

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

TESE

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. e *Piptadenia rigida*
Brenan (Leguminosae); ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM NOVO
DERIVADO DA QUERCETINA**

FRANCISCO EDUARDO ARAGÃO CATUNDA JÚNIOR

Sob a orientação

do Professor

Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Seropédica, RJ

Julho de 2011



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

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. e *Piptadenia rigida*
Brenan (Leguminosae); ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM NOVO
DERIVADO DA QUERCETINA**

FRANCISCO EDUARDO ARAGÃO CATUNDA JÚNIOR

Sob a Orientação do Professor **Dr. Mário Geraldo de Carvalho**

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

Seropédica, RJ
Julho de 2011

547

C369c

T

Catunda Júnior, Francisco Eduardo
Aragão, 1978-

Contribuição ao conhecimento
químico e atividade biológica de
Piptadenia gonoacantha J.F. Macbr. e
Piptadenia rígida Brenan
(Leguminosae); atividade antifúngica
de um novo derivado da quercetina /
Francisco Eduardo Aragão Catunda
Júnior - 2011.

172 f. : il.

Orientador: Mário Geraldo de
Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 159-172.

1. Química orgânica - Teses. 2.
Piptadenia - Análise - Teses. 3.
Quercetina - Teses. 4. Plantas -
Efeito dos fungicidas - Teses. I.
Carvalho, Mário Geraldo de, 1952-.
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

Bibliotecário: _____ Data: ____/____/____

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

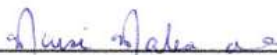
FRANCISCO EDUARDO ARAGÃO CATUNDA JÚNIOR

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

TESE APROVADA EM 27/07/2011



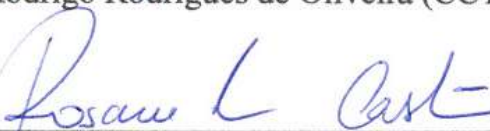
Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DQUIM-ICE-UFRuralRJ)
(Orientador e Presidente)



Dra. Marise Maleck de Oliveira Cabral (D^{pto} de Ciênc. Biol., USS)



Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (CCT-LCQUI-UENF)



Dra. Rosane Nora Castro (DQUIM-ICE-UFRuralRJ)



Dr. Marco Edílson Freire de Lima (DQUIM-ICE-UFRuralRJ)

À minha mãe Benedita Lenira Aragão e minha irmã Lorena Aragão Tabosa, em especial à minha mãe pelo amor, apoio e incentivo necessário para enfrentar este desafio tão distante de casa.

*À minha avó Elizete Prado Aragão (In Memoriam), por em vida ter incentivado e contribuído para meu desenvolvimento.
Dedico e ofereço.*

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza e encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isto é ter tido sucesso.

“Ralph Waldo Emerson”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação racional e criteriosa, porém compreensiva e paciente, e os ensinamentos necessários à realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Raimundo Braz Filho pelas múltiplas contribuições, pelo exemplo de integridade e sabedoria, pelo prazer do convívio no laboratório e as boas conversas no café da tarde.

Aos professores do curso de pós-graduação em Química (ICE-UFRuralRJ) pela contribuição que deram à minha formação acadêmica.

Ao Prof^o Dr. Acácio Geraldo de Carvalho pela coleta as espécies *Piptadenia rigida* e *Piptadenia gonoacantha* para o estudo.

A Prof^a Dra. Marisa Fernandes Mendes (PPGEQ-UFRRJ) juntamente com seus alunos, Bruna dos Santos Moura e Pedro Henrique Pereira de Carvalho, pelo auxílio na extração por fluido supercrítico.

Ao programa CAFPA-BA 003/08 da CAPES que permitiu com que eu e outro aluno de doutorado, Marcelo Francisco de Araújo, realizássemos alguns trabalhos no Departamento de Química da Universidade Nacional do Rio Cuarto – UNRC, em Rio Cuarto, Cordoba, Argentina, sob a orientação dos Profs Drs Héctor Fernandez e Edgardo N. Durantini.

Ao Prof^o Dr. Edgardo N. Durantini (DQ-UNRC-Argentina) e seus alunos pelo auxílio nos experimentos realizados e à Dra. Maria Gabriela Alvarez pela realização dos testes de atividade antifúngica.

A Prof^a Dra. Lucila Barberis (DMI-UNRC-Argentina) e sua equipe pelo auxílio nos testes de atividade antibacteriana.

Ao Prof^o Dr. Edilberto Rocha Silveira do CENAUREM, Curso de Pós-graduação em Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pela obtenção dos espectros de RMN a 500 MHz.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste – LEMANOR da Universidade Federal do Ceará, pelas análises de CL-EM-IES.

Aos técnicos do ICE-UFRRJ, Frances, Eli, Carlão, Fábio, Maurício, Aldir, Vitor, Renato e Osmar pelo auxílio prestado.

Aos alunos de iniciação científica que me acompanharam durante a realização deste trabalho, Daniel Luiz Reis Simas e Débora Oliveira.

Aos colegas de laboratório, cujo incentivo e colaborações me ajudaram bastante, Luciano, Luiz Roberto (Pilha), Mário Sérgio, Virginia, Marli, Maritza, Marcelo, Tereza, Roberta, Queli, Renata, Geovany e Almir, bem como pelos momentos alegres e descontraídos no laboratório.

Em especial ao amigo Marcelo Francisco de Araújo, pelo apoio e incentivo nos trabalhos, parceria nas viagens de congressos e na estadia em Rio Cuarto-Argentina, nos quais passamos momentos felizes e de estresses, que ajudou a solidificar cada vez mais nossa amizade.

Ao amigo Ildomar Alves do Nascimento que me apresentou a UFRRJ.

Aos demais colegas de pós-graduação em Química, Vinicius, Daniel, Letícia, Geraldo, André Vinicius, Andréa Janaína, Rodney, Camila, Kenia, Ana Paula, Adriano, Ari, Andrea Rosane, Bauer, Regina, dentre outros, pelo prazer da convivência.

Aos amigos de Alojamento de Pós-graduação da UFRRJ: Henrique Trevisan, Marcus Sandes, Joaquim Neto, Claudio Eduardo (Gabeira), Juan Ruano, Felipe, Tiago, Júlio Aguiar, Samuel de Deus, Clitor Júnior, Leandro Galzerano, Leandro Ramos, Gideão Galvão, Fábio Edir, Marcus Sá, Hermes, Gabriel, Janio, Juliano, dentre outros, pela amizade e o agradável convívio no dia-a-dia.

À minha namorada Queli Cristina Fidelis pelo auxílio nos experimentos, paciência e incentivo principalmente nos momentos finais deste trabalho.

Desde já a banca examinadora pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

À UFRRJ pela oportunidade e tão agradável acolhimento.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos do nosso grupo de pesquisa.

Aos meus familiares pelo apoio e confiança depositada.

A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.

E principalmente ao Grande Arquiteto do Universo, por ter concedido a realização dos projetos que tenho planejado para minha vida.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL.....	I
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Generalidades sobre a família Leguminosae	1
I.2. Gênero <i>Piptadenia</i>	3
I.3. Histórico	4
I.4. Composição química do gênero <i>Piptadenia</i>	5
I.5. Atividade Biológica	13
I.6. Informações etnofarmacológicas	17
II. OBJETIVOS.....	17
III. PARTE EXPERIMENTAL GERAL	18
III.1. Equipamentos e reagentes	18
III.2. Derivatizações	20
III.2.1. Acetilação com anidrido acético e piridina	20
III.2.2. Síntese do novo derivado da quercetina.....	20
IV. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PIPTADENIA GONOACANTHA	21
IV.1. Generalidades da espécie <i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J. F. Macbr.....	21
IV.2. Substâncias isoladas em <i>Piptadenia gonoacantha</i>	23
IV.3. Parte experimental.....	23
IV.3.1. Material vegetal.....	23
IV.3.2. Isolamento de metabólitos especiais de cascas do caule de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	24
IV.3.3. Isolamento de metabólitos especiais da raiz de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	25
V. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PIPTADENIA RIGIDA	27
V.1. Generalidades da espécie <i>Piptadenia rigida</i> (Benth) Brenan.....	27
V.2. Substâncias isoladas de <i>Piptadenia rigida</i>	30
V.3.1. Material vegetal	30
V.3.2. Isolamento de metabólitos especiais isolados de folhas de <i>Piptadenia rigida</i>	31
V.3.3. Identificação de metabólitos especiais em sementes de <i>Piptadenia rigida</i>	32
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
VI.1. Determinação estrutural dos constituintes isolados de cascas do caule de <i>P. gonoacantha</i>	34
VI.1.1. Identificação das substâncias 1, 2 e 3	34
VI.1.2. Identificação da substância 4.....	38
VI.1.3. Identificação da substância 5	40

VI.1.4. Identificação das substâncias 6, 7 e 8	42
VI.1.5. Identificação da substância 9	44
VI.1.6. Identificação da substância 10	48
IV.1.7. Identificação do derivado 10a.....	50
VI.2. Determinação estrutural dos constituintes isolados da raiz de <i>P. gonoacantha</i>	51
VI.2.1. Identificação das substâncias 10 e 11.	52
VI.2.2. Identificação das substâncias 12, 13 e 14.	53
VI.2.3. Identificação dos Ésteres metílicos (1) e (2).	64
VI.3. Determinação estrutural dos constituintes isolados das folhas de <i>P. rigida</i>	70
VI.3.1. Identificação das substâncias 15 e 16.	70
VI.3.2. Identificação da substância 17	74
VI.3.2. Identificação da substância 18.....	76
VI.4. Identificação de metabólitos em sementes de <i>P. rigida</i>	80
VI.4.1. Identificação das substâncias Triacilglicerol e ácidos graxos.	80
VI.4.2. Identificação das substâncias Bufotenina e Pinitol.	85
VI.4.3. Identificação do derivado acetilado do Pinitol.....	88
VII. IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES EM ÓLEO DE FOLHAS DE PIPTADENIA GONOACANTHA E PIPTADENIA RIGIDA EXTRAÍDOS COM CO₂ SUPERCRÍTICO E HIDRODESTILAÇÃO	91
VII.1. INTRODUÇÃO	91
VII.1.1. Histórico da utilização da extração supercrítica (ESC)	92
VII.1.2. Fluido Supercrítico.....	93
VII.1.3. Extração supercrítica.....	94
VII.1.6. Extração de óleos vegetais – Vantagens e Desvantagens	96
VII.1.7. Óleos essenciais	97
VII.1.8. Óleos fixos	98
VII.2. MATERIAIS E MÉTODOS	98
VII.2.1. Material seco e preparação da amostra.....	98
VII.2.2. Métodos de extração	99
VII.2.2.1. Extração usando fluido supercrítico	99
VII.2.2.2. Hidrodestilação	100
VII.2.3. Métodos de análise.....	101
VII.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	101
VII.3.1. Extração de óleo essencial com fluido supercrítico	101
VII.3.1. Composição química dos óleos obtidos por ESC e hidrodestilação	106

VIII. AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE PIPTADENIA RIGIDA E PIPTADENIA GONOACANTHA.....	139
VIII.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	139
VIII.1.1. Introdução.....	139
VIII.1.2. Material e Métodos.....	139
VIII.1.3. Resultados	140
VIII.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS E TANINOS	141
VIII.2.1. Introdução.....	141
VIII.2.2. Material e Métodos.....	142
VIII.2.2.1. Determinação de fenóis totais.....	142
VIII.2.2.2. Preparo do reagente de Folin-Denis.....	143
VIII.2.2.3. Preparo da curva analítica do ácido gálico.....	143
VIII.2.2.4. Determinação de taninos por precipitação com caseína.....	143
VIII.2.3. Resultados	144
VIII.2.3.1. Determinação do teor de fenóis totais.....	144
VIII.2.3.2. Determinação do teor de taninos.....	145
IX. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM NOVO DERIVADO DA QUERCETINA CONTENDO UM GRUPO 3'-DINITRO-FENIL-TRIFLUOROMETILA (QUERCETINA-DNF-CF₃) SOBRE CANDIDA ALBICANS.....	147
IX.1. INTRODUÇÃO.....	147
IX.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	149
IX.2.1. Geral.....	149
IX.2.2. Síntese de derivados da rutina (quercetina-DNF-CF ₃).....	149
IX.2.3. Medidas de coeficiente de partição.....	150
IX.2.4. Microorganismos e condições de crescimento.....	150
IX.2.5. Atividade antifúngica	151
IX.2.6. Efeito sobre o crescimento de <i>C. albicans</i>	151
IX.2.7. Análises estatísticas	151
IX.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	152
IX.3.1. Síntese.....	152
IX.3.2. Estudos de absorção UV-visível e propriedades lipofílicas	153
IX.3.3. Atividade antimicrobiana de rutina e quercetina-DNF-CF ₃ sobre <i>C. albicans</i>	154
X. CONCLUSÕES	157
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
XII. ANEXOS.....	173

ÍNDICE DE ESQUEMA

Esquema 1. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos de cascas do caule de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	25
Esquema 2. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos da raiz de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	27
Esquema 3. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos das folhas de <i>Piptadenia rigida</i>	32
Esquema 4. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos das folhas de <i>Piptadenia rigida</i>	33
Esquema 5. Proposta de fragmentação da mistura 1 + 2 + 3 para justificar os principais picos detectados no EM.	38
Esquema 6. Proposta de fragmentação da substância 18 para justificar os principais picos detectados no EM.	79
Esquema 7. Proposta de fragmentação derivado acetilado do pinitol para justificar os principais picos detectados no EM.	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabólitos especiais isolados de espécies do gênero <i>Piptadenia</i>	9
Figura 2. Aspecto geral da espécie vegetal <i>Piptadenia gonoacantha</i> . (LORENZI, 2002)	22
Figura 3. Aspecto geral da espécie vegetal <i>Piptadenia rigida</i> (LORENZI, 2002)	29
Figura 4. Estruturas dos constituintes isolados de cascas do caule de <i>P. gonoacantha</i>	34
Figura 5. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da mistura de 1, 2 e 3	36
Figura 6. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da mistura de 1, 2 e 3	36
Figura 7. Expansão do espectro de RMN ¹³ C da mistura 1, 2 e 3 de 10 a 55 ppm	36
Figura 8. Cromatograma (CG) da mistura de cicloartanos.....	37
Figura 9. Espectros de massas das substâncias 1 e 2	37
Figura 10. Espectros de massas da substância 3	37
Figura 11. Espectro no infravermelho das substâncias 1, 2 e 3	38
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 4	39
Figura 13. Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 4 de 0,5 a 2,5 ppm.....	40
Figura 14. Espectro no infravermelho da substância 4	40
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5	41
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 5	41
Figura 17. Espectro no infravermelho da substância 5	42
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da mistura de 6, 7 e 8	43
Figura 19. Cromatograma (CG) da mistura de esteróides	43
Figura 20. Espectros de massas da substância 6	43
Figura 21. Espectros de massas da substância 7	44
Figura 22. Espectros de massas da substância 8	44
Figura 23. Espectro no infravermelho das substâncias 6, 7 e 8	44
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 9	47
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 9	47
Figura 26. Espectro no infravermelho da substância 9	47
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 10	49

Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 10	49
Figura 29. Espectro no infravermelho da substância 10	49
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do derivado 10a	50
Figura 31. Espectro no infravermelho do derivado 10a	51
Figura 32. Estruturas dos constituintes isolados da raiz de <i>P. gonoacantha</i>	51
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da mistura de 10 e 11	52
Figura 34. Cromatograma (CG) da mistura de triterpenos	53
Figura 35. Espectros de massas da substância 10 e comparação com a biblioteca NIST 08 ..	53
Figura 36. Espectros de massas da substância 11 e comparação com a biblioteca NIST 08 ..	53
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	56
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ¹ H da mistura 12, 13 e 14 de 5,7 a 8,7 ppm	56
Figura 39. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	57
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ¹³ C da mistura 12, 13 e 14 de 96,2 a 138,4 ppm .	57
Figura 41. Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135 (125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	58
Figura 42. Espectro de ¹ H x ¹ H-COSY (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	59
Figura 43. Expansões do espectro de RMN-2D HSQC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	60
Figura 44. Expansões do espectro de RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 12, 13 e 14	61
Figura 45. Cromatograma (CL-EM) da mistura de isoflavonas.....	62
Figura 46. Espectro de massas da substância 12 em modo positivo (a) e negativo (b).....	62
Figura 47. Espectro de massas da substância 13 em modo positivo (a) e negativo (b).....	63
Figura 48. Espectro de massas da substância 14 em modo positivo (a) e negativo (b).....	63
Figura 49. Massa de alguns fragmentos da mistura 12 + 13 + 14 , para justificar os principais picos detectados no EM.....	64
Figura 50. Cromatograma de PGRMD 1-4 (4) / E.m. (1)	66
Figura 51. Cromatograma de PGRMD 10-14 (1) / E.m. (2)	66
Figura 52. Espectro de massas do hexadecanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.	67
Figura 53. Espectro de massas do 10-heptadecenoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.....	67
Figura 54. Espectro de massas do 9-octadecenoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.	68
Figura 55. Espectro de massas do tetracosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.	68
Figura 56. Espectro de massas do pentacosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.	69
Figura 57. Espectro de massas do hexacosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.	69
Figura 58. Estruturas dos constituintes isolados das folhas de <i>P. rigida</i>	70
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 e 16	72
Figura 60. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 e 16	72
Figura 61. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 e 16	72
Figura 62. Cromatograma (CG) e espectro de massas da mistura 15 e 16	73
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 17	75
Figura 64. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 17	75
Figura 65. Expansão de espectro de RMN ¹³ C da substância 17 de 15 a 42 ppm.....	75
Figura 66. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, CDCl ₃) da substância 17	76
Figura 67. Espectro de massas da substância 17 e comparação com o padrão da biblioteca..	76

Figura 68. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 18	77
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 18 de 1,0 a 2,6 ppm.....	78
Figura 70. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 18	78
Figura 71. Espectro de massas da substância 18	79
Figura 72. Estruturas dos constituintes identificados das sementes de <i>P. rigida</i>	80
Figura 73. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do extrato PRSH	81
Figura 74. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do extrato PRSH	81
Figura 75. Espectro de massas do ácido hexadecanóico e comparação com o padrão da biblioteca.	82
Figura 76. Espectro de massas do ácido 9-octadecenóico e comparação com o padrão da biblioteca.	82
Figura 77. Espectro de massas do ácido octadecanóico e comparação com o padrão da biblioteca.	83
Figura 78. Espectro de massas do ácido nonadecatrienóico (C ₁₉ H ₃₂ O ₂).....	83
Figura 79. Espectro de massas do ácido eicosanóico e comparação com o padrão da biblioteca.	84
Figura 80. Espectro de massas do ácido docosanóico (C ₂₂ H ₄₄ O ₂).	84
Figura 81. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) do extrato PR SMB	86
Figura 82. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) do extrato PR SMB	87
Figura 83. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, DMSO-d ₆) do extrato PR SMB	87
Figura 84. Cromatograma (CG) do extrato PR SMB	87
Figura 85. Espectro de massas do Pinitol (Tr: 12,592 min.) identificada no extrato PR SMB	88
Figura 86. Espectro de massas da Bufotenina (Tr: 16,942 min.) e comparação com o padrão da biblioteca, identificada no extrato PR SMB	88
Figura 87. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do extrato PR SMB acetilado.	89
Figura 88. Espectro de massas do derivado acetilado do pinitol.....	89
Figura 89. Diagrama de fases mostrando a região do fluido supercrítico para o dióxido de carbono.	94
Figura 90. Planta experimental de ESC com componentes básicos, onde A – cilindro de CO ₂ , B – bomba de alta pressão, C – banho de aquecimento, D – extrator, E – válvula micrométrica, F – refinado, G – rotâmetro.....	95
Figura 91. Sistema de hidrodestilação utilizando Clevenger.	96
Figura 92. Unidade experimental de extração com fluido supercrítico presente no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ)	100
Figura 93. Curva de extração do óleo de <i>P. rigida</i> , a 40 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	103
Figura 94. Curva de extração do óleo de <i>P. rigida</i> , a 60 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	103
Figura 95. Curva de extração do óleo de <i>P. rigida</i> , a 80 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	104
Figura 96. Curva de extração do óleo de <i>P. gonoacantha</i> , a 40 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	104
Figura 97. Curva de extração do óleo de <i>P. gonoacantha</i> , a 60°C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	105
Figura 98. Curva de extração do óleo de <i>P. gonoacantha</i> , a 80 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.	105
Figura 99. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do extrato de <i>piptadenia rigida</i> (1A, 40°C / 100 bar)	108

Figura 100. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do extrato de <i>piptadenia gonoacantha</i> (2B, 60°C / 150 bar)	108
Figura 101. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (40 °C/100 BAR) (1A)	109
Figura 102. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (40 °C/150 BAR) (1B)	109
Figura 103. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (40 °C/200 BAR) (1C)	109
Figura 104. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (60 °C/100 BAR) (2A)	110
Figura 105. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (60 °C/150 BAR) (2B)	110
Figura 106. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (60 °C/200 BAR) (2C)	110
Figura 107. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (80°C/100 BAR) (3A)	111
Figura 108. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (80°C/150 BAR) (3B)	111
Figura 109. Cromatograma / EFS / <i>P. rigida</i> (80°C/200 BAR) (3C)	111
Figura 110. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (40 °C/100 BAR) (1A)	112
Figura 111. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (40 °C/150 BAR) (1B)	112
Figura 112. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (40 °C/200 BAR) (1C)	112
Figura 113. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (60 °C/100 BAR) (2A)	113
Figura 114. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (60 °C/150 BAR) (2B)	113
Figura 115. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (60 °C/200 BAR) (2C)	113
Figura 116. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (80 °C/100 BAR) (3A)	114
Figura 117. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (80 °C/150 BAR) (3B)	114
Figura 118. Cromatograma / EFS / <i>P. gonoacantha</i> (80 °C/200 BAR) (3C)	114
Figura 119. Cromatograma / Hidrodestilação / <i>P. rigida</i>	119
Figura 120. Cromatograma / Hidrodestilação / <i>P. gonoacantha</i>	119
Figura 121. Espectro de massas do ácido gerânico (Tr: 7,136 min.) e comparação com padrão da biblioteca	122
Figura 122. Espectro de massas do 7-Metoxi - 2,2,4,8-tetrametiltriciclo [5.3.1.0(4,11)] undecano (Tr: 8,534 min.) e comparação com padrão da biblioteca	122
Figura 123. Espectro de massas do 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (Tr: 9,155 min.) e comparação com padrão da biblioteca	123
Figura 124. Espectro de massas do 4,6-Dimetil-dodecano (Tr: 11,447 min.) e comparação com padrão da biblioteca	123
Figura 125. Espectro de massas do n-Octadecano (Tr: 12,579 min.) e comparação com padrão da biblioteca	124
Figura 126. Espectro de massas do n-butil-Benzenosulfonamida (Tr: 12,656 min.) e comparação com padrão da biblioteca	124
Figura 127. Espectro de massas do derivado da n-butil-Benzenosulfonamida (Tr: 12,964 min.)	125
Figura 128. Espectro de massas do Ácido hexadecanóico (Tr: 14,441 min.) e comparação com padrão da biblioteca	125
Figura 129. Espectro de massas do Ácido n-Octadecanóico (Tr: 16,348 min.) e comparação com padrão da biblioteca	126
Figura 130. Espectro de massas do Fitol (Tr: 15,872 min.) e comparação com padrão da biblioteca	126
Figura 131. Espectro de massas do Ácido linolênico (Tr: 16,198 min.) e comparação com padrão da biblioteca	127
Figura 132. Espectro de massas do n-Eicosano (16,660 min.) e comparação com padrão da biblioteca	127
Figura 133. Espectro de massas do Hexadionato de bis(2-etil-hexila) (Tr: 18,382 min.) e comparação com padrão da biblioteca	128
Figura 134. Espectro de massas do Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila (Tr: 19,564 min.) e comparação com padrão da biblioteca	128

Figura 135. Espectro de massas do N-(2-Etóxi-fenil)-N'-(1-fenil-etil)-oxalamida (Tr: 20,657 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	129
Figura 136. Espectro de massas do n-Tetracosano (Tr: 20,948 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	129
Figura 137. Espectro de massas do Octadecanoato de 2,3-dihidroxiopropila (Tr: 21,329 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	130
Figura 138. Espectro de massas do Esqualeno (Tr: 22,132 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	130
Figura 139. Espectro de massas do Nonacosano (Tr: 23,026 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	131
Figura 140. Espectro de massas do 2,6-Di-tert-butil-4-[(2-octadeciloxicarbonil)etil]-fenol (Tr: 24,739 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	131
Figura 141. Espectro de massas do n-Dotriacontano (Tr: 25,844 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	132
Figura 142. Espectro de massas do 1,30 Triacontanediol (Tr: 28,899 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	132
Figura 143. Espectro de massas do Heptacosanol (Tr: 30,513 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	133
Figura 144. Espectro de massas da 4,22-Stigmastadieno-3-ona (Tr: 33,152 min.) e comparação com padrão da biblioteca.	133
Figura 145. Espectro de massas da Sitostenona (Tr: 35,249.) e comparação com padrão da biblioteca.	134
Figura 146. Espectro de massas da Friedelina (Tr: 38,745.) e comparação com padrão da biblioteca.	134
Figura 147. Espectro de massas do 4-tert-Butylcalix[4]areno (Tr: 39,378.) e comparação com padrão da biblioteca.	135
Figura 148. Constituintes majoritários do óleo das folhas de <i>P. rigida</i> extraído por fluido supercrítico (ESC)	136
Figura 149. Constituintes majoritários do óleo das folhas de <i>P. gonoacantha</i> extraído por fluido supercrítico (ESC)	137
Figura 150. Constituintes majoritários do óleo das folhas de <i>P. rigida</i> extraído por hidrodestilação.	137
Figura 151. Constituintes majoritários do óleo das folhas de <i>P. gonoacantha</i> extraído por hidrodestilação.	138
Figura 152. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorvâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010).	145
Figura 153. Síntese do derivado quercetina-DNF-CF ₃	149
Figura 154. Estrutura do derivado quercetina-CF ₃	153
Figura 155. Espectro de absorção de quercetina-DNF-CF ₃ (linha sólida) e rutina (linha pontilhada) em metanol.	154
Figura 156. Curva de decaimento do crescimento de células de <i>C. albicans</i> incubadas com diferentes concentrações de rutina [(∇) 1.9 mg/mL, (□) 2.2 mg/mL, (△) 2.5 mg/mL] e quercetina-CF ₃ [(▼) 0.5 mg/mL, (■) 0.6 mg/mL and (▲) 0.7 mg/mL] em caldo Sabouraud a 37 °C. Controle de culturas: células sem adição de flavonóides (○). Valores representados média±desvio padrão de três experimentos em separado.	156

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos dados de RMN ¹³ C da fração 7-10 com dados da literatura (DAVIES <i>et al.</i> , 1992, SILVA <i>et al.</i> , 2005b).....	35
Tabela 2. Dados de RMN ¹ H da substância 4, comparados com dados da literatura para friedelina (VELANDIA, 2002).....	39
Tabela 3. Comparação dos dados de RMN ¹³ C das substâncias 9 e 10 com valores da literatura (GALEGOS & ROQUE, 1990; SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991).....	46
Tabela 4. Dados de RMN (δ , DMSO-d ₆) ¹ H (500 MHz) ¹³ C (125 MHz) da mistura de isoflavonas 12, 13 e 14.	55
Tabela 5. Identificação dos Ésteres metílicos (1) e (2) por comparação com dados da biblioteca Nist08 do aparelho CG-EM	65
Tabela 6. Comparação dos dados de RMN ¹³ C das substâncias 15 e 16 com valores da literatura (FEITOSA <i>et al.</i> , 2007).....	71
Tabela 7. Comparação dos dados de RMN ¹³ C da substância 17 com dados da literatura (GOODMAN <i>et al.</i> , 1973).....	74
Tabela 8. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 18 com dados da literatura (SUNG <i>et al.</i> , 2010).....	77
Tabela 9. Identificação de ácidos graxos presentes no extrato PRSH pela biblioteca Nist08 do aparelho CG-EM.....	81
Tabela 10. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C do extrato PRSMB com dados da literatura (RAMOS, 2008).....	86
Tabela 11. Comparação dos dados de RMN ¹³ C do extrato PRSMB com dados da literatura (BRUTMAIER & VOELTER, 1987).....	86
Tabela 12. Rendimento da extração de óleo de <i>P. rigida</i> com CO ₂ supercrítico	102
Tabela 13. Rendimento da extração do óleo de <i>P. gonoacantha</i> com CO ₂ supercrítico.....	102
Tabela 14. Perfil químico presente no óleo nas folhas <i>Piptadenia rigida</i> por extração por fluido supercrítico.....	115
Tabela 15. Perfil químico presente no óleo nas folhas <i>Piptadenia gonoacantha</i> por extração por fluido supercrítico	117
Tabela 16. Perfil químico presente no óleo nas folhas <i>Piptadenia rigida</i> por extração por hidrodestilação.....	120
Tabela 17. Perfil químico presente no óleo nas folhas <i>Piptadenia gonoacantha</i> por extração por hidrodestilação	121
Tabela 18. Os valores de CIM de frações * dos extratos das raízes de <i>P. gonoacantha</i> contra três linhagens de bactérias.	141
Tabela 19. Resultados obtidos para teor de Fenóis Totais (FT) para as amostras de frações, através do reagente de Folin-Denis.	145
Tabela 20. Resultados obtidos para teor de fenóis na Solução Não Tanante (SNT) para as amostras de frações precipitadas em 1g de caseína, através do reagente de Folin-Denis.....	146
Tabela 21. Resultados obtidos para teor de taninos com base na equação [T] = [FT] – [SNT].	147
Tabela 22. Características de absorção no UV-visível em metanol e 1-octanol/água coeficientes de partição (P) de rutina e quercetina-CF ₃	154
Tabela 23. Atividade antifúngica dos flavonóides sobre <i>C. albicans</i>	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D	bidimensional
δ	deslocamento químico (ppm)
λ	comprimento de onda
ν	estiramento
ρ	coeficiente de partição
AcOEt	acetato de etila
BuOH	butanol
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM-IES	cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas com fonte de ionização de elétron-spray
COSY	C orrelation S pectroscopy
<i>d</i>	dubleto
D ₃ CCOCD ₃	acetona deuterada
D ₃ COD	metanol deuterado
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectrometria de massas
HBBD(BBD)	H ydrogen B and B road D ecoupled
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HSQC	H eteronuclear S ingle- Q uantum C oherence
Hz	hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
M ⁺	íon molecular
MeOH	metanol
p.f.	ponto de fusão
P _C	pressão crítica
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de proton
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
T _C	temperatura crítica
TMS	tetrametilsilano
Tr	tempo de retenção

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

CATUNDA JÚNIOR, Francisco Eduardo Aragão. **Contribuição ao conhecimento químico e atividade biológica de *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. e *Piptadenia rigida* Brenan (Leguminosae); atividade antifúngica de um novo derivado da quercetina.** 2011. 179p. Tese (Doutorado em Química, Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ, 2011.

RESUMO

O fracionamento cromatográfico dos extratos de casca e raiz de *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr., de folhas e sementes de *Piptadenia rigida* Brenan (Leguminosae) e análise das frações através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas conduziu ao isolamento e a identificação de constituintes de diferentes classes de metabólitos. Da casca do caule de *P. gonoacantha* foram isolados cicloartenona, cicloartan-25-26-en-3-ona, 24-metilenocicloartanona, friedelina, 24-metilenocicloartanol, campesterol, sitosterol, estigmasterol, lupeona, lupeol; de raiz desta planta foram isolados cicloartenol, lupeol, campesterol, sitosterol, estigmasterol, uma mistura de isoflavonas, 7-hidroxi-5,8-dimetoxi-isoflavona, 7-hidroxi-3',4'-metilenodioxi-isoflavona e 7-hidroxi-5,8,4'-trimetoxi-isoflavona, além de duas frações ricas em ésteres metílicos. Dos extratos de folhas de *P. rigida* foram isolados dois poliprenóides, (6E,10E,14E,18E,22E)-2,6,10,14,18,22-hexametiltetracos-2,6,10,14,18,22-hexeno e (2E,6E,10E,14E,18E)-3,7,11,15,19,23-hexametiltetracos-2,6,10,14,18,22-hexen-1-ol, fitol e o monoterpene loliolídeo; de sementes de *P. rigida* foram identificados um triacilglicerol, uma mistura de ácidos graxos, além do alcalóide indólico bufotenina e o carboidrato pinitol. As estruturas foram determinadas através da análise de dados fornecidos por espectrometria na região do infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (técnicas 1D e 2D), de massas incluindo CG-EM e CL-EM-ESI das substâncias naturais.

Além da extração de óleos de folhas de *P. rigida* e *P. gonoacantha* usando hidrodestilação, utilizou-se fluido supercrítico com CO_2 como solvente. Foram testadas diferentes condições operacionais, variando-se principalmente a temperatura (40 a 80 °C) e a pressão (100 a 200 bar), de modo a buscar os melhores resultados em termos de rendimento e composição do óleo extraído. Os melhores rendimentos na extração de óleo de folhas destas plantas foram de 0,73% a 60 °C e 200 bar, e 1,31% a 80 °C e 200 bar, respectivamente. A análise dos tempos de retenção, espectros de massas e análise do espectro de RMN ^1H permitiu identificar a presença de vários constituintes; tendo como constituintes majoritários presentes no óleo de *P. rigida* N-butilbenzeno-sulfonamida (em diferentes condições de extração) e seu derivado, além dos esteróides sitostenona, sitosterol, estigmasterol, 4,22-estigmastadien-3-ona, dos triterpenos lupeol, friedelliana, dentre outros. Já no óleo de *P. gonoacantha* o principal constituinte foi N-butilbenzeno-sulfonamida (a 40° e 100 bar), apesar da semelhança do espectro de RMN ^1H , os esteróides e triterpenos foram extraídos em diferentes condições.

Realizaram-se análise de teor de fenóis totais e taninos além de propriedades biológicas como antibacteriana e antifúngica de extratos de *P. rigida* e *P. gonoacantha*. Desta análise verificou-se que *Staphylococcus aureus* foi mais sensível ao extrato PGRMA (fração em acetato do extrato metanólico de raízes de *P. gonoacantha*) rica em fenóis totais e taninos.

Como atividade adicional, preparou-se um novo derivado da quercetina tendo um grupo fenil-2,6-dinitro-4-trifluorometila usando a rutina como material de partida. Os resultados da atividade antifúngica deste derivado contra *C. albicans* foram bastante significativos.

Palavras-chave: *Piptadenia rigida*, *P. gonoacantha*, constituintes químicos, óleo das folhas, *C. albicans*, N-butil-benzeno-sulfonamida, Leguminosae.

CATUNDA JÚNIOR, Francisco Eduardo Aragão. **Contribution to chemical and biological activities acknowledgment of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. and *Piptadenia rigida* Brenan (Leguminosae); antifungal activity of new quercetin derivates.** 2011. 179p. Tesis (Doctor in chemistry), Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ, Brasil, 2011.

ABSTRACT

The chromatographic fractionation of bark and roots extracts of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr., and from the leaves and seeds of *Piptadenia rigida* Brenan (Leguminosae) besides the fractions analysis by chromatographic and spectroscopic techniques allowed to the isolation and identification of many constituents belonging to different metabolite classes. From the bark of *P. gonoacantha* cicloartenone, cicloartan-25-26-en-3-one, 24-metilenecicloartanone, friedelin, 24-metilenecicloartanol, campesterol, sitosterol, estigmasterol, lupeone, and lupeol were isolated; from the roots of this plant the cicloartenol, lupeol, campesterol, sitosterol, stigmasterol, a mixture of isoflavones, 7-hydroxy-5,8-dimethoxy-isoflavone, 7-hydroxy-3',4'-metilenedioxy-isoflavone and 7-hydroxy-5,8,4'-trimethoxy-isoflavone were identified, besides two fractions rich in methyl esters. From the leaves extracts of *P. rigida* two poliprenoids, (6E,10E,14E,18E,22E)-2,6,10,14,18,22-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexene and (2E,6E,10E,14E,18E)-3,7,11,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexen-1-ol, phytol, and the monoterpene known as loliolid; from the seeds of *P. rigida* a triacilglicerol, a mixture of fat acids, besides the indolic alkaloid bufotenine and carbohydrate pinitol. The structures were proposed on the bases of IR, ¹H and ¹³C NMR, GC-MS and LC-MS spectrometric analysis and comparison with literature data.

Besides the extraction of oils from the leaves of *P. rigida* e *P. gonoacantha* by hidrodestillation, and supercritical fluid with CO₂ as solvent were used. Different operational conditions were tested, varying the temperature (40, 60 and 80 °C) and pressure (100, 150 and 200 bar), to find the best yields in the extracted oil composition. The best rendement in this extraction were 0,73% at 60 °C/200 bar, and 1,31% at 80 °C/200 bar, respectively, for the both plants, *P. rigida* and *P. gonoacantha*. The retention time, mass and ¹H NMR spectra analysis, allowed to identify various constituents. The principal constituents in the *P. rigida* oil were N-butyl-benzo-sulfonamida (at different extraction conditions) its derivatives, besides some steroids such as sitostenone, sitosterol, estigmasterol, 4,22-estigmastadien-3-one, the triterpenes lupeol, friedelin, together other ones. In the *P. gonoacantha* oil, the principal constituent was N-butyl-benzo-sulfonamida (at 40°/100 bar), despite the similarity between the ¹H NMR of the both plant oils the steroids and triterpenes were extracted in different conditions.

The total phenols and tannins, besides biological activities such as antibacterial and antifungal activities of the *P. rigida* and *P. gonoacantha* extracts were evaluated. In these analysis was observed that *Staphylococcus aureus* was more sensible to the PGRMA (Ethyl acetate Fraction from the methanolic extract from the roots of *P. gonoacantha*), that is rich in total phenols and tannins.

As an additional activity, a new quercetin derivative with phenil-2,6-dinitro,4-trifluormetil was prepared using the rutin as starting reagent material. The antifungal activity against *C. albicans* was more significant.

Key words: *Piptadenia rigida*, *P. gonoacantha*, chemical constituents, leaves oil, *C. albicans*, N-butyl-benzo-sulfonamida, Leguminosae.

I. INTRODUÇÃO

O estudo de plantas tem se tornado cada vez mais comum para diversas áreas do conhecimento devido a sua ampla utilização que compreende a alimentação, produtos medicinais e outras aplicações industriais (SIMÕES et al., 1999). Conhecer a composição química das plantas permite fazer aplicações mais seguras de suas potencialidades químicas e biológicas.

Dentre os diversos usos que as plantas possuem, é inegável que o uso medicinal é um dos mais conhecidos e relevantes. Fármacos amplamente utilizados em muitas partes do mundo são de origem natural, ou seja, foram descobertos a partir do estudo de partes de plantas e seus insumos, como por exemplo: o taxol, um antitumoral; a morfina e a codeína, analgésico narcótico; vinbrastina e vincristina, alcaloides antineoplásicos da vinca; colchicina, um anti-inflamatório, além de muitas outras substâncias naturais com eficácia terapêutica confirmada cientificamente (TESKE & TRENTINI, 1995; FILHO & YUNES, 1998; SIMÕES et al., 1999). Também é importante ressaltar que o conhecimento da estrutura molecular de substâncias naturais serve de modelo para o desenvolvimento de substâncias sintéticas com melhor potencial terapêutico que aquelas que lhes serviram de origem (BRAZ-FILHO, 1994).

A química de produtos naturais se dedica a estudar a composição química de organismos vivos, sendo a flora uma das fontes de maior abundância. A química de produtos naturais conta hoje com novos recursos instrumentais e técnicas espectroscópicas que facilitam a identificação, determinação e quantificação de substâncias de origem natural (CECHINEL FILHO, 1995; FILHO & YUNES, 1998). Contudo, a qualificação de recurso humano para tal realização continua sendo indispensável. Considerando a riqueza estrutural das substâncias de origem natural, se faz importante ter conhecimento sobre a quimiotaxonomia, sistemática e botânica (BRAZ-FILHO, 1994). Esse conhecimento faz total diferença no trabalho do pesquisador de produtos naturais que se dedica à elucidação estrutural de moléculas complexas.

No estudo da fitoquímica uma série de informações são unidas para corroborar na identificação dos metabólitos secundários presentes na espécie estudada, uma vez que os metabólitos primários são estudados pela bioquímica. Desta forma, a correta identificação botânica é imprescindível, uma vez que o conhecimento prévio do grupo taxonômico da

família e do gênero, serão ferramentas valiosas para guiar a identificação dos metabólitos (BRAZ-FILHO, 1994).

O isolamento dos metabólitos secundário de plantas pode ser conduzido por metodologias da fitoquímica clássica, das quais a cromatografia está inclusa em uma ou mais etapas, ou métodos mais atuais como por exemplo as extrações usando solventes no estado supercrítico (REVERCHON, 1997). A escolha por uma técnica de extração mais seletiva contribui para o menor tempo de bancada para obtenção dos constituintes de interesse e menor consumo de solventes poluentes, além de outras vantagens que são características de cada técnica.

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundário, apenas os componentes majoritários são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica (FILHO & YUNES, 1998). Muito frequentemente, são esses componentes majoritários, com suas estruturas moleculares corretamente identificadas e com pureza elevada, que costumam ser testados em ensaios biológicos preliminares. No entanto, para uma compreensão mais aprofundada do potencial bioativo da substância é necessário vários ensaios biológicos, *in vitro*, *in vivo*, dentre outros, o que torna o caminho do metabólito secundário até a obtenção de um fármaco longo e oneroso e multidisciplinar (SIMÕES et al., 1999).

Avaliações biológicas de extratos e frações pode ser usado como aliado na busca de substâncias bioativas, uma vez que se prioriza os extratos e frações com melhores resultados frente aos ensaios. Contudo, um estudo que atende ao isolamento de substâncias responsáveis pela ação bioativa do material de partida, deixa de contribuir para o conhecimento mais amplo da química de espécie, conseqüentemente, gênero e família (BRAZ-FILHO, 1994).

Dentro deste contexto estão as atividades desenvolvidas neste trabalho com as quais viemos complementar o estudo químico de espécies vegetais cuja química ainda é pouco conhecida e cujas informações da literatura permite observar que partes das espécies envolvidas, *Piptadenia rigida* e *Piptadenia gonoacantha* (Leguminosae), ainda não foram estudadas.

I.1. Generalidades sobre a família Leguminosae

Em publicações recente o termo Fabaceae aparece como substituto de Leguminosae, e sendo dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, compreendendo cerca de 650 gêneros e 18000 espécies (OLIVEIRA, 1999). Fabaceae é a

segunda maior família de plantas medicinais, contendo mais de 490 espécies de plantas medicinais, a maioria dos quais foram utilizadas como medicamentos tradicionais. Existem 31 espécies de plantas medicinais plantas pertencentes a 20 gêneros da família Fabaceae que foram descritas na farmacopéia chinesa, bem como numerosas espécies que são incluídas na farmacopéia japonesa. Estas espécies possuem importantes propriedades medicinais e têm sido amplamente utilizados como componentes de produtos farmacêuticos. Além disso, materiais vegetais provenientes de cerca de 290 espécies pertencentes a 100 gêneros da família Fabaceae foram relatados para ser tóxicos. A identificação das diferentes espécies de Fabaceae é difícil quando baseada exclusivamente em características morfológicas, além disso, algumas limitações na taxonomia tradicional impedem esta técnica de reunião das espécies devido às exigências complicadas de reconhecimento (GAO *et al.*, 2010).

Espécies pertencentes à família Fabacea (Leguminosae) estão difundidas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta, incluindo as zonas áridas ou semi-áridas; somente poucas espécies estendem-se distintivamente em zonas temperadas (CRONQUIST, 1981; MABBERLEY, 1997). As plantas desta família se apresentam como grandes árvores de matas tropicais, arbustos, ervas anuais ou perenes e trepadeiras (CARDOZO, 2006).

Os gêneros de Mimosoideae relatados no Brasil são *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron* muitos deles de valor medicinal, (BARROSO, 1991; GOMES, 2002). O gênero *Piptadenia* pertence a subfamília Mimosoideae, que apresenta cerca de 64 gêneros e aproximadamente 2.950 espécies, (DI STASI *et al.*, 2002) distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e cáldo-temperadas do globo (CARDOZO, 2006).

I.2. Gênero *Piptadenia*

No gênero *Piptadenia* são descritas aproximadamente oitenta espécies tropicais comumente encontradas na América Sul. No Brasil, as espécies são encontradas em todas as regiões do país, com relatos nos estados de Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (LORENZI, 1992; RIZZINI, 1998). As espécies são popularmente conhecidas como angico, angico branco, angico do campo, angico roxo, angico vermelho, angico bravo, angico preto angico rajado e angico de cerrado. Já na Argentina e Paraguai as espécies são conhecidas como cebil, cebil colorado e cebil ita (CORREA, 1984; RIZZINI, 1998). As principais utilizações das espécies de *Piptadenia* são na obtenção de substâncias tanantes para

a indústria de curtumes, na construção naval e civil devido a madeira dura e pesada, produção de lenha e carvão, além do uso na recuperação ambiental, pois cresce muito bem em solos pobres e degradados (CORREA, 1984; RIZZINI, 1998; CARDOZO, 2006).

Piptadenia é considerado um gênero não homogêneo, e várias tentativas foram feitas no sentido de fragmentá-lo em outros gêneros menores, contudo, não se conseguiu uma discriminação capaz de satisfazer a maioria dos estudiosos. Brenan realizou um cuidadoso e elaborado tratamento com base em informações atribuídas por estudo dendrológico (classificação botânica fundamentada em critérios sistemático, características das folhas, flores, frutos, sementes e tronco) que organizou algumas espécies nos gêneros *Anadenanthera* Speg., *Pityrocarpa* (Benth.) Britt. & Rose. e *Piptadenia* Benth. Estes gêneros são adotados na literatura, porém não se deve esquecer que Brenan se vê forçado a valer-se de caracteres insignificantes, como pilosidade e forma de semente para separar alguns dos gêneros que admite (HARBONE, 1971).

Por outro lado, os botânicos brasileiros têm considerado como *Piptadenia sensu stricto* Brenan. A *P. rigida* foi classificada como pertencente à família Leguminosae-Mimosoideae (CORREA, 1984; LORENZI, 1992) e mais recentemente como Família Fabaceae (MORIM, 2010).

A classificação por subgênero também pode confundir, uma vez que, pode-se encontrar na literatura uma mesma espécie com vários nomes diferentes. *Piptadenia gonoacantha* também é denominada *Acacia gonoacantha* Mart., *Piptadenia communis* Benth. ou *Pityrocarpa gonoacantha* (Mant.) Brenan. Já a *Piptadenia rigida* Benth apresenta outros nomes como *Acacia angico* Mart., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan ou *Piptadenia rigida* Var. *Grandis* Linn.

I.3. Histórico

As espécies de *Piptadenia* tem sido usada muito antes da chegada dos europeus as Américas. Há relatos na literatura do uso de espécies do gênero *Piptadenia* por nativos das ilhas do Caribe desde a época do descobrimento do novo continente, como foi relatado por Ramon Pane da caravana de Colombo. A inalação do derivado narcótico usado pelos nativos em cerimônias para suposta comunicação com o poder invisível. O derivado narcótico era obtido a partir de espécie *Piptadenia peregrina*, a qual é uma fonte dos alcaloides (STROMBERG, 1954).

Os primeiros estudos da composição química deste gênero são fundamentados nos interesses e aplicações industriais (CARDOZO, 2006), uma vez que a madeira era usada para construção civil, naval, produção de lenha e carvão, além da extração de taninos para o curtume. Assim sendo, os taninos foram uns dos primeiros constituintes descritos nas espécies de *Piptadenia*. As espécies *P. cebil* (ZELADA & CONI, 1915), *P. chysostachys* (DEFORGE *et al.*, 1929) e *P. rigida* (PRIMO, 1945) foram estudadas quanto seus conteúdos de taninos para uso industrial. O estudo de *P. cebil* também conduziu a identificação do composto fenólico catecol (ZELADA & CONI, 1915).

Propriedades adesivas de gomas exsudadas de espécies de *Piptadenia* foram estudadas (SCHNEIDER, 1937), e as mesmas apresentaram propriedades antitussígenas confirmando, assim, o uso popular (RANGEL, 1943).

I.4. Composição química do gênero *Piptadenia*

A química da família Leguminosae, também chamada de Fabaceae, é uma das mais ricas do flora mundial. A subfamília Mimosoideae é uma boa representante da família, uma vez que, possui na química de suas espécies várias classes de substâncias, dentre essas flavonoides e alcaloides que são tidos como marcadores taxonômicos da família (HARBONE, 1971; CARDOZO, 2006).

O estudo dos constituintes químicos de espécies do gênero *Piptadenia* teve início na década de 1950, motivado pelo a sua utilização por tribos de índios da América do Sul e Caribe no preparo de rapé contendo sementes de *P. peregrina* e outras plantas (HENKER & HUSTON, 1950; STROMBERG, 1954). O primeiro constituinte químico isolado de uma espécie do gênero *Piptadenia* foi um alcaloide indólico, conhecido como Bufotenina (5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, **I**), o mesmo foi obtido das sementes de *P. peregrina* (STROMBERG, 1954). Os alcaloides indólicos são derivados do triptofano, fato que corrobora a característica da família de ser bioprodutora de alcalóides derivados de fenilalanina, tirosina e triptofano, entre outros (HARBONE, 1971).

A presença de alcaloides nas espécies de *Piptadenia* também conduziu o estudo das propriedades estimulantes de extrato aquoso de *P. peregrina* (RAYMOND-HAMET, 1956), assim como as propriedades psicotrópicas e alucinantes de *P. peregrina* (DELAVEAU, 1960). O derivado narcótico “yopo” obtido da mesma espécie também foi investigado e a detecção de alcalóides no mesmo foi confirmada (D’ALCONTRES & CUZZODREA, 1957).

Posteriormente, vários estudos com espécies de *Piptadenia* foram realizados revelando a presença de alcaloides em outras partes da planta. O estudo das espécies *P. peregrina* e *P. macrocarpa* revelaram a presença de bufotenina (I), óxido de bufotenina (II) e óxido de N,N dimetiltriptamina (III) nas sementes e vagens e N,N dimetiltriptamina (IV) nas vagens (FISH *et al.*, 1955). As cascas de *P. peregrina*, coletada no Brasil, forneceram a N-metiltriptamina (V), 5-metoxi-N-metiltriptamina (VI) e 5-metoxi-N, N-dimetiltriptamina (VII) (LEGLER & TSCHESCHE, 1963). O alcaloide bufotenina (I) também foi encontrado na semente de outras espécies de *Piptadenia*, como a *P. colubrina* Benth (PACHTER *et al.*, 1959) e a *P. falcata* (GIESBRECHT, 1960).

Espécies de *Piptadenia* coletadas na Argentina conduziram ao isolamento de bufotenina (I) e a N,N-dimetiltriptamina (III) das sementes e vagens de *P. macrocarpa*, óxido de bufotenina (II) das sementes e 5-metoxi-N-metiltriptamina (VI) das cascas da mesma espécie. De *P. excelsa* foram identificados bufotenina (I) e óxido de bufotenina (II) nas sementes e vagens, e a N, N-dimetiltriptamina (III) das vagens. Contudo, trabalhos de prospecção química com *P. paraguayensis* (casca, sementes e vagens), *P. rigida* (sementes) e *P. viridiflora* (sementes e vagens misturadas) revelaram teste negativo para alcalóides (IACOBUCCI & RUVEDA, 1964; CARDOZO, 2006). A ausência de alcaloides em sementes também foi observada nas espécies *P. africana* (PARIS *et al.*, 1967) e *P. paniculata* (FISH *et al.*, 1955) através de testes para alcaloides.

Estudo realizado com cinco espécies de *Piptadenia* permitiu determinar a presença de bufotenina (I) as sementes de *P. contorta* e *P. moniliformis* e conduziu ao isolamento do alcaloide teobromina (VIII) presente nas sementes de *P. leprostachya* (YAMASATO *et al.*, 1972). Rendimento de 0,5% de bufotenina foi obtido das sementes de *P. macrocarpa* (RENDON & WILLY, 1985). As sementes dessa espécie podem ser usadas como uma fonte natural de obtenção desse alcaloide.

A presença de outros constituintes químicos, além dos alcaloides (I, II e III), também foram registrados nas nas vagens e cascas de *P. peregrina* como taninos, polifenólicos, catéquicos (PARIS *et al.*, 1967; FELLOWS & BELL, 1971).

O estudo da madeira de *P. macrocarpa* resultou no isolamento de flavonoides, esteroides e triterpenos: dalbergina (IX), kuhlmanina (X), lupeona (XI), lupeol (XII), sitosterol (XIII), β -glicosil-sitosterol (XIV), 3,3'4'8-tetraidroxiflavanona (XV) 3,4-dimetoxidalbergiona (XVI) (MIYAUCHI *et al.*, 1976). Da casca do caule dessa espécie

isolado o fisetinidol-3-O- β -D-xilopiranosídeo (anadantosídeo, **XVII**), um flavonoide considerado o constituinte majoritário nas cascas (PIACENTE *et al.*, 1999).

Esteróides, heterosídeos e taninos foram detectados nas cascas do caule de *P. columbrina* (BULHÕES *et al.*, 1976). O caule dessa espécie é rico em taninos e as cascas de produz um exsudato com característica de goma, do qual foram isolados monossacarídeos e heteropolisacarídeos. O exudato é relatado por apresentar propriedades medicinais, sendo utilizado no tratamento de problemas respiratórios (DELGOBO *et al.*, 1997; *et al.*, 1999).

A espécie *P. rígida*, também conhecida como *Parapiptadenia rigida*, forneceu a 7,8,3',4' tetraidroxiflavanona (**XVIII**, ALVES *et al.*, 2003). Outros constituintes químicos de maior polaridade, dessa mesma espécie, foram posteriormente isolados do extrato etanólico de como as proantocianidinas: 4',3''-di-O-metilapocynin-B (**XIX**), 4',3''-metilapocynina-D (**XX**), epigalocatequin-3-O-ferulato (**XXI**), 4'-O-metilepigalocatequin-3-O-ferulato (**XXII**), 4'-O-metilepigalocatequin-3-O-galato (**XXIII**), 4'-O-metilepicatequin-3-O-galato (**XXIV**), epicatequin-3-O-galato (**XXV**), epigalocatequin-3-O-galato (**XXVI**), 3'-O-metilepicatequina (**XXVII**), 4'-O-metilepigalocatequina (**XXVIII**), 4'-O-metilgalocatequina (**XXIX**), epigalocatequin-(4 β →8)-4'-O-metilgalocatequina (**XXX**), epicatequin-(4 β →8)-4'-O-metilgalocatequina (**XXXI**), 4'-O-metilgalocatequina-(4 α →8)-4'-O-metilgalocatequina (**XXXII**) e epigalocatequin-(4 β →8)-epigalocatequin-3-O-galato (**XXXIII**) (SCHMITD, 2009).

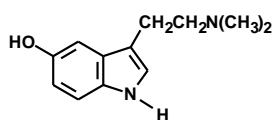
No extrato da casca do caule em CH₂Cl₂:MeOH de *Piptadenia africana* foram encontrados piptadenol A (**XXXIV**), B (**XXXV**) e C (**XXXVI**); 5,6-dimetoxi-7-hidroxiflavona (**XXXVII**), antiqol B (**XXXVIII**), sitosterol (**XIII**), β -amirina (**XXXIX**), ácido betulínico (**XL**), colesterol (**XLI**), 24-(S)-estigma-5,22-dien-3- β -O-glucopiranosídeo (**XLII**), gliceril-1-hexacosanoato (**XLIII**), 4',7-diidroxí-5-metoxi-flavona (**XLIV**), e eicosano (**XLV**) (MBOUANGOUERE *et al.*, 2007, 2008).

O estudo fitoquímico de galhos de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae-Mimosoideae), comumente conhecida como “pau jacaré”, forneceu sitosterol (**XIII**), estigmasterol (**XLVI**), o éster N-benzoilfenilalaninato de 2-N-benzoil-3-fenilpropila, conhecido como asperfenamato (**XLVII**), 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol (**XIV**), além de três flavonóides, apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona, **XLVIII**), 5-metoxiapigenina (**XLIX**) e 7,4'-diidroxí-5,3'-dimetoxiflavona (**L**). Das folhas isolaram-se galato de metila (**LI**) e dois flavonóides, 8-C-glicopiranosil-5,7,4'-triidroxiflavona e 6-C-glicopiranosil-5,7,4'-

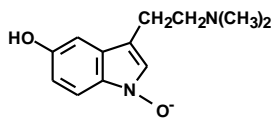
triidroxiflavona, conhecidas como vitexina (**LII**) e isovitexina (**LIII**) (CARVALHO *et al.*, 2010).

A parte aérea de *Piptadenia stipulacea* foi extraída com etanol e submetida a partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila. O fracionamento da fase em acetato de etila forneceu o flavonóide identificado por FGAL (7,5,4'-triidroxi-6,3-dimetoxi-flavonol, **LIV**) (QUEIROZ *et al.*, 2010).

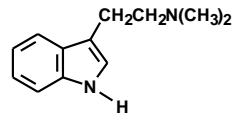
A investigação fitoquímica das raízes de *Piptadenia rigida* Benth., Fabaceae, conhecida como "angico", forneceu sitosterol (**XIII**), betulina (**LV**), lupeol (**XII**), chalcona isoliquiritigenina (**LVI**), os flavonóides 7,8,3',4'-tetraidroxiflavanona (**XVIII**), 7,4'-diidroxiflavona (**LVII**), 7,3',4'-triidroxiflavona (**LVII**), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (**LIX**) e metil-3,4-di-hidroxi-benzoato (**LX**). Ambas as flavonas também foram isoladas a partir dos ramos desta planta (CARVALHO *et al.*, 2011).



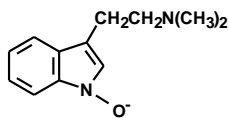
Bufotenina (I)



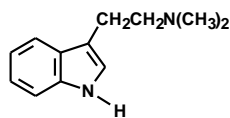
Óxido de bufotenina (II)



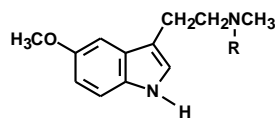
N,N-dimetiltriptamina (III)



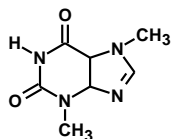
Óxido de N,N-dimetiltriptamina (IV)



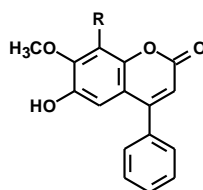
N-metiltriptamina (V)



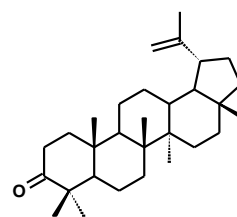
R= H, 5-metoxi-N-metiltriptamina (VI)
R=CH₃, 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (VII)



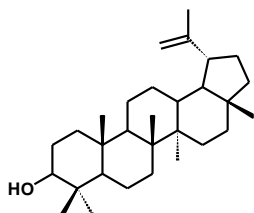
Teobromina (VIII)



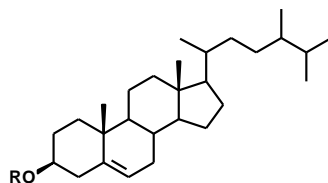
R= H: Dalbergenina (IX)
R= OCH₃: Kuhlmanina (X)



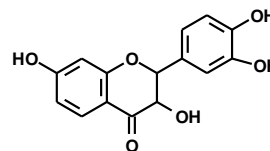
Lupeona (XI)



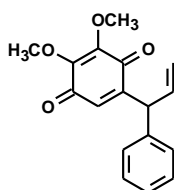
Lupeol (XII)



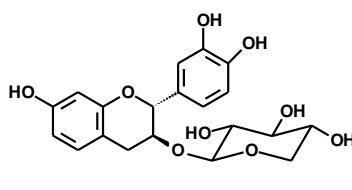
R=H, Sitosterol (XIII)
R= Gli, 3-O-glucopiranosil sitosterol (XIV)



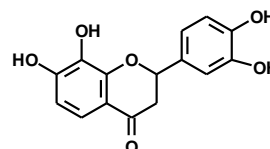
3,7,3',4'-tetraidroxiflavanona (XV)



3,4-dimetoxidalbergiona (XVI)



3-O-xilopiranosil fisetinidol (XVII)



7,8,3',4'-tetraidroxiflavanona (XVIII)

Figura 1. Metabólitos especiais isolados de espécies do gênero *Piptadenia*

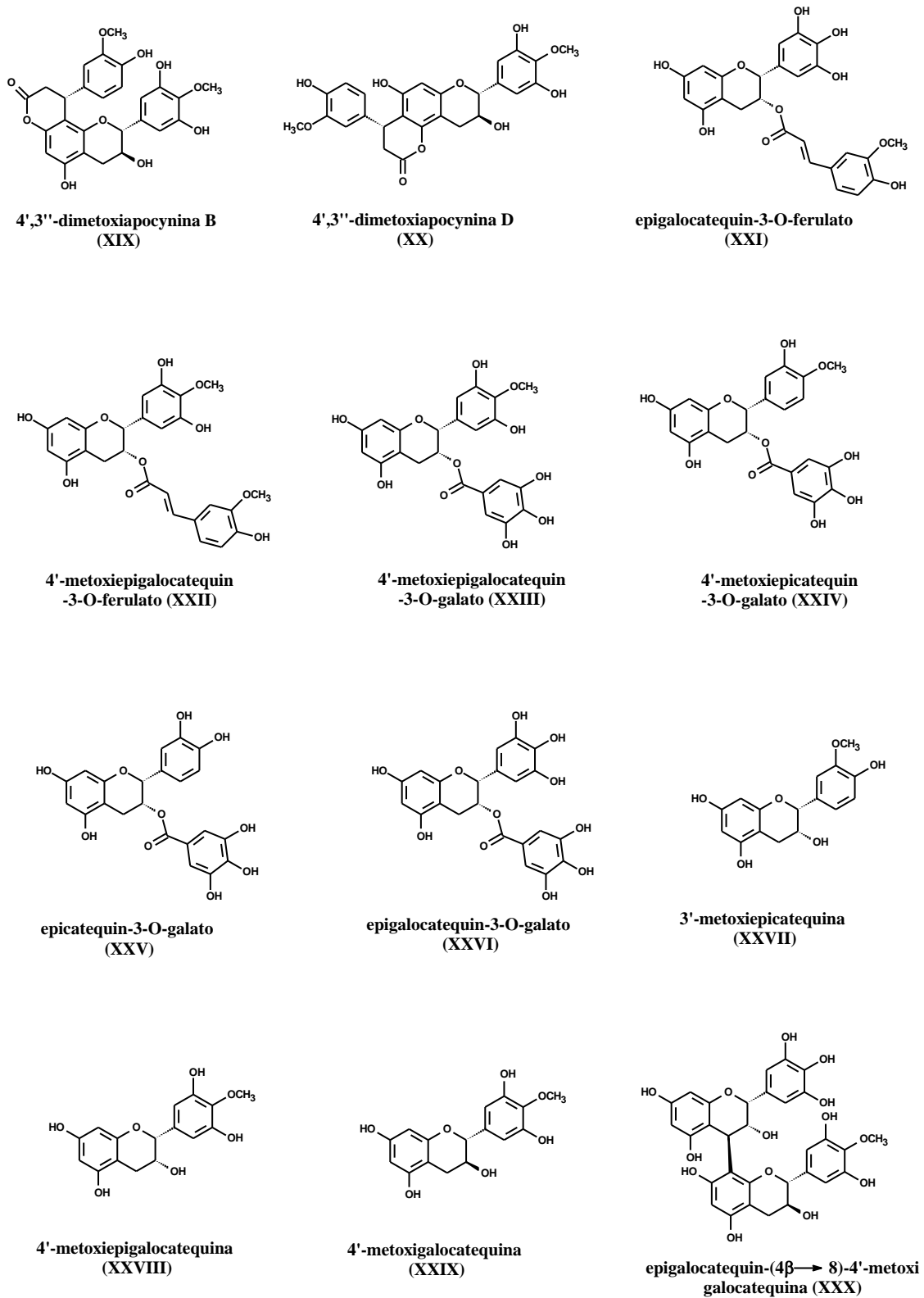


Figura 1. Continuação

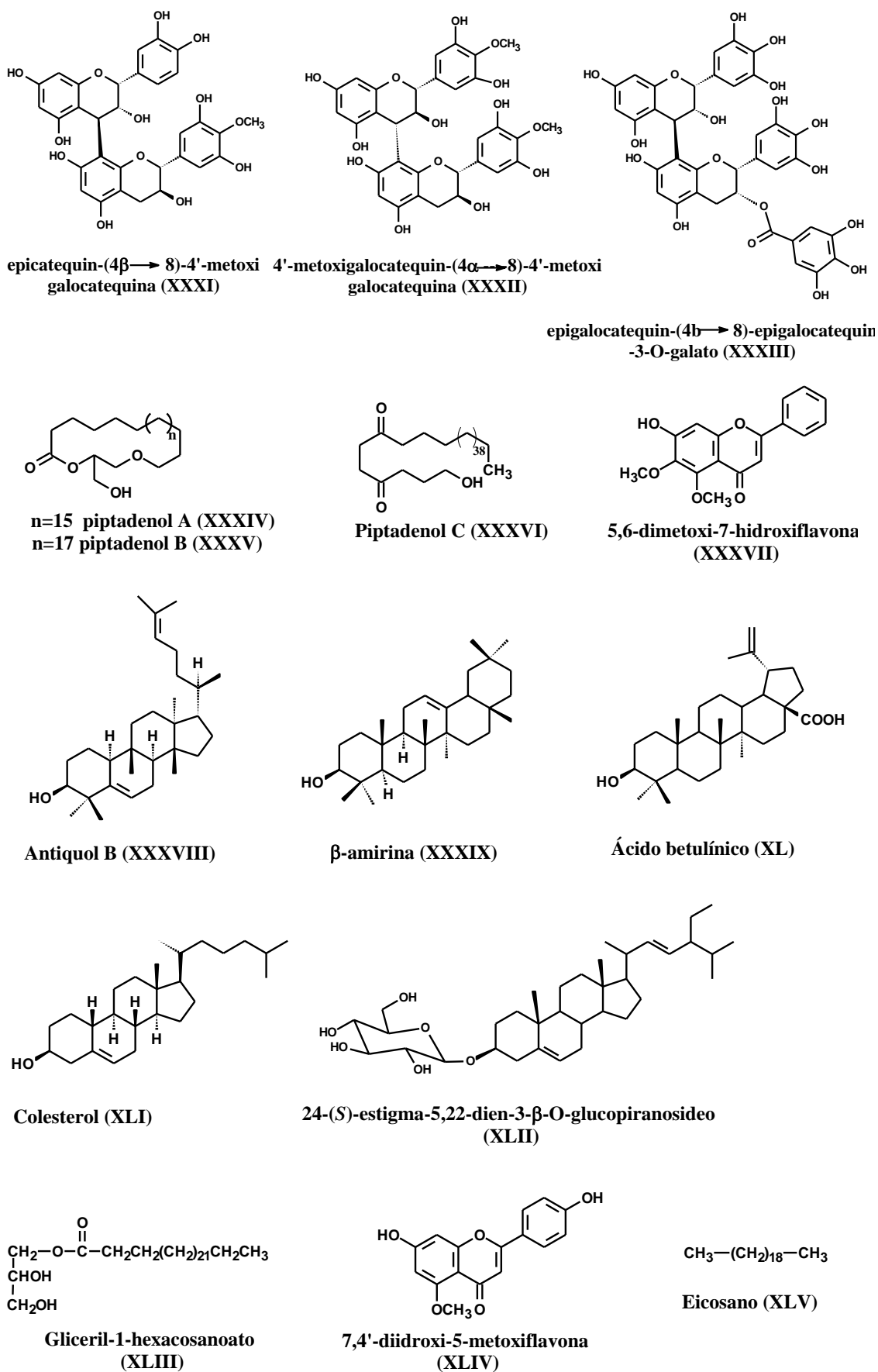
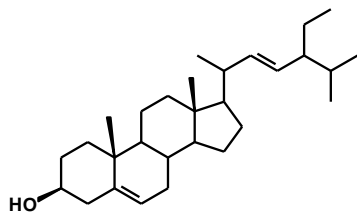
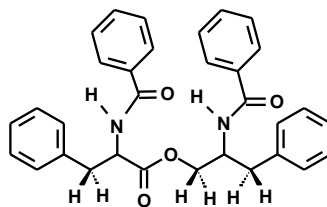


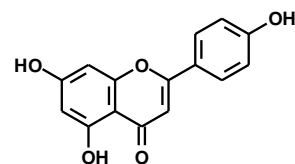
Figura 1. Continuação



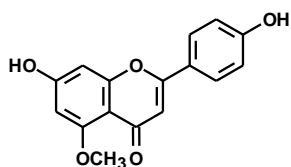
Estigmasterol (XLVI)



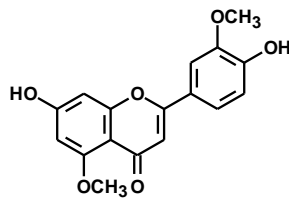
Asperfenamato (XLVII)



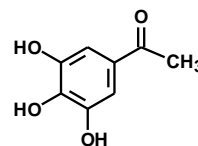
Apigenina (XLVIII)



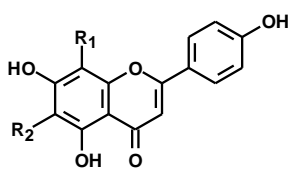
5-metoxiapigenina (XLIX)



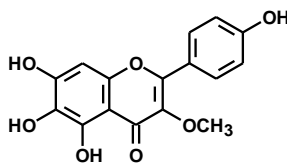
7,4'-diidroxí-5,3'-dimetoxiflavona (L)



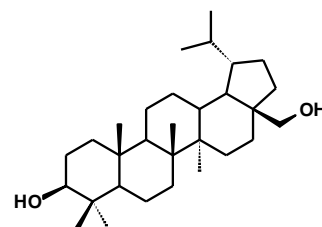
Galato de metila (LI)



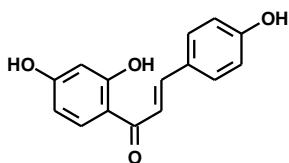
R₁=Glic; R₂=H - vitexina (LII)
R₁=H; R₂=Glic - isovitexina (LIII)



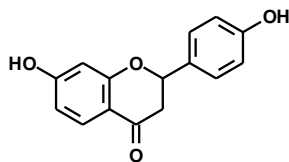
FGAL (LIV)



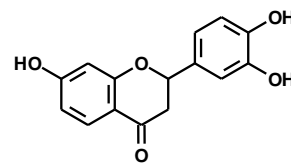
Betulina (LV)



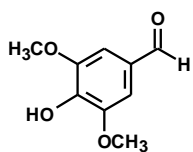
Isoliquiritigenina (LVI)



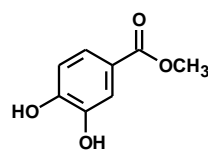
7,4'-diidroxiflavona (LVII)



7,3',4'-triidroxiflavona (LVIII)



4-hidroxi-3,5-dimetoxi benzaldeído (LIX)



metil-3,4-diidroxí benzoato (LX)

Figura 1. Continuação

I.5. Atividade Biológica

Desmarchelier e colaboradores realizaram ensaios diversos, *in vitro*, com extratos de cascas de *Anadenanthera macrocarpa* Brenan (Fabaceae). Avaliou-se o potencial reativo antioxidante total (TRAP) de extratos aquoso e metanólico através da monitorização da intensidade da quimiluminescência do luminol (CL), usando 2,2'-azo-bis (2 amidinopropano) como uma fonte de radical peroxila. A atividade, medida em equivalentes de concentração Trolox, observada para o extrato metanólico de *A. macrocarpa* foi de TRAP= 3028 (+/-) 95 mM, considerada significativa. A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da produção de ácidos tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (CL) iniciada por hidroperóxido de fígado de rato homogeneizados. A maior atividade foi observado no extrato aquoso de *A. macrocarpa* foi CI_{50} 54 µg/mL. Os extratos de *A. macrocarpa* também reduziram a formação do hidroperóxido (CL), mostrando uma CI_{50} de 2,0 µg/mL. O dano DNA-açúcar induzido por sais de Fe (II) também foi utilizado para determinar a capacidade dos extratos para reprimir a degradação radical hidroxila mediada de DNA. foi observada no extrato metanólico de *A. macrocarpa* alta atividade de redução da oxidação do DNA, mostrando uma CI_{50} 47 µg/mL (DESMARCHELIER *et al*, 1999).

Em estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos Tokarnia e col. investigaram a intoxicação causada pela ingestão de folhas de *Piptadenia macrocarpa* (*Anadenanthera macrocarpa*) e *Piptadenia viridiflora*. Foi observado que folhas frescas de *P. macrocarpa* apresentaram grau de intoxicação maior que folhas maduras. Com folhas secas observou-se que sua toxicidade foi perdida lentamente dentro de poucos meses. Tanto as folhas frescas quanto as secas de *Piptadenia viridiflora* mostraram efeitos tóxicos semelhantes a *P. macrocarpa* (TOKARNIA *et al*, 2002). Silva e col. relatam intoxicações causadas por plantas cianogênicas como *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (*Piptadenia macrocarpa*), na região do Seridó, estado do Rio Grande do Norte (SILVA *et al.*, 2006).

Os estudos experimentais com plantas cianogênicas mostraram que em coelhos a dose letal de *Piptadenia viridiflora* e *macrocarpa* foi 6 g/kg para folhas dessecada coletadas na fase de brotação de 2 e 5 meses antes dos experimentos, respectivamente. Os sintomas observados nos coelhos que foram intoxicados pelas folhas secas de *P. macrocarpa*, *P. viridiflora* foram neuromuscular (BRITO *et al.*, 2000).

Em ensaio antimicrobiano o extrato metanólico da casca de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan Fabaceae (50 mg/mL) apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, sendo que o efeito de inibição do crescimento de *S. aureus* e *epidermidis* foi maior ou igual ao apresentado pelo cloranfenicol (40 µg/ml), usado como controle positivo no ensaio (SOUZA *et al.*, 2004).

Moretão e col. estudaram os efeitos imunomoduladores e anti-tumoral de um heteropolissacarídeo ácido contendo principalmente galactose e arabinose (ARAGAL), isolado da goma da leguminosa *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco). Considerando que a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos in vitro e in vivo, aumenta a capacidade fagocítica e produção de ânion superóxido. Foram avaliados os efeitos biológicos da ARAGAL, sob a capacidade de gerar macrófagos peritoneais, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produção e efeito antitumoral contra Sarcoma 180 (S-180). Macrófagos tratados in vitro por 18 horas com ARAGAL, foram capazes de matar células do sarcoma 180 como observado por suas estruturas dentro do citoplasma de macrófagos. ARAGAL (100 mg / kg) apresentou atividade anti-tumoral contra S-180 em ascite ou tumores sólidos sendo, a inibição tumoral de 63 e 38%, respectivamente (MORETÃO *et al.*, 2004).

Monteiro e col. avaliaram a concentração de taninos nos períodos chuvosos e de seca da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan da região semi-árida do estado de Pernambuco, e observaram que o teor de taninos na casca e folhas dessa espécie foi maior durante a estação seca (MONTEIRO *et al.*, 2006).

As atividades antiprotozoário e citotóxica de extrato metanólico 80%, de casca e caule de *Piptadenia africanum* apresentaram boa atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei* com valores CI_{50} de $4,0 \pm 1,1$ e $7,0 \pm 1,7$ µg/mL, respectivamente, e foi o extrato mais citotóxico contra linhagens de células MRC-5 ($CC_{50} < 0,25$ µg/mL), sem seletividade (MESIA *et al.*, 2008).

Em ensaio realizado in vitro contra *Plasmodium falciparum*, resistentes à cloroquina FcB1, as substâncias (+) catequina -5-galato (2) e (+) catequina-3-galato (3) isoladas de *Piptadenia pervillei* apresentaram alta atividade inibitória com valores de $CI_{50} = 1,2$ µ M e $1,0$ µ M, respectivamente, e nenhum efeito citotóxico significativo foi observado contra células embrionárias de pulmão MRC-5 para valores de $CI_{50} > 75$ µ M (RAMANANDRAIBE *et al.*, 2008, KAUR *et al.*, 2009).

Foi isolado de *P. adiantonides* o *Cochliobolus sp.* um fungo endofítico (UFMG-CB-555) que pode matar 90% das formas amastigota de *Leishmania amazonensis* e inibir em 100% reagente de Ellman na tripanotona redutase (TryR) em ensaio, quando testado em 20 µg/mL (CAMPOS *et al.*, 2009).

A avaliação *in vitro* da atividade antiprotozoário de extrato hidrometanólico de casca do caule de *Piptadia africanum* mostrou atividade pronunciada contra o *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e linhagens de células MRC-5 nas concentrações de 7,0; 4,0; 64 e 0.25 µg/mL, respectivamente (MESIA *et al.*, 2008).

O extrato da casca do caule em CH₂Cl₂:MeOH de *Piptadenia africana* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Uma saponina, 24-(*S*)-estigma-5,22-dien-3β-O-glucopiranosídeo, isolada dessa espécie apresentou atividade antimicrobiana contra *Shigella flexenari*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*; além de apresentar potencial de inibição da enzima α-glucosidase (MBOUANGOUERE *et al.*, 2008).

O extrato metanólico de caule *Piptadeniastrum africanum* foi avaliado quanto a atividade antioxidante, atividade inibitória da tirosinase e atividade antifúngica, além da quantificação dos compostos fenólicos total presentes nos extratos (HUANG *et al.*, 2009b). O extrato apresentou atividade antioxidante de 6.9 µg/mL, atividade inibição da enzima tirosinase de 96.7 % e atividade antifúngica contra *Trametes versicolor* FFPRI1030 de 50 mg (concentração mínima). O teor de compostos fenólicos encontrado para esse extrato foi de 310 mg/g (mg de fenóis/g de extrato).

Encontra-se na literatura patentes de produtos cosméticos e dermatológicos para tratamento facial ou corporal de alterações cutâneas específicas, tais como secura da pele, rachaduras ou descamação, cujo princípio ativo são extratos de *Piptadenia colubrina* (angico-branco) em sua forma bruta, ou por extração com solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol, álcool isopropílico, etilenoglicol, butilenoglicol, éter de petróleo, éter etílico e acetona), ou com dióxido de carbono por fluido supercrítico (PEREDA *et al.*, 2010).

As fases aquosas e acetato de etila (p.o 100 mg/kg) e os flavonóides FGAL (p.o e i.p 100 mM/kg), de *Piptadenia Stipulacea*, reduziram a nocicepção produzida pelo ácido acético, por 49,92%, 54,62%, 38,97% e 64,79 %, respectivamente, em ensaios realizados com camundongos. A fase de acetato de etila e o FGAL exibiram atividade antiinflamatória de 35,84% e 37,70%, respectivamente. Estes dados demonstram que o FGAL provoca acentuada atividade antinociceptiva contra vários modelos de dor (CAMPOS *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2010).

Extratos de duas espécies de *Piptadenia* foram testados *in vitro* contra *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi* e cinco bactérias gram-positivas e negativas. Avaliação antimicrobiana do extrato metanólico

da casca de *Piptadenia pteroclada* cf. apresentou atividade contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* além de uma $CI_{50} = 32.4$ para linhagem de células L-6. O extrato em diclorometano das folhas *Piptadenia anolidurus* cf., apresentou atividade contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* ($CI_{50} = 12.2$) e *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 2.7$) e avaliação do efeito citotóxico em células L-6 ($CI_{50} = 36.0$) (GACHET *et al.*, 2010).

Schmidt e colaboradores realizaram atividades biológicas com extrato etanólico e constituintes químicos isolados da casca de *P. rigida* através de ensaio *Scratch* (para verificar propriedades cicatrizantes), atividades anti-inflamatórias e citotóxica. Ensaios *in vitro* avaliaram a influência desses compostos sobre a migração e proliferação de fibroblastos em monocamadas de feridas artificiais em rato Swiss 3T3 (SCHMIDT, 2011). Foi observado que a maioria das amostras apresentaram um aumento significativo no número de células para concentrações de 10 mM de XIX. As substâncias XXIV e XXV foram as mais ativas em uma concentração de 1 mM e XXIII na concentração de 10 μ M. Substâncias possuindo uma porção galoil exibiram maiores atividades migratórias e de proliferação. Em ensaios antiinflamatório por NF-kB de mobilidade eletroforética (EMSA), etanólico bruto e alguns compostos isolados (XIX, XXI, XXIII, XXVI, XXVIII, XXIX e XXX) foram avaliados quanto ao seu efeito sobre o TNF- α induzida por ativação NF-kB em células. À exceção de XIX e XXI, as outras amostras apenas moderadamente prejudicaram a ativação de NF-kB, após 24 h de incubação. Em concentrações geral, cerca de 50 mM foi necessária para induzir 50% de inibição. Os compostos XIX e XXI mostraram uma inibição média de 40% a XXVIII e 20 mM, enquanto que em concentrações mais elevadas, houve a uma diminuição da atividade inibitória. O extrato etanólico de 100 mcg/mL exibiu uma inibição de NF-kB de cerca de 70%, mas essa concentração também mostraram uma citotoxicidade de 50%. As substâncias XIX, XXV, XXVI e XXVIII foram investigadas por seus efeitos inibitórios sobre p38 α MAPK (quases envolvidas na biossíntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α). O CI_{50} seguinte (n = 3) foram obtidos: XIX ($50,80 \pm 4,81$ mM), XXV ($1,47 \pm 0,36$ mM), XXVI ($2,21 \pm 0,48$ mM) e XXVIII ($39,16 \pm 3,92$ mM). Extrato e derivados de catequinas foram testados em ensaios de citotoxicidade MTT usando células T Jurkat. O extrato (100 mcg/mL) mostrou inibição significativa do crescimento das células Jurkat. Os compostos testados em 55 mM apresentaram baixa citotoxicidade, com todos os valores abaixo de 15%, sendo considerados não citotóxico (SCHMIDT *et al.*, 2009, 2010).

