

**IVELONE MARIA DE CARVALHO BARROS**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
BIOLÓGICO DE *Hancornia speciosa* Gomes  
(Apocynaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Inês Sabioni Resck

**Brasília  
2008**

# TERMO DE APROVAÇÃO

IVELONE MARIA DE CARVALHO BARROS

“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
BIOLÓGICO DE *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela seguinte banca examinadora:

---

Dra. Dâmaris Silveira (Orientadora)  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Dr. Luiz Alberto Simeoni  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Dra. Sueli Maria Gomes  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

---

Dra. Inês Sabioni Resck  
Instituto de Química da Universidade de Brasília

**Brasília, dezembro de 2008**

Com amor ao meu filho amado, Rafael,  
por toda a intensidade que trouxe à minha  
vida.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À professora Dâmaris Silveira, pela orientação, amizade, aprendizado e estímulo constante, além da compreensão e apoio que me foram extremamente importantes.

À professora Inês Sabioni Resck, Instituto de Química, pela co-orientação, sobretudo no que se refere aos ensaios espectrométricos como também pela atenção a mim concedida.

À professora Sueli Maria Gomes, pelo empenho e colaboração, principalmente na identificação da espécie estudada e fornecimento do material botânico.

Aos professores Luiz Alberto Simeoni e Maria de Fátima Borin pelos ensinamentos, apoio, amizade e colaboração.

Às alunas de iniciação científica Andressa M. Vieira e Andréa S. Ferreira, pela colaboração na parte experimental deste trabalho, pela dedicação e amizade.

Aos alunos e amigos Ricardo, Viviane, Cecília e Stephanie pelos momentos alegres vividos no laboratório.

A todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, com destaque para Carlos Antônio Ribeiro (técnico de laboratório) que em diversos momentos me auxiliou em meus experimentos.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ismael e Cintia pela amizade companheirismo e troca de experiências que foram extremamente valiosas.

Ao Janio, meu esposo, pela compreensão, apoio, incentivo e dedicação em todos os momentos de nossas vidas.

Às minhas irmãs, eternas incentivadoras.

Ao meu pai e à minha mãe (*in memoriam*), pelos passos dados, pelo caminho andado e pela vida.

Às amigas do curso de pós-graduação Cintia, Ivane e Paloma, pela colaboração, companheirismo, amizade e alegre convivência durante o tempo vivido no laboratório.

Aos meus pastores Célio Gaya e Tânia Márcia pelo carinho, incentivo e compreensão.

E principalmente a Deus, autor de minha vida e de minha fé, meu refúgio e fortaleza, pelas experiências vividas e por ter me ajudado a superar limites e concretizar sonhos.

A FUNPE, FINATEC e FAP-DF pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS</b>	v
<b>LISTA DE FLUXOGRAMAS</b>	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS</b>	viii
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	20
1.1 O Cerrado	26
1.2. Família <i>Apocynaceae</i> – gênero <i>Hancornia</i>	35
1.2.1 Informações etnobotânicas do gênero <i>Hancornia</i>	38
1.2.2 Constituintes químicos e atividade biológica do gênero <i>Hancornia</i>	39
<b>RELEVÂNCIA E OBJETIVOS</b>	45
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	47
<b>2.1 MÉTODOS GERAIS</b>	48
<b>2.1.1 Tratamento com carvão ativado</b>	48
<b>2.1.2 Cromatografia em Camada Delgada</b>	48
2.1.2.1 Fase estacionária	48
2.1.2.2 Eluentes	48
2.1.2.3 Reveladores	49
<b>2.1.3 Cromatografia em Coluna</b>	50
2.1.3.1 Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck	50
2.1.3.2 Exclusão em gel Sephadex	50
<b>2.1.4 Análises Espectrométricas</b>	50
2.1.4.1 Espectrometria no Infravermelho	50
2.1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear	51
<b>2.1.5 – Ensaio biológicos</b>	51
2.1.5.1 Atividade Citotóxica	51
2.1.5.1.1 Toxicidade a larvas de <i>Artemia salina</i>	51
2.1.5.1.2 Avaliação da Atividade Alelopática	52
2.1.5.2 Atividade antifúngica	53
2.1.5.3 Atividade Antioxidante	54

2.1.5.3.1 Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio	54
2.1.5.3.2 Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio	60
<b>2.2 PARTE EXPERIMENTAL</b>	61
<b>2.2.1 Descrição botânica</b>	61
<b>2.2.2 Obtenção do material botânico</b>	62
<b>2.2.3 Obtenção dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB)</b>	62
<b>2.2.4 Isolamento e identificação de constituintes químicos das folhas de <i>Hancornia speciosa</i></b>	63
2.2.4.1 Fitoquímica do extrato hexânico de <i>Hancornia speciosa</i> (EHB)	63
2.2.4.1.1 Estudo farmacognóstico do extrato hexânico bruto (EHB) e suas frações	64
2.2.4.1.2 Elaboração da fração hexânica EHFI	65
2.2.4.1.3 Elaboração da fração EHFIII - Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	66
2.2.4.1.4 Elaboração da fração EHFIV – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	67
2.2.4.1.5 Elaboração da fração EHFV – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	67
2.2.4.1.6 – Elaboração da fração EHFVI – MeOH	68
2.2.4.2. Fitoquímica do extrato etanólico (EEB) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	69
2.2.4.2.1. Partição trifásica do extrato etanólico (EEB) de folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	69
2.2.4.2.2 Estudo farmacognóstico do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações	70
2.2.4.2.3 Elaboração da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (EEMC)	70
2.2.4.2.4 Elaboração da fração Aquosa (EEAq)	71
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	73
<b>3.1 Identificação de substâncias presentes no extrato hexânico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i></b>	74
3.1.1 Estudo farmacognóstico do extrato hexânico bruto (EHB) e suas frações	74
3.1.2 Mistura de Hidrocarbonetos	74
3.1.3 Mistura de Álcoois de cadeia longa	77
3.1.4 Esteróide - $\beta$ - sitosterol	79
3.1.5 Mistura de Triterpenos	85
3.1.5.1 HS03 - $\alpha$ - e $\beta$ -amirina	85
3.1.5.2 HS04- Lupeol, $\alpha$ - e $\beta$ -amirina	90
3.1.5.3 HS05 – Obtusalina e Eritrodiol	96

3.1.6 Acil-ésteres	103
3.1.6.1 HS06 – Mistura de ésteres de $\alpha$ - e $\beta$ -amirina	103
3.1.6.2 Lupeol 3 $\beta$ -O-acilados	108
a) HS07	108
b) HS08 e HS09	114
<b>3.2 Identificação de substâncias presentes no extrato etanólico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i></b>	122
3.2.1 Estudo farmacognóstico do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações	122
3.2.2 Compostos Fenólicos - Mistura de Rutina e Ácido Clorogênico (HS11)	122
<b>3.3 Ensaio Biológicos</b>	134
3.3.1 Atividade Citotóxica	134
3.3.1.1 Toxicidade a larvas de <i>Artemia salina</i>	134
3.3.1.2 Avaliação da Atividade Alelopática	134
3.3.2 Atividade Antifúngica	138
3.3.3 Atividade Antioxidante	139
3.3.3.1 Método da Redução do Complexo de Fosfomolibdênio	141
3.3.3.2 Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio	143
<b>CAPÍTULO 4: DADOS ESPECTROMÉTRICOS</b>	145
4.1 Mistura de hidrocarbonetos (HS01)	146
4.2 Mistura de Álcool de cadeia longa (HS02)	146
4.3 Mistura de triterpenos: $\alpha$ - e $\beta$ -amirina (HS03)	146
4.4 Mistura de triterpenos: $\alpha$ -amirina, $\beta$ -amirina e lupeol (HS04)	147
4.5 Mistura de triterpenos: eritrodiol e obtusalina (HS05)	148
4.6 Mistura de ésteres de $\alpha$ - e $\beta$ -amirina (HS06)	149
4.7 Mistura de ésteres lupeol 3 $\beta$ -O-acilados (HS07)	149
4.8 Mistura de ésteres lupeol 3 $\beta$ -O-acilados (HS08)	150
4.9 Mistura de ésteres lupeol 3 $\beta$ -O-acilados (HS09)	151
4.10 $\beta$ - sitosterol (HS10)	151
4.11 Mistura de rutina e ácido clorogênico (HS11)	152
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES</b>	153
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	156
<b>ANEXO</b>	186

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 2.1</b> Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio	57
<b>FIGURA 2.2</b> Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio	58
<b>FIGURA 2.3</b> Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio	59
<b>FIGURA 2.4</b> <i>Hancornia speciosa</i>	61
<b>FIGURA 3.1</b> Espectro na região do infravermelho de HS01 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	75
<b>FIGURA 3.2</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS01 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	75
<b>FIGURA 3.3</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS01 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	76
<b>FIGURA 3.4</b> Espectro na região do infravermelho de HS02 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	77
<b>FIGURA 3.5</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS02 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	78
<b>FIGURA 3.6</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS02 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	79
<b>FIGURA 3.7</b> Espectro na região do infravermelho de HS10 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	80
<b>FIGURA 3.8</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS10 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	80
<b>FIGURA 3.9</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS10 – Expansão da região entre $\delta 1,2$ e $\delta 2,0$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	81
<b>FIGURA 3.10</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS10 – Expansão da região entre $\delta 2,1$ e $\delta 5,5$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	81
<b>FIGURA 3.11</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS10 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	82
<b>FIGURA 3.12</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS10 – Expansão da região entre $\delta 54$ e $\delta 144$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	82
<b>FIGURA 3.13</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS10 – Expansão da região entre $\delta 11$ e $\delta 51$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	83
<b>FIGURA 3.14</b> Espectro na região do infravermelho de HS03 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	85
<b>FIGURA 3.15</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS03 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	86
<b>FIGURA 3.16</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS03 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	86
<b>FIGURA 3.17</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS03 – Expansão da região entre $\delta 0,6$ e $\delta 2,1$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	87
<b>FIGURA 3.18</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS03 – Expansão da região entre $\delta 2,15$ e $\delta 5,2$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	88
<b>FIGURA 3.19</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS03 – Expansão da região entre $\delta 52$ e $\delta 148$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	88
<b>FIGURA 3.20</b> Espectro na região do infravermelho de HS04 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	90



<b>FIGURA 3.21</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 0,6$ e $\delta 2,0$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	91
<b>FIGURA 3.22</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 4,5$ e $\delta 5,2$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	91
<b>FIGURA 3.23</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 2.3$ e $\delta 3.4$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	92
<b>FIGURA 3.24</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 74$ e $\delta 152$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	92
<b>FIGURA 3.25</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 36$ e $\delta 59$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	93
<b>FIGURA 3.26</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS04 – Expansão da região entre $\delta 14$ e $\delta 36$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	93
<b>FIGURA 3.27</b> Espectro na região do infravermelho de HS05 ( $\text{KBr}$ , $\text{cm}^{-1}$ )	96
<b>FIGURA 3.28</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS05 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	97
<b>FIGURA 3.29</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS05 – Expansão da região entre $\delta 3,0$ e $\delta 3,8$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	97
<b>FIGURA 3.30</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS05 – Expansão da região entre $\delta 4,5$ e $\delta 5,2$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	98
<b>FIGURA 3.31</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS05 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	98
<b>FIGURA 3.32</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS05 – Expansão da região entre $\delta 120$ e $\delta 154$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	99
<b>FIGURA 3.33</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS05 – Expansão da região entre $\delta 45$ e $\delta 80$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	99
<b>FIGURA 3.34</b> Espectro na região do infravermelho de HS06 ( $\text{KBr}$ , $\text{cm}^{-1}$ )	103
<b>FIGURA 3.35</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS06 – expansão da região entre $\delta 1,5$ - $\delta 5,5$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ )	104
<b>FIGURA 3.36</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS06 – Expansão da região entre $\delta 0,79$ e $\delta 1,59$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ )	104
<b>FIGURA 3.37</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS06 – Expansão da região entre $\delta 55,23$ e $\delta 173,71$ (75MHz, $\text{CDCl}_3$ )	105
<b>FIGURA 3.38</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS06 – Expansão da região entre $\delta 14,11$ e $\delta 47,61$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	106
<b>FIGURA 3.39</b> Espectro na região do infravermelho de HS07 ( $\text{KBr}$ , $\text{cm}^{-1}$ )	108
<b>FIGURA 3.40</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS07 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	109

<b>FIGURA 3.41</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS07 – Expansão da região entre $\delta 0,6$ e $\delta 2,4$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	109
<b>FIGURA 3.42</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS07 – Expansão da região entre $\delta 2,8$ e $\delta 5,4$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	110
<b>FIGURA 3.43</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS07 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	111
<b>FIGURA 3.44</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS07 – Expansão da região entre $\delta 58$ e $\delta 178$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	111
<b>FIGURA 3.45</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS07 – Expansão da região entre $\delta 10$ e $\delta 60,0$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	112
<b>FIGURA 3.46</b> Espectro na região do infravermelho de HS09 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	114
<b>FIGURA 3.47</b> Espectro na região do infravermelho de HS08 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	115
<b>FIGURA 3.48</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS08 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	116
<b>FIGURA 3.49</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS08 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) –Expansão da região entre $\delta 66,0$ e $\delta 178,0$	116
<b>FIGURA 3.50</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS09 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	117
<b>FIGURA 3.51</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS09 – Expansão da região entre $\delta 55,0$ e $\delta 173,0$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	117
<b>FIGURA 3.52</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS09 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	119
<b>FIGURA 3.53</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS08 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	119
<b>FIGURA 3.54</b> Espectro na região do infravermelho de HS11 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	123
<b>FIGURA 3.55</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS11 (300 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	124
<b>FIGURA 3.56</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 7,67$ e $\delta 6,21$ (300 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	125
<b>FIGURA 3.57</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 5,12$ e $\delta 3,51$ (300 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	125
<b>FIGURA 3.58</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 3,4$ e $\delta 1,11$ (300 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	126
<b>FIGURA 3.59</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11 (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	127
<b>FIGURA 3.60</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 127,70$ e $\delta 179,34$ (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	127
<b>FIGURA 3.61</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 82,99$ e $\delta 123,51$ (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	128
<b>FIGURA 3.62</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11- Expansão da região entre $\delta 57,64$ e $\delta 78,06$ (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	128

<b>FIGURA 3.63</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11 - Expansão da região entre $\delta 15$ e $\delta 50,0$ (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	129
<b>FIGURA 3.64</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de HS11 (APT, 75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	129
<b>FIGURA 3.65</b> Mapa de Contornos HMBC de HS11 (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	130
<b>FIGURA 3.66</b> Mapa de Contornos HMQC de HS11 (75 MHz, $\text{MeOD}_4$ )	131
<b>FIGURA 3.67</b> Germinação (a) e Índice de velocidade de germinação (IVG) (b) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	137
<b>FIGURA 3.68</b> Tamanho médio da parte aérea (epicótilo) e radicular (hipocótilo) de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> . após sete dias de incubação em soluções aquosas de diferentes concentrações dos extratos etanólico (EEB) (a) e hexânico (EHB) (b) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	137

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b> Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas	29
<b>TABELA 2.1</b> Valores das concentrações, média das absorvâncias e desvio padrão do ácido ascórbico	56
<b>TABELA 2.2</b> Valores das concentrações, média das absorvâncias e desvio padrão do BHT	57
<b>TABELA 2.3</b> Valores das concentrações, média das absorvâncias e desvio padrão da quercetina	58
<b>TABELA 2.4</b> Frações obtidas por filtração em sílica gel do extrato hexânico (EHB) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	64
<b>TABELA 2.5</b> Cromatografia em Sephadex LH-20 da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (EEMC) do extrato etanólico (EEB) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	71
<b>TABELA 2.6</b> Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração aquosa (EEAq) do extrato etanólico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	72
<b>TABELA 3.1</b> Estudo farmacognóstico preliminar do extrato hexânico bruto (EHB) e frações, das folhas de <i>H.speciosa</i>	74
<b>TABELA 3.2</b> Deslocamentos químicos de HS10 em RMN de <sup>13</sup> C (δ CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) em comparação com a literatura	84
<b>TABELA 3.3</b> Deslocamentos químicos de HS03 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) em comparação com a literatura	89
<b>TABELA 3.4</b> Deslocamentos químicos de HS04 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) em comparação com a literatura (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz)	94
<b>TABELA 3.5</b> Deslocamentos químicos de HS04 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) em comparação com a literatura	95
<b>TABELA 3.6</b> Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz), em comparação com a literatura	100
<b>TABELA 3.7</b> Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz), em comparação com a literatura	101
<b>TABELA 3.8</b> Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) em comparação com a literatura para os triterpenos obtusalina e eritrodiol	102
<b>TABELA 3.9</b> Deslocamentos químicos de HS06 em RMN de <sup>13</sup> C (δ, CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) em comparação com a literatura	107

<b>TABELA 3.10</b> Deslocamentos químicos de HS07 em RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação a literatura	113
<b>TABELA 3.11</b> Deslocamentos químicos de HS08 e HS09 em RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com a literatura	121
<b>TABELA 3.12</b> Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico e frações de folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	122
<b>TABELA 3.13</b> Deslocamentos químicos de HS11 em RMN de $^{13}\text{C}$ e as correlações em HMBC ( $\delta$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)	132
<b>TABELA 3.14</b> Deslocamentos químicos de HS11 em RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75MHz) em comparação com os padrões rutina e ácido clorogênico	133
<b>TABELA 3.15</b> Equivalência dos extratos brutos e frações das folhas de <i>Hancornia. speciosa</i> com relação à quercetina, ác. ascórbico e BHT, quanto à capacidade de reduzir o molibdato	142
<b>TABELA 3.16</b> Atividade neutralizante de peróxido de hidrogênio dos extratos hexânico (EHB) etanólico (EEB) de <i>Hancornia speciosa</i>	143

**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

<b>FLUXOGRAMA 2.1</b> Obtenção do extrato hexânico (EHB) e etanólico (EEB) de folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	63
<b>FLUXOGRAMA 2.2</b> Fracionamento do extrato hexânico bruto (EHB) das folhas e <i>Hancornia speciosa</i>	64
<b>FLUXOGRAMA 2.3</b> Elaboração da fração EHFVI do extrato hexânico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	65
<b>FLUXOGRAMA 2.4</b> Elaboração da fração EHFVI – MeOH, do extrato hexânico das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	69
<b>FLUXOGRAMA 2.5</b> Partição trifásica do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de <i>Hancornia speciosa</i>	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- ABS** Absorbância
- AcOEt** Acetato de Etila
- ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APT** Approach Proton Test
- ATCC** American Type Culture Collection
- BHT** Butilhidroxitolueno
- CC** Cromatografia em Coluna
- CCD** Cromatografia em Camada Delgada
- CCP** Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
- CDCl<sub>3</sub>** Clorofórmio deuterado
- CE<sub>50</sub>** Concentração Efetiva Mediana
- CG-EM** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
- CIM** Concentração Inibitória Mínima
- CL<sub>50</sub>** Concentração Letal Mediana
- CLAE** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- d* duplete
- dd* duplete duplo
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DOU** Diário Oficial da União
- ECA** Enzima Conversora de Angiotensina
- EEB** Extrato Etanólico Bruto
- EEH** Fração hexânica do extrato etanólico
- EEMC** Fração acetonitrila:clorofórmio do extrato etanólico
- EEAq** Fração aquosa do extrato etanólico
- EHB** Extrato Hexânico Bruto
- EHFI** Fração I hexânica do extrato hexânico
- EHFII** Fração II hexânica do extrato hexânico
- EHFIII** Fração III hexânica do extrato hexânico
- EHFIV** Fração IV hexânica do extrato hexânico
- EHFV** Fração V hexânica do extrato hexânico
- EHFVI** Fração VI hexânica do extrato hexânico

**ERMO** Espécie Reativa do Metabolismo do Oxigênio

**EtOH** Etanol

**FE** Fase estacionária

**FM** Fase Móvel

**GC-FID** *Gas Chromatography/ Flame Ionization Detector* (Cromatografia Gasosa / Detector de Ionização de Chamas)

**G%** Germinação

**Hex** Hexano

**HIV** *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

**HMBC** *Heteronuclear multiple bond correlation*

**HMCQ** *Heteronuclear multiple quantum coherence*

**Hz** Hertz

**HTS** *High-Troughput-Screening*

**IV** Infravermelho

**IVG** Índice de Velocidade de Germinação

**J** Constante de acoplamento de  $^1\text{H}$

**LDL** *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteínas de Baixa Densidade)

**L-NAME** *L-nitro arginina metil-éster*

**M** Molar

**m** Multiplete

**MeCN** Acetonitrila

**MeOD<sub>4</sub>** Metanol deuterado

**MeOH** Metanol

**MHz** MegaHertz

**mM** Milimolar

**NF- $\kappa$ B** *Nuclear Factor Kappa Beta* (Fator Nuclear Kappa Beta)

**nm** Nanômetro

**NP** Difenilboriloxietanolamina

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PEG** Polietilenoglicol

**PN** Produtos Naturais

**ppm** Partes por milhão

**RDC** Resolução de Diretoria Colegiada

**RMN** Ressonância Magnética Nuclear



**RMN de  $^{13}\text{C}$**  Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

**RMN de  $^1\text{H}$**  Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**s** Simpleto

**SUS** Sistema Único de Saúde

**t** Tripleto

**TMS** Tetrametilsilano

**TPA** *Tissue Plasminogen Activator* (Ativador de Plasminogênio)

**TPA** Tetradecanoilforbol

**UV** Ultravioleta

$\delta$  Deslocamento químico

$\lambda$  Comprimento de onda

## RESUMO

A presente dissertação descreve o estudo químico e da atividade biológica de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), espécie frutífera, genuinamente brasileira, comum no bioma Cerrado do Distrito Federal e conhecida popularmente como mangaba. O látex dessa espécie é utilizado na medicina popular para o tratamento de desordens gástricas e tuberculose e as folhas para tratar dismenorréia e diabetes. Dos extratos hexânico e etanólico foram obtidos: mistura de hidrocarbonetos; mistura de álcoois de cadeia longa; obtusalina e eritrodiol; lupeol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina e seus derivados  $3\beta$ -acilados;  $\beta$ -sitosterol; rutina e ácido clorogênico. Os extratos e frações de *Hancornia speciosa* foram submetidos a ensaios para avaliar sua atividade biológica. Em teste de citotoxicidade, utilizando como modelo a toxicidade às larvas de *Artemia salina*, os extratos brutos e frações não apresentaram toxicidade ( $DL_{50} > 1000$  ppm). Na avaliação da atividade alelopática, foi determinada a ação dos extratos brutos sobre a germinação e crescimento das sementes de *Lactuca sativa*. O extrato hexânico não inibiu a germinação de forma significativa, mas reduziu o índice de velocidade de germinação (IVG) nas concentrações testadas e inibiu o crescimento das partes aéreas (epicótilo) das plântulas e raízes (hipocótilo). O extrato etanólico inibiu a germinação e reduziu o IVG em todas as concentrações avaliadas; não inibiu o crescimento do epicótilo, porém inibiu o crescimento do hipocótilo, nas plântulas. O extrato etanólico foi avaliado quanto à atividade antioxidante através de dois modelos: pelo método de varredura do peróxido de hidrogênio no qual, o extrato etanólico ( $CE_{50} = 4.25$   $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou atividade antioxidante cerca de 20 vezes maior que aquela apresentada pelo controle positivo (ácido ascórbico,  $CE_{50} = 84,87$   $\mu\text{g/mL}$ ) e pelo modelo da redução do complexo de fosfomolibdênio, realizado de acordo com a modificação do método de Prieto, (1999), no qual o extrato etanólico (EEB) apresentou 41% de atividade antioxidante em relação à um equivalente de 1mg/mL de quercetina, Assim, trabalho visa contribuir para o conhecimento de plantas medicinais brasileira e até onde vai nosso conhecimento, esse é o primeiro relato da presença de obtusalina, eritrodiol,  $\beta$ -sitosterol e dos derivados acilados de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina no gênero *Hancornia*.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa*; mangaba; plantas medicinais; Cerrado

## ABSTRACT

This dissertation report describes the chemical and the biological activity studies about leaves of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), a fruitful brazilian species, popularly known as *mangaba*. In the traditional medicine, this latex is used to protect against gastric disorders and tuberculosis and their leaves in to treat dysmenorrhea, diabetes and obesity. From the hexane and ethanol crude extracts several triterpene mixtures could be identified: obtusalin and erythrodiol, lupeol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin and their 3 $\beta$ -acylated derivatives. Also were obtained mixtures of hydrocarbons and of long-chain alcohols,  $\beta$ -sitosterol, and a mixture of rutin and chlorogenic acid. The extracts and fractions of *Hancornia speciosa* were tested to evaluate a possible biological activity. The crude extracts showed no toxic activity on *Artemia salina* brine shrimp assay ( $LD_{50} > 1000$  ppm). Evaluating allelopathy activity over *Lactuca sativa* seeds' germination and growing, the hexane crude extract did not inhibit germination significantly, but reduced the rate of germination (IVG) and inhibited the growth of roots and aerial parts of the seedlings. On the other hand, the ethanol crude extract inhibited germination and reduced IVG, but did not inhibit growing of aerial parts of germinated seeds; nevertheless it inhibited the growth of roots in all evaluated concentrations. The ethanol crude extract was evaluated about antioxidant activity by two models: by the scavenging hydrogen peroxide method, in comparison with ascorbic acid activity, and by reducing phosphomolybdenum complex test, done according to Prieto's method with modifications, using quercetin as control. This work aims to contribute to the knowledge of Brazilian flora species considering that, as far we know, it is the first time the presence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin acylated derivatives, obtusalin, erythrodiol and  $\beta$ -sitosterol are reported to the *Hancornia* genus.

**Key words:** *Hancornia speciosa*; *mangaba*; *medicinal plants*; *Cerrado*, phytochemistry

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

Plantas têm sido um recurso ao alcance do ser humano e seu uso, na cura e/ou alívio de enfermidades, se caracteriza como um dos hábitos mais antigos da humanidade (DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Intuitivamente, o homem primitivo buscou soluções para satisfazer suas necessidades básicas como alimentação, reprodução e proteção. Ao observar o comportamento dos animais percebeu a existência das plantas comestíveis e de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, experimentadas no combate às doenças, revelaram, empiricamente, o seu potencial curativo. Dessa relação homem/natureza nasceu um conhecimento que foi, de início, transmitido oralmente às gerações posteriores, para depois, com o advento da escrita, ser grafado, organizado e guardado como um tesouro valioso (ARAUJO *et al.*, 2007; CUNHA, 2008). Essa cultura medicinal, que se manteve através dos séculos, de geração a geração, despertou o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

Planejar o desenvolvimento de um medicamento a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades encurta o percurso do desenvolvimento de um novo fármaco, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade biológica este fármaco poderia apresentar (FUNARI; FERRO, 2005).

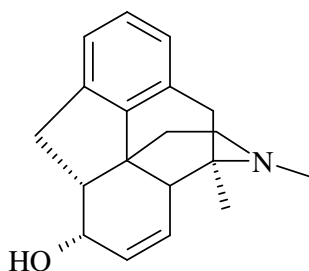
A antiga civilização egípcia já possuía informações sobre plantas medicinais, que foram preservadas no papiro de Ebers, descoberto e publicado por Georg Ebers traduzido, em 1890, por H. Joachin (PINTO *et al.*, 2002). Esse relato descreveu um número significativo de doenças bem como os medicamentos de origem vegetal ou animal empregados no tratamento delas. Embora a medicina egípcia se apoiasse em elementos mágicos e religiosos, sabe-se que já eram utilizados vegetais como o sene, o zimbros, as sementes do linho, o funcho, o rícino e muitas outras plantas (DUARTE, 2006; CUNHA, 2008).

No passado, os medicamentos surgiam da simples observação. Pouco se conhecia sobre o efeito e mecanismo de ação das plantas medicinais (DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004). Os gregos acompanhavam atentamente o restabelecimento de seus pacientes depois desses usarem preparações à base de vegetais; contudo, já citavam o uso de raízes no tratamento de hemorragias, óleo de rícino e couve como purgativos, tácia como emético, além

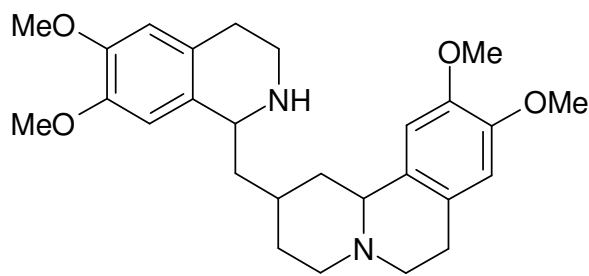
de beladona, meimendo e ópio como narcóticos (TEIXEIRA, 1994; TAVARES, 1996). Vários filósofos da época foram considerados importantes por suas obras em medicina natural, dentre esses, o médico grego Hipócrates (460 a 377 a.C.) e Theophrastos (300 a.C.) conhecido como pai da Botânica e da Farmacognosia. Aquele, considerado um dos pioneiros no estabelecimento das bases racionais da medicina moderna, e este o escritor do livro “História das Plantas”, que descreve espécies vegetais relacionando suas qualidades e peculiaridades (PHILLIPSON, 2001; RIBEIRO JR, 2003; DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Durante a Idade Média, os conhecimentos sobre plantas medicinais ficaram em poder da igreja, confinados nas bibliotecas dos mosteiros. Com isso, o desenvolvimento da medicina restringiu-se aos persas e árabes, dando origem à primeira farmacopéia árabe intitulada “O Corpo dos Simples”, que descrevia 14000 medicamentos, a maioria de origem vegetal. Os árabes introduziram o uso do âmbar, cravo da Índia, sândalo, gengibre, noz-moscada e cânfora (TEIXEIRA, 1994; DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Os primeiros passos na busca de fármacos naturais puros datam de 1803, com o isolamento da morfina (**1**) de *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, fato esse que marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas (TYLER, 1996; SCHULZ, HÄNSEL, TYLER, 2001). Alguns fármacos potentes foram então descobertos e muitos deles têm usos consagrados na terapêutica atual. Joseph Pelletier, farmacêutico francês, descreveu em 1817, o isolamento da emetina (**2**), a partir da *Cephaelis ipecacuanha*, considerada um poderoso emético e expectorante em doses menores (MIGUEL; MIGUEL, 1999; SIMÕES *et al.*, 2001).

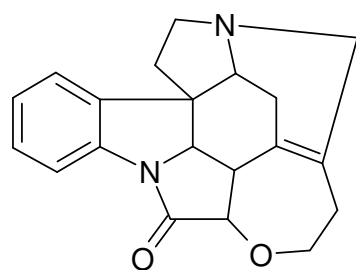


(1)

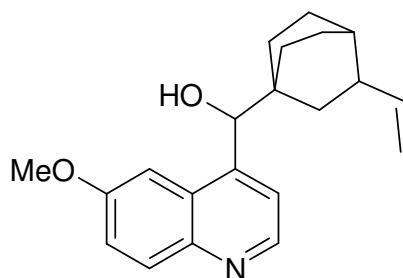


(2)

Os farmacêuticos franceses Pelletier e Caventou podem ser considerados os pais da fitoquímica por terem isolado em 1818 a estricnina (3) de *Strychnos vomica*, e identificado a quinina (4) em 1820, um dos primeiros antimicrobianos utilizados no tratamento da malária (TAVARES, 1996; DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).



(3)



(4)

A Fitoterapia, termo designado para o tratamento feito à base de plantas, foi construída com base no conhecimento de diferentes culturas, representando uma mistura que vai do folclore à religião. Como parte da “Medicina Tradicional” e da “Medicina Complementar e Alternativa”, a fitoterapia desfruta de excelente prestígio em função de sua eficácia.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca 80% da população de países em desenvolvimento ainda utilizam práticas tradicionais na atenção primária à saúde; desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais. O Brasil segue essa tendência mundial, incentivando o emprego de práticas complementares nos programas de atenção à saúde. Para isso implantou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, importantes diretrizes à pesquisa e ao desenvolvimento do uso de plantas medicinais e seus derivados (CARVALHO *et al.*, 2007).

Supõe-se que existam cerca de 200 espécies vegetais aptas a serem economicamente exploradas, na América Latina. Entretanto, o Brasil que detém a maioria dos recursos naturais viáveis, é ao mesmo tempo um grande importador de produtos naturais (SIAULYS, 2008). Atualmente, cerca de 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

No universo da indústria farmacêutica, a América Latina é detentora de apenas 4% do mercado mundial e o Brasil dispõe de apenas 1% desse total (SIAULYS, 2008). A fusão de

grupos multinacionais em conglomerados economicamente capazes de desenvolver e patentear novos fármacos inibiu o crescimento da tecnologia farmacêutica por parte de alguns países em desenvolvimento, transformando-os em meros compradores de tecnologias importadas ou pagadores de *royalties* para grandes laboratórios estrangeiros (FUNARI; FERRO, 2005; SIAULYS, 2008).

Segundo a RDC nº 48/04 (BRASIL, 2004), um medicamento fitoterápico é caracterizado pelo emprego exclusivo de matérias-primas vegetais ativas, cuja eficácia e riscos de seu uso sejam conhecidos, assim como a reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

O desenvolvimento de um agente fitoterápico é um processo interdisciplinar que exige a cooperação entre profissionais e instituições. O início da pesquisa se dá por levantamento da literatura científica especializada e pelo estudo etnobotânico, que se refere à observação do uso popular de plantas nas diferentes culturas (TOLEDO *et al.*, 2003).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, em especial de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica (TOLEDO *et al.*, 2003; FOGLIO *et al.*, 2006).

A avaliação científica dos produtos naturais exige comprovação de sua segurança e da eficácia (BOTSARIS, 2008). Dessa maneira a investigação da atividade biológica se constitui etapa crucial na transformação da planta medicinal em fitoterápico. Algumas etapas compõem esse processo, entre elas a investigação da atividade farmacológica e toxicológica das substâncias isoladas, de frações obtidas ou extratos totais da droga vegetal (TOLEDO *et al.*, 2003). Um dos obstáculos na validação desses medicamentos é a presença de fitocomplexos com grande número de substâncias ativas. Esse fato torna-os completamente diferentes de fármacos constituídos por princípio ativo único e exige a elaboração de novos protocolos de estudo (BOTSARIS, 2008).

Cabe ainda ressaltar o papel de algumas metodologias agregadas com o avanço tecnológico. Dentre elas, a abordagem biotecnológica e as técnicas genéticas correspondentes, que possibilitam identificar e preparar diversas proteínas (FOGLIO *et al.*, 2006); a química combinatória, que por meio de técnicas de triagem em larga escala como o *HTS* (*High-throughput screening*) permite que até 100 mil compostos sejam testados num único dia em relação a sua atividade biológica; e a química computacional que correlaciona a estrutura molecular com a atividade biológica (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001; FOGLIO *et al.*, 2006).



Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados mostram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (FOGLIO *et al.*, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza uma lista com 34 plantas para as quais o registro é facilitado por não precisarem comprovar critérios de segurança e eficácia terapêuticas, pois as mesmas possuem amplo reconhecimento por parte da sociedade científica. Algumas dessas espécies figuram entre as que mais possuem registro na forma de derivados para obtenção de fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2007); entre elas podemos citar:

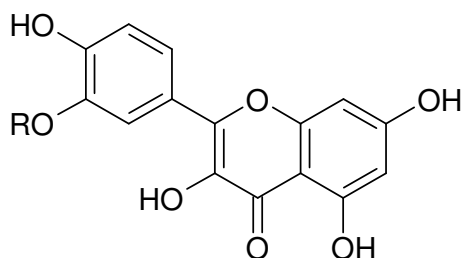
- *Ginkgo biloba* (ginkgo), utilizado no tratamento de distúrbios circulatórios e insuficiência vascular cerebral. Os princípios ativos identificados desta espécie que estão relacionados às suas ações são os flavonóides quercetina (5), kampferol (6), isoramnetina (7) e as misturas de lactonas terpenicas bilobalídeos e ginkgolídeos (BRASIL, 2004).

-*Aesculus hippocastanum* (castanha da índia), utilizada no tratamento de insuficiência venosa e fragilidade capilar, devido em parte à mistura de saponinas (BRASIL, 2004).

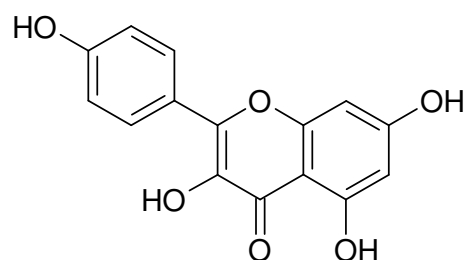
-*Peumus boldus* (boldo), tem uso bastante difundido para tratar distúrbios hepáticos e gastrintestinais. O princípio ativo responsável por essa ação farmacológica é o alcalóide boldina (8) (BRASIL, 2004).

-*Cynara scolymus* (alcachofra), utilizada como colerético e colagogo. Os princípios ativos deste vegetal são ácidos fenólicos, por exemplo, ácido clorogênico (9) (BRASIL, 2004).

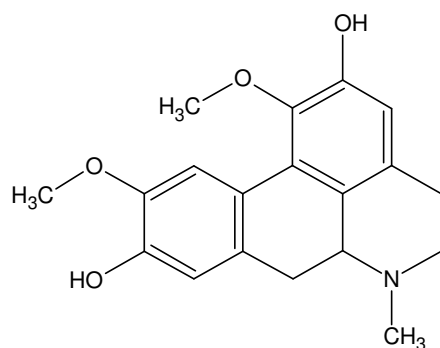
Pode ser citado ainda o *Panax ginseng* (ginseng) usado em casos de fadiga física e mental, a *Passiflora incarnata* (maracujá) usada como calmante e sedativo, a *Senna alexandrina* (sene) usada como laxante, *Valeriana officinalis* (valeriana) usada como sedativo e ansiolítico e finalmente a *Arnica montana* (arnica) usada para tratar hematomas e equimoses (BRASIL, 2004).



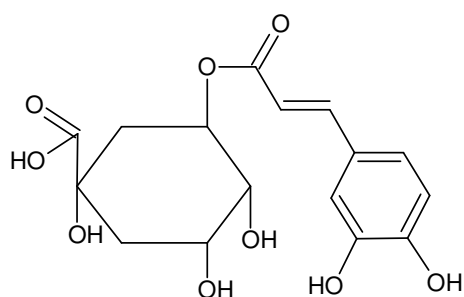
R  
 (5) H quercetina  
 (7) Me isoramnetina



(6)



(8)



(9)

### 1.1 – O Cerrado

O Brasil conta com cerca de 30% de toda a flora mundial conhecida, fato que desperta interesse de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos. Com aproximadamente 120.000 espécies, representa um vasto campo de pesquisa para descobrimento de novas moléculas que possam servir para preparar por semissíntese compostos farmacologicamente ativos; entretanto menos de 1% das espécies vegetais brasileiras foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (YUNES; CALIXTO, 2001; CUNHA, 2008).

No Planalto Central brasileiro predomina o Cerrado, considerado o segundo maior bioma do Brasil, com uma grande diversidade de espécies medicinais. Cobre uma área contínua de aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup> que correspondem a cerca de 24% do território nacional. A abrangência deste domínio engloba desde o Amapá e Roraima até o Paraná. No sentido longitudinal, aparece desde Pernambuco, Alagoas, Sergipe, até o Estado do Pará e Amazonas, com encaves dentro da floresta Amazônica (RIGONATO; ALMEIDA, 2003).

Sua vegetação está sob forte influência da sazonalidade, ocasionada em parte pela grande extensão territorial desse bioma, bem como pela ação de queimadas nas estações mais secas do ano. Além disso, ocorrem espécies que apresentam padrões fenológicos reprodutivos e síndromes de dispersão ajustados à variação climática. As espécies do estrato herbáceo florescem e frutificam ao final da estação chuvosa, enquanto as arbustivas e arbóreas o fazem no início da mesma (COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004).

Extensas áreas e heterogeneidade de espécies animais e vegetais, fazem o Cerrado responsável por aproximadamente 5% da biodiversidade mundial (RIGONATO; ALMEIDA, 2003). Reconhecido como a savana mais rica do mundo, o Cerrado apresenta diversos ecossistemas, riquíssima flora com mais de 10.000 espécies de plantas, das quais muitas têm uso medicinal, alimentício e na produção de artesanatos (PIRES, SANTOS, 2000; COSTA; ARAÚJO; LIMA-VERDE, 2004). Com o avanço da cultura agrícola durante as décadas de 1970 e 1980, as áreas de desmatamento, as queimadas, o uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos aumentaram consideravelmente, resultando em 67% de áreas intensamente modificadas, com voçorocas, assoreamento e envenenamento dos ecossistemas. Atualmente, restam apenas 20% de área em estado conservado (IBAMA, 2007).

Apesar de deter tanta riqueza, esse bioma está seriamente comprometido, constituindo uma das regiões com maiores riscos de extinção de espécies do planeta. É considerado um *hotspot* mundial, ou seja, área de conservação prioritária, devido à ameaça de extinção no mais alto grau, em que se tenha perdido mais de três quartos de sua vegetação original. Termo criado pelo ecólogo inglês Norman Myers para determinar quais as áreas de preservação mais importantes para conservação da biodiversidade na Terra, os *hotspots* correspondem atualmente a 2,3% da superfície terrestre, onde se encontram 50% das plantas conhecidas (MYERS *et al.*, 2000; FOGGIO *et al.*, 2006; RHODIN, 2008).

Atualmente há um interesse maior em se explorar o potencial econômico das espécies nativas. Muitas delas estão descritas em levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos que abordam a utilização e contribuem para valorização desses recursos. Difundir seu uso entre as populações rurais e urbanas e reforçar a conservação dessa biodiversidade para que seja mais bem explorada e utilizada tem sido o objetivo de alguns grupos de pesquisadores. O governo e diversos setores organizados da sociedade debatem a melhor forma de como conservar o que restou do Cerrado. Com isso procuram desenvolver tecnologias que possibilitem o uso adequado dos recursos hídricos, a extração de produtos vegetais nativos, o desenvolvimento do ecoturismo e outras iniciativas capazes de gerar um modelo de desenvolvimento sustentável e justo (IBAMA, 2007).

O uso de espécies nativas pode se constituir em alternativa econômica para o aproveitamento sustentado da região. Como exemplo, há algumas comunidades que se organizam em cooperativas para exercer extrativismo vegetal como fonte de renda e melhoramento da qualidade de vida. Um levantamento feito em vinte e um municípios do norte de Minas Gerais constatou que algumas árvores frutíferas da região são extremamente valorizadas pelo sabor exótico e valor nutricional. Dentre elas podem ser citadas: *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Butiá capitata* (coquinho-azedo), *Hancornia speciosa* (mangaba), *Passiflora* sp (maracujá nativo), *Annona crassiflora* (araticum) e *Caryocar brasiliense* (pequi), que são consumidas *in natura*, ou processadas para fabricação de sorvetes, sucos, compotas e outras iguarias (DE CARVALHO, 2007).

Além de servirem de alimento, as plantas do Cerrado são dotadas de propriedades medicinais e sua utilização faz parte da tradição e costumes locais. Contudo, o interesse da comunidade científica em estudar estes vegetais ocorre de forma tímida, se comparada com as demais regiões, resultando na carência de dados que dêem embasamento científico às práticas populares. Das espécies existentes, muitas são conhecidas e utilizadas como remédios supostamente eficazes para um grande número de moléstias (TABELA 1.1 p 30). Outras não são utilizadas na etnomedicina e não se conhece ainda seu potencial terapêutico ou tóxico expondo a necessidade de estudos multidisciplinares aprofundados que mostrem a utilidade, uso e manejo adequados das plantas (GOIS AQUINO; WALTER; RIBEIRO, 2007).

TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>ANACARDIACEAE</b>			
<i>Anacardium occidentale</i> L. (cajueiro)	aftas, feridas, úlceras e leucorréia, antiséptico	antibacteriana; moluscicida, antihiperlipidêmico, antioxidante, protetor renal	KUBO; KOMATSU; OCHI, 1986; HIMEJIMA; KUBO, 1991; SOUZA, C.P., <i>et al.</i> , 1992; LORENZI, 2002; SOUZA, L. K. H., <i>et al.</i> , 2002; FENNER <i>et al.</i> , 2006 DE BRITO <i>et al.</i> , 2007; PEREIRA <i>et al.</i> , 2006
<b>ANNONACEAE</b>			
<i>Annona impressivenia</i> Saff, ex. R.E. Fr. (graviola brava)	antiparasitária; antitumoral, antidiarreica;	leishmanicida	SANTOS, <i>et al.</i> , 2006
<i>Annona muricata</i> L. (graviola)	anti-helmíntica, anticonvulsivante, sedativa, antipirética, antitumoral, antiespasmódica, digestiva, hipotensora, antidiarreica	leishmanicida; tripanossomicida; moluscicida; larvicida, antitumoral; antioxidante	BORIES <i>et al.</i> , 1991; PADMA <i>et al.</i> , 1998; BETANCUR-GALVIS <i>et al.</i> , 1999; JARAMILLO <i>et al.</i> , 2000; DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001; RAYNAUD-LE GRANDIC <i>et al.</i> , 2004; DE S. LUNA <i>et al.</i> , 2005; MÉNAN <i>et al.</i> , 2006; BASKAR; RAJESWARI; SATHISH KUMAR, 2007; OSORIO <i>et al.</i> , 2007
<i>Annona crassiflora</i> Mart. (marôlo, araticum-do-Cerrado)	antitérmica, tratamento da doença de Chagas	leishmanicida; larvicida; tripanossomicida; moluscicida	RAYNAUD-LE GRANDIC <i>et al.</i> , 2004; MESQUITA <i>et al.</i> , 2005; TEMPONE <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona coriacea</i> Mart. (araticum)	carminativa, estomáquica, anti-reumática, antiparasitária	analgésica; inseticida, genotóxica; larvicida antiinflamatória; antimicrobiana	ATINDEHOU <i>et al.</i> , 2002; SOUSA; DEL-VECHIO-VIEIRA; KAPLAN, 2007; COELHO; MARANGONI; MACEDO, 2007.

Continuação: TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>APOCYNACEAE</b>			
<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Mart. (guatambu-do-cerrado, pau-pereira, peroba-do-campo)	antitérmica; antimalárica.	trypansomocida	MESQUITA <i>et al.</i> , 2005
<i>Hancornia speciosa</i> (mangaba, mangava)	tuberculose, diabetes, doenças venéreas; verruga	antidiabética; vasodilatadora	RITTER <i>et al.</i> , 2002; FERREIRA <i>et al.</i> , 2007
<b>ARECACEAE</b>			
<i>Copernicia prunifera</i> (carnaúba)	sífilis; afecções cutâneas	antibacteriana; analgésica; antiinflamatória; antioxidante	CARVALHO, 1982; RODRIGUES, 2004; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; AYRES <i>et al.</i> , 2008; SOUSA, C. <i>et al.</i> , 2007.
<i>Mauritia vinifera</i> (buriti)	carminativa, estomáquica, vermífuga e cicatrizante	Antimicrobiana, antioxidante	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2005; SILVA, <i>et al.</i> , 2005
<i>Syagrus oleracea</i> (guariroba, licuri)	carminativa, estomáquica, vermífuga, cicatrizante	Antimicrobiana, antioxidante	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2005; SILVA, <i>et al.</i> , 2005
<b>BIGNONIACEAE</b>			
<i>Tabebuia avellaneda</i> Lorenz ex Griseb. (ipê roxo, pau d'arco)	diabetes, úlcera gástrica; analgésica	antibacteriana; analgésica; antiedematogênica; antiinflamatória; antioxidante; antifúngica; antiulcerogênica, antitumoral	RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968; SPAULDING-ALBRIGHT, 1997; DE MIRANDA <i>et al.</i> , 2001; PORTILLO <i>et al.</i> , 2001; PARK <i>et al.</i> , 2003; AWALE <i>et al.</i> , 2005; CRAGG; NEWMAN, 2005; BÖHLER <i>et al.</i> , 2008; TWARDOWSCHY <i>et al.</i> , 2008

Continuação: TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>CARYOCARACEAE</b>			
<i>Caryocar brasiliense</i> A. St.-Hil. (pequi)	problemas respiratórios, afrodisíaco; adstringente	antibacteriana; antioxidante, antifúngica; tripanossomicida	DE ARAUJO, 1995; BEZERRA <i>et al.</i> , 2002; HERZOG-SOARES <i>et al.</i> , 2002; PASSOS <i>et al.</i> , 2002; JÚNIOR, 2004; SANTOS, B. R. <i>et al.</i> , 2004; PAULA; ROCHA; DONATTI, 2006; MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008
<b>CELASTRACEAE</b>			
<i>Austroplenckia populnea</i> (Reissek ex Mart.) Lundell (marmelinho-do-campo, mangabeira-brava, mangabarana e maria-mole )	disenterias; reumatismo; antiinflamatórias	antiinflamatória; analgésica; antifúngica; antibacteriana; antiulcerogênica, inibidora da espermogênese	MAZARO; DI STASI; DE GRAVA KEMPINAS, 2002; SEITO; MAZARO; DI STASI, 2002; ANDRADE, <i>et al.</i> , 2006; ANDRADE, <i>et al.</i> , 2007; ALL, 2008
<b>COCHLOSPERMACEAE</b>			
<i>Cochlospermum regium</i> (algodãozinho-do-campo)	infecções intestinais, uterina e ovariana, úlceras; dermatites	citotóxica; antibacteriana	CORREA, 1984; BRUM <i>et al.</i> , 1997; CASTRO, D. B. <i>et al.</i> , 2004; CESCHINI; CAMPOS, 2006
<b>LEGUMINOSA</b>			
<i>Bauhinia forficata</i> Link; <i>B. monandra</i> Kurz; <i>B. divaricata</i> Lam. (pata de vaca)	glicosúrias; diabetes	hipoglicemiante; antiulcerogênica, antitumoral inibidora da aldosedutase, antioxidante, anticoagulante; antifibrinogenolítica	ARGOLO <i>et al.</i> , 2004; OLIVEIRA, C. <i>et al.</i> , 2005; BNOUHAM <i>et al.</i> , 2006; LIM <i>et al.</i> , 2006; SALGUEIRO, 2007
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart (pau-ferro)	diabetes, feridas, contusões, tosse; antiinflamatória, antidiarreica antitérmica; asma	analgésica; antiinflamatória; antiulcerogênica, antimicrobiana, vasodilatadora,	CARVALHO, <i>et al.</i> , 1996; UEDA <i>et al.</i> , 2001; ARGOLO <i>et al.</i> , 2004; MENEZES, <i>et al.</i> , 2007; SAMPAIO; PEREIRA; CONDE, 2007

Continuação: TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>LEGUMINOSA</b>			
<i>Hymenaea courbaril</i> L. (jatobá, jutaí, jutaí-açu, jutaí-bravo, jutaí-grande, jataí)	hepatites, fraqueza geral, tosse, bronquite, asma, laringite; diarreia	antifúngica; anticolinesterásica; antimicrobiana	BARROS MACHADO <i>et al.</i> , 2005; FERNANDES; SANTOS, 2005
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (barbatimão)	leucorréia; hemorragia; diarreia, hemorróidas; conjuntivite; limpeza de ferimentos	moluscicida; bactericida; tripanossomicida; antiinflamatória, antinociceptivo	BEZERRA <i>et al.</i> , 2002; HERZOG-SOARES <i>et al.</i> , 2002; TOLEDO, 2002; MACEDO; FERREIRA, 2004; FALCÃO <i>et al.</i> , 2005; ORLANDO, 2005; VINAUD <i>et al.</i> , 2005; MELO <i>et al.</i> , 2007; SOUZA, T. M. <i>et al.</i> , 2007
<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. (barbatimão)	leucorréia, hemorragia, diarreia, hemorróidas, feridas; conjuntivite.	Moluscicida, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana	BEZERRA <i>et al.</i> , 2002; LOPES <i>et al.</i> , 2005; SANCHES <i>et al.</i> , 2005 ; VINAUD <i>et al.</i> , 2005
<b>MYRTACEAE</b>			
<i>Eugenia dysenterica</i> DC. (cagaiteira)	antidiarreica	antifúngica; alelopática	CORREA, 1984; COSTA <i>et al.</i> , 2000; GIOTTO; OLIVEIRA; SILVA, 2007
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (jambolão)	diabetes	antioxidante; hipotensora, diurética	CIRQUEIRA; ALVES, 2005; PLAZA, SILVA <i>et al.</i> , 2007
<i>Eugenia uniflora</i> L. (pitangueira)	reumatismo; diurética; anti-hipertensiva; antitérmica; antidiarreica; antiinflamatória.	antifúngica; anti-hipertensiva; antimalárica; antimicrobiana; larvicida; antioxidante; diurética; tripanossomicida;	ADEBAJO, 1989; AGBEDAHUNSI; ALADESANMI, 1993; CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999; ADEWUNMI <i>et al.</i> , 2001; CONSOLINI; SARUBBIO, 2002; HOLETZ <i>et al.</i> , 2002; SOUZA, L. K. H. <i>et al.</i> , 2002; VELÁZQUEZ <i>et al.</i> , 2003; DE S. LUNA <i>et al.</i> , 2005; OGUNWANDE <i>et al.</i> , 2005; CIRQUEIRA; ALVES, 2005; OLIVEIRA, M. <i>et al.</i> , 2008



Continuação: TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>PIPERACEAE</b>			
<i>Piper aduncum</i> L (pimenta de macaco)	antimicrobiana, cicatrizante, adstringente; analgésica; antihemorrágica;	moluscicida; antibacteriana; alelopática; antifúngica, antioxidante, antagonista do receptor do fator de agregação plaquetária (PAF), leishmanicida	ORJALA <i>et al.</i> , 1993; TORRES-SANTOS <i>et al.</i> , 1999; KLOUCEK <i>et al.</i> , 2005; LUSTOSA; JANTAN; RAFI; JALIL, 2005; NAVICKIENE <i>et al.</i> , 2006; YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 2006; BRAGA <i>et al.</i> , 2007; OLIVEIRA; ROMEIRO, 2007; RAPADO, 2007; SILVA LOBATO <i>et al.</i> , 2007
<b>SALICACEAE</b>			
<i>Casearia sylvestris</i> SW. (erva-de-lagarto, cafezeiro-do-mato)	analgésica, antitumoral; antibacteriana; antiinflamatória	tripanossomicida; citotóxica, anti-epidêmica, antioxidante; antinociceptiva, anti-ulcerogênica, inibidora da acetilcolinesterase; antiinflamatória, leishmanicida, antídoto para venenos de ofídeos	JAMAL <i>et al.</i> , 2002; IZIDORO <i>et al.</i> , 2003; ESPINDOLA <i>et al.</i> , 2004; MENEZES; SCHWARZ; SANTOS, 2004; ESTEVES <i>et al.</i> , 2005; MESQUITA <i>et al.</i> , 2005; OSHIMA-FRANCO <i>et al.</i> , 2005; ; DA SILVA <i>et al.</i> , 2006; CAVALCANTE <i>et al.</i> , 2007; DE MATTOS <i>et al.</i> , 2007; CINTRA-FRANCISCHINELLI <i>et al.</i> , 2008; SILVA; CHAAR; FIGUEIREDO, 2008; SCHOENFELDER <i>et al.</i> , 2008
<b>SAPINDACEAE</b>			
<i>Serjania lethalis</i> A.St-Hil. (timbó)	ictiotóxica	Leishmanicida, antimicrobiana	MESQUITA <i>et al.</i> , 2005; LIMA <i>et al.</i> , 2006
<b>SAPOTACEAE</b>			
<i>Pouteria caimito</i> Raldk. (abiu, abieiro, caimito)	doenças pulmonares; desintéria; malária.	antioxidante	CASTRO; SILVA; PERFEITO; SANTOS; RESCK; PAULA; SILVEIRA, 2006

Continuação: TABELA 1.1 - Algumas espécies do cerrado, seus usos populares e atividades biológicas descritas na literatura

ESPÉCIE (SINONÍMIA VULGAR)	USO POPULAR	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
<b>SAPOTACEAE</b>			
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) <i>Baehni</i> (leiteiro-da-folha-miúda, sapotinha, aguáí-guaçu)	construção civil; alimentação	tripanossomicida; inibição da $\alpha$ -amilase	ALBUQUERQUE, 2002; MESQUITA <i>et al.</i> , 2005; CASTRO <i>et al</i> 2006
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk. (grão de galo, massaranduba; pitomba de leite)	vermífugo, disenteria	Inibição da $\alpha$ -amilase; antimicrobiana; antiinflamatória; antinociceptiva; antioxidante a	ALBUQUERQUE, 2002; CHAGAS, 2003; FONTES-JUNIOR, 2004; RAMALHO, 2004; CASTRO; SILVA; PERFEITO; SANTOS; RESCK; PAULA; SILVEIRA, 2006
<i>Pouteria torta</i> Radlk. (guapeva, curiola, acá ferro, abiu do cerrado)	disenteria	antioxidante; antimicrobiana; inibição da $\alpha$ -amilase. alelopática, citotóxica	ALBUQUERQUE, 2002; RAMALHO, 2004; PERFEITO <i>et al.</i> , 2005; CASTRO; SILVA; PERFEITO; SANTOS; RESCK; PAULA; SILVEIRA, 2006; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2007
<b>SOLANACEAE</b>			
<i>Solanum paniculatum</i> L (jurubeba)	icterícia, hepatite crônica; febre	antitumoral, citotóxica, antimutagênica anti-ulcerogênica, inibição da secreção gástrica	MESIA-VELA <i>et al.</i> , 2002; SILVA, T. <i>et al.</i> , 2007; VIEIRA, 2007; MALHEIROS, MENEZES <i>et al.</i> , 2008
<b>VOCHYSIACEAE</b>			
<i>Qualea grandiflora</i> Mart. (pau-terra)	inflamação; .antidiarréico; asma; úlceras; amebicida; feridas; antiinflamatório,	antiulcerogênica; analgésica; antibacteriana; anticonvulsivante; antioxidante	PIO CORRÊA, 1978; ALVES <i>et al.</i> , 2000; RODRIGUES, 2001; GASPI <i>et al.</i> , 2006; HIRUMA-LIMA <i>et al.</i> , 2006; AYRES <i>et al.</i> , 2008; SOUSA, C. <i>et al.</i> , 2007

## 1.2 – Família Apocynaceae – gênero *Hancornia*

As espécies da família Apocynaceae encontram-se bem representadas na vegetação do Cerrado. No Brasil ocorrem cerca de 850 espécies subordinadas a 90 gêneros representadas por arbustos, subarbustos, árvores ou lianas, geralmente latexcentes. Alguns gêneros conhecidos são: *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Plumeria*, *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* e *Hancornia* (SOUZA; LORENZI, 2005).

