

Avaliação da Atividade Citotóxica, Antioxidante e Estudo
Fitoquímico do Caule de *Newtonia contorta*: Uma
Contribuição ao Estudo do Estrato Arbóreo da Região
Norte/Noroeste Fluminense

FERNANDA MENDES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como uma parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Naturais.

Orientadora: Professora Doutora Leda Mathias

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
FEVEREIRO – 2011

Avaliação da Atividade Citotóxica, Antioxidante e Estudo
Fitoquímico do Caule de *Newtonia contorta*: Uma
Contribuição ao Estudo do Estrato Arbóreo da Região
Norte/Noroeste Fluminense

FERNANDA MENDES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como uma parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2011

Comissão Examinadora:

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Dr. Química Orgânica) – UENF

Prof^a. Maria Raquel Garcia Vega (Dr.^a Química de Produtos Naturais) – UENF

Prof^a. Cintia Neves Barreto Carneiro (Dr.^a Biociências e Biotecnologia) – IFF

Prof^a. Leda Mathias (Doutora, Química de Produtos Naturais) – UENF
(Orientadora)

“Mas esforçai-vos, e não desfaleçam as vossas mãos; porque a vossa obra tem uma recompensa.” (II Crônicas 15:7)

AGRADECIMENTOS

Á Deus em primeiro lugar

A minha mãe em especial pelo incentivo e pela ajuda.

Ao meu marido José Augusto, pelo apoio e compreensão.

Aos meus filhos José e Amanda pelo amor incondicional.

A professora Dra. Leda Mathias pelos ensinamentos e sugestões.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos pela inestimável ajuda.

Ao professor Ivo pela colaboração durante a realização do trabalho.

Ao professor Dr. Raimundo Braz-Filho pela importante colaboração na identificação estrutural das substâncias isoladas

A Tânia e Maria Estela pela gentileza e atenção.

Ao técnico Roberto pela obtenção dos espectros de RMN.

Aos demais professores do curso de pós-graduação em Ciências Naturais que contribuíram para o trabalho desta tese.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao centro de ciência e Tecnologia (CCT) pelo oferecimento do curso de Mestrado em Ciências Naturais e pela bolsa concedida.

A todos os colegas do laboratório que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, pelas sugestões, ajuda e pelo ótimo convívio.

Aos amigos Roberta e Rennê pela amizade, apoio e convívio agradável.

E a todos que me apoiaram neste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	1
1.1. Remanescentes florestais da região Norte/Noroeste Fluminense	5
1.1.1. Área de restinga: complexo lagunar Grussaí/Iquipari	5
1.1.2. Floresta submontana da região do Imbé	5
1.1.3. Mata do Carvão	6
1.1.4. Mata do Bom Jesus	7
2. A Família Fabaceae	8
2.1. A subfamília mimosoideae	9
2.2. O gênero <i>Newtonia</i> (basionimo: <i>Piptadenia</i>)	10
2.3. A espécie <i>Newtonia contorta</i>	14
2.4. Posicionamentos sistemáticos da espécie estudada	15
3. Metabólitos especiais (secundários)	16
3.1. Terpenóides	18
3.2. Alcalóides	19
4. Metabolismo primário	21
4.1. Carboidratos	21
4.1.1. Atividade bactericida de derivados carboidratos	22
4.1.2. Atividade antifúngica de derivados de carboidratos	24
4.1.3. Outras atividades atribuídas aos carboidratos	24
5. Objetivos	26
5.1. Objetivos gerais	26
5.2. Objetivos específicos	26
6. Parte experimental	27
6.1. Equipamentos utilizados	27
6.2. Reagentes utilizados	28
6.3. Materiais de consumo utilizados	29

6.4. Solução reveladora empregada nos processos cromatográficos em camada delgada	29
6.4.1. Solução de vanilina sulfúrica	29
6.5. Levantamento bibliográfico	29
6.6. Coleta do material vegetal	30
6.7. Secagem e moagem do material vegetal	30
6.8. Preparação dos extratos brutos	30
7. Fracionamento dos extratos brutos	31
7.1. Extrato em hexano	31
7.1.1. Reação de transesterificação	32
7.2. Extrato em acetato de etila	34
7.3. Extrato metanólico	36
7.3.1. Reação de acetilação	37
7.4. Materiais e métodos	39
8. Resultados e Discussão	40
8.1. Constituintes químicos identificados nos extratos do caule de <i>newtonia contorta</i>	40
8.2. Identificação das substâncias isoladas	44
8.2.1. Identificação da substância NCH	44
8.2.2. Identificação da substância NCH1	53
8.2.3. Identificação da substância NCH2	64
8.2.4. Identificação da substância NCHP	73
8.2.5. Identificação da substância NCA1	76
8.2.6. Identificação estrutural dos componentes majoritários da fração NCM1 do extrato metanólico	81
8.2.7. Identificação da substância NCM2	92
8.3. Avaliação da atividade antioxidante	98
8.3.1. Métodos diretos	98
8.3.2. Métodos indiretos	99
8.3.2.1. Redução do Radical 1,1- difenil-2-picrilidrazila (DPPH)	99
8.3.3. Procedimento Experimental	99
8.3.4. Resultados e discussão	101
8.4. Avaliação da atividade citotóxica	105

8.4.1. Bioensaio da letalidade contra larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	105
8.4.2. Materiais e Reagentes utilizados	106
8.4.3. Procedimento Experimental	106
8.4.4. Resultados e discussão	108
9.0. Conclusões	110
10. Constantes Físicas e dados espectrométricos das substâncias isoladas	111
11. Referências Bibliográficas	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade Antioxidante
AcOEt	Acetato de Etila
APT	Attached Proton Test
<i>J</i>	Constante de Acoplamento (medida em Hertz)
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada preparativa
CC	Cromatografia em coluna
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Deslocamento químico (ppm)
DL ₅₀	Dose letal mínima responsável pela morte de 50% dos espécimes testados
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
EM	Espectro de massas
Rf	Fator de Retenção
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum coherence
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
<i>m</i>	Multiplete
ppm	Parte por milhão
P.F.	Ponto de fusão
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
¹³ C	
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
<i>t</i>	Triplete

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Drogas de importância para a saúde humana	2
Figura 2. Domínio Mata Atlântica	4
Figura 3. Biodiversidade de Espécies do Complexo Lagunar Grussaí/Iquipari	5
Figura 4. Biodiversidade de espécies da Região do Imbé	6
Figura 5. Biodiversidade de Espécies da Mata do Carvão	7
Figura 6. Mapa com a localização da Mata do Bom Jesus	8
Figura 7. Biodiversidade de Espécies da Mata do Bom Jesus	8
Figura 8. Estruturas das Substâncias Isoladas do Gênero <i>Newtonia (piptadenia)</i>	14
Figura 9. Rota metabólica das principais classes de metabólitos secundários	17
Figura 10. Biossíntese de terpenóides	19
Figura 11. Estruturas de alguns alcalóides indólicos	21
Figura 12. 6-O-Lauroil-sacarose, (6'-O-lauroil-maltose, 6''-O-lauroil-maltotriose	22
Figura 13. Primeira vacina comercial com uma porção de carboidrato sintético	23
Figura 14. Éter láurico do α -D-glicopiranosídeo de metila e o éster láurico do α -D-manopiranosídeo de metila	23
Figura 15. Estrutura da N-dodecanoilglicosilamina	24
Figura 16. Ésteres Graxos da sacarose com ação inseticida	24
Figura 17. Estrutura do iminoalditol	25
Figura 18. Fluxograma dos extratos obtidos do caule de <i>N.contorta</i>	31
Figura 19. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato hexânico	33
Figura 20. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato em acetato de etila	35
Figura 21. Fluxograma resumido do fracionamento da (fração 1) do extrato metanólico.	36

Figura 22. Fluxograma resumido do fracionamento do sobrenadante (A)	38
Figura 23. Espectro na região de infravermelho de NCH (ATR)	44
Figura 24. (A)Espectro de massas da substância NCH 70 eV; (B) cromatograma de gás da substância NCH	45
Figura 25. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCH	45
Figura 26. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da substância NCH	46
Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,68 – 3,16 ppm) da substância NCH	47
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH	47
Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 55,40- 14,64 ppm) da substância NCH	48
Figura 30. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH	49
Figura 31. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH (ampliação)	49
Figura 32. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância NCH	50
Figura 33. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância NCH (ampliação)	50
Figura 34. Estrutura da substância NCH (lupeol)	52
Figura 35. Espectro na região de Infravermelho da substância NCH1 (ATR)	53
Figura 36. (A) Espectro de massas da substância NCH1, 70 eV; (B) cromatograma de gás da substância NCH1	54
Figura 37. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCH1	54
Figura 38. Espectro de RMN ^1H da substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3	55
Figura 39. Espectro de RMN ^1H da substância NCH1, 400 MHz,	56

CDCl ₃ (ampliação da região entre 3,16 – 4,67 ppm)	
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H substância NCH1, 400 MHz,	56
CDCl ₃ (ampliação da região entre 2,39 – 0,66 ppm)	
Figura 41. Espectro de RMN ¹³ C da substância NCH1, 400 MHz,	57
CDCl ₃	
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C da substância NCH1, 400 MHz,	57
CDCl ₃ (Expansão da região entre 60,62 – 14,85 ppm)	
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMQC) da substância	58
NCH1, CDCl ₃	
Figura 44. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMQC) da substância	58
NCH1, CDCl ₃ (ampliação)	
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMQC) da substância	59
NCH1, CDCl ₃ (ampliação)	
Figura 46. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMBC) da substância	60
NCH1, CDCl ₃	
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMBC) da substância	60
NCH1, CDCl ₃ (ampliação)	
Figura 48. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMBC) da substância	61
NCH1, CDCl ₃ (ampliação)	
Figura 49. Estrutura da substância NCH1 (28-Hidroxilupeol)	63
Figura 50. Espectro na região de infravermelho da substância	64
NCH2	
Figura 51. (A) Espectro de massas da substância NCH2, 70 eV;	65
(B) cromatograma de gás da substância NCH2	
Figura 52. Proposta de alguns fragmentos de massas para a	65
substância NCH2	
Figura 53. Espectro de RMN ¹ H da substância NCH2, 400 MHz,	66
CDCl ₃	
Figura 54. Espectro de RMN ¹³ C da substância NCH2, 100 MHz,	67
CDCl ₃	
Figura 55. Espectro de RMN ¹³ C da substância NCH2, 100 MHz,	67
CDCl ₃ (ampliação da região entre 14,56 – 55,01 ppm)	
Figura 56. Espectro de RMN ¹ H X ¹³ C (HMQC) da substância	68

NCH ₂ , CDCl ₃	
Figura 57. Espectro de RMN ¹³ C (HMQC) da substância NCH ₂ , CDCl ₃ (ampliação)	69
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C (HMBC) da substância NCH ₂ , CDCl ₃	70
Figura 59. Espectro de RMN ¹³ C (HMBC) da substância NCH ₂ , CDCl ₃ (ampliação)	70
Figura 60. Estrutura da substância (NCH ₂) Lupenona	72
Figura 61. Espectro na região de infravermelho de NCHP	73
Figura 62. Espectros de massas da mistura de ésteres metílicos	74
Figura 63. Fragmentos típicos de ésteres metílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa	75
Figura 64. Espectro na região de infravermelho de NCA1	76
Figura 65. Espectro de RMN ¹ H da substância NCA1, 400 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄	77
Figura 66. Espectro de RMN ¹³ C da substância NCA1, 100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄	77
Figura 67. Espectro de RMN- ¹³ C da substância NCA1, 100 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ (ampliação da região entre 111,5 – 136,8 ppm)	78
Figura 68. Espectro de massas 70 eV de NCA1	78
Figura 69. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCA1	79
Figura 70. Estrutura da substância NCA1 (ácido-3-indol carboxílico)	80
Figura 71. Principais Componentes identificados na fração NCM1 do extrato metanólico de <i>N. contorta</i>	82
Figura 72. Cromatograma da fração NCM1 do extrato metanólico de <i>N. contorta</i>	83
Figura 73. Componentes majoritários da fração NCM1 do extrato metanólico de <i>N. contorta</i>	83
Figura 74. Espectro de RMN ¹ H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl ₃)	84
Figura 75. Espectro de RMN ¹ H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl ₃)	84

-ampliação da região entre 2,0 – 2,1 ppm)	
Figura 76. Espectro de RMN ^1H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 3,9 – 4,3 ppm)	85
Figura 77. Espectro de RMN ^1H da fração NCM1(400 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 5,0 - 5,4 ppm)	85
Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1 (100 MHz, CDCl_3)	86
Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1, (100 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 169,6 – 170,5 ppm)	87
Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1 (100 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 20,5 – 20,8 ppm).	87
Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 Hz, CDCl_3) da fração de NCM1	88
Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 Hz, CDCl_3) da fração NCM1	88
Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT (100 Hz, CDCl_3) da fração NCM1	89
Figura 84. Fragmentograma de massa do peracetato de iditol (NCM1c)	89
Figura 85. Proposta de alguns fragmentos de massas para o peracetato de iditol (NCM1c)	90
Figura 86. Fragmentograma de massa do peracetato de glicitol (NCM1i)	90
Figura 87. Proposta de alguns fragmentos de massas para o peracetato de glicitol (NCM1i)	91
Figura 88. Espectro na região de infravermelho de NCM2	92
Figura 89. Espectro de RMN ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3	93
Figura 90. Espectro de RMN ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 3,4 – 5,67 ppm)	94
Figura 91. Espectro de RMN- ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 1,20 – 2,23 ppm)	94
Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCM2, 100 MHz,	95

CDCl₃

Figura 93. Espectro de RMN- ¹³ C da substância NCM2, 100 MHz, CDCl ₃ (ampliação da região entre 58,4 – 75,7 ppm)	95
Figura 94. Estrutura da substância NCM2 (dissacarídeo sacarose peracetilada)	97
Figura 95. Procedimento Experimental da Análise Quantitativa Antioxidante	100
Figura 96. Gráfico da porcentagem de AA <i>versus</i> concentração dos extratos do caule da espécie <i>N. contorta</i> .	102
Figura 97. Estrutura química de compostos indólicos	103
Figura 98. Provável mecanismo de interação do ácido-3-indol carboxílico e o DPPH.	104
Figura 99. Procedimento Experimental para avaliação da atividade citotóxica.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de substâncias Isoladas do Gênero <i>Piptadenia</i> (<i>Newtonia</i>)	13
Tabela 2. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH, comparados com dados da literatura para o lupeol	51
Tabela 3. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH1 comparados com dados da literatura	62
Tabela 4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH2 comparados com dados da literatura	71
Tabela 5. Mistura de ésteres metílicos encontrados na fração NCHP	75
Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCA1 comparados com dados da literatura.	79
Tabela 7. Principais picos observados no espectro de massa da fração NCM1 do extrato metanólico de <i>Newtonia contorta</i> .	81
Tabela 8. Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância NCM2 comparados com dados da literatura para a sacarose octaacetilada.	96
Tabela 9. Dados de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCM2 comparados com dados da literatura para a sacarose octaacetilada.	96
Tabela 10. Porcentagem de Atividade Antioxidante versus concentração dos extratos brutos do caule de <i>Newtonia contorta</i> .	101
Tabela 11. Porcentagem de mortos após 24 horas e valores de DL_{50} dos extratos de <i>Newtonia contorta</i> .	108
Tabela 12. Valores de DL_{50} dos extratos de <i>N. contorta</i> .	109

RESUMO

O presente trabalho visa à prospecção química e biológica da espécie *Newtonia contorta* (Fabaceae).

As partes aéreas e o caule da planta foram coletados durante o mês de maio de 2008, na Mata do Bom Jesus, localizada no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro

O isolamento dos metabólitos secundários dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico do caule, foi realizado através de técnicas cromatográficas e resultou na identificação de três triterpenos: lupeol, 28-hidroxi-lupeol, lupenona, uma mistura de ésteres metílicos: Metil éster do ácido docosanóico, Metil éster do ácido tetracosanóico, Metil Ester do ácido hexacosanoico, um alcalóide: ácido-3-indol carboxílico, uma mistura de alditois: peracetato de iditol e peracetato de glicitol, as substâncias triacetato de glicerol, tetra acetato de butanol, peracetato de α -D-manopiranosídeo, etil-tetra-O-acetil- β -D-glicopiranosídeo, peracetato de β -D-sorbose, peracetato de β -D-glicopiranosídeo, peracetato de inositol e o dissacarídeo sacarose peracetilada.

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através da obtenção e interpretação de espectros na região do ultravioleta (UV), infravermelho (IV), espectros de massa (EM) e de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C uni e bi-dimensionais, bem como, através de informações obtidas no espectro de massas dos produtos detectados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

As modificações estruturais em determinados sítios da molécula visando principalmente aumentar a solubilidade e/ou elucidação estrutural foram realizadas através de reações de acetilação.

O ensaio biológico dos extratos brutos foi feito através do ensaio da toxicidade aguda frente às larvas de *Artemia salina*.

Os extratos brutos tiveram sua atividade antioxidante avaliada utilizando o método DPPH como radical livre.

ABSTRACT

The present work aims to exploit the chemical and biological species *Newtonia contorta* (Fabaceae).

The shoots and stalks of the plant were collected during the month of May 2008, Mata do Bom Jesus, located in the municipality of Goytacazes, Rio de Janeiro

The isolation of secondary metabolites of hexane, ethyl acetate and methanol extracts of the stem, was performed by chromatographic techniques and resulted in the identification of three triterpenes, lupeol, 28-hydroxylupeol, lupenone, a mixture of methyl esters: Methyl ester of acid docosanoic, Methyl tetracosanoic acid ester, Methyl Ester hexacosanoic acid, alkali, acid indole-3-carboxylic acid, a mixture of alditols: iditol of tert and tert glicitol of the substances glycerol triacetate, tetra acetate, butanol, tert of α manopiranosideo-D-, ethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside, tert of β -D-sorbose, tert of β -D-glucopyranoside, and tert inositol disaccharide sucrose peracetilada. Structure determination of isolated compounds was accomplished through the collection and interpretation of spectra in the ultraviolet (UV), infrared (IR), mass spectra (MS) and ^1H NMR and ^{13}C and uni-dimensional and how, through information obtained in the mass spectrum of the products detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The structural changes in certain sites of the molecule primarily aimed at increasing the solubility and / or structural elucidation were performed by acetylation reactions.

The biological assay of the crude extracts was done by testing the acute toxicity against the larvae of *Artemia salina*.

The extracts were evaluated using the antioxidant activity as the DPPH free radical.

1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira possui imenso potencial para pesquisa, possuindo a maior diversidade macro e microbiológica do planeta. Acredita-se que possua cerca de 20% de toda a biodiversidade do planeta. Estimativas indicam que das 500 mil espécies de plantas existentes nos ecossistemas terrestres, 16% encontram-se na Amazônia brasileira sendo que menos de 10% foi estudado quimicamente, e apenas um pequeno número teve suas propriedades biológicas caracterizadas. Temos, portanto, uma das floras mais ricas do mundo em matérias-primas para fitofármacos, requerendo investigações sistemáticas e aprofundadas em diversas áreas do conhecimento (Barbosa, 2001).

Através dos séculos, a medicina tradicional, baseada nas propriedades terapêuticas das plantas, tem evoluído em sintonia com a composição da flora em dado local, com os aspectos culturais e religiosos em todas as partes do mundo, direcionando em muitos casos, o processo de obtenção de novas drogas de importância à saúde humana tais como: benzilpenicilina (1), taxol (2), vincristina (3), vimblastina (4), ajmalicina (5), atropina (6), digoxina (7), morfina (8), quinina (9), berberina (10), ácido salicílico (11) e artemisinina (12) (Figura 1, p. 2). Atualmente o uso de plantas com base na medicina tradicional representa cerca de 85% dos processos terapêuticos utilizados em países em desenvolvimento e nos países do ocidente (Pezzuto, 1997; Contin, 1999 citado por Yunes & Calixto, 2001).



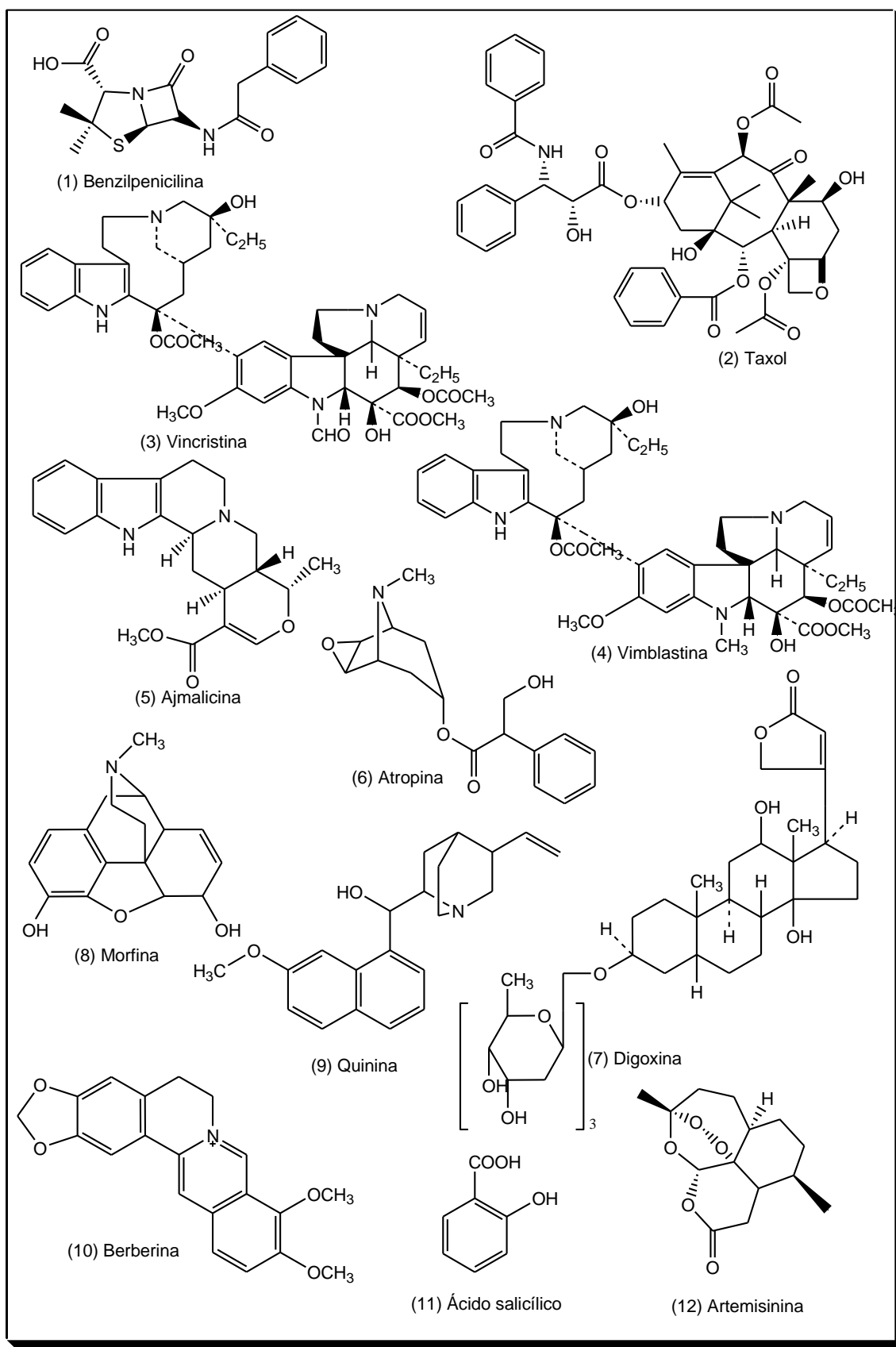


Figura 1. Drogas de importância para a saúde humana

Em um levantamento realizado na década de oitenta foram identificadas 121 substâncias oriundas de 95 espécies vegetais, usadas correntemente na medicina ocidental. Além disto, do total de medicamentos aprovados no período 1983 -1994, cerca de 6% são produtos naturais, 24% são derivados destes e 9% foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica com base em produtos naturais (Yunes & Calixto, 2001).

Neste contexto, a Mata Atlântica (segunda maior formação florestal brasileira) devido à alta biodiversidade de espécies vegetais, apresenta um grande potencial para o estudo de produtos naturais.

A Floresta Atlântica, cobria originalmente uma área de 1,1 milhão de km², o equivalente à cerca de 12% do solo brasileiro. Esta formação estendia-se por mais de 3300 km na costa leste, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Morelato, 2000; Oliveira-Filho & Fontes, 2000). É uma formação vegetal que apresenta uma grande complexidade biológica e foi considerada, pela União Internacional para Conservação da Natureza, como um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (IUCN, 1986). Essa formação recebe diferentes definições, sendo, atualmente, a mais aceita a que a classifica como Domínio Tropical Atlântico (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). Essa classificação inclui não somente as matas de encostas e de planícies costeiras litorâneas, mas também um conjunto de formações vegetais associadas, ampliando o limite de sua distribuição em algumas regiões para cerca de 700 km em direção ao interior do Brasil (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). De acordo com RadamBrasil (1983), uma das formações da Floresta Atlântica é a Floresta Ombrófila Densa, que pode ser subdividida em quatro tipos florestais principais:

- Floresta de baixada (até 50 m);
- Floresta sub-montana (50-500 m);
- Floresta montana (500-1500 m);
- Floresta alto-montana (acima dos 1500 m).

Desde a década de 1980 verificou-se que a Floresta Atlântica está reduzida a cerca de 7% de sua área original, (Figura 2, p. 4), estando os seus remanescentes, em grande parte, representados por um elevado número de fragmentos em diferentes graus de degradação, devido à diferentes atividades e pressões antrópicas (Inpe & Ibama, 1990; Almeida *et al.*, 1998; Ranta *et al.*,

1998; Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Fundação SOS Mata Atlântica/Inpe, 2001; Rocha *et al.*, 2003).

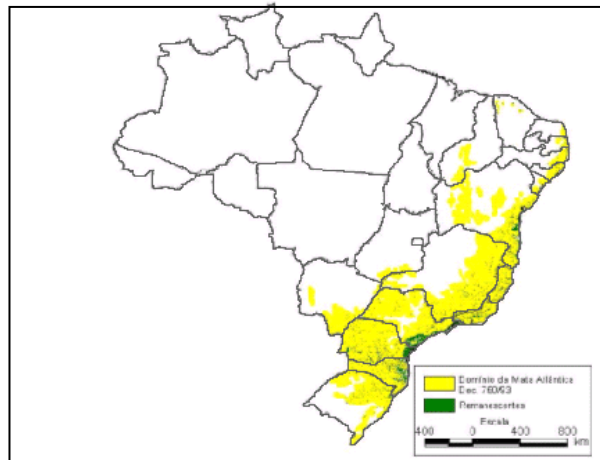


Figura 2: Domínio Mata Atlântica, área original = 1.306.000 km², Remanescentes = 7,5% (Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, 2001).

A Floresta Atlântica apresenta-se como uma paisagem fragmentada e como um mosaico composto por poucas áreas relativamente extensas e uma porção bem maior composta de áreas em diversos estágios de degradação (Guatura *et al.*, 1996), principalmente nas regiões sul e sudeste (zonas núcleo de preservação, de acordo com o Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica; Zaú, 1998). Assim, não importa o tipo ou o grau de impacto causado sobre a Floresta Atlântica, sua degradação causa um impacto imediato ao ambiente (Morellato, 2000), resultando em uma elevada perda de espécies, com uma conseqüente redução da biodiversidade (Pimm & Askins, 1995; Almeida *et al.*, 1998).

Na região Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, a Floresta Atlântica cobria originalmente a maior parte da região, hoje esta reduzida a menos de 10% da sua área original. As áreas de floresta até a altitude de 100m (florestas de baixada e submontanas) foram substituídas por pastagens e plantações de cana-de-açúcar, estando à vegetação remanescente altamente fragmentada e distribuída, na sua maioria, em fragmentos com áreas inferiores a 1000 ha, localizados principalmente em propriedades privadas (Carvalho, 2006). Boa parte destes fragmentos, apesar do tamanho e isolamento, ainda apresentam elevada diversidade de espécies arbóreas (Pagano *et al.*, 1987).

1.1 REMANESCENTES FLORESTAIS DA REGIÃO NORTE/NOROESTE FLUMINENSE

1.1.1. ÁREA DE RESTINGA: COMPLEXO LAGUNAR GRUSSAÍ/IQUIPARI

O complexo lagunar Grussaí/Iquipari, com aproximadamente 4.800 ha, está localizado no município de São João da Barra, região norte do Estado do Rio de Janeiro. O local dista aproximadamente 15 km do delta do rio Paraíba do Sul, situado na bacia hidrográfica das lagoas Grussaí e Iquipari, que possuem área de 1,0 km² e 1,4 km² respectivamente. O rio Paraíba do Sul tem sido citado como importante fator na formação dessa região (Lamêgo, 1974; Dias & Silva 1984; Flexor *et al*, 1984; Suguio & Tessler 1984). A Figura 3 representa um gráfico da biodiversidade de espécies do Complexo lagunar: Grussaí/Iquipari, segundo levantamento realizado por Assumpção & Nascimento, 2000.

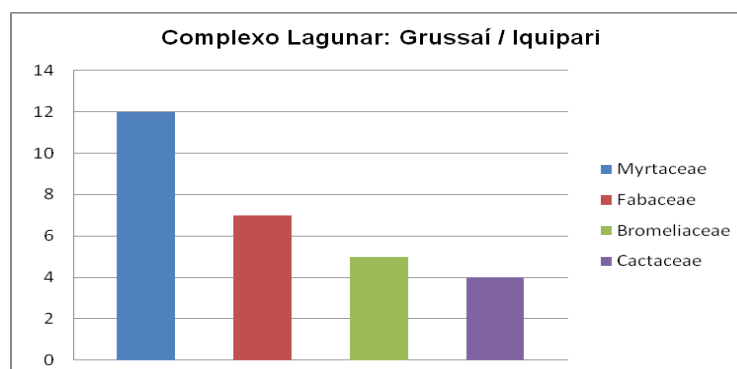


Figura 3. Biodiversidade de Espécies do Complexo Lagunar Grussaí/Iquipari. (Fonte: Assumpção & Nascimento, 2000).

1.1.2. FLORESTA SUBMONTANA DA REGIÃO DO IMBÉ

A região do Imbé está localizada no município de Campos dos Goytacazes, fazendo parte do Parque Estadual do Desengano e de seu entorno, e representa um dos maiores remanescentes de floresta ombrófila densa atlântica, que outrora ocupou boa parte da área do Estado do Rio de Janeiro. Esta floresta encontra-se hoje ilhada e fragmentada por uma série de atividades agropecuárias que se desenvolvem na região desde a colonização, principalmente pelo plantio de cana-de-açúcar e pastagem. A região possui

uma série de pequenos rios que tem origem geralmente nas regiões altas das montanhas e apresentam grande importância econômica e ecológica (Radambrasil, 1983). Na Figura 4, p. 6 apresenta-se um gráfico da biodiversidade de espécies na região do Imbé.

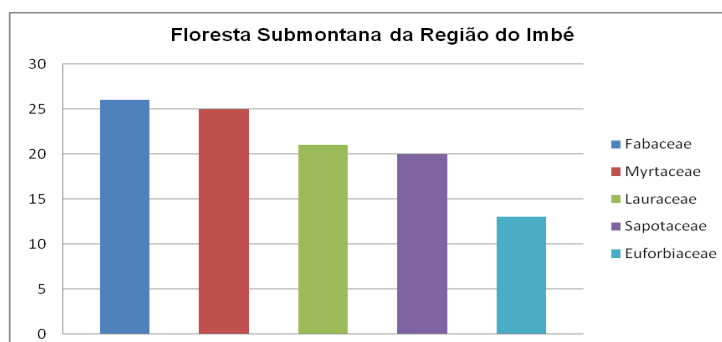


Figura 4. Biodiversidade de espécies da Região do Imbé (Fonte: Moreno *et. al*, 2003).

1.1.3. MATA DO CARVÃO

A Mata do carvão compreende um remanescente de mata sobre tabuleiro terciário da região norte do estado do Rio de Janeiro, localizada na Fazenda São Pedro, município de São Francisco do Itabapoana, RJ, a 30 km em linha reta de Campos dos Goytacazes e a 10 km do litoral.

A Mata do Carvão teve sua área reduzida aos atuais 1.053 ha devido aos desmatamentos ocorridos, principalmente durante as décadas de 60 e 70, para as atividades de plantio de cana-de-açúcar, pecuária, produção de carvão vegetal e comercialização de suas madeiras (por ex., *Aspidosperma spp.* (Apocynaceae), *Copaifera lucens* [Fabaceae (pau óleo)], *Paratecoma peroba* [Bignoniaceae (ipê peroba)] e *Tabebuia spp.* (Bignoniaceae). Esses desmatamentos ocasionaram uma alteração na forma da mata, ficando esta distribuída em uma longa faixa de cerca de 5 km de comprimento e 2 km de largura, cortada por trilhas usadas na retirada de madeiras. Esta forma alongada, sem dúvida, acentua o efeito de borda nesta mata. Hoje, embora a taxa de desmatamento tenha diminuído, ainda ocorrem retiradas seletivas de madeira para a produção de lenha, cabos de ferramentas e/ou moirões em

alguns pontos desta mata (Turner & Corlett, 1996). Apresenta-se na Figura 5, p. 7 um gráfico da biodiversidade de espécies da Mata do Carvão.

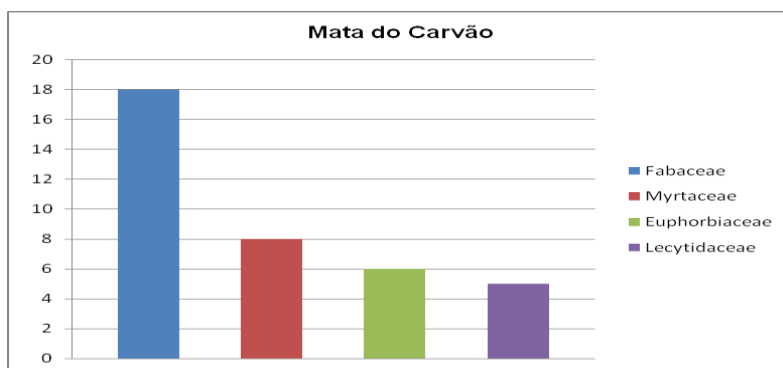


Figura 5. Biodiversidade de Espécies da Mata do Carvão (Fonte: Da Silva & Nascimento, 2001).

1.1.4. MATA DO BOM JESUS

A mata do Bom Jesus que está localizada no município de Campos dos Goytacazes possui uma área de 35 ha (Figura 6, p. 8). Esta região está caracterizada como um fragmento de floresta aluvial situada nas proximidades do rio Paraíba do Sul. Até o início dos anos 80 a mata pertencia a uma fazenda, posteriormente foi cedida a Santa Casa de Misericórdia de Campos dos Goytacazes para a extração seletiva de madeira utilizada na fabricação de caixões. Nos anos 90 esta atividade foi abandonada, porém a mata continua sendo alvo de extração seletiva de madeira caça e queimada. Este fragmento está imerso em uma matriz antrópica formado por extensos canaviais, pastagem e algumas áreas de regeneração florestal (capoeiras) em suas bordas (Carvalho *et. al*, 2006).

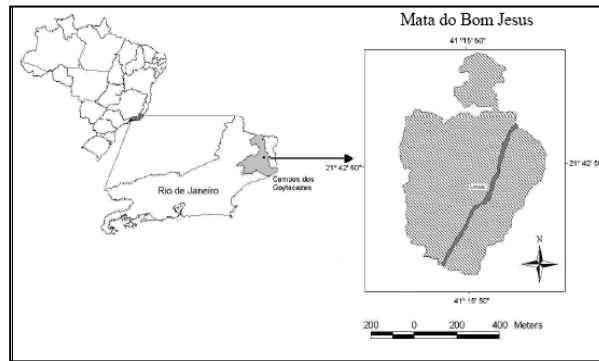


Figura 6. Mapa com a localização da Mata do Bom Jesus (Fonte: Carvalho, 2006, *et. al*).

Os 336 indivíduos amostrados em estudos realizados por Carvalho *et. al* (2006) nesta região, foram distribuídos em 105 espécies pertencentes a 35 famílias e 91 gênero, sendo as que apresentaram maior número de espécies foram: **Fabaceae** (18 espécies), Myrtaceae (10 espécies), Mimosaceae (7 espécies), Euphorbiaceae (7 espécies), Lauraceae (6 espécies), Rubiaceae (6 espécies) e Anacardiaceae (5 espécies), como mostra o gráfico na Figura 7, pag. 8.

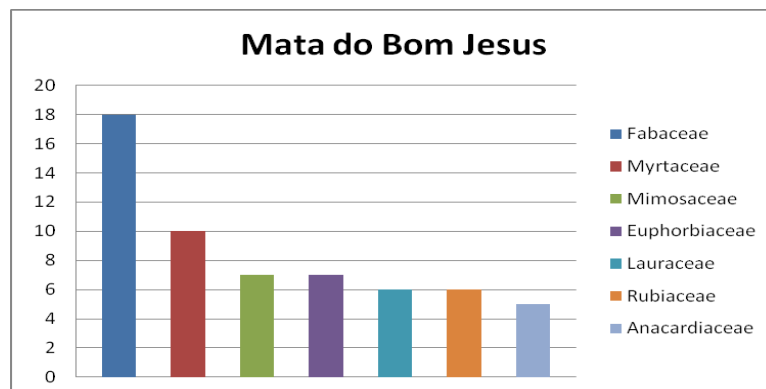


Figura 7. Biodiversidade de Espécies da Mata do Bom Jesus (Fonte: Carvalho, 2006, *et. al*).

2. A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae possui ampla distribuição geográfica e é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, sendo superada apenas pela Asteraceae (antiga Compositae). São aproximadamente 18.000 espécies em mais de 650

gêneros. Estando subdividida em três subfamílias muito distintas: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (www.tropicos.org).

A família também apresenta grande importância econômica pela produção de alimentos. Em geral seus representantes apresentam folhas alternas e compostas, podendo ser pinadas, bipinadas, trifoliolares e digitadas. Há presença de estípulas que podem ser de tamanho variado, muitas vezes a estípula é transformada em espinho. Na base da folha e dos folíolos existem articulações chamadas, respectivamente, de pulvinos e pulvínulos. Algumas plantas da família Fabaceae, como por exemplo, espécies do gênero *Mimosa* usam essas articulações para movimentarem-se rapidamente em resposta a agentes externos, alguns autores denominam essas plantas de sensitivas (Alexandre *et al*, 1998).

Quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium*). Esta característica é de extrema importância ecológica e mais freqüente entre as subfamílias Mimosoideae. Além disso, fatores químicos, físicos e biológicos do solo podem limitar a nodulação de espécies capazes de formar esta simbiose. São de hábito variado podendo ser herbáceas, trepadeiras, arbustivas e arbóreas. Essa família possui uma ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais (Alexandre *et al*, 1998).

A química da família Fabaceae é composta por várias classes de substâncias, destacando-se a classe dos flavonóides e alcalóides que são tidos como marcadores taxonômicos. Entre os flavonóides são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas entre outros. Enquanto que na classe dos alcalóides encontram-se derivados de fenilalanina, tirosina e do triptofano entre outros (Harboner, 1981).

2.1. A SUBFAMILIA MIMOSOIDEAE

Segundo Polhill & Raven, a subfamília Mimosoideae teria sido derivada de ancestrais de Caesalpinioideae. A subfamília está distribuída principalmente, nas regiões tropicais, subtropicais e subtemperadas do mundo. América Tropical, África e Ásia-Austrália são os atuais centros de diversidade dos táxons de Mimosoideae. Na América Tropical, a maioria das espécies

ocorre na América Central e América do Sul, com poucos representantes nas regiões do complexo antilhano (Polhill & Raven, 1981).

A subfamília, mimosoideae é a que apresenta menor número de representantes na família e compreende, cerca de 40 gêneros. Suas flores apresentam floração de simetria radial, podendo ser pentâmera ou tetrâmera diclamídea e hermafrodita. São plantas subarborescentes, arbustivas ou arbóreas, de folhas freqüentemente duplamente pinadas (Ayltho, 1991).

Dentre os gêneros encontrados no Brasil destacam-se pelo número de espécies: *Mimosa* (conhecida popularmente como: sensitiva, bracatinga, jurema, sabiá, estes dois últimos no Nordeste), *Calliandra* (esponjinha), *Ingá* (ingá), *Pithecelobium* (olho de cachorro), *Parkia* (visgueiro) e *Piptadenia* (angico) (Ayltho, 1991).

Dentre os gêneros brasileiros mais utilizados destacam-se *Piptadenia* (angico-jacaré) com madeira destinada a vários fins, bem como *Enterolobium* (tamboril) com seus típicos frutos e *Ingá* (ingá), utilizado o sombreamento de certas culturas como o café e com frutos comestíveis. Merece destaque a espécie do gênero *Entada*, trepadeira vigorosa da região da Hiléia amazônica e que produz vagens com até 1,20 m de comprimento. Com lindas inflorescências pêndulas merecem destaque também a espécie de *Parkia*, conhecidas na Amazônia por visgueiro. Na região nordestina foram introduzidas, recentemente, espécies arbóreas do gênero *Prosopis* (algaroba nome popular da espécie), utilizadas na arborização (Ayltho, 1991).

2.2. O GÊNERO *Newtonia* (BASIONIMO: *Piptadenia*)

As espécies do gênero *Newtonia* são utilizadas na indústria de curtume por possuírem a casca rica em taninos e madeira dura e pesada que é usada na construção naval e civil e como lenha e carvão. Atualmente, com a escassez de espécies utilizadas como fonte de madeiras, o angico voltou a figurar como opção para a construção civil e telhados, além de ser utilizado na recuperação ambiental, pois cresce muito bem em solos pobres e degradados (Correa, 1984).

O gênero *Newtonia* despertou o interesse dos cientistas por seu uso na preparação do rapé (pó usado para inalação). Isto foi evidenciado desde a

chegada de Cristovão Colombo no novo mundo, quando Ramón Pane descreveu a inalação de um rapé narcótico pelos nativos das Ilhas do Caribe ao parecer preparado com espécies de *Newtonia*. O mesmo foi observado em muitas tribos indígenas da América do Sul, onde o pó obtido a partir de sementes torradas de *Piptadenia peregrina*, chamadas pelos indígenas de cohoba, paricá ou yopo, quando inalada na forma de rapé produziam êxtase e alucinações. Só em 1954 através do trabalho de Stromberg, foi relatada a presença do alcalóide indólico 5-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina (13) Bufotenina (Figura 8, Pag.14), substância a que se atribui o efeito alucinógeno.

Os representantes do gênero *Newtonia* no Brasil ocorrem nos estados da Amazônia, Bahia, Goiás Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (Lorenzi, 1992). São conhecidos no Brasil como: angico, angico branco, angico do campo, angico roxo, angico vermelho, angico bravo, angico preto, angico rajado, angico de cerrado e na Argentina e no Paraguai são conhecidos como cebil, cebil colorado e cebil ita (Rizzini, 1998).

A química do gênero é composta por diferentes classes de substâncias e, devido à aplicação industrial, os primeiros estudos descritos que envolvem representantes do gênero foram relacionados à presença de taninos. Zellada (1915) relatou a existência de taninos e catecol na espécie *P. cebil*.

Deforge e colaboradores (1929) relatou a presença de taninos em *P. crysostachys*,

Schneider (1937) estudou as propriedades adesivas de gomas exsudadas da espécie de *Newtonia* e em 1943, Rangel registrou as propriedades antitussígenas dessas gomas confirmando assim o uso popular.

Primo (1945) relatou a presença de taninos em *P. rígida*.

Fish *et al*, (1955), estudando varias espécies de *Newtonia* relataram a presença de bases indólicas nas sementes [bufotenina (13), óxido de bufotenina (14) e óxido de N, N dimetiltriptamina (16)] e vagens [N, N dimetiltriptamina (15)] de *P. peregrina* e *P. macrocarpa* (Tabela 1 e Figura 8, pags. 13 e 14).

Em 1956 Raymond-Hamet relatou as propriedades estimulantes do extrato aquoso de *P. peregrina*.

Patcher colaboradores (1959), pesquisando as sementes de *P. colubrina* Benth. (planta utilizada pelos índios Brasileiros), isolou a bufotenina (13). Em 1960 Delaveau relatou as propriedades psicotrópicas e alucinantes de *P. peregrina*. Giesbrecht (1960) relatou a ocorrência de bufotenina (13) nas sementes de *Piptadenia falcata*. Em 1963, Legler & Tschesche, relataram o isolamento da N-metiltriptamina (17), 5-metoxi-N-metiltriptamina (18) e 5-metoxi-N, N-dimetiltriptamina (19) das cascas de *P. peregrina* (Tabela 1 e Figura 8, pags. 13 e 14).

Em espécies de *Piptadenia* argentinas, Lacobucci & Ruveda, (1964) relataram o isolamento de bufotenina (13) e a N, N-dimetiltriptamina (15) das sementes e vagens de *P. macrocarpa*, óxido de bufotenina (14) das sementes e 5-metoxi-N-metiltriptamina (18) das cascas da espécie *P. macrocarpa*. De *P. excelsa* foram identificadas a bufotenina (13) e óxido de bufotenina (14) nas sementes e vagens, e a N, N dimetiltriptamina (15) nas vagens (Tabela 1 Figura 8 pags. 13 e 14). Enquanto que trabalhos de prospecção química com *P. paraguayensis* (casca, sementes e vagens), *P. rígida* (sementes) e *P. viridiflora* (vagens com sementes misturadas) revelaram teste negativo para alcalóides.

Paris *et al* em 1967, pesquisando a espécie *P. peregrina* verificaram a presença de bufotenina (13), óxido de bufotenina (14) e N, N dimetiltriptamina (15) nas sementes, e taninos polifenólicos, catéquicos nas vagens e cascas (Tabela 1 e Figura 8 pags. 13 e 14).

Em 1972, Yamasato *et al*, relataram o isolamento de teobromina (20) das sementes de *P. leprostachya* e bufotenina (13) em *P. contorta* e *P. moniliformis*. O estudo da madeira de *P. macrocarpa* resultou no isolamento de dalbergina (21), lupenona (22), lupeol (23), sitosterol (24) β -glicosil-sitosterol (25) (Miyauchi *et al.*, 1976) (Tabela 1 Figura 8 pags. 13 e 14).