I.6. Informações etnofarmacológicas

Anadenanthera macrocarpa Brenan (Fabaceae) é utilizada como agente anti-inflamatório no estado da Bahia (DESMARCHELIER *et al.*, 1999).

Em estudo etnofarmacológico realizados com espécies mais utilizadas no Rio Grande do Sul, a espécie *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan Fabaceae mostrou ser usada para tratamento antiinflamatório e antimicrobiano (SOUZA *et al.*, 2004).

Monteiro e col. realizaram estudo etnofarmacológico de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, em comunidades rurais da região semi-árida do Estado de Pernambuco. Para *Anadenanthera colubrina*, os principais tipos de usos foram para o tratamento de tosse, inflamações em geral, feridas e como um expectorante. Xarope era o uso principal forma indicada (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Em estudo etnofarmacológico realizado por levantamento bibliográfico de livros históricos (dos séculos 16 à 19) sobre plantas medicinais exercendo efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) foi encontrada a espécie *Piptadenia colubrina* (Vell.) Benth. (Fabaceae), a qual apresentava registros do uso como tônico. Os resultados mostraram que a maioria das espécies registradas neste estudo têm sido relatadas como medicinal há séculos, mas nunca foram objeto de investigação farmacológica, até o tempo presente (GIORGETTI *et al.*, 2007).

Gachet e col. realizaram estudo etnobotânico com plantas tradicionalmente usadas no Equador, no tratamento da leishmaniose, com base em entrevistas com curandeiros bem como uma pesquisa bibliográfica. Entre as espécies relatados para o tratamento da leishmaniose em encontra-se a *Piptadenia sp.* Benth. com um registro de uso na literatura e citada por vários entrevistados (GACHET *et al.*, 2010).

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivos gerais

- Complementar o estudo químico das espécies *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia rigida*;
- Avaliar algumas propriedades químicas e biológicas de extratos das diferentes partes das plantas estudadas;

- Preparar novos derivados da quercetina e testar outras atividades biológicas.

II.2. Objetivos específicos

- Isolar e/ou identificar metabólitos especiais de cascas e raiz de *Piptadenia gonoacantha*, de folhas e sementes de *Piptadenia rigida* pela utilização de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos (RMN ^1H e ^{13}C , IV, EM);
- Preparar derivados de constituintes isolados e fazer a completa atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados;
- Extrair os óleos de duas espécies do gênero *Piptadenia* (*P. gonoacantha* e *P. rigida*) através do método de hidrodestilação e CO_2 supercrítico, assim como analisá-los por CG-EM;
- Preparar o novo derivado da quercetina contendo um grupo 3'-dinitro-fenil-trifluorometila e testar sua atividade antifúngica contra *Candida albicans*;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos da raiz de *Piptadenia gonoacantha*;
- Determinar o teor de fenóis totais e taninos dos extratos de *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia rigida*.

III. PARTE EXPERIMENTAL GERAL

III.1. Equipamentos e reagentes

Utilizou-se evaporador rotatório Fisaton 801 para retirar solventes das soluções de extratos brutos.

Os reagentes usados foram adquiridos com as empresas: cloreto de alumínio hexahidratado, tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), ácido fosfórico (H_3PO_4) da Vetec; o carbonato de sódio anidro da Grupo Química; o padrão ácido gálico da Merck.

As cromatografias em coluna foram realizadas com gel sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec), e com Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Cromatografia em camada preparativa foi realizada em gel sílica 60 PF₂₅₄ da Merck ou Vetec sobre suporte de vidro e espessura de 1 mm. As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (254 e 366 nm).

As análises em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em “cromatofolhas” com gel sílica 60 F₂₅₄ em suporte de alumínio da Merck, Whatman e

Sorbent. As substâncias foram visualizadas através de irradiação com lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm e 365 nm e/ou pulverizadas com os seguintes reagentes cromogênicos: solução de vanilina sulfúrica, Godin A, Godin B, solução de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%) (DOMINGUEZ, 1973; MATOS, 1988).

Os solventes utilizados para extração, técnicas cromatográficas e reações foram todos de grau P.A. da indústria química Vetec. Alguns solventes comerciais foram destilados antes de serem utilizados como por exemplo o metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e clorofórmio.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Mel–Temp II da Laboratory devices U.S.A., utilizando capilar sem correção dos valores.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro VERTEX-70 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr ou em filmes sobre cela de NaCl.

Para a determinação do total de fenólicos foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240, e as leituras realizadas a 760 nm, em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados a espectrômetro de massas computadorizado com analisador quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, acoplado em cromatógrafo com fase gasosa, CG/EM-QP2010 Plus da Shimadzu, da UFRRJ.

As análises em CL-EM-IES foram realizadas na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste – LEMANOR, em aparelho Shimadzu CL-EM-TOF (225-07100-34) equipado com fonte de ionização de elétron-spray.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo experimentos em 2D, foram obtidos em aparelhos Brücker, modelos Advance II, de (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) existente no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os solventes usados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (D_3COD) acetona deuterada (D_3CCOCD_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidos em Hertz (Hz).

As extrações por fluido supercrítico foram por um aparato experimental foi montado no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ) e é constituído por um extrator de aço inoxidável 316S de 42mL de volume, com telas de 260 mesh no topo e

no fundo para evitar a passagem de qualquer material, evitando o entupimento da linha. Uma bomba de alta pressão (Palm modelo G100), específica para bombeamento de CO₂, foi responsável pela alimentação do solvente no extrator. Um banho termostático modelo Haake K15 foi acoplado ao extrator para o controle da temperatura e um manômetro foi instalado na linha para o controle da pressão. A vazão na válvula de amostragem foi controlada através de um rotâmetro previamente calibrado.

III.2. Derivatizações

III.2.1. Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação das substâncias foi feita adicionando-se piridina/anidrido acético (1:1, v:v) nas amostras. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. A seguir adicionou-se água destilada gelada e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina, e em seguida lavou-se várias vezes com águas destiladas. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em rota evaporador, obtendo-se as substâncias acetiladas (SHRINER, 1979).

III.2.2. Síntese do novo derivado da quercetina

O acoplamento da rutina e do 2-cloro-5-(trifluorometil)-1,3-dinitrobenzeno por uma ligação de éter permitiu a formação do novo flavonóide derivado de quercetina-CF₃. Para sintetizar este composto, a reação de substituição nucleofílica aromática foi realizada em DMF (N,N-dimetilformamida) em 80-90 °C por 15h. O meio básico foi usado para ativar o grupo-OH da reação nucleofílica com o substrato de cloro aromático. Este procedimento também é acompanhado pela hidrólise do grupo açúcar. O produto quercetina-CF₃ foi isolado com 90% de rendimento (**Capítulo IX**).

IV. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE *Piptadenia gonoacantha*

IV.1. Generalidades da espécie *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr.

A espécie *P. gonoacantha* é uma planta levemente espinhenta, que possui de 10-20 m de altura (**Figura 2**). Seu tronco mede de 30-40 cm de diâmetro. A árvore quando jovem apresenta asas lenhosas longitudinais nos ramos e no tronco. Suas folhas são compostas bipinadas com 4-8 jugas, de 10-15 cm de comprimento, pinas de 5-7 cm de comprimento, com 30 a 40 pares de folíolos. A floração ocorre de janeiro a fevereiro e a presença de abelhas é comum nessa época (LORENZI, 2002).

A madeira é apreciada para usos na fabricação de acabamentos internos, móveis, miolo de portas, brinquedos, embalagens e para lenha e carvão. A madeira tem características atrativas ao uso como ser moderadamente pesada, dura ao corte, resistente ao ataque de insetos xilófagos, além de ser considerada uma boa biomassa para produção de calor (LORENZI, 2002; LUNZ, 2004).

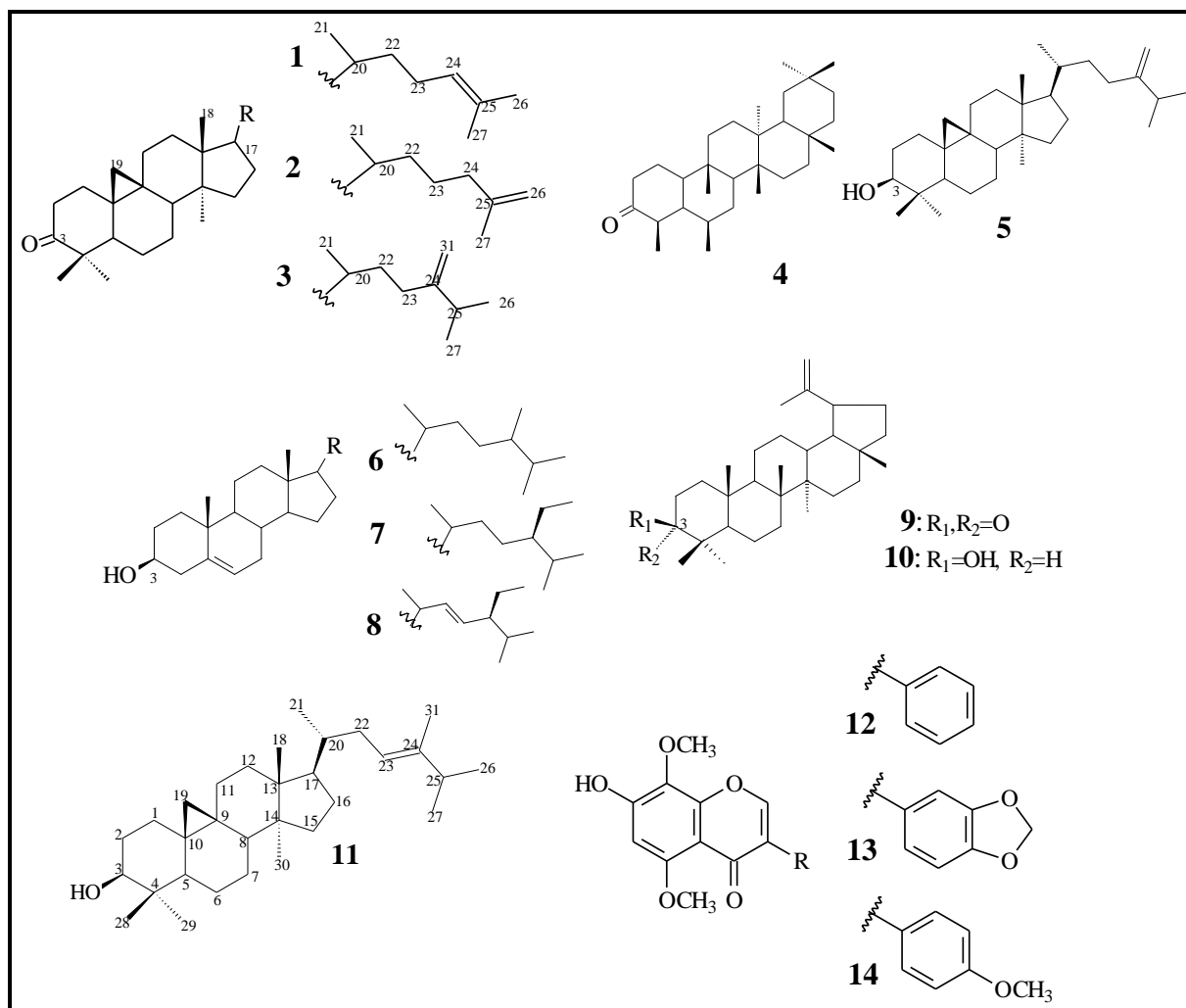
No Brasil, a espécie é popularmente conhecida pelos nomes, icarapé, angico branco, monjoleiro, monjolo, caniveteiro, jacaré, casco-de-jacaré, e mais frequentemente, pau jacaré. Esta planta é encontrada em áreas com sombreamento nas florestas estacionais semidecíduais, com alguma perturbação, nas regiões sudeste e sul do Brasil, incluindo Mato Grosso do Sul e em formações florestais alteradas do complexo atlântico. Ela é indispensável nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente, uma vez que apresenta crescimento rápido e se adapta bem a regiões que sofreram desequilíbrios (LORENZI, 2002; LUNZ, 2004).

A espécie *P. gonoacantha* possui estudos referentes ao teor de taninos (GONÇALVES & LELIS, 2001), avaliação da resistência ao ataque de insetos xilófagos (LUNZ, 2004) e isolamento de metabolitos secundários de folhas e ramos (CARDOZO, 2006).



Figura 2. Aspecto geral da espécie vegetal *Piptadenia gonoacantha*. (LORENZI, 2002)

IV.2. Substâncias isoladas em *Piptadenia gonoacantha*



IV.3. Parte experimental

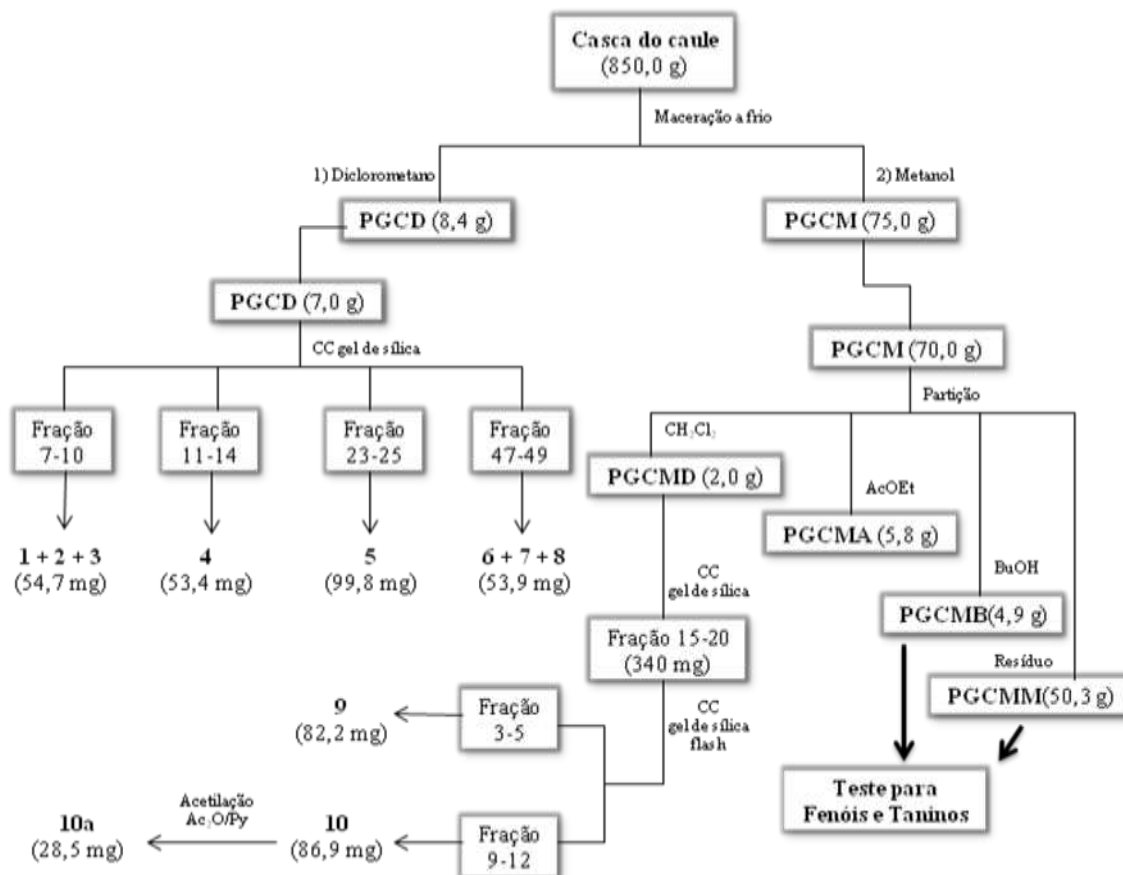
IV.3.1. Material vegetal

As cascas do caule e raiz de *Piptadenia gonoacantha* foram coletadas no Jardim Florestal do Instituto Florestas (IF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo Prof. Dr. Acácio Geraldo de Carvalho (Departamento de Ciências Ambientais-IF-UFRRJ) e identificadas pelo Prof. José Aguiar Sobrinho (Departamento de Ciências Ambientais – IF - UFRRJ). A exsicata desta espécie (RBR 6939) está depositada no herbário RBR, IB-UFRRJ.

IV.3.2. Isolamento de metabólitos especiais de cascas do caule de *Piptadenia gonoacantha*

O material seco e pulverizado (850,0 g) foi submetido à maceração, sucessivamente com diclorometano e metanol a temperatura ambiente. As soluções extrativas foram concentradas em rotavapor a 40° C (diclorometano) e 60° C (metanol) sob pressão reduzida, fornecendo os extratos denominados **PGCD** (8,4 g) e **PGCM** (75,0 g), respectivamente, **Esquema 1**. O extrato **PGCD** (7,0 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica usando hexano como eluente inicial e aumentando a polaridade com clorofórmio e metanol até metanol (100%). Foram coletadas 60 frações de 25 mL. As frações recolhidas foram analisadas por CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2). A revelação inicial foi feita em lâmpada de UV a 254 e 366 nm e depois com Godin A e Godin B cujo resultado foi considerado positivo para triterpenos e esteróides. O material sólido obtido a partir das frações 7-10 (54,7 mg) foi analisado com espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e CG-EM e permitiu identificar a mistura de três triterpenos do grupo dos cicloartanos: **cicloartenona (1)**, **cicloartan-25-26-en-3-ona (2)** e **24-metilenocicloartanona (3)**. As frações 11-14 (53,4 mg; p.f. 254°C) forneceram um sólido que foi identificado como o triterpeno **friedelina (4)** por análise de RMN ¹H e IV. As frações 23-25 (99,8 mg; p.f. 118°C) forneceram o sólido que foi identificado como um triterpeno **24-metilenocicloartanol (5)** por análise de RMN ¹H, RMN ¹³C e IV. As frações 47-49 (53,9 mg) foram cristalizadas em metanol e forneceu a mistura de esteróides **campesterol (6)**, **sitosterol (7)** e **estigmasterol (8)**, esclarecidos por análise de RMN ¹H, bem como análise de CG-EM e comparação com a biblioteca do aparelho. O extrato metanólico **PGCM** (70,0 g) foi dissolvido em metanol:água (8:2) e particionado com diclorometano, acetato de etila e butanol e obtiveram-se os resíduos: **PGCMD** (2,0 g), **PGCMA** (5,8 g), **PGCMB** (4,9 g) e **PGCMM** (50,3 g), respectivamente. **PGCMD** (1,5 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica utilizando clorofórmio como eluente inicial e aumentando a polaridade com metanol até metanol (100%). Coletaram-se trinta frações de 25 mL cada. As frações recolhidas foram analisadas por CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2) e reveladas usando o mesmo procedimento descrito acima. As frações 15-20 (340 mg) foram submetidas a coluna de gel de sílica flash utilizando a mistura de hexano e metanol até metanol (100%). 20 frações de 15 mL foram coletadas e analisadas. As frações **PGCMD-15-20/3-5** (82,2 mg; p.f. 163°C) forneceram um sólido que após cristalização com metanol foi identificado como **lupeona (9)** por análise de RMN ¹H, RMN ¹³C e IV. Já as frações

PGCMD–15-20/9-12 (86,9 mg; p.f. 183°C) foram cristalizadas em acetona fornecendo **lupeol (10)** por análise de RMN ¹H, RMN ¹³C e IV que posteriormente foi submetida a acetilação com anidrido acético e piridina, fornecendo o **acetato de lupelila (10a)** (28,5 mg), que foi identificado através da análise do espectro de RMN ¹H.

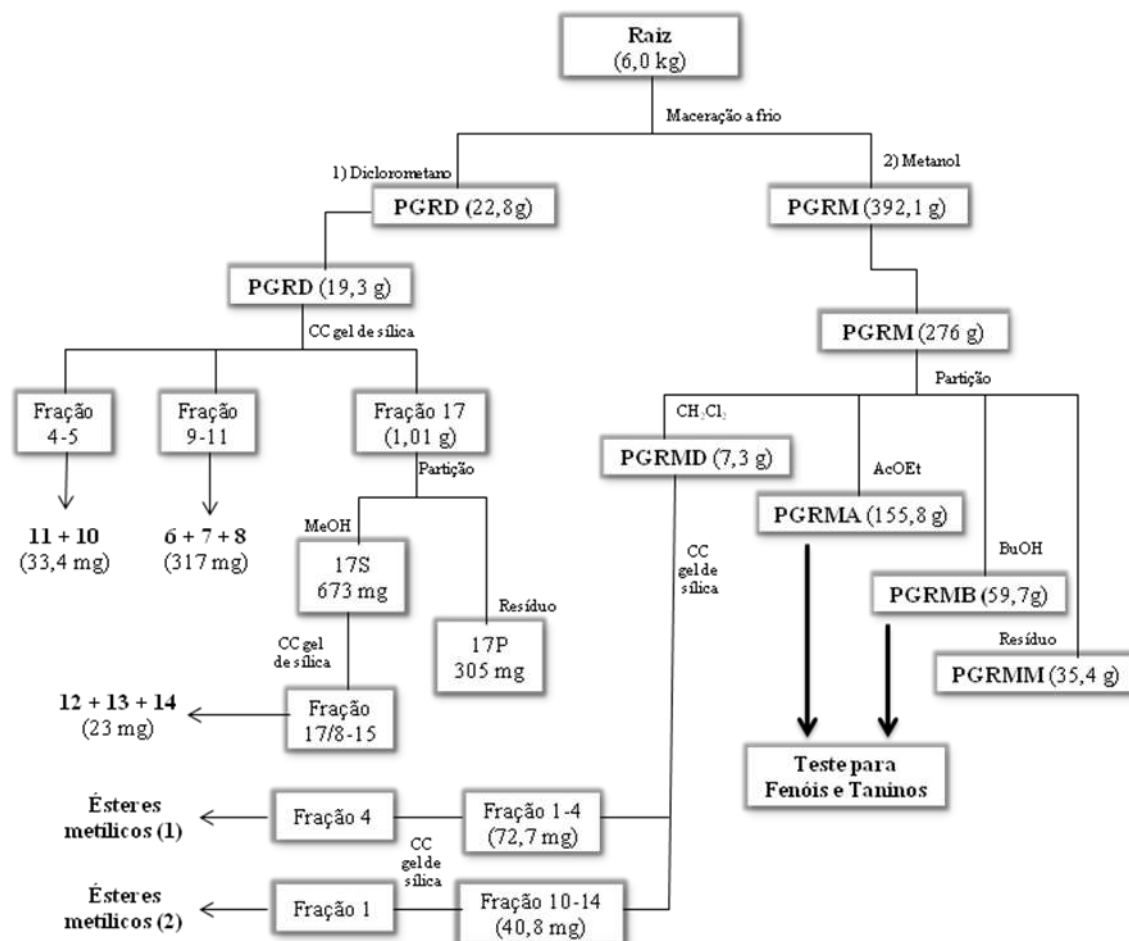


Esquema 1. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos de cascas do caule de *Piptadenia gonoacantha*

IV.3.3. Isolamento de metabólitos especiais da raiz de *Piptadenia gonoacantha*

O material seco e moído (6 Kg) foi extraído exaustivamente sucessivamente por maceração, com diclorometano e metanol, a temperatura ambiente. As soluções extrativas foram concentradas em rota-vapor a 40-80 °C, sob pressão reduzida, e obtiveram-se os extratos de diclorometano, **PGRD** (22,8 g) e o extrato metanólico, **PGRM** (392,1 g) conforme o **Esquema 2**. O extrato **PGRD** (19,3 g) foi fracionado em coluna de sílica gel usando hexano como eluente inicial e aumentando a polaridade com diclorometano, acetato de etila, metanol até metanol (100%). Foram coletadas 34 frações de 200 mL. As frações

recolhidas foram analisadas por CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2). A revelação inicial foi feita em lâmpada de UV a 254 e 366 nm e depois com Godin A e Godin B cujo resultado foi considerado positivo para triterpenos e esteróides. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis em CCDA. O material sólido branco obtido a partir das frações 4-5 (33,4 mg) que foi recristalizado em acetona e analisado com espectros de RMN ¹H e CG-EM permitindo identificar a mistura de triterpenos: **cicloartenol (11)** e **lupeol (10)**. As frações 9-11 (317 mg) foram recristalizadas em metanol fornecendo um cristal branco que comparado em CCDA com padrão de **campesterol (6)**, **sitosterol (7)** e **estigmasterol (8)** deu positivo, sendo em seguida feita análise de RMN ¹H e CG-EM confirmando tal indício. A fração 17 (1,01g) foi particionada com metanol, dando as subfrações 17P (precipitado em metanol, 305 mg) e 17S (solúvel em metanol, 673 mg), sendo esta última cromatografada em sílica gel, utilizando como eluente inicial clorofórmio e aumentando a polaridade com acetato de etila e metanol até metanol (100%). Foram recolhidas 62 frações de 100 mL. Após recolhida com as outras frações semelhantes em CCDA resultando na subfração 17/8-15 (23 mg, 209°C-213°C), que após ser submetida a análise de RMN ¹H, RMN ¹³C e 2D, além de CL-EM-IES forneceram a mistura de isoflavonas (**12**, **13** e **14**). O extrato metanólico **PGRM** (276 g) foi dissolvido em metanol:água (8:2) e particionado com diclorometano, acetato de etila e butanol e obtiveram-se os resíduos: **PGRMD** (15,3 g), **PGRMA** (155,8 g), **PGRMB** (59,7 g) e **PGRMM** (35,4 g), respectivamente. **PGRMD** (7,3 g) foi fracionada em coluna de gel de sílica utilizando clorofórmio como eluente inicial e aumentando a polaridade com metanol até metanol (100%). Foram coletadas sessenta frações de 100 mL. As frações recolhidas foram analisadas por CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2) e reveladas usando soluções de Godin A e Godin B, e reunidas após comparação. As frações 1-4 (72,7 mg) e 10-14 (40,8 mg), após serem fracionadas em gel de sílica utilizando com eluente inicial hexano, hexano/clorofórmio até metanol (100%), forneceram frações 1-4/4(29,9 mg) e 10-14/1(4,1mg) ricas em ésteres metílicos que foram identificados por CG-EM, comparando com a biblioteca do aparelho NIST 08. Os extratos **PGRMA** e **PGRMB** foram testados para quantificar fenóis totais e taninos.



Esquema 2. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos da raiz de *Piptadenia gonoacantha*

V. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE *Piptadenia rigida*

V.1. Generalidades da espécie *Piptadenia rigida* (Benth) Brenan

A espécie *P. rigida* é uma planta com altura de 20-30 m, com tronco de 60 a 110 cm de diâmetro. Suas folhas são bipinadas com 3 a 6 pares de pinas (**Figura 3**). Os folíolos são de 1 cm de comprimento. As inflorescências se apresentam com racemos axilares de cor amarela. Seu fruto é legume do tipo vagem, achatada e deiscente (LORENZI, 2002).

A espécie apresenta uma sinonímia, *Parapiptadenia rigida* Benth., sua área de distribuição geográfica vai do Ceará até o Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso. Preferindo as florestas pluviais, sendo comum, no vale do Xaçupé (SC) e nas matas de Iguazu (PR), chegando à Argentina, Uruguai e Paraguai. Aparece ainda nos capões, nas galerias e

capoeiras, nestas podendo predominar amplamente (BULHÕES et al., 1976; RANG *et al.*, 2001).

A espécie pode ser encontrada pelos seguintes nomes vulgares: angico, angico amarelo, angico branco, angico cedro, angico do banhado, angico do curtume, angico dos montes, angico rosa, angico sujo, angico verdadeiro, angico vermelho, brincos de sagüi, brincos de sahy, paricá e guarucaia no Brasil. Já na Argentina encontra-se denominado como angico colorado, cebil branco e curupay-rá e no Paraguai como curupay-ná (BULHÕES et al., 1976; RANG *et al.*, 2001, LORENZI, 2002).

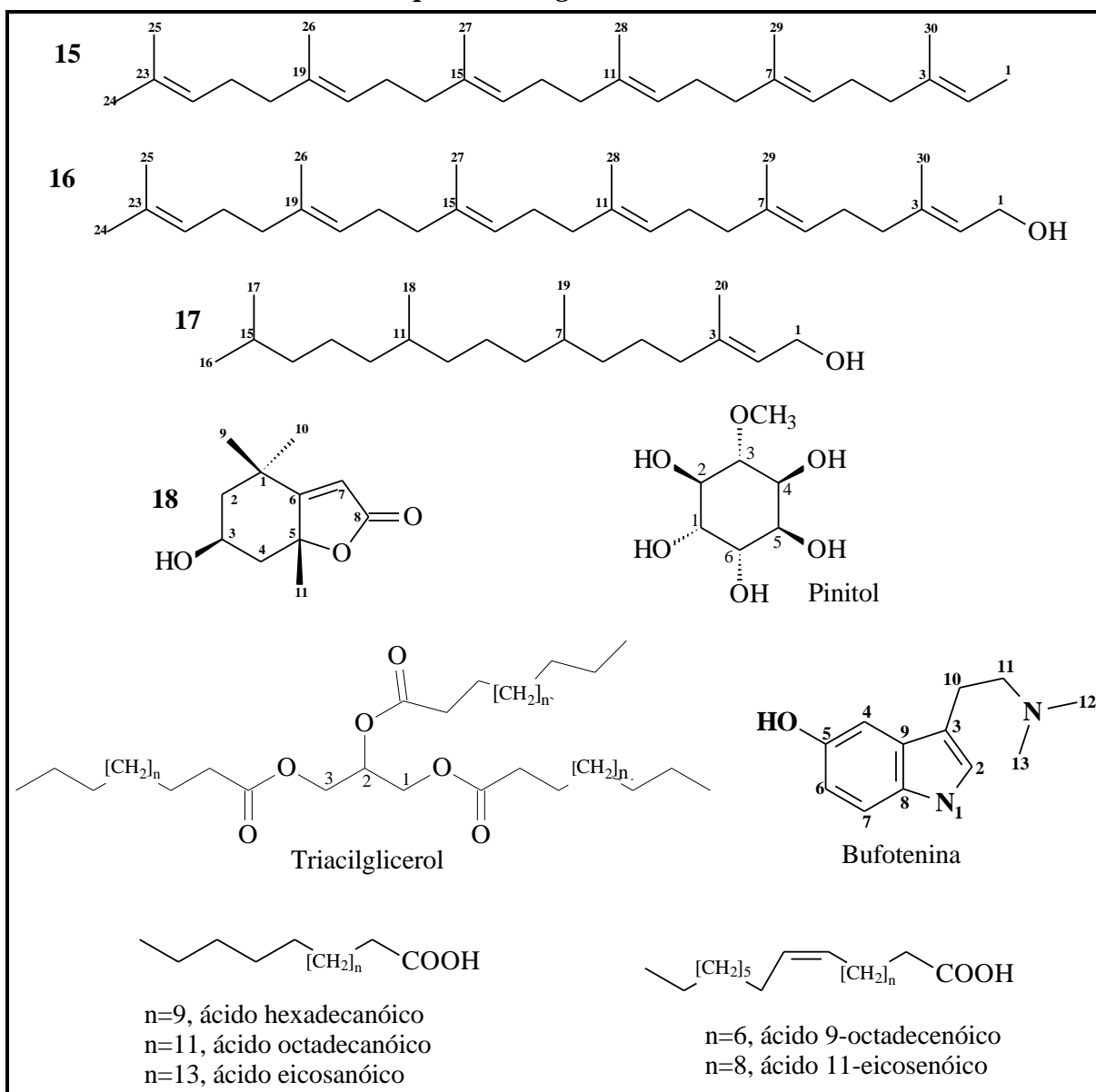
A madeira é compacta, bastante dura, pouco elástica e muito resistente, é própria para obras hidráulicas e expostas, carretas, postes, dormentes, esteios, construção civil e naval, carpintaria, mercenaria, lenha e carvão. As flores são melíferas. A planta possui características ornamentais que a recomendam para o paisagismo em geral. É ótima para reflorestamentos mistos de áreas degradadas (BULHÕES et al., 1976; RANG *et al.*, 2001, LORENZI, 2002).

A casca é amarga, adstringente e rica em taninos (15-20%), é usada na indústria do curtume. Possui aplicações populares como: antileucorréia, antidisentérica, antidiarréica, útil na cura de úlceras e inchaço das pernas. As folhas possuem atividade hemostática em qualquer tipo de ferimento e até em comoções cerebrais. A goma resinosa que exsuda da casca, “goma de angico”, é bem conhecida como expectorante energético e tem várias aplicações medicinais e industriais (BULHÕES et al., 1976; RANG *et al.*, 2001).



Figura 3. Aspecto geral da espécie vegetal *Piptadenia rigida* (LORENZI, 2002)

V.2. Substâncias isoladas de *Piptadenia rigida*



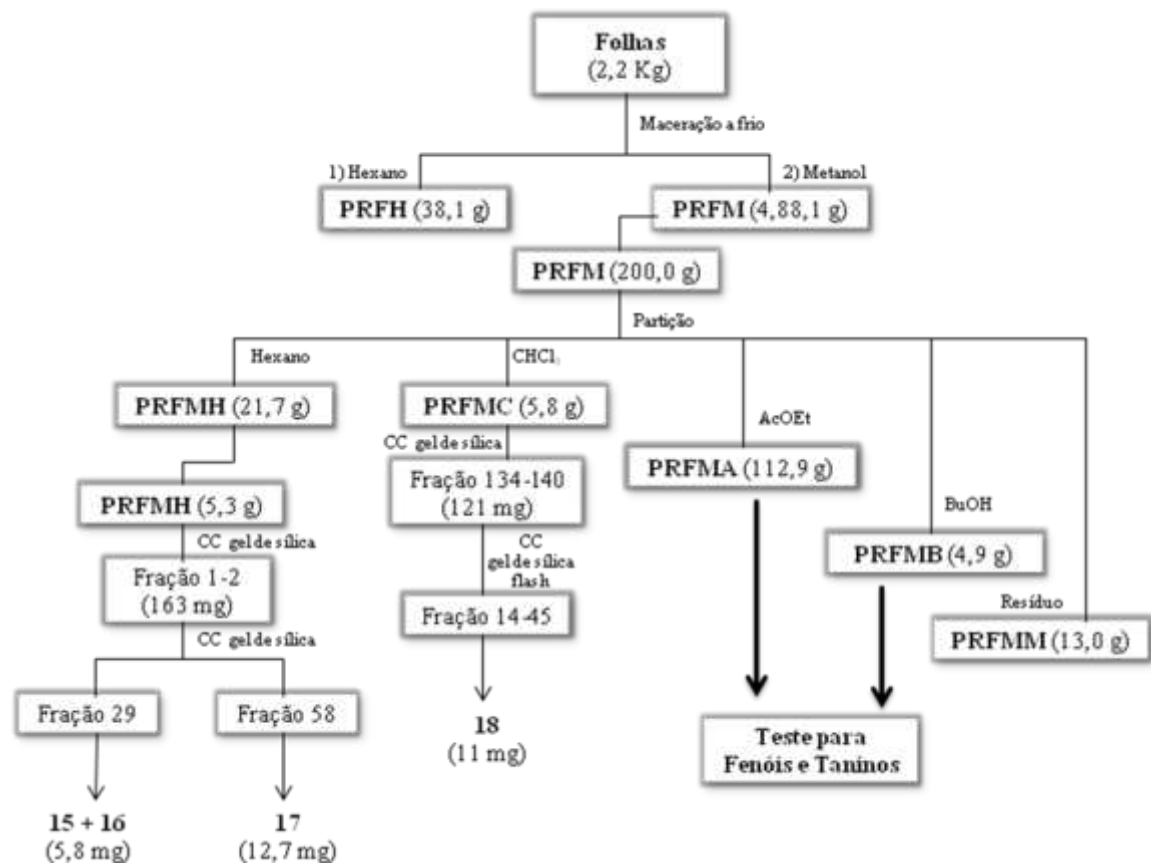
V.3. Parte experimental

V.3.1. Material vegetal

As folhas e sementes de *Piptadenia rigida* foram coletadas no Jardim Florestal do Instituto Florestas (IF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo Prof. Dr. Acácio Geraldo de Carvalho (Departamento de Ciências Ambientais-IF-UFRRJ) e identificadas pelo Prof. José Aguiar Sobrinho (Departamento de Ciências Ambientais – IF - UFRRJ). A exsicata desta espécie (JPB-21438) está depositada no herbário RBR, IB-UFRRJ.

V.3.2. Isolamento de metabólitos especiais isolados de folhas de *Piptadenia rigida*

As folhas após secas (2,2 Kg) foram submetidas à extração exaustivamente sucessivamente por maceração, com hexano e metanol, a temperatura ambiente. O líquido resultante foi concentrado em rota-vapor a 40-80 °C, sob pressão reduzida, e obtiveram-se os extratos de hexano, **PRFH** (38,1 g), e o extrato metanólico, **PRFM** (488,1 g) conforme o **Esquema 3**. O extrato metanólico **PRFM** (200 g) foi dissolvido em metanol:água (8:2) e particionado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol e obtiveram-se os resíduos: **PRFMH** (21,7 g), **PRFMC** (5,8 g), **PRFMA** (112,9 g), **PRFMB** (4,9 g) e **PRFMM** (13,0 g), respectivamente. **PRFMH** (5,3 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica utilizando hexano como eluente inicial e aumentando a polaridade com acetato de etila até (100%). Foram coletadas treze frações de 250 mL. As frações recolhidas foram analisadas por CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2) e reveladas em lâmpada de UV a 254 e 366 nm e em solução de vanilina sulfúrica, e reunidas após comparação. As frações 1-2 (163 mg) foram fracionadas em gel de sílica, usando hexano como eluente inicial e aumentando a polaridade com diclorometano até (100%). Foram coletadas 72 frações de 100 mL, resultando nas frações 29 (5,8 mg) e 58 (12,7 mg), que após analisadas com espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e CG-EM permitiram identificar respectivamente uma mistura de **dois poliprenóides (15 + 16)** e a substância **(E)-3,7,11,15,19,23-hexametiltetracos-2-en-1-ol (17)**. **PRFMC** (5,4 g) foi fracionada em coluna de gel de sílica utilizando diclorometano como eluente inicial e aumentando a polaridade com metanol até metanol (100%). Foram coletadas 340 frações de 100 mL. Após recolhida com as outras frações semelhantes em CCDA resultando na fração 134-140 (121 mg), que foi fracionada em sílica flash, auxiliada com pressão positiva de nitrogênio, utilizando como eluente eluída uma mistura de 90% de diclorometano e 10% de acetato de etila. Foram obtidas 105 frações de 20 mL. Após recolhida com as outras frações semelhantes em CCDA resultando na subfração 14-45 (11 mg, 148°C-153°C), que após ser submetida a análise de RMN ¹H e CG-EM permitiu identificar a substância: **(6S,7aS)-5,6,7,7a-tetrahidro-6-hidroxi-4-4-7a-trimethylbenzofuran-2(4H)-ona (18)**. Os extratos **PRFMA** e **PRFMB** foram testados para quantificar fenóis totais e taninos.

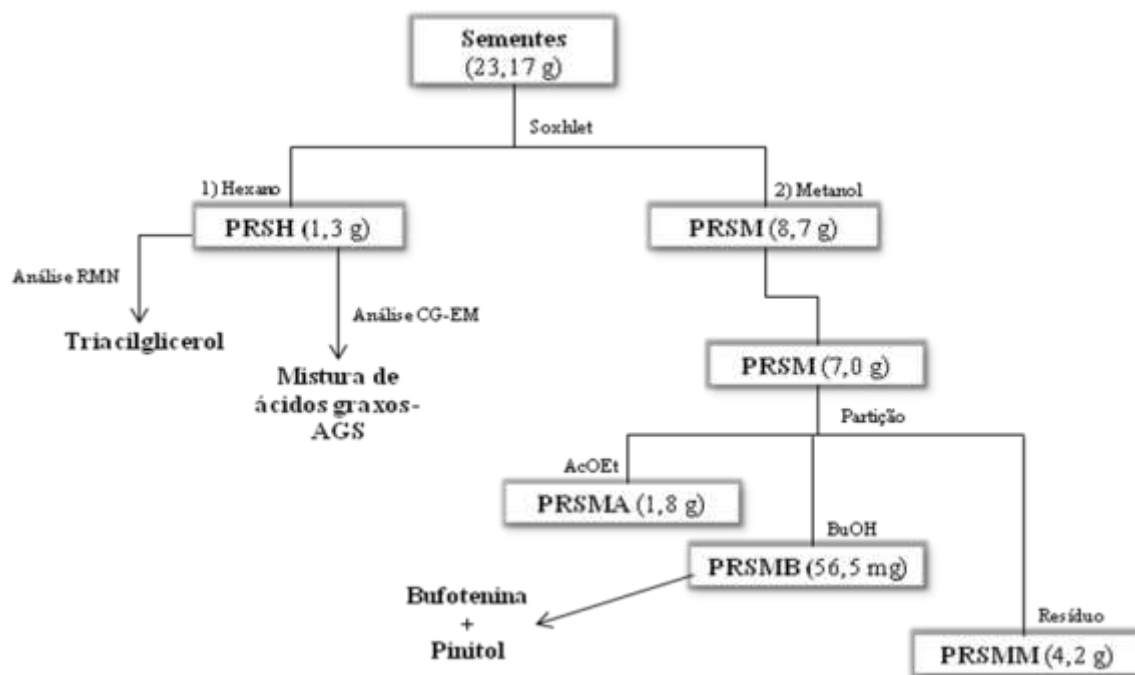


Esquema 3. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos das folhas de *Piptadenia rigida*

V.3.3. Identificação de metabólitos especiais em sementes de *Piptadenia rigida*

As sementes após secas (23,17 g) foram submetidas à extração a quente por soxhlet exaustivamente, sucessivamente com hexano e metanol. O líquido resultante foi concentrado em rota-vapor a 40-80 °C, sob pressão reduzida, e obtiveram-se os extratos de hexano, **PRSH** (1,3 g), e o extrato metanólico, **PRSM** (8,7 g) conforme o **Esquema 4**. O extrato metanólico **PRSM** (7,0 g) foi dissolvido em metanol:água (8:2) e particionado com acetato de etila e butanol e obtiveram-se os resíduos: **PRSMA** (1,8 g), **PRSMB** (56,5 mg), e **PRSM** (4,2 g), respectivamente. A análise do extrato **PRSH** em RMN ¹H revelou a presença de triacilglicerol em mistura, que após análise de CG-EM, devido a alta temperatura de injeção da amostra no aparelho, permitiu identificar apenas uma mistura de ácidos graxos (**AGS** – Ácidos Graxos Sementes). O extrato **PRSMB** após análise em CCDA (cromatofolha de sílica gel 60F₂₅₄) utilizando-se como fase móvel hexano e acetato (8:2) e reveladas em solução de dragendorff cujo resultado foi considerado positivo para alcalóide, que após ser submetida à análise de

RMN ¹H, RMN ¹³C e CG-EM, revelou a presença de uma estrutura com esqueleto de alcalóide indólico em mistura com um carboidrato.



Esquema 4. Marcha de fracionamento para o isolamento das substâncias dos extratos das folhas de *Piptadenia rigida*

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1. Determinação estrutural dos constituintes isolados de cascas do caule de *P. gonoacantha*

O fracionamento cromatográfico dos extratos da casca do caule de *P. gonoacantha* conduziu à identificação de 10 substâncias, cujas estruturas estão representadas a seguir. As estruturas **1-3** e **5** estão sendo registradas pela primeira vez no gênero.

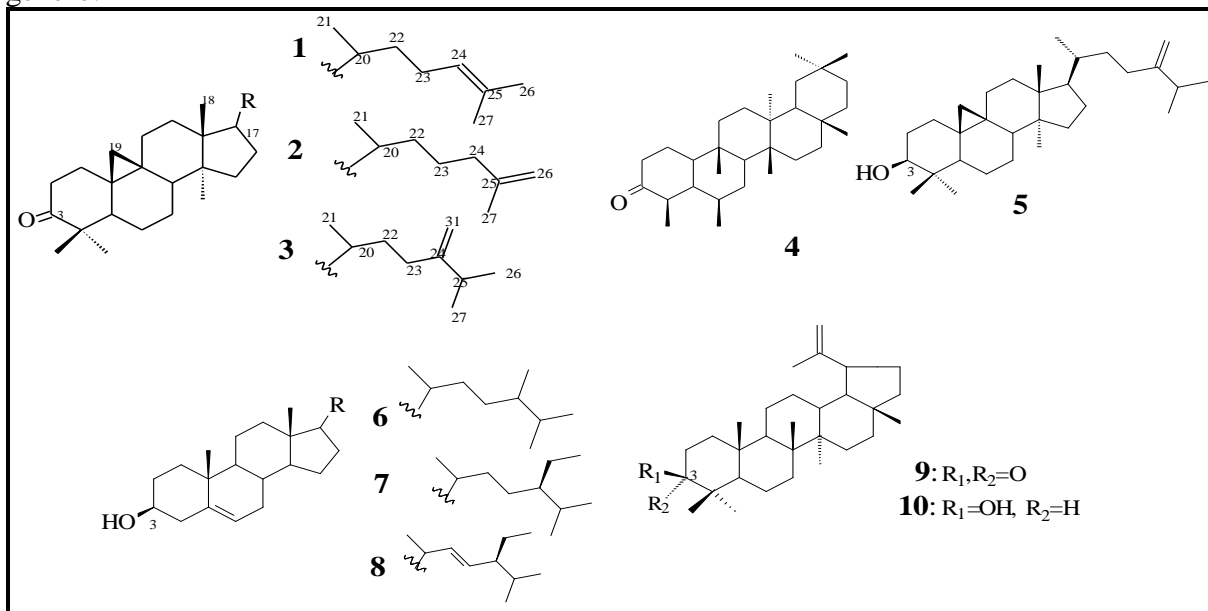


Figura 4. Estruturas dos constituintes isolados de cascas do caule de *P. gonoacantha*.

VI.1.1. Identificação das substâncias **1**, **2** e **3**

Os cicloartanos **1**, **2** e **3** foram obtidos em mistura e identificados através da análise dos espectros de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (DAVIES *et al.*, 1992, SILVA *et al.*, 2005b) e principalmente pela análise com CG-EM. O espectro de RMN ^1H (**Figura 5**) da mistura das substâncias **1**, **2** e **3** apresenta dois dubletos blindados, em δ_{H} 0,33 ($J=4,0$ Hz) e δ_{H} 0,54 ($J=4,0$ Hz), característico de hidrogênios metilênicos de ciclopropano, presentes em triterpenóide com esqueleto cicloartano, juntamente com um triplo-dublete em δ_{H} 2,29 ($J= 13,5$, 4,4, 2,7 Hz) e δ_{H} 2,72 ($J= 13,5$, 13,5 , 6,4 Hz) característicos das configurações α e β ao grupo cetona, dois singletos largos em δ_{H} 4,71 e 4,66, referentes a hidrogênios metilênicos da vinilidina. O espectro de IV (**Figura 11**) apresenta $\nu_{\text{máx}}$ em $\nu_{\text{C=O}}$ em 1709 cm^{-1} característico de carbonila de cetona, absorção de esqueleto carbônico em 1929 e 1867 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$, 1465 cm^{-1} para CH_2 e 1378 cm^{-1} para CH_3 , $\nu_{\text{C=C}} = 1641\text{ cm}^{-1}$ e 3035 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$ de grupo vinilidina. A análise da fração contendo estes triterpenos com CG acoplado com EM apresentou o cromatograma, **Figura 8**,

permitindo identificar os triterpenos: **(1)**, Tr = 14, 314 min., (5,7 %); **(2)**, Tr = 14, 325 min., (6,4 %) e **(3)**, Tr = 15, 623 min., (37,0 %). O **Esquema 5** mostra os mecanismos de fragmentação para a formação dos principais picos detectados no EM (**Figura 9 e 10**).

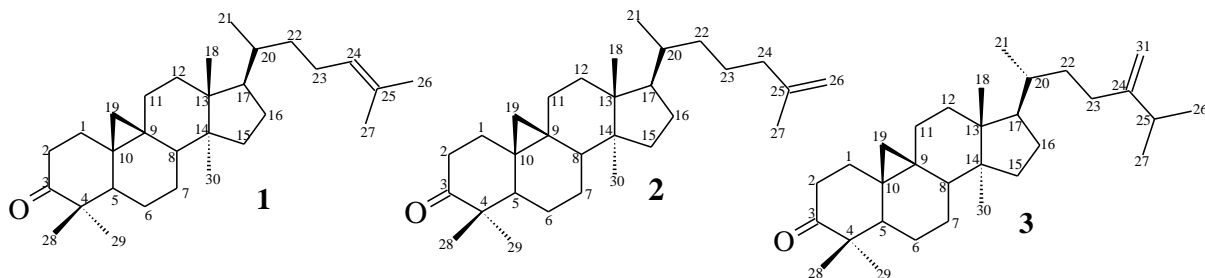


Tabela 1. Comparação dos dados de RMN ^{13}C da fração 7-10 com dados da literatura (DAVIES *et al.*, 1992, SILVA *et al.*, 2005b).

C	δ_c (ppm)					
	1	cicloartenona	2	cicloartan-25-26-en-3-ona	3	24-metilenocicloartanona
1	33,5	33,3	33,5	33,3	31,2	31,9
2	37,1	37,4	37,1	37,4	29,7	30,3
3	217,1	216,5	217,1	216,5	218,0	218,0
4	50,2	50,1	50,2	50,1	40,7	40,5
5	48,1	48,3	48,1	48,3	47,9	47,1
6	21,5	21,4	21,5	21,4	21,5	21,1
7	28,2	28,0	28,2	28,0	28,2	28,2
8	47,9	47,8	47,9	47,8	48,1	47,8
9	21,1	21,0	21,1	21,0	19,9	20,0
10	25,4	25,8	25,4	25,8	26,4	26,1
11	25,9	25,8	25,9	25,8	25,9	26,0
12	32,7	32,7	32,7	32,7	32,7	32,9
13	45,4	45,2	45,4	45,2	45,4	45,3
14	48,4	48,6	48,4	48,6	48,7	48,8
15	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5	35,5
16	26,5	26,6	26,5	26,6	26,5	26,5
17	52,3	52,2	52,3	52,2	52,3	52,2
18	19,3	19,2	19,3	19,2	19,3	19,3
19	29,7	29,5	29,7	29,5	29,7	29,9
20	36,1	35,8	36,1	35,8	36,1	36,1
21	18,3	18,0	18,3	18,0	18,0	18,0
22	36,1	36,2	36,1	36,2	35,0	34,9
23	24,5	24,8	24,2	24,8	31,2	31,2
24	125,3	125,1	39,5	39,0	151,2	152,0
25	131,0	130,8	145,6	147,2	36,1	36,1
26	17,7	17,5	106,1	110,3	22,1	22,5
27	25,4	25,6	22,3	22,4	20,8	21,0
28	18,4	18,1	18,4	18,1	18,3	18,3
29	20,8	20,7	20,8	20,7	25,4	25,5
30	22,1	22,1	22,1	22,1	14,6	14,0
31	--	--	--	--	109,4	109,5

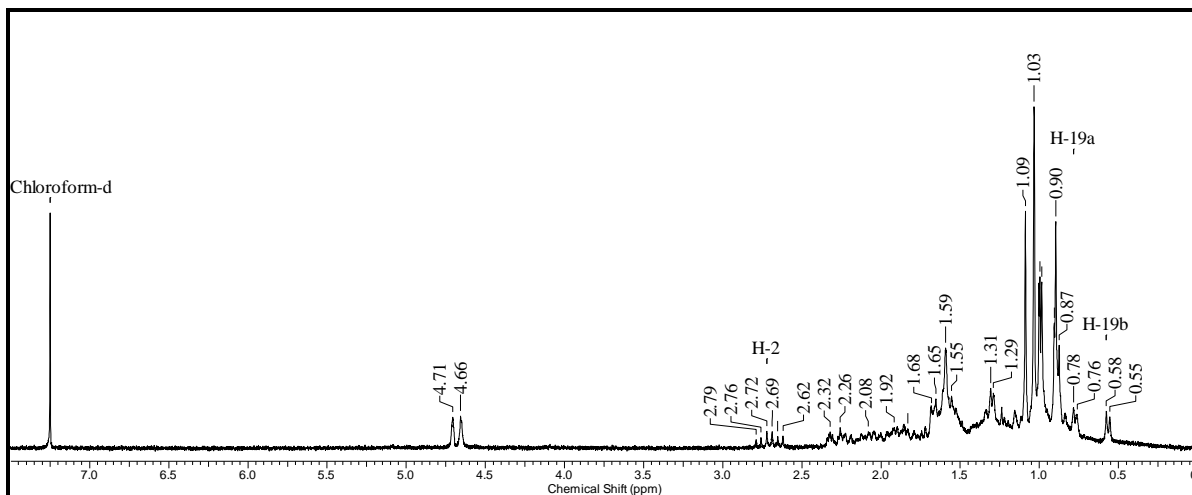


Figura 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **1**, **2** e **3**

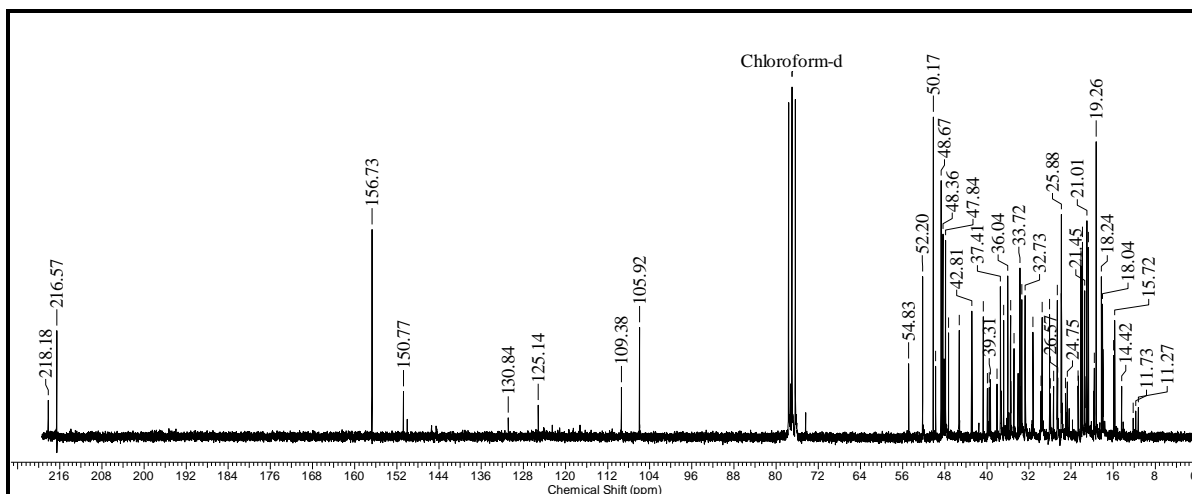


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de **1**, **2** e **3**

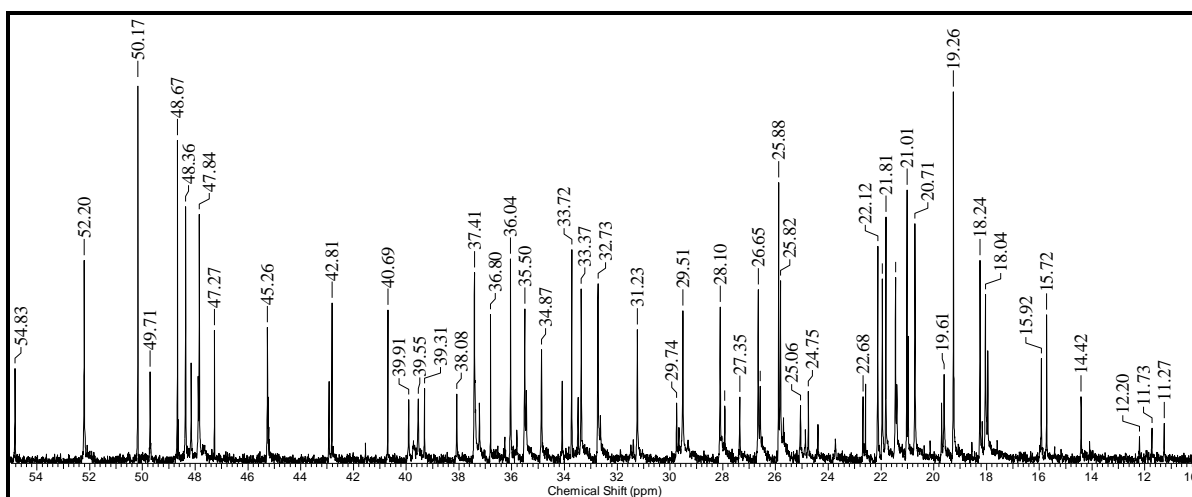


Figura 7. Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura **1**, **2** e **3** de 10 a 55 ppm

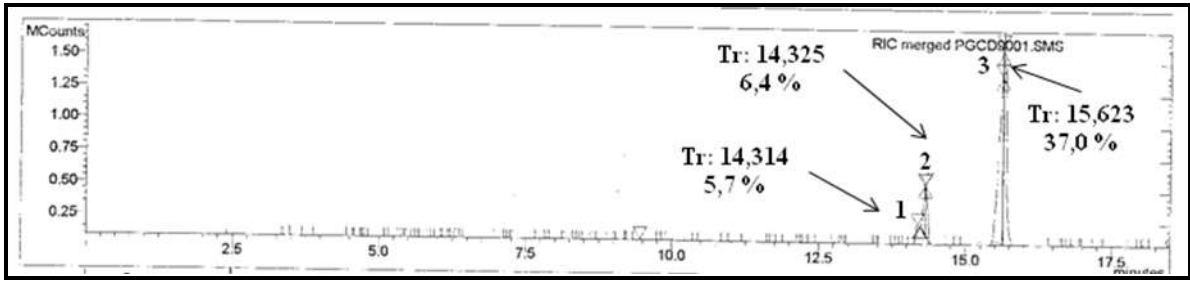


Figura 8. Cromatograma (CG) da mistura de cicloartanos

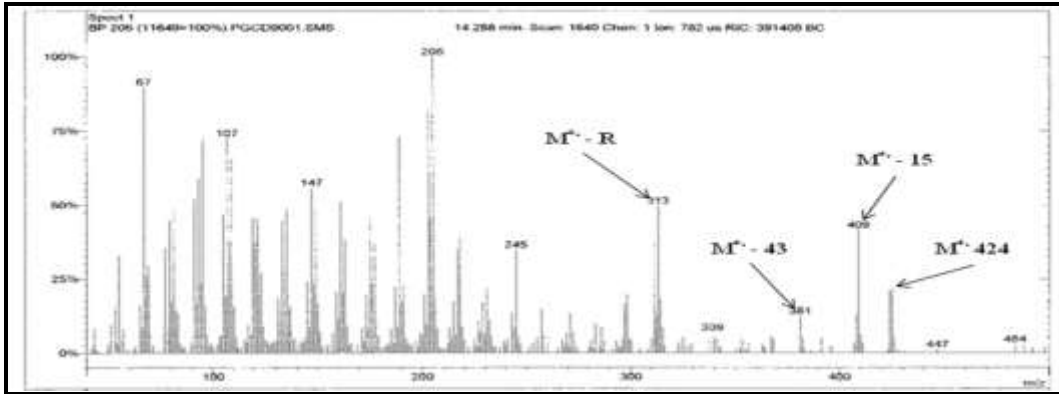


Figura 9. Espectros de massas das substâncias 1 e 2.

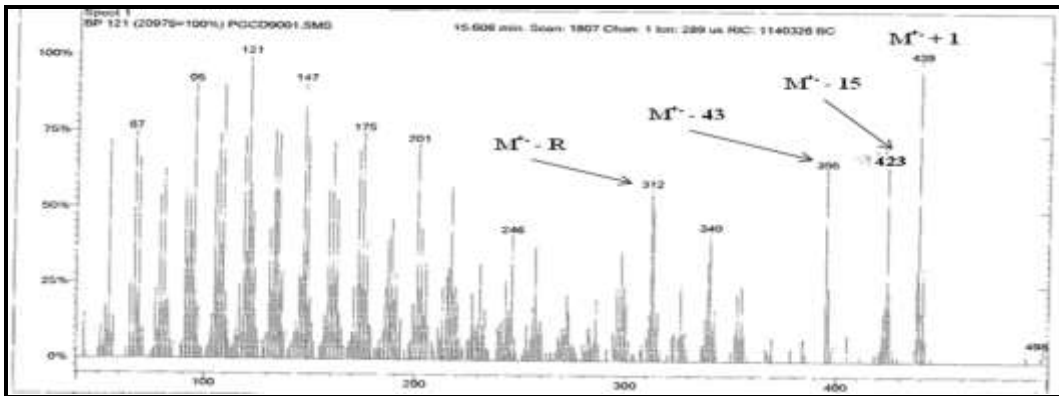
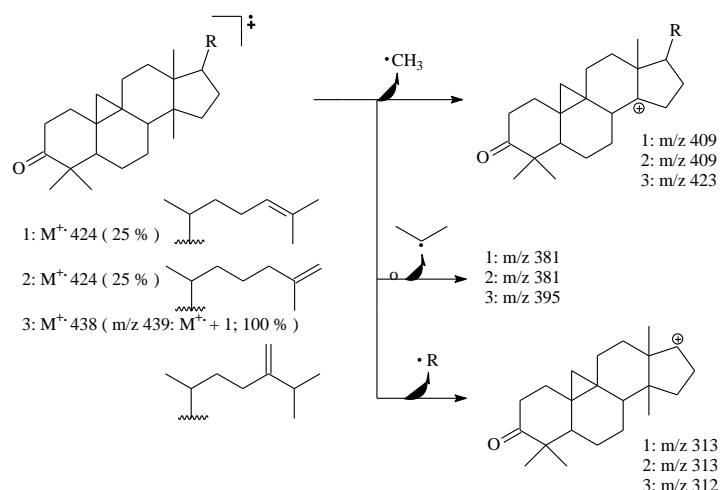


Figura 10. Espectros de massas da substância 3.



Esquema 5. Proposta de fragmentação da mistura **1 + 2 + 3** para justificar os principais picos detectados no EM.

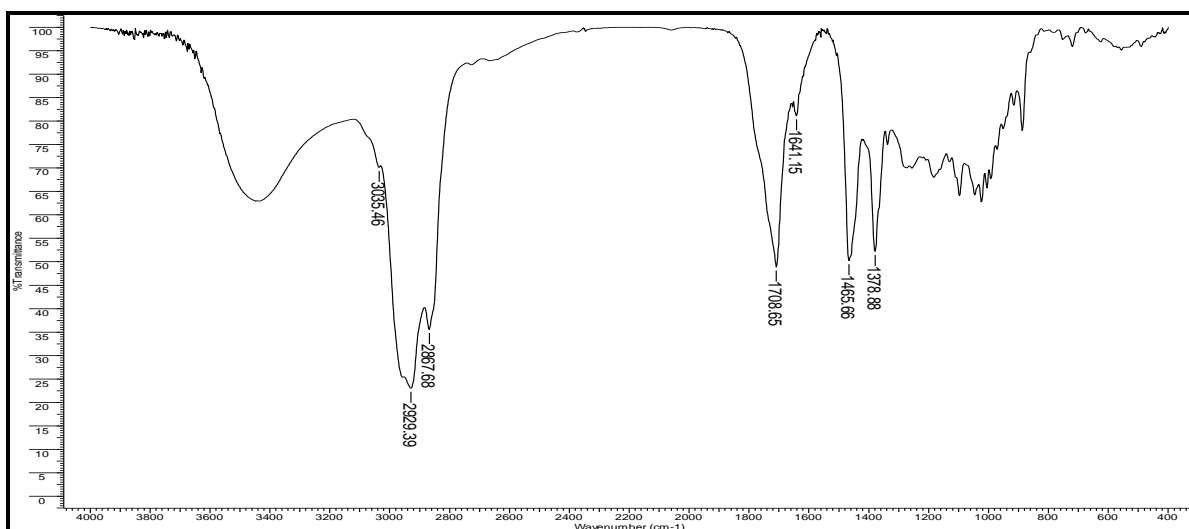


Figura 11. Espectro no infravermelho das substâncias **1, 2 e 3**

VI.1.2. Identificação da substância 4

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 13**) apresenta sinais compatíveis com o triterpeno **4**. Além dos sinais característicos de metilas de triterpeno, δ_{H} 0,73(*s*), 0,88(*s*), 0,96(*s*), 1,01(*d*), 1,05(*s*), 1,19(*s*), 1,26(*s*) e nos sinais em δ_{H} 1,96(*m*); 2,27(*m*) e 2,37(*m*) correspondentes aos hidrogênios vizinhos à função carbonila. A análise desses dados, aliados a considerações biossintéticas e comparação com valores da literatura (CARVALHO *et al*, 1995; VELANDIA, 2002; SILVEIRA & PESSOA, 2005). A comparação com padrão em placa de cromatografia em camada fina analítica permitiu confirmar a proposta. O espectro de IV de **4** (**Figura 14**) revela a presença de uma banda de absorção correspondente a estiramento de um

grupo carbonílico cetônico em 1714 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), deformação axial de CH, CH₂ e CH₃ em $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ e deformação angular de CH₃ em 1389 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$), que são bandas características de uma molécula alifática.

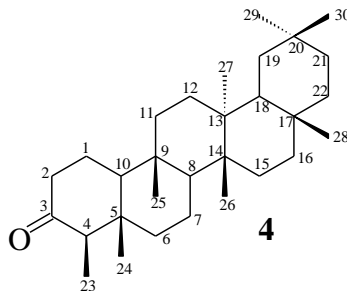


Tabela 2. Dados de RMN ¹H da substância 4, comparados com dados da literatura para friedelina (VELANDIA, 2002)

H	Substância 4 (CDCl ₃) δ _H (ppm)	Friedelina (CDCl ₃) δ _H (ppm)
H-1	1,96(<i>s</i>)	-
H-2	2,37(<i>s</i>)	2,15 -2,50(<i>m</i>)
H-4	2,27(<i>s</i>)	2,15 -2,50(<i>m</i>)
3H-23	0,88(<i>s</i>)	0,87(<i>s</i>)
3H-24, 3H-25, 3H-26	0,73(<i>s</i>); 0,88(<i>s</i>); 0,96(<i>s</i>)	0,72(<i>s</i>); 0,86(<i>s</i>); 0,94(<i>s</i>)
3H-27, 3H-28, 3H-29	1,01(<i>s</i>); 1,01(<i>s</i>); 1,05(<i>s</i>)	0,99(<i>s</i>); 1,04(<i>s</i>); 1,04(<i>s</i>)
3H-30	1,19(<i>s</i>)	1,17(<i>s</i>)

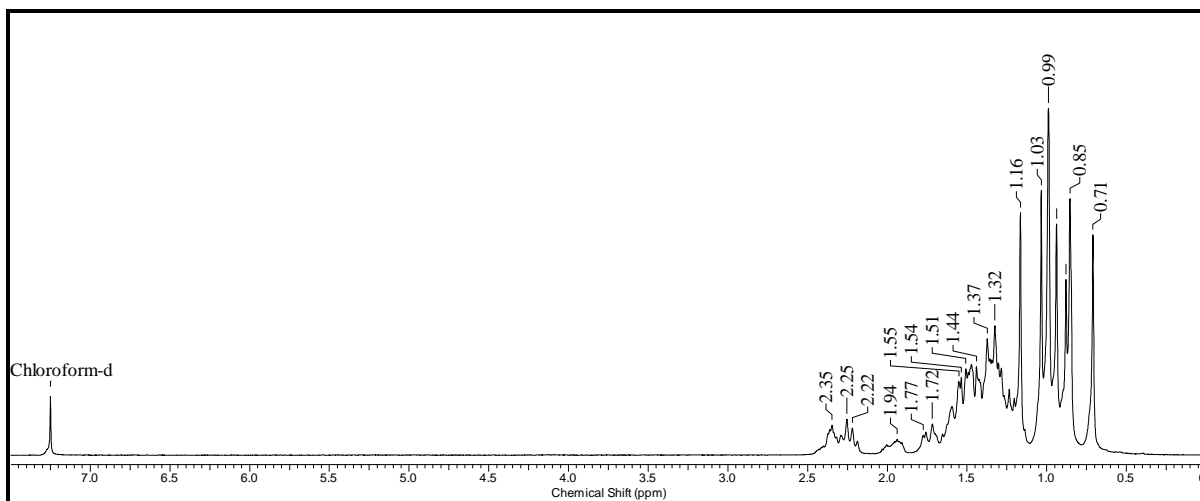


Figura 12. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância 4

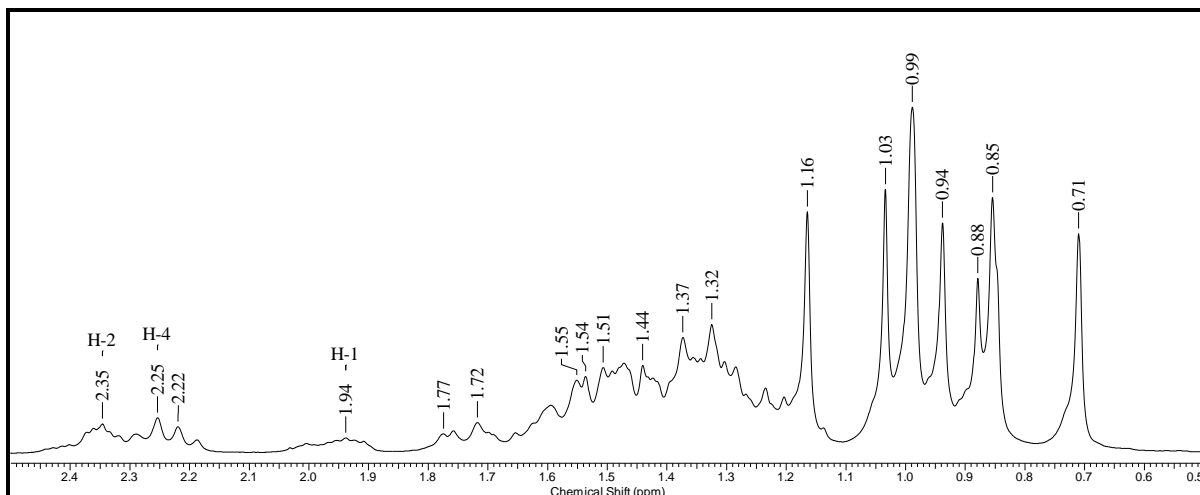


Figura 13. Expansão do espectro de RMN¹H da substância **4** de 0,5 a 2,5 ppm

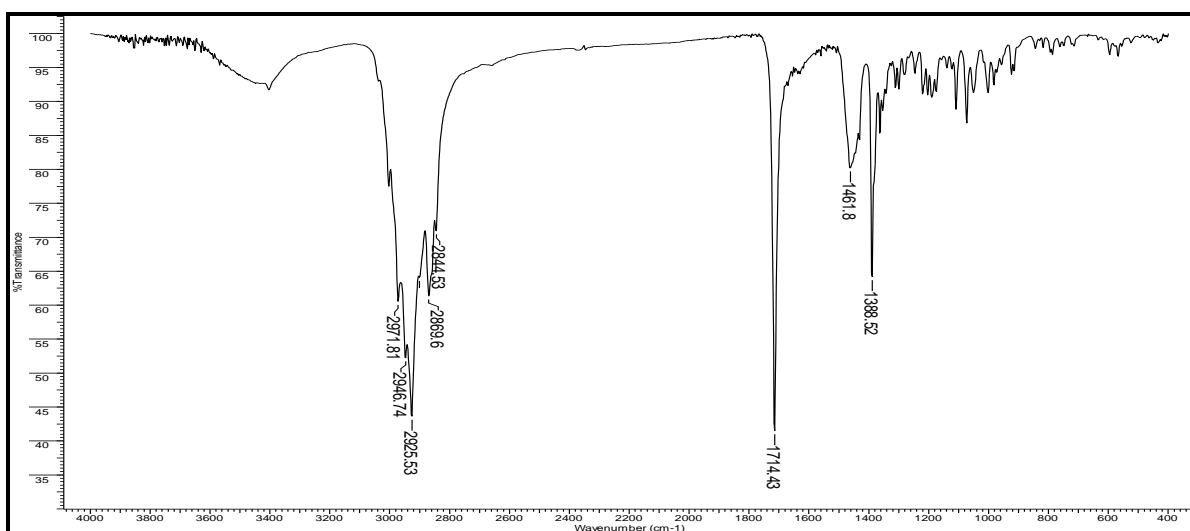


Figura 14. Espectro no infravermelho da substância **4**

VI.1.3. Identificação da substância **5**

O triterpeno **5** foi identificado através de análise dos espectros de IV, RMN ¹H, RMN ¹³C, e comparação com dados descritos na literatura (OHTSU *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2005b). O espectro de RMN ¹H (**Figura 15**) do triterpenóide **5** apresenta dois dubletos blindados, em δ_H 0,33 ($J=4,0$ Hz) e δ_H 0,54 ($J=4,0$ Hz), característico de hidrogênios metilênicos de ciclopropano, presentes em triterpenóide com esqueleto cicloartânico, juntamente com um duplo-dublete em δ_H 3,30 ($J= 4,4$ e 11 Hz) característicos de uma configuração β -hidroxi, dois singletos largos em δ_H 4,70 e 4,65, referentes a hidrogênios metilênicos em ligação dupla geminal dissustituída. O espectro RMN ¹³C apresenta 31 sinais, entre eles um grupo oximetínico em δ_C 78,8 (C-3) e dois carbonos olefínicos em δ_C

105,9 (C-31) e δ_c 157,0 (C-24). Estes dados são compatíveis com um triterpenóide tipo cicloartano-3 β -ol (OHTSU *et al.*, 1998). O espectro de IV (**Figura 17**) apresenta $\nu_{\text{máx}}$ em 3423 cm^{-1} absorção característica de estiramento O-H; absorção de esqueleto carbônico em 2958 e 2918 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}} = 1464 \text{ cm}^{-1}$ para CH_2 e 1377 cm^{-1} para CH_3 ; $\nu_{\text{C=C}} = 1647 \text{ cm}^{-1}$ e 1061 cm^{-1} para estiramento C-O, além de uma banda de 3037 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$ de grupo vinilídina.

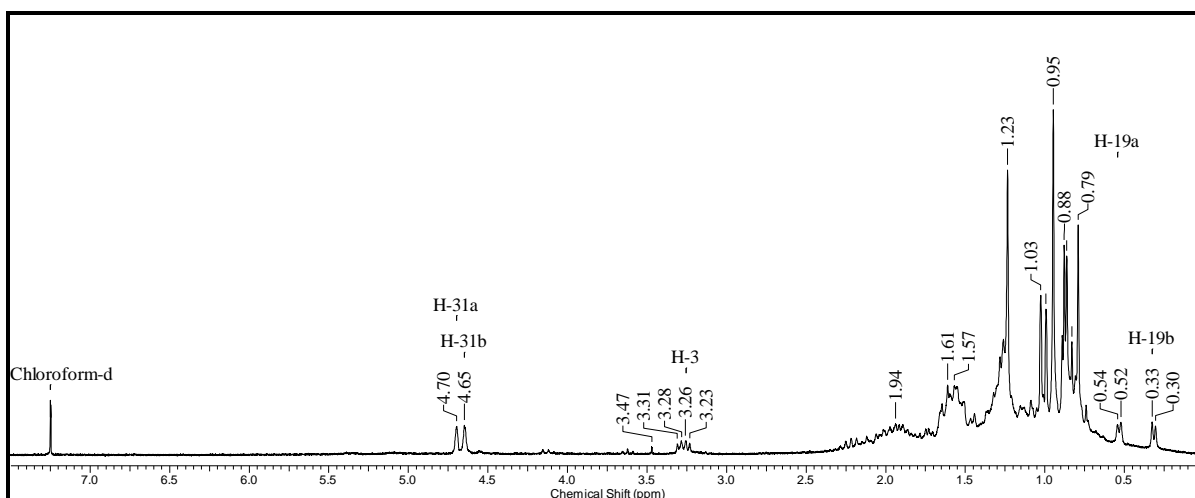
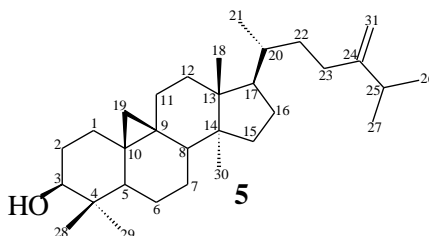


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 5

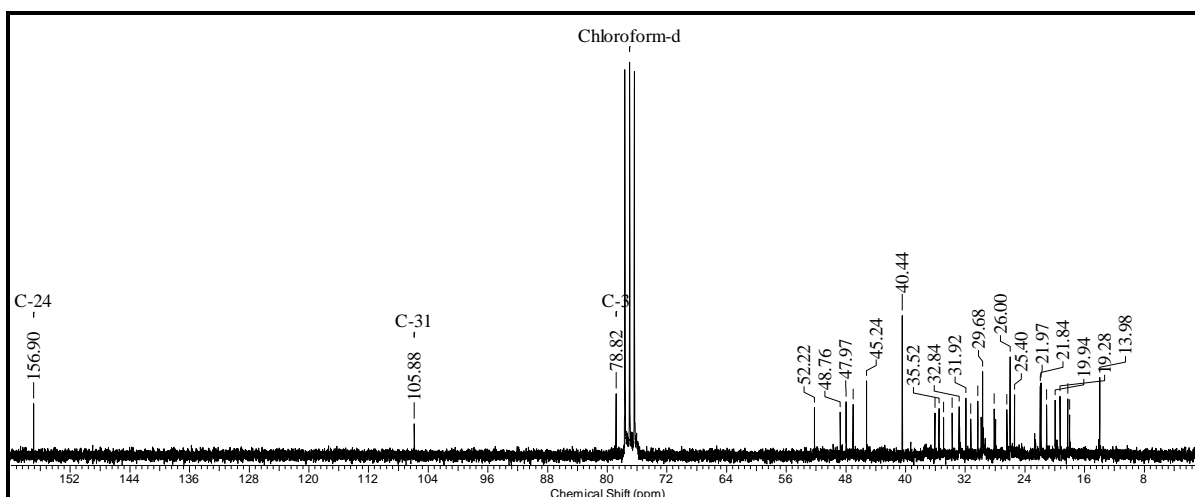


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 5

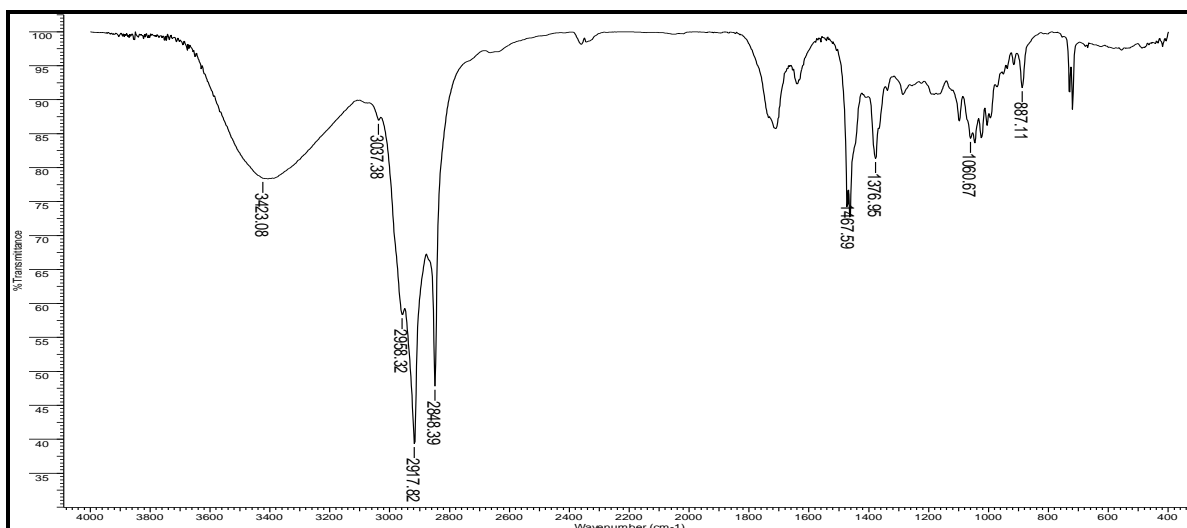


Figura 17. Espectro no infravermelho da substância **5**

VI.1.4. Identificação das substâncias 6, 7 e 8

Os esteróides **6**, **7** e **8** foram obtidos em mistura e identificados através da análise dos espectros de IV, RMN ^1H e comparação com dados descritos na literatura (CARVALHO *et al.*, 2001) e principalmente pela análise com CG-EM. O espectro de RMN de ^1H (**Figura 18**) apresenta sinais entre δ_{H} 0,7 e 1,05 de grupos metílicos com multiplicidades característica de esteróides (RUBINSTEIN *et al.*, 1976), um multipletto em δ_{H} 3,55 para o hidrogênio carbinólico (H-3), o singletto largo um em δ_{H} 5,37 correspondente a hidrogênio olefínico (H-6), de esteróides. Os sinais em δ_{H} 5,17 e 5,06 ambos com (*dd*, $J_1=12,0$ Hz, $J_2=8$ Hz) correspondem aos hidrogênios H-22 e H-23 de estigmasterol. Os dados obtidos por análise em RMN revelam sinais atribuídos aos componentes **7** e **8**. A análise deste material com CG-EM (**Figura 19**) revelou a presença de três componentes com $\text{Tr} = 13,20, 13,66$ e $14,81$ min. Os espectros de massas dos componentes de cada pico foram comparados com os da espectroteca (**Figura 20, 21 e 22**) e além de confirmar a proposta dos esteróides sitosterol (**7**) e estigmasterol (**8**), revelou um terceiro componente, sendo identificado como campesterol (**6**). O espectro de IV (**Figura 23**) apresenta $\nu_{\text{máx}}$ em 3423 cm^{-1} absorção característica de estiramento O-H; absorção de esqueleto carbônico em 2960 e 2935 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$: 1466 cm^{-1} para CH_2 e 1383 cm^{-1} para CH_3 ; $\nu_{\text{C=C}} = 1647\text{ cm}^{-1}$ e 1055 cm^{-1} para estiramento C-O. As absorções observadas na região do infravermelho são comuns as três substâncias da mistura.

