

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

TESE

Contribuição ao estudo químico de *Ouratea microdonta* e *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae), do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Atividade Biológica

Luiz Roberto Marques Albuquerque

2012



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

Contribuição ao estudo químico de *Ouratea microdonta* e *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae), do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Atividade Biológica

Luiz Roberto Marques Albuquerque

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

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

Seropédica, RJ
Novembro de 2012

581.19

A345c

T

Albuquerque, Luiz Roberto Marques, 1970-
Contribuição ao estudo químico de
Ouratea microdonta e Sauvagesia erecta
(Ochnaceae), do látex de Parahancornia
amapa (Apocynaceae) e atividade biológica
/Luiz Roberto Marques Albuquerque - 2012.
188 f.: il.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa
de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 179-188.


1. Química vegetal - Teses. 2.
Ochnaceae - Análise - Teses. 3. Ochnaceae
- Composição - Teses. 4. Apocinaceae -
Análise - Teses. 5. Apocinaceae -
Composição - Teses. 6. Fitoquímicos -
Teses. I. Carvalho, Mário Geraldo de,
1952-. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

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

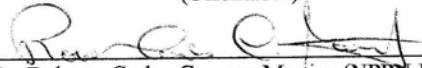
LUIZ ROBERTO MARQUES ALBUQUERQUE

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

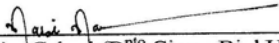
TESE APROVADA EM / /



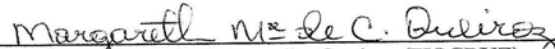
Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Orientador)



Dr. Roberto Carlos Campos Martins (NPPN-UFRRJ)



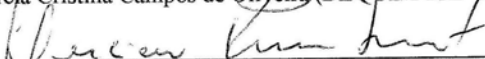
D.ª Marise Maleck de Oliveira Cabral (D.º Cienc. Biol. Univ. Sev. Sombra)



D.ª Margareth Maria de Carvalho Queiroz (FIOCRUZ)



D.ª Marcia Cristina Campos de Oliveira (DEQUIM-ICE-UFRRJ)



Dr. Luciano Ramos Suzart (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Suplente)

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Josi Nascimento Seixas e
nosso filho Miguel Seixas Albuquerque*

DEDICATÓRIA

*Ao meu irmão Luiz Cláudio Marques Albuquerque.
Sua alma viveu em constante conflito com o homem que foi e o que deveria ter sido.
Aonde quer que estejas sempre vou lembrar de ti... que Deus ilumine seu caminho.*

“Não importa onde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível recomeçar.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito neste período? Foi aprendido...
Chorou muito? Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora...
Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto...
Queira o melhor do melhor...
Se pensarmos pequeno...
Coisas pequenas teremos...
Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A meus pais Roberto Luiz Sales Albuquerque e Francisca Marques Albuquerque pela minha existência e incentivo deste cedo na busca de conhecimentos...

A toda a minha família, incluindo a família Seixas

A Dona Isabel (vovó) por todas as horas de carinho dedicadas ao Miguel.

À minha esposa grande incentivadora para o fechamento deste trabalho e talvez a pessoa que mais acredita nas minhas realizações....

Ao meu orientador Doutor Mário Geraldo de Carvalho por todas as oportunidades dadas (e por nunca ter desistido), pela grande pessoa que se mostrou e pela sua extrema competência nas coisas que se propõe a fazer. Um exemplo a ser aprendido e incorporado à vida, não tenho palavras para agradecer....

A todos os professores do programa de pós graduação- PPGQO.

Ao professor Dari Cesarin por toda ajuda dada desta reta final.

À funcionária Áurea (que Deus a tenha) e aos demais funcionários e amigos Frances, Fábio, Maurício, Elli, Karlão, Eugênio, Osmar e Victor por todas as análises realizadas e acima de tudo pela amizade e compreensão nos momentos de “pressa”.

Às estagiárias que contribuíram com este trabalho; Vanessa, Letícia e Renata.

À Dra Ana Lucia dos Santos Barbosa, primeira orientadora e incentivadora;

A todos que mesmo sem saber contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos antigos amigos de laboratório; Lorena, Geraldo, Virginia, Marli, Juliana, Maritza e Renata, por todos os momentos de convivência e alguns pela grande amizade desenvolvida extrapolando a vida nos laboratórios: Idelmar, Luciano (Baiano), Mário Sérgio, Eduardo (Ceará), Ari, Bauer, Júlio e Cláudio.

Aos amigos de turma Regina e Grazielle.

Aos novos companheiros do LQPN: Almir, Tereza, Geovani, Queli, Mirza e todos os estagiários.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

E acima de tudo a Deus

RESUMO

ALBUQUERQUE, Luiz Roberto Marques. **Contribuição ao estudo químico de *Ouratea microdonta* e *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae), do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Atividade Biológica.** 188 p Tese (Doutorado em Ciências, Química). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A análise das frações obtidas dos extratos de *Ouratea microdonta* (Ochnaceae) e *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae), e do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) conduziu ao isolamento de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. Das folhas da *O. microdonta* (Ochnaceae) foram isolados os terpenos sitosterol, estigmasterol, lupeol, α e β -amirina; o ácido 3,5-diidroxibenzóico e os biflavonoides, amentoflavona (5,7,4'-triidroxiflavona (3'-8'')-5'',7'',4'''-triidroxiflavona), 7''-*O*-metilagatisflavona e agatisflavona (5,7,4'-triidroxiflavona (6-8)-5'',7'',4'''-triidroxiflavona). Deste metabólito foi obtido o derivado tetrametil-agatisflavona, através dos dados obtidos das curvas de dicroísmo circular (CD) e ultra violeta (UV) foi possível estabelecer a estereoquímica absoluta dos atropoisômeros destes biflavonóides. Da *S. erecta* foi possível realizar o isolamento dos terpenos, sitosterol e estigmasterol, ácido ursólico, lupeol, α e β -amirina, os terpenos glicosilados 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil estigmasterol, a isoflavona 5,7,4'-trimetoxisoflavona, e o flavonóide vitexina. Do látex da *P. amapa* foram isolados uma mistura dos triterpenos pentacíclicos lupeol, α -amirina e β -amirina e seus ésteres (3-*O*-acil-), com predominância dos ésteres 3-*O*-acil-lupeol, a dienona 1-hidroxi-4-oxo-2,5-dien-cicloexil-1-etileno-*O*-glicopiranosídeo conhecido como cornosídeo e o açúcar metilmioinositol. As estruturas foram identificadas pela análise dos espectros de IV, Massas e RMN ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas especiais 1D e 2D das substâncias naturais e de derivados, e comparação com dados obtidos da literatura. Foram realizados testes de avaliação do potencial moluscicida de *O. microdonta* sobre *Biomphalaria glabrata* (molusco), e os efeitos do látex da *P. amapa* sobre o desenvolvimento pós embrionário das larvas de *Chrysomya megacephala* e inseticida sobre as larvas *Chrysomya putoria*, e ainda o efeito carrapaticida sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (carrapato). O perfil metabolômico do látex da *P. amapa* confirmou as substâncias isoladas e indicou que os efeitos biológicos podem ser atribuídos aos terpenos e a dienona identificada.

Palavras chave: *Ouratea microdonta*, *Sauvagesia erecta*, *Parahancornia amapa*, atividade biológica.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Luiz Roberto Marques. **Contribution to the study of chemical and *Ouratea microdonta* and *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae) of Latex *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) and Biological Activities.** 2012. 188 p. Tese (Doutorado em Ciências, Química. Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The analysis of the fractions obtained from extracts of *Ouratea microdonta* (Ochnaceae) *Sauvagesia erecta* (Ochnaceae) and latex *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) led to the isolation of constituents of different classes of metabolites special. *O. microdonta* (Ochnaceae) were isolated terpenes, sitosterol, stigmasterol, lupeol, α and β -amyrin acid, 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid and biflavonoids, amenthoflavone (5,7,4'-trihydroxyflavone (3'-8'')-5'',7'',4'''-trihydroxyflavone), 7''-O-methyl-agathisflavone and agathisflavone (5,7,4'-trihydroxyflavone (6-8)-5'',7'',4'''-trihydroxyflavone). Of this metabolite derivative was obtained tetramethyl-agathisflavone through of data from the curves circulates dichroism (CD) and ultra violet (UV) could be established the absolute stereochemistry of biflavonoids these atropisomers. *S. erecta* was possible the isolation of terpenes, sitosterol and stigmasterol, ursolic acid, lupeol, α and β -amyrin, terpenes glycosylated 3- β -O- β -D-glucopyranosyl β -sitosterol and 3-O- β -D-glucopyranosyl stigmasterol, isoflavone 5,7,4'-trimethoxy-isoflavone, and flavonoid vitexin. *P. amapa* latex were isolated a mixture of pentacyclic triterpene lupeol, α -amyrin and β -amyrin and esters (3-O-acyl), predominantly esters of 3-O-acyl-lupeol, dienone the 1-hydroxy-4-oxo-2,5-dien-cyclohexyl-1-ethylene-O-glucopyranoside and sugar known as cornosideo metilmioinositol. The structures were identified by analysis of IR, Mass and ^1H and ^{13}C NMR, including 1D and 2D special techniques of natural substances and derivatives, and compared with data obtained from the literature. Tests were conducted to evaluate the potential of molluscicidal *O. microdonta* on *Biomphalaria glabrata* (mollusk), and the effects of latex *P. amapa* on the post embryonic development of the larvae of *Chrysomya megacephala* and insecticide on larvae *Chrysomya putoria*, and the effect on ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (tick). The metabolomic profile latex *P. amapa* confirmed the isolated and indicated that biological effects can be attributed to terpenes and dienone identified.

Keywords: *Ouratea microdonta*, *Sauvagesia erecta*, *Parahancornia amapa*, biological activities.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns iridóides isolados de espécies de <i>Himatanthus</i>	15
Tabela 2. Dados de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 1, 2 e 3	25
Tabela 3. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do cornosídeo 4 (MeOD-d_4) comparados com a literatura (KHAN <i>et al.</i> , 1992).....	27
Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C da substância 5 (50 MHz, DMSO-d_6) comparados com a literatura (BREITMAIER <i>et al.</i> , 1989).....	29
Tabela 5. Dados de RMN ^1H da substância 5a (200 MHz, CDCl_3) comparados com a literatura (BARRETO, 1994).....	31
Tabela 6. Peso e eficiência do extrato de <i>P. amapa</i> em diferentes concentrações sobre o <i>R. (B.) microplus</i>	44
Tabela 7. Flavonóides isolados de espécies de <i>Ouratea</i>	64
Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C dos triterpenos 3, 4 e 5 (50 MHz, CDCl_3) comparados com a literatura (SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991; CARVALHO <i>et al.</i> , 2000).....	80
Tabela 9. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância 6 (ácido 3,5-diidroxibenzóico) comparados com a literatura (SAXENA <i>et al.</i> , 1994).....	85
Tabela 10: Comparação da apigenina (MARKHAN <i>et al.</i> , 1987) com os monômeros que compõem a substância 7	89
Tabela 11. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (200 e 500 MHz) da substância 7 (amentoflavona) comparados com a literatura (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002).....	94
Tabela 12. Dados de RMN ^1H (50 MHz) da substância 8 (7''- <i>O</i> -metilagatisflavona) comparados com a literatura (MOREIRA <i>et al.</i> , 1999).....	97
Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância 9 (agatisflavona) comparados com a literatura (DANIEL <i>et al.</i> , 2005).	102
Tabela 14. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da substância 9a comparados com a literatura (MOREIRA, <i>et al.</i> , 1999)	104
Tabela 15. comparação dos valores das curvas de CD e UV encontrados neste trabalho com os da literatura para a 4',4'',7,7''-tetra- <i>O</i> -metilcupressuflavona (LI <i>et al.</i> , 1997).....	106
Tabela 16. Número de espécimes de <i>B glabrata</i> utilizados nos bioensaios com <i>O. microdonta</i>	112
Tabela 17. Percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos de <i>O. microdonta</i> durante a realização dos bioensaios.....	113
Tabela 18. Análise estatística por classe de diâmetro de concha da taxa de mortalidade dos moluscos sobreviventes ao bioensaio durante 48 dias de observação.....	115
Tabela 19. Análise estatística por extrato da taxa de mortalidade dos moluscos sobreviventes ao bioensaio durante 48 dias de observação.....	115
Tabela 20. Número de massas ovíferas liberadas por <i>B. glabrata</i> sobreviventes aos bioensaios durante 48 dias de observação.....	117
Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 6 comparados com os encontrados na literatura para o ácido ursólico (KRIWACKI & PINTER, 1989).....	142
Tabela 22. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz) da substância 7 (5,7,4'-trimetoxisoflavona).....	146
Tabela 23. Dados de RMN ^1H de 8 e 9 comparados com os encontrados na literatura (KOJIMA <i>et al.</i> ,	

1990).....	150
Tabela 24. Dados de RMN ¹³ C de 8 e 9 comparados com os encontrados na literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990).....	151
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H de 10 comparados com os encontrados na literatura para Vitexina (ZHOU, <i>et al.</i> , 2005).....	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos naturais puros, derivados ou sintetizados utilizados como fármacos.....	4
Figura 2 a. <i>Parahancornia amapa</i> (árvore).....	12
Figura 2 b. Látex de <i>Parahancornia amapa</i>	12
Figura 3. Substâncias puras e derivados isolados de <i>Parahancornia amapa</i>	14
Figura 4. Iridóides isolados de espécies de <i>Himatanthus (Apocynaceae)</i>	16
Figura 5. Constituintes isolados do Látex de <i>Parahancornia amapa</i>	21
Figura 6. Espectro de IV das substâncias 1-3 a-d.	22
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDCl ₃) da mistura das substâncias 1-3a-c.....	23
Figura 8. Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) da mistura das substâncias 1-3a-d.....	24
Figura 9. Espectro de IV da substância 4 (cornosídeo).....	26
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, MeOD) da substância 4 (cornosídeo).....	27
Figura 11. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 4 (cornosídeo).....	28
Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C DEPT (50 MHz, MeOD) da substância 4 (cornosídeo).....	28
Figura 13. Detalhe da região de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5 (metilmioinositol).....	30
Figura 14. Detalhe da região de RMN de ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5 (metilmioinositol)....	30
Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C DEPT (50 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5 (metilmioinositol).....	31
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 5a.....	32
Figura 17. Cromatograma a gás (CG) e espectro de massas (EM) da substância 5a	32
Figura 18. Duração (dia) dos períodos de desenvolvimento de larval, pupal e neolarva a adulto de <i>Chrysomya megacephala</i> tratadas com diferentes concentrações de látex.....	38
Figura 19. O peso (mg) das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> topicamente tratados com diferentes concentrações de látex.....	38
Figura 20. Viabilidade (%) dos períodos de desenvolvimento das larvas, pupas e de neolarva a adulto de <i>Chrysomya megacephala</i> topicamente tratados com diferentes concentrações de látex.....	39
Figura 21. Viabilidade (%) dos períodos de desenvolvimento das larvas, pupas e de neolarva a adulto de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com diferentes concentrações de látex.....	40
Figura 22. Períodos de desenvolvimento (dias) para larvas, pupas e de neolarva a adulto de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com diferentes concentrações de látex.....	41
Figura 23. Peso das larvas (mg) de <i>Chrysomya putoria</i> tratadas com diferentes concentrações de látex....	42
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃)- identificação dos metabólitos na partição CHCl ₃	47
Figura 25. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl ₃)- identificação dos metabólitos na partição CHCl ₃	48
Figura 26. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl ₃)- identificação dos metabólitos na partição CHCl ₃	48
Figura 27. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl ₃)- identificação dos metabólitos na partição CHCl ₃	49
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD)- identificação dos metabólitos na partição MeOH....	50

Figura 29. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, MeOD)- identificação dos metabólitos na partição MeOH.....	51
Figura 30. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, MeOD)- identificação dos metabólitos na fração da partição MeOH.....	51
Figura 31. Estruturas de flavonóides encontradas em espécies de <i>Ouratea</i>	66
Figura 32. Constituintes isolados de <i>Ouratea microdonta</i>	77
Figura 33. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) sitosterol (1) e estigmasterol (2).....	78
Figura 34. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) dos triterpenos Lupeol (3), α-amirina (4) e β-amirina (5).	81
Figura 35. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) dos triterpenos Lupeol (3), α-amirina (4) e β-amirina (5).	81
Figura 36. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) dos triterpenos Lupeol (3), α-amirina (4) e β-amirina (5).....	82
Figura 37. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) ácido 3,5-diidroxí-4-metoxibenzóico (6).....	84
Figura 38. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) ácido 3,5-diidroxí-4-metoxibenzóico (6).....	84
Figura 39. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) ácido 3,5-diidroxí-4-metoxibenzóico (6).....	85
Figura 40. Cromatograma a gás (CG) e espectro de massas (EM) da substância 6....	86
Figura 41. Espectro de IV da substância 7 (amentoflavona) com pastilha de KBr.....	87
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	90
Figura 42.1. Expansão espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	91
Figura 43. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	91
Figura 43.1. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	92
Figura 43.2. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	92
Figura 44. Espectro de RMN HMQC (500 MHz, DMSO- d ₆) amentoflavona (7).....	93
Figura 45. espectro de IV da substância 8 (7''-O-metilagatisflavona) com pastilha de KBr.....	95
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, D ₃ CO) 7''-O-metilagatisflavona (8).....	96
Figura 47. espectro de IV da substância 9 (Agatisflavona) com pastilha de KBr.....	98
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) da substância 9 (agatisflavona).....	99
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ Hx ¹ H-COSY (200 MHz, DMSO-d ₆) da substância 9.....	100
Figura 50. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆) agatisflavona (9).....	101
Figura 51. Espectro de RMN de ¹³ C e DEPT (50 MHz, DMSO-d ₆) agatisflavona (9).....	101
Figura 52. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 10	103
Figura 53. Atropoisômeros CD (+) aR e CD (-) aS para agatisflavona.....	106
Figura 53a. Curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) da biflavona, 4',4''',7,7'''-tetra-O-metilcupressuflavona ((LI <i>et al.</i> , 1997).....	106
Figura 54. curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) das biflavonas, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, isoladas de <i>Ouratea microdonta</i>	107
Figura 55. curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) da biflavona, tetrametilagatisflavona (<i>Ouratea microdonta</i> e <i>Ouratea Hexasperma</i>).....	107
Figura 56. Percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Classe I e II) exposta ao extrato	

OMGM e grupo controle durante 48 dias de observação.....	114
Figura 57. Percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Classe I e II) exposta ao extrato OMPM-F e grupo controle durante 48 dias de observação.....	114
Figura 58. Números de posturas realizadas por <i>Biomphalaria glabrata</i> (classe I) expostas aos extratos OMPM-F e grupo controle durante 48 dias de observação.....	116
Figura 59. Números de posturas realizadas por <i>Biomphalaria glabrata</i> (classe II) expostas aos extratos OMPM-F e grupo controle durante 48 dias de observação.....	116
Figura 60. <i>Sauvagesia erecta</i>	127
Figura 61. Constituintes químicos identificados em <i>Sauvagesia erecta</i>	128
Figura 62. Constituintes isolados de <i>Sauvagesia erecta</i>	137
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) das substâncias 1 e 2	138
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 3, 4 e 5 (lupeol, α -amira e β -amirina).....	140
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Piridina- d_5) de 6	143
Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Piridina- d_5) de 6	143
Figura 67. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, Piridina- d_5) de 6	144
Figura 68. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, Piridina- d_5) de 6	144
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 7	147
Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de 7	147
Figura 71. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de 7	148
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Piridina- d_5) substâncias 8 e 9 (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol)	152
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, Piridina- d_5) substâncias 8 e 9 (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol)	152
Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C (Expansão, 50 MHz, Piridina- d_5) da substâncias 8 e 9 (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol)	153
Figura 75. espectro de IV da substância 10 (vitexina) com pastilha de KBr.....	156
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 10 (vitexina)	156
Figura 77. Espectro de RMN de DEPTQ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 10	157
Figura 78. Expansão do espectro de RMN de DEPTQ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 10	157
Figura 79. Espectro de RMN de HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 10	158
Figura 80. Expansão do espectro de RMN de HMQC (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 10	158

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fracionamento do látex liofilizado de <i>Parahancornia amapa</i>	17
Esquema 2. Fracionamento das partições hexano (PALAH) e diclorometano (PALAD).....	18
Esquema 3. Fracionamento da partição metanol do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	20
Esquema 4. Proposta de fragmentação de 5a.....	33
Esquema 5. Fracionamento do extrato metanol das Folha de <i>Ouratea microdonta</i>	71
Esquema 6. Fracionamento da partição OMPHF das folhas de <i>Ouratea microdonta</i>	72
Esquema 7. Fracionamento da partição OMPCF das folhas de <i>Ouratea microdonta</i>	73
Esquema 8. Fracionamento da partição OMPAcF de <i>Ouratea microdonta</i>	75
Esquema 9. Fracionamento da partição OMPMF de <i>Ouratea microdonta</i>	76
Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do composto com tr 9,65 min (substância 6).....	86
Esquema 11. Preparo e partição dos extratos de <i>Sauvagesia erecta</i>	130
Esquema 12. Fracionamento da partição SEDFC de <i>Sauvagesia erecta</i>	132
Esquema 13. Fracionamento da partição SEDFM de <i>Sauvagesia erecta</i>	134
Esquema 14. Fracionamento do extrato metanólico de <i>Sauvagesia erecta</i> - SEM.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
ν	estiramento
M^+	pico do íon molecular
Ac	acetila
AcOEt	acetato de etila
APT	A ttached P roton T est
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CG	cromatografia a gás
CG-EM	cromatografia de gás associada a espectrometria de massas
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
CD_3OD	metanol deuterado
COSY	C orrelated S pectroscop Y
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
DEPTQ	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer Including the Detection of Q uaternary N uclei
DMSO- D_6	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectroscopia de massas
e.V.	electron volt
HBBD (BBD)	H ydrogen B and B road D ecoupled
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HMQC	H eteronuclear M ultiple- Q uantum C oherence
Hz	Hertz
IES	Ionização Elétron Spray
IV	Infra-vermelho
J	constante de acoplamento em Hertz
m	multiplete
m/z	relação massa/ carga
MeOH	metanol
MHz	megahertz
NOE	N uclear O verhauser E ffect
NOESY	N uclear O verhauser E ffect C orrelation S pectroscopy
P.F.	ponto de fusão
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete

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

SUMÁRIO

I. Introdução geral.....	1
II. Objetivos	7
III. Material e métodos gerais.....	8
III.1 Experimental Geral.....	8
III.2 Derivatizações.....	9
III.2.1 Metilação com diazometano.....	9
III.2.2 Acetilação com anidrido acético e piridina.....	10
IV. Contribuição ao estudo fitoquímico do látex de <i>Parahancornia amapa</i> (Apocynaceae) e avaliação da atividade biológica.....	11
IV.1 Aspectos botânicos e generalidades sobre <i>Parahanornia amapa</i>	12
IV.2. A química da <i>Parahancornia amapa</i>	13
IV.2.1 Considerações químicas sobre os gêneros <i>Parahancornia</i> e <i>Himatanthus</i> (Apocynaceae).....	15
IV.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	17
IV.3.1 Processamento das partições PALAH e PALAD	18
IV.3.2 Processamento da partição metanol PALAM.....	19
IV.4 Resultados e discussão.....	21
IV.4.1 Constituintes químicos isolados do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	21
IV.4.2 Determinação estrutural dos constituintes isolados do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	22
IV.4.2.1 Identificação da substância 1-3a-d (ésteres de acil lupeol).....	22
IV.4.2.2 Identificação da substância 4.....	26
IV.4.2.3 Identificação da substância 5 (metilmioinositol) e o derivado 5a	29
IV.5. Atividade biológica do látex de <i>Parahancornia amapa</i> (Apocynaceae).....	34
IV.5.1 Materias e métodos gerais para os ensaios com larvas de <i>Chrysomya putoria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i>	34
IV.5.1.1 Animais: estabelecimento e manutenção das colônias.....	34
IV.5.1.2 Preparo das soluções do látex liofilizado.....	35
IV.5.1.3 Execução dos testes.....	35
IV.5.1.4 Análise estatística.....	36
IV.5.2 Resultados.....	37
IV.5a Efeito do látex de <i>Parahancornia amapa</i> (Apocynaceae) no desenvolvimento pós embrionário das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i>	37
IV.5b Avaliação da atividade inseticida do látex de <i>P. amapa</i> (Apocynaceae) sobre as larvas de <i>Chrysomya putoria</i>	40
IV.5.2 Eficiência carrapaticida do látex de <i>P. amapa</i> (Apocynaceae) contra <i>Rhipicephalus</i> (Boophilus) <i>microplus</i> (Acari:Ixodidae).....	43
IV.5.2.1 Procedência do <i>Rhipicephalus</i> (Boophilus) <i>microplus</i>	43
IV.5.2.2 Preparo das soluções do látex.....	43