Bulhões *et al*, (1976) pesquisando plantas nativas do nordeste brasileiro, constataram a presença de esteróides, heterosídeos e taninos na casca do caule de *P. columbrina* e Rendon & Willy (1985) relatou o isolamento de bufotenina (13) das sementes de *P. macrocarpa* com um rendimento de 0,5%.

Delgobo *et al*, (1999) isolaram monossacarídeos e heteropolissacarídeos da goma exsudada da casca de *P. columbrina*, utilizada para o tratamento de

problemas respiratórios. Piacente *et al.* (1999) investigando a casca de *P. macrocarpa* isolaram como substância principal, o flavonóide fisetinidol-3-O- β -D-xilopiranosídeo [anadantosídeo, (26)] (Tabela 1 e Figura 8, p. 13 e 14).

A seguinte tabela apresenta um resumo do perfil químico do gênero através de um levantamento bibliográfico realizado no período de 1955 a 1999.

Tabela 1. Classes de Substâncias Isoladas do Gênero *Piptadenia* (*Newtonia*)

Espécie	Material vegetal	Substâncias	Referência
<i>P. peregrina</i>	Sementes e vagens	13, 14, 15, 16 (alcalóides)	Fisch <i>et al.</i> (1955)
<i>P. macrocarpa</i>	Sementes e vagens	13, 14, 15, 16 (alcalóides)	Fisch <i>et al.</i> (1955)
<i>P. colubrina</i>	Sementes	13 (alcalóide)	Pachter <i>et al.</i> (1959)
<i>P. falcata</i>	Sementes	13 (alcalóide)	Giesbrecht <i>et al.</i> (1960)
<i>P. peregrina</i>	Cascas	17, 18, 19 (alcalóides)	Legler <i>et al.</i> (1963)
<i>P. macrocarpa</i>	Vagens, sementes, cascas	13, 14, 15, 18 (alcalóides)	Lacobucci <i>et al.</i> (1964)
<i>P. excelsa</i>	Vagens	13, 14, 15 (alcalóides)	Lacobucci <i>et al.</i> (1964)
<i>P. peregrina</i>	Sementes	13, 14, 15 (alcalóides)	Paris <i>et al.</i> (1967)
<i>P. leprostachya</i>	Sementes	20 (alcalóide)	Yamasato <i>et al.</i> (1972)
<i>P. contorta</i>	Sementes	13 (alcalóide)	Yamasato <i>et al.</i> (1972)
<i>P. moniliformsi</i>	Sementes	13 (alcalóide)	Yamasato <i>et al.</i> (1972)
<i>P. macrocarpa</i>	Madeira	21, 22, 23, 24,25 (cumarina, triterpenos e esteróides)	Miyauchi <i>et al.</i> (1976)
<i>P. macrocarpa</i>	Sementes	13 (alcalóide)	Rendon <i>et al.</i> (1985)
<i>P. macrocarpa</i>	Casca	26 (flavonóide)	Piacente <i>et al.</i> (1999)

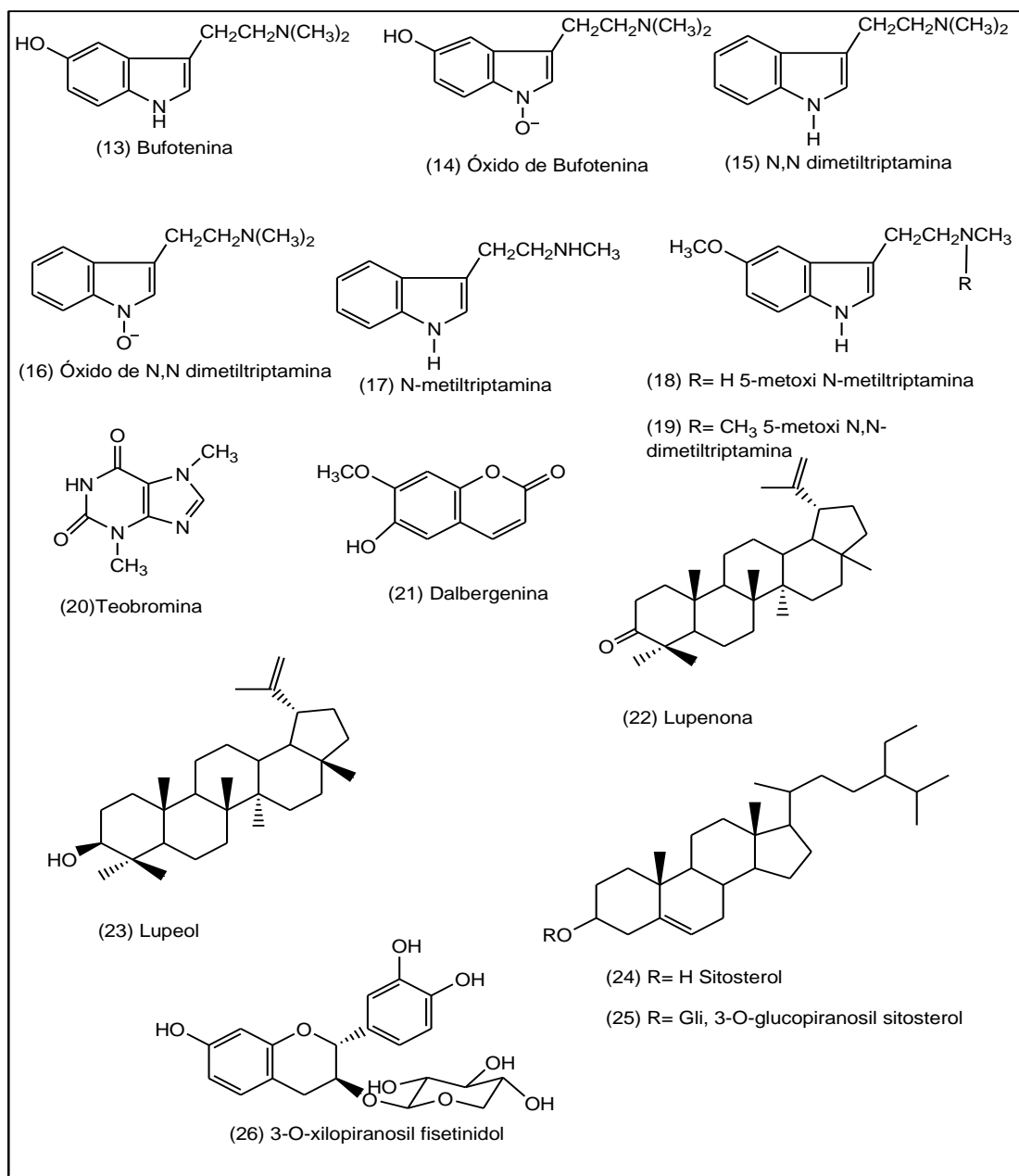


Figura 8. Estruturas das Substâncias Isoladas do Gênero *Newtonia* (*Piptadenia*)

2.3. A ESPÉCIE *Newtonia contorta*

A espécie *Newtonia contorta*, sinonímia *Acacia contorta*, *Newtonia nitida*, *Piptadenia contorta*, *Piptadenia nitida* e *Pseudopiptadenia contorta* é um dos representantes da ordem Fabales, subfamília Mimosoideae e tribo Mimoseae (www.tropicos.org).

A Floresta Atlântica é hábitat predominante e, às vezes, exclusivo das espécies do gênero. *Newtonia contorta* (DC.) Burkart é freqüente na Floresta

Ombrófila Densa tanto nas fisionomias submontanas como Montana (Velooso 1992), restingas e matas de cipó, nos Estados da Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Lewis & Lima 1990). É a espécie de mais ampla distribuição do gênero, bastante característica das matas de encosta e de restinga do estado do Rio de Janeiro (Lewis & Lima 1990). No Parque Nacional do Itatiaia (PARNA Itatiaia) a espécie ocorre em altitudes de 700 até 900 m, em geral em encostas e no interior da mata (Lewis & Lima 1990). Em Poço das Antas, a espécie ocorre em Floresta Ombrófila Densa Submontana (Velooso 1992) onde a topografia é predominantemente de planície, com morros e morrotes de perfis arredondados, cuja altura varia de 30 a 200 m, separados por várzeas alagadiças de fundo achatado (Rôças *et al.* 2001).

2.4. POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DA ESPÉCIE ESTUDADA

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-Reino: Viridiplantae

Filo: Estreptofita

Classe: Equisetopsidae

Sub-Classe: Rosidae

Superordem: Rosanae

Ordem: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamília: Mimosoideae

Tribo: Mimoseae

Gênero: *Newtonia*

Espécie: *Newtonia contorta* (DC.) Bukart

Basionimo: *Acacia contorta* (DC.); *Piptadenia contorta* (DC.) Benth.; *Pseudopiptadenia contorta* (DC.) G.P. Lewis & M.P. Lima.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=148736>

3. METABÓLITOS ESPECIAIS (SECUNDÁRIOS)

Os vegetais produzem uma grande variedade de substâncias orgânicas que parecem não ter função direta sobre seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias, conhecidas como metabólitos secundários (especiais ou naturais), não apresentam efeitos diretos sobre processos celulares primários como fotossíntese, respiração, translocação de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes, dentre outros. Eles diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) pela distribuição restrita no reino vegetal, sendo característicos de uma espécie ou de um grupo de espécies relacionadas, enquanto os metabólitos primários são de ocorrência universal (Costa, 1978).

Os metabólitos secundários podem atuar como substâncias de defesa contra herbívoros e patógenos, sendo divididos em três grupos principais: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (Vickery & Vickery, 1981).

Terpenóides constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas classes são, em geral, insolúveis em água (Robinson, 1991).

As substâncias fenólicas constituem em vegetais um grupo muito heterogêneo com mais de 10.000 substâncias. As quais apresentam funções metabólicas variadas. Duas vias metabólicas estão envolvidas na biossíntese de substâncias fenólicas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. (Robinson, 1991).

As substâncias nitrogenadas são constituídas por uma grande variedade de metabólitos secundários. Algumas substâncias relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos estão localizadas nesse grupo. Algumas substâncias desse grupo são tóxicas aos humanos, embora outras possam ser utilizadas no tratamento de doenças devido as suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados são biossintetizados a partir de aminoácidos do metabolismo protéico (Costa, 1978).

Na Figura 9, p. 17 apresenta-se a rota biossintética dos principais metabólitos secundários.

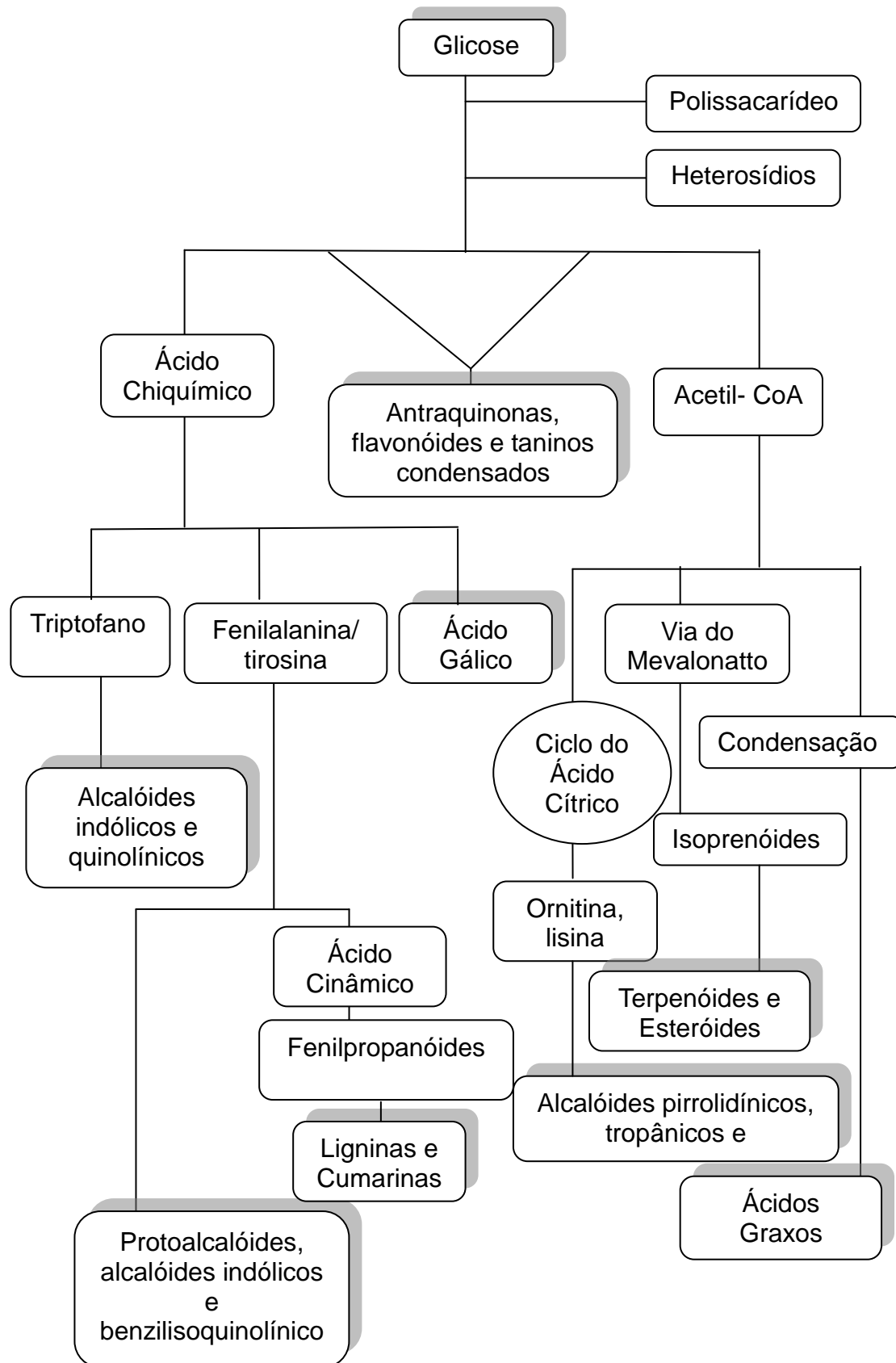


Figura 9- Rota metabólica das principais classes de metabólitos secundários.

Fonte: <http://br.geocites.com/plantastoxicas/rota-metabólica.html>

3.1. TERPENÓIDES

Terpenóides são substâncias derivadas da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. Essas substâncias são freqüentemente encontradas nos óleos essenciais de inúmeras plantas. A classificação dos terpenos está baseada na quantidade de unidades de isopreno contidas na molécula. Cada molécula de isopreno é constituída por 5 átomos de carbonos. Assim sendo, um hemiterpeno apresenta 5 carbonos em sua molécula, os monoterpenos, 10 carbonos; sesquiterpenos, 15 carbonos; diterpenos 20 carbonos; triterpenos, 30 carbonos; tetraterpenos, 40 carbonos; e politerpenos, acima de 40 carbonos (Simões *et al*, 1999).

Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, que podem atuar, por exemplo, na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam função protetora contra bactérias e fungos, enquanto muitos diterpenos dão origem a determinados hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenos e seus derivados, os esteróides, apresentam uma ampla gama de funções. Muitos têm função de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos (agentes que impedem a realização da mitose), e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (Vickery & Vickery, 1981; Harbone & Baxter, 1995).

Os terpenóides são biosintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes, como mostrados na Figura 10, p. 19.

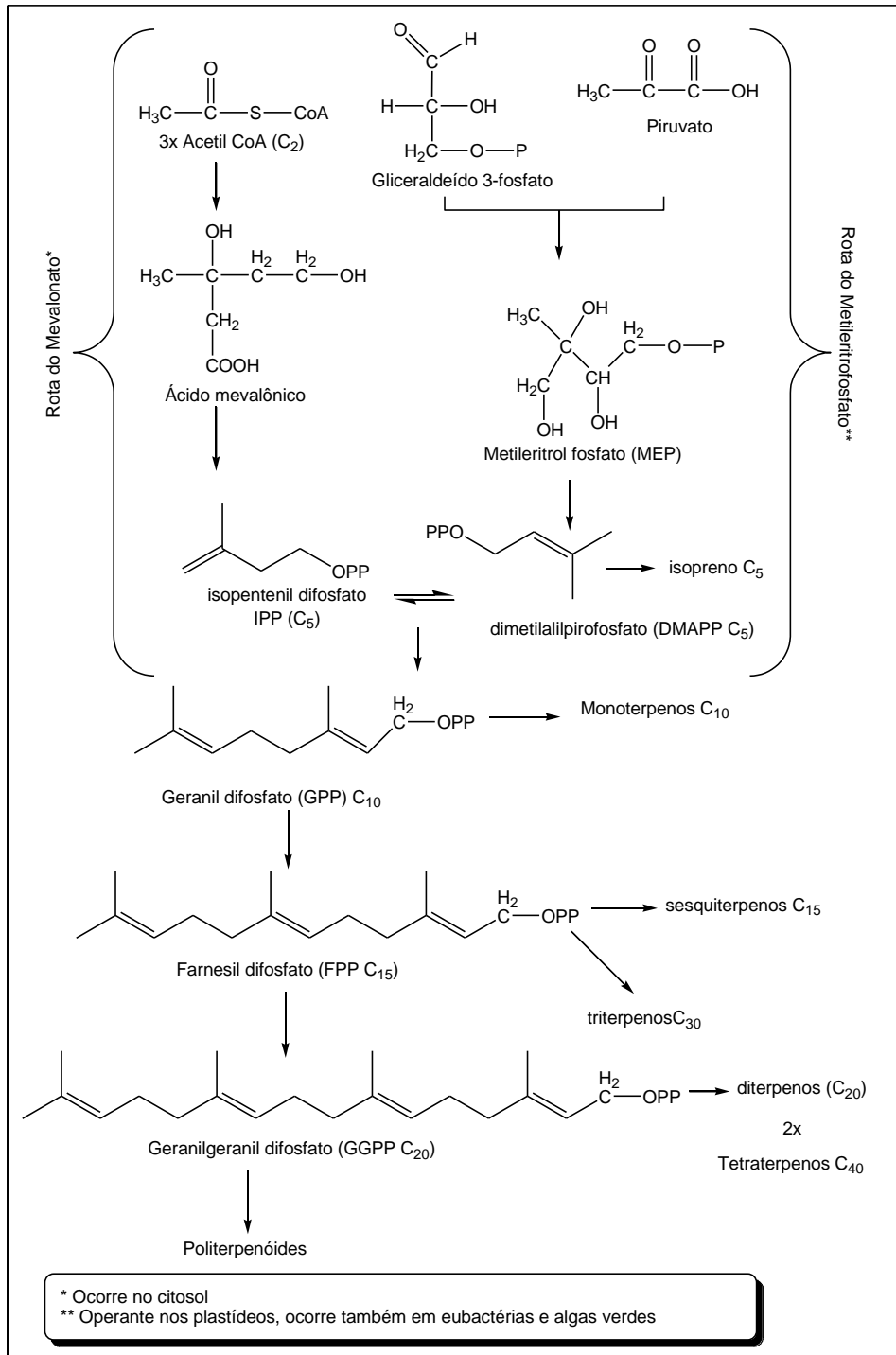


Figura 10. Biossíntese de terpenóides (Fonte: Taiz & Zeiger, 2004)

3.2. ALCALÓIDES

Alcalóides ocorrem em muitas plantas e possuem uma longa e importante história na medicina tradicional (Roberts & Strack, 1999). O uso de extratos de plantas contendo alcalóides como poções, remédios e venenos,

ocorre desde o início da civilização. Cerca de 13000 plantas são conhecidas por terem sido usadas como drogas e aproximadamente 25% dos remédios contemporâneos são derivados de metabólitos de diversas classes, isolados e purificados de plantas, tais como o alcalóide morfina (8) (Figura 1, p. 2), um analgésico narcótico, os agentes quimioterapêuticos vincristina (3) (Figura 1, p. 2) e vimblastina (4) (Figura 1, p. 2), a quinina (9) (Figura 1, p. 2) e o taxol (2) (Figura 1, p. 2) (Kutchan, 1995; Bolzani & Montanari, 2000).

O termo alcalóide é derivado da palavra árabe “al-qali”, denominação vulgar da planta da qual a soda (que tem propriedades alcalinas) foi originalmente obtida. Alcalóides possuem variadas definições e são majoritariamente substâncias orgânicas nitrogenadas, de baixo peso molecular, geralmente com estrutura heterocíclica (Memelink *et al.*, 2001).

Embora sendo classificados como metabólitos especiais eles apresentam papel importante para a existência dos vegetais. Varias são as funções dos alcalóides nas plantas, principalmente na proteção contra *stress* ambientais. Alguns alcalóides protegem a planta contra radiação Ultravioleta, devido ao fato de que, sua maioria apresenta núcleos aromáticos altamente absorventes desta radiação (Jansen *et al.*, 1998). E estão envolvidos no mecanismo de defesa, podendo atuar em resposta a herbivoria e ataques de patógenos (Wittstock & Gershenzon, 2002).

Cerca de 2000 alcalóides conhecidos são do tipo indólicos, ou seja, possuem um anel indólico em sua estrutura, uma versátil estrutura heterocíclica descoberta em 1866, e encontrada em um considerável número de produtos medicinais derivados de plantas (Willians, 2001). Nas Figuras 11 e 1 p. 2 e 21, apresentam-se exemplos de alcalóides indólicos com atividade comprovada.

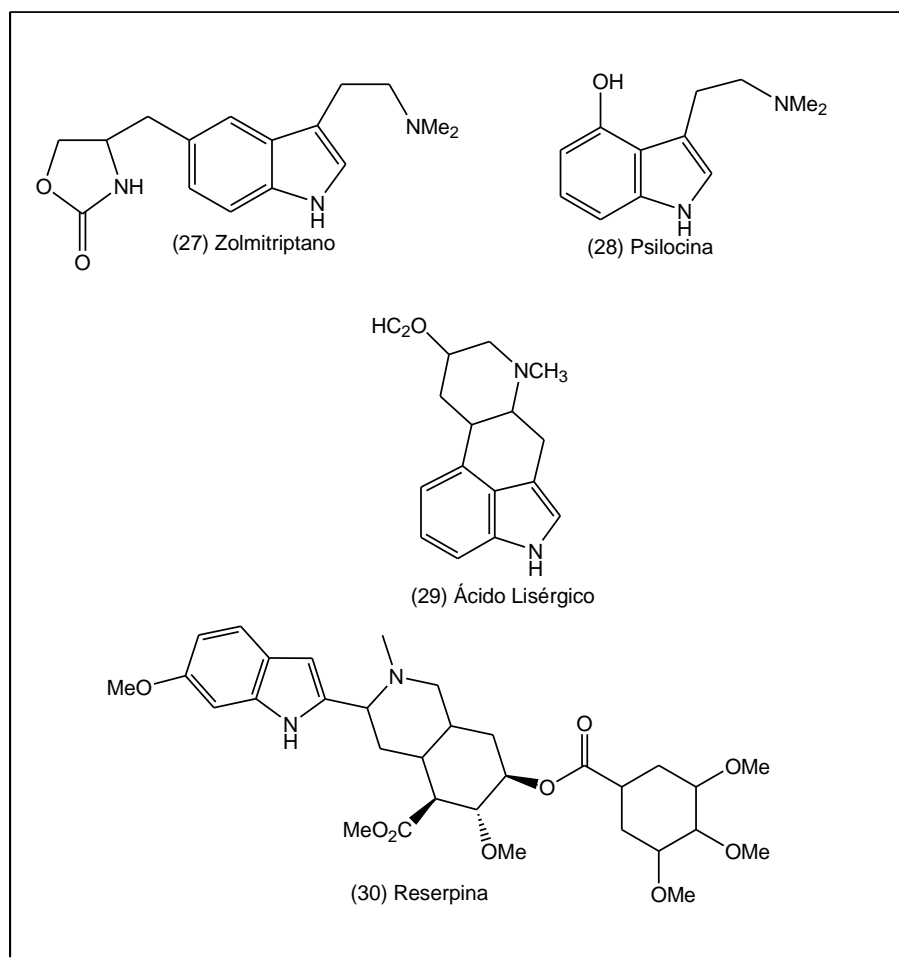


Figura 11. Estruturas de alguns alcalóides indólicos

Essa classe de substância pode ser subdividida em dois grupos: um grupo maior conhecido como alcalóides indólicos monoterpênicos e outro com os demais alcalóides indólicos (Schripsema *et al.*, 2001).

4. METABOLISMO PRIMÁRIO

4.1. CARBOIDRATOS

A palavra carboidrato surgiu pela primeira vez durante o século XIX para descrever uma família de substâncias com fórmula geral $C_n(H_2O)_n$, conhecida também como hidratos de carbono. Com a descoberta de novas substâncias que não obedeciam a essa fórmula, mas apresentavam às mesmas propriedades químicas, o termo carboidrato foi modificado e ampliado. Nessa nova definição foram incluídas as substâncias poli-hidroxiladas de aldeídos,

cetonas, álcoois e ácidos e seus derivados simples, bem como seus polímeros que tenham ligações poliméricas do tipo acetal. Dessa forma, atualmente, mesmo as moléculas que não se ajustam à fórmula geral $C_n(H_2O)_n$ são consideradas carboidratos (Hecht, 1999).

Os carboidratos têm sido importantes a mais de 100 anos e o estudo de suas atividades e colaboradores tem crescido de forma surpreendente, principalmente com relação à diversidade de atividades biológicas, tais como: as atividades antibacterianas, antivirais, antineoplásicas, antiprotozoárias, antifúngicas, entre outras, relatadas recentemente na literatura.

4.1.1. ATIVIDADE BACTERICIDA DE DERIVADOS DE CARBOIDRATOS

Devulapalle (2004) testaram alguns ésteres graxos da sacarose (31), maltose (32) e maltotriose (33) (Figura 12) preparados por processos enzimáticos, quando testadas frente à bactéria *Streptococcus sobrinus* apresentaram capacidade inibitória de 100% (100 $\mu\text{g/mL}$). Deste modo, esses derivados de carboidratos não tóxicos são muito promissores, principalmente quanto a sua inclusão em produtos de higiene oral para o combate da placa bacteriana e prevenção de cáries (Devulapalle *et al.*, 2004).

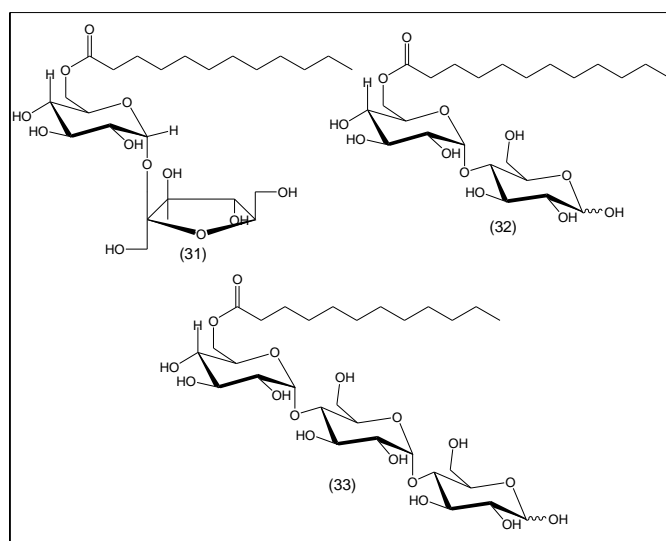


Figura 12. 6-O-Lauroil-sacarose , 6'-O-lauroil-maltose , 6''-O-lauroil-maltotriose (Fonte: Nogueira C.M. *et al*, 2009.)

Veres-Bencomo e colaboradores (2004) relataram à síntese em larga escala, o desenvolvimento farmacológico e a avaliação clínica da primeira vacina comercial derivada de um carboidrato sintético (34), que foi aprovada em Cuba contra a bactéria *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib) causadora de pneumonia e meningite, principalmente em crianças (Figura 13), (Veres-Bencomo *et al.*, 2004).

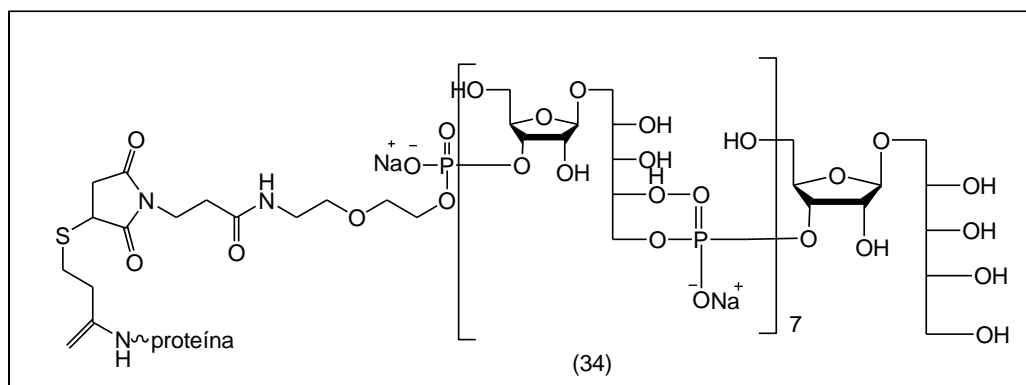


Figura 13. Primeira vacina comercial com uma porção de carboidrato sintético (Fonte: Nogueira *et al.*, 2009)

Nobmann *et al* (2009) investigaram novos ésteres e éteres de carboidratos monossustituídos com ácidos graxos com relação à atividade frente à *Listeria sp.*, que é um agente patogênico alimentar que pode estar presente em alimentos prontos e alimentos lácteos. Dentre os derivados de carboidratos sintetizados, o éter láurico do α -D-glicopiranosídeo de metila (35) e o éster láurico do α -D-manopiranosídeo de metila (36) apresentaram o maior efeito inibitório MIC = 0,04 mM (Figura 14). Essas substâncias são geralmente mais ativas frente às bactérias Gram positivas do que nas Gram negativas.

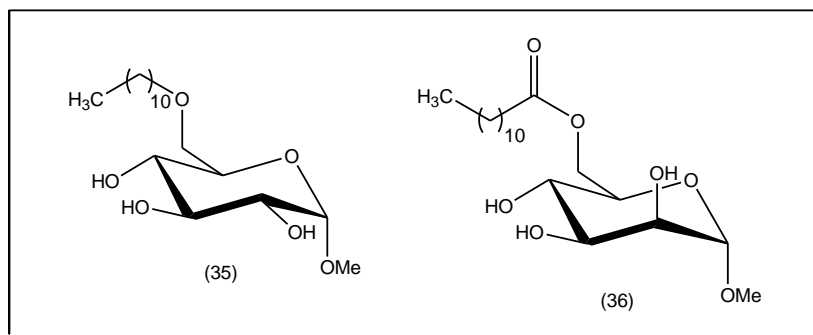


Figura 14. Éter láurico do α -D-glicopiranosídeo de metila e o éster láurico do α -D-manopiranosídeo de metila (Fonte: Nogueira *et al.*, 2009.)

4.1.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS DE CARBOIDRATOS

Muhizi e colaboradores (2008) trabalhando com derivados da glicose verificaram atividade fungicida da N-dodecanoilglicosilamina (37) frente ao crescimento de dois fungos da madeira, *Coriolus versicolor* e *Poria placenta*. Na Figura 15 apresenta-se a estrutura da N-dodecanoilglicosilamina.

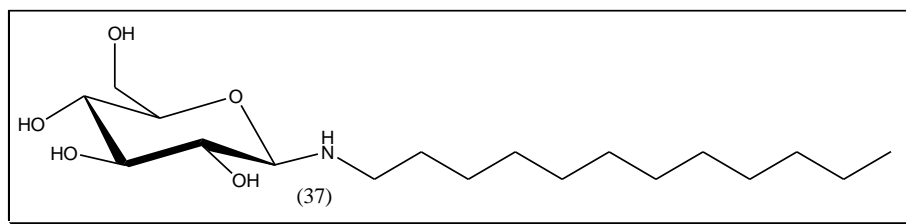


Figura 15. Estrutura da N-dodecanoilglicosilamina (Fonte: Nogueira C.M. *et al*, 2009.)

4.1.3. OUTRAS ATIVIDADES ATRIBUÍDAS AOS CARBOIDRATOS

Puterka e colaboradores (2003) trabalhando com derivados da sacarose demonstraram que o palmitato de sacarose (38) apresenta ação inseticida frente à praga da mosca-branca. Também foi verificada a ação do octanoato de sacarose (39), em baixas concentrações, contra a *Cacopsylla pyricola*, inseto que ataca a pêra, a *Myzus nicotianae*, afídeo que ataca o tabaco e a *Tetranychus urticae*, acáro rajado que ataca a maçã (Figura 16).

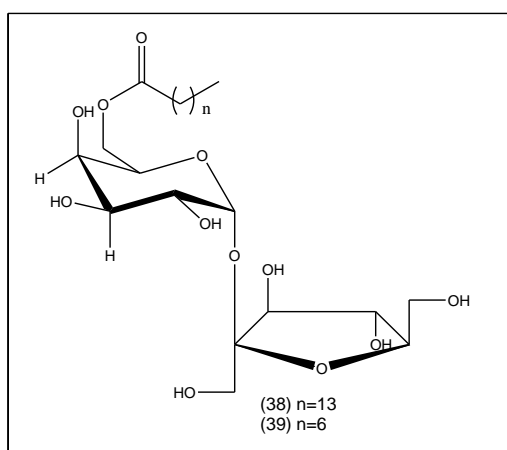


Figura 16. Ésteres graxos da sacarose com ação inseticida (Fonte: Nogueira *et al.*, 2009.)

Sandbhor *et al.* (2008) prepararam uma série de iminoalditóis análogos de galactofuranoses. A atividade destas substâncias foram investigadas frente à galactosidases e glicosidases. A substância (40) (mistura de diastereoisômeros) apresentou atividade frente a β -galactosidase do fígado bovino, $IC_{50} = 2,74 \mu M$ (81% a $100 \mu M$), e ativador da α -galactosidase do grão-de-café, $AC_{50} = 47 \mu M$ (62% a $100 \mu M$) (Figura 17).

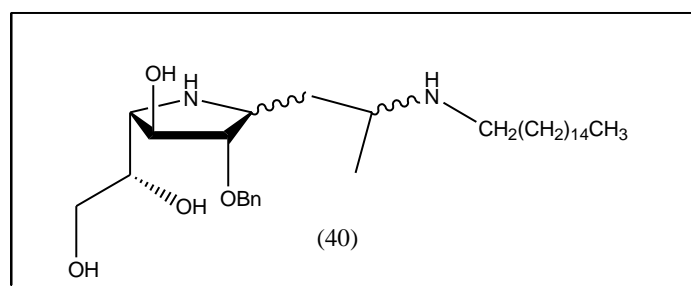


Figura 17. Estrutura de um iminoalditol (Fonte: Nogueira *et al.*, 2009.)

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desta dissertação visou o conhecimento da química de espécies do estrato arbóreo da região norte - noroeste Fluminense, através do estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica e antioxidante de um espécime de *N. contorta*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os constituintes químicos dos extratos brutos do caule de *N. contorta* através de técnicas cromatográficas clássicas;
- Purificar os constituintes isolados através de cromatografia e/ou recristalização;
- Identificar os constituintes isolados através de técnicas espectrométricas (espectrometria na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa);
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos de *N. contorta* frente às larvas de *Artemia salina*.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos polares do caule de *N. contorta* utilizando a reação de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Aparelho de ponto de fusão MQAPF - 301, Microquímica;
- Balança analítica marca Gehaka;
- Balança Triple beam balance, Ohaus;
- Câmara escura UV, Cienlab;
- Capela de exaustão;
- Espectrofotômetro, Perkin Elmer, modelo FT-IR;
- Espectrofotômetro, Bel spectrophotometer, modelo SP 1105;
- Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), modelo QP- 5050, Shimadzu;
- Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), modelo QP-QP2010 Plus (UFRRJ);
- Dessecador;
- Espectrômetro de RMN, Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C – UENF;
- Espectrômetro de RMN, Bruker, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C – UFRRJ;
- Estufa, Med clave;
- Evaporador rotatório, Fisaton;
- Luz ultravioleta portátil, Mineral lamp, modelo UVGL-25;
- Micropipetas multicanal (8 canais), volume ajustável 0,25-10 mL, 5-100 mL e 20-250 ml, Gilson;
- Minivortex, biomix, modelo QL 901;
- Moinho de facas tipo Willey;
- Placa de aquecimento, Corning;
- Soxhlet;
- Soprador serigráfico, Sternel, modelo HL 500;
- Ultra-som, Unique, modelo USC 1450.

6.2. REAGENTES UTILIZADOS

- Acetato de etila P.A., Vetex, Synth;
- Acetona P.A., Synth;
- Ácido acético glacial P.A., Vetec;
- Ácido clorídrico., Vetec;
- Ácido sulfúrico P.A., Isofar;
- Anidrido acético P.A., Vetec;
- Carbonato de cálcio., Vetec;
- Carbonato de sódio, Merck;
- Cloreto de cálcio., Vetec;
- Cloreto de magnésio., Vetec;
- Cloreto de sódio., Vetec, Reagen;
- Clorofórmio deuterado, Cambridge Isotope;
- Clorofórmio P.A., Synth;
- Diclorometano P.A., Synth;
- 2,2- Difenil-1-picril-hidrazila, Aldrich;
- 4- dimetilaminopiridina, Sigma- Aldrich;
- Dimetilsulfóxido (DMSO),. Vetec;
- Etanol P.A., Synth;
- Éter de petróleo, Synth;
- Hexano P.A., Synth;
- Hidróxido de amônio P.A., Merck;
- Hidróxido de sódio P.A., Merck;
- Metanol deuterado, Cambridge Isotope;
- Metanol P.A., Synth;
- *n*-Butanol, Synth;
- Piridina, Merck;
- Sulfato de cobre, Vetec;
- Sulfato de sódio anidro P.A., Vetec.
- Vanilina, Vetec.

6.3. MATERIAIS DE CONSUMO UTILIZADOS

- Celite, Vetec;
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel 60, Merck;
- Papel de filtro qualitativo, porosidade 3 micras, Nalgon;
- Papel de pH Universalindikator pH 0-14, Merck;
- Pipetas de Pasteur;
- Ponteiras, 0,2-10 mL, VWR;
- Sephadex® lipofílico (LH-20), malha 25-100 mm, Pharmacia;
- Sílica gel 60G F₂₅₄ para CCDP, Merck;
- Sílica gel 60G F₂₅₄ para CCDA, Merck;
- Sílica gel para coluna, 70-230 mm, Merck;
- Sílica gel para coluna, 0,04 - 0,063 mm, Merck;
- Tubos de ressonância, 5 mm, Wilmad-Lab-Glass;

6.4. SOLUÇÃO REVELADORA EMPREGADA NO PROCESSO CROMATOGRÁFICO EM CAMADA DELGADA

6.4.1. SOLUÇÃO DE VANILINA SULFÚRICA

Foi preparada uma solução de vanilina sulfúrica a partir da adição de 3 gramas de vanilina em 135 mL de água destilada juntamente com 135 mL de álcool etílico e 30 mL de ácido sulfúrico.

6.5. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Realizado através de pesquisas bibliográficas de periódicos em bibliotecas e em sítios disponíveis na INTERNET. O levantamento bibliográfico foi realizado para a verificação de espécies de plantas que ainda não haviam sido estudadas fitoquimicamente na região.

6.6. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O caule da espécie *N. contorta* foi coletado no Parque Taquaruçú (Mata do Bom Jesus), localizado na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, em maio de 2008.

6.7. SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL

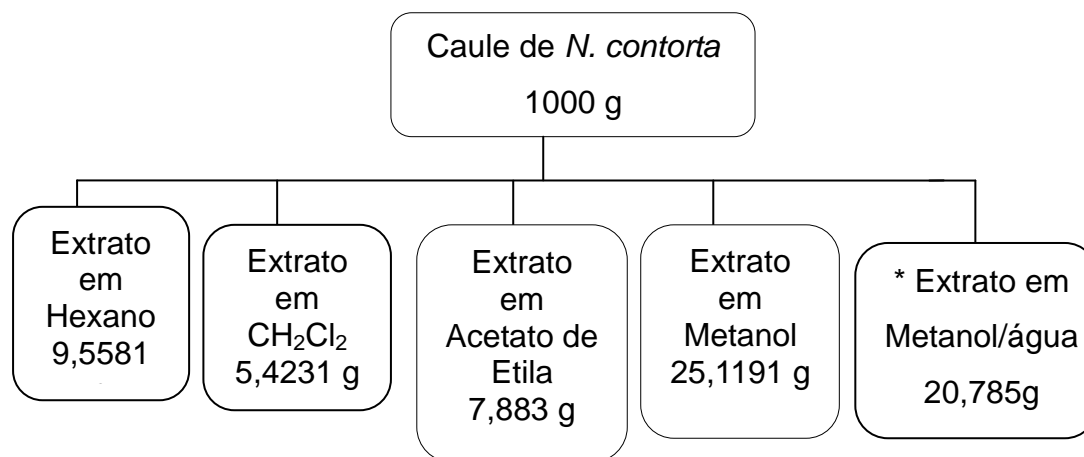
O material vegetal após seco á temperatura ambiente foi moído em moinho do tipo Willey e posteriormente pesado.

6.8. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

O material botânico seco e pesado foi submetido á extração á quente em Soxhlet nos seguintes solventes hexano e posteriormente diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol/água. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, a aproximadamente 50°C, sob pressão reduzida. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para frascos previamente pesados e mantidos em capela de exaustão, por no mínimo 48h.

Esse procedimento forneceu 9,5581g de extrato hexânico, 5,2231 de extrato em diclorometano, 7,883g de extrato em acetato de etila 25,1191g de extrato em metanol e 20,785g de extrato em metanol/água.(Figura 18).

Todos os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel (CCDA), utilizando-se diversos eluentes. Apresenta-se na Figura 18 o fluxograma resumido do fracionamento dos extratos. Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm) e posteriormente revelado com a solução reveladora descrita no item 6.4. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis e transferidas para frascos previamente tarados e mantidas em capela de exaustão, para eliminação do solvente remanescente.



*Extrato não trabalhado

Figura 18. Fluxograma dos extratos obtidos do caule de *N. contorta*

7. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

7.1. EXTRATO EM HEXANO

Uma alíquota do extrato hexânico 2,12 g foi reservado para avaliação da atividade biológica o restante do material 7,43 g foi submetido à filtração utilizando como material filtrante uma mistura contendo celite, sílica, CaCO_3 e Na_2CO_3 . Os solventes utilizados foram diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH). Esse procedimento resultou em duas frações: fração A [filtrado em CH_2Cl_2 (rica em ácidos graxos)] e fração B [filtrado em MeOH (triterpenos)].

O solvente da fração A foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo deixado em dessecador até peso constante. Posteriormente uma alíquota do resíduo (100 mg) foi submetida à reação de transesterificação com solução metanólica 2 mol L^{-1} de KOH (item 7.1.1). Os ésteres de ácidos graxos obtidos a partir dessa reação foram codificados como **NCHP** e analisados através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os índices de similaridade dos fragmentogramas obtidos foram comparados com a biblioteca (NIST) do espectrômetro de massas.

O fluxograma resumido do procedimento realizado com extrato hexânico encontra-se na Figura 19 p. 33.

Outra alíquota da fração A (680 mg) foi submetida a cromatografia tipo *flash* em coluna de gel de sílica utilizando como eluente: hexano e diclorometano (1:2). Foram obtidas 45 frações que foram reunidas de acordo

com a semelhança de Rf após análise de CCDA. A subfração (14 - 20, (100 mg) foi codificada como **NCH (lupeol)**.

A subfração (6-10, 90 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior, utilizando como eluente: éter de petróleo: clorofórmio (2:1). Foram obtidas 13 frações e após análise por CCDA foram reunidas de acordo com a semelhança de Rf. A subfração (8-13, 63 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o mesmo eluente obtendo-se a substância codificada como **NCH2 (lupenona)**.

A fração B foi evaporada sob pressão reduzida e colocada em dessecador até peso constante e submetida a fracionamento e purificação. Para tal foram utilizadas cromatografia em coluna aberta de gel de sílica.

Uma alíquota dessa fração (2 g) foi fracionada em coluna de gel de sílica, utilizando como eluente: diclorometano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. Após este procedimento foram obtidas 145 subfrações. Após análise por CCDA, as frações que apresentaram o mesmo Rf foram reunidas.

A subfração (7-34) (63,5 mg) foi identificada como sendo a substância **NCH (lupeol)**, já isolada do extrato hexânico.

A subfração (103- 117) se apresentou como um sólido branco e então foi submetida a uma coluna de sílica tipo *flash* utilizando como eluente diclorometano e acetato de etila (6:1), sendo obtidas 44 frações que foram reunidas por semelhança de Rf em CCDA , a subfração (7-15) revelou-se como uma única mancha e codificada como **NCH1 (28-hidroxi-lupeol)**.

7.1.1. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Colocou-se em um tubo de ensaio aproximadamente 100 mg da fração em CH₂Cl₂ (oriunda da filtração do extrato hexânico), 2ml de hexano e 0,2 mL de solução metanólica 2 mol/ l⁻¹ de KOH. Agitou-se o tubo por aproximadamente 5 minutos em agitador de vórtex e adicionou-se 1 mL de solução saturada de cloreto de sódio e agitou novamente. A fase orgânica (contendo os ésteres de ácidos graxos) foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada.