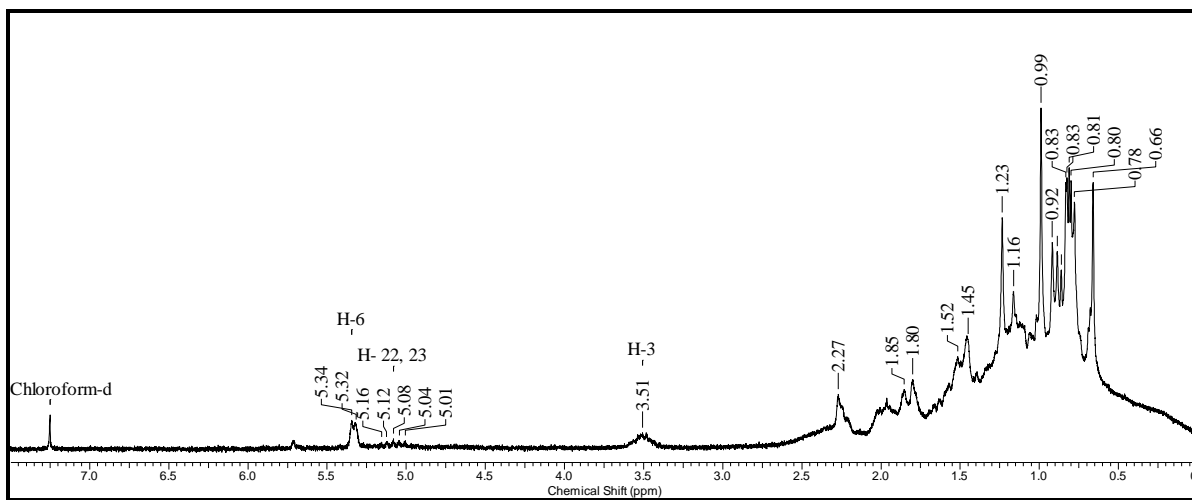
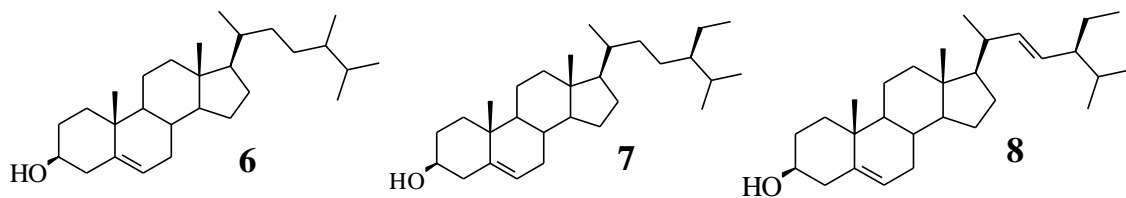


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **6**, **7** e **8**

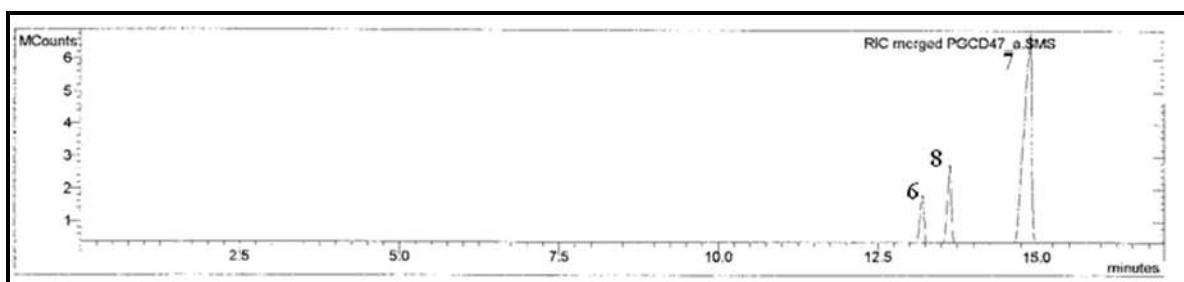


Figura 19. Cromatograma (CG) da mistura de esteróides

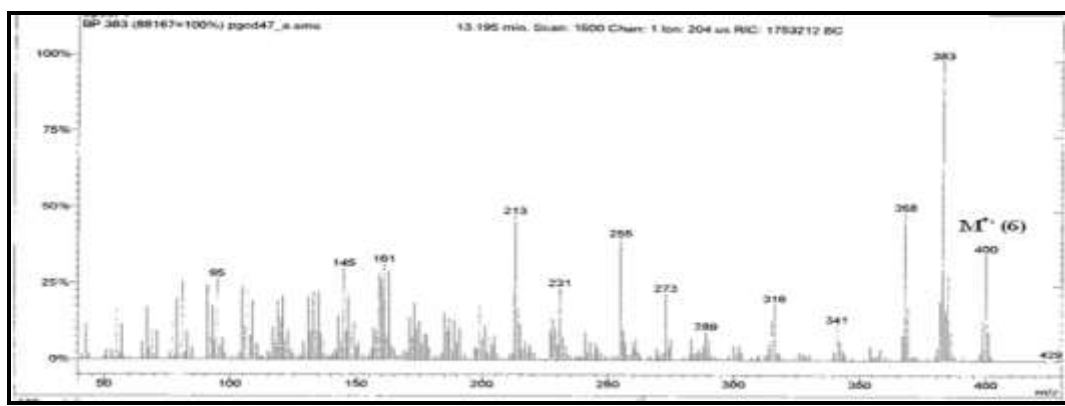


Figura 20. Espectros de massas da substância **6**

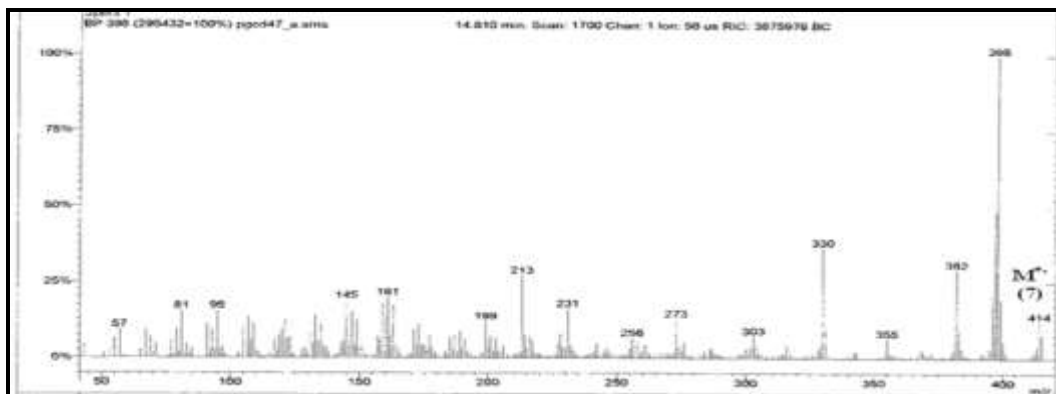


Figura 21. Espectros de massas da substância 7

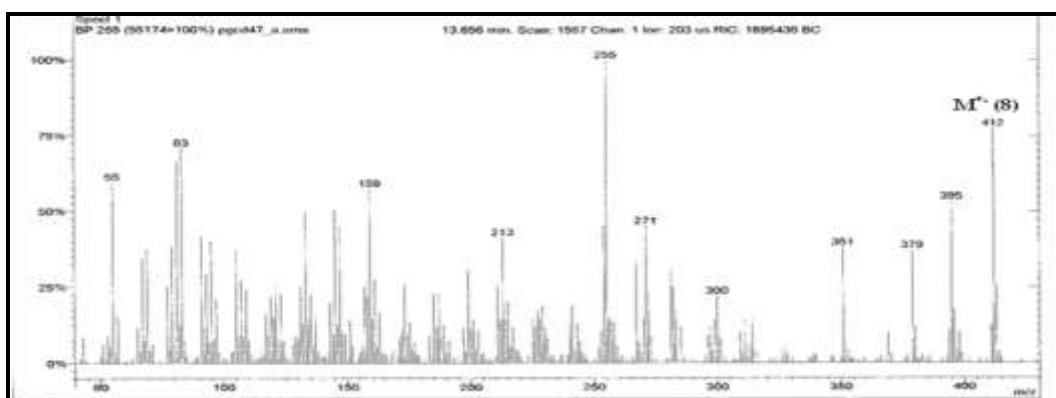


Figura 22. Espectros de massas da substância 8

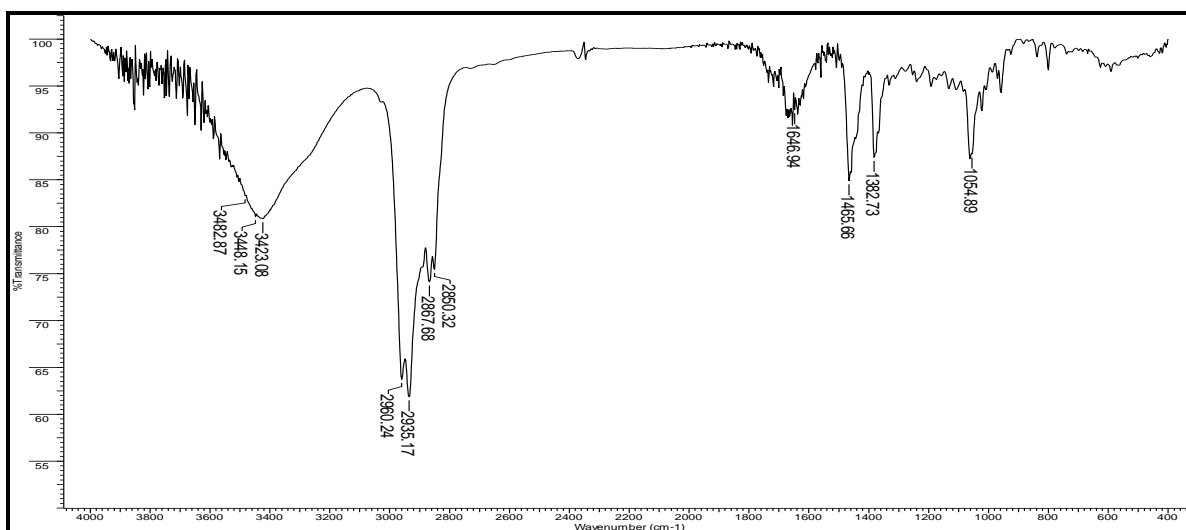


Figura 23. Espectro no infravermelho das substâncias 6, 7 e 8

VI.1.5. Identificação da substância 9

O triterpeno **9** foi identificado através de análise dos espectros de IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e comparação com dados descritos na literatura (GALEGOS & ROQUE, 1990). O

espectro de RMN ^1H (**Figura 24**) revelou a presença de sinais simples correspondente a sete grupos metila, sendo que uma destas metilas apresentou deslocamento químico em δ_{H} 1,66, sendo atribuído à metila ligada a carbono sp^2 . Os sinais de dois dubletos em δ_{H} 4,68 (H-29a) e 4,55 (H-29b) (2,1 Hz) de dois hidrogênios vinílicos e o singlete em 1,66 confirma a presença deste grupo funcional sustentando um grupo metila. Os espectros de RMN ^{13}C (**Figura 25**) confirma a presença de carbonos olefínicos (δ_{C} 150,8 e δ_{CH_2} 109,3) e do carbono característico do grupo carbonila de cetona (δ_{C} 218,3). Os demais sinais estão de acordo com os deslocamentos químicos dos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos do triterpeno da série dos lupanos permitindo propor a estrutura da lupeona para **9**. O espectro de IV (**Figura 26**) uma banda de 3070 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$ de grupo vinilidina, absorção de esqueleto carbônico em 2941 e 2856 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$, 1456 cm^{-1} para CH_2 e 1381 cm^{-1} para CH_3 , $\nu_{\text{C=C}} = 1643\text{ cm}^{-1}$ e uma banda em absorção em 1705 cm^{-1} $\nu_{\text{C=O}}$, típica de grupo cetona.

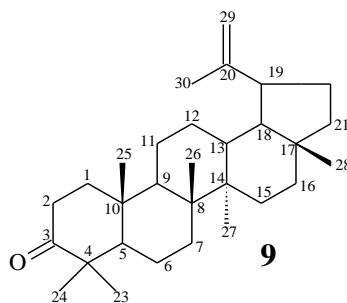


Tabela 3. Comparação dos dados de RMN ^{13}C das substâncias **9** e **10** com valores da literatura (GALEGOS & ROQUE, 1990; SOBRINHO *et al.*, 1991).

C	δ_c (ppm)			
	Substância 9 (CDCl_3)	Lupeona (CDCl_3)	Substância 10 (CDCl_3)	Lupeol (CDCl_3)
1	39,6	39,7	38,8	38,7
2	34,1	34,0	27,4	27,4
3	218,3	217,0	78,9	79,0
4	47,3	47,3	38,7	38,8
5	54,9	55,0	55,2	55,3
6	19,6	19,8	18,3	19,0
7	33,5	33,6	34,2	34,3
8	40,7	40,9	40,8	41,1
9	49,7	49,8	50,4	50,4
10	36,8	37,0	37,1	37,1
11	21,4	21,4	20,9	20,9
12	25,1	25,1	25,1	25,1
13	38,1	38,3	38,0	38,0
14	43,0	43,0	42,8	42,8
15	27,4	27,4	27,4	27,3
16	35,5	35,6	35,5	35,6
17	42,8	43,0	43,0	43,0
18	48,2	48,2	48,2	48,3
19	47,9	47,9	47,9	48,0
20	151,1	150,5	151,0	150,9
21	29,8	29,9	29,7	29,4
22	39,9	40,0	40,0	40,0
23	26,6	26,7	28,0	28,0
24	21,0	21,1	15,4	15,3
25	15,7	15,8	16,0	16,0
26	16,0	16,0	16,1	16,1
27	14,5	14,6	14,5	14,5
28	18,0	18,1	18,0	18,0
29	109,4	109,6	109,3	109,3
30	19,3	19,4	19,3	19,3

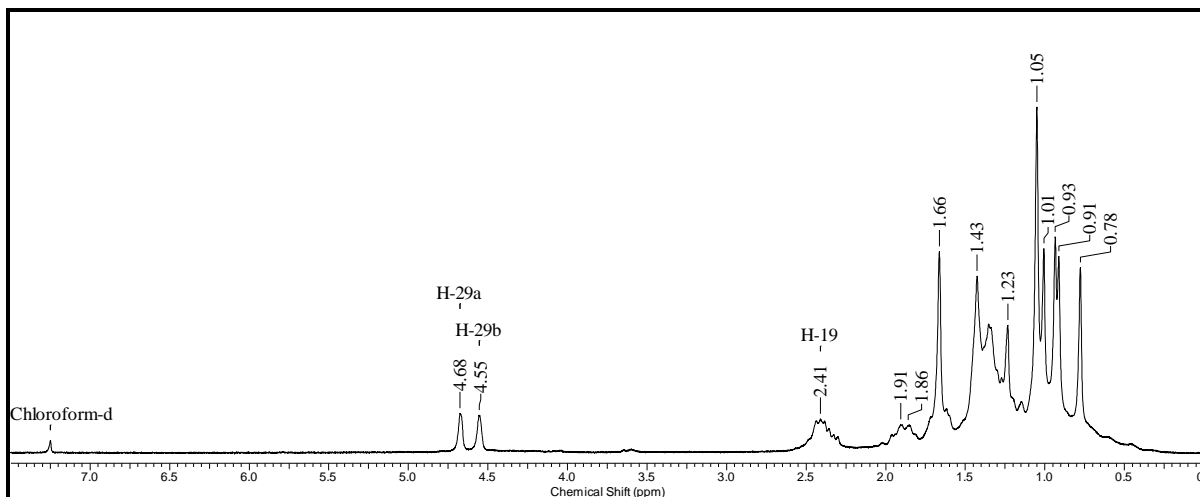


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **9**

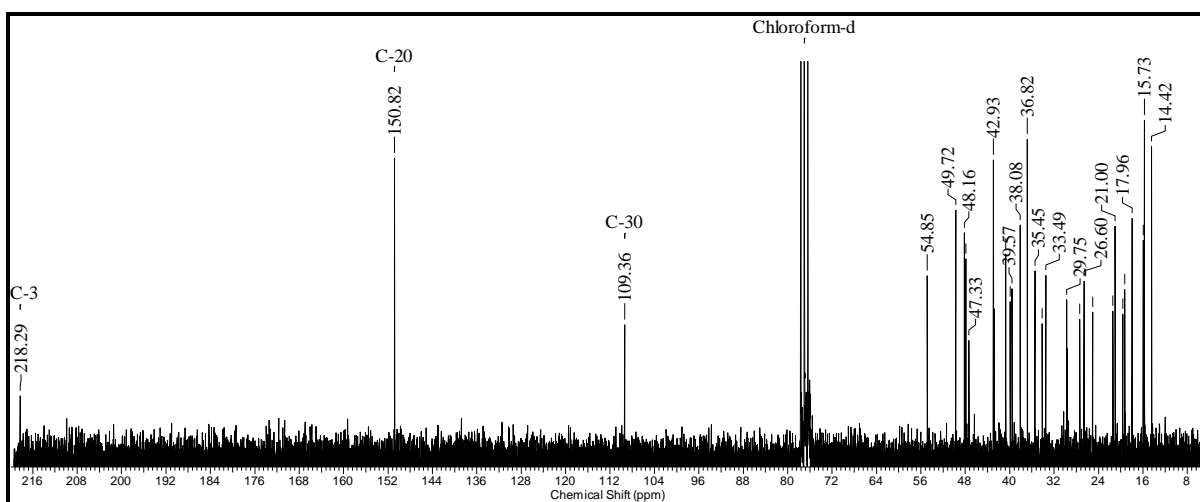


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **9**

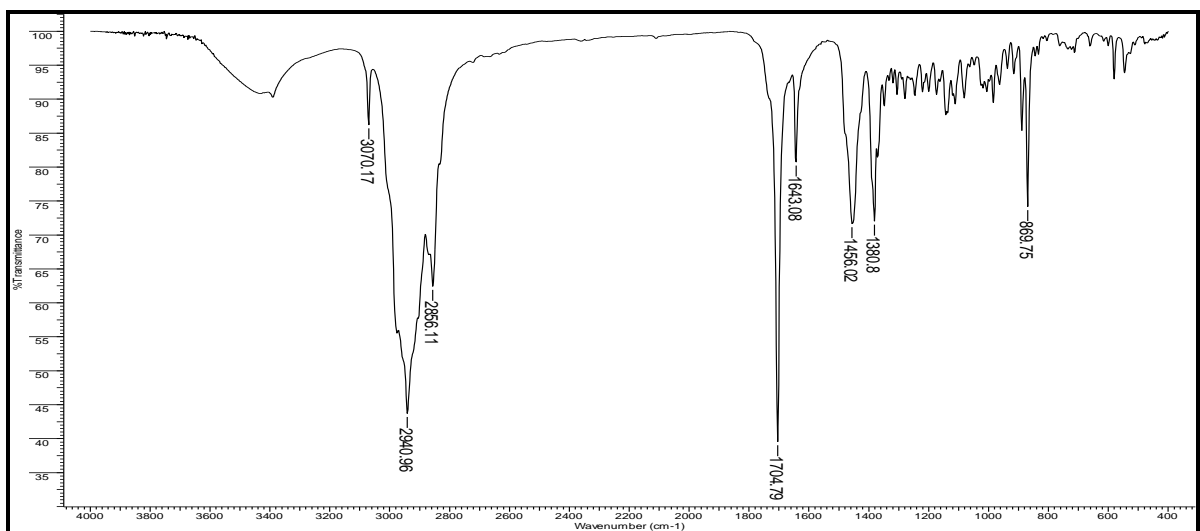
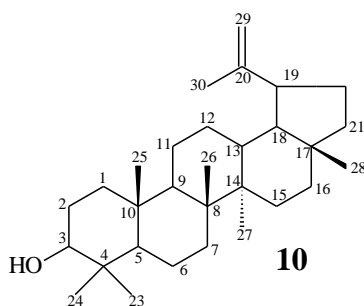


Figura 26. Espectro no infravermelho da substância **9**

VI.1.6. Identificação da substância 10

O triterpeno **10** foi identificado através de análise dos espectros de IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (GALEGOS & ROQUE, 1990; SOBRINHO *et al.*, 1991). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (**Figura 27**) representam os hidrogênios metílicos (δ_{H} 0,74 e 1,65). O duplo dubleto em δ_{H} 3,23 ($J= 10,8$ e $5,2$ Hz) corresponde ao hidrogênio carbinólico H-3. Os sinais de dois dubletos em δ_{H} 4,70 e 4,57 (2,1 Hz) de dois hidrogênios vinilídínico e o singlete em 1,66 confirma a presença deste grupo funcional sustentando um grupo metila. Estes sinais são característicos de triterpenos da série lupano. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 28**) confirma a presença de carbonos olefínicos (δ_{C} 150,9 e δ_{CH_2} 109,3) e do carbono carbinólico (δ_{CH} 79,0). Os demais sinais estão de acordo com os deslocamentos químicos dos carbonos metínicos, metilênicos e metílicos do triterpeno da série indicada acima permitindo propor a estrutura do lupeol para **10**. A comparação dos deslocamentos dos carbonos do lupeol estão na **Tabela 3**. O espectro de IV (**Figura 29**) apresenta $\nu_{\text{máx}}$ em 3342 cm^{-1} absorção característica de estiramento O-H, 3067 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$ de grupo vinilídina, absorção de esqueleto carbônico em 2945 e 2872 cm^{-1} para $\nu_{\text{C-H}}$, 1454 cm^{-1} para CH_2 e 1379 cm^{-1} para CH_3 , $\nu_{\text{C=C}} = 1637\text{ cm}^{-1}$ e 1043 cm^{-1} para estiramento C-O.



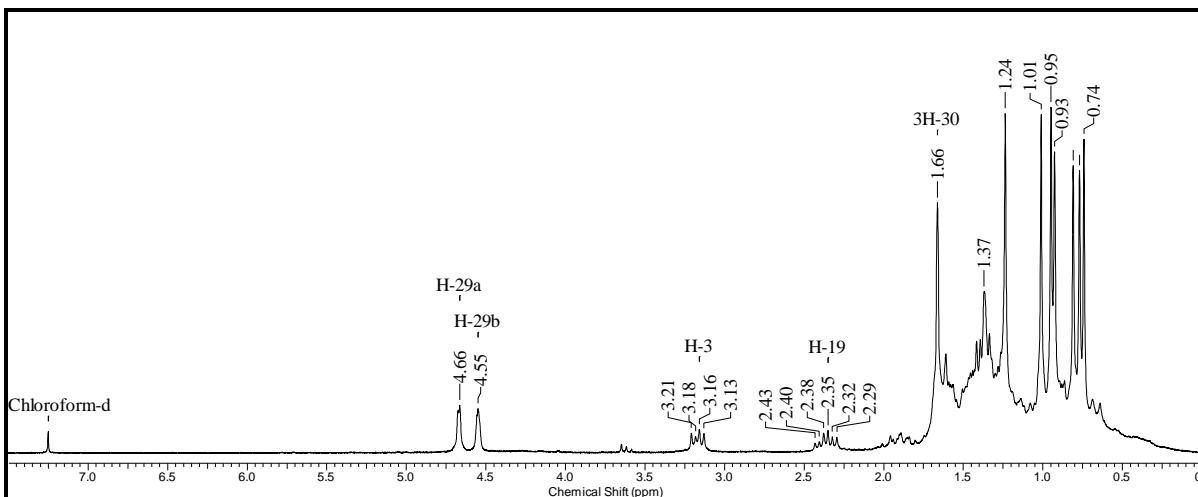


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **10**

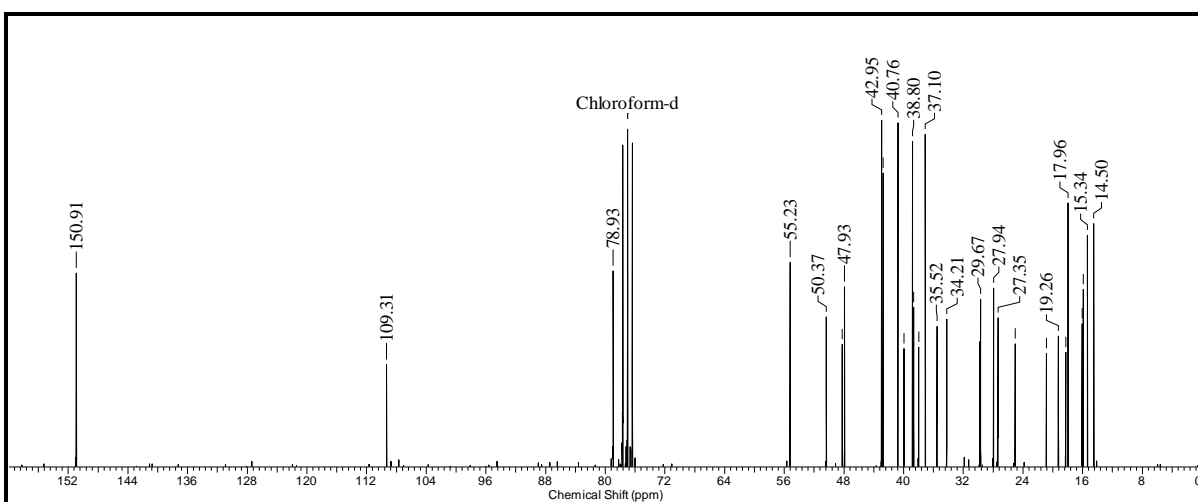


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **10**

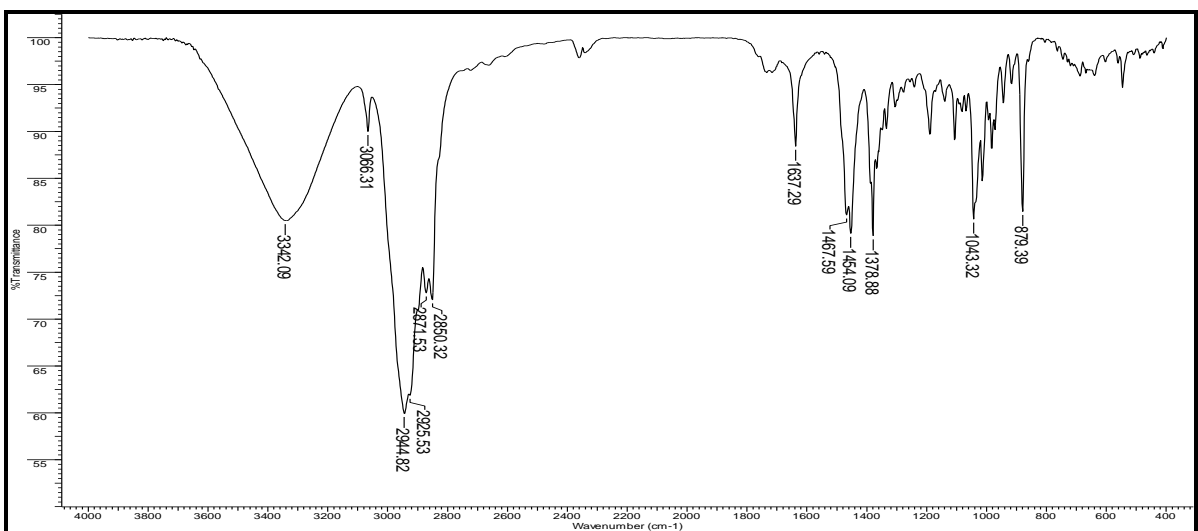


Figura 29. Espectro no infravermelho da substância **10**

IV.1.7. Identificação do derivado 10a

O derivado **10a** foi obtido por acetilação com anidrido acético e piridina, e foi identificado por análise de RMN ^1H e IV, que permitiram visualizar as modificações esperadas do esqueleto estrutural da substância **10**. No espectro de RMN ^1H (**Figura 30**) o produto foi confirmado com o aumento do valor de deslocamento químico do H-3 (δ_{H} 3,23) para δ_{H} 4,45, devido a desproteção deste hidrogênio pelo grupo acetila, bem como o surgimento do sinal em δ_{H} 2,03, referente ao grupo metila do acetato. Com o espectro de IV (**Figura 31**) pode-se observar o desaparecimento da banda de absorção em 3342 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$) do grupo hidroxila do C-3 e o surgimento das bandas em 1733 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) e 1247 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$) da função éster confirmando a formação do derivado.

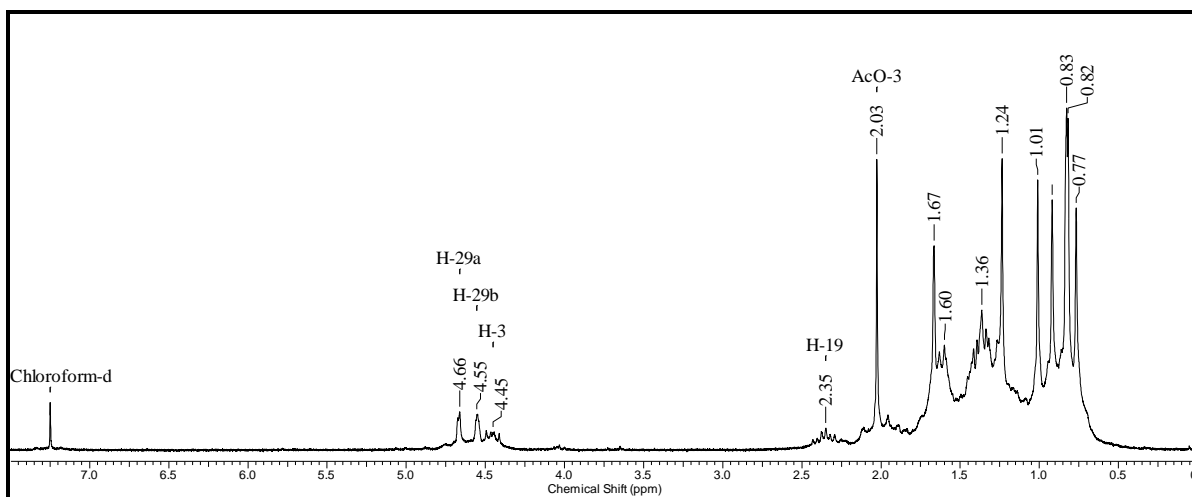
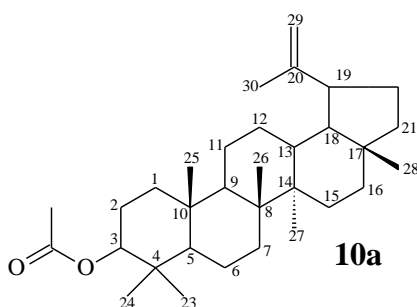


Figura 30. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do derivado **10a**

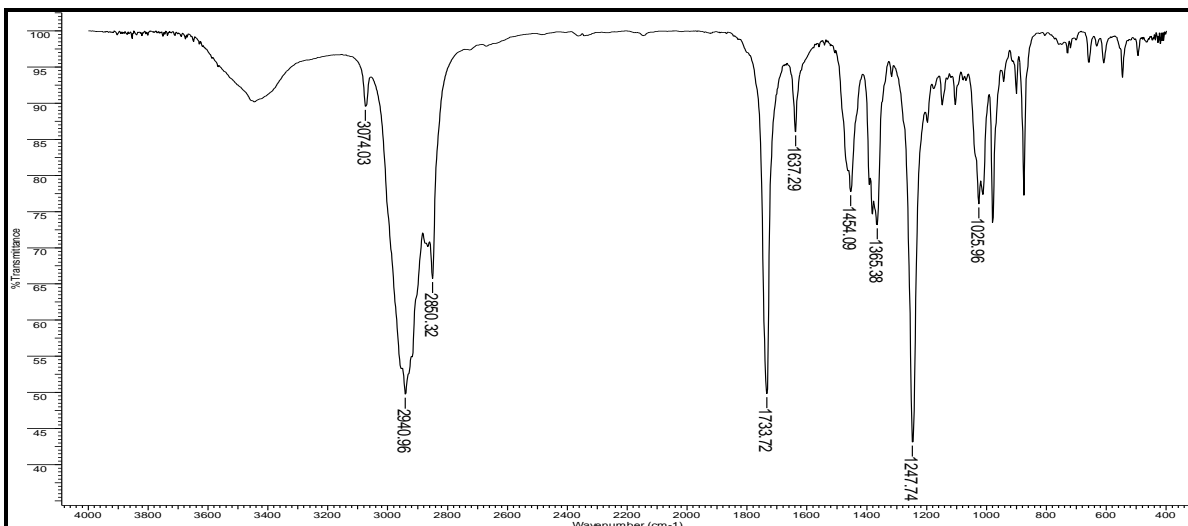


Figura 31. Espectro no infravermelho do derivado **10a**

VI.2. Determinação estrutural dos constituintes isolados da raiz de *P. gonoacantha*

O fracionamento cromatográfico dos extratos da raiz de *P. gonoacantha* conduziu à identificação de 8 substâncias, cujas estruturas estão representadas a seguir. As estruturas **11-14** estão sendo registradas pela primeira vez no gênero.

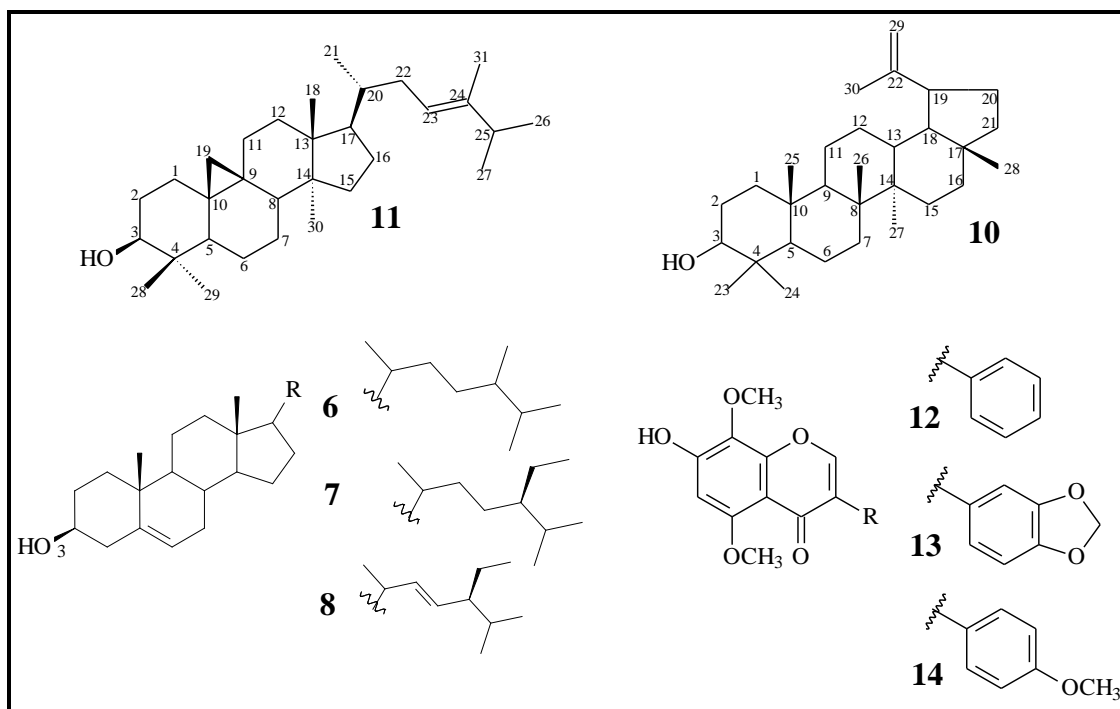


Figura 32. Estruturas dos constituintes isolados da raiz de *P. gonoacantha*.

VI.2.1. Identificação das substâncias 10 e 11.

Os triterpenos lupânico (**10**) e cicloartânico (**11**) foram obtidos em mistura e identificados através dos espectros de RMN ^1H e principalmente pela análise com CG-EM. O espectro de RMN ^1H (**Figura 33**) da mistura das substâncias **10 e 11** apresenta dois dubletos blindados, em δ_{H} 0,31 ($J=4,0$ Hz) e δ_{H} 0,53 ($J=4,0$ Hz), característico de hidrogênios metilênicos de ciclopropano, presentes em triterpenóide com esqueleto cicloartânico, juntamente com um duplo-dublete em δ_{H} 3,16 ($J= 4,4$ e 11 Hz) característicos de uma configuração β -hidroxi, um triplete em δ_{H} 5,09 correspondente ao hidrogênio metínico da vinilidina, além de sinal em δ_{H} 1,59 do grupo metila ligado a carbono sp^2 . Já a presença de um duplo dublete em δ_{H} 3,29 ($J= 10,8$ e 5,2 Hz) corresponde ao hidrogênio carbinólico H-3, além dos sinais de dois dubletos em δ_{H} 4,67 e 4,55 (2,1 Hz) de dois hidrogênios vinilidínico e o singlete em 1,67 confirma a presença deste grupo funcional sustentando um grupo metila, estes sinais reforçam a presença de um triterpeno da série lupano. A análise da fração contendo estes triterpenos com CG acoplado com EM apresentou o cromatograma, **Figura 34**, permitindo identificar os triterpenos: (**11**), $\text{Tr} = 19,871$ min., (11,6 %) e (**10**), $\text{Tr} = 20,195$ min., (74,3 %) e os respectivos espectro de massas, **Figura 35 e 36**.

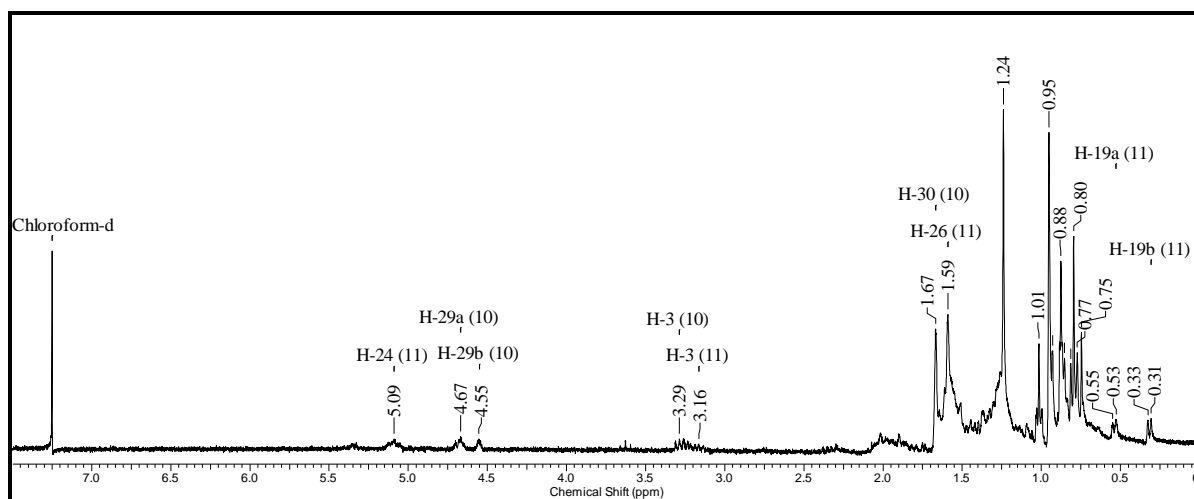
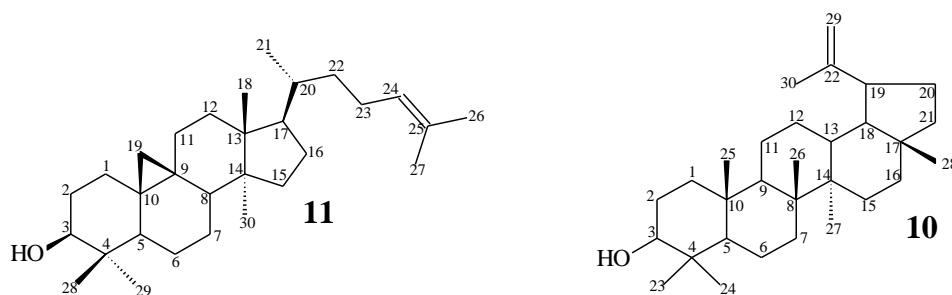


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **10 e 11**

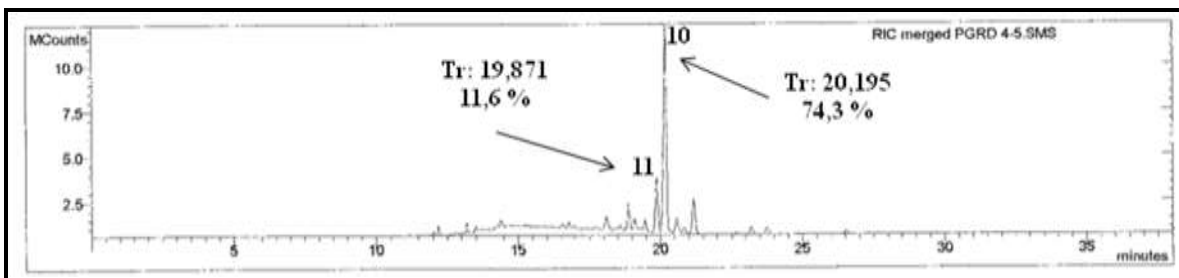


Figura 34. Cromatograma (CG) da mistura de triterpenos

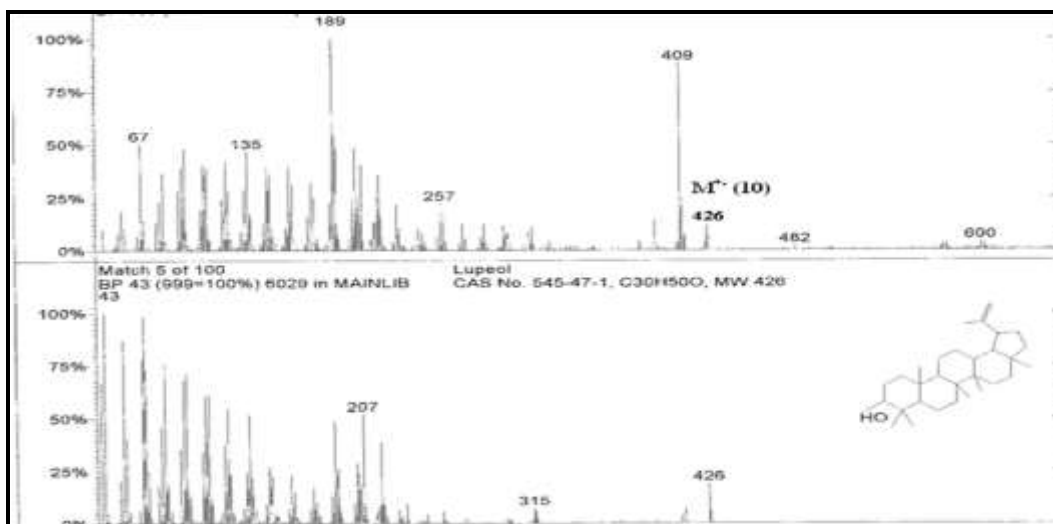


Figura 35. Espectros de massas da substância **10** e comparação com a biblioteca NIST 08

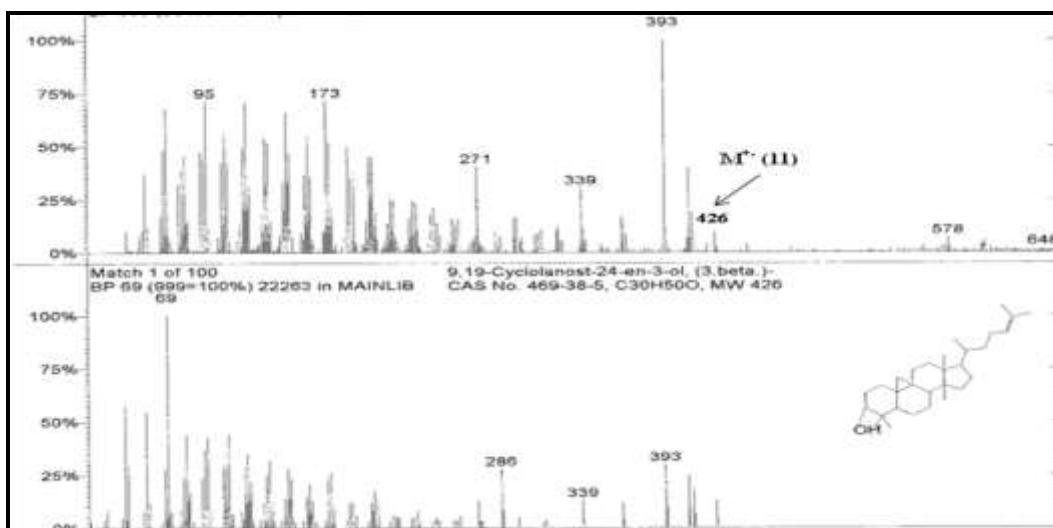


Figura 36. Espectros de massas da substância **11** e comparação com a biblioteca NIST 08

VI.2.2. Identificação das substâncias 12, 13 e 14.

As frações que indicaram a presença de flavonóides em CCDA foram analisadas por RMN ^1H , RMN ^{13}C e CL-EM-IES, e mostraram mistura de substâncias. A análise do espectro

de RMN ^1H (**Figura 37**) permitiu verificar sinais de hidrogênios em δ_{H} 8,4; 8,3 e 8,2 ppm que podem ser atribuídos a H-2 de isoflavonas; os sinais em δ_{H} 6,0; 6,43; 6,7; 6,9; 7,0; 7,08; 7,4; 7,5; 7,72 e 7,8 podem ser atribuídos a hidrogênios de sistema aromático do anel A e B dos isoflavonóides. Além do sinal em δ_{H} 10,60 ppm que pode ser de hidroxila fenólica, há sinais de metoxilas em δ_{H} 3,89; 3,80 e 3,79 ppm e do grupo metilenodioxila em δ_{H} 6,03 e δ_{C} .100,09 (**Figura 41**). Os sinais observados nos espectros 2D: $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY e HSQC (**Figura 42 e 43**), serviram para confirmar a proposta das isoflavonas, através do $^1\text{J}_{\text{CH}}$ dos hidrogênios H-2 e H-6 com carbonos cujos deslocamentos químicos são compatíveis para CH-2 e CH-6 de isoflavonas. Os valores dos deslocamentos químicos e multiplicidades observados nos espectros de RMN ^{13}C (BD e DEPT) estão de acordo com as propostas para **12-14** (**Tabela 4**). Para detectar o número de componentes na mistura fez-se análise por CL-EM-ESI (**Figuras 45, 46, 47 e 48**). O EM forneceu os valores dos íons quase moleculares de cada componente. A análise dos espectros de massas com sistema de íons positivos (a) e negativos (b) permitiu identificar os valores de m/z para a substância **12**, **Figura 46a**: $m/z = 269$ ($299 - \text{OCH}_2$), 299 ($\text{M} + \text{H}^+$), 321 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 619 ($2x\text{M} + \text{Na}^+$) e **Figura 46b**: 239 ($267 - 28$) ou $180 + \text{H}_3\text{CCO}_2^-$), 267 ($\text{M} - \text{H} - \text{OCH}_2$), 297 ($\text{M} - \text{H}$), 357 ($\text{M} + \text{H}_3\text{CCO}_2^-$); para a substância **13**, **Figura 47a**: $m/z = 313$ ($\text{M} + \text{H}^+ - \text{OCH}_2$), 343 ($\text{M} + \text{H}^+$), 365 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 707 ($2x\text{M} + \text{Na}^+$); e **Figura 47b**: $m/z = 239$ ($180 + \text{H}_3\text{CCO}_2^-$), 311 ($341 - \text{OCH}_2$), 341 ($\text{M} + \text{H}^+$); e para a substância **14**, **Figura 48a**: $m/z = 271$ ($299 - \text{CO}$), 299 ($\text{M} + \text{H}^+ - \text{OCH}_2$), 329 ($\text{M} + \text{H}^+$), 351 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 512 ($2x 271 - \text{OCH}_2$), 679 ($2x\text{M} + \text{Na}^+$) e **Figura 48b**: 269 ($297 - \text{CO}$), 297 ($\text{M} - \text{H} - \text{OCH}_2$), 327 ($\text{M} - \text{H}$), respectivamente com os tempos de retenção 48,9 min; 51,3 min e 52,3 min (**Figura 45**), confirmando a proposta das isoflavonas: **12** como 7-hidróxi-5,8-dimetóxi-isoflavona, **13** como 7-hidróxi-5,8-dimetóxi-3',4'-metilenodioxil-isoflavona e **14** como 7-hidróxi-5,8,4'-trimetóxi-isoflavona.

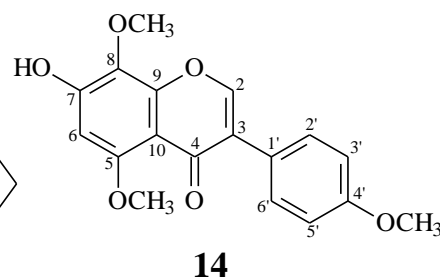
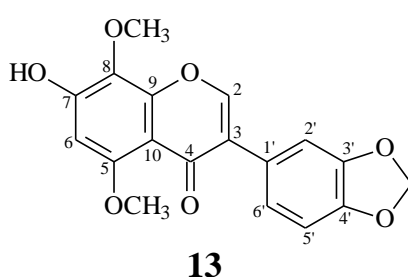
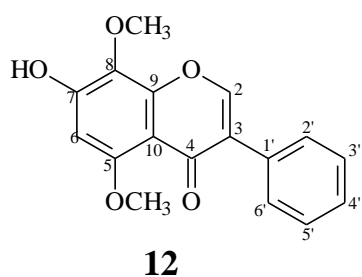


Tabela 4. Dados de RMN (δ , DMSO- d_6) ^1H (500 MHz) ^{13}C (125 MHz) da mistura de isoflavonas **12**, **13** e **14**.

C	12		13		14	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	152,6	8,3	152,9	8,4	151,3	8,2
3	124,5	-	124,1	-	124,4	-
4	174,8	-	174,0	-	173,8	-
5	155,6	-	156,1	-	155,8	-
6	99,0	6,7 (<i>s</i>)	99,0	6,7 (<i>s</i>)	99,0	6,7 (<i>s</i>)
7	158,9	-	158,8	-	158,9	-
8	134,7	-	135,9	-	130,0	-
9	151,6	-	151,7	-	152,6	-
10	107,9	-	109,6	-	108,0	-
1'	122,6	-	125,9	-	120,7	-
2'	130,1	7,5 (<i>d</i>)		7,08	130,3	7,43 (<i>d</i>)
3'	122,3	7,0 (<i>m</i>)	146,9		113,0	6,9 (<i>m</i>)
4'	123,5	7,0 (<i>m</i>)	146,8		158,9	-
5'	123,9	7,0 (<i>m</i>)	109,4	7,15 (<i>m</i>)	113,0	6,9 (<i>m</i>)
6'	130,1	7,5 (<i>d</i>)	120,7	7,72 (<i>d</i>)	130,3	7,43 (<i>d</i>)
MeO-5	60,8		61,7		61,7	
MeO-8	55,1		55,1		55,1	
MeO-4'	-	-	-	-	55,9	
O ₂ CH ₂	-	-	100,9	6,0	-	-

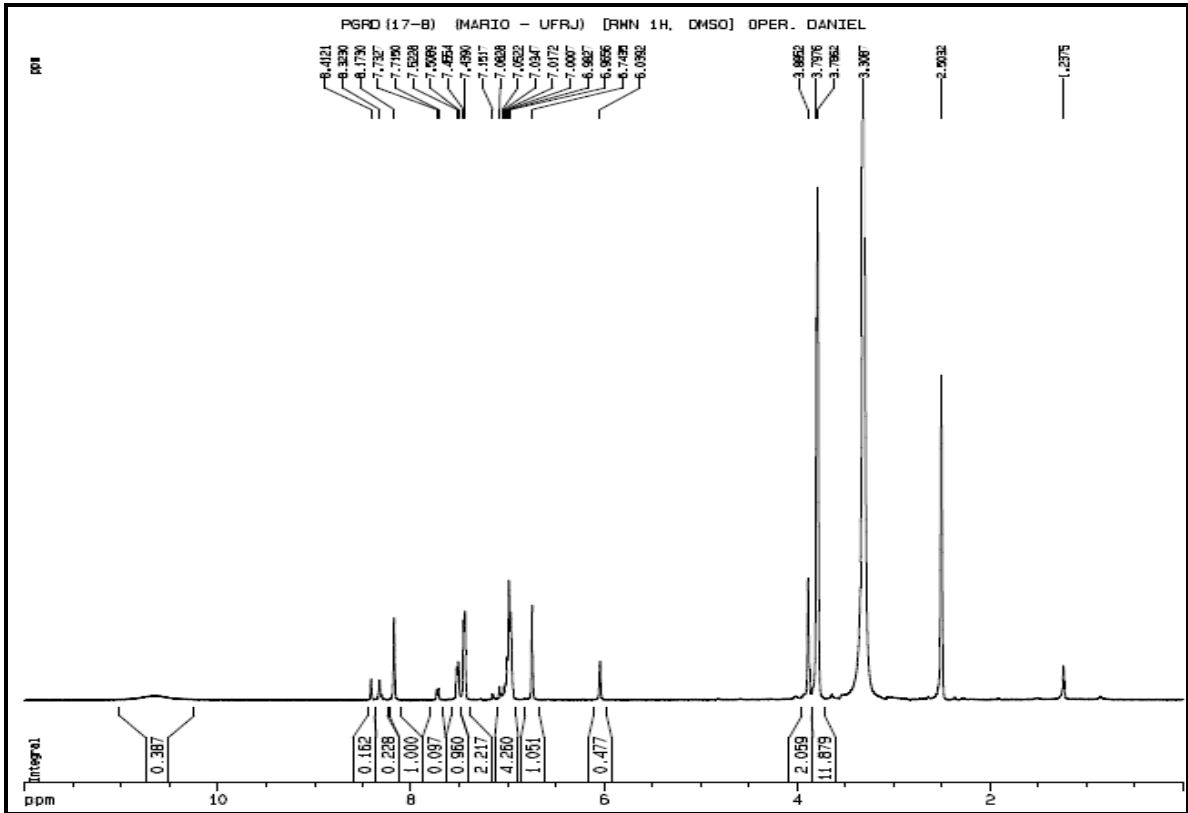


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da mistura **12**, **13** e **14**

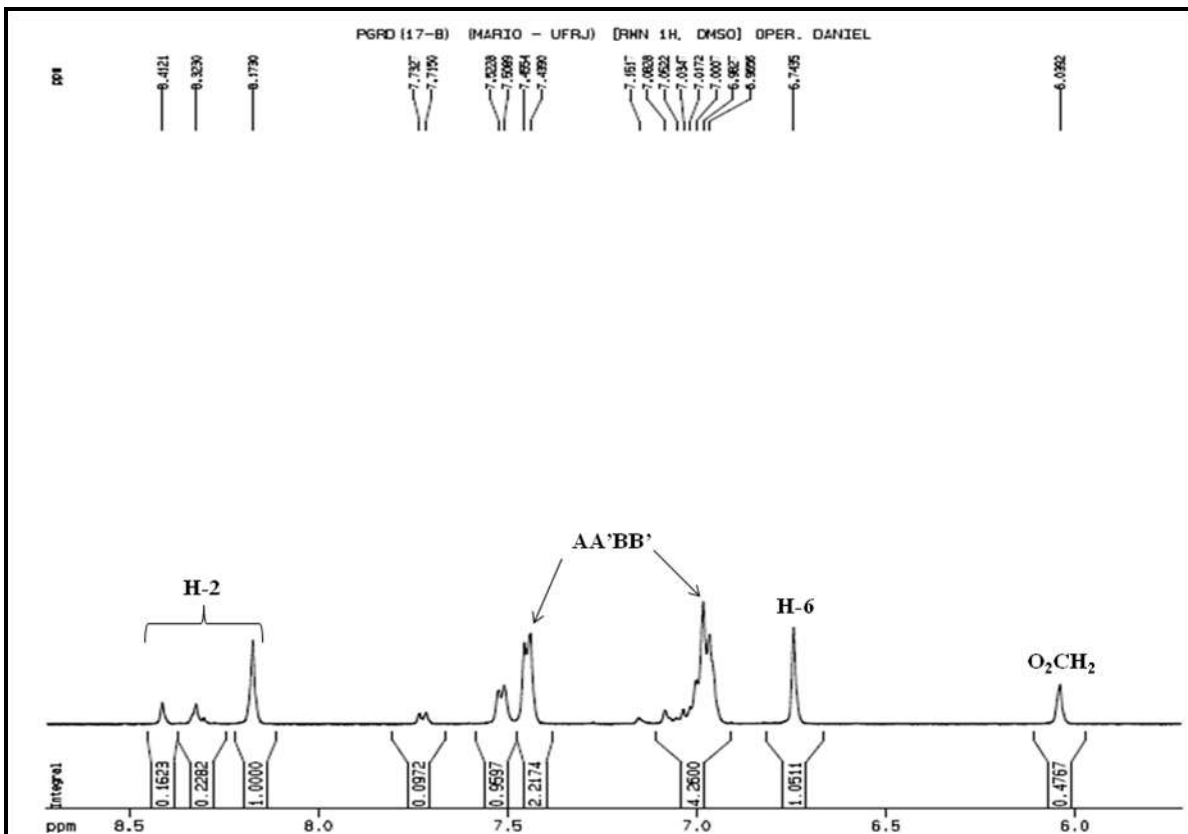


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura **12**, **13** e **14** de 5,7 a 8,7 ppm

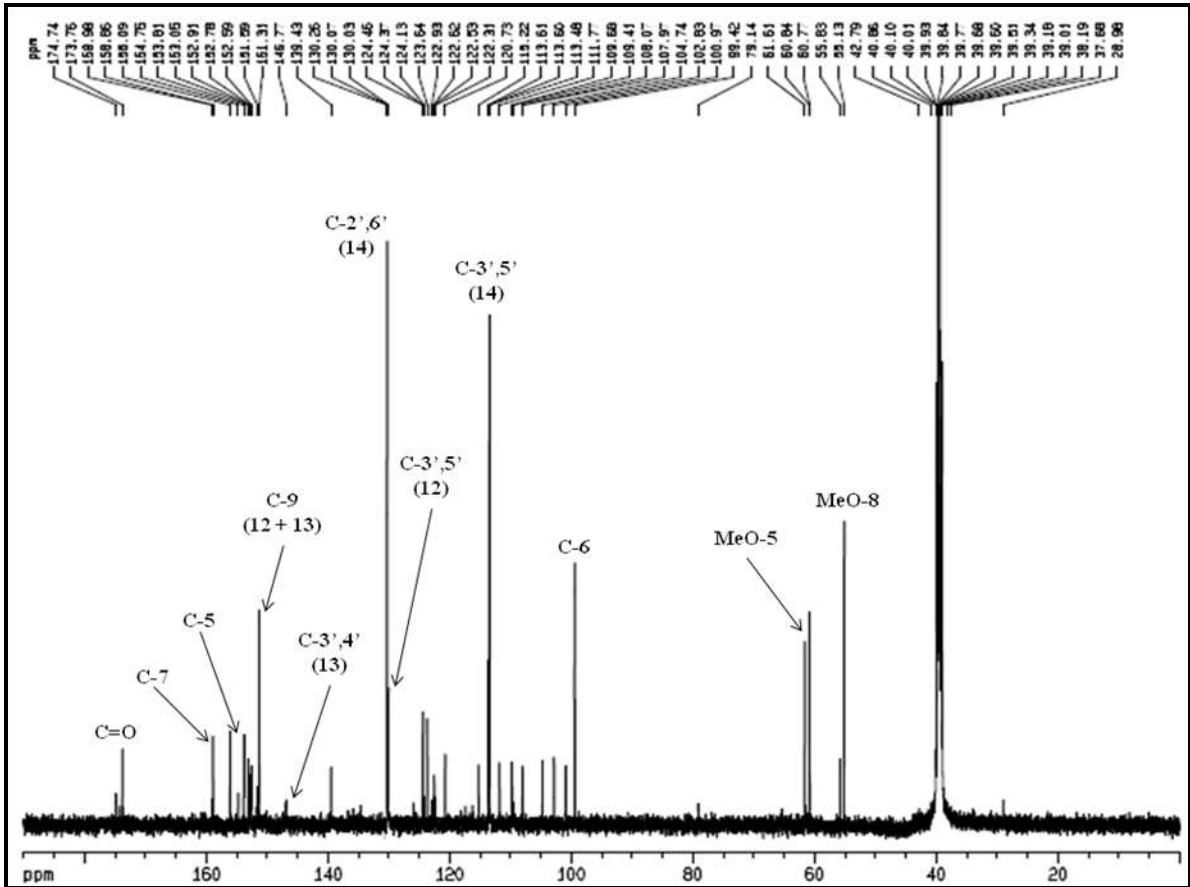


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da mistura 12, 13 e 14

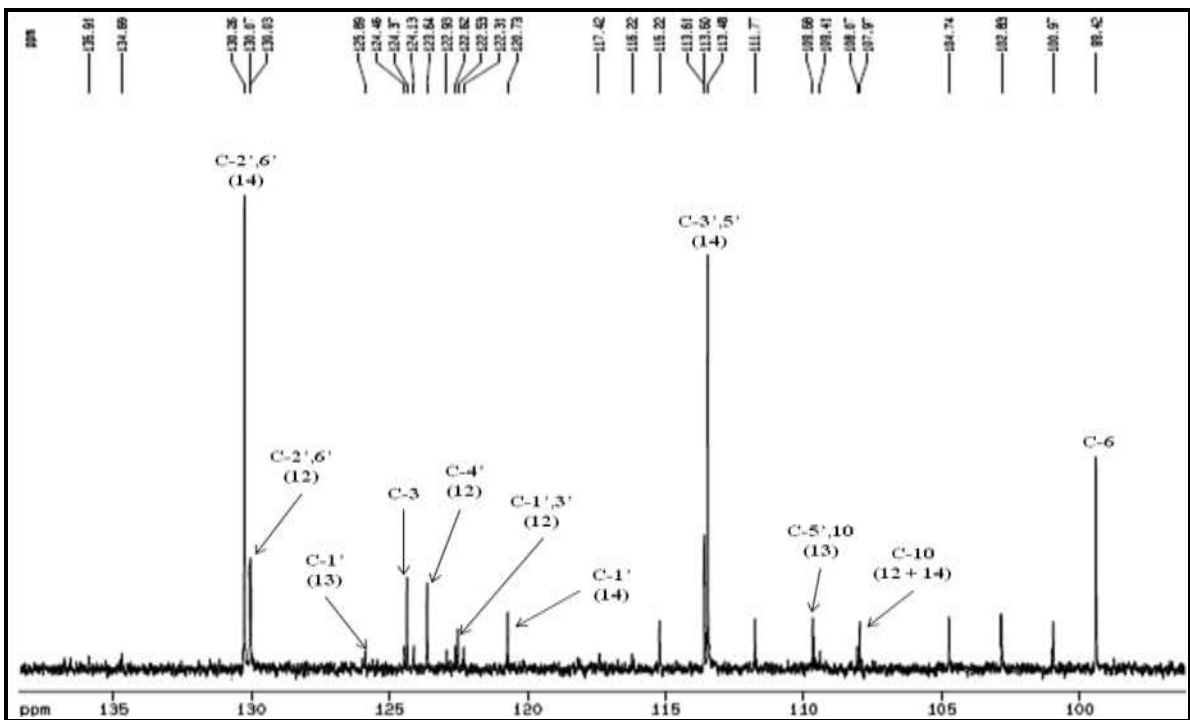


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura 12, 13 e 14 de 96,2 a 138,4 ppm

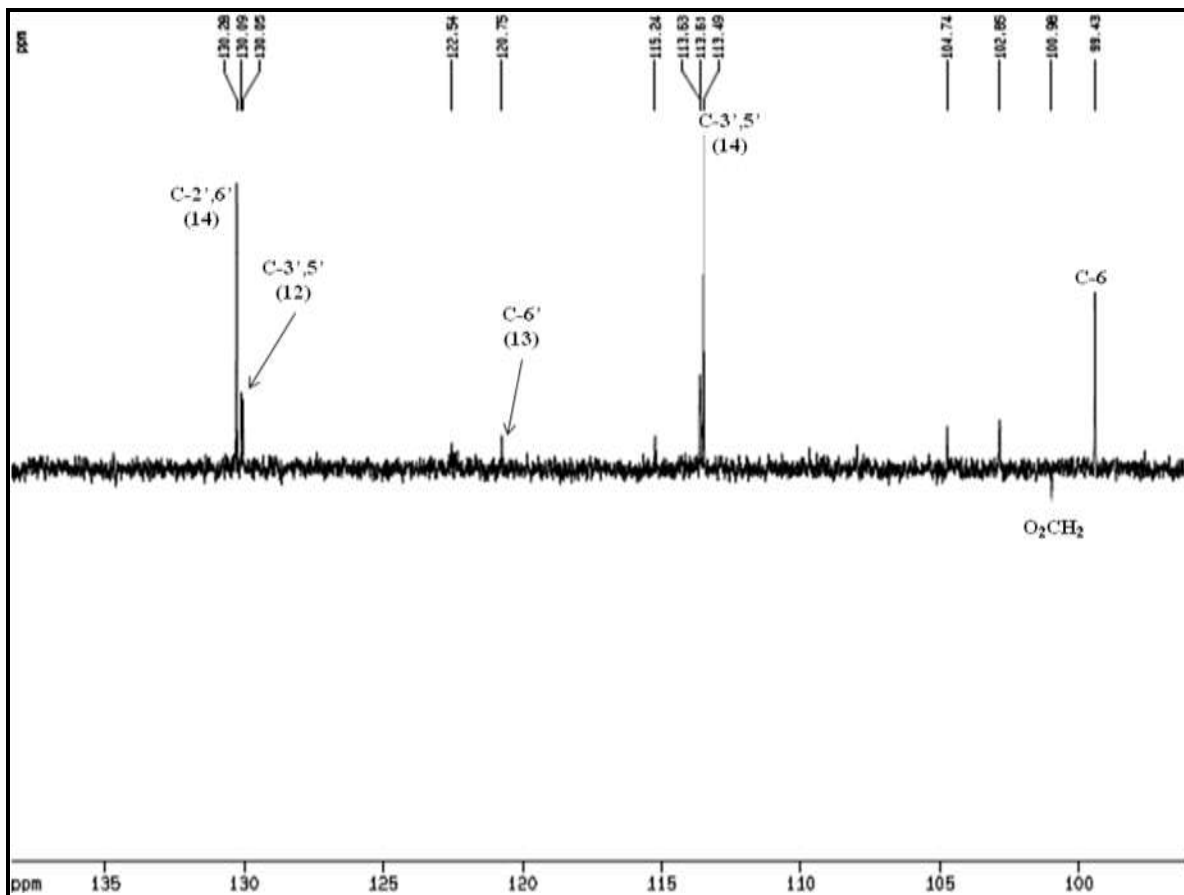


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 (125 MHz, DMSO- d_6) da mistura **12**, **13** e **14**.

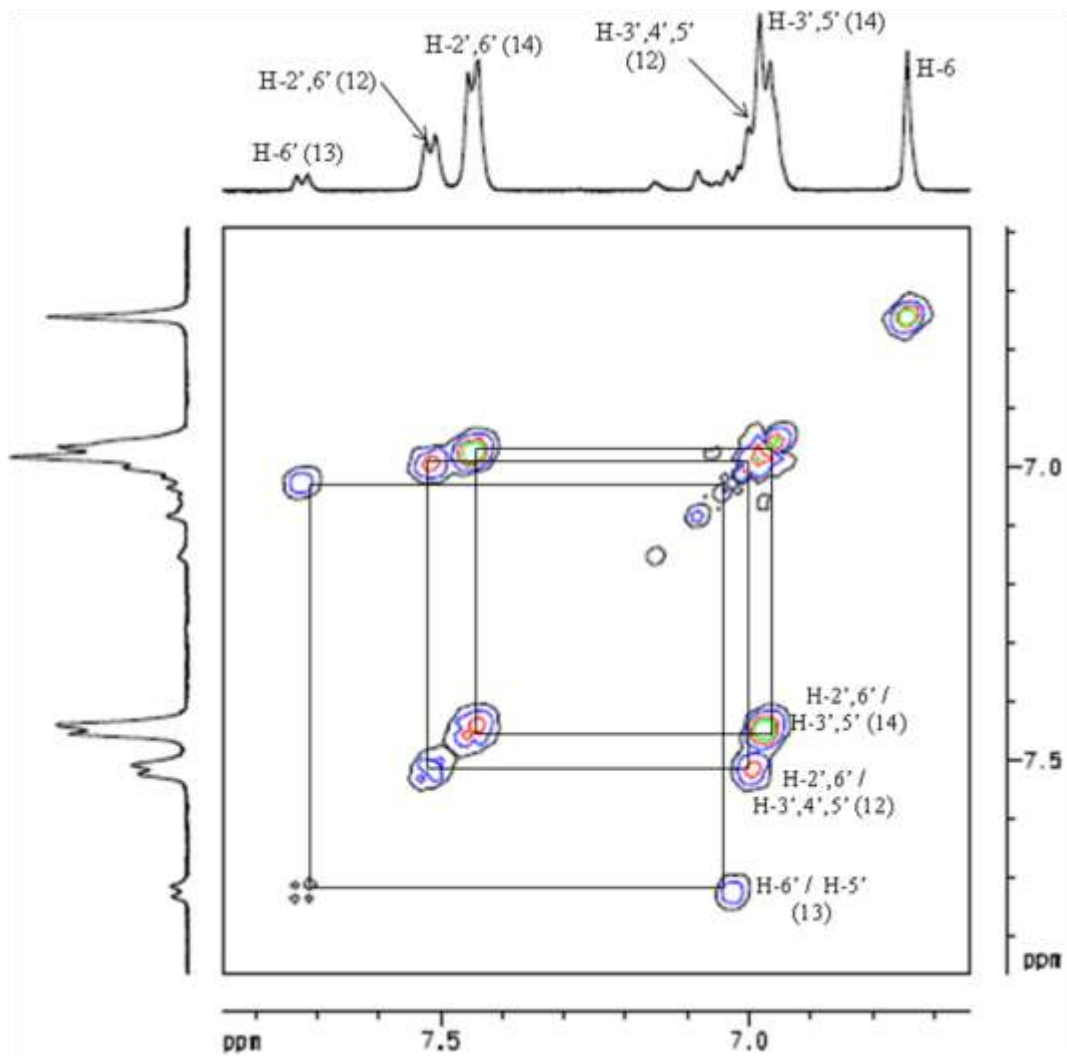


Figura 42. Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO-d_6) da mistura **12**, **13** e **14**.

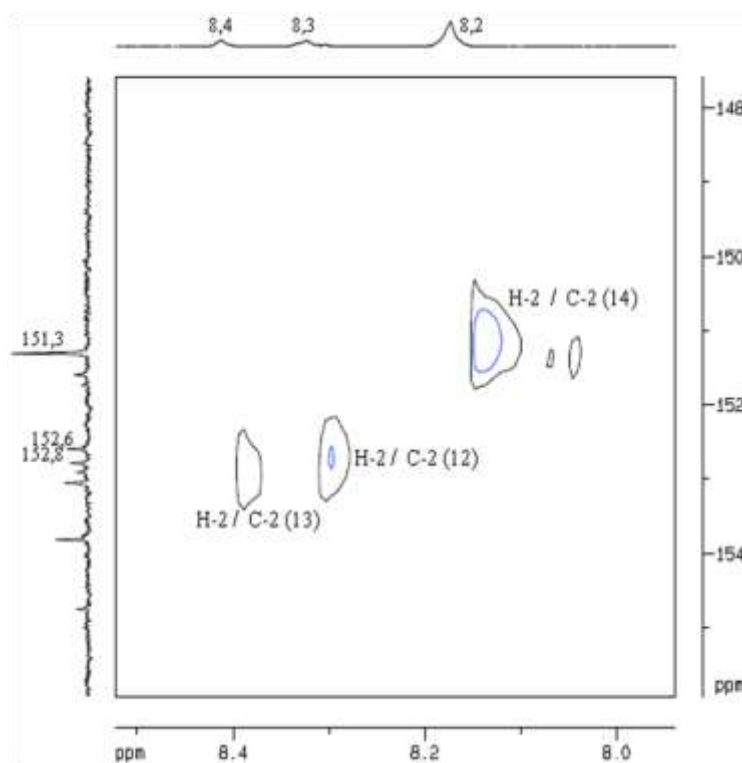
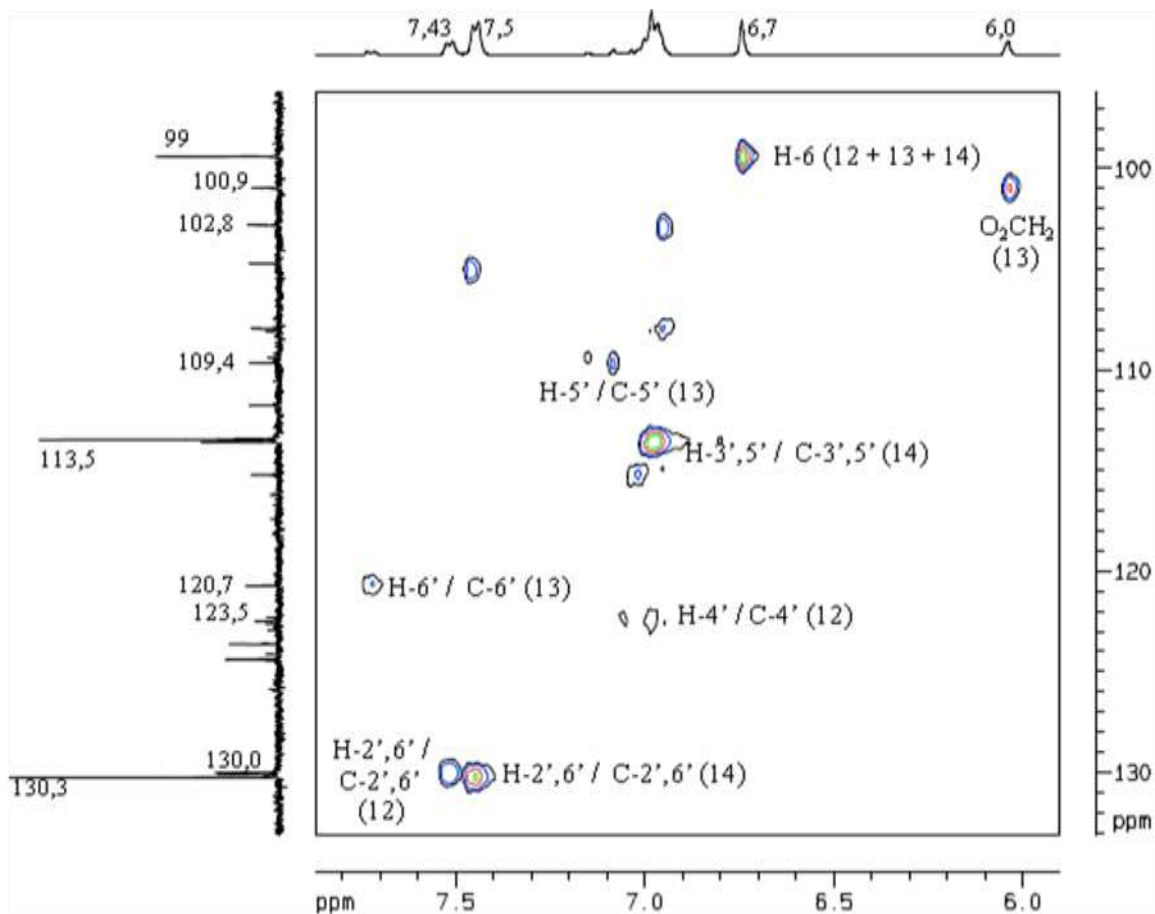


Figura 43. Expansões do espectro de RMN-2D HSQC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da mistura 12, 13 e 14

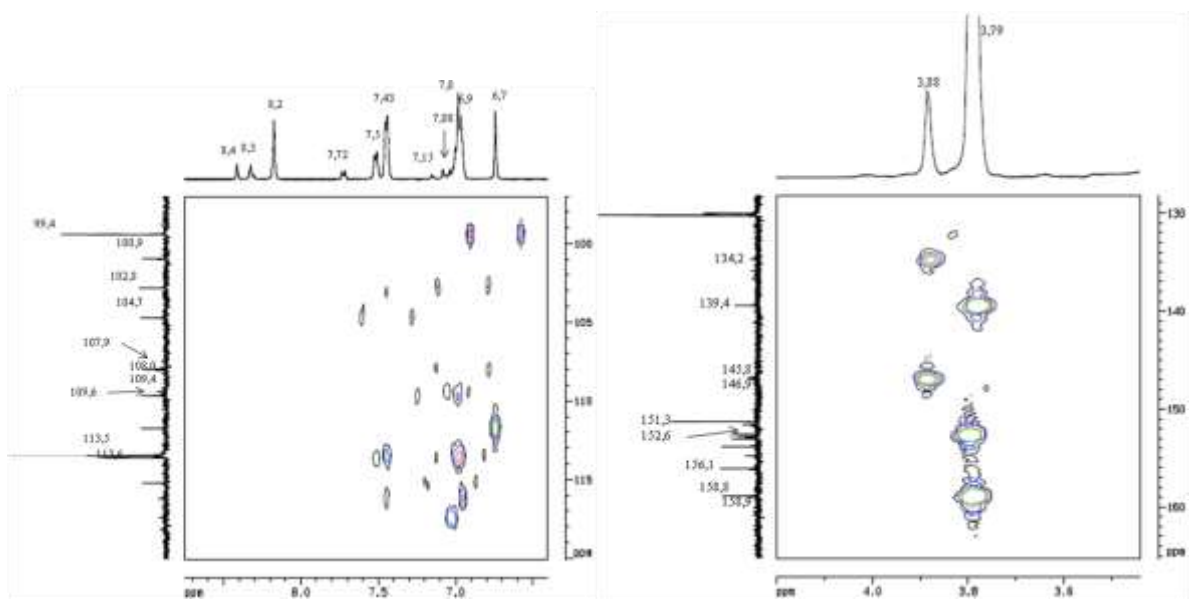
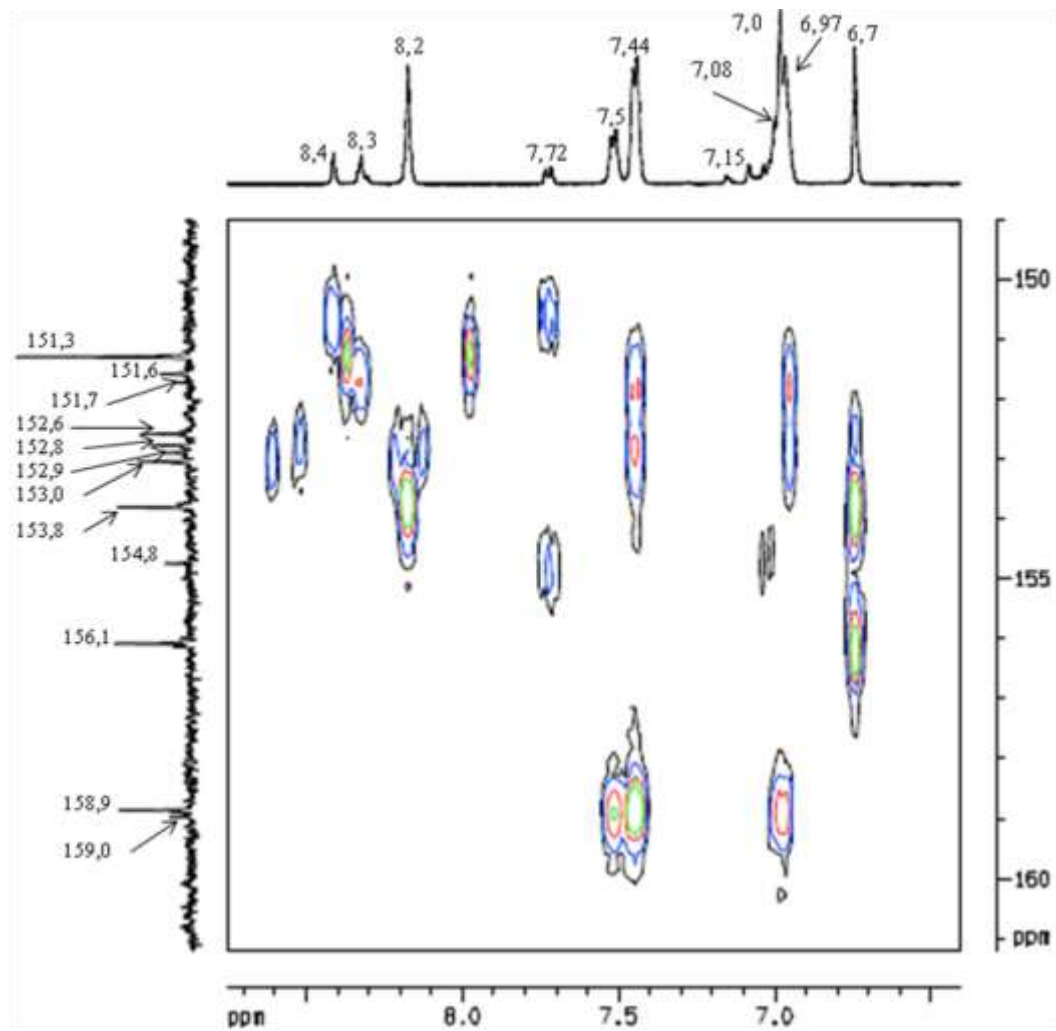


Figura 44. Expansões do espectro de RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO- d_6) da mistura **12**, **13** e **14**.