Plantas de hábitos variados, as espécies dessa família apresentam, na sua maioria, látex branco e abundante, em alguns casos visível apenas nos ramos terminais.

É relevante a importância econômica dos vegetais desta família. Como exemplo as espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. polyneuron*; *A. pyriformis*) que são muito procuradas pela qualidade de sua madeira usada na indústria de móveis, construção civil, construção naval e carpintaria (SOUZA; LORENZI, 2005; RIBAS, 2005). Outras apresentam potencial paisagístico pela beleza de suas flores ou pela forma do tronco e da copa. Dentre as espécies cultivadas no Brasil, destacam-se a alamaanda (*Allamanda cathartica*), o jasmim-manga (*Plumeria rubra*), o chapéu-de-napoleão (*Thevetia peruviana*), a espirradeira (*Nerium oleander*) e a vinca (*Catharanthus roseus*) (HOPKINS, et al., 1999; SOUZA; LORENZI, 2005).

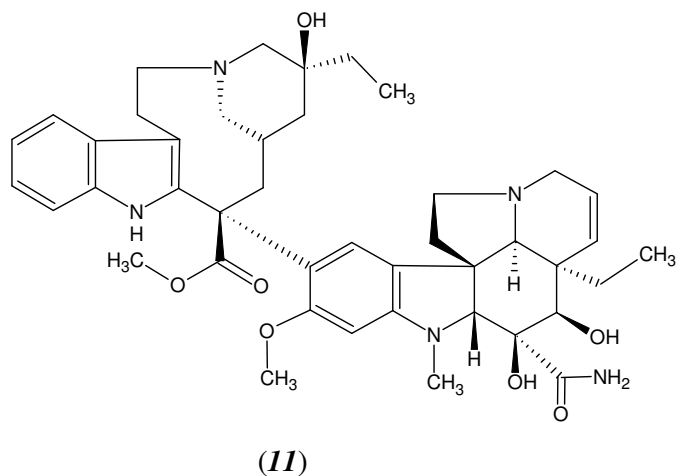
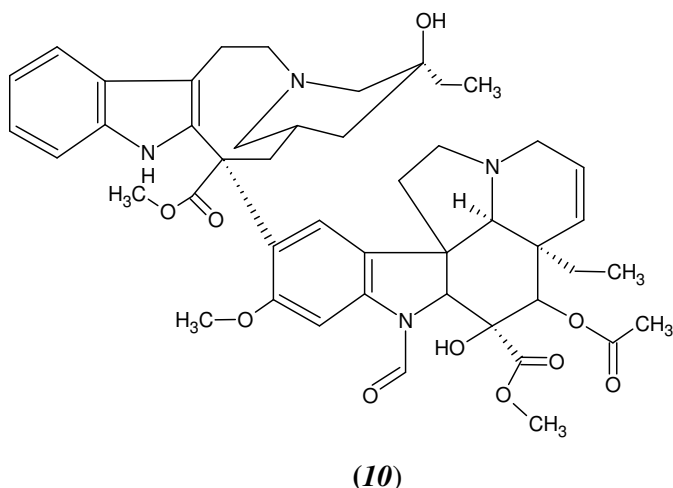
Alguns gêneros apresentam frutos comestíveis (*Couma*, *Ambelania*, *Rhigospira* e *Hancornia*). O látex da sorva (*Couma utilis*) é comestível e foi utilizado para a produção da goma de mascar (HOPKINS, et al., 1999; FALCÃO; CLEMENTE; GOMES, 2003).

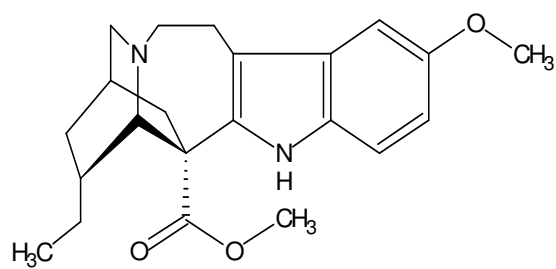
Estudos feitos com algumas espécies de Apocynaceae possibilitaram o isolamento de diversos compostos ativos de ação biológica variada, como anticancerígena, leishmanicida, antibacteriana e anti-HIV – inibidores da transcriptase reversa. Estas atividades estão relacionadas, especialmente, aos alcalóides esteroidais e indólicos provenientes do metabolismo secundário destes vegetais. Neste grupo estão substâncias de grande interesse farmacológico e terapêutico que se constituem em importantes princípios ativos na elaboração de medicamentos. Entre as plantas mais conhecidas e estudadas que produzem tais compostos podem ser citadas: *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata* e *Rauwolfia serpentina* (REYES et al., 2006).

A vincristina (**10**) e a vimblastina (**11**), conhecidos como os “alcalóides da vinca”, são amplamente utilizados para tratar, entre outros males, o câncer de mama e leucemias. Foram extraídos das folhas e talos de *Catharanthus roseus*, espécie nativa de Madagascar cultivada no Brasil com fins ornamentais (LUZ FERRADÁ, 2002; LOYOLA-VARGAS, 2004).

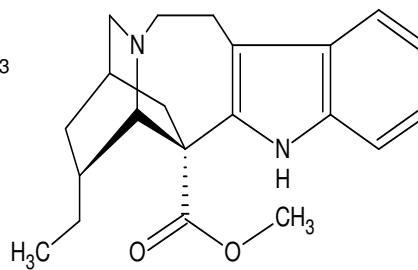
Estudos realizados com os extratos de *Tabernaemontana catharinensis* sugeriram que a atividade anticancerígena detectada nos ensaios sejam em função dos alcalóides voacangina (**12**) e coronaridina (**13**) presentes neste vegetal (PEREIRA *et al.*, 2004; ZOCOLER *et al.*, 2005; PEREIRA; ROSA; MEIRELES, 2006).

E finalmente do gênero *Rauwolfia*, há a ajmalicina (**14**), a ajmalina (**15**) e a reserpina (**16**). Esta última é reconhecida pelas suas propriedades hipotensoras, sendo comercializada no Brasil de forma isolada ou em associação com hidroclorotiazida, diidralazina, clortalidona ou furosemida. As demais possuem ação vasodilatadora e antiarrítmica (SIMÕES *et al.*, 2001).

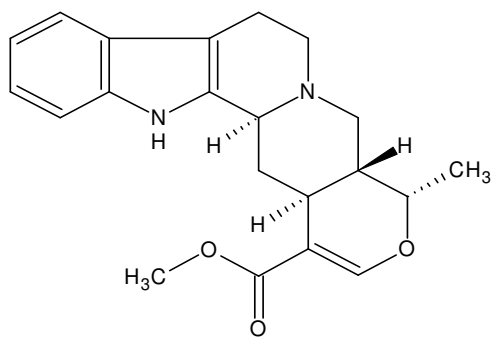




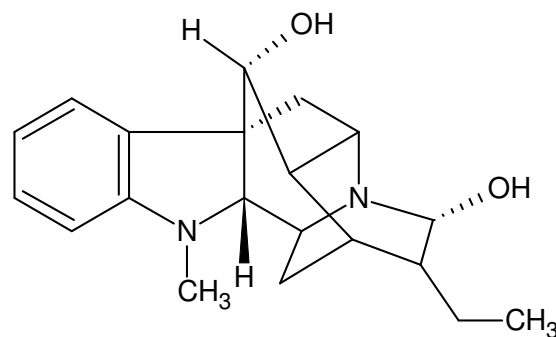
(12)



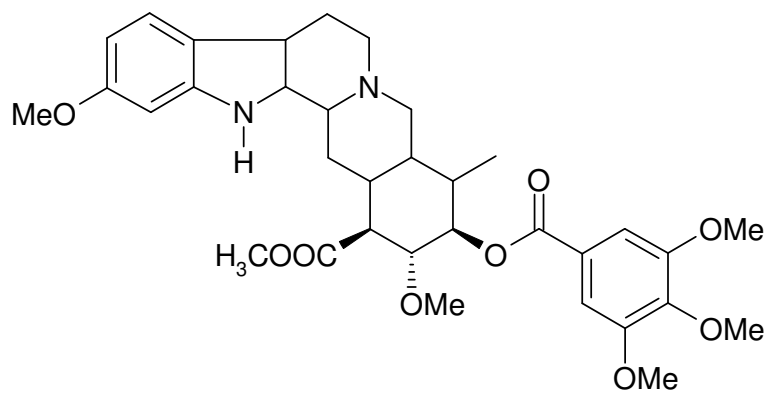
(13)



(14)



(15)



(16)

### 1.2.1 – Informações etnobotânicas do gênero *Hancornia*

O gênero *Hancornia* é monoespecífico, constituído por uma única espécie, a *Hancornia speciosa* Gomes, e suas variedades. Conhecida como mangaba, mangabeira, mangava, mangabeira-do-norte e fruta de doente. *H. speciosa* (Apocynaceae), é espécie frutífera, arbóreo-arbustiva genuinamente brasileira (ALMEIDA *et al.*, 1998; ANDRADE, 2002).

Desenvolve-se bem em solos ácidos, com baixa fertilidade e em diferentes ecossistemas como Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Vegeta espontaneamente em várias regiões brasileiras, desde o Amazonas até São Paulo, ocorrendo em maior abundância nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, onde o fruto é bastante apreciado em função das excelentes características organolépticas e do elevado valor nutricional associado aos altos índices de proteína, vitamina C, vitamina A, ferro e cálcio (AGUIAR FILHO; BOSCO; ARAÚJO, 1998).

O nome mangaba vem do tupi-guarani que significa “coisa boa de comer” traduzindo a aceitação da fruta na alimentação regional. Bastante apreciado, pelo seu sabor levemente ácido, possui suco leitoso tóxico, por isso, deve ser consumido depois de totalmente maduro, quando cair ao chão. Além do seu consumo in natura, é matéria-prima para industrialização, resultando em vários produtos como doces, sucos, sorvetes, compotas além de outros (ALMEIDA *et al.*, 1998; EPSTEIN, 2004; SILVA JÚNIOR, 2004; DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2005).

Nas regiões de ocorrência desta planta, muitas famílias ganham seu sustento, informalmente, com a coleta e comercialização de mangabas. Alguns cultivos comerciais estão começando a ser estabelecidos e o potencial econômico da espécie tem sido percebido, despertando o interesse de alguns setores representados, em especial, por órgãos como EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), EMEPA (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba) - na Paraíba, EMDAGRO (Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe) – no Sergipe. (EPSTEIN, 2004).

Além do aproveitamento do fruto e do uso medicinal, a mangaba pode ser explorada como fonte secundária na produção de borracha. No período da Segunda Guerra Mundial havia uma preocupação em se obter toda a borracha natural possível. Com isso houve um aumento na produção comercial desse produto e o látex da mangabeira foi então utilizado como material de partida, ao lado da seringueira (*Hevea brasiliensis*), que era mais

comumente utilizada e resultava em um produto de melhor qualidade (BEKKEDAHL; SAFFIOTI, 1948). Atualmente o látex é utilizado para impermeabilizar tecidos e confeccionar bolas (ALMEIDA *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2004).

O suco leitoso do fruto e o látex desta espécie são usados como medicamento caseiro para tratamento de tuberculose e úlcera (NOGUEIRA *et al.*, 2004). A folha é usada para tratar dismenorréia, diabetes, obesidade e verrugas; as cascas têm ação adstringente e servem para afecções dos pulmões e fígado, câimbras e luxações (ALMEIDA *et al.*, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).

Os levantamentos etnobotânicos feitos no estado de Goiás confirmaram os usos, anteriormente citados, por parte da população estudada. (SOUZA; FELFILI, 2006, VILA VERDE; PAULA; CANEIRO, 2003). O látex também é citado para o tratamento de doenças de pele causadas por fungos (SANTOS *et al.*, 2007), diarreia e herpes (SILVA JUNIOR, 2004).

### 1.2.2 - Constituintes químicos e atividades biológicas do gênero *Hancornia*

Foram encontrados na literatura alguns relatos sobre a avaliação da atividade bilógica de *H. speciosa*, como também sobre sua composição fitomolecular.

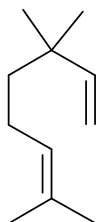
#### - Compostos isolados

A avaliação da composição química de *H. speciosa* por Sampaio e Nogueira (2006) evidenciou a presença de inúmeros compostos voláteis nos frutos desta espécie, em três estágios de maturação, por técnicas de CG/EM e GC/FID. Foram identificados 33 compostos nos frutos verdes, prevalecendo um teor maior de monoterpenos oxigenados (51,5%), tais como linalol (**17**);  $\alpha$ -terpineol (**18**) e geraniol (**19**), enquanto que os teores de ésteres (6,5%), álcoois (18,4%), aldeídos (5,9%) e cetonas (0,5%) são reduzidos. Nos frutos maduros foram identificados ésteres (40,9%), álcoois (18,4%), aldeídos (10,2%) e cetonas (9,7%). O teor de monoterpenos oxigenados nos frutos maduros foi bastante reduzido (1,9%). Nos frutos em estágio médio de maturação foram encontradas todas as classes de compostos anteriormente citadas em proporções intermediárias (SAMPAIO; NOGUEIRA, 2006)

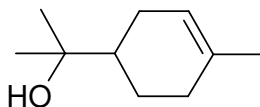
Além dos frutos, os compostos voláteis presentes nas folhas desta espécie também foram determinados. Foi obtido um teor variado de monoterpenos oxigenados e dentre os

compostos majoritários podem ser citados o geraniol (19),  $\alpha$ -terpineol (18) e linalol (17) (SANTOS *et al.*, 2006).

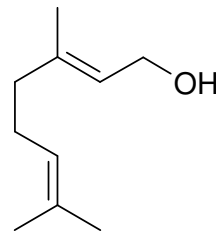
Um estudo químico realizado em extratos polares das folhas resultou no isolamento do inositol L-(+)-bornesitol (20) e na identificação do flavonóide rutina (21) por CLAE (EDRINGER *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007a).



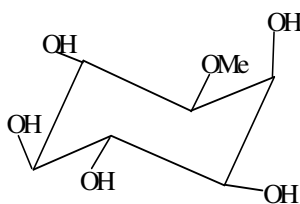
(17)



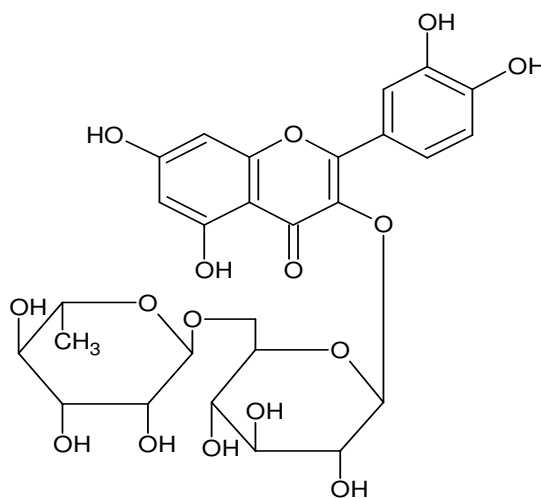
(18)



(19)



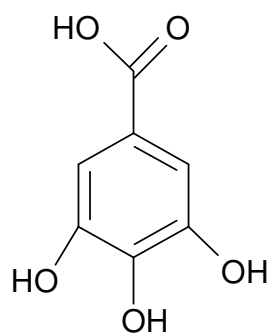
(20)



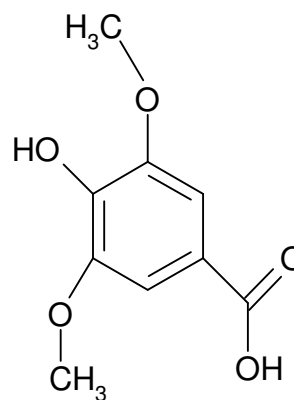
(21)

Testes farmacognósticos preliminares e a utilização de padrões revelaram a presença de substâncias fenólicas tais como catequina (22) e ácido clorogênico (9) no decocto das cascas deste vegetal (ANDRADE, 2002). Outros estudos com a fração acetato de etila da infusão das cascas da mangaba levaram ao isolamento de ácidos fenólicos tais como: gálico (23); ácido clorogênico (9) e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico) (24) (RODRIGUES *et al.*, 2006; RODRIGUES, 2007).





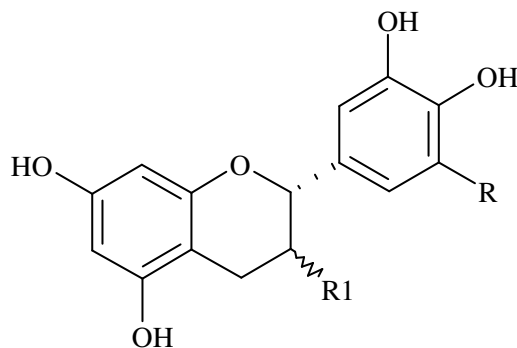
(23)



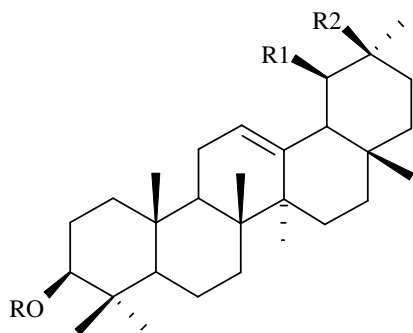
(24)

A presença em grande quantidade de compostos com alto grau de polimerização no infuso das cascas também foi citada (RODRIGUES *et al.*, 2006), Catequinas monoméricas e oligoméricas (taninos condensados e proantocianidinas) foram detectadas por CLAE. Algumas substâncias foram caracterizadas, por método de co-injeção com padrões de referência, sendo identificadas como catequinas (22), epicatequina (25), epigallocatequina (26) e ácido clorogênico (9) (RODRIGUES *et al.*, 2006; RODRIGUES, 2007).

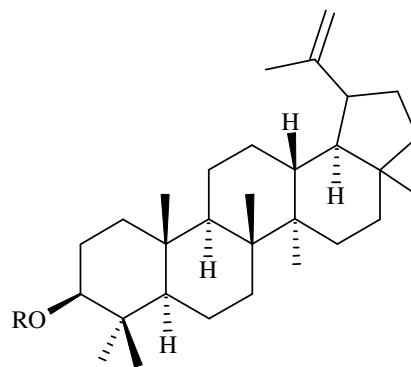
A análise do látex por CG/EM, levou à caracterização de mistura dos triterpenos  $\alpha$ -amirina (27),  $\beta$ -amirina (28) e lupeol (29) na forma livre e 3- $\beta$ -acilado com ácidos graxos de cadeia longa (NOGUEIRA *et al.*, 2004).



R	R1	
OH	a-OH	(26)
H	b-OH	(22)
H	a-OH	(25)



R	R1	R2
H	Me	H (27)
H	H	Me (28)



R = H (29)

### - Atividade biológica

#### Ação antihipertensiva e vasodilatadora

Nos últimos anos tem crescido o número de estudos que visam avaliar as possíveis atividades de *H. speciosa*. O extrato etanólico das folhas e as frações obtidas diclorometano e diclorometano:AcOEt (1:1), apresentaram atividade antihipertensiva em ensaio de inibição *in vitro* da enzima conversora da angiotensina (ECA) (SERRA *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2006).

Foi constatada também a capacidade vasodilatadora dose/dependente ( $IC_{50}$   $10,8 \pm 4,0$   $\mu\text{g/mL}$ ) desse extrato, quando testado em anéis de artérias de ratos pré-tratados com fenilefrina ou cloreto de potássio. O efeito não foi observado sobre endotélio não funcional, caracterizando uma dependência da liberação de alguns fatores relaxantes derivados do endotélio. O efeito vasodilatador endotélio/dependente foi inibido pelo L-NAME (inibidor do óxido nítrico), e não foi inibido pela indometacina (inibidor das cicloxigenases) nem pela atropina (antagonista muscarínico seletivo) e independente da participação dos prostanóides ou da ativação de receptores muscarínicos (FERREIRA *et al.*, 2007a).

Os mesmos autores mostraram que a ação vasodilatadora endotélio/ dependente do extrato etanólico era preservada em anéis de aorta de ratos que foram pré tratados com superóxido dismutase (SOD) e inibida por um inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)

(vortmanina), sugerindo que a ação vasodilatadora do extrato também não depende da produção de óxido nítrico, mas da ativação da via PI3K (FERREIRA *et al.*, 2007b).

### **Ação antimicrobiana**

A ação antimicrobiana do látex da mangabeira foi avaliada pelos métodos de difusão em discos e por adição do látex, em diferentes concentrações, ao meio de cultura. Nesse ensaio, o látex não apresentou atividade contra *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp, *Neisseria meningitidis* e *Mycobacterium tuberculosis* (SANTOS *et al.*, 2007). Porém o extrato etanólico de cascas do caule deste vegetal mostrou atividade contra *Helicobacter pylori* (CIM 125µg) e *Staphylococcus aureus* (CIM 50µg) (MORAES *et al.*, 2008).

### **Ação gastroprotetora**

Estudos preliminares feitos com o extrato etanólico das cascas de *H. speciosa*, avaliaram a atividade contra úlcera gástrica, em modelo induzido por indometacina, betanecol e HCl/EtOH em camundongos. O extrato na concentração de 500mg/Kg, administrado via oral, apresentou atividade antiulcerogênica significativa, sem alterar a acidez gástrica dos animais, quando comparados aos controles tratados com cimetidina e lansoprazol (ANDRADES-MIRANDA *et al.*, 2002).

Em um trabalho semelhante com o extrato etanólico das cascas dessa espécie, o efeito gastroprotetor foi evidenciado por alterações do suco gástrico (diminuição da acidez e aumento do pH) e ação antissecretora. O estímulo da liberação de muco e a cicatrização de úlceras gástricas, também foram observados e não houve efeitos tóxicos provenientes da ingestão do extrato nas doses avaliadas (250, 500 ou 1000 mg/kg). Essas ações estariam relacionadas à presença de ácidos fenólicos (que inibem diretamente a bomba de prótons) e proantocianidinas (antioxidantes e captadores de radicais livres), previamente identificados nessa planta (MORAES *et al.*, 2008).

### **Outras ações**

As atividades antiinflamatória e quimiopreventiva foram avaliadas e o extrato etanólico bruto das folhas de *H. speciosa* e a fração metanólica foram ativos na quimioprevenção, em ensaio de inibição de NF-kB induzido por TPA em células HepG2-Luc,

e no ensaio de inibição da enzima ciclooxigenase-2, que avalia a ação antiinflamatória (ENDRINGER *et al.*, 2006 a;b).

A administração do látex de *H. speciosa* (5; 10; 25; 50%) em camundongos, diariamente durante 15 dias, promoveu redução significativa do peso médio corporal quando comparado ao controle (VRATIMOS; BRANDÃO; SILVA, 2006).

## **RELEVÂNCIA E OBJETIVOS**

Considerando a importância da espécie *Hancornia speciosa* para as populações do Cerrado tanto no uso medicinal como na exploração extrativista de seus frutos e que pouco se sabe sobre seus constituintes químicos e das atividades biológicas destes, os seguintes objetivos são propostos:

### **Objetivo Geral**

Determinar a composição química de extratos das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae.

### **Objetivos Específicos**

Realizar o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Hancornia speciosa*.

Avaliar as possíveis atividades biológicas apresentadas pelos extratos brutos hexânico e etanólico e frações destes.

## **CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

## 2.1 - MÉTODOS GERAIS

### 2.1.1 - Tratamento com carvão ativado

A amostra foi dissolvida com solvente apropriado. À solução obtida foi adicionada pequena quantidade de carvão ativo. A mistura foi aquecida sob agitação constante até ebulição e cuidadosamente filtrada, a quente, em papel de filtro. Para avaliar se, além dos pigmentos, outros compostos não foram adsorvidos, o processo foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), usando vários sistemas de eluição, em ordem crescente de polaridade, e diferentes reveladores.

### 2.1.2- Cromatografia em camada delgada (CCD)

#### 2.1.2.1- Fase Estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica) ativadas a 105 °C.
- Placas de sílica gel 60G (Merck) preparadas em suporte de vidro, com 0,50 mm de espessura (preparativa) ativadas a 105 °C.
- Placas de sílica gel 0,2 mm Kieselgel 60 ALUGRAM SIL G. (MACHEREY-NAGEL).

#### 2.1.2.2. - Eluentes (FM):

FM1: Hexano

FM2: Hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1)

FM3: Hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8:2)

FM4: Hexano:AcOEt (9:1)

FM5: Hexano:AcOEt (8:2)

FM6: MeOH

FM7: CHCl<sub>3</sub> (64):MeOH (40):H<sub>2</sub>O(4)

FM8: AcOEt:MeOH (1:1)

FM9: AcOEt(100):CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(11): CH<sub>3</sub>COOH(11):H<sub>2</sub>O(16)

FM10: C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>:AcOEt (8:2)



**2.1.2.3 – Reveladores (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984)****R1 - Solução ácida de anisaldeído**

Reagente para detecção de esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos, micotoxinas.

**Solução A:** solução de anisaldeído em ácido acético 2%

**Solução B:** solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%

A cromatoplaca foi borrifada com a solução A, em seguida, com a solução B e foi então aquecida a temperatura aproximada de 100°C. Revelador geral.

**R2 – Reagente Dragendorff**

Reagente para detecção de alcalóides e peptídeos, pelo surgimento de mancha amarelo-alaranjada, imediatamente após a borrifação.

**Solução A:** nitrato básico de bismuto (1,7 g) foi dissolvido em 100 mL solução de ácido acético:água (1:4)

**Solução B:** solução aquosa de iodeto de potássio 40%

A cromatoplaca foi borrifada com a solução, previamente preparada, composta de 5,0 mL de A; 5,0 mL de B; 20 mL de ácido acético e 70,0 mL de água.

**R3 – Reagente NP/PEG**

Reagente para detecção de flavonóides e outras substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência

**Solução A:** solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2%

**Solução B:** solução etanólica de polietilenoglicol – 400 (PEG 400) 5 %

A cromatoplaca foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B e observada sob luz ultravioleta.

**R4 – Reagente de Verde de Bromocresol**

Reagente para detecção de ácidos carboxílicos pelo surgimento de cor amarela sobre fundo azul, imediatamente após a borrifação.

O verde de bromocresol (0,1 g) foi dissolvido em 100 mL de MeOH e alcalinizado com solução NaOH 1 M até que a solução apresentasse cor azul intensa.

**R5 – Reagente Komarovisky**

Reagente para detecção de glicosídeos (saponinas) ocorre pelo aparecimento de manchas azuis, alaranjadas ou marrons.

**Solução A:** Solução metanólica de 4-hidroxibenzaldeído 2%.

**Solução B:** Solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%.

Imediatamente antes da utilização, o reagente foi preparado pela mistura das soluções A e B na proporção 3:2. A cromatoplaça foi borrifada com o reagente e aquecida a temperatura aproximada de 100 °C.

**R6 - Radiação ultravioleta**

O cromatograma foi observado sob luz ultravioleta ( $\lambda = 365$  nm). Detecção de substâncias contendo grupos cromóforos.

**2.1.3 – Cromatografia em coluna (CC)****2.1.3.1 – Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck**

A fase estacionária [Sílica gel 60 A (70-230 mesh), marca Merck] foi suspendida com o solvente utilizado inicialmente como fase móvel (usualmente, hexano) e empacotada em coluna de vidro até total decantação da sílica. A amostra foi incorporada em quantidade suficiente de sílica e solvente e então foi aplicada no topo da coluna, sendo posteriormente procedida a eluição, com gradiente em ordem crescente de polaridade.

**2.1.3.2 – Exclusão em gel Sephadex**

O sephadex (Sephadex™ LH-20 Amersham Biosciences) foi suspenso no solvente utilizado como fase móvel, mantido em repouso por 24 horas e empacotado em coluna de vidro até total decantação do gel. A coluna foi mantida sob repouso por 24 horas. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente do eluente e então aplicada no topo da coluna que foi eluída até completo esgotamento.

**2.1.4 - Análises Espectrométricas****2.1.4.1 – Espectrometria no Infravermelho (IV)**

Os espectros foram obtidos no espectrofotômetro Bomem Hartmann & Braun MB – 100 (Alemanha), com valores expressos em cm<sup>-1</sup>.

As amostras foram analisadas em pastilhas preparadas com brometo de potássio (KBr) (Instituto de Química – IQ – UnB).

#### 2.1.4.2 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados no espectrômetro Varian Mercury Plus (300 MHz, 7,04T, E.U.A), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{MeOD}_4$ , com TMS (tetrametilsilano) como referência interna (Instituto de Química – IQ – UnB).

#### 2.1.5 – Ensaio biológicos

##### 2.1.5.1 – Atividade Citotóxica

###### 2.1.5.1.1 - Toxicidade a larvas de *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982).

- **Preparação da solução salina:** Uma solução de sal marinho sintético (36 g/L) foi preparada e ajustada, com uma solução 0,1 M de NaOH, até pH 8-9. Essa solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *A. salina* e para o preparo das diluições dos extratos hexânico e etanólico de *Hancornia speciosa*.

- **Eclosão dos ovos:** Os ovos de *A. salina* foram postos em solução salina aquosa com aeração constante e expostos à luz diurna por 48 horas para eclodir.

- **Preparação das diluições seriadas:** Os extratos (20 mg) foram solubilizados em 0,2 mL de DMSO e o volume foi completado para 20 mL com a solução salina (1000 ppm). Desta solução foram preparadas diluições (500, 250 e 125 ppm) em três repetições. Em cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*.

- **Controle positivo:** Uma amostra de 2,00 mg de dicromato de potássio foi submetida a condições da amostra a ser analisada.

- **Controle negativo:** Tubos contendo 0,2 mL de DMSO e 10 larvas de *A. salina*, nas mesmas condições da amostra a ser analisada.

- **Bioensaio:** Os tubos foram mantidos sob iluminação e, após 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas. O cálculo da  $\text{DL}_{50}$  foi realizado utilizando o programa PROBITOS<sup>®</sup> (MEYER *et al.*, 1982).

### 2.1.5.1.2 – Avaliação da Atividade Alelopática

- **Germinação** (FERREIRA; BORGHETTI, 2004)

#### - Preparo das Sementes

Sementes selecionadas de alface (*Lactuca sativa*) previamente tratadas com hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e lavadas com água destilada, foram colocadas para germinar em placas de petri de 9 cm de diâmetro. As placas foram previamente esterilizadas em autoclave, revestidas com papel de filtro Wathman nº1 umedecido com 10 mL das soluções a serem testadas para completa evaporação do solvente.

#### Preparo das amostras e controles

Os extratos hexânico e etanólico das folhas de *H. speciosa*, nas concentrações de 1000 ppm, 2000 ppm e 4000 ppm foram solubilizadas em solvente adequado (diclorometano ou etanol) e 10 mL das soluções obtidas foram utilizados para umedecer o papel que revestiu cada placa de petri. Após a evaporação do solvente 10 mL de água destilada foram adicionados a cada placa e 25 sementes foram distribuídas sobre o papel de forma aleatória. O conjunto foi mantido sob condições de luminosidade e temperatura ambiente ( $\pm 27^\circ\text{C}$ ). Para cada tratamento foram feitas 3 repetições totalizando 75 sementes por grupo.

Nos grupos controle, o papel com o qual a placa foi revestida foi umedecido com o solvente utilizado para o preparo das soluções (diclorometano ou etanol), sendo o conjunto submetido ao mesmo protocolo descrito para os grupos das amostras.

A ocorrência de germinação das sementes foi monitorada nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O critério utilizado para a germinação foi a emergência da radícula ( $\pm 2$  mm) seguida de curvamento geotrópico da raiz. As sementes germinadas eram excluídas do experimento a cada intervalo de observação.

Para a análise dos testes foram usadas as variáveis: índice de velocidade de germinação (IVG), com contagens diárias até o quarto dia, e germinação (G%). Os valores das variáveis germinação (G%) e índice de velocidade de germinação (IVG) foram obtidos por meio das seguintes expressões, descritas por Ferreira e Borghetti (2004):

$$G = N/A \times 100$$

onde:

$G$  = percentual de germinação;

$N$  = número total de sementes germinadas;

$A$  = número total de sementes colocadas para germinar;

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

onde:

*IVG* = índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2, \dots, G_n$  = número de sementes germinadas na primeira, segunda até enésima observação

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias após a sementeira.

### - Crescimento

Foram utilizadas sementes de *L. sativa*, previamente germinadas a temperatura média de 27 °C por até 40 horas. Dez sementes pré germinadas foram distribuídas em placa de petri de 9 cm de diâmetro. Às placas, previamente preparadas como descrito para o teste de germinação, foram adicionados 10 mL das soluções a serem testadas para evaporação completa dos solventes.

Os extratos hexânico e etanólico das folhas de *H. speciosa*, nas concentrações de 1000 ppm, 2000 ppm e 4000 ppm foram preparadas como descrito para o teste de germinação. O grupo controle recebeu apenas os solventes utilizados na solubilização das amostras e água destilada. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições, totalizando 30 plântulas para cada grupo.

As plântulas cresceram por 7 dias sujeitas às condições de temperatura (27 °C) e luminosidade ambiente (noite/dia). No sétimo dia foram medidos o epicótilo e o hipocótilo com auxílio de paquímetro. Aspectos morfológicos, tais como presença de raízes secundárias, pêlos radiculares e necroses também foram verificados.

### - Análise estatística

Foram calculados a germinabilidade (G%), e o índice de velocidade de germinação (IVG), segundo Labouriau (1983). Os dados, tanto de germinação quanto de crescimento, foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey a 5%. Foi considerado estatisticamente diferente quando  $p < 0,05$ .

#### 2.1.5.2 - Atividade antifúngica

##### Método de Difusão em Ágar (SMANIA *et al.*, 1995)

Este experimento foi realizado no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), pela equipe da Prof<sup>a</sup>. MSc. Ana Lúcia Alves de Arruda.

**Microorganismos:** *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus* sp CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium* sp CCT 2147, *Epidermophyton floccosum* URM 4799, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Candida parapsilosis* CCT 3438 e *Aspergillus fumigatus* CCT 1277.

**Inóculo inicial:** Foram preparadas suspensões dos organismos supracitados, de forma a atingir um número aproximado de células equivalentes a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, utilizando uma Câmara de Neubauer para contagem das células.

**Meio de Cultura:** Ágar Sabouraud (VETEC), preparado de acordo com as instruções do fabricante.

**Bioensaio:** Discos de papel de filtro de seis milímetros de diâmetro, previamente autoclavados, foram impregnados com 20 µL de uma solução da amostra, preparada em solvente adequado até completa solubilização (hexano ou etanol), para obtenção de uma concentração final de 100 mg/mL. Os discos impregnados foram inseridos no meio de cultura contendo suspensões dos microrganismos supra-citados.

As placas foram incubadas a 37 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 horas (para as bactérias) e 28 °C por 48 horas (para leveduras). Depois da inoculação, o diâmetro da zona de inibição ao redor do disco, foi medida utilizando halômetro. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

**Controles:**

-positivo: discos comerciais de nistatina e anfotericina B (ambos da marca CECOM).

-negativo: solvente.

A atividade antifúngica dos extratos e dos controles foi avaliada a partir do tamanho do halo de inibição formado, em comparação com os controles positivos.

### 2.1.5.3 – Atividade Antioxidante

#### 2.1.5.3.1 - Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999)

A avaliação da capacidade antioxidante abordada neste estudo foi fundamentada na metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) com ligeira modificação.

A capacidade redutora do complexo de fosfomolibdênio foi avaliada em comparação com a quercetina, ácido ascórbico e BHT, compostos de atividade antioxidante conhecida. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601) (Laboratório de

Farmacologia Molecular da Faculdade de Saúde – UnB) onde foram registradas as absorvâncias de todas as substâncias analisadas a 695 nm.

#### - Reagente

O reagente foi preparado pela mistura de 0,025 L de solução aquosa de fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 28 mM), 0,025 L de solução aquosa de molibdato de amônio tetra hidratado [ $(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM,] e 0,025 L de solução aquosa de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,6 M).

#### - Substâncias de referência:

Ácido ascórbico (Dinâmica): para a construção da curva-padrão, alíquotas da solução estoque foram adicionadas de etanol, para fornecer soluções diluídas nas concentrações: 0,050 mg/mL, 0,100 mg/mL, 0,200 mg/mL, 0,400 mg/mL, 0,600 mg/mL, 0,800 mg/mL e 1,00 mg/mL.

2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (Synth): para a construção da curva-padrão, alíquotas da solução-estoque (1 mg/mL) foram adicionadas de EtOH, para fornecer soluções diluídas nas concentrações: 0,050 mg/mL, 0,100 mg/mL, 0,200 mg/mL, 0,400 mg/mL, 0,600 mg/mL, 0,800 mg/mL e 1,000mg/mL.

Quercetina (amostra gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Unicamp): foi utilizada como substância de referência. Para a construção da curva-padrão foi preparada uma solução estoque de quercetina (1 mg/mL) em etanol. A partir dessa solução foram preparadas diluições (0,9 mg/mL; 0,8 mg/mL; 0,7 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL), em EtOH.

#### - Obtenção das curvas de calibração

Em tubos do tipo eppendorf (Axigen) 0,1 mL da solução estoque e das diluições foram adicionados de 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após o período determinado, as amostras foram deixadas a arrefecer até a temperatura ambiente.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1 cm) e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu, previamente zerado com uma mistura de 1 mL do reagente e 0,1 mL de etanol.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Prisma e curvas-padrão foram construídas pelo método de regressão linear.

**Construção da curva-padrão do ácido ascórbico**

A TABELA 2.1 apresenta a concentração das soluções de ácido ascórbico utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 2.1), que apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

**Construção da curva-padrão do BHT**

A TABELA 2.2 apresenta a concentração das soluções de BHT utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 2.2), que apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

**Construção da curva-padrão da quercetina**

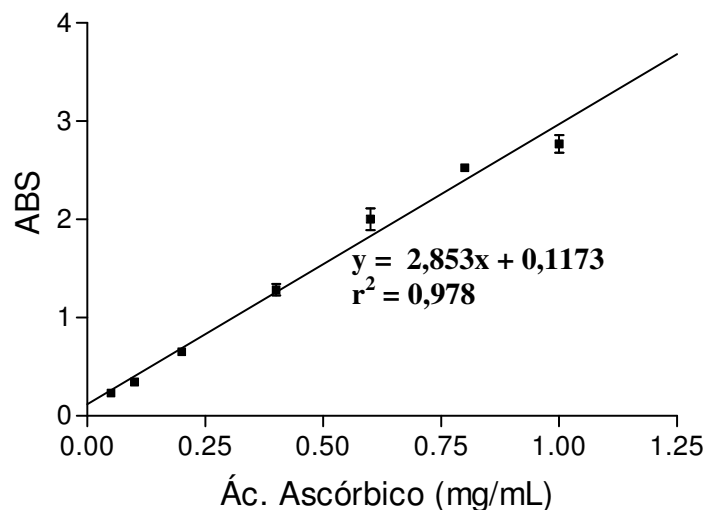
A TABELA 2.3 apresenta a concentração das soluções de quercetina utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 2.3), que apresentou boa linearidade, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) igual a 0,996.

**TABELA 2.1 - Valores das concentrações, média das absorvâncias e desvio padrão do ácido ascórbico**

Concentrações em mg/mL	Média das absorvâncias	Desvio padrão
0,050	0,230	0,026
0,100	0,347	0,032
0,200	0,650	0,036
0,400	1,283	0,098
0,600	2,000	0,190
0,800	2,527	0,060
1,000	2,770	0,155



### Curva-padrão do Ác. Ascórbico

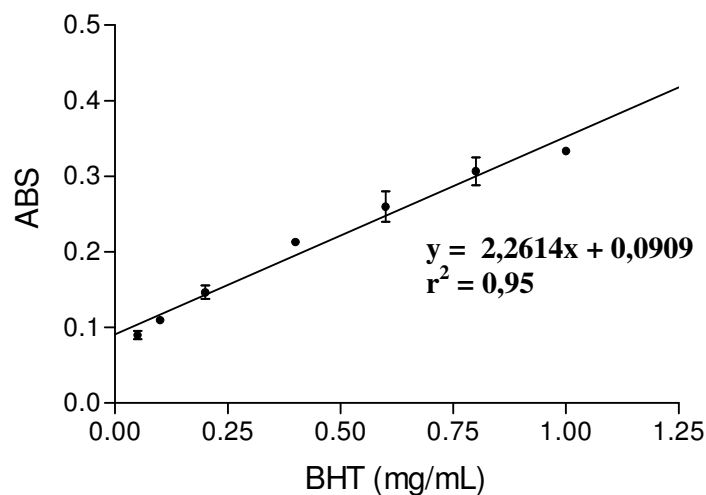


**FIGURA 2.1 - Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorbâncias de concentrações crescentes do ac. ascórbico. Cada ponto é representado pela média  $\pm$  desvio-padrão das absorbâncias para cada concentração em triplicata**

**TABELA 2.2 - Valores das concentrações, média das absorbâncias e desvio padrão do BHT**

Concentrações em mg/mL	Média das absorbâncias	Desvio padrão
0,050	0,090	0,010
0,100	0,110	0,009
0,200	0,146	0,015
0,400	0,213	0,005
0,600	0,260	0,034
0,800	0,306	0,032
1,000	0,333	0,005

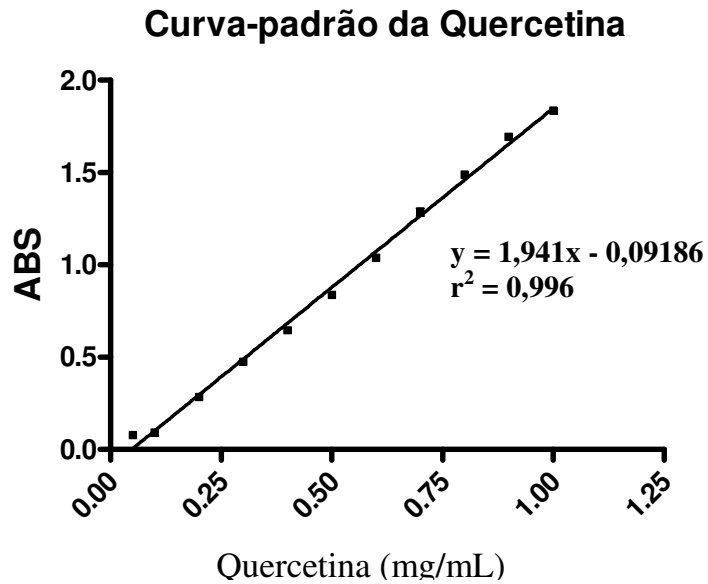
## Curva-padrão do BHT



**FIGURA 2.2 - Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorvâncias de concentrações crescentes do BHT. Cada ponto é representado pela média  $\pm$  desvio-padrão das absorvâncias para cada concentração em triplicata**

**TABELA 2.3 - Valores das concentrações, média das absorvâncias e desvio padrão da quercetina**

Concentrações Em mg/mL	Média das absorvâncias	Desvio padrão
0.05	0,080	0,0065
0.1	0,092	0,0015
0.2	0,284	0,0015
0.3	0,476	0,0032
0.4	0,646	0,0046
0.5	0,840	0,0115
0.6	1,038	0,0015
0.7	1,286	0,0344
0.8	1,490	0,0017
0.9	1,694	0,0275
1.0	1,837	0,0218



**FIGURA 2.3 - Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorbâncias de concentrações crescentes de quercetina. Cada ponto é representado pela média  $\pm$  desvio-padrão das absorbâncias para cada concentração em triplicata**

#### **.- Teste de atividade antioxidante**

Foi preparada uma solução etanólica das amostras em análise (extratos brutos e frações) na concentração de 1 mg/mL da qual uma alíquota de 0,1 mL foi utilizada no mesmo protocolo da substância de referência.

Para calcular a equivalência dos compostos analisados com relação à quercetina foi utilizada a equação da reta obtida da curva-padrão construída para essa substância. A absorbância lida no comprimento de onda de 695 nm foi aplicada à equação da reta e, desta forma, foi obtida a concentração relativa aos controles. A equivalência foi calculada dividindo a concentração obtida para o padrão pela concentração usada para cada composto analisado. O resultado é dado em equivalentes de quercetina, BHT e ácido ascórbico.

**2.1.5.3.2 – Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio (RUCH; CHENG; KLAINING, 1989)**

Este experimento foi realizado no laboratório de Análise Instrumental e Laboratório de Testes Biológicos da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), em Campo Grande – MS, pela equipe da Prof<sup>a</sup>. MSc. Ana Lúcia Alves de Arruda.

O Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio baseia-se na investigação da habilidade das amostras testadas seqüestrarem os radicais livres de peróxido de hidrogênio. Uma elevada habilidade em seqüestrar o peróxido de hidrogênio está relacionada à presença de antioxidantes, nas amostras capazes de reagir com radicais livres (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

**- Reagentes e soluções**

**Reagente:** Solução de peróxido de hidrogênio em que foi preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (40 mM).

**Tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4:** Em um balão volumétrico foram vertidos 50 mL da solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M e 2,8 mL da solução de NaOH 0,2 M e o volume foi completado para 100 mL. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl ou NaOH.

As amostras foram solubilizadas em MeOH, de forma a serem obtidas diferentes diluições (250, 125, 50, 25, 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ). A cada amostra foram adicionados 3,4 mL de tampão fosfato, preparado conforme descrito acima e 0,6 mL de solução de peróxido de hidrogênio 40 mM.

Foi utilizado como padrão ácido ascórbico nas mesmas condições das amostras. As amostras foram incubadas por 10 minutos e foi feita a leitura em espectrofotômetro Aqua Mate UV/Visível (Thermo Spectronic AQA095109) a 230 nm.

## 2. 2 – PARTE EXPERIMENTAL

### 2.2.1 – Descrição botânica

**Família:** Apocynaceae

**Gênero:** *Hancornia*

**Espécie:** *Hancornia speciosa*

**Sinonímia Popular:** mangaba



**FIGURA 2.4** - Planta adulta (A), sumidades florais (B), frutos (C), sementes (D) de *Hancornia speciosa*. Fonte: Profa. Dra. S. M. Gomes (A); I. M. C. Barros (B)C. Melo - EMBRAPA (C e D);

*Hancornia speciosa* Gomes var. *gardneri* (A.D.C.) Müll. Arg. (Apocynaceae) é árvore hermafrodita com exsudação leitosa abundante medindo até 7 m de altura (MONACHINO, 1945; ALMEIDA *et al*, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).

Apresenta tronco áspero, reticulado com até 15 cm de diâmetro e copa com ramos terminais lisos e avermelhados (ALMEIDA *et al*, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).

As folhas são simples, opostas e pecioladas com margens inteiras; ápice abruptamente acuminado ou obtuso e base obtusa ou arredondada. As flores são brancas medindo de 3 a 4,5 cm de comprimento com 5 pétalas unidas em longo tubo. Podem ocorrer em conjunto de até sete flores dispostas em cimeira terminal (ALMEIDA *et al*, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).

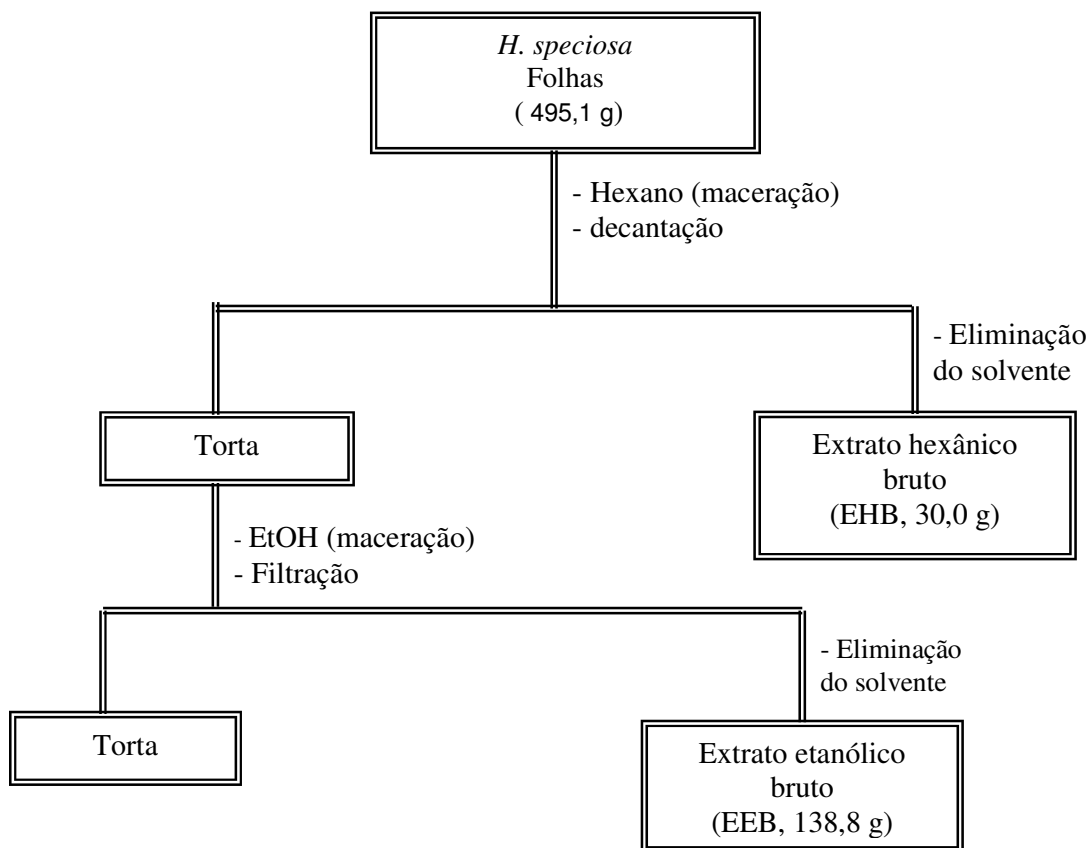
Os frutos são elipsóides ou globosos, carnosos e de cor amarela ou esverdeada, com ou sem pigmentação vermelha quando maduros. Possuem cerca de 7 cm de diâmetro, polpa viscosa esbranquiçada e até 35 sementes para cada fruto (ALMEIDA *et al*, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).

### **2.2.2 – Obtenção do material botânico**

As folhas de *Hancornia speciosa* foram coletadas na Fazenda Campininha, Bairro Martinho Prado – Mogi Guaçu, São Paulo, em Novembro de 2003. O material vegetal foi coletado e identificado pela Profa. Sueli Maria Gomes. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) sob o número 142204. O material foi secado à temperatura ambiente e pulverizado em moinho de facas.

### **2.2.3– Obtenção dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB)**

O material botânico pulverizado (495 g) foi submetido à extração por maceração a frio, por quatro vezes, perdurando sete dias cada, utilizando primeiramente hexano como solvente. Após decantação, as soluções extrativas foram concentradas à secura, sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Com o material botânico resultante, o mesmo processo foi realizado, utilizando EtOH 95% como solvente (FLUXOGRAMA 2.1). O rendimento do extrato hexânico (EHB) foi de 6% (30 g) e do extrato etanólico (EEB) foi de 28% (138,8 g).

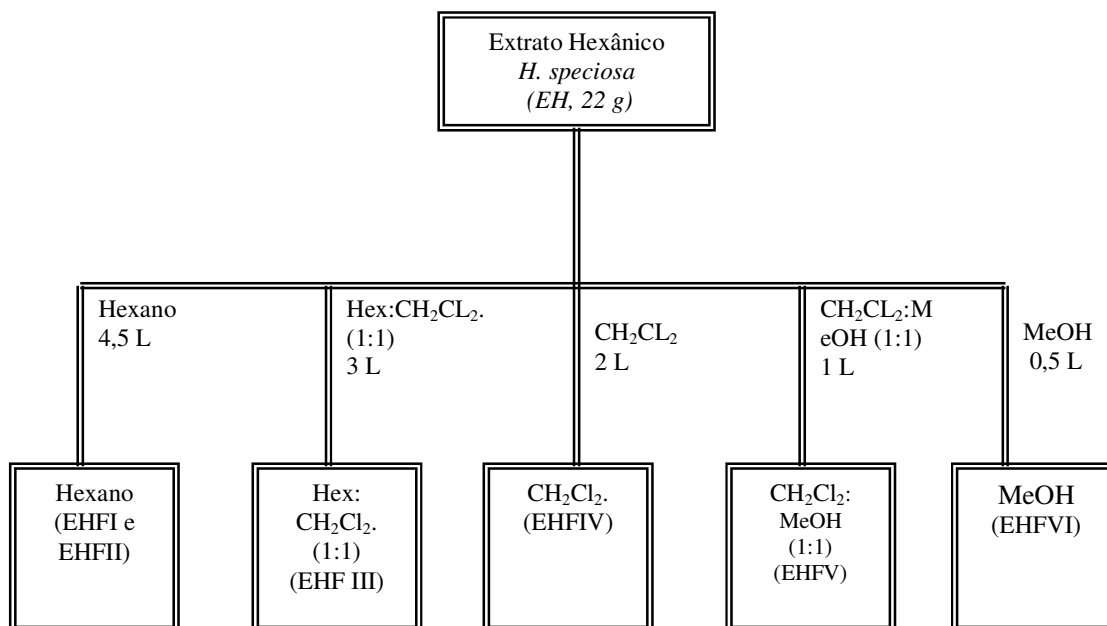


**FLUXOGRAMA 2.1 - Obtenção do extrato hexânico (EHB) e etanólico (EEB) de folhas de *Hancornia speciosa***

#### 2.2.4 - Isolamento e Identificação de constituintes químicos das folhas de *Hancornia speciosa*

##### 2.2.4.1 – Fitoquímica do extrato hexânico de *Hancornia speciosa* (EHB)

Parte do extrato hexânico (EHB, 3,0 g) foi submetida à filtração em sílica gel 60 utilizando um filtro sinterizado (diâmetro = 7,5 cm e altura da sílica = 4,0 cm). Foram obtidas seis frações, conforme o FLUXOGRAMA 2.1. Os solventes utilizados no procedimento foram recuperados em rotaevaporador, e reutilizados no processo de filtração do extrato hexânico, totalizando o volume especificado para cada solvente.