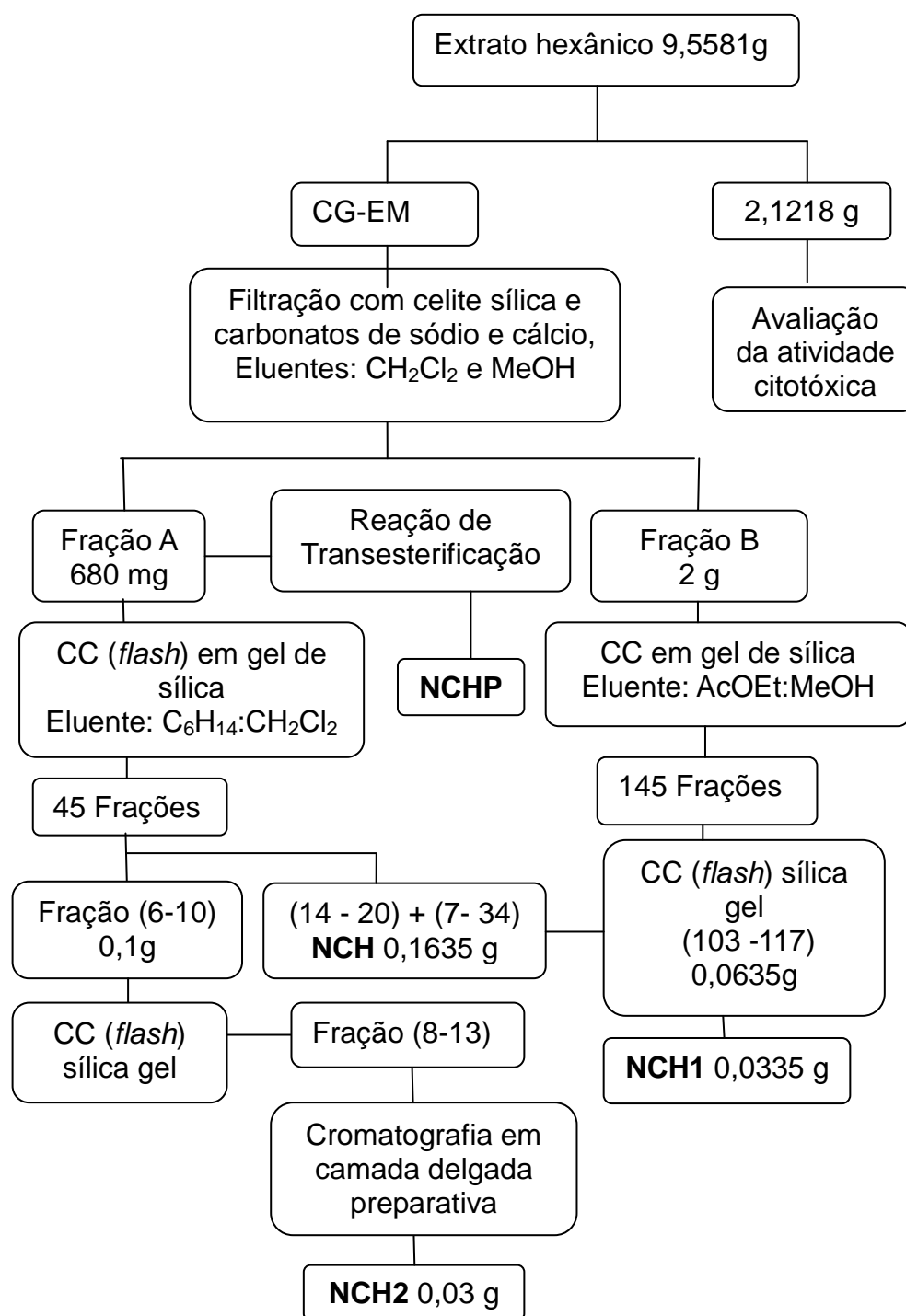


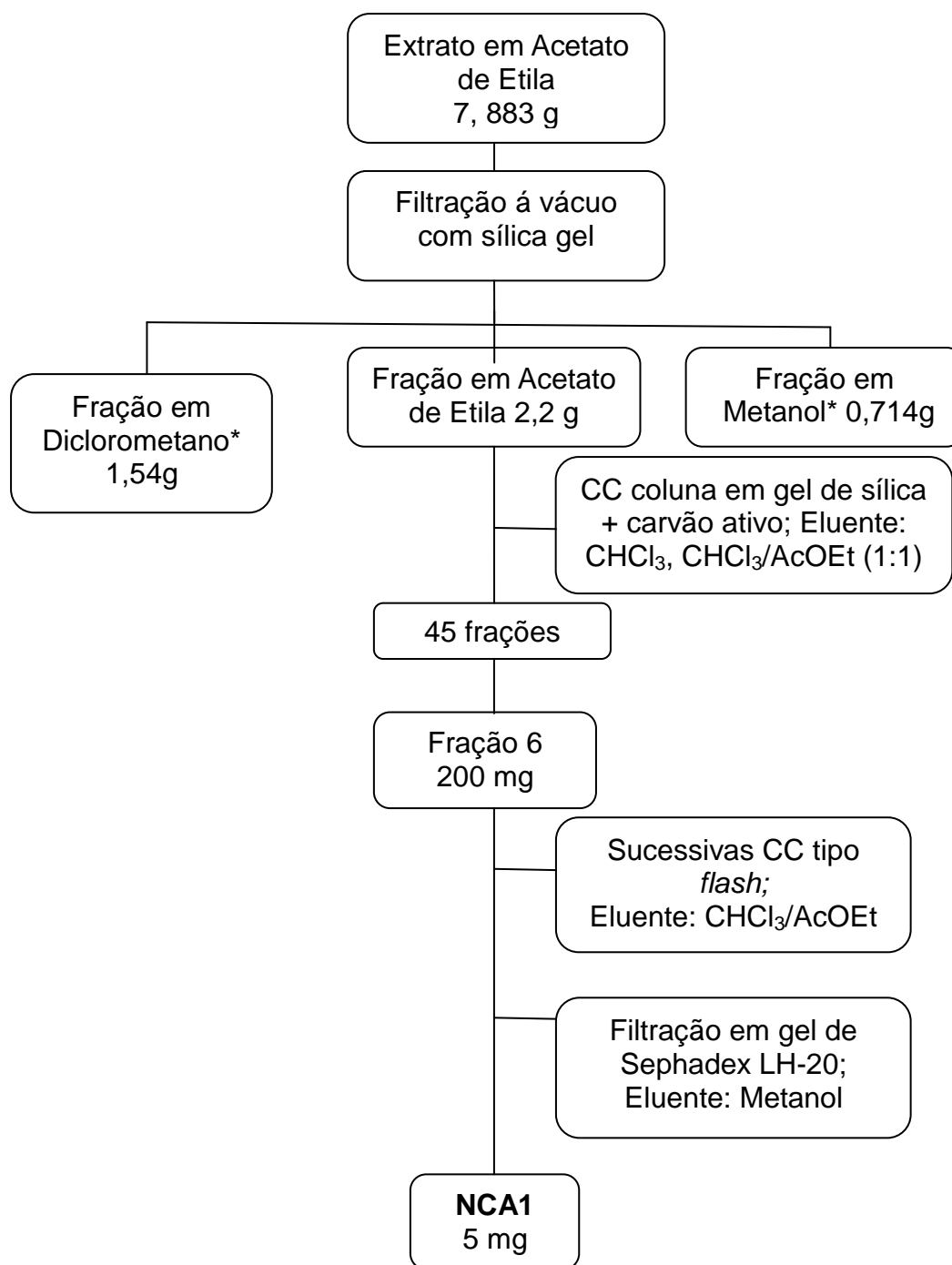
Figura 19. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato hexânico.

7.2. EXTRATO EM ACETATO DE ETILA

O extrato em acetato de etila (7,8 g) foi filtrado á vácuo com sílica gel em funil de Buckner, utilizando os seguintes solventes: diclorometano, acetato de etila e metanol.

A fração em acetato de etila (2,2 g) foi submetida a uma coluna em gel de sílica com carvão ativo, utilizando os seguintes eluentes: clorofórmio e acetato (1:1). Foram obtidas 45 subfrações, sendo que a subfração 6 (200 mg) foi submetida a uma coluna tipo *flash* de sílica gel com os seguintes eluentes: clorofórmio: acetato de etila (8:1). Este procedimento resultou em 63 subfrações que foram reunidas por semelhança de Rf em CCDA. A subfração 9 -15 (287 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior e obteve-se 49 subfrações. A subfração 27- 34 (105 mg) também foi submetida ao mesmo procedimento resultando em 50 subfrações. A subfração 10 – 17 apresentou-se como uma mancha vermelha quando revelada em solução de vanilina sulfúrica. Posterior filtração em Sephadex LH-20 utilizando como eluente metanol, resultou em 17 subfrações. A subfração 13 foi codificada de **NCA1** (ácido-3-indol carboxílico).

Na Figura 20, p.35 apresenta-se o fluxograma resumido do fracionamento do extrato em acetato de etila.



*Frações não trabalhadas

Figura 20. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato em acetato de etila

7.3. EXTRATO METANÓLICO

Cerca de 25,0 g do resíduo do extrato metanólico foi solubilizado em metanol. Após adicionou-se acetato de etila até que ocorresse a formação de precipitado. O precipitado foi separado do sobrenadante através de filtração em papel de filtro. O solvente do sobrenadante (fração 1) foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo solubilizado em metanol. Após adicionou-se éter de petróleo para forçar nova formação de precipitado.

O fracionamento da fração 1 esta resumido na Figura 21.

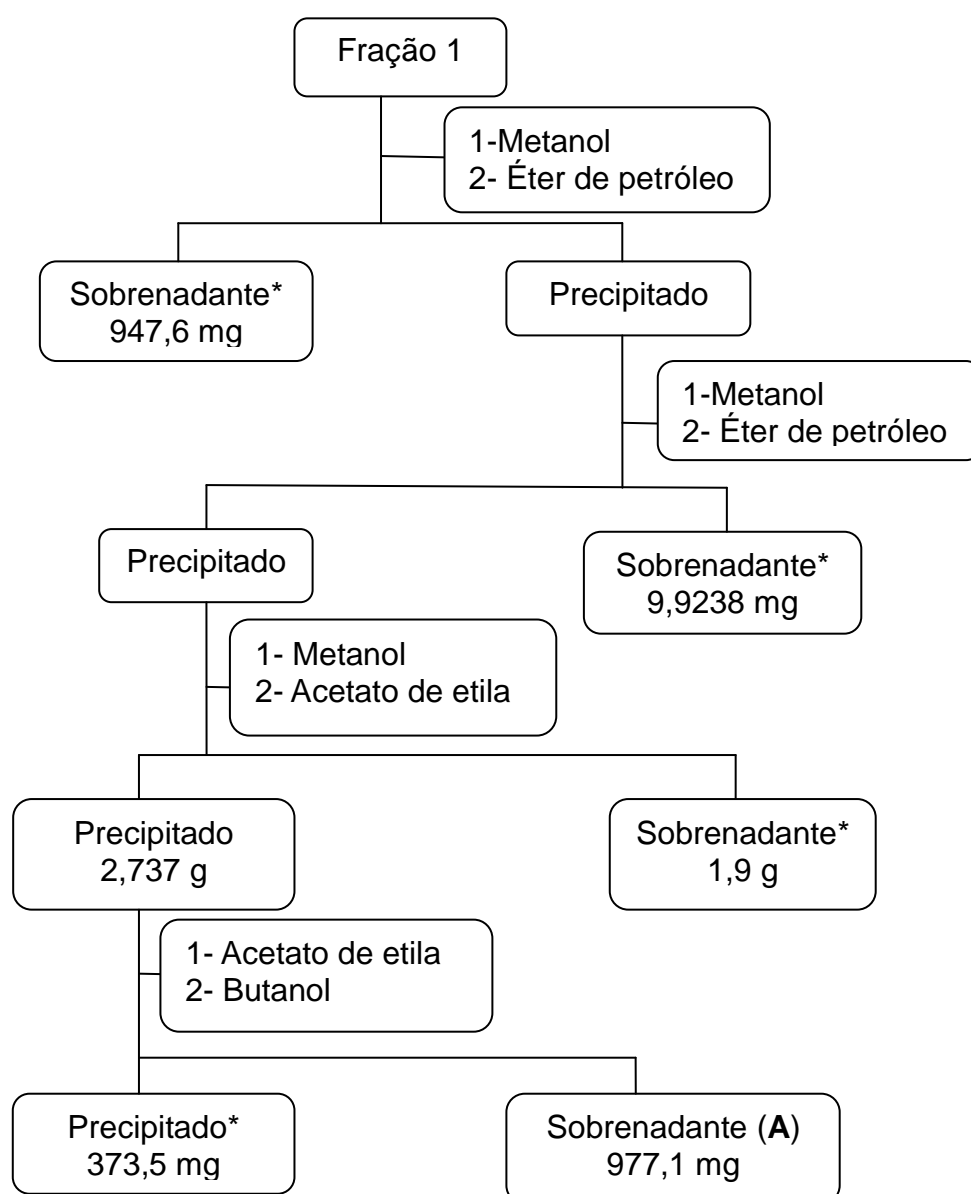


Figura 21. Fluxograma resumido do fracionamento da (fração 1) do extrato metanólico (* Frações não trabalhadas).

O solvente do sobrenadante (**A**) foi evaporado e o resíduo (977,1 mg) submetido a filtração em Sephadex LH-20, utilizando como eluente MeOH. Este procedimento resultou em 25 frações que foram reunidas através de semelhança de Rf em CCDA. A fração 9 - 25 (508,2 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior, utilizando-se desta vez como eluente CHCl₃/MeOH (1:1). Este procedimento resultou em 27 frações. A fração 15 - 27 (323,5 mg) foi submetida a reação de acetilação conforme descrito no item 7.3.1.

Na Figura 22 apresenta-se o fluxograma resumido do fracionamento do sobrenadante (A).

7.3.1. REAÇÃO DE ACETILAÇÃO

Preparou-se uma solução de anidrido acético e piridina (catalisador) na proporção (9:1) respectivamente.

A amostra (323,5 mg) foi colocada em um Becker e adicionou-se aproximadamente 2 mL da solução anterior, aqueceu-se a mistura reacional (aprox. 50°C) e deixou-se em repouso por uma noite, após este período adicionou-se água gelada (2 mL) e submeteu-se a extração em ampola de separação utilizando AcOEt (4 mL) por três vezes .

A fase orgânica foi lavada com água várias vezes para retirar o excesso de piridina. Após adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e procedeu-se a evaporação em evaporador rotatório. Posteriormente o produto acetilado (316,5 mg) foi submetido à CC tipo *flash* em gel de sílica, utilizando como eluente CHCl₃, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Este procedimento resultou em 51 frações que foram reunidas por semelhança de Rf em CCDA. A fração 7 - 8 (38,1 mg) foi codificada de **NCM1**(acetato de alditóis). A subfração 12 -51 (32 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior utilizando como eluente CHCl₃/AcOEt (1:1). Foram obtidas 33 frações que foram reunidas de acordo com a semelhança de Rf em CCDA. A fração 4 - 8 (10,8 mg) foi codificada de **NCM2** (sacarose peracetilada).

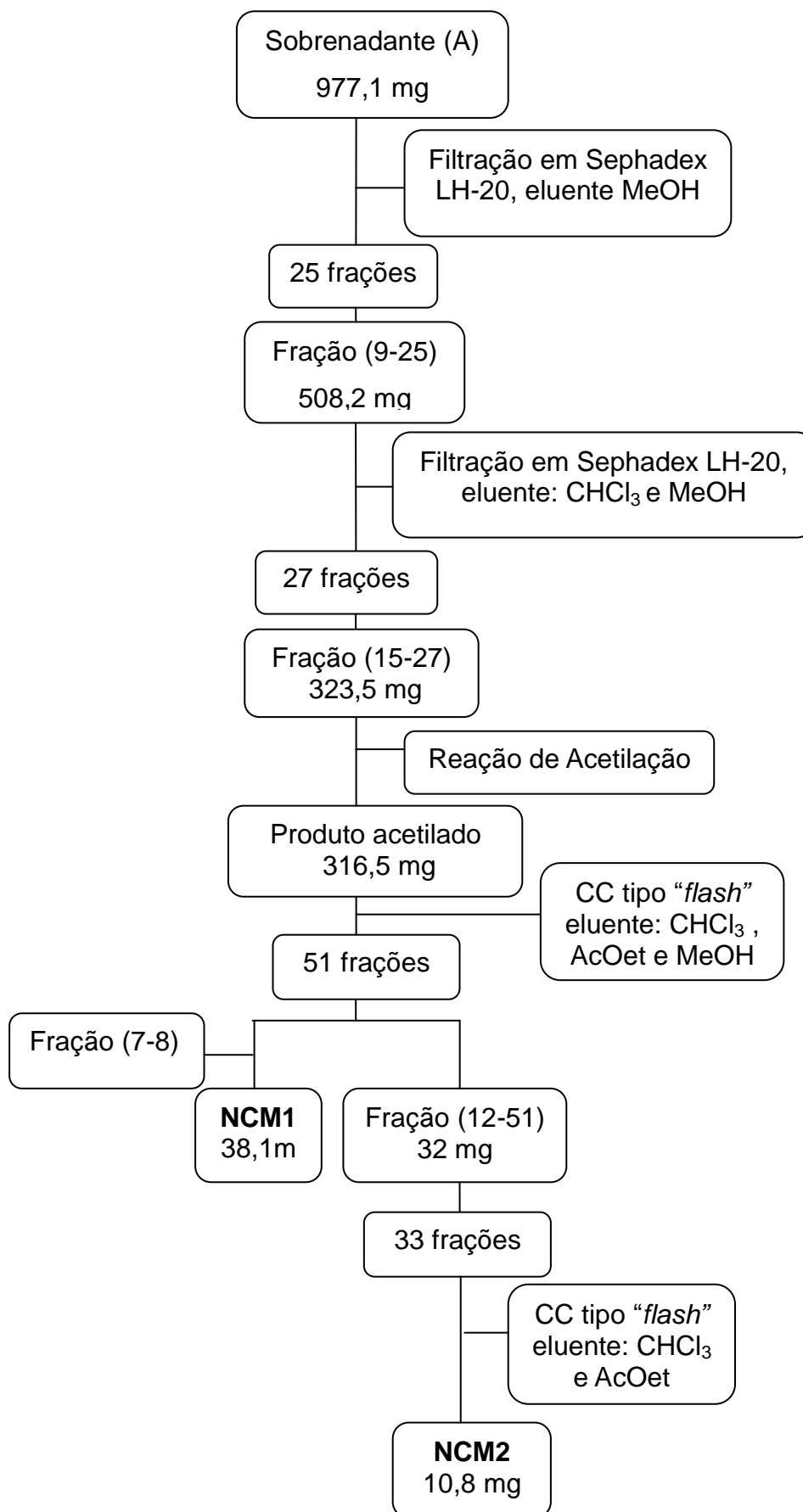


Figura 22. Fluxograma resumido do fracionamento do sobrenadante (A).

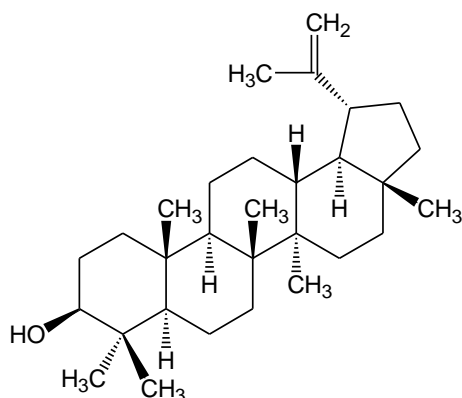
7.4. MATERIAIS E MÉTODOS

- A concentração dos extratos e frações foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Buchi B-480 e Fisatom 802;
- As cromatografias em camada delgada (CCDA) foram feitas em cromatofolhas de sílica gel 60 GF₂₅₄ e celulose (Merck). As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 e 365nm e/ou borrifação com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica e solução alcoólica de cloreto férrico hexaidratado);
- Os critérios de pureza adotados foram a observação de uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCDA), variando-se a fase móvel e faixa estreita de ponto de fusão;
- Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho MQAPF – 301 da microquímica;
- Nas separações cromatográficas em coluna, foram utilizados dois tipos de sílica: sílica Perkin Elmer gel 60G (0,04 - 0,063-0,200mm; 70-230 mesh ASTM e Merck);
- Agente dessecante: Na₂SO₄ anidro;
- Nos procedimentos cromatográficos e reações foram utilizados solventes analiticamente puros e das marcas Vetec, Synth e Merck;
- Os espectros de massas (EM) foram obtidos no Espectrometro de CG/EM– QP – 5050, Shimadzu a 70 eV e Espectrometro de gás acoplado ao massas (CG-EM), modelo QP-QP2010 Plus.
- Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma frequência 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C e Espectrômetro de RMN, Bruker, operando a uma frequência 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. Os solventes utilizados foram: clorofórmio deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (CD₃OD), puros da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm (parte por milhão) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz .

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. CONSTITUINTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DO CAULE DE *Newtonia contorta*

O fracionamento do extrato hexânico do caule de *N. contorta* permitiu o isolamento e identificação de três triterpenos e a mistura de três ésteres de ácidos graxos de cadeia longa.

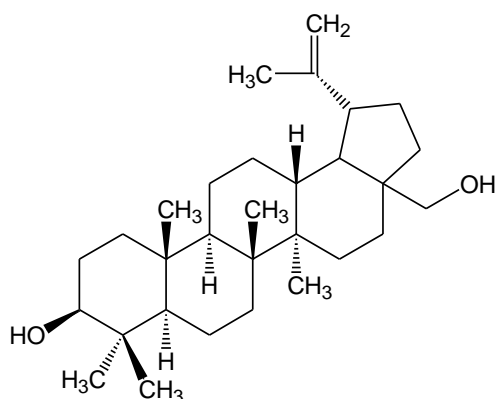
**Lupeol (NCH)**

Massa = 0,1635 g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.44

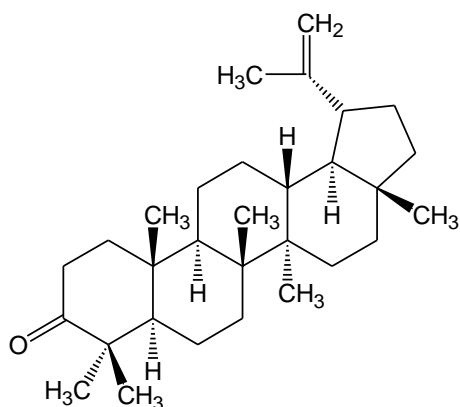
**28-Hidroxi-lupeol (NCH1)**

Massa = 0,0335g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.53

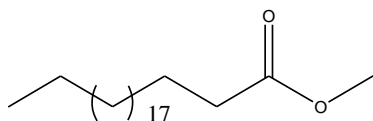
**Lupenona (NCH2)**

Massa = 0,0300g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.64

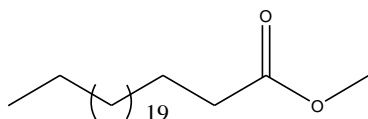
**Metil Éster do Ácido Docosanóico (NCHP)**

Massa = 0,005g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.73

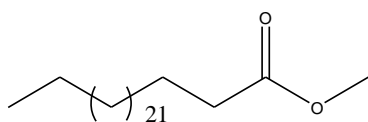
**Metil Éster do Ácido Tetracosanóico (NCHP)**

Massa = 0,027g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.73

**Metil Éster do Ácido Hexacosanóico (NCHP)**

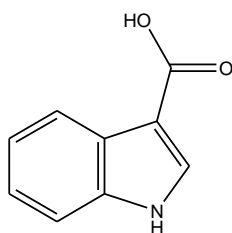
Massa = 0,018 g

Procedência: Extrato hexânico

Isolamento: p.31

Identificação: p.73

O fracionamento do extrato em acetato de etila do caule de *N. contorta* permitiu o isolamento e identificação do ácido-3-indol carboxílico.

**Ácido-3-indol carboxílico (NCA1)**

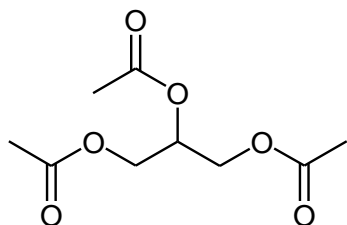
Massa = 0,005g

Procedência: Extrato acetato de etila

Isolamento: p.34

Identificação: p.76

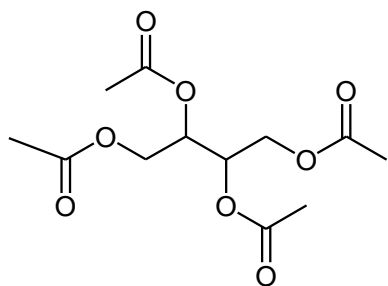
O fracionamento do extrato metanólico do caule de *N. contorta* permitiu a identificação das seguintes substâncias:

**Triacetato de glicerol (NCM1a)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

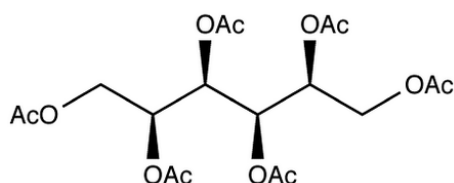
Identificação: p.81

**Tetra acetato de butanol (NCM1b)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

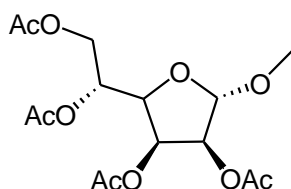
Identificação: p.81

**Peracetato de Iditol (NCM1c)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

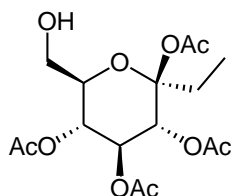
Identificação: p.81

**Peracetato de -D-manopiranosideo (NCM1d)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

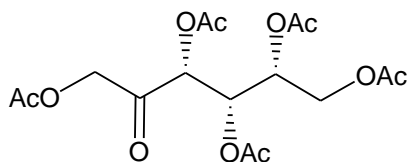
Identificação: p.81

**Etil-tetra-O-acetil- -D-glicopiranosídeo (NCM1e)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

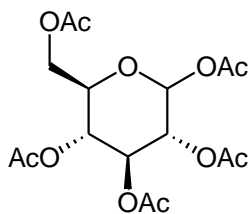
Identificação: p.81

**Peracetato de -D-sorbose (NCM1f)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

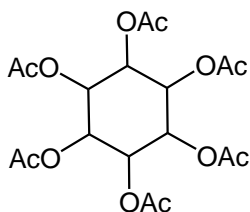
Identificação: p.81

**Peracetato de -D-glicopiranosídeo (NCM1g)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

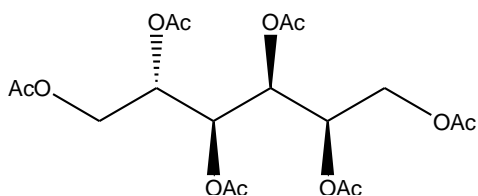
Identificação: p.81

**Peracetato de inositol (NCM1h)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p. 36

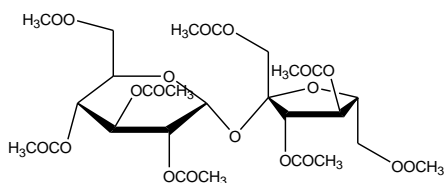
Identificação: p.81

**Peracetato de Glicitol (NCM1i)**

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

Identificação: p.81

**Sacarose peracetilada (NCM2)**

Massa = 0,0108g

Procedência: Extrato Metanólico

Isolamento: p.36

Identificação: p.92

8.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

8.2.1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA NCH

A substância NCH apresentou-se na forma de um sólido cristalino, solúvel em CH_2Cl_2 e com ponto de fusão 220-232 °C. A identificação estrutural da substância foi feita através de análise dos dados espectrais na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) e comparação com os dados encontrados na literatura.

No espectro na região do infravermelho (Fig. 23, pg. 44) pode-se observar a presença do grupamento hidroxila na banda de estiramento axial de OH em ligação de hidrogênio intermolecular, o que caracteriza a absorção do carbinol em $3302,13\text{ cm}^{-1}$ e em $3062,96\text{ cm}^{-1}$ o estiramento de CH vinílico e entre $2850 - 2943\text{ cm}^{-1}$ bandas de estiramento de CH_2 e CH_3 de carbono alifático. Observa-se a banda de deformação axial de C-O de álcool a $1041,5\text{ cm}^{-1}$. Observa-se também a deformação angular e simétrica no plano de CH_2 e CH_3 em 1381 cm^{-1} e entre $1454,3 - 1469,7\text{ cm}^{-1}$ e deformação angular assimétrica fora do plano de CH_2 em $879,5\text{ cm}^{-1}$.

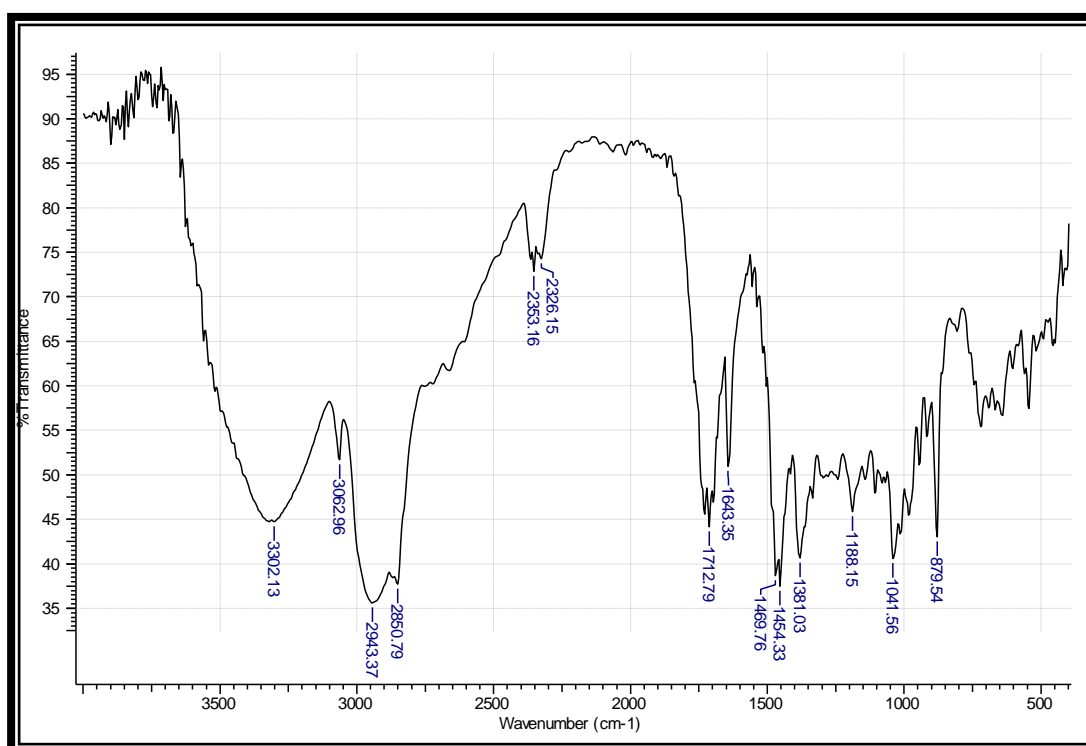


Figura 23. Espectro na região de infravermelho de NCH (ATR)

O espectro de massa apresentou pico do íon molecular a m/z 426 (compatível com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$). Também foram observados fragmentos a m/z 411 $[(M^{*+}) - CH_3]$, m/z 218 $[(M^{*+}) - C_{14}H_{23}OH]$ e m/z 189 $[(M^{*+}) - C_{16}H_{27}OH]$, característicos de esqueleto lupano (Figura 24, p. 45). O mecanismo de fragmentação proposto para a substância NCH está descrito na Figura 25, p. 45.

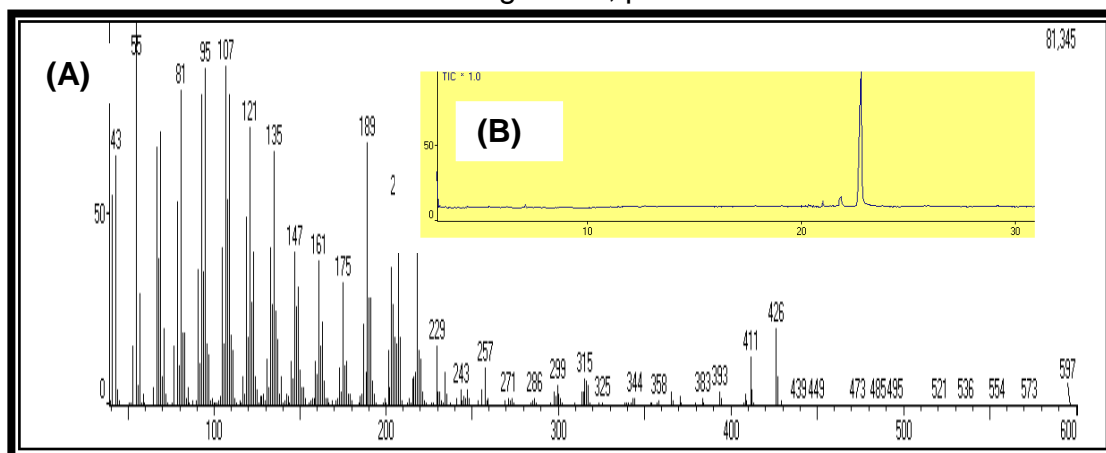


Figura 24. (A) Espectro de massas da substância NCH a 70 eV.; (B) cromatograma de gás da substância NCH

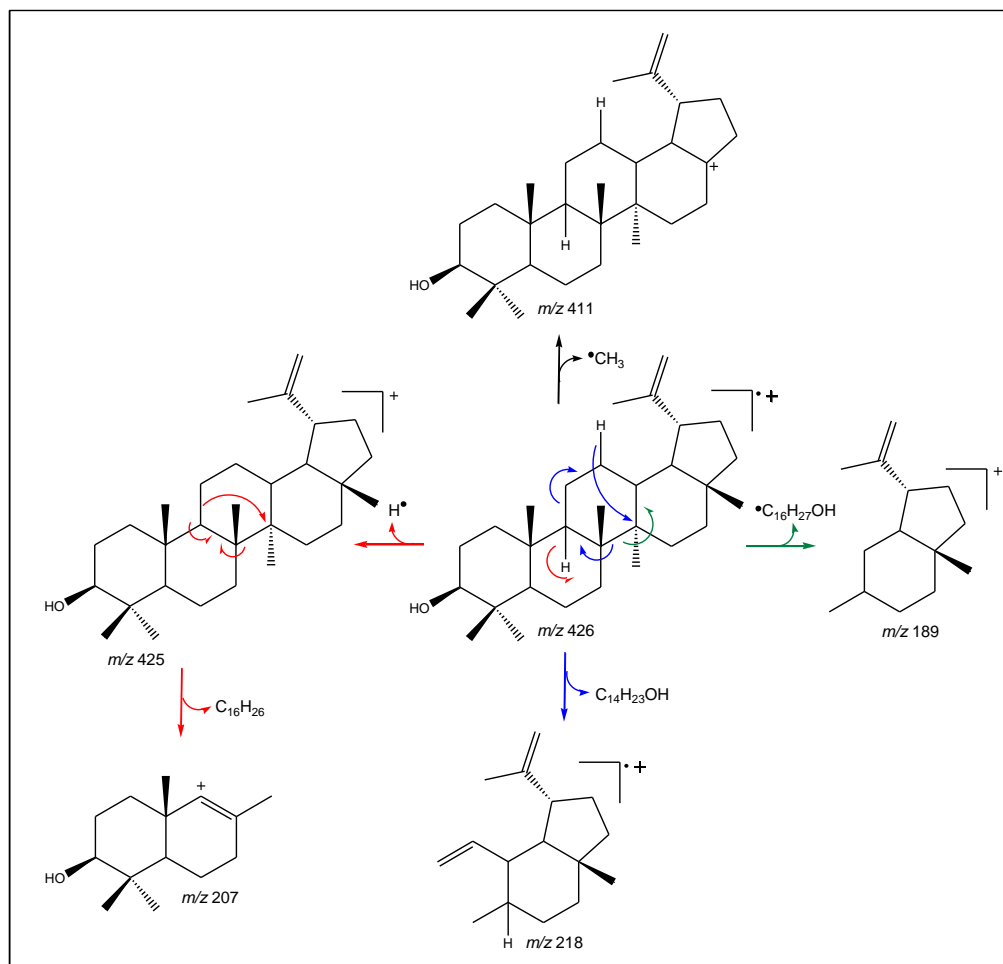


Figura 25. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCH

O espectro de RMN de ^1H (Figura 26. p. 46) revela a presença de sete sinais singletos, relativos aos grupos metilas, sendo que um deles em frequência mais alta δ_{H} (1,67) foi atribuído a um grupo metila ligado a um carbono sp^2 . Também foram observados sinais em δ_{H} 4,63 referentes ao hidrogênio da ligação dupla terminal (H-29). Outro sinal observado é o duplo sinal duplo (*dd*) centrado em δ_{H} 3,18 ($J=4$ e 12 Hz) referente ao H-3.

A substância apresentou deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C (Fig. 28, p. 47) em δ_{C} 151,0 ppm e 109,4 ppm, característicos do grupo olefínico (C-20 e C-29) dos triterpenos lupanos. A comparação dos demais sinais com os da literatura (Mahato & Kundu, 1994) confirmaram a estrutura proposta.

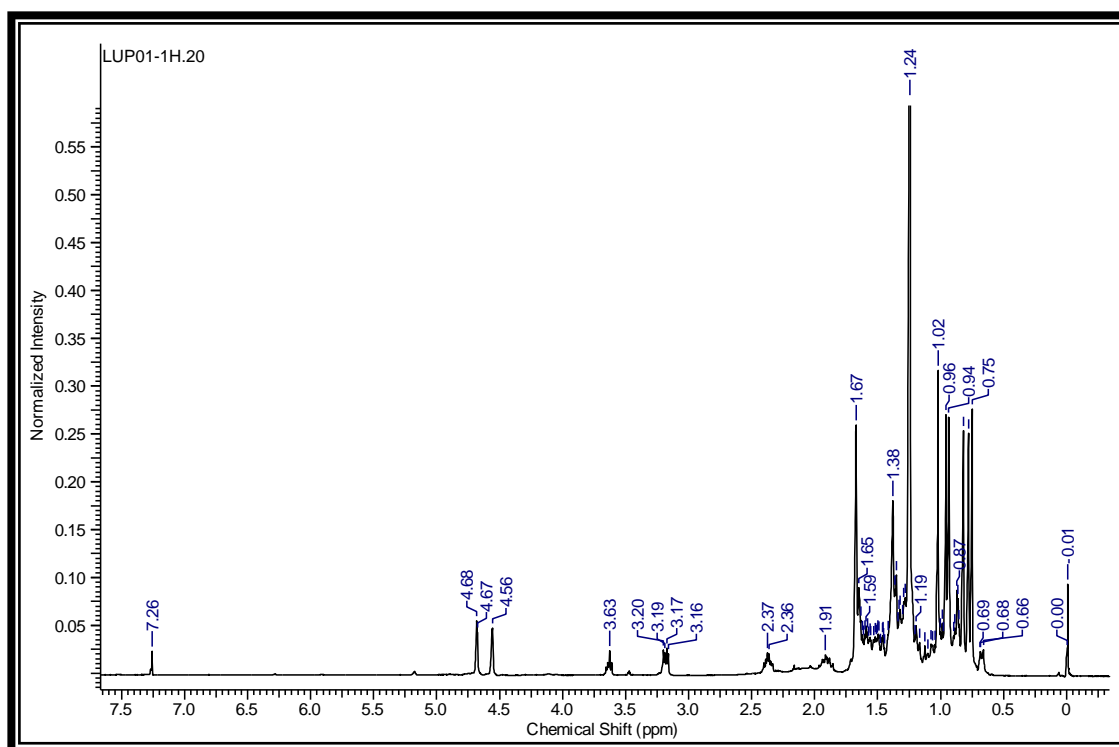


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da substância NCH

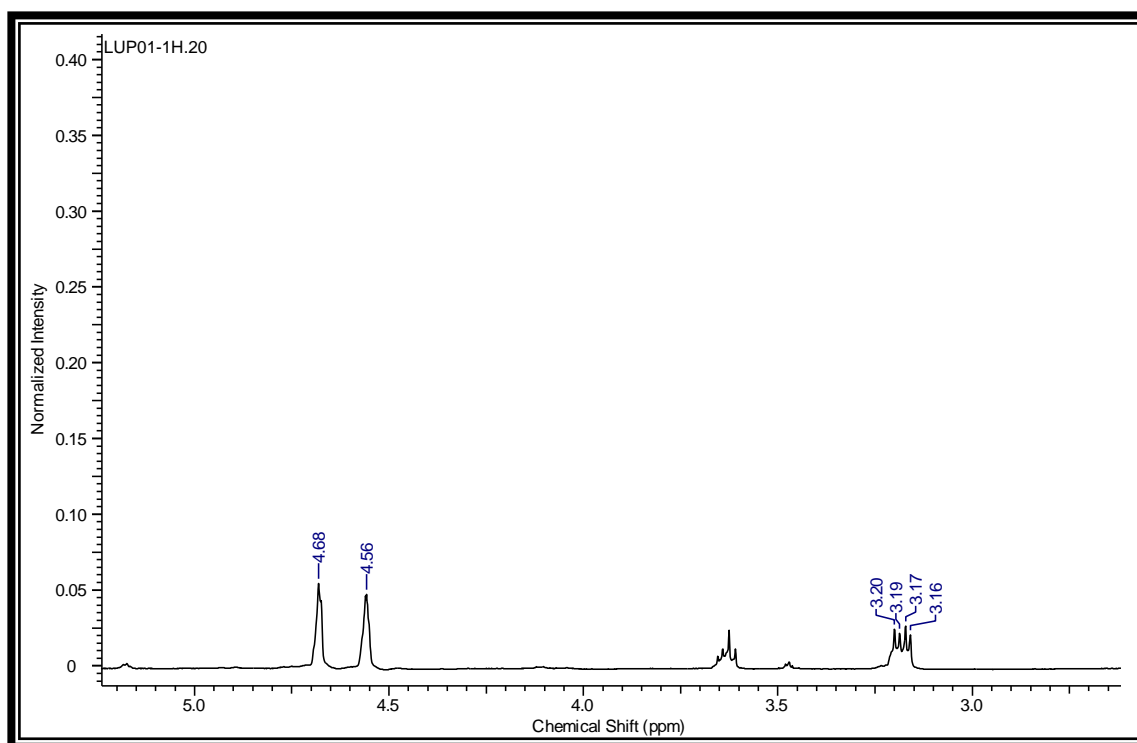


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 4,68 – 3,16 ppm) de NCH

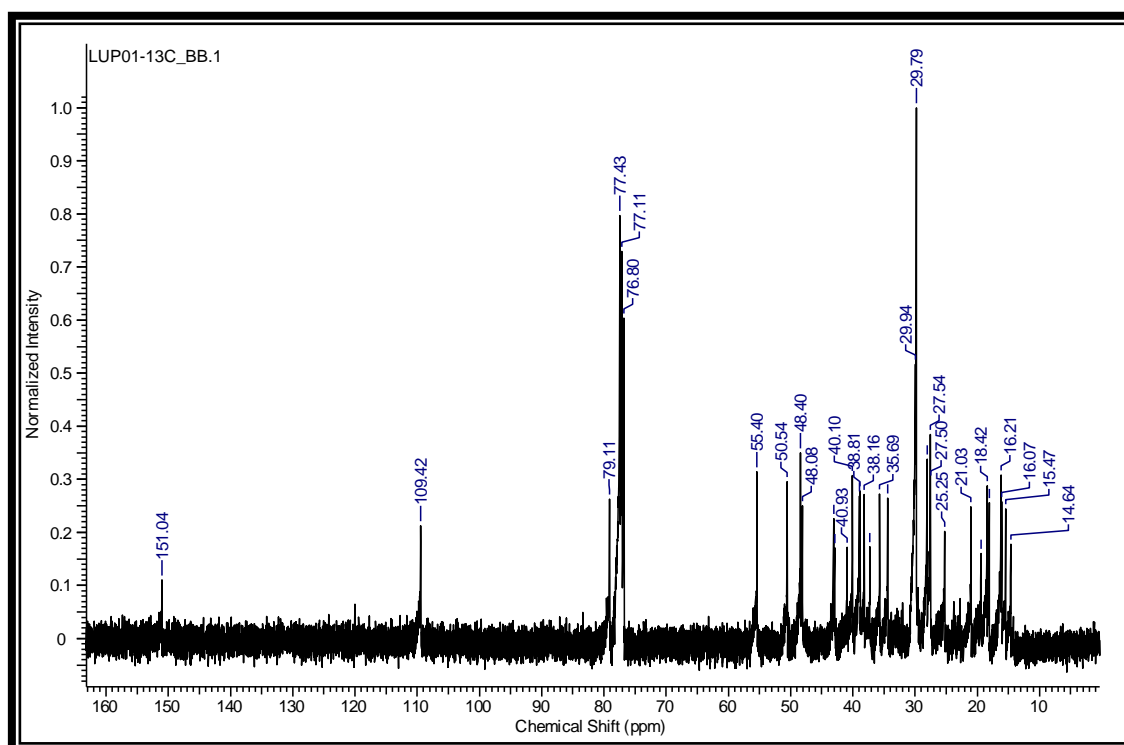


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCH (400 MHz, CDCl_3)

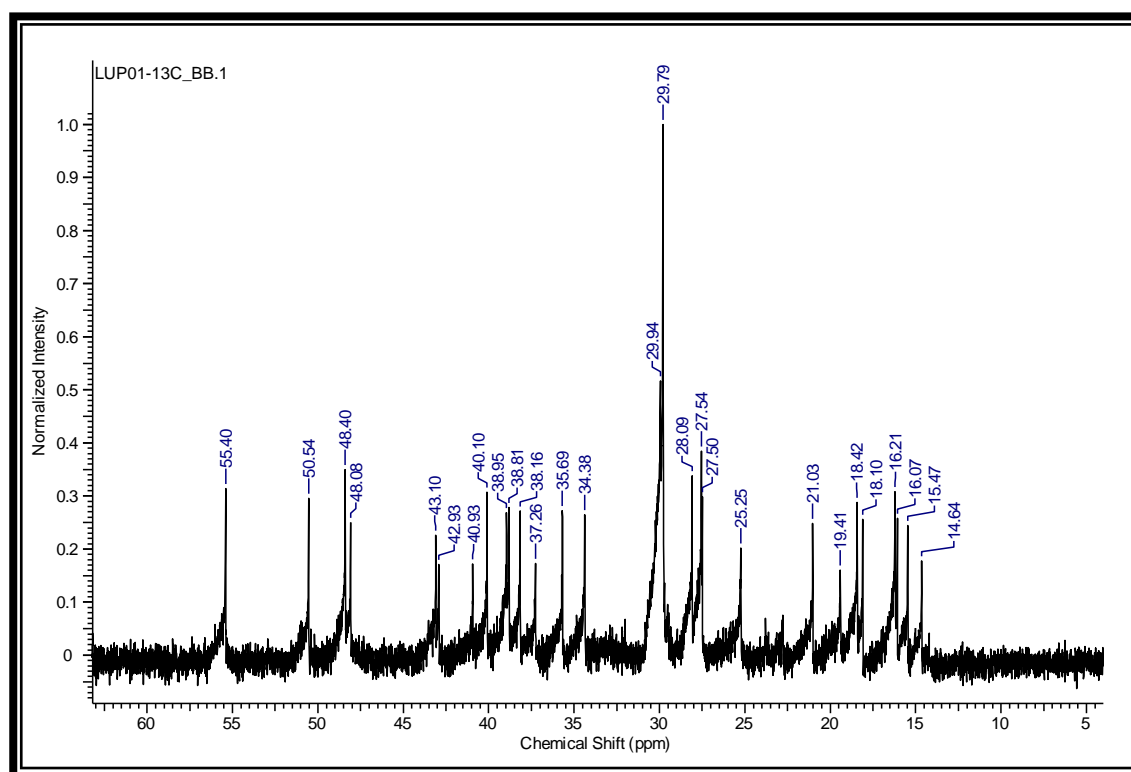


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) (Expansão da região entre 55,40-14,64 ppm) de NCH

No mapa de contorno de correlação heteronuclear HMQC (Figura 30, p. 49) que traz informações da correlação entre o hidrogênio diretamente ligado ao carbono observa-se a correlação entre o H-29 (δ_{H} 4,63) e o C-29 (δ_{C} 109,4) entre o H-3 (δ_{H} 3,2) e o C-3 (δ_{C} 79,11; referente ao grupamento OH). A presença dos grupos metilas pode ser confirmado pela correlação do carbono C- 23 (δ_{C} 28,0 ppm) e o hidrogênio a (δ_{H} 1,02 ppm); o carbono C-24 (δ_{C} 15,4 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 0,75 ppm); o carbono C-25 (δ_{C} 16,2 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 0,94 ppm); o carbono C-26 (δ_{C} 16,0 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 0,96 ppm); o carbono C-27 (δ_{C} 14,6 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 0,78 ppm); o carbono C-28 (δ_{C} 18,0 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 0,82); e o C-30 (δ_{C} 19,4 ppm) e os hidrogênios a (δ_{H} 1,67 ppm).