IV.5.2.3 Execução do testes (Controle in vitro de <i>R. (B.) microplus</i>).....	43
IV.5.2.4 Resultados.....	44
IV.5.2.5 Conclusão.....	45
IV.6. Perfil metabolômico do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	46
IV.7 Artigos publicados com o estudo do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	52
V Contribuição ao estudo fitoquímico de <i>Ouratea microdonta</i> (<i>Ochanaceae</i>).....	61
V.1 Revisão de literatura.....	62
V.2. Isolamento e Purificação dos Constituintes químicos de <i>Ouratea microdonta</i>	70
V.2.1 Isolamento e Purificação dos Constituintes químicos das folhas de <i>O. microdonta</i>	70
V.2.1.1 Processamento da partição OMPFH.....	72
V.2.1.2 Processamento da fração OMPCF.....	73
V.2.1.3 Processamento da fração OMPAcF.....	73
V.2.1.4 Processamento da fração OMPMF.....	75
V.3 Constituintes Químicos Isolados de <i>Ouratea microdonta</i>	76
V.3.1 Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>Ouratea microdonta</i>	78
V.3.1.1 Identificação das substâncias 1 e 2 (sitosterol e estigmasterol).....	78
V.3.1.2 Identificação das substâncias 3, 4 e 5 (Lupeol, α -amirina, β -amirina).....	79
V.3.1.3 Identificação da substância 6 (ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico).....	83
V.3.1.4 Identificação da substância 7 (amentoflavona).....	87
V.3.1.5. Identificação da substância 8 (7''-O-metilagatisflavona).....	95
V.3.1.6. Identificação da substância 9 (Agatisflavona) (5,7,4'-triidroxiflavona (6 \rightarrow 8'')-5'',7'',4'''-triidroxiflavona).....	98
V.3.1.7. Identificação do derivado 10 (tetrametilagatisflavona).....	103
V.4 Estereoquímica absoluta dos atropisômeros dos biflavonóides isolados de <i>O. microdonta</i>	105
V.5 Atividade moluscicida dos extratos de folhas de <i>Ouratea microdonta</i>	108
V.5.1 Avaliação do potencial moluscicida de <i>O. microdonta</i> (<i>Ochnaceae</i>) sobre <i>B. glabrata</i> (Planorbidae) e verificação de efeitos tardios nos moluscos sobreviventes aos bioensaios.....	109
V.5.1.1. Criação e manutenção de linhagem de <i>Biomphalaria glabrata</i>	109
V.5.1.2 Avaliação Moluscicida.....	110
V.5.1.3 Preparo das amostras.....	110
V.5.1.4 Execução do teste.....	110
V.5.1.5 Análise estatística dos resultados.....	112
V.5.1.6 Resultados.....	112
V.5.1.7 Conclusões.....	118
V.6 Artigos publicados da <i>Ouratea microdonta</i>	119
VI Contribuição ao estudo fitoquímico de <i>Sauvagesia erecta</i> (<i>Ochnaceae</i>).....	125
VI.1 Revisão de literatura.....	126
VI.1.1 Aspectos botânicos e generalidades sobre a características do gênero <i>Sauvagesia</i>	126
VI.2 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Sauvagesia erecta</i>	129

VI.2.1 Processamento da Partição SEDFC.....	130
VI.2.2 Processamento da partição SEDFM.....	132
VI.2.3 Processamento do extrato metanólico da <i>Sauvagesia erecta</i> - SEM.....	134
VI.3 Constituintes Químicos Isolados de <i>Sauvagesia erecta</i>	137
VI.4 Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>S. erecta</i>	138
VI.4.1 Identificação das substâncias (1) e (2) (mistura de sitosterol e estigmasterol).....	138
VI.4.2. Identificação das substâncias 3, 4 e 5 (lupeol, α -amirina, β -amirina).....	139
VI.4.3 Identificação da substância (6) ácido ursólico.....	141
VI.4.5 Identificação da substância 7 (5, 7, 4' - trimetoxisoflavona).....	145
VI.4.6 Identificação das substância 8 e 9 (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol).....	149
VI.4.7 Identificação da substância (10) vitexina.....	154
VII Conclusões.....	159
VIII. Referências.....	160
Anexo A. Cornoside and other constituents from the latex of <i>Parahancornia amapa</i> (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil.....	54
Anexo B. Effects of latex from "Amapazeiro" <i>Parahancornia amapa</i> (Apocynaceae) on blowfly <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development.....	57
Anexo C. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of <i>Ouratea microdonta</i> Engl. (Ochnaceae).....	121

I. INTRODUÇÃO GERAL

A fitoquímica interage com diferentes áreas de conhecimento e sua relevância está ligada a essa interdisciplinaridade. O estudo fitoquímico visa detectar informações inerentes aos metabólitos especiais e contribuir para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência.

A grande variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às variações das condições ambientais, de adaptação e regulação. Há substâncias macromoleculares (proteínas, ácidos nucleicos etc.) que são produzidas pelos processos metabólicos primários e são estudados pelos Bioquímicos. A maioria das substâncias micromoleculares (alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignóides etc.) são elaboradas por processos metabólicos especiais e são estudadas pelos Químicos de Produtos Naturais.

Além do interesse econômico visando explorar os metabólitos especiais na produção de perfumes, corantes, medicamentos, inseticidas etc., deve-se considerar que os estudos realizados pelos Químicos de Produtos Naturais trazem informações inerentes aos metabólitos especiais que enriquecem e contribuem para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, tais como: Farmacologia, Botânica, Agricultura, Química Orgânica, Evolução e Ecologia Química.

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas e, principalmente, o aperfeiçoamento dos instrumentos de análises espectrométricas aliado ao desenvolvimento de técnicas espectroscópicas como UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C e EM, juntamente com as técnicas especiais de RMN (NOE, NOESY, HMBC, HMQC, COSY, HETCOR, INADEQUATE etc.), além de difração de raios-X ou dicroísmo circular, os químicos orgânicos têm conseguido com certa rapidez e facilidade, elucidar estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas. Como resultado, a aplicação de diversas técnicas cromatográficas, juntamente com o uso dessas técnicas modernas de análise orgânica,

tem conseguido detectar uma grande diversidade de substâncias de diferentes classes de metabólitos especiais.

Conforme revelado acima, a justificativa mais frequente para se realizar o estudo químico de plantas é o anseio de se descobrir substâncias naturais com atividade biológica. Isto é observado nas obras relacionadas com detecção, isolamento e determinação estrutural de produtos naturais bioativos (WANGER & WOLFF, 1977; PEZZUTO, 1997). Pode-se incluir como exemplo adicional às obras de Colegate, 1993 e Bruneton, 1993, que revelaram claramente a importância de se desenvolver estudos sobre a química das plantas. Além de se conseguir meios de verificar a viabilidade do uso de espécies vegetais pela população, através de estudos de farmacognosia para orientá-los quanto ao uso das plantas, há também a possibilidade de se descobrir substâncias que podem ser usadas como medicamento e, inclusive, servirem como modelo ou matéria-prima para síntese de fármacos. Este tipo de trabalho tem sido razão do emprego de bilhões de dólares por grupos de pesquisas dos países desenvolvidos. Inúmeras drogas têm sido obtidas de plantas e muitas atividades terapêuticas são controladas por estes medicamentos que são empregados em forma de produtos naturais puros ou fração de extratos, de derivados ou sintetizados (Figura 1, página 4). Entre 1997-2007, mais de 500 substâncias químicas novas foram aprovadas pelas instituições reguladoras de todo o mundo, desse total quase 50% são de origem natural (NEWMAN & CRAGG, 2007). E, nos últimos 30 anos, aproximadamente 49% de todos os fármacos utilizados no tratamento de diferentes tumores são oriundos de produtos naturais ou derivados destes. Em outras classes, como no tratamento de infecções a dependência dos produtos naturais é ainda maior (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Como os exemplos ilustrados na figura 1, página 4, podemos citar os alcalóides anti-hipertensivos (*Rauwolfia serpentina*, reserpina, **1**), colinérgicos (*Pilocarpus jaborandi*, pilocarpina, **2**), antimalarial (alcalóides de Cinchona, **3** e **4**), anestésico (*Erythroxylum coca*, cocaína, **5**), relaxante muscular (*Chondrodendron tomentosum* ou curare, tubocurarina, **6**) e

anticancerígenos (vincristina ou Oncovina, **7** de *Catharanthus roseus* e a camptotecina **8**, de *Camptotheca acuminata*). Em relação a agentes anticancerígenos não se pode deixar de citar o lignóide podophilotoxina (**9**, de *Podophyllum peltatum*) e o derivado diterpênico, paclitaxel (ou taxol, **10**, de *Taxus brevifolia*) (COLEGATE & MOLYNEUX 1993; BRUNETON 1993). Outros já comercializados são os glicosídeos cardiotônicos, a digoxina (**11**), encontrada em espécies de *Digitalis* (PEZZUTO 1997; COLEGATE & MOLYNEUX 1993; BRUNETON 1993; WANGER 1977). A avaliação da atividade antiviral de substâncias naturais tem sido frequente. Como exemplos podemos citar o trabalho de Hu *et al.*, 1994, onde fizeram a avaliação da atividade de vários flavonóides isolados de *Chrysanthemum morifolium* e de outros flavonóides conhecidos. Nesta avaliação verificaram que a crisina (**12**), 7,8-diidroxiflavona (**13**) e a apigenina (**14**) revelaram-se mais ativas e menos tóxicas do que a 7-O-β-D-glicosil-5-hidroxi-4'-metoxiflavona (**15**). Na classe dos flavonóides, os biflavonóides têm sido citados com mais frequência quanto à avaliação de atividade biológica. Como exemplo os trabalhos: “Antiviral Activities of Biflavonoids” (LIN *et al.*, 1999), “Biflavonoids as Novel Antituberculosis Agents” (LIN *et al.*, 2001) e os trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo (LQPN- UFRRJ) sobre isolamento, determinação estrutural e avaliação de atividade antitumoral, citotóxica e inibição de DNA topoisomerase (CARVALHO *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005), inclusive, em células humanas (DANIEL *et al.*, 2007), além de atividade anti-helmíntica (SILVA *et al.*, 2005) e moluscicida (CARVALHO *et al.*, 2006) das biflavonas isoladas de espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia*. Como exemplo podemos destacar a 7"-metil-agatisflavona (**16**, abundante em espécies de *Ouratea*), amentoflavona (**17**) e diidrochnaflavona (**18**). Além dos trabalhos de elucidação estrutural e preparação de derivados desses metabólitos naturais (CARVALHO *et al.*, 2006; DANIEL *et al.*, 2005; CARVALHO & DANIEL, 2005).

Na classe dos triterpenos (Figura 1, página 4), os ácidos 3-oxo-2a,19a-diidroxius-12-en-28-oico (**20**), ursólico (**21**) e maslínico (**22**) isolados de *Geum japonicum* (XU *et al.*, 1994)

e 3-oxo-16,28-diidroxi-friedelano (celasdina B, **19**) revelaram potente atividade inibidora do vírus HIV, sendo este último menos tóxico do que o AZT (KUO & KUO, 1997).

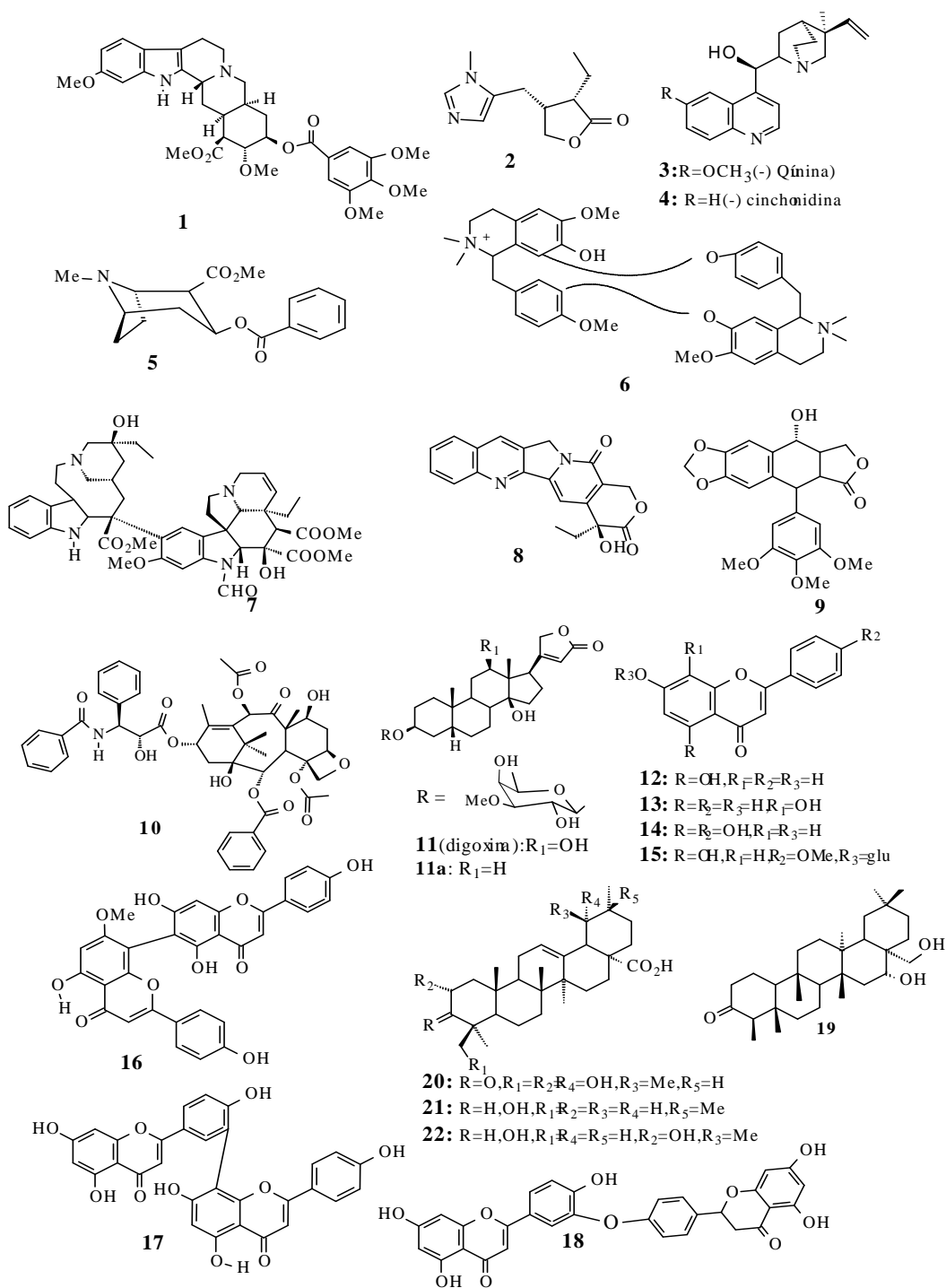


Figura 1. Produtos naturais puros, derivados ou sintetizados utilizados como fármacos.

O interesse da comunidade científica mundial em relação à flora brasileira tem sido extremamente expressivo. Esta procura tem acontecido devido a sua grande variedade de espécies e às mais diversas propriedades que muitas delas apresentam como: tintoriais,

odoríferas, estimulantes, alucinogênicas etc. (GOTTLIEB & MORS, 1978). Além de exemplo de substâncias naturais com atividade farmacológica, temos que levar em consideração que a contribuição do estudo químico de plantas brasileiras ultrapassa estes limites. Devemos considerar também as contribuições científicas oriundas dos resultados do estudo químico de plantas de forma mais ampla e não se limitar a fins exploratórios com lucros imediatos. Neste sentido, os critérios morfológicos utilizados na identificação das espécies vegetais, podem ser acrescidos de informações relacionadas com seus possíveis constituintes químicos, detectados pelo estudo fitoquímico. Essas estreitas relações, denominadas quimiotaxonômicas, permitem, inclusive, fazer previsão da composição química de uma determinada espécie vegetal e aumentam as chances de se encontrar substâncias específicas que podem ocorrer dentro de uma família ou gênero. Sob este aspecto, merecem destaque os estudos de rotas biossintéticas e enzimas envolvidas nos processos de produção desses metabólitos especiais, além de estudos em ecologia química no entendimento das interações dessas substâncias com o meio ambiente. Neste contexto, a fitoquímica está relacionada com outras áreas de estudo, como Agronomia, Veterinária, Ecologia, Biologia, Farmacologia etc.

Na área da química, a Química de Produtos Naturais é importante para a formação de profissionais de química com conhecimento dos processos biossintéticos, técnicas de elucidação estrutural e uso de reações de derivatização, além do estudo das atividades biológicas.

Estas considerações mostram a importância dos trabalhos relacionados com o estudo químico e avaliação de atividade biológica de plantas. Nesse sentido, além dos trabalhos citados acima, o Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRuralRJ tem atuado na detecção de constituintes não identificados anteriormente de espécies de diferentes famílias gerando informações sobre os constituintes químicos ativos das espécies vegetais, na preparação de derivados, e análises detalhadas das estruturas com as técnicas modernas de análise orgânica. Aliado a estes estudos e, com auxílio de outros grupos de institutos de

pesquisa, o grupo tem realizado estudos dos fatores químicos e ecológicos relacionados a efeitos de germinação de sementes e desenvolvimento de insetos como predadores das plantas e animais (LUNZ *et al.*, 2007; ESPINDOLA *et al.*, 2006). Outra contribuição relevante deste estudo é a informação quimiotaxonômica dos gêneros estudados (SUZART *et al.*, 2007).

Sendo assim, propusemos neste trabalho um complemento do estudo do látex de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae), para confirmar a ausência de iridóides na mesma, uma vez que no norte do País tem sido confundida com espécies de *Himatanthus*, cujas propriedades são atribuídas a presença desta classe de metabólitos.

A atividade inseticida do látex e de espécies vegetais é também um ponto que deve ser investigado. Alguns estudos tais como, a avaliação do efeito do látex de *Euphorbia splendens* (Euphorbiaceae) no desenvolvimento pós-embrionário de *Peckia chrysostoma* (Wiedemann, 1830) (GOMES *et al.*, 2003) e no controle de carrapatos *Rhipicephalus* (Boophilus) *sanguineus* (Latreille, 1806) (PINTO *et al.*, 2011), o efeito do látex de *Plumeria rubra* (Apocynaceae) em larvas de mosquitos (*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Anopheles stephensi* (Liston 1901)) (PATIL *et al.*, 2012), a utilização dos extratos de *Saraca indica* (Caesalpiniaceae), *Suplentes clitoria* (Fabaceae) e *Nyctanthes arbor-tristis* (Oleaceae) contra os mosquitos vetores da malária, filariose linfática e dengue (MATHEW *et al.*, 2009). Estes estudos demonstram a grande variedade de espécies vegetais testadas no controle de insetos transmissores de doenças. Estas considerações e a disponibilidade do látex de *P. amapa* motivaram o desenvolvimento do estudo sobre atividade inseticida do látex desta planta. Devido às considerações sobre atividades biológicas de flavonóides, frequência desta classe de metabólitos em espécies de *Ochnaceae* e disponibilidade de colaboração para fazer testes de atividade molucida de extratos de plantas resolveu-se fazer este estudo com os extratos de *O. microdonta*. Sendo, inclusive o primeiro estudo químico de *O. microdonta*, assim como o de *Salvagesia erecta*, que foram desenvolvidos como complemento ao conhecimento da química da família *Ochnaceae*.

II. OBJETIVOS

- Realizar o estudo químico de *Ouratea microdonta* (Folhas) e *Sauvagesia erecta* afim de complementar o conhecimento da família Ochnaceae.
- Complementar o estudo do látex de *Parahancornia amapa* para confirmar a ausência de iridóides.
- Identificar as substâncias isoladas utilizando-se métodos espectroscópicos na região do IV, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e espectrometria de massas.
- Preparar derivados com o propósito de facilitar a identificação das substâncias isoladas.
- Avaliar atividade molucicida dos extratos de *Ouratea microdonta* sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e verificar os efeitos tardios nos moluscos sobreviventes aos bioensaios
- Avaliar atividade do látex de *Parahancornia amapa* no desenvolvimento pós embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e inseticida em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818)
- Avaliar atividade carrapaticida do látex de *Parahancornia amapa* sobre *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Canestrini, 1887)

III. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

III.1 Experimental Geral

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores.

Os espectros de infravermelho foram obtidos nos espectrofotômetro FT-IR modelo Perkin-Elmer 1600/1605 e Vertex 70 da Bruker em pastilhas de KBr ou filme em NaCl.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (hidrogênio) e ^{13}C (carbono), incluindo experimentos em 2D, foram registrados nos espectrômetros: Bruker Avance-200 (^1H : 200 MHz e ^{13}C : 50 MHz), Bruker Avance II-400 (^1H : 400 MHz e ^{13}C : 100 MHz) e Bruker Avance II-500 (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz) utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS) e como solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), metanol deuterado (D_3COD), clorofórmio deuterado (CDCl_3), piridina deuterada (Piridina- d_5). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidos em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo a gás HP-5880A acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons a 70 eV; CG/EM Varian Saturn 2000; CG/EM HP-5989A.

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro J-815 Circular Dichroism da JASCO; O desvio da luz polarizada foi obtido em um polarímetro Perkin-Elmer 343 e os espectros de UV foram obtidos em espectrômetro UV-1601 PC Shimadzu.

A visualização das substâncias foi feita através de irradiação de lâmpadas ultravioleta (254 e 365 nm) e as revelações cromatográficas, quando necessárias, foram efetuadas com as

soluções de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%), vanilina sulfúrica (vanilina: 1,0g, + 45 mL de etanol + 45 mL de água + 10 mL de ácido sulfúrico), vapores de iodo, reagente Liebermann-Burchard, Godin A e B (DOMINGUEZ, 1973 e MATOS, 1988). Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F_{254} (Merck). A cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel (230-400 e 70-230 mesh, Vetec) e Sephadex® LH-20 (Sigma, USA) e para a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizada sílica G (2-25 μm , 60 Å, PF_{254}) Vetec sobre suporte de vidro, as placas cromatográficas depois de prontas apresentavam 1mm espessura de sílica.

Os solventes não deuterados utilizados foram da marca Vetec de grau P.A., sendo que alguns solventes comerciais foram destilados no Departamento de Química da UFRRJ antes de serem utilizados.

III.2 Derivatizações

III.2.1 Metilação com diazometano

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita por VOGEL (1989) e Carvalho *et al.* (2006). Conforme essa descrição experimental, uma alíquota de 2,14 g do reagente *n*-metil-*n*-nitroso-*p*-toluenosulfonamida (Diazald®) foi solubilizada em 30,0 mL de éter etílico e colocada dentro de um balão de destilação juntamente com uma solução de KOH (0,4 g em 10,0 mL de etanol). A mistura reacional foi então destilada com aquecimento brando em banho de óleo e a solução de diazometano foi recolhida em erlenmeyer mergulhado em banho de gelo. A substância a ser metilada foi solubilizada em metanol, tratada com excesso de diazometano e deixada em repouso por 24 horas.