**FLUXOGRAMA 2.2 - Fracionamento do extrato hexânico bruto (EHB) das folhas e *Hancornia speciosa***

**TABELA 2.4 - Frações obtidas por filtração em sílica gel do Extrato hexânico (EHB) de folhas de *Hancornia speciosa***

Frações EHB	massa (g)	Rendimento (%)
EHFI	3,2	14,7
EHFII	0,8	3,6
EHFIII	6,7	30,8
EHFIV	1,9	8,6
EHFV	4,3	19,5
EHFVI	0,3	1,5

#### 2.2.4.1.1 – Estudo farmacognóstico do extrato hexânico bruto (EHB) e suas frações

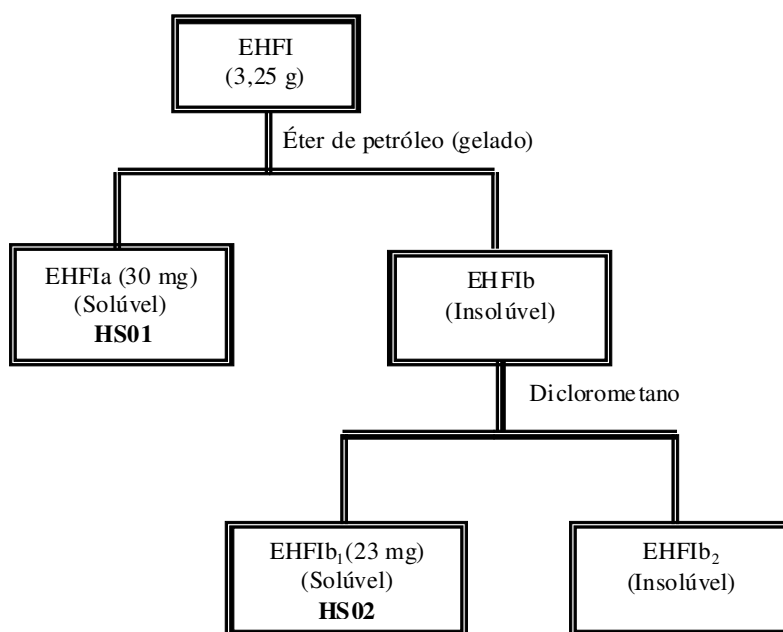
O EHB e suas frações foram analisados quanto à presença de terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (principalmente flavonóides), saponinas e ácidos graxos de cadeia longa, utilizando R1, R2, R3, R4, R5 e R6 respectivamente, como reveladores. Os resultados estão apresentados na TABELA 3.1.



**2.2.4.1.2 - Elaboração da fração hexânica EHF1 (FLUXOGRAMA 2.2)**

A fração EHF1, após análise por CCD, revelou-se como uma mistura pouco complexa a qual foi submetida a um processo de lavagem com éter de petróleo (gelado) e, posteriormente, com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (FLUXOGRAMA 2.3), na tentativa de separar os compostos por polaridade. Na primeira etapa, na qual foi utilizado éter de petróleo gelado, parte da amostra foi solubilizada (EHF1a) e o restante permaneceu insolúvel. A fração insolúvel resultante da primeira lavagem (EHF1b) foi então submetida a uma segunda lavagem com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ocorrendo novamente a solubilização de parte da amostra (EHF1b<sub>1</sub>) e outra permanecendo insolúvel (EHF1b<sub>2</sub>).

EHF1a (30 mg) e EHF1b<sub>1</sub> (23 mg) apresentaram-se como uma cera amarelada, solúveis em  $\text{CHCl}_3$ . As análises e cromatográficas espectrométricas subsequentes mostraram que ambas as frações apresentam características semelhantes. Dessa forma, foram novamente reunidas e denominadas **HS01**.



**FLUXOGRAMA 2.3 - Elaboração da fração EHF1 do extrato hexânico das folhas de *Hancornia speciosa***

**2.2.4.1.3 - Elaboração da fração EHFIII - Hex: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) (FLUXOGRAMA 2.2)**

Parte da fração EHFIII (3 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 27,0 cm; diâmetro= 4,2 cm), utilizando Hexano→CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>→MeOH como gradiente, e forneceu um total de 904 frações de 50,0 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 37 grupos. Os grupos e frações descritos abaixo foram trabalhados; os demais apresentaram uma composição complexa quando analisados por CCD não sendo possível purificá-los e analisá-los.

**Grupo 04 (26,5 mg):** Esse grupo corresponde às frações 56-63, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) e apresentou-se como um sólido esbranquiçado, solúvel em CHCl<sub>3</sub> denominado **HS02**. Quando avaliado por CCD, apresentou uma mancha azulada, (FM2, R1).

**Grupo 07 (114,0 mg):** Esse grupo corresponde às frações 79-95, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1). Após várias lavagens com a mesma mistura com a qual foi eluído, apresentou-se como um sólido de cor branco-amarelada, separado por decantação, solúvel em CHCl<sub>3</sub>, denominado de **HS06** (38,8 mg). **HS06** mostrou relativa pureza quando avaliado por CCD (FM2, R1), apresentando-se como uma mancha azul-violácea.

**Grupo 09 (183,6 mg):** Esse grupo corresponde às frações 126-144, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1). Após ser submetido ao mesmo tratamento que o **Grupo 07**, apresentou-se como um sólido branco-amarelado, solúvel em CHCl<sub>3</sub> e denominado **HS07** (47,9 mg). Sob análise por CCD (FM2, R1), apresentou-se como uma mancha azul-violácea.

**Grupo 17 (22,8 mg):** Esse grupo corresponde às frações 309-312, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:2). apresentou-se como sólido branco, solúvel em CHCl<sub>3</sub> e foi denominado de **HS03**. Em CCD (FM3, R1), apresentou-se como uma mistura simples composta, majoritariamente, de um composto que se apresenta como uma mancha violácea.

**Grupos 18 e 20 (431,11 mg):** Esse grupos correspondem às frações 313-347 e 393-404, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:2). Parte deste material (60,3 mg) foi purificada por cromatografia em camada preparativa (CCP) (FM3, R1). A substância isolada apresentou-se como sólido branco solúvel em CHCl<sub>3</sub> (50 mg).denominado **HS04**. Quando avaliada por CCD (FM3, R1), apresentou-se na forma de uma mancha violácea.

**Grupo 22 (382,2 mg):** Esse grupo corresponde às frações 424-474, eluídas com mistura Hex:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:2). Apresentou-se como um sólido branco que ao ser analisado por CCD (FM2, R1) mostrou a presença de uma substância majoritária que se apresentou, nas

cromatoplasmas, como uma mancha de cor violeta. Parte desse material (194,9 mg) foi submetida à CCP. A substância isolada apresentou-se como sólido branco, solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e foi denominada de **HS09** (57,3 mg).

#### 2.2.4.1.4 – Elaboração da fração EHFIV – $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (FLUXOGRAMA 2.2)

Parte da fração EHFIV (1,9 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 21,5 cm; diâmetro= 4,20 cm), utilizando o gradiente: Hexano→AcOEt→MeOH, fornecendo um total de 485 frações de 50,0 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 24 grupos. Os grupos e frações apresentados abaixo são aqueles que foram submetidos a técnicas de purificação. Os demais apresentaram uma composição complexa não sendo possível purificá-los e analisá-los.

**Grupo 40 (262,9 mg):** Esse grupo corresponde às frações 32-35, eluídas com mistura Hexano:AcOEt (9:1) e apresentou-se como um sólido esverdeado que foi purificado por lavagem exaustiva com a mesma mistura de solventes utilizada em sua eluição. Após essa elaboração, forneceu um precipitado branco (39,0 mg) de aspecto granuloso que foi separado por decantação. O sólido resultante foi submetido à CCD (FM10; R1) e constatada a presença de uma substância majoritária de coloração violácea posteriormente purificada por CCP (FM10 e R1). A substância isolada apresentou-se como sólido branco (10,4 mg), solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . As análises cromatográficas e espectrométricas subsequentes mostraram que a substância obtida apresentava características semelhantes a **HS04**, resultante dos **grupos 18 e 20** da fração EHFIII. Dessa forma, foram novamente reunidas e denominadas **HS04**.

**Grupo 44 (135,2 mg):** Esse grupo corresponde às frações 43-47, eluídas com mistura Hexano:AcOEt (9:1). Apresentou-se como um sólido esverdeado rico em clorofila que foi purificado por lavagem com mistura Hexano:AcOEt (8:2), resultando em um sólido branco amorfo separado por decantação, solúvel em  $\text{CHCl}_3$  e denominado **HS10** (10,8 mg).

#### 2.2.4.1.5 – Elaboração da fração EHFV – $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (1:1) (FLUXOGRAMA 2.2)

Parte da fração EHFV (2,65 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 27,0 cm; diâmetro= 4,20 cm), utilizando o gradiente: Hexano→AcOEt→MeOH, fornecendo um total de 596 frações de 50,0 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 22 grupos. Os grupos e frações

destacados e descritos abaixo são aqueles que foram trabalhados posteriormente; os demais apresentaram uma composição complexa não sendo possível purificá-los e analisá-los.

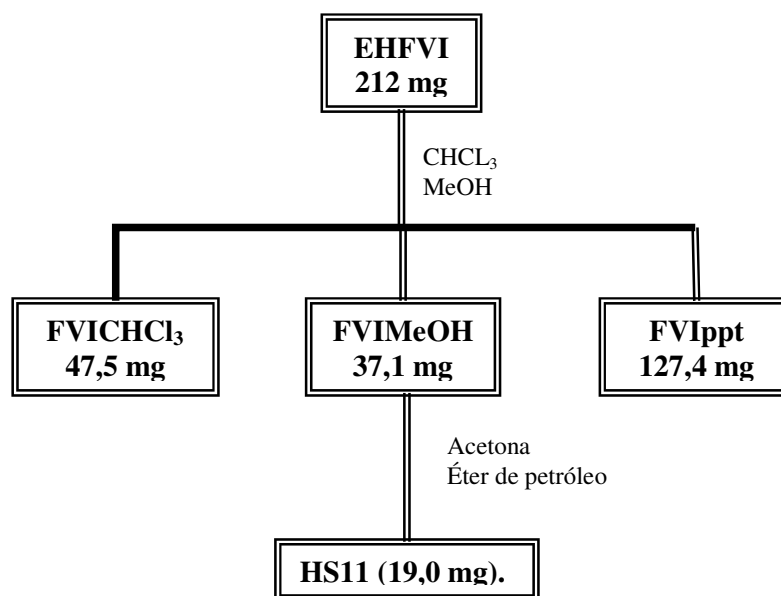
**Grupo 65 (191,1 mg):** Esse grupo corresponde às frações 44-59, eluídas com mistura Hex:AcOEt (9:2). Apresentou-se como um sólido branco-amarelado que foi purificado por lavagem exaustiva com acetona, fornecendo um precipitado branco de aspecto granuloso, separado por decantação e solúvel em  $\text{CHCl}_3$ . Sob análise por CCD (FM5; R1) apresentou-se como uma mancha violácea, e foi denominado **HS08** (22,8 mg).

**Grupo 66 (171,1 mg):** Esse grupo corresponde às frações 60-75, eluídas com mistura Hex:AcOEt (9:2). O material apresentou-se como um sólido rico em clorofila e foi purificado por sucessivas lavagens com mistura hexano:acetato de etila (8:2), resultando em um sólido branco de aspecto granuloso, separado por decantação e solúvel em  $\text{CHCl}_3$  denominado **HS05** (10,4 mg). Em análise por CCD (FM5; R1) apresentou uma mancha de cor rosa intenso.

#### 2.2.4.1.6 – Elaboração da fração EHFVI - MeOH (FLUXOGRAMA 2.2)

Parte desse material (212 mg) foi submetida à extração com  $\text{CHCl}_3$ , seguido de MeOH gerando três novas frações: EHFVI eluída com  $\text{CHCl}_3$  (47,5 mg); EHFVI eluída com MeOH (37,1 mg) e um sólido (127,4mg), insolúvel nos dois solventes utilizados (FVIppt) como mostra o FLUXOGRAMA 2.4.

A fração resultante da lavagem com MeOH (EHFVIMeOH) foi purificada por sucessivas lavagens com acetona e éter de petróleo. A parte insolúvel nos dois solventes utilizados apresentou cor amarela e consistência semissólida, pastosa. Esse material (19,0 mg), denominado **HS11**, foi analisado por CCD (FM7, R3) e sob luz UV, apresentou fluorescência amarela.

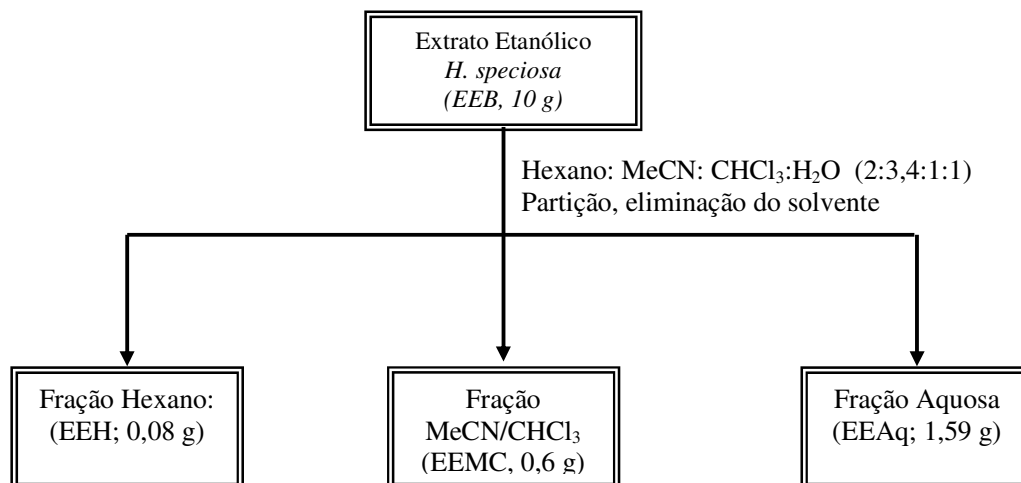


**FLUXOGRAMA 2.4 - Elaboração da fração EHFVI – MeOH, do extrato hexânico das folhas de *Hancornia speciosa***

#### 2.2.4.2. Fitoquímica do extrato etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa*

##### 2.2.4.2.1. Partição trifásica do extrato etanólico (EEB) de folhas de *Hancornia speciosa* (DUARTE *et al.*, 2000)

Parte do extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* (EEB, 10g) foi submetida à partição líquido-líquido trifásica, utilizando a mistura hexano:  $\text{CHCl}_3$ :MeCN:H<sub>2</sub>O (2:1:3,4:1) como solvente (DUARTE *et al.*, 2000) Após a partição, foram obtidas três frações: hexânica (EEH; 0,08g, 0,8%),  $\text{CHCl}_3$ :MeCN (EEMC; 0,6g, 6%) e aquosa (EEAq; 1,59g, 15%), conforme mostrado no FLUXOGRAMA 2.5.



**FLUXOGRAMA 2.5 - Partição trifásica do extrato etanólico bruto (EE) de folhas de *Hancornia speciosa***

#### 2.2.4.2.2 – Estudo farmacognóstico do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações

O EEB e as frações obtidas por partição trifásica, foram analisados quanto à presença de terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (especialmente flavonóides), cumarinas, saponinas e ácidos de cadeia longa utilizando R1, R2, R3, R4, R5 e R8 respectivamente, como reveladores. Os resultados são apresentados na TABELA 3.12.

#### 2.2.4.2.3 – Elaboração da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (EEMC) (FLUXOGRAMA 2.5)

##### - Tratamento com carvão ativado

Parte da fração EEMC (150,0 mg) diluída em MeOH, foi submetida ao tratamento com carvão ativado no intuito de diminuir o pigmento presente nesse material.

Todo o processo foi monitorado por CCD para detecção de alterações no perfil cromatográfico da amostra, por comparação das cromatoplacas, antes e depois do tratamento com carvão. Foram utilizados vários sistemas de eluição Hexano→Hexano:AcOEt (1:1)→AcOEt→MeOH, e diferentes reveladores, a fim de certificar se algum constituinte, além da clorofila (caracterizada por fluorescência vermelha), estava sendo perdido durante o procedimento.

Após o tratamento foi observada uma redução considerável nos níveis de clorofila corroborada pela diminuição significativa da fluorescência vermelha característica da presença deste pigmento, quando observado sob luz ultravioleta. O rendimento foi de 95,6 mg (63,7%) de material tratado.

#### - Cromatografia por Exclusão em gel Sephadex LH-20 (p. 50)

A fração EEMC (95,6 mg) tratada com carvão ativado foi submetida a cromatografia por exclusão em gel sephadex LH-20 (altura = 17 cm; diâmetro = 3 cm), empacotada e eluída com AcOEt:MeOH (1:1), fornecendo um total de 22 frações de 15 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião de frações em 4 grupos, como representado na TABELA 2.5.

**TABELA 2.5 - Cromatografia em Sephadex LH-20 da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (EEMC) do extrato etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa*, após tratamento com carvão ativado**

Grupo EEMC	Frações	Massa (g)	Eluente
<b>01</b>	<b>01 a 03</b>	<b>0,0705</b>	<b>AcOEt:MeOH (1:1)</b>
02	04	0,0087	
03	05	0,0024	
04	06 a 22	0,0031	

**Grupo EEMC01 (70,5 mg):** desse grupo de frações foi obtido um sólido branco amarelado (45,2 mg) que foi separado por decantação. Após análise em CCD, (FM8, R1 e R3) e após análises espectrométricas, observou-se que esse composto era semelhante às substâncias já isoladas da fração EHFIII (Grupo 20) sendo dessa forma reunidas e denominadas **HS09**.

Os outros grupos obtidos apresentaram uma composição complexa não sendo possível purificá-los e analisá-los.

#### 2.2.4.2.4 - Elaboração da fração Aquosa (EEAq) (FLUXOGRAMA 2.5)

#### - Cromatografia por Exclusão em gel Sephadex LH-20

Parte da fração EEAq (90,0 mg) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel utilizando Sephadex LH-20 (altura = 17 cm; diâmetro = 3 cm), empacotada e eluída com MeOH, fornecendo um total de 61 frações de 15 mL. As frações foram concentradas em

evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião de frações em grupos (TABELA 2.6),

**EEAq03 (51,8 mg):** apresentou-se como um sólido amarelo pastoso, solúvel em MeOH, denominado **HS11 (51,8 mg)**. Quando avaliado por CCD (FM9, R3), apresentou uma mancha amarela que se intensificava ao ser submetida à luz UV e outra mancha que emitia fluorescência verde-brilhante intensa que só era observada sob luz UV, após revelação com NP/PEG.

**TABELA 2.6 - Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração aquosa (EEAq) do extrato etanólico das folhas de *Hancornia speciosa***

EEAq	Frações	Massa (g)
01	01	0,0011
02	02	0,0030
<b>03</b>	<b>03</b>	<b>0,0518</b>
04	04	0,0176
05	05 a 07	0,0047
06	08	0,0004
07	09	0,0002
08	10	0,0009
09	11 a 61	0,0019

#### - Tentativa de purificação

Parte da fração EEAq (1,3 g) foi solubilizada em MeOH quente e deixada arrefecer à temperatura ambiente, em seguida foi submetida a filtração. O filtrado foi mantido sob refrigeração a 4 °C por 24 horas. Após esse período, foi adicionado de éter de petróleo gelado (lentamente). Durante o processo, houve formação de um precipitado sólido avermelhado que foi separado por decantação. O sobrenadante foi submetido a sucessivas lavagens com éter de petróleo gelado. Ao final, os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em rotaevaporador.

As duas frações resultantes, precipitado (0,29 g) e sobrenadante (0,95 g), foram avaliadas por CCD (FM9, R1 e R3). A análise do cromatograma obtido mostrou que o sobrenadante, sólido amarelo pastoso (43,7 mg), solúvel em MeOH, era constituído de uma mistura que possuía o mesmo padrão de manchas da fração **EEAq03** ( $R_f = 0,52$  e  $0,89$ ; fluorescência amarela ou verde no UV), dessa forma reuniu-se as duas frações em um mesmo grupo que permaneceu com a numeração anterior **HS11**.



## **CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1 – IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*

#### 3.1.1 - Estudo farmacognóstico do extrato hexânico bruto (EHB) e suas frações

O EHB e suas frações (FLUXOGRAMA 2.2) foram analisados quanto à presença de terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (principalmente flavonóides), saponinas e ácidos graxos de cadeia longa, utilizando R1, R2, R3, R4, R5 e R6 respectivamente, como reveladores (p. 49). Os resultados estão apresentados na TABELA 3.1.

**TABELA 3.1 - Estudo farmacognóstico preliminar do extrato hexânico bruto (EHB) e frações das folhas de *Hancornia .speciosa***

Reagentes	EHB	EHFI	EHFII	EHFIII	EHFIV	EHFV	EHFVI
<i>Sol. Ác. Anisaldeído(R1)</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Reag. Dragendorf(R2)</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Reag. NP-PEG(R3)</i>	+	-	-	-	+	+	+
<i>Verde de Bromocresol(R4)</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Reag. Kumarovisk(R5)</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Radiação UV(R6)</i>	+	-	-	-	+	+	+

#### 3.1.2 – Mistura de Hidrocarbonetos

**HS01** (53 mg) foi obtida a partir da fração hexânica EHFI resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2).

O espectro na região do infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) (FIGURA 3.1), mostrou absorções características dos hidrocarbonetos: foram observadas bandas de absorção em  $2955 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2910 \text{ cm}^{-1}$  e  $2847 \text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de C-H de grupos metílicos e metilênicos; absorções em  $1473 \text{ cm}^{-1}$  e  $1462 \text{ cm}^{-1}$  características de deformações angulares de ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos e/ou alicíclicos e bandas em  $729 \text{ cm}^{-1}$  e  $719 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação angular assimétrica de ligação C-H de grupamentos  $(\text{CH}_2)_n$ , onde  $n \geq 4$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , FIGURA 3.2), apresentou sinal em  $\delta 0,8$  atribuído a hidrogênios de grupo metila terminal; um sinal largo em  $\delta 1,25$  atribuído a hidrogênios metilênicos; e sinal em  $\delta 5,1$  correspondente aos hidrogênios olefínicos.

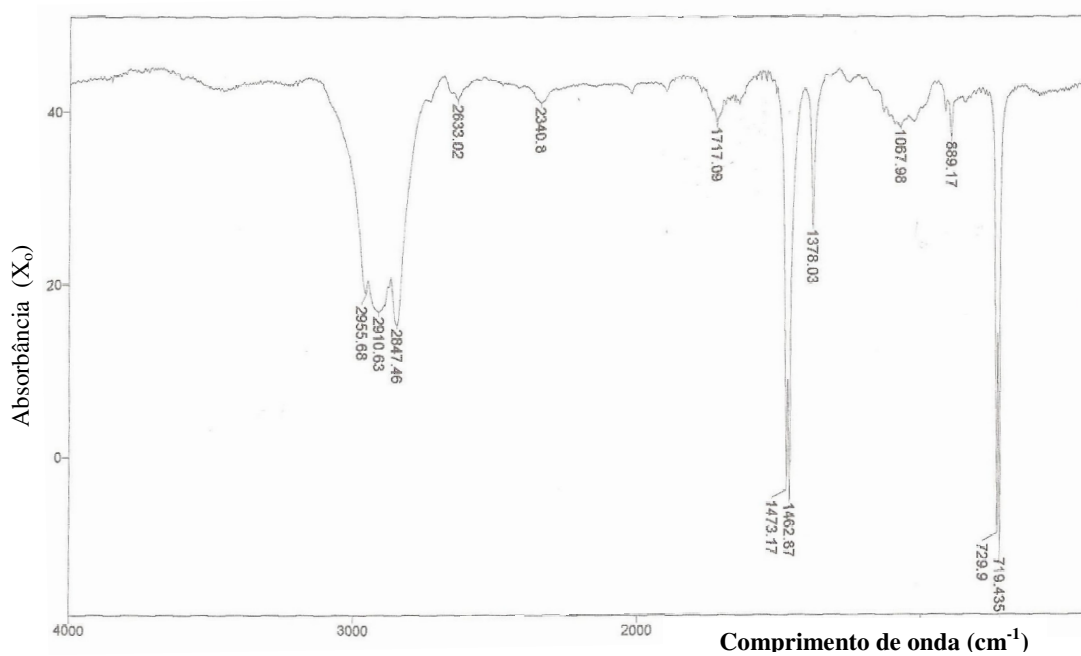


FIGURA 3.1 - Espectro na região do infravermelho de HS01 (KBr, cm<sup>-1</sup>)

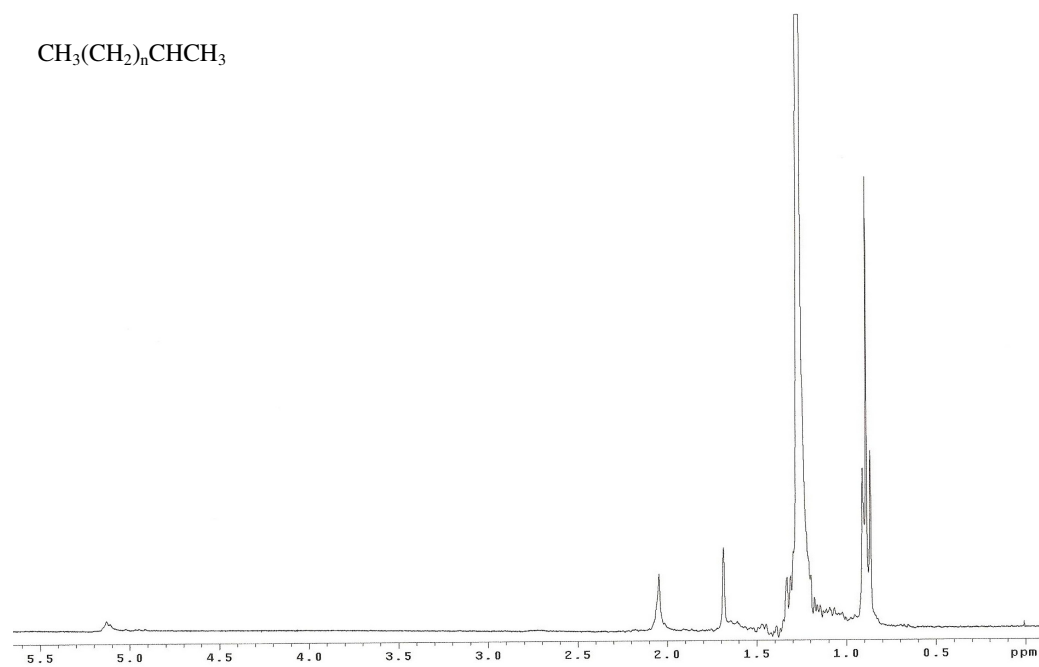


FIGURA 3.2 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS01 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , FIGURA 3.3) apresentou sinais em  $\delta 22,6$ ;  $\delta 23,4$ ;  $\delta 26,3$ ;  $\delta 29,3$  e  $\delta 29,6$  atribuídos a carbonos metilênicos; e sinal em  $\delta 14,1$  atribuído a carbono metílico; sinais em  $\delta 31,9$  e  $\delta 32,1$  correspondentes a grupos metilênicos ligados aos carbonos olefínicos. Apresentou ainda dois sinais relativos a carbonos olefínicos em  $\delta 135,1$  e  $\delta 125,0$ .

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas na região do IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , sugerem que **HS01** é constituída, principalmente, por uma mistura de hidrocarbonetos insaturados.

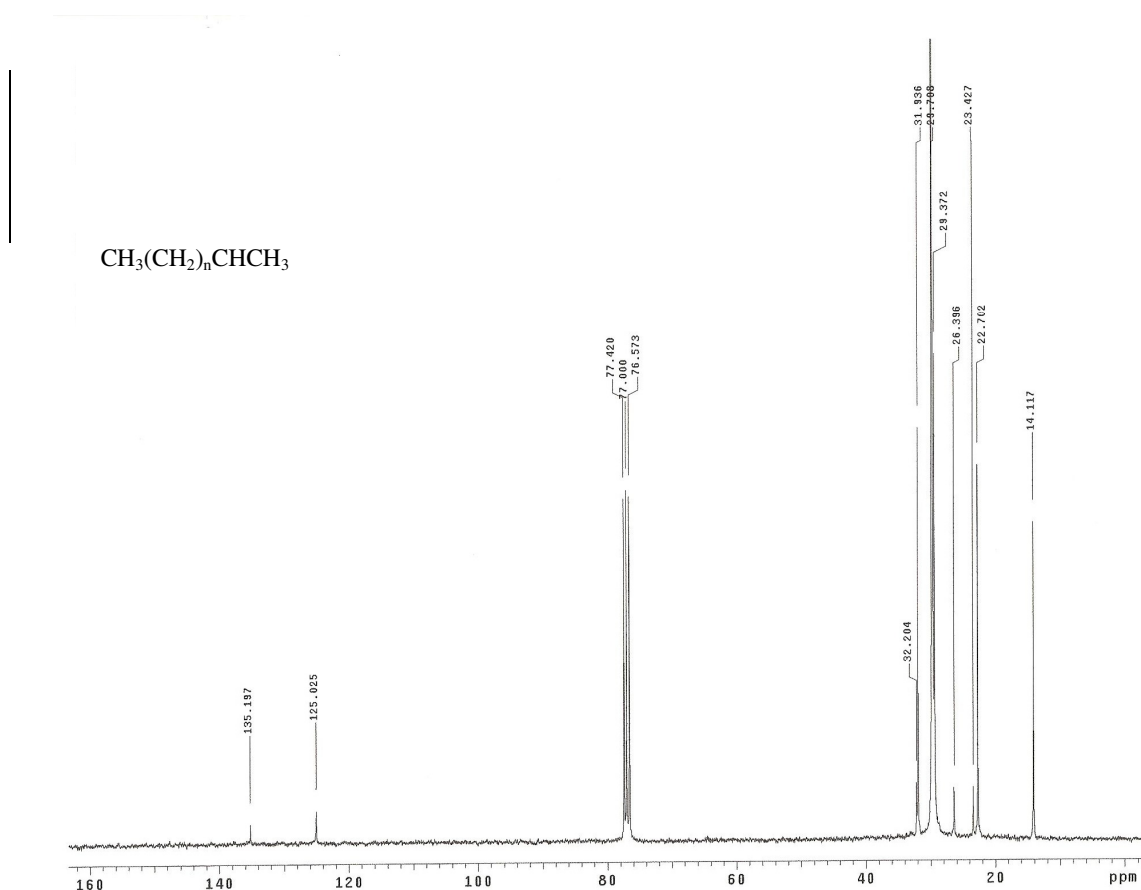
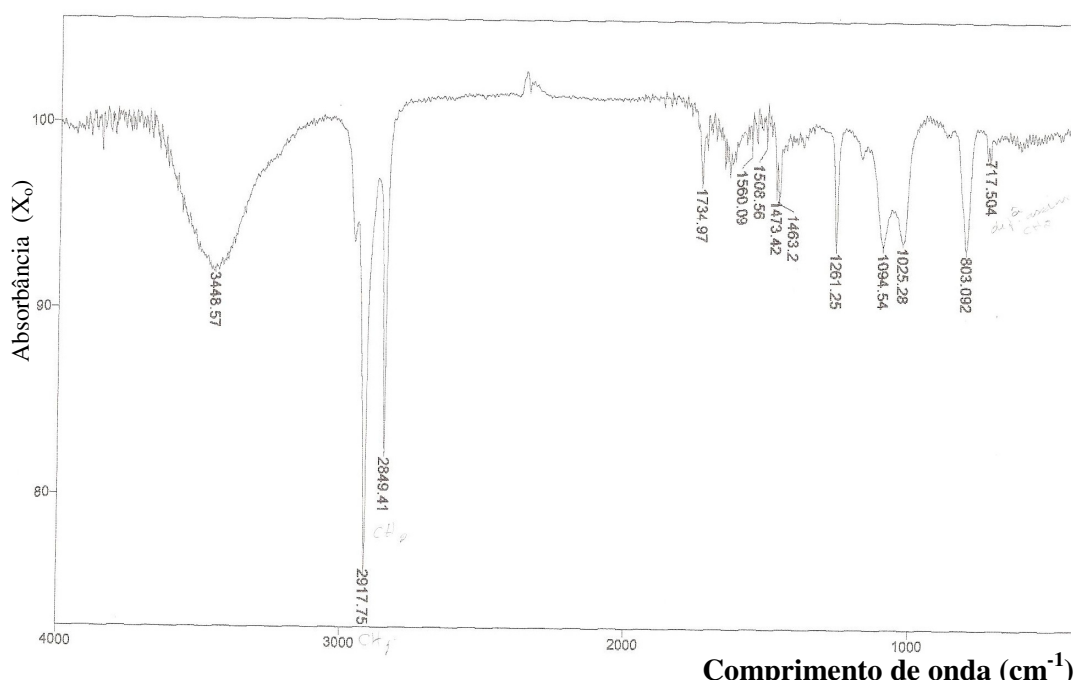


FIGURA 3.3 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS01 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

### 3.1.3 - Mistura de Alcoóis de cadeia longa

**HS02** foi obtida por cromatografia em coluna da fração hexânica EHFIII, resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2).

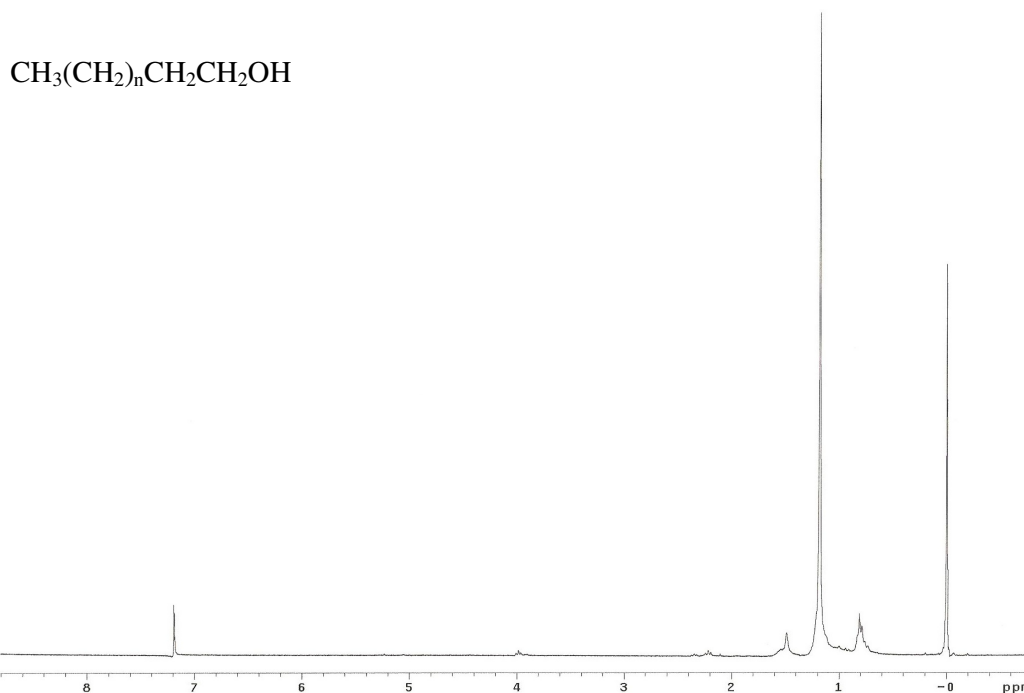
O espectro na região do infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **HS02** (FIGURA 3.4) apresentou bandas de absorção em  $3448 \text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação O-H de álcoois, corroborada por absorções entre  $1094 \text{ cm}^{-1}$  e  $1025 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes a estiramento de ligação C-O de álcoois primários. Outros sinais foram observados em:  $2917 \text{ cm}^{-1}$  e  $2849 \text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; absorções em  $1473 \text{ cm}^{-1}$  e  $1463 \text{ cm}^{-1}$ , características de deformações angulares de ligação C-H de compostos alifáticos e/ou alicíclicos; e em  $717 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação angular assimétrica de ligação C-H de grupamentos  $(\text{CH}_2)_n$ , onde  $n \geq 4$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).



**FIGURA 3.4 - Espectro na região do infravermelho de HS02 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **HS02** (FIGURA 3.5) mostrou sinal em  $\delta 0,8$ , atribuído a hidrogênios de grupo metila terminal; sinal em  $\delta 1,2$  relativo a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática e em  $\delta 1,49$ , atribuído aos hidrogênios metilênicos

do carbono em posição  $\alpha$  àquele que sustenta a hidroxila; em  $\delta$ 3,95 relativo aos hidrogênios do carbono ligado à hidroxila.



**FIGURA 3.5 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS02 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **HS02** (FIGURA 3.6) foram observados os seguintes sinais:  $\delta$ 14,1 (atribuído a carbono de grupo metila terminal);  $\delta$ 22,6;  $\delta$ 29,2;  $\delta$ 29,3;  $\delta$ 29,7 atribuídos aos carbonos metilênicos de cadeia alifática; em  $\delta$ 31,9 atribuído a carbono em posição  $\beta$  em relação à hidroxila e o deslocamento em  $\delta$ 64,3, referente ao carbono ligado a oxigênio (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

As informações espectrométricas na região do IV e de RMN sugerem que **HS02** é constituído, principalmente, de uma mistura de álcoois alifáticos.

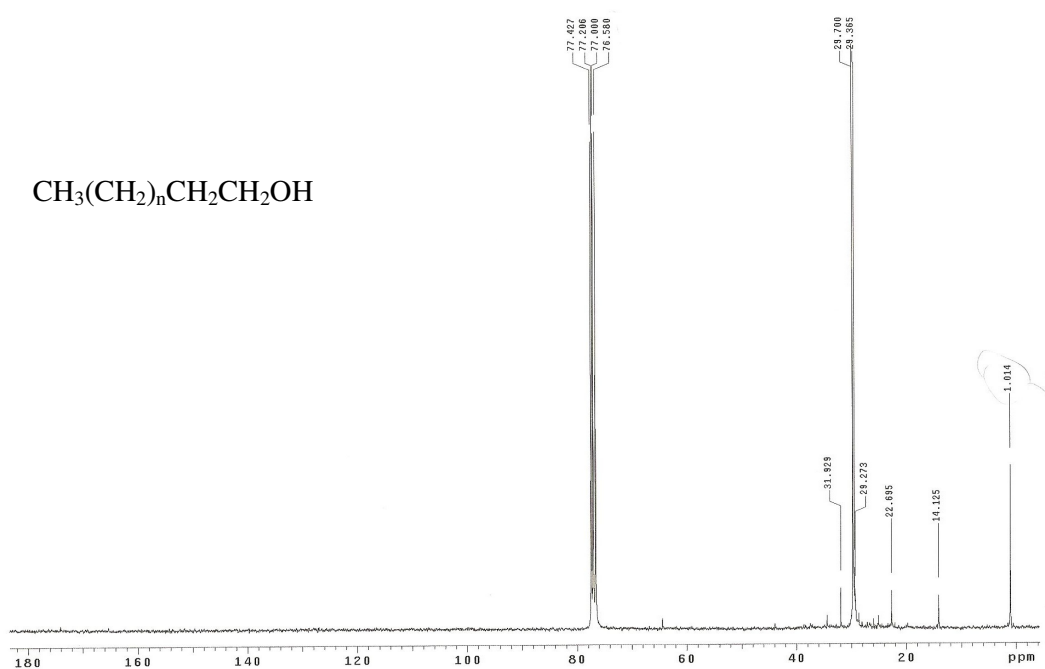


FIGURA 3.6 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS02 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

### 3.1.4 – Esteróide - β- sitosterol

**HS10** (10,4 mg) foi obtida por CC da fração EHFIV, resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2). Apresentou-se como um sólido branco amorfo separado por decantação após lavagem com hexano:AcOEt (8:2), do grupo de frações do qual foi originado.

No espectro no IV de **HS10** (FIGURA 3.7) foram observadas bandas de absorção em: 3426 cm<sup>-1</sup>, estiramento de ligação O-H; 2956 cm<sup>-1</sup>, 2936 cm<sup>-1</sup>, 2867 cm<sup>-1</sup> e 2850 cm<sup>-1</sup>, estiramentos de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; 1639 cm<sup>-1</sup>, estiramento de ligação C=C de olefinas; 1465 cm<sup>-1</sup> e 1382 cm<sup>-1</sup>, deformações de ligação C-H; e absorção em 801 cm<sup>-1</sup>, característica de deformação de ligação dupla trissubstituída (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

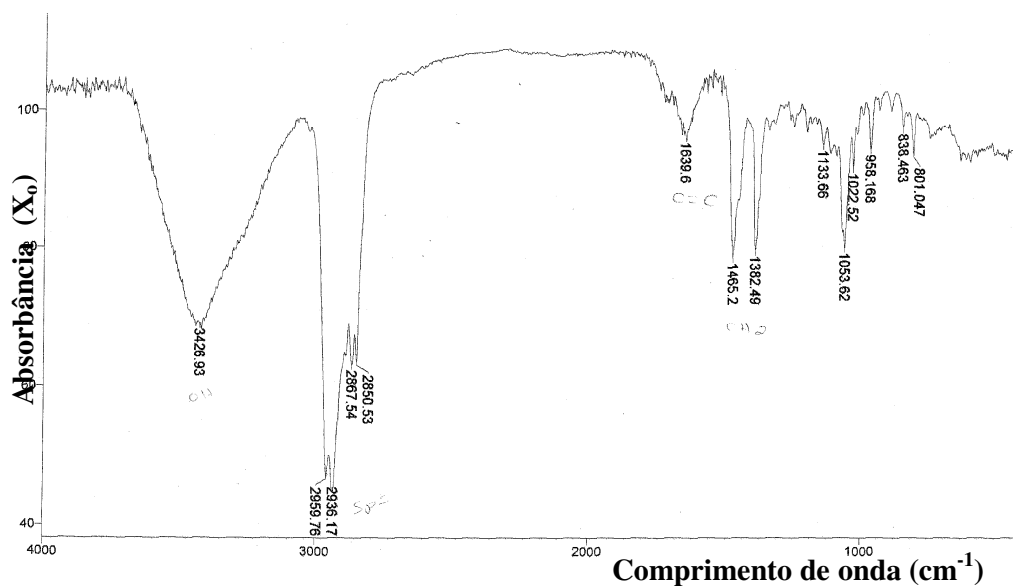


FIGURA 3.7 - Espectro na região do infravermelho de HS10 (KBr, cm<sup>-1</sup>)

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS10 (FIGURAS 3.8; 3.9 e 3.10) apresentou vários sinais característicos de fitoesteróides, tais como aqueles de hidrogênios olefínicos em δ5,35 (d, J = 5,1Hz; H-6), de hidrogênios oximetínicos (δ3,54 – δ3,50, *m*, H-3) e o acúmulo de sinais na região entre δ0,6 e δ2,28, referentes aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, os quais caracterizam a presença do esteróide β-sitosterol (ABREU *et al.*, 2001; BORGES, 2006; KOJIMA *et al.*, 1990).

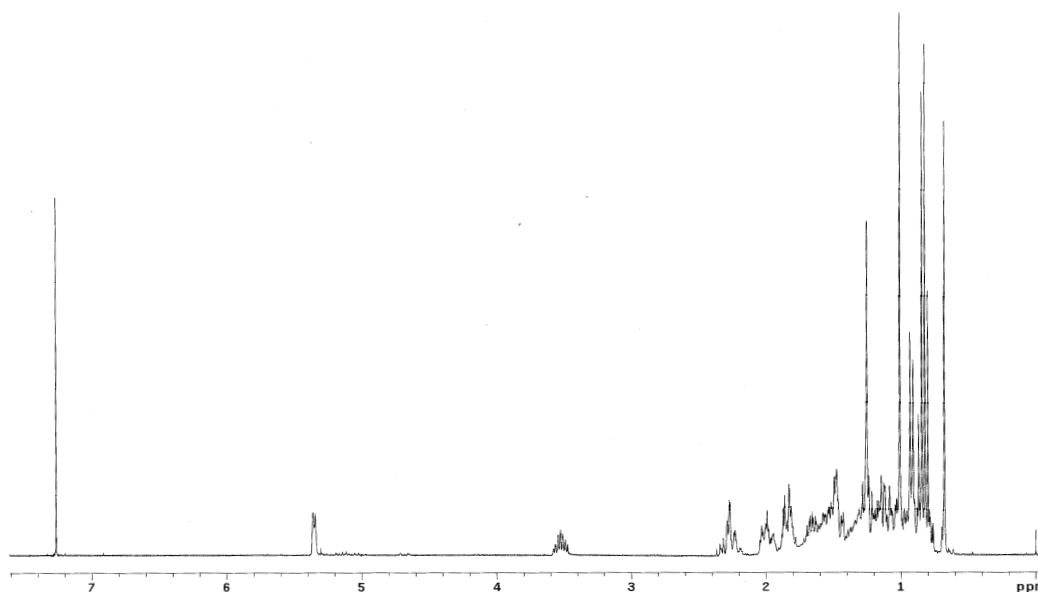


FIGURA 3.8 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS10 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



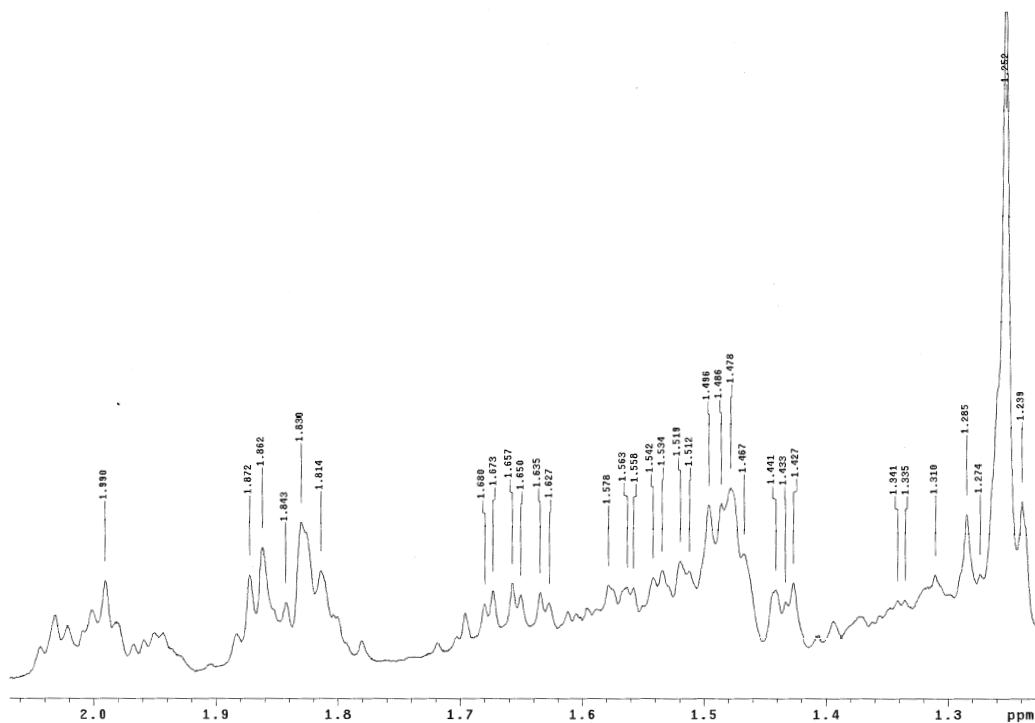


FIGURA 3.9 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS10 – Expansão da região entre  $\delta 1.2$  e  $\delta 2,0$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

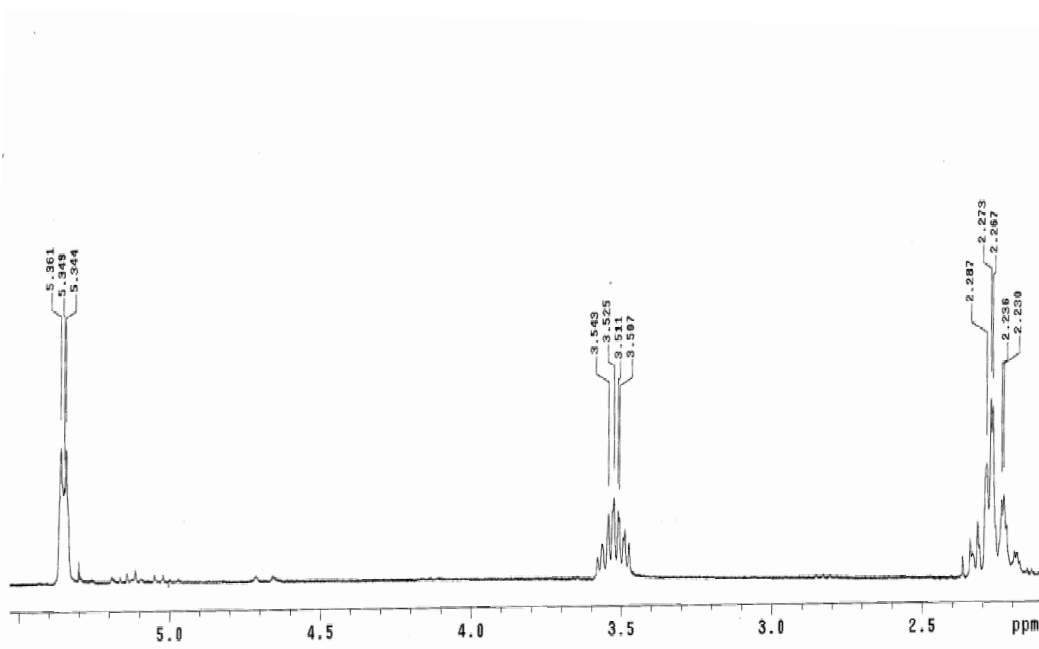


FIGURA 3.10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS10 – Expansão da região entre  $\delta 2,1$  e  $\delta 5,5$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURAS 3.11; 3.12 e 3.13) foi possível observar sinais em  $\delta 140,7$  e  $\delta 121,7$  a relativos aos carbonos C5 e C6 do  $\beta$ -sitosterol. Esse fitoesterol possui uma hidroxila em  $\beta$  na posição C3, evidenciada pelo sinal em  $\delta 71,8$  (KOJIMA *et al.*, 1990; MACARI *et al.*, 1990).

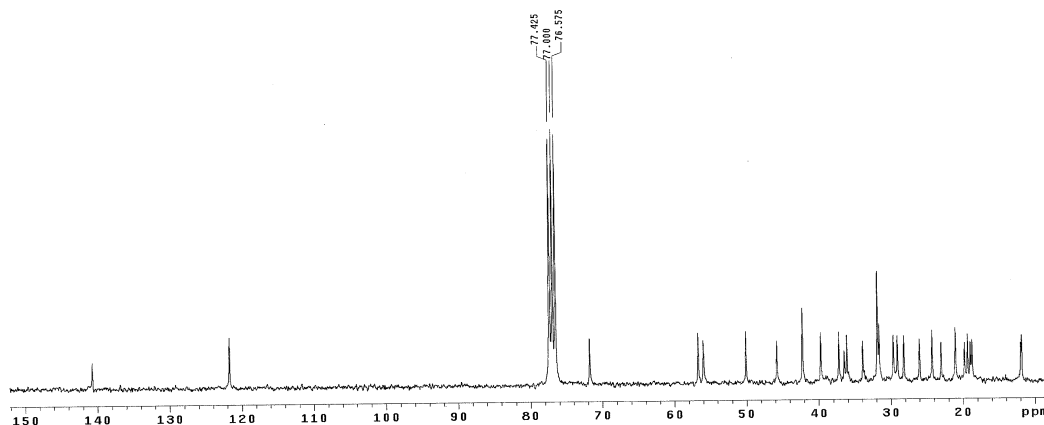


FIGURA 3.11 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS10 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

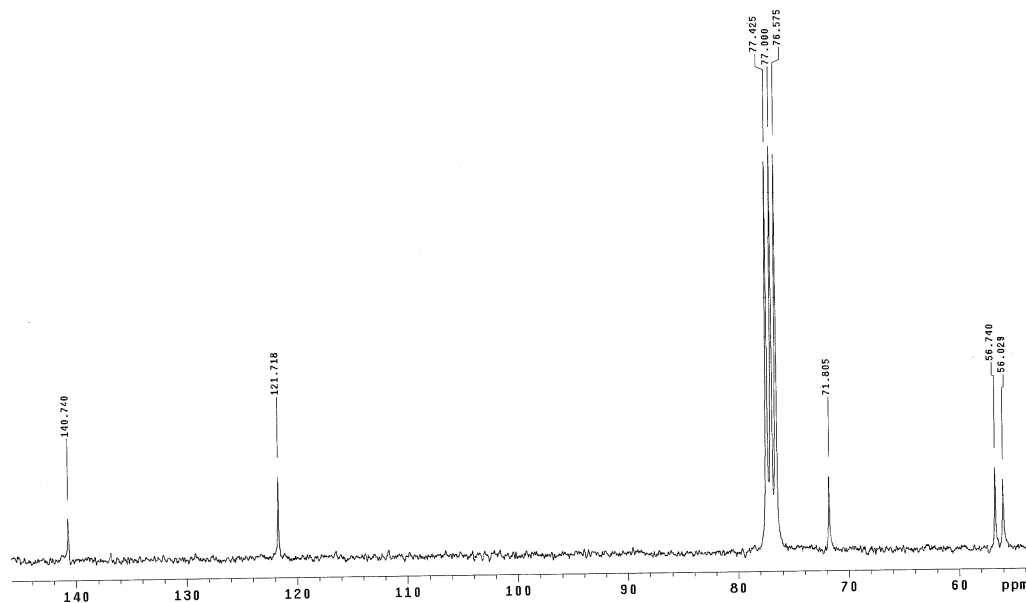
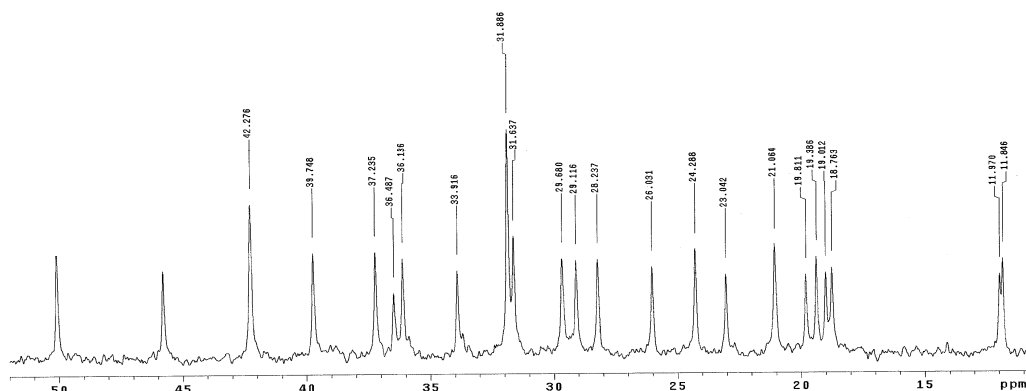
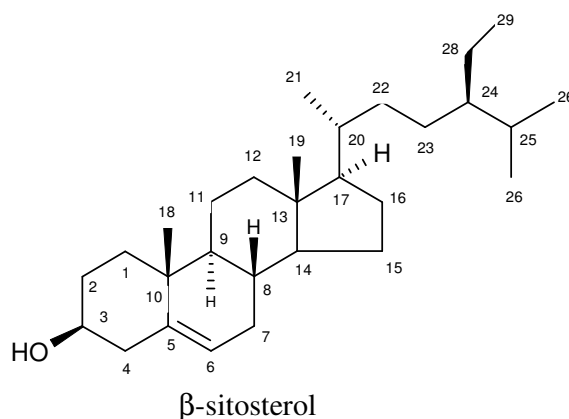


FIGURA 3.12 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS10 - Expansão da região entre  $\delta 54$  e  $\delta 144$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**FIGURA 3.13 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS10 – Expansão da região entre δ11 e δ 51 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

A confirmação estrutural e a atribuição dos demais deslocamentos químicos referentes ao RMN de <sup>13</sup>C deram-se por comparação com a literatura (MACARI *et al.*, 1990) e foram descritos na TABELA 3.2. Tal comparação sugeriu que **HS10** seja constituída principalmente pelo fitoesteróide  $\beta$ -sitosterol.



**TABELA 3.2 - Deslocamentos químicos de HS10 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$   $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com a literatura (MACARI *et al.*, 1990,  $\delta$   $\text{CDCl}_3$ , 25 MHz)**

<b>C</b>	<b><math>\beta</math>-sitosterol (<math>\delta</math>)</b>	<b>HS10</b>
1	37,2	37,2
2	31,6	31,6
3	71,7	71,8
4	36,4	36,5
5	14,7	140,7
6	121,6	12,7
7	31,8	31,9
8	31,8	31,9
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	39,7	39,7
13	42,3	42,3
14	56,7	56,7
15	24,2	24,3
16	28,1	28,2
17	56,1	56,0
18	11,9	11,8
19	19,3	19,4
20	36,0	36,0
21	18,7	18,7
22	33,9	33,9
23	26,1	26,0
24	45,8	45,8
25	29,1	29,1
26	19,6	19,8
27	18,9	19,0
28	23,0	23,0
29	11,9	11,9

### 3.1.5 – Mistura de Triterpenos

#### 3.1.5.1 - HS03 - $\alpha$ - e $\beta$ -amirina

**HS03** (22,8 mg) foi obtida na forma de um sólido branco, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , a partir de cromatografia em coluna da fração hexânica EHFIII, resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2).