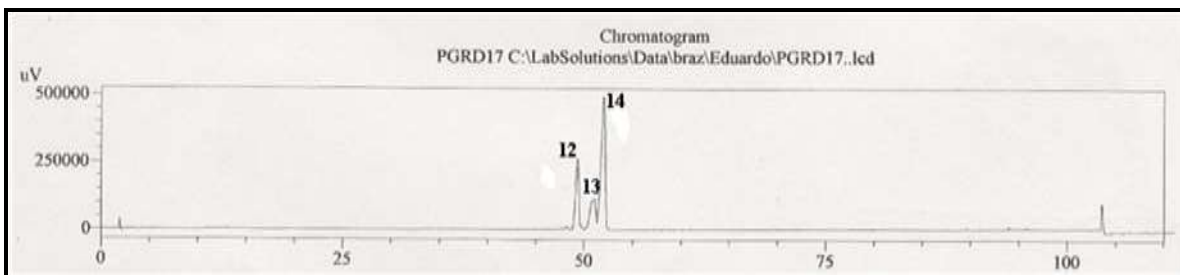


Figura 45. Cromatograma (CL-EM) da mistura de isoflavonas

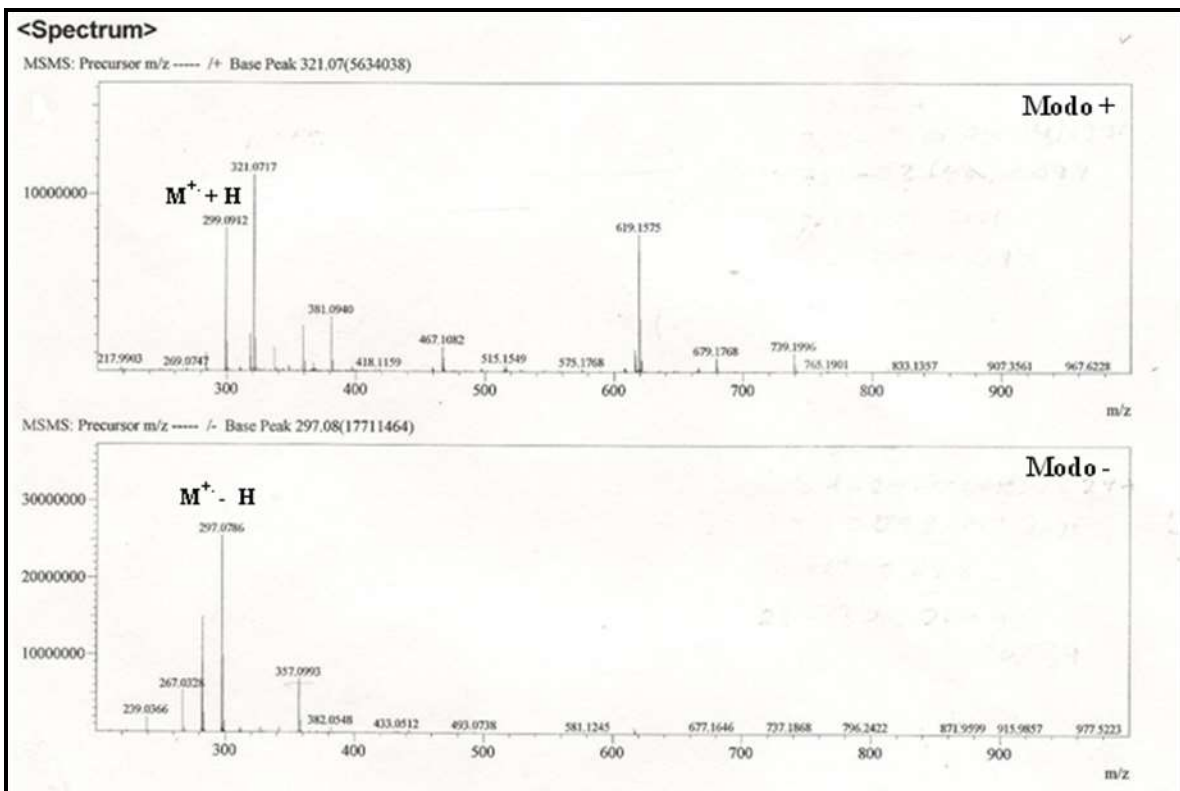


Figura 46. Espectro de massas da substância 12 em modo positivo (a) e negativo (b)

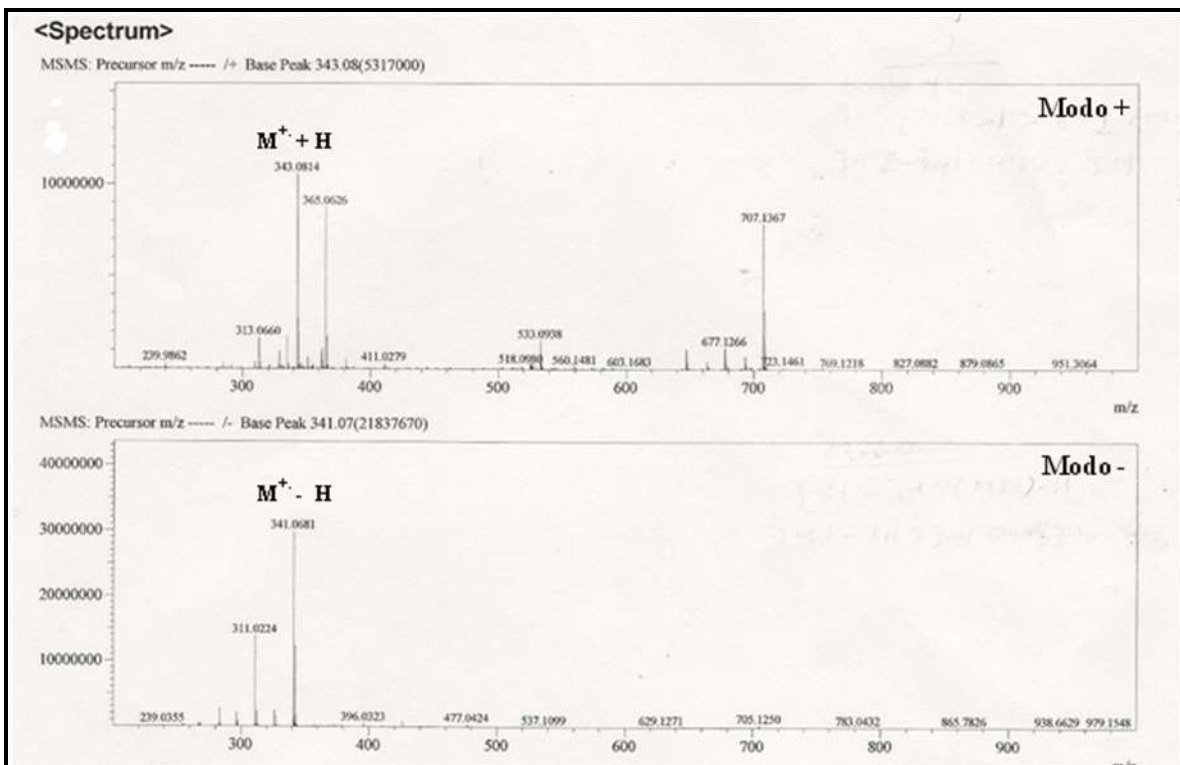


Figura 47. Espectro de massas da substância **13** em modo positivo (a) e negativo (b)

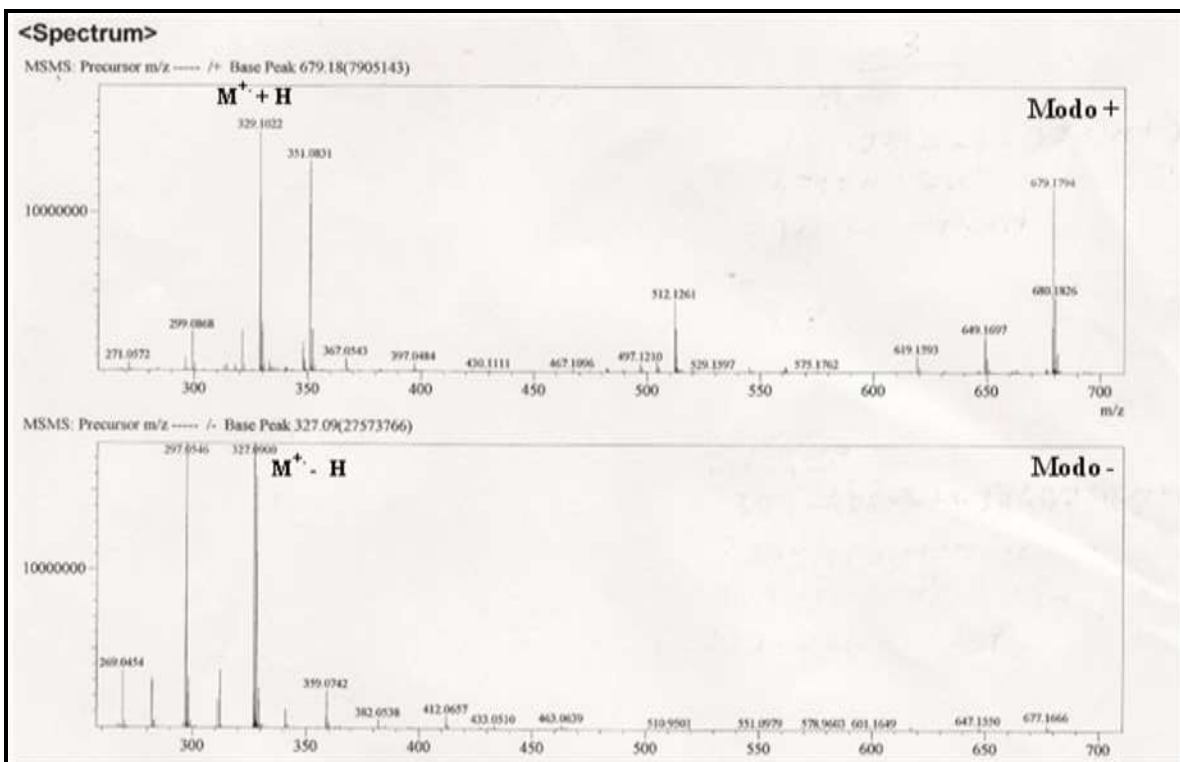


Figura 48. Espectro de massas da substância **14** em modo positivo (a) e negativo (b)

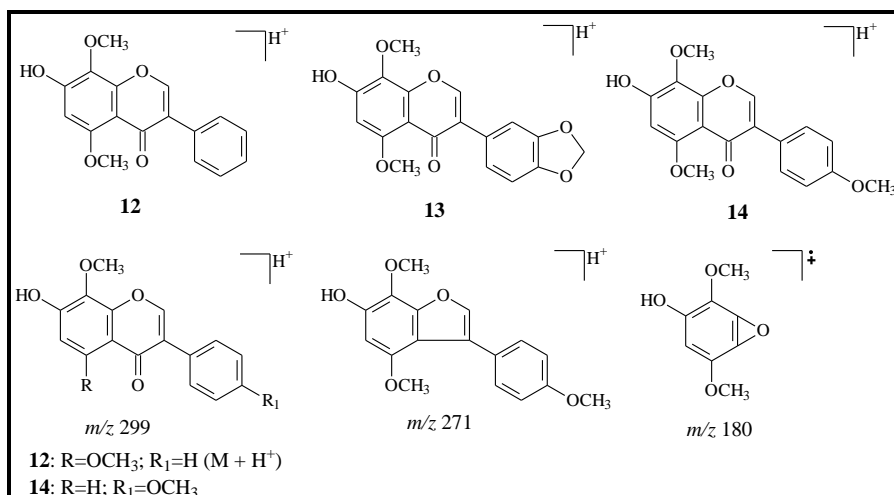


Figura 49. Massa de alguns fragmentos da mistura **12** + **13** + **14**, para justificar os principais picos detectados no EM.

VI.2.3. Identificação dos Ésteres metílicos (1) e (2).

As análises dos **Ésteres metílicos (1) e (2)**, presentes nas frações PGRMD 1-4 (4) (**E.m. (1)**) e PGRMD 10-14 (1) (**E.m. (2)**), respectivamente, foram feitas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) fornecendo seus respectivos cromatogramas (**Figuras 50-57**).

A identificação dos **Ésteres metílicos (1) e (2)**, presentes nas frações PGRMD 1-4 (4) (**E.m. (1)**) e PGRMD 10-14 (1) (**E.m. (2)**), respectivamente, foi realizada por comparação do espectro de massas referente a cada pico do cromatograma com espectros de massas da biblioteca NIST 08 do aparelho CG-EM.

A partir destes dados foi possível caracterizar os ésteres metílicos em maioria referentes a ácidos graxos no cromatograma das frações PGRMD 1-4 (4) e PGRMD 10-14 (1), num total de 90,42 e 94,39 % da composição das mesmas. Os compostos identificados de cada fração encontram-se listados na **Tabela 5**.

Analisando a **Tabela 5**, foi possível observar uma significativa variação na composição dos ésteres metílicos presentes em cada fração. Verificou-se assim que a fração PGRMD 1-4 (4) teve como constituintes majoritários os ésteres metílicos de maior peso molecular, tetracosanoato de metila (**Figuras 55**), pentacosanoato de metila (**Figuras 56**) e hexacosanoato de metila (**Figuras 57**), revelando também a presença dos ésteres hexadecanoato de metila (**Figuras 52**) e 9-octadecenoato de metila (**Figuras 54**), que aliás estes últimos se mostram em maior concentração na fração PGRMD 10-14 (1), com 15,92 % e 19,66 %, respectivamente, junto ao 10-heptadecenoato de metila (**Figuras 53**).

Tabela 5. Identificação dos Ésteres metílicos (1) e (2) por comparação com dados da biblioteca Nist08 do aparelho CG-EM

Constituinte proposto	Nome comum	TR	M ⁺	Área (%)	
				E.m. (1)	E.m. (2)
Tetradecanoato de metila	Miristato de metila	11,718	242	-	1,29
5-Octadecenoato de metila	-	12,688	296	-	0,99
Pentadecanoato de metila	-	12,868	256	-	2,83
9-Hexadecenoato de metila	Palmitoleato de metila	13,748	268	-	3,51
Hexadecanoato de metila	Palmitato de metila	13,975	270	7,66	15,92
Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	14,366	256	4,10	-
Hexadecanoato de etila	Palmitato de etila	14,658	284	-	0,77
10-Heptadecenoato de metila	-	14,784	282	-	8,25
Heptadecanoato de metila	Margarato de metila	15,002	284	2,07	4,36
9,12- Octadecadienoato de metila	Linolenato de metila	15,710	294	3,74	-
9-Octadecenoato de metila	Oleato de metila	15,770	296	7,54	19,66
Octadecanoato de metila	Estereato de metila	15,999	298	4,11	5,13
Ácido 9-Octadecenóico	Ácido oleico	16,159	282	4,95	-
Ácido Octadecanóico	Ácido esteárico	16,358	284	1,41	-
10-Nonadecenoato de metila	-	16,841	310	0,83	2,48
Nonadecanoato de metila	-	16,944	312	0,75	1,44
11-Eicosenoato de metila	-	17,623	324	-	1,84
Eicosanoato de metila	Aracidato de metila	17,855	326	2,24	2,59
Heneicosanoato de metila	-	18,703	340	-	1,39
Docosanoato de metila	Behenato de metila	19,570	354	4,45	2,82
Octadecanoato de hexila	Estereato de hexila	19,976	368	1,27	-
Tricosanoato de metila	-	20,389	368	4,64	2,50
Tetracosanoato de metila	Lignocerato de metila	21,303	382	10,21	4,35
Pentacosanoato de metila	-	22,309	396	7,56	2,96
Hexacosanoato de metila	Ceroticato de metila	23,512	410	11,91	4,10
Heptacosanoato de metila	-	24,876	424	3,44	0,98
Octacosanoato de metila	-	26,577	438	5,39	1,46
Triacotanoato de metila	Melissato de metila	31,148	466	2,15	-
Acetato de lupeïla	-	27,392	468	-	2,77
Total				90,42	94,39

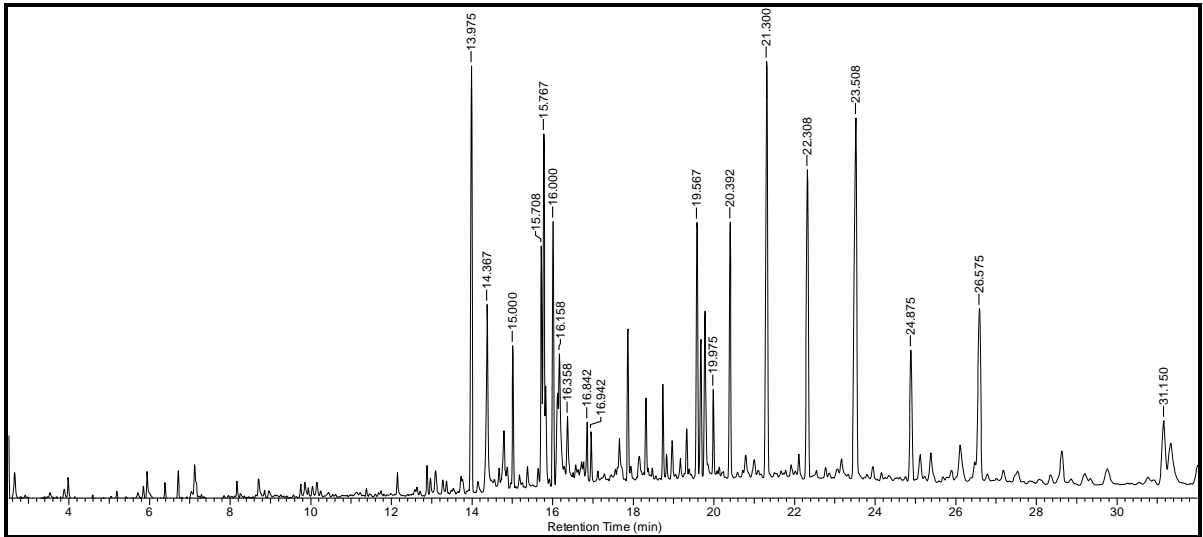


Figura 50. Cromatograma de PGRMD 1-4 (4) / E.m. (1)

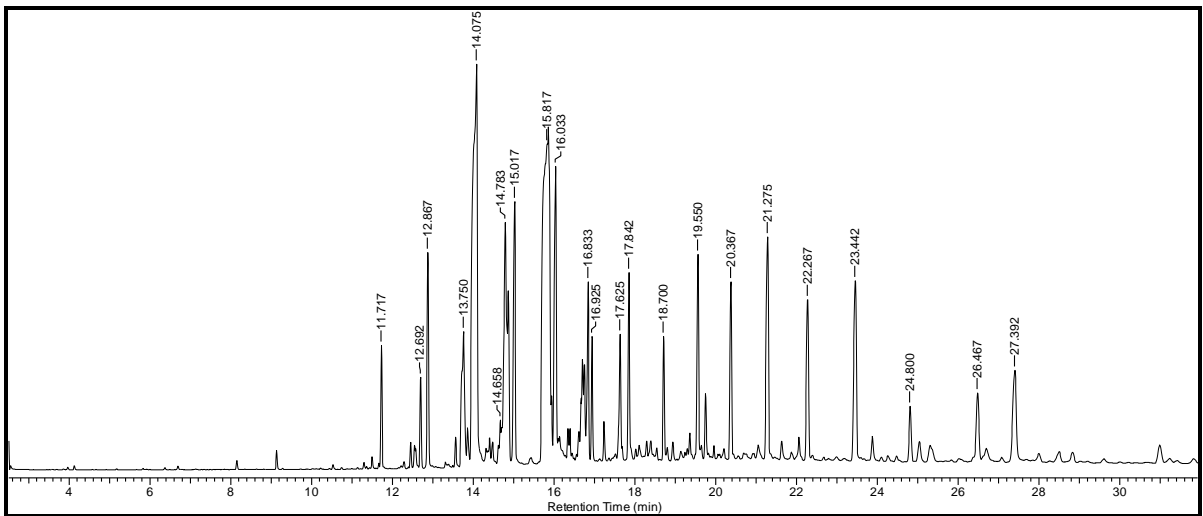


Figura 51. Cromatograma de PGRMD 10-14 (1) / E.m. (2)

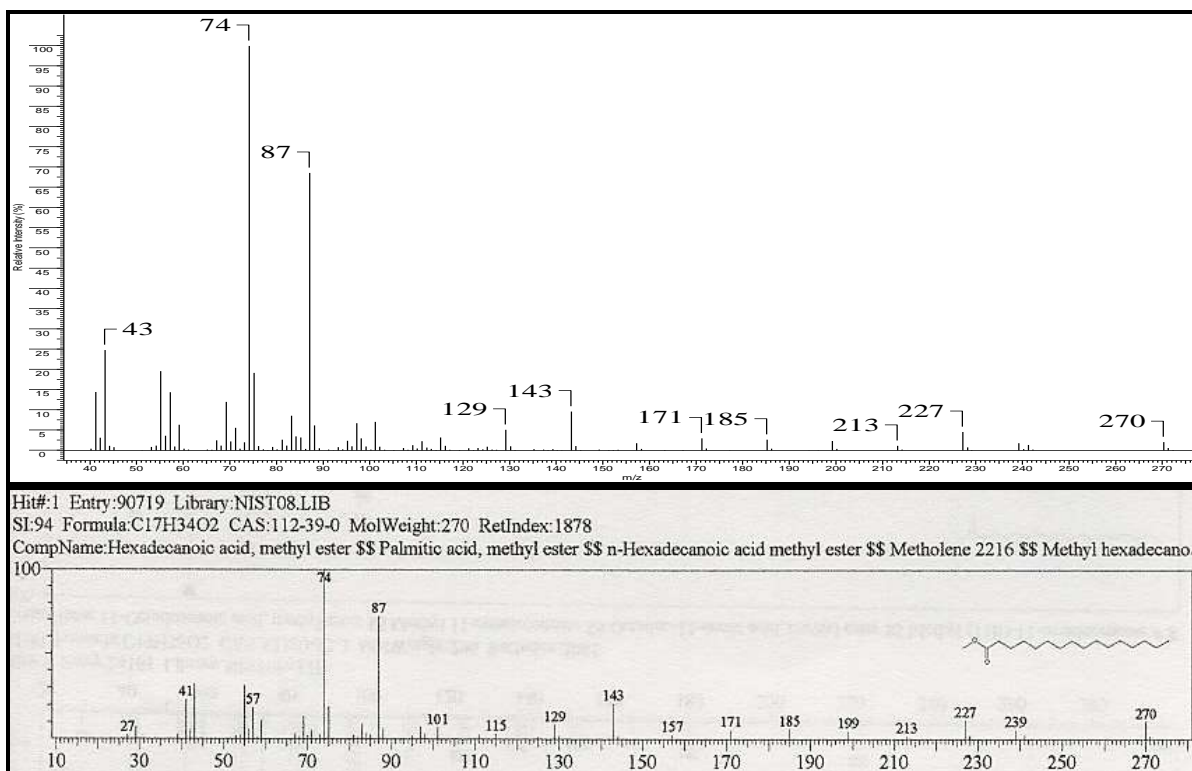


Figura 52. Espectro de massas do hexadecanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

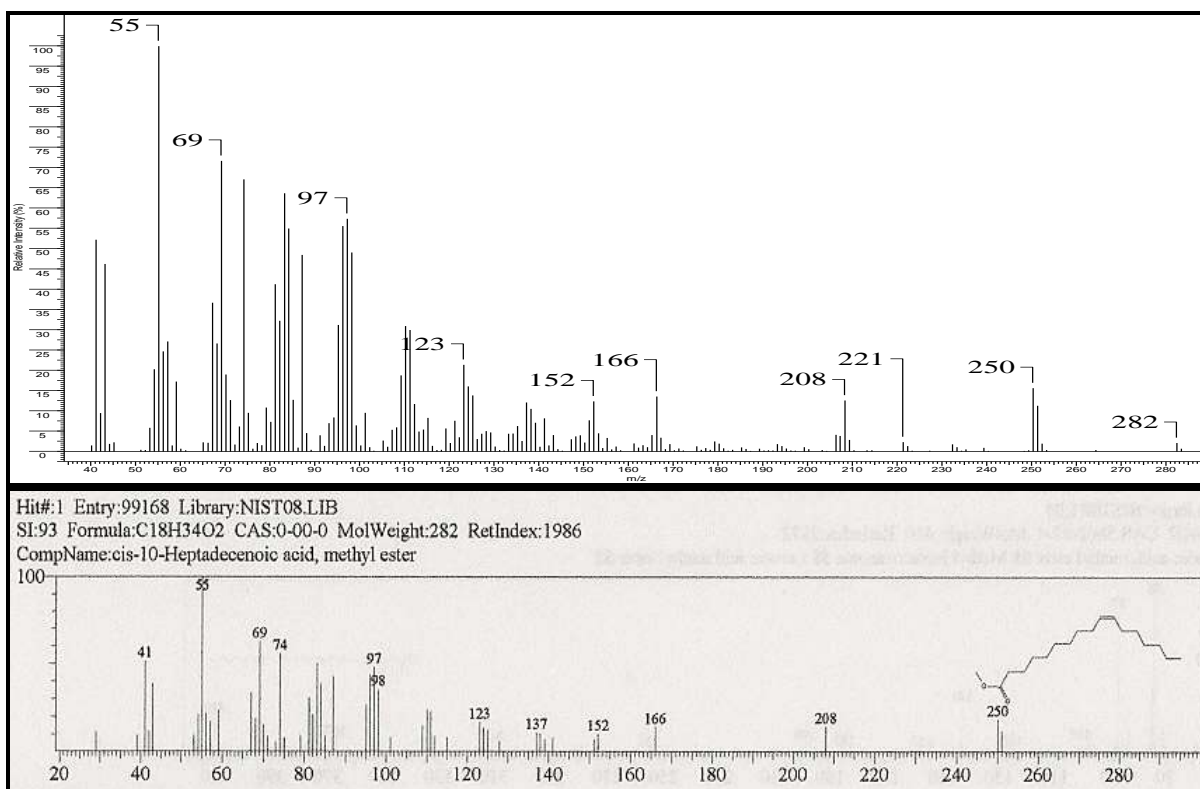


Figura 53. Espectro de massas do 10-heptadecenoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

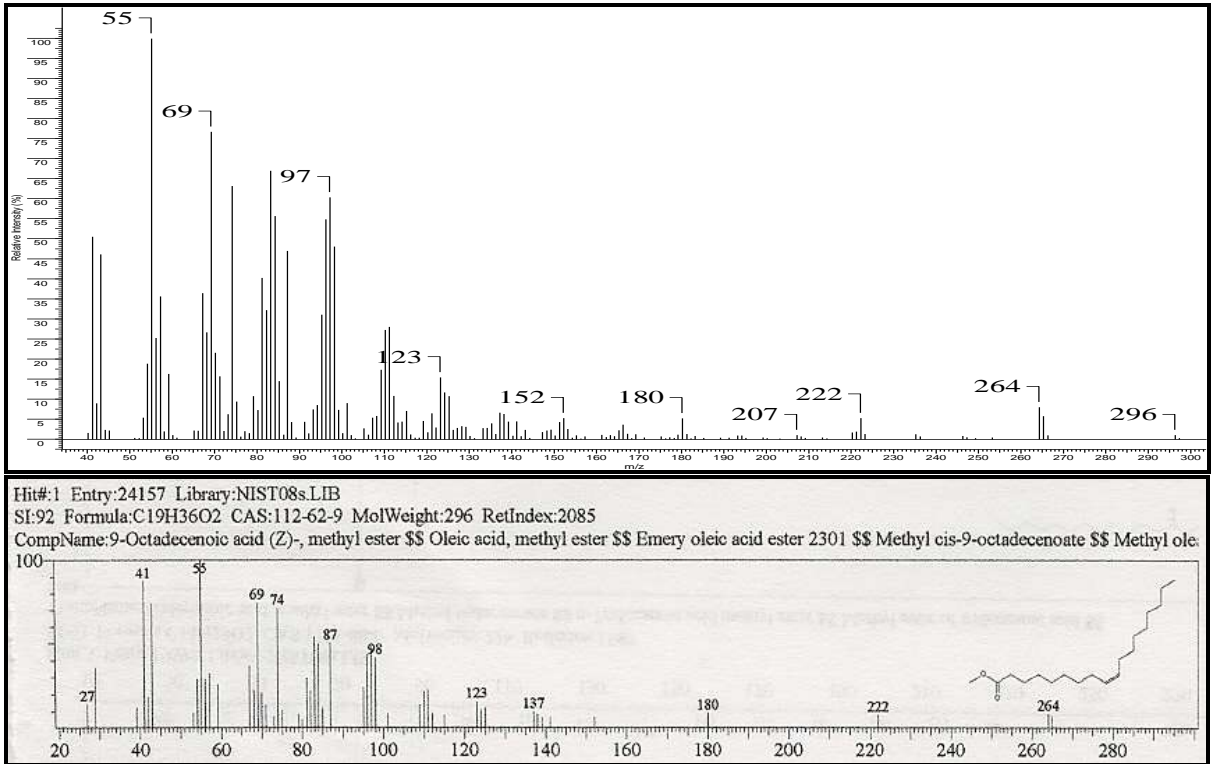


Figura 54. Espectro de massas do 9-octadecenoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

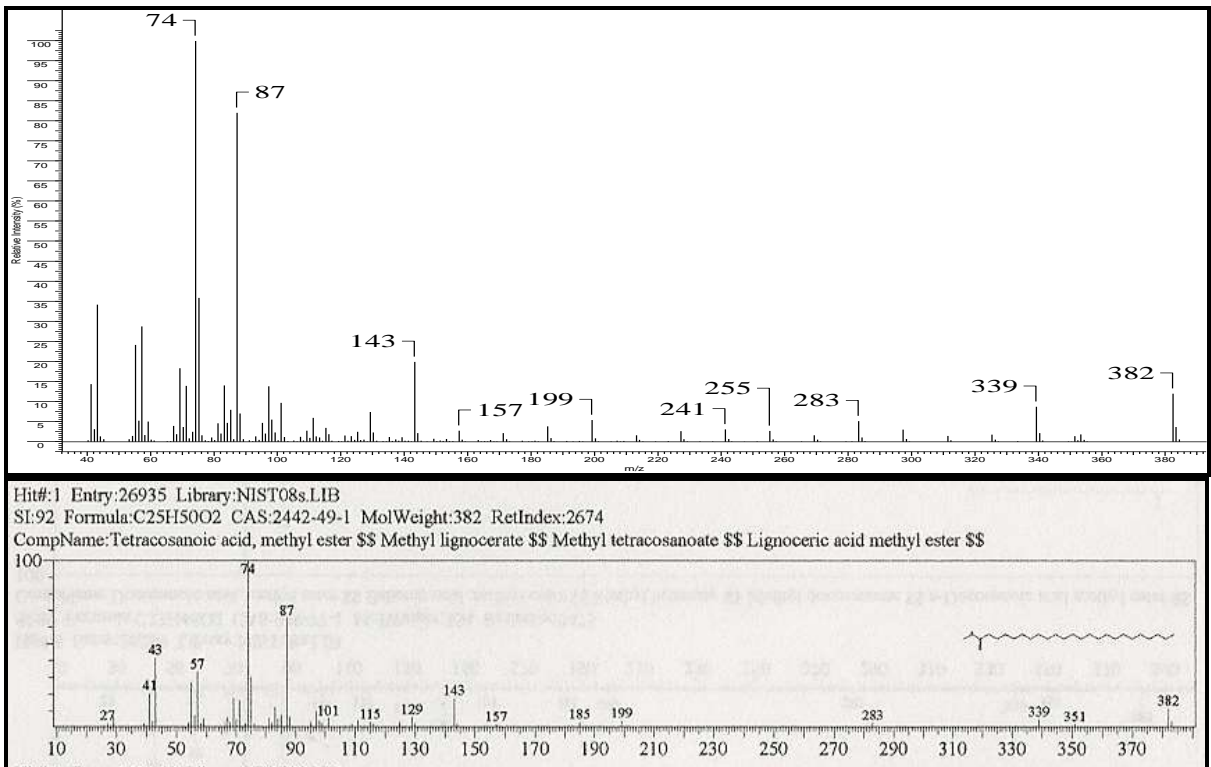


Figura 55. Espectro de massas do tetracosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

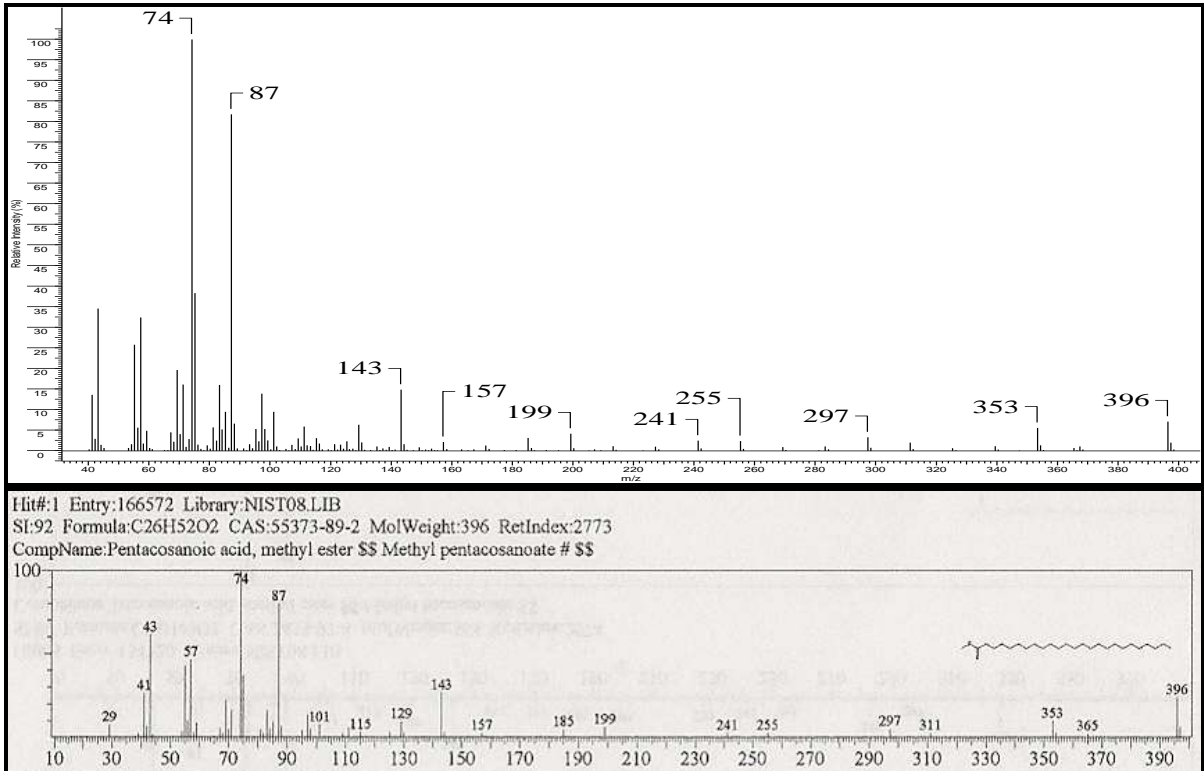


Figura 56. Espectro de massas do pentacosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

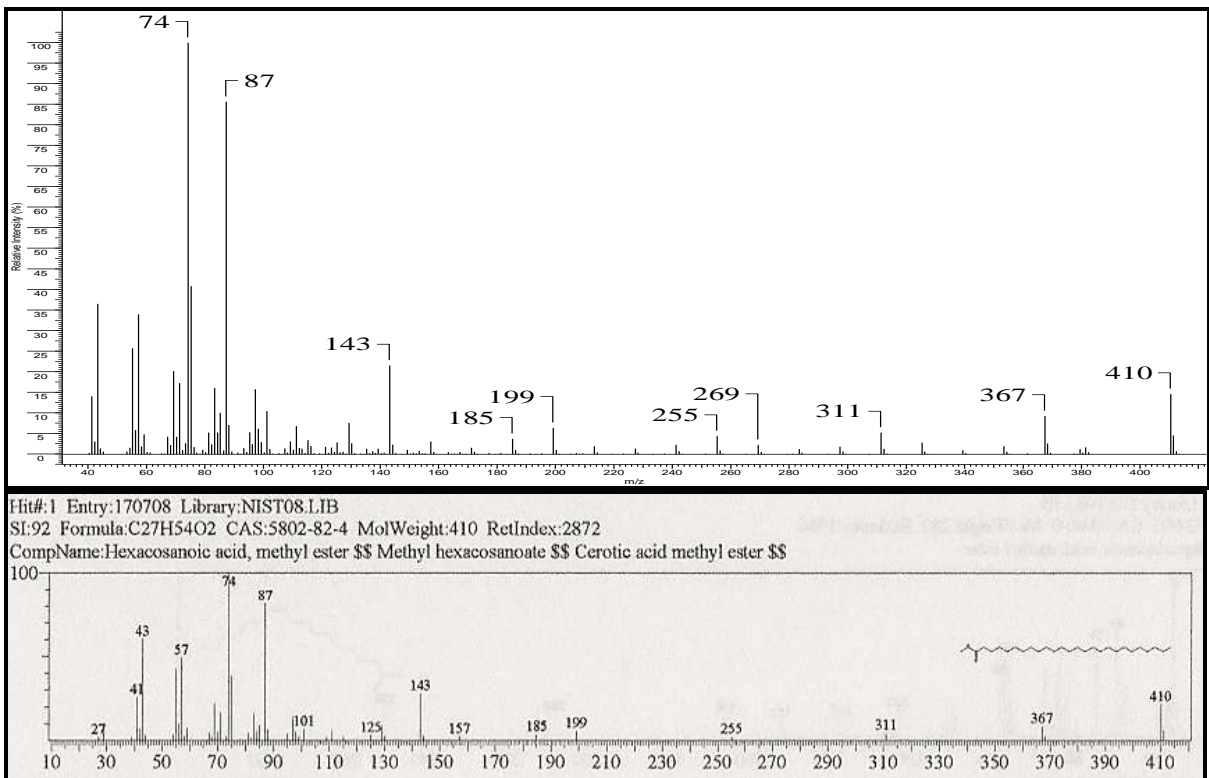


Figura 57. Espectro de massas do hexacosanoato de metila e comparação com o padrão da biblioteca.

VI.3. Determinação estrutural dos constituintes isolados das folhas de *P. rigida*

O fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de *P. rigida* conduziu à identificação de 4 substâncias, cujas estruturas estão representadas a seguir. As substâncias 15-18 estão sendo registradas pela primeira vez nesta planta.

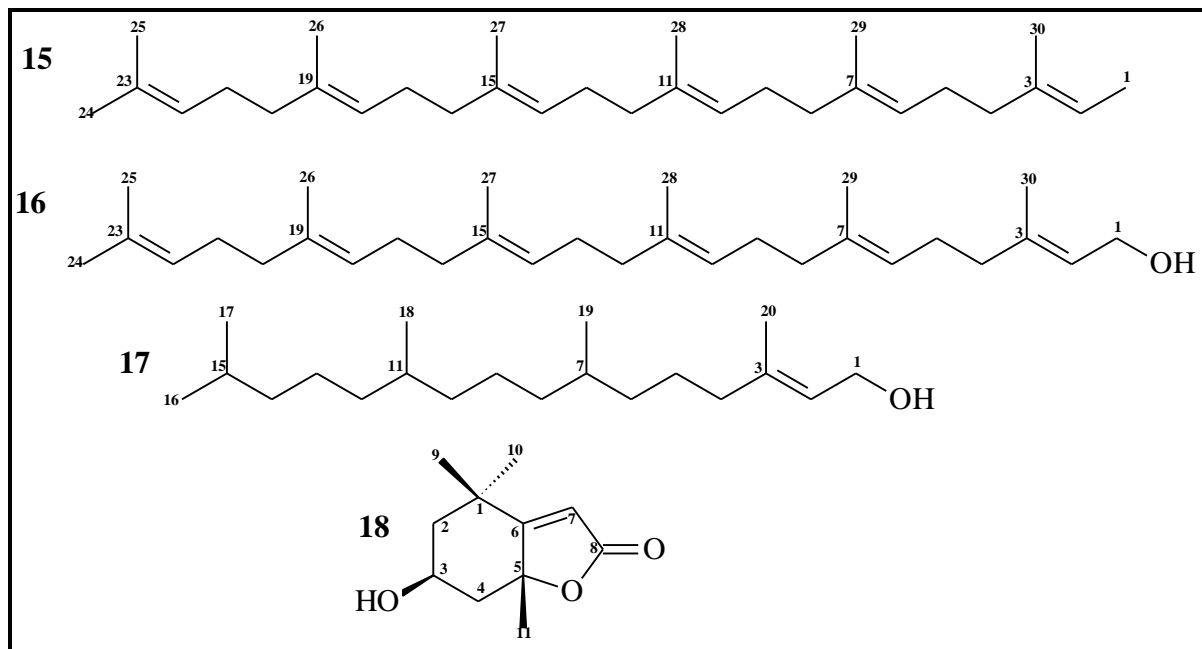


Figura 58. Estruturas dos constituintes isolados das folhas de *P. rigida*

VI.3.1. Identificação das substâncias 15 e 16.

Os poliprenóides **15** e **16** foram identificados através de análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , CG-EM e comparação com dados descritos na literatura (FEITOSA *et al.*, 2007). O espectro de RMN ^1H (**Figura 59**) apresentou sinais correspondentes a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 4,09 e hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,12 e 5,45; absorções referentes a hidrogênios de metilas ligadas a carbono sp^2 em δ_{H} 1,60; 1,68 e 1,74. Observou-se ainda absorções em δ_{H} 2,04-2,09, atribuídos a hidrogênios de carbonos metilênicos ligados a carbonos sp^2 . A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C (**Tabela 6**) permitiu propor as absorções sugerindo um esqueleto poliprenóide. A análise deste material com CG-EM (**Figura 62**) revelou a presença de dois componentes com $\text{Tr} = 25,39\text{min.}$, (58,97 %) e 31,17 min., (33,23 %). Os espectros de massas dos componentes de cada pico (**Figura 62**), confirmaram a proposta do poliprenóide **(6E,10E,14E,18E,22E)-2,6,10,14,18,22-hexamiltetracosa-2,6,10,14,18,22-hexaeno (15)**, revelou um segundo componente, sendo

identificado como **(2E,6E,10E,14E,18E)-3,7,11,15,19,23-hexametiltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaen-1-ol (16)**.

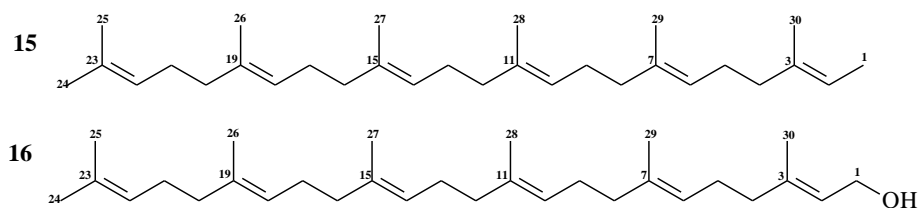


Tabela 6. Comparação dos dados de RMN ^{13}C das substâncias **15** e **16** com valores da literatura (FEITOSA *et al.*, 2007)

C	δ_c (ppm)		
	Substância 15 (CDCl_3)	Substância 16 (CDCl_3)	Hexaprenol (CDCl_3)
1	15,98	59,00	58,59
2	125,09	124,12	123,84
3	135,35	139,87	139,46
4	39,72	39,72	39,31
5	25,68	25,68	25,27
6	125,01	125,01	123,99
7	135,27	136,06	135,66
8	26,39	26,39	25,98
9	31,97	31,97	31,57
10	124,24	124,24	124,11
11	135,27	135,35	134,95
12	32,19	32,19	31,79
13	26,39	26,39	25,89
14	125,01	125,01	124,52
15	135,27	134,95	134,82
16	32,19	32,19	31,79
17	26,66	26,66	26,26
18	125,01	125,01	124,60
19	135,27	134,87	134,54
20	32,19	32,19	31,79
21	26,39	26,39	26,35
22	125,01	125,01	124,60
23	135,27	131,23	130,82
24	25,74	25,68	25,27
25	17,66	17,66	17,26
26	23,41	23,41	23,02
27	23,41	23,41	15,58
28	23,41	23,41	15,58
29	23,41	23,41	15,58
30	23,41	23,41	23,02

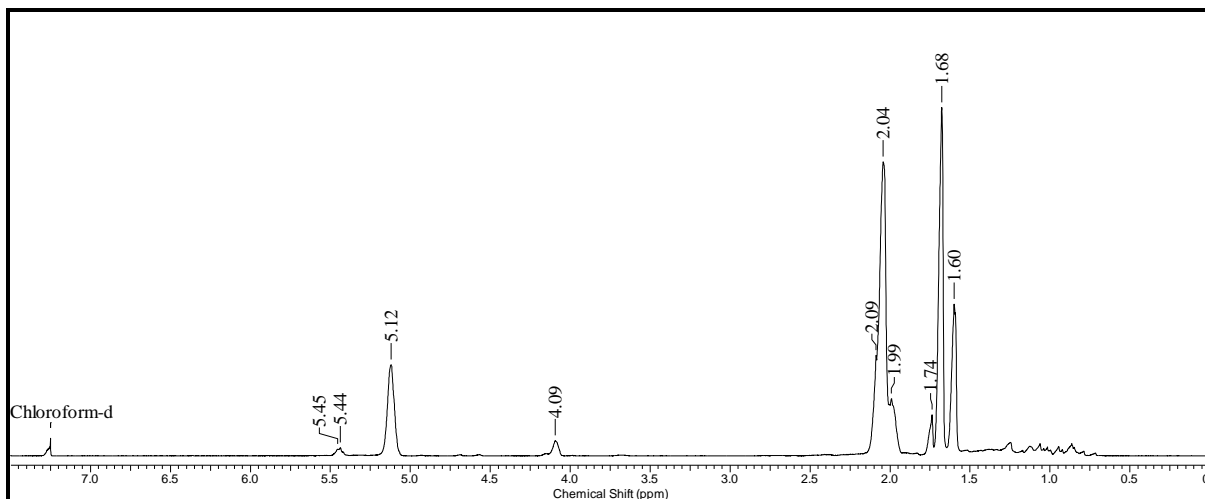


Figura 59. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **15** e **16**

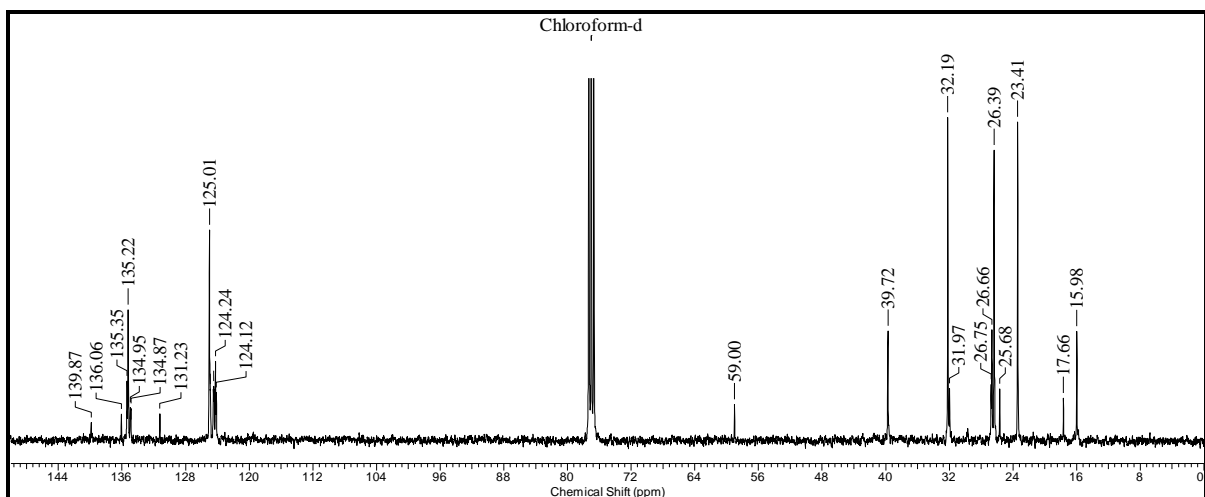


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de **15** e **16**

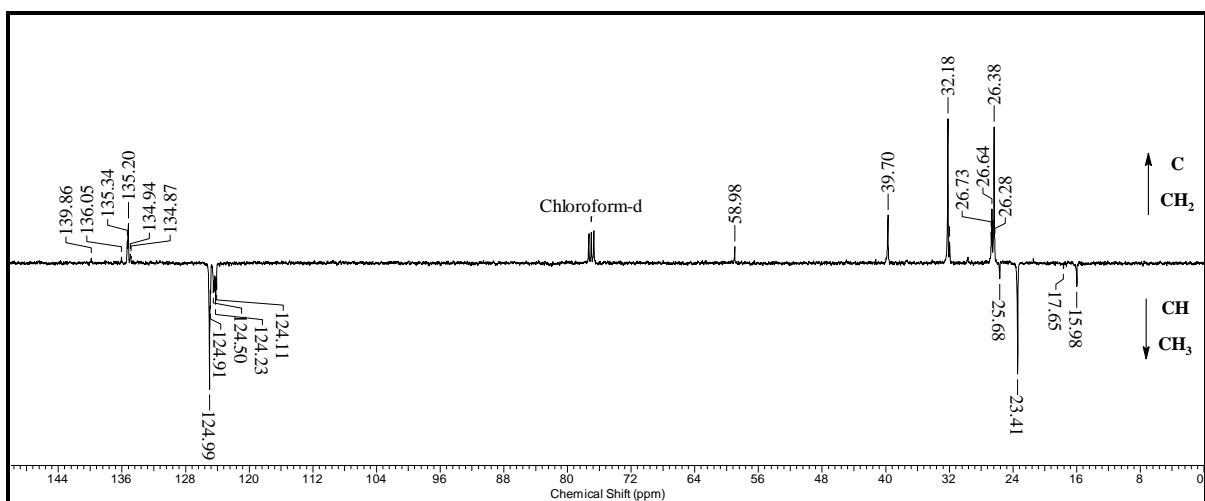


Figura 61. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura de **15** e **16**

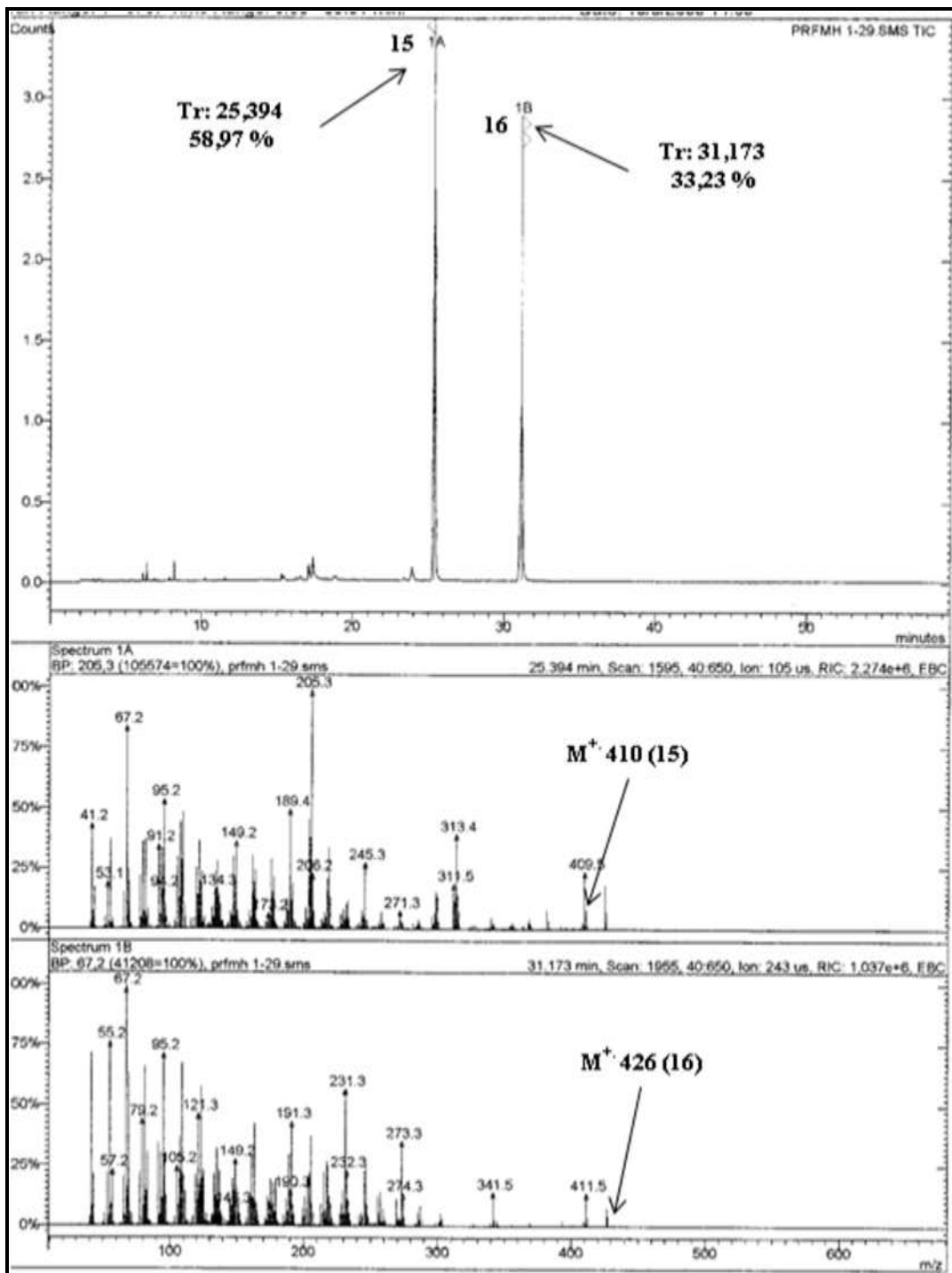


Figura 62. Cromatograma (CG) e espectro de massas da mistura 15 e 16.

VI.3.2. Identificação da substância 17

O espectro de RMN ^1H apresenta sinais de dubletos em δ_{H} 0,85-0,87 de grupos metílicos e singleto em δ_{H} 1,66 de metila ligada a dupla ligação. Além de sinais entre δ_{H} 1,06-1,59 de hidrogênios ligados em carbono sp^3 , apresenta sinais de hidrogênios de carbono alílico em δ_{H} 1,99, de H olefínico em δ_{H} 5,41 (sl), e sinal de hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,15. O espectro de RMN ^{13}C (BBD e APT, **Figuras 64 e 65**) apresentam sinais de carbono sp^2 de uma dupla trissubstituída com δ_{C} 140,32 e δ_{CH} 123,07, sinal em 59,43 compatível com metileno de álcool primário. Os demais sinais de deslocamento de carbono-13 (**Tabela 7**) e espectro de massas (**Figura 67**) permitiram identificar o diterpeno abaixo como fitol.

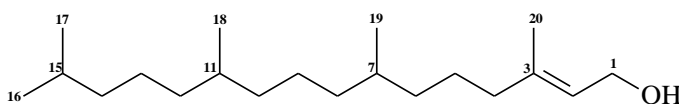


Tabela 7. Comparação dos dados de RMN ^{13}C da substância **17** com dados da literatura (GOODMAN *et al.*, 1973)

C	δ_{C} (ppm)	
	Substância 17 (CDCl_3)	Fitol (CDCl_3)
1	59,4	59,4
2	123,1	123,4
3	140,3	139,9
4	39,9	39,9
5	25,1	25,3
6	36,7	36,8
7	32,8	32,8
8	37,4	37,5
9	24,5	24,6
10	37,4	37,5
11	32,8	32,9
12	37,3	37,4
13	24,8	24,8
14	39,4	39,5
15	28,0	28,0
16	22,7	22,7
17	22,6	22,6
18	19,7	19,8
19	19,7	19,8
20	16,2	16,2

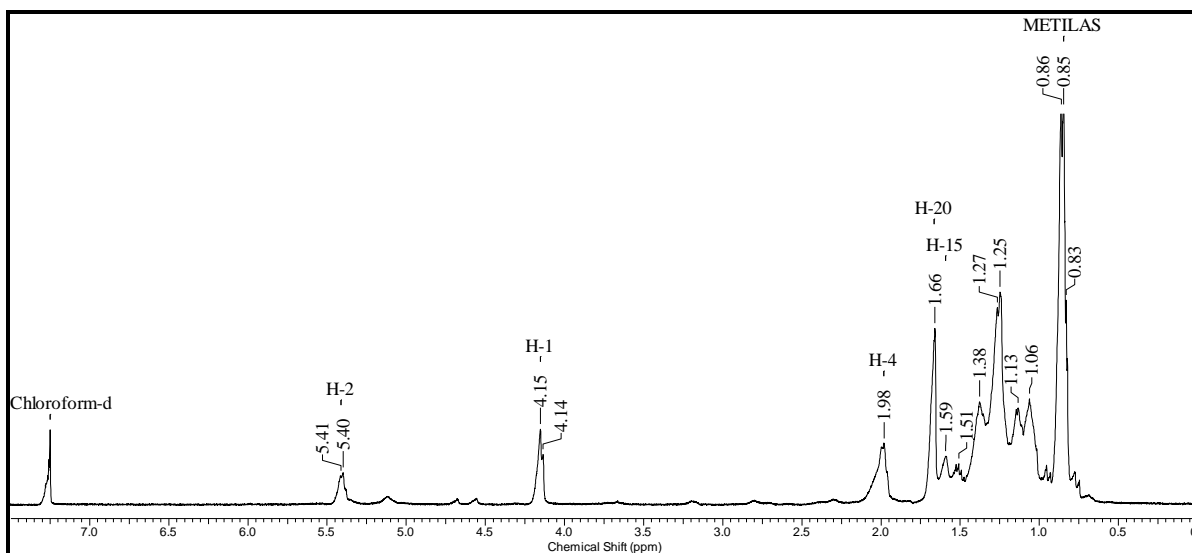


Figura 63. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância 17.

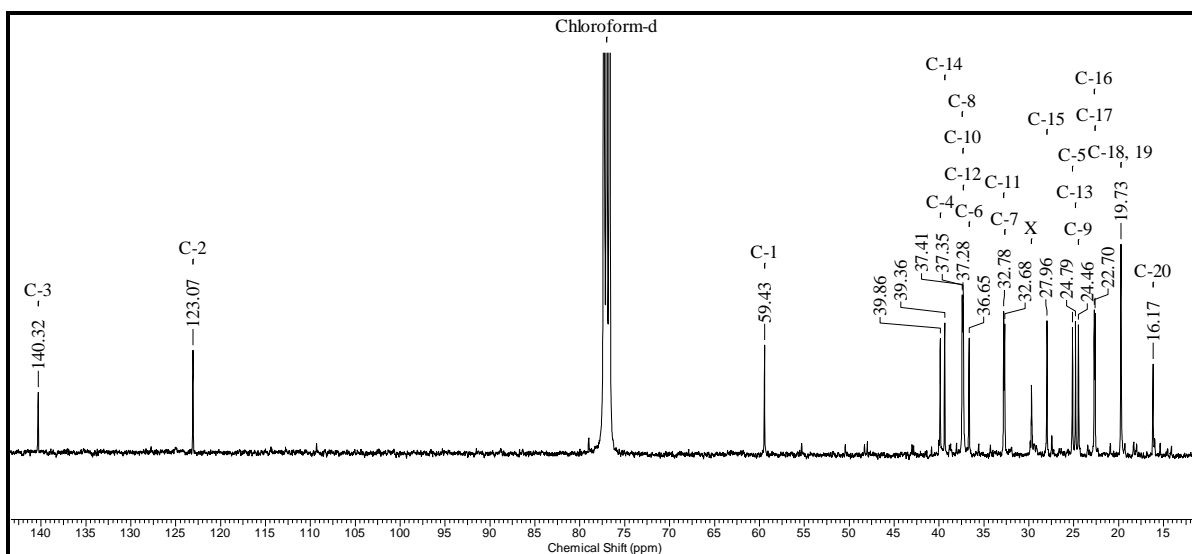


Figura 64. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da substância 17.

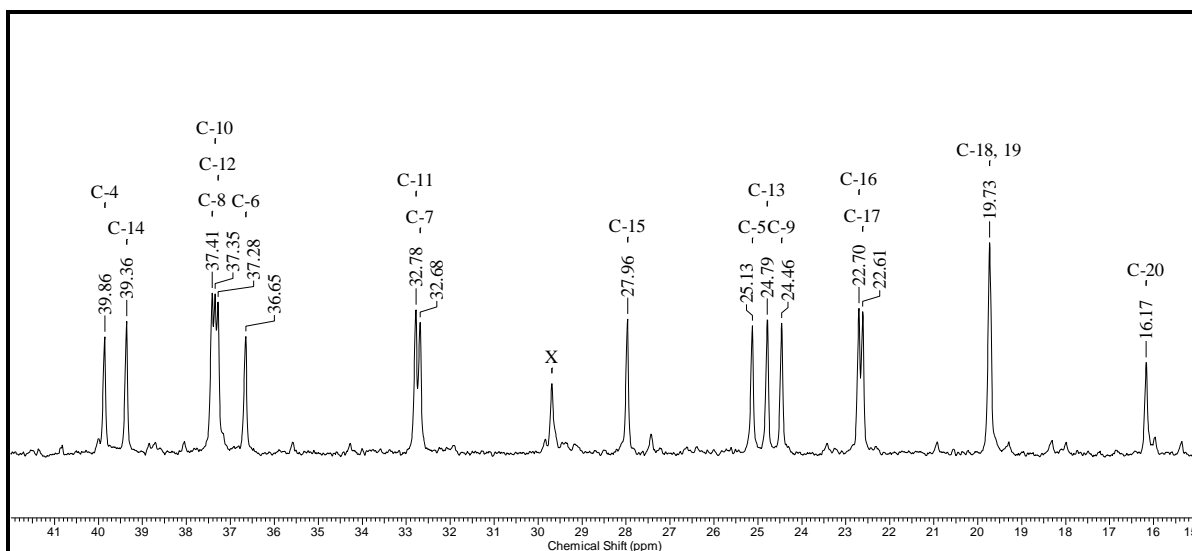


Figura 65. Expansão de espectro de RMN ¹³C da substância 17 de 15 a 42 ppm.

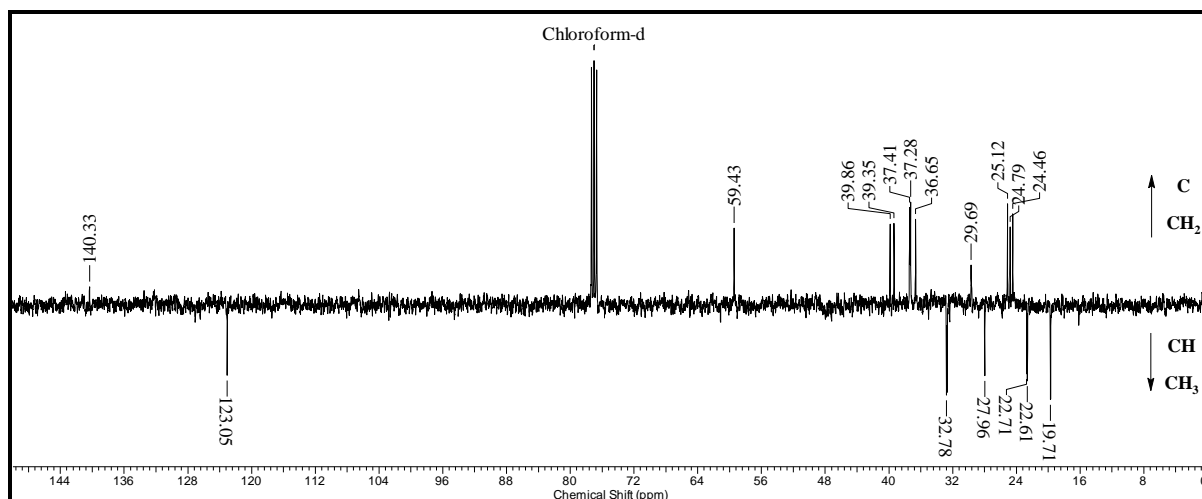


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, CDCl_3) da substância **17**.

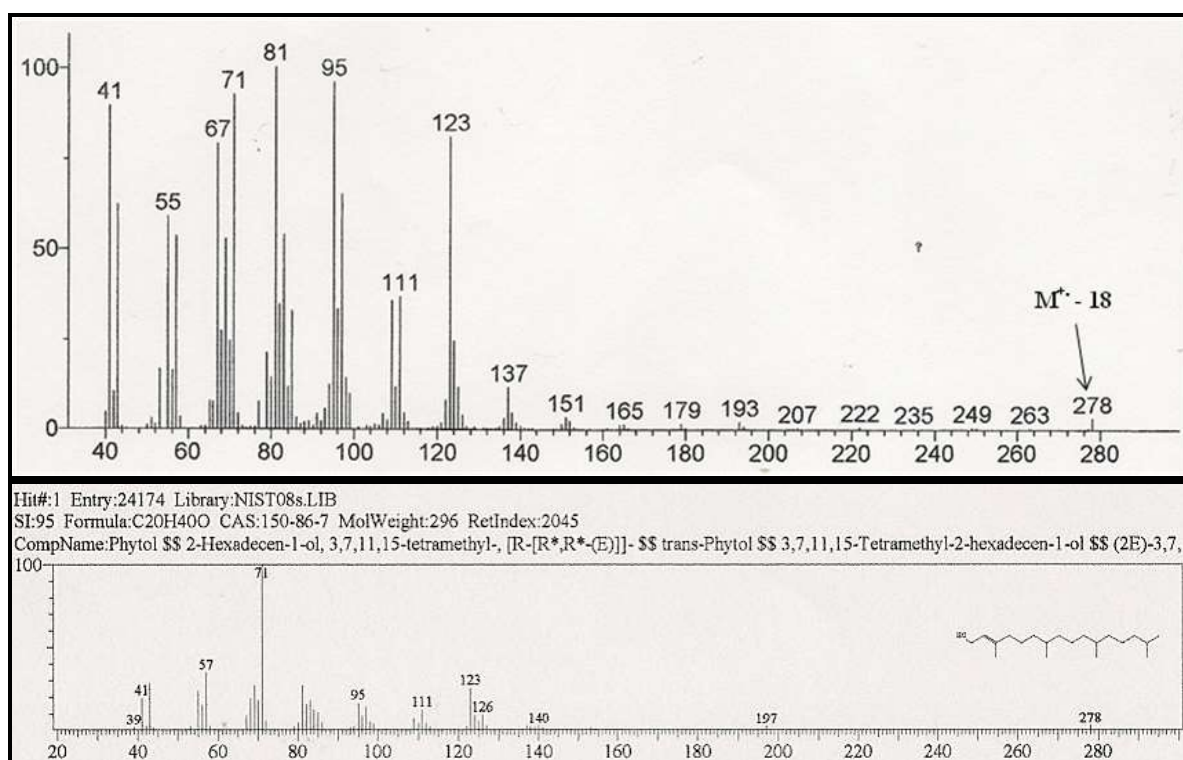


Figura 67. Espectro de massas da substância **17** e comparação com o padrão da biblioteca.

VI.3.2. Identificação da substância **18**

O monoterpeneo **18** foi identificado através de análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , CG-EM e comparação com dados descritos na literatura (SUNG *et al.*, 2010). O espectro de RMN ^1H (Figura 68) mostra sinais característicos em δ_{H} 5,68 atribuídos ao hidrogênio metínico próximo ao grupo carboxila, sinal em δ_{H} 4,32 por estar ligado ao carbono carbinólico, além de sinais de metilas em δ_{H} 1,26; 1,45 e 1,77. O espectro de RMN ^{13}C

(Figura 70) apresenta sinais de uma lactona de cinco membros contendo uma dupla ligação conjugada com a carbonila (δ_C 185, 172,0 e δ_{CH} 112,9), além do sinal de carbono quartenário em δ_C 86,8 há um valor em δ_{CH} 66,8 de carbono metínico carbinólico. A comparação dos deslocamentos dos hidrogênios e carbonos da substância **18** estão relacionados na Tabela 8. O valor do íon molecular m/z 196 e os demais picos presentes no espectro de massas (Figura 71) estão de acordo com a estrutura do carotenóide, Esquema 6.

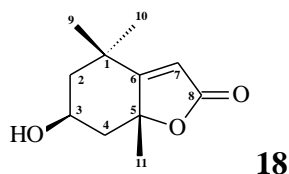


Tabela 8. Comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **18** com dados da literatura (SUNG *et al.*, 2010)

C	Substância 18 (CDCl ₃)		Loliólídeo (CDCl ₃)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	35,9	-	35,9
2	1,98 (<i>td</i> ; 14,7; 2,7) 1,54 (<i>td</i> ; 14,7; 3,9)	47,3	1,97 (<i>td</i> ; 14,8; 2,8) 1,53 (<i>td</i> ; 14,7; 3,6)	47,3
3	4,32 (<i>m</i>)	66,8	4,33 (<i>m</i>)	66,8
4	2,47 (<i>td</i> ; 14,0; 2,4) 1,79	45,6	2,46 (<i>td</i> ; 14,0; 2,4) 1,78 (<i>td</i> ; 14,0; 4,0)	45,6
5	-	86,8	-	86,7
6	-	182,5	-	182,4
7	5,68 (<i>s</i>)	112,9	5,69 (<i>s</i>)	112,9
8	-	172,0	-	171,9
9	1,45 (<i>s</i>)	26,5	1,47 (<i>s</i>)	26,5
10	1,26 (<i>s</i>)	30,6	1,27 (<i>s</i>)	30,6
11	1,77 (<i>s</i>)	26,5	1,78 (<i>s</i>)	27,0

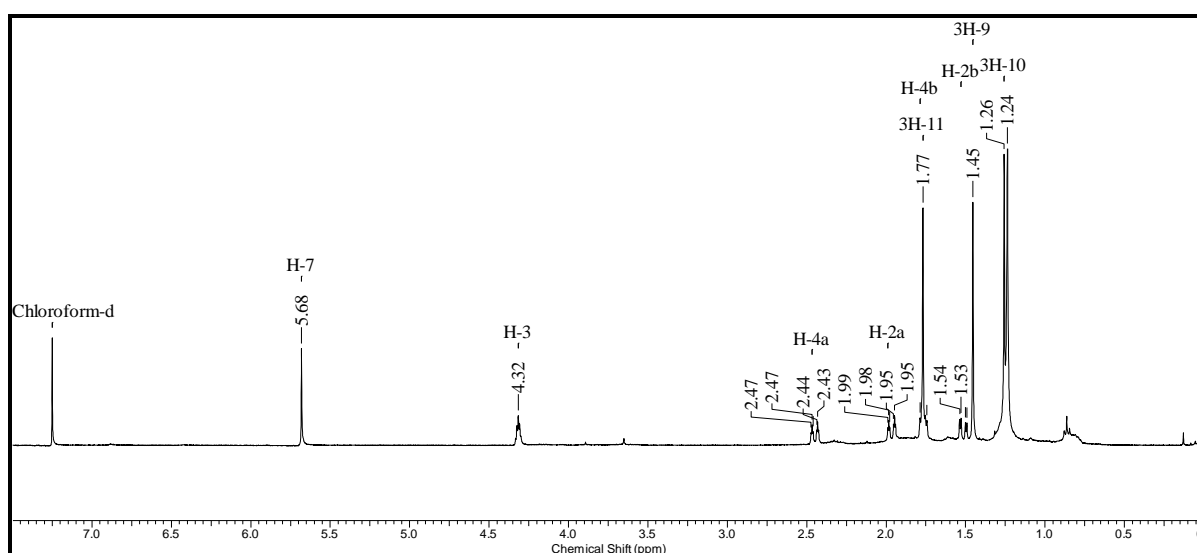


Figura 68. Espectro de RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) da substância **18**

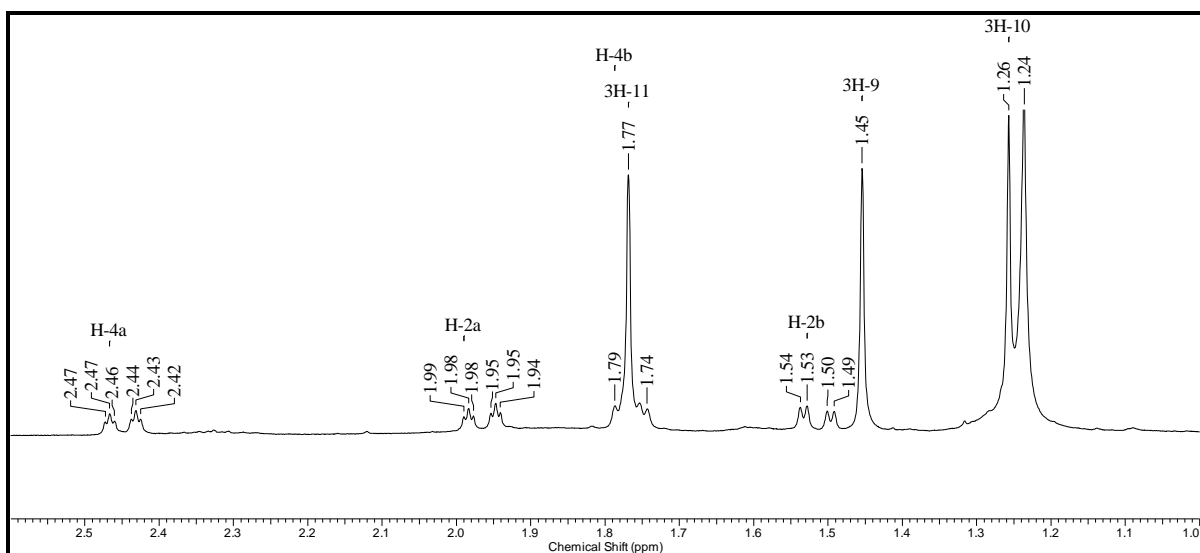


Figura 69. Expansão do espectro de RMN¹H da substância **18** de 1,0 a 2,6 ppm

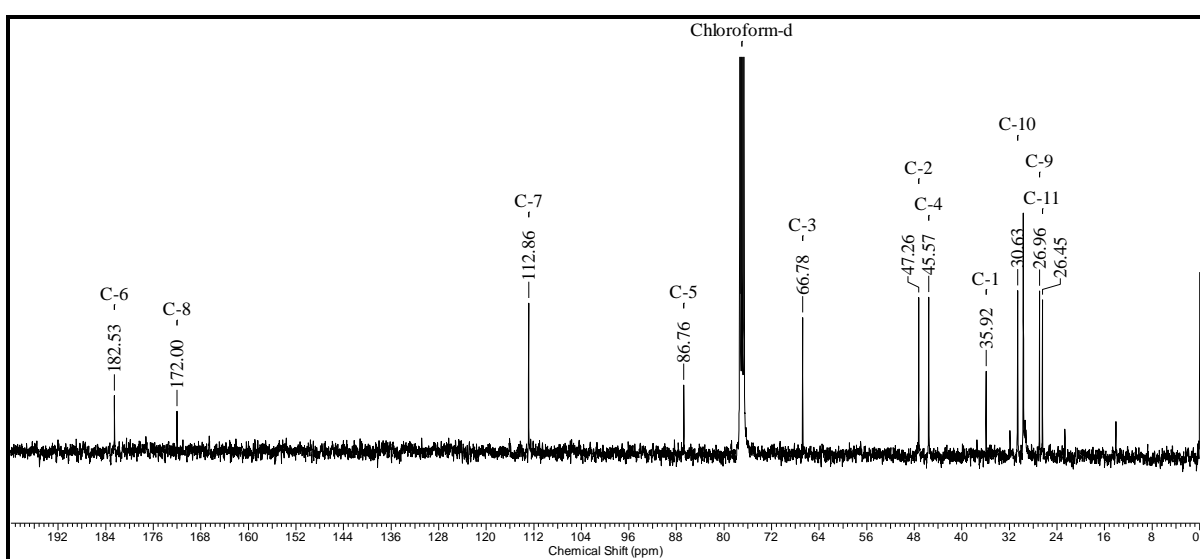


Figura 70. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da substância **18**

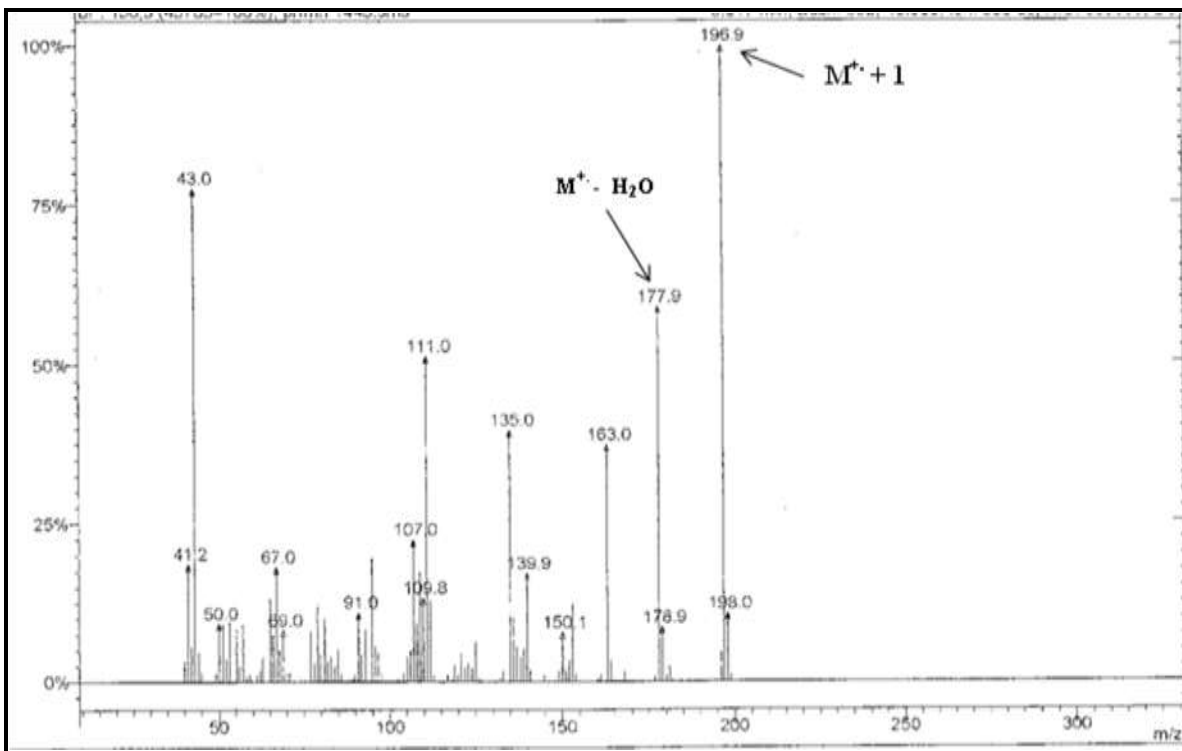
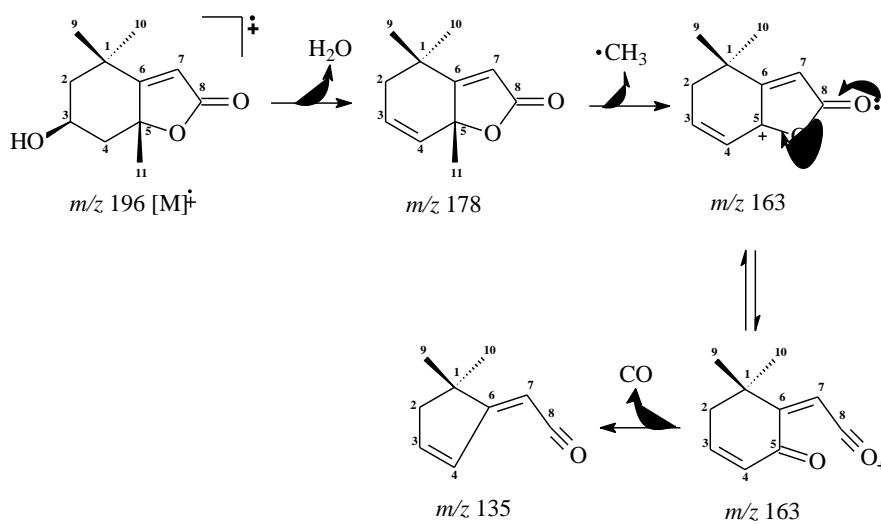


Figura 71. Espectro de massas da substância **18**



Esquema 6. Proposta de fragmentação da substância **18** para justificar os principais picos detectados no EM.