III.2.2 Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação foi feita utilizando-se 1,0 mL de anidrido acético e 1,0 mL de piridina para cada 10,0 mg de material. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas em banho de óleo na temperatura entre 50 - 60 °C. A seguir adicionou-se água destilada gelada e extraiu-se com clorofórmio (10mL). A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico 10%, até o completo desaparecimento do cheiro de piridina, secou-se com sulfato de sódio anidro e após evaporação à pressão reduzida (rotaevaporador) e purificação em coluna de silicagel obteve-se a substância acetilada (SHRINER, 1979).

CAPÍTULO IV

Contribuição ao estudo fitoquímico do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e avaliação da atividade biológica.



(SILVA *et al.*, 2012)

IV.1 Aspectos botânicos e generalidades sobre *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke

A *Parahancornia amapa* ou amapazeiro (Figura 2a, página 12), pertence à Ordem Gentianales, na Família Apocynaceae, Gênero *Parahancornia* que inclui 4555 espécies, distribuídas em 415 gêneros (RAPINI, 2000). Seu látex, comumente chamado de "leite do amapá", (Figura 2b, página 12) é usado como cicatrizante e no tratamento de hematomas, sendo também misturado com mel, para ser usado como uma bebida para o tratamento de asma, bronquites e fraqueza física (RAPINI, 2000). As cascas do caule e o látex desta espécie têm sido utilizados na medicina popular local como antissifilítico (VAN DEN BERG, 1982). Além do uso medicinal, esta planta também serve como fonte de fibras para cordas e fios utilizados em artesanato, fornece madeira para a construção civil e produção de móveis e ferramentas. Borracha e goma de mascar são produzidas a partir do látex; a goma das sementes é utilizada no enchimento de travesseiros e almofadas, e até mesmo veneno para flechas de caça pode ser extraído de algumas de suas espécies (RIBEIRO, 2010).



Figura 2a. *Parahancornia amapa* (árvore) (Fonte: disponível em: www.portalsaofrancisco.com.br)

Figura 2b. Látex de *Parahancornia amapa* (Fonte: disponível em: www.voutifalar.blogspot.com.br)

IV.2. A química da *Parahancornia amapa*

A revisão sobre a química desta espécie (SciFinder Scholar™ 2012 e outras bases de dados) mostrou apenas três trabalhos publicados, onde foram utilizadas a casca e o látex (SOBRINHO *et al.*, 1991), raízes (CARVALHO *et al.*, 2001) e o látex (CARVALHO *et al.*, 2008). Estes trabalhos descrevem o isolamento e identificação de triterpenos, ésteres de acil lupeóis, esteróides, ácidos alifáticos, carboidrato e feniletanóides (Figura 3, página 14). Além destes compostos naturais foram obtidos os derivados acetilados dos triterpenos; lupeol, α e β -amirina, dos esteróides; β -sitosterol, estigmasterol e β -sitostenona, e ésteres metílicos obtidos através da hidrólise dos acil lupeóis e metilação (Figura 3, página 14).

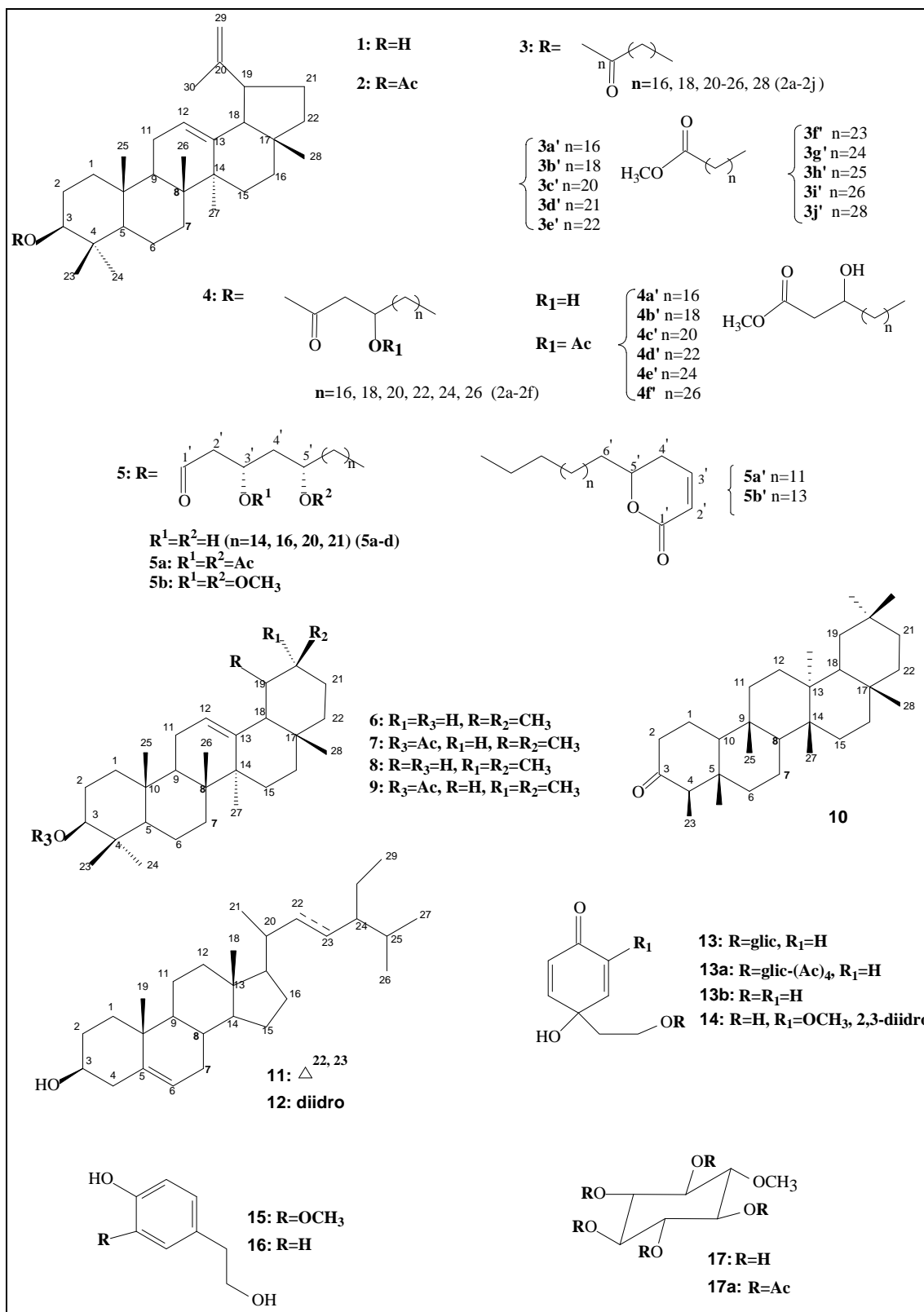


Figura 3. Substâncias puras e derivados isolados de *Parahancornia amapa*.

IV.2.1 Considerações químicas sobre os gêneros *Parahancornia* e *Himatanthus* (Apocynaceae)

A *P. amapa* e *Himatanthus articulata* são árvores encontradas no Amapá, na Região Amazônica, e por serem muito semelhantes são utilizadas pela população (casca e látex) no tratamento de diferentes enfermidades, como se fossem a mesma espécie (ALVES, 2003; CARVALHO *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 1998; VELOSO *et al.*, 1999). No entanto, as espécies de *Himatanthus* estudadas até o momento bioproduzem, entre outras classes de metabólitos especiais, principalmente iridoídes e alcalóides indólicos (ABDEL-KADER *et al.*, 1997; BARRETO *et al.*, 1998), enquanto que nos estudos fitoquímicos de *P. amapa* encontrados na literatura (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2008) não foram encontradas, até o momento, essas classes de metabólitos. Desta forma, o trabalho realizado nesta tese confirma as informações químicas existentes sobre esta espécie e contribui para a diferenciação das espécies *P. amapa* e *Himatanthus*. Uma vez que neste trabalho não foram encontrados iridoídes nem tão pouco alcalóides, compostos bioproduzidos por espécies de *Himatanthus* e que podem ser utilizados como marcadores químicos destas espécies.

Na figura 4 (página 16) e tabela 1 (página 15) estão representados alguns exemplos de iridoídes isolados de espécies de *Himatanthus*.

O trabalho sobre o estudo químico do látex de *P. amapa* resultou no artigo publicado na *Revista Brasileira de Farmacognosia* (CARVALHO *et al.*, 2008). (Anexo A, página 54)

Tabela 1. Alguns iridoídes isolados de espécies de *Himatanthus*.

Espécie	Classe das substâncias	Referências
<i>H. phagedaenica</i>	Iridoíde (1)	Vanderlei <i>et al.</i> , 1991
<i>H. fallax</i>	Iridoídes (2, 3)	Abdel-Kader <i>et al.</i> , 1997
<i>H. articulata</i>	Iridoíde (4)	Barreto <i>et al.</i> , 1998
<i>H. sucuruva</i>	Iridoíde (5)	Silva <i>et al.</i> , 1998
<i>H. phagedaenicus</i>	Iridoíde (6)	Veloso <i>et al.</i> , 1999

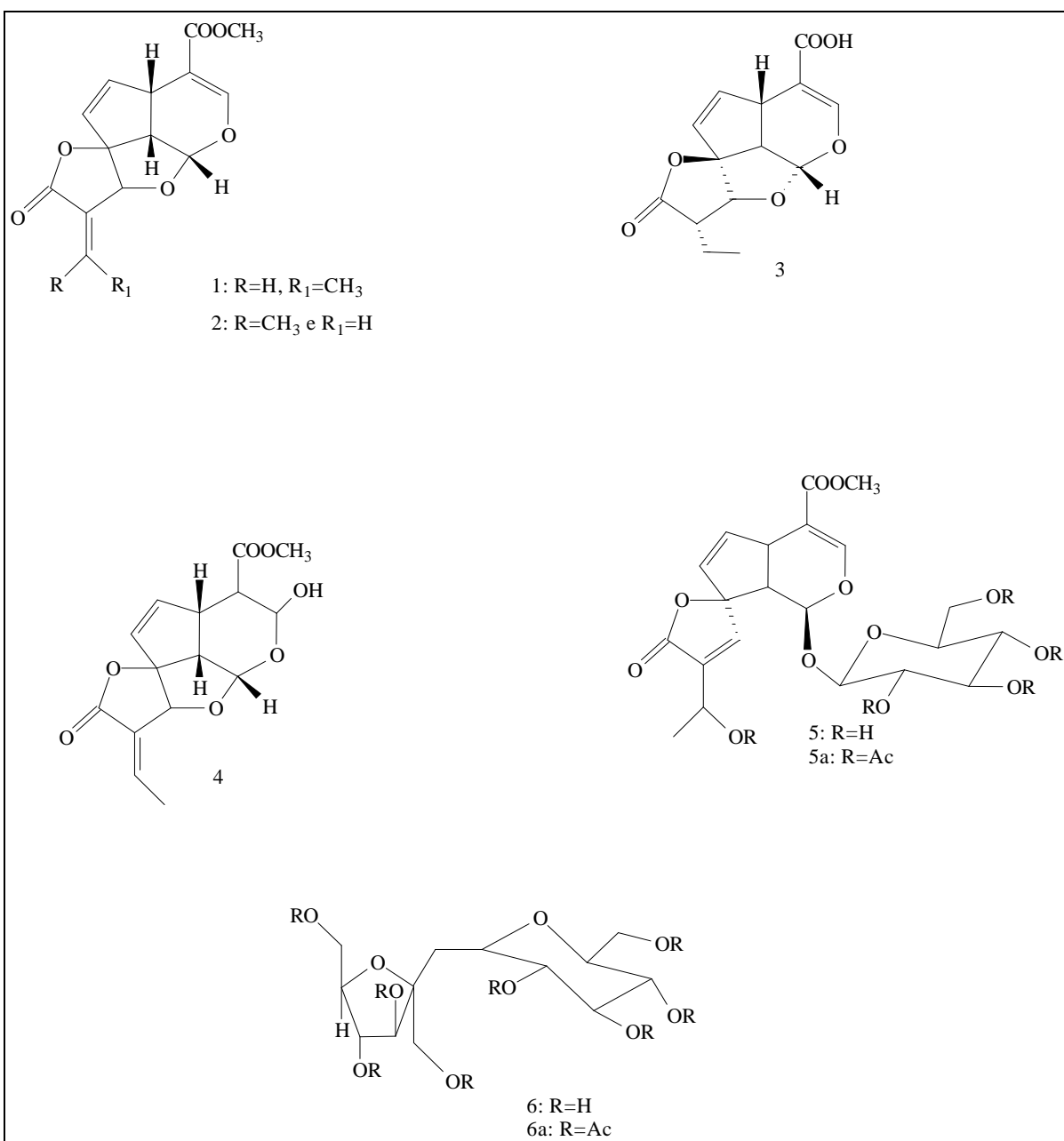
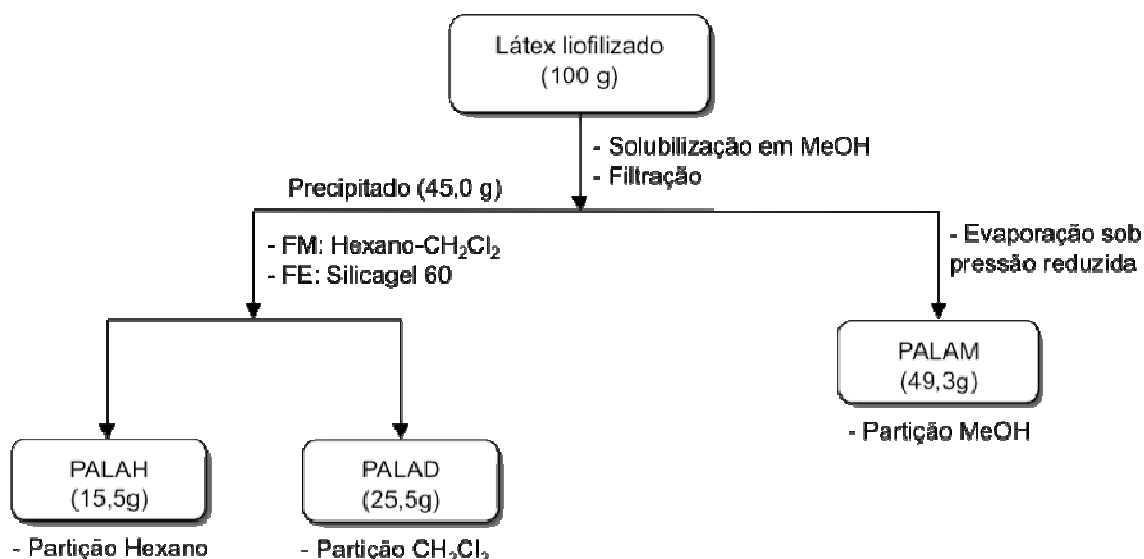


Figura 4. Iridóides isolados de espécies de *Himatanthus* (*Apocynaceae*).

IV.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos do látex de *Parahancornia amapa*

O látex utilizado neste trabalho foi inicialmente extraído de um espécime de *P. amapa* identificado pelo botânico Benedito Vitor Rabello no estado do Amapá-Brasil, cuja exsicata do espécime (n^o 07231) encontra-se depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) da divisão de botânica do museu Ângelo Moreira da Costa Lima, no Instituto de Estudos e Pesquisas do Amapá (AIEPA), Macapá-Brasil.

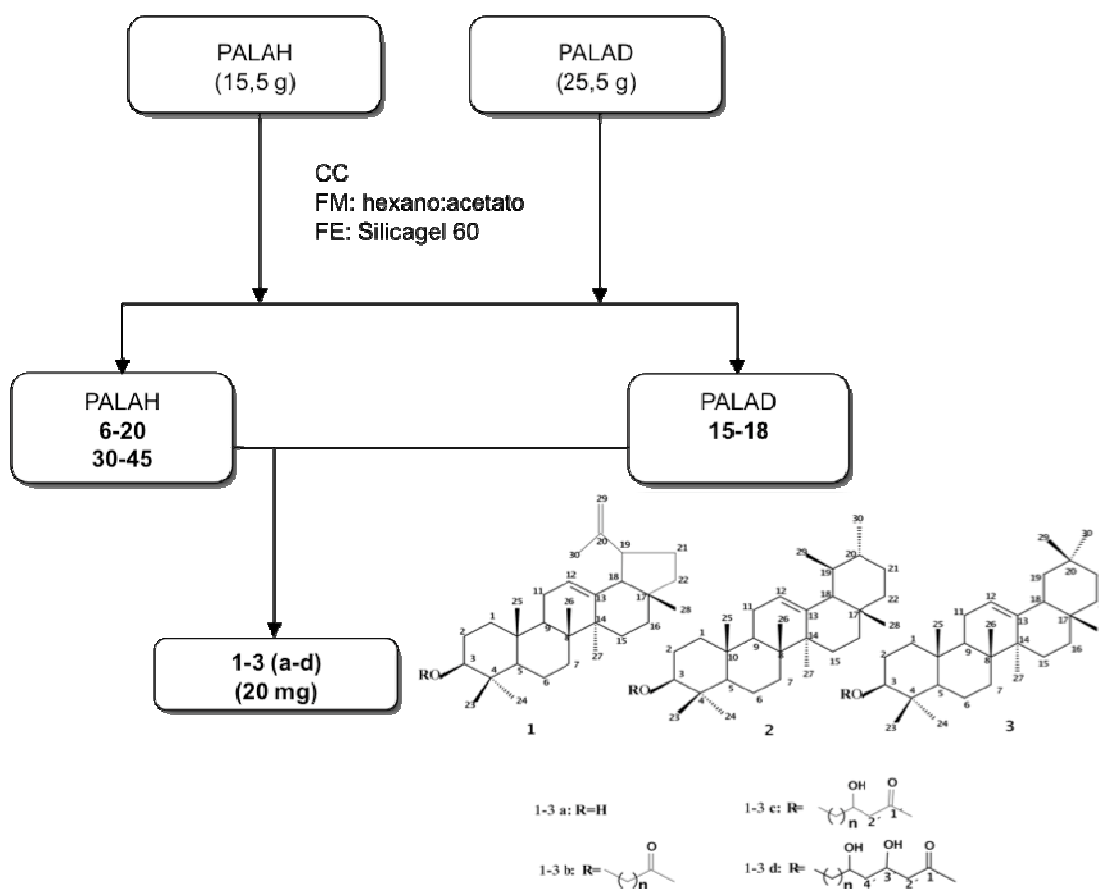
Uma alíquota de 100 g do látex liofilizado de *P. amapa* foi solubilizado em metanol e filtrado em um funil simples com papel de filtro. A solução metanólica gerou a partição **Parahancornia Amapa Látex Metanol, PALAM** (49,3g) e o precipitado foi submetido ao fracionamento em coluna de filtração de sílica gel utilizando-se como eluentes: hexano e diclorometano. Obtendo-se as partições **Parahancornia Amapa Látex Hexano, PALAH** (15,5g) e **Parahancornia Amapa Látex Diclorometano, PALAD** (25,5g) (Esquema 1, página 17).



Esquema 1. Fracionamento do látex liofilizado de *Parahancornia amapa*.

IV.3.1 Processamento das partições PALAH e PALAD

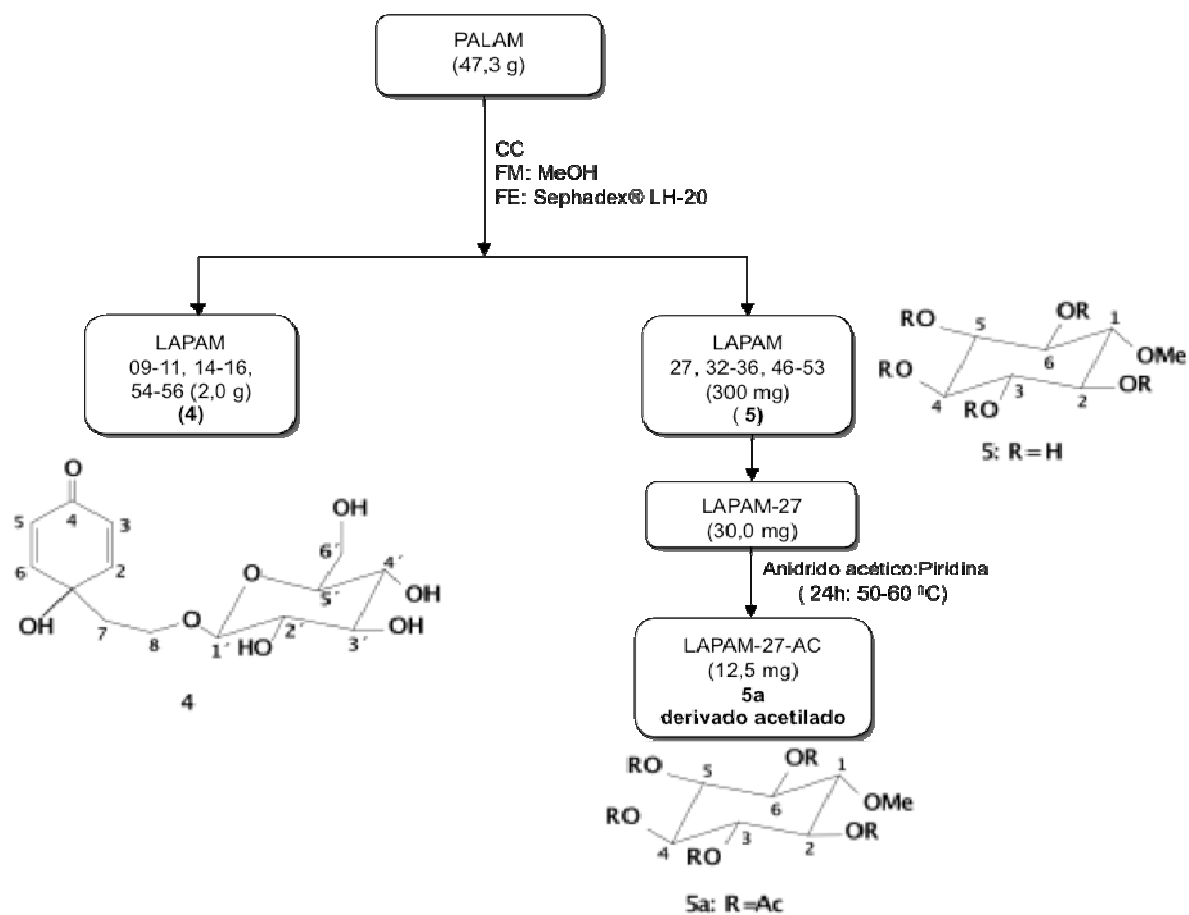
Nas partições **PALAH** e **PALAD**, foram identificados uma mistura de triterpenos e ésteres de lupeol, α -amirina, β -amirina (**1-3a-d**). As duas partições foram cromatografadas em coluna de silicagel utilizando como eluentes hexano e acetato de etila, de forma gradiente, partindo de hexano 100% até acetato de etila 100%. Após análise por CCDA e revelação com Liebermann-Burchard foi observado a predominância de compostos terpênicos, e as frações foram reunidas em subfrações (Esquema 2, página 18). A análise dos dados espectrais das subfrações e a comparação com espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura de ésteres de acil-lupeol isolados anteriormente de *P. amapa* (CARVALHO *et al.*, 2001) permitiu identificar a mistura dos ésteres de lupeol, α -amirina, β -amirina (**1-3a-d**).



Esquema 2. Fracionamento das partições hexano (**PALAH**) e diclorometano (**PALAD**)

IV.3.2 Processamento da partição metanol PALAM

A partição **PALAM** (49,3 g), foi cromatografada em coluna de Sephadex® LH 20, utilizando-se como eluente metanol (100%), obtendo-se 50 frações de 125 mL cada, que forma reunidas após a análise de CCDA em outras subfrações (Esquema 3, página 20). Análise dos Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (KAN *et al.*, 1992), confirmaram a presença da dienona (cornosídeo) (**4**) nas frações LAPAM 09-11, 14-16, 54-56. Nas frações 27, 32-36, 46-53 foi observado a presença de um precipitado de coloração branca, com ponto de fusão (pf 214-217 °C), o qual foi identificado após a análise dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPT) e comparação com os dados da literatura (BREITMAIER *et al.*, 1989) como sendo o açúcar metilmioinositol (**5**). Uma alíquota de 30 mg da substância (**5**) foi tratada com anidrido acético e piridina (temperatura 50-60 °C), obtendo-se o derivado acetilado (**5a**). A análise por CG-EM do derivado {tr =5,35 min., m/z 345, (M^+ , 100%)} e os fragmentos m/z 301, 243 e 182 confirmaram o derivado **5a**. Os dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (BARRETO, 1994; MOREIRA *et al.*, 1999) do derivado **5a**, confirmaram a estrutura da substância **5** (metilmioinositol).