O espectro na região do infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **HS03** (FIGURA 3.14), apresentou banda larga de absorção em  $3302 \text{ cm}^{-1}$  e em  $1359 \text{ cm}^{-1}$  que caracterizaram a presença de ligação O-H. As absorções em  $2947 \text{ cm}^{-1}$  a  $2854 \text{ cm}^{-1}$ , combinadas com aquelas em  $1465 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1378 \text{ cm}^{-1}$  e  $1379 \text{ cm}^{-1}$  indicaram a ocorrência estiramento de ligação C-H de compostos alicíclicos, enquanto aquela em  $1655 \text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à ligação C=C de olefinas. A absorção em  $1036 \text{ cm}^{-1}$  caracterizou a presença de estiramento de ligação C-O e a absorção em  $995 \text{ cm}^{-1}$  foi relacionada à presença de deformação angular fora do plano de ligação C-H.

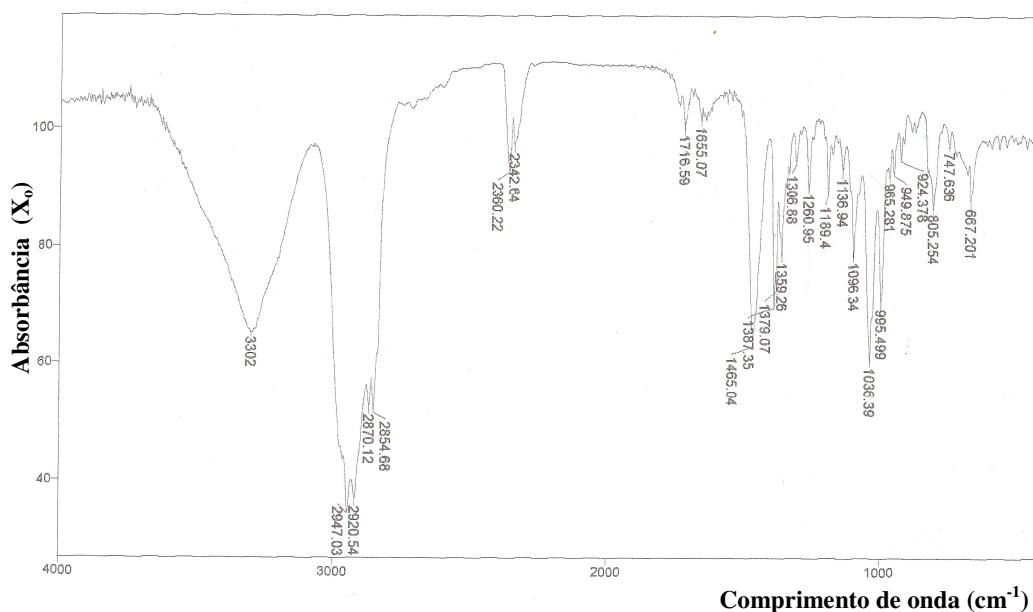
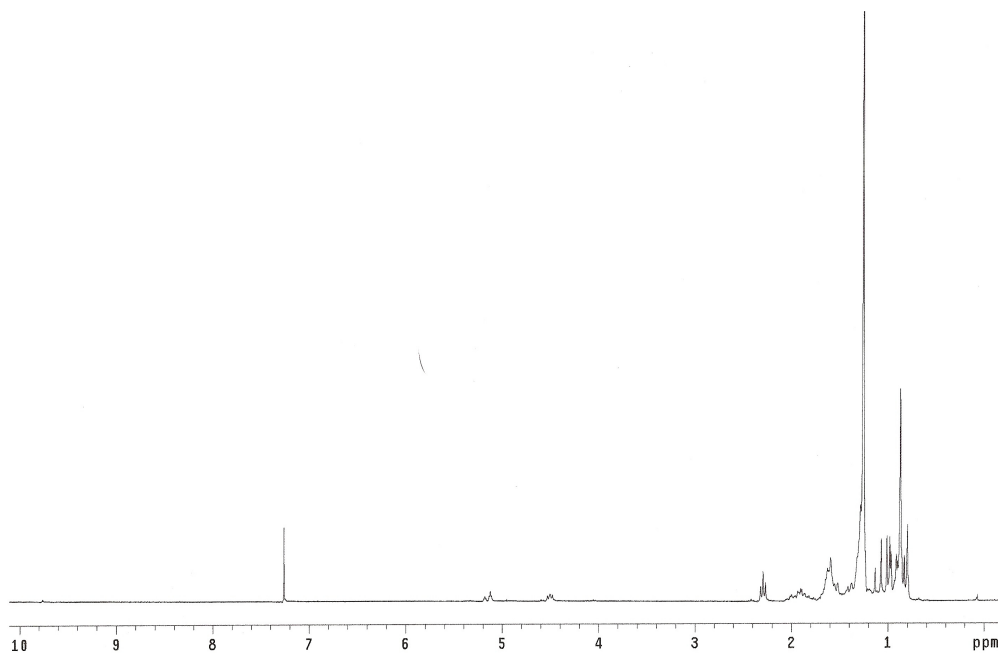
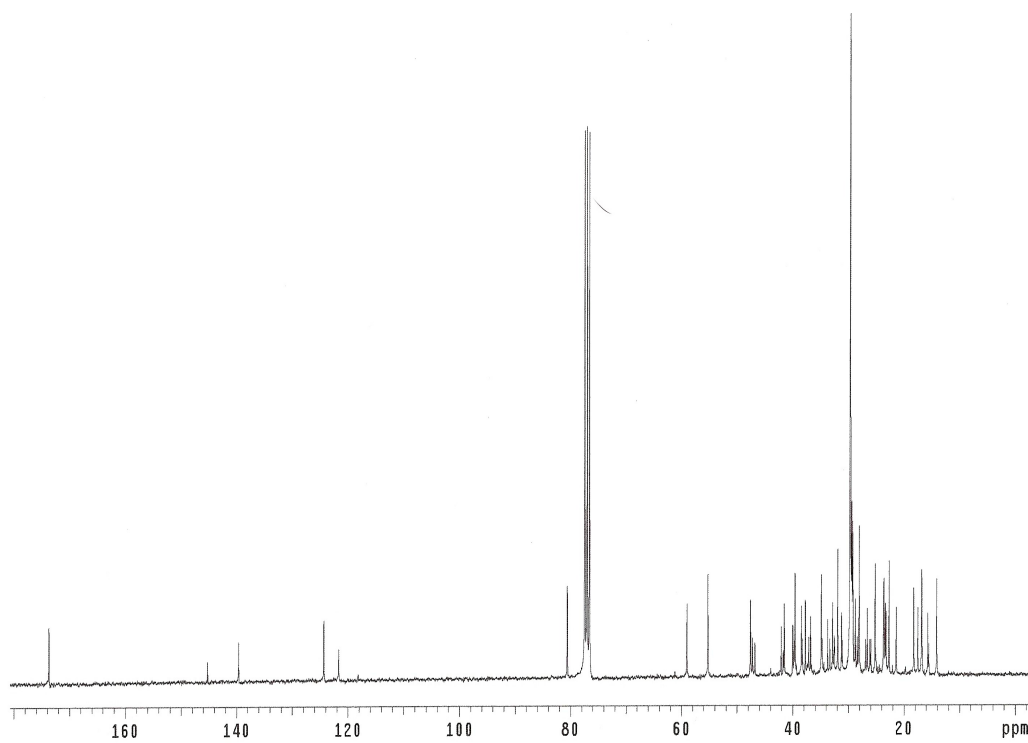


FIGURA 3.14 - Espectro na região do infravermelho de HS03 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

A multiplicidade de picos na região de menor blindagem nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) (FIGURAS 3.15 e 3.16) revelou o caráter triterpênico dos constituintes dessa mistura.



**FIGURA 3.15 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS03 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**



**FIGURA 3.16 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS03 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.15, 3.17 e 3.18) mostrou sinais em:  $\delta 5,12$  (1H, *t*,  $J = 3,6\text{Hz}$ ) e em  $5,18$  (1H, *t*,  $J = 4,0\text{Hz}$ ) que correspondem a hidrogênios olefínicos em C12 de esqueleto triterpênico; em  $\delta 3,24$  (1H, *d*,  $J = 5,1\text{Hz}$ ) e em  $\delta 3,20$  (1H, *d*,  $J = 5,4\text{Hz}$ ) relativos a hidrogênio H-3 para ursanos e oleanos, além de sinais entre  $\delta 0,78$  e  $\delta 2,17$  que correspondem a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. A presença dos simpletos em  $\delta 1,13$  e  $\delta 0,87$  caracteriza hidrogênios metílicos nos carbonos C27 e em C29, respectivamente, dos oleanos (DING *et al.*, 2000; KOLAK *et al.*, 2005; NEPLAN, 2007).

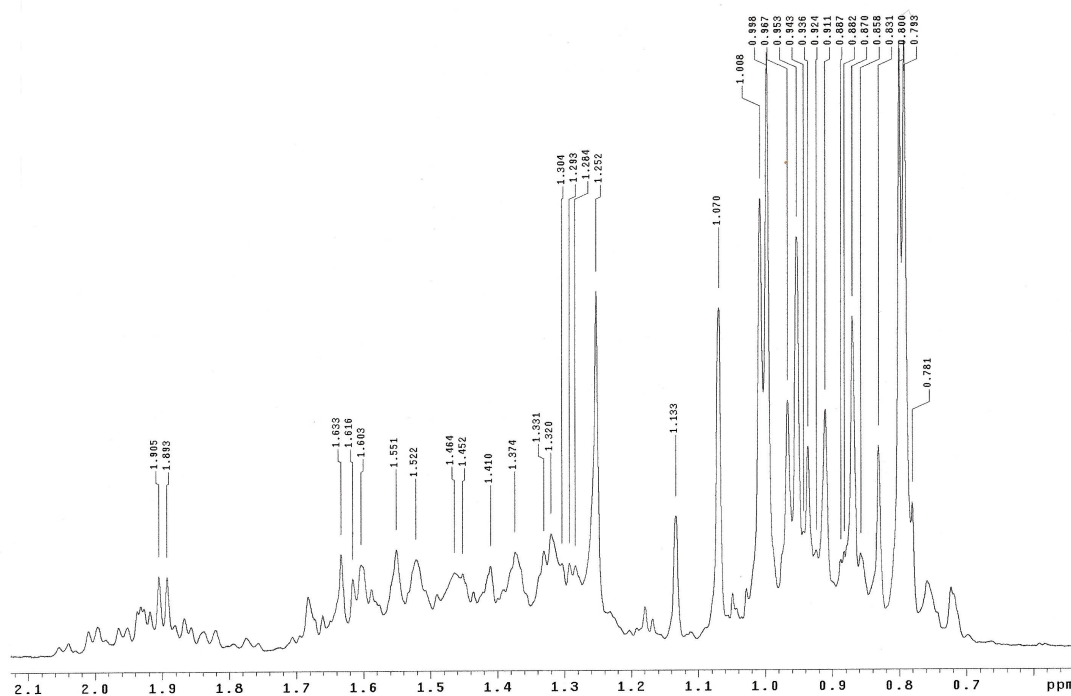
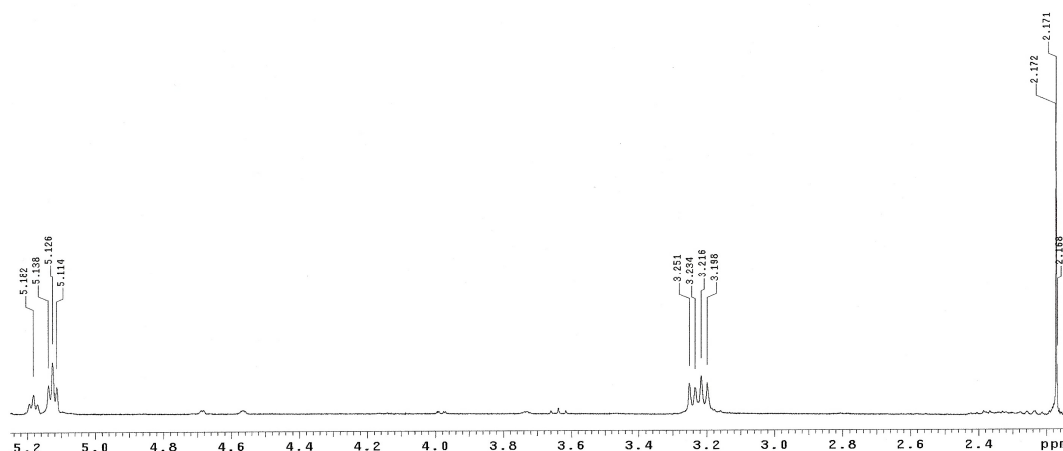
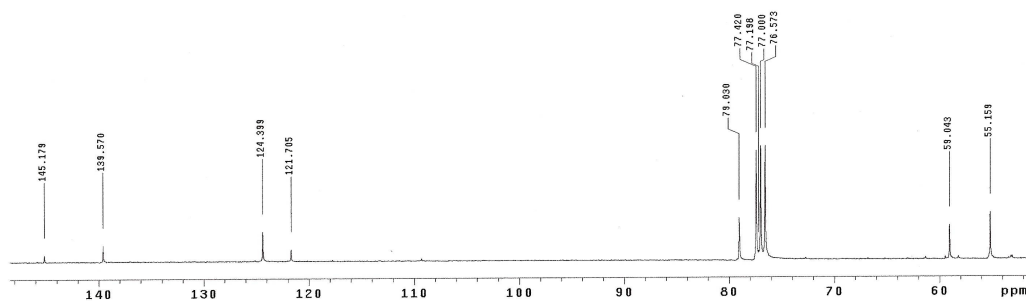


FIGURA 3.17 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS03 – Expansão da região entre  $\delta 0,6$  e  $\delta 2,1$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**FIGURA 3.18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS03 – Expansão da região entre  $\delta 2,15$  e  $\delta 5,2$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS03 (FIGURAS 3.16 e 3.19) mostrou sinais na região de olefinas para os carbonos  $\text{sp}^2$  C13 (não hidrogenado) e C12 em  $\delta 145,1$  e  $\delta 121,7$  de oleanos e em  $\delta 139,5$  e  $\delta 124,3$  de ursanos, respectivamente; e sinal em  $\delta 79,0$  que corresponde a carbono carbinólico C3 para os dois esqueletos triterpênicos (MAHATO; KUNDU, 1994, BARREIROS *et al.*, 2002).



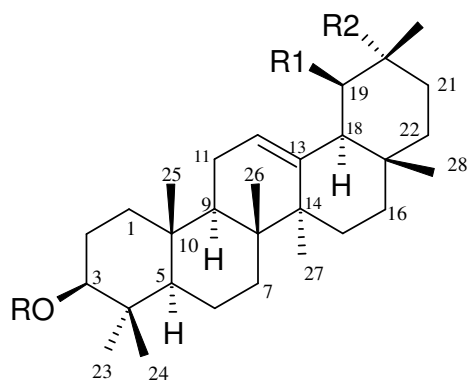
**FIGURA 3.19 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS03 – Expansão da região entre  $\delta 52$  e  $\delta 148$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



A comparação com dados obtidos na literatura, permitiu identificar sinais referentes aos triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (TABELA 3.3), sugerindo que **HS03** seja constituído principalmente por uma mistura desses compostos (MAHATO; KUNDU, 1994, BARREIROS *et al.*, 2002).

**TABELA 3.3 - Deslocamentos químicos de HS03 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com a literatura (MAHATO; KUNDU, 1994)**

C	HS03 ( $\delta$ )	amirina ( $\delta$ )		C	HS03 ( $\delta$ )	amirina ( $\delta$ )	
		$\alpha$	$\beta$			$\alpha$	$\beta$
1	38,6	38,7	38,7	16	26,60; 26,9	26,6	27,0
2	27,3	27,2	27,3	17	33,7; 32,6	33,7	32,5
3	79,0	78,3	79,0	18	59,0; 47,6	58,9	47,4
4	38,6; 38,8	38,7	38,8	19	39,6; 46,8	39,6	46,9
5	55,2	55,2	55,3	20	39,6; 31,2	39,6	31,1
6	18,3	18,3	18,5	21	31,2; 34,7	31,2	34,8
7	32,9	32,9	32,8	22	41,5; 37,1	41,5	37,2
8	40,0; 38,8	40,0	38,8	23	28,1	28,1	28,2
9	47,7	47,7	47,7	24	15,6; 15,5	15,6	15,5
10	36,9	36,9	37,6	25	15,7	15,6	15,6
11	23,4; 23,5	23,3	23,6	26	16,8	16,8	16,9
12	124,4; 121,7	124,3	121,8	27	23,4; 26,0	23,3	26
13	139,6; 145,2	139,3	145,1	28	28,1; 28,4	28,1	28,4
14	42,1	42,0	41,8	29	17,5; 33,3	17,4	33,3
15	28,7; 26,1	28,7	26,2	30	21,4; 23,7	21,3	23,7



R	R1	R2	
H	Me	H	$\alpha$ -amirina
H	H	Me	$\beta$ -amirina

### 3.1.5.2 - HS04- Lupeol, $\alpha$ - e $\beta$ -amirina

**HS04** (58,8 mg) foi obtido por CC das frações EHFIII e EHFIV, resultantes do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2). Apresentou-se na forma de sólido de cor branca, solúvel em clorofórmio.

A análise do espectro na região do IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ), de **HS04** (FIGURA 3.20) mostrou a presença de bandas de absorção em  $3299\text{ cm}^{-1}$  relativa a estiramento de ligação O-H; em  $2946\text{ cm}^{-1}$  a  $2853\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; em  $1639\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação dupla C=C de olefinas; em  $1465\text{ cm}^{-1}$  e  $1359\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a deformação angular de ligação C-H; e em  $1036\text{ cm}^{-1}$ , referente a estiramento de ligação C-O.

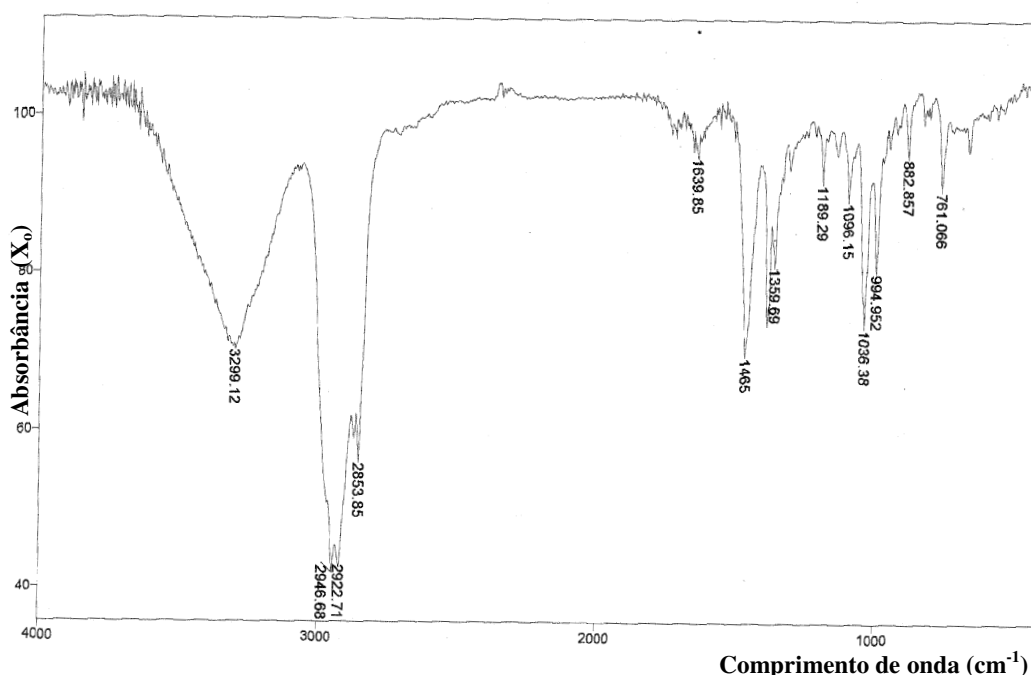


FIGURA 3.20 - Espectro na região do infravermelho de HS04 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **HS04** foram observados os seguintes sinais: entre  $\delta 0,71$  e  $\delta 1,93$  (FIGURA 3.21), referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos;  $\delta 5,18$  (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ ) e  $\delta 5,12$  (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ ), atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos de esqueleto ursano e oleano, respectivamente; um duplete em  $\delta 4,68$  ( $J = 2,7\text{Hz}$ ) e um multiplete centrado em  $\delta 4,56$  (FIGURA 3.22), atribuídos a hidrogênios de grupo vinilidênico (H-29a e H-29b, respectivamente, de esqueleto lupano).

Em  $\delta$ 1,68 foi observado um simpleto largo que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila em C30 do esqueleto lupano. Os sinais relativos aos hidrogênios oximetínicos H3 de triterpenos dos três tipos citados (lupano, ursano e oleano) usualmente ocorrem na região entre  $\delta$ 3,16 e  $\delta$ 3,25. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **HS04** (FIGURA 3.23), podem estar sobrepostos e representados por dupletos em  $\delta$ 3,24 ( $J= 4,8\text{Hz}$ , 1H),  $\delta$ 3,21 ( $J= 5,4\text{Hz}$ , 1H) e em  $\delta$ 3,17 ( $J= 5,1\text{Hz}$ ; 1H) (ABREU *et al.*, 2001).

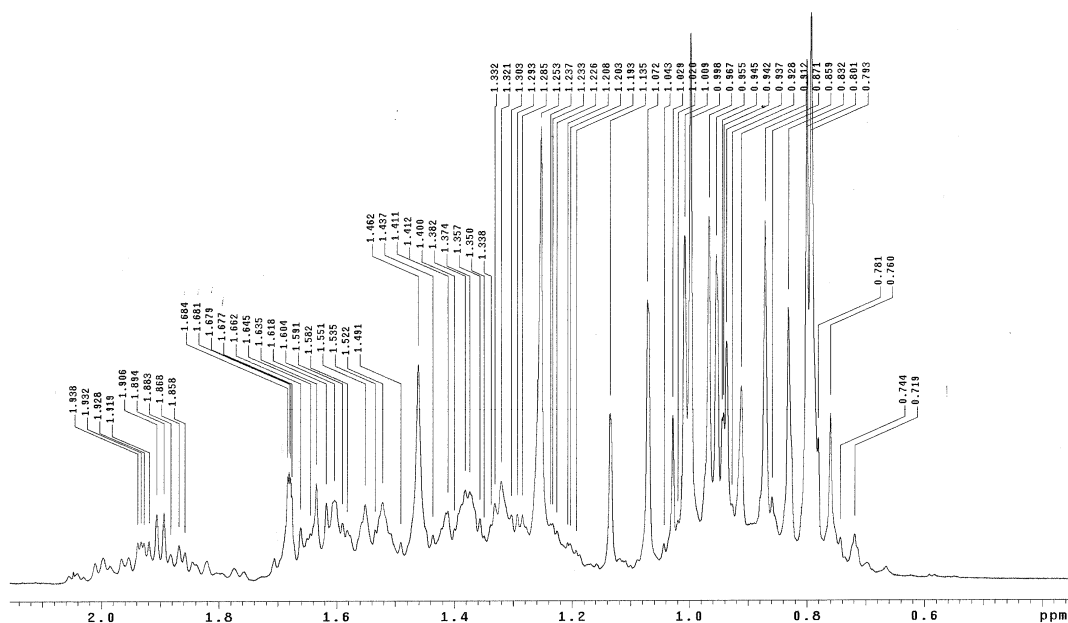


FIGURA 3.21 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS04 – Expansão da região entre  $\delta$ 0,6 e  $\delta$ 2,0 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

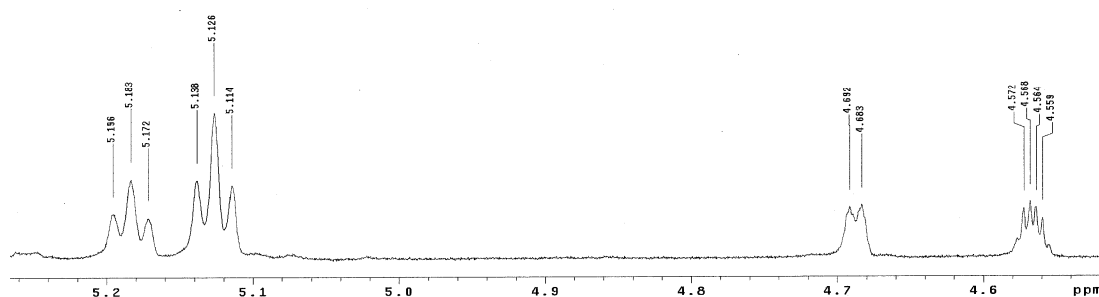
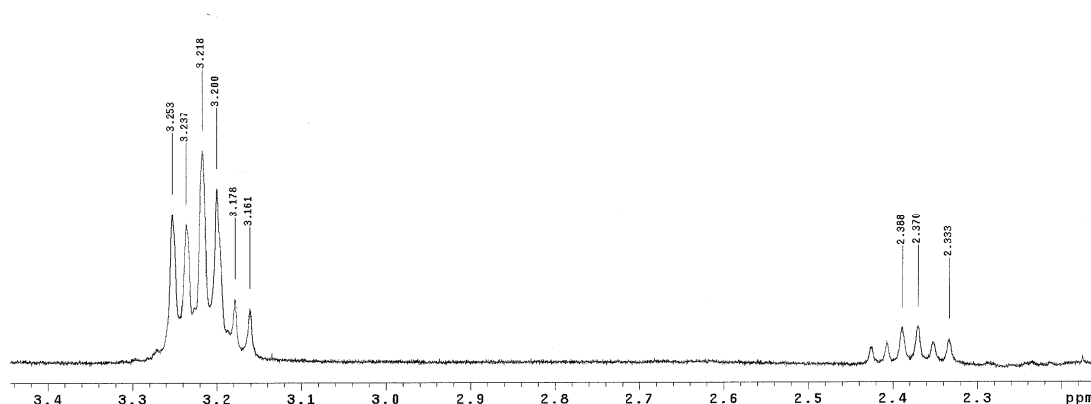


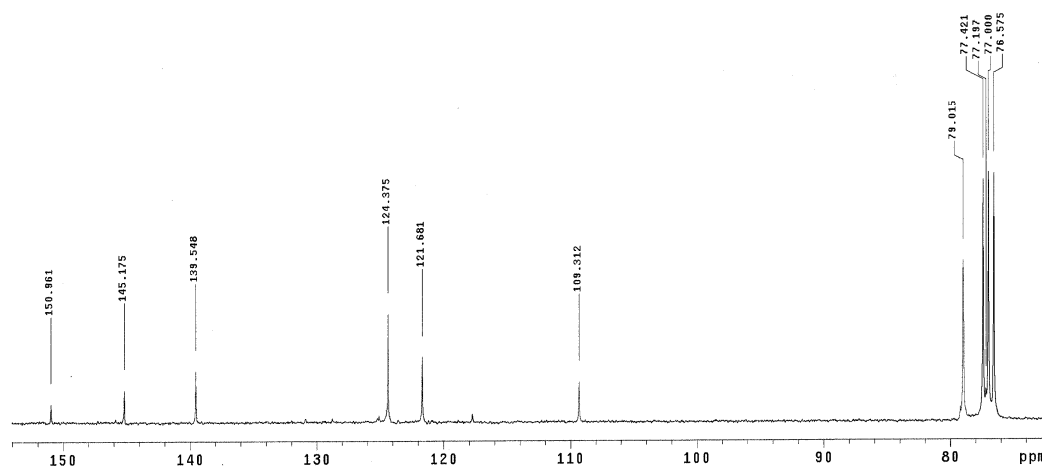
FIGURA 3.22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS04 – Expansão da região entre  $\delta$ 4,5 e  $\delta$ 5,2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**FIGURA 3.23 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS04 – Expansão da região entre  $\delta$  2,3 e  $\delta$  3,4 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.24) mostrou os sinais característicos para estes triterpenos em:  $\delta$ 145,1 e  $\delta$ 121,6 para oleanos; em  $\delta$ 139,5 e  $\delta$ 124,3 para ursanos; e em  $\delta$ 150,9 e  $\delta$ 109,3 característicos da dupla ligação entre os carbonos  $\text{sp}^2$  C20 (não hidrogenado) e C29 de esqueleto lupeno.

Além disso, foram observados os sinais em:  $\delta$ 79,0 para os carbonos oximetínicos C3; e  $\delta$ 19,28 (FIGURA 3.24; 3.26) relativo a grupo metila ligado a carbono  $\text{sp}^2$  de esqueleto lupano (BARREIROS, 2000; MAHATO; KUNDU, 1994).



**FIGURA 3.24 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS04 – Expansão da região entre  $\delta$  74 e  $\delta$  152 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

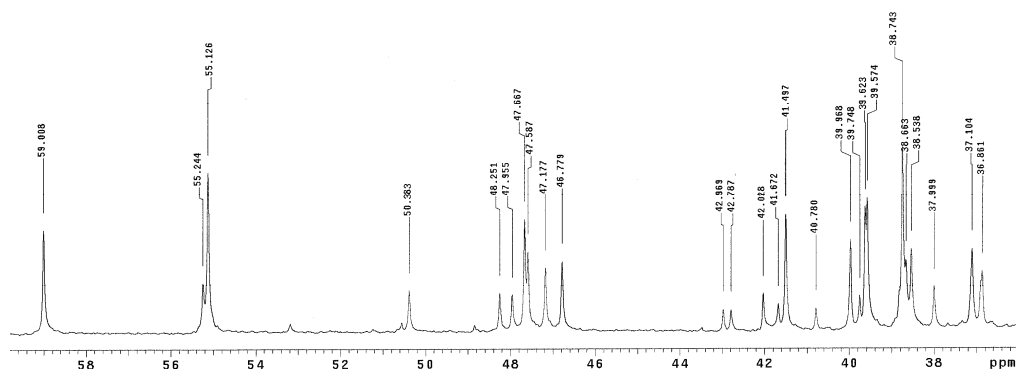


FIGURA 3.25 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS04 – Expansão da região entre 36 e  $\delta$  59 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

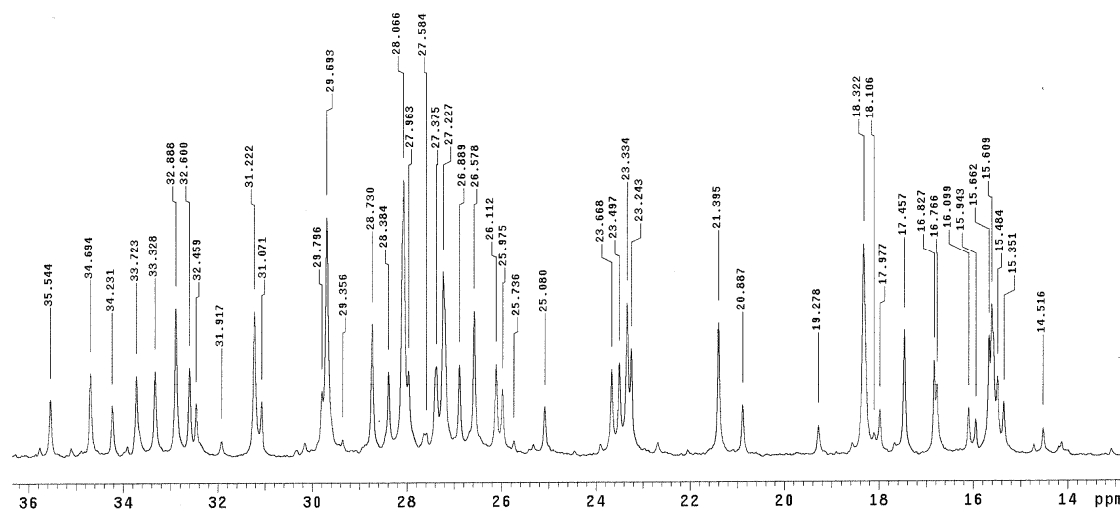


FIGURA 3.26 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS04 – Expansão da região entre 14 e  $\delta$  36 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

As informações espectrométricas no IV e de RMN de **HS04**, comparadas com dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994), sugeriram que **HS04** seja composta de uma mistura de triterpenos, principalmente lupeol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. Os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  estão nas TABELAS 3.4 e 3.5.

TABELA 3.4 - Deslocamentos químicos de HS04 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz), em comparação com a literatura ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) (MAHATO; KUNDU, 1994)

C	HS04 ( $\delta$ )	$\alpha$ -amirina ( $\delta$ )	$\beta$ -amirina ( $\delta$ )
1	38,7	38,7	38,7
2	27,2; 27,4	27,2	27,3
3	79,0	78,3	79,0
4	38,7	38,7	38,8
5	55,2	55,2	55,3
6	18,3	18,3	18,5
7	32,9	32,9	32,8
8	40,0; 38,7	40,0	38,8
9	47,7	47,7	47,7
10	36,8; 37,9	36,9	37,6
11	23,3; 23,5	23,3	23,6
12	124,4; 121,7	124,3	121,8
13	139,5; 145,2	139,3	145,1
14	42,0; 41,7	42,0	41,8
15	28,7; 26,1	28,7	26,2
16	26,6; 27,2	26,6	27,0
17	33,7; 32,5	33,7	32,5
18	59,0; 47,6	58,9	47,4
19	39,6; 46,8	39,6	46,9
20	39,6; 31,1	39,6	31,1
21	31,2; 34,7	31,2	34,8
22	41,5; 37,1	41,5	37,2
23	28,1	28,1	28,2
24	15,6; 15,5	15,6	15,5
25	15,6	15,6	15,6
26	16,8	16,8	16,9
27	23,3; 26,0	23,3	26
28	28,1; 28,4	28,1	28,4
29	17,5; 33,3	17,4	33,3
30	21,4; 23,7	21,3	23,7

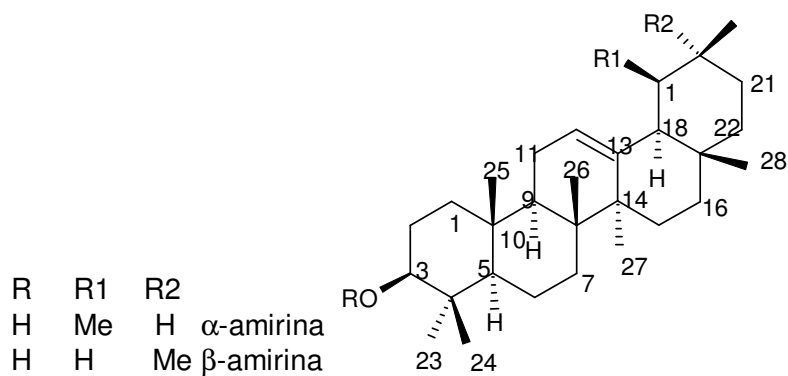
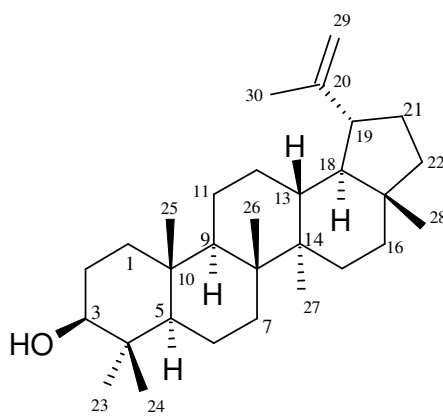


TABELA 3.5 - Deslocamentos químicos de HS04 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz), em comparação com a literatura ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) (MAHATO; KUNDU, 1994)

C	HS04 ( $\delta$ )	Lupeol ( $\delta$ )	C	HS04 ( $\delta$ )	Lupeol ( $\delta$ )
1	38,7	38,7	16	35,5	35,5
2	27,4	27,4	17	43,0	43,0
3	79,0	78,9	18	48,3	48,2
4	38,7	38,8	19	48,0	47,9
5	55,2	55,3	20	151,0	150,9
6	18,3	18,3	21	29,8	29,8
7	34,3	34,2	22	40,0	40,0
8	40,8	40,8	23	28,0	28,0
9	50,4	50,4	24	15,4	15,4
10	37,1	37,1	25	16,1	16,1
11	20,9	20,9	26	15,9	15,9
12	25,1	25,1	27	14,5	14,5
13	38,0	38,0	28	18,0	18,0
14	42,8	42,8	29	109,3	109,3
15	27,4	27,4	30	19,3	19,3



lupeol

### 3.1.5.3 - HS05 – Obtusalina e Eritrodiol

**HS05** (10,4 mg) foi obtida por CC da fração EHFV, resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2, p 63). Apresentou-se como um sólido branco granulado que em CCD revelou-se como uma mancha de cor rosa intenso.

No espectro na região do IV de **HS05** (FIGURA 3.27) foi observada banda larga de absorção em  $3382\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação O-H além de outros sinais em  $1044\text{ cm}^{-1}$  e  $1004\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam estiramento de ligação C-O. As absorções em  $2928\text{ cm}^{-1}$  e  $2867\text{ cm}^{-1}$ , referem-se a estiramentos de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; e  $1635\text{ cm}^{-1}$ , a estiramento de ligação C=C de olefinas. Foram observada ainda absorções em  $1463\text{ cm}^{-1}$  e  $1365\text{ cm}^{-1}$ , relativas a deformação angular de ligação C-H.

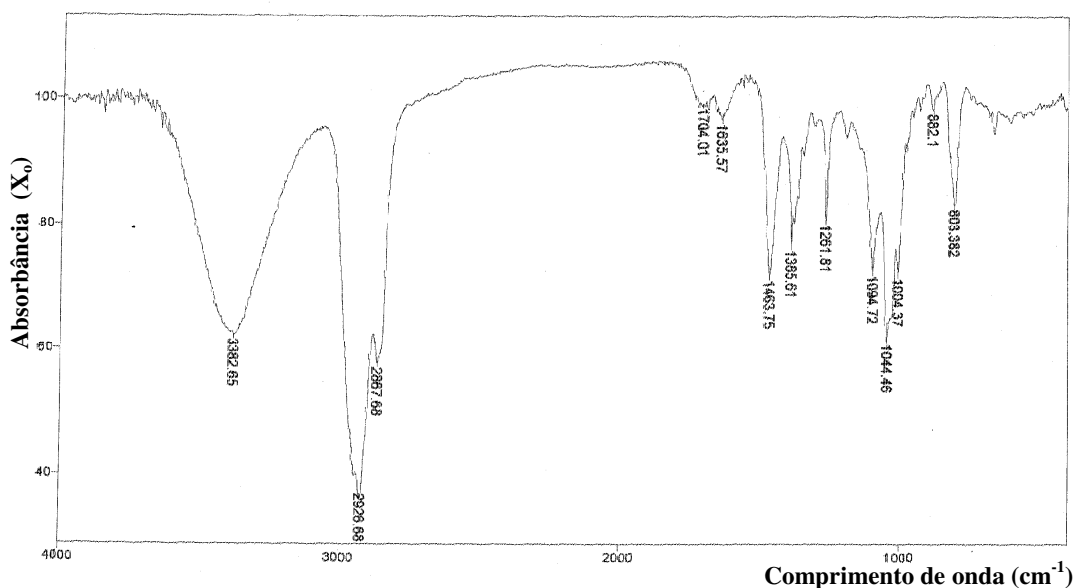


FIGURA 3.27 - Espectro na região do infravermelho de HS05 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

A natureza triterpênica da amostra ficou evidenciada pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.28 a 3.30), que permitiu a visualização de sinais em  $\delta 5,19$  (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ , H-12) e  $\delta 5,13$  (1H, t,  $J = 3,7\text{Hz}$ , H-12), característicos de hidrogênios olefínicos destes compostos, e em  $\delta 3,21$  (2H, dd,  $J = 11,0\text{Hz}$  e  $6,0\text{Hz}$ ) e  $\delta 3,54$  (1H, dd,  $J = 10,9\text{Hz}$  e  $7,0\text{Hz}$ ) relativos aos hidrogênios oximetínicos (FIGURA 3.29) (NAEED, 1991; PAULETTI *et al.*, 2002).



Além disso, foram observados múltiplos sinais distribuídos entre duas regiões espectrais: entre  $\delta 0,73$ - $\delta 1,25$ , atribuídos a grupos metílicos e entre  $\delta 1,31$ - $\delta 1,89$  que correspondem a hidrogênios metilênicos e metínicos (FIGURA 3.28) (NAEED, 1991; PAULETTI *et al.*, 2002).

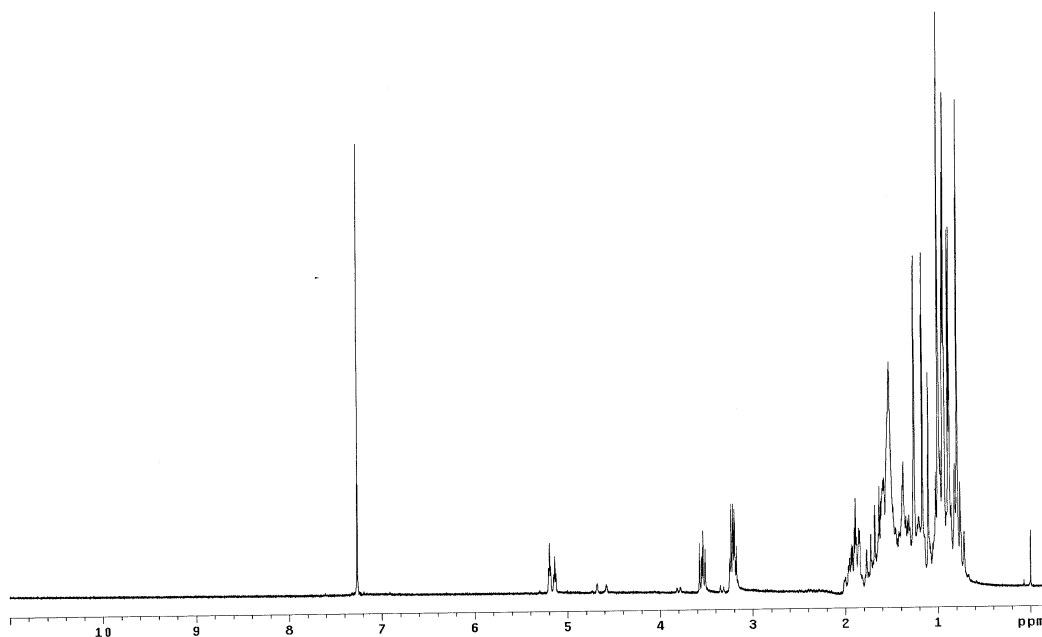


FIGURA 3.28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS05 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

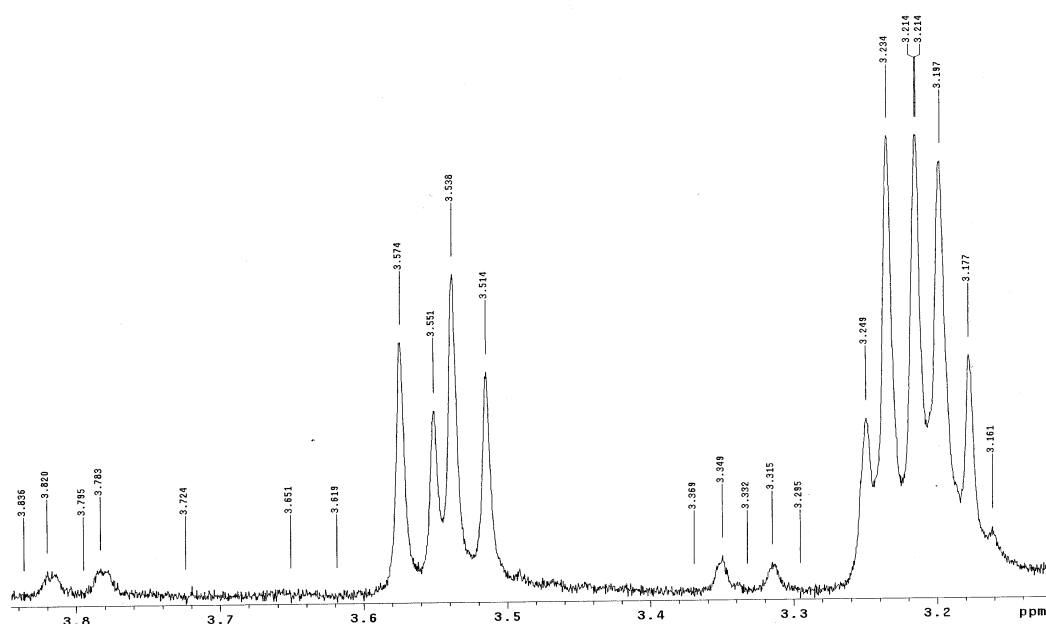
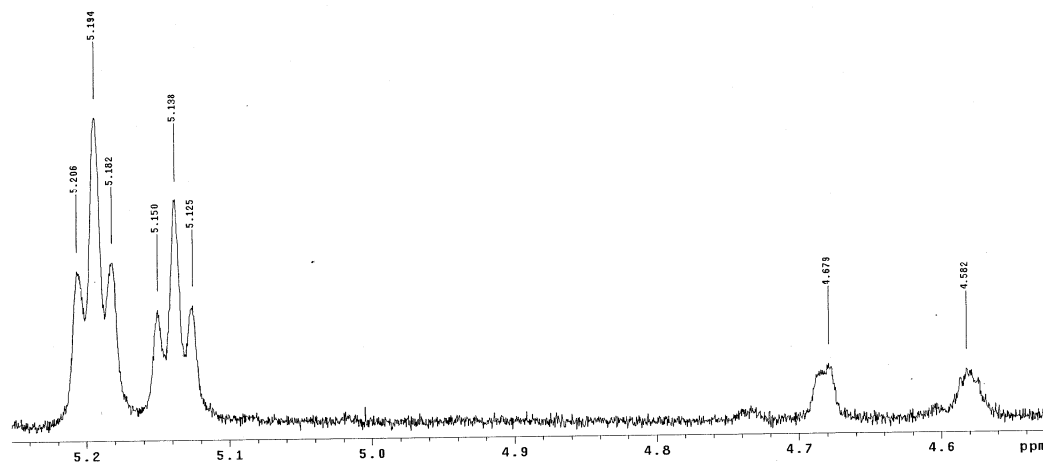


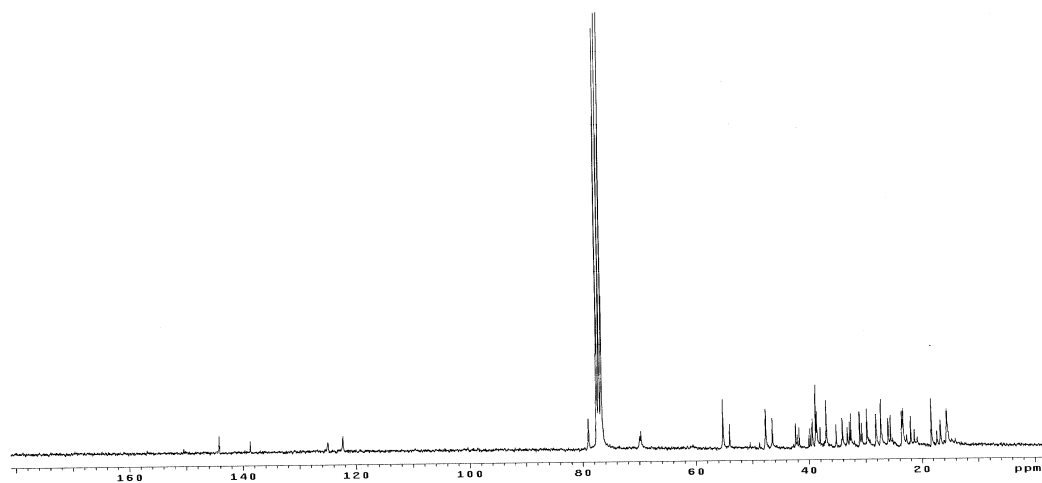
FIGURA 3.29 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS05 – Expansão da região entre  $\delta 3,0$  e  $\delta 3,8$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



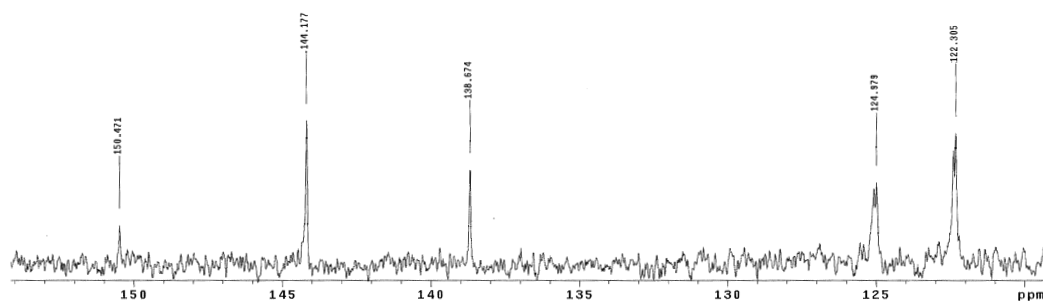
**FIGURA 3.30 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS05 – Expansão da região entre  $\delta 4,5$  e  $\delta 5,2$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 3.31) foram observados sinais relativos a carbonos olefínicos (carbono não hidrogenado) em  $\delta 122,3$ ;  $\delta 125,0$ ;  $\delta 138,7$  e em  $\delta 144,2$  (FIGURA 3.32).

A presença de dois pares de carbonos olefínicos (FIGURA 3,32) sugeriu que **HS05** fosse constituído de um triterpeno contendo 2 ligações duplas, ou uma mistura contendo dois triterpenos. A possibilidade de **HS05** ser constituído por uma mistura de triterpenos foi sustentada pelo fato do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentar muito mais sinais que os 30 esperados para um triterpeno.

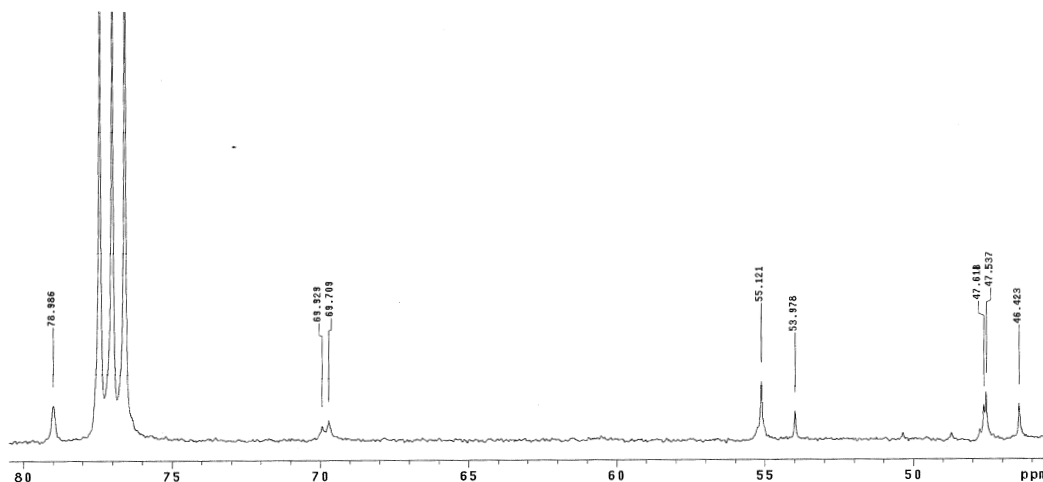


**FIGURA 3.31 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS05 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



**FIGURA 3.32 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS05 – Expansão da região entre  $\delta 120$  e  $\delta 154$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

Além dos sinais referentes a carbonos olefínicos, outros foram observados:  $\delta 79,0$ ,  $\delta 69,9$ , e  $\delta 69,7$ , atribuídos a sinais de carbonos carbinólicos (FIGURA 3.33). Foi possível observar, ainda, que o sinal em  $\delta 79,0$  aparentou ter uma intensidade cerca de 2 vezes a intensidade dos outros sinais atribuídos a carbonos carbinólicos. Tal fato levou à consideração de que esse sinal poderia ser devido à sobreposição de dois sinais para carbonos oximetínicos com deslocamento químico semelhante.



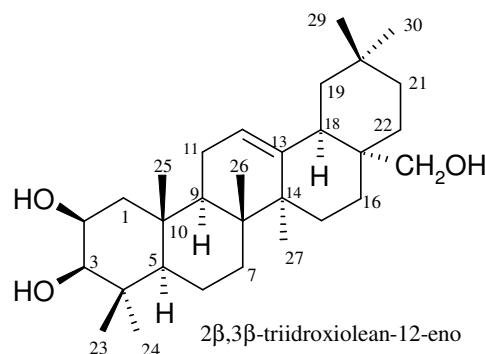
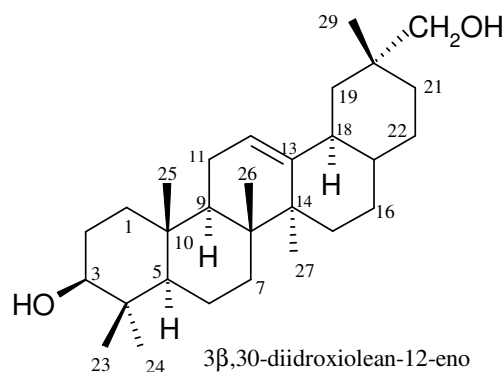
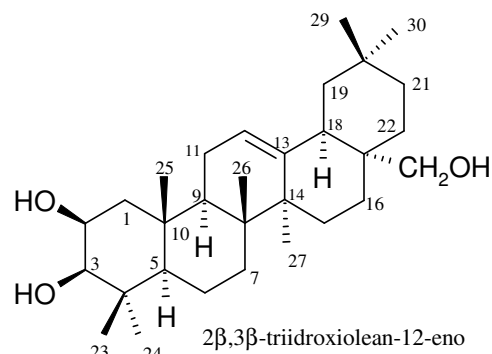
**FIGURA 3.33 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS05 – Expansão da região entre  $\delta 45$  e  $\delta 80$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

Considerando a presença de triterpenos do tipo oleano e do tipo lupano nos extratos de *Hancornia speciosa* (HS04; HS07; HS08 e HS09), foi feita uma busca na literatura por dados espectrométricos de triterpenos desses tipos que apresentassem deslocamentos químicos para carbonos olefínicos semelhantes àqueles apresentados para **HS05**. Dessa forma, os

deslocamentos químicos de **HS05** foram comparados com aqueles dos seguintes triterpenos do tipo oleano (TABELAS 3.6).

**TABELA 3.6 - Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), em comparação com dados da literatura para triterpenos do tipo oleano (AGRAWAL;JAIN,1992)**

C	HS05 ( $\delta$ )	1 ( $\delta$ )	2 ( $\delta$ )	3 ( $\delta$ )
1	38,6	38,6	38,5	47,7
2	27,2	27,2	27,2	66,6
3	79,0	79,0	78,8	78,9
4	38,8	38,8	38,7	38,8
5	55,1	55,2	55,1	48,2
6	18,3	18,4	18,4	18,6
7	32,5	32,6	32,7	33,8
8	39,7	39,8	39,7	38,2
9	47,6	47,6	47,6	47,6
10	36,9	36,9	36,8	37,1
11	23,5	23,6	23,5	22,5
12	122,3	122,3	122,1	122,0
13	144,2	144,2	144,4	144,0
14	41,7	41,7	41,7	41,5
15	25,5	25,6	<u>28,1</u>	27,8
16	22,0	22,0	27,3	22,8
17	36,9	36,9	32,4	46,3
18	42,3	42,3	46,7	43,0
19	46,4	46,5	41,9	46,4
20	31,0	31,0	35,5	31,0
21	34,0	34,1	29,6	34,0
22	31,0	31,0	36,5	33,2
23	28,1	28,1	28,1	28,3
24	15,6	15,5	15,5	21,9
25	15,6	15,5	15,5	16,9
26	16,7	16,7	16,8	17,0
27	25,9	25,9	25,9	26,1
28	69,7	69,7	28,1	72,0
29	33,2	33,2	29,6	34,0
30	23,5	23,6	66,6	22,5

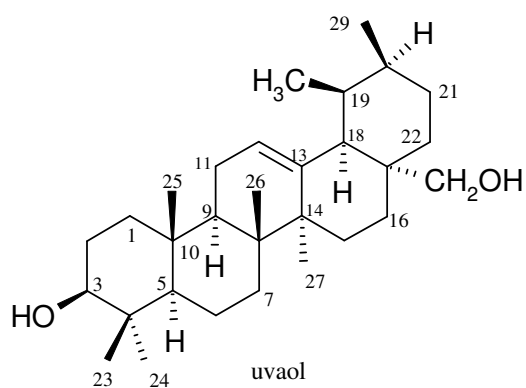
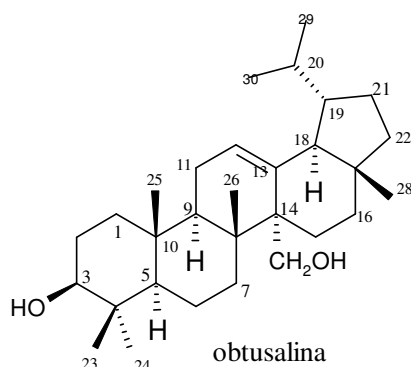


- 1- 3 $\beta$ ,28-diidroiolean-12-eno (eritrodio);
- 2- 3 $\beta$ ,30-diidroiolean-12-eno;
- 3- 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,28-triidroiolean-12-eno

Partindo do mesmo princípio, os deslocamentos químicos de **HS05** foram comparados com aqueles dos seguintes triterpenos do tipo lupano, obtusalina e uvaol (TABELA 3.7).