VI.4. Identificação de metabólitos em sementes de *P. rigida*

A análise por métodos espectrométricos dos extratos das sementes de *P. rigida* permitiu identificar 8 substâncias, cujas estruturas estão representadas a seguir.

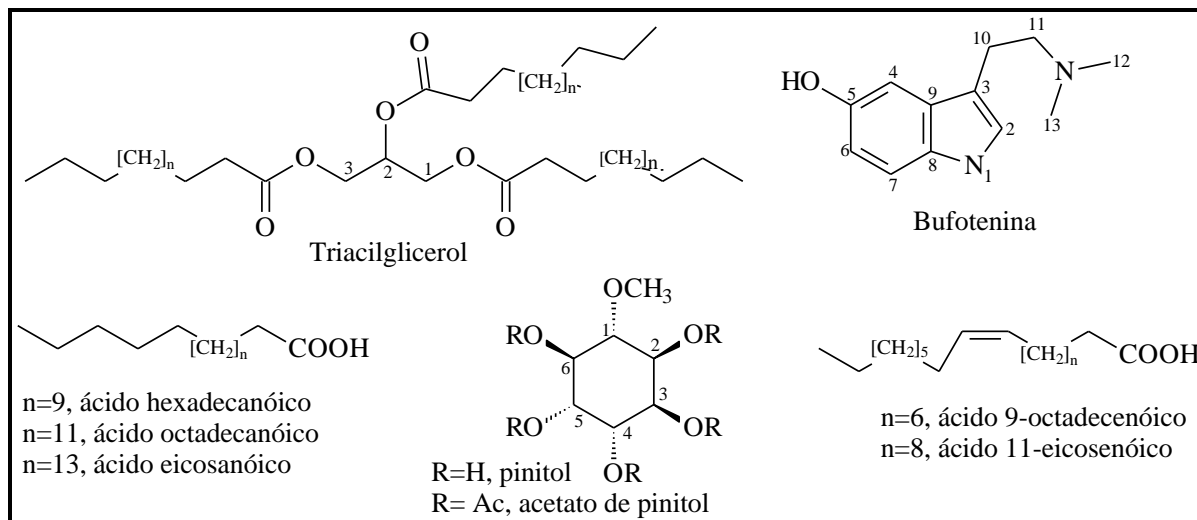


Figura 72. Estruturas dos constituintes identificados das sementes de *P. rigida*.

VI.4.1. Identificação das substâncias Triacilglicerol e ácidos graxos.

A análise do extrato **PRSH** por RMN ¹H (**Figura 73**) revela sinal característico em δ_H 5,23 atribuído ao hidrogênio metínico próximo do glicerol; duplo dubleto em δ_H 4,28 e δ_H 4,14 de hidrogênios metilênicos; hidrogênios α e β -carboxílicos em δ_H 2,31 e 1,60 respectivamente; além de valores em δ_H 1,98 de hidrogênicos alílicos, já os sinais em δ_H 1,27 e 0,87 são de hidrogênios metilênicos e metílicos dos ácidos graxos de triacilglicerol.

Após análises por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do extrato **PRSH** e comparação do espectro de massas referente a cada pico do cromatograma com espectros de massas do bando de dados da biblioteca NIST 08 do aparelho CG-EM.

A partir destes dados foi possível caracterizar os ácidos graxos no cromatograma do extrato **PRSH**, num total de 67,47 % da composição da mesma. Os compostos identificados do extrato **PRSH** encontram-se listados na **Tabela 8**. Analisando a **Tabela 8**, foi possível verificar o ácido 9-octadecenóico (**Figuras 76**) como majoritário dentre os demais ácidos graxos, seguido dos ácidos saturados eicosanóico (**Figuras 79**), octadecanóico (**Figuras 77**) e hexadecanóico (**Figuras 75**).

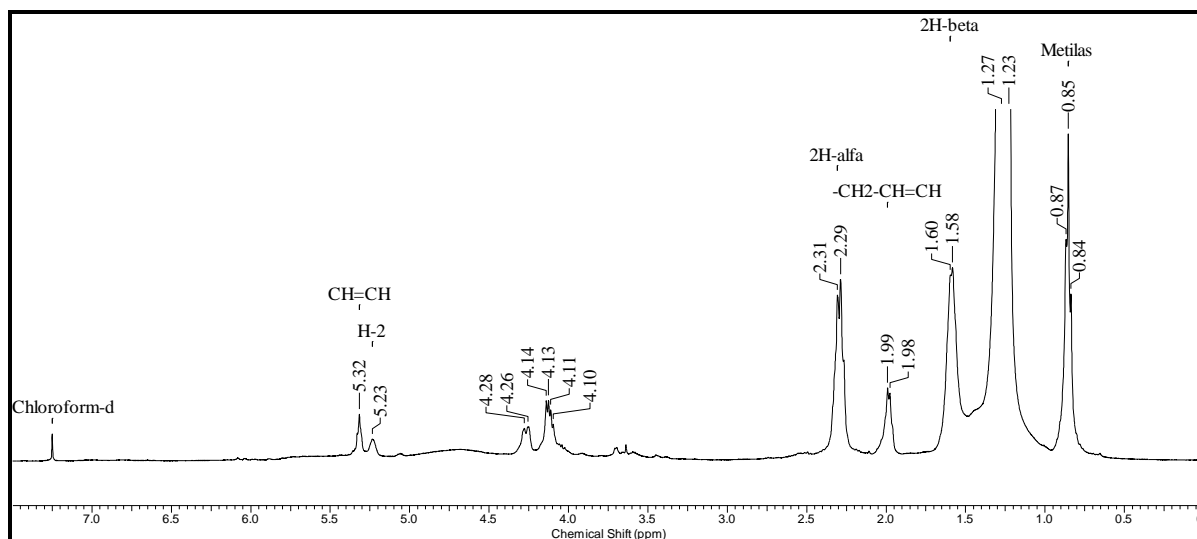


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do extrato **PRSH**

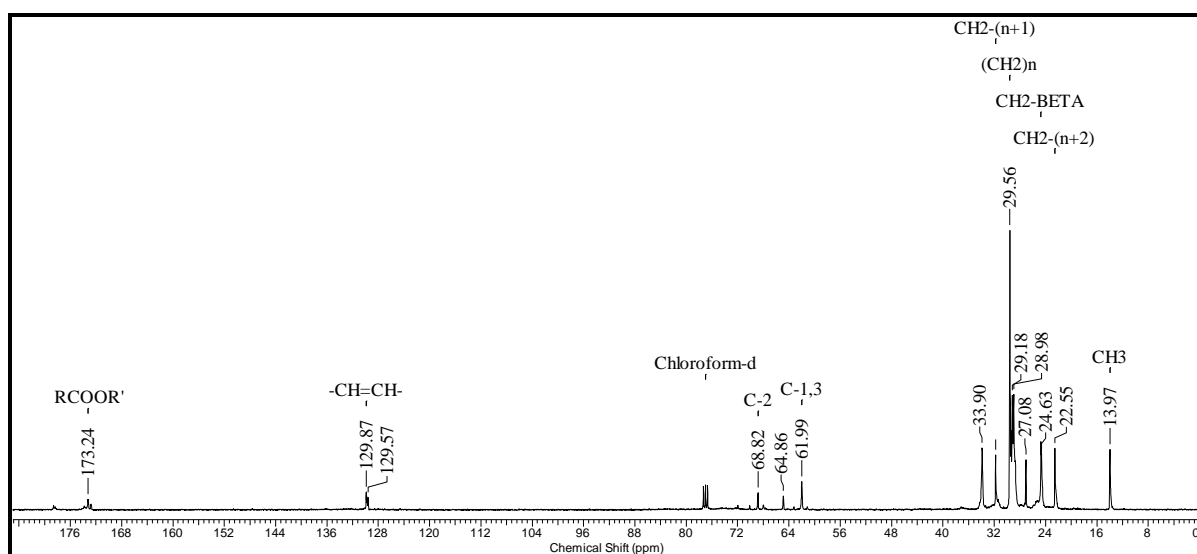


Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do extrato **PRSH**

Tabela 9. Identificação de ácidos graxos presentes no extrato PRSH pela biblioteca Nist08 do aparelho CG-EM

Constituinte proposto	Nome comum	M^+	Área (%)
Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	256	10,23
Ácido 9-Octadecenóico	Ácido oleico	282	17,19
Ácido Octadecanóico	Ácido esteárico	284	10,78
Ácido nonadecatrienóico	-	292	8,91
Ácido eicosanóico	Ácido araquídico	312	11,68
Ácido docosanóico	Ácido beênico	340	8,68

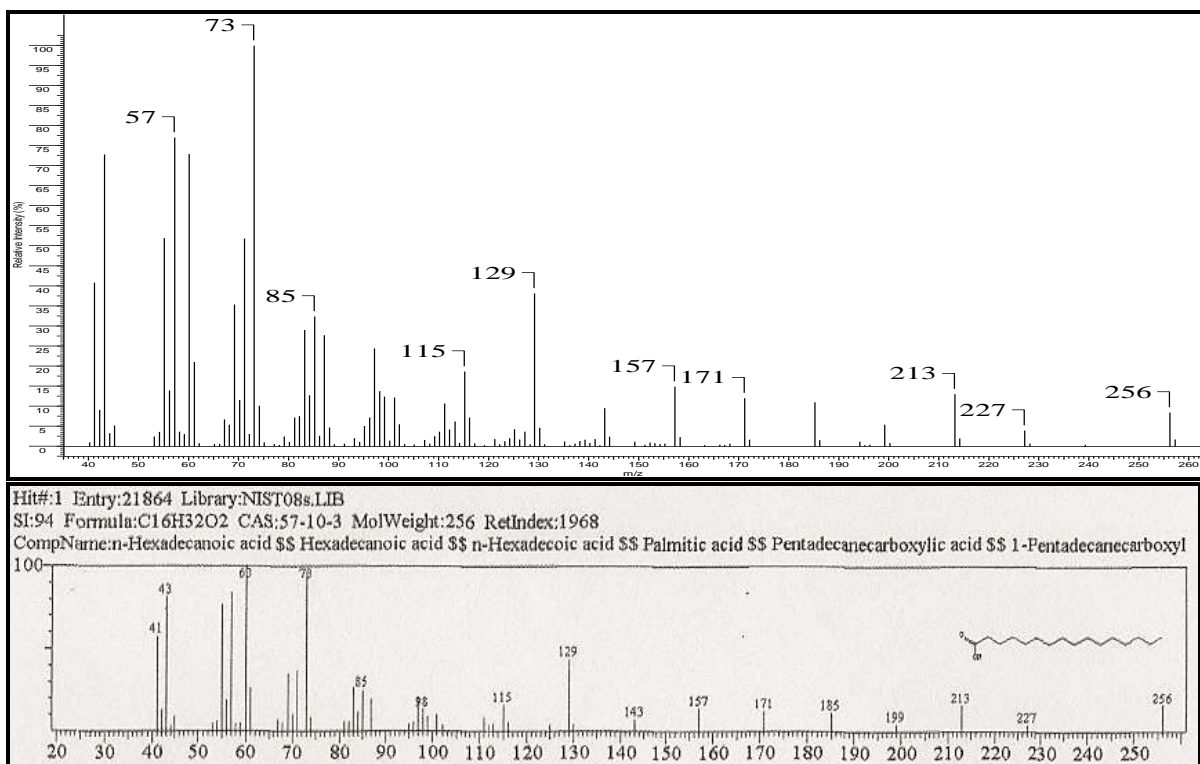


Figura 75. Espectro de massas do ácido hexadecanóico e comparação com o padrão da biblioteca.

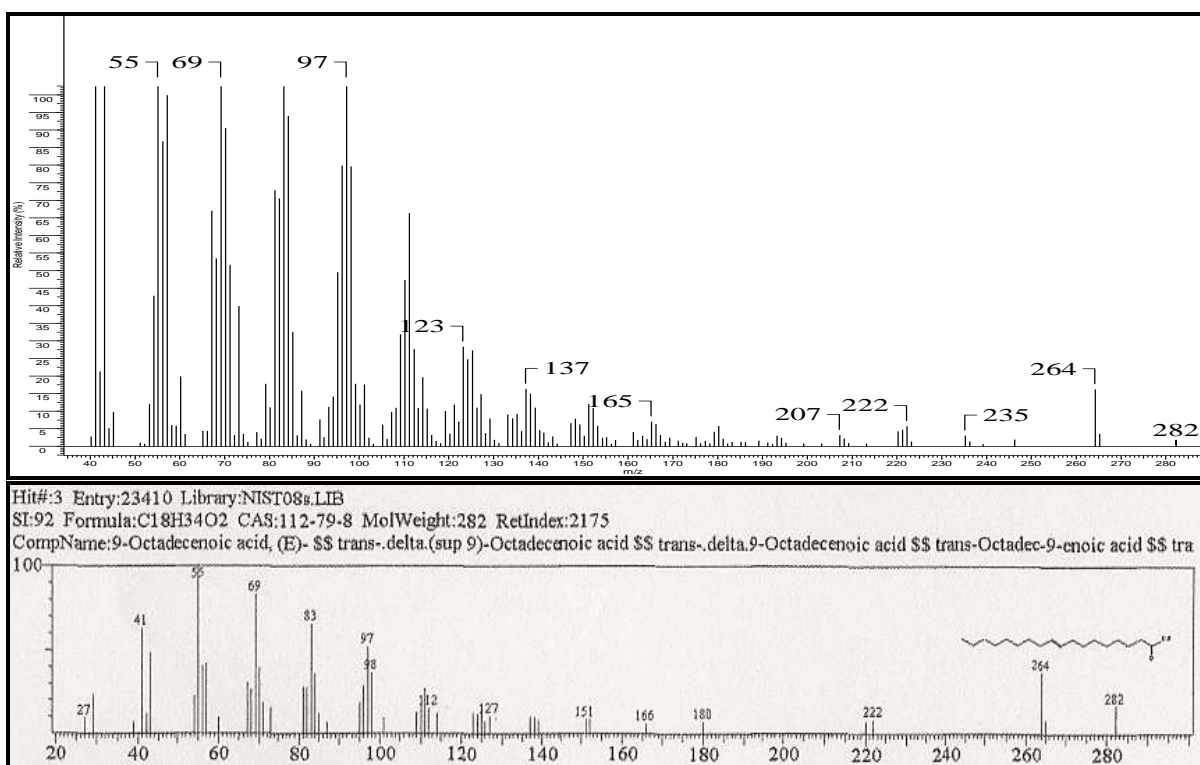


Figura 76. Espectro de massas do ácido 9-octadecenóico e comparação com o padrão da biblioteca.

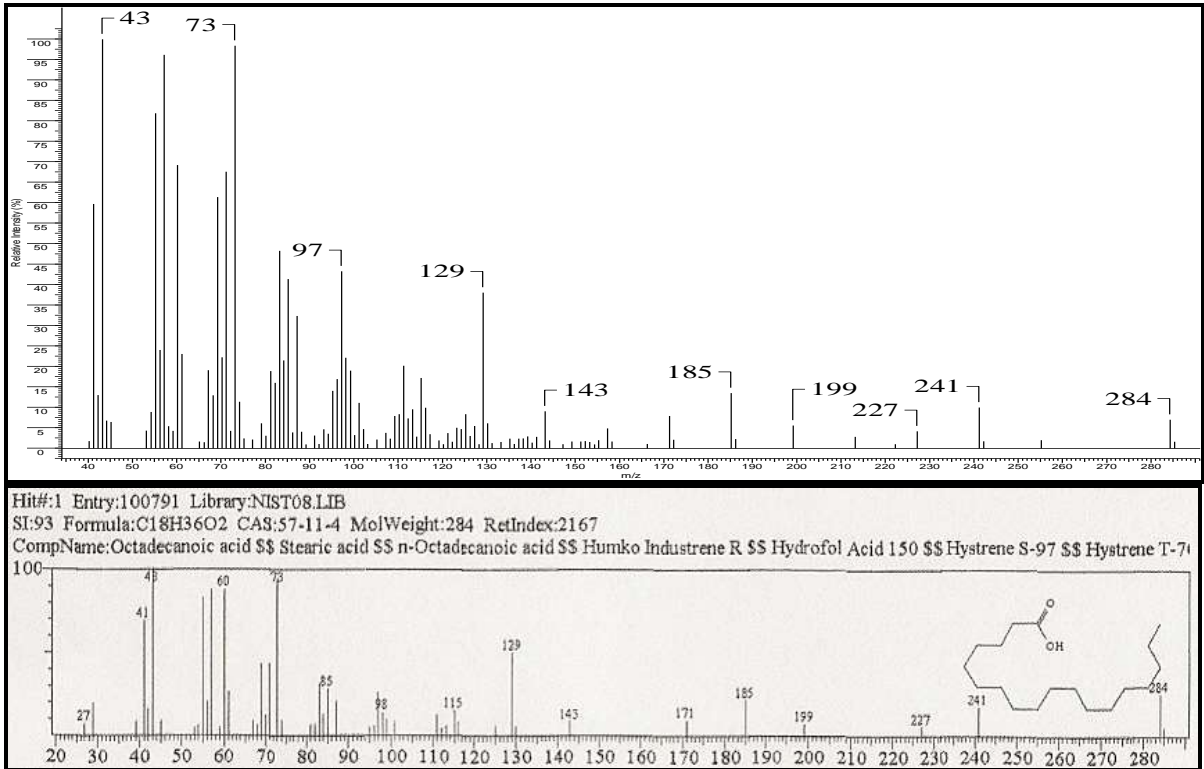


Figura 77. Espectro de massas do ácido octadecanóico e comparação com o padrão da biblioteca.

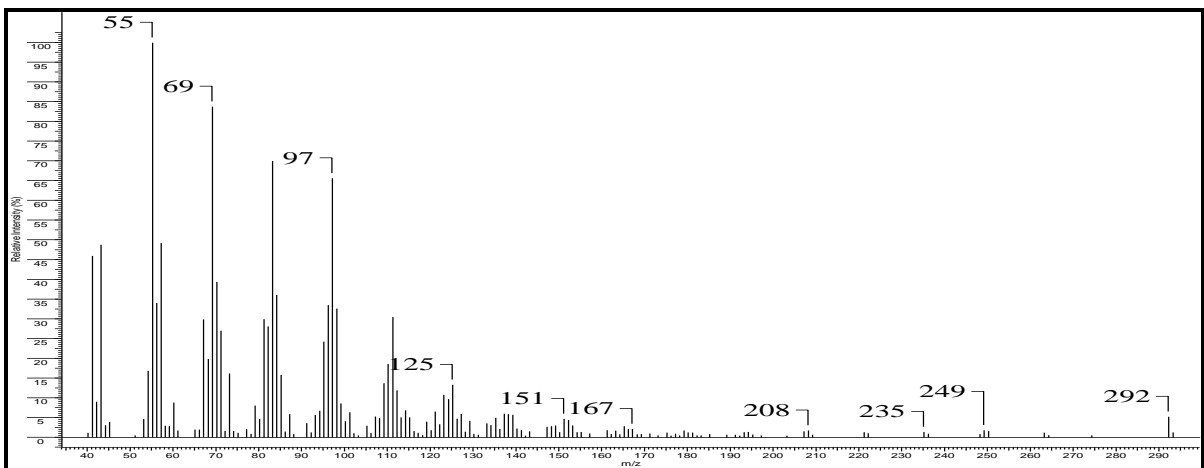


Figura 78. Espectro de massas do ácido nonadecatrienóico (C₁₉H₃₂O₂)

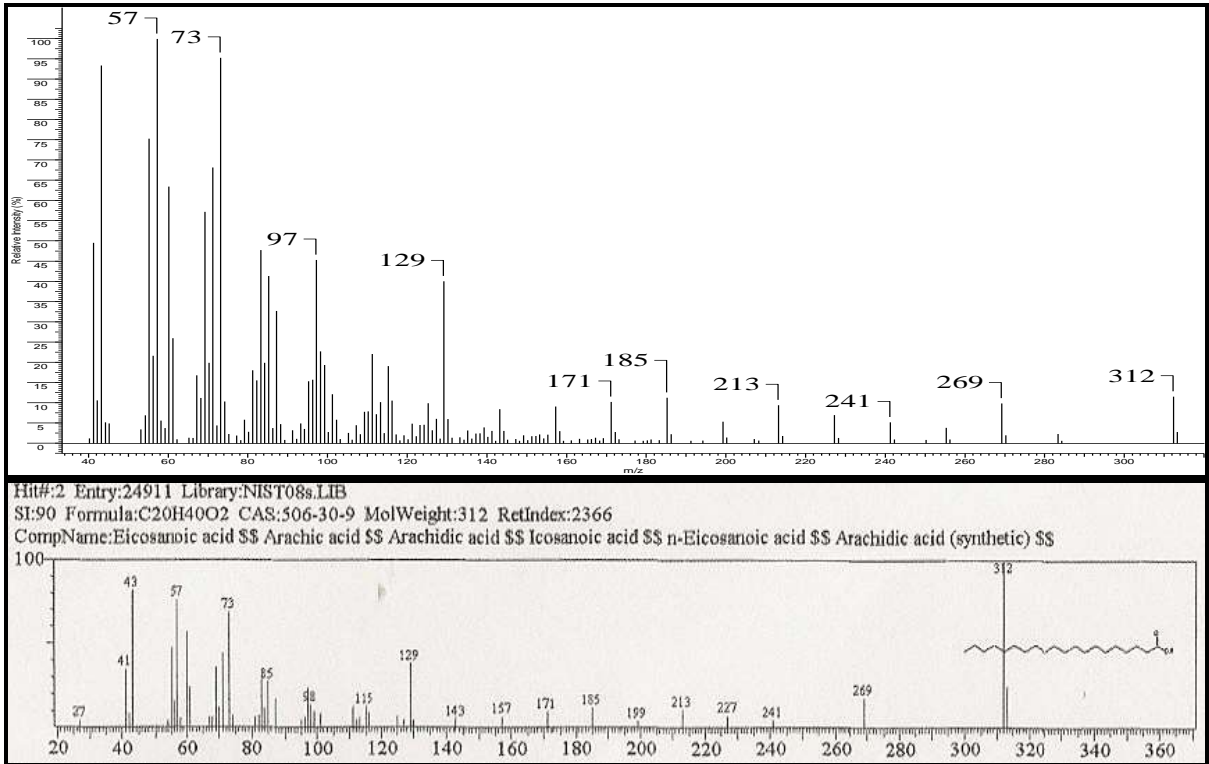


Figura 79. Espectro de massas do ácido eicosanóico e comparação com o padrão da biblioteca.

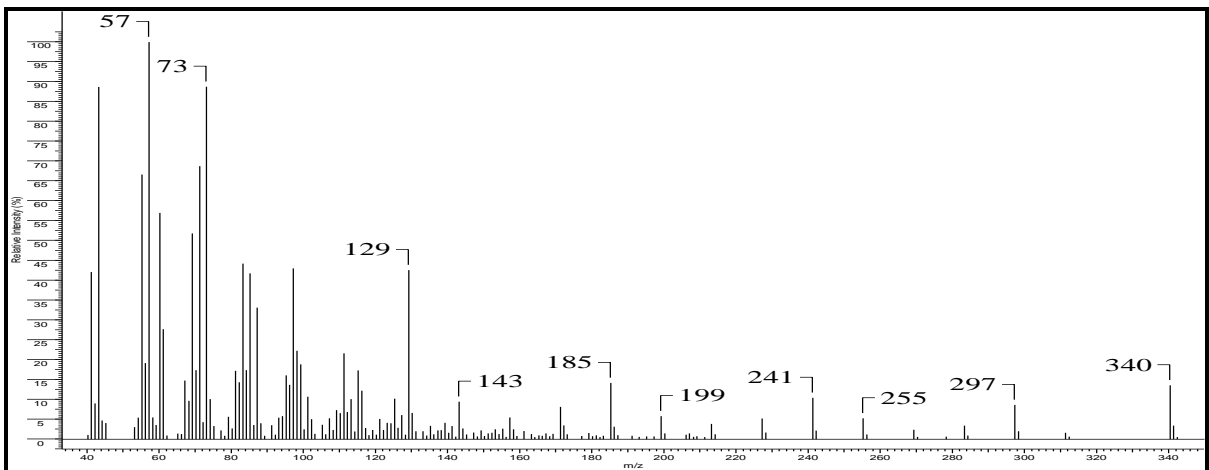
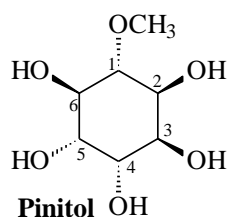
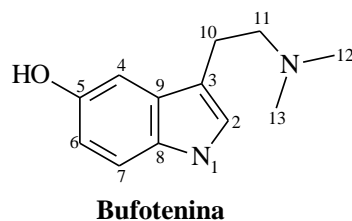


Figura 80. Espectro de massas do ácido docosanóico (C₂₂H₄₄O₂).

VI.4.2. Identificação das substâncias Bufotenina e Pinitol.

O alcalóide indólico **bufotenina** e o poliálcool cíclico **pinitol** foram identificados em mistura através de análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , CG-EM do extrato **PR SMB** e comparação com dados descritos na literatura (RAMOS, 2008). O espectro de RMN ^1H (**Figura 81**) apresenta sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,59; 7,07 e 7,11, além de hidrogênio olefínico próximo a nitrogênio em δ_{H} 6,84, o espectro mostra ainda sinal em δ_{H} 10,56, atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio, sinais em δ_{H} 2,88 e 2,94, característicos de hidrogênios metilênico benzílicos e ligados a nitrogênio. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 82 e 83**) apresenta sinais de um esqueleto indol contendo uma dupla ligação no anel pirrol (δ_{C} 190,3 e δ_{CH} 102,2), além de sinais de carbono quartenário em δ_{C} 130,9 e 127,7. Há um valor em δ_{C} 150,3 de carbono de sistema aromático oxigenado. A comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da substância alcaloídica estão relacionados na **Tabela 10**. A **Tabela 11** mostra a comparação dos deslocamentos de RMN ^{13}C com a literatura. A análise deste extrato **PR SMB** em CG-EM (**Figura 84**) revelou a presença de dois componentes, entre a mistura, com Tr = 12,70 min., (39,37 %) e Tr = 16,94 min., (32,88 %). Os espectros de massas dos componentes destes picos (**Figura 85 e 86**), confirmaram a presença do carboidrato pinitol e do alcalóide indólico bufotenina dentre a mistura.

De acordo com a literatura, bufotenina foi relatada em sementes de outras espécies do gênero *Piptadenia* como: *P. peregrina* (STROMBERG, 1954; FISH *et al.*, 1955), *P. macrocarpa* (FISH *et al.*, 1955), *P. colubrina* (PACHTER *et al.*, 1959), *P. falcata* (GIESBRECHT, 1960), *P. excelsa*, *P. paraguayensis* e *P. viridiflora* (IACOBUCCI & RUVEDA, 1964). Este alcalóide é considerado como principal constituinte em algumas destas espécies de *Piptadenia*, conferindo a elas inclusive propriedades psicotrópicas e alucinantes (RAYMOND-HAMET, 1956; D'ALCONTRES & CUZZODREA, 1957; DELAVEAU, 1960), que podem ser potencializadas ou até apresentar outras atividades biológicas devido a presença do pinitol (BHAT *et al.*, 2009)



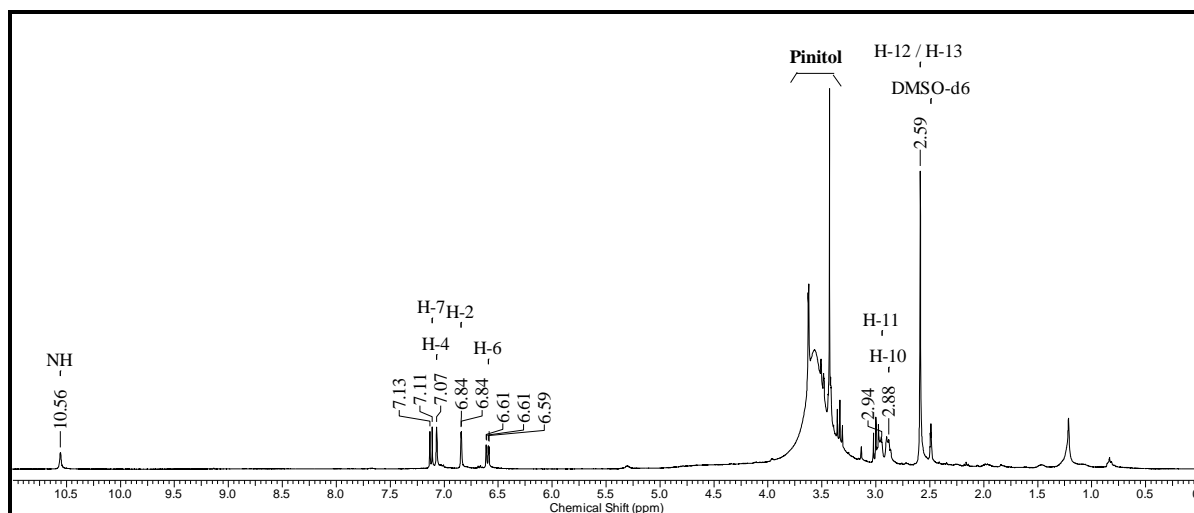


Figura 81. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do extrato PRSMB

Tabela 10. Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do extrato PRSMB com dados da literatura (RAMOS, 2008)

C	PRSMB (DMSO)		Bufotenina (DMSO)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
N-H	10,56	-	10,42	-
2	6,84	102,2	6,80	102,5
3	-	109,3	-	11,8
4	7,07	123,5	7,02	123,2
5	-	150,3	-	150,4
6	6,59	111,5	6,59	111,4
7	7,11	111,8	7,11	111,9
8	-	130,9	-	131,1
9	-	127,7	-	128,2
10	2,88	21,3	2,73	23,4
11	2,94	57,9	2,49	60,2
12	2,59	43,2	2,20	45,3

Tabela 11. Comparação dos dados de RMN ^{13}C do extrato PRSMB com dados da literatura (BRUTMAIER & VOELTER, 1987)

C	δ_{C} (ppm)	
	PRSMB (DMSO)	Pinitol
1	83,8	82,5
2	72,6	72,1
3	71,0	70,4
4	72,4	71,3
5	72,0	71,7
6	70,1	69,8
CH ₃	59,7	59,4

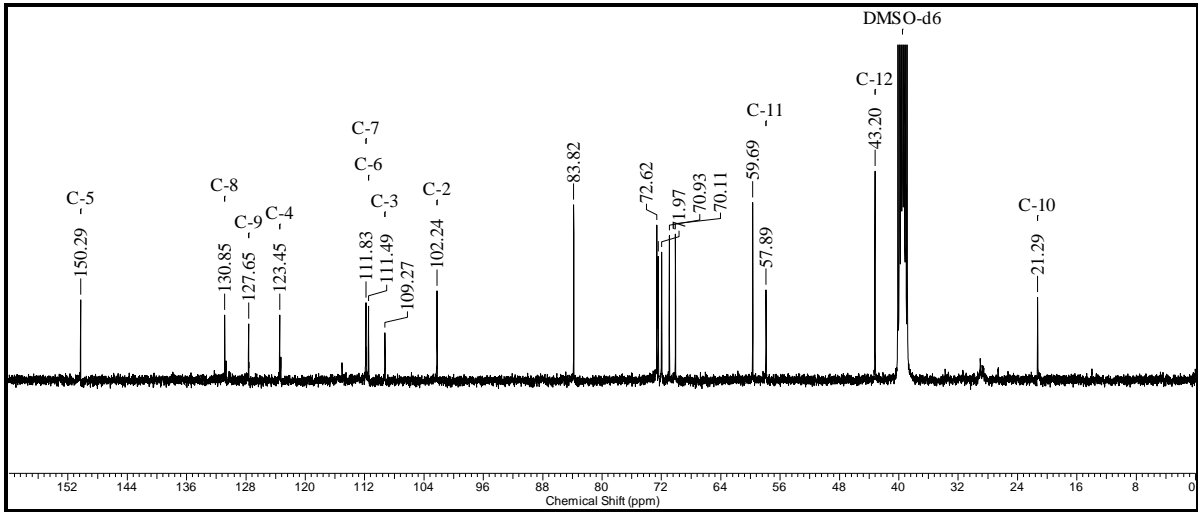


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do extrato PRSMB

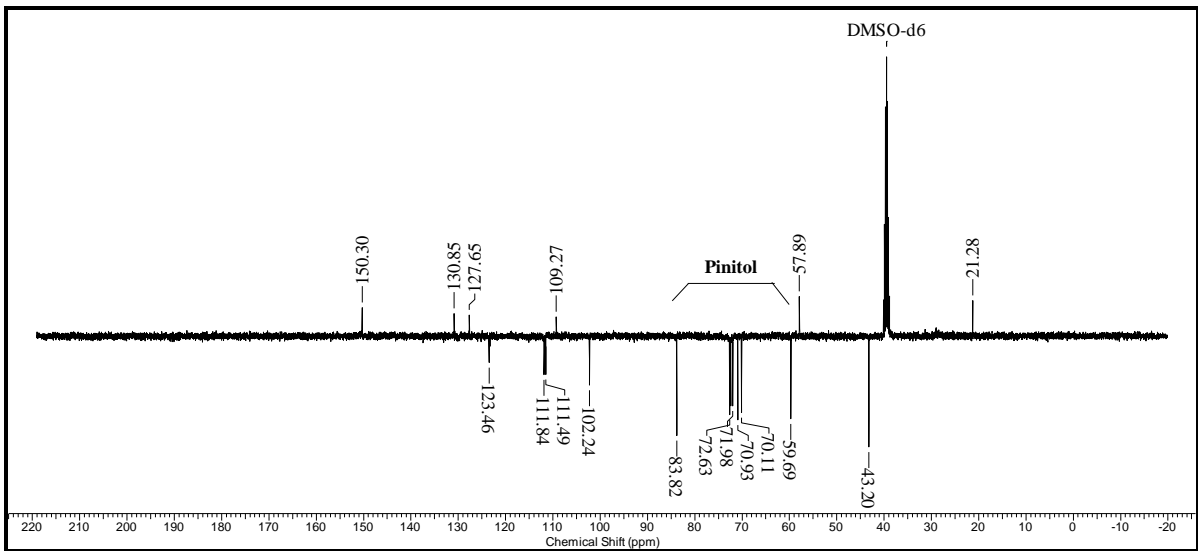


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, DMSO- d_6) do extrato PRSMB

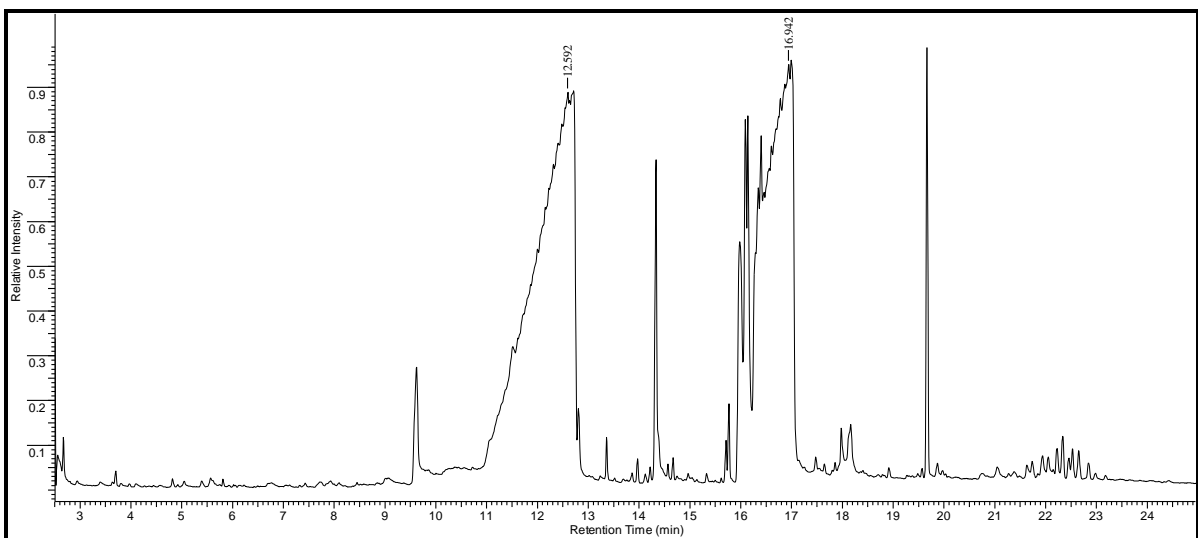


Figura 84. Cromatograma (CG) do extrato PRSMB

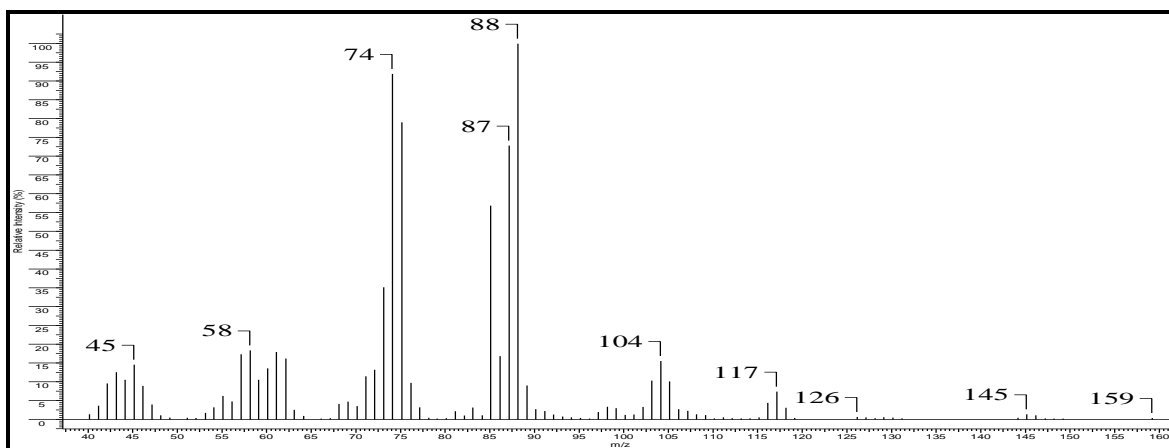


Figura 85. Espectro de massas do Pinitol (Tr: 12,592 min.) identificada no extrato **PR SMB**.

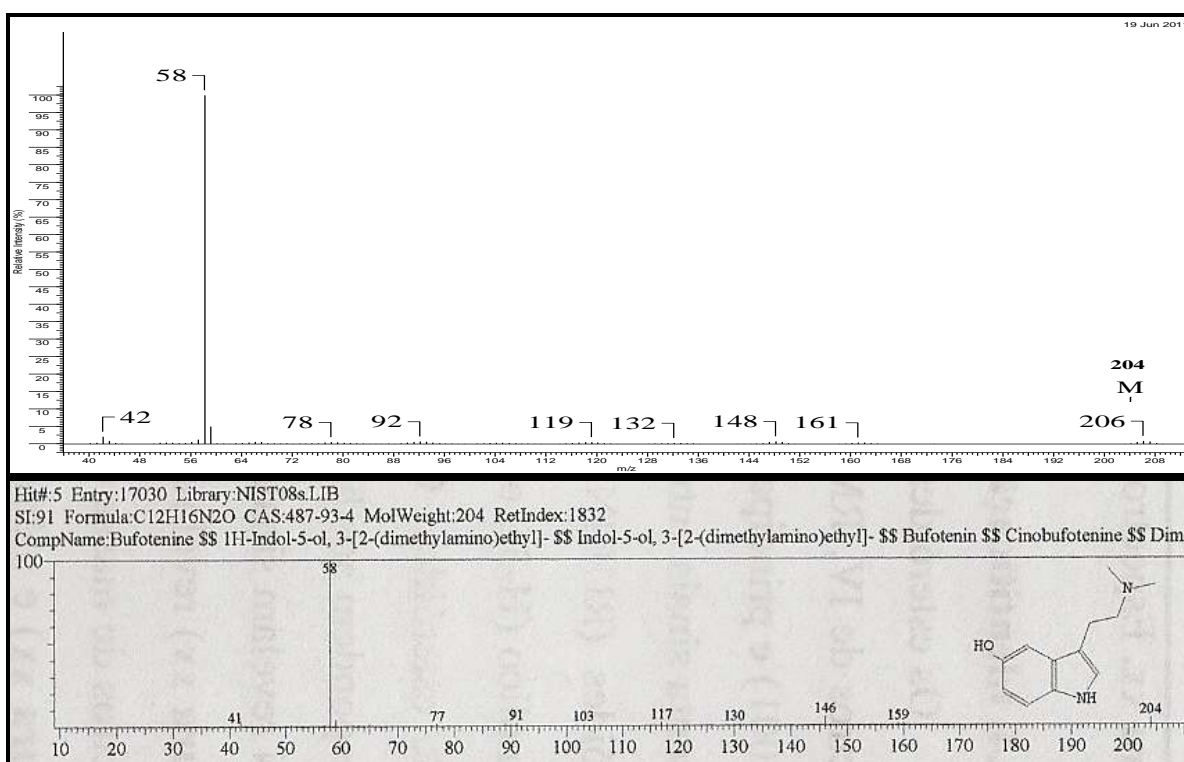


Figura 86. Espectro de massas da Bufotenina (Tr: 16,942 min.) e comparação com o padrão da biblioteca, identificada no extrato **PR SMB**.

VI.4.3. Identificação do derivado acetilado do Pinitol.

O extrato **PR SMB** foi submetido à derivatização por reação de acetilação com piridina e ácido acético. A análise em RMN ^{13}C e CG-EM, mostrou como produto majoritário, apesar de algumas impurezas, o derivado pentacetilato do pinitol. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 87**) revelou a presença de carbonilas de acetato em campo baixo, bem como metilas do grupo acetato em campo alto. O espectro de massas (**Figura 88**) apresentou padrão de fragmentação compatível para o produto devido às fragmentações envolvendo unidades acetoxílicas. O

Esquema 7 mostra as propostas de fragmentações que justificam alguns dos picos detectados no espectro de massas do produto contendo cinco unidades de acetila.

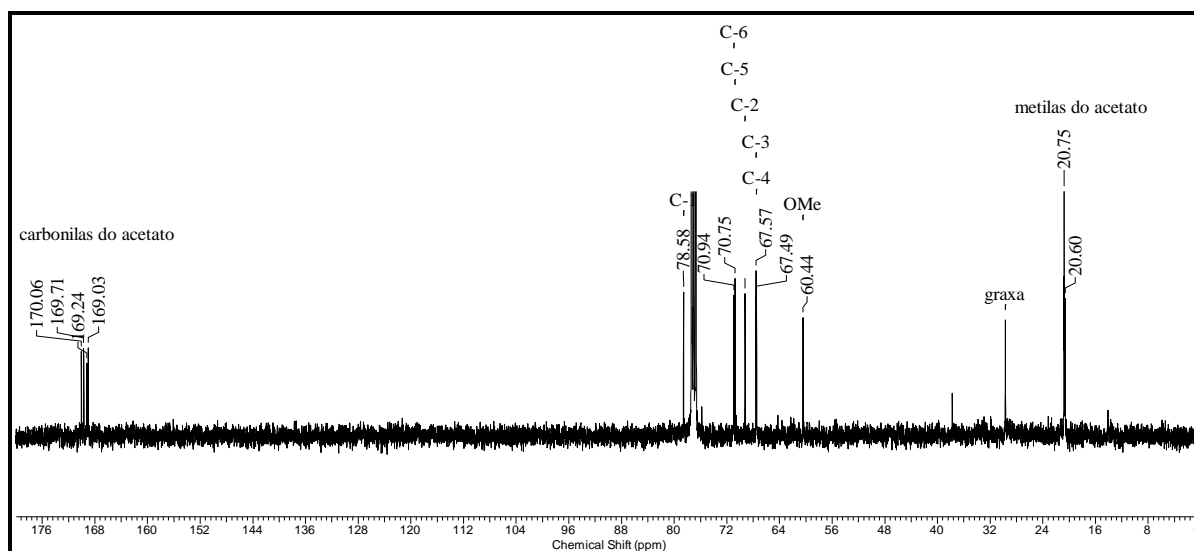
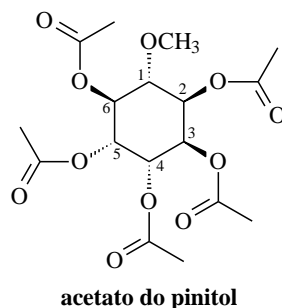


Figura 87. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do extrato **PR SMB** acetilado.

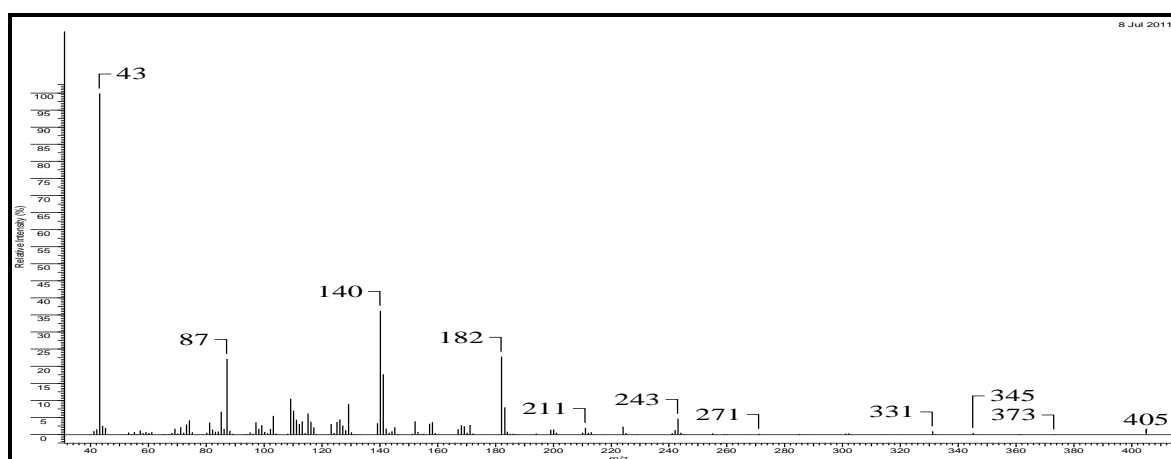
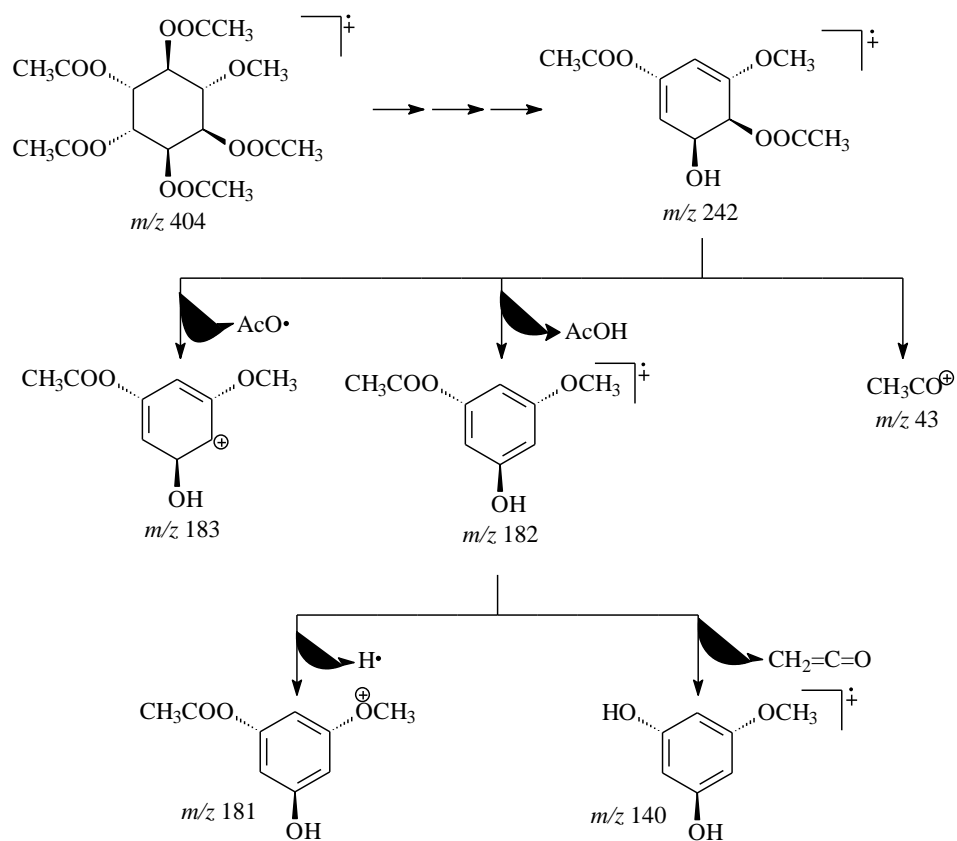


Figura 88. Espectro de massas do derivado acetilado do pinitol.



Esquema 7. Proposta de fragmentação derivado acetilado do pinitol para justificar os principais picos detectados no EM.

VII. IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES EM ÓLEO DE FOLHAS DE *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia rigida* EXTRAÍDOS COM CO₂ SUPERCRÍTICO E HIDRODESTILAÇÃO

VII.1. INTRODUÇÃO

O avanço dos estudos envolvendo produtos naturais é justificado pelo interesse nas características medicinais, aromatizantes e corantes para alimentos ou na fabricação de cosméticos e perfumes de diversos extratos de plantas. Assim, a obtenção de óleo a partir de matéria-prima de origem vegetal é uma atividade de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos.

Um exemplo é a extração de óleos vegetais, sejam eles essenciais ou fixos. Os óleos essenciais são, normalmente, misturas de substâncias oleosa de baixa ou média viscosidade, altamente voláteis, com exceção das substâncias puras, que podem ser sólidas como a cânfora (MILLER & MILLER, 1991). Seus componentes são, principalmente, mono e sesquiterpenos, além de fenilpropanoides, metabólitos que apresentam características sensoriais, com ampla utilização em composições farmacêuticas e elaboração de fragrâncias (BIZZO, 2009). Os óleos fixos são aqueles que, geralmente, não apresentam compostos voláteis, mas sim compostos graxos como constituintes majoritários. Como exemplo, tem-se o óleo de amêndoas de pêssego rico em ácido oléico e linoléico, e o óleo de rosa mosqueta que apresenta ácido linoléico como constituinte principal (MAGALHÃES *et al.*, 2005; MEZZOMO, 2008).

As utilidades destes óleos são muitas, eles são responsáveis pelos aromas e odores especiais em perfumes, cosméticos, sabonetes, desodorantes etc. Também podem ser utilizados como solventes e insumos para a indústria, medicamentos e materiais de partida em síntese orgânica nas indústrias química e farmacêutica (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades medicinais, as quais tem sido cientificamente estudadas (SIANI *et al.*, 1999). Devido a elevada demanda por óleos essenciais, sua comercialização se dá tanto na forma bruta como na forma de substâncias isoladas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO, 2009).

Os óleos essenciais são obtidos tradicionalmente por hidrodestilação, extração por arraste a vapor e extração com solvente orgânico. No entanto, durante o desenvolvimento desses processos pode ocorrer a degradação térmica de compostos durante a extração, a possibilidade de hidrólise e a hidrossolubilização dos mesmos. Estes fatores são sérios

obstáculos na reprodução de fragrâncias naturais. Outra desvantagem seria o fato desses processos envolverem o uso e a eliminação de solventes orgânicos.

Assim, faz-se necessário, muitas vezes, a aplicação de técnicas de extração alternativas com melhor seletividade e eficiência. Neste contexto, a extração com fluido supercrítico explora as propriedades do solvente acima de seus pontos críticos. Utilizando o dióxido de carbono (CO₂) como solvente, a extração supercrítica (ESC) é reconhecida como “limpa”. O CO₂ tem a vantagem de ser atóxico, inerte, não inflamável, altamente disponível, principalmente como subproduto de outras indústrias, como as que empregam fermentação (REVERCHON, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999).

São inúmeras as matérias-primas adequadas para a realização de estudos com tecnologia supercrítica. A demanda por compostos de alto valor agregado presente nos óleos essenciais ou fixos, obtidos a partir de matérias-primas vegetais, tem aumentado o interesse por novos processos de extração. Visando melhorar a qualidade dos extratos obtidos das plantas, e baixar os custos operacionais de processo, a extração com fluido supercrítico tem sido bastante utilizada para extrair óleos essenciais ou fixos de plantas. Diante disso, ela apresenta-se como uma técnica capaz de gerar uma fonte alternativa de renda, sem necessidade de pós-processamento e com a possibilidade de ajustar parâmetros visando a seletividade do processo para um grupo específico de compostos a serem extraídos da matriz vegetal.

A aplicabilidade da ESC é encontrada em diferentes áreas, como as de alimentos, farmacêuticas, químicas e indústrias de combustível. Devido às vantagens dos fluidos supercríticos, atualmente, eles são especialmente úteis para extração em duas situações: (1) a extração de compostos bioativos valiosos como flavors, corantes e outras biomoléculas ou (2) a remoção de compostos indesejáveis como poluentes orgânicos, toxinas e pesticidas. Em ambos os casos, o substrato sólido pode ser tratado como uma matriz que é geralmente inerte para o solvente e o soluto ou a mistura de solutos que constituirão o extrato (RODRIGUES *et al.*, 2002; REVERCHON, DE MARCO, 2003).

VII.1.1. Histórico da utilização da extração supercrítica (ESC)

A extração com fluido supercrítico surge para atender às exigências de mercado por produtos com alta pureza e menores impactos ambientais. Na década de 60 foi utilizado para extração alternativa de óleos essenciais e aromas (VARGAS, 2005) e em seguida, nos anos

70, remoção da cafeína do café em escala industrial (MOORE *et al.*, 1994). Desde então, a extração supercrítica continua sendo difundida como: uma tecnologia limpa, que não deixam resíduos, que não há necessidade de mais uma etapa de separação, que não alteração das propriedades das matérias-primas e que extrai produtos com maior seletividade e pureza (VARGAS, 2005). Em consequência, a extração com fluido supercrítico tornou-se uma alternativa importante na extração de óleos essenciais ou fixos de plantas, assim como na extração de compostos de alto valor agregado presente neles.

VII.1.2.Fluido Supercrítico

A extração com fluido supercrítico (EFSC) tem apresentado muitos estudos com aplicações diversas pela sua versatilidade como técnica de extração onde o solvente extrator é um fluido supercrítico capaz de permear matrizes complexas (REVERCHON, DE MARCO, 2006).

O uso do dióxido de carbono como solvente supercrítico tem valorizado a utilização da técnica para diferentes usos, se valendo de suas características favoráveis, como ser atóxico, não inflamável e ser de fácil obtenção, para ganhar espaço na área industrial. Outra vantagem é que ele agrada os órgãos ambientais pois é considerada uma tecnologia limpa e se enquadra nos resquesitos da química verde (PINTO *et al.*, 2006).

O estado de fluido supercrítico (FSC) é definido como aquele em que a temperatura e a pressão estão acima da temperatura crítica (T_c) e da pressão crítica (P_c), o que pode ser visualizado em um diagrama de fases (CAMEL, 1998), apresentado na **Figura 89** (PINTO *et al.*, 2006).

O poder de solvatação é uma característica presentes nos fluidos supercríticos que auxiliam na extração de analitos da matriz. Isso é possível, uma vez que, nas condições supercríticas o fluido adquire densidade semelhante a de um líquido, contudo ele ainda pode sofrer compressão assim como um gás (SKOOG, 1995; STUART *et al.*, 1996). Quanto maior for o poder de solvatação do fluido, maior sua capacidade de extrair substância da matriz. A alta densidade e a difusibilidade do fluido supercrítico garantem uma extração com maior rendimento e rapidez, respectivamente (PINTO *et al.*, 2006; REVERCHON, DE MARCO, 2006).

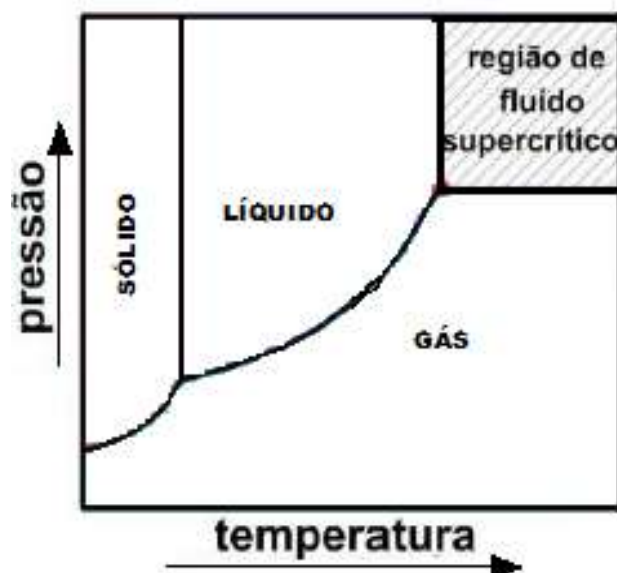


Figura 89. Diagrama de fases mostrando a região do fluido supercrítico para o dióxido de carbono. (Adaptado de PINTO *et al.*, 2006)

O dióxido de carbono é considerado um solvente supercrítico adequado para fins de extração de óleos essenciais, pois é atóxico, não inflamável, é inerte, é de fácil obtenção, apresenta baixa temperatura crítica (pode ser aplicado em condições de temperatura que não venham a degradar substâncias termolábeis), e tem a vantagem de que seu poder de seletividade ou solvência pode ser ajustável, de acordo com a pressão. O dióxido de carbono possui baixa viscosidade e elevados coeficientes de difusão. Como desvantagem desse processo pode-se citar a extração de componentes de óleo essencial juntamente com ceras cuticulares; ou seja, compostos parafínicos localizados na superfície do material vegetal (REVERCHON, 1997).

VII.1.3. Extração supercrítica

Uma unidade de extração com fluido supercrítico pode apresentar diferentes modelos. Mas alguns componentes são essenciais em um sistema de extração supercrítica como: uma bomba de solvente, que bombeia o fluido para o vaso extrator, uma segunda bomba pode também estar conectada ao vaso extrator para o uso de um co-solvente (modificador de fase), o vaso extrator pode apresentar o formato que for mais adequado a sua utilização, separadores para coleta do extrato e despressurização do solvente, o quais podem ter refrigeração para melhor recuperação do extrato. As condições experimentais como temperatura e pressão

devem ser controladas durante a extração. Geralmente, o vaso extrator é aquecido por meio de banho termostático com recirculação do líquido aquecedor. A pressão é controlada e mantida constante pelo uso de um manômetro. A extração com reciclo do fluido extrator pode ser usado em unidades cuja a planta atende esses requisitos (HERRERO *et al.*, 2006).

A **Figura 90** apresenta um aparato experimental típico de uma unidade de extração com fluido supercrítico e que se encontra montada no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, no Departamento de Engenharia Química da UFRRJ.

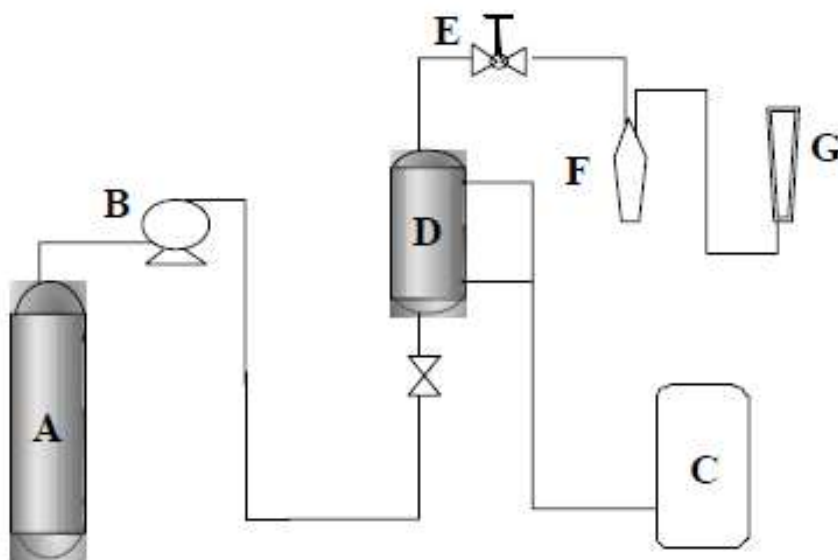


Figura 90. Planta experimental de ESC com componentes básicos, onde A – cilindro de CO₂, B – bomba de alta pressão, C – banho de aquecimento, D – extrator, E – válvula micrométrica, F – refinado, G – rotâmetro.

VII.1.4. Hidrodestilação

A extração de óleo essencial promovida por hidrodestilação usando método Clevenger requer basicamente um balão de destilação, uma manta de aquecimento compatível ao tamanho do balão a ser utilizado e um condensador do tipo Clevenger conectado a um sistema de refrigeração. O material vegetal é colocado no balão de destilação e imerso em água destilada. A extração do óleo essencial se dá pelo aquecimento da mistura até a temperatura de ebulição da água. A partir do desprendimento de vapor os constituintes essenciais são arrastados e são condensados. Após a condensação, os compostos solúveis separam-se da

água por decantação (MARTINEZ, *et al.*, 2004; MEIRELES, 2003, SILVA *et al.*, 2005a). A **Figura 91** mostra o sistema de hidrodestilação utilizando o Clevenger.

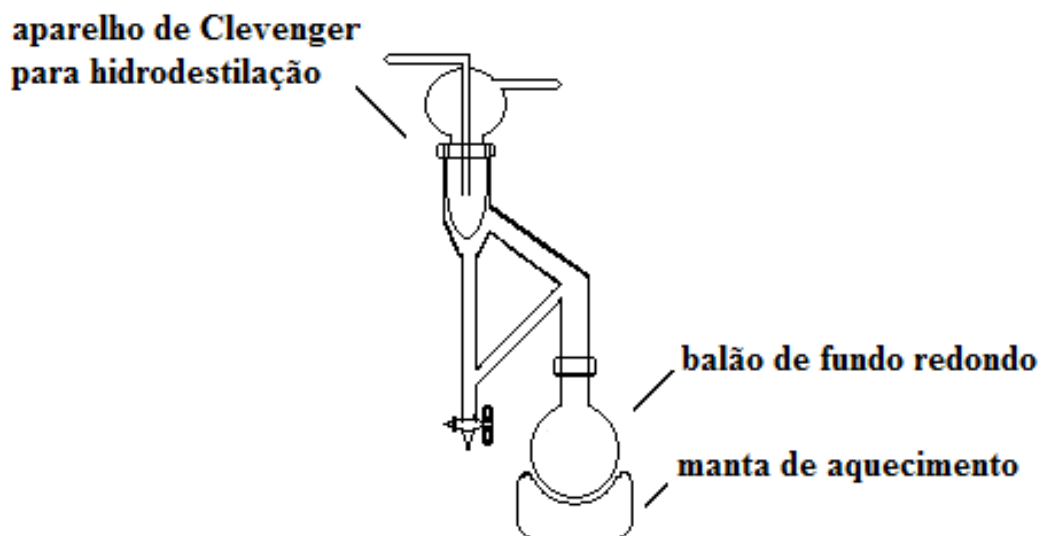


Figura 91. Sistema de hidrodestilação utilizando Clevenger.

VII.1.6. Extração de óleos vegetais – Vantagens e Desvantagens

Na obtenção de óleos essenciais ou fixos, os processos de extração mais comuns são a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação, extração com solventes orgânicos, extração por prensagem e a extração com fluido supercrítico (EFSC).

A hidrodestilação, embora seja um processo simples, apresenta desvantagens como baixos rendimentos e, principalmente, eventual perda de componentes termolábeis presentes no óleo volátil, devido as altas temperaturas requeridas no processo. A extração com solvente orgânico tem como principais restrições a possibilidade de contaminações ambientais, de extração de compostos indesejáveis que podem aumentar o custo do fracionamento do extrato ou diminuir o rendimento em compostos de interesse, a necessidade de pós-processamento para remoção do solvente, o qual reduz a qualidade do produto devido a sua toxicidade.

As propriedades dos solventes acima dos seus pontos críticos, como alta massa específica, difusividade intermediária e baixa viscosidade, são atributos que a extração com fluido supercrítico possui para favorecer a extração de constituintes de diversas matrizes (REVECHON, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999; MEZZOMO, 2008).

A versatilidade dessa técnica de extração está na possibilidade de alterar as variáveis do processo (temperatura e pressão de operação) permitindo obter diferentes condições experimentais capazes de extrair os constituintes de interesse da matriz estudada. Desta forma, o mesmo solvente pode solubilizar substâncias com diferentes polaridades devido as alterações feitas nas suas condições supercríticas (BRUNNER, 1994).

A utilização de soxhlet para obter óleo essencial tem como vantagem um bom rendimento, porém este pode estar, às vezes, relacionado a substâncias de alto peso molecular co-extraídas, devido a alta temperatura usada no momento da extração, além da presença de impurezas do solvente que podem permanecer na composição do óleo. O aumento do rendimento também pode levar a diminuição do teor de compostos interesse, devido a presença de substâncias de menor interesse (WENQIANG *et al.*, 2007).

VII.1.7. Óleos essenciais

O aroma característico das plantas aromáticas procede das centenas de compostos, os quais são metabólitos secundários voláteis e estão presentes nos óleos essenciais bioproduzidos por essas plantas. Estes óleos são misturas de substâncias orgânicas voláteis que na sua maioria são de origem terpênicas, e menos frequente de fenilpropanoides, alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta (VARGAS *et al.*, 2010). Os terpenos encontrados são, normalmente, monoterpenos e sesquiterpenos, como moléculas de dez e de quinze carbonos respectivamente. A obtenção de terpenos com moléculas maiores depende do método de extração e da espécie vegetal (SIANI *et al.* 1999).

Comumente, óleos essenciais são encontrados em várias partes das plantas como flores, folhas, casca, madeira, rizomas, frutas ou sementes. Apesar de qualquer parte da planta poder conter óleos essenciais, a composição química do óleo pode apresentar perfis diferentes influenciados pela fatores como localização geográfica, condições climáticas, horário de coleta, idade da planta, forma de cultivo e características genéticas (PEREIRA *et al.*, 2008 a, b; SIMÕES *et al.*, 1999).

Nas plantas, os óleos voláteis exercem as funções de defesa contra patógenos, insetos predadores e animais herbívoros, uma vez que sua presença pode deixar a planta menos palatável. Entretanto, poder ser atrativo a insetos e pássaros responsáveis pela polinização da espécie (SIANI *et al.*, 1999; VARGAS, 2005).

VII.1.8. Óleos fixos

Na composição de alguns óleos essenciais podem ser encontradas substâncias que não apresentam aroma ou características flavorizantes, o que normalmente caracteriza um óleo essencial. Em óleos essenciais podem ser encontrados constituintes que variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Geralmente, a mistura apresenta um dos compostos como majoritários e os demais como traços (SIMÕES *et al.*, 1999). Quando a composição desses óleos apresenta predominância de substâncias graxas, de alto peso molecular ou que não lhe conferem aroma; estes óleos podem ser denominados óleos fixos. Óleos fixos são utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos, além de outras aplicações relacionadas às propriedades biológicas e farmacológicas que muitos deles apresentam (PEREIRA *et al.*, 2010).

Um exemplo disso é o óleo de abajeru obtido por EFSC, que apresentou potencial hiperglicêmico devido a presença do triterpeno lupeol (VARGAS *et al.*, 2010). Outro exemplo é o óleo da rosa mosqueta, rosa selvagem encontrada na Argentina e Chile; na Europa ela é conhecida como *rosehip* e é comercialmente utilizada na indústria de cosméticos. A sua semente possui de 6-7 % de óleo fixo, cujo principal componente é o ácido linoléico (MAGALHÃES *et al.*, 2005).

VII.2. MATERIAIS E MÉTODOS

VII.2.1. Material seco e preparação da amostra

As folhas de *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia rigida* foram coletadas no Jardim Florestal do Instituto de Florestas (IF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A coleta das folhas de ambas as espécies de *Piptadenia* foi realizada na estação de estiagem, de julho a janeiro, do ano de 2008, no período da tarde, correspondente a, aproximadamente, um saco de 20 litros. Após a coleta, as folhas foram secas e armazenadas em local com boa ventilação.

As amostras das folhas foram tratadas da mesma forma, ou seja, as folhas foram retiradas dos galhos e deixadas em uma bancada para secagem. Depois de secas, em condições ambiente, no momento da utilização, as folhas eram cortadas com tesoura em

pedaços menores, de uma forma irregular. Após serem cortadas, as folhas eram pesadas em balança digital, numa quantidade entre 4 e 5 g, e alimentadas no extrator da unidade experimental de extração com fluido supercrítico. As demais folhas, não cortadas, ficavam na bancada, expostas às condições ambientes, até serem utilizadas.

O CO₂ com 99,9% de pureza mínima, solvente utilizado para extração supercrítica, foi adquirido da AGA S.A..

VII.2.2. Métodos de extração

VII.2.2.1. Extração usando fluido supercrítico

Cerca de 4,5 g de material vegetal foram alimentados no extrator e, em seguida, o banho termostático e a bomba de alta pressão eram ligados, atingindo-se a temperatura e a pressão desejadas. A amostra permanecia durante 40 minutos em contato com o solvente na condição operacional estipulada e logo após eram realizadas amostragens a cada 5 minutos, utilizando a técnica de despressurização através de uma válvula micrométrica situada na saída do extrator. Com a redução de pressão, a amostra era recuperada em um tubo de polipropileno.

Os experimentos foram realizados nas condições operacionais de 100, 150 e 200 bar para a pressão e 40, 60 e 80 °C para a temperatura. O tempo máximo de extração foi de 80 minutos, onde se observou a saturação da curva de extração. A amostragem ocorreu a uma vazão máxima de 16,45 mL/min, controlada por um rotâmetro previamente calibrado.

A **Figura 92** mostra o equipamento experimental utilizado nos experimentos.

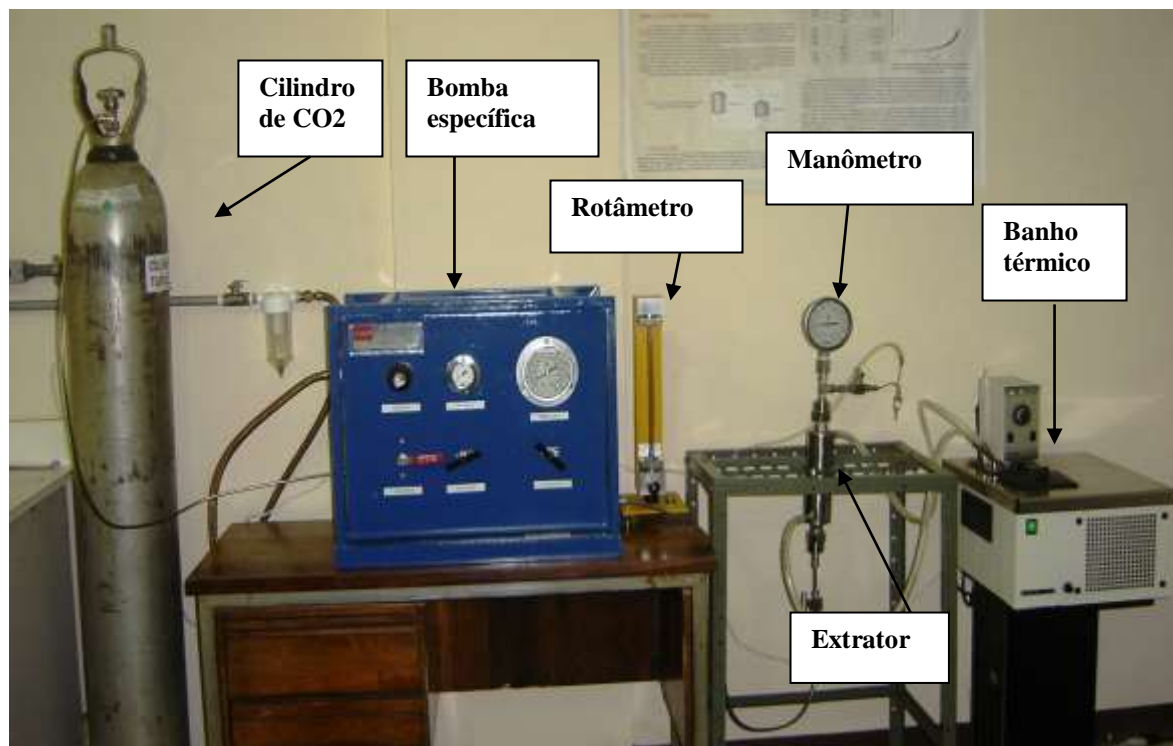


Figura 92. Unidade experimental de extração com fluido supercrítico presente no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ)

VII.2.2.2. Hidrodestilação

As extrações por hidrodestilação das amostras das folhas foram feitas com 191 g de *P. gonoacantha* e 348 g de *P. rigida*, e 1000 mL de água destilada, por 3 horas no ponto de ebulição da água, em aparato modificado de Clevenger.

Ao término da extração, tem-se o hidrolato, que é a mistura do óleo com a água. De forma a separar o óleo da água, procedeu-se à extração com diclorometano (3 x 50 mL) em funil de separação. A fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de sódio anidro em excesso. Após alguns minutos em repouso, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo. A massa de extrato obtida foi de 0,010 g para *P. gonoacantha* e 0,017 g para *P. rigida*. Foi realizado apenas um experimento utilizando essa técnica de extração e o extrato foi guardado em freezer.

VII.2.3. Métodos de análise

As análises cromatográficas dos extratos obtidos por fluido supercrítico e hidrodestilação foram feitos com o suporte do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-DQ-ICE-UFRRJ). Todos os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) usando um cromatógrafo QP2010 Plus da Shimadzu, com hélio (He) como gás carreador.

Foi utilizada uma coluna capilar Factor Four/VF-5 ms, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura de filme. O fluxo do gás carreador foi de 1 mL/min e a programação de temperatura de 100 °C a 290 °C (10 °C/min), sendo a temperatura do injetor de 250 °C e a temperatura do detector de 310 °C. O modo de injeção foi *split* e o volume de injeção foi de 2 µL. Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV). Os espectros de massas dos constituintes foram comparados com os padrões existentes na biblioteca Nist08 do computador no aparelho.

VII.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

VII.3.1. Extração de óleo essencial com fluido supercrítico

A extração de óleo das espécies vegetais com dióxido de carbono supercrítico foi realizada nas pressões de 100, 150 e 200 bar e temperatura de 40, 60 e 80 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos rendimentos obtidos são mostrados nas **Tabelas 12 e 13** para *P. rigida* e *P. gonoacantha*, respectivamente. O rendimento experimental foi calculado de acordo com a equação 1.

$$e\% = \frac{\text{Massa de Extrato}}{\text{Massa de Carga Livre de Solute}} \times 100 \quad (1)$$

onde a massa de extrato é a massa de óleo extraída e a massa de carga livre de soluto é a massa de material vegetal alimentado menos a quantidade de óleo presente nela. Essa quantidade de óleo é a quantidade encontrada usando a metodologia convencional, que é a hidrodestilação.

De acordo com os resultados, as melhores condições de extração para as folhas de *P. rigida* foram obtidas a 60 °C e pressão de 200 bar, sendo o rendimento de 0,73% e para as folhas de *P. gonoacantha* foram obtidas a 80 °C e pressão de 200 bar, sendo o rendimento de 1,31%.

Tabela 12. Rendimento da extração de óleo de *P. rigida* com CO₂ supercrítico

P(Bar)	T (°C)		
	40	60	80
100	0,44 ± 0,11*	0,40 ± 0,07	0,54 ± 0,12
150	0,60 ± 0,17	0,57 ± 0,03	0,79 ± 0,18
200	0,64 ± 0,21	0,73 ± 0,12	0,75 ± 0,05

* desvio padrão

Tabela 13. Rendimento da extração do óleo de *P. gonoacantha* com CO₂ supercrítico

P(Bar)	T (°C)		
	40	60	80
100	0,31 ± 0,21*	0,42 ± 0,13	0,65 ± 0,04
150	0,68 ± 0,22	0,56 ± 0,10	1,05 ± 0,13
200	0,85 ± 0,24	0,67 ± 0,08	1,31 ± 0,15

* desvio padrão

Em todos os experimentos, tanto de *P. rigida* quanto de *P. gonoacantha*, os melhores rendimentos foram obtidos com o aumento da pressão, mantendo a temperatura constante. O aumento da pressão, a temperatura constante, ocasiona um aumento na densidade do solvente, aumentando assim o seu poder de solvatação, resultando em um aumento no rendimento.

Dessa forma, a pressão foi a variável de maior influência sob o rendimento obtido. A temperatura teve um efeito irregular, pois para a maioria dos experimentos o rendimento diminuiu com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C e aumentou de 60 para 80 °C, com exceções apenas para os extratos de *P. rigida* obtidos a 200 bar e os extratos de *P. gonoacantha* obtidos a 100 bar (**Tabelas 12 e 13**). Neste caso, o rendimento volta a subir, porque com o aumento de temperatura (à pressão constante) a pressão de vapor do soluto também aumenta, compensando a queda da densidade de CO₂, aumentando assim a quantidade de óleo extraída (VARGAS, 2005). No entanto, compostos com alto peso molecular (ácidos graxos, ácidos graxos ésteres metílicos, esteróis, etc) também são co-extraídos gerando o aumento do rendimento (WENQIANG *et al.*, 2007).

O rendimento acumulado em função do tempo de extração do óleo das folhas de *P. rigida* pode ser observado nas **Figuras 93, 94 e 96** a 40, 60 e 80°C, respectivamente, para as pressões estudadas.

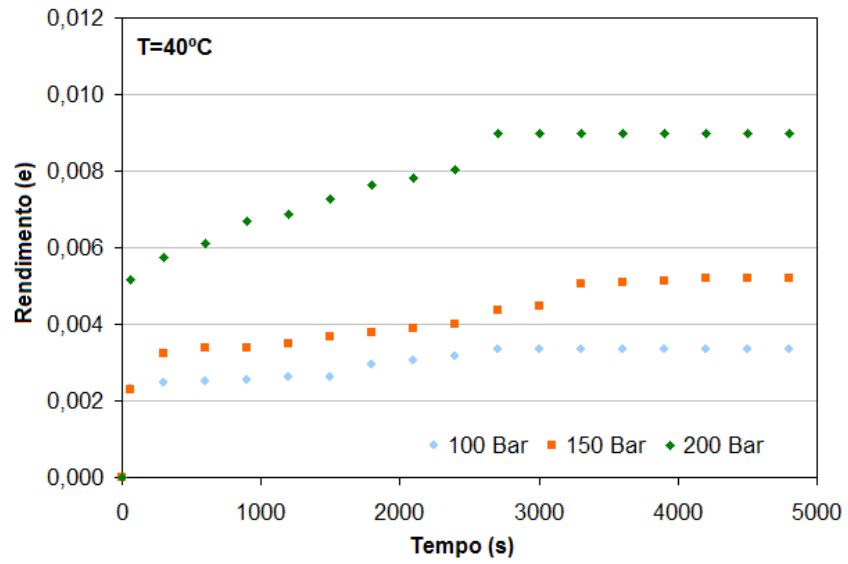


Figura 93. Curva de extração do óleo de *P. rigida*, a 40 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

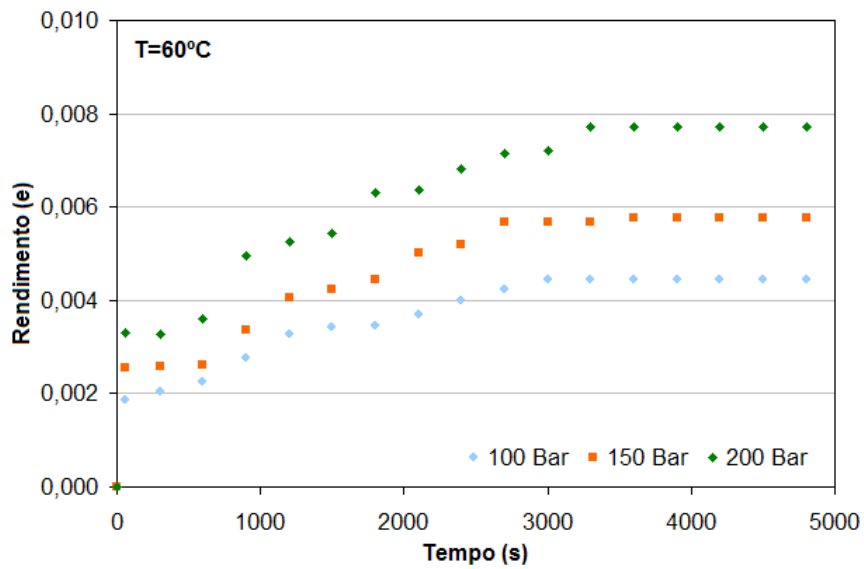


Figura 94. Curva de extração do óleo de *P. rigida*, a 60 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

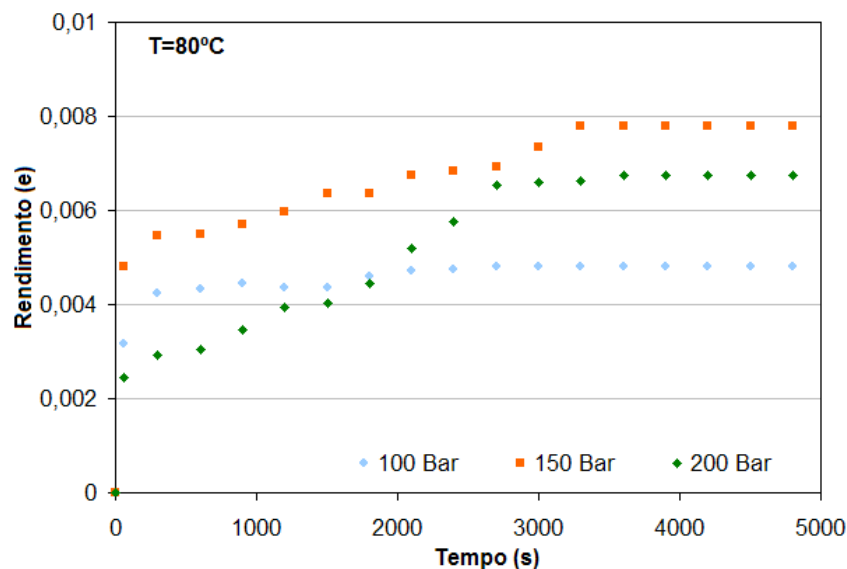


Figura 95. Curva de extração do óleo de *P. rigida*, a 80 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

A 80°C foi observado um comportamento de “cross-over” entre as curvas de 100 e 200 bar, evidenciando os efeitos de densidade e pressão de vapor do soluto na eficiência de extração do solvente. Esse tipo de comportamento ocorre muito nas extrações de óleos presentes em plantas e já foi observado por outros autores.