Esquema 3. Fracionamento da partição metanol do látex de *Parahancornia amapa*.

IV.4 Resultados e discussão

IV.4.1 Constituintes químicos isolados do látex de *Parahancornia amapa*

As estruturas das substâncias isoladas de *P. amapa* podem ser visualizadas na figura 5, página 21. Os resultados obtidos nesta parte do trabalho foram publicados no artigo: Carvalho *et al.* (2008), Anexo A (página 54).

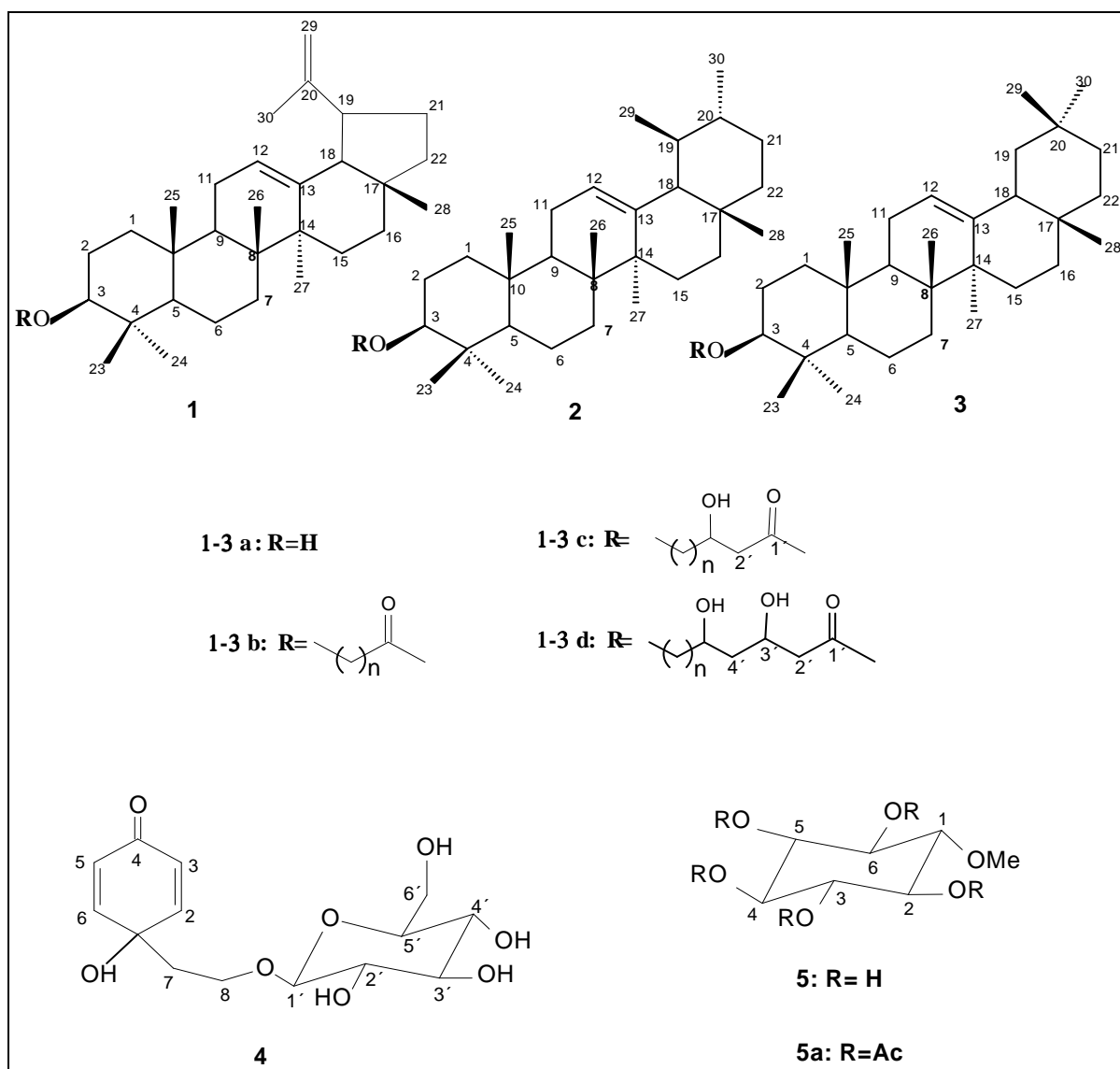


Figura 5. Constituintes isolados do látex de *Parahancornia amapa*.

IV.4.2 Determinação estrutural dos constituintes isolados do látex de *Parahancornia amapa*

IV.4.2.1 Identificação da substância 1-3a-d (ésteres de acil lupeol)

O espectro na região do IV da mistura de substâncias 1-3a-d (Figura 6, página 22) mostra bandas de absorção para grupo hidroxila em 3442 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), grupamentos CH_2 e CH_3 com bandas de absorção em 2922 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} (estiramento C-H, $\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente e uma banda de absorção característica de carbonila de éster em 1730 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$).

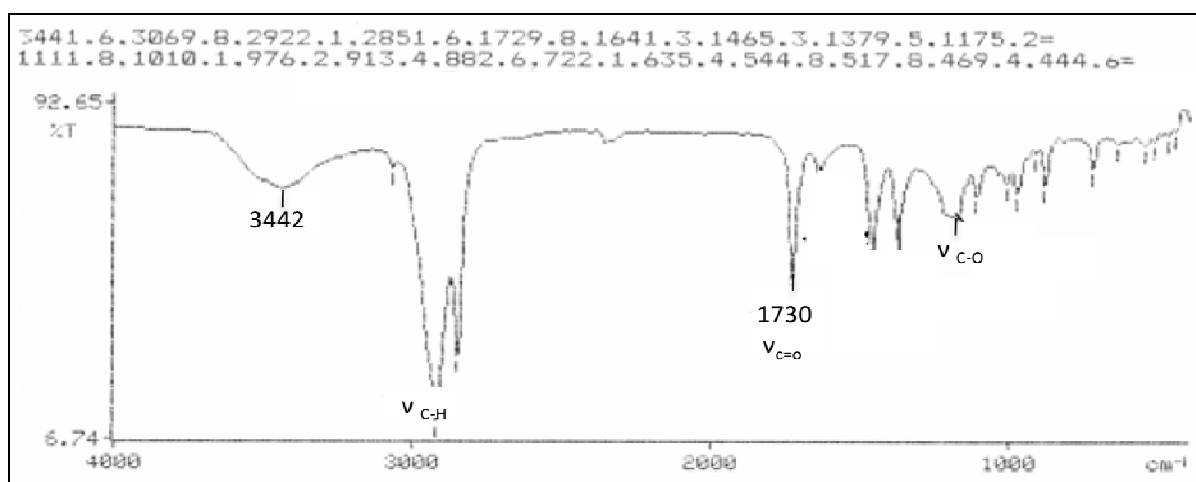


Figura 6. Espectro de IV das substâncias 1-3 a-d.

Analisando os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H (Figura 7, página 23) podemos identificar sinais característicos de metilas em deslocamento químico entre 0,76 ppm a 1,33 ppm. Além dessas metilas existe um sinal em δ_{H} 1,66 ppm atribuído a metila ligada a um carbono sp^2 (H-30). A ausência do sinal em δ_{H} 3,50 do hidrogênio H-3 do carbono carbinólico metílico e a observação do mesmo em δ_{H} 4,47 deve-se a presença de um grupo acila ligado ao carbono carbinólico, o que sugere a presença de ésteres dos triterpenos lupeol, α e β -amirina (2 e 3). Existem ainda dois sinais atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-29a e H-29b, respectivamente em δ_{H} 4,53 e δ_{H} 4,65 e outros sinais assinalados no espectro de hidrogênio que indicam a presença majoritária do triterpeno lupeol (1).

Foram observados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8, página 24) sinais mais intensos em δ_{C} 150,93 ppm atribuído ao carbono quaternário C-20 em δ_{C} 109,36 atribuído ao carbono olefínico C-29 e um sinal em δ_{C} 80,58 do carbono carbinólico C-3. Todos esses sinais estão de acordo com triterpenos pentacíclicos da série lupano; outros sinais observados entre δ_{C} 110 e 150 ppm comprovam a presença de triterpenos pentacíclicos das séries oleanano e ursano. A comparação destes e dos outros sinais observados com os dados extraídos da literatura (CARVALHO *et al.*, 2001), que estão apresentados na Tabela 2 (página 25), garantem a presença majoritária da mistura de ésteres de acil-lupeol.

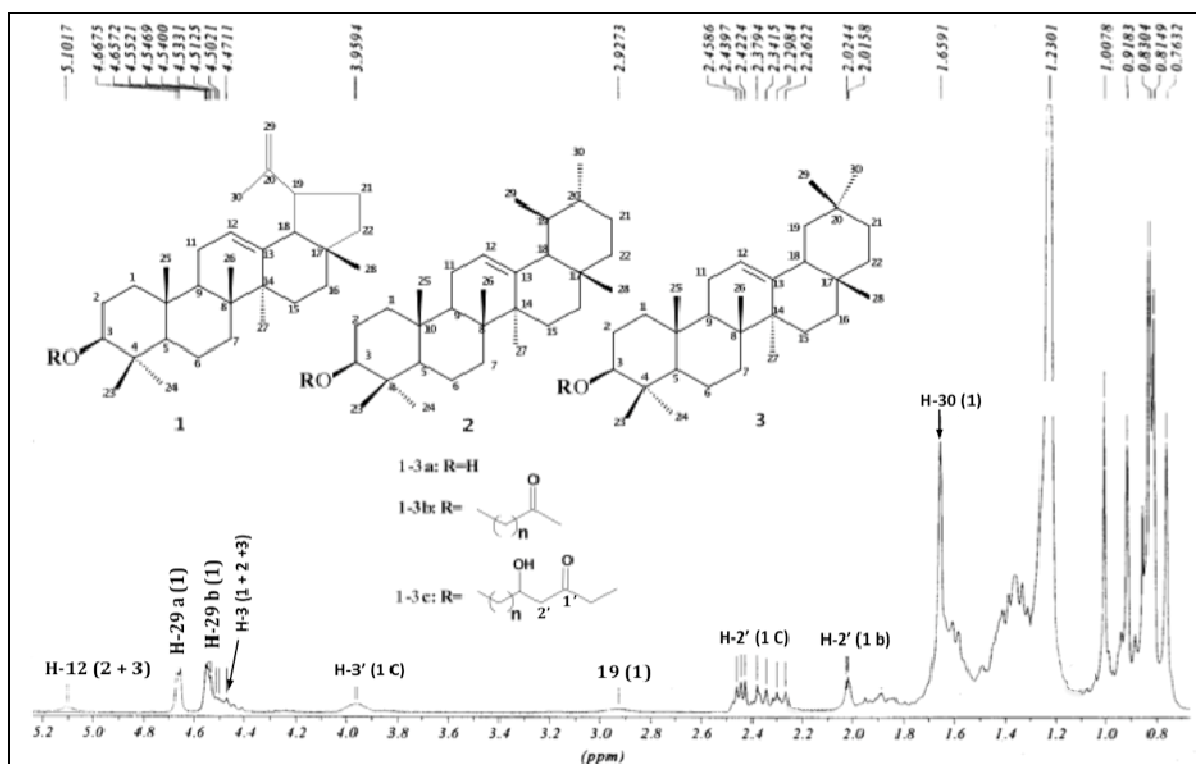


Figura 7. Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 1-3a-c.

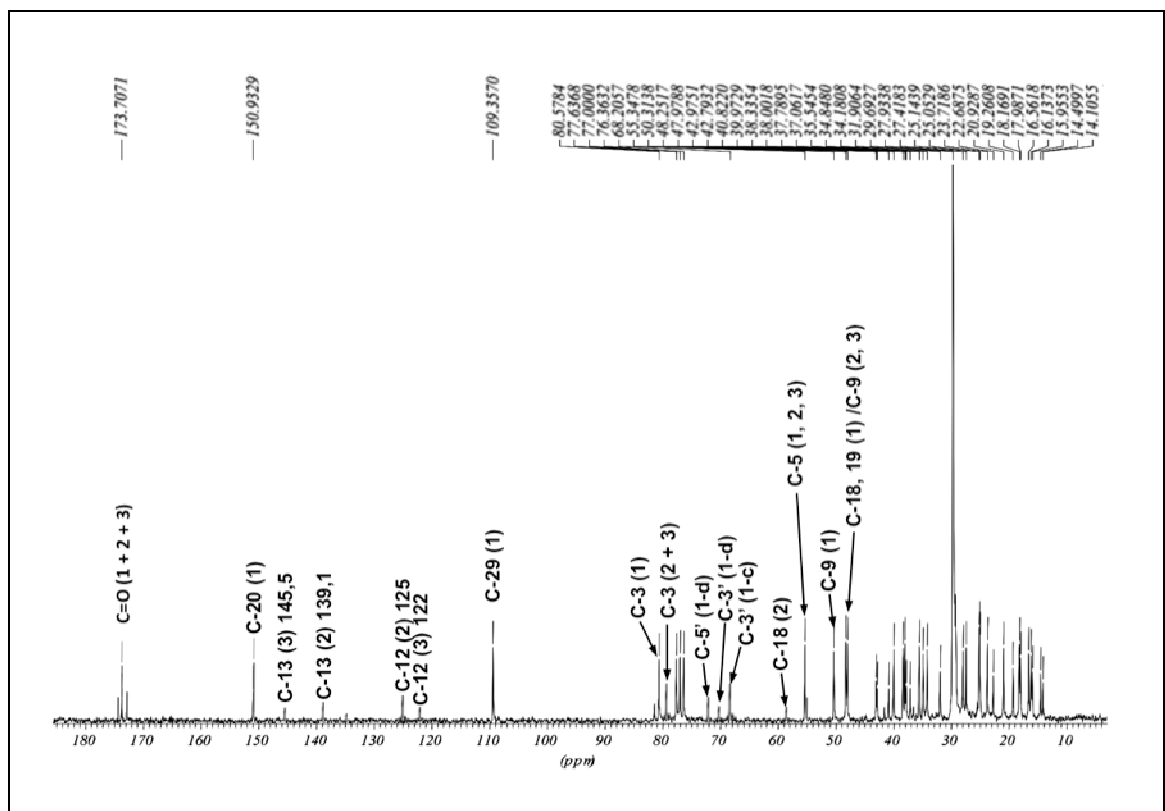
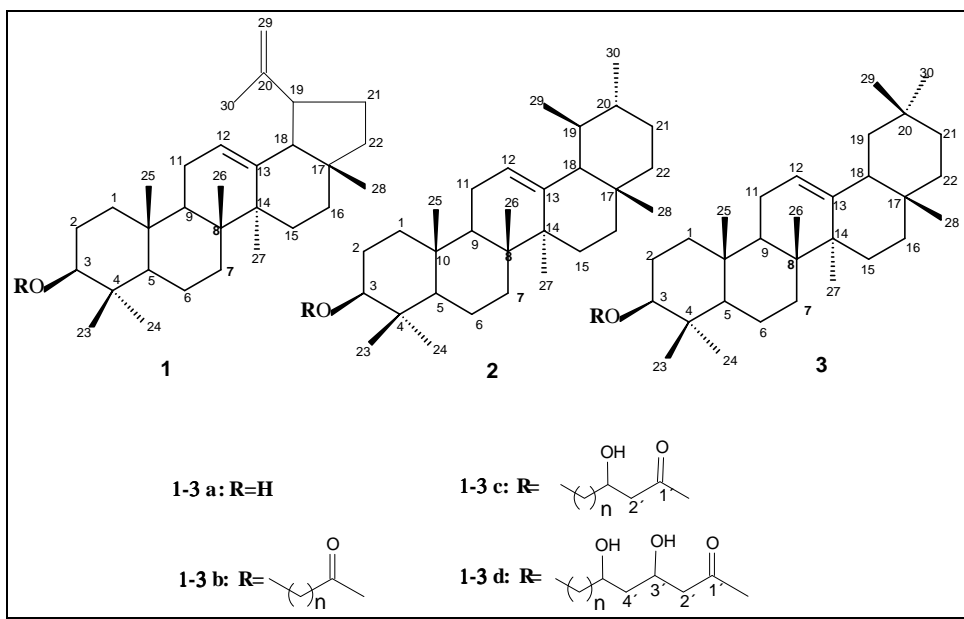


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 1-3a-d.

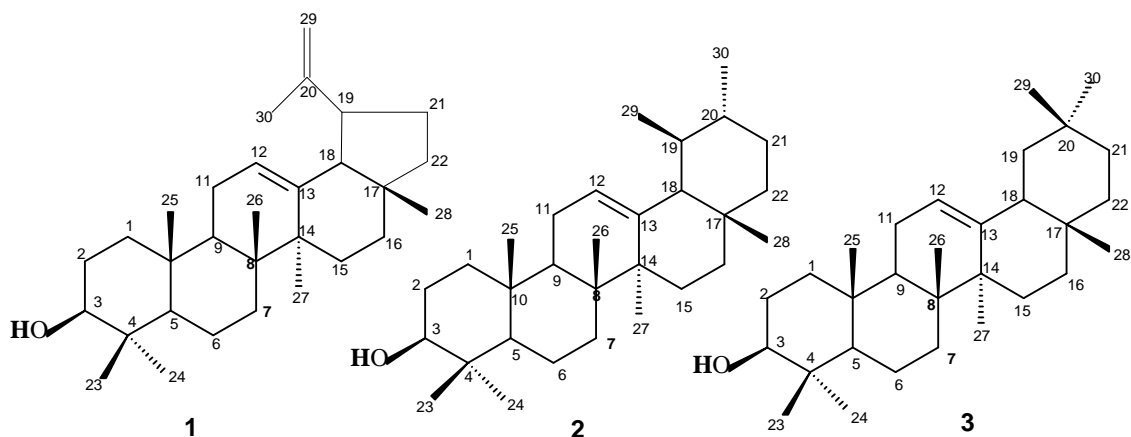


Tabela 2. Dados RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **1**, **2** e **3**

C	CARVALHO <i>et al.</i> , 2001, SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991					
	Ref.	δ_{C} de 1 lupeol	Ref.	δ_{C} de 2 α -amirina	Ref.	δ_{C} de 3 β -amirina
1	37,7	37,78	38,7	38,33	38,7	38,33
2	27,4	27,41	27,2	27,4	27,3	27,4
3	78,9	80,57	78,6	79,1	79,0	79,1
4	38,8	38,33	38,7	38,8	38,8	38,8
5	55,3	55,34	55,2	55,34	55,3	55,34
6	18,3	18,16	18,1	18,2	18,5	18,2
7	34,2	34,18	32,7	31,90	32,8	31,90
8	40,8	40,82	39,8	39,90	38,8	39,97
9	50,4	50,31	47,8	47,97	47,7	47,97
10	37,1	37,06	36,9	37,8	37,6	37,7
11	20,9	20,92	23,3	23,7	23,6	23,4
12	25,1	25,14	124,2	125,0	121,8	122,0
13	38,0	38,0	139,4	139,1	145,1	145,5
14	42,8	42,79	41,6	41,9	41,8	43,0
15	27,4	27,41	28,7	28,4	26,2	26,2
16	35,5	35,54	26,5	26,0	27,0	27,4
17	43,0	42,97	33,5	34,18	32,5	32,6
18	48,2	48,25	58,9	59,0	47,2	47,97
19	47,9	47,97	39,5	31,90	46,9	47,97
20	150,9	150,93	39,5	39,97	31,1	31,90
21	29,8	31,90	31,1	31,90	34,8	34,84
22	40,0	39,97	41,6	40,25	37,2	37,78
23	28,0	27,93	28,2	27,93	28,2	27,93
24	15,4	14,49	15,8	15,95	15,5	15,95
25	16,1	16,13	15,6	15,80	15,6	15,80
26	15,9	15,95	16,4	16,56	16,9	16,56
27	14,5	14,10	23,3	27,41	26,0	27,61
28	18,0	17,91	28,2	27,93	28,4	28,00
29	109,3	109,35	17,4	17,91	33,3	33,51
30	19,3	19,26	21,3	20,92	23,6	23,5

IV.4.2.2 Identificação da substância 4

A partir da análise do espectro de IV da substância **4** (Figura 9, página 26) foi possível identificar bandas absorção em 3386 cm^{-1} para grupos hidroxila (estiramento O-H, $\nu_{\text{O-H}}$), em 2927 cm^{-1} e 2893 cm^{-1} de grupos CH_2 e CH_3 (estiramento C-H, $\nu_{\text{C-H}}$), carbonila conjugada em 1668 cm^{-1} , deformação axial C=C em 1624 cm^{-1} e a presença de estiramento de C-O em 1078 cm^{-1} confirmando a presença de álcool e éter na estrutura proposta.

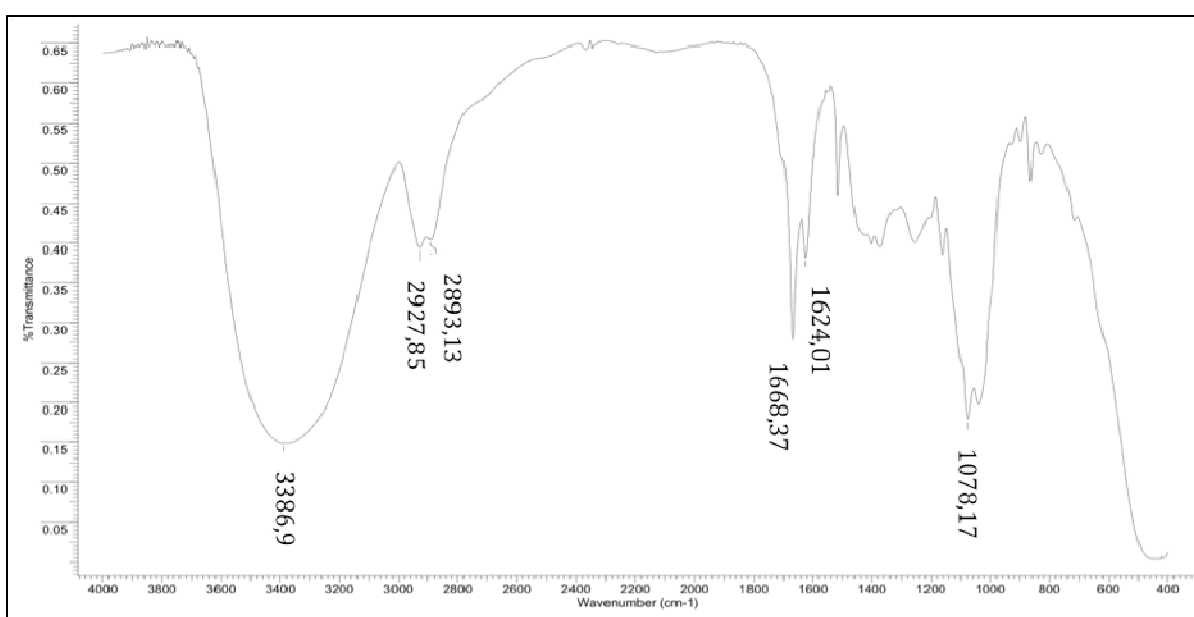


Figura 9. Espectro de IV da substância **4** (cornosídeo).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 10, página 27) da substância **4** apresenta dois dupletos ($J=9,9\text{ Hz}$) em $\delta_{\text{H}} = 6,20$ (H-3, 5) e $\delta_{\text{H}} = 7,10$ (H-2, 6) correspondentes a um sistema AA'BB', hidrogênios metilênicos $\delta_{\text{H}} = 2,06$ (H-7), e 3,63 e 3,98 (H-8a e H-8b) e sinais em $\delta_{\text{H}} = 3,17\text{-}4,27$ (m) atribuídos aos hidrogênios do carboidrato.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 11 e 12, páginas 28) da substância **4** e sua comparação com os dados da literatura (Tabela 3, página 27) para feniletanóides (KHAN *et al.*, 1992) permitiu identificar a substância **4** como sendo a dienona 1-hidroxi-4-oxo-2,5-dien-cicloexil-1-etileno-*O*-glicopiranosídeo (cornosídeo, pf. 219-220 °C).