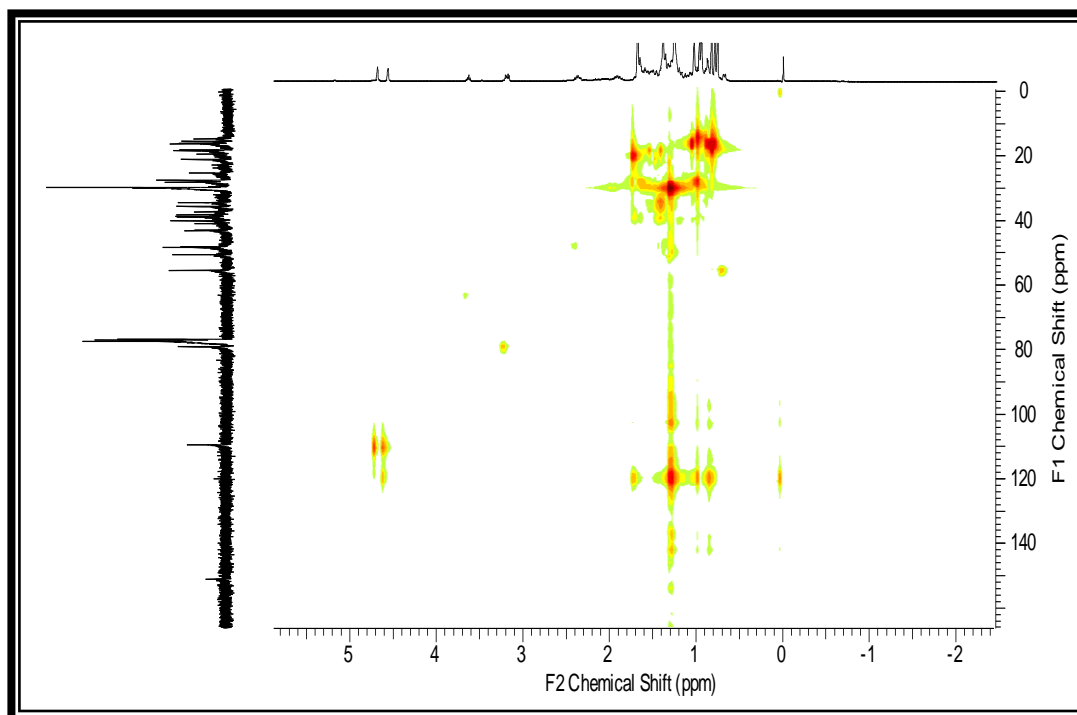


Figura 30. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH

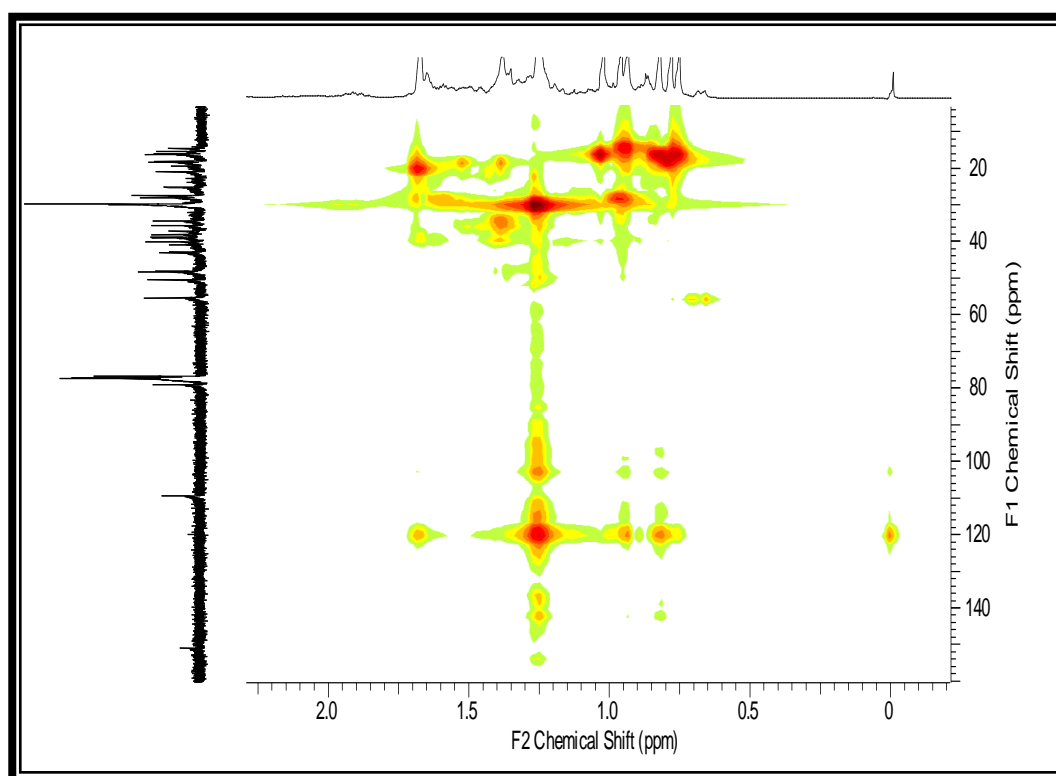


Figura 31. Mapa de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH (ampliação)

O mapa de contorno de correlação heteronuclear HMBC ($^n J_{CH}$ $n=2$ e $n=3$), (Figura 32, p. 50) mostra correlações entre o H-29 (δ_H 4,63) e o C-19 (δ_C 19,4); o acoplamento do H-30 (δ_H 1,67) com C-29 (δ_C 109,4) e C-20 (δ_C 151,0).

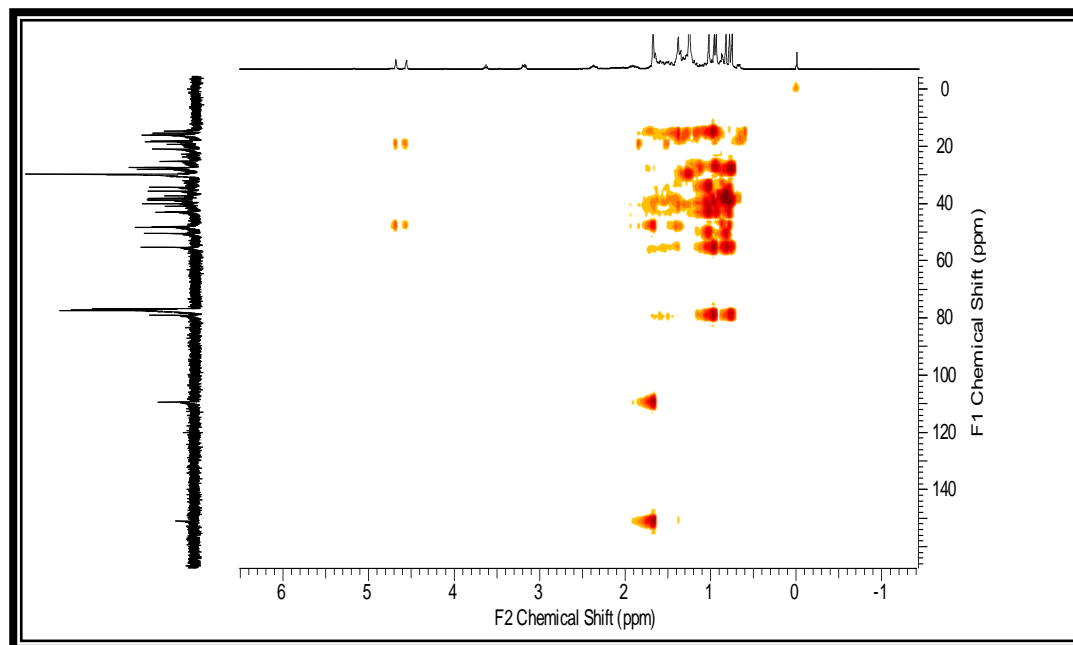


Figura 32. Mapa de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ (HMBC) da substância NCH

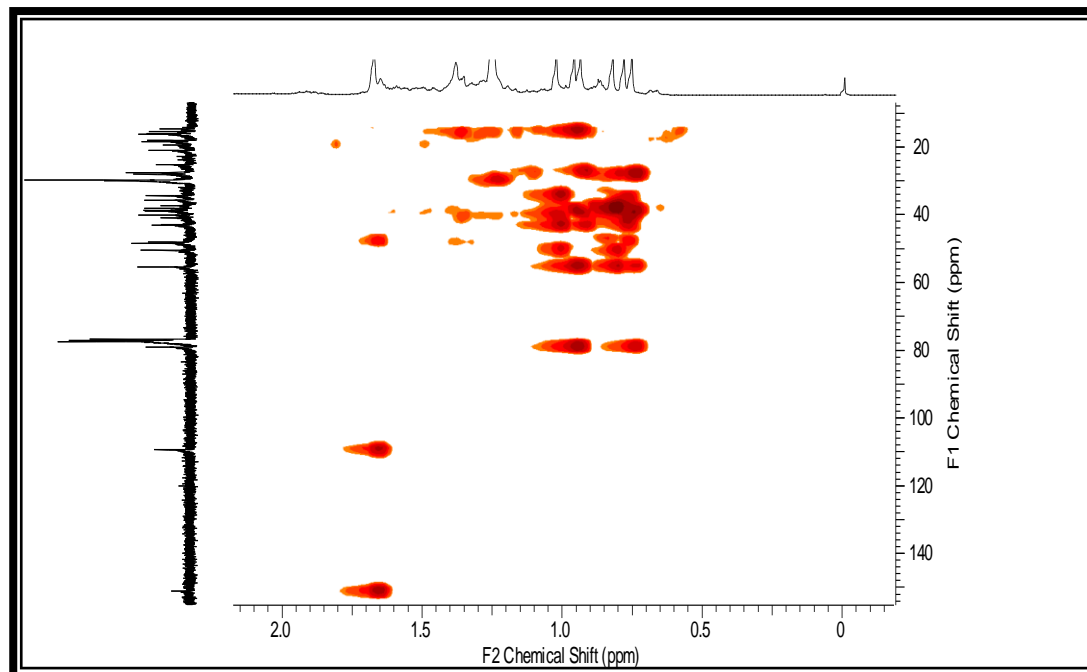


Figura 33. Mapa de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ (HMBC) da substância NCH (ampliação).

Tabela 2: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH, comparados com dados da literatura para o lupeol .

C	HMQC NCH		HMBC		Literatura*	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
4	38,8				38,8	
8	40,9				40,7	
10	37,2				37,1	
14	42,9		3H-25		42,7	
17	43,0				42,9	
20	151,0		3H-30		150,8	
CH						
3	79,1	3,2 (dd, $J= 4$ e 12)	3H-23		78,9	3,19
5	55,3	0,67		3H-25	55,2	
9	50,5	1,27			50,3	
13	38,1	1,24			38,0	
18	48,4	1,26			48,2	
19	47,9	1,38			47,9	
CH₂						
1	38,9	1,38			38,6	
2	27,5	0,96			27,3	
6	18,4	0,82			18,2	
7	34,3	1,49			34,2	
11	21,0	1,67			20,9	
12	25,2	-			25,0	
15	27,5	0,9			27,4	
16	35,6	1,38			35,5	
21	29,9	1,24			29,8	
22	40,0	1,38			39,9	
29	109,4	4,68(d) $J= 4\text{Hz}$		3H-30	109,3	4,68
CH₃						
23	28,0	1,02(s)		3H-24	27,9	1,02
24	15,4	0,75 (s)			15,3	0,76
25	16,2	0,94 (s)			16,1	0,94
26	16,0	0,96 (s)			15,9	0,96
27	14,6	0,78 (s)			14,5	0,78
28	18,0	0,82 (s)			17,9	0,82
30	19,4	1,67 (s)			19,2	1,67

*Mahato e Kundu (1994)

Os dados de espectrométricos discutidos acima juntamente com aqueles descritos na literatura permitem deduzir para a substância NCH a estrutura do triterpeno pentacíclico lupeol (Figura. 34).

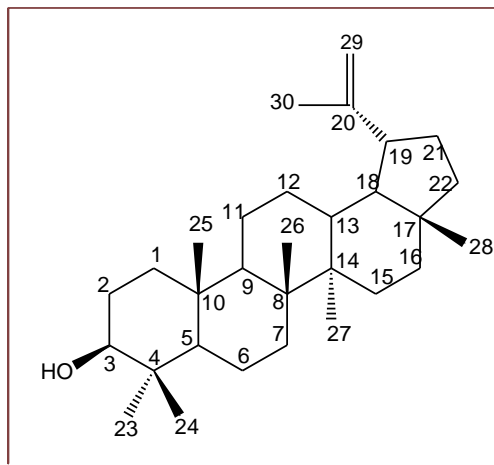


Figura 34. Estrutura da substância NCH (lupeol)

8.2.2. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA NCH1

A substância NCH1 foi obtida na forma de um sólido branco, solúvel em CH_2Cl_2 , e com ponto de fusão 266- 284°C. A identificação estrutural da substância foi feita através de análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, Infravermelho, CG-EM e comparação com os dados encontrados na literatura.

A análise do espectro no infravermelho de NCH1 (Figura 35, p. 53) evidenciou seu caráter alifático, pela presença de bandas intensas em 2939,52 e 2866,22 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento CH_3/CH_2 de carbono alifático. A banda larga e de intensidade forte em 3332,99 cm^{-1} , foi atribuída a absorção de grupo hidroxila. A banda intensa em 1454 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação C-H (CH_2) (Silverstein *et al.*, 1994).

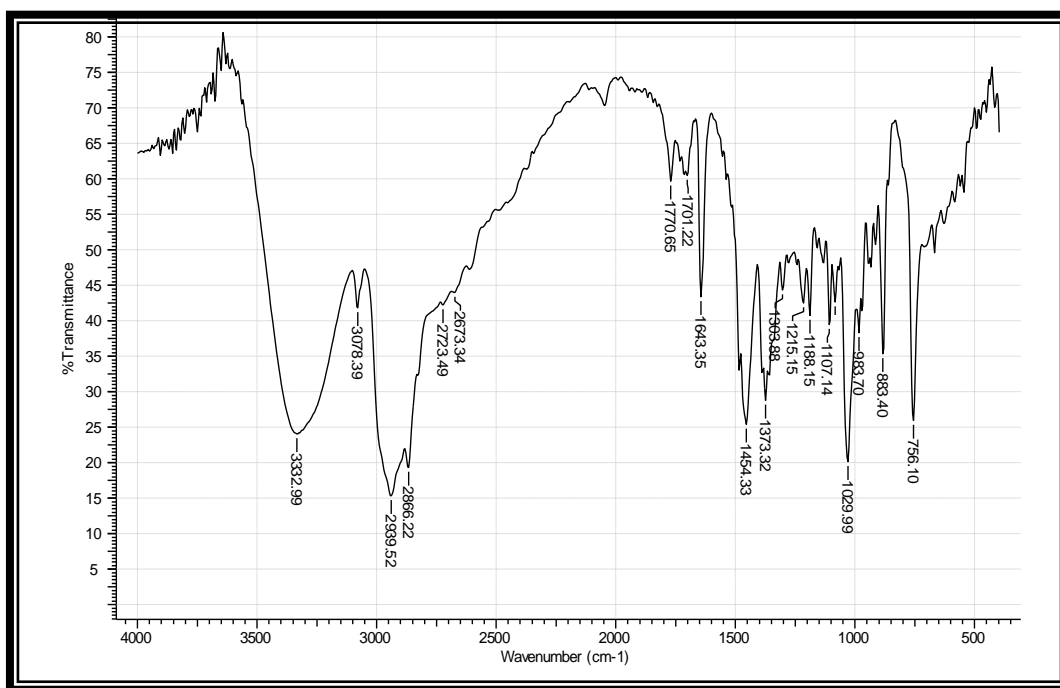


Figura 35. Espectro na região do infravermelho da substância NCH1 (ATR)

O espectro de massa apresentou pico do íon molecular a m/z 442 (compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$). Também foram observados fragmentos a m/z 220, 189 e 203 u.m.a. (Figura 36, p. 54). O mecanismo de fragmentação proposto para a substância NCH1 esta descrito na Figura 37, p. 54.

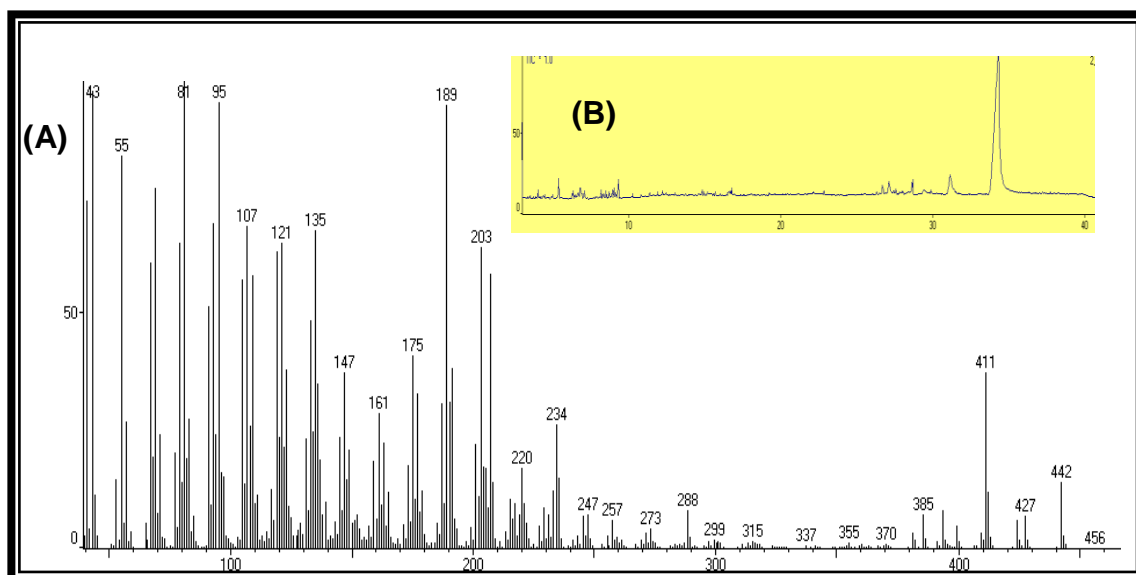


Figura 36: (A) Espectro de massas da substância NCH1 a 70 eV.; (B) cromatograma de gás da substância NCH1.

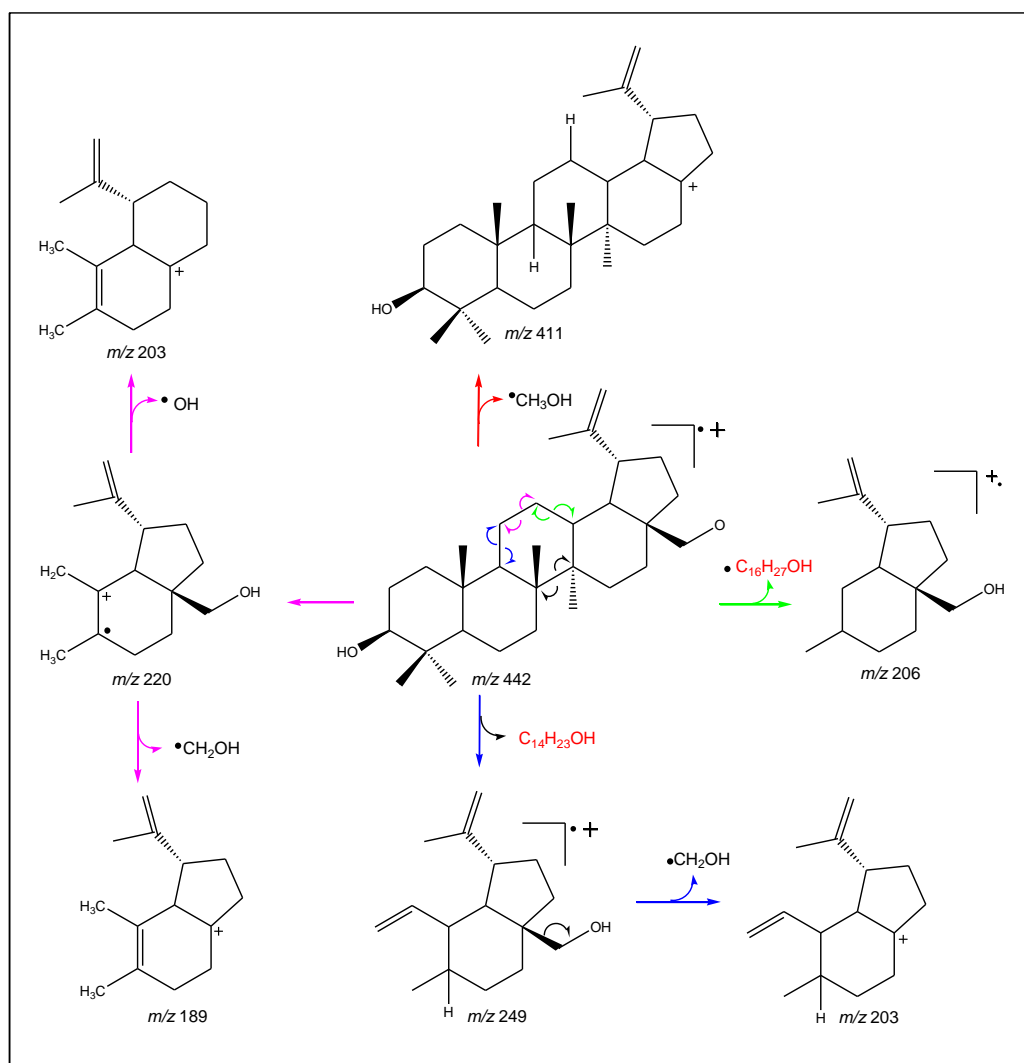


Figura 37. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCH1

No espectro de RMN de ^1H , (Figura. 38 p.55) destacam-se os sinais: em δ_{H} 4,62 referentes ao hidrogênio da ligação dupla terminal (H-29); outro sinal característico é o duplo sinal duplo centrado em δ_{H} 3,18 ($J=4$ e 12 Hz) referente ao H-3. Dentre os sinais atribuídos aos grupos metila, destaca-se, aquele referente a metila a δ_{H} 1,68 ppm que esta ligada a carbono sp^2 . A substância apresentou deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C (Fig. 41, p.57) em δ_{C} 150,5 e 109,7 ppm. Esses deslocamentos observados sugerem que a substância NCH1 apresenta o mesmo esqueleto básico da substância NCH descrita anteriormente. Então, além desses sinais característicos de esqueleto lupano observa-se também um sinal em δ_{C} 60,62 ppm que foi atribuído a presença de um grupo hidroxila em carbono primário no (C-28).

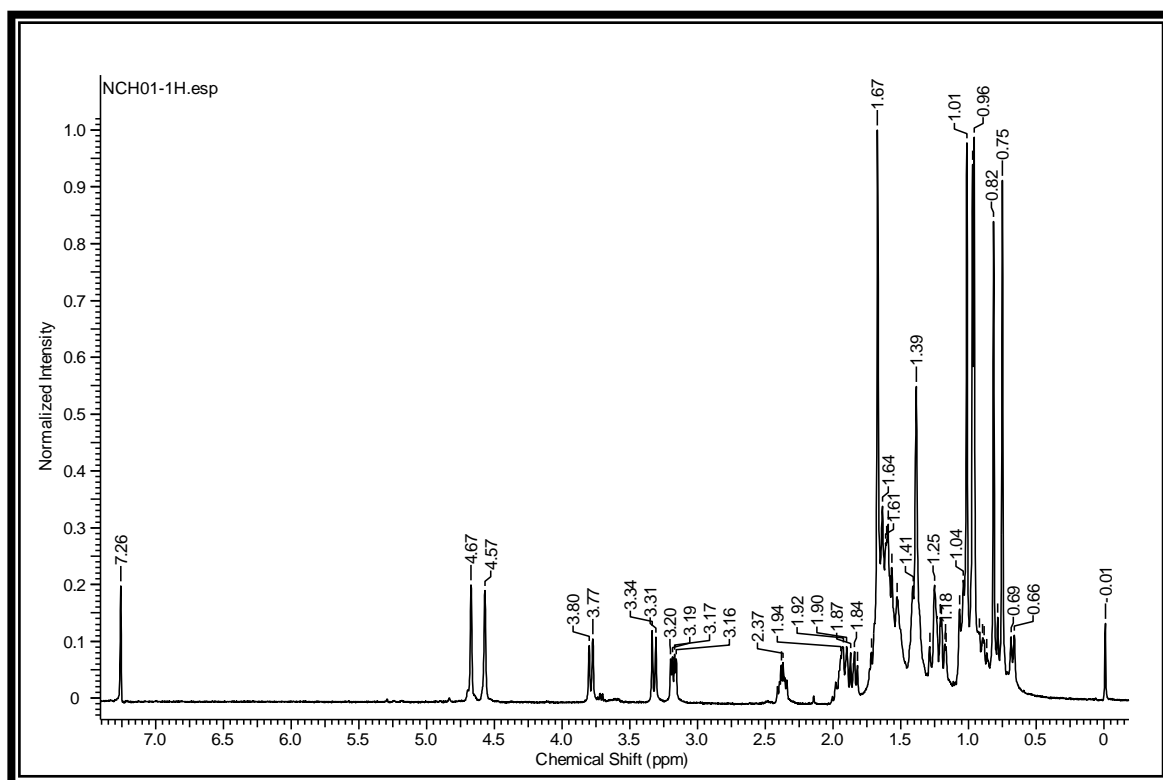


Figura 38. Espectro de RMN ^1H da substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3

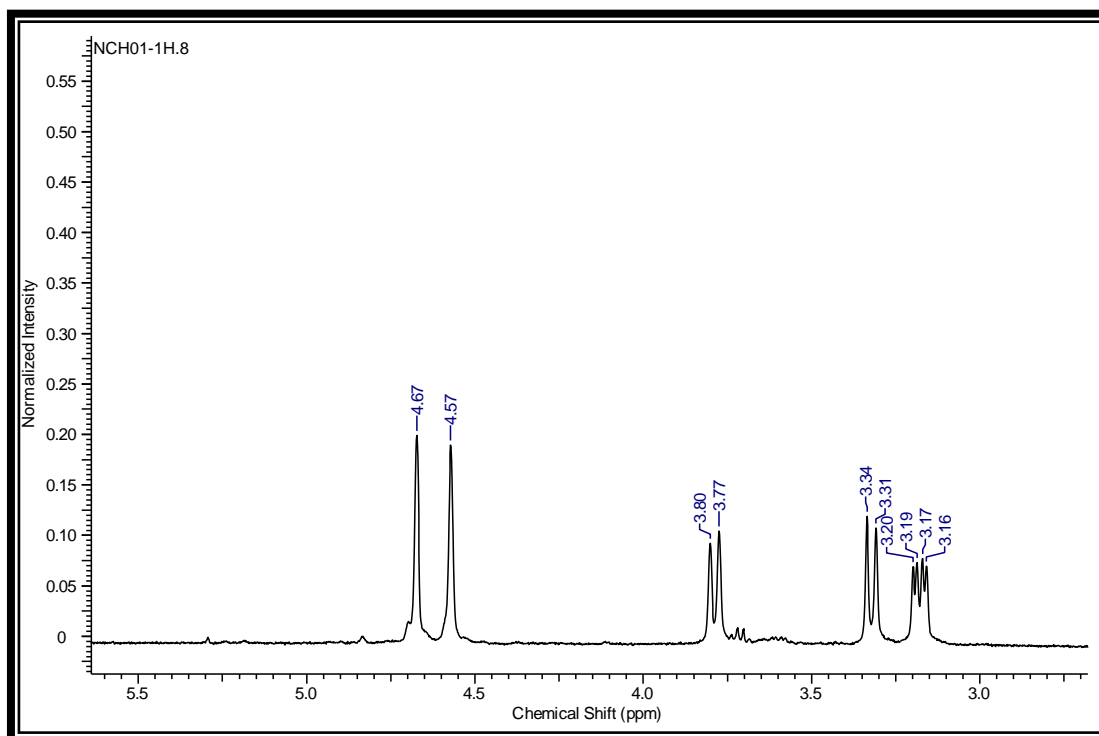


Figura 39. Espectro de RMN ^1H da substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 3,16 – 4,67 ppm).

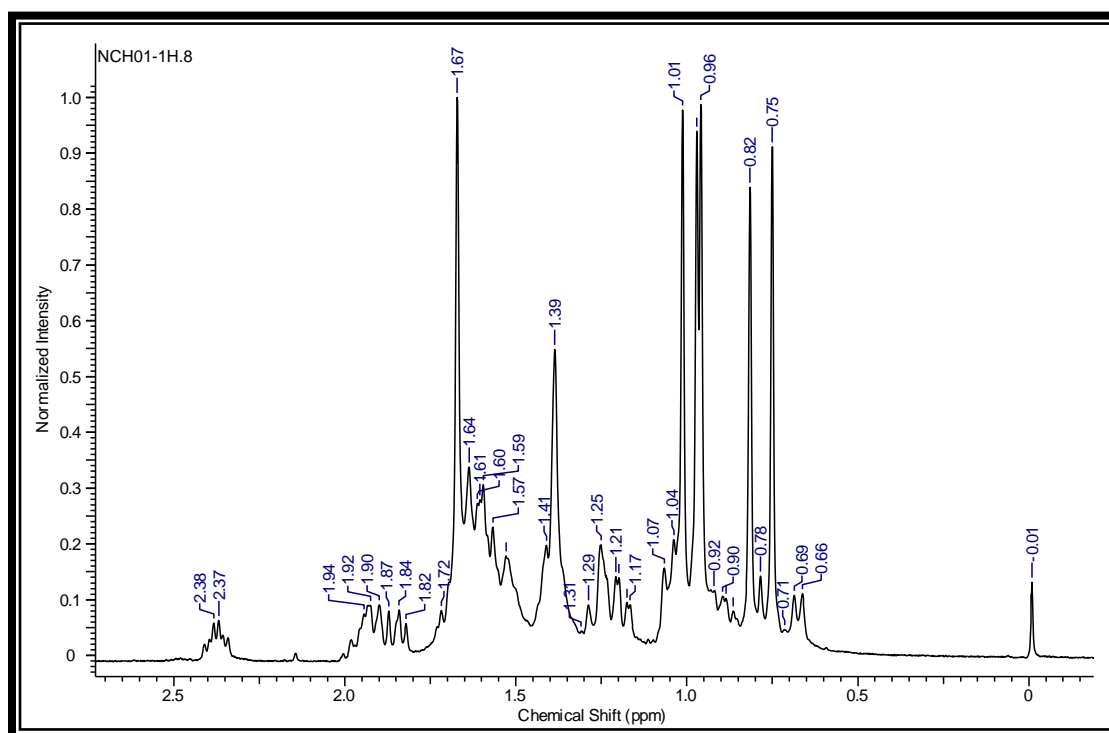


Figura 40. Espectro de RMN ^1H substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 2,39 – 0,66 ppm)

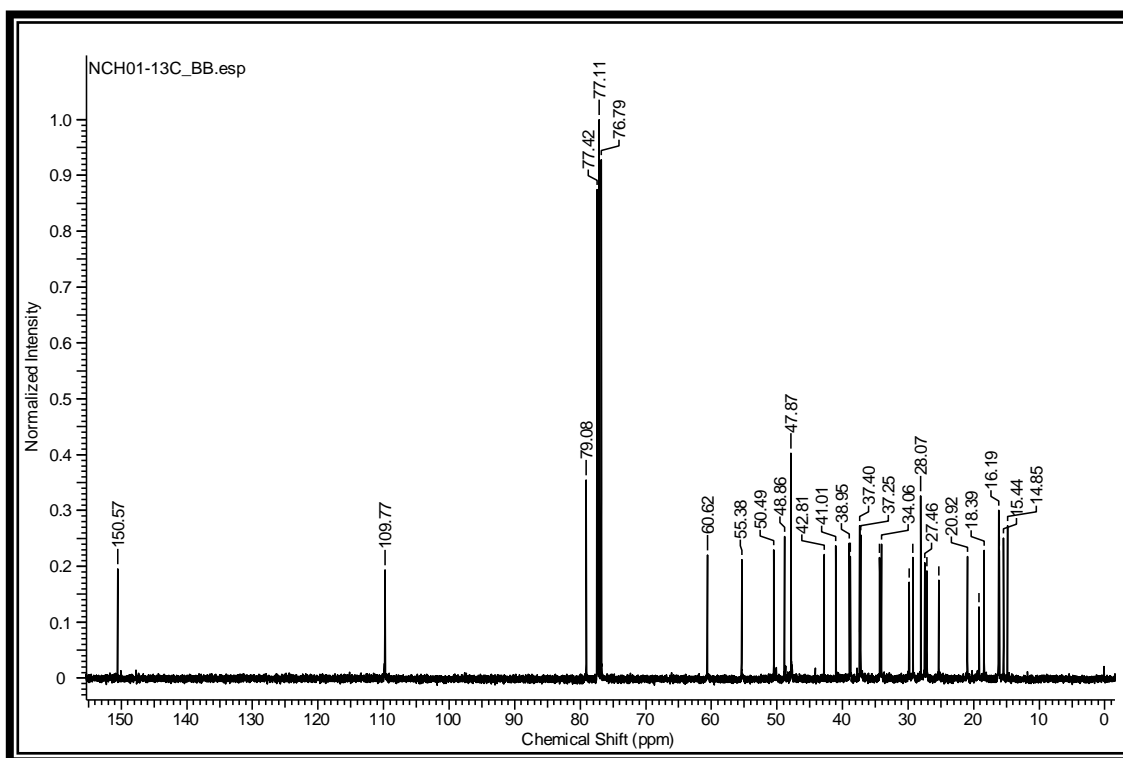


Figura 41. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3

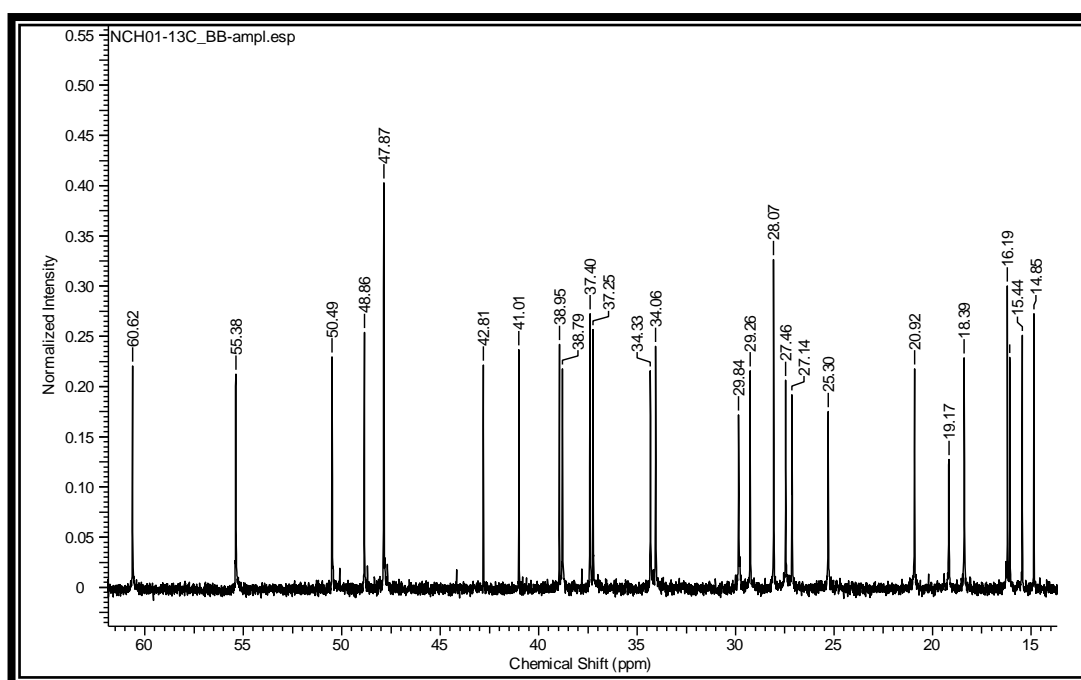


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCH1, 400 MHz, CDCl_3 (Expansão da região entre 60,62 – 14,85 ppm)

O mapa de contornos de correlação heteronuclear HMQC, (Figura. 43, p. 58) confirma os acoplamentos a uma ligação entre os hidrogênios e os carbonos observou-se os sinais entre o H-29 (δ_H 4,62) e o C-29 (δ_C 109,7), confirmaram-se também a ligação da hidroxila através do acoplamento do H-28 (δ_H 3,3) e o C-28 (δ_C 60,6), os sinais referentes às metilas e o sinal da hidroxila no C-3 (δ_C 79,0) e o H-3 (δ_H 3,18).

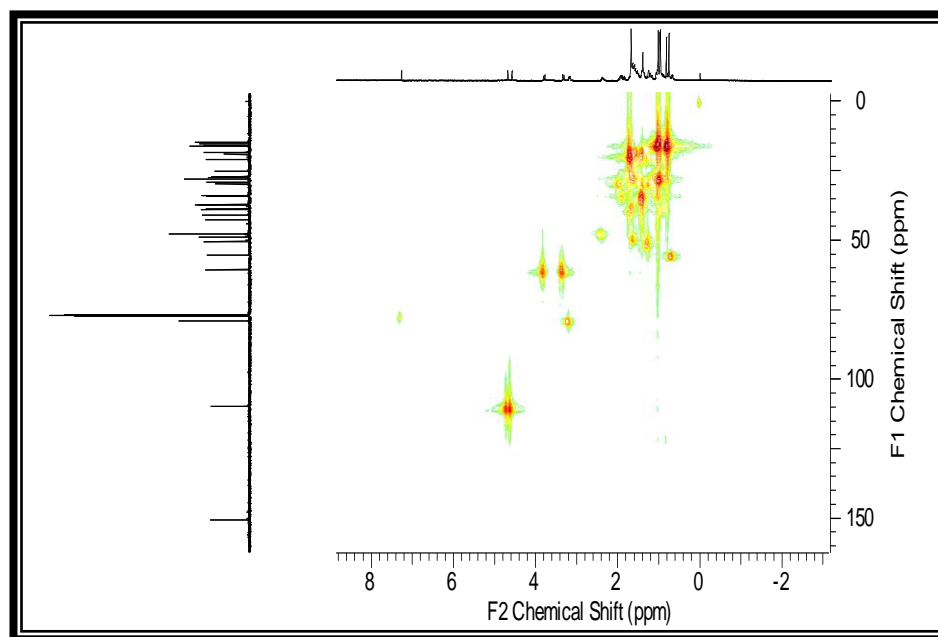


Figura 43. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH1, CDCl_3

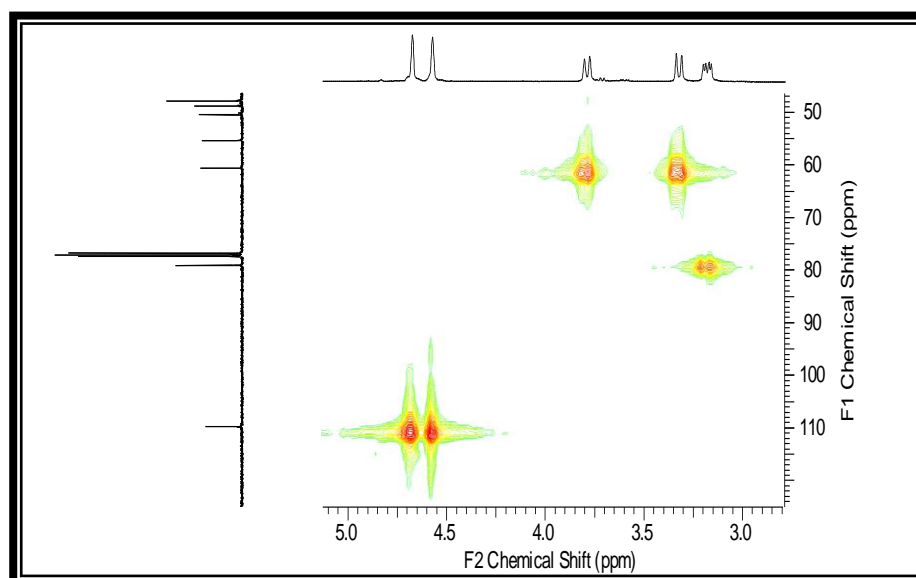


Figura 44. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH1, CDCl_3 (ampliação).

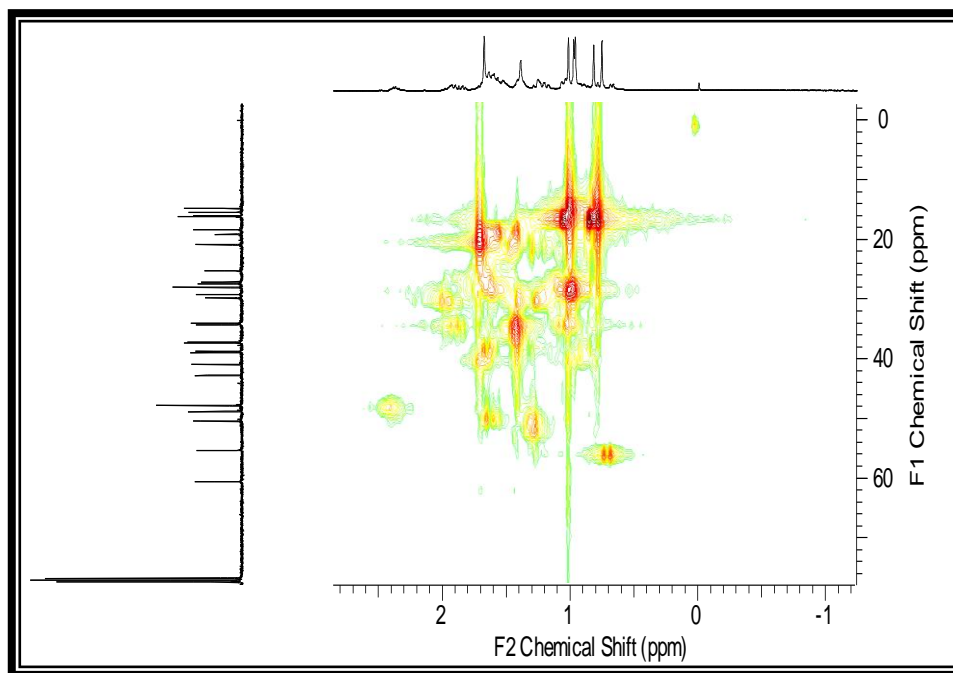


Figura 45. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância NCH1, CDCl_3 (ampliação).

No mapa de contornos de correlação heteronuclear HMBC (Figura 46, p. 60) observa-se os sinais do C-19 (δ_{C} 47,8) acoplado com os hidrogênios H-29 (δ_{H} 4,62) a H-30 (δ_{H} 1,67) a três ligações, um sinal no C-29 (δ_{C} 109,7) referente ao acoplamento a três ligações com H-30 (δ_{H} 1,67) e o acoplamento a duas ligações do C-20 (δ_{C} 150,5) com o H-30 (δ_{H} 1,67).