**TABELA 3.7 - Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), em comparação com dados da literatura para triterpenos do tipo lupano (MAHATO, KUNDU, 1994)**

C	HS05	1	2
1	38,8	38,8	38,8
2	27,2	27,3	27,3
3	79,0	79,1	79,0
4	38,0	38,0	38,8
5	55,1	55,2	55,4
6	18,3	18,4	18,4
7	32,8	32,9	32,9
8	40,0	40,1	39,4
9	47,6	47,7	47,8
10	36,9	36,9	36,8
11	23,5	23,4	23,4
12	125,0	125,1	125,0
13	138,7	138,8	138,0
14	42,0	42,1	42,8
15	23,5	23,4	29,2
16	26,0	26,0	22,6
17	38,8	38,8	37,2
18	54,0	54,4	54,1
19	39,7	39,5	38,9
20	39,3	39,4	39,4
21	30,6	30,7	30,7
22	35,2	35,2	30,6
23	28,1	28,2	28,1
24	16,7	16,8	15,4
25	15,6	15,6	15,6
26	15,6	15,7	16,9
27	69,9	69,9	23,4
28	23,3	23,3	69,7
29	21,3	21,3	16,2
30	17,3	17,3	21,3



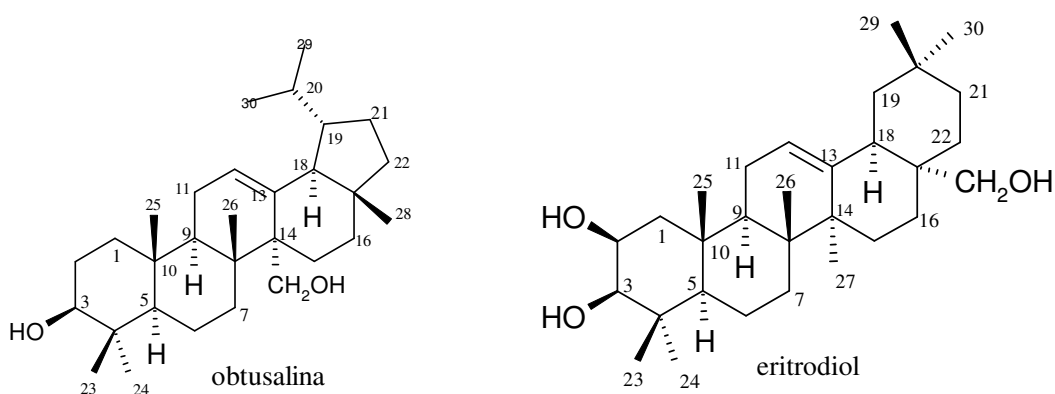
1- Obtusalina;

2- Uvaol

A comparação desses deslocamentos químicos com os dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994; AGRAWAL; JAIN, 1991; NAEED, 1991) (TABELA 3.8) sugeriu que **HS05** fosse constituído por uma mistura de eritrodiol e obtusalina.

**TABELA 3.8 - Deslocamentos químicos de HS05 em RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com os dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) para os triterpenos obtusalina e eritrodíol**

C	HS05	Obtusalina	HS05	Eritrodíol
1	38,8	38,8	38,6	38,6
2	27,2	27,3	27,2	27,2
3	79,0	79,1	79,0	79,0
4	38,0	38,0	38,8	38,8
5	55,1	55,2	55,1	55,2
6	18,3	18,4	18,3	18,4
7	32,8	32,9	32,5	32,6
8	40,0	40,1	39,7	39,8
9	47,6	47,7	47,6	47,6
10	36,9	36,9	36,9	36,9
11	23,5	23,4	23,5	23,6
12	125,0	125,1	122,3	122,3
13	138,7	138,8	144,2	144,2
14	42,0	42,1	41,7	41,7
15	23,5	23,4	25,5	25,6
16	26,0	26,0	22,0	22,0
17	38,8	38,8	36,9	36,9
18	54,0	54,4	42,3	42,3
19	39,7	39,5	46,4	46,5
20	39,3	39,4	31,0	31,0
21	30,6	30,7	34,0	34,1
22	35,2	35,2	31,0	31,0
23	28,1	28,2	28,1	28,1
24	16,7	16,8	15,6	15,5
25	15,6	15,6	15,6	15,5
26	15,6	15,7	16,7	16,7
27	69,9	69,9	25,9	25,9
28	23,3	23,3	69,7	69,7
29	21,3	21,3	33,2	33,2
30	17,3	17,3	23,5	23,6



### 3.1.6 – Acil-ésteres

#### 3.1.6.1 - HS06 – Mistura de ésteres de $\alpha$ - e $\beta$ -amirina

A fração **HS06** foi obtida a partir de cromatografia em coluna da fração hexânica EHFIII, resultante do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2), e apresentou-se como um sólido amorfo branco-amarelado (38,8 mg), solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

Na região do infravermelho ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **HS06** (FIGURA 3.34), foram observadas bandas de absorção em:  $2917\text{ cm}^{-1}$  e  $2849\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; em  $1733\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento de ligação C=O de éster;  $1469\text{ cm}^{-1}$  e  $1379\text{ cm}^{-1}$ , características de deformação angular de ligação C-H;  $1246\text{ cm}^{-1}$  e  $1174\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento de ligação C-O de éster; a banda  $989\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a deformação angular fora do plano de C-H; e em  $718\text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação angular assimétrica de ligação C-H de grupamentos metilênicos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

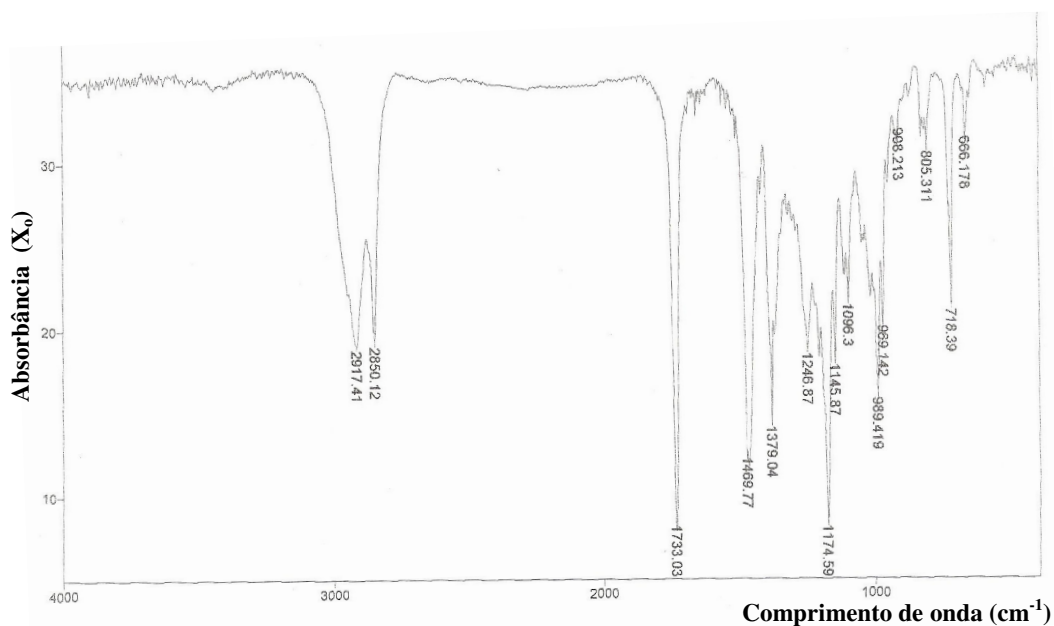
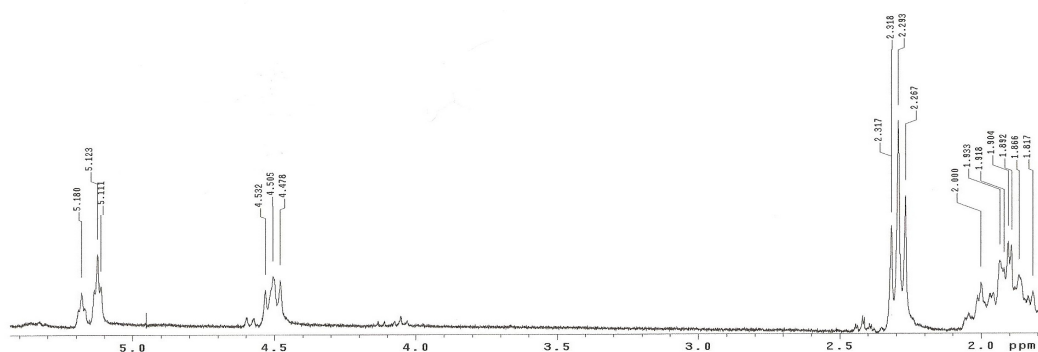


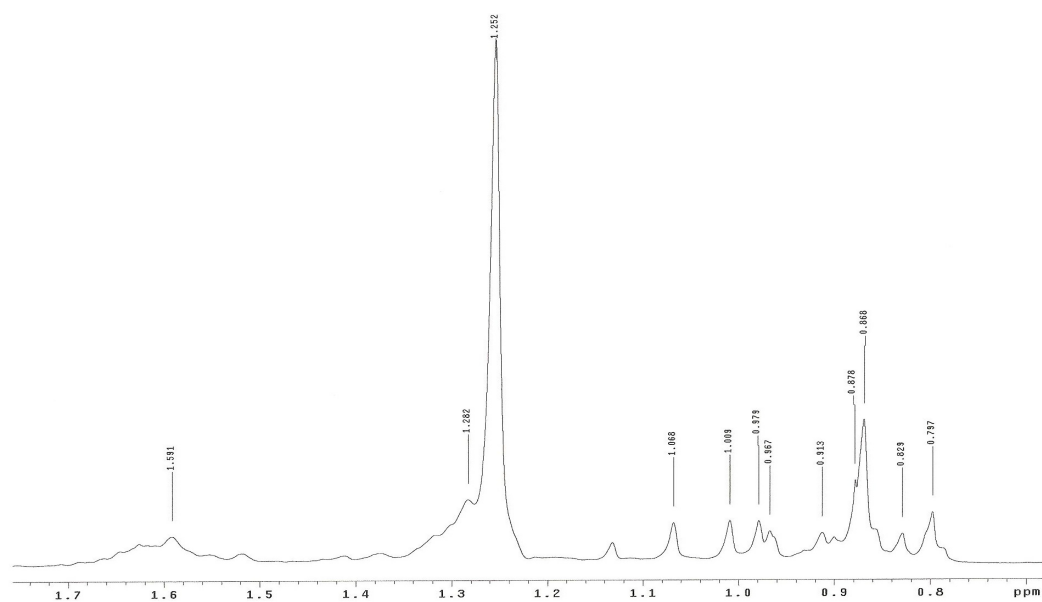
FIGURA 3.34 - Espectro na região do infravermelho de HS06 ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (FIGURAS 3.35; 3.36), forneceu sinais entre  $\delta 0,79$  e  $\delta 1,06$  correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos. A presença de

ligação C-O de éster foi evidenciada pelos sinais em:  $\delta$ 2,29 (2H, t,  $J=7,2\text{Hz}$ ), correspondente a hidrogênios em átomo de carbono ligado a oxigênio;  $\delta$ 1,81-2,0 e  $\delta$ 1,25 (sinal intenso), que correspondem a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática; e em  $\delta$ 0,86 correspondente a hidrogênios de grupo metila terminal.



**FIGURA 3.35 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS06 ( $\delta$  300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – expansão da região entre  $\delta$ 1,5 -  $\delta$ 5,5**

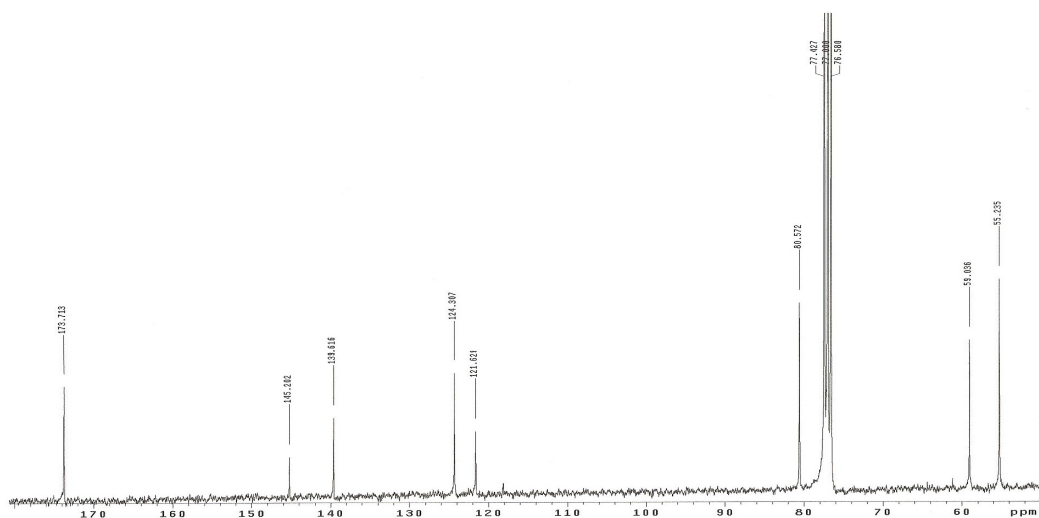


**FIGURA 3.36 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS06 – Expansão da região entre  $\delta$ 0,79 e  $\delta$ 1,59 (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

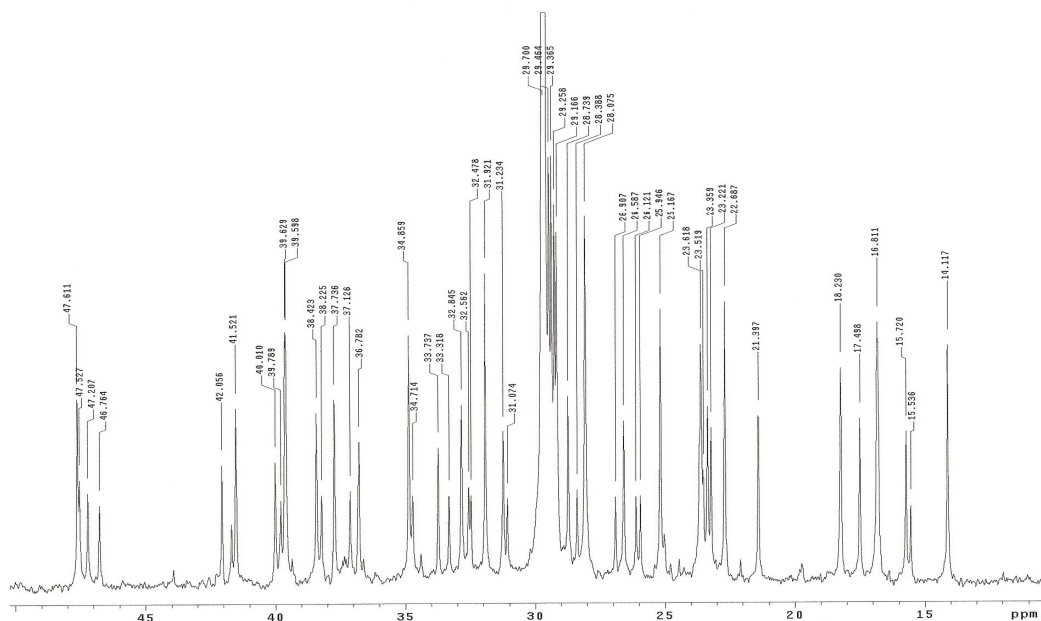


Também foram observados sinais em  $\delta$ 5,12 (1H, t,  $J=3,6$  Hz) e  $\delta$ 5,18 (t, 1H), correspondentes a hidrogênios olefínicos, e em  $\delta$ 4,5 (1H, t,  $J=8,1$ Hz), correspondente a hidrogênio oximetínico. Estes dados indicaram a presença de compostos triterpênicos  $3\beta$ -substituídos (CHATURVEDULA *et al.*, 2002).

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **HS06** (FIGURAS 3.37; 3.38), mostrou sinais correspondentes a carbonos olefínicos de esqueletos ursano e oleano: os sinais característicos correspondentes aos carbonos olefínicos C13 e C12 aparecem em  $\delta$ 139,6 e  $\delta$ 124,3 respectivamente para ursanos; e em  $\delta$ 145,1 e  $\delta$ 121,6 para oleanos (MAHATO; KUNDU, 1994, MENDES *et al.*, 1999; BARREIROS *et al.*, 2002). A presença dos sinais em  $\delta$ 14,1 e em  $\delta$  173,71 foi atribuída a carbono de grupo metila adicional e de grupo carbonílico de éster, respectivamente. Além disso, a presença de sinal em  $\delta$ 22,7, atribuído ao C2 mostrou que este estava protegido, enquanto que o sinal em  $\delta$ 80,5, com deslocamento químico maior que o esperado para o C3 de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina ( $\delta$ 78,3 e  $\delta$ 79,0, respectivamente), ocorreu devido a efeito de desproteção. Estas informações sugeriram que a esterificação ocorra na posição C3.

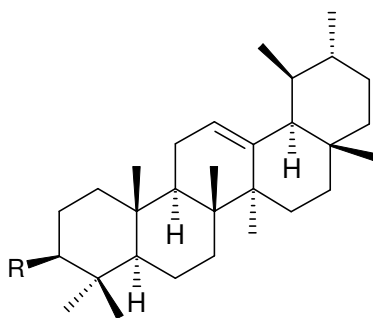


**FIGURA 3.37 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS06 – Expansão da região entre  $\delta$ 55,23 e  $\delta$ 173,71 (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

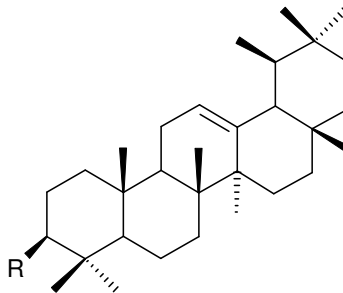


**FIGURA 3.38 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS06 – Expansão da região entre  $\delta 14,11$  e  $\delta 47,61$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

As informações obtidas por análises espectroscópicas no IV e de RMN de **HS06**, comparadas à literatura, permitiram a observação de sinais característicos dos compostos triterpênicos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, substituídos por moléculas de ácidos graxos na posição  $3\beta$ . Além disso, foram encontrados na amostra citada, os 33 sinais referentes ao composto palmitato de  $\beta$ -amirina (TABELA 3.9). Contudo se faz necessário a realização de análises complementares para elucidação das estruturas em questão.



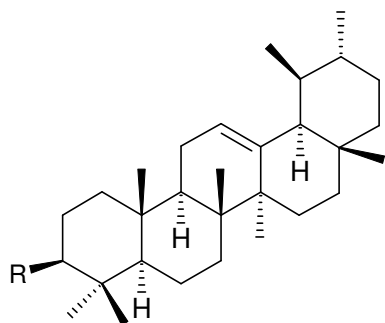
$\alpha$ -amirina: R = H  
 HSO6 R =  $\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$



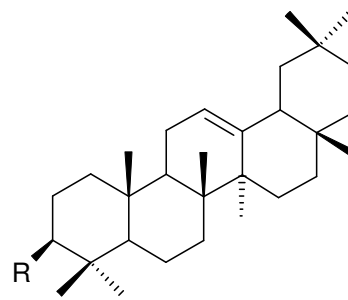
$\beta$ -amirina R = H  
 HSO6 R =  $\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$

TABELA 3.9 - Deslocamentos químicos de HS06 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com os dados da literatura ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) ( $^1$ MAHATO KUNDU, 1994;  $^2$ BARREIROS *et al.*, 2002)

C	$\alpha$ -amirina $^1$ ( $\delta$ )	$\beta$ -amirina $^1$ ( $\delta$ )	Palmitato de $\beta$ -amirina $^2$ ( $\delta$ )	HS06( $\delta$ )
1	38,7	38,7	38,2	38,2
2	27,2	27,3	22,7	22,7
3	78,3	79,0	80,6	80,6
4	38,7	38,8	37,7	37,7
5	55,2	55,3	55,2	55,2
6	18,3	18,5	18,2	18,2
7	32,9	32,8	32,8	32,8
8	40,0	38,8	39,7	39,8
9	47,7	47,7	47,1	47,2
10	36,9	37,6	36,9	36,8
11	23,3	23,6	23,5	23,4
12	124,3	121,8	121,6	121,6
13	139,3	145,1	145,0	145,1
14	42,0	41,8	41,6	41,5
15	28,7	26,2	26,8	26,9
16	26,6	27,0	26,0	26,1
17	33,7	32,5	32,3	32,4
18	58,9	47,4	47,8	47,6
19	39,6	46,9	47,4	47,5
20	39,6	31,1	31,1	31,1
21	31,2	34,8	35,6	36,8
22	41,5	37,2	37,1	37,1
23	28,1	28,2	28,4	28,4
24	15,6	15,5	16,6	16,8
25	15,6	15,6	15,6	15,7
26	16,8	16,9	16,8	16,8
27	23,3	26,0	25,9	25,9
28	28,1	28,4	28,0	28,1
29	17,4	33,3	33,4	33,3
30	21,3	23,7	23,6	23,6
(COO)			173,6	173,7
CH <sub>3</sub>			14,1	14,1
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>			29,6	29,7



$\alpha$ -amirina: R = H  
HSO6 R =  $\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$



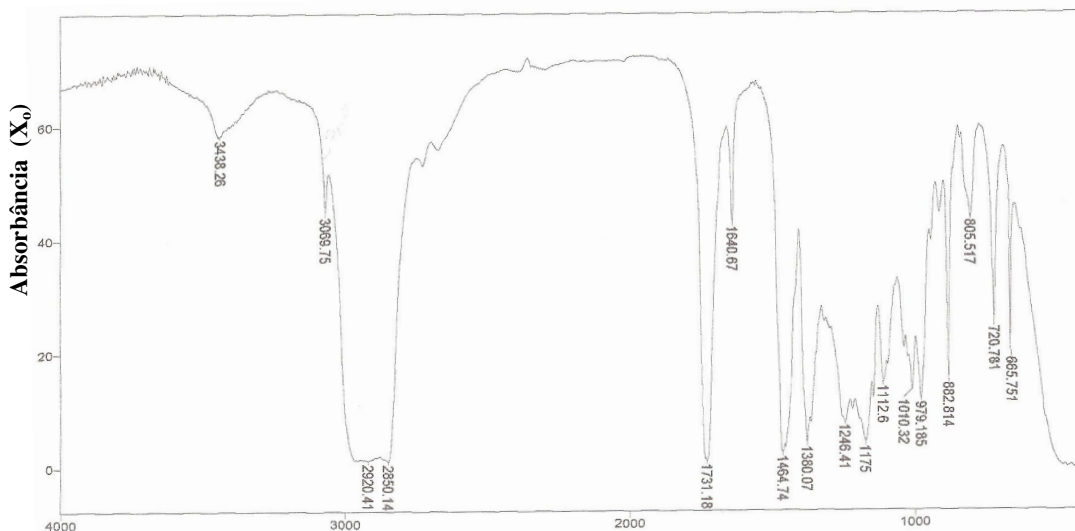
$\beta$ -amirina R = H  
HSO6 R =  $\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$

### 3.1.6.2 - Lupeol 3 $\beta$ -O-acilado

#### a) HS07

**HS07** foi obtida na forma de um sólido branco-amarelado (47,9 mg), após CC da fração hexânica EHFIII resultante do fracionamento do extrato bruto hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2).

A análise do espectro na região do IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **HS07** (FIGURA 3.39), revelou bandas de absorção em:  $3069\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a estiramento de ligação C-H de carbono  $\text{sp}^2$ ; em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , a estiramento de ligação C-H de carbono  $\text{sp}^3$ ; em  $1731\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação C=O de éster; em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , a estiramento de ligação C=C;  $1246\text{ cm}^{-1}$  e  $1175\text{ cm}^{-1}$ , absorções atribuídas a estiramento de ligação C-O de éster e ainda em  $979\text{ cm}^{-1}$  e  $882\text{ cm}^{-1}$ , que caracterizam deformação de ligação C-H fora do plano.



**FIGURA 3.39 - Espectro na região do infravermelho de HS07 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (FIGURAS 3.40 a 3.42) forneceu sinais entre  $\delta 0,76$  e  $\delta 1,61$  correspondentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos. Além disso, foram observados sinais em:  $\delta 1,18$  relativo a hidrogênios metilênicos de cadeia alifática;  $\delta 0,79$ , a grupo metila terminal;  $\delta 5,22$ - $\delta 5,29$ , região de hidrogênios olefínicos dos triterpenos das classes ursano e oleano;  $\delta 4,6$  (*d*,  $J = 2,7\text{ Hz}$ ) atribuído a hidrogênios da dupla exocíclica em C29 para triterpenos com esqueleto lupano; um duplo-dupletto em  $\delta 4,49$  ( $J = 1,5$  e  $3,9\text{ Hz}$ )

que sugeriu a presença de um grupo hidroxila esterificado na posição C3 do esqueleto triterpênico (ABREU *et al.*, 2001; CHATURVEDULA *et al.*, 2002).

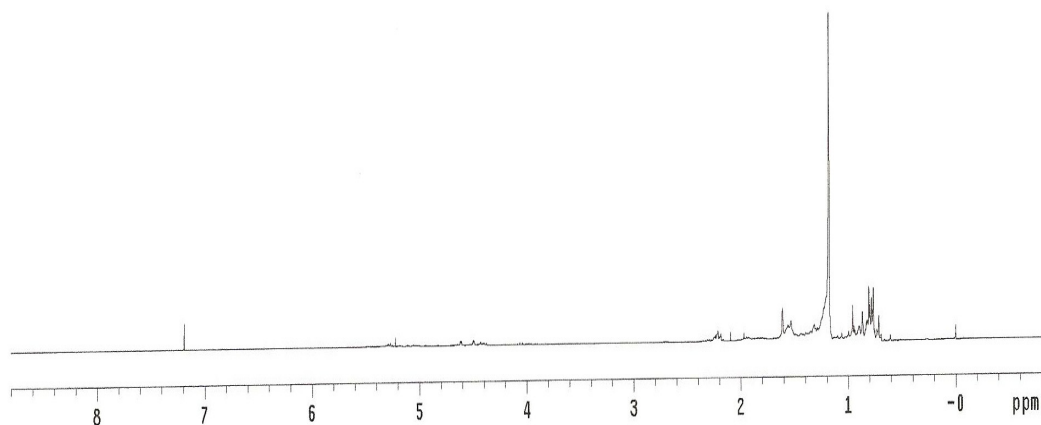


FIGURA 3.40 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS07 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

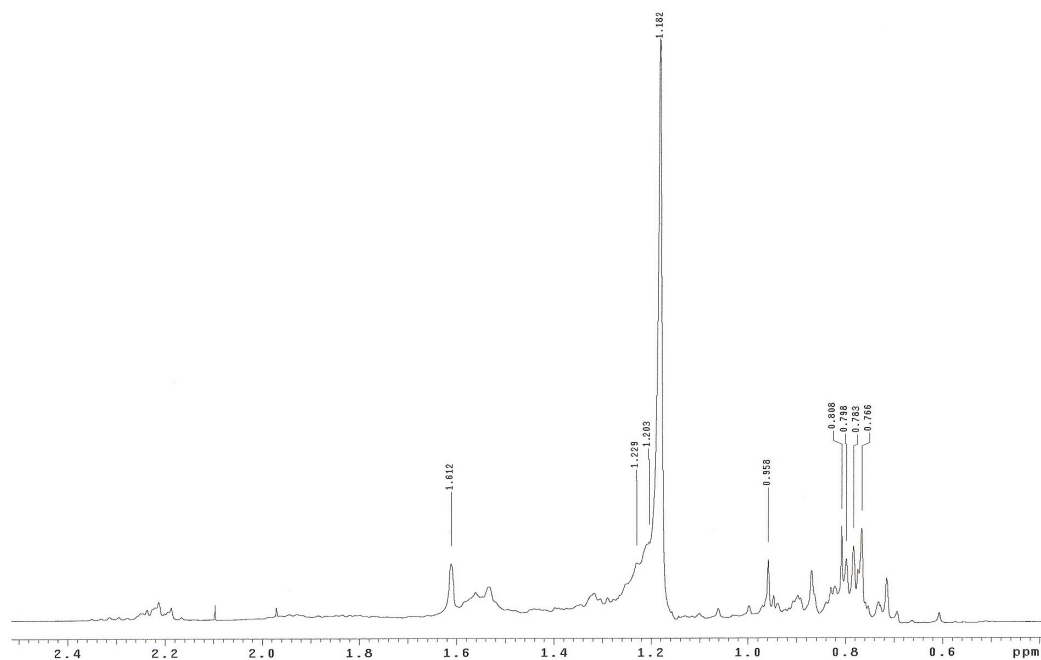
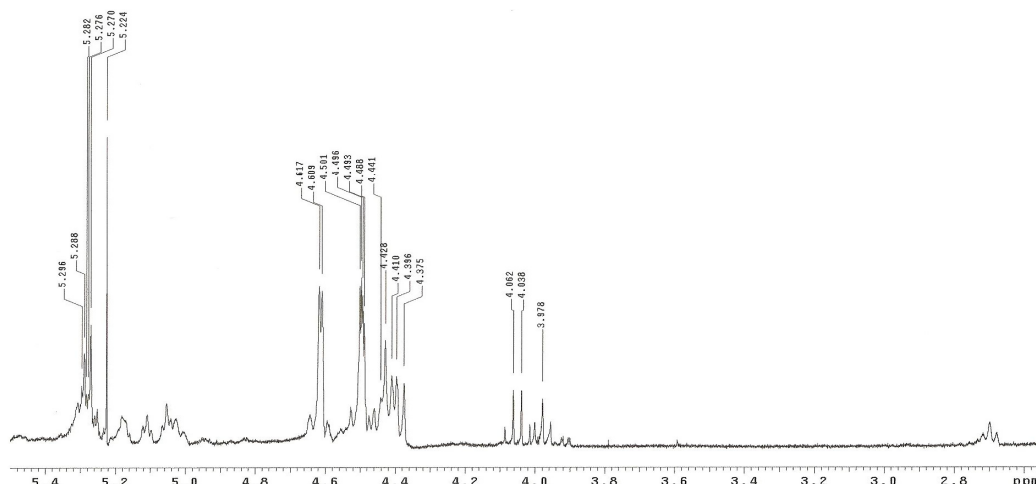
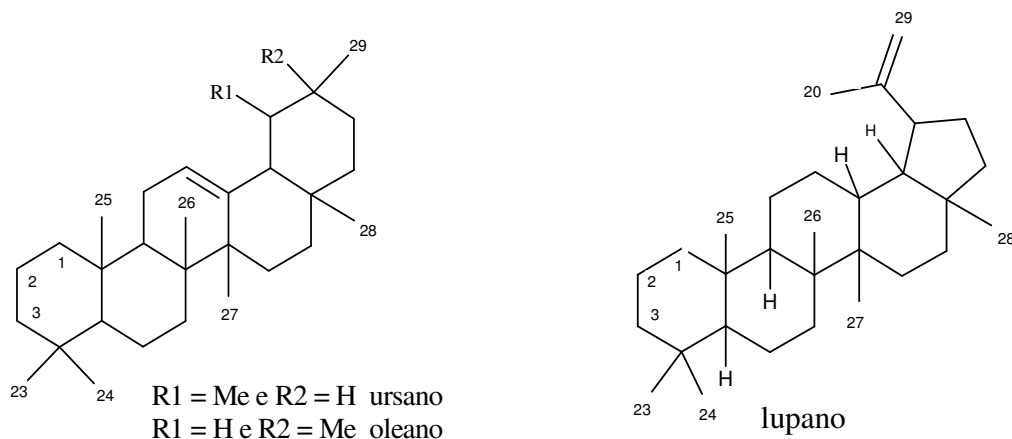


FIGURA 3.41 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HS07 – Expansão da região entre δ0,6 e δ2,4 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**FIGURA 3.42 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS07 – Expansão da região entre  $\delta 2,8$  e  $\delta 5,4$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **HS07** (FIGURAS 3.43 a 3.45) mostrou, na região de carbonos olefínicos, sinais característicos dos carbonos C12 e C13 de esqueletos ursano ( $\delta 139,7$  e  $\delta 124,3$ ) e oleano ( $\delta 145,1$  e  $\delta 121,6$ ) e dos carbonos C20 e C29 de esqueleto lupano ( $\delta 150,9$  e  $\delta 109,3$ ). Também foi possível observar a presença de sinais de carbonos carbonílicos de ésteres ( $\delta 173,69$  e  $\delta 173,28$ ) e outros que evidenciaram a ocorrência de efeito de proteção para o sinal do carbono C2 ( $\delta 4,6$  e  $\delta 3,7$ ) e de desproteção ( $\delta 1,3$ -  $\delta 1,7$ ) para o carbono C3, cujos sinais aparecem em uma frequência mais alta ( $\delta 80,77$ ;  $\delta 80,31$  e  $\delta 80,59$ ), quando comparados a compostos triterpênicos da classe dos ursanos, oleanos e lupanos, tais como:  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina e lupeol ( $\delta 78,3$ ;  $\delta 79,0$  e  $\delta 78,9$ , respectivamente). Estes dados foram indicativos de que estes compostos poderiam estar presentes na amostra na forma de ésteres de ácidos graxos na posição C-3 (DAVID *et al.*, 2003, MENDES *et al.*, 1999; MAHATO; KUNDU, 1994, BARREIROS *et al.*, 2002).



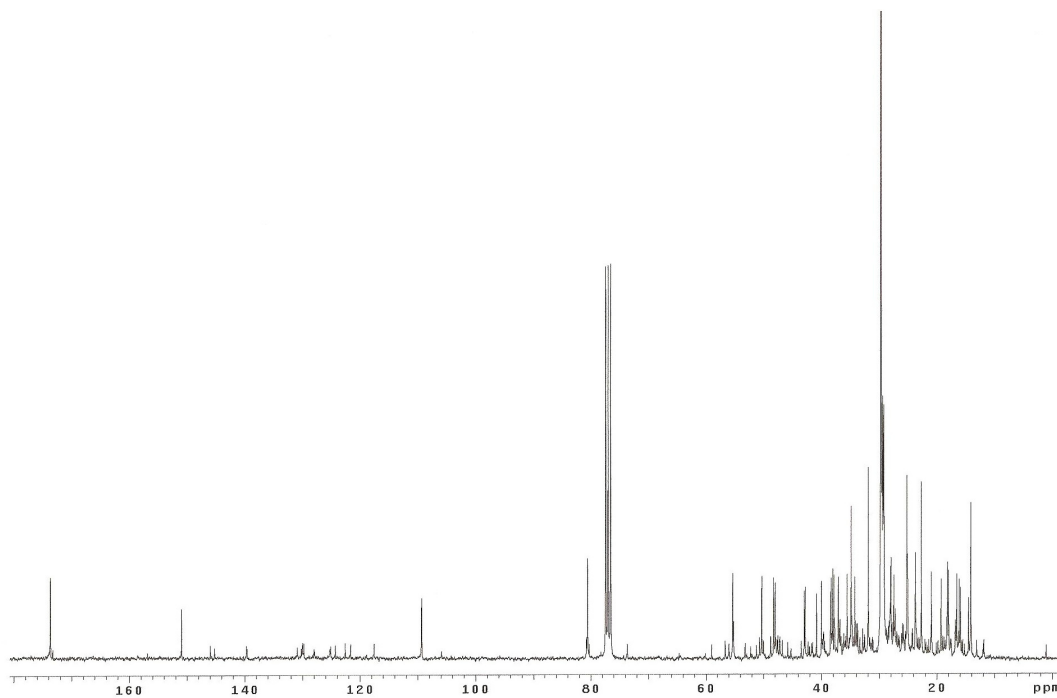


FIGURA 3.43 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS07 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

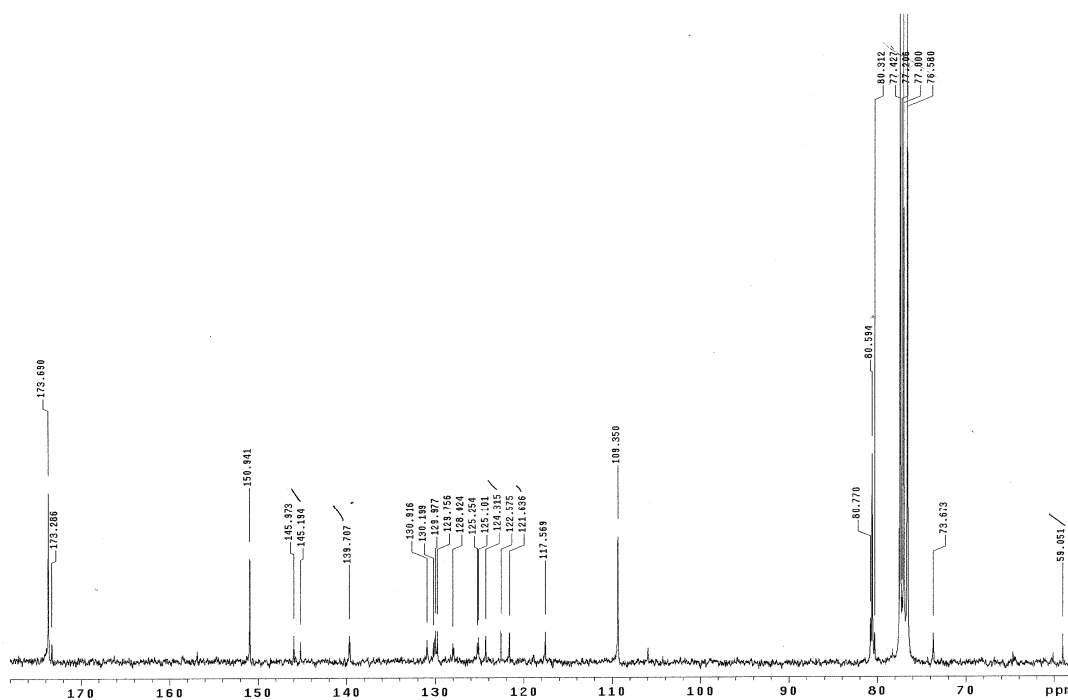
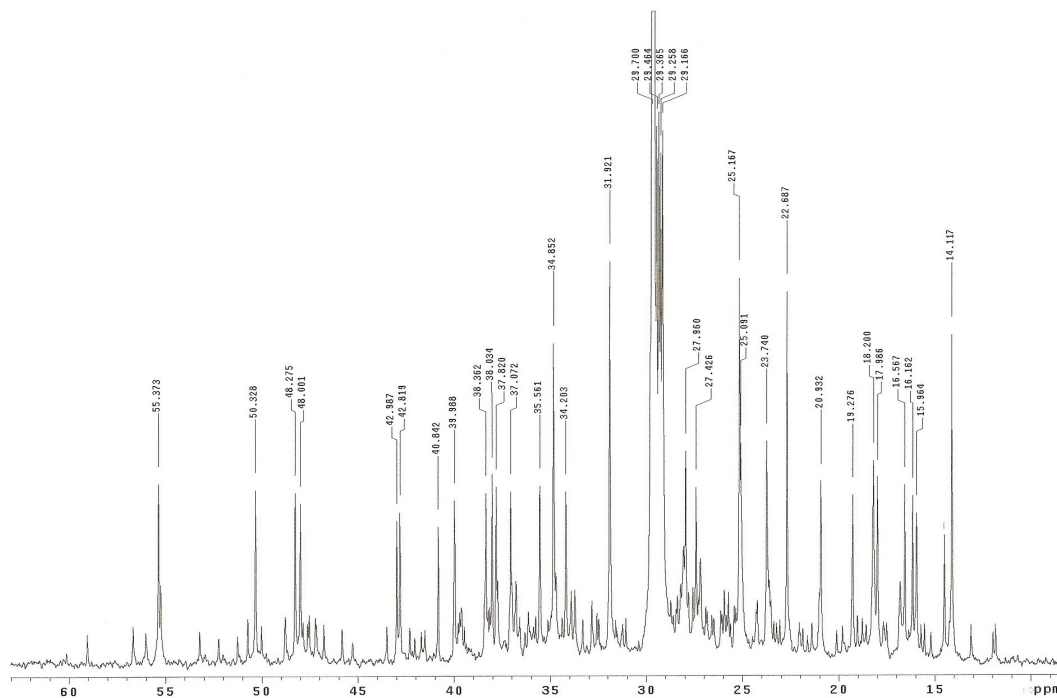


FIGURA 3.44 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS07 – Expansão da região entre δ58 e δ178 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**FIGURA 3.45 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS07 – Expansão da região entre  $\delta 10$  e  $\delta 60,0$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

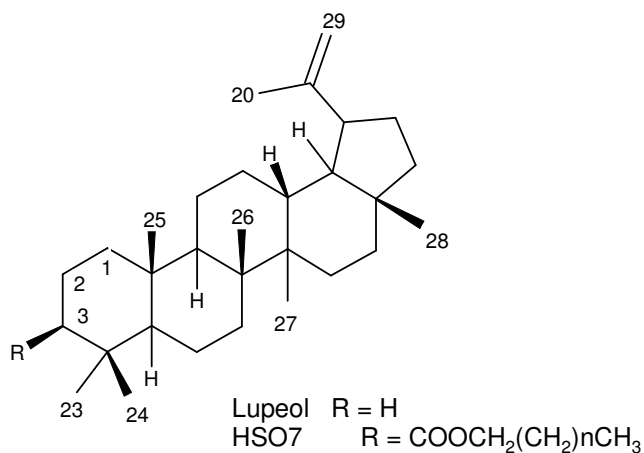
A presença de derivados de lupeol  $3\beta$ -O-acilados foi corroborada pelos dados espectrais no espectro de IV que mostrou sinais referentes a grupo carbonílico de grupo éster em  $1731\text{ cm}^{-1}$ , bem como sinais de carbono carbonílico de grupo éster. Os sinais em  $\delta 23,74$ ;  $\delta 80,59$  e  $\delta 16,56$  correspondem, respectivamente, aos deslocamentos para os carbonos C2, C3 e C24, típicos de derivados  $3\beta$ -O-acilados do lupeol (DAVID *et al.*, 2003, MENDES *et al.*, 1999; MAHATO; KUNDU, 1994, BARREIROS *et al.*, 2002).

O sinal em  $\delta 34,85$  corresponde ao grupo metilênico em posição  $\alpha$  à carbonila e os deslocamentos entre  $\delta 29,25$  e  $\delta 29,70$  correspondem a grupos  $-(\text{CH}_2)_n-$  de cadeia alifática de ácidos graxos. A análise dos dados apresentados e comparação com a literatura, sugeriram que **HS07** apresenta em sua composição uma mistura de ésteres triterpênicos, principalmente do tipo lupeol  $3\beta$ -O-acilados, semelhante à descrita na literatura (TOMOSAKA *et al.*, 2001) (TABELA 3.10).



**TABELA 3.10 - Deslocamentos químicos de HS07 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com os dados da literatura para lupeol e derivados acilados (MAHATO; KUNDU, 1994<sup>1</sup>; TOMOSAKA *et al.*, 2001<sup>2</sup>)**

C	HS07 ( $\delta$ )	Acil-lupeol <sup>1</sup> ( $\delta$ )	Lupeol <sup>2</sup> ( $\delta$ )	C	HS07 ( $\delta$ )	acil-lupeol <sup>1</sup> ( $\delta$ )	Lupeol <sup>2</sup> ( $\delta$ )
1	38,36	38,37	38.7	20	150,94	150,97	150.9
2	23,74	23,74	27.4	21	29,7	29,82	29.8
3	80,59	80,60	78.9	22	39,98	39,99	40.0
4	37,82	37,83	38.8	23	27,96	27,96	28.0
5	55,37	55,37	55.3	24	16,96	16,96	15.4
6	18,2	18,19	18.3	25	16,16	16,16	16.1
7	34,20	34,21	34.2	26	15,96	15,96	15.9
8	40,84	40,84	40.8	27	14,51	14,51	14.5
9	50,33	50,32	50.4	28	17,98	17,99	18.0
10	37,07	37,08	37.1	29	109,35	109,34	109.3
11	20,93	20,94	20.9	30	19,27	19,28	19.3
12	25,09	25,09	25.1	CO	173,69	173,71	
13	38,03	38,04	38.0	COCH <sub>2</sub>	34,85	34,86	
14	42,81	42,82	42.8	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	25,16	25,16	
15	27,42	27,42	27.4	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	29,16	29,17	
16	35,56	35,56	35.5	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> - $\omega$ 4	29,25-29,70	29,25-29,70	
17	42,98	42,98	43.0	$\omega$ 3	31,92	31,92	
18	48,27	48,28	48.2	$\omega$ 2	22,68	22,69	
19	48	48	47.9	$\omega$ 1	14,11	14,12	



## b) HS08 e HS09

**HS08** (57,3 mg) e **HS09** ((22,8 mg) foram obtidas a partir da purificação, por CC das frações EHFIII e EHFV resultantes do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *H. speciosa* (FLUXOGRAMA 2.2). Apresentaram-se na forma de sólido de cor branca, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

Os espectros na região do infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) para **HS08** (FIGURA 3.46) e **HS09** (FIGURA 3.47) foram semelhantes e mostraram bandas de absorção em:  $3487\text{cm}^{-1}$  (**HS08**) e em  $3459\text{cm}^{-1}$  (**HS09**), referente a estiramento de ligação O-H;  $3071\text{cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação C-H de carbono  $\text{sp}^2$ ;  $2963\text{cm}^{-1}$ ,  $2918\text{cm}^{-1}$  e  $2849\text{cm}^{-1}$  (**HS08**) e em  $2918\text{cm}^{-1}$  e  $2851\text{cm}^{-1}$  (**HS09**), referentes a estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos;  $1732\text{cm}^{-1}$  e  $1700\text{cm}^{-1}$  (**HS08**) e em  $1730\text{cm}^{-1}$  e  $1707\text{cm}^{-1}$  (**HS09**), referentes a estiramento de ligação C=O de éster;  $1640\text{cm}^{-1}$  (**HS08** e **HS09**), referente a estiramento de ligação C=C de olefinas;  $1466$  e  $1380\text{cm}^{-1}$  (**HS08** e **HS09**), pela deformação angular de ligação C-H;  $1095\text{cm}^{-1}$ ,  $1021\text{cm}^{-1}$  e  $1262\text{cm}^{-1}$  (**HS08**) e em  $1261\text{cm}^{-1}$  e  $1181\text{cm}^{-1}$  (**HS09**), pelo estiramento de ligação C-O de éster;  $800\text{cm}^{-1}$  (**HS08**) e em  $883\text{cm}^{-1}$  (**HS09**), deformação angular fora do plano de C-H olefínico; e  $721\text{cm}^{-1}$  (**HS09**): deformação angular assimétrica no plano de carbonos metilênicos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

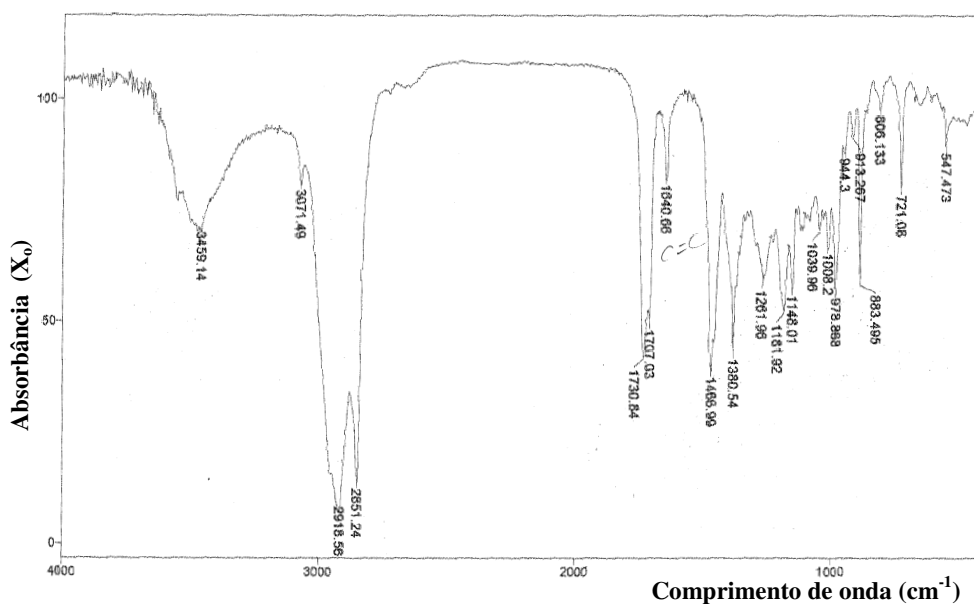


FIGURA 3.46 - Espectro na região do infravermelho de HS09 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

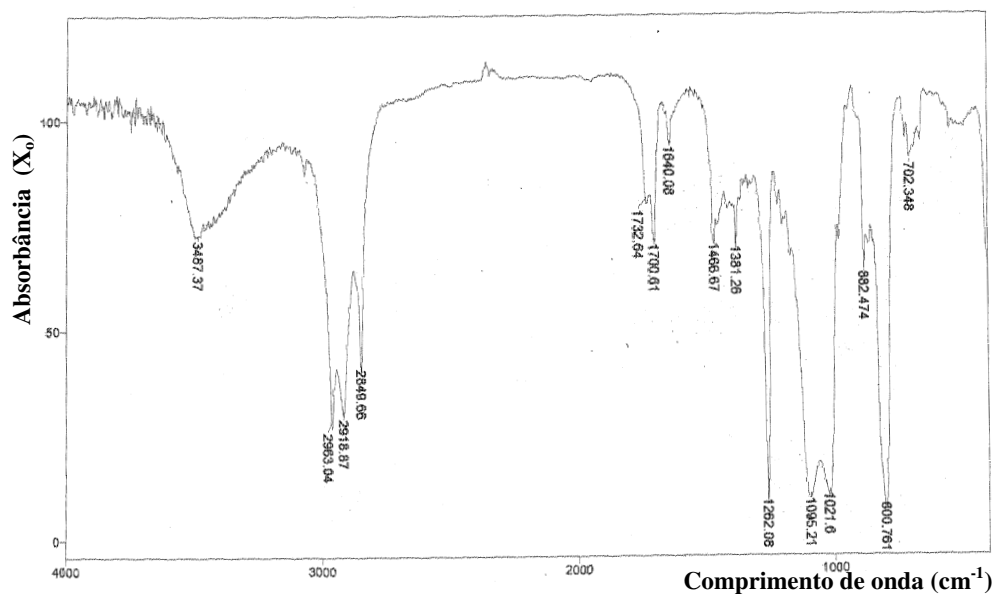


FIGURA 3.47 - Espectro na região do infravermelho de HS08 (KBr, cm<sup>-1</sup>)

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **HS08** (FIGURAS 3.48 e 3.49) e **HS09** (FIGURAS 3.50 e 3.51), mostraram, na região das olefinas, sinais característicos de dupla ligação em compostos com esqueleto lupano, que apresentam grupamento isoprenila com deslocamentos químicos específicos em δ19,2; δ150,9 e δ109,3 para os carbonos C30, C20 e C29, respectivamente (AGUIAR *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2001; CHATURVEDULA *et al.*, 2004; BHATTACHARYA; BARROS, 1986; MEBE *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2003;); e sinais característicos de carbonila de éster (ABREU *et al.*, 2001; CHATURVEDULA *et al.*, 2002), também foram observados em δ172, 3 (**HS08**) e em δ172,85 (**HS09**)

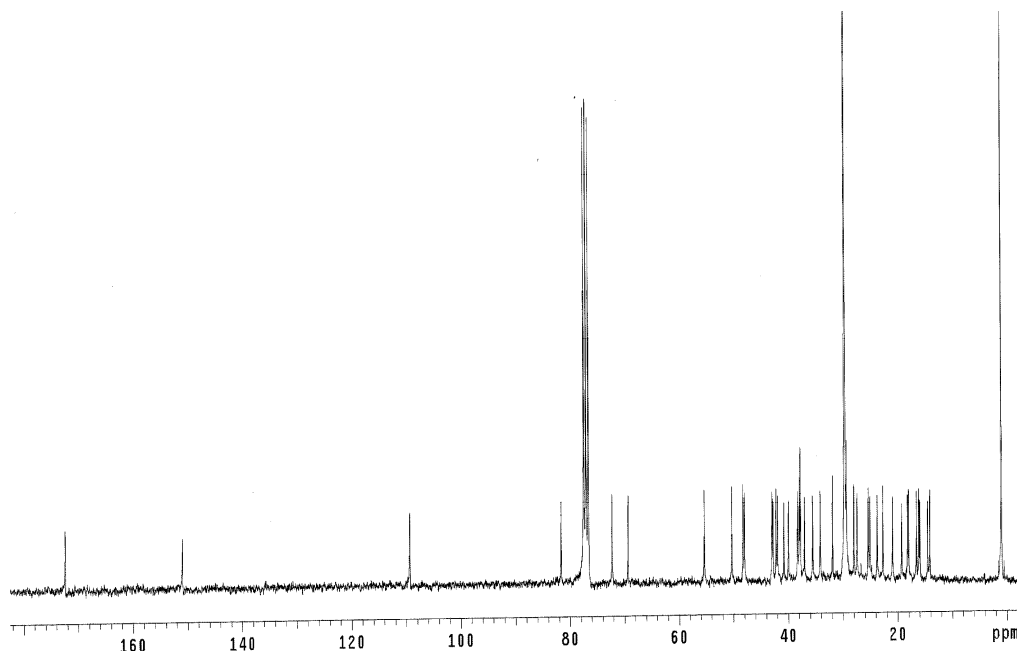


FIGURA 3.48 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS08 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

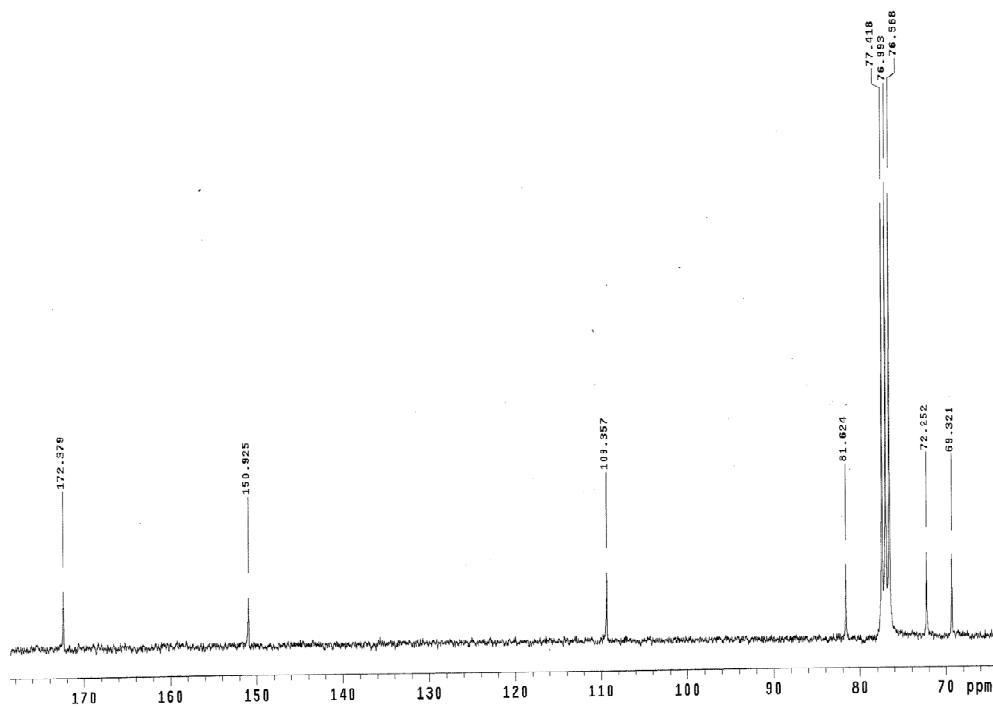


FIGURA 3.49 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS08 – Expansão da região entre δ66,0 e δ178,0 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

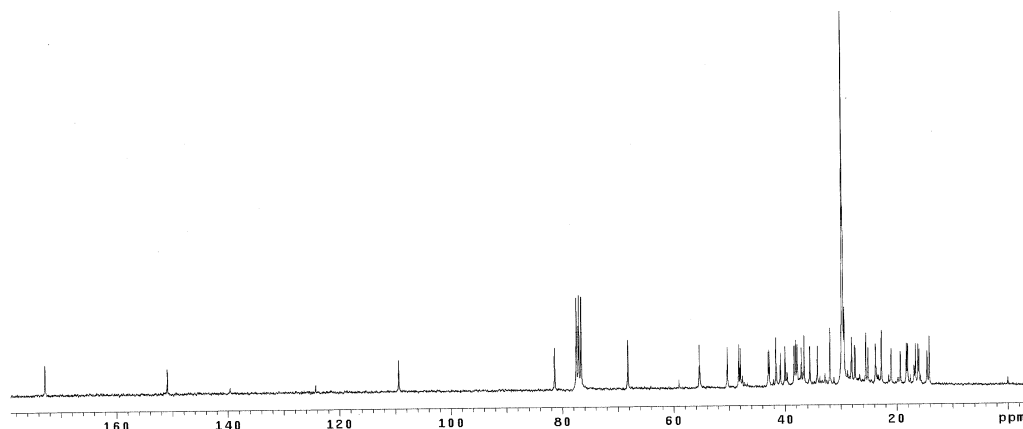


FIGURA 3.50 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS09 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

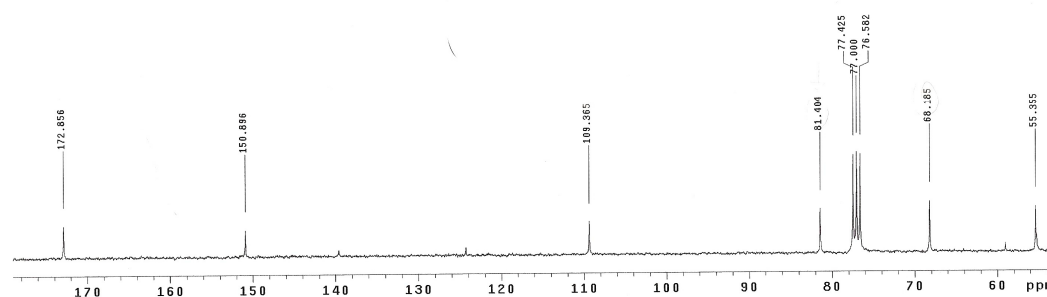


FIGURA 3.51 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS09 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Expansão da região entre  $\delta 55,0$  e  $\delta 173,0$

Ainda, foram observados sinais correspondentes a carbonos sustentando grupos hidroxila em  $\delta 69,32$  e  $\delta 72,2$  para **HS08** (FIGURA 3.49) e em  $\delta 68,18$ , para **HS09** (FIGURA 3.51)

Considerando que os espectros de **HS08** e **HS09** apresentaram sinais que foram atribuídos a carbonos oximetínicos de ésteres em C3, os sinais  $\delta 68,18$ ,  $\delta 69,32$  e  $\delta 72,2$  indicaram a presença de hidroxilas adicionais no núcleo triterpênico.