Tabela 3. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do cornosídeo **4** (MeOD- d_4) comparados com a literatura (KHAN *et al.*, 1992).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} literatura (KHAN <i>et al.</i> , 1992)
1	69,13	-	69,2
2	153,46	7,10 (d; 9,9 Hz)	154,3
3	126,89	6,20 (d; 9,9 Hz)	128,0
4	188,01	-	187,8
5	126,89	6,20 (d; 9,9 Hz)	127,9
6	153,46	7,10 (d; 9,9 Hz)	154,3
7	40,51	2,09 (m)	41,0
8	65,53	3,98 (m); 3,63 (m)	65,9
1'	103,8	4,31 (d; 7,62 Hz)	104,9
2'	74,59	3,25 (m)	75,5
3'	77,57	3,38 (m)	77,9
4'	71,11	3,34 (m)	71,8
5'	77,35	3,38 (m)	75,0
6'	62,34	3,86 (m)	64,6

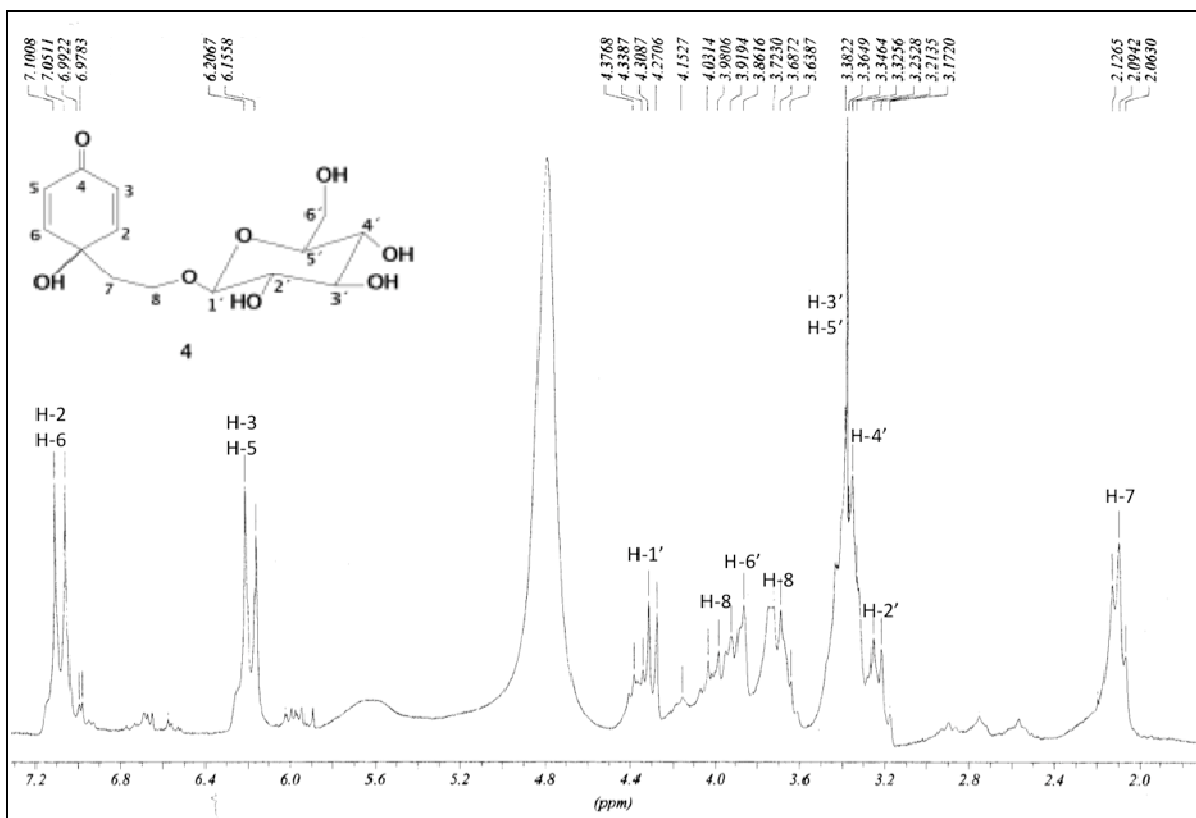


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) da substância **4** (cornosídeo).

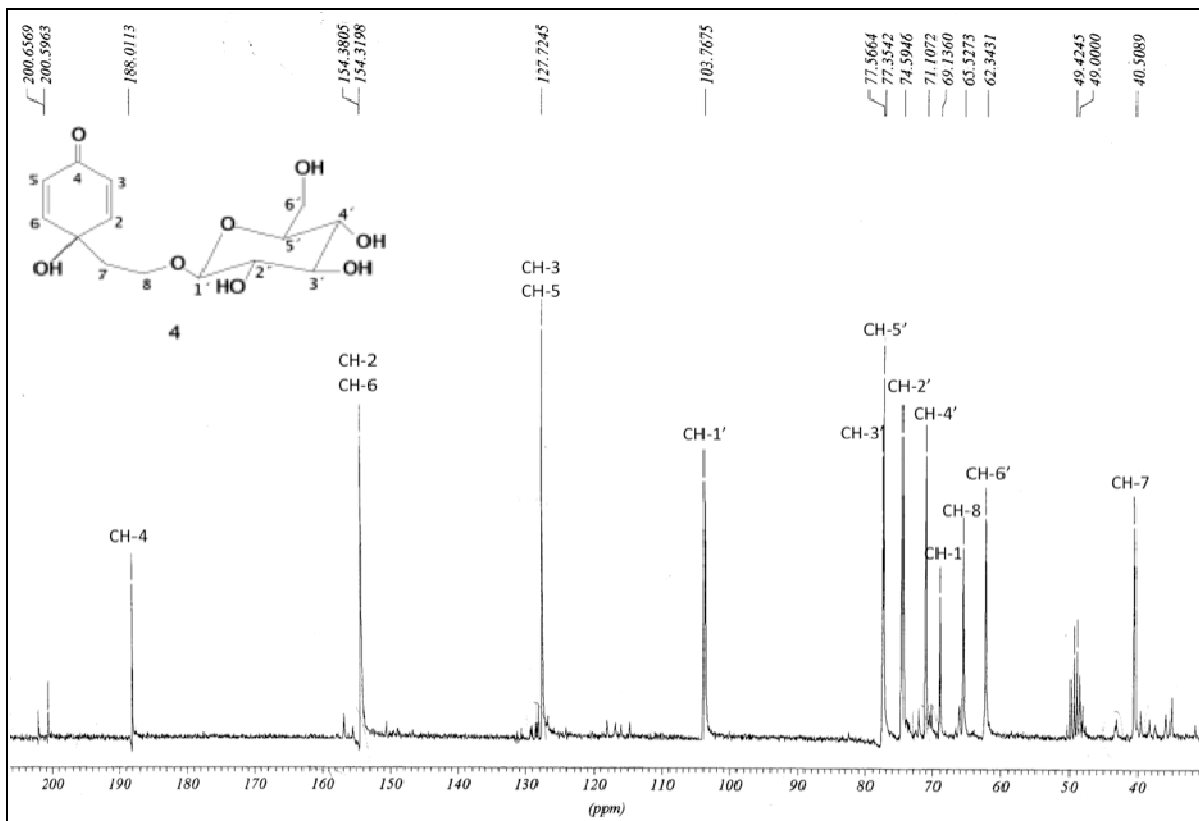


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância **4** (cornosídeo).

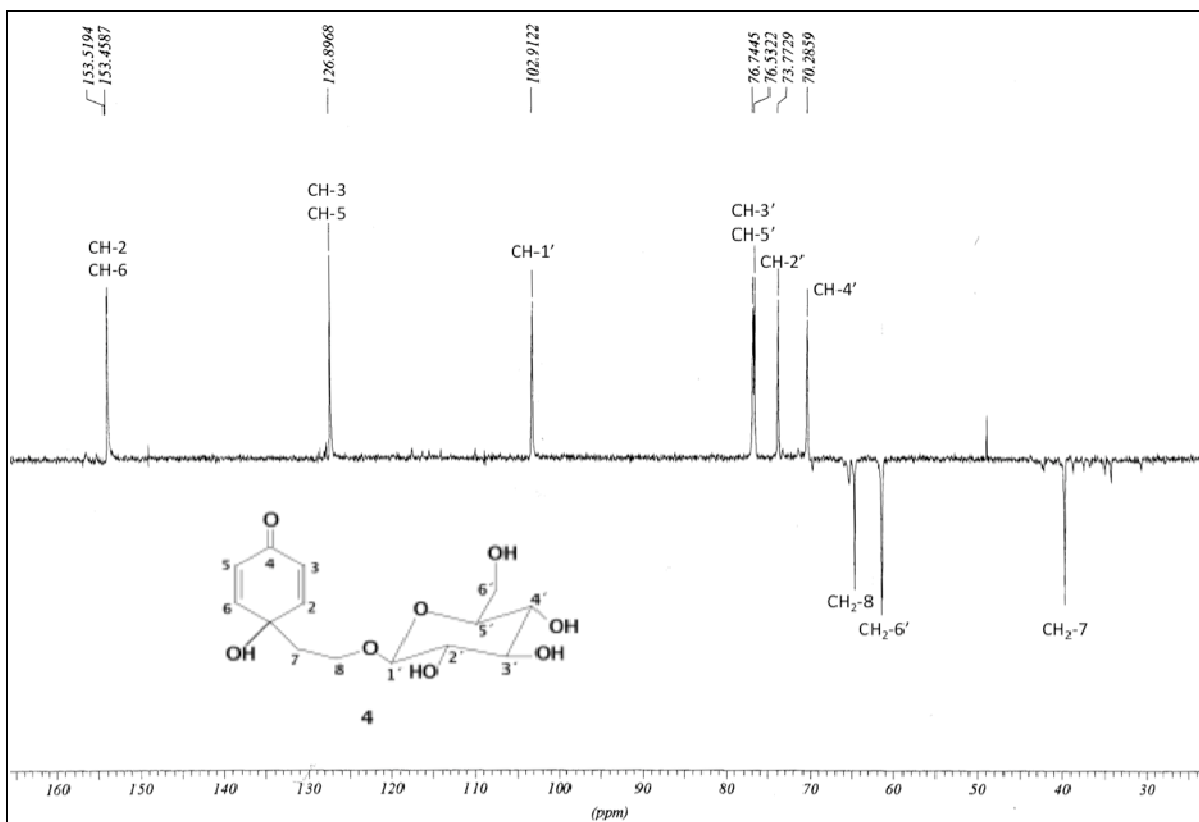


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz, MeOD) da substância **4** (cornosídeo).

IV.4.2.3 Identificação da substância 5 (metilmioinositol) e o derivado 5a

A substância 5 foi isolada na forma de um sólido branco solúvel em metanol (pf 214-217 °C). O espectro de RMN ^1H (Figura 13, página 30) apresentou sinais entre δ_{H} : 4,5-3,0 ppm compatíveis com deslocamentos químicos de carboidratos e uma metoxila em δ_{H} 3,28.

O espectro de RMN ^{13}C e DEPT (Figuras 14 e 15, páginas 30 e 31) apresentou seis sinais correspondentes à CH e um sinal correspondente a CH_3 cujos valores foram comparados com os da literatura (BREITMAIER *et al.*, 1989) permitindo sugerir que a substância 5 seja o monossacarídeo metilmioinositol (Tabela 4, página 29).

Através da análise dos espectros de RMN de ^1H da substância 5a (Figura 16, página 32) e comparação com o mesmo derivado acetilado isolado de *H. articulata* (BARRETO *et al.*, 1998) (Tabela 5, página 31), podemos confirmar a substância 5 como sendo o açúcar metilmioinositol. Esta substância está sendo identificada pela primeira vez em *P. Amapa*, veja anexo A (página 54) no final deste capítulo.

A confirmação da obtenção do derivado 5a foi verificada pela análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS). Para isso foi necessário injetar-se uma alíquota da amostra no CG-MS o qual forneceu os espectros de massas da substância 5a ($t_r = 5,35$ min., m/z 345, M^+ , 100%) e os fragmentos m/z 301, 243, 182 e 140 (Figura 17, página 32). Uma proposta de fragmentação encontra-se no esquema 4 (pág. 33).

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C da substância 5 (50 MHz, DMSO- d_6) comparados com a literatura (BREITMAIER *et al.*, 1989).

C	δ_{C}	δ_{C} literatura (BREITMAIER <i>et al.</i> , 1989)
1	67,9	67,2
2	80,3	80,1
3	69,9	71,9
4	72,3	72,8
5	69,0	70,4
6	69,8	71,3
OCH_3	56,7	56,8

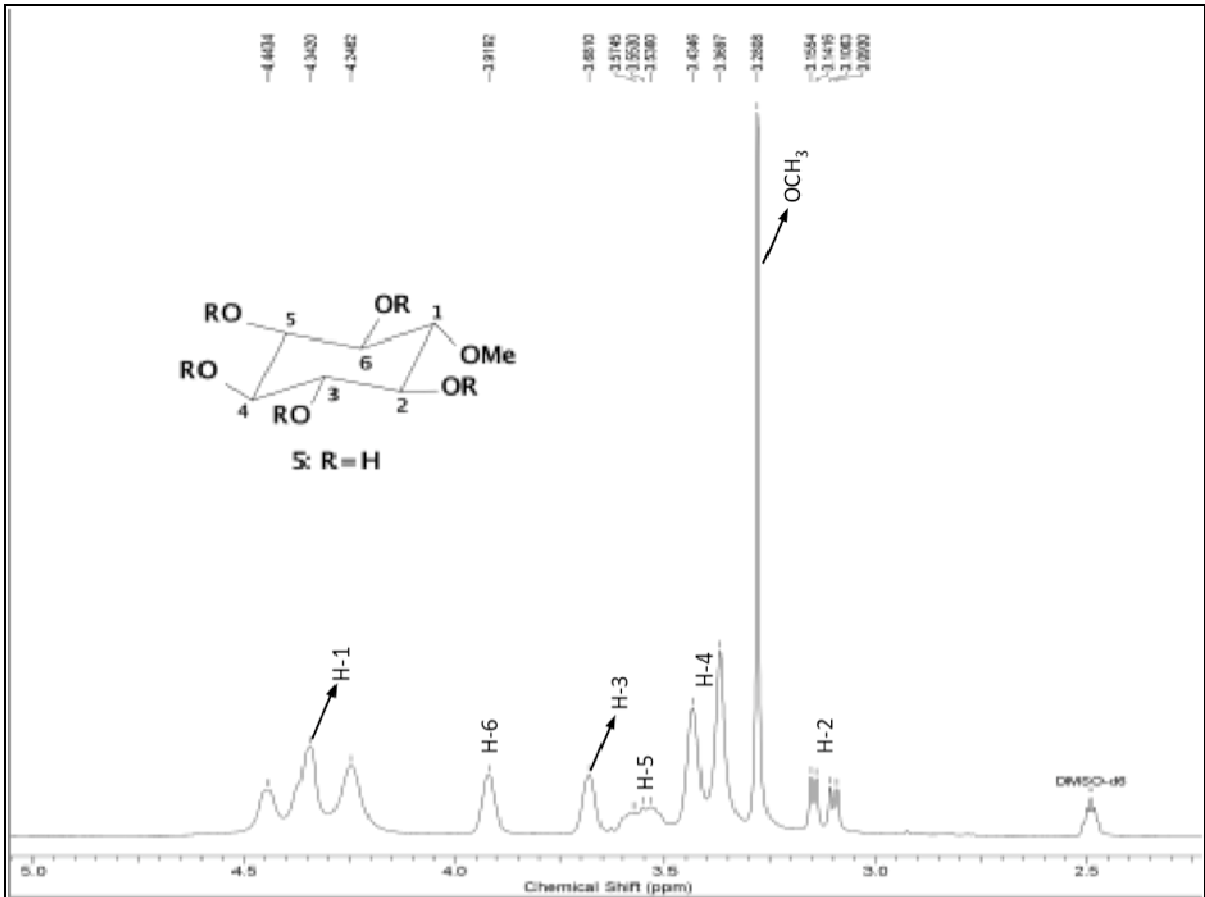


Figura 13. Detalhe da região de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) da substância 5 (metilmioinositol).

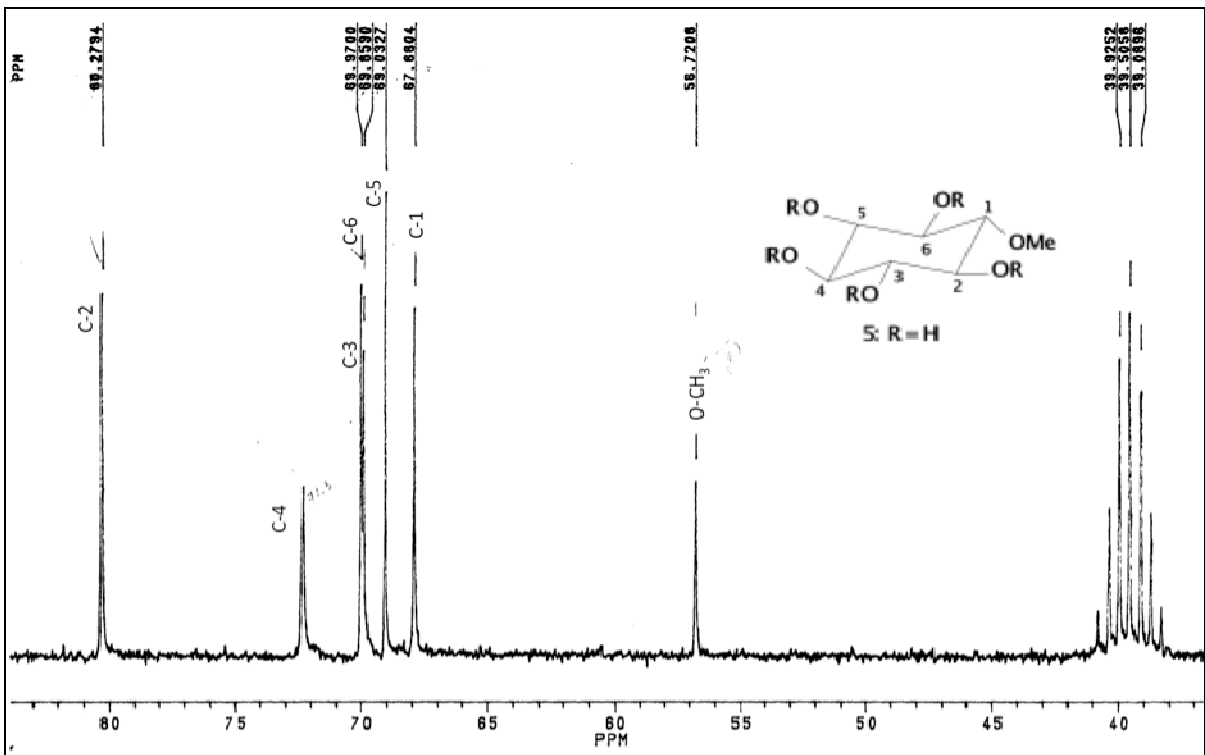


Figura 14. Detalhe da região de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) da substância 5 (metilmioinositol).

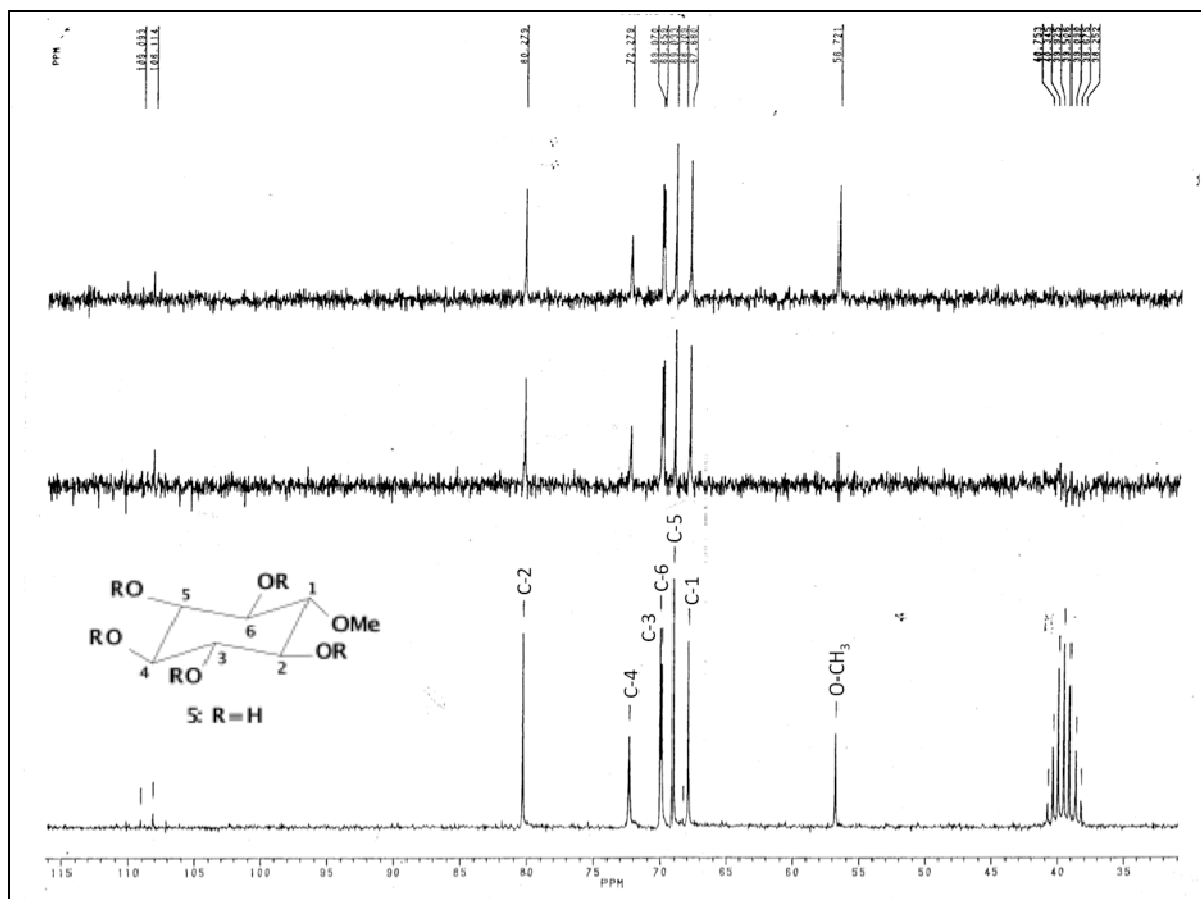


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz, DMSO-d_6) da substância 5 (metilmioinositol).

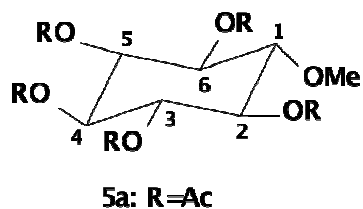


Tabela 5. Dados de RMN ^1H da substância 5a (200 MHz, CDCl_3) comparados com a literatura (BARRETO, 1994).