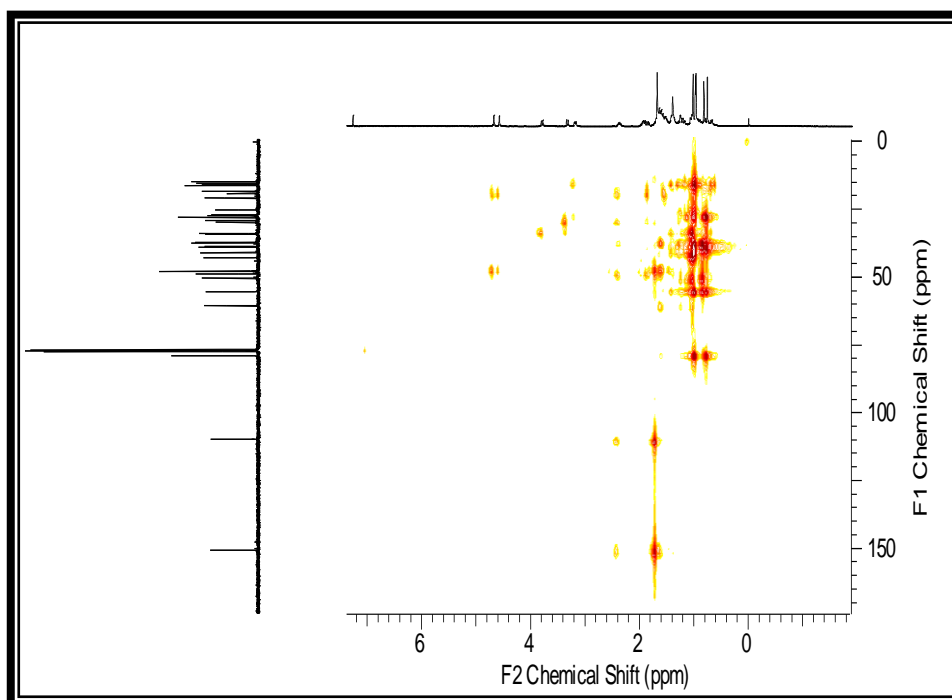


Figura 46. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância NCH1, CDCl_3

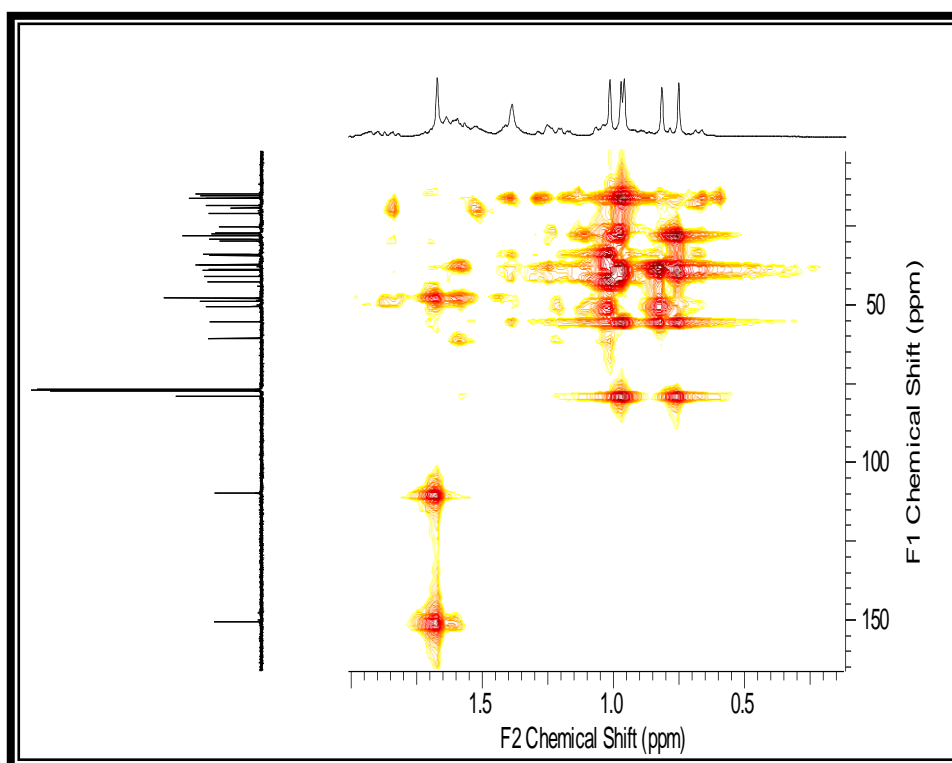


Figura 47. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância NCH1, CDCl_3 (ampliação).

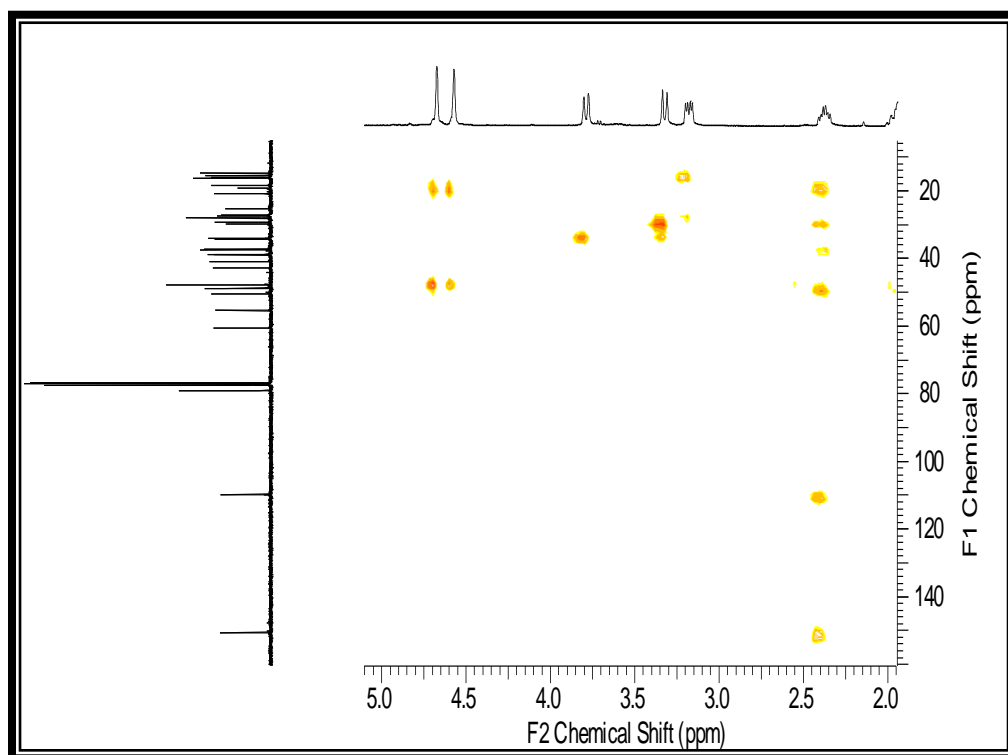


Figura 48. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C (HMBC) da substância NCH1, CDCl_3 (ampliação).

Tabela 3. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH1 comparados com dados da literatura

C	HMQC NCH1		HMBC		Literatura*	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
4	38,7		3H-23		38,8	3,15
8	41,0				40,7	
10	37,2				37,1	
14	42,8				42,7	
17	-				42,9	
20	150,5		3H-30		150,8	
CH						
3	79,0	3,18 (dd, J=4 e 12)		3H-23	78,9	3,19
5	55,3	0,67		3H-23, 3H-25	55,2	
9	50,4	1,64			50,3	
13	38,7	1,67		3H-25	38,0	
18	48,8	1,68			48,2	
19	47,8	2,38 d (J= 4)		2H-29	47,9	2,38
CH₂						
1	38,9	1,67			38,6	
2	27,1	0,96			27,3	
6	18,3	1,38			18,2	
7	34,3	1,38			34,2	
11	20,9	1,67			20,9	
12	28,0	0,96			25,0	
15	27,4	0,96			27,4	
16	34,3	1,38		2H-28	35,5	
21	29,8	0,96			29,8	
28	60,6	3,33 (d, J = 12)		2H-22	61,3	3,45
29	109,7	4,67		3H-30, H-19	109,3	4,68
CH₃						
23	28,0	1,01 (s)			27,9	1,02
24	15,4	0,75 (s)			15,3	0,76
25	16,1	0,94 (s)			16,1	0,94
26	16,0	0,97 (s)			15,9	0,96
27	14,8	0,82 (s)			14,5	0,82
30	19,1	1,67 (s)		2H-29	19,2	1,67

*Mahato e Kundu (1994)

Os dados de espectrométricos discutidos acima juntamente com aqueles descritos na literatura permitem deduzir para a substância NCH1 a estrutura do triterpeno pentacíclico 28-hidroxi-lupeol (Figura 49, p. 63).

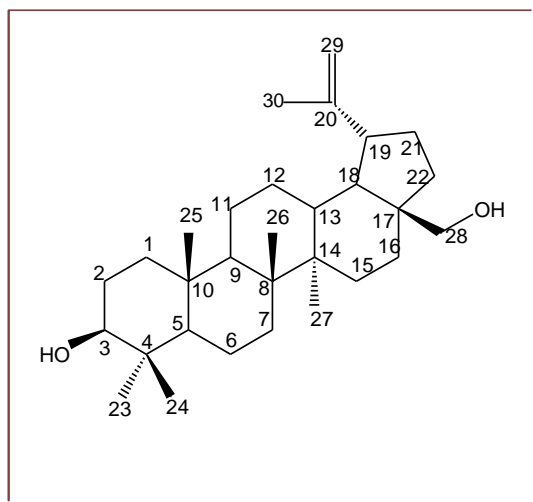


Figura 49. Estrutura da substância NCH1 (28-Hidroxi-lupeol)

8.2.3. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE NCH2

A substância NCH2 apresentou-se na forma de cristais acilares incolores, solúvel em CH_2Cl_2 , e com ponto de fusão 200-203°C. A identificação estrutural da substância foi feita através de análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, CG-EM, infravermelho e comparação com os dados encontrados na literatura. A análise do espectro no infravermelho de NCH2 (Figura. 50 p. 64) evidenciou seu caráter alifático, pela presença de bandas intensas em 2939,52, 2912,51 e 2854,65 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento CH_3/CH_2 de carbono alifático. Banda na região de 3070, 67 cm^{-1} de CH vinílico, uma banda intensa em 1454 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação C-H (CH_2). Observou-se também banda intensa em 1728,22 e 1705,07 cm^{-1} o que corresponde a carbonila de cetona. (Silverstein *et al.*, 1994).

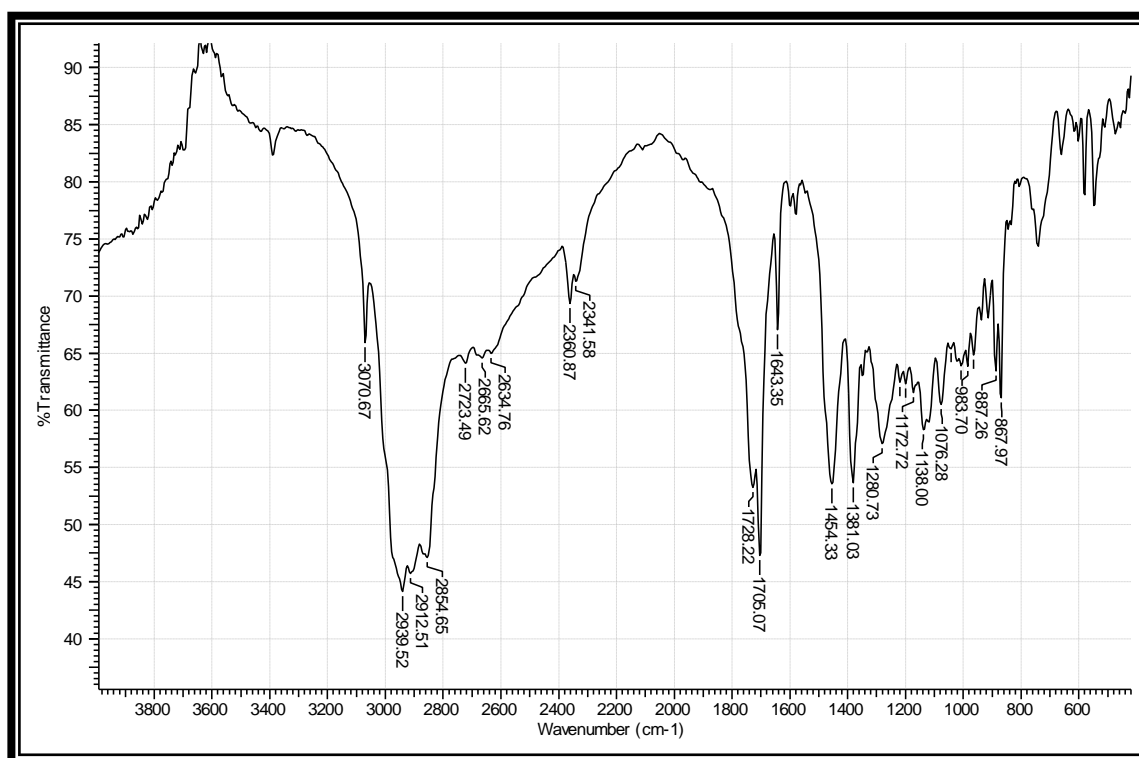


Figura 50. Espectro na região de infravermelho da substância NCH2

O espectro de massa apresentou pico do íon molecular a m/z 424 (compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$). Também foram observados fragmentos a m/z 218, 205 e 189 u.m.a. (Figura 51, p. 65). A proposta de fragmentação para a substância NCH1 esta descrito na Figura 52, p. 65.

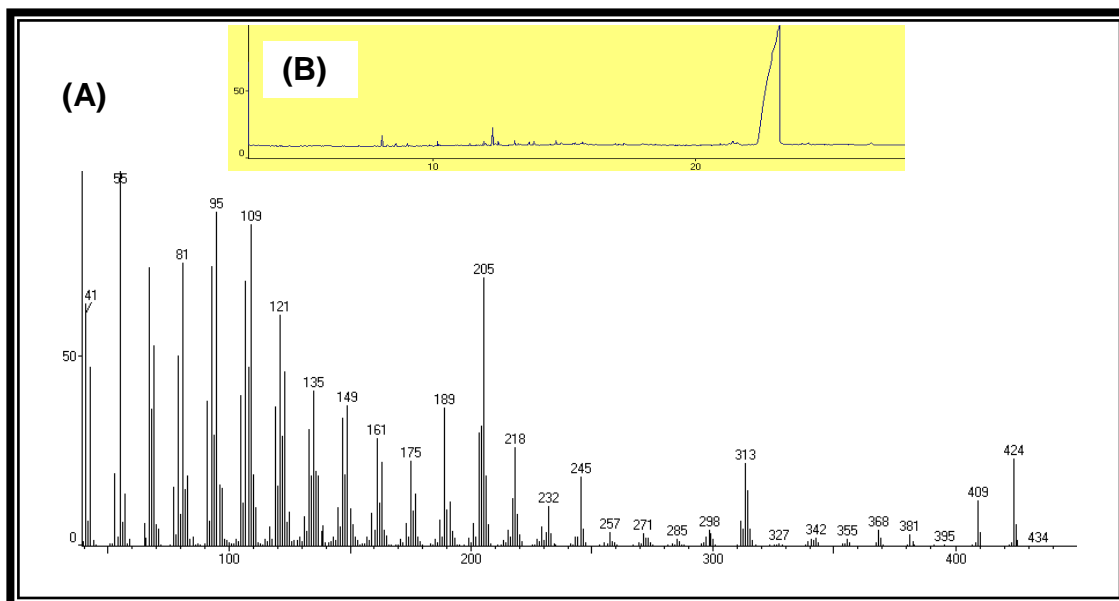


Figura 51. (A) Espectro de massas da substância NCH2 a 70 eV.; (B) cromatograma de gás da substância NCH2.

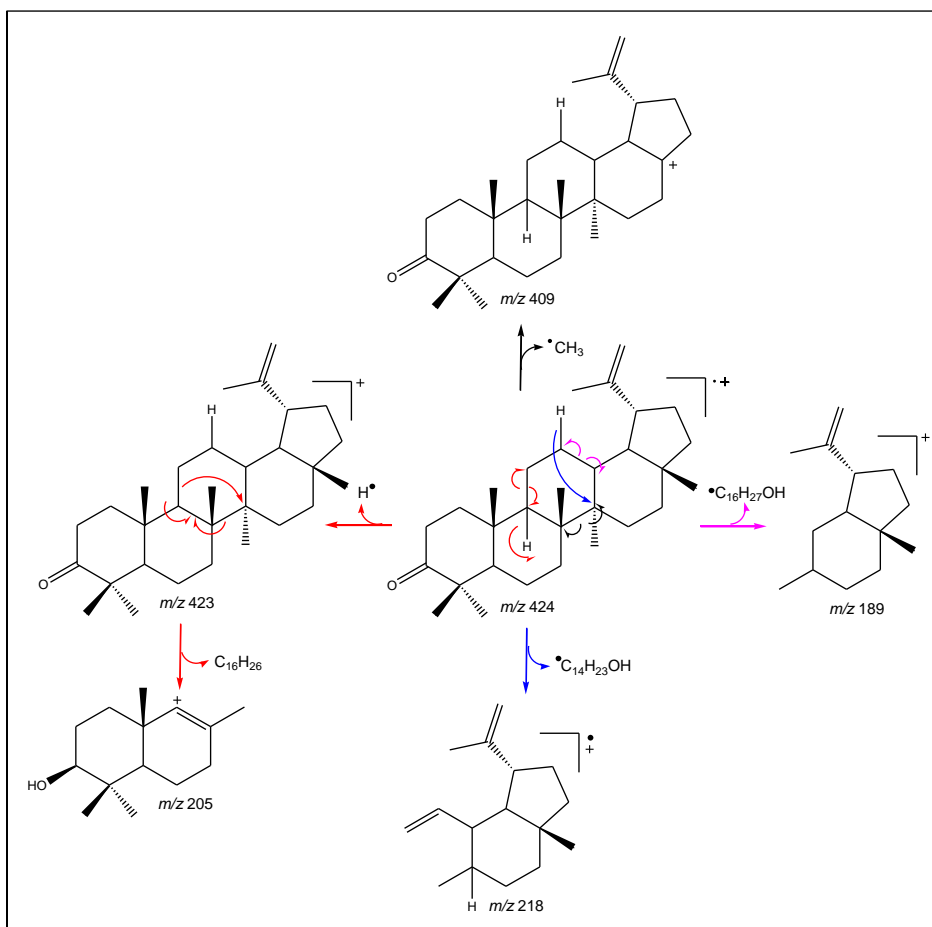


Figura 52. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCH2

No espectro de RMN de ^1H (Figura. 53, p. 66) foram observados seis singletos referentes à hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,79; 0,93; 0,96; 1,02; 1,07; 1,68 ppm. Também foi observado um singlete em 1,68 característicos de hidrogênio de metila ligado a um carbono sp^2 ; um dubleto em δ 4,63 (d , $J = 12,0$ Hz). Comparando-se os deslocamentos químicos observados para a substância NCH2 com aqueles obtidos para o lupeol (NCH) e 28-hidroxi-lupeol (NCH1) verifica-se a ausência do sinal relativo a hidrogênio carbinólico na posição 3. Em contrapartida, observa-se no espectro de RMN ^{13}C uma sinal em alta freqüência a δ_{C} 218,2 ppm que foi atribuído a presença de carbono carbonílico (Figura. 54, p. 67).

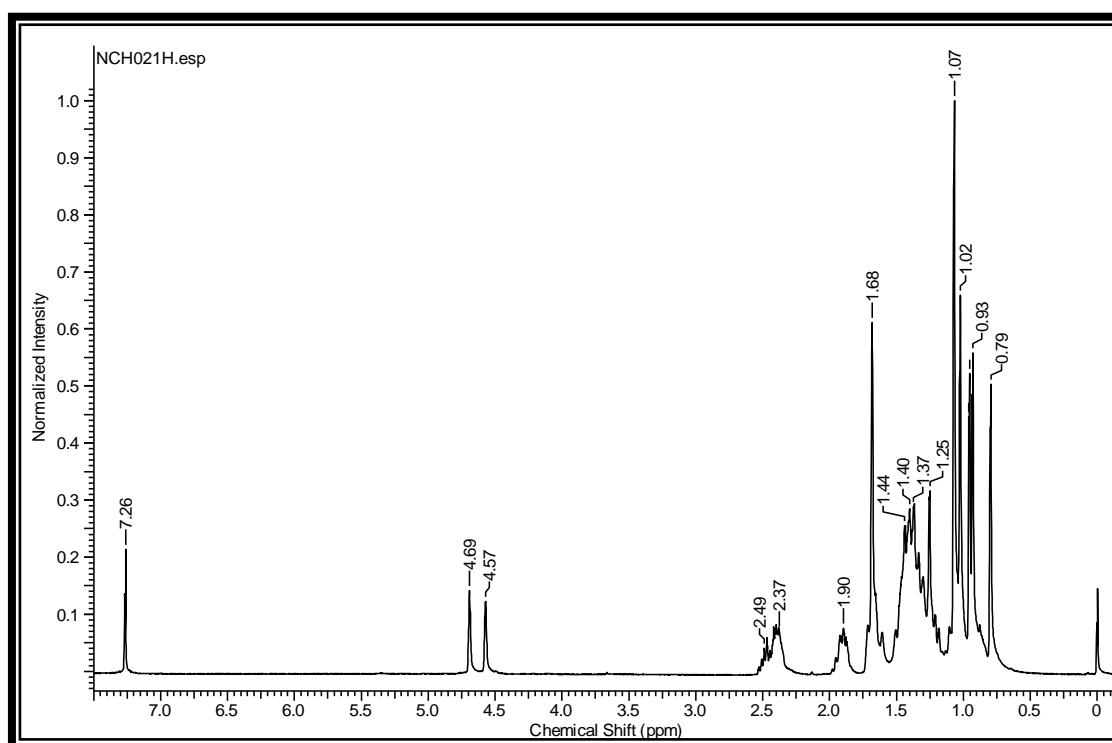


Figura 53. Espectro de RMN ^1H da substância NCH2, 400 MHz, CDCl_3

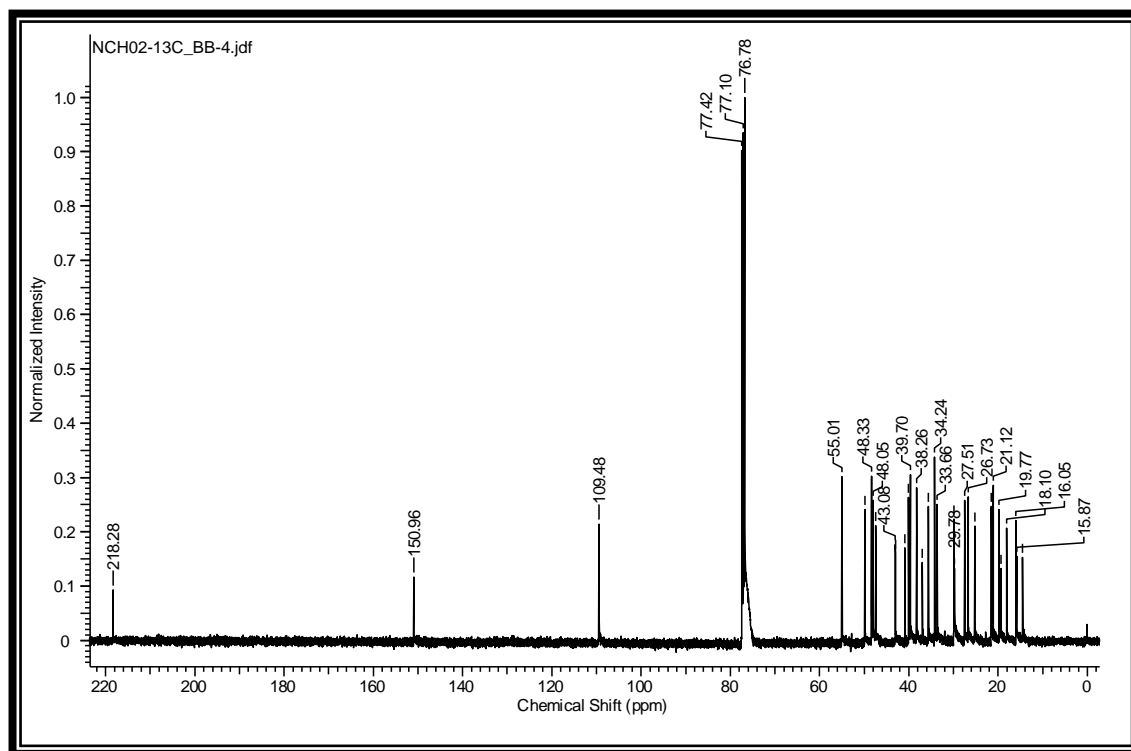


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCH2, 100 MHz, CDCl_3

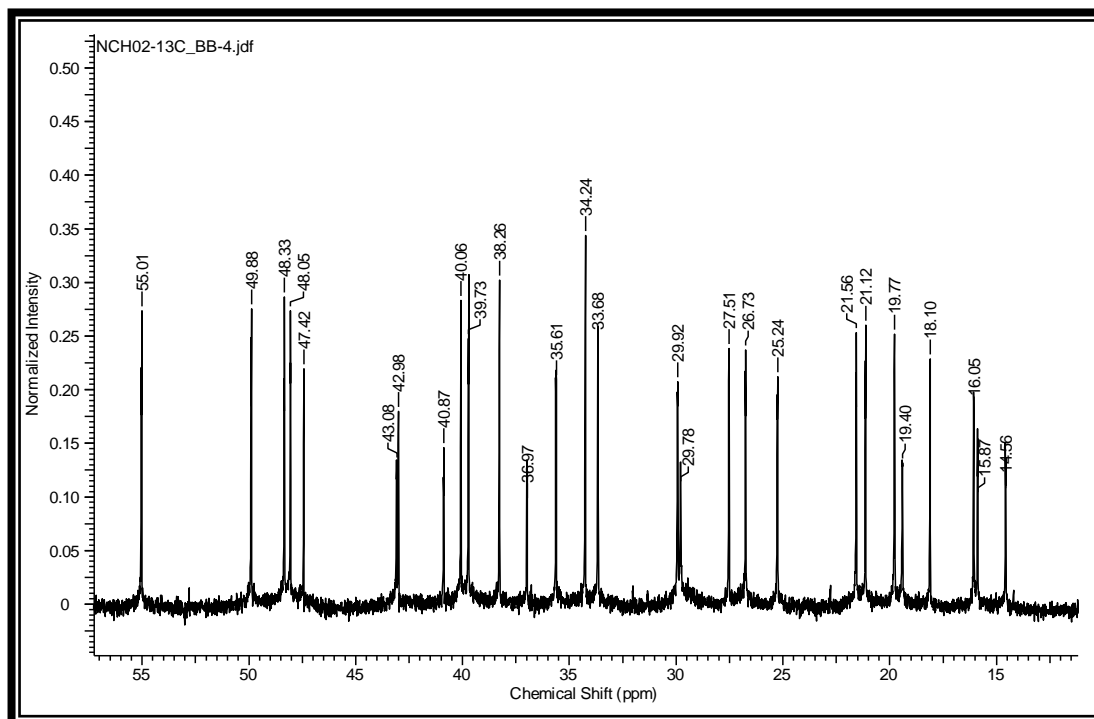


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCH2, 100 MHz, CDCl_3
(ampliação da região entre 14,56 – 55,01 ppm)

O mapa de contorno de correlação heteronuclear HMQC (Figura 56, p. 68) revela a correlação existente entre o carbono C-29 (δ_C 109 ppm) e o hidrogênio H-29 (δ_H 4,63 ppm). A presença dos grupos metilas pode ser confirmado pela correlação do carbono C- 28 (δ_C 18,1 ppm) e o hidrogênio a (δ_H 0,79 ppm); o carbono C-25 (δ_C 16,0 ppm) e os hidrogênios a (δ_H 1,07 ppm); o carbono C-26 (δ_C 15,8 ppm) e os hidrogênios a (δ_H 0,93 ppm); o carbono C-23 (δ_C 27,5 ppm) e os hidrogênios a (δ_H 1,02 ppm); o carbono C-24 (δ_C 14,5 ppm) e os hidrogênios a (δ_H 0,96 ppm) e finalmente o carbono C-30 (δ_C 19,4 ppm) e os hidrogênios a (δ_H 1,68 ppm).

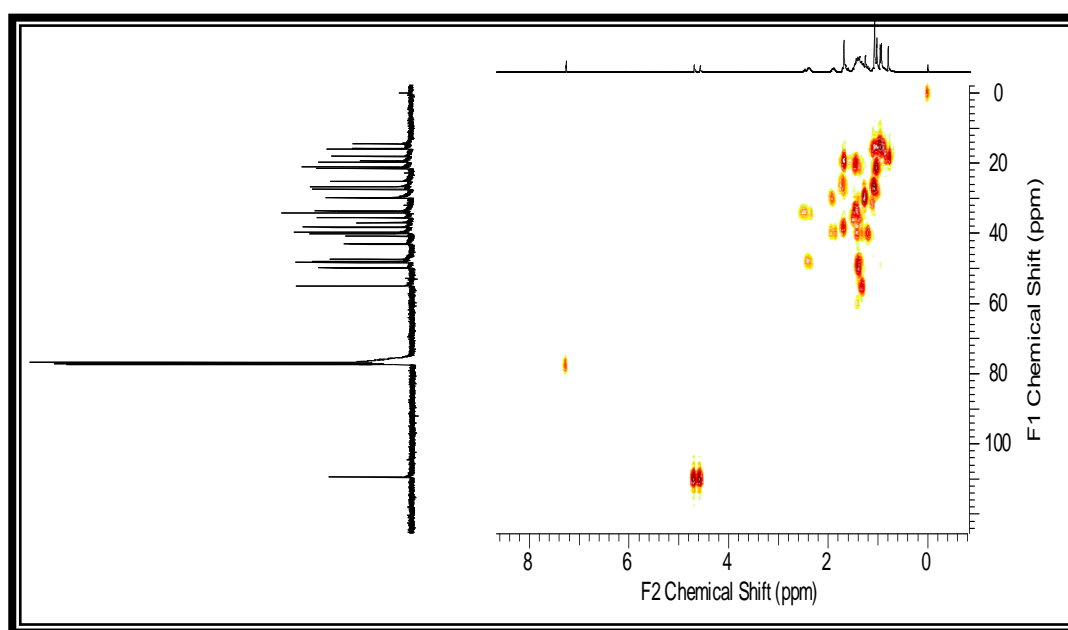


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -HMQC da substância NCH₂, CDCl₃

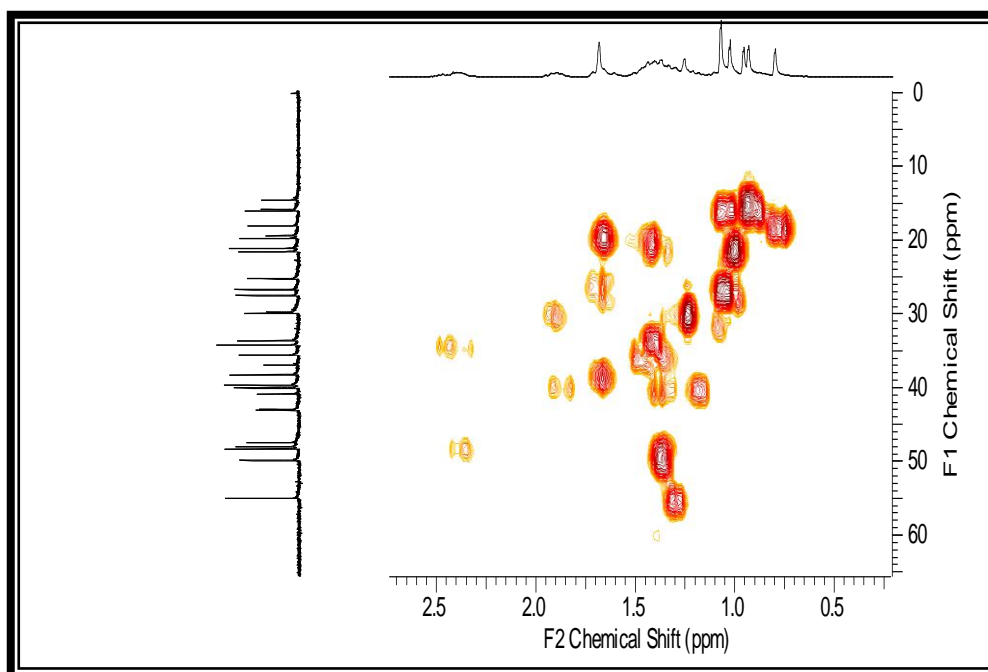


Figura 57. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – (HMQC) da substância NCH₂, CDCl_3 (ampliação)

No mapa de contorno de correlação a longa distância HMBC (Figura 58, p. 70) pode-se confirmar a localização do grupo carbonila em C-3 através da correlação a três ligações existente entre o carbono carbonílico C-3 (δ_{C} 218 ppm) e o sinal dos hidrogênios da metila C-23 (δ_{H} 1,02 ppm). Observou-se também a existência de correlação entre os hidrogênios da metila C-30 (δ_{H} 1,68 ppm) com os carbonos C-20 [δ_{C} 150,9 (duas ligações)], C-29 [δ_{C} 109,4 ppm (duas ligações) e o carbono C-19 δ_{C} 47,4 ppm (três ligações)]. E pode se observar os sinais referentes as correlações das metilas.

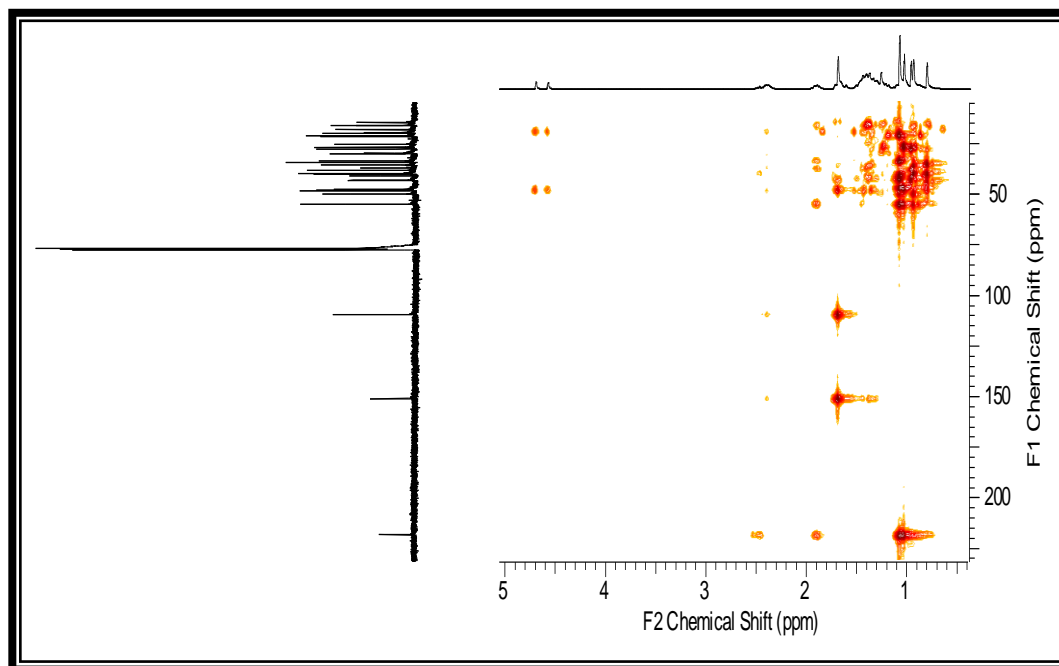


Figura 58. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância NCH₂, CDCl₃

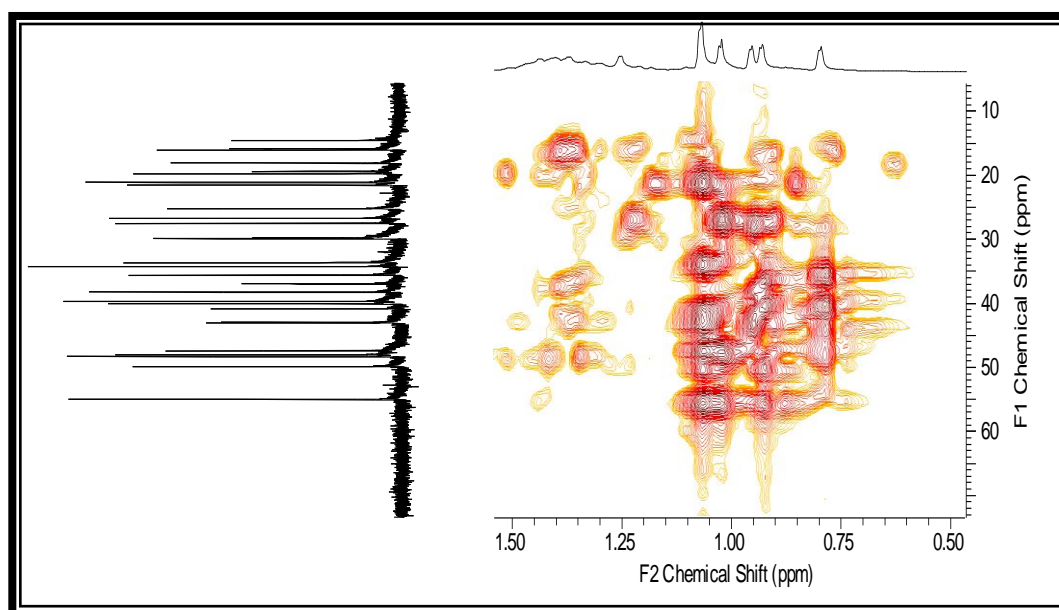


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C – HMBC da substância NCH₂, CDCl₃ (ampliação)

Tabela 4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCH2 comparados com dados da literatura

C	HMQC NCH2		HMBC		Literatura*	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_c	δ_H
3	218,2	-			218,1	
4	38,2		3H-23		38,8	3,15
8	40,8				40,7	
10	36,9				37,1	
14	-				42,7	
17	42,9				42,9	
20	150,9		3H-30		150,8	
CH						
5	55,0	1,26		3H-23, 3H-25	55,2	
9	-				50,3	
13	38,2	1,67		3H-25	38,0	
18	48,3	1,36			48,2	
19	47,4	2,38		2H-29	47,9	2,38
CH₂						
1	-				38,6	
2	26,7	1,0			27,3	
6	18,1	0,79			18,2	
7	34,2	1,43			34,2	
11	21,1	1,0			20,9	
12	25,2	1,0			25,0	
15	27,5	1,0			27,4	
16	35,6	1,4			35,5	
21	29,9	1,2			29,8	
29	109,4	4,69		3H-30	109,3	4,68
CH₃						
23	27,5	1,02 (s)			27,9	1,02
24	14,5	0,96 (s)			15,3	0,76
25	16,0	1,07 (s)			16,1	0,94
26	15,8	0,93 (s)			15,9	0,96
27	14,5	0,95 (s)			14,5	0,78
28	18,1	0,79 (s)			17,9	0,82
30	19,4	1,68 (s)		2H-29	19,2	1,67

* Mahato e Kundu (1994)

Os dados de espectrométricos discutidos acima juntamente com aqueles descritos na literatura permitem deduzir para a substância NCH2 a estrutura do triterpeno pentacíclico lupenona (Figura. 60, p.72).

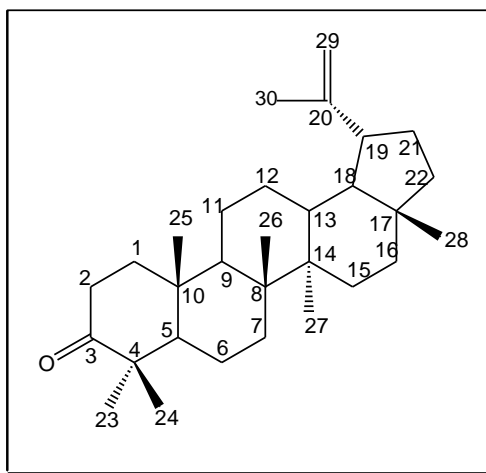


Figura 60. Estrutura da substância NCH2 (lupenona)

8.2.4 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO NCHP

A fração NCHP apresentou-se na forma de um sólido branco acinzentado amorfo, solúvel em CH_2Cl_2 . A identificação estrutural dos componentes da fração foi feita através de análise dos dados obtidos de CG-EM, infravermelho e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro na região do infravermelho da fração NCHP (Figura 61, p. 73) apresentou bandas intensas na região de 2900 e 2850 cm^{-1} superpostas a uma absorção larga entre 3500-2800 cm^{-1} , compatíveis, respectivamente, com estiramentos de grupos CH e OH. Absorção adicional em 1705 cm^{-1} , caracterizou a presença de carboxila típica de uma mistura de ácidos graxo (Silverstein *et al.*, 1994).

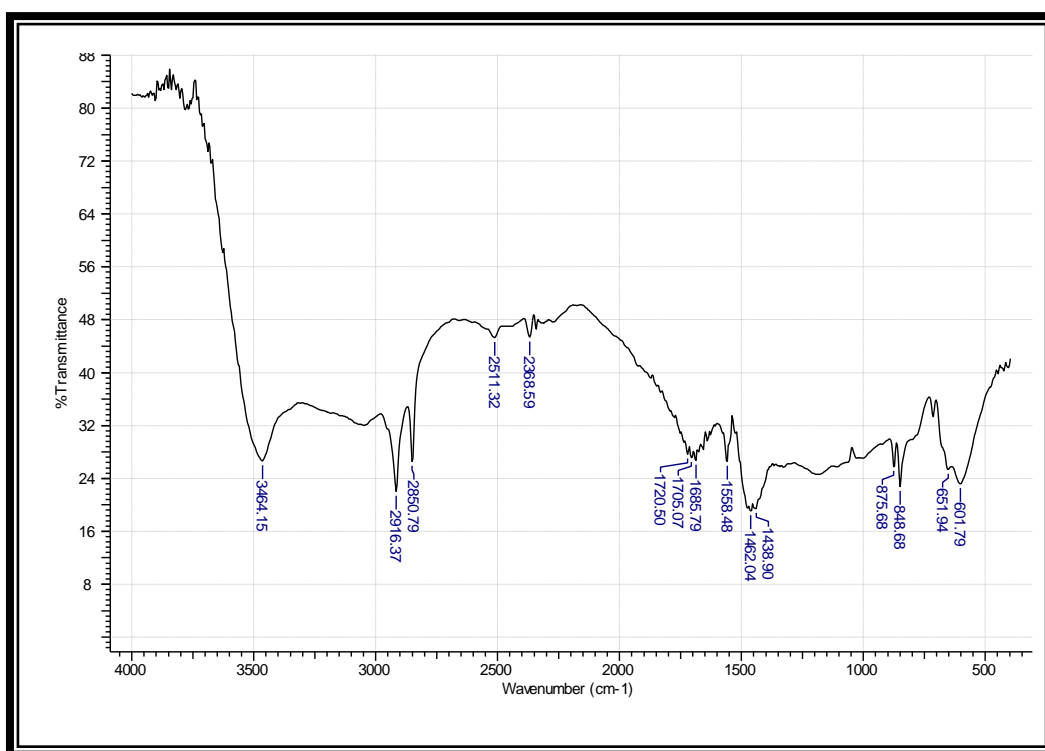


Figura 61. Espectro na região do infravermelho da substância NCHP

Através de análise em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa a substância NCHP foi identificada, baseada nos tempos de retenção e comparação com a biblioteca (NIST) equipamento, como sendo uma mistura de ésteres métilicos: metil éster do ácido docosanóico (5,30%), metil éster do ácido tetracosanóico (28,73%) e metil Ester do ácido hexacosanoico (19,45%) (Tabela 5, p. 75).

O pico do íon molecular de um éster métilico de um ácido alifático linear pode ser em geral observado (Figura 62, p. 74). O fragmento mais característico desses

ésteres é devido ao rearranjo tipo McLafferty e á quebra de uma ligação afastada do grupo C=O. Assim, um éster metílico de um ácido alifático não ramificado no carbono α dá um pico intenso a m/z 74 que é o pico base nos ésteres metílicos lineares (Silverstein *et al.*, 1991). Na Figura 63, p. 75 apresenta-se os principais fragmentos relativo a mistura de ésteres metílicos NCHP.

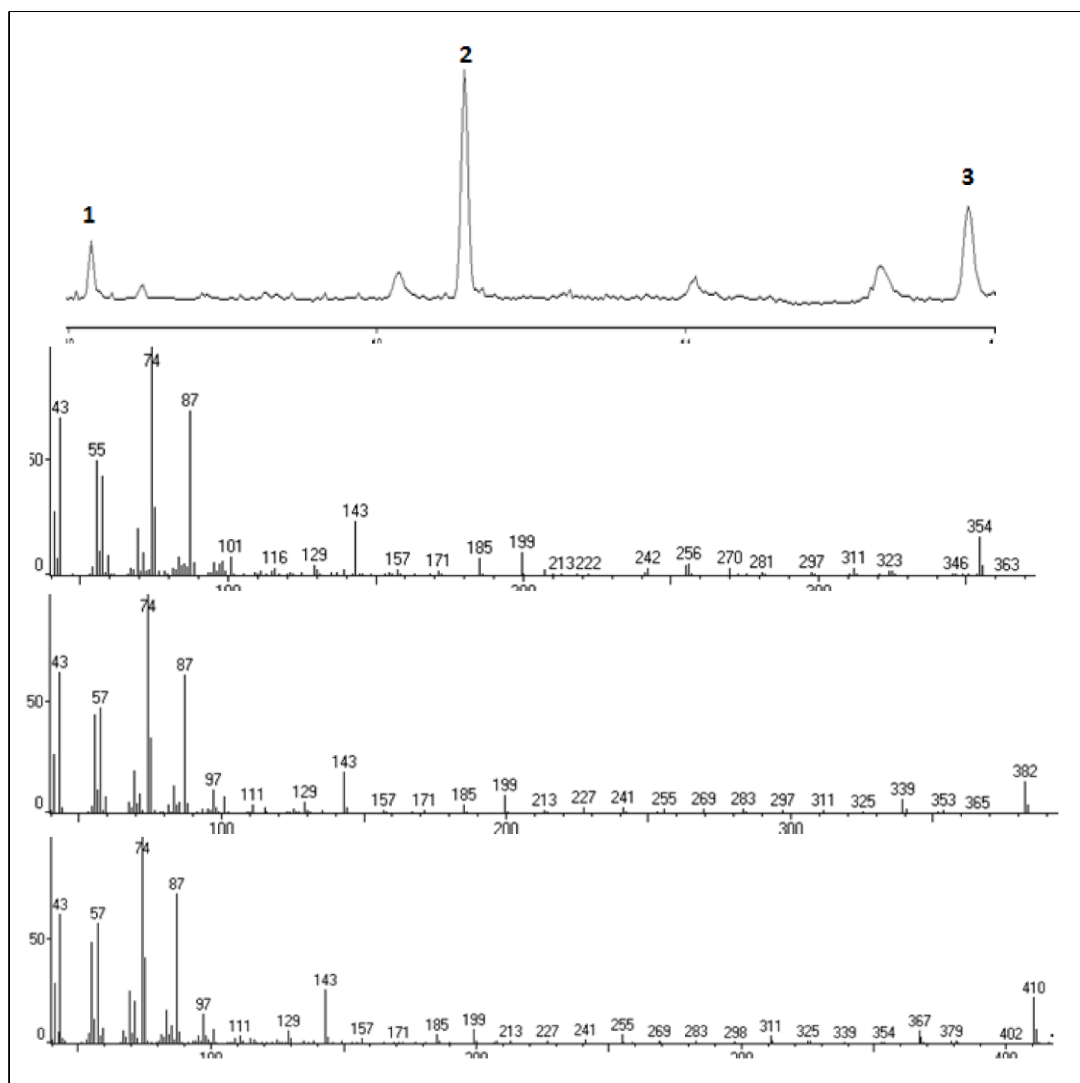
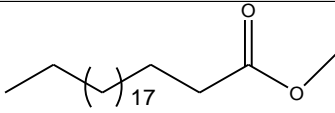
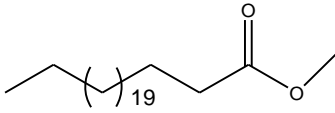
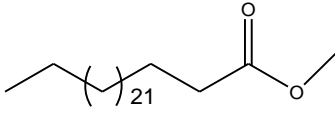


Figura 62. Espectros de massas da mistura de ésteres metílicos

Tabela 5. Mistura de ésteres metílicos encontrados na fração NCHP

Pico	m/z	Substância	Fórmula molecular
1	354		$C_{23}H_{46}O_2$
2	382		$C_{25}H_{50}O_2$
3	410		$C_{27}H_{54}O_2$

Legenda: 1- Metil éster do ácido docosanoico, 2 - Metil éster do ácido tetracosanoico, 3 - Metil Ester do ácido hexacosanoico

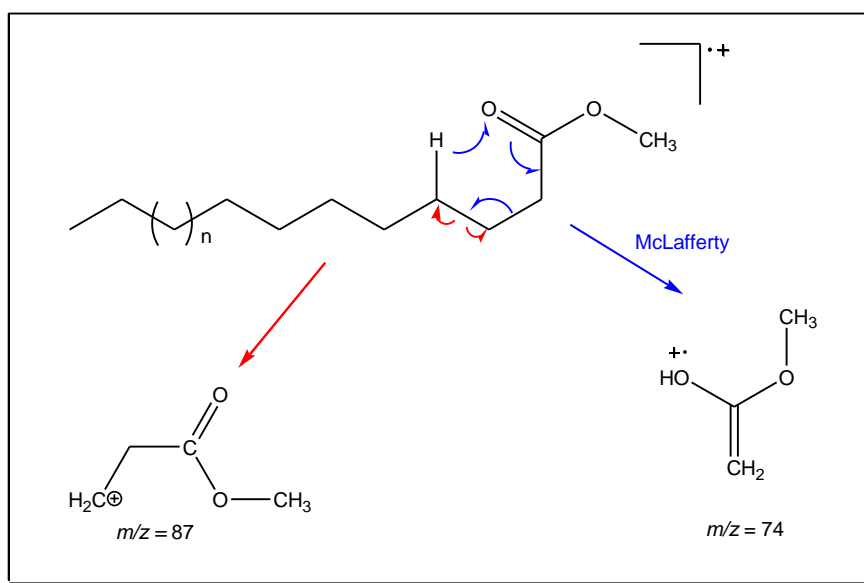


Figura 63. Fragmentos típicos de ésteres metílicos de ácidos carboxílicos de cadeia longa.