O rendimento acumulado em função do tempo de extração do óleo das folhas de *P. gonoacantha* pode ser observado nas **Figuras 96, 97 e 98** a 40, 60 e 80 °C, respectivamente, para as pressões estudadas. O tempo de extração foi de 80 minutos para todos os experimentos.

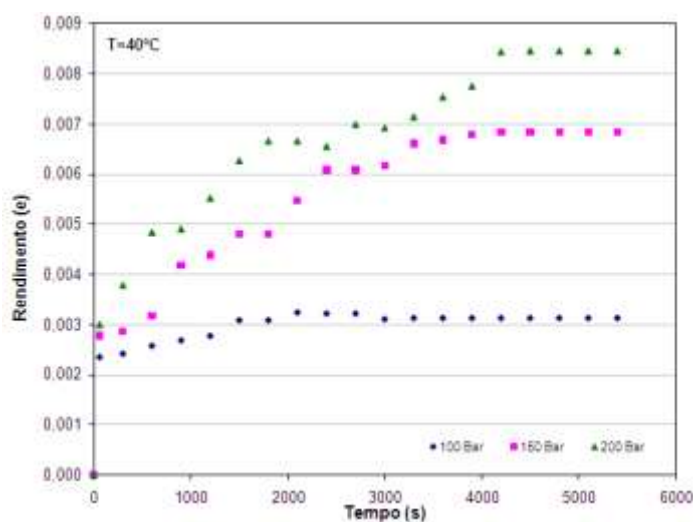


Figura 96. Curva de extração do óleo de *P. gonoacantha*, a 40 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

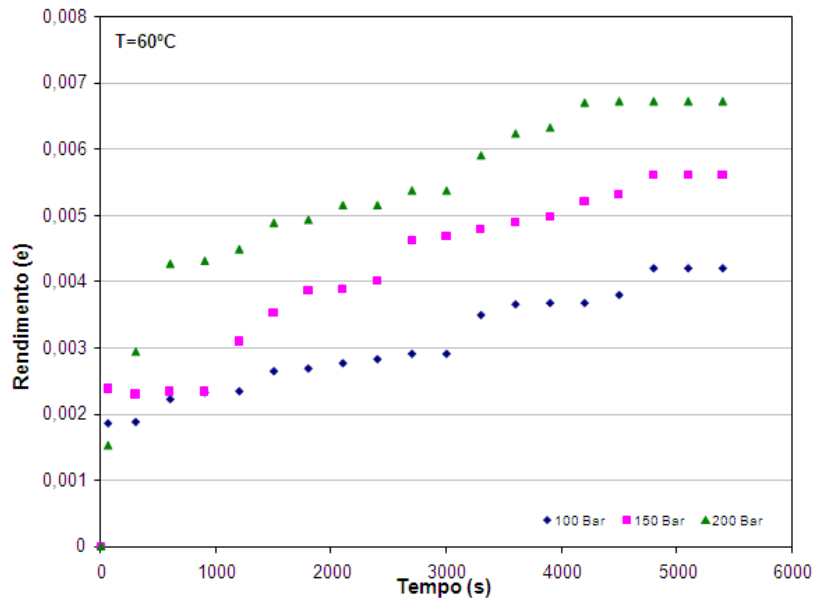


Figura 97. Curva de extração do óleo de *P. gonoacantha*, a 60°C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

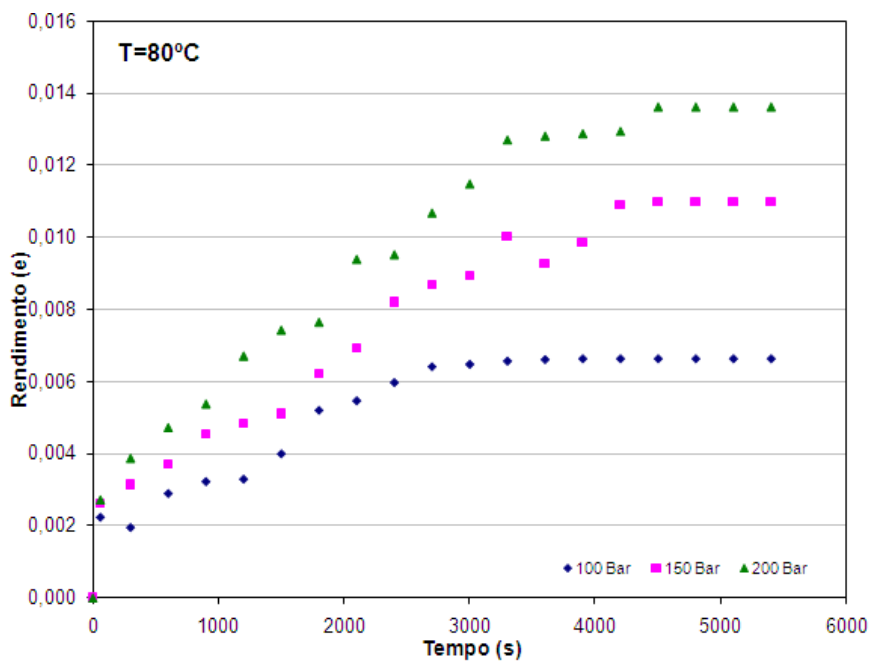


Figura 98. Curva de extração do óleo de *P. gonoacantha*, a 80 °C para as pressões de 100, 150 e 200 bar.

Os comportamentos observados para a *P. rigida* também foram vistos para a *P. gonoacantha*.

VII.3.1. Composição química dos óleos obtidos por ESC e hidrodestilação

A composição química relativa dos óleos de *P. rigida* e *P. gonoacantha*, obtidos por extração supercrítica, está apresentada nas **Tabelas 14 e 15**, respectivamente, com o nome dos componentes identificados e área integrada relativa dos cromatogramas para cada extrato a partir de diferentes condições experimentais.

Pode ser visto que os óleos apresentam mistura complexa. Dentre os constituintes majoritários identificados no óleo de *P. rigida* (**Figura 148**), em termos de área (%) do pico, são: 4,6-dimetil-dodecano (**Figura 124**), N-butil-benzeno-sulfonamida (NBBS) (**Figura 126**), derivado da N-butil-benzeno-sulfonamida (**Figura 127**), hexadionato de bis(2-etil-hexila) (**Figura 133**), hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila (**Figura 134**), octadecanoato de 2,3-dihidroxipropila (**Figura 137**) e sitostenona (**Figura 145**), dentre outros. Já no óleo de *P. gonoacantha* (**Figura 149**) foram identificados como majoritários os seguintes constituintes: N-butil-benzeno-sulfonamida (**Figura 126**), derivado da N-butil-benzeno-sulfonamida (**Figura 127**), hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila (**Figura 134**), N-(2-Etóxi-fenil)-N'-(1-fenil-etil)-oxalamida (**Figura 135**), octadecanoato de 2,3-dihidroxipropila (**Figura 137**), esqualeno (**Figura 138**), nonacosano (**Figura 139**), 1,30-triacontanediol (**Figura 142**) e heptacosanol (**Figura 143**) foram os principais componentes, dentre outros.

O alto teor de N-butil-benzeno-sulfonamida (NBBS) presente no óleo de *P. rigida* confere interesse neste óleo, pois este constituinte apresenta atividade antifúngica contra patógenos de planta. Segundo KIM e colaboradores, a N-butil-benzeno-sulfonamida isolada de *Pseudomonas sp.* AB2, uma estirpe bacteriana antifúngica, apresentou uma DE₅₀ (dose efetiva) de 73, 41, 33 e 102 contra *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinerea*, respectivamente (KIM *et al.*, 2000). Este efeito gerado pela N-butil-benzeno-sulfonamida permite constatar que a espécie *P. rigida* produz este metabólito para alta defesa contra estes tipos de patógenos. Também foi obtida a N-butil-benzeno-sulfonamida isolada das raízes de *Angelica sinensis* (DENG *et al.*, 2006). A substância N-butil-benzeno-sulfonamida isolada a partir da casca de *Prunus africana* (*Pygeum africanum*) apresenta uma elevada atividade antiandrogênica, podendo inibir o crescimento de células de câncer da próstata, que já não respondem ao tratamento com hidroxiflutamida (antiandrogênio) (HOFFMANN *et al.*, 2008).

Foi observado que o teor de NBBS diminui com o aumento da pressão nas temperaturas de 40 e 60 °C, logo ocorre uma relação inversa ao rendimento total de óleo de *P. rigida* que aumenta nestas mesmas condições. Para a temperatura de 80 °C, o teor de NBBS e o rendimento aumentam com o aumento da pressão. No óleo de *P. gonoacantha*, o constituinte principal é o derivado da NBBS (peso molecular = 290g/mol). Ele é observado na pressão de 150 bar e temperatura de 60 °C, quando obteve-se um óleo com maior teor do derivado de NBBS (53,70%). A 40 °C, o maior teor do derivado de NBBS foi obtido no óleo extraído a pressão de 100 bar, quando houve uma diminuição na concentração do derivado de NBBS a 150 bar e um aumento pouco pronunciado a 200 bar. Na temperatura 80 °C, somente à pressão de 150 bar foi extraído o derivado de NBBS (ver **Tabela 14 e 15**).

A NBBS já foi encontrada em outras matérias-primas naturais, como no óleo de bagaço de laranja extraído por EFSC, onde apresentou concentrações de 88,8 e 91,4% nas condições de 40 °C a 200 bar e 40 °C a 300 bar, respectivamente (BENELLI *et al.*, 2010). O derivado de NBBS foi encontrado no óleo de caroço de pêssgo, obtido por EFSC, onde este derivado apresentou concentrações de até 97,0 e 98,8% para as respectivas condições de extração a 50 °C e 300 bar e 40 °C a 300 bar (MEZZOMO *et al.*, 2010).

A composição dos óleos de *P. rigida e gonoacantha*, respectivamente, obtidos por hidrodestilação é aparentemente diferente (**Tabela 16 e 17**). Os constituintes majoritários presentes no óleo obtido por EFSC não foram encontrados na composição destes óleos, com exceção do ácido hexadecanóico. No entanto, pode-se verificar a presença de substâncias de menor peso molecular presente em óleos essenciais, como m-cumenol, *cis*-pulegol, α -ionona e β -ionona. Os constituintes majoritários no óleo de *P. rigida* (**Figura 150**) foram o ácido hexadecanóico (**Figura 128**), o fitol (**Figura 130**) e 2,6-di-*tert*-butil-4-[(2-octadeciloxycarbonil)etil]-fenol (**Figura 140**) e os constituintes majoritários no óleo de *P. gonoacantha* (**Figura 151**) foram o ácido hexadecanóico (**Figura 128**), o fitol (**Figura 130**) e o ácido linolênico (**Figura 129**), dentre outros.

Além dos tempos de residência (Tr) e espectro de massas usados na indicação da presença dos constituintes químicos, fez-se o espectro de RMN ¹H dos extratos de *Piptadenia rigida* (1A, 40°C / 100 bar, **Figura 99**) e *piptadenia gonoacantha* (2B, 60° C / 150 bar, **Figura 100**) e verificaram-se sinais que estão de acordo com a presença da N-butil-benzeno sulfonamida e de esteróides, como a sistotenona e os demais esteróides. Os assinalamentos nos espectros de RMN ¹H confirmam as propostas (**Figuras 99 e 100**).

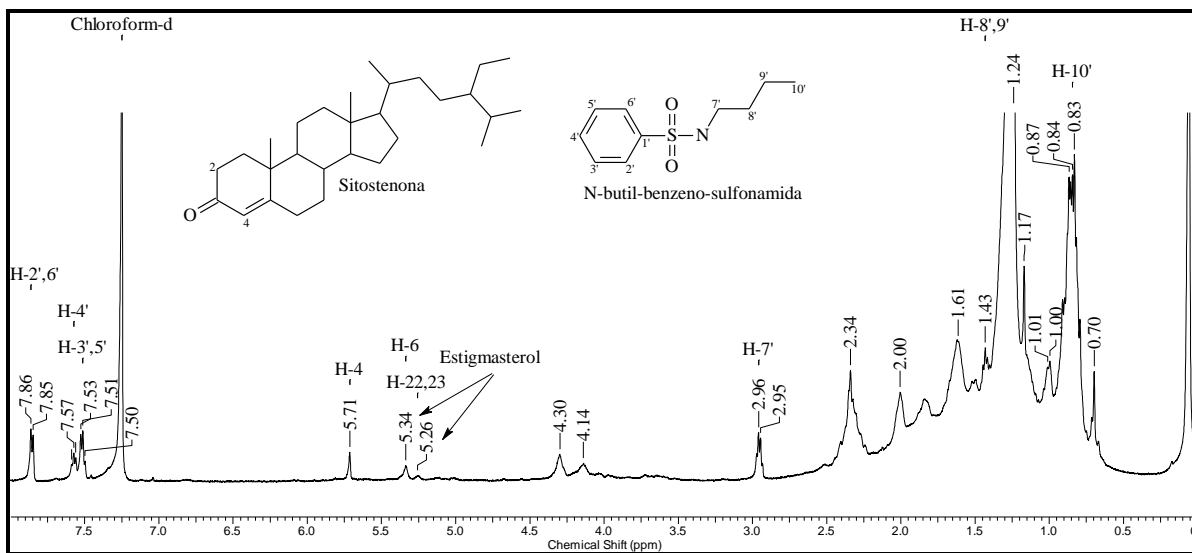


Figura 99. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do extrato de *piptadenia rigida* (1A, 40°C / 100 bar)

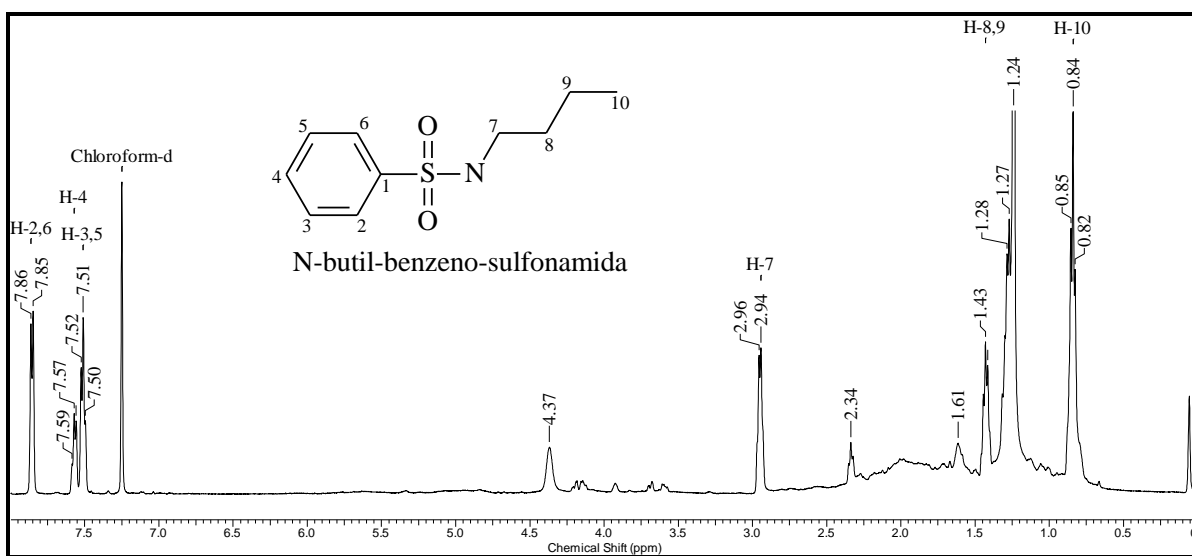


Figura 100. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do extrato de *piptadenia gonoacantha* (2B, 60°C / 150 bar)

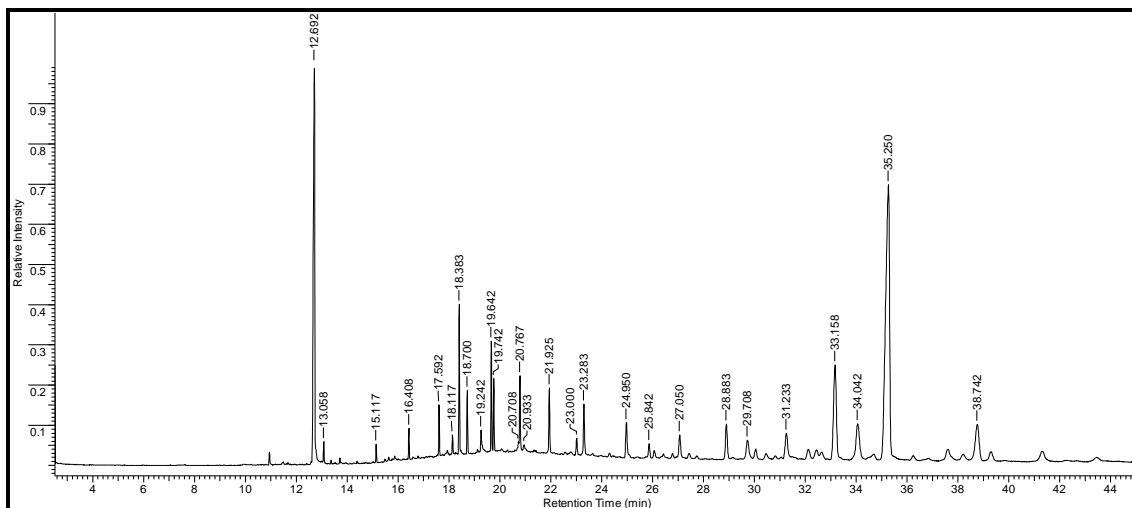


Figura 101. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (40 °C/100 BAR) (1A)

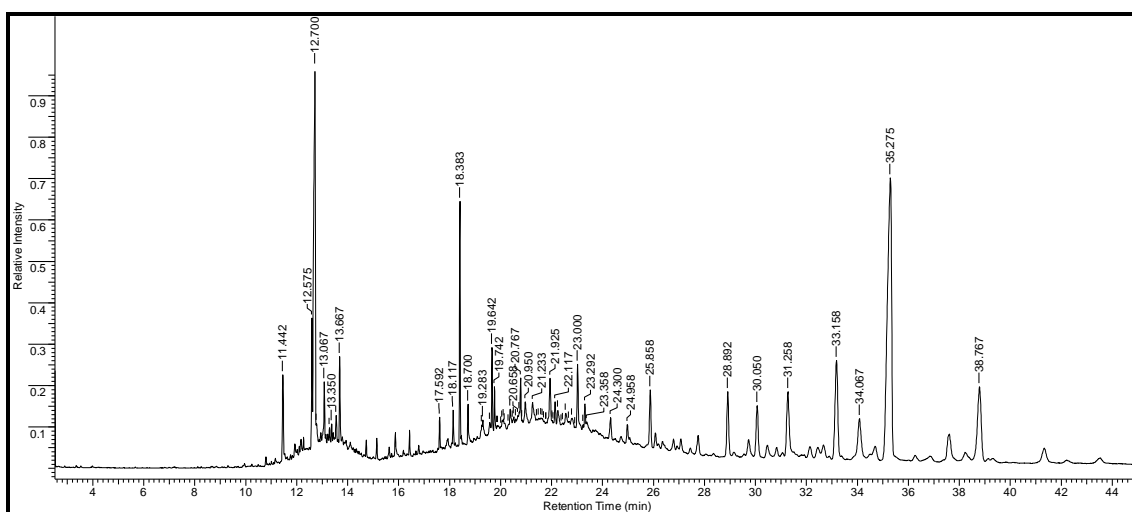


Figura 102. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (40 °C/150 BAR) (1B)

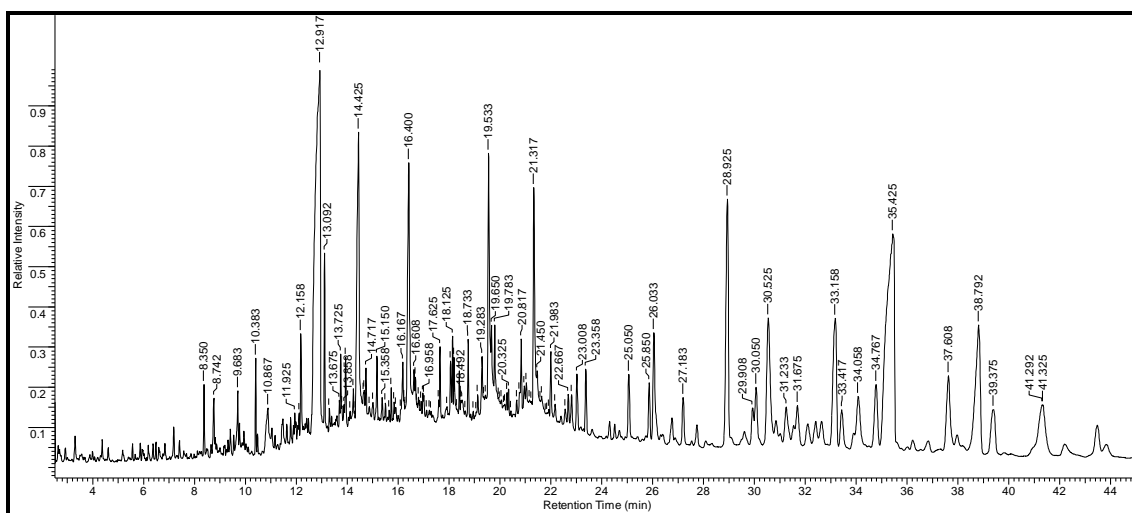


Figura 103. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (40 °C/200 BAR) (1C)

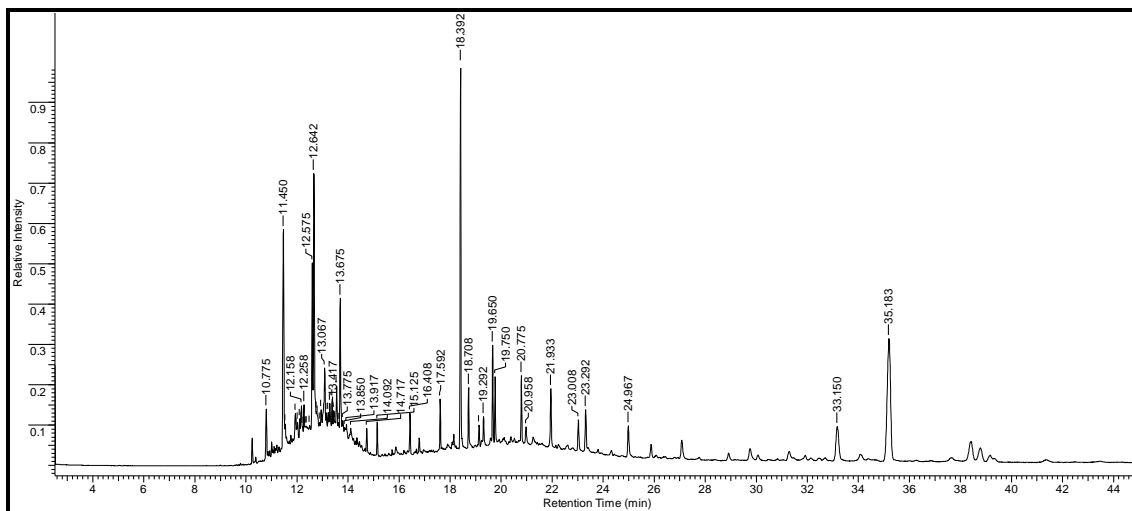


Figura 104. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (60 °C/100 BAR) (2A)

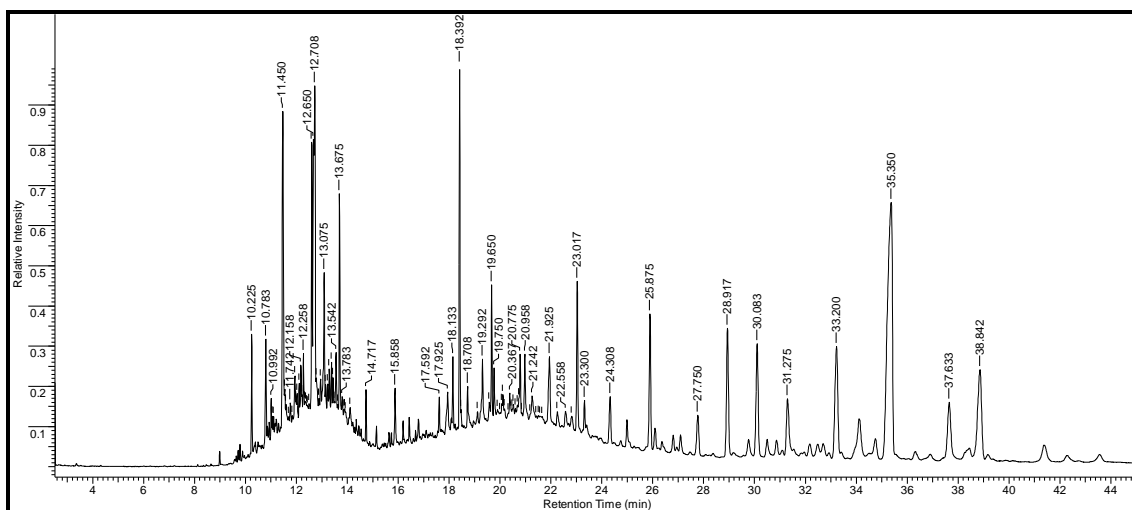


Figura 105. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (60 °C/150 BAR) (2B)

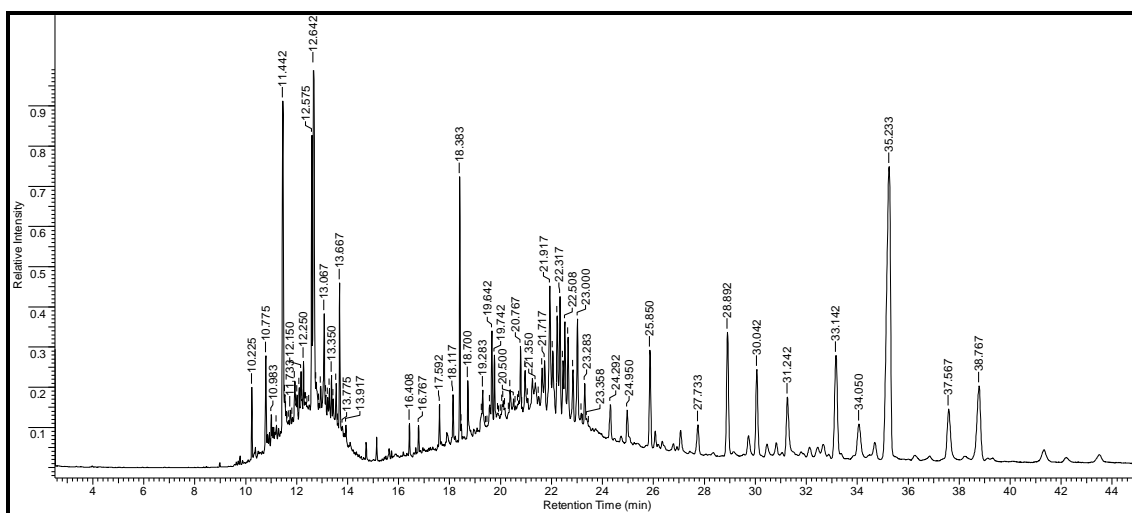


Figura 106. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (60 °C/200 BAR) (2C)

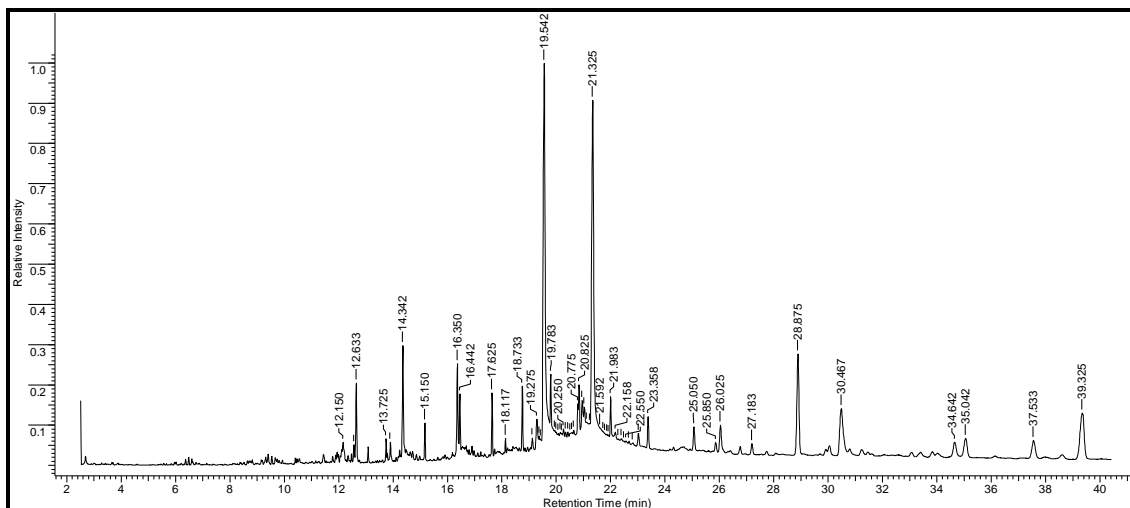


Figura 107. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (80°C/100 BAR) (3A)

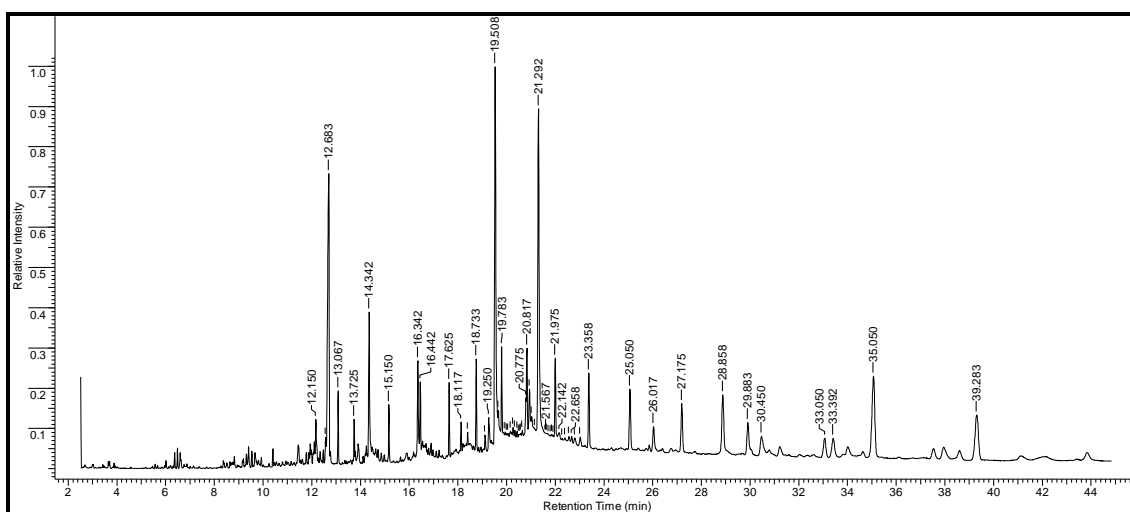


Figura 108. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (80°C/150 BAR) (3B)

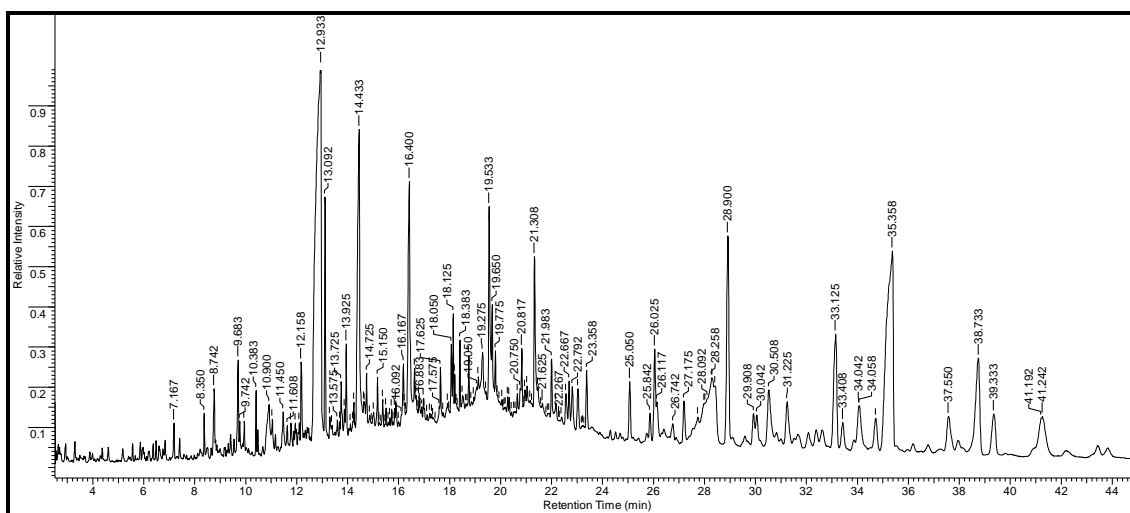


Figura 109. Cromatograma / EFS / *P. rigida* (80°C/200 BAR) (3C)

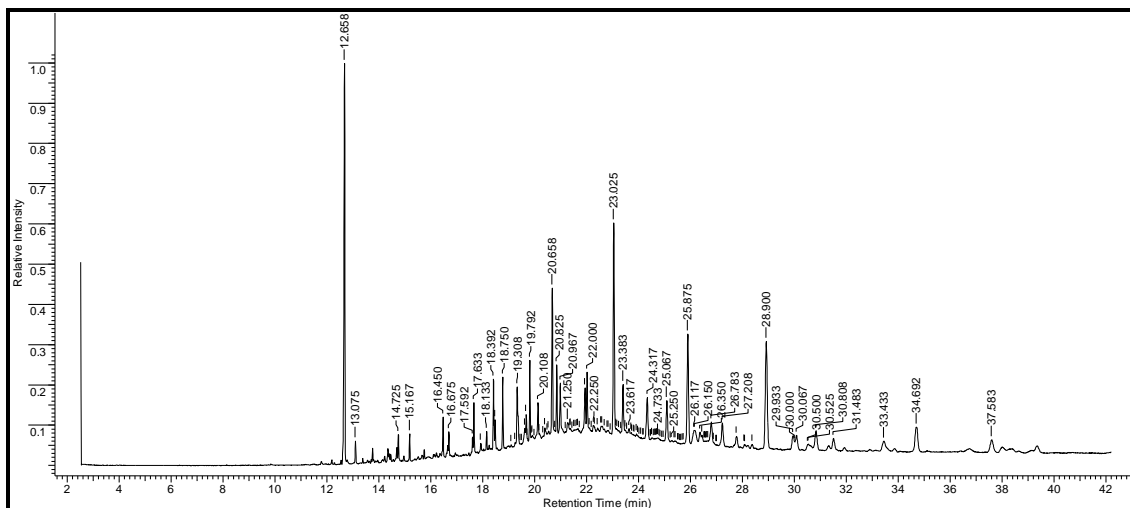


Figura 110. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (40 °C/100 BAR) (1A)

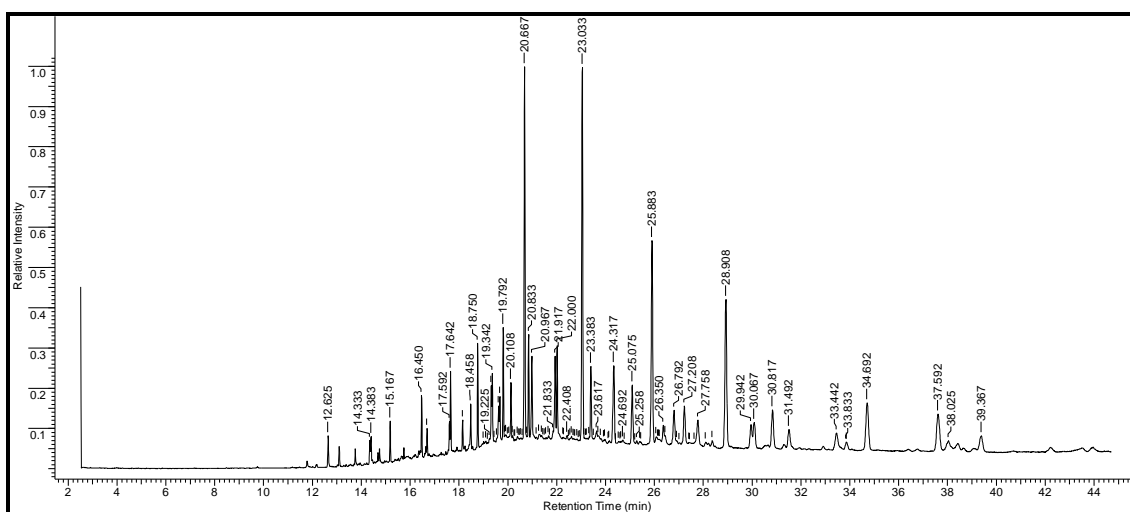


Figura 111. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (40 °C/150 BAR) (1B)

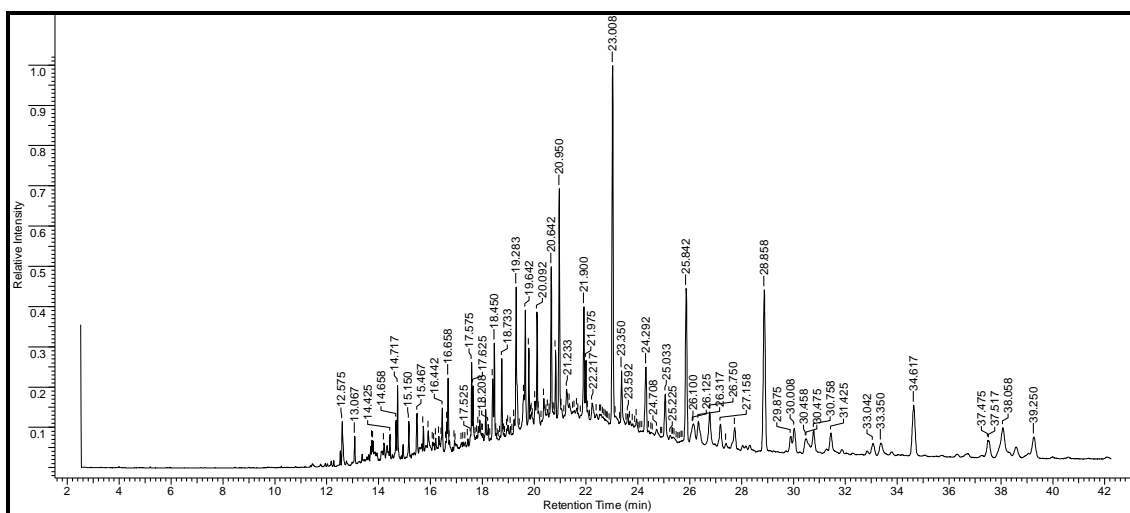


Figura 112. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (40 °C/200 BAR) (1C)

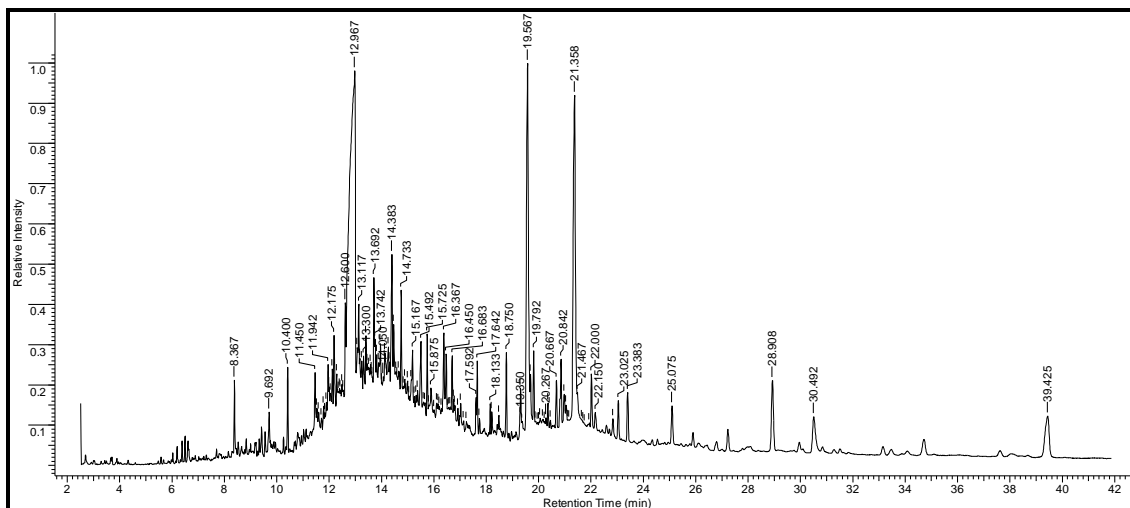


Figura 113. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (60 °C/100 BAR) (2A)

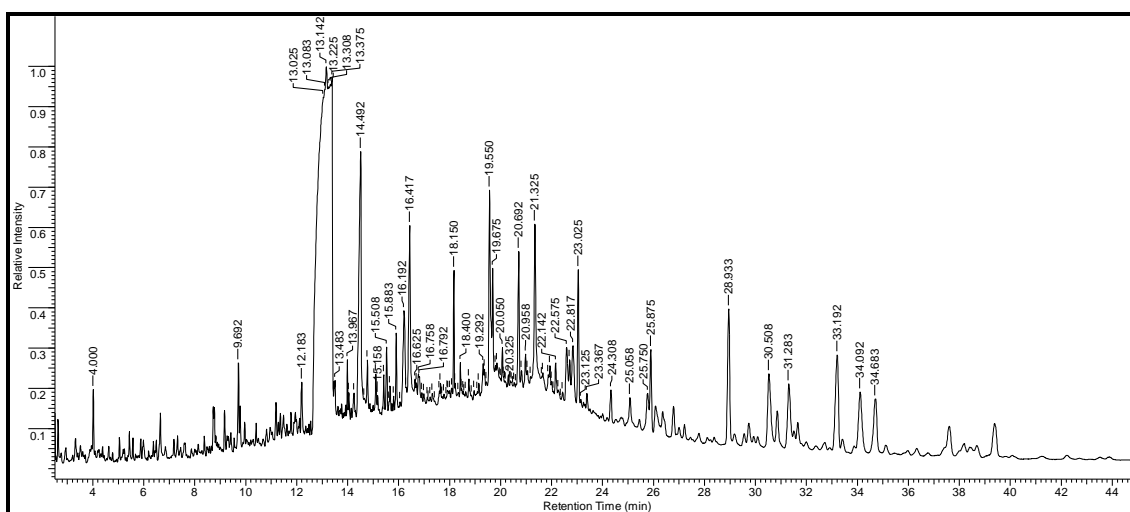


Figura 114. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (60 °C/150 BAR) (2B)

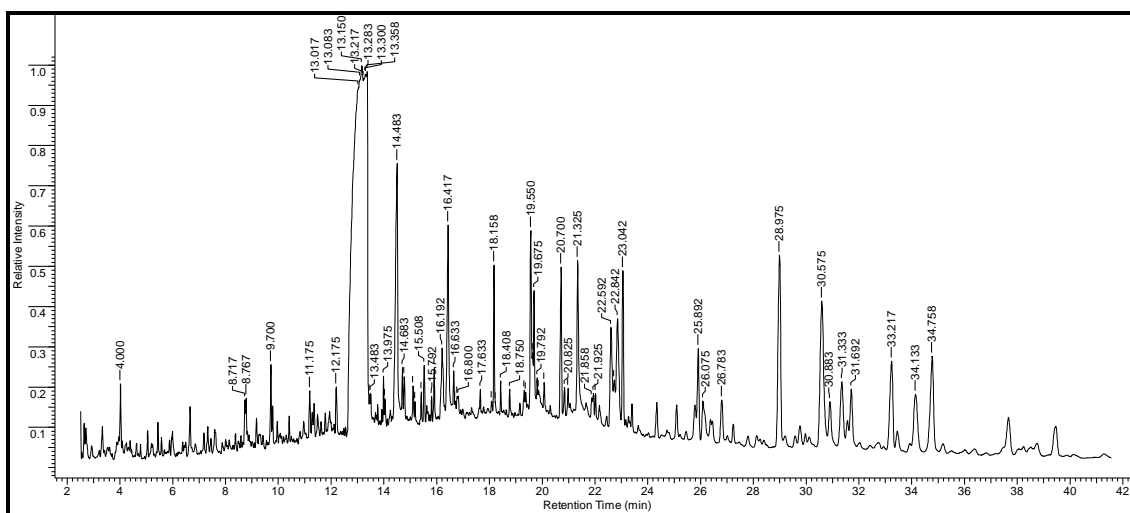


Figura 115. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (60 °C/200 BAR) (2C)

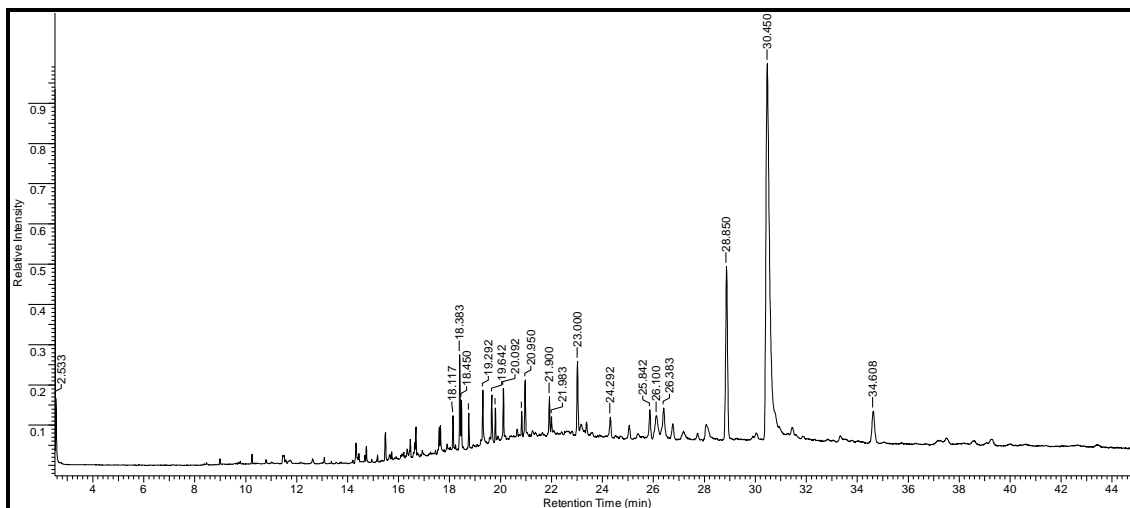


Figura 116. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (80 °C/100 BAR) (3A)

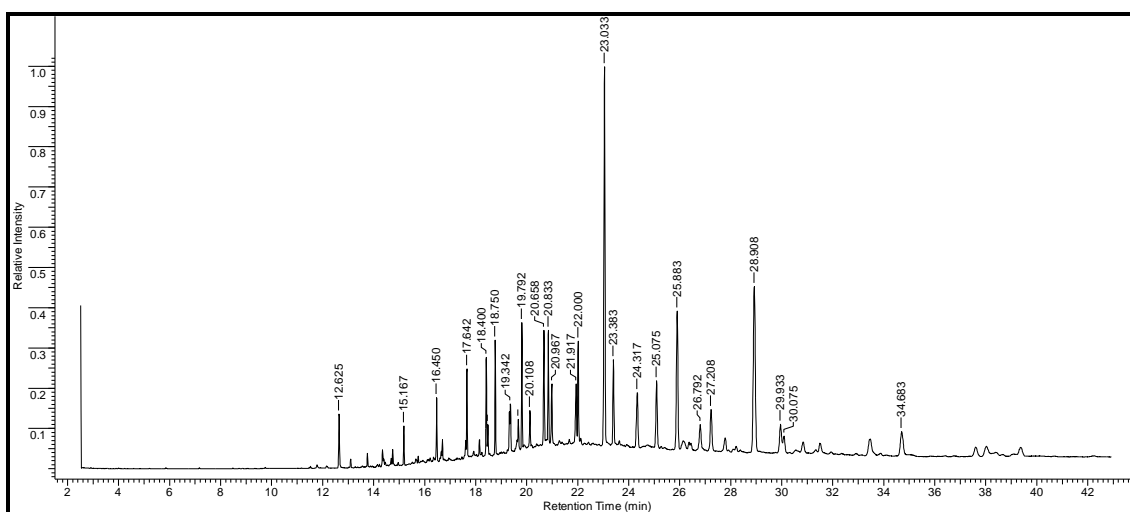


Figura 117. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (80 °C/150 BAR) (3B)

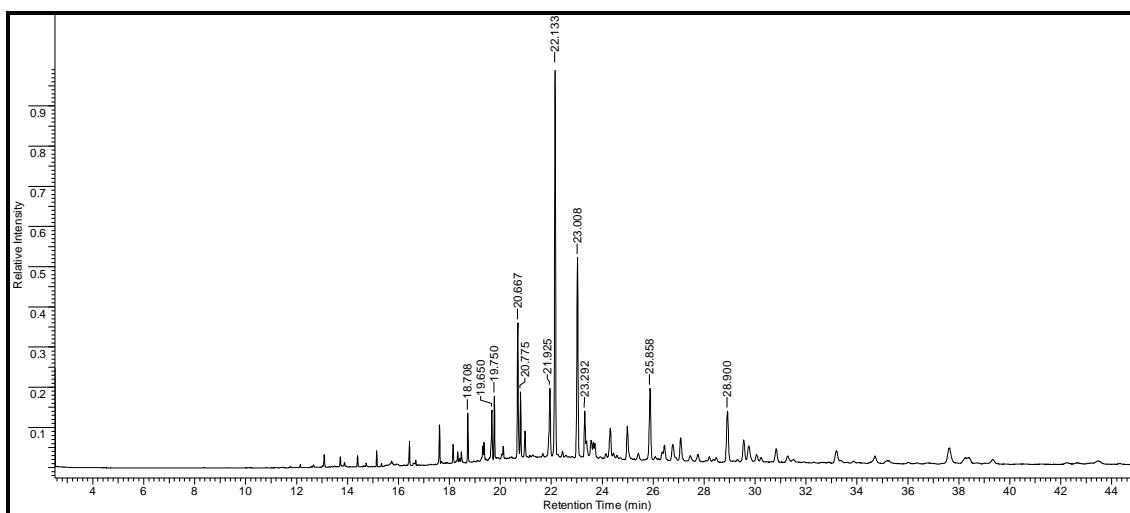


Figura 118. Cromatograma / EFS / *P. gonoacantha* (80 °C/200 BAR) (3C)

Tabela 14. Perfil químico presente no óleo nas folhas *Piptadenia rigida* por extração por fluido supercrítico

Compostos	TR(min)	Area relativa (%)								
		Condições de extração ^a								
		1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimetil- (R)-2(4H)-Benzofuranona,	9,681									1,05
3-Metil-5-propilnonana	10,227					1,36	0,89			
2,6,10-Trimetil-dodecano	10,777				1,58	1,54	1,38			
Ácido nonanedióico	10,897									1,57
4,6-dimetil-dodecano	11,447				10,43	6,49	6,08			
10-metilnonadecano	11,917				1,06	0,92	0,93			
Isotridecanol	12,083								0,91	
4-(2,4-Dimetilciclohex-3-enil)but-3-en-2-ona	12,550								0,87	
n-Octadecano	12,579				5,00	3,69	3,48			
n-butil-Benzenosulfonamida	12,656	19,92	17,24		10,79	10,86	7,93	2,84	13,86	22,53
derivado da n-butil-Benzenosulfonamida (m/z 290)	12,964			16,89						
Hexahidrofarnesil acetona	13,068		1,24		3,28	2,55	1,76		1,50	2,35
7,9-Di-tert-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-diona	13,886								0,86	
Fitol	13,926			0,81						1,14
Ácido n-Hexadecanóico	14,345			5,74				4,33	4,16	7,48
2-Hexil-1-decanol	14,725									0,95
cis-13-Octadecenal	16,169			0,96						1,16
Ácido n-Octadecanóico	16,348			5,15				3,45	2,73	5,44
9-Hexadecenoato de etila	16,608			1,12						1,20
Ácido linoleico	16,958									0,84
4,8,12,16-Tetrametil-heptadecan-4-olide	18,127			1,63		0,87	0,65			
Hexadionato de bis(2-etil-hexila)	18,382	3,68	4,89		12,03	5,40	3,60			
2-Etilbutanoato de eicosila	19,251								1,23	
Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila	19,540			4,94				27,93	15,24	4,14
Ftalato	19,650	2,83	1,68		2,80	1,71	1,16		1,08	
Eicosanoato de 2,3-bis[(trimetil-silil)oxi]propila	20,775									1,65
D-Ribose, 2-deóxi-bis(tiononil)-ditioacetal	20,992							1,33	1,50	
Octadecanoato de 2,3-dihidroxi-propila	21,329			3,36				24,89	13,74	2,61
Nonacosano	23,009				1,24	2,80	2,19			
Triacotano	25,845	0,63	2,13	0,75	0,67	3,30	2,39			
Acetato de estigmasterila	26,040			2,08				1,61	1,12	2,34
1,30 Triacotandiol	28,881	2,16	3,00	5,49		4,06	4,19	7,81	3,38	4,94
Heptacosanol	30,533			3,76				5,65		1,44
Sitosterol	31,237	2,01	3,94	1,07		2,16	2,33			

Compostos	TR(min)	Area relativa (%)								
		Condições de extração ^a								
		1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
4,22-estigmastadiene-3-ona	33,152	8,78	6,84	4,09	3,45	5,15	4,81		1,19	3,87
Lupeol	34,042	3,29	2,72	1,21						1,44
Sitostenona	35,249	36,22	29,63	14,95	15,18	20,27	19,60		6,98	13,98
Friedelina	38,745	4,51	6,94	5,35		5,59	4,05			3,94
4-tert-Butylcalix[4]areno	39,378			1,70				6,22	4,27	1,65
Estigmastane-3,6-diona	41,326			2,18						

Condições de extração^a: 1A, 40° C / 100 bar; 1B, 40° C / 150 bar; 1C, 40° C / 200 bar; 2A, 60° C / 100 bar; 2B, 60° C / 150 bar; 2C, 60° C / 200 bar; 3A, 80° C / 100 bar; 3B, 80° C / 150 bar; 3C, 80° C / 200 bar;

Tabela 15. Perfil químico presente no óleo nas folhas *Piptadenia gonoacantha* por extração por fluido supercrítico

Compostos	TR(min)	Área relativa (%)								
		Condições de extração ^a								
		1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
4,6-dimetil-dodecano	11,447				0,85					
4-metil-tetradecano	12,106				1,20					
n-Octadecano	12,579				1,48					
n-metil-Benzenosulfonamida	12,626		0,80	1,34						
n-butil-Benzenosulfonamida	12,656	20,38							1,72	
derivado da n-butil-Benzenosulfonamida (m/z 290)	12,964				35,44	53,70	47,24			
Hexahidrofarnesil acetona	13,079	0,82			2,97					
n-nonadecano	13,964				2,04					
Ácido n-Hexadecanóico	14,332		0,62		2,82	6,89	5,42	0,62	0,54	
cis-9-Hexadecenal	16,199					2,19	1,34			
Ácido n-Octadecanóico	16,364				1,54	3,03	2,96			
n-Eicosano	16,660	2,04	1,20	5,64						
2,7,10-Trimetildodecano	16,678	0,78	0,52							
2,6,10,15-Tetrametil-heptadecano	17,576	0,65	0,39							
Heptadecano	17,638		2,34							
n-Heneicosano	17,825			0,76						
4,8,12,16-Tetrametil-heptadecan-4-olide	18,129	0,67	0,71	1,23				0,98	0,44	
Hexadionato de bis(2-etilhexila)	18,395	2,83		1,45				3,22	3,01	
n-Docosano	18,448							1,49	0,85	
n-Tricosano	19,289							1,75	1,27	
Oxalato de 2-etil-hexil octadecila	19,306	3,26	1,45	4,23						
Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila	19,564				13,86	4,37	2,68			
N,N'-bis(2-etil-fenil)-oxaladiamida,	19,606		0,79							
Ftalato	19,650	0,69	1,03	4,05	0,94		0,88	1,47	0,90	2,51
N-(2-Etóxi-fenil)-N'-(1-fenil-etil)-oxalamida	20,657	6,74	12,48	4,25	0,90	1,86	1,86		4,10	7,19
n-Tetracosano	20,948	4,21	5,07	9,04				1,91	2,06	1,35
Octadecanoato de 2,3-dihidroxipropila	21,355				12,37	2,90	2,38			
n-Pentacosano	21,901							1,42	2,68	
Esqualeno	22,132									22,91
Nonacosano	23,026	11,67	14,25	11,68		1,80	1,95	3,49	16,93	13,49
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicoso-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	23,547									1,61
n-Dotriacontano	24,316	2,94	3,90	2,62				0,68	3,25	2,42
n-Triacontano	25,844	7,70	10,14	6,25		1,33	1,41	1,32	8,29	6,02

Compostos	TR(min)	Área relativa (%)								
		Condições de extração ^a								
		1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
1-Heptatriacotanol	26,387							1,38		1,28
Vitamina E	26,753						0,83			2,00
n-Tritetracontano	27,761		0,89	0,80					0,79	
1,30 Triacontanediol	28,899	10,31	9,22	8,38	2,60	3,17	4,49	13,98	12,86	5,25
Heptacosanol	30,513					2,61	5,05	53,98		
2-Nonadecanona	30,819		4,99	2,19						1,49
Sitosterol	31,296					2,12	1,90			
Lupeona	33,193					3,17	2,46			
Lupeol	34,042					2,17	1,82			
Pentadecanal	34,608	2,10	3,40	4,62				2,52	2,09	
1,2-Epóxi-3-(hexadecilóxi)- propane	37,612									2,50

Condições de extração^a: 1A, 40° C / 100 bar; 1B, 40° C / 150 bar; 1C, 40° C / 200 bar; 2A, 60° C / 100 bar; 2B, 60° C / 150 bar; 2C, 60° C / 200 bar; 3A, 80° C / 100 bar; 3B, 80° C / 150 bar; 3C, 80° C / 200 bar;

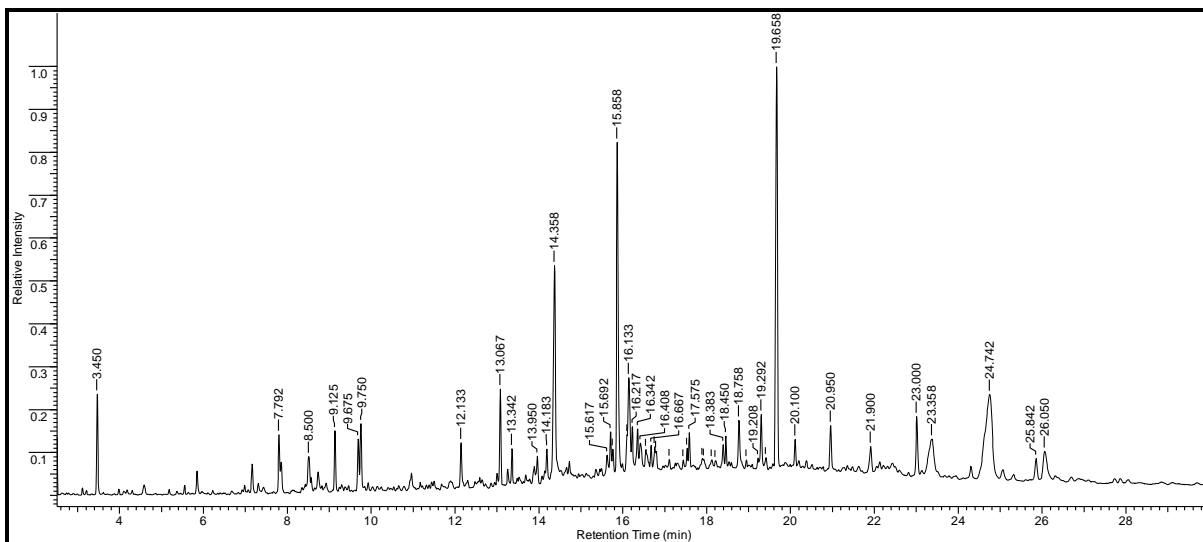


Figura 119. Cromatograma / Hidrodestilação / *P. rigida*

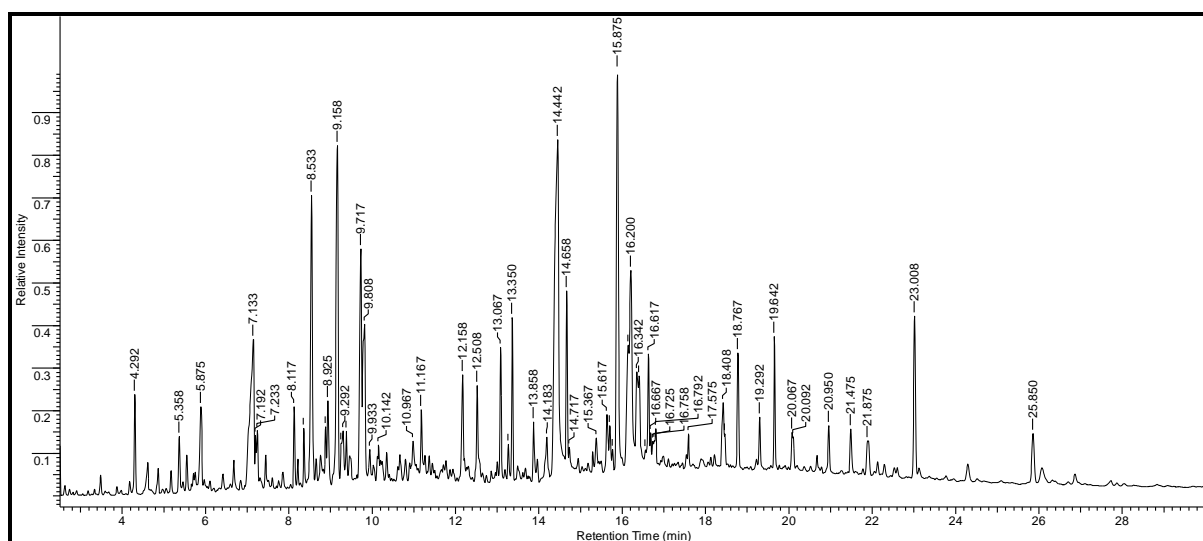


Figura 120. Cromatograma / Hidrodestilação / *P. gonoacantha*

Tabela 16. Perfil químico presente no óleo nas folhas *Piptadenia rigida* por extração por hidrodestilação

Compostos	TR(min)	%
Benzeno-acetaldeído	3,454	3,02
m-Benziloxibenzaldeído	7,791	3,02
2-fenil-1,3-dioxan-5-il (9E,12E,15E)-9,12,15-octadecatrienoato	8,498	1,44
2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol	9,125	1,69
5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-, -2(4H)-benzofuranone	9,679	1,69
Ácido dodecanóico	9,746	2,27
Ácido tetradecanóico	12,131	1,45
Hexahidrofarnesil acetona	13,066	2,59
Pentadecanoato de metila	13,951	1,79
Ácido hexadecanóico	14,361	9,89
Ácido linolênico	15,696	1,65
Fitol	15,858	13,44
Ácido octadecanóico	16,338	1,89
2-(fenilmetil)- 1,3-Dioxolano	16,409	1,56
Δ 16-Progesterona	18,761	2,00
Eicosano	19,289	1,47
Ftalato	19,66	16,62
Heneicosano	20,947	1,62
Tetracosano	23,001	2,47
4-tert-Butilcalix[4]areno	23,36	3,88
2,6-Di-tert-butil-4-[(2-octadeciloxycarbonil)etil]-fenol	24,739	12,84

Tabela 17. Perfil químico presente no óleo nas folhas *Piptadenia gonoacantha* por extração por hidrodestilação

Compostos	TR(min)	%
Ácido hexahidro-1-metil-2-piridineacético	4,294	1,18
m-Cumenol	5,356	0,82
cis-Pulegol	5,543	0,66
Ácido nonanóico	5,876	1,55
Ácido gerânico	7,136	5,51
Ácido decanóico	7,233	1,13
trans- α -Ionone	8,119	0,99
cis-Geranylacetona	8,352	0,69
7-Metoxi-2,2,4,8-tetrametiltriciclo[5.3.1.0(4,11)]undecano	8,534	5,05
trans- β -Ionone	8,867	0,60
Epóxido de b-Ionone	8,925	1,07
2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol	9,155	6,73
Ciclohexil cetona	9,29	1,20
5,5,8a-trimetil-3,5,6,7,8,8a-hexahidro-2H-cromeno	9,37	0,70
Ácido metil-cinâmico	9,45	0,53
5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-, -2(4H)-benzofuranone	9,714	4,24
Ácido dodecanóico	9,806	3,77
1-Tetradeceno	10,144	1,52
Ácido tetradecanóico	12,157	1,63
1-Nonadeceno	12,509	1,54
Hexahidrofarnesil acetona	13,069	1,65
Farnesil acetona	13,861	0,97
Isofitol	14,179	0,99
Ácido hexadecanóico	14,441	13,05
Hexadecanoato de etila	14,66	2,08
1-Nonadecanol	15,621	1,07
Ácido linoleico	15,7	0,67
Fitol	15,872	7,90
Ácido linolênico	16,198	7,99
(9E,12E)-9,12-octadecadienoato de etila	16,342	3,58
1-Heneicosanol	16,62	2,19
Δ 16-Progesterone	18,77	1,73
Eicosano	19,29	0,58
Ftalato	19,644	1,69
Heneicosano	20,948	0,66
2,6-Ditert-butil-4-(mesitilmetil)fenol	21,475	0,70
Tetracosano	23,006	2,82

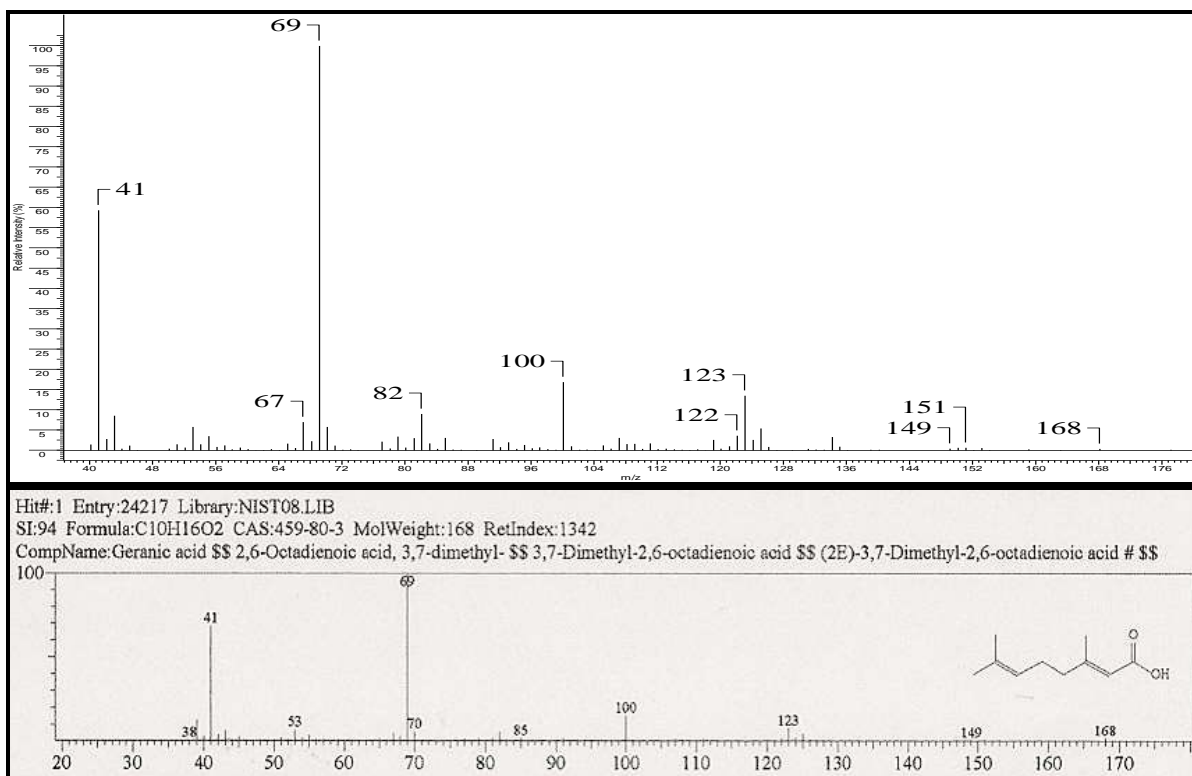


Figura 121. Espectro de massas do ácido gerânico (Tr: 7,136 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

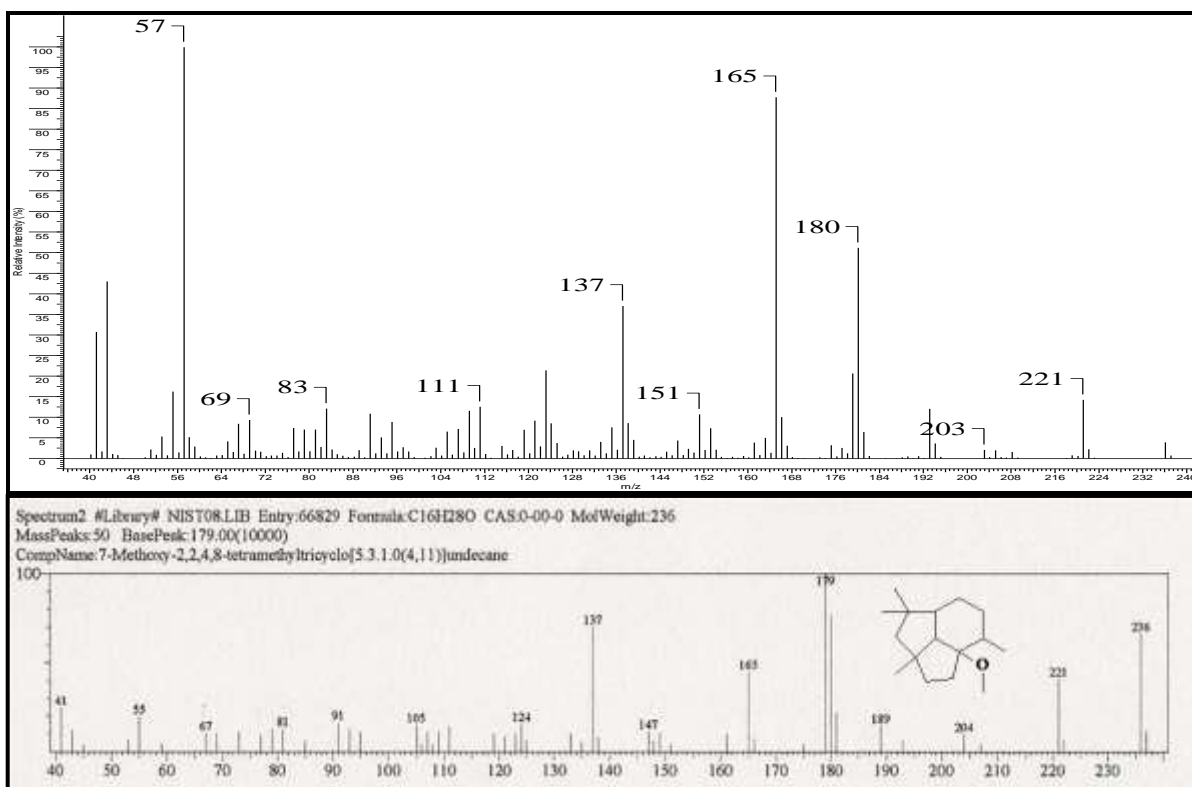


Figura 122. Espectro de massas do 7-Metoxi - 2,2,4,8-tetrametiltricyclo [5.3.1.0(4,11)] undecano (Tr: 8,534 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

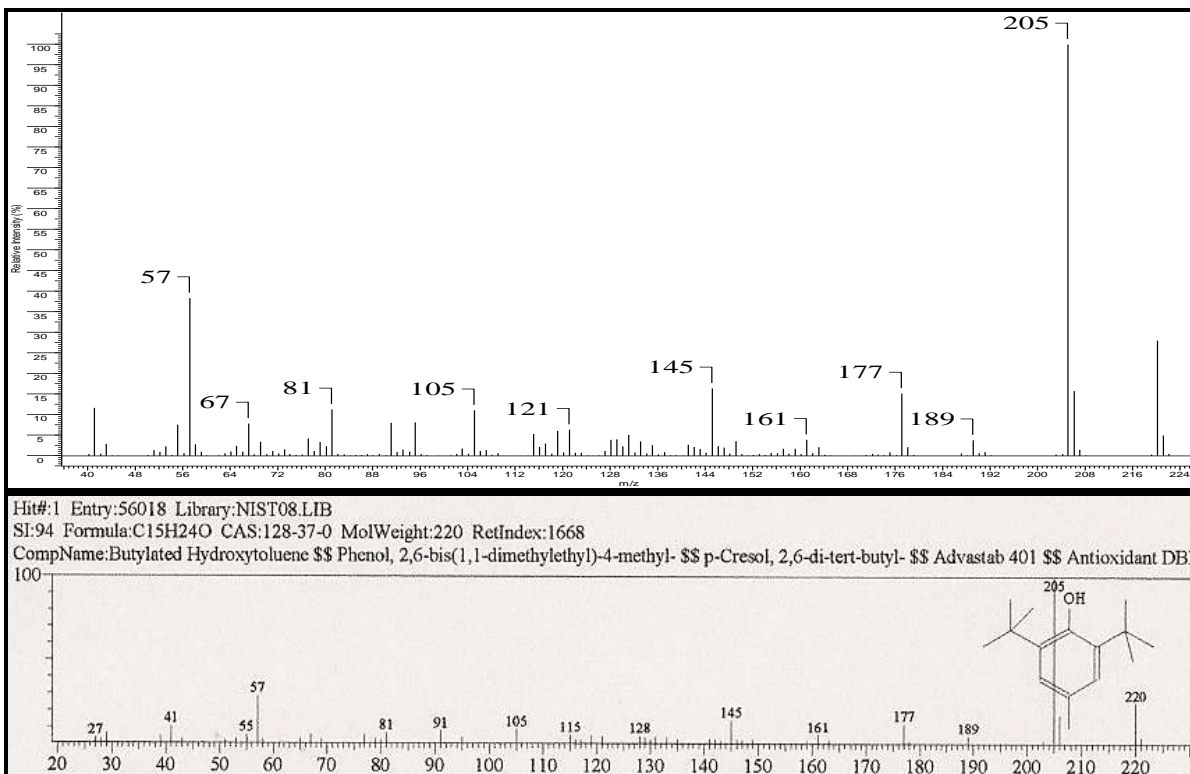


Figura 123. Espectro de massas do 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (Tr: 9,155 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

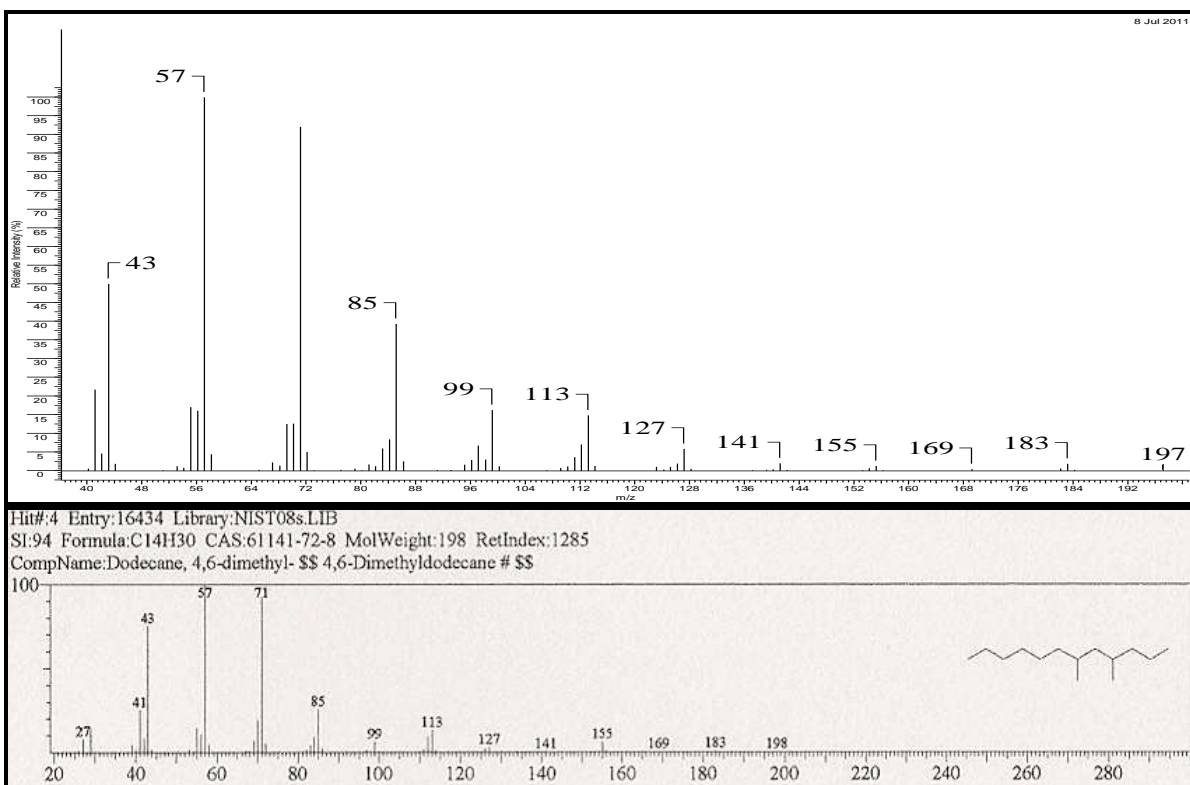


Figura 124. Espectro de massas do 4,6-Dimetil-dodecano (Tr: 11,447 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

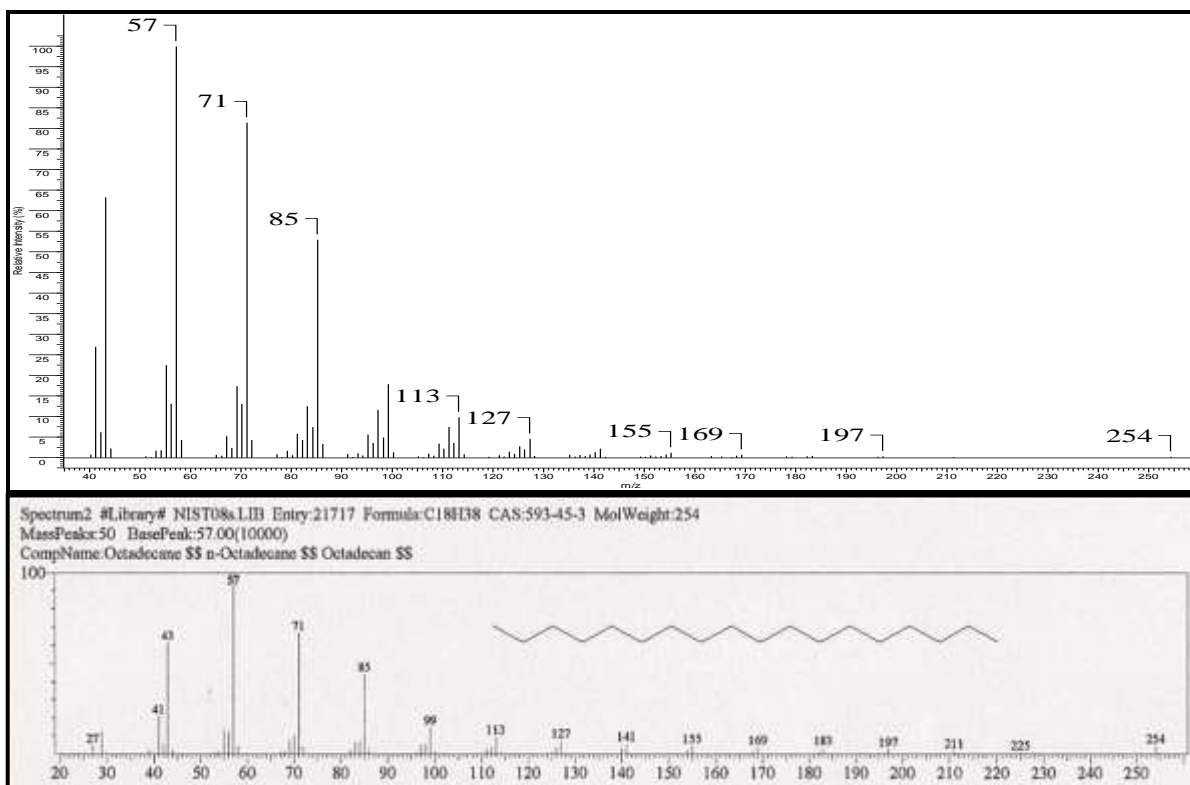


Figura 125. Espectro de massas do n-Octadecano (Tr: 12,579 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

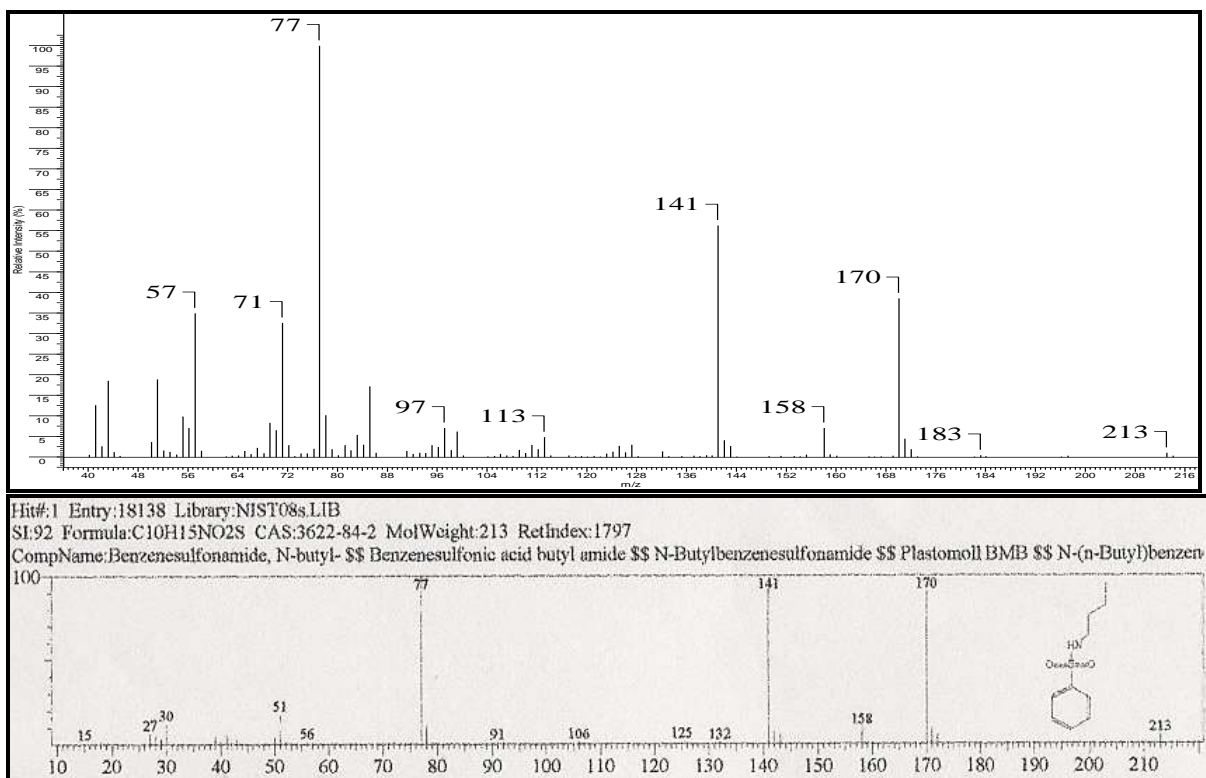


Figura 126. Espectro de massas do n-butyl-Benzenosulfonamida (Tr: 12,656 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

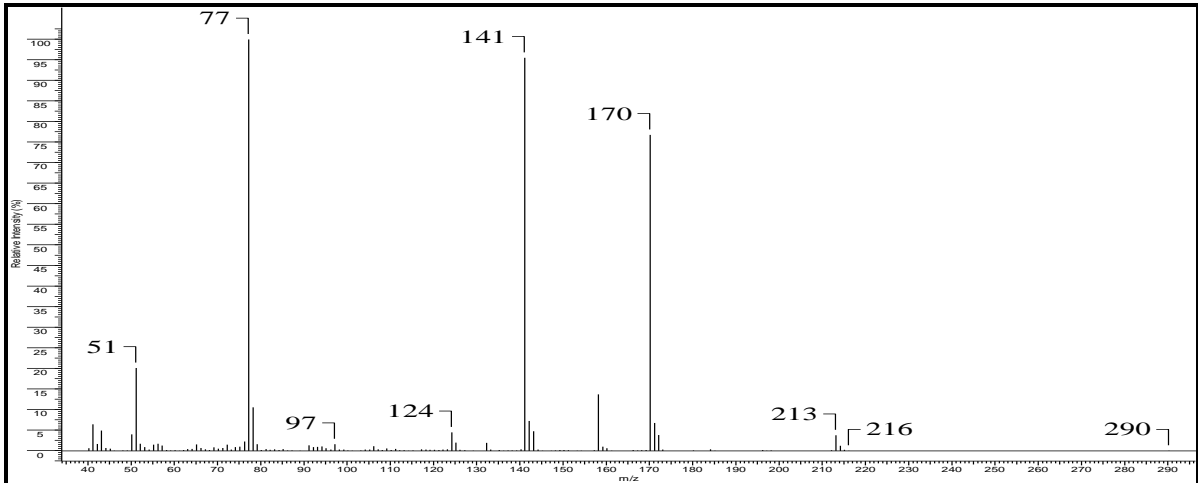


Figura 127. Espectro de massas do derivado da n-butil-Benzenosulfonamida (Tr: 12,964 min.)