H	5a δ_{H}	δ_{H} literatura (BARRETO, 1994)
1	3,66 (dd: 10,48 e 2,96 Hz)	3,40 (dd: 10,6 e 2,7 Hz)
2	5,78 (t: 2,8)	5,71 (t: 2,8)
3	5,19 (m)	4,92 (dd: 2,7 e 10,6 Hz)
4	5,61 (t: 5,8 Hz)	5,45 (t: 10,6 Hz)
5	5,26 (t: 9,0 Hz)	5,08 (t: 10,6 Hz)
6	5,35 (t: 10,9 Hz)	5,34 (t: 10,6 Hz)
OCH_3	3,37 (s)	3,17 (s)
OCCH_3	1,99 (x2); 2,02; 2,04; 2,20	1,97 (x3); 1,96 (x2)

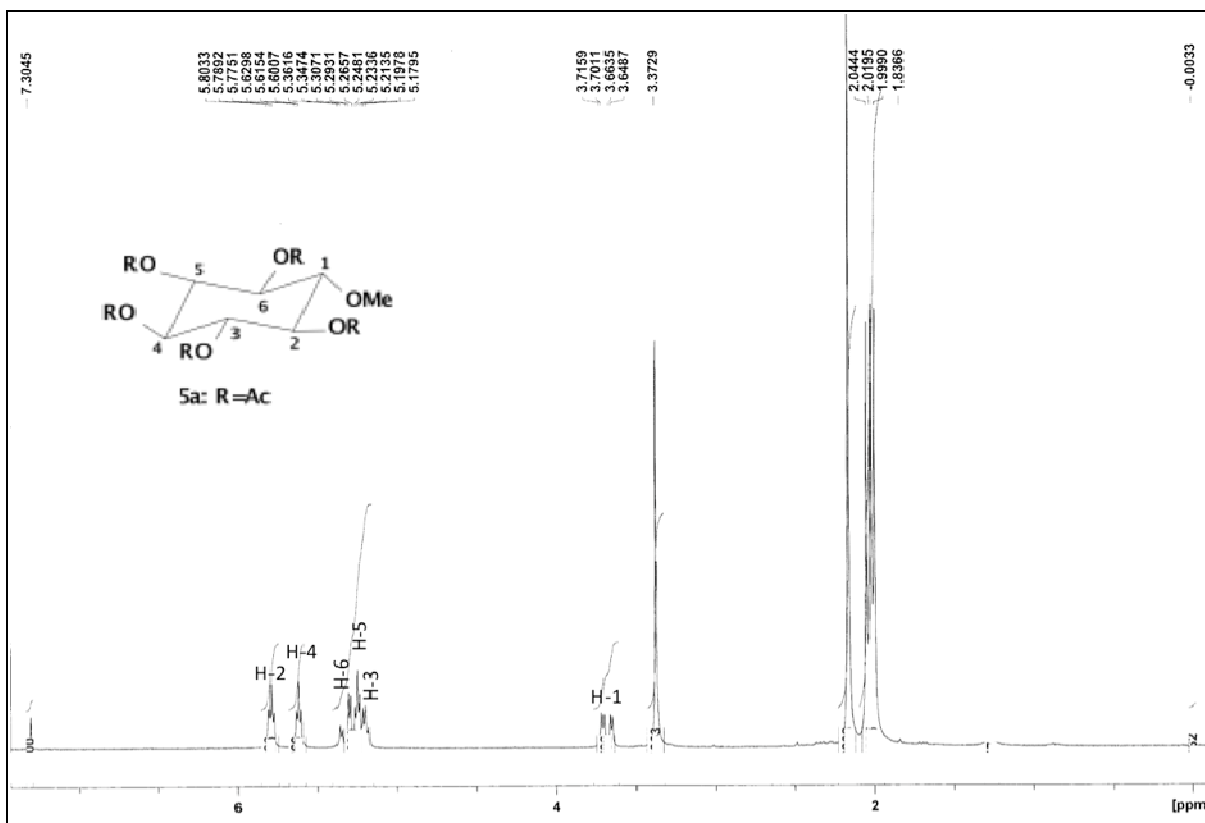


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 5a.

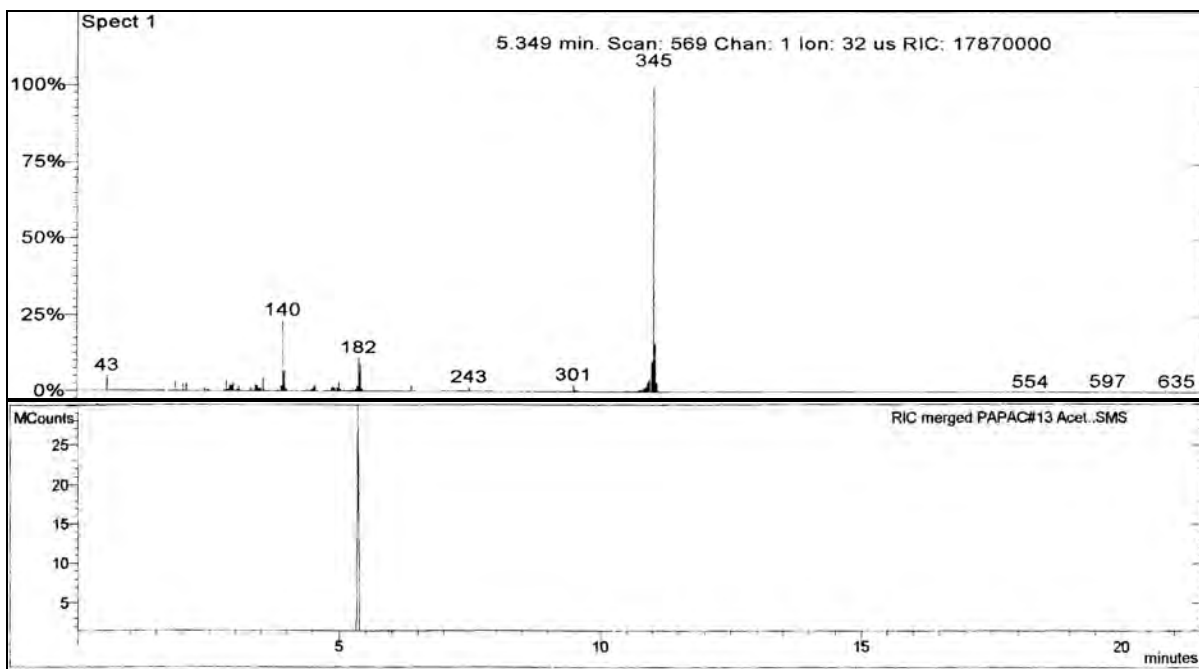
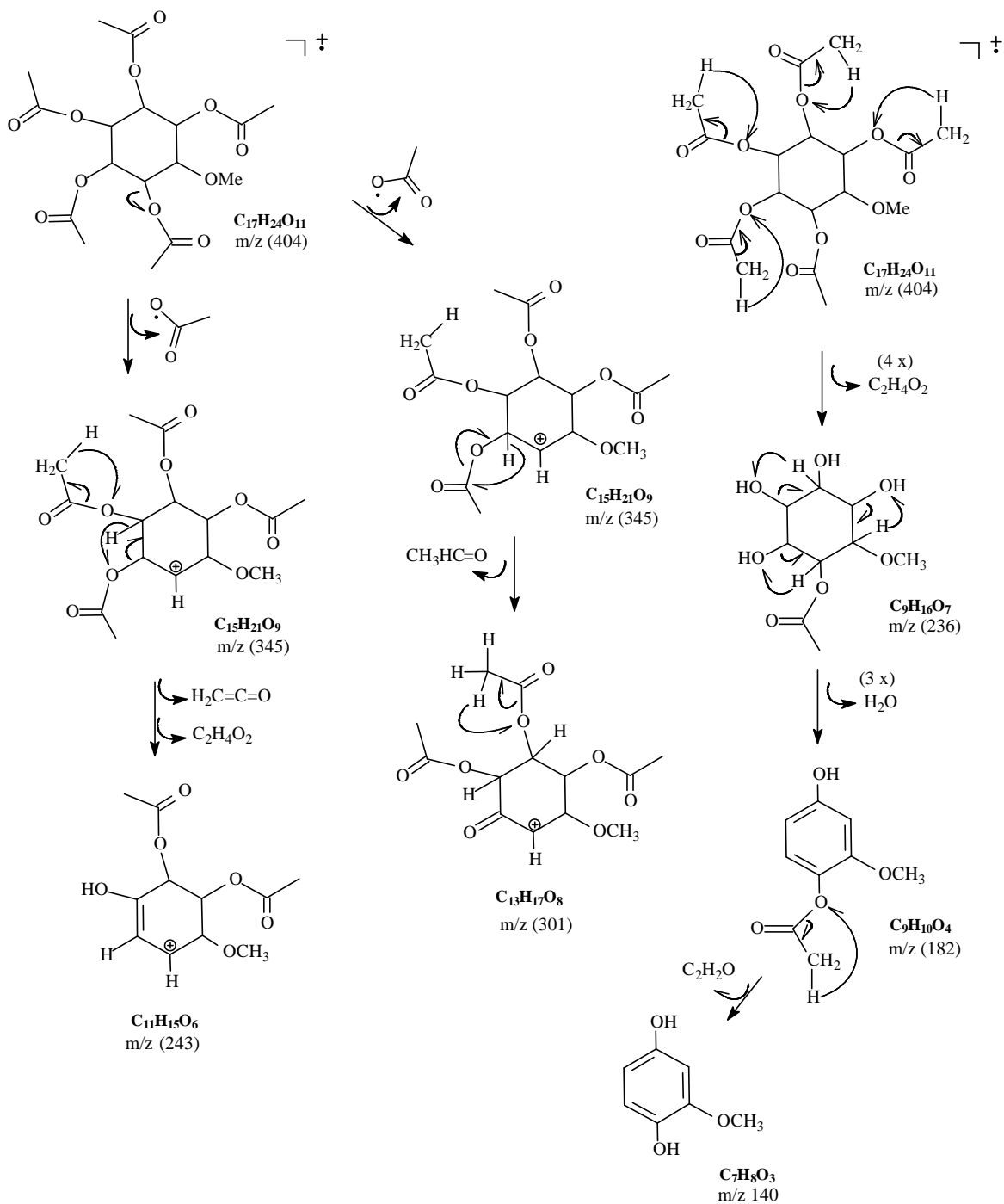


Figura 17. Cromatograma a gás (CG) e espectro de massas (EM) da substância 5a.



Esquema 4. Proposta de fragmentação de 5a.

IV.5. Atividade biológica do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae)

Esta etapa do estudo foi realizada em colaboração com pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, Rio de Janeiro.

Foi publicado um trabalho sobre a atividade biológica de látex desta planta e um outro foi enviado para publicação.

1- Efeito do látex no desenvolvimento pós embrionário das larvas de *Chrysomya megacephala*. (anexo B, página 57)

2- Avaliação da atividade inseticida do látex sobre as larvas de *Chrysomya putoria*. (aguardando publicação)

IV.5.1 Material e métodos gerais para os ensaios com larvas de *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala*

IV.5.1.1 Animais: estabelecimento e manutenção das colônias

Colônias de *Chrysomya putoria* (Wiedeman, 1818) e de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) foram estabelecidas a partir de larvas e adultos coletados na área do Campus do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, Rio de Janeiro, e foram criadas e mantidas pelo Laboratório de transmissores de leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense da mesma instituição.

As larvas maduras foram coletadas com auxílio de pinças em carcaças de porcos domésticos (*Sus scrofa*), com aproximadamente 10-15 Kg de massa corporal, que foram utilizados em estudos de entomologia forense no Campus da Fiocruz, sendo estes animais sacrificados mecanicamente por traumatismo craniano (estes animais são comprados logo após a morte, diretamente de criadores que criam estes animais para o consumo na alimentação humana). Estas larvas foram transferidas para recipientes plásticos contendo vermiculita, tampados com tecido de algodão preso por elástico e observadas até a

emergência. Após a emergência, os adultos foram sexados e transferidos para gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30cm) revestidas lateralmente por tela de náilon, adotando-se a relação sexual de um macho para cada fêmea.

Para as coletas dos adultos nativos foi utilizada uma rede entomológica passada várias vezes sobre as carcaças de porco doméstico. Os adultos obtidos foram transferidos para gaiolas de madeira semelhantes às descritas anteriormente. No laboratório receberam sacarose, água e carne equina putrefata como fonte de alimentação, estimulante e substrato para postura.

Tanto os adultos provenientes das larvas criadas em laboratório quanto aqueles coletados diretamente foram criados seguindo a metodologia preconizada por Queiroz e Milward-de-Azevedo (1991). A nova geração foi criada seguindo a mesma metodologia e as larvas recém-nascidas da segunda geração foram usadas nos experimentos com *C. megacephala* e da quinta geração para *C. putoria*.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de transmissores de leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

IV.5.1.2 Preparo das soluções do látex liofilizado

O látex de *P. amapa* foi diluído em água destilada para obter as concentrações de ensaio. Foram utilizadas 7 (sete) diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 5,0 e 10 %).

IV.5.1.3 Execução dos testes

As diferentes concentrações do látex de *P. amapa* foram aplicadas topicamente em neolarvas usando grupos de 50 espécimes (1µL/larva). Quatro repetições foram realizadas para cada bioensaio, além de dois grupos de controle (água e metanol).

Larvas recém-eclodidas foram agrupados em uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido com água destilada, e a substância foi aplicada topicamente sobre as larvas usando micropipetas.

Após o contato com a solução, o papel de filtro com as larvas foi transferido para um recipiente plástico (100 mL) contendo carne bovina putrefata (50,0 g), com uma proporção de 1,0 g de carne para cada larva, para garantir alimento suficiente para o desenvolvimento máximo e também evitar qualquer tipo de manipulação das larvas. Estes recipientes plásticos (100 mL) foram, então, colocados em recipientes maiores (500 mL) contendo vermiculita que serve como substrato para a fase de pupa e, em seguida, coberta com um tecido de náilon, presos com elástico de borracha.

Depois de atingir a maturidade, as larvas espontaneamente abandonaram a dieta, estas larvas foram então pesadas individualmente e transferidas para tubos de vidro contendo vermiculita com cerca de um quarto do seu volume e, os tubos foram fechados com tampões de algodão hidrófobo.

Observações diárias foram feitas até os adultos emergirem. Após a emergência, os adultos foram separados por sexo. Os experimentos foram realizados em câmaras climatizadas a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $70 \pm 10\%$ UR.

IV.5.1.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA ($P \leq 0,05$), os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer com nível de significância $p < 0,05$ e a razão sexual foi testada pelo teste do Qui-quadrado (SOKAL E ROHLF, 1979).

IV.5.2 Resultados

IV.5a Efeito do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) no desenvolvimento pós embrionário das larvas de *Chrysomya megacephala*

As larvas de *C. megacephala* tratadas com 3,0% de látex de *P. amapa* mostraram um aumento na duração do período larval, quando comparado com o grupo controle (4,8 e 4,3 dias, respectivamente). Por outro lado, as larvas tratadas com 1,0% de látex apresentaram uma menor duração deste período (3,9 dias) e diferiu significativamente do grupo controle (Figura 18, página 38).

A duração do período pupal foi menor para as moscas tratadas com látex na concentração de 1,0% e maior para as tratadas à 2,0% (5,0 e 6,0 dias, respectivamente), diferindo do grupo controle (5,4 dias) e dos demais tratamentos. Estes tratamentos não apresentaram diferença entre si, mas todos eles foram estatisticamente diferentes do grupo controle (Figura 18 , página 38).

O tratamento na concentração de 1,0% de látex apresentou a menor duração do período de larva a adulto (9,0 dias), e à 2,0 e 3,0% de látex duração mais longa para o mesmo período (10 dias para ambos os tratamentos). A duração do grupo controle foi de 9,4 dias, e diferiram significativamente de todos os outros tratamentos (Figura 18, página 38).

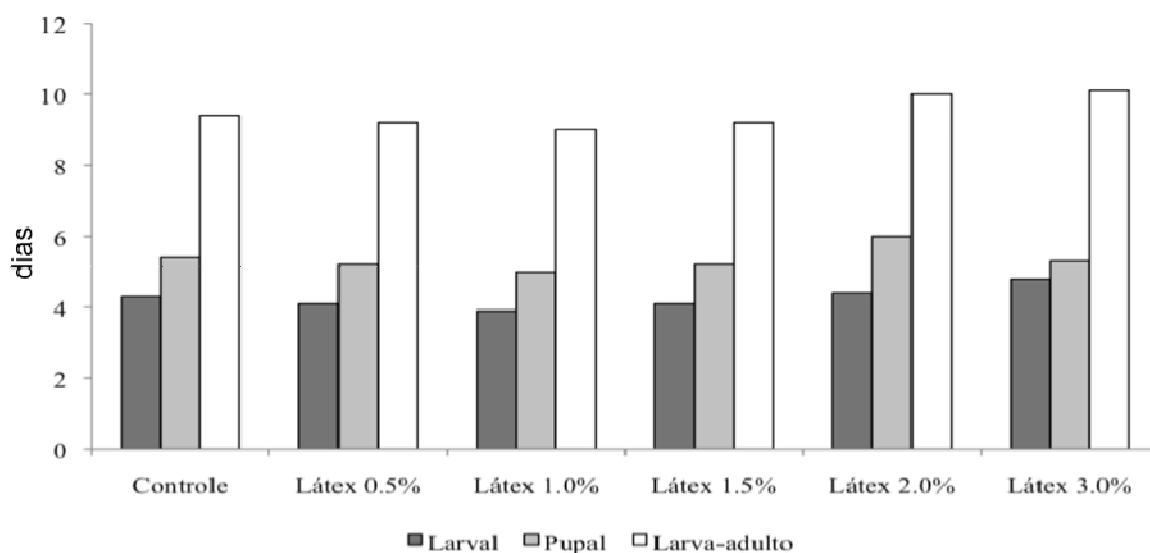


Figura 18. Duração (dias) dos períodos de desenvolvimento de larval, pupal e neolarva a adulto de *Chrysomya megacephala* tratadas com diferentes concentrações de látex.

Em relação ao peso das larvas tratados com diferentes concentrações de látex, os grupos de larvas tratadas com látex a 1,0% tiveram um menor peso (60,2 mg) que os tratados com látex a 2,0% foram os mais pesados (76 mg), enquanto que o grupo controle pesava 61 mg (Figura 19, página 38).

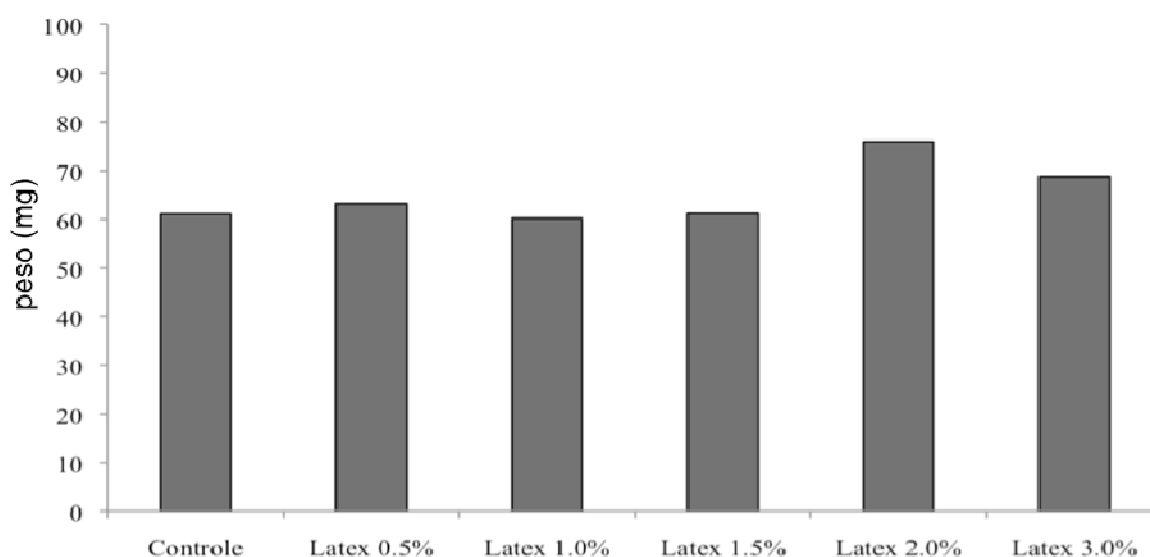


Figura 19. O peso (mg) das larvas de *Chrysomya megacephala* topicamente tratados com diferentes concentrações de látex.

As larvas de *C. megacephala* foram especialmente afetadas quando tratadas com látex a concentração de 3,0%, onde a viabilidade foi baixa nos períodos larval e de neolarva a adulto (65 e 53%, respectivamente), todas as outras concentrações testadas e o grupo controle apresentaram viabilidades superior a 65% para todos os períodos (larval, pupal e neolarva a adulto). O tratamento com látex a 0,5% apresentou a maior viabilidade, para todos os períodos observados (Figura 20, página 39), porém algumas larvas puparam no meio (carne equina) utilizado para produzir as larvas.

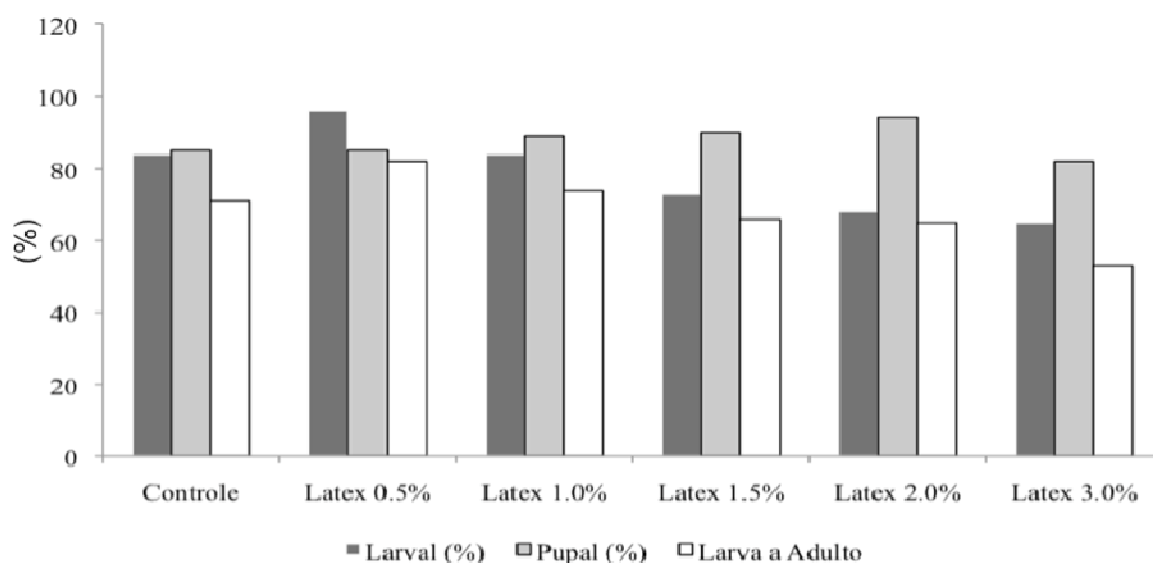


Figura 20. Viabilidade (%) dos períodos de desenvolvimento das larvas, pupas e de neolarva a adulto de *Chrysomya megacephala* topicamente tratados com diferentes concentrações de látex.

Neste ensaio, todos os períodos de desenvolvimento (larva, pupa e neolarva a adulto) foram menores (em dias) para o grupo das larvas tratado com látex a 1,0%, e estas larvas também pesaram menos.

Os resultados mostraram que *P. amapa* altera o desenvolvimento *C. megacephala* em elevadas concentrações e podem influenciar a pupação na concentração mais baixa.

IV.5b Avaliação da atividade inseticida do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) sobre as larvas de *Chrysomya putoria*

Os grupos tratados utilizando o látex na concentração de 5,0 % apresentaram as menores viabilidades para todos os períodos de desenvolvimento (larval, pupal e neolarva a adulto), sendo 66,0% para o período larval e 58,5% para o período de neolarva a adulto, já o período pupal para o grupo testado com látex a 10% alcançou viabilidade de 86,2 % (Figura 21, página 40).