Assim, a comparação com a literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) levou à proposição de que **HS08** e **HS09** poderiam apresentar oxidação nos carbonos C23, C15, C11 ou C1. A oxidação em qualquer dessas posições levaria a, pelo menos, alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos vizinhos. Contudo, a análise dos dados obtidos mostrou que não houve mudanças significativas no deslocamento químico dos carbonos do

esqueleto triterpênico de **HSO8** e **HSO9**, quando comparados com o lupeol, levando à conclusão de que a oxidação não ocorreu no núcleo triterpênico.

A semelhança dos dados espectrométricos de **HSO8** e **HSO9** com aqueles de compostos anteriormente descritos (SOBRINHO *et al.*, 2001), levou à conclusão que a oxidação tenha ocorrido na cadeia alifática do ácido graxo esterificado com o núcleo triterpênico em C3.

Os sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta 81,4$  (**HSO9**) e  $\delta 81,6$  (**HSO8**) são compatíveis com hidroxila substituída na posição 3- $\beta$  da cadeia carbônica dos triterpenos. A conformação desse grupo foi determinada por comparação com os valores registrados na literatura para lupeol e seus derivados: o deslocamento químico do sinal correspondente ao C3 varia de acordo com a estereoquímica do grupo hidroxila (ou derivado éster ou éter) presente, ocorrendo em torno de  $\delta 75,0$  quando esse está em configuração 3- $\alpha$  (SOUZA *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 1998), e entre  $\delta 78,9$  e  $\delta 79,05$  quando em 3- $\beta$  (JIANG *et al.*, 1995; MEBE *et al.*, 1998; CHATURVEDULA *et al.*, 2004).

Entretanto, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **HSO8** e **HSO9** mostraram que C3 sofreu efeito de desblindagem e o sinal correspondente apresentou deslocamento químico  $+ \delta 2,5$  para **HSO9** e  $+ \delta 2,7$  para **HSO8**, em relação a carbono portador de hidroxila livre na posição 3- $\beta$  de outros triterpenos. Também foi observado um efeito de proteção para o carbono C2 ( $\delta 23,73$ ) e C4 ( $\delta 37,77$ ), de  $- \delta 3,69$  e  $- \delta 1,02$ , respectivamente, em comparação com o lupeol (DAVID *et al.*, 2003, MENDES *et al.*, 1999; MAHATO; KUNDU, 1994; BARREIROS *et al.*, 2002).

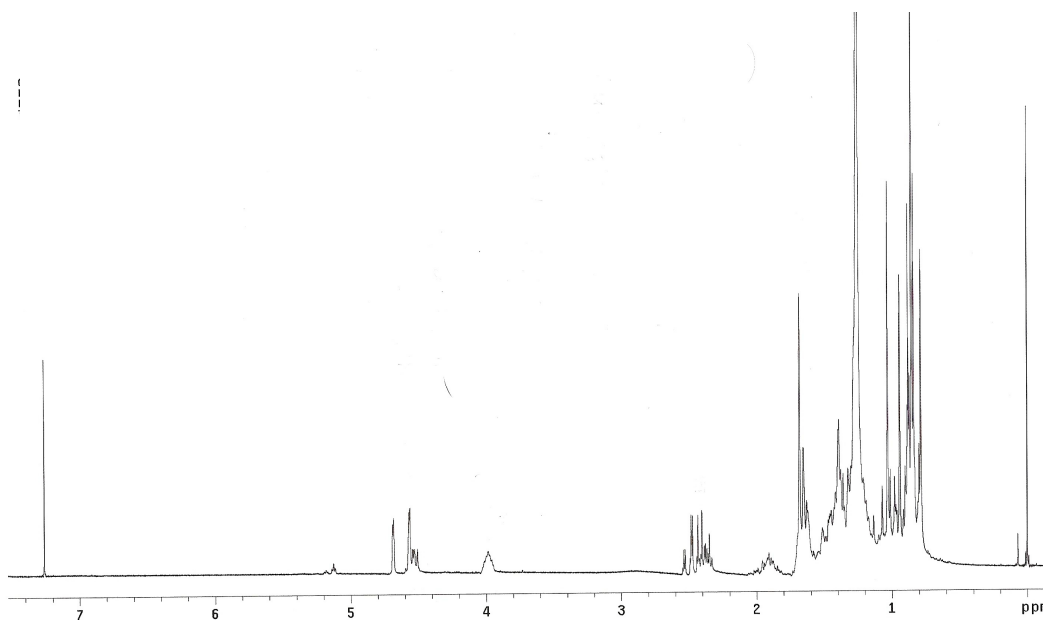
Outra evidência de esterificação em posição 3- $\beta$  em **HSO8** e em **HSO9** são os deslocamentos dos carbonos vizinhos. Os valores dos deslocamentos para C1 ( $\delta 38,3$ ) e C5 ( $\delta 55,3$ ) indicaram que o éster está no mesmo plano e assim, interagindo com esses carbonos deslocando-os para uma região mais protegida.

Caso estivessem em configurações opostas, os carbonos não sofreriam efeito de desblindagem pelo oxigênio e os sinais do deslocamento químico ocorreriam em  $\delta 34,0$  para C1 e em  $\delta 49,5$  para C5 (CARVALHO *et al.*, 1998).

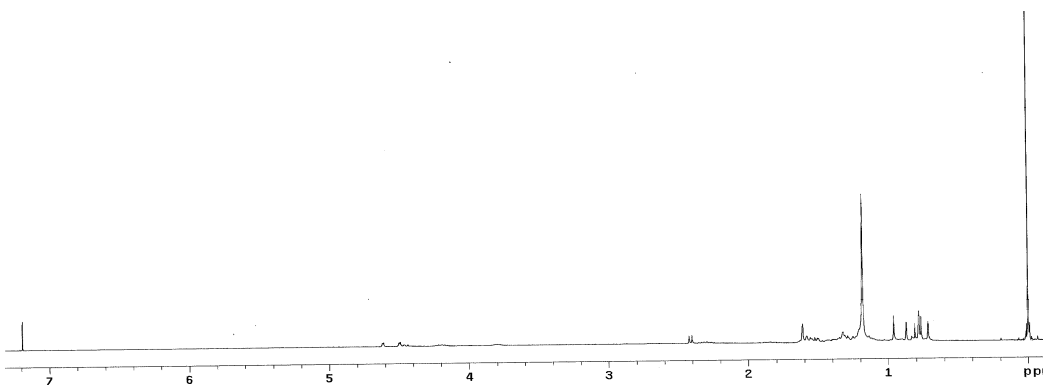
Os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também contribuíram para determinação da conformação de C-3. No lupeol, quando H-3 está em configuração  $\beta$ , o deslocamento ocorre em torno de  $\delta 3,40$ ; quando em  $\alpha$ , em  $\delta 3,20$  (SOUZA *et al.*, 2001).

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **HSO8** (FIGURAS 3.53) e de **HSO9** (FIGURA 3.52), pôde ser observada a ausência do sinal referente ao deslocamento químico nessa região; e a

presença de um multipletto em  $\delta 4,53$ , que sugeriu que a hidroxila em C3 se encontrava esterificada, corroborando com os dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .



**FIGURA 3.52-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS09 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**FIGURA 3.53 -** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS08 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Além desses, outros sinais importantes foram observados em:  $\delta 1,25$  (hidrogênios metilênicos de cadeia alifática);  $\delta 1,68$  (hidrogênios de grupo metila em C30) e multipletto entre  $\delta 2,57 - \delta 2,37$  (hidrogênios em C19 e C2') (JIANG *et al.*, 1995; JUNGES *et al.*, 1999; SOBRINHO *et al* 1991). Os sinais em  $\delta 4,56$  e  $\delta 4,68$  referem-se aos dois hidrogênios da ligação dupla vinilidênica em  $29\alpha$  e  $29\beta$ .

Estes sinais, somados ao deslocamento químico em  $\delta 1,68$  são característicos de hidrogênios pertencentes a um grupamento isopropenila, sugerindo que **HS08** e **HS09** se tratam de triterpenos pentacíclicos do tipo lupeno (JIANG *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1998; AGUIAR *et al.*, 2005). Também foi observada uma variedade de sinais entre  $\delta 0,76$  e  $\delta 2,6$  correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos. As hidroxilas adicionais estão representadas pelos deslocamentos químicos em  $\delta 3,98$  (s; H3') e  $\delta 3,86$  (s; H5') para **HS09**, e entre  $\delta 4,32$ -  $\delta 4,22$  (m; H3') para **HS08** (SOBRINHO *et al* 1991).

Esses dados aliados à presença de sinal correspondente ao deslocamento químico de carbono de carbonila de éster em e à presença de sinais intensos na região entre  $\delta 29,35$  e  $\delta 29,68$  no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e em  $\delta 1,25$  no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sugeriram que C3 encontrava-se esterificado com compostos alifáticos de cadeia longa (DAVID *et al.*, 2003, TORIUMI *et al*, 2003; BARREIROS *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 1999; MAHATO; KUNDU, 1994).

Dessa forma foi feita uma busca na literatura por dados espectrométricos de triterpenos com essas características, que apresentassem deslocamentos químicos para carbonos olefínicos semelhantes com aqueles apresentados para **HS08** e **HS09**. Esses dados estão apresentados na TABELA 3.11.

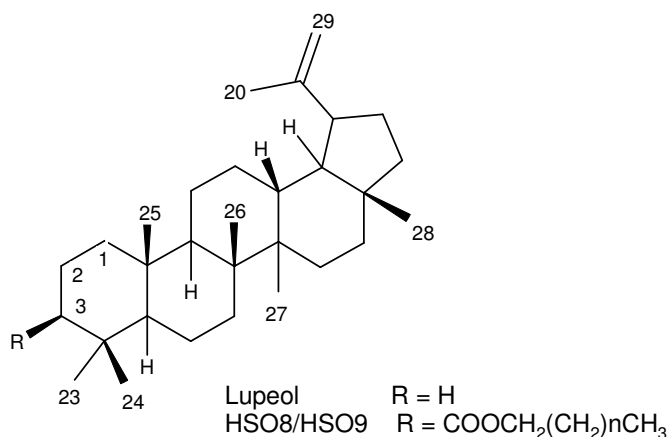




TABELA 3.11 - Deslocamentos químicos de HS08 e HS09 em RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) em comparação com os dados da literatura para lupeol e seus derivados acilados ( $^1$ SOBRINHO *et al.*, 1991;  $^2$ SOUZA *et al.*, 2001)

C	HS09 <sup>(6)</sup>	Acil-lupeol <sup>1(6)</sup>	HS08 <sup>(6)</sup>	Acil-lupeol <sup>1(6)</sup>	Lupeol <sup>2(6)</sup>	Epilupeol <sup>2(6)</sup>
1	38,32	38,37	38,31	38,26	38,7	32,5
2	23,73	23,74	23,71	23,65	27,4	25,3
3	81,40	81,33	81,62	81,40	78,9	76,4
4	37,77	37,78	37,81	37,70	38,8	37,6
5	55,35	55,36	55,34	55,26	55,3	48,2
6	18,18	18,21	18,16	18,12	18,3	18,4
7	34,16	34,20	34,15	34,12	34,2	34,4
8	40,81	40,82	40,81	40,74	40,8	41,1
9	50,30	50,33	50,29	50,23	50,4	50,5
10	37,77	37,69	37,81	36,97	37,1	37,3
11	20,92	20,97	20,92	20,88	20,9	21,2
12	25,05	25,09	25,05	24,99	25,1	25,3
13	38,01	38,04	37,99	37,95	38,0	38,0
14	42,81	42,81	42,80	42,73	42,8	43,0
15	27,40	27,43	27,40	27,36	27,4	27,6
16	35,54	35,57	35,53	35,48	35,5	35,8
17	42,81	42,86	42,80	42,88	43,0	43,2
18	48,25	48,23	48,24	48,19	48,2	48,2
19	47,97	47,97	47,97	47,89	47,9	48,2
20	150,89	150,71	150,92	150,63	150,9	151,2
21	29,68	29,80	29,68	29,63	29,8	29,9
22	39,97	39,99	39,96	39,91	40,0	40,2
23	28,00	28,00	27,99	27,91	28,0	28,2
24	15,94	15,97	15,94	15,89	15,4	22,4
25	16,13	16,15	16,13	16,06	16,1	16,4
26	16,57	16,58	16,56	16,51	15,9	16,2
27	14,49	14,52	14,49	14,43	14,5	14,7
28	17,97	18,00	17,97	17,91	18,0	18,2
29	109,36	109,42	109,35	109,33	109,3	109,6
30	19,27	19,31	19,26	19,22	19,3	19,5
<u>CO</u>	172,85	172,73	172,37	172,07	-	-
<u>COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub></u>	68,18	68,18	69,32	69,10	-	-
<u>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub></u>	41,60	25,31	72,25	72,05	-	-
<u>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-<math>\omega</math>4</u>	29,7	29,7	29,6	29,6	-	-
<u><math>\omega</math>1</u>	68,18	14,05	14,1	14,05	-	-

### 3.2 – IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Hancornia speciosa*

#### 3.2.1 – Estudo farmacognóstico do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações

O EEB e as frações obtidas por partição trifásica (FLUXOGRAMA 2.5), foram analisados quanto à presença de terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (especialmente flavonóides), cumarinas, saponinas e ácidos de cadeia longa utilizando R1, R2, R3, R4, R5 e R6 respectivamente, como reveladores. Os resultados são apresentados na TABELA 3.12.

**TABELA 3.12 - Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico e frações de folhas de *Hancornia speciosa***

Reagentes	EEB	EEMC	EEAq	EEH
<i>Sol. Ac. Anisoaldeído(R1)</i>	+	+	+	+
<i>Reag. Dragendorf(R2)</i>	-	-	-	-
<i>Reag. NP-PEG(R3)</i>	+	+	+	+
<i>Reag. Kumarovisk(R5)</i>	+	+	+	-
<i>Radiação UV(R6)</i>	+	+	+	+

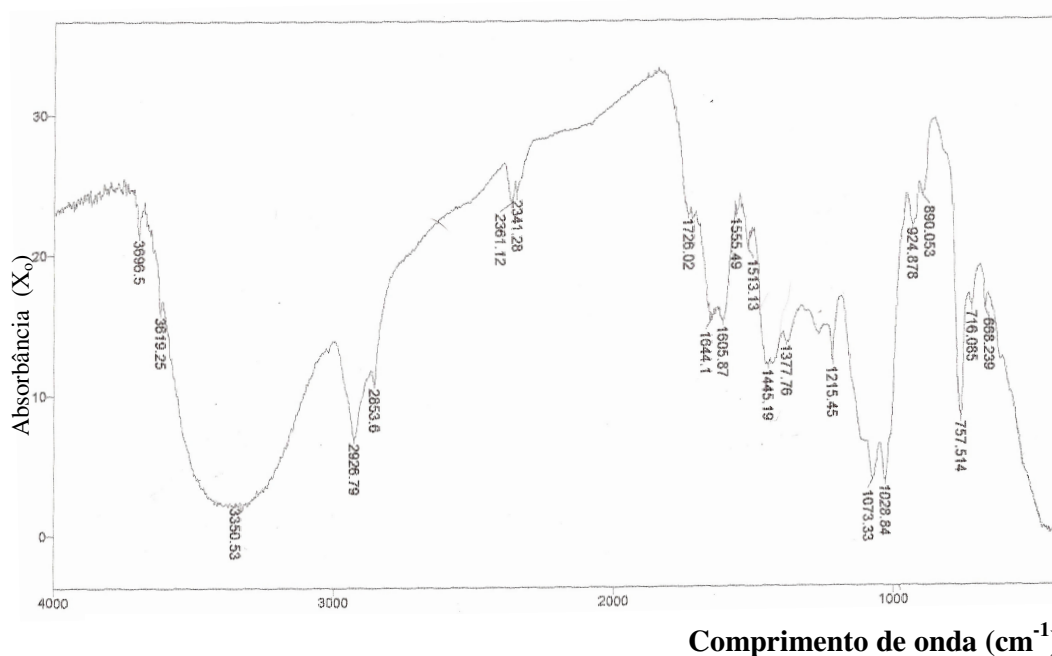
#### 3.2.2 – Compostos Fenólicos - Mistura de Rutina e Ácido Clorogênico

**HS11** (51,8 mg) apresentou-se como um sólido amarelo pastoso, obtido a partir da fração metanólica EHFVI do extrato hexânico e da fração aquosa (EEAq) do extrato etanólico bruto das folhas de *H. speciosa*, conforme descrito na Parte Experimental (p. 69; 70 e 73).

A análise da CCD (FM9, R3), mostrou que **HS11** constituía-se de uma mistura, pois quando observada sob luz ultravioleta (365 nm), apresentou duas manchas: uma emitiu fluorescência alaranjada, e a segunda, correspondente a um composto pouco polar, com fluorescência verde-azulada.

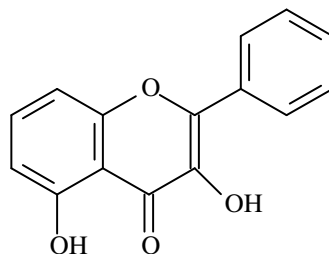
O espectro no infravermelho (FIGURA 3.54) apresentou banda larga de absorção em  $3350\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação O-H, sugerindo a presença de grupo hidroxila livre confirmada pelas absorções em  $1215\text{ cm}^{-1}$ ,  $1073\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento de ligação C-O (SILVERSTEIN; WEBSTER 2000). A presença de carboníla conjugada com ligação dupla foi evidenciada por bandas de absorção em  $1644\text{ cm}^{-1}$  e  $1605$

$\text{cm}^{-1}$ , enquanto a natureza aromática do composto foi constatada pela presença de bandas de absorção em  $1513 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1445 \text{ cm}^{-1}$  e  $1377 \text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às deformações axiais de ligações C=C do anel aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). As absorções em  $2926 \text{ cm}^{-1}$  e  $2853 \text{ cm}^{-1}$  indicaram a presença de estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos.



**FIGURA 3.54 - Espectro na região do infravermelho de HS11 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 3.55 a 3.58) exibiu sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, dentre eles um par de dupletos em  $\delta 6,42$  e  $\delta 6,22$  ( $J = 2,0 \text{ Hz}$ ) referentes a hidrogênios meta-acoplados, característicos de H-6 e H-8; e sinais em  $\delta 7,67$  ( $d$ ,  $J = 2,1 \text{ Hz}$ ),  $\delta 7,62$  ( $J = 8,3$  e  $2,1 \text{ Hz}$ ) e  $\delta 6,89$  ( $J = 8,4 \text{ Hz}$ ), referentes a hidrogênios do anel B de flavonóides, atribuídos a H-2', H-6' e H-5', respectivamente (DE DEUS FONSECA *et al.*, 2007). A comparação desses dados com espectros de flavonóis já descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2005; ZHANG; FENG; WANG, 2005; DE DEUS FONSECA *et al.*, 2007), associada aos dados dos espectros na região do IV e à fluorescência alaranjada da mancha após revelação com NP/PEG/UV, permitiu confirmar que a estrutura de **HS11** apresenta um esqueleto do tipo flavonol.



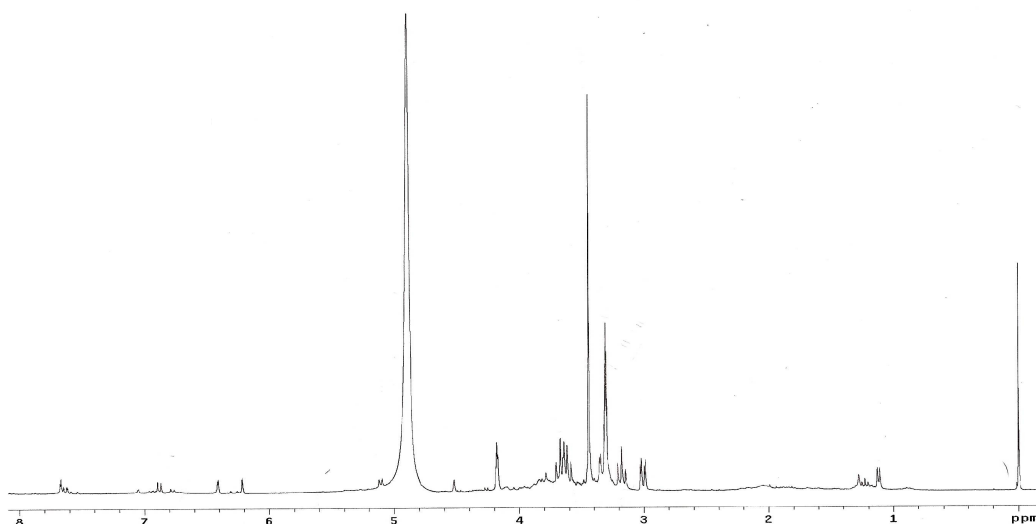
núcleo fundamental do tipo flavonol

A proposta de esqueleto do tipo flavonol para **HS11** foi corroborada pela ausência, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.55), de um simpleto com absorção entre  $\delta 6,39$  e  $\delta 6,94$ , característico do hidrogênio H3 de 5,7-diidroxiflavonas (SILVA *et al.*, 2005).

A presença de sinais na região entre  $\delta 5,20$  e  $\delta 2,90$  permitiu inferir a presença de unidades de açúcar na molécula, corroborada pelos sinais em  $\delta 5,1$  (*d*,  $J = 7,2$  Hz) e em  $\delta 4,52$  (*s*), atribuídos a hidrogênios anoméricos; o sinal em  $\delta 1,13$  (*d*,  $J = 3,6$  Hz) foi atribuído a grupo metila de uma unidade de ramnose.

Além disso, um sinal em  $\delta 3,45$  foi atribuído a H de grupo metoxila. Para comprovar que essa metoxila não correspondia ao sinal proveniente do  $\text{MeOD}_4$ , foi obtido o espectro de de RMN de  $^1\text{H}$  desse solvente no qual não foi constatada a presença desse sinal.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **HS11** (FIGURAS 3.55 a 3.57) mostrou ainda sinais em  $\delta 7,56$  (*d*;  $J = 16$  Hz),  $\delta 7,05$  (*d*;  $J = 1,8$  Hz),  $\delta 6,95$  (*dd*;  $J = 2,1$  e  $8,4$  Hz),  $\delta 6,78$  (*d*;  $J = 7,8$  Hz),  $\delta 6,28$  (*d*;  $J = 15,9$  Hz),  $\delta 4,18$  (*m*; H5) e  $\delta 3,01$  (*dd*;  $J = 2,7$  e  $9,9$  Hz).

FIGURA 3.55 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS11 (300 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )

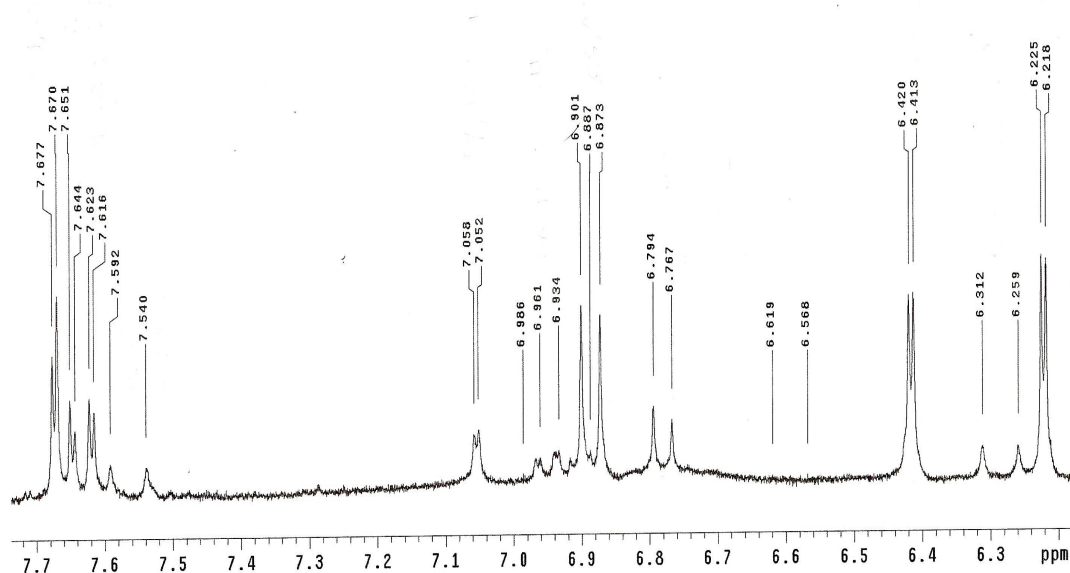


FIGURA 3.56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS11 - Expansão da região entre  $\delta 7,67$  e  $\delta 6,21$  (300 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )

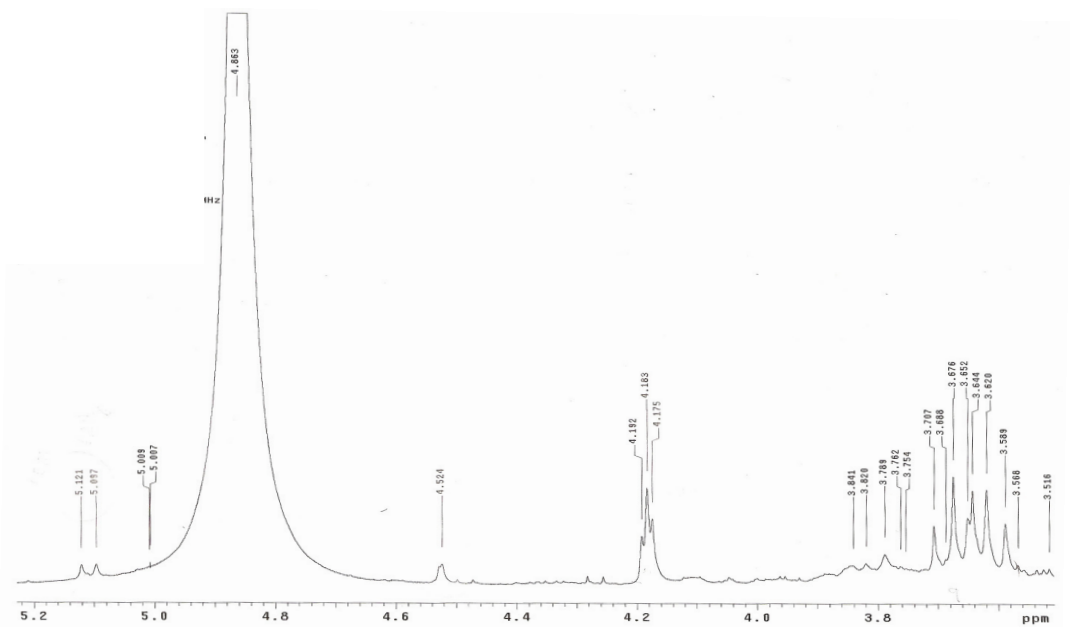


FIGURA 3.57 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS11 - Expansão da região entre  $\delta 5,12$  e  $\delta 3,51$  (300 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )

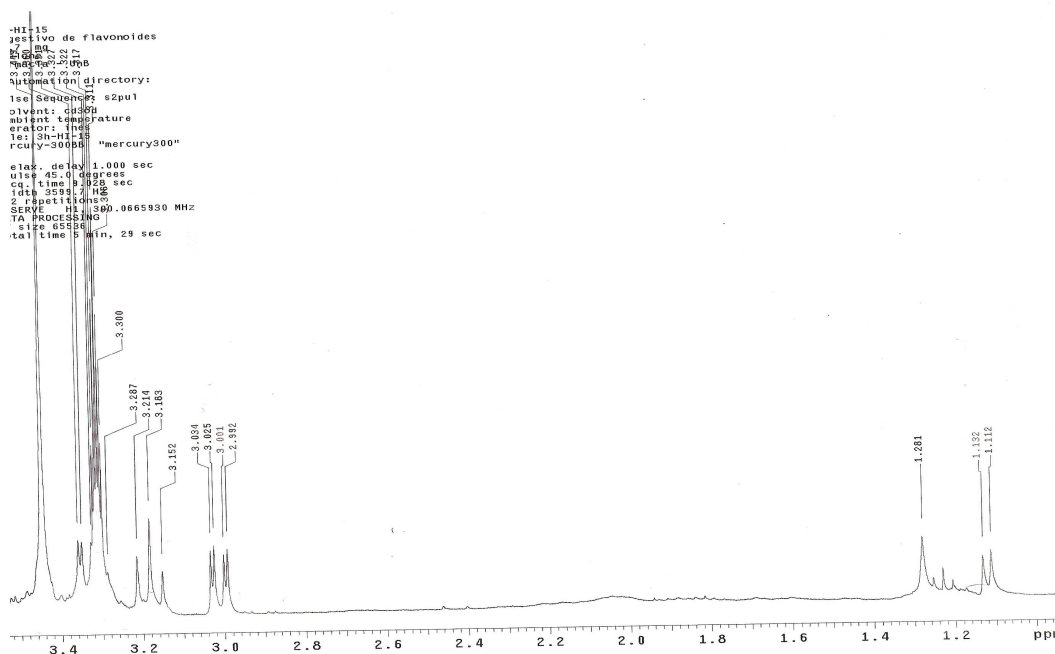


FIGURA 3.58 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HS11 - Expansão da região entre  $\delta 3,4$  e  $\delta 1,11$  (300 MHz,  $\text{MeOD}_4$ )

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **HS11** (FIGURAS 3.59 a 3.63) revelou, na região acima de  $\delta 94,0$ , um total de 17 sinais majoritários, dos quais dez foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados do núcleo flavonol onde os deslocamentos em  $\delta 135,5$ ;  $\delta 158,4$  e  $\delta 179,3$  correspondem aos carbonos C3, C2 e C4, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT de **HS11** (FIGURA 3.64) mostrou sinais referentes a dois carbonos metilênicos, um dos quais, em  $\delta 69,6$ , atribuído ao carbono C6'' de glicose. Foram observados também, sete sinais correspondentes a carbonos metínicos dos quais dois, em  $\delta 102,3$  e em  $\delta 105,5$ , (FIGURA 3.61) foram atribuídos aos carbonos anoméricos C1'' e C1''' (ramnose e glicose, respectivamente) e os demais aos carbonos monohidrogenados do núcleo flavonol.

Esse subspectro revelou ainda a presença de dois carbonos metílicos, um dos quais, em  $\delta 17,8$  foi atribuído ao grupo metila da ramnose e outro, em  $\delta 57,6$ , foi atribuído a uma metoxila que poderia estar em C4', C3', C5 ou C7.

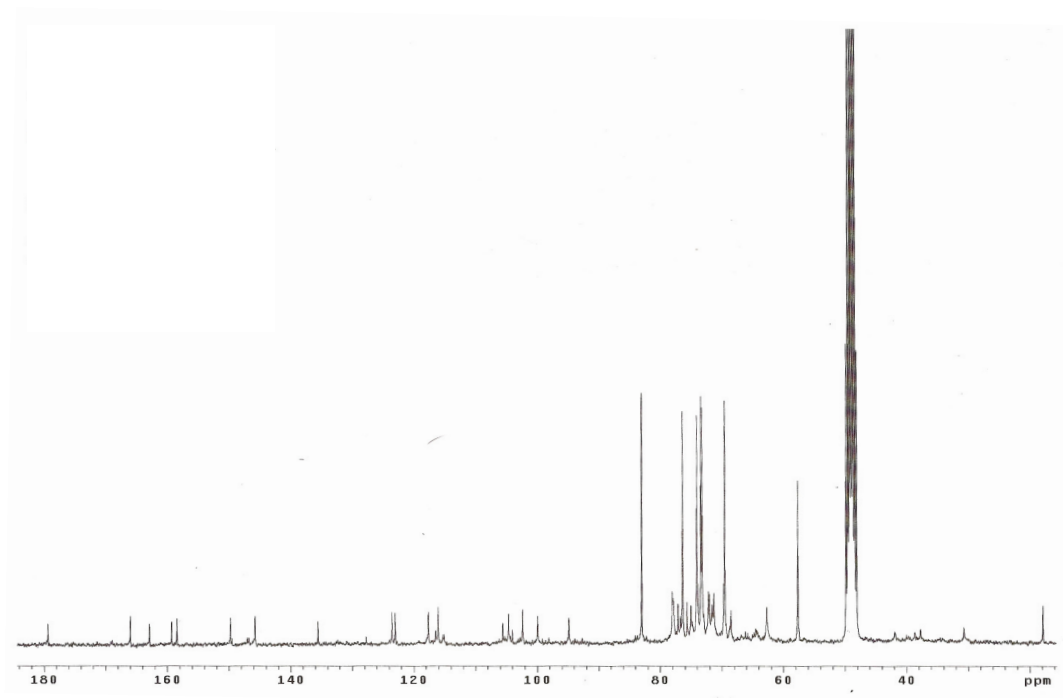


FIGURA 3.59 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)

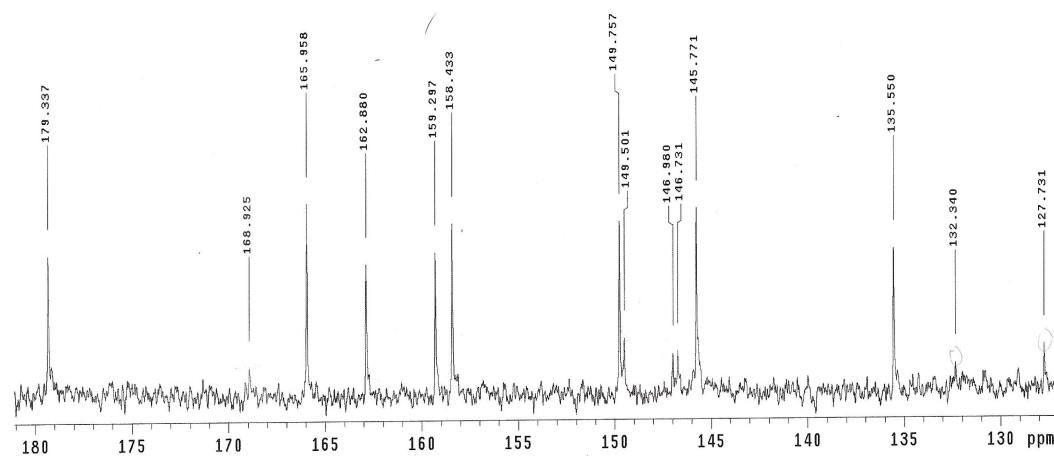


FIGURA 3.60 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 - Expansão da região entre  $\delta$ 127,70 e  $\delta$ 179,34 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)

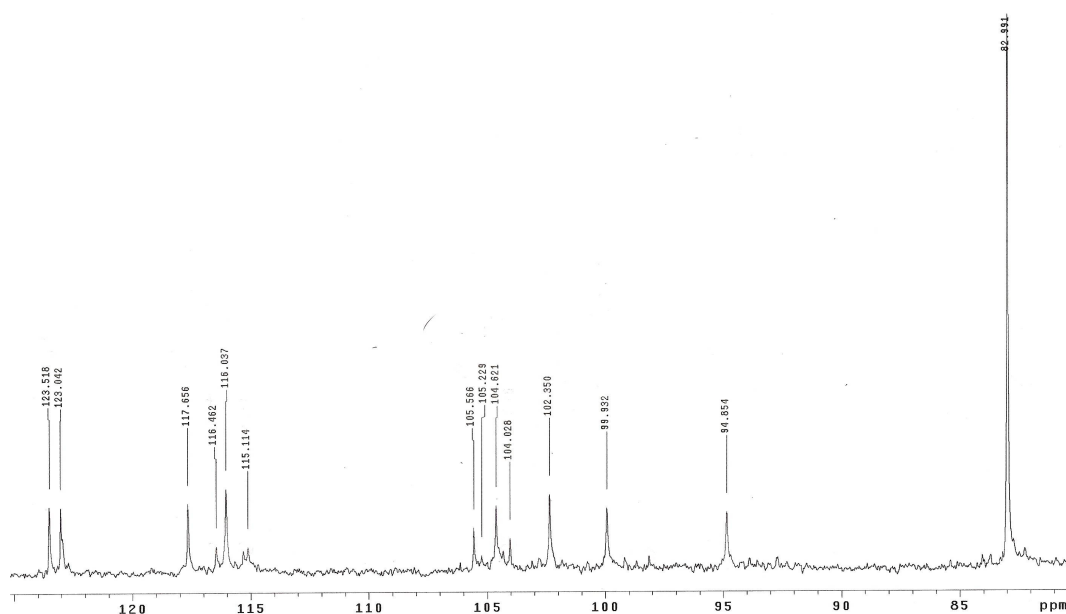


FIGURA 3.61 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 - Expansão da região entre  $\delta$ 82,99 e  $\delta$ 123,51 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)

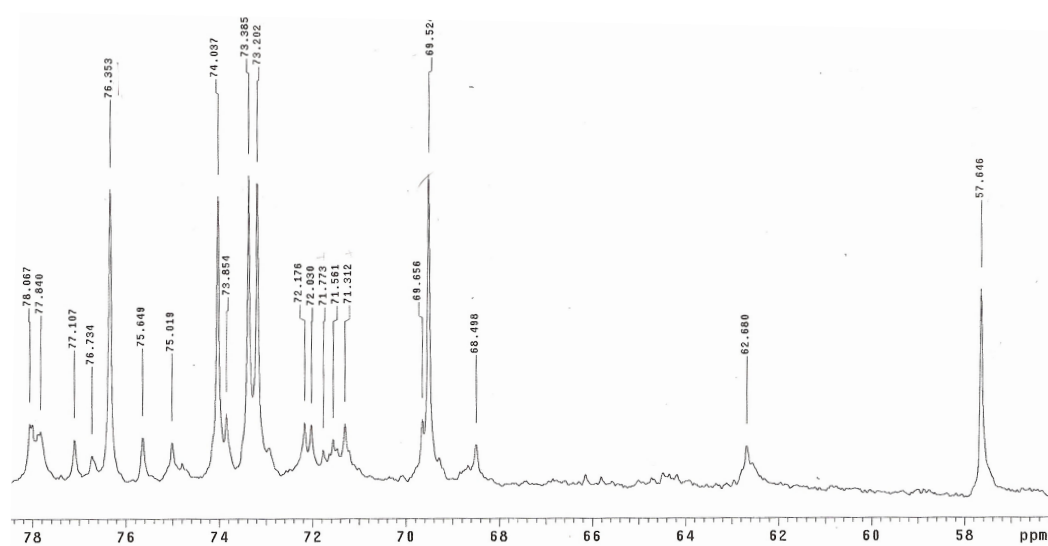
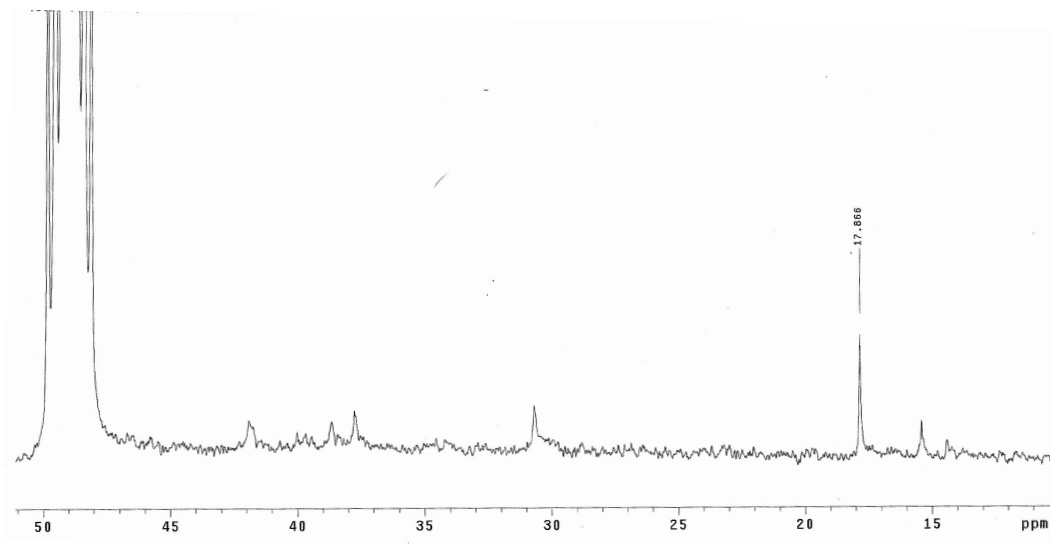
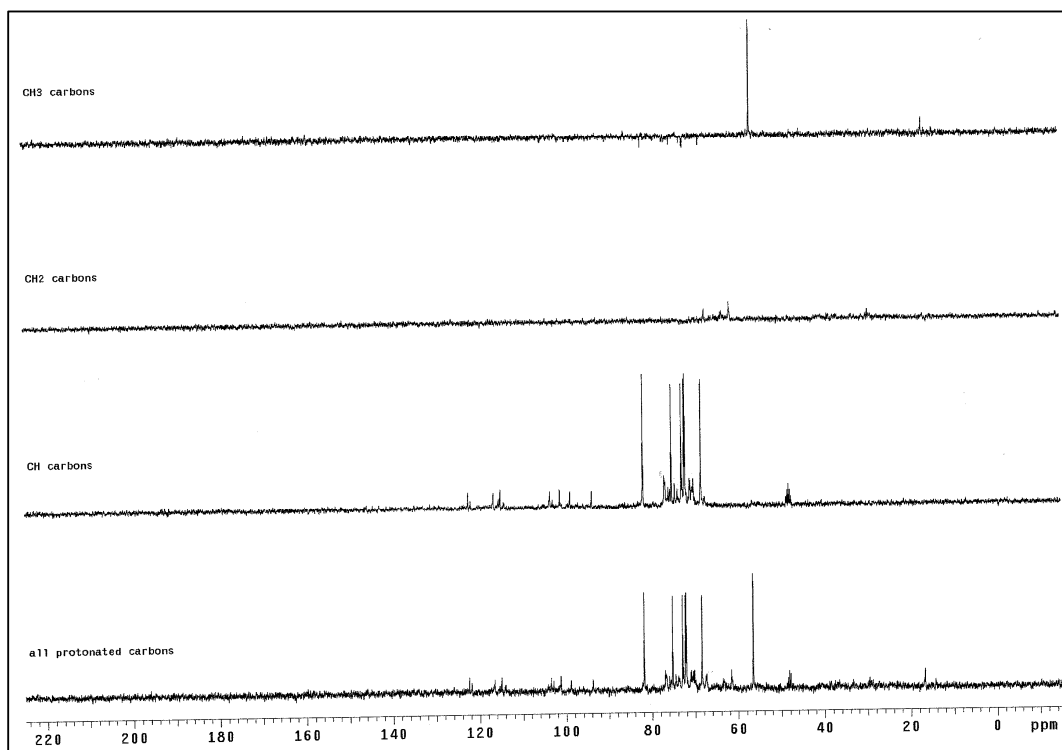


FIGURA 3.62 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 - Expansão da região entre  $\delta$ 57,64 e  $\delta$ 78,06 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)





**FIGURA 3.63 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 - Expansão da região entre δ15 e δ50,0 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)**



**FIGURA 3.64 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de HS11 (APT, 75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)**

Os espectros de RMN bidimensionais foram fundamentais na definição dos deslocamentos químicos de alguns carbonos do flavonol. A análise do espectro de HMBC de **HS11** (FIGURA 3.65,) possibilitou a atribuição do sinal de C3' em  $\delta 145,7$ , tendo em vista as correlações observadas para esse carbono com o hidrogênio H2' (d,  $^2J$ ;  $\delta 7,67$ ; 2,1 Hz) e com o hidrogênio H5' (d;  $^3J$ ;  $\delta 6,89$ ; 8,4 Hz). Esse espectro mostrou ainda acoplamento para o carbono C4', em  $\delta 149,7$ , com o hidrogênio H2' (d,  $^3J$ ;  $\delta 7,67$ ; 2,1 Hz).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Experimento HMQC, FIGURA 3.66) mostrou a existência de correlação entre os sinais atribuídos a H2' e H5' e os sinais em  $\delta 17,6$  e  $\delta 116,0$ , previamente atribuídos aos carbonos C2' e C5', respectivamente.

Os carbonos C5' ( $\delta 116,0$ ) e C6' ( $\delta 123,5$ ) foram identificados pela correlação em espectro de HMCQ (FIGURA 3.66) com os sinais em  $\delta 7,62$  (dd; 2,1 e 1,8 Hz) e  $\delta 6,89$  (d; 8,4 Hz) atribuídos a H6' e H5', respectivamente. O deslocamento químico do sinal referente ao carbono C6' foi confirmado pela correlação com o sinal referente a H5', observada no espectro HMBC expandido (FIGURA 3.65).

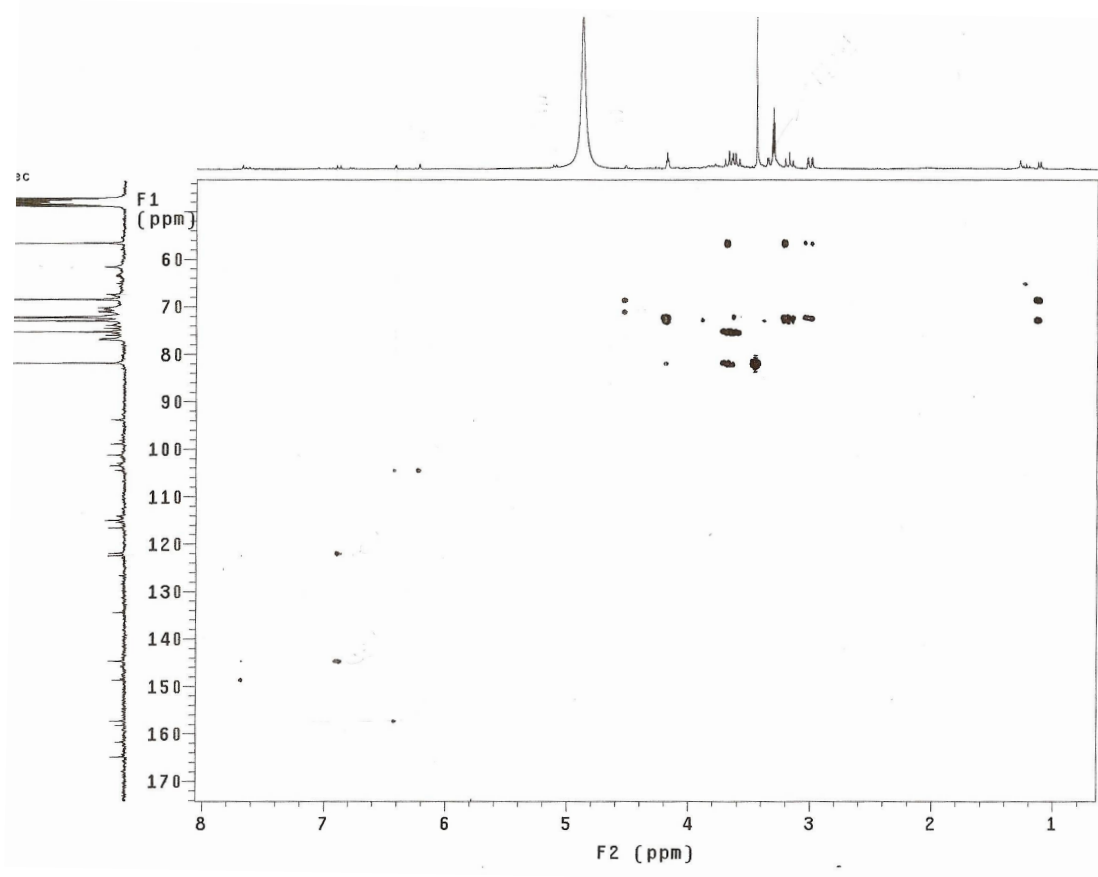


FIGURA 3.65 - Mapa de Contornos HMBC de HS11 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)

Os sinais em  $\delta 6,41$  (d; 2,1 Hz) e  $\delta 6,22$  (d; 2,1 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos meta acoplados H6 e H8, respectivamente. Os sinais atribuídos a H6 e H8 mostraram, no espectro de HMQC (FIGURA 3.66), correlação com os carbonos cujos deslocamentos químicos foram  $\delta 94,8$  e  $\delta 99,9$ , atribuídos, respectivamente, a C6 e C8. No espectro de HMBC (FIGURA 3.65), o hidrogênio H6 mostrou correlação com os carbonos não hidrogenados C9 e C10 para os quais se atribuiu deslocamentos de  $\delta 159,3$  e  $\delta 104,6$ , respectivamente. Também foi observada correlação entre o sinal atribuído ao carbono C10 com o sinal atribuído ao hidrogênio H8.

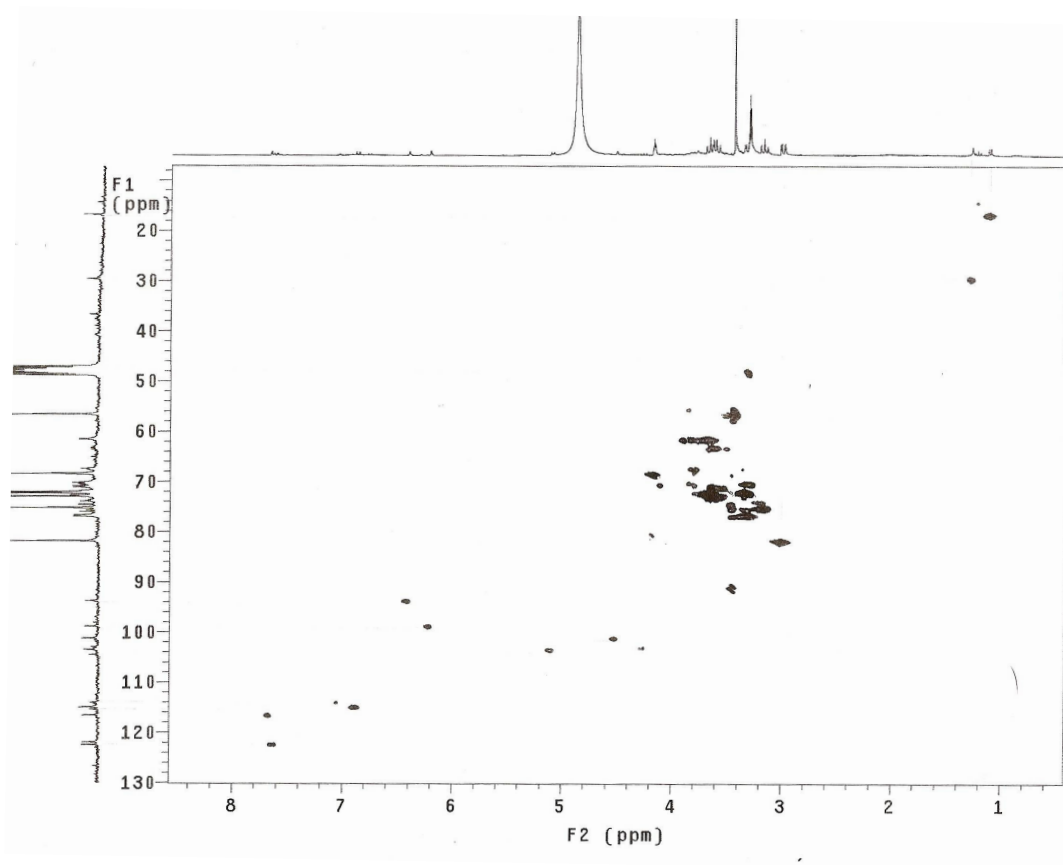


FIGURA 3.66 - Mapa de Contornos HMQC de HS11 (75 MHz, MeOD<sub>4</sub>)

Os deslocamentos atribuídos aos carbonos anoméricos da ramnose - C1'' ( $\delta 102,3$ ) - e da glicose - C1''' ( $\delta 105,5$ ) - e ao carbono metílico C6''' ( $\delta 17,9$ ) da ramnose, foram identificados no espectro de HMQC pela correlação com os sinais  $\delta 4,52$ ;  $\delta 5,11$  (d; 7,2 Hz) e  $\delta 1,13$  (d; 6 Hz) atribuídos aos hidrogênios H1'', H1''' e H6''', respectivamente. Os principais deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de **HS11** com as correlações entre seus carbonos foram apresentadas na TABELA 3.13.

**TABELA 3.13 - Deslocamentos químicos observados para HS11 e as correlações mostradas pelo experimento HMBC ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz)**

C	HIDROGÊNIO			CARBONO		HMBC
	$\delta$	m	<i>J</i> (Hz)	$\delta$	Tipo	
2	-	-	-	158,4	C	
3	-	-	-	135,5	C	
4	-	-	-	179,3	C	
5	-	-	-	162,9	C	
6	6,41	d	2,1	94,8	CH	C10,C9
7	-	-	-	165,9	C	
8	6,22	d	2,1	99,9	CH	C10
9	-	-	-	159,3	C	
10	-	-	-	104,6	C	
1'	-	-	-	123,0	C	
2'	7,67	d	2,1	117,6	CH	C4',C3'
3'	-	-	-	145,7	C	
4'	-	-	-	149,7	C	
5'	6,89	d	8,4	116,0	CH	C6',C3'
6'	7,62	dd	2,1 e 8,4	123,5	CH	
1''	4,52	sl	-	102,3	CH	
2''	-	-	-	72,17	CH	
3''	-	-	-	77,1	CH	
4''	-	-	-	71,3	CH	
5''	-	-	-	74,0	CH	
6''	-	-	-	69,6	CH <sub>2</sub>	
1'''	5,11	d	7,2	105,5	CH	
2'''	-	-	-	72,17	CH	
3'''	-	-	-	78,01	CH	
4'''	-	-	-	75,64	CH	
5'''	-	-	-	68,49	CH	
6'''	1,13	d	6,0	17,9	CH <sub>3</sub>	

A análise dos dados espectrais, bem como as comparações com dados da literatura (MALCHER *et al.*, 2007) permitiram identificar o glicosídeo de flavonol presente em **HS11** como a rutina.