8.2.5 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA NCA1

A substância NCA1 apresentou-se na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol. A identificação estrutural da substância foi feita através de análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C , CG-EM, infravermelho e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro na região de infravermelho (Figura 64, p. 76) revelou bandas de absorção de deformação axial de O-H na região de 3317 cm^{-1} . Observam-se também bandas características de deformação angular das ligações CH de anel benzênico na região de 1261 cm^{-1} . Estiramentos de CH_2 e CH_3 na região de $2848 - 2918\text{ cm}^{-1}$.

Na região de 1612 cm^{-1} observa-se uma banda que foi atribuída a estiramento da carbonila.

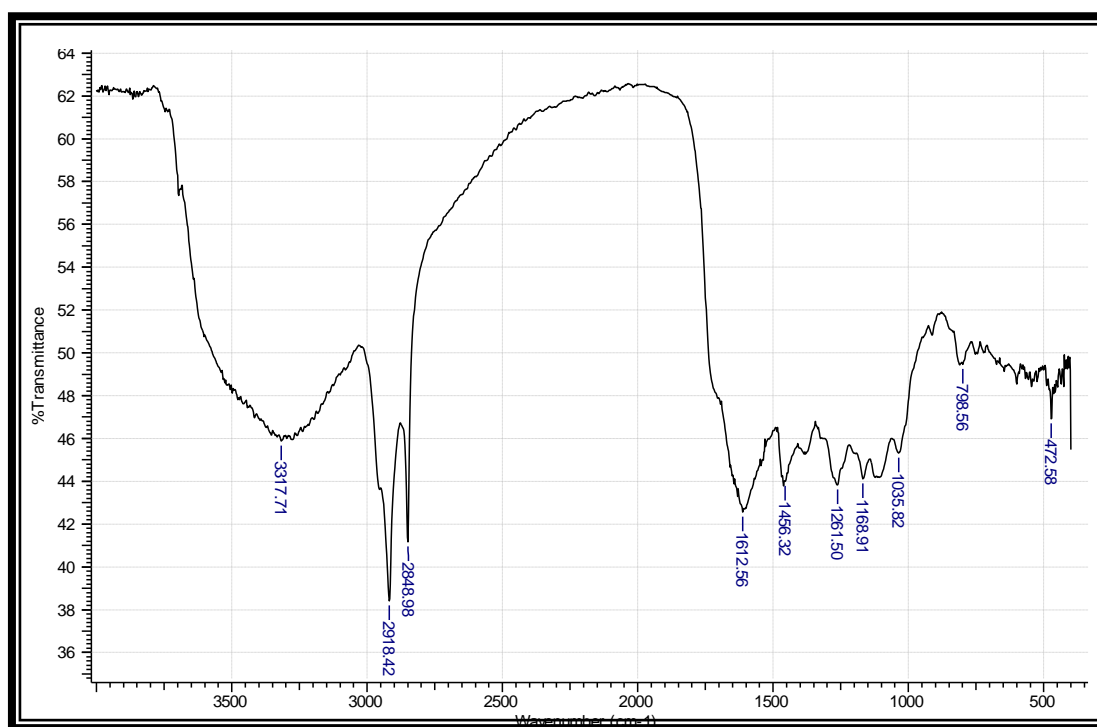


Figura 64. Espectro na região de infravermelho de NCA1

O espectro de RMN de ^1H (Figura 65 p. 77) confirmou a presença de hidrogênios ligados a anel aromático pela presença de sinais na região compreendida entre $\delta_{\text{H}} 7,0 - 8,0\text{ ppm}$. O espectro de RMN ^1H apresentou o sinal em $\delta_{\text{H}} 8,07$, atribuído a H-4; $\delta_{\text{H}} 7,2$ atribuído a H-5 e H-6; $\delta_{\text{H}} 7,4$ atribuído a H-7 e $\delta_{\text{H}} 7,94$ atribuído a H-2.

Os sinais dos carbonos metínicos foram observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 66 p. 77) a $\delta_{\text{C}} 120,7$ (C-4), $\delta_{\text{C}} 121,0$ (C-5) e $\delta_{\text{C}} 111,5$ (C-7), $\delta_{\text{C}} 131,9$ (C-2) e os quaternários a $\delta_{\text{C}} 136,8$ (C-7a) e $\delta_{\text{C}} 122,2$ (C-3a).

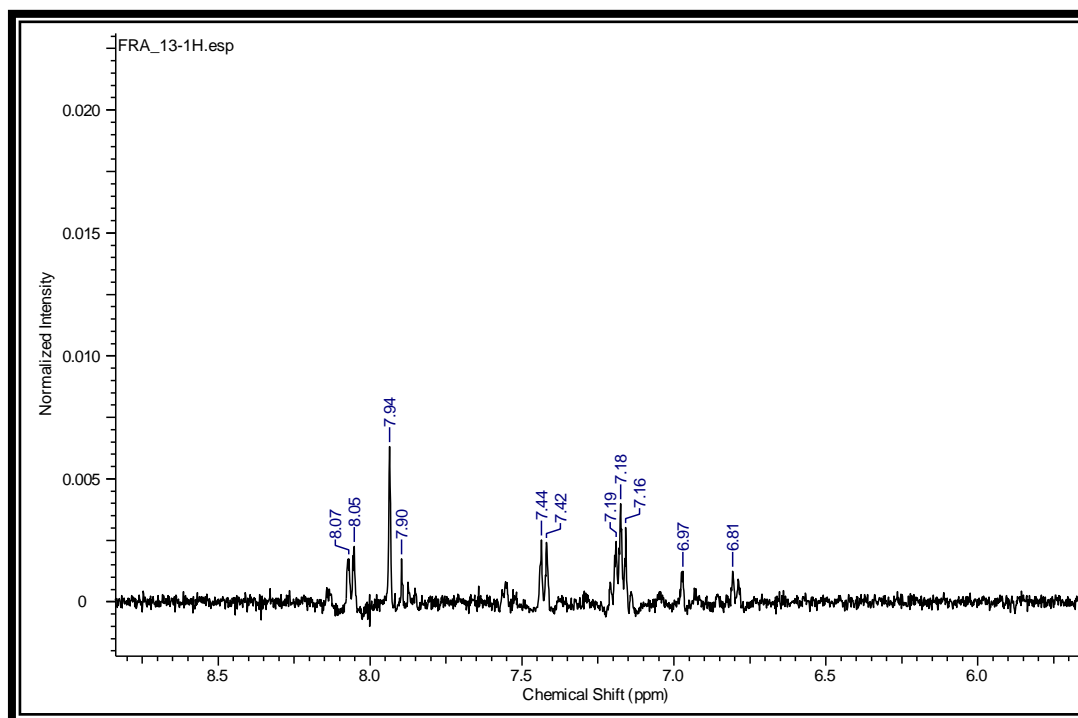


Figura 65. Espectro de RMN ^1H da substância NCA1, 400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$

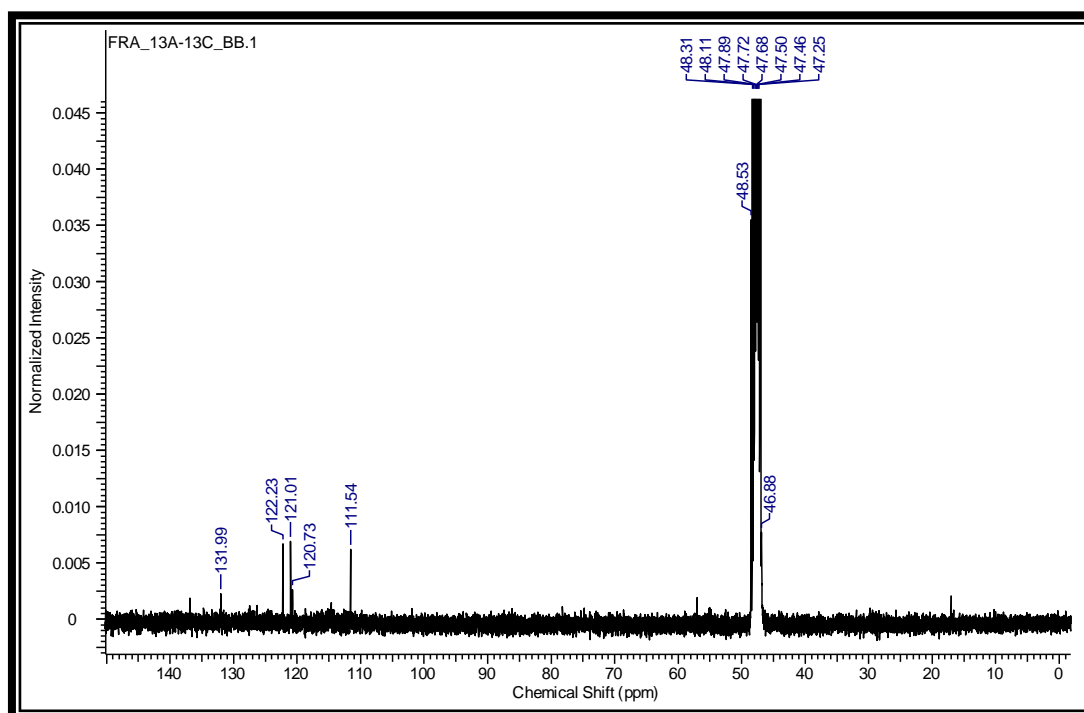


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCA1, 100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$

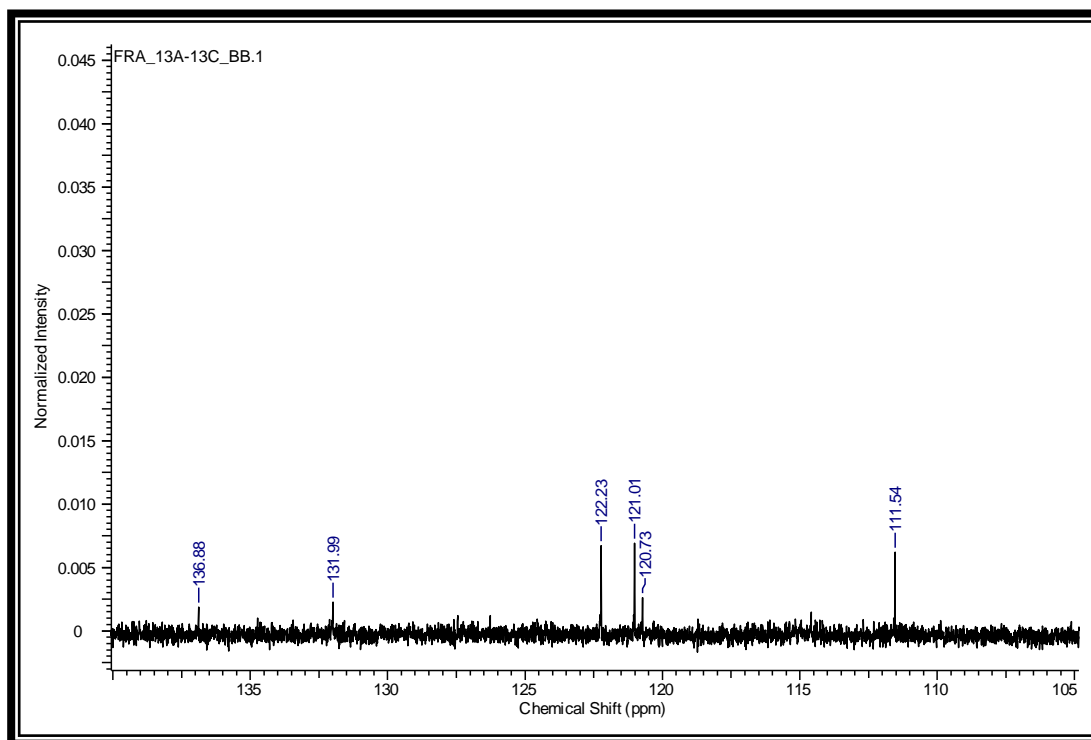


Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C da substância NCA1, 100 MHz, MeOH- d_4 (ampliação da região entre 111,5 – 136,8 ppm).

Na análise do espectro obtido por cromatografia gasosa acoplada ao massas (CG/EM) (Figura 68, p.78) foi possível identificar o pico do íon molecular em $m/z = 161$ (compatível para molécula com um átomo de nitrogênio) e alguns fragmentos característicos como o do cátion arênio $m/z = 144$. Os fragmentos a $m/z = 116$ (perda de CO) e $m/z = 89$ (perda de HCN) confirmam a presença do grupamento carbonílico não observado no espectro de RMN, (Figura 69, p.79).

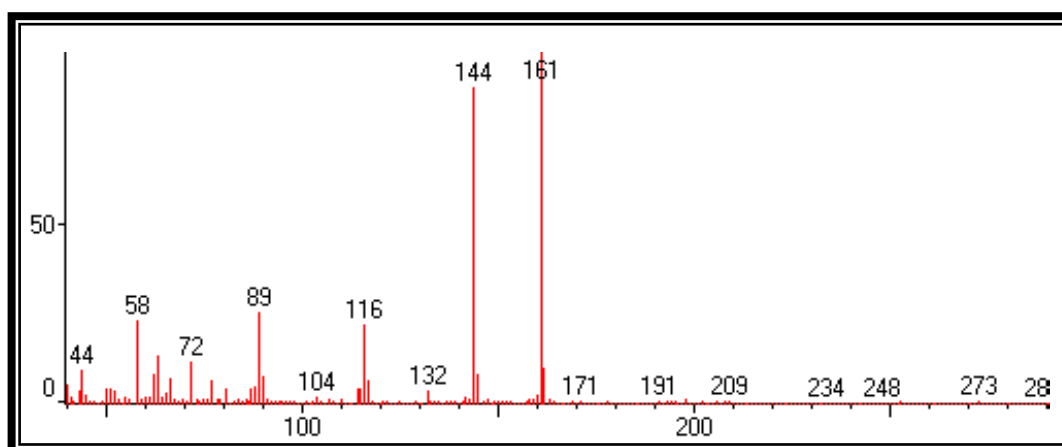


Figura 68. Espectro de massas 70 eV de NCA1

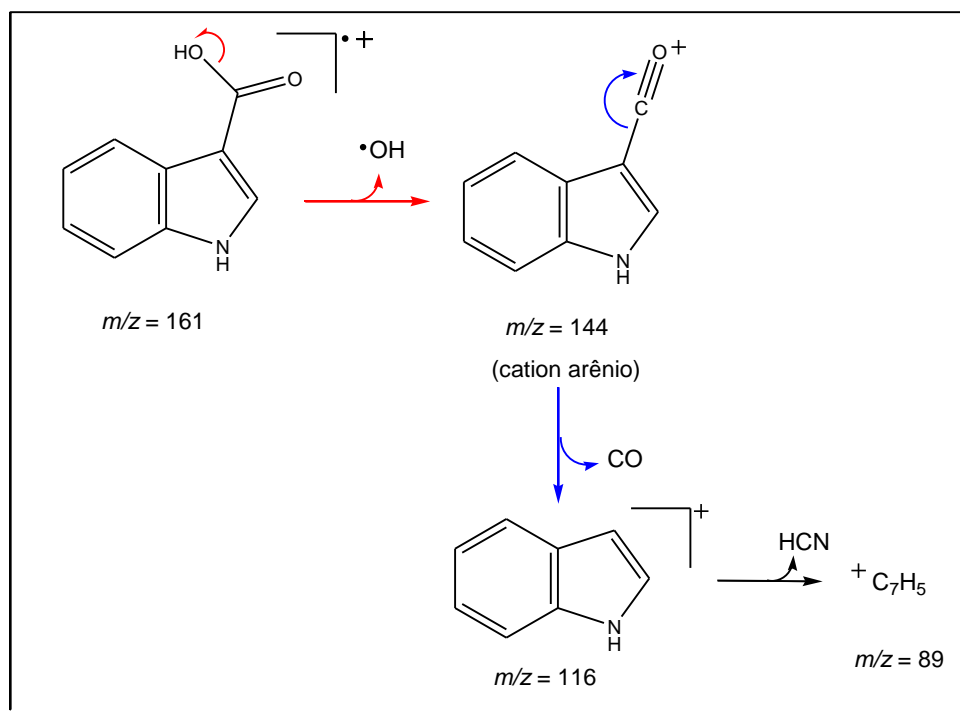


Figura 69. Proposta de alguns fragmentos de massas para a substância NCA1

Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCA1 comparados com dados da literatura

C	NCA1		Literatura*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
3	-		108,7	
3a	122,2		127,6	
7a	136,8		138,2	
8	-		-	
CH				
2	131,9	7,9	133,4	7,9 (s)
4	120,7	8,0	122,0	8,1 (dd, $J = 7,7$ e 1,3)
5	121,0	7,2	122,4	7,2 (ddd, $J = 7,7; 7,7$ e 1,3)
6	122,2	7,2	123,6	7,2 (ddd, $J = 7,7; 7,7$ e 1,3)
7	111,5	7,4	112,9	7,4 (dd, $J = 7,7$ e 1,3)

*Hagemeier *et al.*, (2001)

Com base nesses dados espectrométricos discutidos acima juntamente com aqueles descritos na literatura permitem deduzir para a substância NCA1 a estrutura do ácido-3-indol carboxílico. (Figura. 70, p. 80).

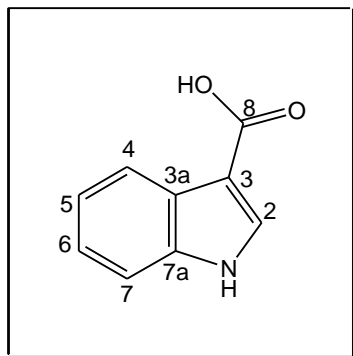


Figura 70. Estrutura da substância NCA1 (ácido-3-indol carboxílico)

Dentre as atividades biológicas descritas para o ácido-3-indol carboxílico, as mais importantes são a antiinflamatória e antipirética, sendo utilizado no tratamento da artrite e desordens dermatológicas (Shen, 1967). Além disso, este alcalóide é matéria prima para a preparação de inúmeros derivados apresentando atividade biológica, tais como ésteres ativos contra vírus da hepatite e influenza A (Vasil'evich *et al.*, 2009).

Segundo (Popov, 1979) o ácido 3-indol-3-carboxílico apresenta atividade aleloquímica similar aquela apresentada pelo ácido indol-3-acético sobre o crescimento de coleótilos (primeira porção de planta que aparece à superfície do solo) obtidos a partir de 5 cultivares de trigo.

8.2.6. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DA FRAÇÃO NCM1 DO EXTRATO METANÓLICO

A fração NCM1 foi obtida a partir da acetilação de uma alíquota do extrato metanólico. NCM1 apresentou-se com um sólido gelatinoso incolor, solúvel em clorofórmio. A identificação dos componentes da fração (Tabela 7, p.81; Figura 71, p. 82), em mistura, foi feita através de análise dos dados obtidos do CG-EM (substâncias NCM1a, NCM1b, NCM1c, NCM1d, NCM1e, NCM1f, NCM1g, NCM1h e NCM1i), junto com os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados encontrados na literatura (substâncias NCM1c e NCM1i).

Tabela 7. Principais picos observados no espectro de massa da fração NCM1 do extrato metanólico de *Newtonia contorta*

Pico*	t_R **	Substância	PM	%
1	14,83	triacetato de glicerol (NCM1a)	218	1,42
2	21,83	tetra acetato de butanol (NCM1b)	290	8,38
3	22,19	nd	-	2,28
4	27,20	nd	-	2,38
5	27,65	peracetato de iditol (NCM1c)	434	37,36
6	27,84	peracetato de α -D-manopiranosídeo (NCM1d)	390	6,03
7	28,99	nd	-	0,92
8	29,73	etil-tetra-O-acetil- β -D-glicopiranosídeo (NCM1e)		0,52
9	30,36	peracetato de β -D-sorbose (NCM1f)	390	0,92
10	30,51	nd	-	2,27
11	30,67	peracetato de β -D-glicopiranosídeo (NCM1g)	390	2,61
12	30,79	nd	-	2,66
13	31,52	peracetato de inositol (NCM1h)	432	1,00
14	32,16	peracetato de glicitol (NCM1i)	434	31,34

*Pico: ver Figura 71; ** t_R = tempo de retenção em minutos; nd = não identificado

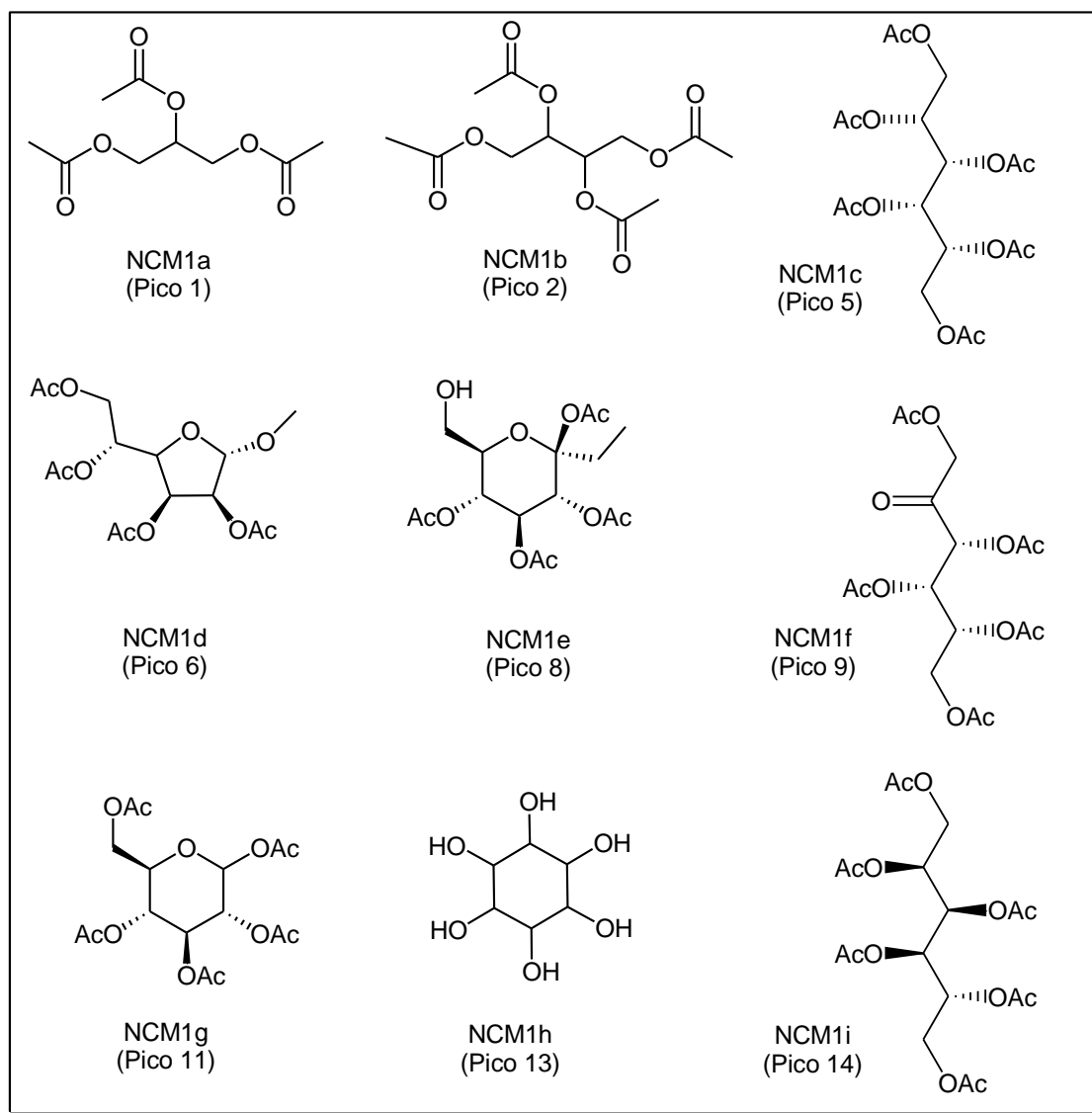


Figura 71. Principais componentes identificados na fração NCM1 do extrato metanólico de *N. contorta*

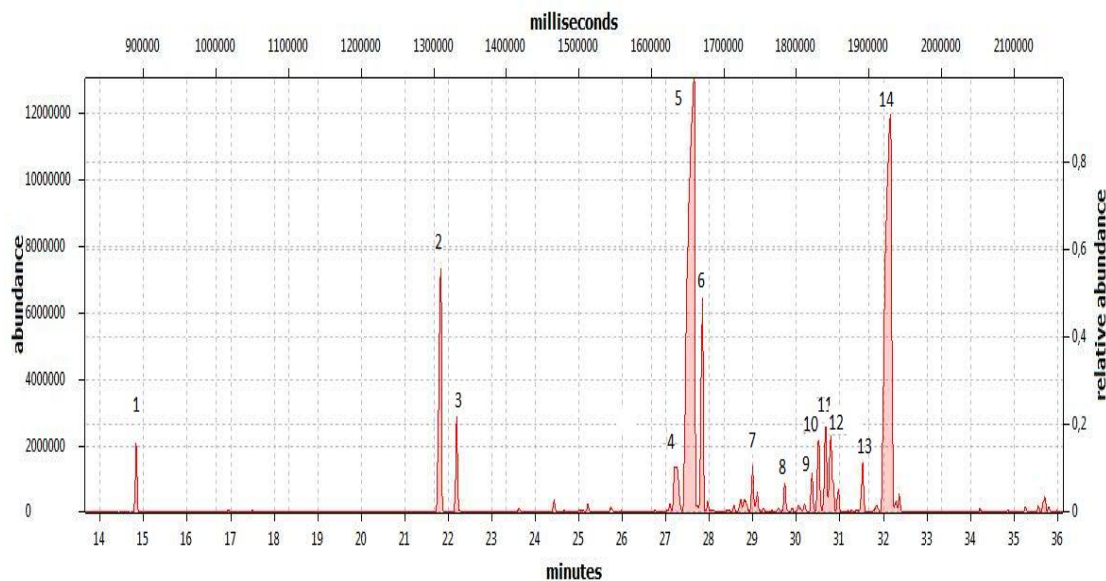


Figura 72. Cromatograma da fração NCM1 do extrato metanólico de *N. contorta*.

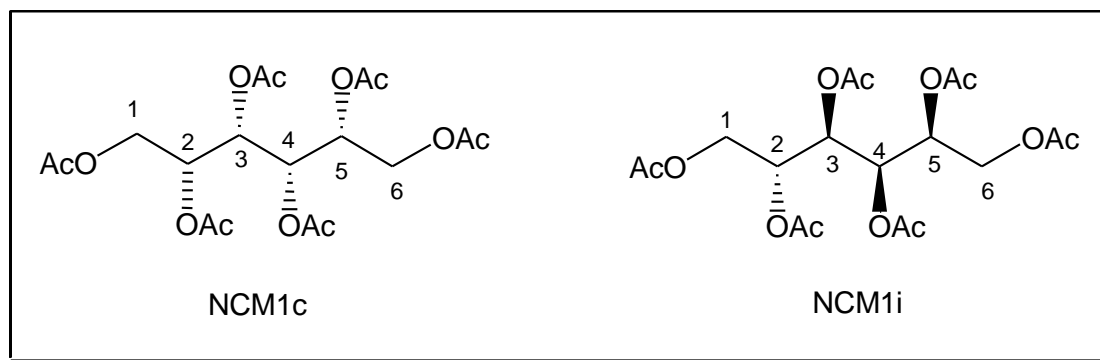


Figura 73. componentes majoritários da fração NCM1 do extrato metanólico de *N. contorta*.

A presença dos componentes majoritários da fração NCM1 do extrato metanólico de *N. contorta*, peracetato de iditol (NCM1c) e peracetato de glicitol (NCM1i), pode ser evidenciada através da análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração NCM1 onde verifica-se a presença de sinais intensos característicos de hidrogênios metílicos de carbonos ligados a oxigênio na região de δ_{H} (2,04 - 2,13 ppm) atribuídos aos hidrogênios das metilas do grupo acetil ($-\text{OCOCH}_3$); sinais em δ_{H} (4,0 a 4,3 ppm) atribuídos aos hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2\text{OAc}$); sinais na região de δ_{H} (4,30 a 5,48 ppm) atribuídos aos hidrogênios metínicos ($-\text{CHO-OAc}$) (Figura 74, p. 84)

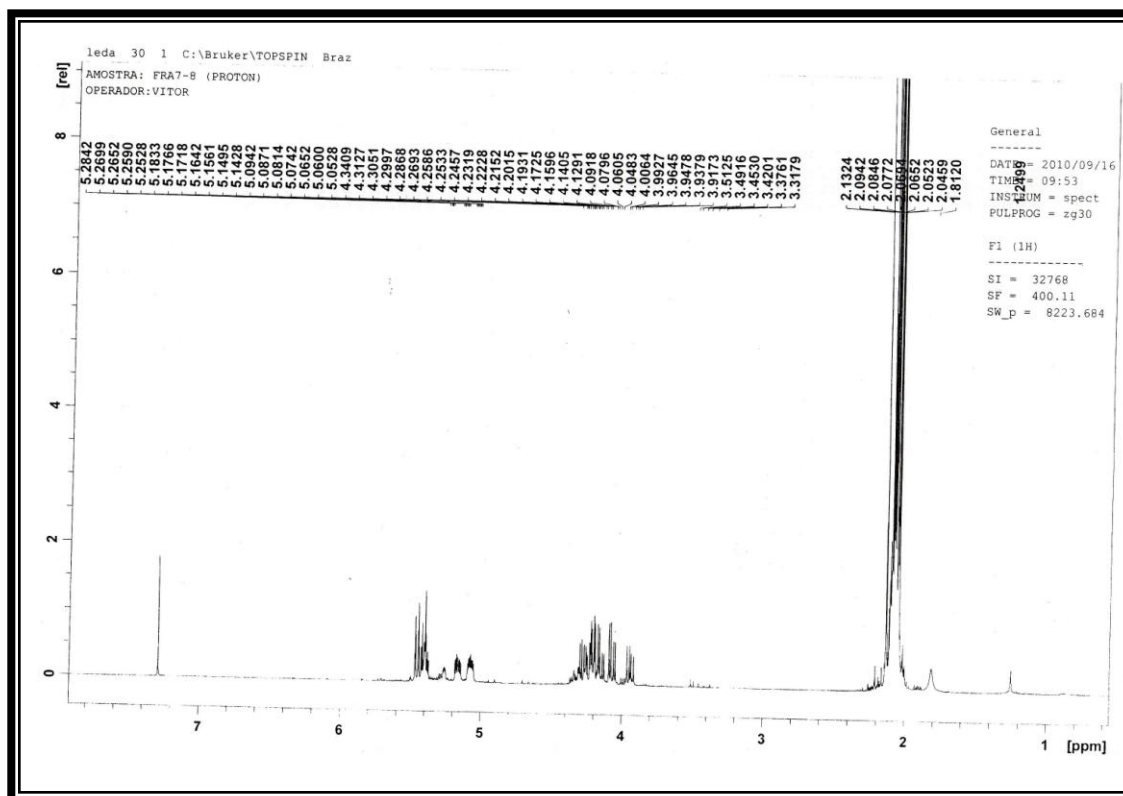


Figura 74. Espectro de RMN ¹H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl₃)

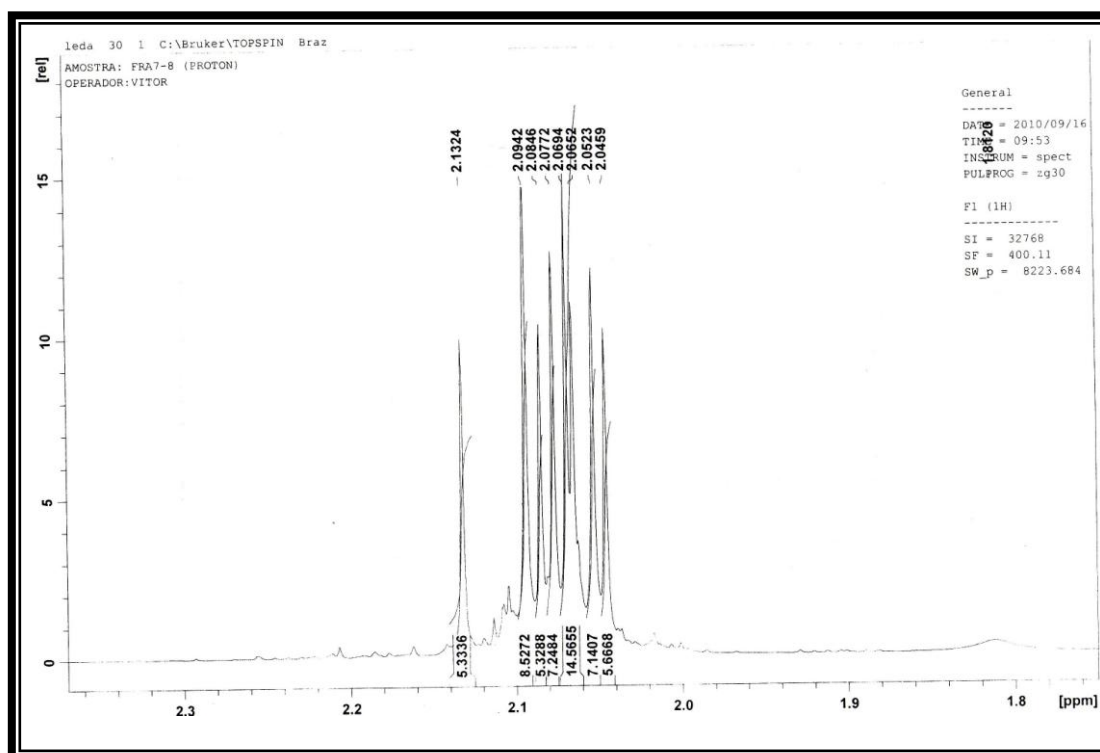


Figura 75. Espectro de RMN ¹H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl₃ -ampliação da região entre 2,0 – 2,1 ppm)

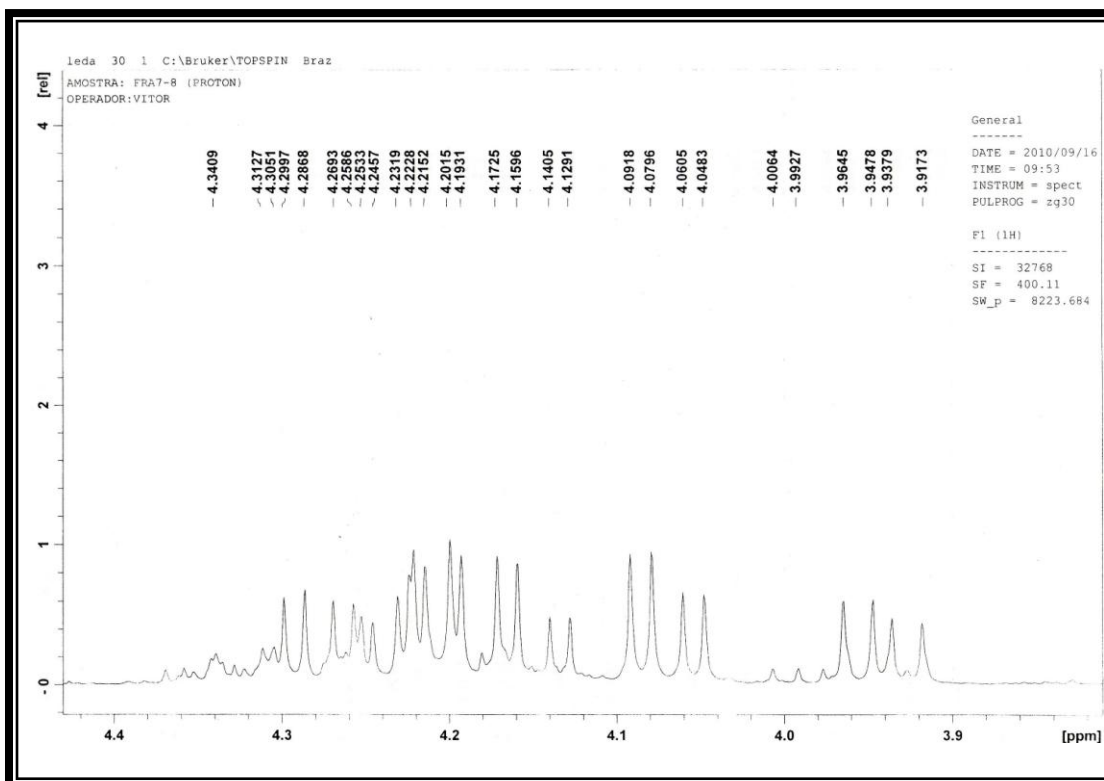


Figura 76. Espectro de RMN ¹H da fração NCM1 (400 MHz, CDCl₃ - ampliação da região entre 3,9 – 4,3 ppm).

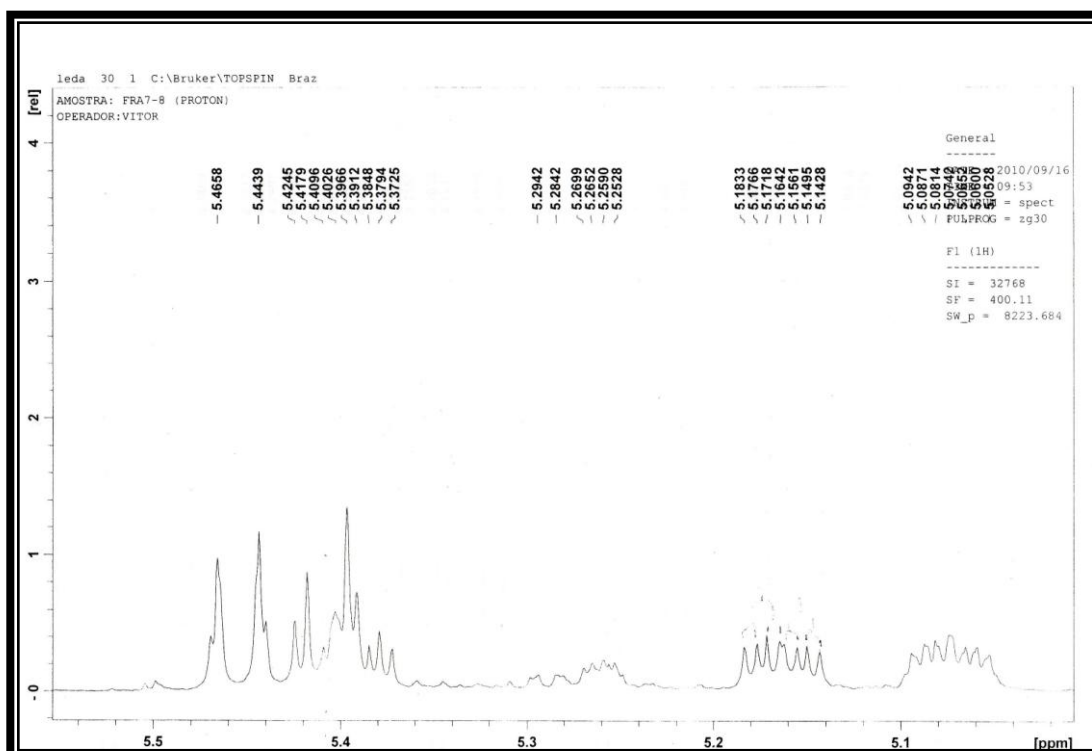


Figura 77. Espectro de RMN ¹H da fração NCM1(400 MHz, CDCl₃ - ampliação da região entre 5,0 - 5,4 ppm).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 78, p.86) da fração NCM1 apresentou sinais na região de δ_{C} (170,5 – 169,6 ppm) confirmando então a presença dos carbonos carbonílicos ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$); sinais entre δ_{C} (20,5 – 20,8 ppm) relativos as metilas do grupo acetil ($-\text{O}-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$); sinais em δ_{C} (61,7 e 61,8) relativos aos grupos metilênicos ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OAc}$) e também os sinais característicos dos carbonos metínicos ($-\underline{\text{C}}\text{HOAc}$) a δ_{C} (64,7; 68,0; 69,1 e 69,3 ppm). O espectros RMN ^{13}C -APT (Figura 81, p. 88) e RMN ^{13}C -DEPT (Figura 83, p.89) auxiliaram na confirmação dos dados acima que juntamente com o espectro de RMN ^1H corroboram que alditóis estavam acetilados (Figura 74, p. 84).

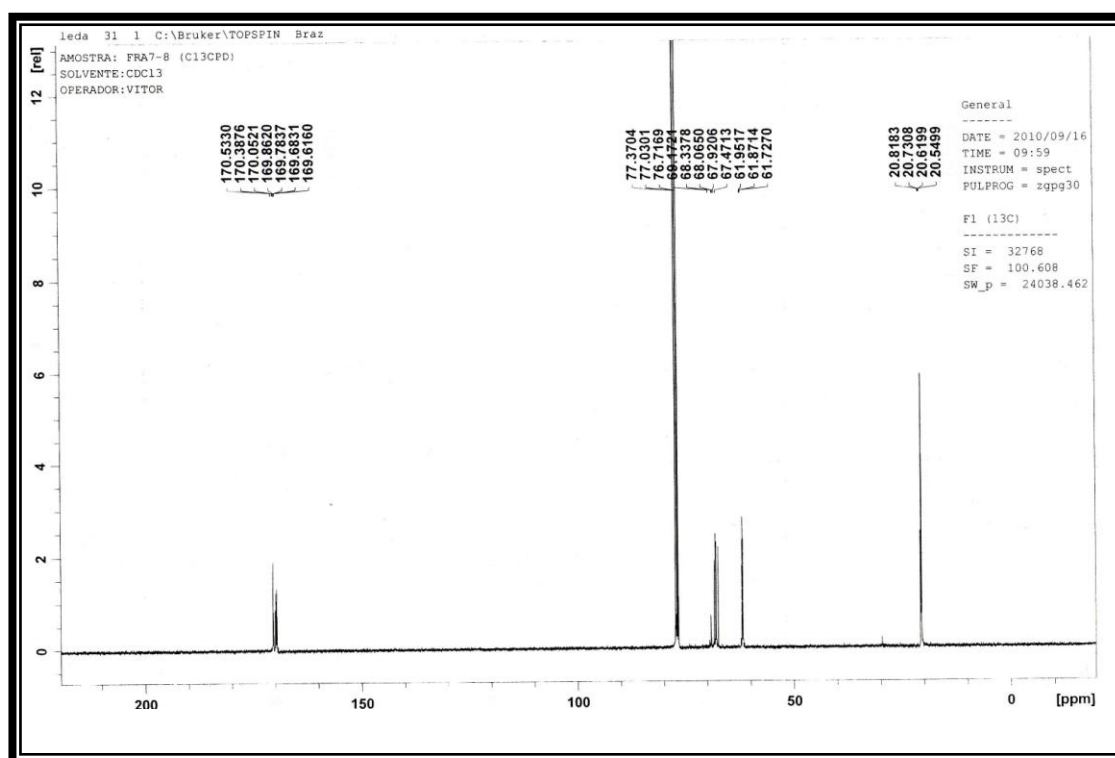


Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1 (100 MHz, CDCl_3)

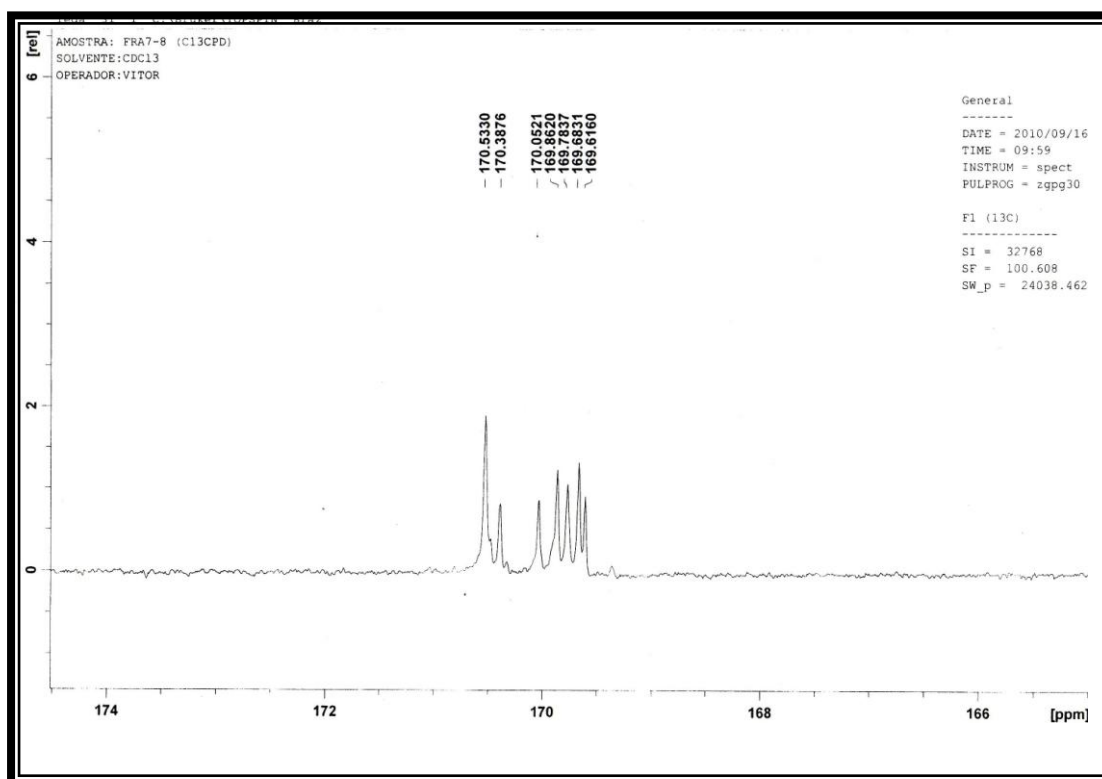


Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1, (100 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 169,6 – 170,5 ppm).