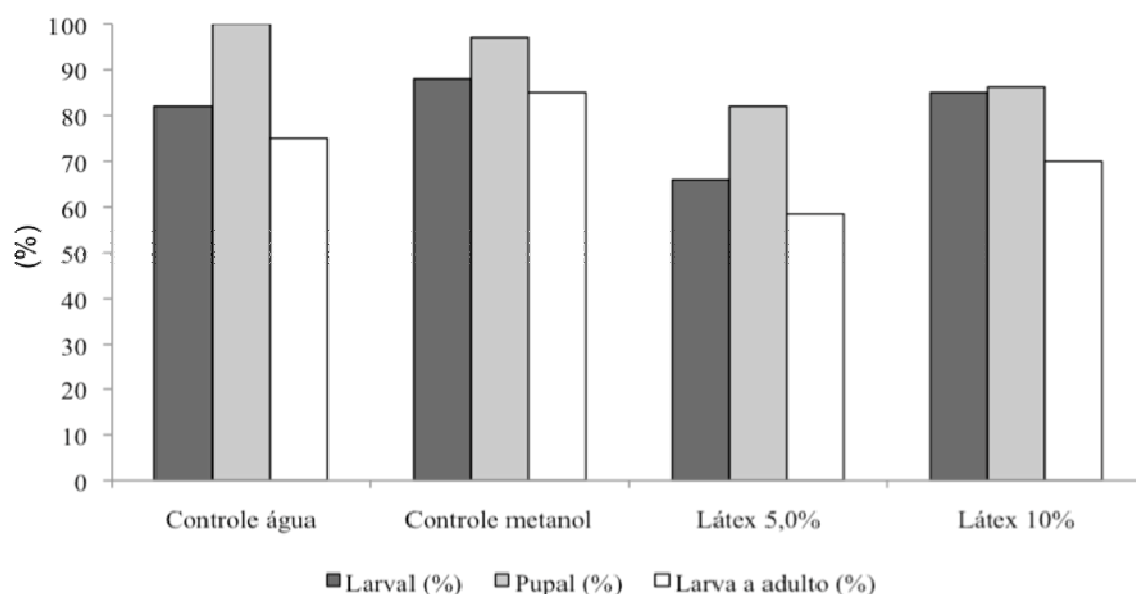


Figura 21: Viabilidade (%) dos períodos de desenvolvimento das larvas, pupas e de neolarva a adulto de *Chrysomya putoria* tratadas com diferentes concentrações de látex.

Quanto ao tempo decorrido nos períodos pós-embrionários (pupal, larval, neolarva a adulto) em comparação com o controle metanol, o látex a 10% reduziu todos os períodos observados, enquanto a concentração do látex a 5% causou o prolongamento do período pupal (Figura 22, página 41).

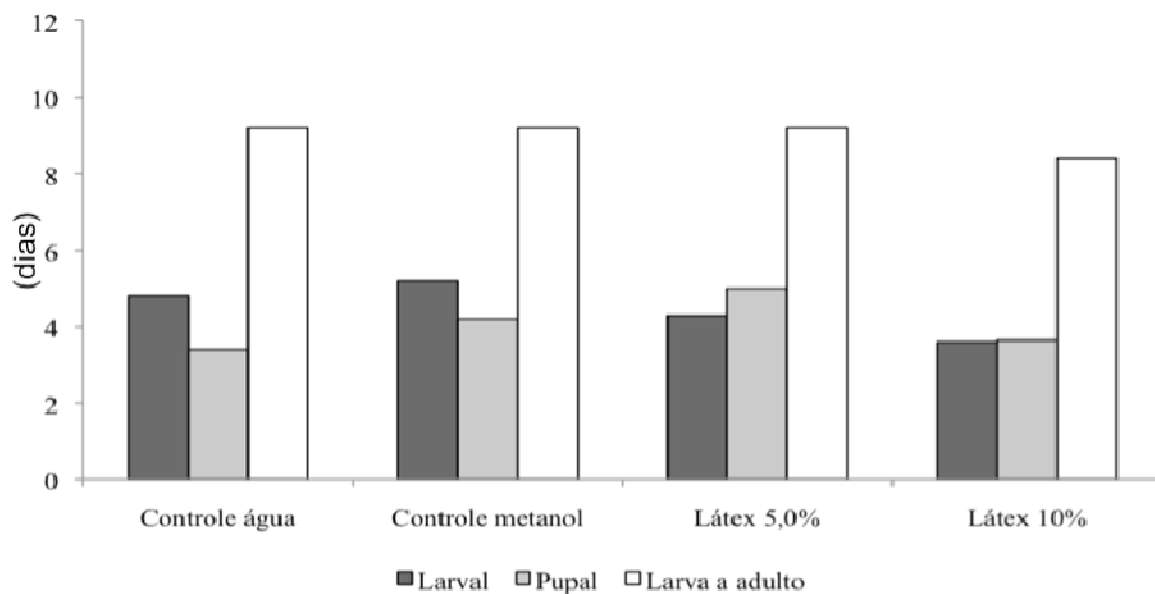


Figura 22: Períodos de desenvolvimento (dias) para larvas, pupas e de neolarva a adulto de *Chrysomya putoria* tratadas com diferentes concentrações de látex.

O tempo decorrido a partir de neolarvas a adultos e sua viabilidade parecem ser os parâmetros mais eficazes para avaliar a eficácia de substâncias, pois evita distorções entre os períodos de larva e pupa (D'ALMEIDA *et al.*, 2001). Cabral *et al.* (2007a, 2007b) testaram a eficácia de yangambina extraído de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) sobre ovos de *C. putoria*. Os períodos de ovo para adulto e de neolarvas a adultos pareceram ser particularmente sensíveis a essa lignana, com um tempo de desenvolvimento mais longo do que o grupo de controle.

Santos & Moya-Borja (1997) consideram que, quando a quantidade de nutrientes disponíveis não é suficiente ou a competição entre as larvas é muito elevada, larvas de dípteros geralmente deixam a dieta à procura de outra fonte de alimento. Às vezes, as larvas podem ficar um longo período na dieta para compensar a baixa qualidade ou quantidade de nutrientes.

Neste experimento, o período larval dos tratamentos com látex (5,0 e 10 %) foi menor do que para os controles (água e metanol), o grupo tratado com látex a 10% apresentou larvas mais pesadas do que o controle (água), demonstrando que o látex havia acelerado o

metabolismo larval, ou seja as larvas se alimentaram mais rápido, atingindo logo o peso necessário e abandonaram a dieta para pupar. O que pode ser verificado se observarmos que a viabilidade larval e pupal nesta concentração (10%) foi bastante elevada (Figura 21, página 40).

Mendonça *et al.* (2011) avaliaram os efeitos do látex de *P. amapa* em *C. megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) e relataram que muitas larvas estavam pupando no interior da carne. Este resultado não foi observado no presente ensaio, onde, para ambos os tratamentos, quase todas as larvas abandonaram a carne à procura de um substrato para pupar e completar o seu desenvolvimento.

O peso das larvas do grupo tratadas na concentração a 5% de látex foi o mais leve (46,70 mg) e não diferiram significativamente do grupo controle (água): o grupo tratado com látex a 10% foi o mais pesado, diferindo significativamente do grupo controle metanol (Figura 23, página 42).

Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção entre os sexos em todos os tratamentos e grupos controle (proporção de 1:1).

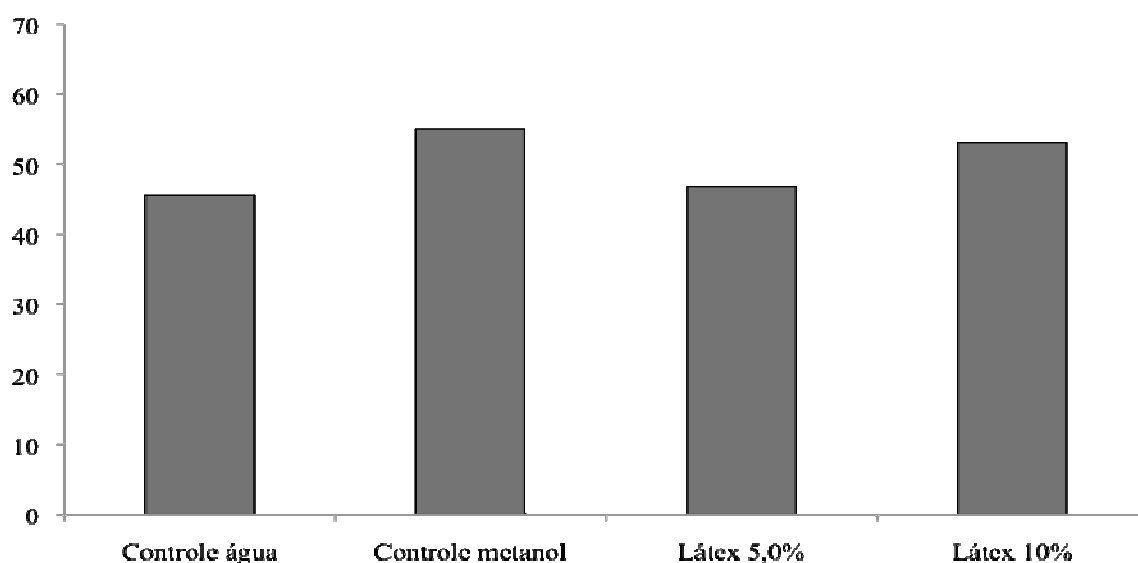


Figura 23. Peso das larvas (mg) de *Chrysomya putoria* tratadas com diferentes concentrações de látex.

IV.5.2 Eficiência carrapaticida do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae)

Esta parte do estudo foi feita em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, Minas Gerais.

IV.5.2.1 Procedência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A coleta das fêmeas ingurgitadas (teleóginas) e antes da alimentação (partenóginas) foi feita de forma manual em diferentes animais infestados, naturalmente alocados em fazendas do sul de Minas Gerais. Os parasitas foram armazenados em uma pequena caixa de papelão vedada com algodão e trazidos ao Laboratório de Biologia Parasitária (BIOPAR) localizado na Universidade Federal de Lavras-Lavras-MG.

IV.5.2.2 Preparo das soluções do látex

O látex liofilizado de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) foi diluído em água destilada para obtenção de 3 (três) concentrações diferentes (1,0, 2,0 e 3,0%).

IV.5.2.3 Execução do testes (Controle in vitro de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*)

Os ensaios com as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram conduzidos utilizando-se o látex de *P. amapa* (Apocynaceae) diluído em água destilada em 3 concentrações diferentes (1,0, 2,0 e 3,0%), além de um grupo controle negativo, que foi tratado somente com água destilada. Para cada tratamento foram separadas 12 fêmeas, tanto partenóginas quanto teleóginas na mesma proporção, e estas foram mantidas imersas durante 5 minutos no extrato com a concentração correspondente ao grupo. Decorrido o tempo, o excesso de extrato foi retirado

secando-se os exemplares de carrapatos e os mesmos foram colocados em vidros que foram vedados com gaze e o auxílio de fita adesiva. O mesmo procedimento foi feito com o grupo controle.

Os vidros contendo os parasitas foram colocados em local escuro a temperatura e umidade ambiente.

Após 17 dias foi realizada a pesagem dos ovos de cada grupo em balança de precisão analítica, fazendo a conversão dos valores para a eficácia das diferentes concentrações do látex de *P. amapa*, sabendo-se que no grupo controle temos 0% (zero) de eficácia.

IV.5.2.4 Resultados

Nos resultados obtidos, o grupo tratado com látex a 3% obteve menor peso de ovos, portanto a maior eficiência (45%), já que consideramos para o grupo controle 0% (zero) de eficiência (Tabela 6, página 44).

Tabela 6. Peso e eficiência do extrato de *Parahancornia amapa* em diferentes concentrações sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

TRATAMENTO	PESO POSTURA (g)	EFICIÊNCIA
Controle*	0.6465	0%
Látex de <i>P. amapa</i> 1%	0.6294	2.65%
Látex de <i>P. amapa</i> 2%	0.6933	0%
Látex de <i>P. amapa</i> 3%	0.3551	45.08%

*O grupo controle foi considerado como tendo 0% de eficiência

No presente ensaio a menor eficiência de um tratamento com relação ao controle foi observada para o grupo testado na concentração de látex a 2%, esse grupo alcançou o maior peso final dos ovos (em gramas), o que foi considerado como eficiência zero.

IV.5.2.5 Conclusão

Os resultados obtidos mostram uma alteração na postura dos ovos de *R. (Boophilus) microplus* (carrapato) em todas as concentrações de látex da *P. amapa* utilizadas.

A avaliação de todas as etapas do desenvolvimento deste parasita possibilitaram uma análise mais precisa da influência do látex no seu ciclo de vida. A realização de estudos complementares podem acrescentar informações importantes para a potencialização do efeito carrapaticida encontrado na látex de *P. amapa* trazendo possibilidades inovadoras para o controle do *R. (Boophilus) microplus*.

IV.6. Perfil metabolômico do látex de *Parahancornia amapa*.

A análise do metaboloma ou metabolômica (metabolômica), termo que começou a ser utilizado nos anos 90 é o estudo científico que visa identificar e/ou quantificar o conjunto de metabólitos intra e extracelulares (o metaboloma) produzidos e/ou modificados por um organismo. O metaboloma representa o conjunto de todos os metabólitos em uma célula, fluido biológico, tecido ou organismo, sendo estas substâncias consideradas como os produtos finais dos processos celulares (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006). Como na prática não é possível detectar todos os metabólitos pelos métodos analíticos existentes, utiliza-se uma abordagem experimental que permite analisar um grupo de metabólitos de interesse. Para isto pode-se fazer uma análise dirigida ou o estudo do perfil metabolômico.

O estudo do perfil metabolômico tem por objetivo a análise do maior número de metabólitos produzidos pela célula através de uma ou da combinação de várias técnicas analíticas. Entre elas, estão a espectroscopia de RMN (1D e 2D), Espectrometria de Massas, Cromatografia Líquida de Alta Pressão (CLAE) e Gasosa (CG) (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2004; OLDIGES & TAKORS, 2005).

No nosso estudo foi possível fazer um perfil metabolômico do látex de *P. amapa* utilizado nos testes biológicos, através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da partição MeOH (metanol) e CHCl_3 (clorofórmio) e comparação com os metabólitos especiais identificados nas diferentes partes desta planta.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 24, página 47) do extrato CHCl_3 apresentou uma riqueza de sinais em:

- ◆ δ : 0,79-1,39(s) (m), característicos de grupos metila de terpenos (lupeol **1**, α e β - amirina **1 e 2**);
- ◆ δ : 1,68(s), metila ligada a carbono sp^2 característico de esqueleto lupano (lupeol,**1**);

- ◆ δ : 2,03 (m); 2,47(m); 3,97(m); 4,47(m), característico de ésteres de triterpenos;
- ◆ δ : 4,56-4,66(s), hidrogênios característicos de esqueleto lupano (lupeol,**1**);
- ◆ δ : 5,13-5,18(m), característico dos triperpenos α e β - amirina (**2 e 3**).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25, 26 e 27, página 48 e 49) do extrato CHCl_3 apresentou uma riqueza de sinais em:

- ◆ δ_c : 170-180ppm, característicos de grupos carbonila conjugada.
- ◆ δ_c : 130-160ppm, carbonos quaternários característicos de triterpenos pentacíclicos das séries lupano, ursano e oleanano;
- ◆ δ_c : 110ppm (CH_2), característico de esqueleto de lupeol;
- ◆ δ_c : 14-18ppm (CH_3), sinais das metilas (24, 25, 26, 27, 28, 29)

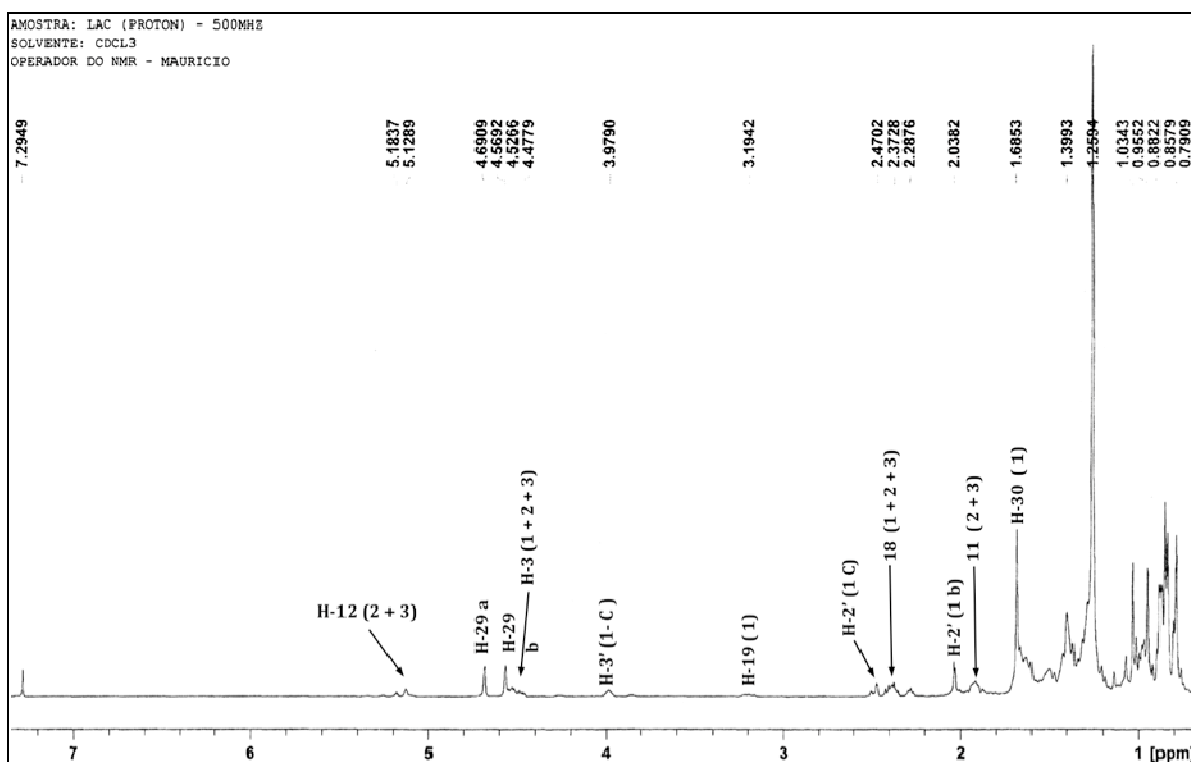


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3)- identificação dos metabólitos na partição CHCl_3 .

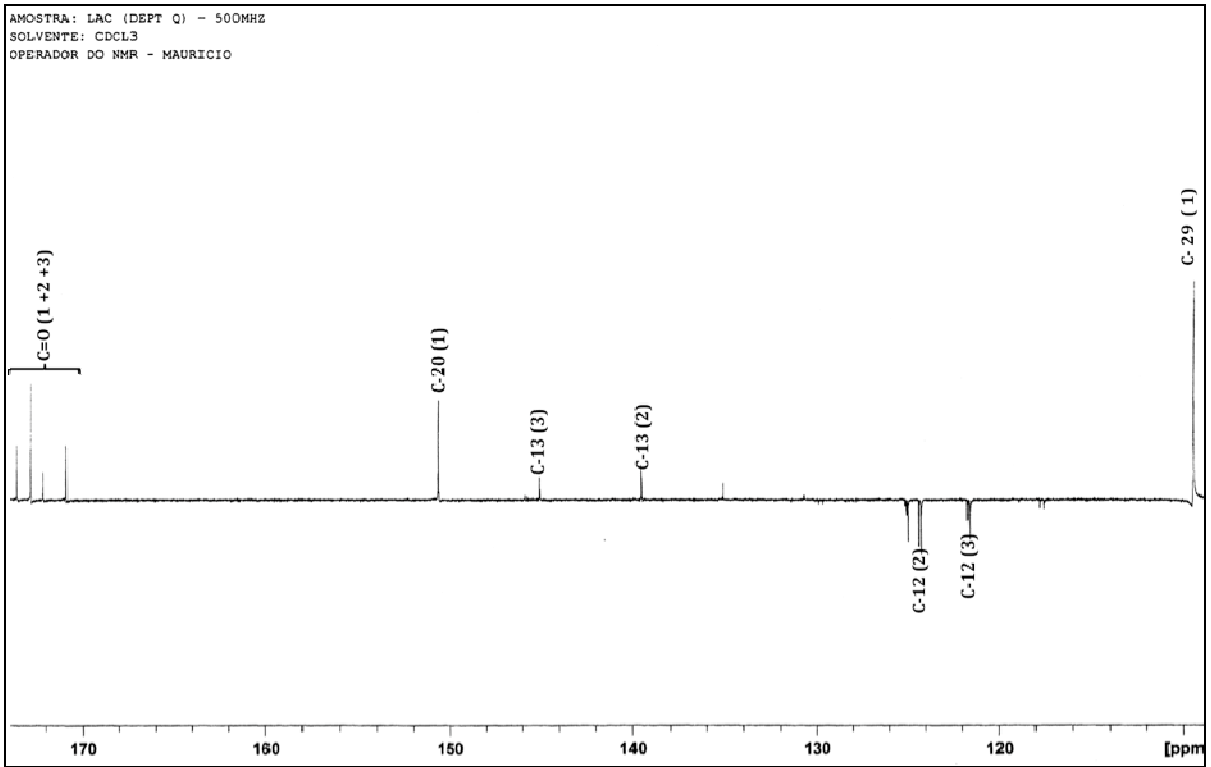


Figura 25. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl_3)- identificação dos metabólitos na partição CHCl_3 .

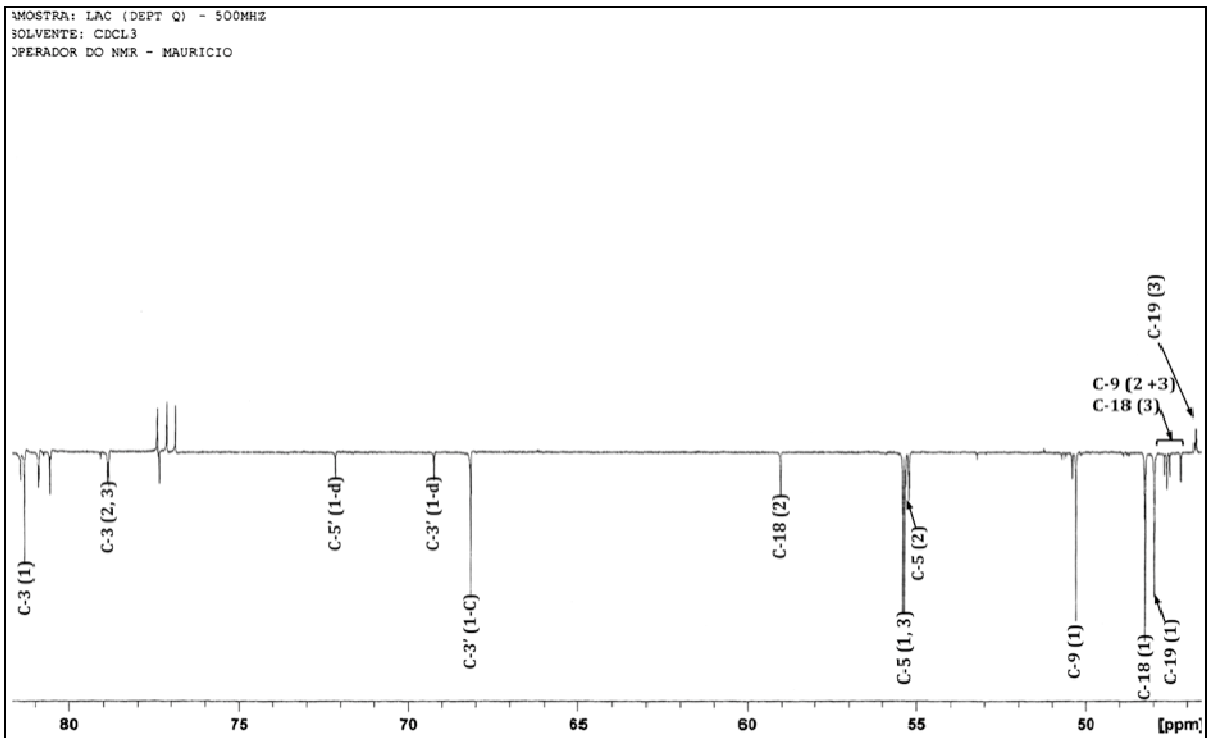


Figura 26. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl_3)- identificação dos metabólitos na partição CHCl_3 .