A suspeita da presença de um derivado de ácido cafeico pôde ser inferida, além do aparecimento da fluorescência verde azulada característica (*R<sub>f</sub>* 0,8) no cromatograma obtido, em função do aparecimento de sinais adicionais àqueles atribuídos ao flavonol, tanto no espectro de RMN de <sup>1</sup>H quanto no de RMN de <sup>13</sup>C. Além disso, o deslocamento observado em  $\delta$ 168,9 (FIGURA 3.60), de acordo com dados da literatura (NAKATANI *et al.*, 2000) é característico do carbono carbonílico C9' de compostos dessa natureza.

Para confirmar se **HS11** constituía-se de uma mistura de rutina e derivado de ácido cafeico, foram obtidos os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de amostras genuínas de ácido clorogênico - CAS 327-97-9 (SIGMA): e dos flavonóides rutina (amostra gentilmente cedida

pelo grupo do Prof. Dr. Délio Soares Raslan –UFMG) e quercetina (amostra gentilmente cedida pelo professor Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Unicamp).

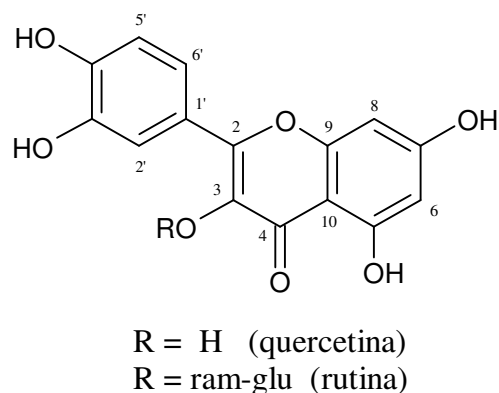
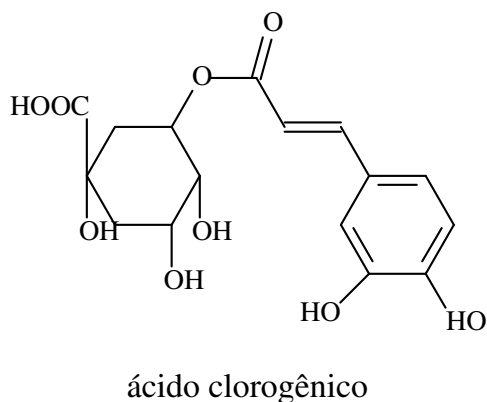
A comparação entre os deslocamentos químicos de **HS11** com os deslocamentos químicos de rutina e ácido clorogênico está apresentada na TABELA 3.14.

**TABELA 3.14 - Deslocamentos químicos de HS11 em RMN de <sup>13</sup>C (δ, CD<sub>3</sub>OD, 75MHz) em comparação com os padrões rutina e ácido clorogênico**

C	HS11 (δ)	Rutina (δ)	C	HS11 (δ)	Rutina (δ)	C	HS11 (δ)	Ac. clorogênico (δ)
2	158,4	158,4	1''	102,3	102,3	1	76,3	76,1
3	135,5	135,6	2''	72,2	72,2	2	37,7	38,1
4	179,3	179,2	3''	77,1	77,1	3	73,4	73,4
5	162,9	162,8	4''	71,3	71,3	4	71,7	71,8
6	94,8	94,8	5''	74,0	73,9	5	71,3	71,2
7	165,9	165,9	6''	69,6	69,6	6	38,7	38,7
8	99,9	99,9	1'''	105,5	105,5	7	*	174,9
9	159,3	159,3	2'''	72,2	72,2	1'	127,7	127,7
10	104,6	104,7	3'''	78,0	78,1	2'	115,1	115,1
1'	123,0	123,0	4'''	75,6	75,6	3'	146,9	147,0
2'	117,6	117,6	5'''	68,5	68,5	4'	149,5	149,4
3'	145,7	145,7	6'''	17,9	17,9	5'	116,4	116,4
4'	149,7	149,7	-	-	-	6'	123,0	123,0
5'	116,0	116,0	-	-	-	7'	146,7	146,6
6'	123,5	123,6	-	-	-	8'	115,1	115,1
						9'	168,9	168,5

\* Deslocamento não observado

A presença do ácido clorogênico foi confirmada, na amostra, pelas análises em CCD e de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. Entretanto, não foi evidenciada sua ligação na estrutura do flavonóide.



### 3.3 – ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa* foram submetidos à avaliação com o objetivo de monitorar possíveis atividades biológicas. Os resultados são apresentados a seguir.

#### 3.3.1 – Atividade citotóxica

##### 3.3.1.1 - Modelo de toxicidade a larvas de *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982).

O bioensaio envolvendo *Artemia salina* consiste em avaliar os efeitos da exposição deste microcrustáceo a um determinado composto. O custo da implantação e manutenção da cultura de *A. salina* é muito baixo, o que faz deste, um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da Biologia para avaliação preliminar de toxicidade de metais pesados, extratos de plantas além de outras substâncias químicas (CARBALLO, 2002; MOLINAS-SALINAS, 2006). Existe ainda uma correlação do ensaio com larvas de *A. salina* com a toxicidade a algumas linhagens de células tumorais, tais como KB, P-388 e L-1210 (DE ROSA *et al.*, 1994).

A análise é feita mediante o cálculo da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) tornando possível determinar e avaliar a atividade biológica (toxicidade) de um certo composto ou mistura (DOLABELA, 1997).

O efeito tóxico dos extratos brutos: hexânico (EHB) e suas frações (FIEH; FIIIEH; FIIIEH; FIVEH; FVEH e FVIEH) e etanólico (EEB) e suas frações (EEMC; EEH e EEAq) foi avaliado pelo método de Meyer e cols. (1982). De acordo com esse método, os extratos brutos podem ser considerados tóxicos quando apresentarem DL<sub>50</sub> < 1 mg/mL. Com base nessa classificação foi observado que todos os extratos avaliados apresentaram DL<sub>50</sub> > 1 mg/mL, sendo considerados de baixa toxicidade às larvas de *A. salina*. Os resultados apresentados para *Hancornia speciosa* sugerem que os extratos poderão ser utilizados para a realização de ensaios posteriores.

##### 3.3.1.2- Avaliação da Atividade Alelopática

Espécies vegetais competem naturalmente entre si por fatores como luz, água e nutrientes. Esse processo estimula o desenvolvimento de mecanismos biológicos que

favoreçam a sobrevivência de algumas plantas em detrimento de outras. Esse mecanismo de defesa é atribuído a substâncias originadas a partir do metabolismo secundário que, além de desempenharem funções fisiológicas, interferem com o metabolismo de outras espécies, causando impacto no ambiente adjacente (FERREIRA, AQUILA, 2000).

A alelopatia pode ser definida como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta (ou microorganismo) exerce sobre outra, pela produção de compostos químicos liberados no ambiente (RICE, 1984). Esses compostos, chamados de fitotoxinas ou aleloquímicos, agem inibindo algumas fases do metabolismo vegetal como a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas (SOARES, 2000).

O efeito desses aleloquímicos sobre as plantas ainda não é bem conhecido mas acredita-se que eles sejam uma sinalização secundária de mudanças ocorridas no nível molecular e celular. Essas mudanças incluem alterações no balanço hormonal assim como na permeabilidade das membranas, prejudicando a absorção de água e nutrientes (RIZVI & RIZVI, 1992). Essa interação bioquímica tem sido amplamente estudada nos últimos anos, devido à sua importância em diversos ecossistemas.

Um dos aspectos mais explorados da alelopatia é o seu papel na agricultura. Atualmente, a busca por herbicidas naturais ganhou grande impulso e o potencial alelopático de várias plantas é avaliado como método de controle alternativo, em substituição ao uso intensivo de herbicidas sintéticos, que acarretam problemas ambientais e de saúde (PINTO *et al.*, 2002; RIZVI & RIZVI, 1992).

Vários são os modelos utilizados para avaliar a atividade alelopática. Os modelos experimentais envolvendo a germinação são considerados os mais simples e fáceis de serem quantificados. O ensaio pode ser realizado em laboratório, à temperatura ambiente; entretanto é mais comum o uso de temperatura entre 22 e 28 °C. A observação deve ser diária ou em intervalos menores e as sementes germinadas devem ser retiradas das placas para que não haja duplicidade na contagem da mesma semente (FERREIRA; BORGHETTI, 2004)

Para avaliação preliminar da fitotoxicidade a espécie modelo deve apresentar rápido crescimento e possibilitar a visualização de fatores que reflitam o efeito das substâncias testadas sobre o crescimento e/ou germinação das sementes (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Por isso a escolha da espécie-alvo (*Lactuca sativa*) baseou-se nos fatores: sensibilidade aos aleloquímicos, curto período requerido para a germinação (24 a 48 horas), potencial de germinação à temperatura ambiente do laboratório e facilidade no acesso.

A germinação se caracteriza pela retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento, seguido pelo curvamento geotrópico da radícula. É um

fenômeno discreto que se dá individualmente para cada semente de forma positiva ou negativa (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Dessa forma, foi avaliada a ação dos extratos brutos, hexânico (EHBH) e etanólico (EEBH), das folhas de *H. speciosa* sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e sobre o desenvolvimento do hipocótilo e epicótilo de sementes pré-germinadas.

A germinação (%) foi avaliada frente aos extratos brutos, hexânico (EHB) e etanólico (EEH), das folhas de *H. speciosa*, nas concentrações de 1000, 2000 e 4000 ppm. O extrato hexânico bruto (EHB) não afetou de forma significativa a germinação das sementes de *L. sativa*, sendo observada inibição de 32,3% e 29% somente nas maiores concentrações (FIGURA 3.67). No entanto, foi observada redução dose-dependente no índice de velocidade de germinação (IVG) (FIGURA 3.67) que segundo Ferreira & Borghetti (2004), pode ser influenciado por efeito alelopático sem alterar a germinação.

O extrato etanólico bruto (EEB) apresentou efeitos inibitórios significativos sobre a germinação nas três concentrações avaliadas, quando comparados aos controles. As doses 2000 ppm e 4000 ppm foram as mais ativas (68,1 e 65,2%), não apresentando diferença significativa entre elas (FIGURA 3.68). Como pode ser observado, o extrato etanólico provocou redução do IVG em todas as doses testadas.

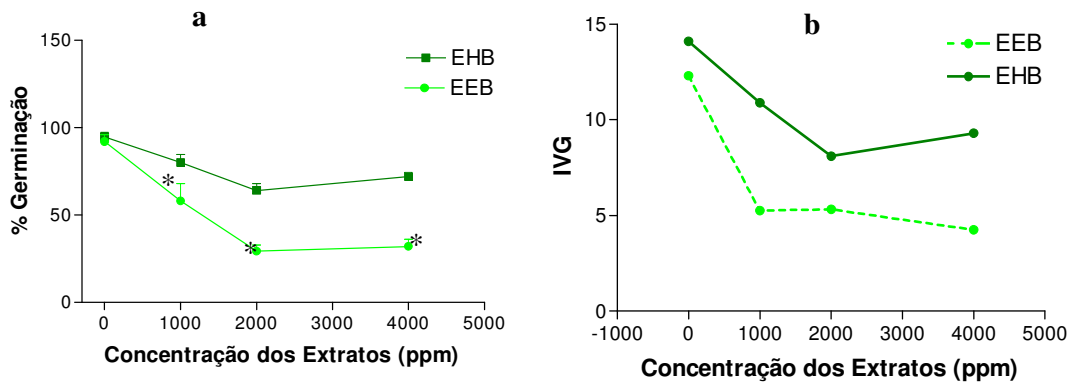
Na análise de crescimento das plântulas de sementes pré-germinadas de *L. sativa*, os extratos foram testados nas mesmas concentrações usadas no teste de germinação (1000 ppm, 2000 ppm e 4000 ppm). O crescimento da parte aérea (epicótilo) não foi afetado pelo EEB; entretanto, o desenvolvimento das raízes foi inibido nas concentrações de 2000 e 4000 ppm não havendo diferença estatística entre elas (FIGURA 3.68).

O EHB mostrou atividade significativa inibindo o crescimento da parte aérea, nas concentrações de 1000 ppm e 4000 ppm; foi observada uma redução da atividade inibitória de acordo com o aumento da dose, não havendo uma diferença significativa entre as respostas das concentrações mais altas (2000 e 4000 ppm). Quanto à inibição do crescimento das raízes, EHB foi ativo apenas na maior concentração avaliada (4000 ppm), como pode ser observado na FIGURA 3.68.

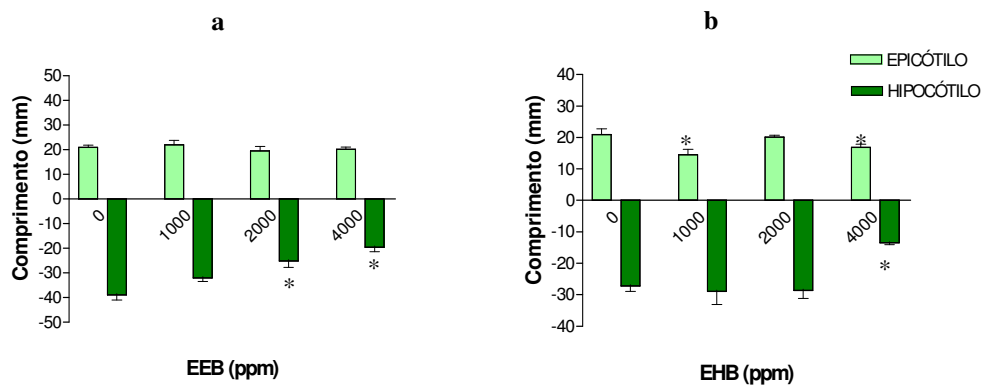
A ação dos extratos sobre o crescimento das partes aéreas (epicótilo) e das radículas (hipocótilo) pode ser justificada pela composição micromolecular dos mesmos. O extrato hexânico (EHB) das folhas de *H. speciosa* é rico em ácidos graxos e derivados, e triterpenos e derivados, principalmente de esqueletos lupano, oleano e ursano. Esses compostos podem ser encontrados em resinas, ceras e látex, e atuam como reguladores de crescimento, fitoalexinas e repelentes para insetos herbívoros (RICE, 1984). De fato, a atividade alelopática de  $\alpha$ - e  $\beta$ -



amirina, bem como de seus derivados, é bem documentada na literatura (MACÍAS-RUBALCAVA *et al.*, 2007; GERSHENZON, 1994; ANAYA *et al.*, 2003).



**FIGURA 3.67:** Germinação (a) e Índice de velocidade de germinação (IVG) (b) de sementes de *Lactuca sativa*, sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa*. Foi considerado estatisticamente diferente quando  $p < 0,05$  (\*). O ponto zero corresponde ao grupo controle



**FIGURA 3.68:** Tamanho médio do epicótilo e do hipocótilo de plântulas de *Lactuca sativa* após sete dias de incubação em soluções aquosas de diferentes concentrações dos extratos etanólico (EEB) (a) e hexânico (EHB) (b) das folhas de *Hancornia speciosa*. Foi considerado estatisticamente diferente quando  $p < 0,05$  (\*). O ponto zero, no eixo das concentrações, corresponde ao grupo controle.

É descrito que compostos fenólicos possuem funções pigmentantes, atrativas ou repelentes de herbívoros, e protetora contra radiação UV, além de apresentarem efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (RICE, 1984). Do extrato etanólico do vegetal em estudo foram isolados os compostos fenólicos rutina e ácido clorogênico com potencial alelopático já descrito na literatura (CHUNG, *et al.*, 2002; LODHI, 1979; KANCHAN; JAYACHANDRA, 1980; CORRÊA; SOARES; FETT-NETO, 2008) sugerindo que tais compostos podem ser, ao menos em parte responsáveis por causar tal inibição observada.

Além da inibição da germinação e do crescimento das sementes de *L. sativa*, foram observadas alterações morfológicas nas plântulas tratadas com os extratos sendo possível verificar a ocorrência de necrose das radículas e o desenvolvimento de raízes laterais. De acordo com FERREIRA e AQUILILA (2000), o crescimento da plântula é a fase do desenvolvimento vegetal mais sensível à ação dos aleloquímicos, que podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Quanto ao desenvolvimento de raízes laterais pode estar relacionado aos distúrbios no balanço hormonal das plântulas (DAYAN *et al.*, 2000), sugerindo que os extratos testados podem ter causado tais alterações morfológicas.

Os resultados obtidos mostraram que os extratos das folhas de *Hancornia speciosa* possuíam a capacidade de inibir tanto o processo germinativo quanto o desenvolvimento das partes aéreas de sementes pré-germinadas de (*L. sativa*). Entretanto faz-se necessário a realização de ensaios complementares que verifiquem a ação desses extratos sobre outras espécies alvo a fim de melhor avaliar o potencial herbicida dos mesmos.

### 3.3.2 – Atividade Antifúngica (SMANIA *et al.*, 1995).

Os extratos brutos hexânico (EHB) (100 mg/mL) e etanólico (EEB) (100 mg/mL) de *H. speciosa* não inibiram o crescimento dos microrganismos testados, pois não houve formação de halo de inibição para as concentrações avaliadas. Os controles positivos anfotericina B e nistatina mostraram-se eficazes na inibição do crescimento dos microrganismos testados apresentando halo de inibição, que variou de 9 a 25 mm para a nistatina e de 9 a 15 mm, para a anfotericina B. Os solventes hexano, metanol, etanol e água foram utilizados como controles negativos e não inibiram o crescimento dos microrganismos testados.

Apesar dos extratos brutos das folhas de *H. speciosa* não terem apresentado atividade na inibição de fungos, existem estudos com os extratos polares das cascas deste vegetal que

mostraram ser esses ativos contra *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* (MORAES et al., 2008). Dessa forma a realização de ensaios complementares que avaliem a ação dos extratos brutos das folhas desse vegetal em bactérias é necessária para melhor caracterizar a ação antimicrobiana da espécie pesquisada.

### 3.3.3 – Atividade Antioxidante

Espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio (ERMOs) estão presentes em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários altamente reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

Os ERMOs reagem com as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídios e do colesterol, sendo as membranas celulares um dos locais mais atingidos por esses compostos. O ataque às membranas celulares provoca alterações na estrutura e permeabilidade das mesmas, com conseqüente perda de seletividade na troca iônica e na liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SOUZA *et al.*, 2007)

De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. O mecanismo de defesa celular contra a produção desses radicais é feito no organismo por meio de compostos antioxidantes, endógenos ou provenientes da alimentação, capazes de estabilizá-los ou desativá-los antes que ataquem seus alvos biológicos. Estudos relacionam a ação das vitaminas E e C e de carotenóides provenientes da dieta alimentar, com a prevenção de doenças ocasionadas pelo *stress* oxidativo. Assim o interesse por compostos que apresentem esse tipo de atividade tem aumentado, quadruplicando o número de estudos na última década (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HUANG *et al.*, 2005).

Compostos antioxidantes são aqueles que possuem a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. Não existe um grupo ou um composto químico específico que confine em

si a capacidade antioxidante. Da mesma forma, a definição acima não se refere a um mecanismo de ação particular.

Tais compostos podem ser de origem endógena ou exógena. Como exemplos de antioxidantes intracelulares podem ser citadas moléculas de baixo peso molecular capazes de seqüestrar espécies oxidantes, ligantes de íons Fe, enzimas que degradam superóxidos e hidroperóxidos, evitando assim a formação de espécies radicalares ou inibindo sua reação com as estruturas biológicas, e outros compostos que atuam afetando a transdução do sinal e a expressão gênica (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Seqüestradores hidrofílicos, por exemplo, ascorbatos são encontrados no citosol, na mitocôndria e no núcleo. Seqüestradores hidrofóbicos, por sua vez, são encontrados em lipoproteínas e membranas. Eles atuam interrompendo a propagação da peroxidação lipídica pela destruição dos radicais peroxila  $ROO^{\bullet}$ , ou bloqueando a formação de hidroperóxidos a partir de oxigênio simpleto  $^1O_2$  (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Os antioxidantes de origem exógena, por sua vez, podem ser substâncias seqüestradoras de radicais livres, cooxidantes, redutoras ou retardadoras da oxidação e sua ação pode estar relacionada à proteção de substratos específicos contra o processo oxidativo, ou a formação de produtos de oxidação (HALLIWELL, 1995).

Geralmente existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos. O interesse pelos antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas depois que estudos *in vivo* mostraram que a exposição aguda ou por longo período de tempo aos compostos BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol) e T-BHQ (t-butilhidroxiquinona), utilizados como agentes antioxidantes em alimentos e cosméticos, pode causar tumores de fígado e pâncreas, aumento da formação de  $H_2O_2$  e carcinogênese no estômago de ratos (DEGÁSPARI *et al.*, 2004; JARDINI, 2007).

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam pela sua importância e diversidade entre os demais produtos de origem vegetal. Muitas funções são atribuídas a essa classe de compostos das quais se destaca marcadamente sua atividade antioxidante, fazendo com que essa classe de compostos seja considerada promissora como uma alternativa aos antioxidantes utilizados. A quercetina, como exemplo geral, apresenta a propriedade de remover os radicais superóxido, oxigênio singleto e peróxidos lipídicos e inibir a oxidação das LDL (BATLOUNI, 1997; SIMÕES *et al.*, 2000).

Existem vários modelos experimentais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de determinado composto ou mistura, através dos diferentes mecanismos que podem, por sua vez e resguardadas as suas limitações, serem extrapolados para o meio biológico.

Não existe um único ensaio que possa avaliar a capacidade oxidante total de uma determinada amostra (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Dessa forma, os extratos brutos e frações das folhas de *Hancornia speciosa* foram avaliados por dois métodos: o primeiro, redução do complexo de fosfomolibdênio, baseia-se na transferência eletrônica do composto antioxidante para o reagente (sonda) oxidante (HUANG; PRIOR, 2005). O segundo ensaio – Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio, que baseia-se na capacidade dos compostos testados em neutralizar a ação oxidante do peróxido de hidrogênio.

### 3.3.3.1 – Ensaio da Redução do Complexo de Fosfomolibdênio.

A capacidade antioxidante de uma substância pode ser determinada a partir de método espectrométrico (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). De acordo com SHUKOR e cols. (2007), que estudaram o mecanismo de redução do molibdato utilizando microrganismos, o fundamento desse método reside na redução em meio ácido, do molibdênio VI ( $\text{Mo}^{6+}$ ) de cor amarelada em solução, formando um complexo de cor azul, cuja intensidade é diretamente proporcional à extensão da redução (SHUKOR *et al.*, 2007; SHUKOR *et al.*, 2008).

O Molibdênio VI ( $\text{Mo}^{6+}$ ) não existe em solução; ocorre como íon molibdato. O mecanismo proposto por SHUKOR e cols. (2007) envolve a formação de fosfomolibdato como uma espécie intermediária entre molibdato e o complexo azul de molibdênio. A formação do intermediário é favorecida pelo pH baixo da solução e a presença de íons fosfato.

Sob tais condições (meio ácido) os íons molibdato podem combinar entre si formando poliíons tais como  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ ,  $\text{Mo}_8\text{O}_{26}^{4-}$  e  $\text{Mo}_{12}\text{O}_{37}^{2-}$ . Esses íons então na presença de agentes redutores podem ser reduzidos formando o complexo azul de isopolimolibdênio (SHUKOR *et al.*, 2007).

O mecanismo da formação do azul de fosfomolibidênio pode ser explicado pela ressonância de spin eletrônico: o agente redutor doa 2 elétrons para um heteropolimolibdato, 12-fosfomolibdato ( $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ ), convertendo-o em azul de molibdênio. Os elétrons são então dispersos uniformemente envolvendo toda a esfera de polimetalato por um processo térmicamente ativado. Os elétrons nas espécies reduzidas ficam deslocalizados e movimentam-se rapidamente fazendo com que a valência seja uma média das valências de todos os 12 átomos de molibidênio (SHUKOR *et al.*, 2007).

No experimento aqui descrito, a capacidade redutora foi mensurada pela comparação dos valores de absorvância encontrados para as amostras analisadas, em comparação com os padrões quercetina, ácido ascórbico e BHT.

A partir dos extratos brutos (EHB e EEB) e frações (EEMC e EEAq) das folhas de *H. speciosa*, foram preparadas soluções na concentração de 1 mg/mL, utilizando etanol como solvente. Os resultados são apresentados em equivalentes de quercetina (TABELA 3.15).

**TABELA 3.15 – Equivalência dos extratos brutos e frações das folhas de *Hancornia speciosa* com relação à quercetina, Ác. ascórbico e BHT, quanto à capacidade de reduzir o molibdato**

AMOSTRAS		PADRÃO Equivalentes em mg/mL		
Concentração	ABS	Quercetina	Ác. Ascórbico	BHT
EHB	0,460	0,280	0,12	0,16
EEB	0,700	0,410	0,20	0,27
EEMC	0,430	0,270	0,11	0,15
EEAq	0,410	0,260	0,10	0,14

EHB – Extrato Hexânico Bruto; EEB – Extrato Etanólico Bruto; EEMC – Fração acetônitrila do extrato etanólico; EEAq – Fração aquosa do extrato etanólico

Todas as amostras avaliadas (EHB, EEB, EEMC, EEAq) foram capazes de reduzir o complexo fosfomolibdênio, mas em comparação com os padrões utilizados, a natureza redutora mostrou ser relativamente baixa, o EEB foi o mais ativo, com 41% de atividade (quando comparado com a quercetina) enquanto que os demais extratos mostraram atividade inferior a 30% tanto em relação à quercetina como ao ácido ascórbico e ao BHT. Esses valores foram obtidos em relação a 100% da atividade total atribuída à quercetina, ác. ascórbico e BHT.

A baixa solubilidade dos extratos de *H. speciosa* no EtOH, pode ser uma das razões dos modestos índices de atividade antioxidante encontrados nesse experimento. Essa dificuldade de solubilização dos extratos e frações polares deste vegetal pode ser causada, em parte, pela presença de compostos com alto grau de polimerização (catequinas monoméricas e oligoméricas), evidenciada pela formação de precipitado vermelho que é intensificada com a senilidade dos extratos (RODRIGUES, 2007).

**3.3.3.2 – Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio (RUCH *et al.*, 1989).**

Os extratos brutos etanólico (EEB) e hexânico (EHB) de *Hancornia speciosa*, foram avaliados quanto à habilidade em neutralizar o peróxido de hidrogênio em comparação com o controle positivo (ácido ascórbico).

O peróxido de hidrogênio, no sistema biológico, pode agir como um sinal metabólico sob determinadas circunstâncias, possivelmente oxidando grupos tiol em proteínas disparando certos eventos intracelulares. O peróxido de hidrogênio pode facilmente atravessar as membranas celulares e atacar alguns alvos celulares. Por exemplo, altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem inativar a enzima glicolítica 3-fostato-gliceraldeídodesidrogenase em células de mamíferos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

O extrato hexânico (EHB) de *Hancornia speciosa* não apresentou atividade antioxidante nas condições do ensaio (TABELA 3.16). Levando-se em consideração a natureza apolar desse extrato e que o solvente utilizado na realização do teste para solubilização das amostras tenha sido o metanol, o que dificultou a diluição desse extrato, talvez o método aqui realizado não seja um adequado para a avaliação da atividade antioxidante desse tipo de amostra, haja visto o resultado positivo para esse extrato no teste de redução do complexo de fosfomolibdênio.

**TABELA 3.16 – Atividade neutralizante de peróxido de hidrogênio exercida pelos extratos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa***

Extratos	CE <sub>50</sub>		Correlação Linear
	Extratos	Ác. ascórbico	
EHB	I	84,87 µg/mL	I
EEB	4.25 µg/mL	84,87 µg/mL	0.98

EHB – Extrato Hexânico Bruto; EEB – Extrato Etanólico Bruto; I - inativo

Entretanto, o extrato etanólico (EEB) apresentou uma atividade antioxidante significativa, com CE<sub>50</sub> cerca de 20 vezes menor que aquela apresentada pelo controle positivo (ácido ascórbico).

A presença de compostos fenólicos pode justificar a atividade antioxidante expressada nos ensaios realizados. A análise fitoquímica, feita no presente estudo, dos extratos e frações

das folhas deste vegetal, levou ao isolamento do glicosilflavonóide rutina de conhecida atividade antioxidante. A quercetina, porção não glicosídica do flavonóide rutina, possui propriedades inibitórias da peroxidação lipídica através do seqüestro de espécies reativas ao oxigênio e quelação de metais responsáveis pela geração destas espécies (OHSHIMA et al.,1998). Ácidos fenólicos, catequinas e proantocianidinas, compostos com atividade antioxidante amplamente relatada, também foram isolados das cascas de *H. speciosa* (MORAES et al., 2008; RODRIGUES, 2007; AZUMA et al., 2000; BRUYNE et al.,1999; KIMURA et al., 2008). Assim, os resultados obtidos sugerem que a atividade do EEH, observada nos experimentos realizados, seja ao menos em parte, devido aos achados fitoquímicos inferidos aos extratos das diferentes partes (cascas, folhas) desta espécie.

Finalmente, essa atividade antioxidante dos extratos das folhas de mangaba pode ocorrer pelo seqüestro ou redução de radicais livres ou ainda pela inibição da peroxidação lipídica, o que contribui para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo como câncer, envelhecimento precoce, doenças degenerativas e neurológicas além de outras. Esses resultados aliados aos dados fitoquímicos revelam o potencial desse vegetal como fonte de compostos que podem ser utilizados na produção de formulações farmacêuticas além de incentivar a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos á base dessa planta.

Para que os dados do presente trabalho sejam confirmados é importante que sejam feitos estudos complementares que avaliem a ação dos extratos através de mecanismos diferentes daqueles abordados nos ensaios aqui realizados, além de testes *in vivo*.



## **CAPÍTULO 4 - DADOS ESPECTROMÉTRICOS**

**4.1 – Mistura de hidrocarbonetos (HS01)**

**Características:** cera amarelada solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 2955, 2910, 2847, 1473, 1462, 729 e 719

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 0,8 (s), 1,25 (s) e 5,1 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 22,6; 23,4; 26,3; 29,3; 29,6; 31,9; 32,1; 135,1 e 125,0

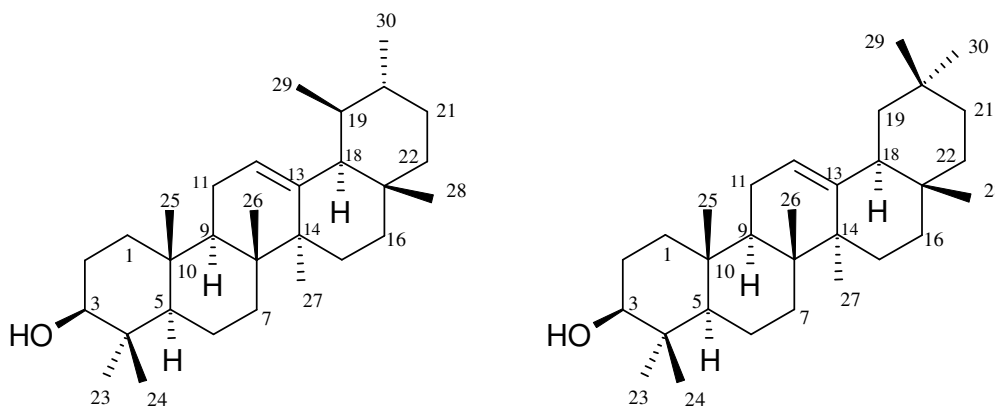
**4.2 – Mistura de álcool de cadeia longa (HS02)**

**Características:** sólido esbranquiçado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3448; 2917; 2849; 1473; 1463; 1094; 1025 e 717

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 0,8 (s); 1,2 (s); 1,49 (s); 3,95 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 14,1; 22,6; 29,2; 29,3; 29,7; 31,9; 64,3

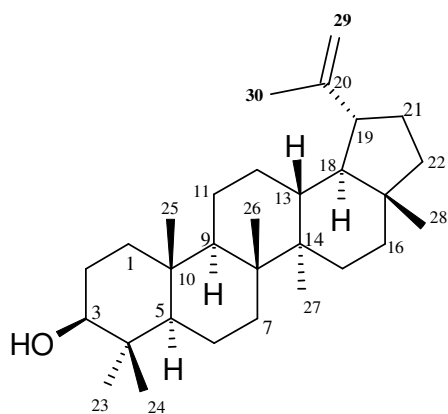
**4.3 - Mistura de triterpenos:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (HS03)**

**Características:** sólido esbranquiçado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

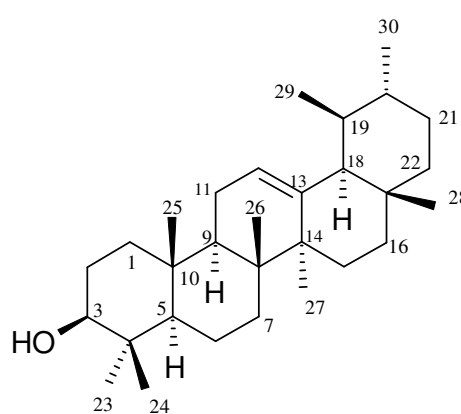
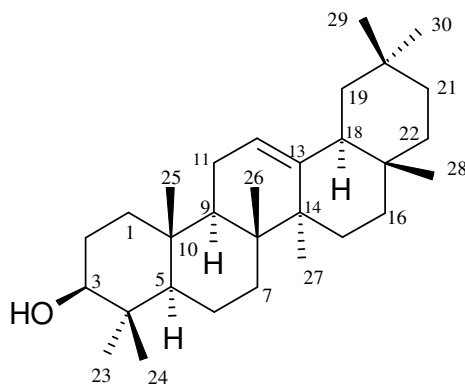
**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3302; 2947; 2854; 1465; 1378; 1379; 1359; 1655; 1036 e 995

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\alpha$ -amirina: 5,12 (1H, *t*,  $J = 3,6\text{Hz}$ );  $\beta$ -amirina: 5,18 (1H, *t*,  $J = 4,0\text{Hz}$ ); 3,24 (1H, *d*,  $J = 5,1\text{Hz}$ ); 3,20 (1H, *d*,  $J = 5,4\text{Hz}$ ); 2,17 (s) - 0,78 (s); 1,13 (s) 0,87 (m)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\alpha$ -amirina: 38,6; 27,3; 79,0; 38,6; 55,2; 18,3; 32,9; 40,0; 47,7; 36,9; 23,4; 124,4; 139,6; 42,1; 28,7; 26,60; 33,7; 59,0; 39,6; 39,6; 31,2; 41,5; 28,1; 15,6; 15,7; 16,8; 23,4; 28,1; 17,5; 21,4  $\beta$ -amirina: 38,6; 27,3; 79,0; 38,8; 55,2; 18,3; 32,9; 38,8; 47,7; 36,9; 23,5; 121,7; 145,2; 42,1; 26,1; 26,9; 32,6; 47,6; 46,8; 31,2; 34,7; 37,1; 28,1; 15,5; 15,7; 16,8; 26,0; 28,4; 33,3; 23,7

4.4 – Mistura de triterpenos:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol (HS04)

Lupeol

 $\alpha$  - amirina $\beta$ - amirina

**Características:** sólido esbranquiçado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

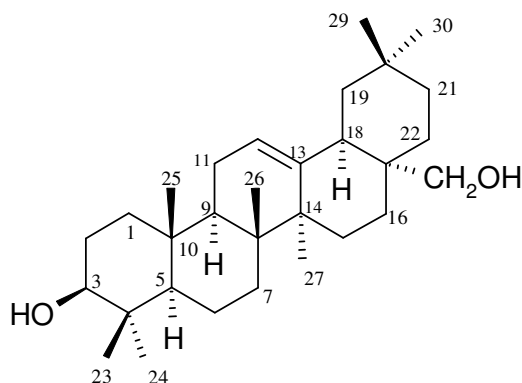
**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3299; 2946; 2853; 1639; 1465; 1359 e 1036

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\alpha$ -amirina: 5,12 (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ ); 3,24 ( $J = 4,8\text{Hz}$ , 1H); 3,21 ( $J = 5,4\text{Hz}$ , 1H); 3,17 ( $J = 5,1\text{Hz}$ ; 1H); 0,71 (s) - 1,93 (s);  $\beta$ -amirina: 5,18 (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ ); 3,24 ( $J = 4,8\text{Hz}$ , 1H); 3,21 ( $J = 5,4\text{Hz}$ , 1H); 3,17 ( $J = 5,1\text{Hz}$ ; 1H); 0,71 (s) - 1,93 (s); Lupeol: 4,68 (d,  $J = 2,7\text{Hz}$ ); 4,56 (m); 1,68 (s); 3,24 ( $J = 4,8\text{Hz}$ , 1H); 3,21 ( $J = 5,4\text{Hz}$ , 1H); 3,17 ( $J = 5,1\text{Hz}$ ; 1H); 0,71 (s) - 1,93 (s);

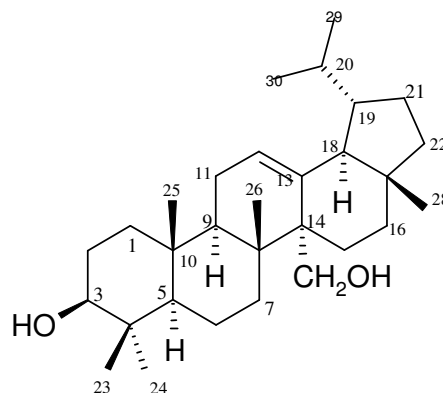
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\alpha$ -amirina: 38,7; 27,2; 79,0; 38,7; 55,2; 18,3; 32,9; 40,0; 47,7; 36,8; 23,3; 124,4; 139,5; 42,0; 28,7; 26,6; 33,7; 59,0; 39,6; 39,6; 31,2; 41,5; 28,1; 15,6; 15,6; 16,8; 23,3; 28,1; 17,5; 21,4;  $\beta$ -amirina: 38,7; 27,4; 79,0; 38,7; 55,2; 18,3; 32,9; 38,7; 47,7; 37,9; 23,5; 121,7; 145,2; 41,7; 26,1; 27,2; 32,5; 47,6; 46,8; 31,1; 34,7; 37,1; 28,1; 15,5; 15,6; 16,8; 26,0; 28,4; 33,3; 23,7 Lupeol: 38,7; 27,4; 79,0; 38,7; 55,2; 18,3; 34,3; 40,8; 50,4;

37,1; 20,9; 25,1; 38,0; 42,8; 27,4; 35,5; 43,0; 48,3; 48,0; 151,0; 29,8; 40,0; 28,0; 15,4; 16,1; 15,9; 14,5; 18,0; 109,3; 19,3

#### 4.5 – Mistura de triterpenos: eritrodiol e obtusalina (HS05)



Eritrodiol



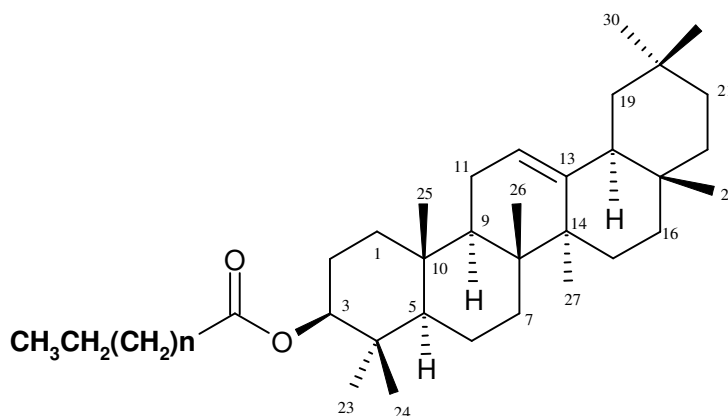
Obtusalina

**Características:** sólido esbranquiçado, solúvel em  $\text{CHCl}_3$ .

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3376; 2946, 2926; 2868; 1639; 1375; 1361; 1341; 1044; 1004;

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 5,19 (1H, t,  $J = 3,6\text{Hz}$ , H-12); 5,13 (1H, t,  $J = 3,7\text{Hz}$ , H-12); 3,21 (2H, dd,  $J = 11,0\text{Hz}$  e  $6,0\text{Hz}$ ); 3,54 (1H, dd,  $J = 10,9\text{Hz}$  e  $7,0\text{Hz}$ ); 1,31 (s) - 1,89 (s); 0,73 (s) - 1,25 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** Obtusalina: 38,8; 27,2; 79,0; 38,0; 55,1; 18,3; 32,8; 40,0; 47,6; 36,9; 23,5; 125,0; 138,7; 42,0; 23,5; 26,0; 38,8; 54,0; 39,7; 39,3; 30,6; 35,2; 28,1; 16,7; 15,6; 15,6; 69,9; 23,3; 21,3; 17,3; Eritrodiol: 38,6; 27,2; 79,0; 38,8; 55,2; 18,4; 32,6; 39,8; 47,6; 36,9; 23,6; 122,3; 144,2; 41,7; 25,6; 22,0; 36,9; 42,3; 46,5; 31,0; 34,1; 31,0; 28,1; 15,5; 15,5; 16,7; 25,9; 69,7; 33,2; 23,6

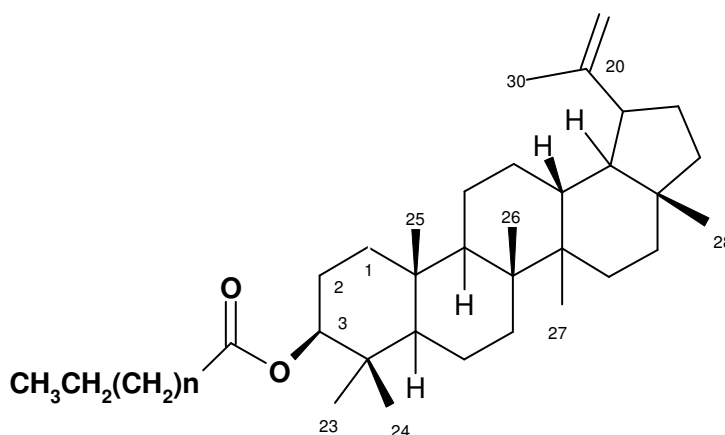
4.6 - Mistura de ésteres – palmitato de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (HS06)

**Características:** sólido amorfo branco-amarelado solúvel em  $\text{CHCl}_3$

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 2917; 2849; 1733; 1469; 1246; 1174; 989 e 718

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\alpha$ -amirina: 5,12 (1H, t,  $J=3,6$  Hz); 4,5 (1H, t,  $J = 8,1$ Hz); 2,29 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz ), 1,81 (s) -2,0 (s); 1,25 (s) 0,86 (s); 0,79 (s) - 1,06 (s);  $\beta$ -amirina: 5,18 (t, 1H;  $J = 3,6$  Hz); 4,5 (1H, t,  $J = 8,1$ Hz); 0,79 (s) - 1,06 (s); 2,29 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz ), 1,81 (s) -2,0 (s); 1,25 (s) 0,86 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):**  $\beta$ -amirina 38,24; 22,68; 80,57; 37,73; 55,25; 18,23; 2,85; 9,79; 47,22; 36,79; 23,36; 121,6; 145,1; 41,52; 26,91; 26,12; 32,47; 47,61; 47,54; 31,07; 36,79; 37,13; 28,38; 16,81; 15,72; 16,84; 25,95; 28,08; 33,32; 23,62; (COO) 173,69;  $\text{CH}_3$  14,1;  $(\text{CH}_2)_n$  29,7

4.7 - Mistura de ésteres - lupeol  $3\beta$ -O-acilados (HS07)

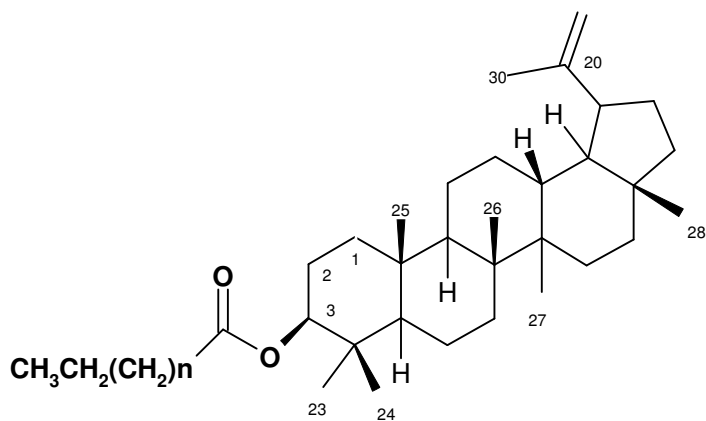
**Características:** sólido amorfo branco-amarelado solúvel em  $\text{CHCl}_3$

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3069; 2920; 2850; 1731; 1640; 1246; 1175; 979 e 882

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 5,22 - 5,29 (m); 4,6 (d,  $J = 2,7$  Hz); 4,49 ( $J = 1,5$  e 3,9Hz); 0,76 (s) - 1,61 (s); 1,18 (s); 0,79 (m)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 38,36; 23,74; 80,59; 37,82; 55,37; 18,2; 34,20; 40,84; 50,33; 37,07; 20,93; 25,09; 38,03; 42,81; 27,42; 35,56; 42,98; 48,27; 150,94; 29,7; 39,98; 27,96; 16,96; 16,16; 15,96; 14,51; 17,98; 109,35; 19,27; CO - 173,69;  $\text{COCH}_2$  - 34,85;  $\text{COCH}_2\text{CH}_2$  - 25,16;  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$  - 29,16;  $\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$  -  $\omega_4$  - 29,25-29,70;  $\omega_3$  - 31,92;  $\omega_2$  - 22,68;  $\omega_1$  - 14,11

#### 4.8 - Mistura de ésteres - lupeol $3\beta$ -O-acilados (HS08)

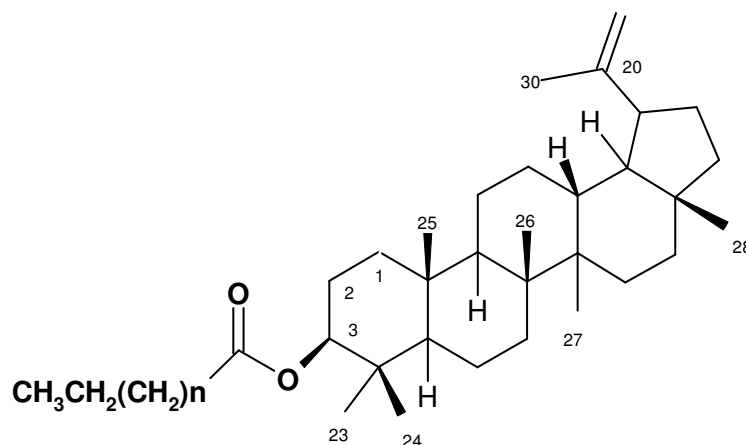


**Características:** sólido branco solúvel em  $\text{CHCl}_3$

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3487; 2963, 2918; 2849; 1732; 1700; 1640; 1466; 1380; 1095; 1021; 1262 e 800

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 4,68 (s); 4,56 (s); 4,53 (m); 4,32 - 4,22 (m;  $\text{H}_{3'}$ ); 2,57 - 2,37 (m); 1,68 (s); 1,25 (s); 0,76 (s) - 2,6 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 38,31; 23,71; 81,62; 37,81; 55,34; 18,16; 34,15; 40,81; 50,29; 37,81; 20,92; 25,05; 37,99; 42,80; 27,40; 35,53; 42,80; 48,24; 47,97; 150,92; 29,68; 39,96; 27,99; 15,94; 16,13; 16,56; 14,49; 17,97; 109,35; 19,26; 172,37; 69,32; 72,25; 29,6; 14,1

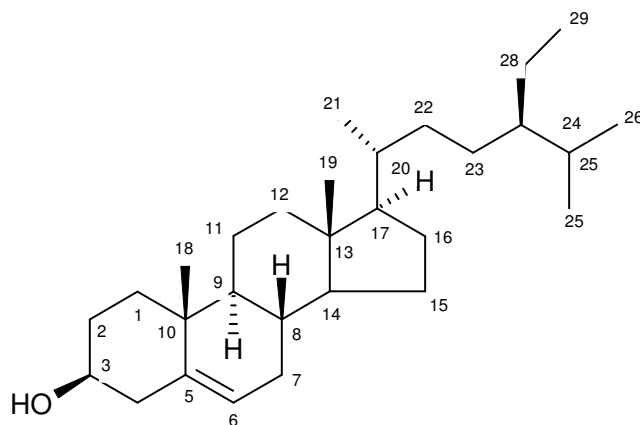
4.9 – Mistura de ésteres - lupeol 3 $\beta$ -O-acilados (HS09)

**Características:** sólido branco solúvel em  $\text{CHCl}_3$

**IV (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3459; 3071; 2918; 2851; 1730; 1707; 1640; 1466; 1380; 1261; 1181 e 883

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 4,68 (s); 4,56 (s); 4,53 (m); 3,98 (s; H3'); 3,86 (s; H5'); 2,57 - 2,37 (m); 1,68 (s); 1,25 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 38,32; 23,73; 81,40; 37,77; 55,35; 18,18; 34,16; 40,81; 50,30; 37,77; 20,92; 25,05; 38,01; 42,81; 27,40; 35,54; 42,81; 48,25; 47,97; 150,89; 29,68; 39,97; 28,00; 15,94; 16,13; 16,57; 14,49; 17,97; 109,36; 19,27; 172,85; 68,18; 41,60; 29,7; 68,18

4.10 -  $\beta$ - Sitosterol (HS10)

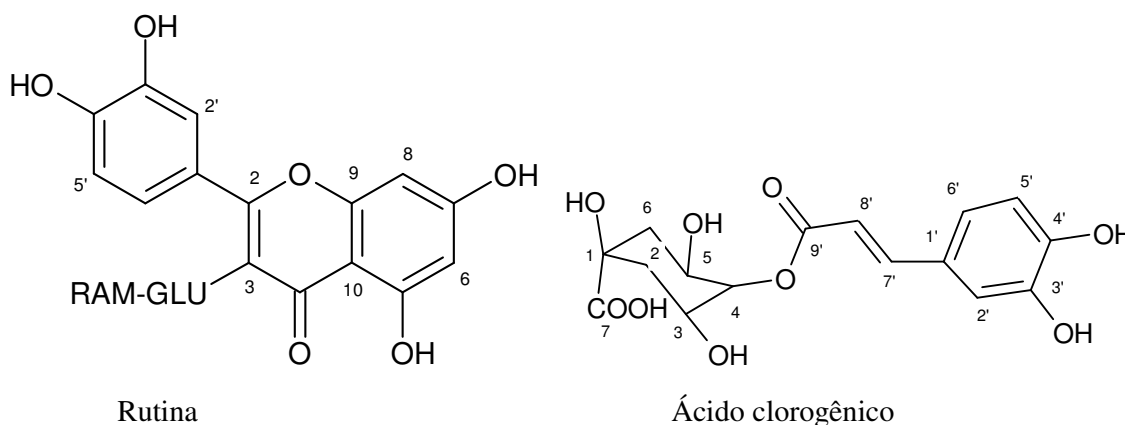
**Características:** sólido branco amorfo solúvel em  $\text{CHCl}_3$

IV (KBr)  $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ : 3426; 2956; 2936; 2867; 2850; 1639; 1465; 1382 e 801

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 5,36 (d,  $J = 5,1\text{Hz}$ ); 3,54 – 3,50 (m, H-3); 0,6 (s) - 2,28 (s)

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** 37.2; 31.6; 71.8; 36.5; 140.7; 121.7; 31.9; 31.9; 50.1; 36.5; 21.1; 39.7; 42.3; 56.7; 28.1; 56.1; 11.9; 19.3; 36.0; 18.7; 33.9; 26.1; 45.8; 29.1; 19.6; 18.9; 23.0; 11.9

#### 4.11 – Mistura de rutina e ácido clorogênico (HS11)



**Características:** sólido amarelo pastoso solúvel em MeOH

IV (KBr)  $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ : 3350; 2926; 2853; 1644; 1605; 1513; 1445; 1377; 1215; 1073; 1028

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** Rutina: 7,67 (d,  $J = 2,1 \text{ Hz}$ ); 7,62 (dd,  $J = 8,3$  e  $2,1 \text{ Hz}$ ); 6,89 (d,  $J = 8,4 \text{ Hz}$ ); 6,41 (d,  $J = 2,0 \text{ Hz}$ ); 6,22 (d,  $J = 2,0 \text{ Hz}$ ); 4,52 (s); 5,11 (d,  $J = 7,2\text{Hz}$ ); 1,13 (d,  $J = 6,0\text{Hz}$ ); Ácido clorogênico: 7,56 (d;  $J = 16 \text{ Hz}$ ); 7,05 (d;  $J = 1,8 \text{ Hz}$ ); 6,95 (dd;  $J = 2,1$  e  $8,4 \text{ Hz}$ ); 6,78 (d;  $J = 7,8 \text{ Hz}$ ); 6,28 (d;  $J = 15,9 \text{ Hz}$ ); 4,18 (m; H5) e 3,01 (dd;  $J = 2,7$  e  $9,9 \text{ Hz}$ )

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):** Rutina 158,4; 135,5; 179,3; 162,9; 94,8; 165,9; 99,9; 159,3; 104,6; 123,0; 117,6; 145,7; 149,7; 116,0; 123,5; 102,3; 72,17; 77,1; 71,3; 74,0; 69,6; 105,5; 72,17; 78,01; 75,64; 68,49; 17,9; Ácido clorogênico: 76,3; 37,7; 73,4; 71,7; 71,3; 38,7; 127,7; 115,1; 146,9; 149,5; 116,4; 123,0; 146,7; 115,1; 168,9



## **CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES**

A realização do trabalho descrito nesta dissertação permitiu o isolamento de compostos de classes estruturais distintas, resultantes do fracionamento químico dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae).

Do extrato hexânico foram obtidos:

- Mistura de hidrocarbonetos (HS01);
- Mistura de alcoóis de cadeia longa (HS02);
- Mistura dos triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (HS03),  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina e lupeol (HS04), obtusalina e eritrodiol (HS05);
- $\beta$ -sitosterol (HS06);
- Mistura de ésteres  $3\beta$ -acilados de:  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (HS07); lupeol (HS08, HS09 e HS10).

Do extrato etanólico foi obtida:

- Mistura de rutina e ácido clorogênico (HS11).

Os extratos hexânico, etanólico e frações destes não apresentaram atividade citotóxica quando avaliados em modelo de toxicidade às larvas de *Artemia salina*.

O extrato hexânico mostrou-se pouco ativo na inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa*, porém foi capaz de reduzir a velocidade de germinação, inibir o crescimento das partes aéreas (epicótilo) das plântulas e das raízes (hipocótilo). Essa ação pode estar relacionada à composição micromolecular deste extrato, rico em compostos conhecidamente alelopáticos como os triterpenos e derivados, principalmente de esqueletos lupano, oleano e ursano, além de ácidos graxos e derivados.

O extrato etanólico inibiu a germinação das sementes de *Lactuca sativa* e tornou o processo germinativo mais lento. Não mostrou atividade de inibição do crescimento das partes aéreas (epicótilo) das plântulas, porém inibiu o crescimento das raízes (hipocótilo) em todas as concentrações avaliadas.

Nenhum extrato apresentou atividade antifúngica contra as cepas de *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus* sp CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium* sp CCT 2147, *Epidermophyton floccosum* URM 4799, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 *Candida parapsilosis* CCT 3438 e *Aspergillus fumigatus* CCT 1277.

Quanto à atividade antioxidante, o extrato etanólico apresentou uma atividade seqüestradora de radicais livres (derivados via peróxido de hidrogênio) cerca de 20 vezes maior que aquela apresentada pelo ácido ascórbico, e o extrato hexânico mostrou-se inativo.

Na redução do complexo de fosfomolibdênio, realizado de acordo com a modificação do método de Prieto, todos os extratos mostraram-se moderadamente ativos em relação à

quercetina, BHT e ácido ascórbico. Dentre eles, o extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante em comparação com a quercetina.

A presença de compostos fenólicos (rutina e ácido clorogênico) no extrato etanólico pode justificar não somente a ação alelopática sobre a germinação e crescimento das sementes de *Lactuca sativa*, mas também a atividade antioxidante - mesmo que moderada - apresentada por este extrato.

Outro aspecto importante a ser destacado é que este é o primeiro relato da presença dos derivados acilados de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, da obtusalina, do eritrodiool e do  $\beta$ -sitosterol no gênero *Hancornia*. Além disso, é a primeira vez que rutina foi caracterizada por análises espectrométricas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  nos extratos polares das folhas de *Hancornia speciosa*.