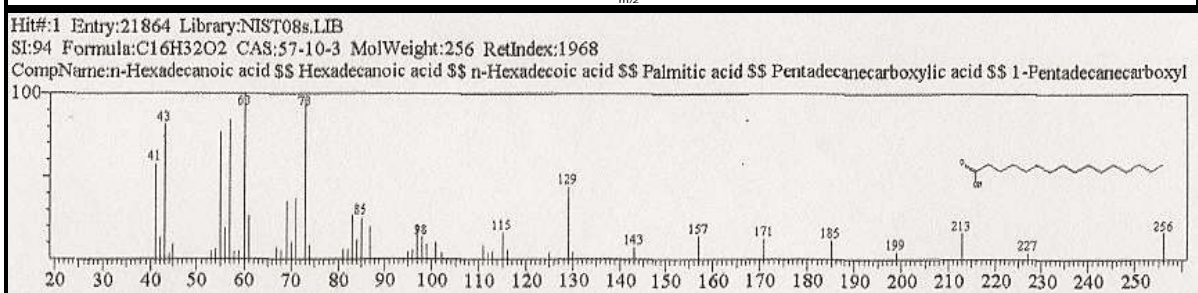
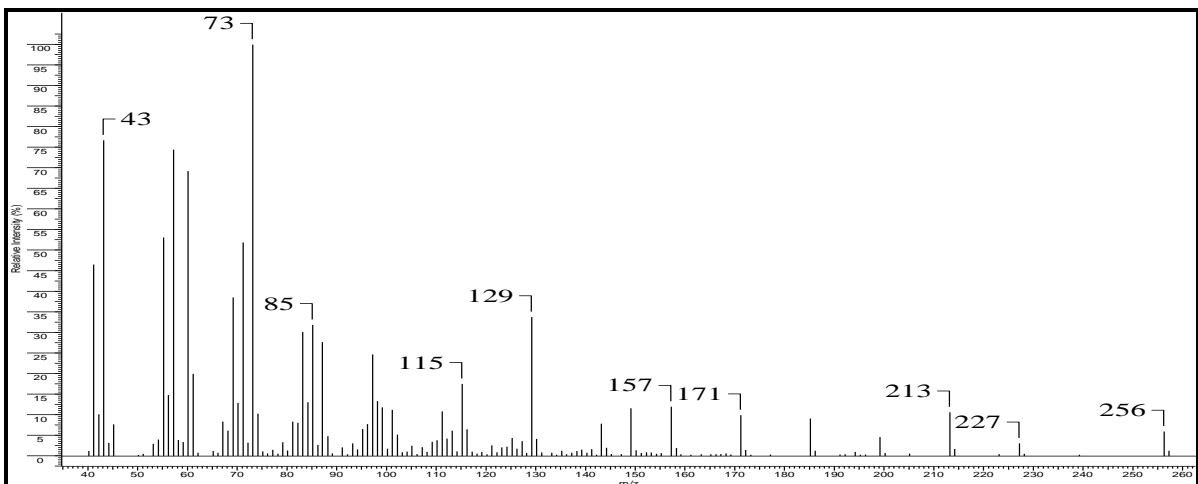


Figura 128. Espectro de massas do Ácido hexadecanóico (Tr: 14,441 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

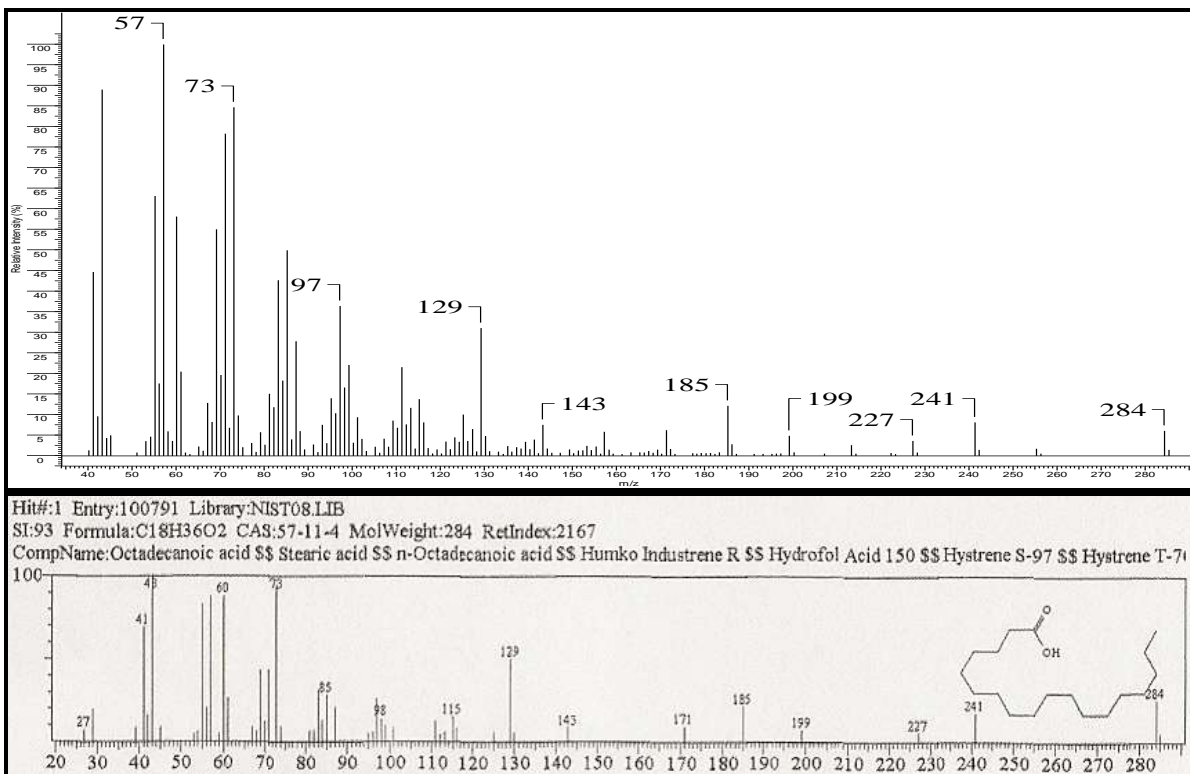


Figura 129. Espectro de massas do Ácido n-Octadecanóico (Tr: 16,348 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

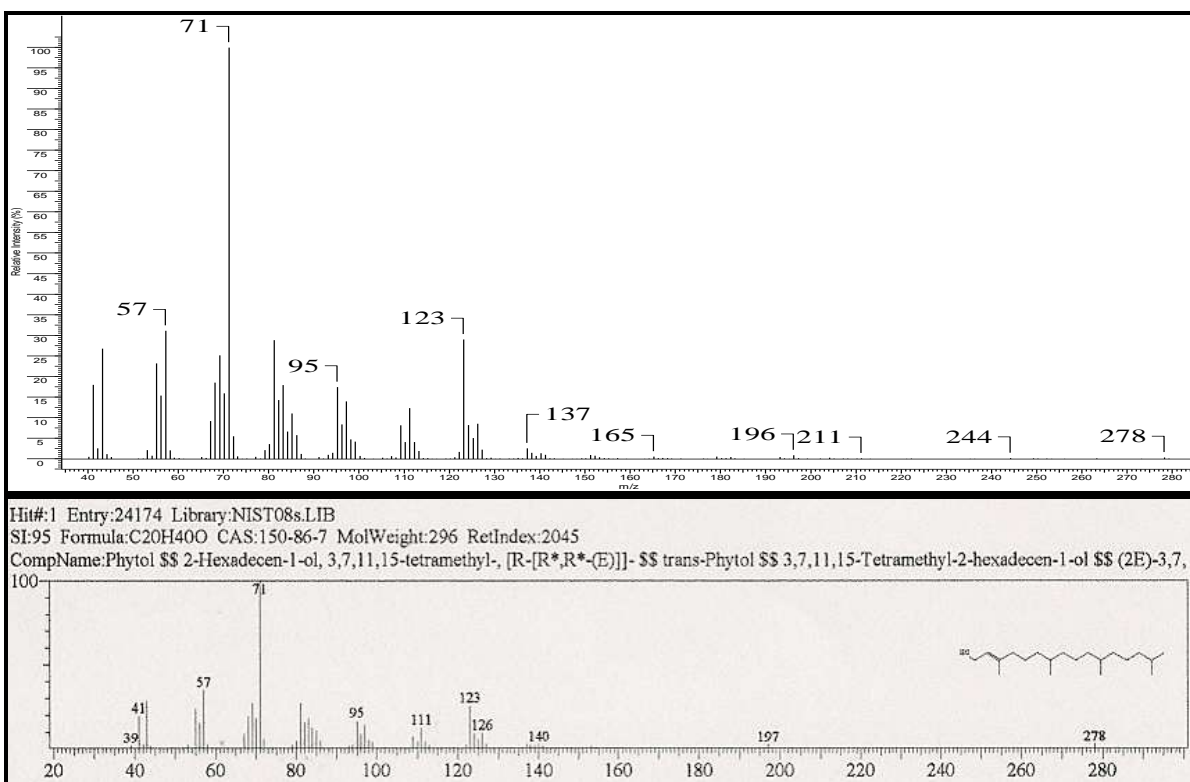


Figura 130. Espectro de massas do Fitol (Tr: 15,872 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

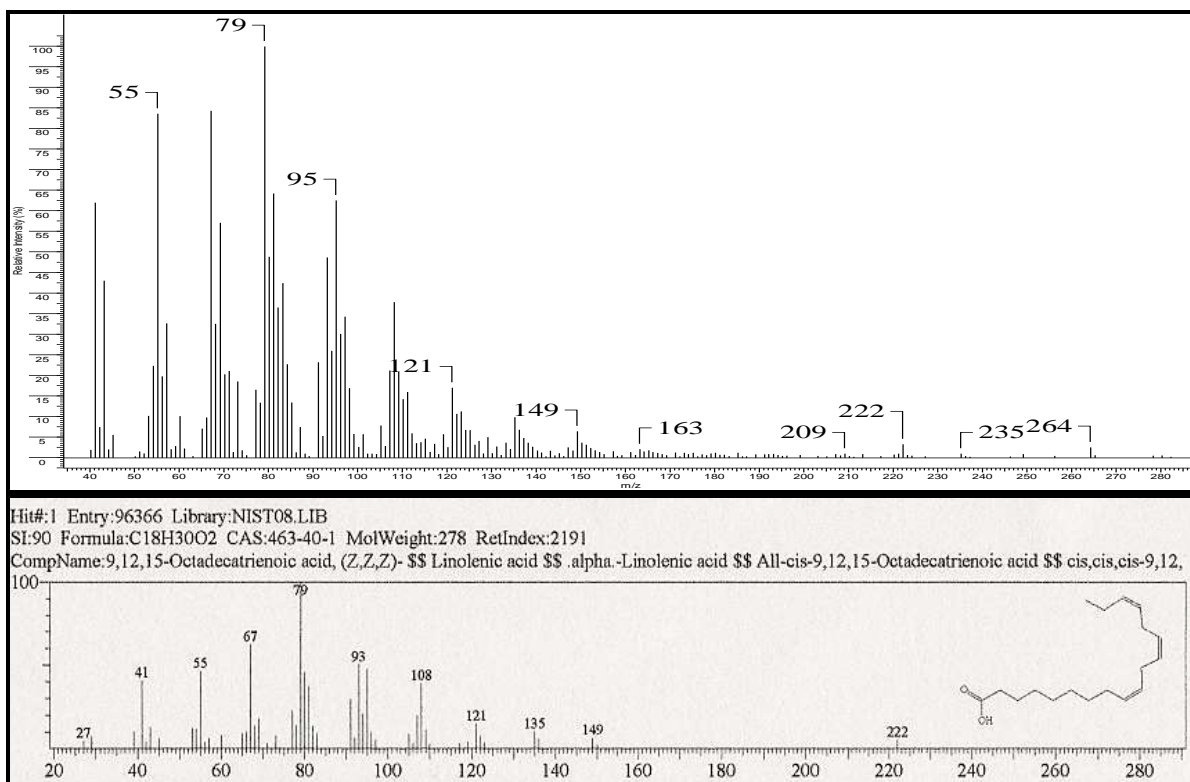


Figura 131. Espectro de massas do Ácido linolênico (Tr: 16,198 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

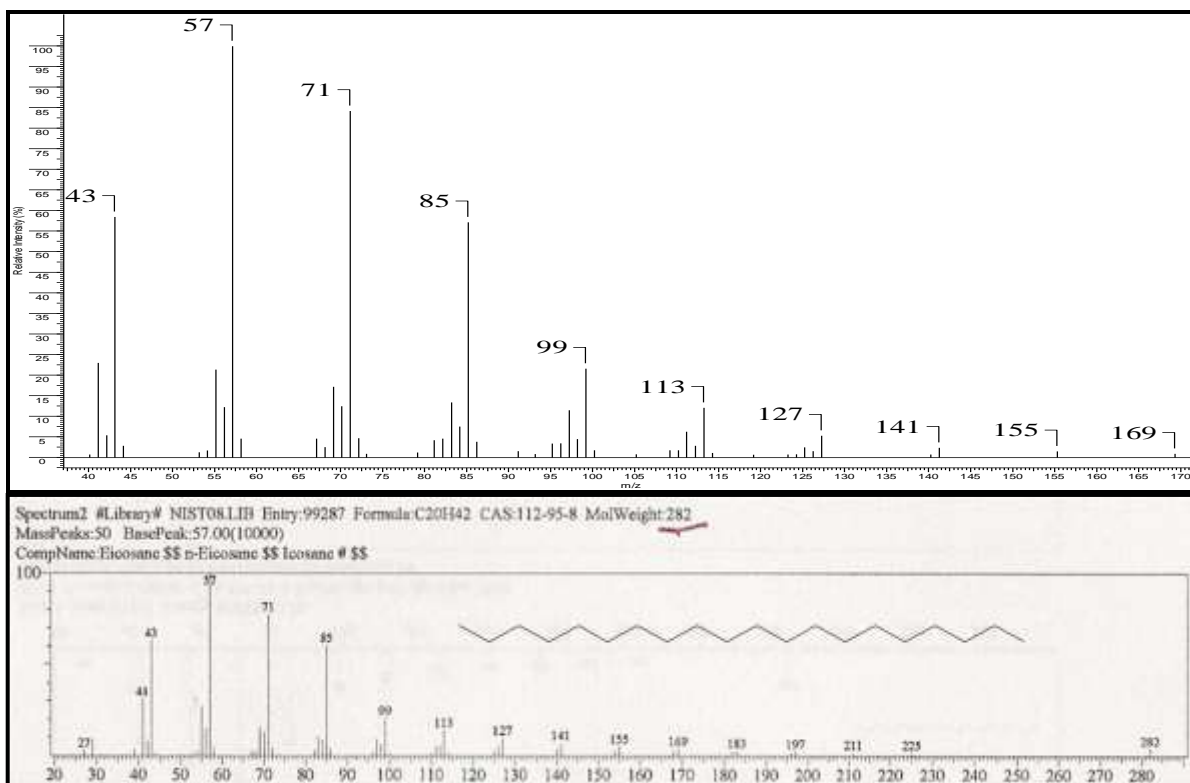


Figura 132. Espectro de massas do n -Eicosano (16,660 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

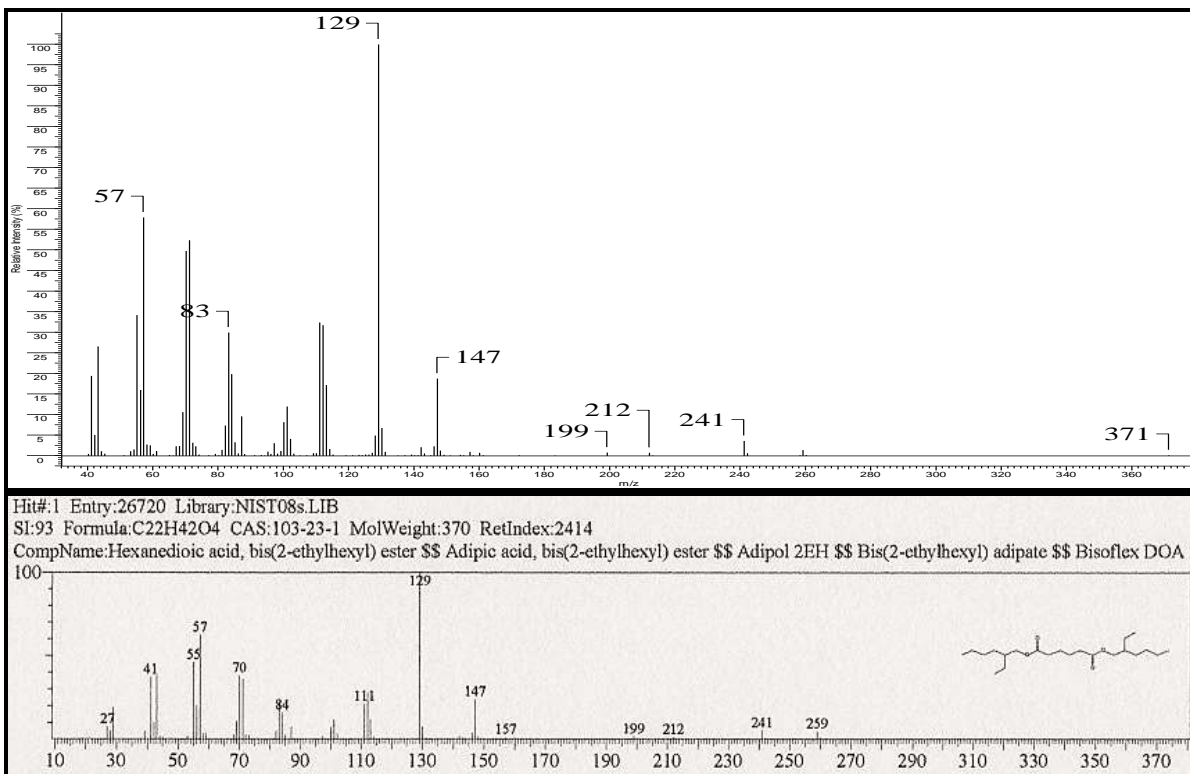


Figura 133. Espectro de massas do Hexadionato de bis(2-etil-hexila) (Tr: 18,382 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

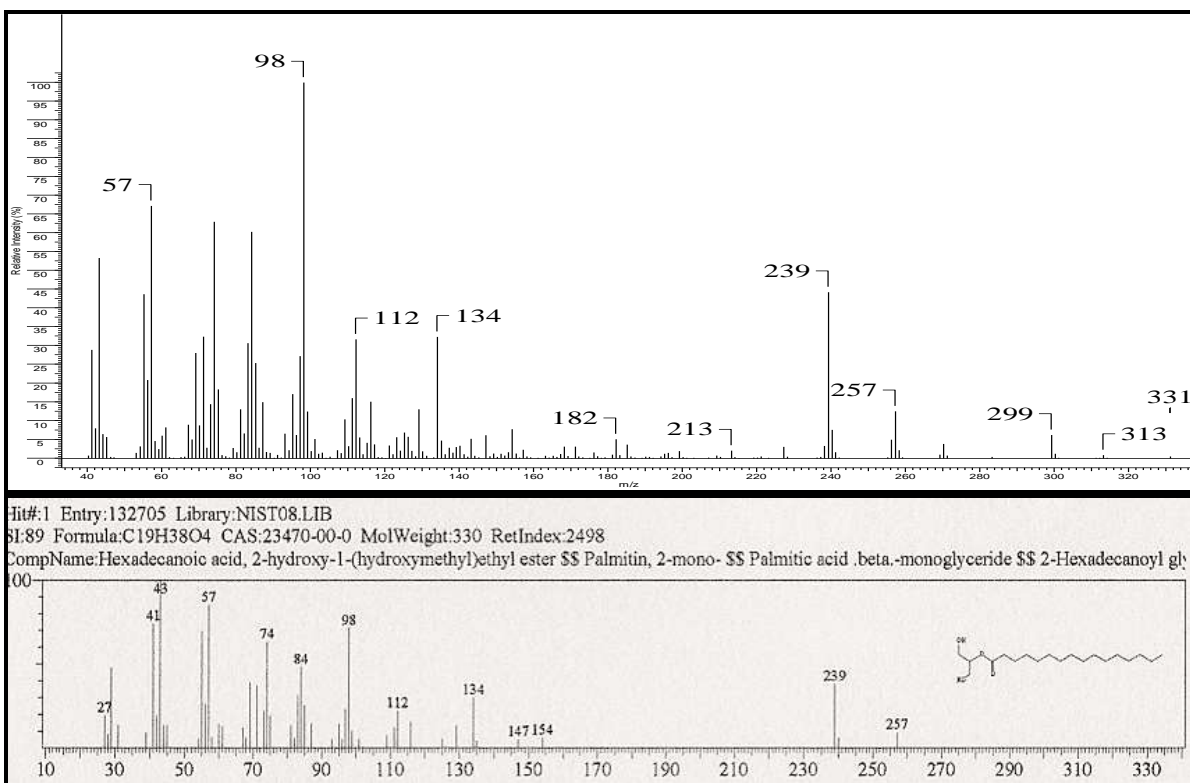


Figura 134. Espectro de massas do Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroxi-metil)etila (Tr: 19,564 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

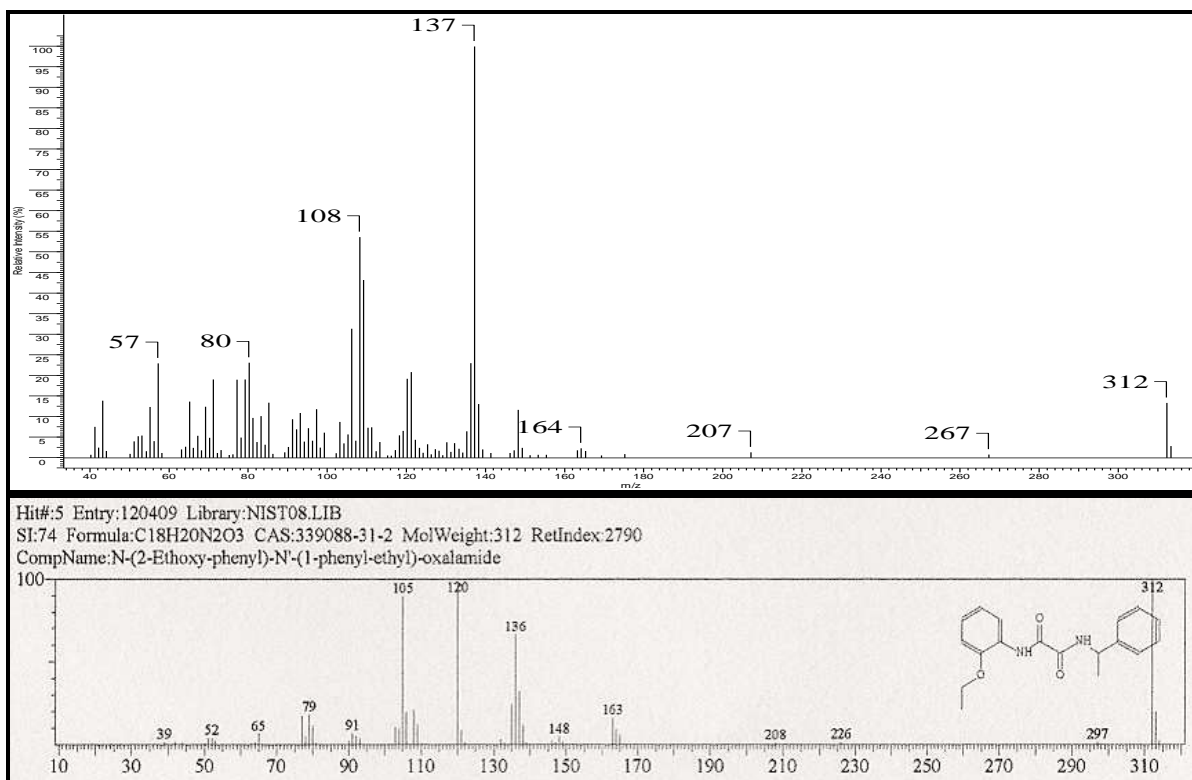


Figura 135. Espectro de massas do N-(2-Etóxi-fenil)-N'-(1-fenil-etil)-oxalamida (Tr: 20,657 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

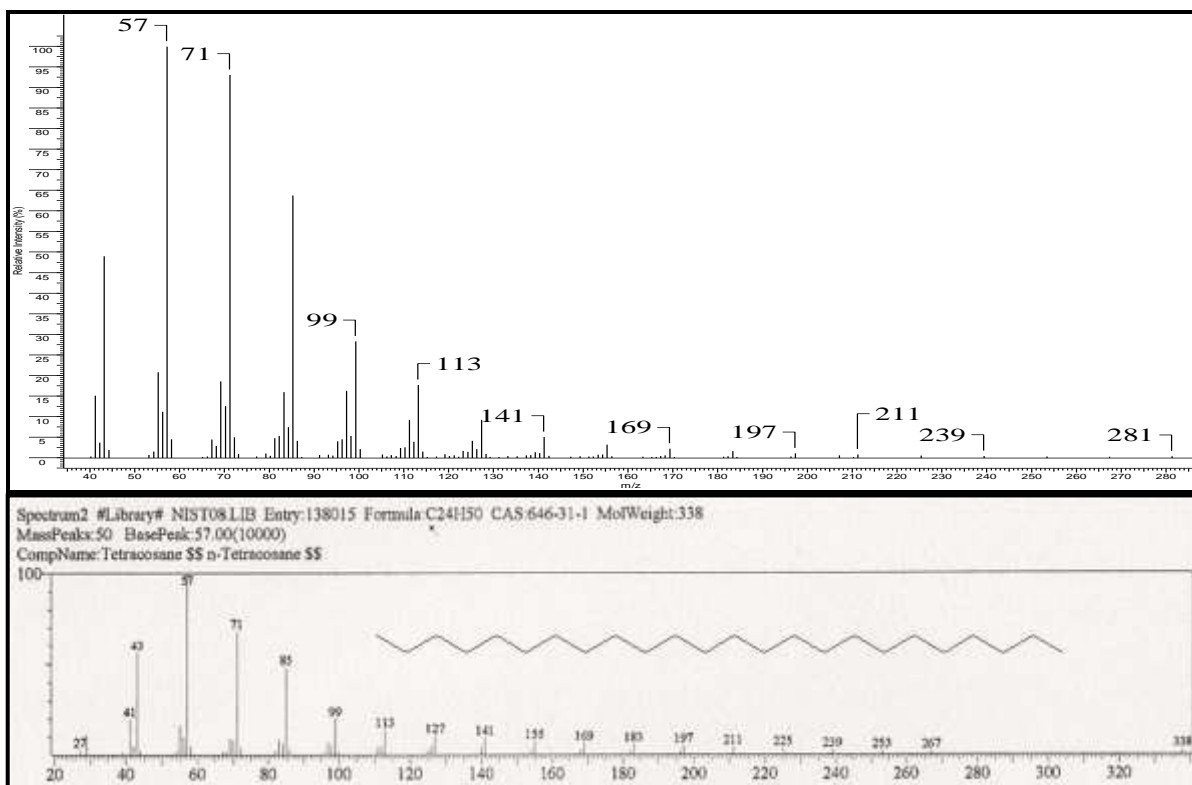


Figura 136. Espectro de massas do n-Tetracosano (Tr: 20,948 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

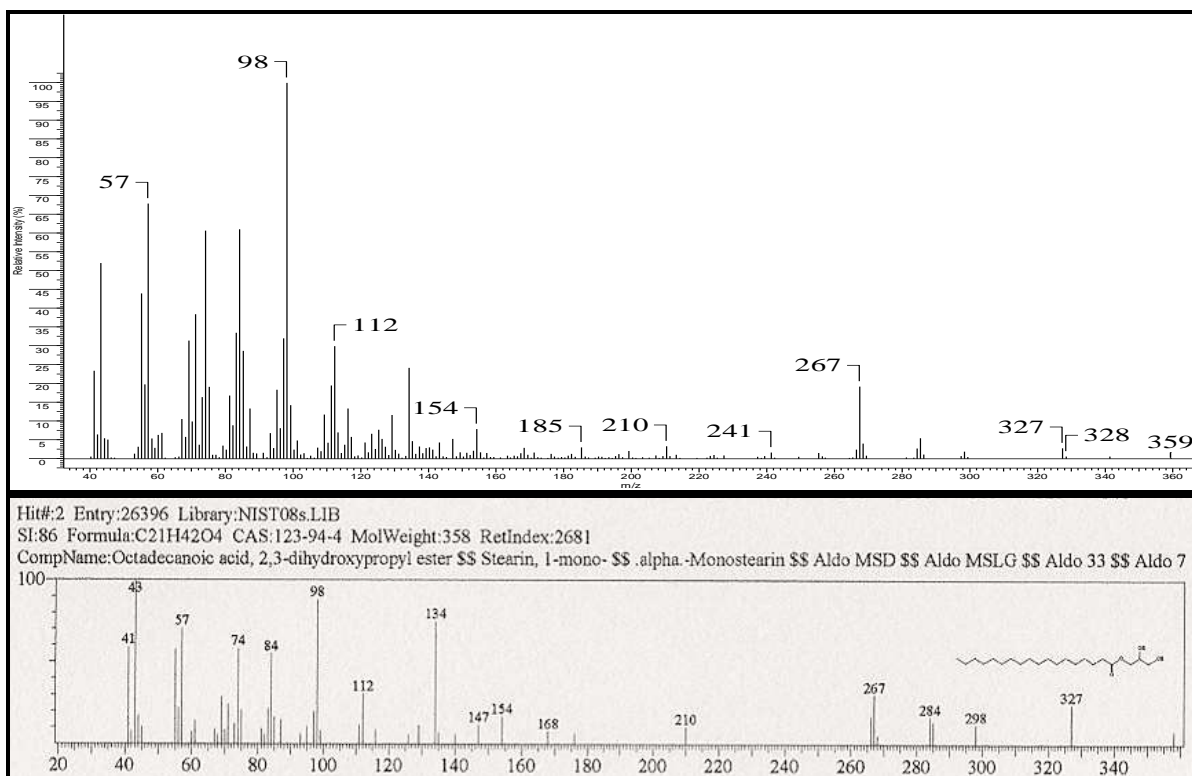


Figura 137. Espectro de massas do Octadecanoato de 2,3-dihidroxipropila (Tr: 21,329 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

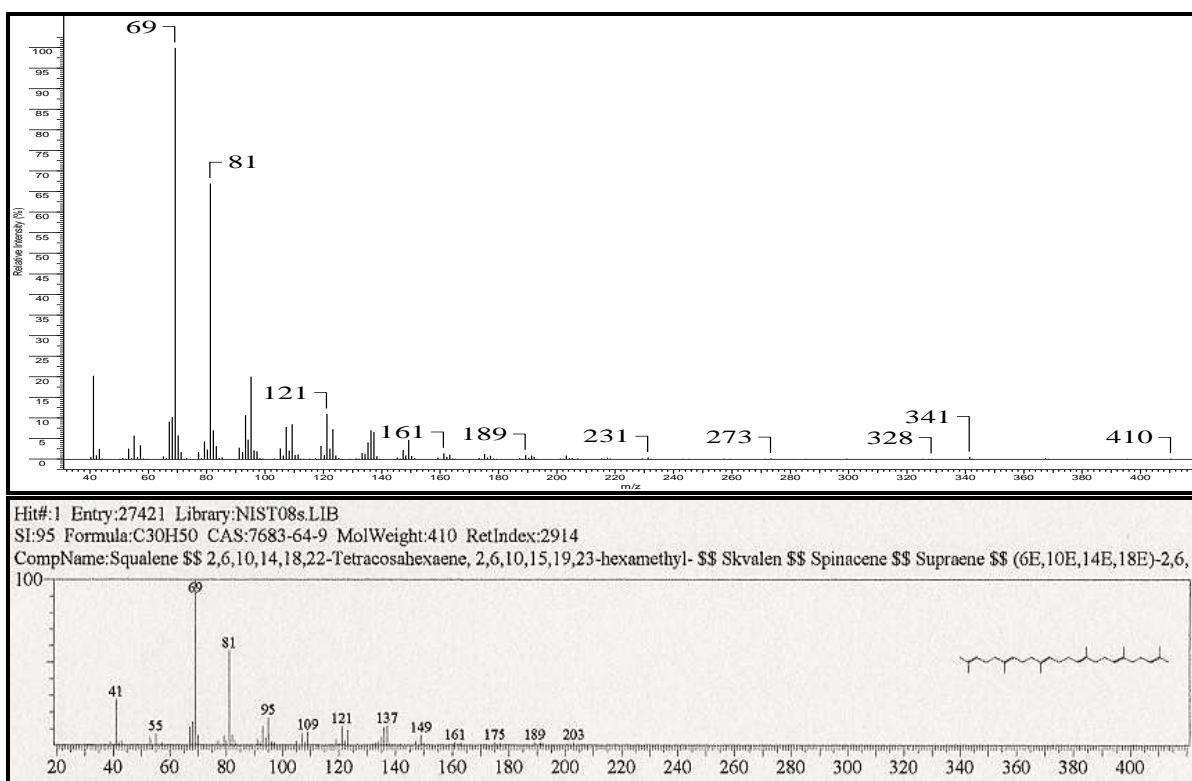


Figura 138. Espectro de massas do Esqualeno (Tr: 22,132 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

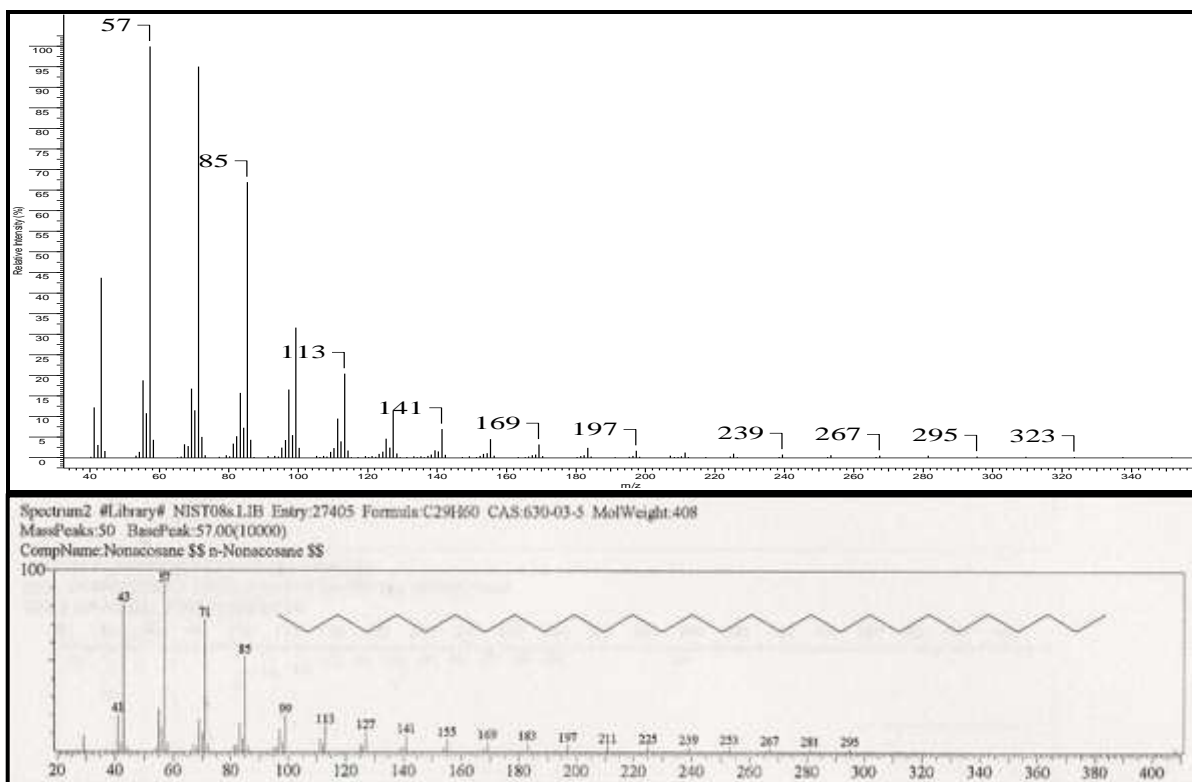


Figura 139. Espectro de massas do Nonacosano (Tr: 23,026 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

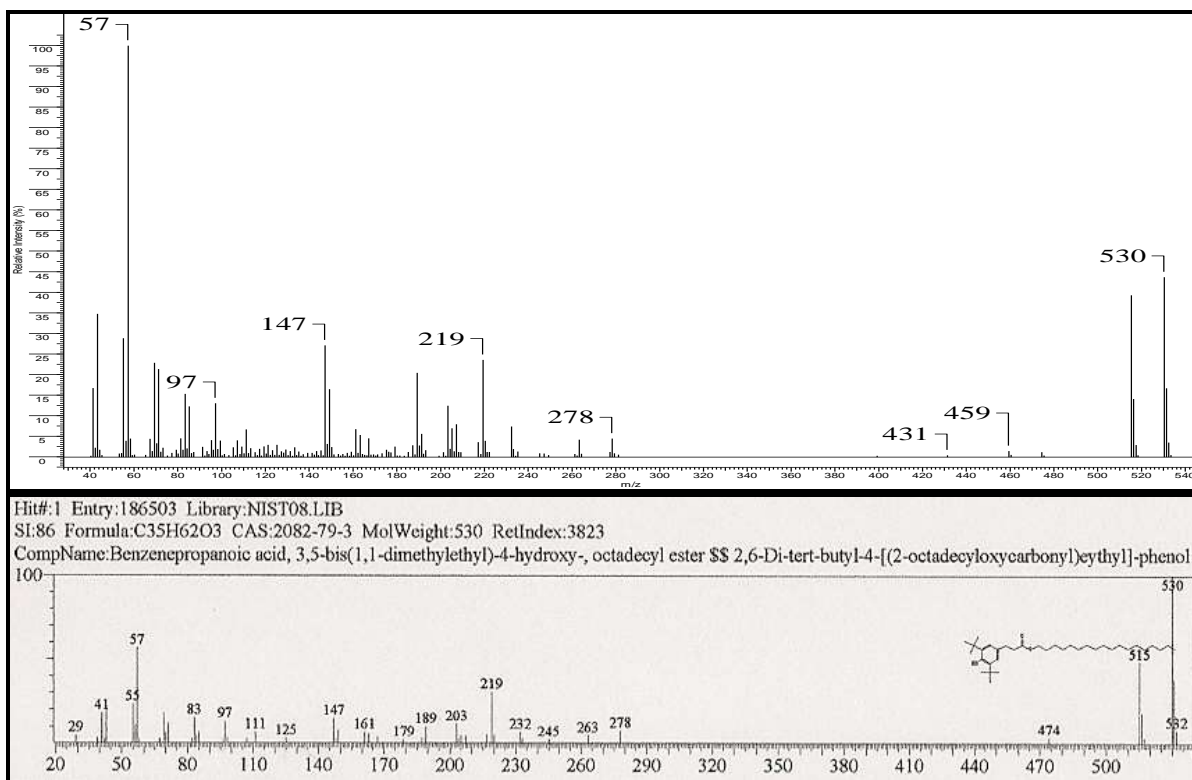


Figura 140. Espectro de massas do 2,6-Di-tert-butyl-4-[(2-octadecyloxy)ethyl]-fenol (Tr: 24,739 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

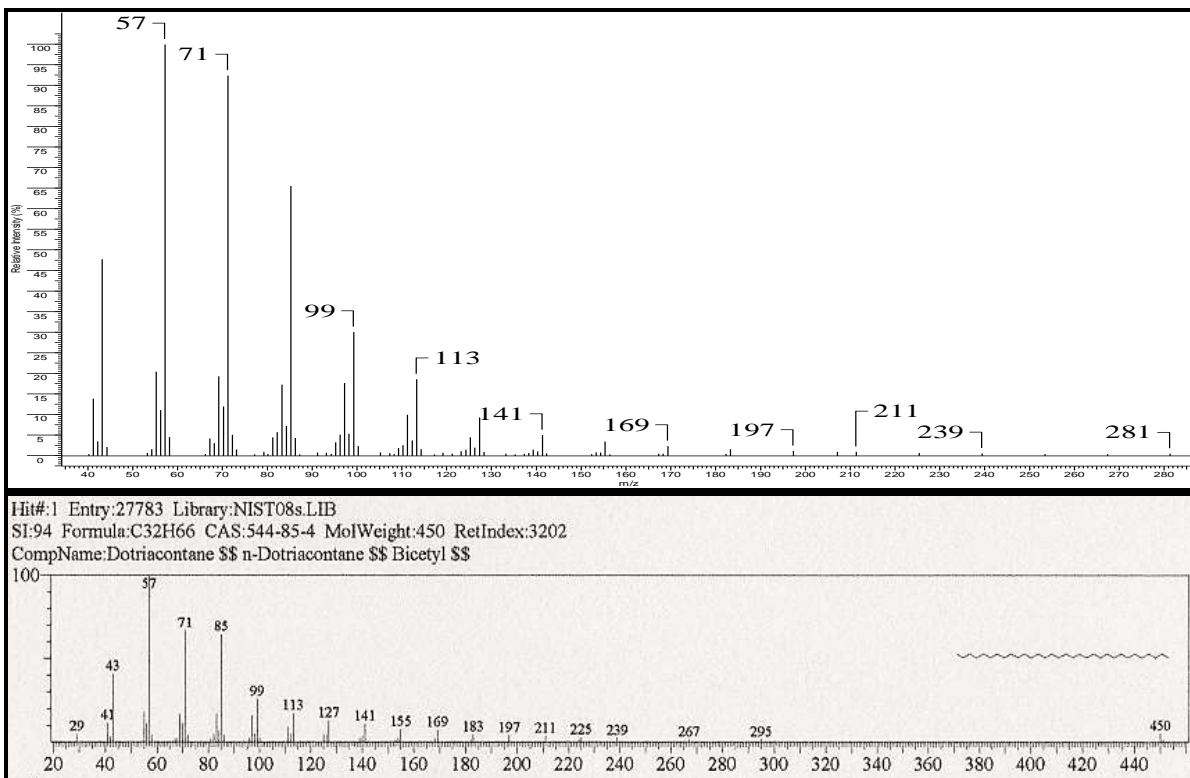


Figura 141. Espectro de massas do n-Dotriacontano (Tr: 25,844 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

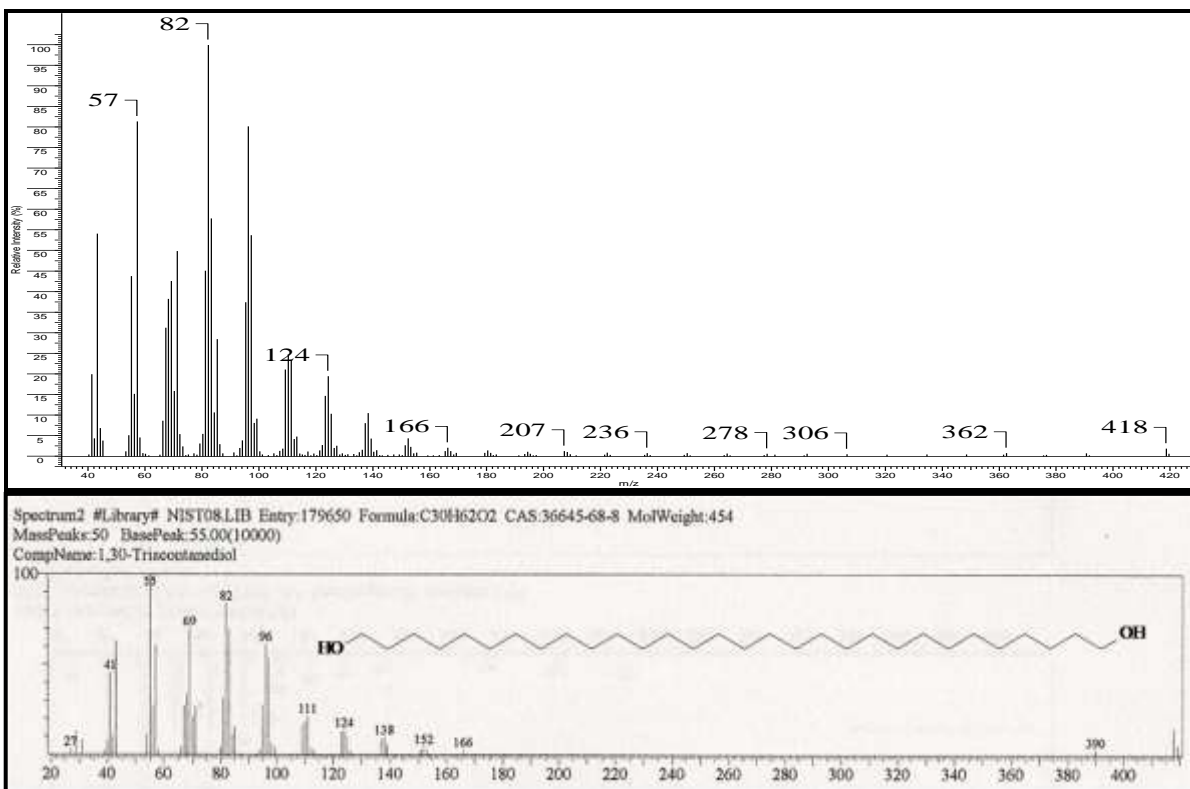


Figura 142. Espectro de massas do 1,30 Triacontanediol (Tr: 28,899 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

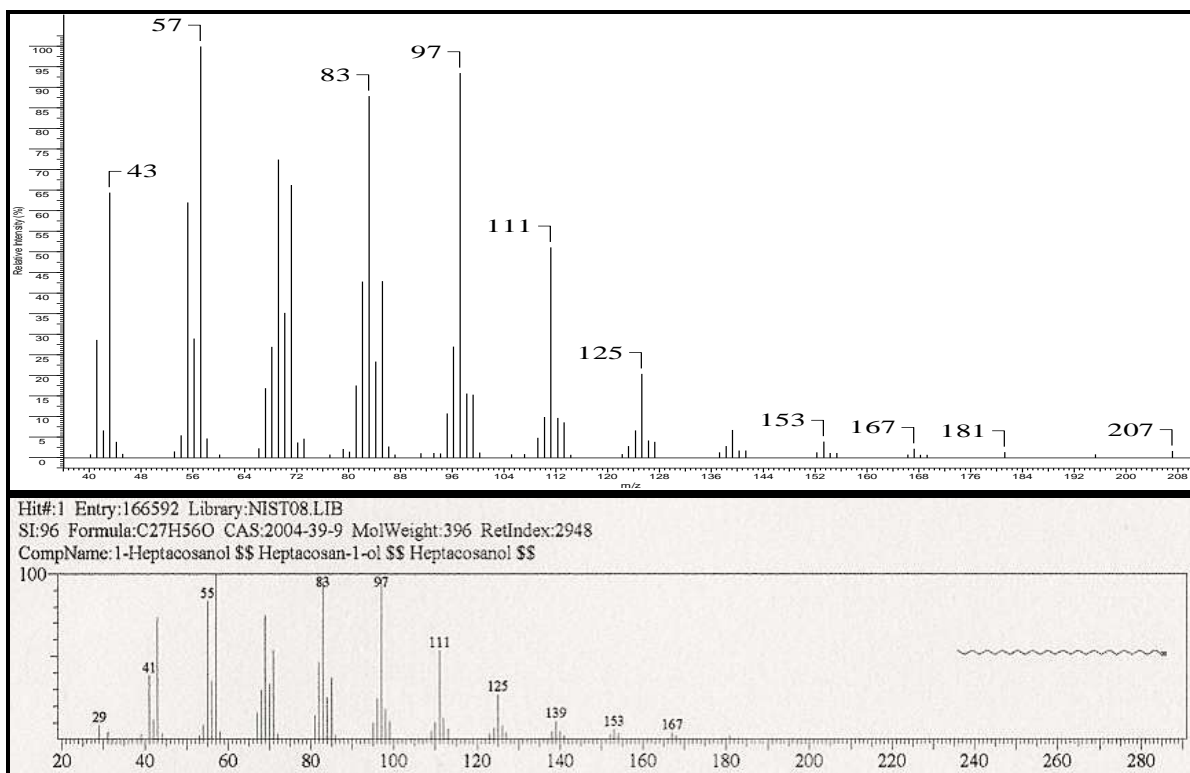


Figura 143. Espectro de massas do Heptacosanol (Tr: 30,513 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

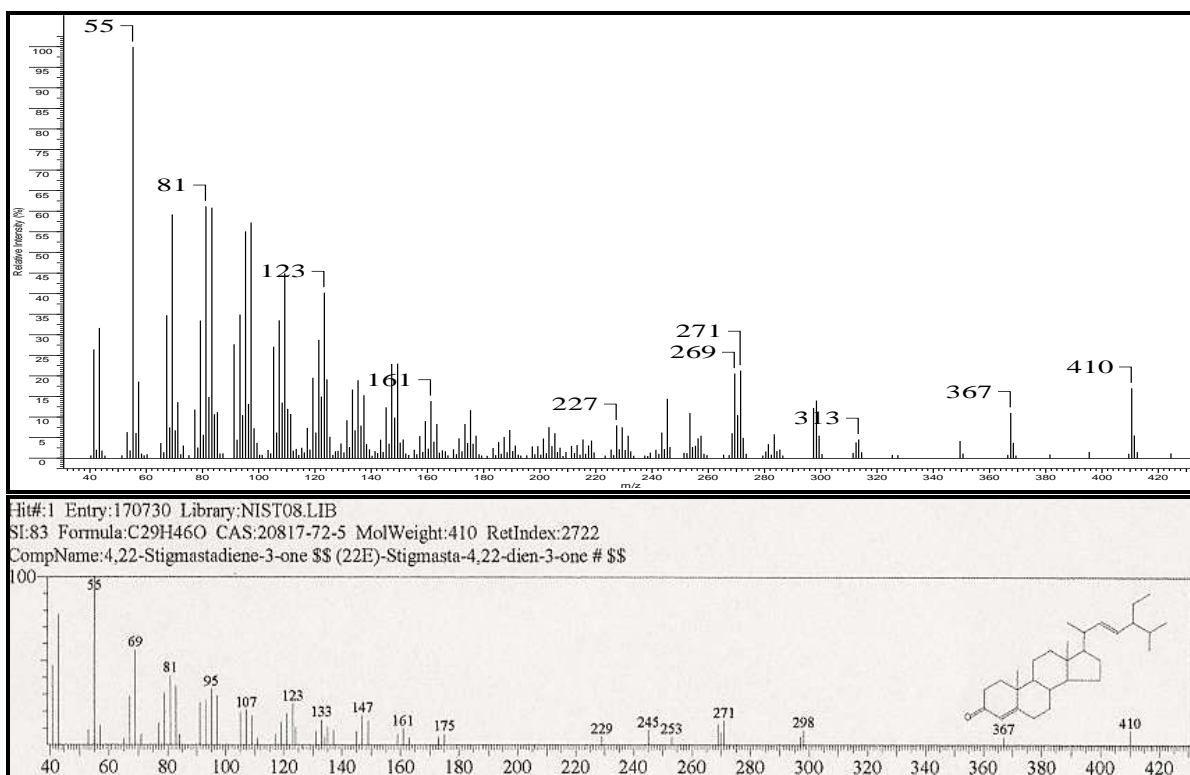


Figura 144. Espectro de massas da 4,22-Stigmastadieno-3-ona (Tr: 33,152 min.) e comparação com padrão da biblioteca.

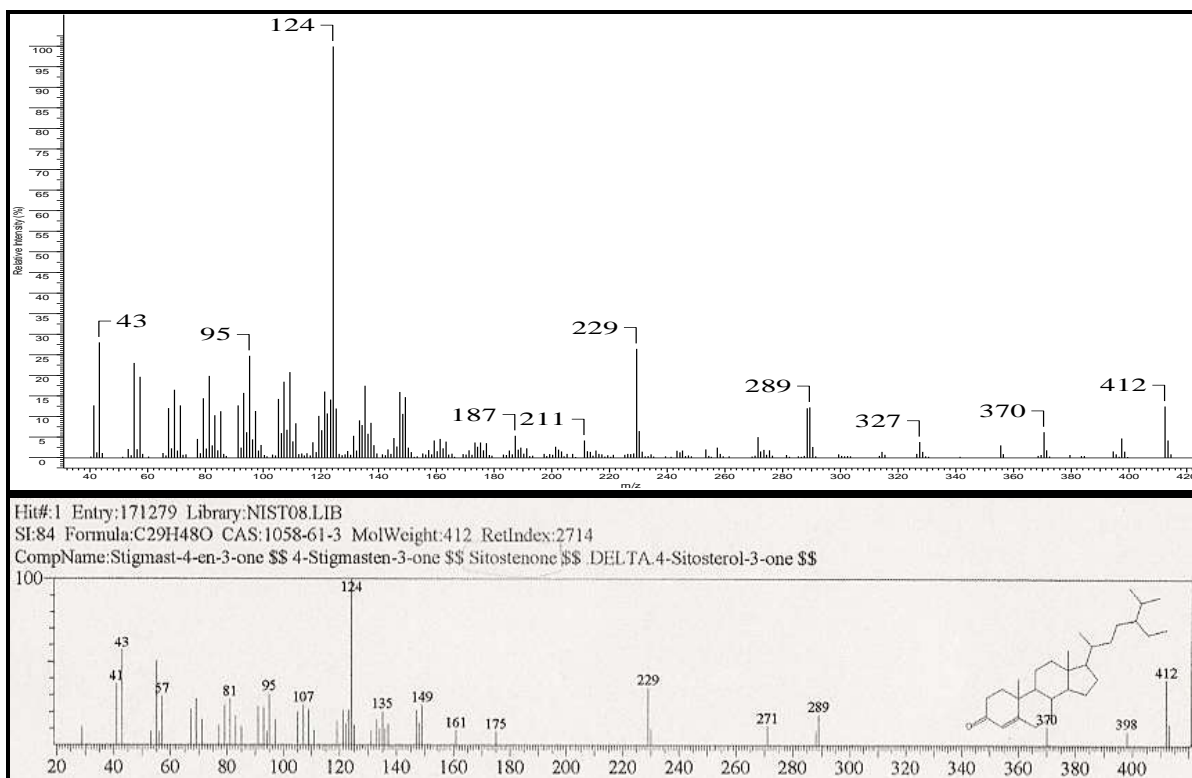


Figura 145. Espectro de massas da Sitostenona (Tr: 35,249.) e comparação com padrão da biblioteca.

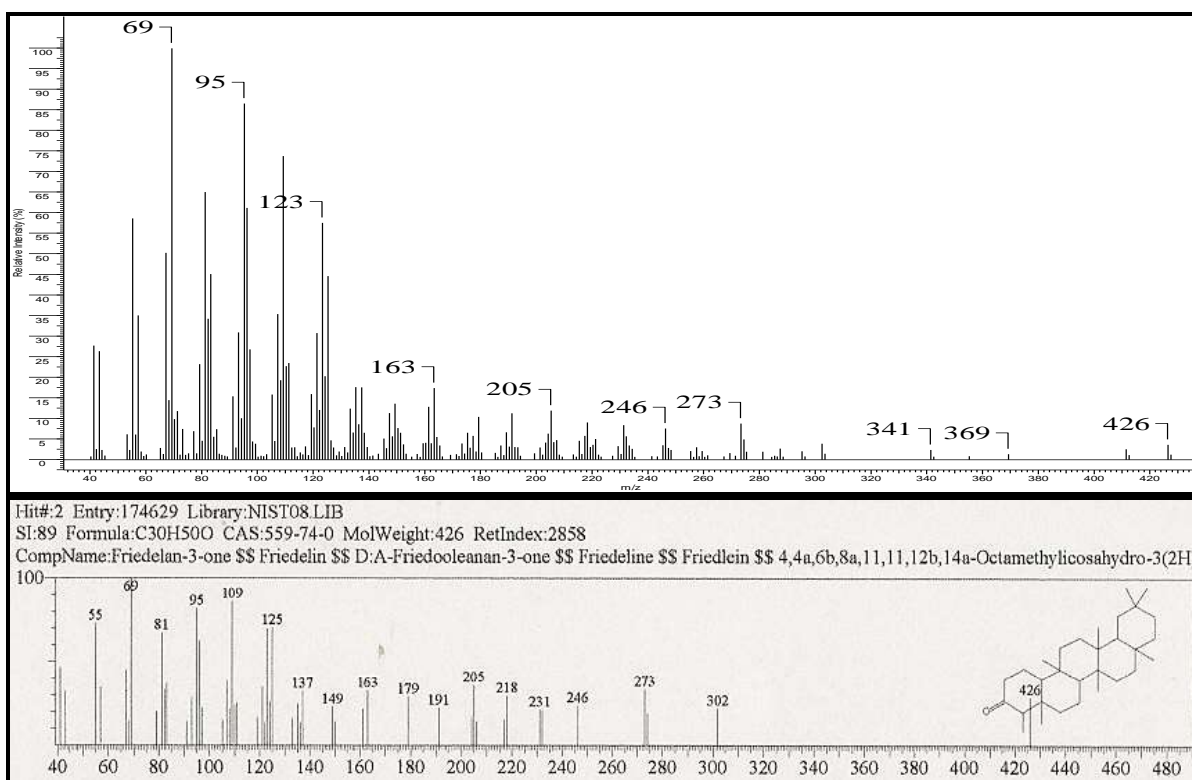


Figura 146. Espectro de massas da Friedelina (Tr: 38,745.) e comparação com padrão da biblioteca.

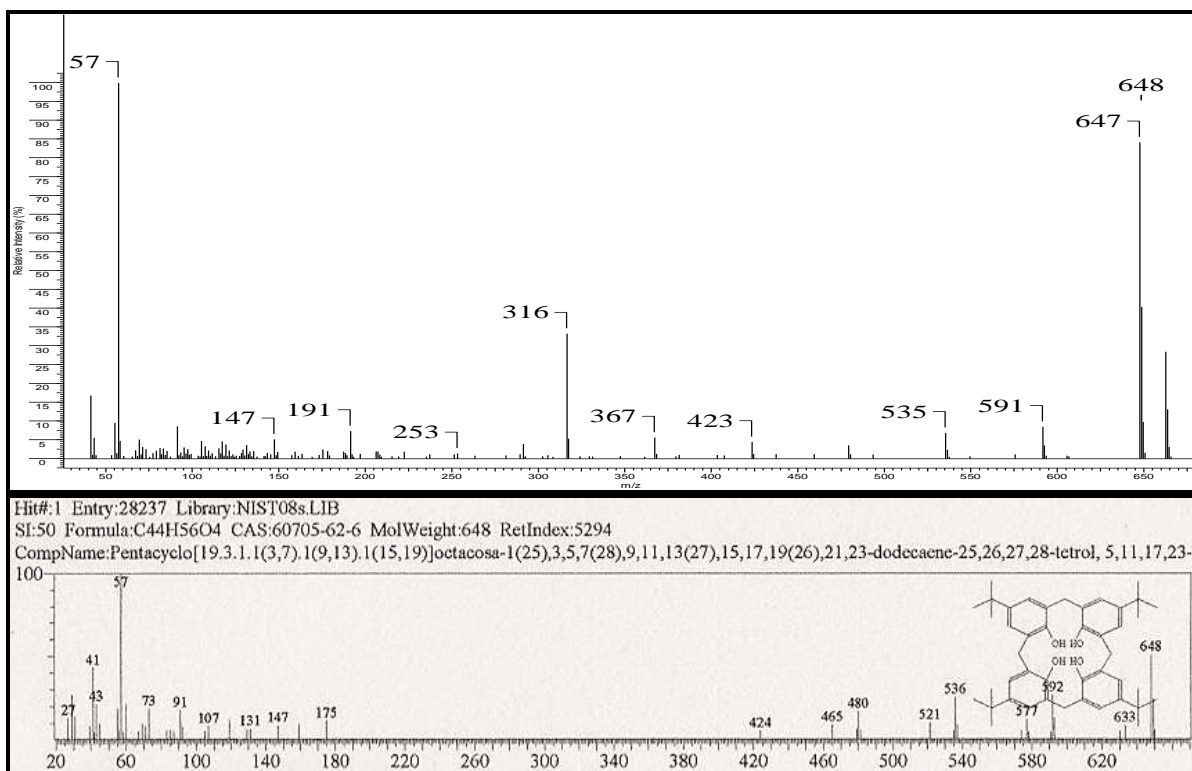


Figura 147. Espectro de massas do 4-*tert*-Butylcalix[4]areno (Tr: 39,378.) e comparação com padrão da biblioteca.

(Tr; %; Condições)

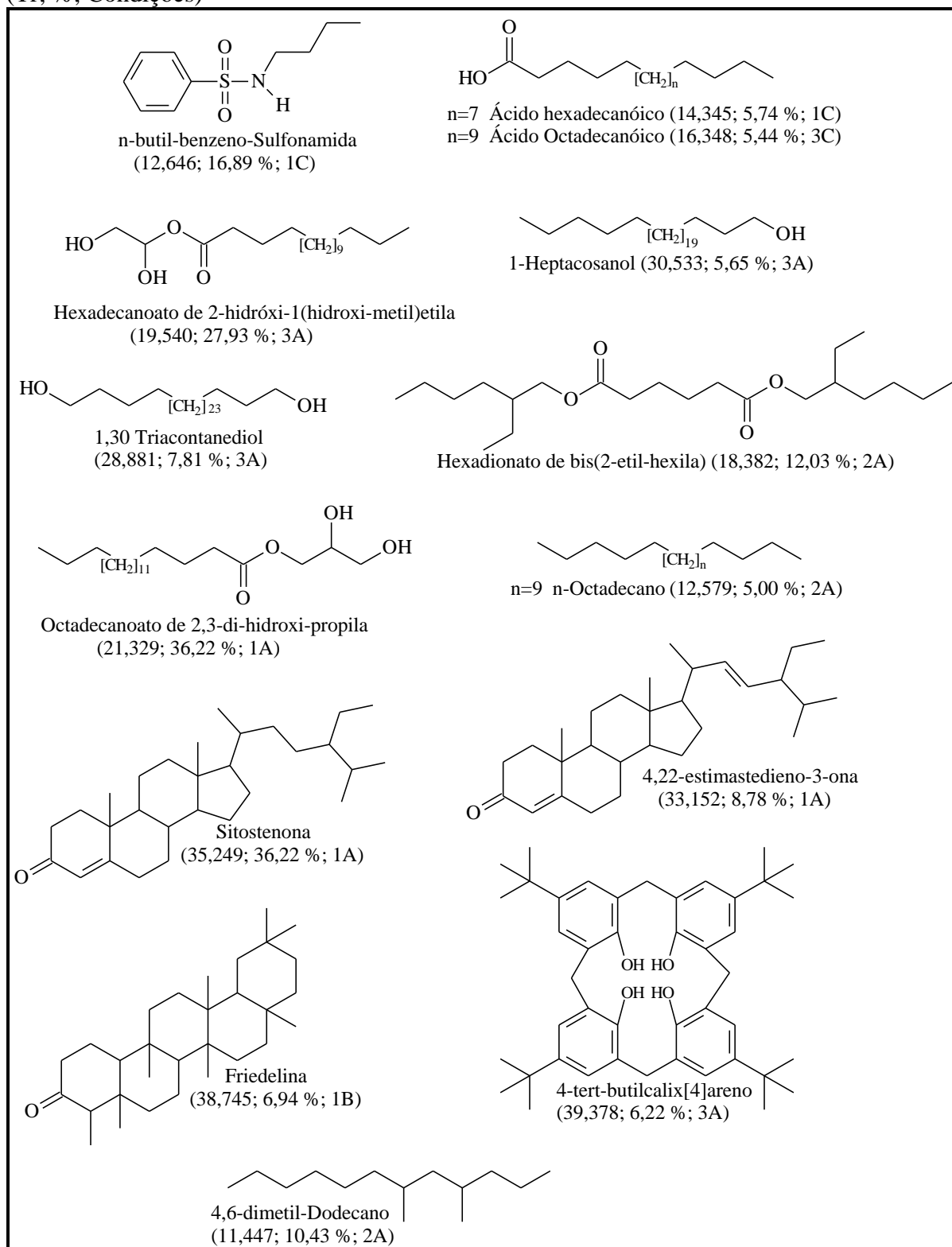


Figura 148. Constituintes majoritários do óleo das folhas de *P. rigida* extraído por fluido supercrítico (ESC)

(Tr; %; Condições)

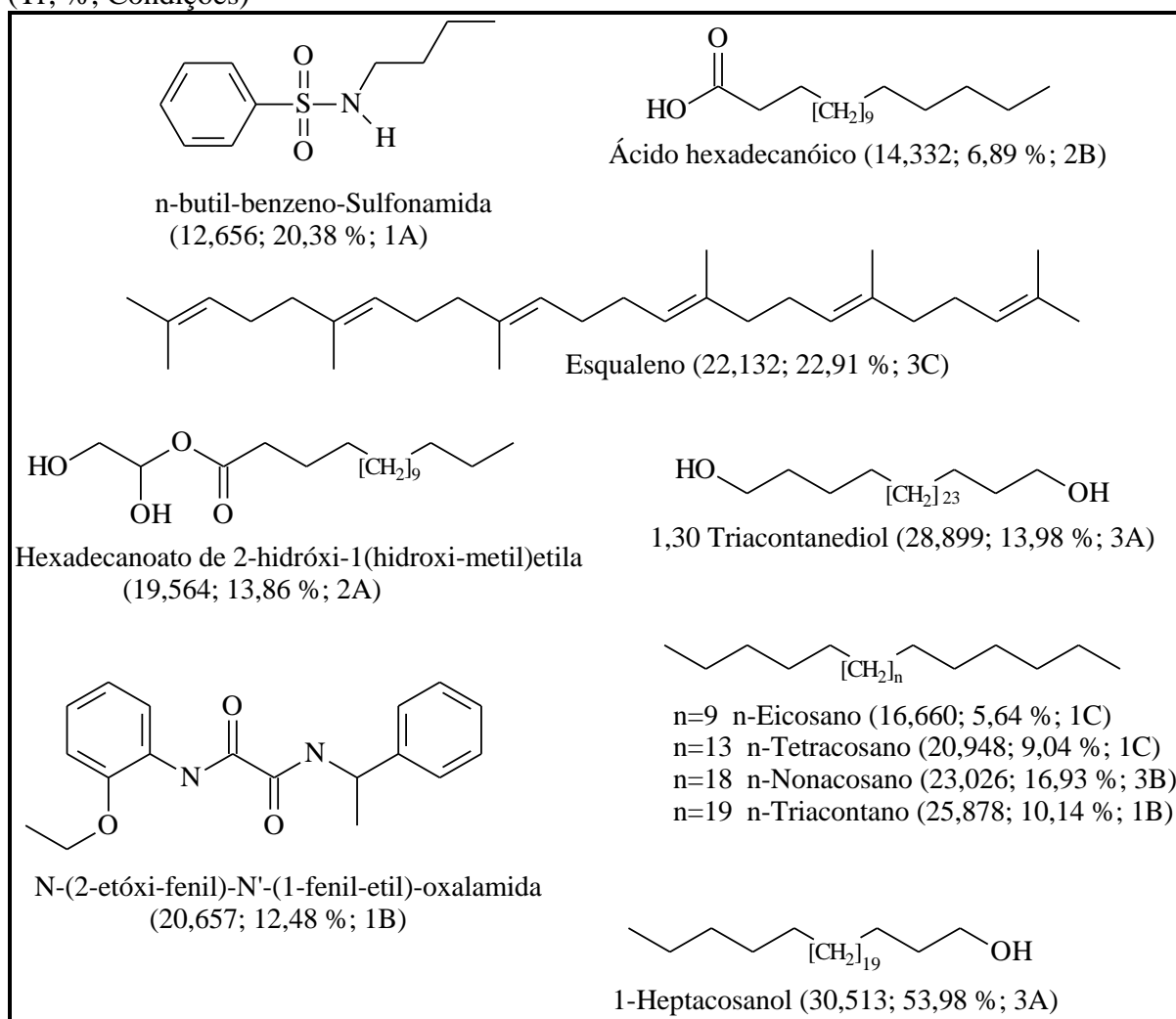


Figura 149. Constituintes majoritários do óleo das folhas de *P. gonoacantha* extraído por fluído supercrítico (ESF)

(Tr; %)

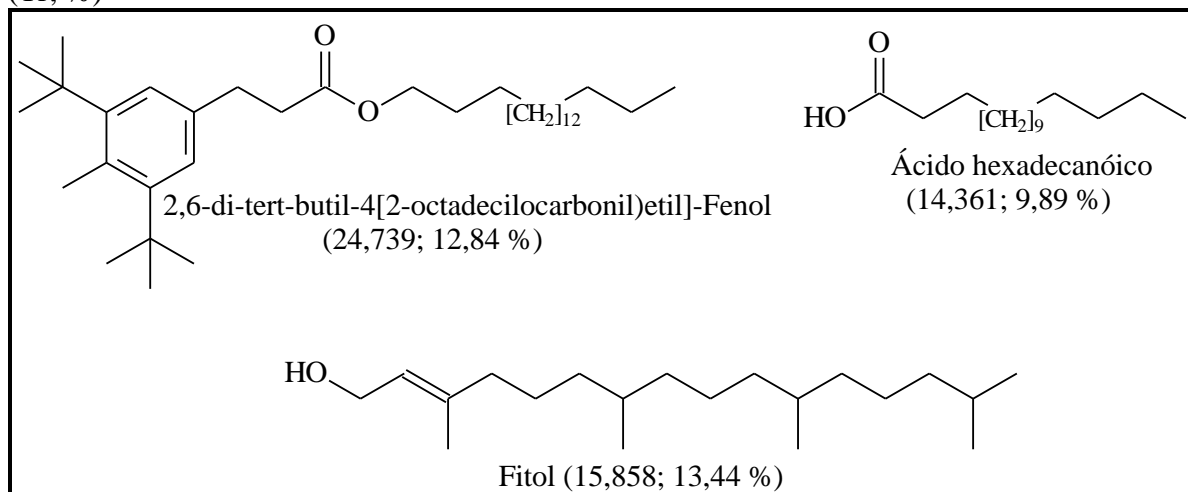


Figura 150. Constituintes majoritários do óleo das folhas de *P. rigida* extraído por hidrodestilação

(Tr; %)

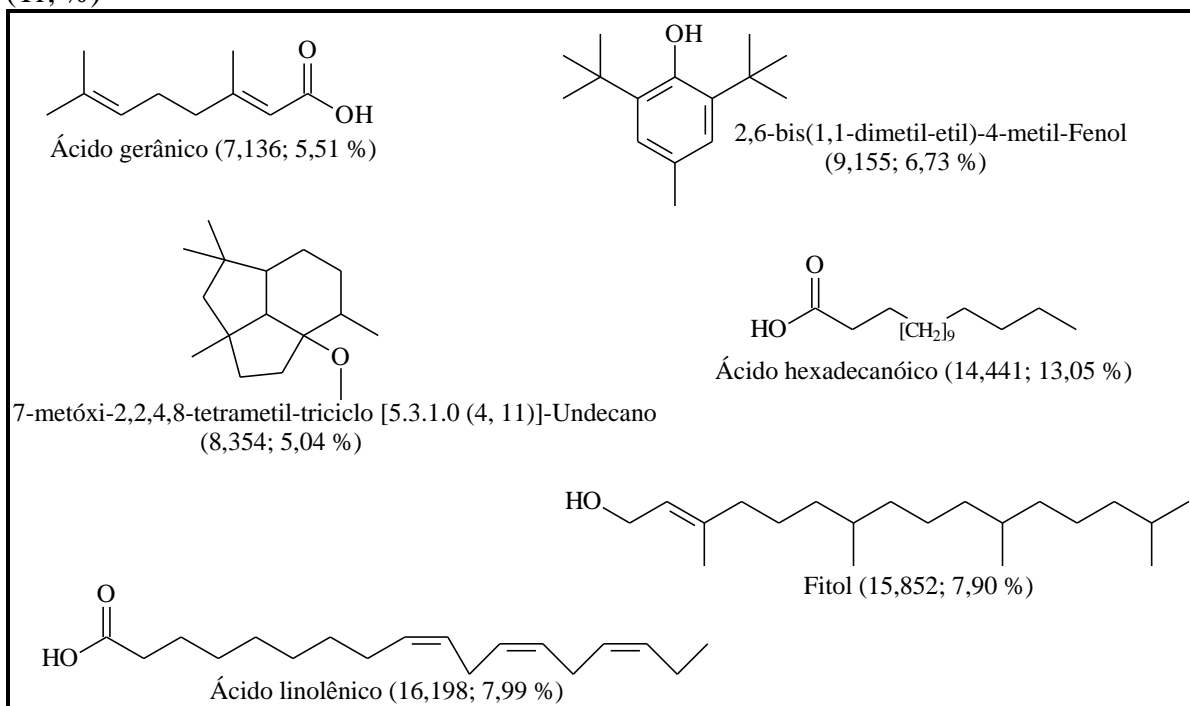


Figura 151. Constituintes majoritários do óleo das folhas de *P. gonoacantha* extraído por hidrodestilação

VIII. AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Piptadenia rigida* e *Piptadenia gonoacantha*

VIII.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Este experimento foi realizado em colaboração com o Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Nacional do Rio Cuarto - UNRC, pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Lucila Barberis.

VIII.1.1. Introdução

Os antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. Essas substâncias, mesmo em pequenas concentrações, apresentam as seguintes propriedades: atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenção do desenvolvimento de cepas resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química (YUNES & CALIXTO, 2001). O uso prolongado de antibióticos de amplo espectro tem levado ao aparecimento de patógenos resistentes a drogas, tanto na medicina e na agricultura. Diante dessas novas ameaças, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (BASIL *et al.*, 2004). O presente estudo foi realizado para investigar propriedades antibacterianas das frações de extratos metanólicos da raiz de *Piptadenia gonoacantha* obtida por partição de solvente do extrato.

VIII.1.2. Material e Métodos

As frações do extrato metanólico da raiz de *P. gonoacantha* usadas para os testes foram obtidas de acordo com o **Esquema 2**.

Neste estudo foram utilizadas cinco cepas de *Escherichia coli* e uma cepa de referência ATCC 25922, cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e uma cepa de referência ATCC 25923 e cinco cepas de *Listeria monocytogenes*.