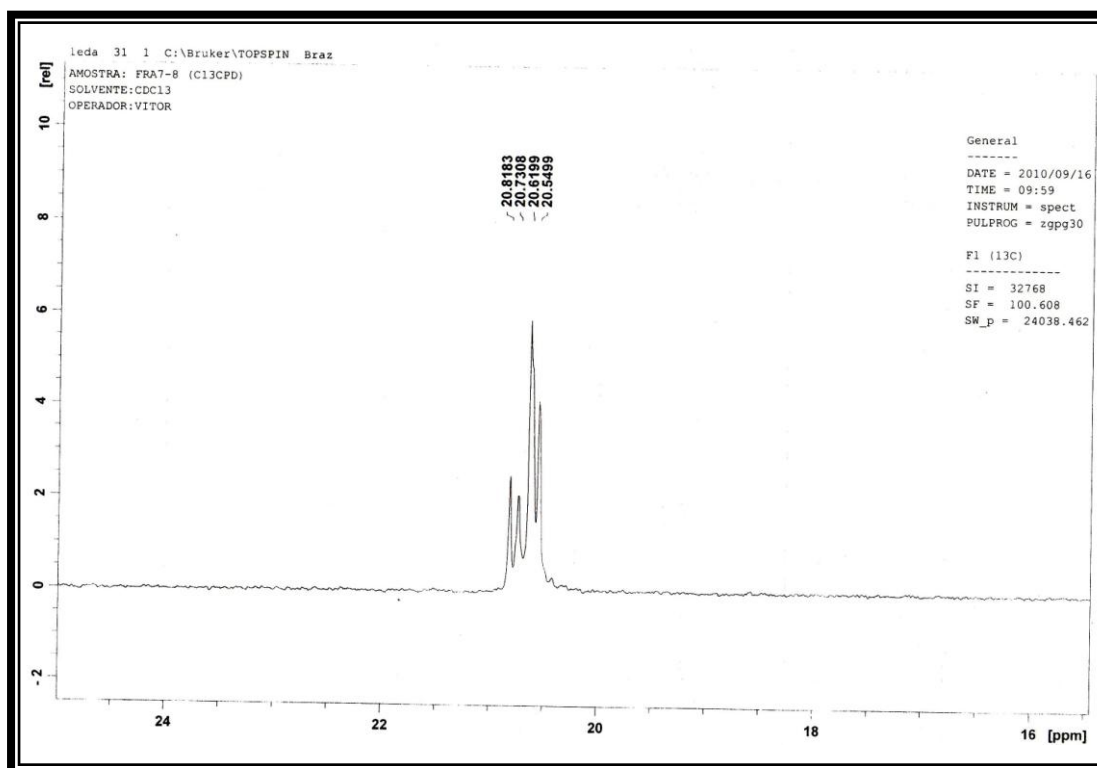


Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C da fração NCM1 (100 MHz, CDCl_3 - ampliação da região entre 20,5 – 20,8 ppm).

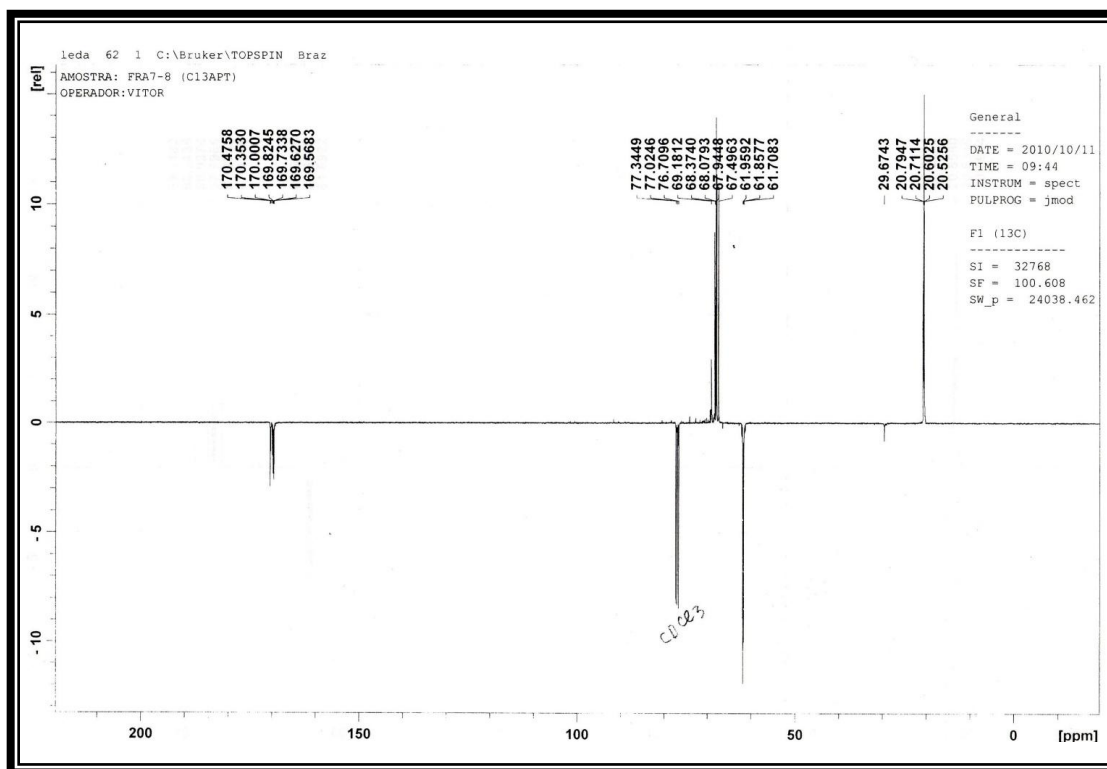


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 Hz, CDCl_3) da fração NCM1

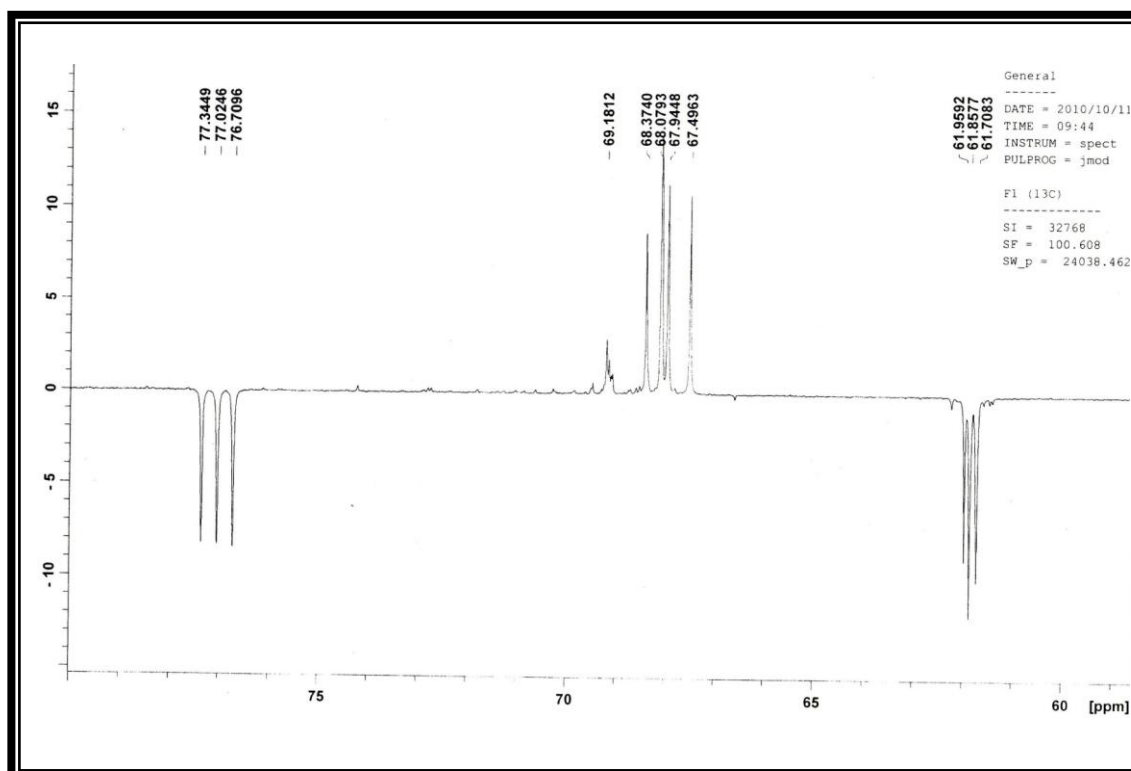


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C - APT (100 Hz, CDCl_3) da fração NCM1

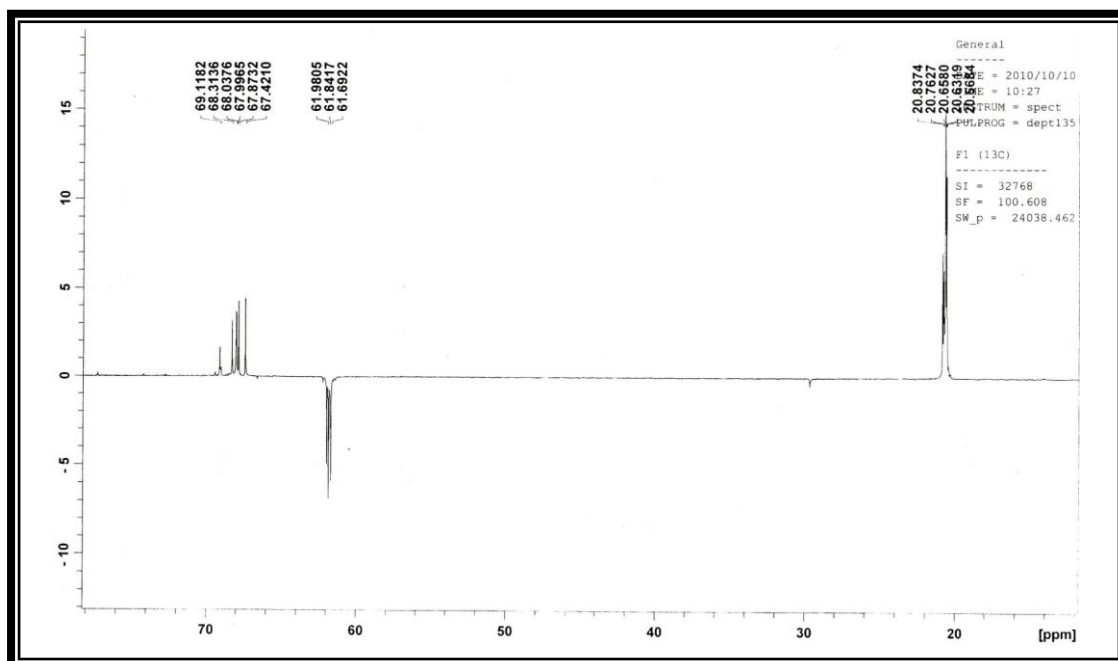


Figura 83. Espectro de RMN ¹³C - DEPT (100 Hz, CDCl₃) da fração NCM1

Nas Figuras (84 - 87 p. 89 - 91) apresentam-se os fragmentogramas e prováveis fragmentos de massa para as substâncias NCM1c e NCM1i.

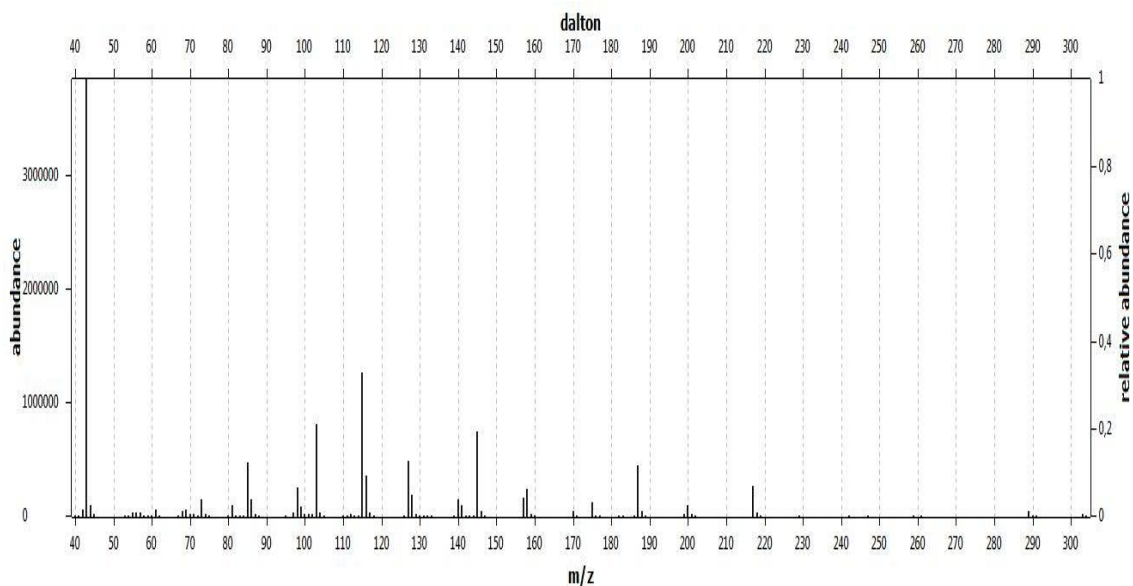


Figura 84. Fragmentograma de massa do peracetato de iditol (NCM1c)

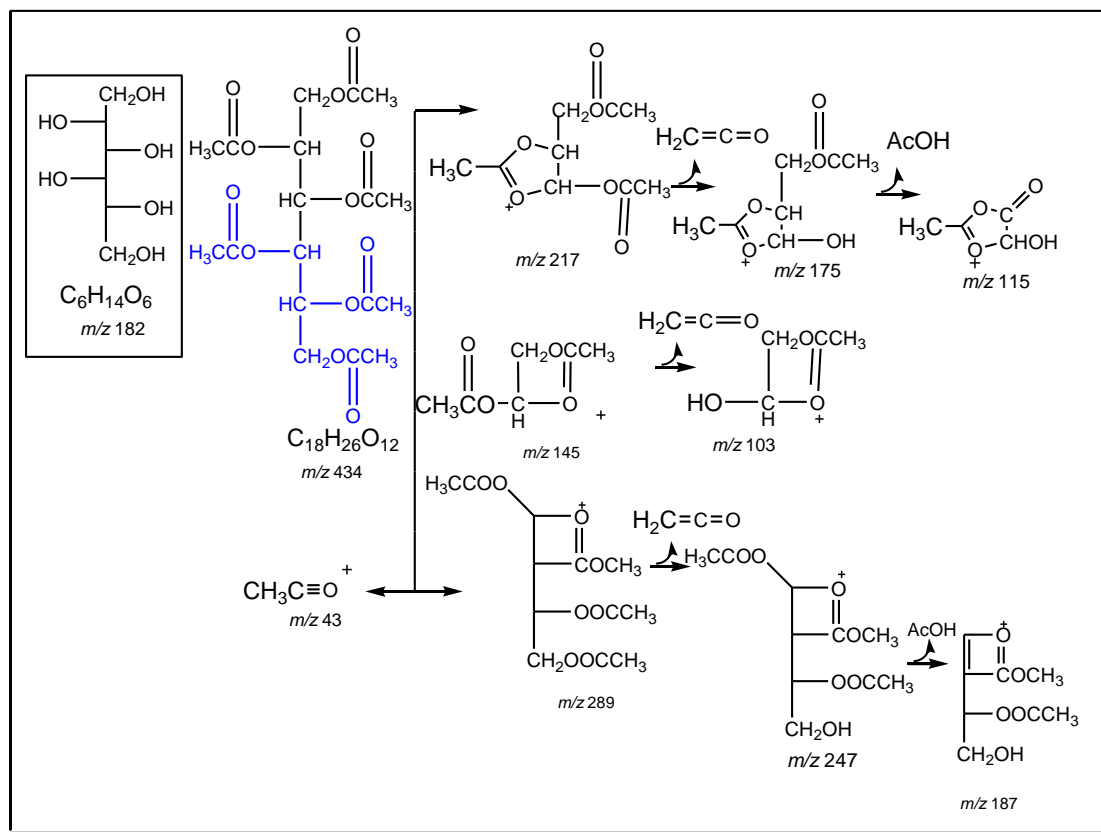


Figura 85. Proposta de alguns fragmentos de massas para o peracetato de iditol (NCM1c)

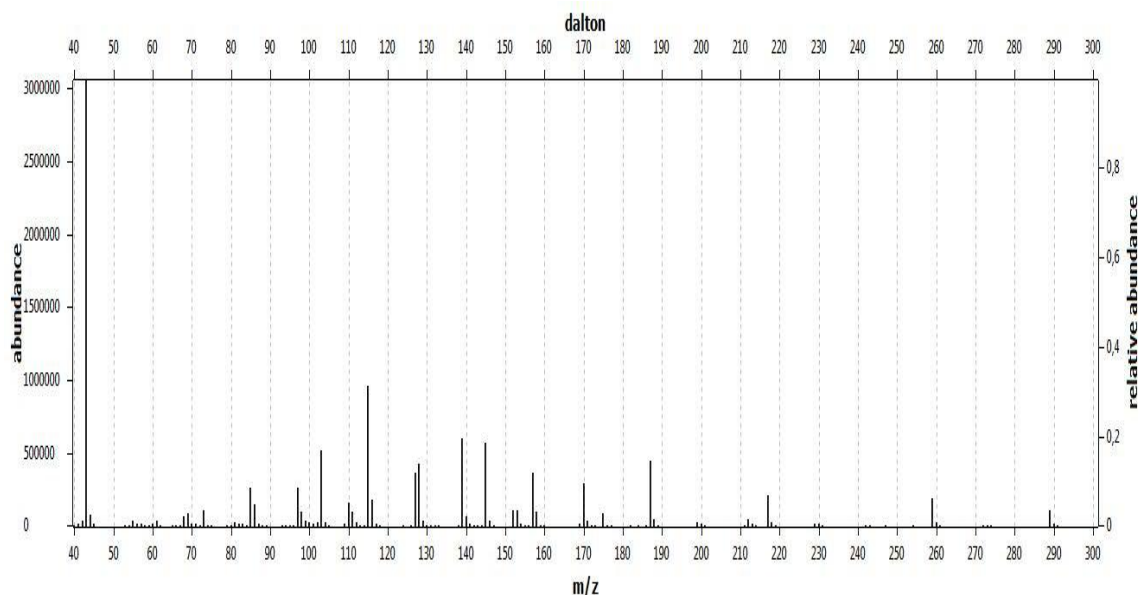


Figura 86. Fragmentograma de massa do peracetato de glicitol (NCM1i)

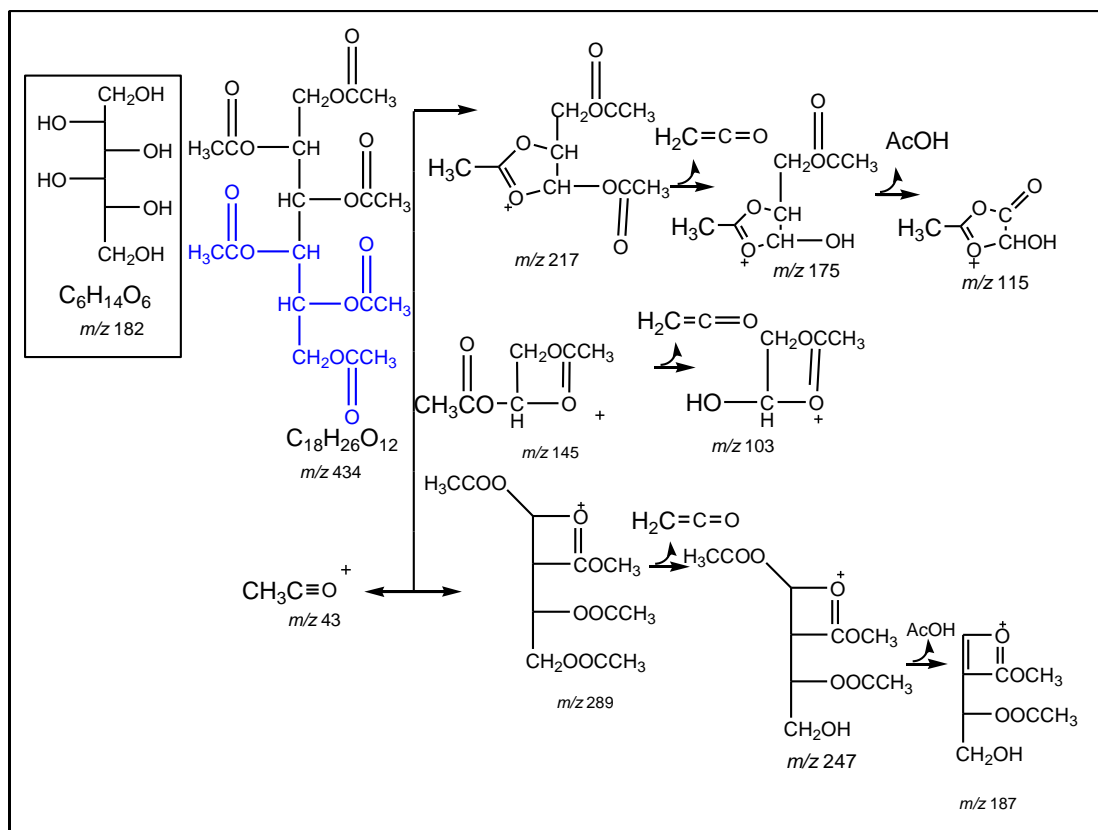


Figura 87. Proposta de alguns fragmentos de massas para o peracetato de glicitol (NCM1i)

Através dos dados espectrais acima foi possível então identificar a presença dos alditóis NCM1c e NCM1i na mistura, porém através dos espectros de RMN não foi possível a atribuição do deslocamento químico de cada carbono da molécula. Para tal, há necessidade de utilização de técnicas de RMN a duas dimensões (COSY, HMQC, HSQC, HMBC) e também o experimento de TOCSY 1D que possibilitaria atribuir inequivocamente cada hidrogênio a sua respectiva molécula.

8.2.7. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA NCM2

A substância NCM2 apresentou-se na de um sólido gelatinoso incolor, solúvel em clorofórmio, e com ponto de fusão 120°C. A identificação estrutural da substância foi feita através de análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C unidimensional, infravermelho e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro na região de infravermelho (Figura. 88 p. 92) mostra uma banda intensa de absorção de C=O na região de $1772,6\text{ cm}^{-1}$ característico de carbonila de éster. Vibrações de deformação axial de C-O de ésteres que na verdade são duas ligações assimétricas acopladas: C-C(=O)-O e O-C-C, a primeira sendo a mais importante, apresentando-se como uma banda intensa em $1273,7\text{ cm}^{-1}$. Os sinais em 2970, 1442 e 1390 cm^{-1} indicam a presença de grupos metílicos na molécula. (Silverstein *et al.*, 1994).

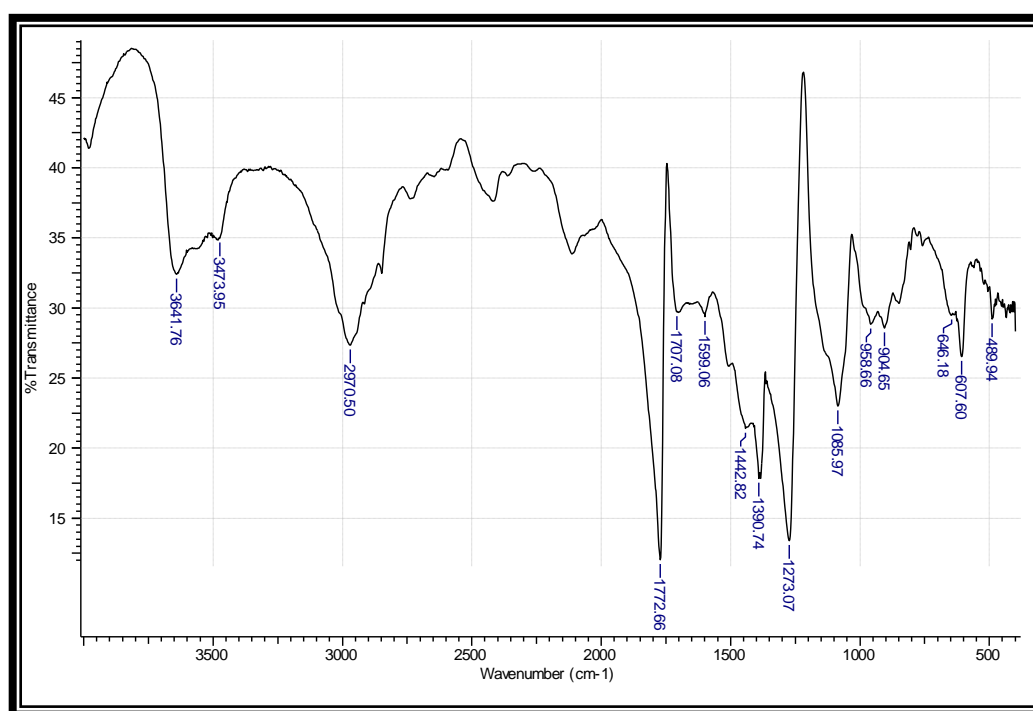


Figura 88. Espectro na região de infravermelho de NCM2

A substância NCM2 foi identificada como sacarose na forma de seu derivado peracetilado, seu espectro de RMN ^1H (Figura 89 p. 93) apresentou absorções referentes ao H-1(hidrogênio anomérico) em δ_{H} 5,6 (*d*), ao hidrogênio H-2 em δ_{H} 4,8 (*dd*), ao H-4 δ_{H} 5,05, ao H-5 δ_{H} 4,2 e ao H-6 δ_{H} 4,2, todos atribuídos ao resíduo de glicose; as metilas dos grupos acetila mostraram absorções características entre δ_{H} 2,02 e 2,19.

No espectro de ^{13}C (Figura 92, p. 95), os sinais entre δ_{C} 20,7 e 20,8 e os sinais entre δ_{C} 169,7 e 170,0 foram atribuídos aos grupos acetilas (CH_3 e $\text{C}=\text{O}$), respectivamente. Os sinais atribuídos aos carbonos do resíduo de frutose foram localizados a δ_{C} 104,0 (CH, C-2); 75,7 (CH, C-3); 75,0 (CH, C-4); 70,0 (CH, C-5); 63,7 (CH₂, C-6), sendo o C-2 atribuído ao carbono anomérico da frutose envolvido na ligação glicosídica entre os dois açúcares. Os sinais atribuídos aos hidrogênios do resíduo de frutose foram localizados H-1 em δ_{H} 4,15; H-3 em δ_{H} 5,4; H-4 em 5,3; H-5 em δ_{H} 4,2 e H-6 em δ_{H} 4,2.

Para o resíduo de glicose foram atribuídas as seguintes absorções características δ_{C} 61,8 (CH₂, C-6), δ_{C} 68,6 (CH, C-5), δ_{C} 68,2 (CH, C-4), δ_{C} 69,7 (CH, C-3), δ_{C} 70,3 (CH, C-2), δ_{C} 89,8 (CH, C-1) sendo este último referente ao carbono anomérico da glicose.

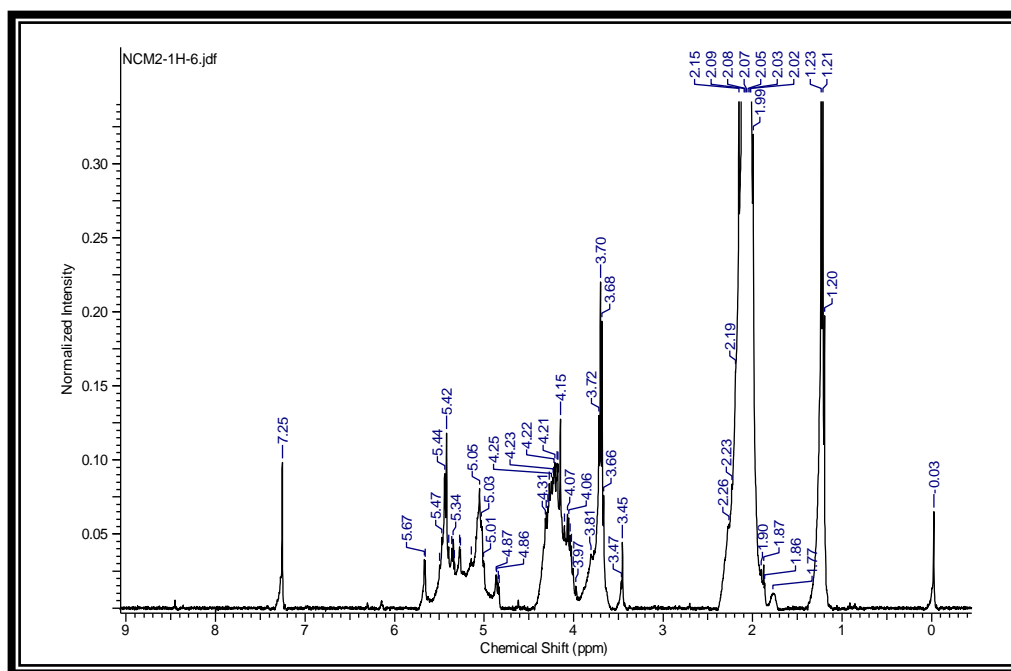


Figura 89. Espectro de RMN ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3

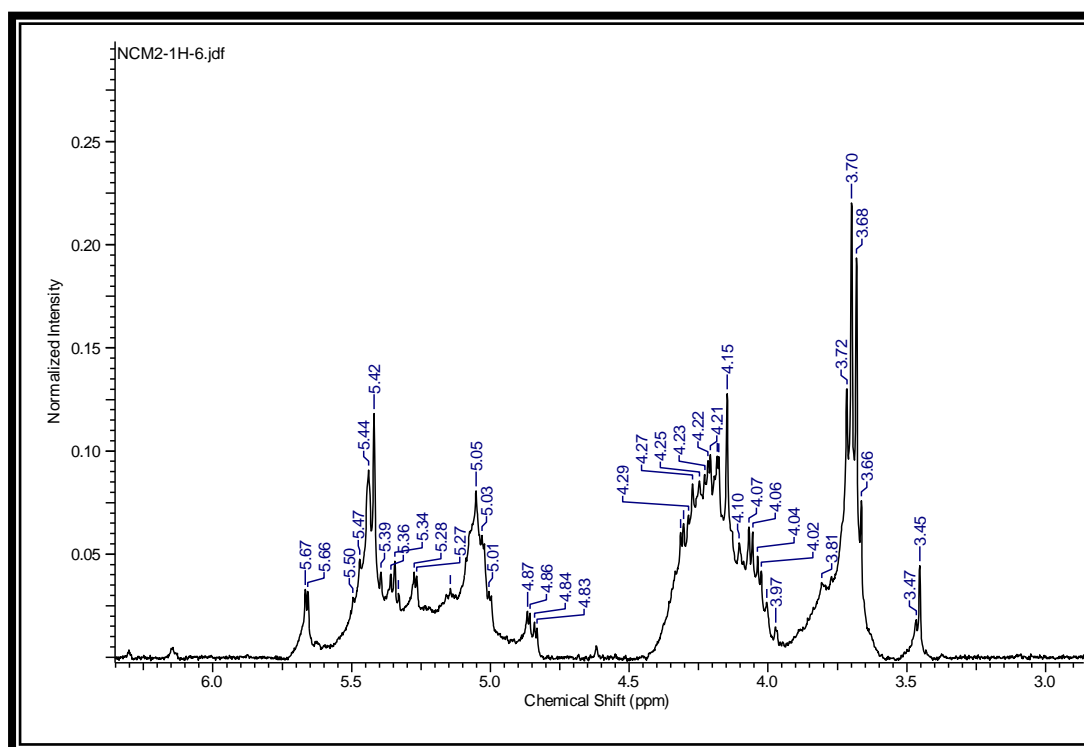


Figura 90. Espectro de RMN ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 3,4 – 5,67 ppm)

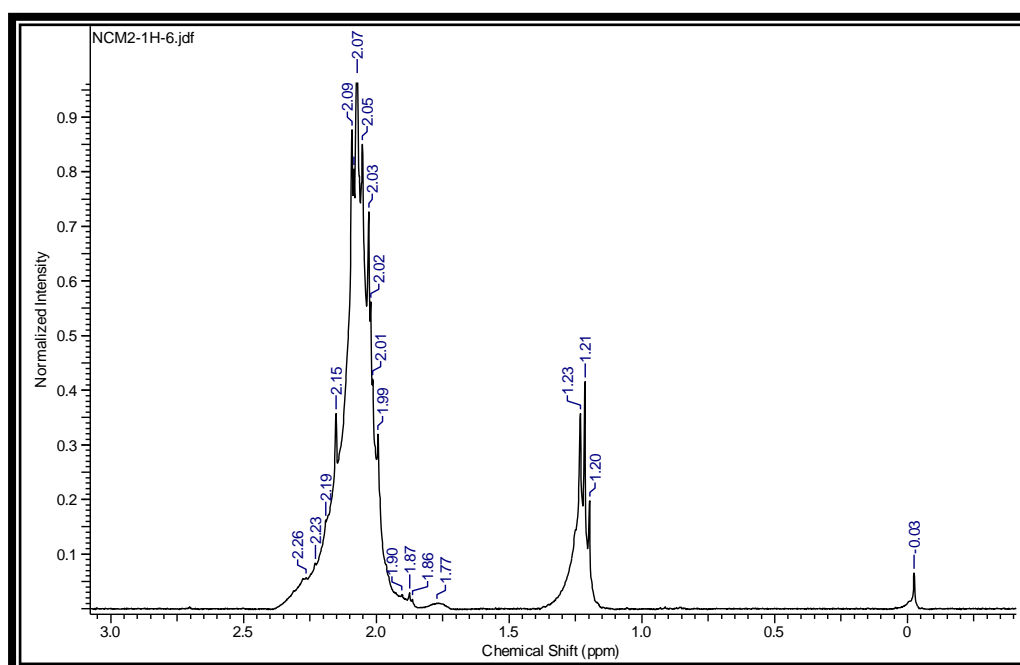


Figura 91. Espectro de RMN ^1H da substância NCM2, 400 MHz, CDCl_3 (ampliação da região entre 1,20 – 2,23 ppm)

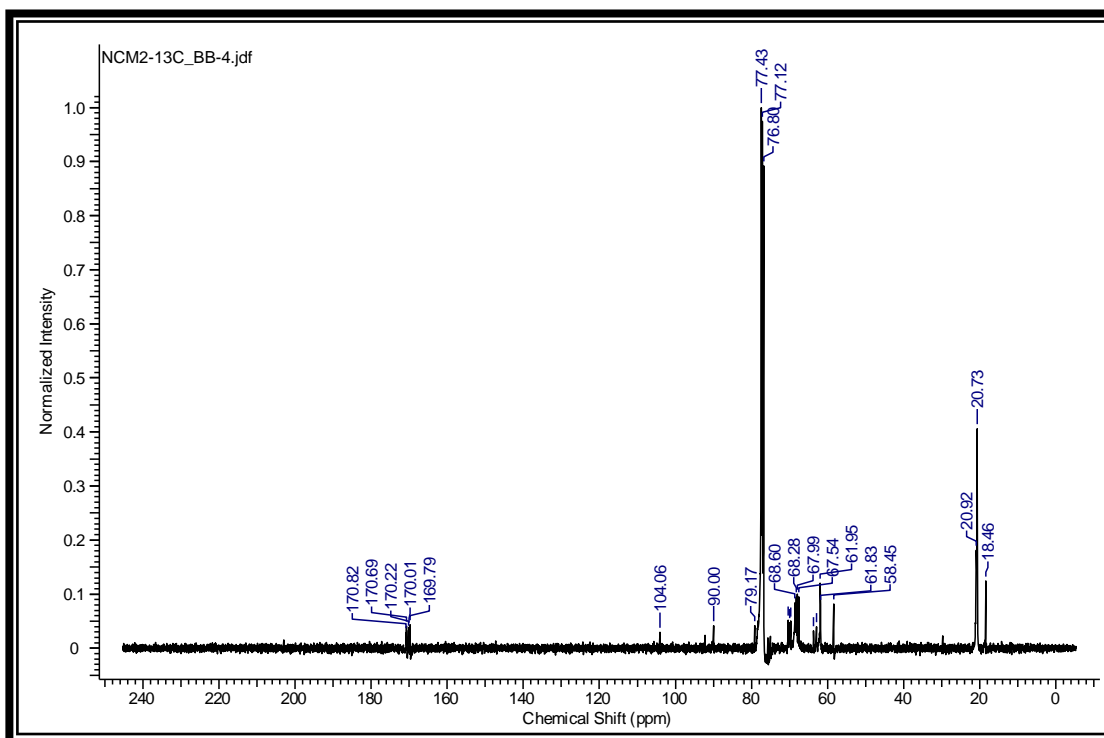


Figura 92. Espectro de RMN ¹³C da substância NCM2, 100 MHz, CDCl₃

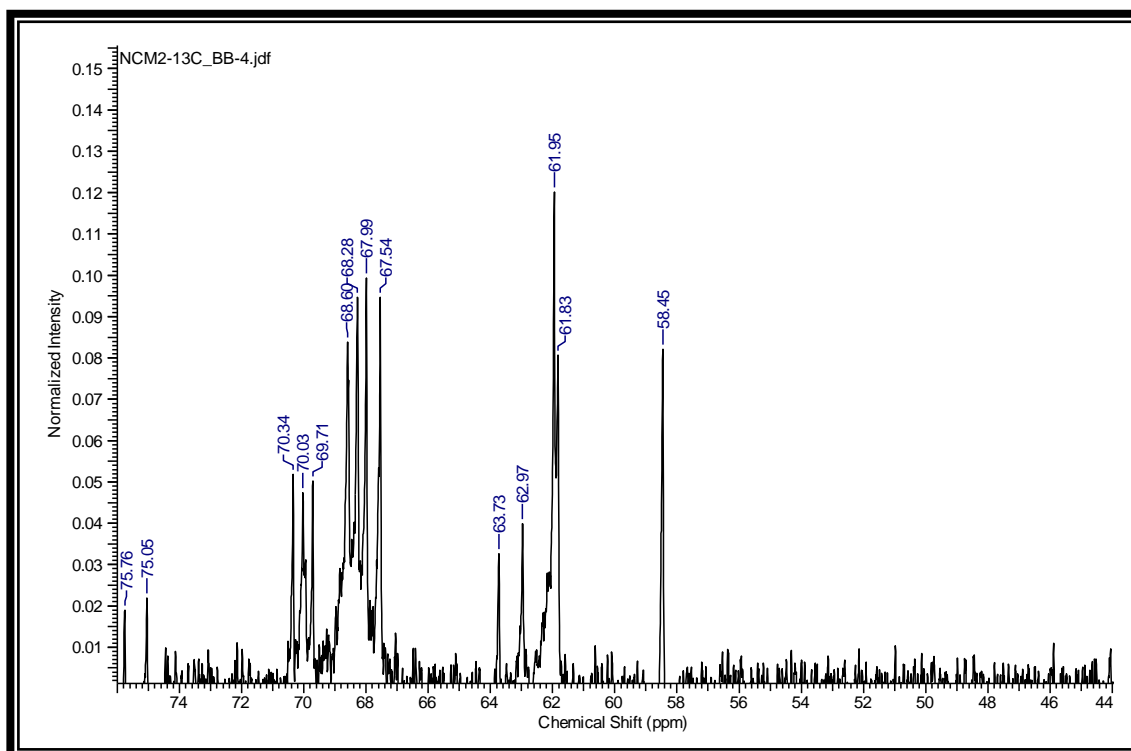


Figura 93. Espectro de RMN ¹³C da substância NCM2, 100 MHz, CDCl₃ (ampliação da região entre 58,4 – 75,7 ppm)

Tabela 8. Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância NCM2 comparados com dados da literatura para a sacarose octaacetilada.

Hidrogênio	NCM2		Literatura *	
	δ_{H}	OAc (CH_3)	δ_{H}	OAc (CH_3)
G1	5,6 (<i>d</i> , $J=4$)	-	5,69	-
G2	4,8	2,09	4,87	2,10
G3	5,44	2,02	5,44	2,02
G4	5,05	2,05	5,08	2,05
G5	4,2	-	4,28	-
G6	4,15; 4,29	2,09	4,14;	2,10
F1	4,15	2,15	4,28	2,12
F2	-	-	4,17	-
F3	5,42	2,19	-	2,18
F4	5,36	2,09	5,47	2,11
F5	4,21	-	5,36	-
F6	4,2	2,15	4,21	2,12
			4,35;	
			4,29	

*Nishida (2005); Binkley *et al.*, (1969).

Tabela 9. Dados de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância NCM2 comparados com dados da literatura para a sacarose octaacetilada.

Hidrogênio	NCM2			Literatura *		
	δ_{C}	C=O	CH_3	δ_{C}	C=O	CH_3
G1	90,00	-	-	89,93	-	-
G2	70,3	170,01	20,7	70,26	170,07	20,64
G3	69,7	170,01	20,7	69,61	170,01	20,66
G4	68,2	169,7	20,7	68,17	169,05	20,61
G5	68,6	-	-	68,50	-	-
G6	61,83	170,7	-	61,75	170,66	20,58
F1	62,97	-	20,7	62,85	170,09	20,69
F2	104,06	-	-	104,02	-	-
F3	75,76	169,7	-	75,68	169,65	20,56
F4	75,05	169,7	20,8	74,98	169,88	20,72
F5	70,03	-	20,8	70,14	-	-
F6	63,7	170,2	20,7	63,63	170,46	20,63

*Nishida (2005); Binkley *et al.*, (1969).

Com os dados dos espectros de ^1H e ^{13}C pode-se constatar que a substância NCM2, tratava-se de um carboidrato, pois todos os deslocamentos químicos se encontravam na região característica de átomo de carbono quimicamente ligado a átomo de oxigênio.

A confirmação destas atribuições discutidas acima se deu através de comparação dos dados descritos na literatura e permitem deduzir para a substância NCM2 a estrutura da sacarose peracetilada (Figura. 94, p. 97).

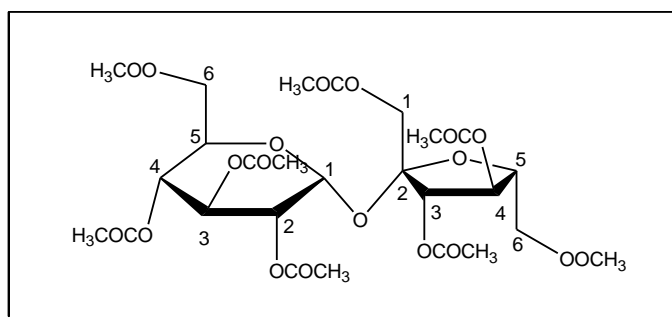


Figura 94: Estrutura da substância NCM2 (dissacarídeo sacarose peracetilada)

8.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Substâncias antioxidantes desempenham um papel importante na saúde através de seus efeitos na modulação dos processos oxidativos que ocorrem no organismo. A formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente oxidação de moléculas biológicas constituem um mecanismo de dano tecidual presente em vários processos patológicos como inflamação, derrame, infarto do miocárdio, arteriosclerose, doença de Alzheimer e Parkinson e em alguns tipos de câncer (http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry).

Os ensaios antioxidantes hoje disponíveis podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos (Huang *et al*, 2005)

8.3.1. MÉTODOS DIRETOS

Este sistema caracteriza-se pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres (Roginsk, 2005). Como substratos para oxidação podem ser utilizados lipídios individuais, misturas lipídicas, proteínas, DNA (ácido desoxirribonucléico), ou lipídios contendo espécies biológicas revelantes como plasmas sanguíneos membranas biológicas, etc. A peroxidação lipídica apresenta-se como sendo mais conveniente neste propósito sendo um dos motivos a cinética da lipoperoxidação já estar bem estudada teórica e experimentalmente (Barclay & Vinquist, 2003).