Como perspectivas futuras propõe-se a elucidação das estruturas dos acil-ésteres isolados, e a avaliação dos extratos e frações de *Hancornia speciosa* por meio de outros modelos de atividade biológica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial Potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytother. Res**, v. 13, n., p. 494-497. 1999.
- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de iniciação Científica UFPA**, v. 1, n. 2, p. 1-9. 2001.
- ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v. 60, n. 5, p. 451-455. 1989.
- ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 19-24. 2001.
- AGBEDAHUNSI, J. M.; ALADESANMI, A. J. Effect of *Eugenia uniflora* on early malaria infection. **FITOTERAPIA-MILANO**, v. 64, n., p. 174-174. 1993.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n., p. 114-140. 2007.
- AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C. <sup>13</sup>C NMR SPECTROSCOPY OF OLEANANE TRITERPENOIDS. **Progress in NMR Spectroscopy**, v. 24, p. 1-90, 1992.
- AGUIAR FILHO, S. P.; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. **A mangabeira (*Hancornia speciosa*): Domesticação e técnicas de cultivo**. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (Brasil), 1998. 26p. Relatório técnico.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2388-2392. 2005.
- ALBUQUERQUE, C. L.; BORTOLINE, J. M. A.; MESQUITA, M. L.; SILVEIRA, D.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. **Inibição da atividade de alfa-amilase da saliva humana por extratos de plantas**. XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Cuiabá: Livro de resumos, 2002.

ALL, D. Antileishmanial, antimalarial and antimicrobial activities of the extract and isolated compounds from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Z Naturforsch [C]**, v. 63, n. 7-8, p. 497-502. 2008.

ALMEIDA, J. R. G. S. Outros constituintes químicos de *Diploptropis ferruginea* Benth (Fabaceae). **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 44-46. 2003

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC**, 1998. p.197-201.

ALVES, T. M.; SILVA, A. F.; BRANDAO, M.; GRANDI, T. S.; SMANIA, E.; SMANIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, May-Jun 2000.

ANAYA, A. L.; MATA, R.; SIMS, J. J.; GONZ´LEZ-COLOMA, A.; CRUZ-ORTEGA, R.; GUADAÑO, A.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; MIDLAND, S. L.; RÍOS, G.; GÓMEZ-POMPA, A. Allelochemical Potential of *Callicarpa acuminata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 12, p. 2761-2776. 2003.

ANDRADE, F. D. **Estudos químicos de chás brasileiros**.111p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2002.

ANDRADE, S.; ANTONIOLLI, D.; COMUNELLO, E.; CARDOSO, L.; CARVALHO, J.; BASTOS, J. Antiulcerogenic Activity of Crude Extract, Fractions and Populnoic Acid Isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C**, v. 61, n. 5/6, p. 329. 2006.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464-471. 2007.

ANDRADES-MIRANDA, J.; ZANCHIN, N. I.; OLIVEIRA, L. F.; LANGGUTH, A. R.; MATTEVI, M. S. (T2AG3)<sub>n</sub> telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *oryzomys subflavus*. **Genetica**, v. 114, n. 1, p. 11-16. 2002.

ARAÚJO, E. C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E. C. A. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da Rede Pública de Saúde em João Pessoa (PB). **Rev. Espac. saúde (Online)**, v.8, n.2, p.44-52. 2007.

ARGOLO, A.; SANT'ANA, A.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233. 2004.

ATINDEHOU, K.; KONE, M.; TERREAUX, C.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K.; DOSSO, M. Evaluation of the Antimicrobial Potential of Medicinal Plants from the Ivory Coast. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 5, p. 497-502. 2002.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166-175. 2006.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal. Traditional**, v. 2, n. 2, p. 153-165. 2005.

AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric Oxide (NO) Production Inhibitory Constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 53, n. 6, p. 710-713. 2005.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. bras. farmacogn. vol**, v. 18, n. 1, p. 2008.

AZUMA, K.; NAKAYAMA, M.; KOSHIOKA, M.; IPPOUSHI, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOHATA, K.; YAMAUCHI, Y.; ITO, H.; HIGASHIO, H. Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L. **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**, v. 47, p. 3963-3966. 1999.

BALUNAS, M. J., KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p.431-441. 2005.

BARATA, L. E. S. **Fitomedicamentos no Brasil: realidade possível ou ficção?** XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo. 2008.

BARREIROS, A. L. B. S. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Dioclea lasiophylla***. 147 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2000.

BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; PEREIRA, P. A. P.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n., p. 669-673. 2002.

BARROS MACHADO, T.; LEAL, I. C. R.; KUSTER, R. M.; AMARAL, A. C. F.; KOKIS, V.; SILVA, M. G.; SANTOS, K. R. N. Brazilian Phytopharmaceuticals-Evaluation against Hospital Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 6, p. 519. 2005.

BARROSO, G. M. 1986. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária, Viçosa-MG. 3:8-16

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; SATHISH KUMAR, T. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian journal of experimental biology**, v. 45, n. 5, p. 480-485. 2007.

BECKER, E.; NISSEN, L.; SKIBSTED, L. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561-571. 2004.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. E. Antitumor and Antiviral Activity of Colombian Medicinal Plant Extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n., p. 531-535. 1999.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430. 2002.

BHATTACHARYYA, J.; BARROS, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscopus urens*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 274-276. 1986.

BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity -A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **INTERNATIONAL JOURNAL OF DIABETES AND METABOLISM**, v. 14, n. 1, p. 1. 2006.

BÖHLER, T.; NOLTING, J.; GURRAGCHAA, P.; LUPESCU, A.; NEUMAYER, H.; BUDDE, K.; KAMAR, N.; KLUPP, J. *Tabebuia avellanedae* extracts inhibit IL-2-independent T-lymphocyte activation and proliferation. **Transplant Immunology**, v. 18, n. 4, p. 319-323. 2008.



BORGES, E. M. **Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae – Eupatorieae)**. 82 p. Dissertação (Mestrado), USP, Ribeirão Preto, 2006.

BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVE, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Med**, v. 57, n. 5, p. 434-436. 1991.

BOTSARIS, S. A. **Aspectos diferenciados da validação de medicamentos fitoterápicos**. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo. 2008.

BRAGA, F.; BOUZADA, M.; FABRI, R.; DE O. MATOS, M.; MOREIRA, F.; SCIO, E.; COIMBRA, E. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402. 2007.

BRASIL. ANVISA; Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução RDC N° 48, de 16 de março de 2004.

BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; HESS, S. C.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia (Milano)**, v. 68, n. 1, p. 1997.

BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DOMMISSE, R.; KOŁODZIEJ, H.; WRAY, V.; VANDEN, B. D.; VLIETINCK, A. NMR characterization and biological evaluation of proanthocyanidins: a systematic approach. **Basic Life Sci**, v. 66, p. 193-209, 1999.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol**, v. 2, n. 1, p. 17. 2002.

CARVALHO, A. C. B., NUNES, D. S. G., BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q., E NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, Número 11. 2007.

CARVALHO, J. B. M. Ensaio sobre a carnaubeira. **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S.A.**, Natal (Brazil) 369p., n. 253. 1982.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178. 1996.

CARVALHO, M. G.; RINCÓN VELANDIA, J.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenes isolated from *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n., p. 740-743. 1998.

CASTRO, C. F. S., SILVA, C. A. M., PERFEITO, J. P., SANTOS, M. L., RESCK, I. S., PAULA, J. E., SILVEIRA, D. **Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de Pouteria**. 29º Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. 2006.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Cytotoxic and mutagenic activity of *Cochlospermum regium* Mart.(algodaozinho-do-campo) in mice. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 15-19. 2004.

CAVALCANTE, W.; CAMPOS, T.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.; OLIVEIRA, C.; SOARES, A.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497. 2007.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 302-305. 2006.

CHAGAS, F. L., BITTENCOURT, A. L. M. L., BISPO, C. I., ESPINDOLA-DARVENNE, L. S., SILVEIRA, D., MESQUITA, M. L. F., FERREIRA, V. M. M., PAULA, J. E. **Avaliação antinociceptiva de Pouteria**. XVIII Reunião Anual da FESBE. Curitiba: Anais da XVIII Reunião Anual da FESBE, 2003.

CHATURVEDULA, V. S. P.; SCHILLING, J. K.; MILLER, J. S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Two New Triterpene Esters from the Twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar Rainforest. **JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS**, v. 65, n. 8, p. 1222-1224. 2002.

CHATURVEDULA, V. S. P.; ZHOU, B. N.; GAO, Z.; THOMAS, S. J.; HECHT, S. M.; KINGSTON, D. G. I. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase  $\beta$ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 23, p. 6271-6275. 2004.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 949-962. 1999.

CHUNG, I. M.; KIM, K. H.; AHN, J. K.; CHUN, S. C.; KIM, C. S.; KIM, J. T.; KIM, S. H. Screening of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa*) variety hull extracts. **Crop Protection**, v. 21, n. 10, p. 913-920. 2002.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.; GIGLIO, J.; LEITE, G.; CRUZ-HÖFLING, M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antibiothropic action of *Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy research: PTR**, v., n., p. 2008.

CIRQUEIRA, R.; ALVES, M. Hypotensive and diuretic effects of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and jambos (*Eugenia jambolana* Lam.) aqueous extracts in normotensive anesthetized rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 7, n. 2, p. 86-91. 2005.

COELHO, M.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 146, n. 3, p. 406-414. 2007.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39. 1999.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57-63. 2002.

CORRÊA, L. R.; SOARES, G. L. G.; FETT-NETO, A. G. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 4, p. 583-590. 2008.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF. 1984.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; VANDEN, B. D.; VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Med**, v. 60, n. 5, p. 460-463. 1994.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1979-1981. 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-1130. 1991.

COSTA, C. M. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; DOS SANTOS, V. F.; MAIA, L. C. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 40, n. 3, p. 225-232, 2005.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIAO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 111-117. 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, **17**, n. 2, p. 153-163. 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79. 2005.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus cocnstituíntes ativos e fitoterapia**. [Http://Antoniopcunha.Com.Sapo.Pt/Ahspmscaf.Htm](http://Antoniopcunha.Com.Sapo.Pt/Ahspmscaf.Htm). Acesso em 03/11/ 2008.

DA COSTA, I. R.; DE ARAÚJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras**, v.18, n.4. 2004.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Limited Fruit Production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and Pollination by Nocturnal and Diurnal Insects. **The Journal of Biology and Conservation**, v.37, n.3, p.381-388. 2005.

DA SILVA, A.; BALZ, D.; DE SOUZA, J.; MORSCH, V.; CORRÊA, M.; ZANETTI, G.; MANFRON, M.; SCHETINGER, M. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 509-514. 2006.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Flavonoid and triterpenes from *Stigmaphyllom paralias*. **Química Nova**, v. 26, n., p. 484-487. 2003.

DAVIENNE, K. F., RADDI, M. S. G., POZETTI, G. L. Das Plantas Mediciniais aos Fitofármacos. **Revista Brasileira Planta Médica**. 6: 11-14 p. 2004.

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.;DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p. 2079-2094, 2000.

DE ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (caryocaraceae)—an economically valuable species of the central brazilian cerrados. **Economic Botany**, v. 49, n. 1, p. 40-48. 1995.

DE BRITO, E.; PESSANHA DE ARAÚJO, M.; LIN, L.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112-1118. 2007.

DE CARVALHO, I. S. H. Potenciais e limitações do uso sustentável de biodiversidade do cerrado: Um estudo de caso da Cooperativa Grande Sertão no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2. 2007.

DE DEUS FONSECA, A. P. N.; DE FÁTIMA SILVA, G. D.; DE JESUS CARVALHO, J.; SALAZAR, G.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; DE ALMEIDA ALVES, T. M. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, p. 2007.

DE MATTOS, E.; FREDERICO, M.; COLLE, T.; DE PIERI, D.; PETERS, R.; PIOVEZAN, A. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 1-6. 2007.

DE MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; DE HOLANDA CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, Â. BMC Pharmacology. **BMC Pharmacology**, v. 1, n., p. 6. 2001.

DE ROSA, S.; DE GIULIO, A.; IODICE, C. Biological Effects of Prenylated Hydroquinones: Structure-Activity Relationship Studies in Antimicrobial, Brine Shrimp, and Fish Lethality Assays. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1711-1716. 1994.

DE S. LUNA, J.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206. 2005.

DING, Hsiou-Yu; WU, Yang-Chang; LIN, Hang-Ching. Phytochemical and Pharmacological Studies on Chinese Changzhu. **Jornal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, p. 561-566, 2000.

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120. 2001.

DUARTE, D. S.; DOLABELA, M. F.; SALAS, C. E.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRAS, A. B.; NENNINGER, A.; WIEDEMANN, B.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.; LOPES, M. T. P. Chemical Characterization and Biological Activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 347-352, 2000.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MutiCiência: Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da UNICAMP**. 7, 2006.

EMDAGRO (SE). **Cultura da mangabeira**. Aracaju, 1994. (Circular Técnica. 2)

ENDRINGER, D. C.; SOARES, C. M.; Pezzuto, J. M.; BRAGA, F. C. L-(+)-Bornesitol. **Acta Cryst.**, v. 63, n 2, p1067–1068, feb., 2007.

ENDRINGER, D. C. *et al* ENDRINGER, D. C.; KONDRATYUK, T.; BRAGA, F. C.; PEZZUTO, J.M. **Phytochemical Study of *Hancornia speciosa* guided by *in vitro* cancer chemiopreventive assays**. In: 47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 2006, Washington. Abstract book of the 47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 2006.

ENDRINGER, D. C.; SOARES, C. M.; CAMPANA, P. V.; BRAGA, F. C. **Phytochemical study of *Hancornia speciosa* guides by angiotensin converting enzyme inhibition assay**. In: CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, v. 41. p. 328-328, 2005.

EPISTEIN, L. Mangaba: coisa boa de comer. **Rev. Bahia Agríc.** Salvador, v.6, n.2, p. 19-22, jun. 2004.

ESPINDOLA, L. S.; ROSSY E VASCONCELOS JUNIOR, J.; MESQUITA, M. L.; MARQUIE, P.; PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. lingua. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095. 2004.

ESTEVEES, I.; SOUZA, I.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.; SANTOS, L.; SERTIE, J.; PERAZZO, F.; LIMA, L.; SCHNEEDORF, J.; BASTOS, J. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 191-196. 2005.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; DOS SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DE FFM DINIZ, M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev. bras. farmacogn. vol.**, v. 15, n. 4, p. 2005.

FALCÃO, M. A.; CLEMENT, C. R.; GOMES, J. B. M. Phenology and yield of sorva (*Couma utilis* (Mart.) Muell. Arg.) in Central Amazonia. **Acta bot. bras.** 17(4): 541-547. 2003.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz J Pharm Sci**, v. 42, n., p. 369-394. 2006.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Rev. patol. trop.**, v. 34, n. 2, p. 113-122. 2005.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopátia: Uma área Emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Brasília; v.12; p.175-205; 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n., p. 61-68. 1997.

FERREIRA, G. A.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7-8, p. 473-478. 2007a.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 1, p. 161-164. 2007.

FOGLIO, A. M. Q., C. L. SOUZA, I. M. O. RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **MutiCiência: Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da UNICAMP**. 7, 2006.

FONTES-JUNIOR, E. A., SILVEIRA, D., SANTOS, A. R. S., COSTA, A. M. R., BAS, G. N. T., SANTOS, S. N., NASCIMENTO, J. L. M., ESPÍNDOLA, L. S., MORAES, V. M. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Pouteria ramiflora***. XIX Reunião Anual da FESBE. Águas de Lindóia: Livro de resumos, 2004.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.178-182. 2005.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 19-24. 2006.

GERSHENZON, J. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1281-1328. 1994.

GIOTTO, A. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; SILVA, J. G. P. Efeito Alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg.(Myrtaceae) na Germinação e no Crescimento de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 2, p. 600-602. 2007.

GOIS AQUINO, F.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F. Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado-Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.supl 1, p.147-149. 2007.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization : Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348.1995.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 5 Supl, p. 715S-725S. 1993.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Rev Bras Farmacogn** 12 (Supl. 1), v., n., p. 1-2. 2002.



HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 418-421. 1991.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 207-214. 2006.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n., p. 1027-1031. 2002.

HOPKINS, M. J. G.; RIBEIRO, J.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. INPA. p. 560-81. 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, p. 1841-1856. 2005.

IBAMA. **Ecosistemas Brasileiros: Cerrado:** Disponível em <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm> 2007.

IZIDORO, L.; RODRIGUES, V.; RODRIGUES, R.; FERRO, E.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, n. 7, p. 669-675. 2003.

JAMAL, C. M.; BORGES, M. H.; LIMA, M. E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S. Anti PLA-2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **BOLLETTINO CHIMICO FARMACEUTICO**, v. 141, n. 6, p. 457-470. 2002.

JANTAN, I.; RAFI, I.; JALIL, J. Platelet-activating factor (PAF) receptor-binding antagonist activity of Malaysian medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 88-92. 2005.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M.; VELEZ, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183-186. 2000.

JARDINI, F. A.; FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1. 2007.

JIANG, Z. H.; TANAKA, T.; KOUNO, I. A lupane triterpene and two triterpene caffeates from *Rhoiptelea chiliantha*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1223-1226. 1995.

JUNGES, M. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M.; RODRIGUES FILHO, E. The use of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H-NMR in the structural elucidation of a new Nor-lupane triterpene. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n., p. 317-320. 1999.

JUNGUES, M. J. Triterpenos ursânicos e oleânicos isolados do caule de *Eugenia florida* D. C. **Rev. de Pesquisa e Pós-Graduação**, Erechin – RS, v. 01, p. 13-30, 2000.

JÚNIOR, W. P. **Atividades Biológicas in vitro de Extratos Hidroetanólicos de Folhas e do Mesocarpo Interno de *Caryocar brasiliense* Cambess** - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KANCHAN, S.; JAYACHANDRA. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* L. **Plant and Soil**, v. 55, n. 1, p. 67-75. 1980.

KIMURA, Y.; ITO, H.; KAWAJI, M.; IKAMI, T.; HATANO, T. Characterization and Antioxidative Properties of Oligomeric Proanthocyanidin from Prunes, Dried Fruit of *Prunus domestica* L. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 6, p. 1615-1618. 2008.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 309-312. 2005.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355. 1990.

KOLAK, U.; TOPÇU, G.; BIRTEKSOZ, S. Terpenoids and Steroids from the Roots of *Salvia blepharochlaena*. **Turk. J. Chem**, v. 29, n., p. 177-186. 2005.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 970-973. 1986.

KUBOTA, T.; DÓREA, H. S.; NOGUEIRA, P. C. L. **Constituintes voláteis dos frutos de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae)**. 29º Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006. PN271.

LABOURIAU, L. G. 1983. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington.

LIM, H.; KIM, M.; LIM, Y.; CHO, Y.; LEE, C. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. **Cancer Letters**, v. 233, n. 1, p. 89-97. 2006.

LIMA, M.; SOUZA LUNA, J.; SANTOS, A.; ANDRADE, M.; SANT'ANA, A.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 137-147. 2006.

LODHI, M. A. K. Allelopathic potential of *Salsola kali* L. and its possible role in rapid disappearance of weedy stage during revegetation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, n. 3, p. 429-437. 1979.

LOPES, G.; SANCHES, A.; NAKAMURA, C.; DIAS FILHO, B.; HERNANDES, L.; MELLO, J. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265-272. 2005.

LORENZI, H. E. M., F.J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil / Nativas e exóticas**. Nova Odessa. 2002. 512 p.

LUSTOSA, F. L. F.; OLIVEIRA, S. C. C.; ROMEIRO, L. A. Efeito Alelopático de Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 2, p. 849-851. 2007.

LOYOLA-VARGAS, V. M. *et al.* Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. **Rev. Soc. Quím. Méx. México**, v 48, n 1, p. 67-94, 2004.

LUZ, L. A.; FERRADÁ, T. C. R. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Vicaria. **Rev. Cubana Planta Med.** Cuba, v 7, p. 96-9, 2002.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 14, n. supl 01, p. 40-44. 2004.

MACARI, P. A. T. E., V. P.; FERREIRA, Z. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Quim Nova**, v. 13, n., p. 260-262. 1990.

MACHADO, L. L.; RAMOS, M. L. G.; CALDAS, L. S.; VIVALDI, L. J. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesq. agropec. bras**, v. 39, n. 5, p. 2004.

MACÍAS-RUBALCAVA, M.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. Pentacyclic Triterpenes with Selective Bioactivity from *Sebastiania adenophora* Leaves, Euphorbiaceae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 1, p. 147-156. 2007

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química nova**, v.25, n.3, p.429-438. 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.1, p. 176-177, 1962.

MALCHER, G. T.; ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, T. B. M; VASCONCELOS; J. N. E.; RODRIGUES, F. E. A.; SANTIAGO, G. M. P.; OLIVEIRA, M. C. F.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de *Teophrosia cinérea* Pers. (Fabaceae). **30º Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, 2006.

MAZARO, R.; DI STASI, L.; DE GRAVA KEMPINAS, W. Effects of the hydromethanolic extract of *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) on reproductive parameters of male rats. **Contraception**, v. 66, n. 3, p. 205-209. 2002.

MEBE, P. P.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from *Euclea divinorum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 311-313. 1998.

MELO, J.; ENDO, T.; BERSANI-AMADO, L.; SVIDZINSKI, A.; BARONI, S.; MELLO, J.; BERSANI-AMADO, C. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol, v. 43, n. 3, p. 2007.

MÉNAN, H.; BANZOUZI, J. T.; HOCQUETTE, A.; PÉLISSIER, Y.; BLACHE, Y.; KONÉ, M.; MALLIÉ, M.; ASSI, L. A.; VALENTIN, A. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 131-136. 2006.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v. 22, n., p. 185-188. 1999.

MENEZES, I.; MOREIRA, Í.; CARVALHO, A.; ANTONIOLLI, A.; SANTOS, M. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 41-47. 2007.

MENEZES, P.; SCHWARZ, E.; SANTOS, C. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 398-400. 2004.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.; LAPA, A. *Solanum paniculatum* L.(Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 508-514. 2002.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n., p. 783-787. 2005.

MIRANDA-VILELA, A.; RESCK, I.; GRISOLIA, C. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956-963. 2008.

MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial. 1999. 116 p.

MAHATO S. B.; KUNDU, A. P. Review article number 98 13 CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517 – 1575, 1994.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633-638. 2006.

MORAES, T. M.; RODRIGUES, C. M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T. M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C. H.; BRITO, A.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti - *Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 161-168. 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MYERS, N., MILTTERMEIER, R. A., MILTTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. B., KENTS. J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-858 p. 2000.

NAEED, A. Studies in the chemical constituents of *Plumeria obtusa* and structure and activity relationship studies in the harmine series of alkaloids. 223 p. Tese (Doutorado). H.E.J. Institute of Chemistry, University of Karachi, 1991.

NAKATANI, N.; KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**, v. 48, n. 11, p. 5512-5516. 2000.

NASCIMENTO, M.; ALCANTARA, S.; HADDAD, C.; MARTINS, F. Allelopathic potential of *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., a species of the Brazilian cerrado. **Allelopathy Journal**, v. 20, n. 2, p. 279-286. 2007.

NAVICKIENE, H.; MORANDIM, A.; ALÉCIO, A.; REGASINI, L.; BERGAMO, D.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.; LOPES, M.; BOLZANI, V.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quimica Nova**, v. 29, n., p. 467-470. 2006.

NEPLAN, Núcleo de estudos de Plantas Mediciniais – Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais Disponível em <http://zeus.qui.ufmg.br/~neplam/principal.htm> Acesso em 30/10/2008.

NOGUEIRA, P. C. L.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; RIBEIRO, A. S.; MORAES, V. R. S.; MACHADO, S. M. F.; ALVES, P. B.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H. **Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae de estado de Sergipe**. II Seminário de Pesquisa FAP-SE, Aracajú, 2004.

OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 317-320. 1989.

OGUNWANDE, I.; OLAWORE, N.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.; SCHMIDT, J.; SETZER, W. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147-152. 2005.

OHSHIMA, H. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxyxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 25, p.1057–1065, 1998.

OLIVEIRA, C.; MAIORANO, V.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.; JANUÁRIO, A.; LOURENÇO, M.; SAMPAIO, S.; FRANÇA, S.; PEREIRA, P.; SOARES, A. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 213-216. 2005.

OLIVEIRA, M.; ANDRADE, C.; SANTOS-MAGALHAES, N.; COELHO, L.; TEIXEIRA, J.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.; CORREIA, M. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376. 2008.

OLIVEIRA, S. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta bot. bras.**, v.18, n.3, p. 401-406, 2004.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Five New Prenylated p-Hydroxybenzoic Acid Derivatives with Antimicrobial and Molluscicidal Activity from *Piper aduncum* Leaves. **Planta Médica**, v. 59, n., p. 546-546. 1993.

ORLANDO, S. C. **Avaliação da atividade antimicrobina da extrato hidroalcoólico bruto da casca do *S. adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 89 p. - Programa de Pós-Graduação da Universidade de Franca, Universidade de Franca, Franca, 2005.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of *Colombian Annonaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635. 2007.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 81-83. 1998.

PARK, B. S.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T.; LEE, S. E.; TAKEOKA, G. R. Antioxidant Activity and Characterization of Volatile Constituents of *Tahebo* (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 295-300. 2003.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 6, p. 623-627. 2002.

PAULA, W.; ROCHA, F.; DONATTI, L. Atividades leishmanicida, bactericida e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 16, n., p. 625-630. 2006.

PAULETTI, P. M.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Triterpenos de *Styrax camporum* (styracaceae). **Quím. Nova.** v. 25, n. 3, p. 34-352, 2002

PEREIRA, C. G.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC: Technical and economical analysis. **The Journal of Supercritical Fluids**, v 40, n 2, p. 232-238. 2007.

PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO<sub>2</sub>+ ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **J. Supercrit. Fluids**, v. 30, p. 51-61, 2004.

PEREIRA, J.; SAMPAIO, F.; PEREIRA, M.; MELO, A.; HIGINO, J.; CARVALHO, A. In vitro antimicrobial activity of an extract from *anacardium occidentale* Linn. on *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. **Odontol. clín.-cient**, v. 5, n. 2, p. 137-141. 2006.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Braz J. Pharmacogn.**, v. 15, n., p. 3. 2005.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, n.3, p.237-243. 2001.

PIRES, M. O.; SANTOS, I.M. (Orgs) **Rede Cerrado – Construindo o Cerrado Sustentável. Experiências e Contribuições das ONG's** – Brasília: Gráfica Nacional, 2000.



PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, s. 1, p. 45-61, 2002.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, v.V. 1978

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93-98. 2001.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341. 1999.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302. 2005.

RAMALHO, L. S.; PERFEITO, J. P.; LOPEZ, K. E.; PAULA, J. E.; FERNANDEZ, I. M.; SOUZA, S. R.; ELIZABETH, N. F.; SANTOS, M. L.; SILVEIRA, D. **Avaliação da atividade citotóxica e antimicrobiana de extratos de *Pouteria ssp* (Sapotaceae)**. Congresso Ibero-Americano de Plantas Medicinais. III Jornada de Fitoterapia do Rio de Janeiro. Angra dos Reis: Livro de resumos, 2004.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, n. 10, p. 1952. 1968.

RAPADO, L. N. **Efeito moluscicida de extratos de Piperaceae no vetor da esquistossomose *Biomphalaria glabrata***. 106 p. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Cordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2007.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral Catarinense (Brasil). **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 495-503. 2004.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 6-7, p. 388-392. 2004.

RHODIN, A. **Conservation International do Brasil. Prioridades de conservação:** <http://conservation.org.br/como/index.php?id=8>, Acesso em 03/11/2008, 2008.

RIBAS, L. L. F., ZANETTE, F., KULCHETSCKI, L., GUERRA, M. P. Micropopagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis, **Rev. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.4, p.517-524, 2005

RIBEIRO JR, W. A. Aspectos reais e lendários da biografia de Hipócrates, o" pai da medicina. **Jornal Brasileiro de História da Medicina**, v.6, n.1, p.8-10. 2003.

RICE, E. L. Allelopathy. Orlando: AcademicPress, 1984. 422p.

RIGONATO, V. D.; ALMEIDA, M. G. **A singularidade do cerrado:a interrelação das populações tradicionais com as fitofisionomias.** VIII Encontro Regional de Geografia. Cidade de Goiás. Anais... UEG. 2003.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, n., p. 51-62. 2002.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. **Allelopathy: Basic and applied aspects.** London, Chapman & Hall, 1992. p.443-472.

RIZZO, J.A.; FERREIRA, H.D. **Hancornia speciosa G. no estado de Goiás.** In: Congresso Nacional de Botânica, 1985, Curitiba, PR. Anais. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, v.1, p.363-368. 1990

ROCHA, A.I.; REIS LUZ, A. I.; RODRIGUES, W.A. Apresença de Alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. **Acta Amazônica**, 12(2):381-387. 1982.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais.** Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Tese de Doutorado, 2007. 197 p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande - MG. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 25, n., p. 102-123. 2001.

RODRIGUES, V. P. **Copernicia cerifera Mart.: Aspectos Químicos e Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira.** 129p. - Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. **Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae).** 29<sup>o</sup> Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006. PN256.

RUCH, K. J.; CHENG, S. J.; KLAINING, J. E. Prevention of cytotoxic and inhibition of intercellular communication by antioxidant cataquin isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 1003-1008, 1989.

SALGUEIRO, F. R.; RENATO SAKAI CID, R. S., SILVA, L. P.; TOMA, W. **Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Bauhinia forficata* Link. leaves extract.** 6<sup>o</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto: Livro de resumos, 2007.

SAMPAIO, F.; PEREIRA, M.; CONDE, N. In vitro Antimicrobial Activity of *Caesalpinia ferrea* Fruits against Oral Pathogens: 55. **Caries Research**, v. 41, n. 4, p. 287. 2007.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v.95, n.4, p.606-610. 2006.

SAMPAIO, T. S.; MORAES, V. R. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C. L. **Éster 3-b-O-acil lupeol do látex dos frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae).** 29<sup>o</sup> Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006. PN340.

SANCHES, A.; LOPES, G.; NAKAMURA, C.; DIAS FILHO, B.; MELLO, J. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 101-107. 2005.

SANTOS, A. G., ALENCAR, D. C., PINHEIRO, M. L. B., SILVA, J. R. A., AMARAL, A. C. F., COSTA, E. V., BARISON, A., CAMPOS, F. R. **ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Annona impressivenia*.** 30<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Águas de Lindóia: Livro de resumos, 2006.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, Á. PEQUIZEIRO (CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.): UMA ESPÉCIE PROMISSORA DO CERRADO BRASILEIRO. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, v. 64, n., p. 2004.

SANTOS, E. A.; SAMPAIO, T. S.; FEITOSA, J. G. R.; RIBEIRO, A. O.; NOGUEIRA, P. C. L. **Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae)**. 29<sup>o</sup> Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006. PN005.

SANTOS, P. O. B. J., A. M.; MÉLO, D.; TRINDADE, R. C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.2, p.108-111, 2007.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C.; GEREMIAS, R.; AVILA, S.; DAMINELLI, E.; PEDROSA, R.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v., n., p. 2008.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. 4.ed. New York, Berlin: Springer, p.1-39. 2001.

SEITO, L. N.; MAZARO, R.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of the *Austroplenckia populnea* extracts in mice. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 2, p. 193-196. 2002.

SERRA, C. P.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v.12, n.6-7, p.424-432. 2005.

SHUKOR, Y.; ADAM, H.; ITHNIN, K.; YUNUS, I.; SHAMAAN, N.; SYED, M. Molybdate Reduction to Molybdenum Blue in Microbe Proceeds via a Phosphomolybdate Intermediate. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 8, p. 1448-1452. 2007.

SHUKOR, Y.; SHAMSUDDIN, B.; MOHAMAD, O.; ITHNIN, K.; SHAMAAN, N.; SYED, M. A Method to Study the Effects of Chemical and Biological Reduction of Molybdate to Molybdenum Blue in Bacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 672-675. 2008.

SIAULYS, V. **Fitomedicamentos: vocação natural da indústria farmacêutica nacional**. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, 2008.

SILVA, C.; HERDEIRO, R.; MATHIAS, C.; PANEK, A.; SILVEIRA, C.; RODRIGUES, V.; RENNÓ, M.; FALCÃO, D.; CERQUEIRA, D.; MINTO, A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229-233. 2005.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3, 7-di-O-a-L-ramnopiranosídeo. **Rev. bras. farmacogn.** vol, v. 15, n. 1, p. 2005

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v.5, n.9, p.859-865. 2005.

SILVA JÚNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, 26: p.1-192, abr. 2004.

SILVA JÚNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado: um guia de campo**. Brasília: Rede de sementes do cerrado, 2005.

SILVA LOBATO, A.; SANTOS, D.; OLIVEIRA, F.; GOUVEA, D.; SILVA TORRES, G.; LIMA JÚNIOR, J.; OLIVEIRA NETO, C.; SILVA, M. Ação do Óleo Essencial de Piper aduncum L. Utilizado como Fungicida Natural no Tratamento de Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 2, p. 915-917. 2007.

SILVA, S.; CHAAR, J.; FIGUEIREDO, P. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amaz**, v. 38, n. 1, p. 107-112. 2008.

SILVA, T.; NASCIMENTO, R.; BATISTA, M.; AGRA, M.; CAMARA, C. Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n., p. 35-38. 2007.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; JUNIOR, I. N.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Rev. bras. farmacogn.** vol, v. 15, n. 2, p. 2005.

SILVERSTEIN R. M.; WEBSTER F. X., 2000. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6.<sup>a</sup> Edição. 460 p. Livros Técnicos e Científicos Editora SA, Rio de Janeiro.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC. 2001. p. 87-99.

SMÂNIA, A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 3, p. 177-181, 1995.

SOARES, C. M.; ENDRINGER, D. C.; CAMPANA, P. V.; VALADARES, Y. M.; BRAGA, F. C. **Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes biomonitorado por ensaio in vitro de atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA)**. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador. Livro de resumos, 2006.

SOARES, G.L.G. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Floresta e Ambiente**, v.7, p.190-197, 2000.

SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*. **J Braz Chem Soc**, v. 2, p. 15-20. 1991.

SOUSA, C.; SILVA, H.; VIEIRA JÚNIOR, G.; AYRES, M.; COSTA, C.; ARAÚJO, D.; CAVALCANTE, L.; BARROS, E.; ARAÚJO, P.; BRANDÃO, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

SOUSA, O. V., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., KAPLAN, M.A.C. Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de Folhas de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 872-877. 2007.

SOUZA, A. D. L.; DA ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE GUSTAVIA AUGUSTA L.(LECYTHIDACEAE). **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 439-442. 2001.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta bot. bras.**, v 20, n 1, p. 135-142. 2006.

SOUZA, C. P.; MENDES, N. M.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; PEREIRA, J. P. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 34, n. 5, p. 459-466. 1992.

SOUZA, C. S. M.; SILVA, W. L. P.; GUERRA, A. M. N. M.; CARDOSO, M. C. R.; TORRES, S. B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde**, Mossoró, v.2, n.2, p.96 - 100 jul/dez. 2007.

SOUZA, C. V., LORRENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa - SP. 2005

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n., p. 247-249. 2002.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R.; ISAAC, V. L. B. Antiseptic activity evaluation of the dry extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville and cosmetic preparation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n., p. 71-75. 2007.

SPAULDING-ALBRIGHT, N. A Review of Some Herbal and Related Products Commonly used in Cancer Patients. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n. 10S, p. 208-215. 1997.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: W. Tavares (Ed.). **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos.** São Paulo: Atheneu, 1996. p.3-13

TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr Bach.** São José do Rio Preto: São José. 1994. 33 p.

TEMPONE, A. G.; TREIGER BORBOREMA, S. E.; DE ANDRADE, H. F.; DE AMORIM GUALDA, N. C.; YOGI, Á.; SALERNO CARVALHO, C.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390. 2005.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L., BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.7-13. 2003.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]:** Araraquara 2002.

TOMOSAKA, H.; KOSHINO, H.; TAJIKA, T.; OMATA, S. Lupeol Esters from the Twig Bark of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cv. Shinko. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 1198-1201. 2001.

TORIUMI, Y.; KAKUDA, R.; KIKUCHI, M.; YAOITA, Y.; KIKUCHI, M. New Triterpenoids from *Gentiana lutea*. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 51, n. 1, p. 89-91. 2003.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective Effect of 2', 6'-Dihydroxy-4'-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1234-1241. 1999.

TWARDOWSCHY, A.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; MAYER, B.; DOS SANTOS, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; ZACARIAS, A. A.; DOS SANTOS, E. P.; OTUKI, M. F.; MARQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 455-459. 2008.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M.J.; LISABETSKY,.; LAIRD, S.A., eds. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p.3-10.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytochemistry**, v. 8, n. 5, p. 377-381. 2001.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 91-97. 2003.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CANEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 13, p. 64-66. 2003.

VINAUD, M. C.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Rev. patol. trop.**, v. 34, n. 2, p. 137-143. 2005.

VRATIMOS, M O; BRANDÃO, P H ; SILVA, R. M. G. . **Investigação do efeito do látex de *Hancornia speciosa* no desenvolvimento, ingestão de água, alimentos e o ganho de peso na nutrição experimental de camundongos**. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. 1984. **Plant Drug Analysis**. Berlin:Springer Verlag.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**. n. 43, p. 50-1. 1998.



YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Santa Catarina: Editora Universitária: UNOSC/Argos. 2001

YUNES, R. A., CECHINEL-FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental. In: R. A. Yunes, Calixto, J. B (Ed.). **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC: Argus, 2001. p.523

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-152. 2001.

ZHANG, P.; FENG, Z.; WANG, Y. Flavonoids, including an unusual flavonoid-Mg<sup>2+</sup> salt, from roots of *Cudrania cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 23, p. 2759-2765. 2005.

ZOCOLER, M. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; GRZESIUK, V. L.; VIDOTTI, G. J. Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1372-1377. 2005.

**ANEXO**

### **Fitotoxicidade dos extratos das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes**

Ivelone Maria de Carvalho Barros (PG)<sup>1</sup>, Andréa da Silva Ferreira<sup>1</sup>; Inês Sabioni Resck (PQ)<sup>2</sup>; Sueli Maria Gomes (PQ)<sup>3</sup>, Dâmaris Silveira (PQ)<sup>1</sup> (<sup>1</sup>*Faculdade de Ciências da Saúde;* <sup>2</sup>*Instituto de Química;* <sup>3</sup>*Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília, DF, Brasil. CEP 70910-900, e-mail: [ivelone@unb.br](mailto:ivelone@unb.br)*)

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático dos extratos, hexânico e etanólico das folhas de *Hancornia speciosa* sobre a germinação e crescimento das plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Foram utilizadas três concentrações de cada extrato (1000, 2000 e 4000 ppm), em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de 25 sementes cada. Os dois extratos reduziram o índice de velocidade de germinação (IVG) e a germinação foi inibida de forma significativa apenas pelo extrato etanólico nas três doses testadas. O crescimento das partes aéreas foi inibido apenas pelo extrato hexânico nas concentrações de 1000 e 4000ppm. O crescimento da radícula mostrou-se mais sensível sendo inibido pelos dois extratos nas concentrações de 4000ppm para O extrato hexânico, e de 2000 e 4000ppm para extrato etanólico. Esses resultados sugerem que os extratos das folhas de *H. speciosa* sejam ativos e estudos complementares estão sendo realizados por nosso grupo com o objetivo de isolar e caracterizar substâncias que possam estar envolvidas nesse processo.

Termos para indexação: Alelopatia, Germinação, *Hancornia speciosa*, *Lactuca sativa*

### **Toxic effects of the leaves extracts of *Hancornia speciosa* Gomes**

Abstract - The objective of this work was to evaluate the allelopathic potential of the hexane and ethanolic extracts from the leaves of *Hancornia speciosa* on the germination and growth of seedlings of lettuce (*Lactuca sativa*). Three concentrations were utilized for each extract (1000, 2000 and 4000ppm) arranged into a completely randomized design, with three replicates of 25 seeds each. The two extracts reduced the germination speed (IVG) and germination was inhibited with significance only by ethanolic extract, in the three tested concentrations. The growth of the aerial parts was inhibited only by hexane extract at concentrations of 1000 and 4000ppm. The growth of the radicle is more sensitive being inhibited by the two extracts at concentrations of 4000ppm for the hexane extract, and 2000 and 4000ppm for ethanolic extract. These results suggest that the extracts from the leaves of *H. speciosa* are active and further studies are being conducted by our group aiming to isolate and characterize substances that may be involved in that process.

Index terms: Allelopathy, Germination, *Hancornia speciosa*, *Lactuca sativa*.

## Introdução

Espécies vegetais que vivem em comunidade competem naturalmente entre si por fatores como: luz, água e nutrientes. Tal processo estimula o desenvolvimento de mecanismos biológicos que favoreçam a sobrevivência de algumas plantas em detrimento de outras. Essa resposta, faz parte do mecanismo de defesa das plantas que, normalmente, envolve substâncias químicas do metabolismo secundário, as quais, podem ser chamadas fitotoxinas ou aleloquímicos. Ao serem liberados no meio, os aleloquímicos podem interagir com outras espécies causando impacto no ambiente adjacente. Esse fenômeno, onde uma planta exerce uma ação direta ou indireta sobre outra planta ou sobre microorganismos, insetos e herbívoros predadores, é conhecido como alelopatia (Pinto *et al.*, 2004).

Um dos aspectos mais explorados da alelopatia é o seu papel na agricultura. Atualmente, a busca por inseticidas naturais ganhou grande impulso e o potencial alelopático de várias plantas é avaliado como método de controle alternativo, em substituição ao uso intensivo de herbicidas sintéticos, que acarretam problemas ambientais e de saúde ( Rizvi & Rizvi, 1992).

*Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) é uma espécie frutífera, arbóreo-arbustiva genuinamente brasileira, conhecida como mangaba, mangabeira, mangava, mangabeira-do-norte e fruta de doente (Almeida *et al.*, 1998; Andrade, 2002). Desenvolve-se em diferentes ecossistemas como Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Entretanto, ocorre em maior abundância nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste onde o fruto é bastante apreciado (Aguar Filho *et al.*, 1998).a medicina popular é usada no tratamento da tuberculose, úlcera, dismenorréia, diabetes, obesidade e verrugas. As cascas têm ação adstringente e servem para afecções dos pulmões e fígado, câimbras e luxações (Almeida *et al.*, 1998; Silva Junior, 2005). Nas regiões de ocorrência desta planta, muitas famílias ganham seu sustento com a coleta e comercialização de mangabas. O fruto é consumido *in natura*, e é matéria-prima para industrialização de vários produtos como doces, sucos, sorvetes e compotas. Atualmente a importância econômica da mangabeira tem sido percebida, despertando a necessidade de realizar estudos para um maior aproveitamento da espécie e de suas potencialidades. Com o intuito de corroborar para o conhecimento dessa espécie, o objetivo desta pesquisa é verificar se os extratos brutos de *H. speciosa* apresentam efeito fitotóxico sobre a germinação e/ou crescimento de sementes de *Lactuca sativa* L.

## **Material e Métodos**

Os extratos brutos foram obtidos a partir da maceração do material botânico seco e pulverizado (495g) com hexano e em seguida com etanol 95%. Após decantação, as soluções extrativas foram concentradas à secura, sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40°C.

O ensaio biológico foi realizado em triplicata, de acordo com a técnica previamente descrita por Oliveira *et al* (2004) com modificações. Placas de petri de 9 cm de diâmetro, previamente autoclavadas foram revestidas por papel de filtro Wathman n°1, estéril. Para o estudo foram selecionadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) adquiridas comercialmente, previamente tratadas com solução de hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e lavadas com água destilada.

As amostras consistiram em soluções, em solvente adequado, dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de *H. speciosa*, nas concentrações de 1000, 2000 e 4000 ppm. As soluções foram distribuídas (10mL) em cada placa de petri, de modo a umedecer totalmente o papel. O grupo controle recebeu apenas os solventes que foram utilizados para diluir os extratos (diclorometano ou etanol).

Após a evaporação do solvente, foram adicionados 10 mL de água destilada em cada placa, com o objetivo de manutenção de umidade.

### **Avaliação da influencia dos extratos de *Hancornia speciosa* sobre a germinação de *Lactuca sativa***

Esse ensaio foi realizado de acordo com Souza *et al.* (2004) com modificações. Foram distribuídas 25 sementes de forma aleatória para cada placa. As placas foram mantidas sob condições de temperatura ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade ambiente (noite/dia).

O número de sementes germinadas foi verificado nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, sendo eliminadas do ensaio as sementes germinadas. O critério de germinação foi a emergência da radícula ( $\pm 2\text{mm}$ ) seguida de curvamento geotrópico da raiz. O experimento foi realizado em três repetições.

### **Avaliação da influencia dos extratos de *Hancornia speciosa* sobre o crescimento das plântulas de *Lactuca sativa***

Esse ensaio foi realizado de acordo com Oliveira *et al.* (2004) com modificações. Resumidamente, dez sementes previamente germinadas (por período de até 40 horas) foram

distribuídas aleatoriamente em placa de petri de 9 cm de diâmetro forradas com papel de filtro Whatman n. 1, tratado como previamente descrito, em triplicata.

As plântulas cresceram por 6 dias ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ ) e no sexto dia foi feita a medida das partes aérea e radicular, com auxílio de paquímetro. Aspectos morfológicos, tais como presença de raízes secundárias, pêlos radiculares e necroses também foram verificados.

### **Análise estatística**

Foram calculados a germinabilidade (G%) (Labouriau, 1983) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire, 1962). Os dados, tanto de germinação quanto de crescimento, foram submetidos ao teste de ANOVA *one way*, seguido pelo teste de *Tukey* a 5%, ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

A avaliação preliminar da fitotoxicidade exige a utilização de plantas que apresentem rápido crescimento e possibilite a visualização de fatores que reflitam o efeito das substâncias testadas sobre o crescimento e/ou germinação de sementes. A escolha da espécie-alvo (*Lactuca sativa*) baseou-se em alguns fatores como: maior sensibilidade aos aleloquímicos, pequeno período requerido para a germinação (24 a 48 horas) e facilidade no acesso (Ferreira & Borghetti, 2004). Considerando ainda que a alface (*L. sativa*) é uma das plantas mais utilizadas como espécie-alvo em ensaios experimentais.

A germinabilidade (%) foi avaliada frente aos extratos brutos, hexânico (EHB) e etanólico (EEH), das folhas de *H. speciosa*, nas concentrações de 1000, 2000 e 4000 ppm. O extrato hexânico (EHB) não afetou de forma significativa a germinabilidade das sementes de *L. sativa* sendo observada inibição de 32,3% e 29% somente nas maiores concentrações (Figura 1a). No entanto, foi observada redução dose-dependente no índice de velocidade de germinação (IVG) (Figura 1b) que segundo Ferreira & Borghetti (2004) pode ser influenciado por efeito alelopático sem alterar a germinabilidade. Esses resultados foram observados por Borges *et al.* (2007), em estudo alelopático com extrato de folhas de mamona (*Ricinus communis* L.).

O extrato etanólico (EEB) apresentou efeitos inibitórios significativos sobre a germinação nas três concentrações avaliadas, quando comparadas aos controles. As doses

2000 e 4000 ppm foram as mais ativas (68,1 e 65,2%), não apresentando diferença significativa entre elas (Figura 1a). Como pode ser observado na figura 1b, em todas as doses, o extrato etanólico provocou redução do IVG. A partir da avaliação desse índice, o qual indica a velocidade de germinação, observa-se que as sementes de alface tratadas com os extratos tiveram o vigor diminuído, requerendo um tempo maior para germinar. Esses dados sugerem a presença, no meio, de substâncias que modificam o metabolismo das sementes, submetidas à ação dos extratos, lentificando e/ou inibindo o processo germinativo. Esse efeito pode ser causado pelo mesmo composto que pode agir proporcionalmente à sua concentração no extrato.

Na análise de crescimento das plântulas de sementes pré-germinadas de *L. sativa*, os extratos foram testados nas mesmas concentrações usadas no teste de germinação (1000 ppm, 2000 ppm e 4000 ppm). O crescimento da parte aérea não foi afetado pelo EEB nas concentrações avaliadas, e o desenvolvimento das radículas foi inibido de forma significativa nas concentrações de 2000 ppm e 4000 ppm não havendo diferença estatística entre elas (Figura 2a).

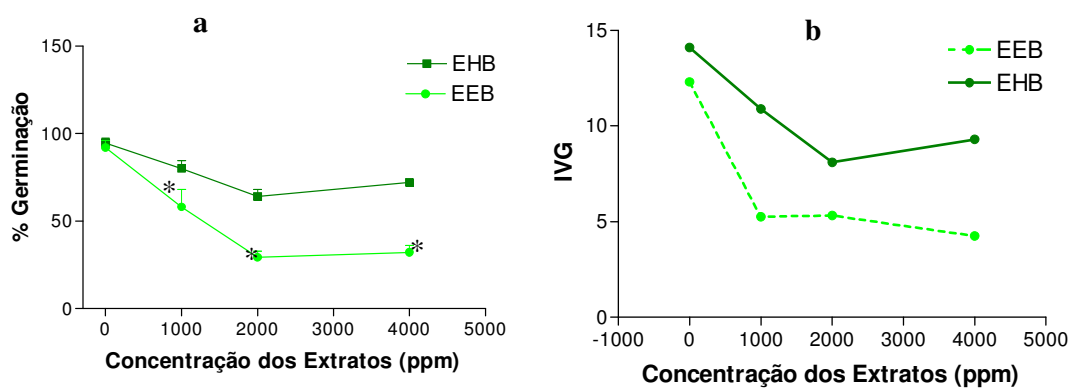
O EHB demonstrou atividade significativa ao inibir o crescimento da parte aérea nas concentrações de 1000 ppm e 4000 ppm observando-se uma redução da atividade inibitória de acordo com o aumento da dose não havendo uma diferença significativa entre as respostas das concentrações mais altas 2000 ppm e 4000ppm (Figura 2b). Quanto à inibição das raízes o EHB mostrou-se mais ativo apenas na maior concentração de 4000 ppm (Figura 2b).

A ação dos extratos sobre o crescimento das partes aéreas e das radículas pode ser justificado pela composição micromolecular dos mesmos. Em estudo realizado por este grupo constatou-se que o extrato hexânico (EHB) das folhas de *H. speciosa* é rico em terpenos, compostos geralmente insolúveis em água encontrados em resinas, ceras, látex e óleos essenciais que atuam como reguladores de crescimento, fitoalexinas e repelentes para insetos herbívoros (Rice, 1984). Quanto ao extrato etanólico (EEB) foi verificada a presença de compostos fenólicos como flavonóides que além das funções de pigmentos, atrativos ou repelentes de herbívoros, proteção contra radiação UV, estas substâncias apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir o crescimento de plantas e fungos (Rice, 1984). Apesar dessas evidências não é possível indicar quais substâncias causaram tal inibição, pois além dos extratos terem uma complexa composição química, não se sabe ao certo como agem os compostos alelopáticos.

O conceito de alelopatia sugere que biomoléculas produzidas por uma planta alcancem o meio ambiente e influenciem o crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas. O efeito

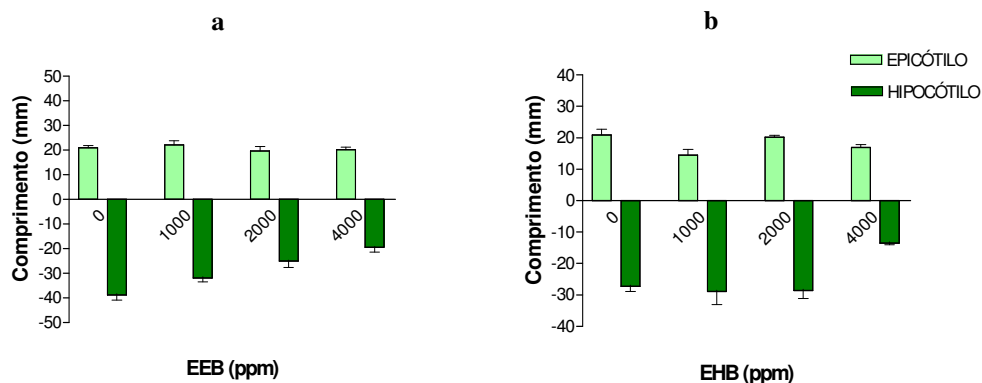
desses aleloquímicos sobre as plantas ainda não é bem conhecido mas acredita-se que eles sejam apenas uma sinalização secundária de mudanças anteriores ocorridas inicialmente ao nível molecular e celular. Entre essas mudanças incluem alterações no balanço hormonal assim como na permeabilidade das membranas prejudicando a absorção de água e nutrientes. ( Rizvi & Rizvi, 1992).

Dentre as alterações morfológicas nas plântulas tratadas com os extratos, observou-se necrose das radículas e presença de raízes laterais. De acordo com Ferreira & Aquilila (2000), o crescimento da plântula é a fase mais sensível no desenvolvimento vegetal à ação dos aleloquímicos, que podem induzir o aparecimento plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Quanto à presença de raízes laterais pode estar relacionada aos distúrbios no balanço hormonal das plântulas (Dayan *et al.* 2000).



**Figura 1:** Germinação (a) e Índice de velocidade de germinação (IVG) (b) de sementes de *Lactuca sativa*, sob o efeito de diferentes concentrações dos extratos brutos hexânico (EHB) e etanólico (EEB) das folhas de *Hancornia speciosa*. Foi considerado estatisticamente diferente quando  $p < 0,05$  (\*). O ponto zero corresponde ao grupo controle





**Figura 2:** Tamanho médio do epicótilo e hipocótilo de plântulas de *Lactuca sativa* após sete dias de incubação em soluções aquosas de diferentes concentrações dos extratos etanólico (EEB) (a) e hexânico (EHB) (b) das folhas de *Hancornia speciosa*. Foi considerado estatisticamente diferente quando  $p < 0,05$  (\*). O ponto zero, no eixo das concentrações, corresponde ao grupo controle.

## Conclusões

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares de toxicidade mostraram que o extrato hexânico (EHB) não possui a propriedade de inibir a germinação de sementes de *L. sativa*. Porém quando em menor concentração (1000 ppm), foi capaz de reduzir a velocidade de germinação, bem como de inibir o crescimento das partes aéreas (epicótilo) das plântulas. Tal ação inibitória diminuiu com o aumento da dose. Com relação ao crescimento das raízes (hipocótilo) a inibição ocorreu apenas na concentração de 4000 ppm.

O EEB mostrou-se mais ativo ao inibir a germinação em todas as concentrações avaliadas (1000, 2000 e 4000 ppm) e reduzir o IVG tornando o processo germinativo mais lento quando comparado aos controles. Não mostrou atividade de inibição das partes aéreas (epicótilo) das plântulas, porém inibiu o crescimento das raízes (hipocótilo) em todas as concentrações avaliadas mostrando maior significância em 2000 e 4000 ppm.

Esses dados sugerem que os extratos das folhas de *H. speciosa* contêm substâncias com potencial alelopático, e estudos complementares estão sendo realizados por nosso grupo com o objetivo de isolar e caracterizar tais substâncias.

## Referências Bibliográficas

- AGUIAR FILHO, S. P.; BOSCO, J.; ARAÚJO, I. A. **A mangabeira** (*Hancornia speciosa* Gomes): **domesticação e técnicas de cultivo**. João Pessoa: Emepa-PB, 1998. 26p. (Emepa-PB. Documentos, 24).
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. V. 1, 464p.
- ANDRADE, F. D. P. **Investigação química de chás brasileiros**. 2002. 178p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- BORGES, C. S.; CUCHIARA, C. C.; MACULAN K.; SOPEZKI, M. S.; BOBROWSKI, V. L. Alelopatia do extrato de folhas secas de mamona ( *Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 747-749, jul. 2007.
- DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.;DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p. 2079-2094, 2000.
- FERREIRA, G. A.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.
- FERREIRA , A. G; AQUILA, M. E. A. Alelopátia: Uma área Emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Brasília; v.12; p.175-205; 2000.
- LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, Organização dos Estados Americanos, 1983. P. 170.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.1, p. 176-177, 1962.
- OLIVEIRA, S. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta bot. bras.**, v.18, n.3, p. 401-406, 2004.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, s. 1, p. 45-61, 2002.
- RICE, E. L. Allelopathy. Orlando: **AcademicPress**, 1984. 422p.
- RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London, Chapman & Hall, 1992. p.443-472.
- SILVA JUNIOR, M. C. 100 Árvores do cerrado: guia de campo. Brasília: Rede de sementes do cerrado, 2005. 278 p.
- SOUZA, C. S. M.; SILVA, W. L. P.; GUERRA, A. M. N. M.; CARDOSO, M. C. R.; TORRES, S. B. Alelopatia do extrato aquoso de folhas de aroeira na germinação de sementes de alface. **Revista Verde**, Mossoró, v.2, n.2, p.96 - 100 jul/dez. 2007.