Este ensaio foi realizado utilizando o método de difusão em agar (PASCUAL *et al.*, 2008a) alteradas em função das condições experimentais. As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo nutriente tripteína de soja em condições aeróbias, a 37 ° C por 24 h. Em

seguida, eles foram suspensas em PBS e ajustada para os padrões de turbidez de 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / ml). A suspensão foi usada para inocular em Mueller-Hinton (MH) em caldo com 1,2% de agar a 3 mm de altura das placas de Petri. Círculos (diâmetro de 7 mm) foram perfurados no ágar e preenchidos com 100 μ l de 20 mg / ml de cada fração (PGRMD = D, PGRMA = A, PGRMB = B e PGRMM = M, **Tabela 18**). As frações orgânicas foram dissolvidas em uma solução de 33% (v / v) de DMSO em PBS. Cada fração foi analisada em triplicata. Gentamicina (10 μ g/disc) foi utilizado como padrão para confirmar se todos os microorganismos testados foram inibidas pelo antibiótico. As placas foram incubadas em condições aeróbias, a 37 ° C por 18 h. A atividade antibacteriana foi avaliada através da medição dos diâmetros da zona de inibição.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações testadas foi determinada por *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* utilizando o método da microdiluição seriada com tampão salina a uma concentração final variando de 20 mg / ml a 0,312 mg / ml (PASCUAL *et al.*, 2008b). As frações testadas foram adicionadas ao caldo estéril Mueller Hinton com ágar 1,2% em placas e depois a suspensão bacteriana (diluição: $1,5 \times 10^8$ UFC / ml). Cada fração foi analisada em triplicata. Foram utilizados controles positivo e negativo. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibe o crescimento após a incubação a 37 ° C.

VIII.1.3. Resultados

75% das cepas de *E. coli*, 100% das cepas de *S. aureus*, e 100% das cepas de *L. monocytogenes* testados foram inibidos por estes extratos. O efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas foi maior do que Gram negativas.

Os valores do CIM das frações dos extratos das raízes de *P. gonoacantha* contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* são mostradas na **Tabela 18**. Os valores do CIM das frações PGRMD e PGRMB contra *S. aureus* foram os mesmos (5 mg / ml), enquanto que os valores do CIM das frações PGRMA e PGRMM contra as mesmas bactérias foram 0,625 mg / ml e 1,25 mg / ml, respectivamente. Os valores do CIM da fração PGRMA contra *L. monocytogenes* e *E. coli* foram de 5 mg / ml e 10 mg / ml, respectivamente. Os menores valores de CIM das frações PGRMA e PGRMM contra *S. aureus*, em comparação com *L. monocytogenes* e *E. coli*, sugere que o *S. aureus* apresentou maior sensibilidade para as frações dos extratos das raízes de *P. gonoacantha*.

Tabela 18. Os valores de CIM de frações * dos extratos das raízes de *P. gonoacantha* contra três linhagens de bactérias.

Concentração (mg/mL)	<i>S. aureus</i>				<i>L. monocytogenes</i>				<i>E. coli</i>				Controle	
	D	A	B	M	D	A	B	M	D	A	B	M	Positivo	Negativo
20.000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10.000	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
5.000	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
2.500	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1.250	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0.625	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0.312	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

- Ausência de crescimento, Controle Positivo: suspensão bacteriana e salina; + Presença de crescimento, Controle Negativo: Extratos e caldo de carne; * D: fração PGRMD, A: fração PGRMA, B: fração PGRMB e M: fração PGRMM.

VIII.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS E TANINOS

VIII.2.1. Introdução

Os taninos são compostos fenólicos de estrutura complexa produzidos pelo metabolismo secundário de plantas. São encontrados na maioria dos órgãos das plantas e em diferentes quantidades. Taninos podem ser classificados em condensados, polímeros de proantocianidinas, e em hidrolisáveis, ésteres formados pelas moléculas de ácidos benzoicos, principalmente de ácido gálico, e glicosídeos (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os taninos são importantes para as plantas pois são agentes de proteção contra patógenos, insetos e animais que ofereça alguma ameaça as plantas (SCALBERT, 1991; MOLE *et al.*, 1993; HELDT, 1997; SANT'ANA, 2002; PAES *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2005). Além dessas propriedades, eles também apresentam diversas propriedades biológica e medicinais como, atividade antiinflamatória e cicatrizante (MELLO *et al.*, 2001), anticarcinogênica (CHUNG *et al.*, 1998), inibidores da transcriptase reversa em HIV (KILKUSKIE *et al.*, 1992), dentre outras.

Os taninos são conhecidos por interagirem com proteínas, uma vez que seu uso no curtimento de couro é bem antiga (MONTEIRO *et al.*, 2005). Essa característica tem sido explorada como método para determinação quantitativa dos taninos presentes nas plantas e derivados. Devido a necessidade de diferenciar os taninos dos demais compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais, a utilização da precipitação de taninos pela interação com proteínas passa a ser usada em métodos de quantificação de taninos somados a métodos espectrofotométricos frequentemente usados para compostos fenólicos (VERZA *et al.*, 2007).

Comparados à outros compostos fenólicos, os taninos apresentam peso molécula maior, entre 500 e 3000 Dalton, o que favorece a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas (MELLO *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005). O tamanho das moléculas de taninos é adequado para que haja um número de interações intermoleculares suficiente entre ele e a cavidade da macro estrutura da molécula proteica. Compostos fenólicos simples não são capazes de formar um número suficiente de interações intermoleculares com a molécula proteica (BRUNETON, 1991; MONTEIRO *et al.*, 2005).

VIII.2.2. Material e Métodos

VIII.2.2.1. Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais nas frações polares: PRFMA (fração da partição AcOEt do extrato metanólico da folha) e PRFMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da folha) de *P. rigida*; PGCMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da casca do caule), PGCM (fração residual do extrato metanólico da casca do caule), PGRMA (fração da partição AcOEt do extrato metanólico da raiz) e PGRMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da raiz) de *P. gonoacantha* foram feitas por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Denis, com adaptações quanto ao tempo de reação e concentração da amostra (FOLIN & DENIS, 1912; SOUSA *et al.*, 2007; SANT'ANA, 2010). O comprimento de onda ótimo de leitura (760 nm) foi estabelecido mediante varredura na faixa de 400 a 800 nm, em 2h após a adição do reagente de oxi-redução ao extrato. Foram preparadas soluções na concentração de 0,15 mg/mL, em metanol grau espectroscópico, de cada frações e todas as análises foram feitas em triplicatas. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 µL) dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 14%, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2h, e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e metanol/água Milli-Q (9:1) como branco. O teor de fenóis totais das frações foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com soluções padrão de ácido gálico em metanol e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 1g de fração (mgEAG/1g).

VIII.2.2.2. Preparo do reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram inseridos 20g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4g de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 152 mL de água Milli-Q. Após duas horas de refluxo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, passada para balão volumétrico de 200 mL e seu volume completado com água Milli-Q. A solução apresentou coloração esverdeada, foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

VIII.2.2.3. Preparo da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico ($1 \text{ mg/mL} \equiv 0,0059 \text{ mM}$). Aliquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30 μL desta solução mãe foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa recém-preparada de carbonato de sódio a 14%. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água Milli-Q como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

VIII.2.2.4. Determinação de taninos por precipitação com caseína

Para determinação de taninos usou-se uma metodologia de precipitação com caseína com modificações (SEIGLER *et al.*, 1986; READEL *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2007, VERZA *et al.*, 2007). A precipitação dos taninos por caseína, consistiu em adicionar 5 mL das soluções estoque de cada fração em tubos de ensaios contendo caseína na concentração de 1g. Os tubos de ensaios ficaram em banho de ultra som por 90 min (WANG *et al.*, 2009), e após sonicação foram centrifugadas e retiradas alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante (solução não-tanante) para determinação dos fenóis residuais por método de Folin-Denis como descrito em (VIII.2.2.1). Todas as análises foram feitas em triplicata. A quantidade de taninos presente nas frações corresponde à diferença entre o valor encontrado para a solução não tanante e o obtido na determinação de fenóis totais. O teor de fenóis simples e taninos foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 1g de fração (mgEAG/1g), assim como os fenóis totais.

VIII.2.3. Resultados

VIII.2.3.1. Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais nas frações polares: PRFMA (fração da partição AcOEt do extrato metanólico da folha) e PRFMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da folha) de *P. rigida*; PGCMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da casca do caule), PGCMM (fração residual do extrato metanólico da casca do caule), PGRMA (fração da partição AcOEt do extrato metanólico da raiz) e PGRMB (fração da partição BuOH do extrato metanólico da raiz) de *P. gonoacantha* foi escolhida a metodologia de Folis-Denis que se mostrou a mais acessível e eficiente dentre as consultadas na literatura (FOLIN & DENIS, 1912; SANT'ANA, 2010; SOUSA *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2005; VERZA, 2007). A metodologia original segundo Sant'Ana (2010) foi adaptada para extratos vegetais seguindo o preparo das soluções estoque de acordo com Souza e colaboradores (2007). Esta análise permite determinar a concentração de fenóis totais pela interpolação das absorbâncias obtidas das soluções reagentes de cada extrato contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,4456 a 6,6424 μ g/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 1g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 795,1298A - 133,0411$ onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 760 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,99904$. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As frações PRFMA, PGCMB e PGRMA foram as que apresentaram a maior concentração de fenóis totais, como pode ser observado na **Tabela 19**.

Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

Parametro	Valor	Erro
A	0,16732	0,00646
B	83,84375	1,83949

R	SD	N	P
0,99904	0,00947	6	<0.0001

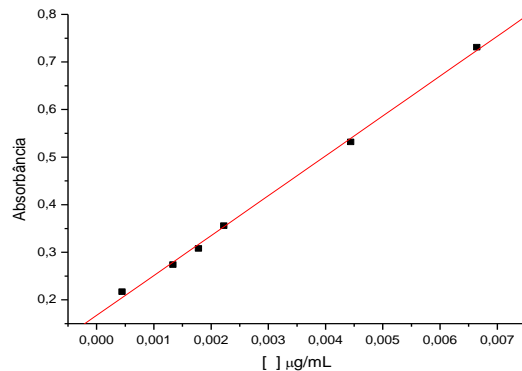


Figura 152. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorvâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010).

Frações polares testadas:

PRFMA: *P. rígida*, extrato de Folha em Metanol Partição em Acetato de etila.

PRFMB: *P. rígida*, extrato de Folha em Metanol Partição em Butanol.

PGCMB: *P. gonoacantha*, extrato do Caule em Metanol Partição em Butanol.

PGCMM: *P. gonoacantha*, extrato do Caule em Metanol Partição Metanol (resíduo).

PGRMA: *P. gonoacantha*, extrato da Raiz em Metanol Partição em Acetato de etila.

PGRMB: *P. gonoacantha*, extrato do Raiz em Metanol Partição em Butanol.

Tabela 19. Resultados obtidos para teor de Fenóis Totais (FT) para as amostras de frações, através do reagente de Folin-Denis.

Amostras	FT (mg de EAG/g da fração \pm DP)
PRFMA	755,65 \pm 33,68
PRFMB	220,26 \pm 18,24
PGCMB	503,06 \pm 25,06
PGCMM	340,06 \pm 27,35
PGRMA	518,44 \pm 13,92
PGRMB	377,43 \pm 12,03

EAG = equivalente de ácido gálico; DP = desvio padrão da média

VIII.2.3.2. Determinação do teor de taninos

Para determinar o teor de taninos realizou-se uma busca na literatura e pode-se verificar que os métodos espectrofotométricos mais aceitos envolvem a complexação previa dos taninos com substratos protéicos (pó-de-pele, caseína, albumina) ou poliméricos (PVPP)

(MONTEIRO *et al.*, 2005; NING *et al.*, 2010; READEL *et al.*, 2001; SEIGLER *et al.*, 1986; SHEN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; VERZA *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2009). A escolha da caseína grau técnico como agente de precipitação foi feita com base no trabalho de Verza e colaboradores (2007), no qual a caseína grau técnico apresentou maior precisão frente a caseína purificada. Modificações na metodologia original (SEIGLER *et al.*, 1986) foram feitas de modo a adequá-las às nossas condições experimentais. Toda modificação foi firmada em outros métodos, de determinação de taninos da literatura, no intuito de não gerar resultados errôneos. A determinação da quantidade de **taninos (T)** presente nas frações foi realizada com base na diferença entre o valor de absorvância da **solução não tanante (SNT)** e o valor obtido na determinação de **fenóis totais (FT)**; $[T] = [FT] - [SNT]$. Os ensaios de precipitação de taninos foram realizados com caseína na concentração de 1g, para complexar totalmente os taninos presentes em uma alíquota de 5 mL da solução estoque. Os valores expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 1g de extrato, obtidos da determinação de fenóis da solução não tanante pelo método de Folin-Denis estão apresentados na **Tabela 20**. As frações PRFMA, PGCMB e PGRMA foram as que apresentaram maior teor de taninos. Observa-se ainda que as frações menos polares nas folhas de *P. rígida* (PRFMA), na casca do caule (PGCMB) e da raiz (PGRMA) de *P. gonoacantha* apresentaram maior teor de taninos quando comparados com suas frações mais polares das respectivas espécies e partes da planta (PRFMB, PGCMM e PGRMB). Foram usados os valores de absorvância da média das melhores repetições para obter a média das reprodutibilidades. Na **Tabela 21** estão apresentados os teores de fenóis totais (FT), fenóis simples presentes na solução não tanante (SNT) e taninos expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 1g de extrato.

Tabela 20. Resultados obtidos para teor de fenóis na Solução Não Tanante (SNT) para as amostras de frações precipitadas em 1g de caseína, através do reagente de Folin-Denis

Amostras	SNT (mg de EAG/g da fração ± DP)
PRFMA	549,71 ± 30,51
PRFMB	170,17 ± 5,58
PGCMB	375,58 ± 2,43
PGCMM	321,24 ± 6,62
PGRMA	498,56 ± 41,20
PGRMB	203,83 ± 16,34

EAG = equivalente de ácido gálico; DP = desvio padrão da média

Tabela 21. Resultados obtidos para teor de taninos com base na equação $[T] = [FT] - [SNT]$.

Amostras	FT (mg de EAG/g da fração)	SNT (mg de EAG/g da fração)	T(mg de EAG/g da fração)
PRFMA	755,65	549,71	205,94
PRFMB	220,26	170,17	50,09
PGCMB	503,06	375,58	127,49
PGCMM	340,06	321,24	18,82
PGRMA	518,44	498,56	19,88
PGRMB	377,43	203,83	173,60

EAG = equivalente de ácido gálico

IX. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UM NOVO DERIVADO DA QUERCETINA CONTENDO UM GRUPO 3'-DINITRO-FENIL-TRIFLUOROMETILA (quercetina-DNF-CF₃) SOBRE *Candida albicans*

IX.1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos tem se tornado um problema cada vez mais importante e urgente a nível mundial. Isto complica o tratamento de infecções hospitalares e comunitárias adquiridas. A candidíase é uma infecção significativa em pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia para câncer, e em pacientes que tem baixa imunidade devido à infecção pelo HIV e AIDS. *Candida albicans* causa candidíase hematogênica disseminada e infecções locais, como aftas e vaginite. *C. albicans* é o patógeno mais comum de fungos e desenvolveu uma ampla gama de mecanismos de virulência reconhecido que permite a colonização bem sucedida e infecção do hospedeiro sob condições adequadas predisponentes (WHITE *et al.*, 2002). Nos últimos anos, a resistência de *C. albicans* tem sido crescente contra antifúngicos tradicionais, como fluconazol (GOLDMAN *et al.*, 2004; BRIONA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Cada vez mais, os flavonóides tem se tornado alvo de investigação médica, inclusive sendo relatados de possuírem muitas propriedades úteis, como atividade antiinflamatória, atividade estrogênica, a inibição da enzima, atividade antimicrobiana, atividade antialérgica, atividade antioxidante, atividade vascular e atividade antitumoral citotóxica (CUSHNIE *et al.*, 2005). Devido à capacidade generalizada de flavonóides para inibir a germinação de esporos de patógenos de plantas, têm sido proposto seu uso contra fungos patogênicos do homem (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Extratos e produtos naturais provenientes de plantas contendo flavonóides podem oferecer uma alternativa para o tratamento da candidíase oral. Extratos das folhas e galhos de *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia*, uma planta indígena sul

africana, é tradicionalmente utilizada como gargarejo para garganta e candidíase oral (PATEL & COOGAN, 2008)

A rutina (quercetina-3 rutinosídeo, **Figura 153**) é um flavonóide polifenólico amplamente presente em alimentos de origem vegetal, como trigo, salsa e tomate (GUARDIA *et al.*, 2001; ERLUND *et al.*, 2000). A rutina é conhecida como um dos flavonóides comuns que ocorrem naturalmente com uma variedade de atividades bioquímicas e farmacológicas. Artigos recentes indicam que a rutina elimina os radicais livres (DUTHIE & DOBSON, 1999), suprime a imunidade celular (MIDDLETON *et al.*, 2000) e tem efeitos anticancerígenos (ROTELLI *et al.*, 2003), bem como efeitos anti-inflamatórios (GUARDIA *et al.*, 2001). Relatos mais recentes mostram que a rutina também possui atividade antimicrobiana (PEREIRA *et al.*, 2007). A flavanona prenilada isolado do arbusto *Eysenhardtia texana*, identificada como 4',5,7-trihidroxi-8-metil-6-(3-metil-[2-butenyl])-(2S)-flavanona, tem demonstrado possuir atividade contra o patógeno oportunista *C. albicans* (WACHTER *et al.*, 1999). O flavonóide 7-hidroxi-3',4'-(metilenodioxo)-flavana, isoladas da casca da fruta de *Terminalia bellerica*, foi ativo contra *C. albicans* (VALSARAJ *et al.*, 1997). Recentemente, a rutina foi proposto para exercer um efeito terapêutico na artrite séptica causada por *C. albicans* (YONGMOON, 2009). No entanto, uma desvantagem da rutina é a sua solubilidade em meio aquoso, 0,125 g / L, considerada baixa quando comparada a alguns derivados sintetizados da rutina (ALLUIS *et al.*, 2000; PEDRIALI, 2005). Esta é a razão de sua pouca biodisponibilidade. Assim, ela impõe algumas restrições ao uso farmacêutico ainda mais, especialmente para a administração oral (MAULUDIN *et al.*, 2009). Além disso, é geralmente considerado que, quando os flavonóis são fornecidos como glicosídeos na dieta, eles são primeiramente hidrolisados pela microflora digestiva, antes de serem absorvidos (MANACH *et al.*, 1997).

Por outro lado, ésteres de quercetina-3-O-amino foram descobertos como uma nova classe de inibidores da tirosina quinase (HUANG *et al.*, 2009a). A quercetina desaparece imediatamente a partir do plasma quando administrada por via intravenosa para os roedores. Isto sugere que a quercetina é rapidamente metabolizada e excretada na urina, sem acúmulo nos tecidos e fluidos biológicos (MURAKAMI *et al.*, 2008).

A fim de descobrir uma nova rutina pró-fármaco com melhor biodisponibilidade, no presente trabalho, realizou-se a síntese de um novo derivado tendo um grupo trifluorometila (quercetina-CF₃, **Figura 153**). A influência do grupo trifluorometila nas moléculas biologicamente ativas é freqüentemente associada com o aumento da lipofilicidade deste

substituinte (MCCLINTON & MCCLINTON, 1992; ANDO & KUMADAKI 1999). A atividade antifúngica deste composto sintético foi comparada com a de rutina em culturas de *C. albicans*. Os resultados mostraram um notável aumento na atividade biológica deste composto.

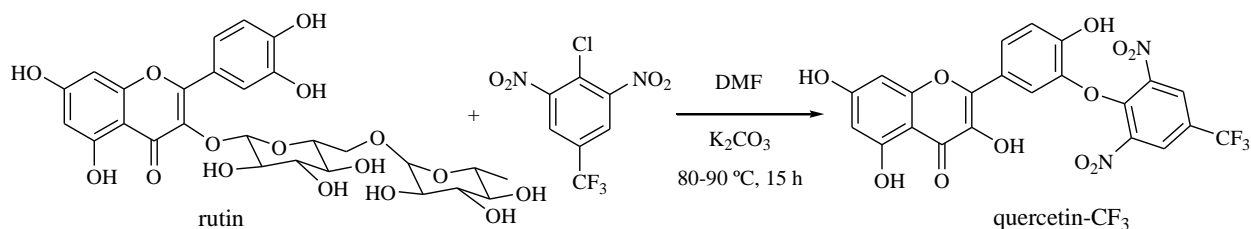


Figura 153. Síntese do derivado quercetina-DNF-CF₃

IX.2. MATERIAIS E MÉTODOS

IX.2.1. Geral

Espectros de UV-visível foram registrados em $25,0 \pm 0,5$ C usando uma cuba de quartzo de comprimento em 1 cm espectrômetro Shimadzu UV-2401PC. Espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Advance Bruker FT-NMR 400 e 200 MHz. Os espectros de massas foram feitos com uma interface APCI-MS Varian 1200L. Os experimentos CLAE foram realizadas em 1525 Waters cromatógrafo líquido equipado com um detector Varian2550 UV-visível comprimento de onda variável e C18 Phenomenex Luna (5 μ m, 150x4.60 mm) de coluna. A separação foi realizada usando uma fase móvel composta de 49% de metanol water/49% / 2% de ácido acético (fluxo: 0,5 mL / min). Cálculos semiempíricos de orbitais moleculares (AM1) foram realizados utilizando o software HyperChem. Todos os produtos químicos a partir de Aldrich foram utilizados sem purificação adicional. Foram utilizadas placas de 250 microns de cromatografia em camada delgada (TLC) da Aldrich (Milwaukee, WI, EUA).

IX.2.2. Síntese de derivados da rutina (quercetina-DNF-CF₃)

Uma solução de 50 mg (0,08 mmol) de rutina e 11 mg (0,04 mmol) de 2-cloro-5-(trifluorometil) -1,3-dinitrobenzeno em 5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) foi agitada com K₂CO₃ (100 mg) durante 15 horas a 80-90 °C. Após, a solução foi extraída com acetato de etila (3x15 mL) e água (20 mL). A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi lavada

três vezes com acetato de etila. Combinada fase orgânica foi concentrada em um evaporador rotatório e o sólido foi seco sob pressão reduzida. O produto identificado como (quercetina - CF₃) foi obtido com 90% de rendimento. P.f. 143-145 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆, TMS) δ [ppm] 6,17 (d, 1H, J = 2,0 Hz, C-6), 6,39 (d, 1H, J = 2,0 Hz, C-8), 6,87 (d, 1H, J = 8,3 Hz, C-5'), 7,53 (dd, 1H, J = 2,0, 8,3Hz, C-6'), 7,66 (d, 1H, J = 2,0 Hz, C-2'), 8,1 (s, 2H, C-3"e C-5"). ¹³C (DMSO-d₆,TMS) 93,8 (C-8), 98,6 (C-6), 103,5 (C-10), 115,5 (C-2'), 116,1 (C-5'), 120,4 (C-6'),122,1 (CF₃), 122,4 (C-1'), 126,8 (C-4"), 126,9 (C-3"e C-5"), 136,2 (C-3), 143,1(C-1"), 145,5 (C-3'), 147,3 (C-4'), 148,2 (C-2"e C-6"), 156,6 (C-9), 157,1 (C -2), 161,2 (C-5), 164,3 (C-7), 176,3 (C-4). m/z 575 (M + K), (575,00 calculadas para C₂₂H₁₁F₃N₂O₁₁K).

IX.2.3. Medidas de coeficiente de partição

Coefficientes de partição 1-Octanol/water (P) foram determinados a 25 °C, usando volumes iguais de água (2 mL) e 1-octanol (2 mL). Tipicamente, uma solução de cada flavonóide (~ 100 µM) foi agitada em um termostato após o equilíbrio ter sido alcançado (8h). Uma alíquota (200 µL) das fases aquosa e orgânica foram dissolvidas em 2 mL de metanol e concentração final dos flavonóides foi determinada por espectroscopia de absorção (SCALISE & DURANTINI, 2004).

IX.2.4. Microorganismos e condições de crescimento

As linhagens de *C. albicans* PC31, recuperadas de lesão de pele humana, foram previamente caracterizadas e identificadas de acordo com os procedimentos convencionais (CORMICK *et al.*, 2008; CORMICK *et al.*, 2009). A classificação preliminar das colônias das placas foi baseada nas características de colônias (pigmentação e forma), o modo de reprodução vegetativa, formação de pseudo-hifas e produção ascoporos. Identificação dos isolados de leveduras ao nível de espécie foi feita usando a API20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), sistema de perfis de assimilação de carboidratos. A cepa de *C. albicans* foi cultivada em condições aeróbias durante a noite em caldo Sabouraud (4 mL) (Britania, Buenos Aires, Argentina) a 37 °C em fase estacionária. Células viáveis de *C. albicans* foram monitoradas e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado em placas de agar Sabouraud em ~ 48h de incubação a 37 °C. Este procedimento produz ~ 107 UFC / mL após uma incubação durante a noite.

IX.2.5. Atividade antifúngica

Após a incubação durante a noite, as células foram diluídas conforme necessário para obter ~ 10⁴ UFC /mL em caldo Sabouraud. Em todos os experimentos, 2 mL das suspensões de células em tubos tipo pirex cultura (13x100 mm) foram utilizados e os derivados de flavonóides foram adicionados a partir de uma solução de ~ 10 mg / mL em DMF:água (1:1). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de derivados de flavonóide que inibe o crescimento visível do *C. albicans* após 48 h de incubação a 37 °C (faixa de 0,06-2,50 mg / mL). Assim, nenhuma turbidez após a incubação, é indicativo de inibição de crescimento. Antes dos ensaios, verificou-se que o carregamento de solvente N,N-dimetilformamida: água (1:1), foi completamente inativo contra os microrganismos testados nas condições do ensaio. Além disso, experimentos de controle foram realizados sob as mesmas condições na ausência de extratos. Cada experimento foi repetido três vezes em separado.

IX.2.6. Efeito sobre o crescimento de *C. albicans*

As culturas de células de *C. albicans* foram cultivadas durante a noite, como descrito acima. Uma porção (1 mL) desta cultura foi transferida para 20 mL de meio fresco caldo Sabouraud. A suspensão foi homogeneizada e alíquotas de 2 mL foram incubadas com diferentes concentrações dos derivados dos flavonóides, a 37 °C. A cultura cultivada foi medida pela turvação a 660 nm usando um espectrofotômetro Tuner SP-830. Em todos os casos, experimentos de controle foram realizados na ausência dos extratos. Cada experimento foi repetido três vezes em separado.

IX.2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de cada grupo. Variação entre os grupos foi avaliada utilizando o teste t de Student, com nível de confiança de 95% (p<0,05), considerado estatisticamente significativo.

IX.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IX.3.1. Síntese

A quercetina-CF₃ tem um grupo trifluorometila altamente lipofílico, o que aumenta o caráter anfifílico da estrutura (LAZZERI & DURANTINI, 2003). A influência do grupo trifluorometila nas moléculas biologicamente ativas é freqüentemente associada com o aumento da lipofilicidade que este substituinte tem (MCCLINTON & MCCLINTON, 1992; ANDO & KUMADAKI 1999).

O produto foi purificado por CLAE. Como era esperado para a sua lipofilicidade, o tempo de retenção (tR) do composto quercetina-CF₃ (TR = 18 min) foi maior do que a rutina (TR = 5 min). Estudos espectroscópicos de RMN confirmam a estrutura proposta (**Figura 154**). A comparação dos espectros de ¹H RMN (em DMSO-d₆) de rutina e quercetina-CF₃ mostra que os sinais na região de 7,5-7,6 ppm de rutina, correspondendo os prótons orto e do grupo hidroxila no anel de benzeno, sofrem uma separação no composto quercetina-CF₃, conforme definido por dois sinais, um em 7,5 ppm e outro em 7,7 ppm, o efeito do substituinte. Os espectros de COSY e HMQC foram registrados para estabelecer a atribuição específica dos hidrogênios. Ele também observa o desaparecimento dos sinais correspondentes aos açúcares da rutina e da emergência de um novo sinal em 8,1 ppm, que está correlacionada com os hidrogênios do substrato contendo o grupo CF₃.

Para avaliar o efeito produzido pela distribuição dos grupos de polaridade diferente sobre a polaridade intramolecular, os momentos de dipolo das porfirinas foram estimados. O método semi-empírico para a modelagem molecular (AM1) foi utilizado nos cálculos de otimização de geometria (**Figura 154**). Um valor de 5,2 D foi encontrada para quercetina-CF₃. Esse valor é maior que a encontrada para a rutina correspondentes derivados, sem substituição por grupos amino (3,8 D). Como esperado, a presença de um grupo lipofílico na periferia da estrutura quercetina melhora o momento de dipolo. A combinação de substituintes hidrofóbicos e hidrofílicos nos resultados da estrutura molecular de um eixo de polarização intramoleculares, o que pode facilitar a penetração da membrana produzindo uma melhor acumulação em compartimentos celulares, melhorando a eficácia do agente antifúngico.

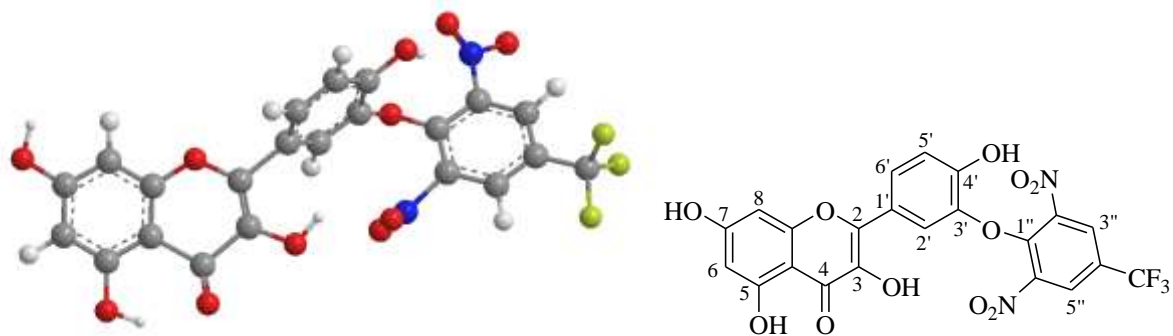


Figura 154. Estrutura do derivado quercetina-CF₃

IX.3.2. Estudos de absorção UV-visível e propriedades lipofílicas

O espectro de absorção UV-visível da rutina e quercetina-CF₃ em metanol foram comparados na **Figura 155**. Os derivados de flavonóides mostra a típica banda I que cerca de 370 nm e banda II a 260 nm, de acordo com a estrutura molecular. Máximo comprimento de onda da banda I derivados de quercetina-CF₃ apresenta uma mudança batocrômica de ~ 12 nm em relação a rutina. Comportamento semelhante foi observado anteriormente para a quercetina em diferentes meios (LE NEST *et al.*, 2004).

Os coeficientes de partição n-octanol/água (P) de flavonóides foram avaliados a temperatura de 25 °C ($P = \frac{[\text{porfirina}]_o}{[\text{porfirina}]_w}$). Como pode ser observado na **Tabela 22**, os resultados indicam que o caráter lipofílico aumentou na estrutura da quercetina-CF₃ em relação a rutina, devido à presença de um grupo trifluorometila (LAZZERI & DURANTINI, 2003).

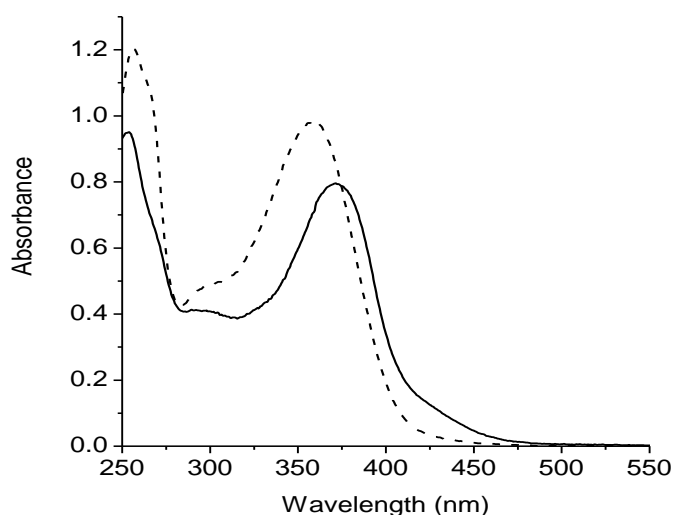


Figura 155. Espectro de absorção de quercetina-DNF-CF₃ (linha sólida) e rutina (linha pontilhada) em metanol.

Tabela 22. Características de absorção no UV-visível em metanol e 1-octanol/água coeficientes de partição (*P*) de rutina e quercetina-CF₃.

Compostos	λ (nm) (ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ (nm) (ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹)	log <i>P</i>
rutina	256 (14100)	360 (12200)	0.31
quercetina-CF ₃	254 (18800)	372 (17100)	0.62

IX.3.3. Atividade antimicrobiana de rutina e quercetina-DNF-CF₃ sobre *C. albicans*

A atividade biológica dos flavonóides foi investigada em suspensão celular de *C. albicans* em meio de Sabouraud. Os extratos foram avaliados em uma faixa de 0,060-2,5 mg / mL. A atividade antimicrobiana sobre *C. albicans* estão resumidos na **Tabela 23**. A partir desses resultados, os valores de CIM de $2,20 \pm 0,10$ e $0,60 \pm 0,10$ mg / mL foram calculados para rutina e quercetina-DNF-CF₃, respectivamente. Como pode ser observado, quercetina-CF₃ mostrou uma cerca de 4 vezes maior atividade antifúngica de rutina.

Tendo em conta estes resultados, o decaimento no crescimento de culturas de *C. albicans* produzido por flavonóides foi realizada em meio de Sabouraud. Assim, diferentes quantidades de flavonóides foram adicionadas às culturas frescas de *C. albicans*, atingindo a fase de registro e os frascos foram incubados a 37 °C. Três concentrações de rutina e

quercetina-CF₃, que vão acima e abaixo dos valores de CIM, foram analisadas sob estas condições. Como pode ser observado na **Figura 156**, o crescimento foi suprimida quando as culturas de *C. albicans* foram tratados com ambos os extratos com concentração idêntica ou superior à CIM. Após 30 minutos de incubação na presença de 2,2 ou 2,5 mg / mL de rutina, as células não mais parecia estar a crescer como medido pela turbidez em 660 nm. Sob essas condições, o efeito da quercetina-DNF-CF₃ foi mais eficiente do que a rutina, porque era eficaz entre 0,6-0,7 mg / mL. Por outro lado, as células de *C. albicans* incubadas com uma menor concentração de flavonóides (sob o valor de CIM) demonstrou apenas um pequeno atraso de crescimento em comparação com os controles. Sob essa condição, da fase de latência foi aumentada em relação ao controle. Portanto, acima do MIC, o crescimento não ocorreu, e em concentrações no âmbito do MIC, o crescimento ocorreu, mas comum a fase de latência prolongado. Estes dados mostram que o atraso de crescimento observado é devido ao efeito antimicrobiano da quercetina-CF₃ sobre as células *C.albicans*.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que uma maior atividade antifúngica é produzida pela quercetina-DNF-CF₃ em comparação com a exercida pela rutina. Além disso, compostos quercetina-CF₃ tem um maior valor de log P. Em estudos anteriores, observou-se que a glicosilação de quercetina reduziu a atividade vasodilatadora (CHEN *et al.*, 2004). Em geral, nesse tipo de compostos, uma forte atividade biológica é acompanhada por um aumento dos valores de log P.

Tabela 23. Atividade antifúngica dos flavonóides sobre *C. albicans*

Compostos	Concentração (mg/mL)												
	2.50	2.20	2.10	1.90	1.60	1.30	1.25	0.60	0.50	0.40	0.30	0.15	0.06
rutina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
quercetina-CF ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(+): inibição de crescimento visível, (-): sem inibição

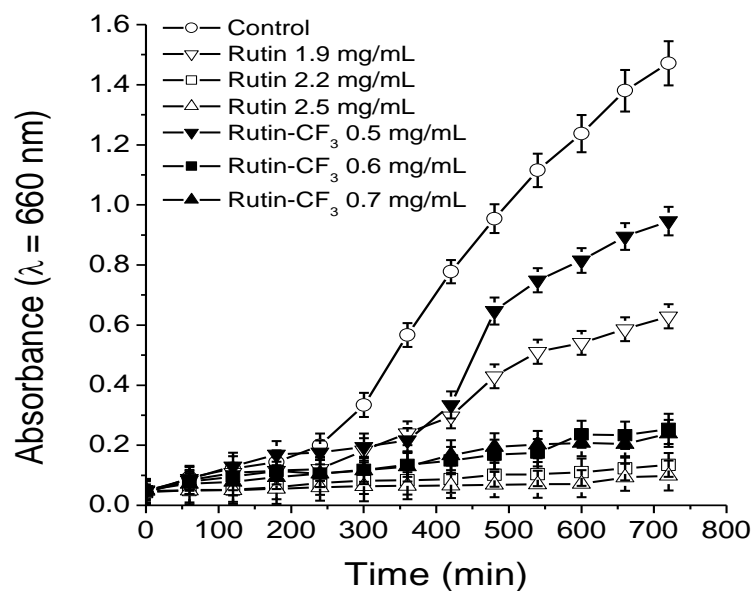


Figura 156. Curva de decaimento do crescimento de células de *C. albicans* incubadas com diferentes concentrações de rutina [(▽) 1.9 mg/mL, (□) 2.2 mg/mL, (△) 2.5 mg/mL] e quercetina-CF₃ [(▼) 0.5 mg/mL, (■) 0.6 mg/mL and (▲) 0.7 mg/mL] em caldo Sabouraud a 37 °C. Controle de culturas: células sem adição de flavonóides (○). Valores representados média±desvio padrão de três experimentos em separado.

X. CONCLUSÕES

O estudo químico da casca do caule de *Piptadenia gonoacantha* resultou no isolamento de sete triterpenos, sendo quatro cicloartanos, um friedelano e dois lupanos, além de três esteróides. Os cicloartanos estão sendo registrados pela primeira vez neste gênero.

O estudo químico da raiz de *Piptadenia gonoacantha* conduziu ao isolamento de três isoflavonas, novas na família Fabaceae, além de um triterpeno cicloartano e um lupano.

Já o estudo químico das folhas de *Piptadenia rigida* resultou no isolamento de um monoterpreno, um álcool de cadeia longa insaturado, além de dois poliprenóides. Já as sementes desta mesma espécie revelaram a presença de um triacilglicerol, ácidos graxos saturados e insaturados, além de um alcalóide com esqueleto indólico e um carboidrato.

O estudo do óleo das folhas de *P. rigida* e *P. gonoacantha* por extração por fluido supercrítico, em determinadas condições revelou a presença de um poderoso agente antifúngico contra patógenos de plantas.

A extração com fluido supercrítico se mostrou uma técnica bem eficaz na extração do óleo de *Piptadenia rigida* e *Piptadenia gonoacantha* apresentando rendimentos de extração superiores aos obtidos por técnicas convencionais, como a hidrodestilação. Os melhores rendimentos na extração de óleo das folhas de *P. rigida* foram obtidos nas condições operacionais de 60 °C e 200 bar, sendo o rendimento de 0,73%. Já para as folhas de *P. gonoacantha* o melhor rendimento foi de 1,31% obtido a 80 °C e 200 bar.

Considerando as propriedades do componente mais abundante nos extratos em fluido supercrítico e as aplicações de folhas de *piptadenia rigida* como inseticida, estudos adicionais serão realizados pelo grupo.

Os resultados do ensaio antibacteriano das frações do extrato metanólico da raiz de *Piptadenia gonoacantha* apresentaram bom potencial contra as cepas testadas, principalmente as cepas Gram-positivas. Sendo que, na busca de novas drogas, estas frações podem ser consideradas em estudos futuros como potenciais agentes antimicrobianos. O potencial antibacteriano elevado nas frações da partição acetato do extrato metanólico da raiz pode estar relacionado ao alto teor de fenóis totais e taninos, descritos na literatura com fortes agentes antimicrobianos.

Quando comparado com outras espécies de plantas da literatura, os teores de fenóis totais e taninos das frações polares dos extratos metanólicos das espécies *P. rigida* e *P. gonoacantha* foram elevados. Principalmente considerando que na raiz se encontra o maior

teor destes constituintes fenólicos, bem como que o gênero *Piptadenia* se encontra descrito na literatura com ricos na quantidade destes metabólitos.

A síntese de um novo derivado a partir da rutina contendo um grupo 3'-dinitro-feniltlfluorometil, conferiu ao produto um potencial antifúngico contra *Candida albicans* consideravelmente superior ao da rutina.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLUIS, B.; PÉROL, N.; EL HAJJÍ, H.; DANGLES, O. Water-soluble flavonol (= 3-hidroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: chemical synthesis, colouring and antioxidant properties. *Helv. Chim. Acta* 83: 428-443. **2000**.

ALVES, N.I.; GOMES, M.S.; CARVALHO, M.G.; CARVALHO, A.G. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de 5-H flavanona e 5-H-flavonol isolados de Leguminosae. *Revista Universidade Rural, Serie Ciências Exatas e da Terra*, v. 22, n.1-2, p. 81-87. **2003**.

ANDO, A.; KUMADAKI, I. Progress on the syntheses of fluorine analogs of natural porphyrins potentially useful for the diagnosis and therapy of certain cancers. *J Fluor Chem* 100:135-146. **1999**.

BARROSO, G. M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Universitária, v.2. **1991**.
BASIL, A.J.; STRAP, J.L.; KNOTEK-SMITH, H.M.; CRAWFORD, D.L. Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). *J Ind Microbiol Biotechnol*; 31(6):278-288. **2004**.

BENELLI, P.; RIEHL, C.A.S.; SMÂNIA JR., A.; SMÂNIA, E.F.A.; FERREIRA, S.R.S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *J. of Supercritical Fluids*. v. 55, p. 132-141, **2010**.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594, **2009**.

BRAITMAIER, E., VOELTER, N. *Carbon 13 – NMR Spectroscopy, High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. 3 ed., V.C.H. publishers, Weinheim, pg 401, **1987**.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Química Nova*, v. 17, n. 5, 405-445, **1994**.

BRIONA, L.P.; UKOA, S.E.; GOLMANB, D.L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. *J Infection* 54:521-529. **2007**.

BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; OLIVEIRA, K.D.; CERQUEIRA, V.D. Estudos experimentais em coelhos com plantas cianogênicas. *Pesq. Vet. Bras.* 20, (2): 65-70. **2000**.

BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, **1991**.

BRUNNER, G. *Gas Extraction: Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process*. Steikopff Darmstadt. New York, Springer, v. 4, p. 387, **1994**.

BULHÕES, G.D.C.; DA MOTA E SILVA A.; MARQUES DE SA, M.A.; Phytochemical screening of plants native to northeastern Brazil, II., *Anais da Faculdade de Farmacia, Universidade Federal de Pernambuco*, v.15, p. 39-44. **1976**.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R.A.; RAE, G.A.; MEDEIROS, Y.S. In Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research; R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, p. 88, **1990**.

CAMEL, V. "Supercritical Fluid Extraction as a Useful Method for Pesticides Determination". *Analisis Magazine*. v. 26, p. M99, **1998**.

CAMPOS, F.F., ROSA, L.H.; COTA, B.B.; CALIGIORNE, R.B.; RABELLO, A.L.T.; ALVES, T.M.A.; ROSA, C. A.; ZANI, C.L. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Negl Trop Dis*, v.3(1). **2009**.

CARDOZO, M.A.R. Metabólitos especiais isolados de galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e de flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2006**.

CARVALHO, M.G. de; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M.C.C., *In: Recent Progress in Medicinal Plants*, Govil, JN (Ed), Centre Res. Books (Org) New Dehli, v. 8, **2001**.

CARVALHO, M.G. de; HAUPTLI, M.B.; ALMEIDA, M.E.; MELEIRO, L.A.C. Triterpenos Isolados de *Eschweilera rabeliana* Mers (Lecitidaceae), *Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Exatas e da Terra*, v.17, p. 33-36, **1995**.

CARVALHO, M.G.; CARDOZO, M.A.R.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; CARVALHO, A.G. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(3): 561-567. **2010**.

CARVALHO, M.G.; GOMES, M.S.R.; OLIVEIRA, M.C.C.; SILVA, C.J.; CARVALHO, A.G. Chemical constituents from *Piptadenia rígida* Benth., Fabaceae, "angico". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *in press*. **2011**.

CECHINEL FILHO, V. Tese de Doutorado em Química, UFSC, Florianópolis, SC, **1995**.

CHEN, Z.; HU, Y.; WU, H.; JIANG, H. Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3949-3952. **2004**.

CHUNG, K.T.; WEI, C.I.; JOHNSON, M.G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Nutr.* 9, 168–175. **1998**.

CORMICK, M.P., ROVERA, M., DURANTINI, E.N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J Photochem Photobiol A: Chem* 194: 220-229. **2008**.

CORMICK, M.P.; ALVAREZ, M.P.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem* 44: 1592-1599. **2009**.

CORRÊA, A.G. Taxol: Da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, 18, 5, 460-467, **1995**.

CORREA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil; e das exóticas cultivadas*. RJ, I. Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, **1984**.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste, Editora da UFC: Fortaleza, **1981**.

CRONQUIST, A. *An Integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University. 1291. **1981**.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26:343-356. **2005**.

D'ALCONTRES, G.S.; CUZZODREA, G. Active principles of *Piptadenia peregrina*. *Atti.Soc.Peloritana sci.fis.mat. e nat.* v. 1956-1957, n. 3, p. 166-167. **1957**.

DAVIES, N.W.; MILLER, J.M.; NAIDU, R.; SOTHEESWARAN, S. Triterpenoids in bud exudates of Fijian *Gardenia* species. *Phytochemistry*, 31, 159-162, **1992**.

DEFORGE, A.; MAHEU, J.; DE BALSAC, F.H. Tenniferous Barks of Madagascar. VII. "Fany" bark (*Piptadenia chrysostachys* Benth). *Halle aux Cuirs*, p. 309-314. **1929**.

DELAVEAU, P. New possibilities in medicinal plants. *Products pharmaceutical*. v.15, p. 479-488. **1960**.

DELGOBO, C.L.; GORIN, A.J.; TISCHER, C.A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera columbrina*) gum exude: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. *Carbohydrate Research*., v. 320, p. 167-175. **1999**.

DELGOBO, C.L.; GORIN, A.J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera columbrina*. *Phytochemistry*. v. 47, n. 7, p. 1207-1214. **1997**.

DENG, S.; CHEN, S.; YAO, P.; NIKOLIC, D.; BREEMEN, R.B.V.; BOLTON, J.L.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; PAULI, G.F. Serotonergic Activity-Guided Phytochemical Investigation of the Roots of *Angelica sinensis*. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 536-541, **2006**.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R.L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 69-77. **1999**.

DI STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.M. *Fabales medicinais*. In DI STASI, L.C. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2ª edi. rev. e ampl. São Paulo:Editora UNESP. 604 p. **2002**.

DOMINGUEZ; A X.; Metodos de investigacion fitoquímica, México, Ed Limusa, p. 139, 149, 211, **1973**.

DUTHIE, S.J.; DOBSON, V.L. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *Eur J Nutr* 38:28-34. **1999**.

ERLUND, I.; KOSONEN, T.; ALFTHAN, G.; MAENPAA, J.; PERTTUNEN, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEN, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J Clin Pharmac* 56:545-553. **2000**.

FEITOSA, C.M.; BEZERRA, M.Z.B.; CITÓ, A.M.G.L.; COSTA-JÚNIO, J.S.; LOPES, J.A.D.; MOITA-NETO, J.M. Constituintes químicos de *Philodendron imbe* Schott. *Quim. Nova*. 30 (1), 41-44, **2007**.

FELLOWS, L.E.; BELL, E.A. Indole metabolism in *Piptadenia peregrina*. *Phytochemistry*, (10), 2083-2091, **1971**.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *J. of Supercritical Fluids*. v. 14, p. 235-245, **1999**.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21 (1), 99-105, **1998**.

FISH, M.S.; JOHNSON, N.M.; HORNING, E.C. *Piptadenia* alkaloids. Índole bases of *Piptadenia peregrina* and related species. *Journal of the American Chemical Society*, v. 77, p. 5892-5895. **1955**.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *The Journal of Biological Chemistry*, v.XII, n. 2, 239-243, **1912**.

GACHET, M.S.; LECARO, J.S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H.; MUNOZ, R.A.; BAUER, R.; SCHUHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 184–197. **2010**.

GALEGOS, R.S.; ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Química Nova*, 13 (4), 278-281, **1990**.

GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 116–121. **2010**.

GIESBRECHT, A.M. Bufotenine occurrence in *Piptadenia falcate* seeds. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v. 19, p. 117-119. **1960**.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 338–347. **2007**.

GOLDMAN, G.H.; DA SILVA FERREIRA, M.E.; DOS REIS MARQUES, E.; SAVOLDI, M.; PERLIN, D.; PARK, S.; GODOY MARTINEZ, P.C.; GOLDMAN, M.H.S.; COLOMBO, A.L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Micr Infec Dis* 50:25-32. **2004**.

GOODMAN, R.A.; OLDFIELD, E.; ALLERHAND, A. Assignments in the natural-abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of chlorophyll a and a study of segmental motion in neat phytol. *J. Am. Chem. Soc.* 95 (23), 7553-7558. **1973**.

GOMES, M.S. Constituintes Químicos Isolados da Raíz de *Piptadenia rígida* (Leguminosae-Mimosoideae). Dissertação PPGQ-ICE-UFRuralRJ. Seropédica, R.J. Brasil, **2002**.

GONÇALVES, C.A.; LELIS, R.C.C. Teores de taninos de casca e da madeira de cinco Leguminosas arbóreas. *Floresta e ambiente*, v. 8, n. 1, p. 167-173. **2001**.

GRANIER – DOYEUX, M. *Native hallucinogenic groups piptadenias*. **1965**.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* 56:683-687. **2001**.

HARBORNE, J.B. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Ed. Academic press Inc. (London) LTD. **1971**.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem* 55:481-504. **2000**.

HELDT, H. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, University Press: Oxford, **1997**.

HENKER, G.A.; HUSTON, M.J. Yopo, a south American Snuff, *Canadian Pharmaceutical Journal*, v. 83, n. 18, p. 8-9. **1950**.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*. v. 98, p. 136–148, **2006**.

HOFFMANN, H.; MATUSCH, R.; BANIAHMAD, A. Isolation of N-butylbenzenesulfonamide, synthesis of benzenesulfonamide derivatives, and use of n-butylbenzenesulfonamide and benzenesulfonamide derivatives for the treatment of benign prostate hyperplasia and/or prostate carcinoma. Ger., Chemical Indexing Equivalent, 27pp. **2008**.

HUANG, H.; JIA, Q.; MA, J.; QIN, G.; CHEN, Y.; XI, Y.; LIN, .;L, ZHU, W.; DING, J.; JIANG, H.; LIU, H. Discovering novel quercetin-3-O-amino acid-esters as a new class of Src tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 44:1982-1988. **2009a**.

HUANG, Z.; HASHIDA, K.; MAKINO, R.; KAWAMURA, F.; SHIMIZU, K.; KONDO, R.; OHARA, S. Evaluation of biological activities of extracts from 22 African tropical wood species. *J Wood Sci*, 55:225–229. **2009b**.

IACOBUCCI, G.A.; RUVEDA, E.A.; Bases derived from tryptamine in Argentine *Piptadenia* species. *Phytochemistry*, v. 3, n. 3, p. 465-467. **1964**.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3229–3256. **2009**.

KILKUSKIE, R.E.; KASHIWADA, Y., NONAKA, G., NISHIOKA, I.; BODNER, A.J.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2, 1529–1534. **1992**.

KIM, K.K.; KANG, J.G.; MOON, S.S.; KANG, K.Y. Isolation and identification of antifungal N-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. *The Journal of Antibiotics*. v. 53, n. 2, p. 131-136, **2000**.

KINGSTON, D.G.I. Taxol, an exciting anticancer drug from *taxus brevifolia* in human medicinal agents from plants. Eds. Kinghor, A. D and Balandrin, M. F. Washington – D.C. American Chemical Society Publications, 138-148, **1993**.

KLAYMAN, D.L. *Artemisia annua* – from weed to respectable antimalarial plant in human medicinal agents from plants. Eds. Kinghor, A. D and Balandrin, M. F. Washington – D.C. American Chemical Society Publications, 242-255, **1993**.

LAZZERI, D.; DURANTINI, E.N. Synthesis of *meso*-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. *Arkivox* 10:227-239. **2003**.

LE NEST, G.; CAILLE, O.; WOULDSTRA, M.; ROCHE, S.; GUERLESQUIN, F.; LEXA, D. Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorg Chim Acta* 357:775-784. **2004**.

LEGLER, G.; TSCHESCHE, R. The isolation of N-methyltryptamine, 5-methoxy-N-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine from the bark of *Piptadenia peregrina*. *Naturwissenschaften*, v. 50, p. 94-95. **1963**.

LIANDA, R.L.P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Tese de doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2009**.

LORENZI, H. *Arvores Brasileiras*, Vol. 01 – Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brasil, 4ª Ed. **2002**.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*. Vol-01. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 384 p. **1992**.

LUNZ, A.M. Prospecção fitoquímica e susceptibilidade da madeira de 4 essências arbóreas a Scolytidae coleóptera em duas formações florestais. Tesis, Instituto de Agronomia, curso de pós-graduação em fitotécnia-fitosanidade. UFRuralRJ, **2004**.

MABBERLEY, D. J. *The plant book*. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 858p. **1997**.

MAGALHÃES, S. P.; SILVA, C. F.; MENDES, M. F.; QUEIROZ, E. M.; PESSOA, F. L. P. Obtenção do óleo essencial da rosa mosqueta com CO₂ supercrítico: estudo experimental e teórico. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. **2005**

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGERAT, F.; RÉMÉSY, C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 409:12-16. **1997**.

MARTINEZ, J.; ROSA, P.T.V.; MENUT, C.; LEYDET, A.; BRAT, P.; PALLET, D.; MEIRELES, M.A.A. Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L) nash of small) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 6578-6584, **2004**.

MATOS, F.J.A. *Rev Extensão-Desafio* (UFC), 3, 5-13, **1990**.

MATOS; F.J.A; *Introdução a fitoquímica experimental*, Fortaleza, Ed. Edições UFC, p.121, **1988**.

MAULUDIN, R.; MULEER, R.H.; KECK, C.M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *Int J Pharm* 370:202-209. **2009**.

MBOUANGOUERE, R. N.; TANE, P.; CHOUDHARY, M.I.; DJEMGOU, P.; NGADJUI, B.T.; NGAMGA, D. Piptadenol A-C e α -glucosidase inhibitor form *Piptadenia africana*. *Research Journal of Phitochemistry*, 2 (1) : 27-34. **2008**.

MBOUANGOUERE, R. N.; TANE, P.; NGAMGA, D.; DJEMGOU, P.; CHOUDHARY, M.I.; NGADJUI, B.T. Piptaderol from *Piptadenia africana*. *Afr. J. Trad. CAM*, 4 (3): 294 – 298. **2007**.

MCCLINTON, M.A.; MCCLINTON, D.A. Trifluoromethylations and related reactions in organic chemistry. *Tetrahedron* 48:6555-6666. **1992**.

MEIRELES, M.A.A., Supercritical extraction from solid: Process design data (2001-2003). *Current opinion in solid state materials science*. v. 7, p. 321-330, **2003**.

MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., orgs., Ed. UFSC: Porto Alegre, 3ª ed., **2001**.

MESIA, G.K.; TONA, G.L.; NANGA, T.H.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 115, p. 409–415. **2008**.

MEZZOMO, N. Óleo de amêndoa de pêssego: avaliação, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa

Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis-SC, Brasil, **2008**.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52:673-751. **2000**.

MILLER, R. A.; MILLER, I. A. A utilização ritual e a magia dos perfumes, Rio de Janeiro, Record, **1991**.

MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. Extractives of hardwood, IX, Extractives from hertwoos of *Piptadenia sp. Mokuzai gakkaiishi*, v. 22, n. 1, p. 47-50. **1976**.

MOLE, S.; ROGLER, J.C.; BUTLER, L.G. Growth reduction by dietary tannins: different effects due to different tannins. *Biochem Syst Ecol* 21:667-677. **1993**.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS-NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 173-186. **2006**.

MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; AMORIM, E.L.C. DE; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. DE; Teor de taninos de três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga, *Revista Árvore*, v. 29, n. 6, p. 999-1005, **2005**.

MOORE, S.; SAMDANI, S; ONDREY, G.; PARKINSON, G. New roles for Supercritical, Chem. Eng., March, p. 32-35, **1994**.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, v. 93, p. 189-197. **2004**.

MORIM, M.P. *Piptadenia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, available on <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB103167>. **2010**.

MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAJO, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett*, v. 269, p. 315-325. **2008**.

NING, Y.; GUAN, J.; YAN, D. Method for accurately and reliably determining content of tannins in folium callicarpae formosanae or its extract by spectrophotometry. *Faming Zhuanli Shenqing*, 16 pp, **2010**.

OHTSU, H.; TANAKA, R.; MICHIDA, T.; SHINGU, T.; MATSUNAGA, S. Tetracyclic tripterpenes and other constituents from the leaves and bark of *Larix kampferi*. *Phytochemistry* v. 49, n. 6, p. 1761-1768, **1998**.

OLIVEIRA, D.M.T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. *Revta brasil. Bot.*, v.22, n. 3, p. 413-427. **1999**.

PAES, J.B.; MORAIS, V.M.; LIMA, C.R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p. 135-144, **2002**.

PARIS, R.R.; SAINT-FIRMIN, A.; ETCHEPARE, S. Alkaloids and flavonoids of *Piptadenia peregrina* from Haiti. Absence of alkaloids in *Piptadenia africana*. *Annales Pharmaceutiques francaises*, v. 25, p. 7-8. **1967**.

PASCUAL, L.M; DANIELE, M.B; GIORDANO, W.; PÁJARO, M.C; BARBERIS, L. Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin 3 L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*. 56: 397-402. **2008a**.

PASCUAL, L.M; DANIELE, M.B; RUIZ, F.; GIORDANO, W.; PÁJARO, M.C; BARBERIS, L. "Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from human vagina" *Journal Gral. Applied Microbiolology*. 54(3):141-8, **2008b**.

PACHTER, I.J.; ZACHARIUS, D.E.; RIBEIRO, O.; Índole alkaloids of *Acer saccharinum* (silver maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrine*, and *Mimosa hostilitis*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 24, p. 1285-1287. **1959**.

PATEL, M.; COOGAN, M.M. Antifungal activity of the plant *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* from HIV-infected patients. *J. Ethnopharmacol*, v. 118, p. 173-176. **2008**.

PEDRIALI, C.A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. Dissertação de mestrado Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, São Paulo-SP, Brasil, **2005**.

PEREDA, M.D.C.V.; DIEMANT, G.C.; EBERLIN, S.; WERKA, R.M.; COLOMBI, D.; QUEIROZ, M.L.S.; DI STASI, L.C. Expression of differential genes involved in the maintenance of water balance in human skin by *Piptadenia colubrina* extract. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 9, p. 35–43. **2010**.

PEREIRA, A.P.; FERREIRA, I.C.; MARCELINO, F.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; **PEREIRA**, J.A. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, v. 12, p. 1153-1162. **2007**.

PEREIRA, C.G., GUALTIERI, I.P., MAIA, N.B., MEIRELES, M.A.A. Supercritical extraction to obtain vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) extracts from roots cultivated hydroponically. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 35, n. 2, p. 44–50, **2008b**.

PEREIRA, C.G., GUALTIERI, I.P., MEIRELES, M.A.A. Effect of different extraction processes on the recovery of extracts from *Achyrocline satureioides* D.C.: An evaluation of antioxidant activity. *Separation Science and Technology*, v. 43, p. 1549–1563, **2008a**.

- PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technol.* v. 3, p. 340–372, **2010**.
- PIACENTE, S.; BALDERRAMA, L.; DE TOMASSI, N.; MORALES, L.; VARGAS, L.; PIZZA, C. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 709-711. **1999**.
- PINTO, G.M.F.; PINTO, J.F.; JARDIM, I.C.S.F. Extração com Fluido Supercrítico. *Chemkeys. Licenciado sob Creative Commons (BY-NC-AS)*. **2006**. www.chemkeys.com.br.
- PRIMO, B.L. Tannin content of certain Brazilian vegetable products. *Anais Associação Química Brasileira.*, v. 4, p. 117-120. **1945**.
- QUEIROZ, A. C.; LIRA, D.P.; DIAS, T.L.M.F.; SOUZA, E.T.; MATTA, C.B.B.; AQUINO, A.B.; SILVA, L.H.A.C.; SILVA, D.J.C.; MELLA, E.A.C.; AGRA, M.F.; FILHO, J.M.B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 377–383. **2010**.
- RAMANANDRAIBE, V.; GRELLIER, P.; MARTIN, M.T.; DEVILLE, A.; JOYEAU, R.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; MOURAY, E.; RASOANAIVO, P.; MAMBU, L. Antiplasmodial phenolic compounds from *Piptadenia pervillei*. *Planta Med.* v. 74, n. 4, p. 417-21, **2008**.
- RAMOS, L.M. Obtenção do alcalóide indólico bufotenina de sementes de *Anadenanthera* sp (Fabaceae: Mimosideae) do bioma Cerrado e sua utilização para síntese de substâncias bioativas. Dissertação PPGQ-IQ-UNB. Brasília, DF, Brasil, **2008**.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. Ed. Guanabara Koogan. 4ª ed. **2001**.
- RANGEL. J.L. Angico gum. *Revista de Química Industrial Rio de Janeiro*, v. 12, p. 16-18. **1943**.
- RAYMOND-HAMET. Sur quelques propriétés physiologiques d'un excitant Sud-Américain: le *Piptaenia peregrina* Benth, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, v. 243, n. 5, p. 512-514. **1956**.
- READEL, K.; SEIGLER, D.S.; HWANG, K.; KEESY, J.; SEILHEIMER, S. Tannins from mimosoid legumes of Texas and Mexico. *Economic Botany* 55(2), 212-222. **2001**.
- RENDON, P.; WILLY, J. Isolation of bufotenine from seeds of the *Piptadenia macrocarpa* Benth, *Revista Boliviana de Química*, v. 5, n. 1, p. 39-43. **1985**.
- REVERCHON, E.; Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. of Supercritical fluids*. v. 10, p. 1-37, **1997**.
- REYMENT, R, JÖRESKOG, K.G., Applied factor analysis in the natural sciences, Editora, Cambridge University Press, Cambridge,UK, **1996**.

RIBEIRO, M.A.; RODRIGUES, C.P. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication? *Diagn Microb Infec Dis* v. 57, p. 71-75, **2007**.

RIZZINI, C.T. Manual de Dendrologia Brasileira –Árvores e madeiras Úteis do Brasil. Ed. Nacional. SP. **1998**.

RODRIGUES, V.M., SOUSA, E.M.B., MONTEIRO, A.R., CHIAVONE-FILHO, O., MARQUES, M.O.M. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: A pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 22, p. 21–36, **2002**.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; DE LA ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*, v. 48, p. 601-606, **2003**.

RUBINSTEIN, I.; GOAD, L. J.; CLAGUE, A. D. H.; MULHEIRN, L. J. The 220 MHz NMR spectra of Phytosterols, *Phytochemistry*, v. 15, p. 195-200, **1976**.

SANT'ANA, A. E. G. Em Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. ARAÚJO, E. L., MOURA, A. N., SAMPAIO, E. S. B.; GESTRINARI, L. M. S., CARNEIRO, J. M. T., eds., Imprensa Universitária: UFRPE, Recife, **2002**.

SANT'ANA, L. D. Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas e avaliação da capacidade antioxidante de méis de *Apis mellifera* comercializados no estado do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2010**.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, **1991**.

SCALISE, I.; DURANTINI, E.N. Photodynamic effect of metallo 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-methylphenyl) porphyrins in biomimetic media. *J Photochem Photobiol A: Chem*, v. 162, p. 105-113, **2004**.

SCHMIDT, C.A.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B.; LAUFER, S.A.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol.*, v. 122, p. 523-532, **2009**.

SCHMIDT, C.A.; MURILLO, R.; BRUHN, T.; BRINGMANN, G.; GOETTERT, M.; HEINZMANN, B.; BRECHT, V.; LAUFER, S.A.; MERFORT, I. Catechin Derivatives from *Parapiptadenia rigida* with *in Vitro* Wound-Healing Properties. *J. Nat. Prod.*, v. 73, p. 2035–2041, **2010**.

SCHNEIDER, H.S. Angico gum. *Revista de Química industrial Rio de Janeiro*, v. 6, p. 286-290. **1937**.

SEIGLER, D.S.; SEILHEIMER, S.; KEESY, J; HUANG, H.F. Tannins from four common *Acacia* Species of Texas and Northeastern Mexico. *Economy Botany*, v. 40, n. 2, p. 220-232, **1986**.

SHEN, J.; XU, J.; HU, J.; CHENG, Y.; QU, H. Determination of tannins in *Radix salvia miltiorrhiza* with phosphomolybdenum tungstic acid-casein reaction. *Fenxi Huaxue*, v. 36, n. 4, p. 553-555, **2008**.

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

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA JR., O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of antiinflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharm.* v. 66, p. 57-69, **1999**.

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

SILVA, I.V.; FERREIRA, M.S.; WARDELEY, A.G.; FERNANDES, M.J.; SOARES, L. A. L.; de SOUZA, T.P. Influence of extractive parameters on the preparation of a solution from *Psidium guajava* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 1, p. 116-120, **2009**.

SILVA, L.V., CONSTANCIO, S.C.M., MENDES, M.F., COELHO, G.L.V. Extração do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, **2005a**.

SILVA, M.S.S.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H.; LOPES, J.A.D. Triterpenóides tipo cicloartano de propolis de Teresina-PI. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 801, **2005b**.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN ¹³C. Fortaleza Expressão Gráfica e Editora, 216p., **2005**.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, Ed. Universidade UFRGS e Ed. Da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, **1999**.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J., "Principles of Instrumental Analysis", 4th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, p. 670-671, **1995**.

SOBRINHO, D.C.; HAUPTLI, M.B.; APOLINÁRIO E.V.; KOLLENZ, C.L.M.; GERALDO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated From *Parahancornia amapa*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 2, n. 1, p. 15-20, **1991**.

SOUSA, C.M. de M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C. L.S. da; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B. de M.;

BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, **2007**.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; VON-POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 135–143, **2004**.

STROMBERG, V.L. The isolation of bufotenine from *Piptadenia peregrina*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, p. 1707. **1954**.

STUART, I.A.; MACLACHLAN, J.; MCNAUGHTAN, A., “Compounds of agricultural significance using environmental analytical supercritical fluid extraction”. *Analyst*. v. 11R, p. 121, **1996**.

SUNG, P.J.; CHEN, B.Y.; CHEN, Y.H.; CHIANG, M.Y.; LIN, M.R. Loliolide: Occurrence of a carotenoid metabolite in the octocoral *Briareum excavatum* (Briareidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 38, p. 116-118, **2010**.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. Compêndio de Fitoterapia, 2a. ed., Herbarium Lab. Botânico, Curitiba, Paraná, **1995**.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*, v. 40, p. 1635–1660, **2002**.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U.W.; ADSERSEN, A.; CHRISTENSEN, S.B.; SITTE, A.; NYMAN, U.; NIELSEN, C.; OLSEN, C.E. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J Nat Prod*, v. 60, p. 739-742, **1997**.

VARGAS, C.E. Extração supercrítica do óleo essencial do Abajeru (*Chrysobalanus icaco*). Dissertação de mestrado Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, **2005**.

VARGAS, C.E.; MENDES, M.F.; AZEVEDO, D.A.; PESSOA, F.L.P.; ULLER, A.C. Extraction of the essential oil of abajeru (*Chrysobalanus icaco*) using supercritical CO₂. *J. of Supercritical Fluids*. v. 54, p. 171–177, **2010**.

VELANDIA, J.R.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A.A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semisserrata*, *Phytochemical Analysis*, v.13, p. 283-292, **2002**.

VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L., *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-820, **2007**.

VIANNA, C.A.F.J. Substâncias fenólicas e avaliação da atividade antioxidante em méis de *Apis mellifera*. Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2010**.

WACHTER G.A, HOFFMANN, J.J.; FURBACHER, T.; BLAKE, M.E.; TIMMERMANN, B.N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem*, v. 52, p. 1469-1471, **1999**.

WANG, J.; XIAO, T.; ZHAO, Y.; ZHANG, J.; XIAO, X. Comparative study of determination of tannins in rhubarb by spectrophotometry and absorbed mass analysis. *Zhongguo Xinyao Zazhi*. v. 18, n. 14, p. 1369-1371, **2009**.

WENQIANG, G.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*. v. 101, p. 1558-1564, **2007**.

WHITE, T.C; HOLLEMAN, S; DY, F.; MIRELS, L.F.; STEVENS, D.A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 1704-1713, **2002**.

www.qmc.ufsc.br/organica/exp7/solido.html

XIE, K.; TANG, L.; ZHANG, W.; PIAO, X.; LOU, C.; CUI, J. Determination of tannin content in traditional Mongolian drug Agei before and after processing with phosphomolybdenum tungstic acid/casein method. *Zhongyaocai*, v. 32, n. 10, p. 1517-1519, **2009**.

YAMASATO, S.; KAWANISHI, K.; KATO, A.; HASHIMOTO, Y. Organic bases from Brazilian *Piptadenia* species. *Phytochemistry*, v. 11, n. 2, p. 737-739. **1972**.

YONGMOON, H. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Inter. Immunopharmacol*, v. 9, p. 207-211, **2009**.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. ARGOS editora, **2001**.

ZELADA, F.; CONI, H. Contribution to the study of *Piptadenia cebil*. Tese, Univesidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. 72 p. **1915**.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. ARTIGO PUBLICADO



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2010) 82(3): 561-567
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
ISSN 0001-3765
www.scielo.br/aabc

Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré)

MÁRIO G. DE CARVALHO¹, MARITZA A.R. CARDOZO¹,
FRANCISCO E.A. CATUNDA JUNIOR¹ and ACÁCIO G. DE CARVALHO²

¹Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
BR 465, km 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil

²Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
BR 465, km 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil

Manuscript received on February 4, 2009; accepted for publication on November 24, 2009

ABSTRACT

The phytochemical investigation of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae-Mimosoideae), commonly known as “pau jacaré” (alligator stick), afforded sitosterol, campesterol, stigmasterol, the N-benzoyl-phenylalanine-2-benzoylamide-3-phenylpropyl ester, known as asperphenamate, sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside, besides three flavonoids, apigenin, 5-O-methylapigenin and 7,4'-dihydroxy-3',5-dimethoxyflavone from its branches. From its leaves, the methyl gallate and two flavonoids, vitexin and isovitexin, were isolated. From its bark, a mixture of sitosterol, campesterol, and stigmasterol, besides a mixture of cycloartenone, cycloartan-25-en-3-one, and 24-methylene-cycloartenone, and the pure triterpenes 24-methylenecycloartanol, friedelin, lupeol and lupenone, were isolated. Their structures were established on the basis of spectral analysis, comparison with literature data and GC-MS analysis of the mixtures. The ester, flavonoids and the cycloartanes are been identified for first time in the genus *Piptadenia*.

Key words: Leguminosae, *Piptadenia gonoacantha*, terpenoids, asperphenamate, flavonoids, “pau jacaré”.

ANEXO 2. ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

2.1. Revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o artigo “Efeito protetor da acetamida sobre a intoxicação experimental por monofluoroacetato de sódio e plantas, de importância pecuária, que causam morte súbita em ratos”, de autoria de Tiago C. Peixoto, Laura Iglesias, Saulo A. Caldas, Francisco E.A. Catunda Junior, Mário G. Carvalho, Ticiania N. França e Paulo V. Peixoto, submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, foi aceito para publicação.

Seropédica/RJ, em 9 de fevereiro de 2011



Jürgen Döbereiner

Editor Pesq. Vet. Bras.

2.2. Revista “Medicinal Chemistry Research”

Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*

Tomas C. Tempesti^a, M. Gabriela Alvarez^a, Marcelo Francisco de Araújo^b, Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior^b, Mário Geraldo de Carvalho^b, Edgardo N. Durantini^{a,*}

^aDepartamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia Postal Nro 3, X5804BYA Río Cuarto, Argentina.

^bDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, 23890-000, Seropédica-RJ, Brazil.

Abstract

A novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group was synthesized by the nucleophilic aromatic substitution reaction between rutin and 2-chloro-5-(trifluoromethyl)-1,3-dinitrobenzene in basic medium. This synthetic quercetin showed antifungal activity against *Candida albicans* cultures. The results indicated a remarkable increase in the biological activity of this compound as compared to rutin.

Keywords: antifungal activity; flavonoid; rutin; quercetin; *Candida albicans*.

2.3. Revista “Electrochimica Acta”

Elsevier Editorial System(tm) for Electrochimica Acta
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: THE REDOX THERMODYNAMICS AND KINETICS OF FLAVONOID RUTIN ADSORBED AT GLASSY CARBON ELECTRODES BY STRIPPING SQUARE WAVE VOLTAMMETRY

Article Type: Research Paper

Keywords: flavonoids; rutin; cyclic voltammetry; square wave voltammetry; quasi-reversible maximum

Corresponding Author: Prof. Hector Fernandez, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad Nacional de Rio Cuarto

First Author: Francisco E Aragão Catunda Jr, Lic

Order of Authors: Francisco E Aragão Catunda Jr, Lic; Marcelo F De Araujo, Lic; Adrian M Granero, Dr. Fernando J Arévalo, Dr.; Mario G De Carvalho, Dr.; María A Zon, Dr.; Hector Fernandez, Ph.D.

Abstract: The adsorptive accumulation of rutin (RU) at glassy carbon (GC) electrodes in 10% ethanol + 90% 1 mol dm⁻³ HClO₄ aqueous solution is studied by using cyclic (CV) and square wave (SWV) voltammetries. The Frumkin adsorption isotherm best described the specific interaction of rutin with carbon electrodes. By fitting the experimental data, values of -31.9 kJ mol⁻¹ and 0.54±0.02 were obtained for the Gibbs free energy of adsorption and the interaction parameter, respectively. SWV fully characterized the thermodynamics and kinetics of the surface redox process, using a combination of the "quasi-reversible maximum" and the "splitting of SW peaks" methods. Average values of 0.644±0.003 V and 0.44±0.02 were obtained for the formal potential and the anodic transfer coefficient, respectively. Moreover, a formal rate constant of 609 s⁻¹ was obtained. SWV was also employed to generate calibration curves. The lowest concentration of RU was 2 x 10⁻⁸ mol dm⁻³ (12 ppb), measured for a signal to noise ratio of 3:1.

ANEXO 3. ARTIGOS EM ELABORAÇÃO

3.1. Revista “Parasitology Research”

Avaliação da atividade acaricida do eugenol sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae), utilizando uma nova adaptação para o teste de pacote de larvas.

Caio Márcio de Oliveira Monteiro, Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior, Mário Geraldo de Carvalho.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade acaricida do eugenol, com diferentes solubilizações e concentrações sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*, utilizando uma nova adaptação para o teste de pacote de larvas. O estudo foi dividido em três experimentos, e avaliação da atividade acaricida do eugenol foi feita através da utilização do teste de pacote de larvas com pequena adaptação relatadas e discutidas no corpo do trabalho. No primeiro experimento, o eugenol foi solubilizado na concentração de 20 µl/ml (2%), em etanol (50%), metanol (70%) e acetona (60%), e testado sobre larvas de *R. microplus*. Para cada formulação foi preparado um controle (mesmas formulações isentas de eugenol), sendo formado também um grupo controle onde as larvas não receberam nenhum tratamento. A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foi selecionada a formulação com melhor relação custo benefício e essa foi testada nas concentrações 2.5, 5.0; 10.0 15.0 e 20 µl/ml, sobre larvas de *R. microplus* e *D. nitens*. A mortalidade observada no primeiro experimento foi de 100% para todos os grupos tratados com eugenol, não sendo observada mortalidade em nenhum dos grupos controle. No segundo experimento, foi selecionada a formulação etanólica do eugenol por apresentar melhor relação custo-benefício, e a mortalidade registrada para *R. microplus* e *D. nitens* foi de 99.4; 100.0; 100.0; 100.0 e 100% e 89.5; 100.0; 100.0; 100.0 e 100%, nas concentrações de .5, 5.0; 10.0 15.0 e 20 µl/ml, respectivamente. Com base nos resultados é possível concluir o eugenol e pequenas concentrações e solubilizado em diferentes solventes apresentou atividade carrapaticida sobre as espécies testadas.

Palavras-chave - Cattle tick, Carrapato dos bovinos, Tropical horse tick, monoterpene.

3.2. Revista “Journal of Fluid Supercritical”

Extraction of the essential oil of angico (*Piptadenia rigida*) and pau-jacare (*Piptadenia gonoacantha*) using supercritical CO₂

Bruna dos Santos Moura, Pedro Henrique Pereira de Carvalho, Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior, Mário Geraldo de Carvalho, Marisa F. Mendes

Resumo

Além da extração de óleos de folhas de *P.rigida* e *P.gonoacantha* usando hidrodestilação, utilizou-se fluido supercrítico com CO₂ como solvente. Foram testadas diferentes condições operacionais, variando-se principalmente a temperatura (40 a 80 °C) e a pressão (100 a 200 bar), de modo a buscar os melhores resultados em termos de rendimento e composição do óleo extraído. Os melhores rendimentos na extração de óleo de folhas destas plantas foram de 0,73% a 60 °C e 200 bar, e 1,31% a 80 °C e 200 bar, respectivamente. A análise dos tempos de retenção, espectros de massas e análise do espectro de RMN ¹H permitiu identificar a presença de vários constituintes; tendo como constituintes majoritários presentes no óleo de *P.rigida* N-butil-benzeno-sulfonamida (em diferentes condições de extração) e seu derivado, além dos esteróides sitostenona, sitosterol, estigmasterol, 4,22-estigmastadien-3-ona, dos triterpenos lupeol, friedelliana, dentre outros. Já no óleo de *P. gonoacantha* o principal constituinte foi N-butil-benzeno-sulfonamida (a 40° e 100 bar), apesar da semelhança do espectro de RMN ¹H, os esteroides e triterpenos foram extraídos em diferentes condições.

3.3. “Revista Brasileira de Farmacognosia”

Antibacterial activity of extracts from the roots of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Leguminosae)

Francisco Eduardo Aragão Catunda Júnior, Daniel Luiz Reis Simas, Mário Geraldo de Carvalho, Lucila Barberis, Liliana Pascual, Francisco Ruiz, Acácio Geraldo de Carvalho

Abstract

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value was used with concentration ranging from 20 mg/ml to 0,312 mg/ml of fractions from the methanolic extract from the roots of *Piptadenia gonoacantha* to determinate the antibacterial potential. A set of 15 strains were used, as followed: 5 *Staphylococcus aureus* strains, 5 of *Listeria monocytogenes* strains, and 5 of *Escherichia coli* strains. Among of these microorganisms tested, *S. aureus* was the most susceptible with the MIC values of fractions in the ranged from 20 mg/ml to 0,625 mg/ml of ethyl acetate fraction from the methanolic extract (PGRME). On the other hand, the fractions showed weak inhibitory effect against *L. monocytogenes* and *E. coli*. The MIC value of fraction PGRME against *S. aureus* and *L. monocytogenes* were 0,625 mg/ml and 5 mg/ml respectively and the fraction PGRMM against *S. aureus* was 1,250 mg/ml.

Key words: Antibacterial activity, pathogenic microorganisms, *Piptadenia gonoacantha*, Leguminosae, MIC

3.4. Revista “Química Nova” ou “Journal of Brazilian Chemical Society”

Estudo comparativo da interação de 3,5,4'-triidroxi-7-O-β-D-glicopiranosil-6-prenil-flavona e seu análogo metilado com albumina sérica bovina (ASB)

Francisco Eduardo Aragão Catunda-Júnior, Daniel Rosa da Silva, Bruno Benedito Spolidoro, Carlos Mauricio Rabello Sant'Anna, Luciano Ramos Suzart, Otavio Augusto Chaves, Leonardo Santos de Barros, Darí Cesarin-Sobrinho, Mario Geraldo de Carvalho

Resumo

Como a albumina é um carreador de moléculas no sangue, decidiu-se estudar o comportamento fotofísico da interação do flavonóide 3,5,4'-triidroxi-7-O-β-D-glicopiranosil-6-prenil-flavona isolado de galhos da espécie *Ouratea hexasperma* (Ochnacea) e de seu análogo metilado, frente a uma solução de albumina sérica bovina (ASB) ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) tamponada com PBS (pH = 7,4), por UV-Vis, fluorescência. Foram feitos também estudos de “docking” molecular para se determinar características estruturais da interação da albumina com as moléculas citadas. Para os estudos de “docking”, as estruturas dos compostos foram construídas com o programa Spartan 06 (Wavefunction). Foi construído um modelo tridimensional para a ASB a partir da estrutura cristalográfica da albumina sérica humana, por meio de modelagem por homologia. O procedimento de “docking” foi feito com o programa Gold 4.1.1 (CCDC), usando-se a função de escore Chemscore2. A função de escore é calculada como o negativo da soma de termos de energia, de modo que quanto mais positivo um escore, melhor é a interação. Os dois compostos apresentaram boa interação no chamado sítio I de Sudlow, que contém um resíduo de triptofano (Trp237). Os estudos de Docking e supressão de fluorescência revelaram que tanto o flavonóide 3,5,4'-triidroxi-7-O-β-D-glicopiranosil-6-prenil-flavona como seu análogo metilado apresentam boa interação com albumina sérica bovina. Sendo que no análogo metilado o controle da interação é exercido predominantemente pelo fator entrópico enquanto no composto não metilado a forma de interação predominante é por controle entálpico.