Um exemplo de método direto é o ensaio de redução do β -caroteno, que se baseia na capacidade de uma amostra contendo substâncias antioxidantes em retardar a oxidação do β -caroteno na presença de luz. (Pratt & Miller, 1984).

8.3.2. MÉTODOS INDIRETOS

Em ensaios indiretos o processo é caracterizado por uma reação de oxirredução entre o oxidante (geralmente uma sonda para monitorar a reação) e o antioxidante. Estão baseados na seguinte reação de transferência de elétrons.

Sonda (oxidante) + é (do antioxidante) → sonda reduzida + antioxidante oxidado.

A sonda ao ser reduzida pelo antioxidante sofre mudanças colorimétricas. A intensidade da mudança de cor é proporcional a atividade deste antioxidante ou a concentração do mesmo (Benzie & Straing, 1999).

8.3.2.1. REDUÇÃO DO RADICAL 1,1- DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA (DPPH)

Como exemplo de método indireto pode citar a redução do radical livre DPPH, que se baseia em um ensaio qualitativo e quantitativo do grau da atividade antioxidante e na habilidade das substâncias de agirem como seqüestradoras de radicais livres.

- **PRINCÍPIO**

O DPPH é um radical livre estável a temperatura ambiente que produz uma solução violeta em etanol. Devido ao seu elétron ímpar, a solução etanólica de DPPH exibe uma forte banda de absorção na faixa de 515 - 518 nm. Em contato com um potencial antioxidante, o DPPH é reduzido.

Estudos recentes demonstram que a interação de um potencial antioxidante com DPPH depende da conformação estrutural da molécula analisada, (Mensor *et al*, 2001).

8.3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

No ensaio realizado no Setor de Química de Produtos Naturais LCQUI -UENF, uma solução estoque dos extratos analisados foi preparada dissolvendo-se 10 mg de cada extrato em 10 mL de EtOH. A partir dessa solução serão preparadas soluções de

concentrações diferentes (25, 50, 125 e 250 µg/mL). Um esquema simplificado do procedimento experimental encontra-se na Figura 95, p.100.

A análise foi realizada reagindo-se 1 mL de uma solução etanólica de DPPH (0,3 mM) com 2,5 mL de cada concentração. Após 30 minutos, será feita a leitura em um espectrofotômetro a 518 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Os valores das absorbâncias obtidas foram convertidos para porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle\ negativo}} \right\}$$

O controle positivo foi feito utilizando o flavonóide rutina através do mesmo procedimento utilizado para os extratos brutos.

O controle negativo foi realizado com 1mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi feita com 2,5 mL de solução das concentrações dos extratos brutos adicionado de 1 mL de etanol.

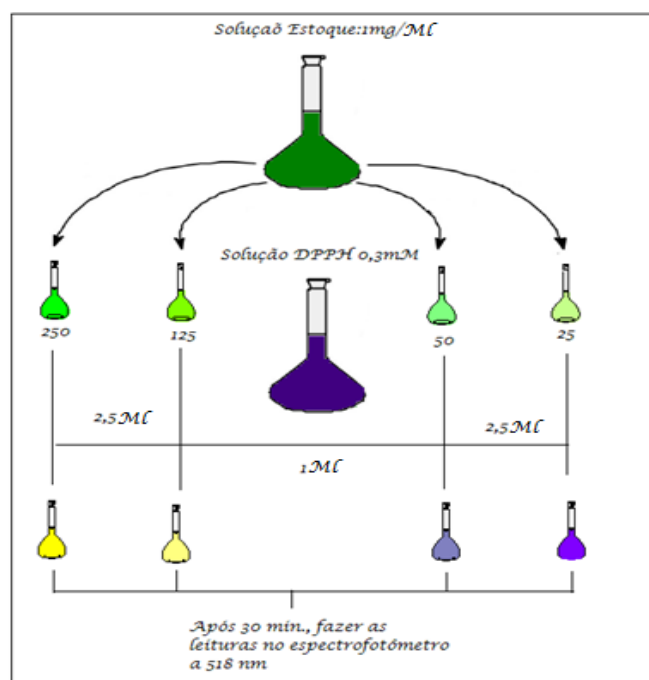


Figura 95. Procedimento Experimental da Análise Quantitativa Antioxidante

8.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante estão resumidos na Tabela 10 e na Figura 96. A análise desses resultados mostra que o extrato em acetato de etila foi o que apresentou a maior porcentagem de atividade antioxidante entre os extratos testados.

Tabela 10. Porcentagem de Atividade Antioxidante *versus* concentração dos extratos brutos do caule de *Newtonia contorta*

Extrato	Concentração (µg/mL)	AA%
Acetato de etila		
	25	8,76
	50	9,12
	125	9,25
	250	16,55
Metanol		
	25	5,47
	50	6,69
	125	8,39
	250	9,85
Rutina		
	25	15,94
	50	16,55
	125	16,67
	250	20,92

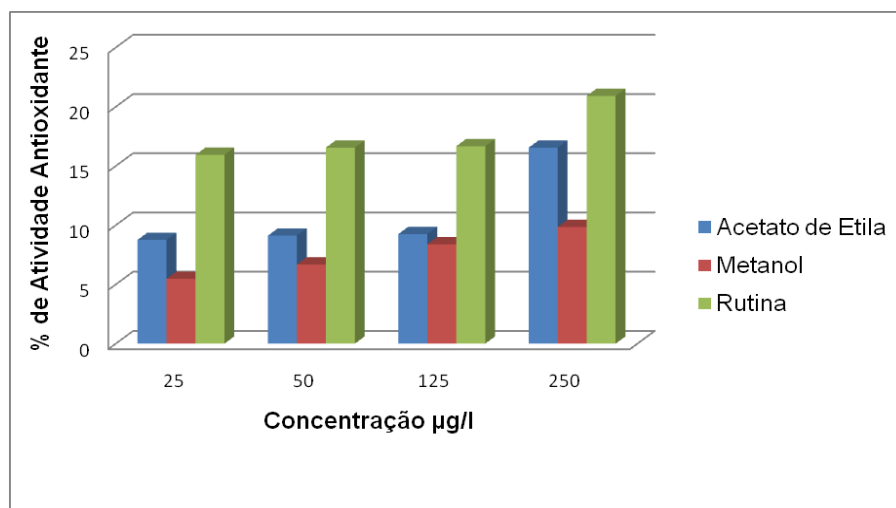


Figura 96. Gráfico da porcentagem de AA versus concentração dos extratos do caule da espécie *N. contorta*.

Embora o grande número de trabalhos encontrados na literatura sobre atividade antioxidante esteja relacionado à presença de substâncias fenólicas devido a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs). É sabido que substâncias nitrogenadas também podem apresentar tal atividade devido a espécies reativas de nitrogênio (ERNs). No presente trabalho não foi possível a identificação de substâncias fenólicas nos extratos analisados. Porém como o extrato que apresentou maior AA (extrato em AcOEt) foi aquele onde foi isolado o ácido 3-indol carboxílico, podemos sugerir que este esteja relacionado com a AA do extrato.

Índóis fazem parte de uma ampla família de substâncias presentes em microrganismos, plantas e animais. Elas estão relacionadas principalmente ao metabolismo do triptofano, e apresentam particularidades que dependem de suas estruturas químicas. Os membros mais importantes da família são os hormônios vegetais, o ácido indol-3-acético, e a melatonina, hormônio presente em animais. Uma característica importante de algumas substâncias indólicas é que elas podem ser úteis como agentes químicos preventivos contra doenças como o câncer, o *stress* oxidativo, etc. Por este motivo, a possível atividade antioxidante (atividade seqüestradora de radicais livres) do índóis tem sido estudada.

Cano e colaboradores, (2003), comparam a atividade antioxidante hidrofílica e lipofílica de alguns indóis derivados de plantas (Figura. 97, p. 103), em diferentes valores de pH. E o que se observa é que, durante a oxidação de compostos indólicos um elétron é removido do átomo de nitrogênio do pirrol, gerando um cátion radical, devido a esta capacidade do anel pirrol a atividade antioxidante das substâncias indólicas 3-substituídas é afetada pelos grupos funcionais presentes na molécula.

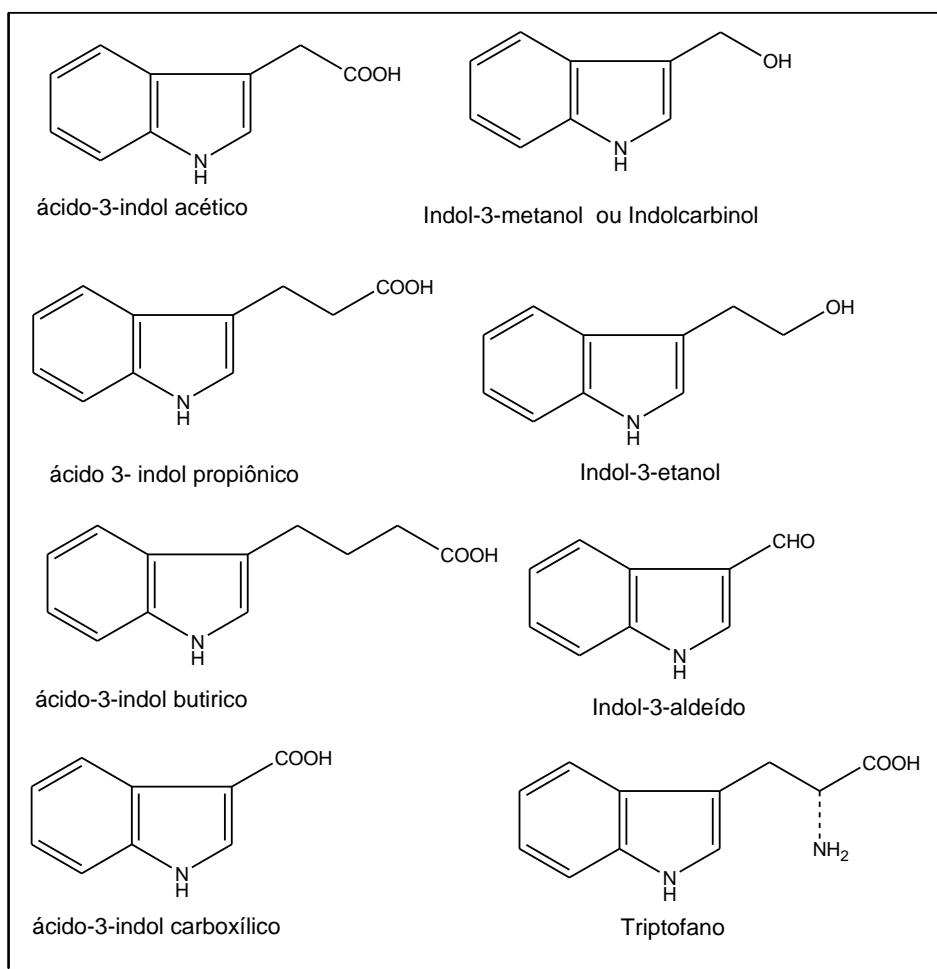


Figura 97. Estrutura química de compostos indólicos

Com base no que foi exposto na Figura 97 sugere-se o mecanismo para a provável interação do ácido-3-indol carboxílico e o DDPH (Figura 98, p. 104).

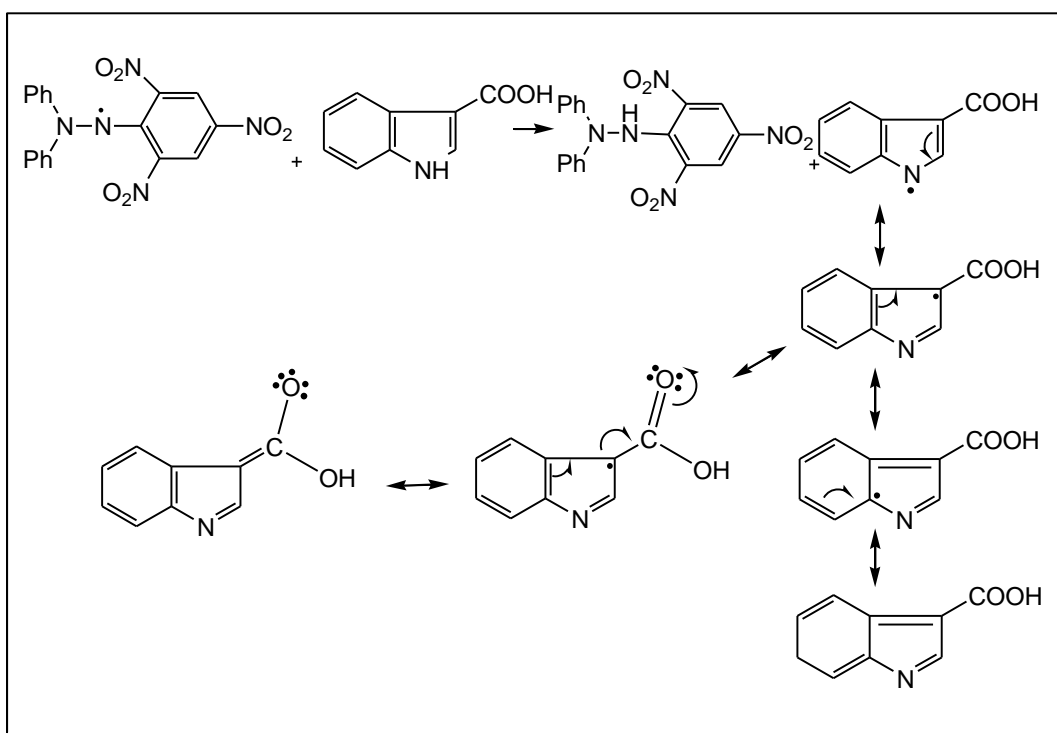


Figura 98. Provável mecanismo de interação do ácido-3-indol carboxílico e o DPPH.

8.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA:

8.4.1. BIOENSAIO DA LETALIDADE CONTRA LARVAS DE *ARTEMIA SALINA* LEACH:

Artemia salina (larva de camarão de água salgada) é comumente utilizado como alimento para peixes. A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa, pois a técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (Meyer *et al.*, 1982). O bioensaio é caracterizado por ser uma forma simples de determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras, extratos brutos e frações (McLaughlin *et al.*, 1995).

Artemia salina é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. Possuem quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie.

Essas “alternativas” ou modos de reprodução se referem à oviparidade, viviparidade, partenogênese e encistamento (diapausa), quando as condições ambientais são impróprias. Os indivíduos adultos apresentam notável dimorfismo sexual e, em condições adequadas, é possível eclodir simultaneamente as larvas em cultura. O custo da implantação e manutenção da cultura de *Artemia salina* é muito baixo, o que faz desta, um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da biologia. *Artemia salina* é amplamente conhecida como indicador de toxicidade em um bioensaio (Brine Shrimp Test), utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (Lopes *et al.*, 2005)

O teste baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias ativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a atividade substâncias presentes nos extratos brutos. A literatura relata alguns trabalhos relacionando a toxicidade sobre as larvas de *A. salina* com atividades, tais como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomocidas (Siqueira *et al.*, 1998) e também com células cancerosas do tipo P-388 (Meyer *et al.*, 1982).

Segundo McLaughlin, valores de $DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados ativos para extratos brutos e $< 30 \mu\text{g/mL}$, muito ativos para substâncias puras.

O único parâmetro envolvido no ensaio é a morte ou vida dos croscrustácios em contato com o material analisado e os dados obtidos são facilmente tratados estatisticamente (Cavalcante *et al.*, 2000).

8.4.2. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

- Água destilada;
- Água do mar artificial [NaCl (24,0 mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,50 mg), KBr (0,10 mg), KCl (0,70 mg), Na_2SO_4 (4,00 mg), NaHCO_3 (0,20 mg) e $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (11,0 mg)], 2L;
- DMSO;
- Balões volumétricos (5,00 e 1000 mL);
- Béqueres;
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50,0 mg);
- Larvas de *Artemia salina*;
- Luminária de lâmpada fria;
- Mini-aquário de acrílico (5,0 X 7,5 X 14,0 cm);
- Pipeta automática (10 - 100 μL) Labmate;
- Pipeta Pasteur;
- Tubos de ensaio;

8.4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As análises foram realizadas no Setor de Química de Produtos Naturais LCQUI-UENF.

Na análise foram utilizados 50 mg de cada extrato diluído em um volume de 5 mL no seguinte sistema de solventes: [$\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (3:2)], formando soluções estoque de 10 mg/mL.

Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de: 50, 100, 200, 300 e 500 μL as quais foram diluídas com água do mar artificial até atingir um volume final de 5 mL. As concentrações finais foram de: 100, 200, 400, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Para realização do teste 24 os ovos de *A. salina* foram previamente colocados para eclodir em água do mar artificial a temperatura ambiente, por um período de 48 horas e em um mini-aquário dividido ao meio por uma peneira fina. Uma das partes do aquário foi iluminada com uma lâmpada fria enquanto que a outra foi coberta para que não recebesse iluminação, conforme esquematizado na Figura. 99, p. 107. Os ovos foram colocados na parte sem iluminação e ao eclodirem ocorre migração através da peneira para a parte iluminada, devido ao fototropismo positivo dos náuplios. Então, após a eclosão 15 larvas foram colocadas em cada tubo de ensaio contendo a água do mar artificial e a amostra a ser analisada. Após 24 horas de incubação em contato com os extratos e sob iluminação artificial e temperatura ambiente, o número de indivíduos mortos e vivos foi contabilizada. A quantificação dos resultados foi realizada através do programa Finey Probit que permite calcular a DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$), isto é, a dose letal para 50% da população de crustáceos presentes nos tubos nas concentrações acima definidas.

Como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo foi utilizado a mistura de solventes $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (3:2) sem os extratos.

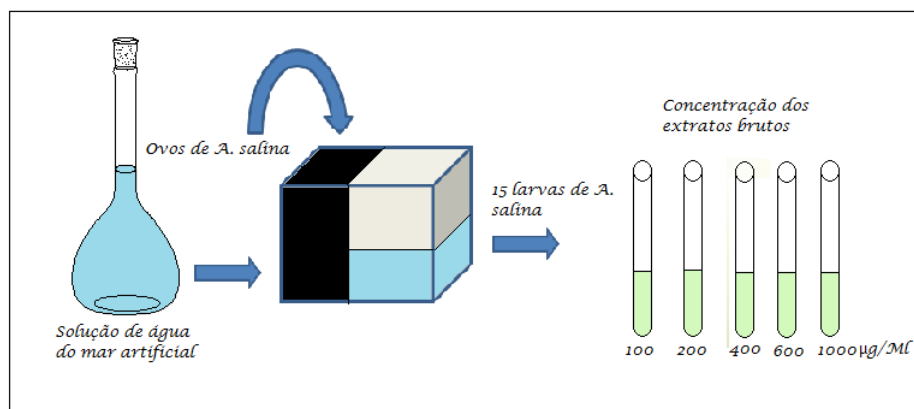


Figura 99. Esquema do procedimento experimental para avaliação da atividade citotóxica.

8.4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados pelos extratos brutos de *N. contorta* no ensaio da letalidade frente a larvas de *A. salina* estão ilustrados na Tabela 11, p.108, onde pode se observar que todos os extratos com exceção do diclorometano foram ativos. Sendo que não foi possível medir a DL₅₀ do extrato em acetato de etila na concentração utilizada para os outros extratos, pois todas as larvas contadas estavam mortas então foi realizado um novo ensaio com a metade da concentração onde então se pode calcular a DL₅₀.

Segundo McLaughlin, valores de DL₅₀ ≤ 10³ µg/mL são considerados ativos para extratos brutos. Os resultados obtidos apontam os extratos em metanol/água, hexano e acetato de etila respectivamente como os que apresentaram melhor atividade. Sendo que o acetato de etila foi o que na concentração utilizada para os outros extratos, matou todos os indivíduos, apresentando assim uma maior atividade.

Nas Tabela 11, p.108 e 12, p.109, apresentam-se a porcentagem de indivíduos mortos após 24 horas e a DL₅₀ verificada para os extratos brutos de *N. contorta*.

Tabela 11. Porcentagem de mortos após 24 horas e valores de DL₅₀ dos extratos de *Newtonia contorta*.

Extratos	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	600 µg/mL	1000 µg/mL	DL ₅₀ µg/mL	Intervalo de confiança a 95%
NCH	0	0	4,65	6,52	45,7	565,3749	454,6085-892,9058
NCD	0	0	4,87	13,16	85,7	>1000	
NCAE	2,27	6,25	2,17	0	75,0	551,0021	832,3124-1102,42
NCM	4,25	4,34	5,13	25,0	41,6	758,7964	468,0455-2241,872
NCMH	2,17	9,09	12,5	46,5	83,8	310,5002	251,3459-411,7052

Legenda: NCH – *N. contorta*- hexano, NCD – *N.a contorta*- diclorometano, NCAE – *N. contorta*- Acetato de etila, NCM – *N. contorta*- metanol, NCMH – *N. contorta*- Metanol/água

Tabela 12. Valores de DL₅₀ dos extratos de *N. contorta*

Extratos	DL ₅₀ µg/mL
Hexano	565,3749
Diclorometano	>1000
Acetato de Etila	551,0021
Metanol	758,7964
Metanol/água	310,5002

9. CONCLUSÕES

A avaliação fitoquímica dos extratos do caule de *Newtonia contorta* resultou na identificação de três triterpenos **NCH** (lupeol), **NCH1** (28-hidroxi-lupeol), **NCH2** (lupenona), uma mistura de ésteres metílicos **NCHP** (Metil éster do ácido docosanóico, Metil éster do ácido tetracosanóico, Metil Ester do ácido hexacosanoico), que foi isolado do extrato em hexano, um alcalóide **NCA1** (ácido-3-indol carboxílico) isolado do extrato em acetato de etila, uma mistura de alditóis (peracetato de iditol **NCM1c** e peracetato de glicitol **NCM1i**), as substâncias triacetato de glicerol **NCM1a**, tetra acetato de butanol **NCM1b**, peracetato de α -D-manopiranosídeo (**NCM1d**), etil-tetra-O-acetil- β -D-glicopiranosídeo **NCM1e**, peracetato de β -D-sorbose **NCM1f**, peracetato de β -D-glicopiranosídeo **NCM1g**, peracetato de inositol **NCM1h** e o dissacarídeo **NCM2** (sacarose peracetilada) isolados do extrato em metanol.

A revisão bibliográfica da espécie mostrou que o caule de *N. contorta* não havia sido estudado fitoquimicamente até o momento. Deste modo, o presente trabalho contribui para o conhecimento da composição química da espécie *N. contorta*, e também como ferramenta para um futuro estudo biológico mais específico, pois o extrato em acetato de etila apresentou uma resposta positiva frente ao teste de citotoxicidade, contra *A. salina* Leach e em comparação com os extratos testados frente ao radical livre DPPH. Vale ressaltar que foi desse extrato que o ácido-3-indol carboxílico foi isolado.

10. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Lupeol (NCH)

Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$

Peso molecular: 426 u.m.a

Ponto de fusão: 220 - 232 °C

Aspecto: Sólido branco cristalino

Solubilidade: Clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (3,2, dd, $J=4$ e 12; H-3); (0,67; H-5); (0,8; H-6); (1,4; H-7); (1,27; H-9); (1,6; H-11); (1,24; H-13); (0,9; H-15); (1,38; H-16); (1,26; H-18); (1,38; H-19); (1,24; H-21); (1,38; H-22); (1,02 s, H-23); (0,75, s, H-24); (0,95, s, H-25); (0,82, s, H-28); (4,68, d, $J=4$, H-29); (1,67, s, H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (38,9; C-1); (27,5; C-2); (79,1; C-3); (38,8; C-4); (55,3; C-5); (18,4; C-6); (34,3; C-7); (40,9; C-8); (50,5; C-9); (37,2; C-10); (21,0; C-11); (25,2; C-12); (38,1; C-13); (42,9; C-14); (27,5; C-15); (35,6; C-16); (43,0; C-17); (48,4; C-18); (47,9; C-19); (151,0; C-20); (29,9; C-21); (40,0; C-22); (28,0; C-23); (15,4; C-24); (16,2; C-25); (16,0; C-26); (14,6; C-27); (18,0; C-28); (109,4; C-29); (19,4; C-30).

Espectrometria de infravermelho (cm^{-1}): 3302,13; 2943; 2850; 1469,7; 1454,3; 1381; 1041; 879,5 cm^{-1} .

Espectrometria de massas (70 eV): M^+ (426); m/z : (207; 218, 189).

28-hidroxiupeol (NCH1):

Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O_2$

Peso molecular: 442 u.m.a

Ponto de fusão: 266 - 282 °C

Aspecto: sólido branco amorfo

Solubilidade: Clorofórmio

Espectrometria de RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (1,67; H-1); (0,96; H-2); (3,18, dd, $J=4$ e 12, H-3); (0,67; H-5); (1,38; H-6); (1,64; H-9); (1,67; H-11); (0,96; H-12); (1,67; H-13); (2,38; H-19); (0,75, s, H-24); (0,82, s, H-27); (3,33, d, $J=12$, H-28); (4,67, H-29).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (38,9; C-1); (27,1 C-2); (79,0; C-3); (38,7; C-4); (55,3; C-5); (18,3; C-6); (34,3; C-7); (41,0; C-8); (50,4; C-9); (37,2; C-10); (20,9; C-11); (28,0; C-12); (38,7; C-13); (42,8; C-14); (27,4; C-15); (34,3; C-16); (48,8; C-18); (47,8; C-19); (150,5; C-20); (29,8; C-21); (28,0; C-23); (15,4; C-24); (16,1; C-25); (16,0; C-26); (14,8; C-27); (60,6; C-28); (109,7; C-29); (19,1; C-30).

Espectrometria de Infravermelho (cm^{-1}): 3332,9; 2939,5; 2866,2; 1643,35; 1454,3.

Espectrometria de Massas (70 eV): M^+ (442); m/z: (411, 220, 206, 203, 189).

Lupenona (NCH2)

Fórmula molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$

Peso molecular: 424 u.m.a

Onto de fusão: 200 - 203 °C

Aspecto: sólido branco cristalino

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (1,0; H-2); (1,26; H-5); (0,79; H-6); (1,43; H-7); (1,67; H-13); (1,0; H-15); (1,4; H-16); (1,36; H-18); (2,38; H-19); (1,2; H-21); (0,96, s, H-24); (1,07 s, H-25); (0,79, s, H-28); (4,69, H-29); (1,68, s, H-30).

Espectrometria de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (26,7; C-2); (218,2; C-3); (38,2; C-4); (55,0; C-5); (18,1; C-6); (34,2; C-7); (40,8; C-8); (36,9; C-10); (21,1; C-11); (25,2; C-12); (38,2; C-13); (27,5; C-15); (35,6; C-16); (42,9; C-17); (48,3; C-18); (47,4; C-19); (150,9; C-20); (29,9; C-21); (27,5; C-23); (14,5; C-24); (16,0; C-25); (15,8; C-26); (14,5; C-27); (18,1; C-28); (109,4; C-29); (19,4; C-30).

Espectrometria de Infravermelho (cm^{-1}): 2939,5; 2912,5; 2854,6; 1643,0; 1454; 1728,2; 1705,07.

Espectrometria de Massas (70 eV): M^+ (424); m/z: (409, 218, 205, 189).

Mistura de ésteres metílicos (NCHP)

Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$; $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_2$; $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_2$

Pesos moleculares: 354; 382; 410 u.m.a.

Aspecto: sólido acinzentado

Solubilidade: clorofórmio

Espectrometria de Infravermelho (cm^{-1}): 2900; 2850; 1705.

Espectrometria de Massas (70 eV): m/z: 74, 87.

Ácido-3-indol carboxílico (NCA2)**Fórmula molecular:** C₉H₇O₂N**Peso molecular:** 161 u.m.a**Aspecto:** sólido amarelo**Solubilidade:** metanol**Espectrometria de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** (7,9; H-2); (8,0; H-4); (7,2; H-5); (7,2; H-6); (7,4; H-7).**Espectrometria de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** (122,2; C-3a); (136,8; C-7a); (131,9; C-2); (120,7; C-4); (121,0; C-5); (122,2; C-6); (111,5; C-7).**Espectrometria de Infravermelho (cm⁻¹):** 1261; 1612; 2848,9 – 2918,4; 3317**Espectrometria de Massas (70 eV):** M⁺ (161); *m/z*: (144, 116, 89).**Glicitolexaacetato (NCM1c)****Fórmula molecular:** C₁₈H₂₆O₁₂**Peso moleclar:** 434 u.m.a.**Aspecto:** sólido gelatinoso incolor**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de Massas (70 eV):** M⁺ (434); *m/z*: (217, 145, 115, 103).**Iditolexaacetato (NCM1i)****Fórmula molecular:** C₁₈H₂₆O₁₂**Peso molecular:** 434 u.m.a.**Aspecto:** sólido gelatinoso incolor**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de Massas (70 eV):** M⁺ (434); *m/z*: (217, 145, 115, 103)**Sacarose peracetilada (NCM2)****Fórmula molecular:** C₂₆H₃₈O₁₉**Peso molecular:** 654 u.m.a.**Ponto de fusão:** 120°C**Aspecto:** óleo amarelo**Solubilidade:** clorofórmio**Espectrometria de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 90,0 (G-1), 70,3 (G-2), 69,7 (G-3), 68,6 (G-5), 61,83 (G-6), 62,9 (F-1), 104,0 (F-2), 75,7 (F-3), 75,0 (F-4), 70,0 (F-5), 63,7

(F-6), 170,0 (G-2, C=O), 170,01, (G-3, C=O), 169,7, (G-4, C=O), 170,7, (G-6, C=O),
169,7, (F-3, C=O), 170,2, (F-6, C=O), 20,7 (F-1, CH₃), 20,8, (F-4, CH₃), 20,8, (F-5,
CH₃), 20,7, (F-6, CH₃), 20,7 (G-2,G-3 e G-4, CH₃).

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMEIDA, D.R., COGLIATTI-CARVALHO, L & ROCHA, C.F.D. **(1998)**. As bromeliáceas da Mata Atlântica da Ilha Grande, RJ: composição e diversidade de espécies em três ambientes diferentes. *Bromélia* 5 (1-4): 54-65.

ALEXANDRE BARBERI, MARCO A. C. CARNEIRO, FÁTIMA M. S. MOREIRA, JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA **(1998)** Nodulação em Leguminosas Florestais em Viveiros no Sul de Minas Gerais, *Cerne* 1 (4): 145-153.

ASSUMPÇÃO, J; NASCIMENTO, M.T. **(2000)**. Estrutura e composição florística de quatro formações Vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil, *Acta Botânica Brasílica* 14(3): 301-315.

AYLTHON BRANDÃO **(1991)** Botânica, Introdução à taxonomia vegetal, Companhia Editora Nacional, São Paulo, – 10ª Edição.

BARBOSA, F. B. C. **(2001)**. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 18(2): 69-94.

BARCLAY, L.R.S., VINQUIST, M.R. **(2003)**. Phenol as antioxidant. In: Rappoport, Z. The chemistry of phenols Ed Wiley: New York. P. 839-908

BENZIE I.F.F., STRAING, J.J. **(1999)**. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology*. (299): 15-27.

BINKLEY, W. W. HORTON, D. BHACA, N. S. **(1969)**. Physical studies on oligosaccharides related to sucrose: Part I. N.M.R. studies on the peracetates of

sucrose, 1-kestose, and nystose. *Carbohydrate Research* v. 10, n. 2, p. 245-258.

BOLZANI, V.S; MONTANARI, C. A. **(2001)**. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Phytomedicine*, v.8, p.202-206.

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

CANO, A; ALCARAZ, O; ARNAO, M. B. **(2003)** Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 : 33–37.

CARVALHO, F. A, BRAGA, J. M. A., GOMES, J. M. L., SOUZA, J. S. NASCIMENTO, **(2006)**. Comunidade Arbórea de uma Floresta de Baixada Aluvial no Município de Campos dos Goytacazes-RJ. *Cerne* 12 (2): 157-166.

CAVALCANTE, M. F., OLIVEIRA, M. C. C; VELANDIA, J. R; ECHEVARRIA, A. **(2000)**. Síntese de, 3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, *Química nova*, V. 23, p. 20-22.

CORREA M. P. **(1984)**. Dicionário de plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas RJ, Vol. I, Imprensa Nacional (ed.), Rio de Janeiro, p. 458-459.

COSTA, A. F. **(1978)** Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiros no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão). *Revista Brasileira de Botânica*, V.24, n.1, p.51-62.

DA SILVA, G. C; NASCIMENTO, M. T. **(2001)**. Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiros no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão) *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, V.24, n.1, p.51-62

DEFORGE, A. MAHEU J. DE BALSAC, S.H. (1929). Tenniferous Barcks of Madagascar VII "Fany" barck (*piptadenia crysostachys* Benth) *Haulle aux. Cuirs* P. 309-314.

DELAVEAU, P. (1960). New possibilities in medicinal plants. *Products pharmaceutical.* (15): 479-488.

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

DEVULAPALLE, K. S.; SEGURA, A. G.; FERRER, M.; ALCALDE, G. M.; PLOU, F. J. (2004), Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research.* 339, 1029.

DIAS, G. T. M. & Silva, C. G. (1984). Geologia de depósitos arenosos costeiros emersos - Exemplos ao longo do litoral fluminense. Pp. 47-60 In: L. D. Lacerda; D. S. D. Araujo; R. Cerqueira; B. Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói.

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*, (1955). (77): 5892-5895.

FLEXOR, J-M.; MARTIN, L.; SUGUIO, K. & DOMINGUEZ, J.M.L. (1984). Gênese dos cordões litorâneos da parte central da costa brasileira. Pp. 35-46 In: L. D. Lacerda; D. S. D. Araujo; R. Cerqueira; B. Turcq (Eds.) Restingas: Origem, Estrutura e Processos. CEUFF, Niterói.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE (2001). São Paulo - *Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica* - Período 1995-2000 - Relatório Parcial - Estado do Rio de Janeiro.

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

GUATURA, I. N.; CORRÊA, F.; COSTA, J. P.O. & AZEVEDO, P. U. E. (1996). A questão fundiária: roteiro para a solução dos problemas fundiários nas áreas protegidas da Mata Atlântica. Roteiro para a conservação de sua biodiversidade. *Série Cadernos da Reserva da Biosfera*, Caderno nº 1, p. 47.

HAGEMEIER J, SCHNEIDER B, OLDHAM NJ, HAHLBROCK K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 98:753-758.

HARBONER, J.B. (1971). Chemotaxonomy of the leguminosae. ed. academic press inc. (London) Ltd

HARBONE, J.B. & BAXTER, H. (1995). Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants. Taylor & Francis, London.

HECHT, S. M.; (1999). Bioorganic Chemistry – Carbohydrates, Oxford University Press.

HUANG, D OU, B. Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. (53): 1841-1856.

INPE E IBAMA (1990). Atlas dos Remanescentes Florestais do Domínio da Mata Atlântica. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo.

IUCN, (1986). Plants in danger. What do we Know? Cambridge.

JANSEN, M; GABA, V; GREENBERG, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends plant Science*, v.3 p. 131-135.

KUTCHAN, T.M. (1995). Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059-1070.

LACOBUCCI, G.A., RUVEDA, E.A. (1964). Bases derived from tryptamine in Argentine *Piptadenia* species. *Phytochemistry*, 3 (3): 465-467.

LAMÊGO, A. R. (1974). O Homem e a Restinga. 2ª ed. Editora Lidador, Rio de Janeiro.

LEGLER, G.; TSCHESCHE, R. (1963). The isolation of N-methyltryptamine, 5-methoxy-N-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine from the bark of *Piptadenia peregrine*. *Naturwissenschaften* (50): 94-95.

LEWIS, G.P. & LIMA, M.P.M. (1990). *Pseudopiptadenia* Rauschert no Brasil Leguminosae-Mimosoidae). *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 30:43-68.

LOPES, W. B. (2005). Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Horizonte Científico*.

LORENZI, H. (1992). *Árvores Brasileiras*. Instituto Plantarum, Nova Odessa (1): 384.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. (1994). ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and some salient features”. *Phytochemistry*, 37(6): 1517-1575

MCLAUGHLIN, J. L. COLMAN-SAZARBITORIA,T., ANDERSON J.E. (1995). Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p.13-18.

MEMELINK, J.; VERPOORTE, R. e KIJNE, J.W. **(2001)**. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloids metabolism. *Trends in Plant Science*, 6: 212-219.

MENSOR, L.L., MENEZES, S.F., LEITÃO, G.G., REIS, S.A., DOS SANTOS, C.T., COUBE, S.C., LEITÃO, G.S. **(2001)**. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytherapy Research*, (15) 127.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.F., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. **(1982)**. Brine Shrimp a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, (45): 31.

MIYAUCHI, Y., YOSHIMOTO, T., MINAMI, K. **(1976)**. Extractives of hardwood, IX, Extractives from hertwoos of *Piptadenia sp.* *Mokuzai gakkaiishi*, 1(22): 47-50.

MORELLATO, L.P.C.; TALORA, D.C.; TAKAHASHI, A.; BENCKE, C.; ZIPPARO, V.B. **(2000)**. Phenology of Atlantic rain forest trees: A comparative study. *Biotropica*. 32: 811-823.

MORENO, M.R.; NASCIMENTO, M.T.; KURTZ, B.C. **(2003)**. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo em duas zonas altitudinais na mata atlântica de encosta da região do imbé, RJ Brasil, *Acta Botânica Brasílica* 17(3): 371-386.

MUHIZI, T.; COMA, V.; GRELIER, S. (2008). Synthesis and evaluation of N-alkyl- β -D-glucosylamines on the growth of two wood fungi, *Coriolus versicolor* and *Poria placenta*. *Carbohydrate Research*, 343, 2369.

- NISHIDA, T. ENZELL, C.R & MORRIS, G. A. **(2005)**. Concerted use of homo- and hetero-nuclear 2D NMR: ^{13}C and ^1H assignment of sucrose octaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 24(2) 179-182.
- NOBMANN, P.; SMITH, A.; DUNNE, J.; HENEHAN, G.; BOURKE, P. **(2009)** The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal Food Microbiol.*, 128, 440.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T. & FONTES, M.A. **(2000)**. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forest in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32(4b): 793 809.
- PAGANO, S.N., LEITÃO-FILHO, H.F. & SHEPHERD, G.J. **(1987)**. Estudo fitossociológico em Mata Mesófila semidecídua no município de Rio Claro (Estado de São Paulo). *Revista Brasileira de Botânica* 10(1): 49-62.
- PARIS, R., SAINT-FIRMIN, A., ETCHEPARE, S. **(1967)**. Alkaloids and flavonoids of *Piptadenia peregrina* from Haiti. Absence of alkaloids in *Piptadenia africana*. *Annales Pharmaceutiques francaises*. (25): 7-8
- PATCHER, I.J.; ZACHARIUS, D.E.; RIBEIRO. **(1959)**. Índole alkaloids of *Acer saccharinum* (silver maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrine*, and *Mimosa hostilitis*. *Journal of Organic Chemistry*, (24): 1285-1287.
- PEZZUTO, J.M. **(1997)**. Plant derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*, v.53, n.2, p.121-133.
- PIACENTE, S., BALDERRAMA, L., DE TOMASSI, N., MORALES, L., VARGAS, L., PIZZA, C. **(1999)**. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. *Phytochemistry*, (51): 709-711.
- PIMM, S.L. & ASKINS, R.A. **(1995)**. Forest losses predict bird extinctions in eastern North America. *Ecology* 92: 9343-9347.

PIMM, S.L., RUSSEL, G.J., GITTLEMAN, J.L. & BROOKS, T.M. (1995). The Future of Biodiversity. *Science* 269: 347-350.

POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. (1981). Advances in Legume Systematics. *Royal Botanic Gardens, Kew*, p. 1049.

POPOV, N. V. (1979) .Study an optimal conditions and suitability of some wheat cultivars in Bulgaria for determining the activity of indole auxins inhibitors. *Higher Institute of Agriculture*, 5, 39-44.

PRATT, D.E. MILLER, E.E. (1984). A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hipogoeae*). *Journal of American Oil Chemical Society* (61): 1064-1067.

PRIMO, B. L. (1945). Tannin content of certain Brazilian vegetable products. *Anais Associação química Brasileira*. (4): 117-120.

PUTERKA, G. J.; FARONE, W.; PALMER, T.; BARRINGTON, A. (2003), Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activity of sugar esters. *Journal of Economic Entomology*, 96, 636.

RADAMBRASIL, (1983) . Geologia, Geomorfologia, Pedologia, Vegetação e Uso Potencial da Terra. MME, Rio de Janeiro, RJ. 32, 780pp.

RANGEL. J.L. (1943). Angico gum. *Revista de Química Industrial Rio de Janeiro*, (12): 16-18.

RANTA, P.; BLON, T.; NIEMELÄ, J.; JOENSUU, E., SIITONEN, M. (1998). The fragmented Atlantic rain Forest of Brazil: size, shape and distribution of Forest fragments. *Biodiversity and Conservation*, v.7, p.385-403.

RAYMOND-HAMET. (1956). Sur quelques propriétés physiologiques d'un excitant Sud-Américain : le *Piptadenia peregrina* Benth, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie de sciences*, 5 (243): 512-514.

RENDON, P., WILLY, J. (1985). Isolation of bufotenine from seeds of the *Piptadenia macrocarpa* Benth, *Revista Boliviana de Química*, 1 (5): 39-43.

RIZZINI C.T. (1998). Manual de dendrologia Brasileira- *Árvores e madeiras úteis do Brasil*. Ed. Nacional, São Paulo

ROCHA, C.F.D.; BERGALLO, H.G.; ALVES, M.A.S. & VAN SLUYS, M. (2003). A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Mata Atlântica. São Carlos, Editora RiMa.

ROBERTS, M.F. e STRACK, D. (1999) Biochemistry and Physiology of alkaloids and betalains. In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Review of Plant*, 1: 17-78.

ROBINSON, T.W. (1991). The organic constituents of highest plant: their chemistry and interrelationships. 6th ed. Cordus Press, North Amherst.

RÔÇAS, G.; SCARANO, F.R. & BARROS, C.F. (2001). Leaf anatomical variation in *Alchornea triplinervia* (Spreng) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) under distinct light and soil water regimes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136:231-238.

ROGINSK, Y. V.; LISSI, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235-254.

SANDBHOR, M.; BHASIN, M.; WILLIAMS, D. T.; HSIEH, M.; WU, S. H.; ZOU, W. (2008). Synthesis of iminoalditol analogues of galactofuranosides and their activities against glycosidases. *Carbohydrate Research*, 343, 2878.

SCHNEIDER, H.S. (1937). Angico gum. *Revista de Química industrial Rio de Janeiro* (6): 286-290.

SCHRIPSEMA, J; DAGNINO, D;. SIMÕES, C. M; SCHENKEL, E. P. **(2001)**. Alcalóides indólicos in. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, p.689-716.

SILVERSTEIN, R.M; BASSER, G.C; MORRIL, T.C. **(1994)**. Identificação espectrométrica dos compostos orgânicos. 5º edição, Guanabara Koogan.

SIQUEIRA, M. J., BOMM, D. M., PEREIRA, G. F. N., GARCEZ, S. W., BOAVENTURA, D. A. M. **(1998)**. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii-Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. (5): 21

SHEN, TSUNG-YING. **(1967)**. Indolecarboxylic acids. Número da patente: US 3316267.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. **(1999)**. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFSC.

SUGUIO, K. & TESSLER, M. G. **(1984)**. Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: Origem e nomenclatura. Pp. 15-26. In: L. D. Lacerda; D. S. D. Araujo; R. Cerqueira; B. Turcq (Eds.) *Restingas Origem, Estrutura e Processos*. CEUFF, Niterói.

TAIZ, L.; ZEIGER, E., **(2004)**. Trad. SANTAREM *et al.* *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed.

TURNER, I.M. & CORLETT, R.T. **(1996)**. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends in Ecology & Evolution*. 11: 330-333.

VASIL'EVICH, I. A.; IVASHCHENKO, A. A.; KISIL, V. M.; MATUSOVICH, O.; SAVCHUK, N. F. **(2009)** Esters of substituted 5-hydroxy-1H-indol-3-carboxylic acid, pharmaceutical compositions thereof useful as antiviral agents. *Drug Data*, 31, 368.

VELOSO, H.P. (1992). Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro, IBGE.

VERES-BENCOMO, V.; FERNANDEZ-SANTANA, V.; HARDY, .; TOLEDO, M. E.; RODRIGUEZ, M. C.; HEYNNNGNEZZ, L., ODRIGUES, A.; BALY, A., HERRERA, L.; IZQUIERDO, W.; ILLAR, A.; VALDES, Y.; COSME, V.; DELER, M. L.; MONTANE, M.; GARCIA, E.; RAMOS, A.; AGUILAR, A.; MEDINA, E.; ORANO, G.; SOSA, I.; HERNANDEZ, I.; MARTINEZ, R.; MUZACHIO, A.; COSTA, L.; CARDOSO, F.; CAMPA, C.; DIAZ, M.; RAY, R. (2004), A synthetic Conjugate Polysaccharide Vaccine Against *Haemophilus influenzae* Type b. *Science* 305, 522.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. (1981). Secondary Metabolism. The Macmillam Press. Ltd., Hong Kong.

WILLIAMS, J.E. (2001) . Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. *Alternative Medicine Review*, v.6, n: 6. P.567-79.

WITTSTOCK, K. U; GERSHENZON, J. (2002). Constitutive plant toxics and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in plant Biology*, v.5, p.1-8.

www.br.geocites.com/plantastoxicas/rota-metabólica.html, (acesso em 13/04/2010).

www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry, (acesso em 17/03/2010).

www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=148736, (acesso em 20/11/2010).

www.tropicos.org, (acesso em 12/06/2009).

YAMASATO, S., KAWANISHI, K., KATO, A., HASHIMOTO, Y. (1972). Organic bases from Brazilian *Piptadenia* species. *Phytochemistry*, 2 (11): 737-739.

YUNES, R.S., CALIXTO, J.B. (2001). Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. UNOESC, SC- Chapecó, ARGOS Editora Universitária, 382-384 p.

ZAÚ, A.S. (1998) Fragmentação da Mata Atlântica: Aspectos Teóricos. *Floresta e Ambiente*. Vol.5 (1): 160-170.

ZELADA, F., CONI, H. (1915). Contribution to the study of *piptadênia cebil*. Tese. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. p.72.