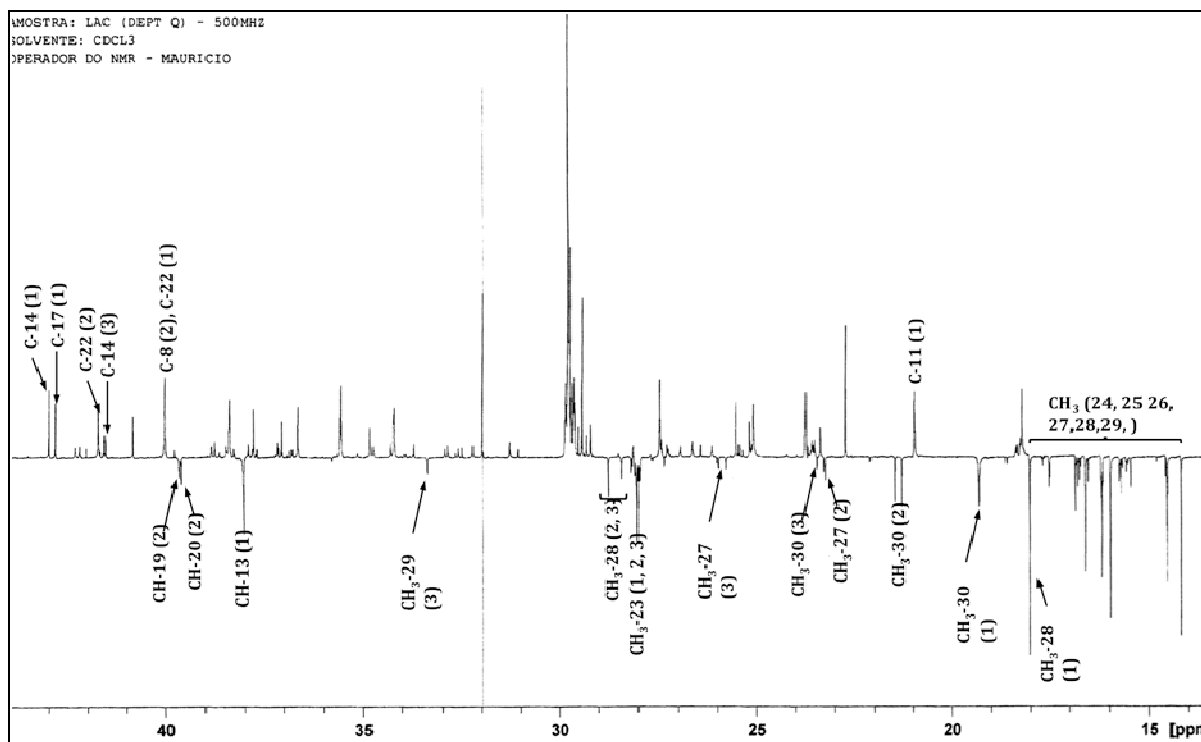


Figura 27. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CDCl_3)- identificação dos metabólitos na partição CHCl_3 .

O espectro de RMN de ^1H (Figura 28, página 50) do extrato MeOH apresentou uma riqueza de sinais em:

- ◆ δ : 2,10(s), atribuído ao H-7 do cornosídeo;
- ◆ δ : 3,0-4,4(s) (m), característicos de açúcar (cornosídeo);
- ◆ δ : 3,46 (s), sinal característico de metoxila (metil-mioinositol);
- ◆ δ : 5,0-6,0 (sinais fracos), atribuídos ao açúcar metil-mioinositol;
- ◆ δ : 6,20 e 7,10(s), característico de sistema *p*-substituído (AA'BB') (cornosídeo).

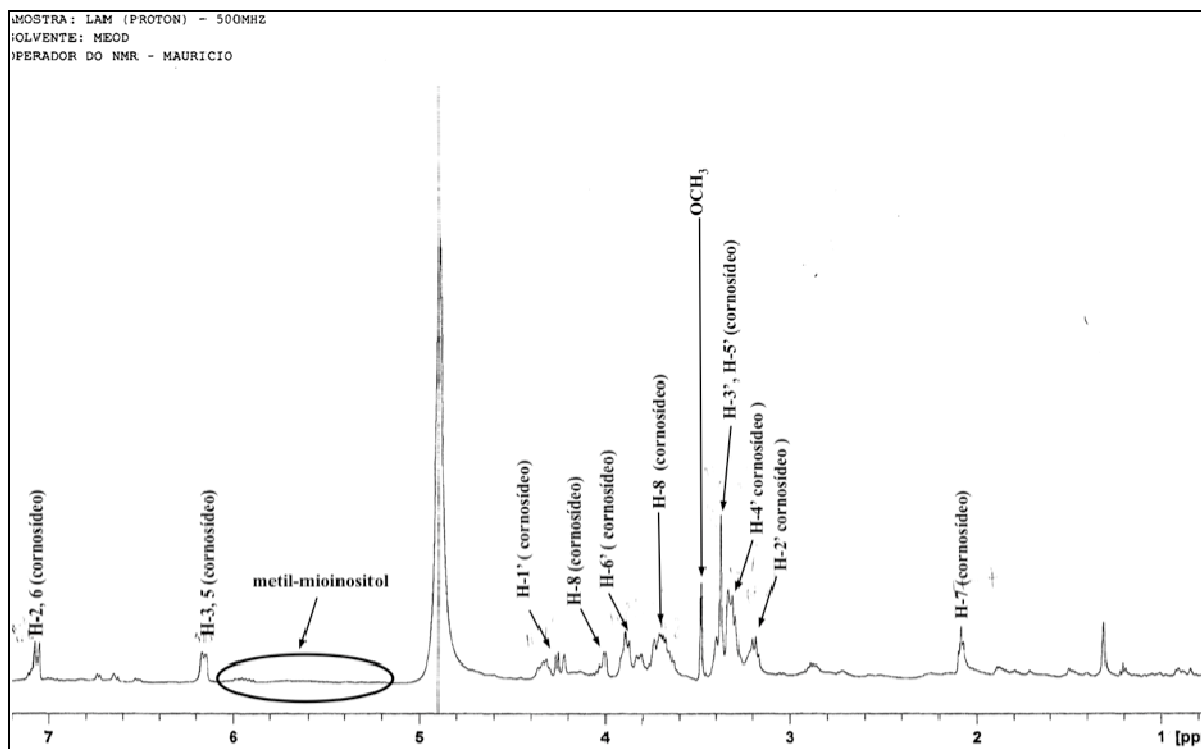


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD). identificação dos metabólitos na partição MeOH.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 29 e 30, página 51) do extrato MeOH apresentou uma riqueza de sinais em:

- ◆ δ_c : 186 (C), carbonila (cornosídeo);
- ◆ δ_c : 155 e 126 (CH), característicos de sistema p-substituído (cornosídeo);
- ◆ δ_c : 110, carbono anomérico característico de açúcar;
- ◆ δ_c : 70 - 80 (CH), sinais característicos de açúcar (cornosídeo);
- ◆ δ_c : 60 - 70, (CH), atribuídos ao açúcar metil-mioinositol;
- ◆ δ_c : 56 (OCH_3), confirmando o sinal da metoxila do açúcar metil-mioinositol.

O perfil metabolômico do látex indica que os triterpenos pentacíclicos, seus ésteres e a dienona (cornosídeo) provavelmente são os responsáveis pelas atividades biológicas e demonstra ainda que existe uma maior concentração dos ésteres de acil lupeol e do cornosídeo no látex de *P. amapa*.

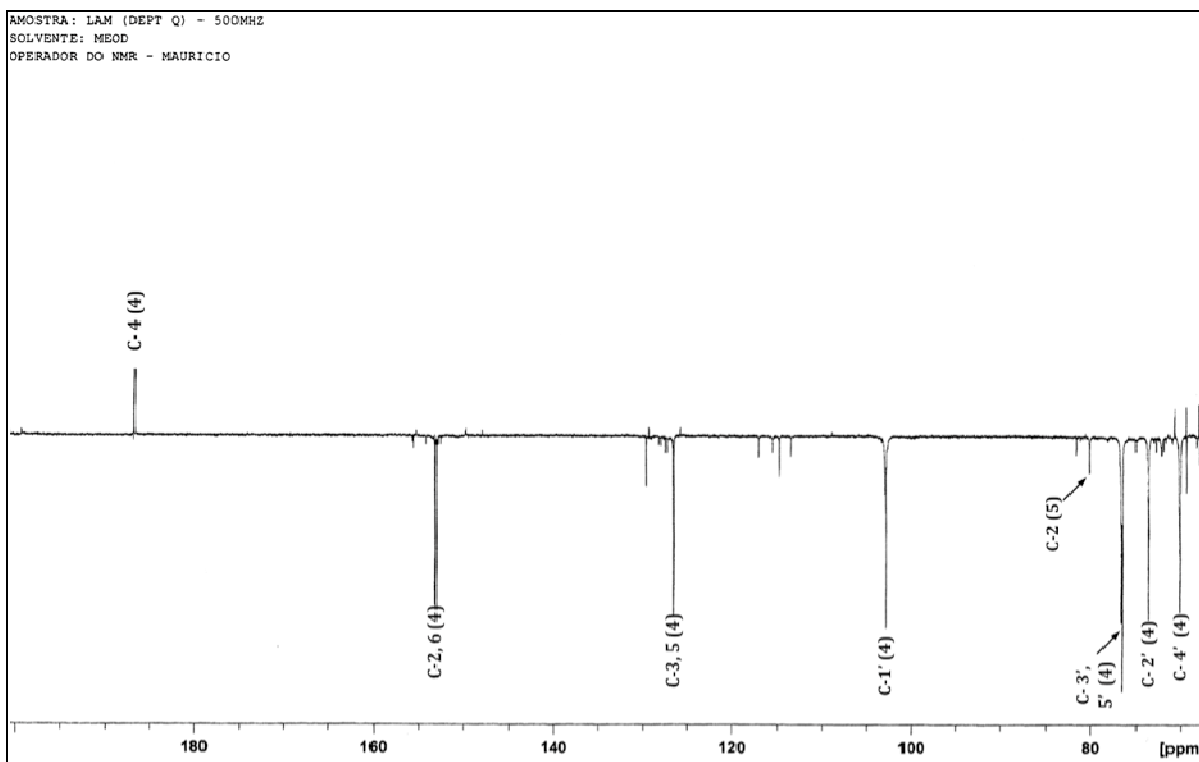


Figura 29. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CD₃OD)- identificação dos metabólitos na partição MeOH.

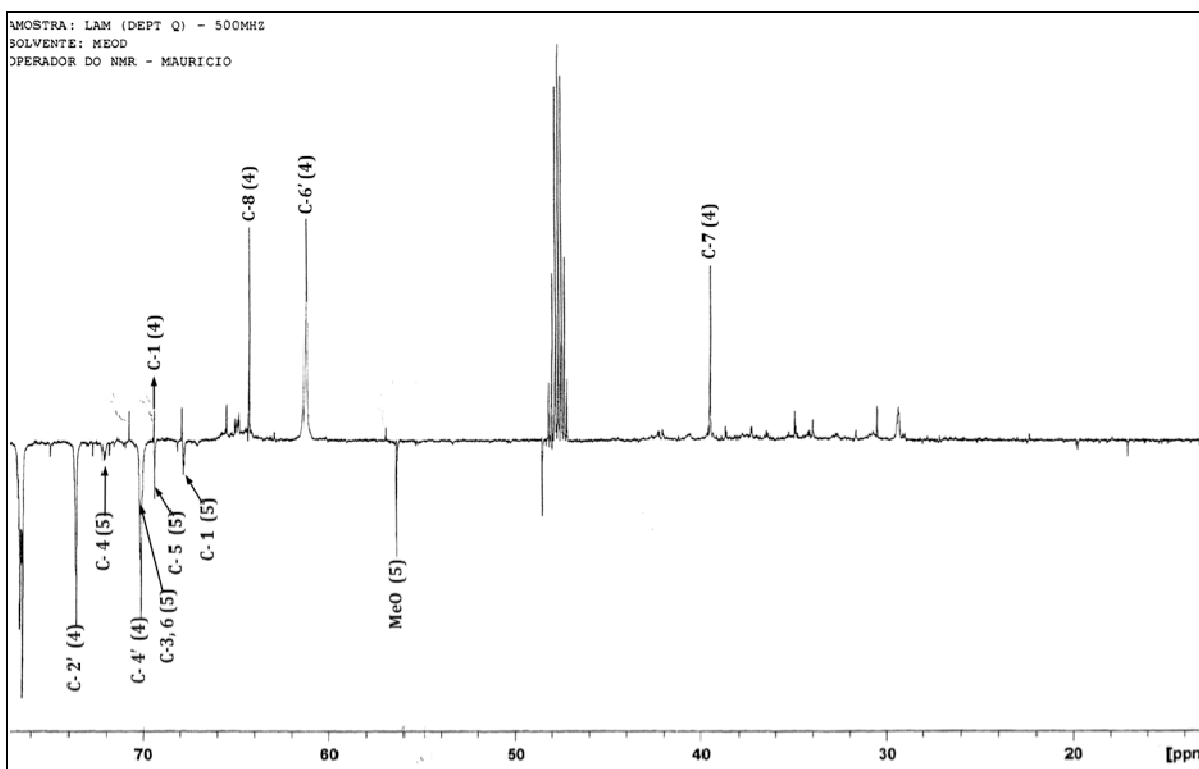


Figura 30. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, CD₃OD)- identificação dos metabólitos na fração da partição MeOH.

IV.7 Artigos publicados com o estudo do látex de *P. amapa*

Ao longo deste estudo foram publicados dois artigos nos anos de 2008 (CARVALHO *et al.*, 2008) e 2011 (MENDONÇA *et al.*, 2011); um terceiro em 2012 (CAETANO *et al.*, 2012) foi submetido para publicação. Existe ainda a expectativa da publicação de outros artigos, visto que ainda existem dados referentes a alguns testes biológicos que ainda estão sendo analisados.

Os artigos publicados foram:

1- CARVALHO, M. G. de; ALBUQUERQUE, L. R. M.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, p. 667-669, Dez. **2008**.

2- MENDONÇA, P. M.; LIMA, M. G.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; CARVALHO, M. G.; QUEIROZ, M. M. Effects of latex from "Amapazeiro" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. *Veterinary Parasitology*, v.178, p. 379-382, **2011**.

3- CAETANO, R. L.; MENDONÇA, P. M.; LIMA, M. G.; PINTO, Z. T.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; RIBEIRO, T.; CARVALHO, M. G.; QUEIROZ, M. M.; The Effect of Latex from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) and a Biflavonoid from *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae) on *Chrysomya putoria* (Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*. **(2012)**.

Um cópia dos artigos segue em anexo no final deste capítulo (Anexos A a B).

ANEXOS

Anexo A. Carnoside and other constituents from the latex of <i>Parahancornia amapa</i> (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil.....	54
Anexo B. Effects of latex from "Amapazeiro" <i>Parahancornia amapa</i> (Apocynaceae) on blowfly <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development...	57



Received 14 May 2008; Accepted 21 October 2008

Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern BrazilMário G. de Carvalho,^{*,1} Luis A. de Albuquerque,¹ Cássia C. F. Alves,¹ Vera Cascon²¹Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km. 7, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil,²Fundação CINERJ, Rua Visconde de Niterói, 1364, Mangueira, 20943-001 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Artigo

RESUMO: “Cornosídeo e outros constituintes do látex de *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) uma planta medicinal no Norte do Brasil”. O látex de *Parahancornia amapa*, popularmente conhecido como “leite do amapá” foi extraído com hexano, diclorometano e metanol. As frações obtidas com hexano e diclorometano forneceram misturas de 3-*O*-acil-lupeol e triterpenos confirmando resultados de estudos já realizados. No extrato metanólico identificou-se uma grande quantidade de mistura de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo. Estes constituintes foram identificados através da análise de espectros de IV, RMN ¹H e ¹³C e CG-EM das frações e do derivado acetilado do cornosídeo e do metilmioinositol.

Unitermos: *Parahancornia amapa*, amapá, feniletanóides, carboidratos, cornosídeo, ésteres de lupeol.

ABSTRACT: Latex of *Parahancornia amapa* which is known as “amapa milk” in folk medicine was extracted with hexane, dichloromethane and methanol. From the hexane and dichloromethane were identified mixtures of 3-*O*-acyl lupeol esters such as identified previously. In the methanol extract, a large amount of carbohydrates, the phenylethanoid glucoside known as cornoside, other phenylethanoids derivatives and methylmyoinositol were identified. The analysis of IR, NMR and GC-LRMS of the natural compounds and tetra-acetylcornoside and comparison with literature data were used to identify the compounds.

Keywords: *Parahancornia amapa*, amapá, phenylethanoids, carbohydrates, cornoside, lupeol esters.

INTRODUCTION

Parahancornia amapa (Huber) Dicke (Apocynaceae) is a tree which occurs in the State of Amapá in the Brazilian Amazon region. It is commonly called “amapa milk”, its latex is used in scars and bruises as plaster treatment, it is also mixed with honey, in equal quantities, to be used as a drink for treatment of asthma, bronchitis and physical weakness (Van den Berg, 1982). In the previous phytochemical study of this specie we reported the presence of sitosterol, stigmasterol, sitosterone, friedelin, lupeol, β -amyrin, α -amyrin, their acetyl derivatives, besides 3 β -*O*-acyl lupeol esters in bark, latex and roots of this plant (Carvalho et al., 2001; Sobrinho et al., 1991). These pentacyclic triterpenes, its acyl derivatives and the mixtures of four *n*-acyl-lupeol, four 3 β -hydroxy-*n*-acyl lupeol and two β , δ -dihydroxy-*n*-acyl-lupeol were identified in the non-polar fractions of the latex from *P. amapa* (Sobrinho et al., 1991). In this paper we describe an additional study directing the identification of polar constituents in the latex from *P.*

amapa. The presence of phenyletanoid glycoside and acyl lupeol esters in *Parahancornia* reveal biochemical metabolism different from *Himatanthus* (Barreto et al., 1998; Veloso et al., 1999; Abdel-Kader et al., 1997; Silva et al., 1998), *Plumeria* (Adam et al., 1979; Hamburger et al., 1991; Coppen & Cobb, 1983; Kardono et al., 1990) and *Allamanda* (Coppen & Cobb, 1983; Abdel-Kader et al., 1997) that have been identified as source of iridoids. On the other hand, it is in agreement with Jensen et al (2005) that cornoside often substitutes iridoid glucosides in plants where these are expected to be present. Considering that these kinds of compounds have been found in important herbal medicine (Teshima et al., 1996), these phenylethanoids and inositol can be the active compounds in the used polar fraction from the latex of *P. amapa* called as “amapa milk” by the folk medicine. An additional consideration is that the unadvised people substitute the latex from *P. amapa* with the one from *Hmatanthus* that has iridoids and sugars as polar compounds in its latex (Barreto et al., 1998).

* E-mail: mgeraldo@ufrj.br

MATERIAL AND METHODS

General procedures

Melting points have not been corrected. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1605 FT-IT spectrophotometer. ^1H (200.0 MHz) and ^{13}C (50.3 MHz) NMR spectra were recorded on a Bruker AC 200 spectrometer using DMSO-d_6 , D_2COD or CDCl_3 with TMS as internal standard. Electron Ionization Mass Spectra (LREI-MS) were taken with Gas Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS) on a Varian Saturn 2000 using ion trap and 70 eV. Column chromatography with silica gel (Vetec and Aldrich 0.05-0.20 mm) and Sephadex LH-20 (Sigma, USA); for preparative TLC was used silica gel F254 G (Vetec), and silica gel TLC plates w/UV254, aluminum backed (Sorbent) were used to analyze the fractions collected from column chromatography (CC) with visualization under UV (254 and 366 nm), Lieberman-Burchard and/or Godin reagents or exposure to iodine vapor.

Plant material

The used material was collected from one specimen identified by the botanist Benedito Vitor Rabello in State of Amapá, Brazil. The voucher specimen (n° 07231) is deposited at the Herbário Amapaense (HAMAB) of the Divisão de Botânica do Museu Ângelo Moreira da Costa Lima, Instituto de Estudos e Pesquisas do Amapá (IEPA), Macapá-AP, Brazil.

Extraction

The dried latex (100.0 g) was extracted by maceration three times with hexane, dichloromethane and with methanol at room temperature. The solutions were obtained by filtration and the solvents were removed by distillation under vacuum to afford the residues PALAH (37.5 g), PALAD (30.0 g) and PALAM (25.0 g).

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of PALAH and PALAD by ^1H and ^{13}C NMR spectra and TLC plate revealed the presence of a mixture of pentacyclic triterpenes (α -amyrin, β -amyrin and lupeol), those acetyl derivatives and a complex mixture of acyl-lupeol esters identified previously (Carvalho et al., 2001; Sobrinho et al., 1991). The residue PALAM (15.0 g) was dissolved in methanol and submitted to Sephadex LH-20 column chromatography, eluted with methanol, to yield 40 fractions. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of fractions 18-21 (50.0 mg) collected from this column showed signals of glycopyranoside (1, identified in the fractions 22-24) together with signals compatible with other phenylethanoid derivatives such as **1b**, **2**, **2a**, and **3**. The GC-MS analysis of this group

of fractions afforded a chromatogram whose analysis of each corresponding mass spectrum considering the main peaks let us to identify **1b** [4-hydroxy-4-(2-hydroxyethyl)-2,5-cyclohexadien-1-one; Rt: 4.36 min; m/z (%): 154 (100, M^+), 135 (30), 123 (25), 108 (20), certainly yielded from **1**]; **2** [ethanol-2-(ciclohexyl-1-hydroxy-5-methoxy-2-en-4-one; Rt: 2,33 min; m/z (%): 186 (2, M^+), 155 (20), 137 (34), 112 (31), 110 (33), 82 (100)] and **3** [4-hydroxyphenylethanol (tyrosol); Rt: 2.43 min; m/z (%): 138 (40, M^+), 121 (17), 107 (100), 94 (5), 77 (33)]. The absence of corresponding peak of **2a** let us to propose to be a derivative from **2**. The fraction 22-24 (gum, 2.0 g) was examined by IR, NMR spectra, including 2D-NMR experiments, besides mass spectrum and comparison with literature data (Khan et al., 1992) let to identify the quinol glucoside **1**, known as cornoside (Jiménez and Riguera, 1994). **1** (50.0 mg) was treated with acetic anhydride and pyridine (1:1) at room temperature overnight, following usual work-up and filtration through a silica gel column, yielded the tetra-acetyl derivative **1a** [m.p. 219-220 °C, 40.0 mg]; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 6.8 (d, 8.0 Hz, H-3,5), 6.2 (d, 8.0 Hz, H-2,6), 4.9-5.2 (m, 2',3',4'), 4.60 (d, 8 Hz, H-1') 4.0-4.3 (m, H-6'), 3,6 (m, H-5'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50.3 MHz): 188.0 (C-1), 169.3-169.5 (OCOC(11)), 147.8 (CH-3,5), 128.6 (CH-2,6), 100.3 (CH-1'), 72.7 (CH-3'), 71.8 (CH-5'), 71.1 (CH-2'), 68.4 (CH-4'), 63.9 (CH₂-8), 61.9 (C-4), 61.7 (CH₂-6'), 39.0 (CH₂-7), 24.1-24.7 (OCOCH_3). The analysis of ^1H and ^{13}C NMR spectra of a solid material (300.00 mg), obtained from the fractions 27-31, revealed the presence of carbohydrate (**4**). 30.0 mg of **4** was acetylated by the same methodology used for **1** to obtain the derivative **4a**. The analysis of IR and NMR spectra of **4a**, besides comparison with the same penta-acetyl derivative of carbohydrate isolated from *Himatanthus articulata* (Barreto et al., 1998) and from

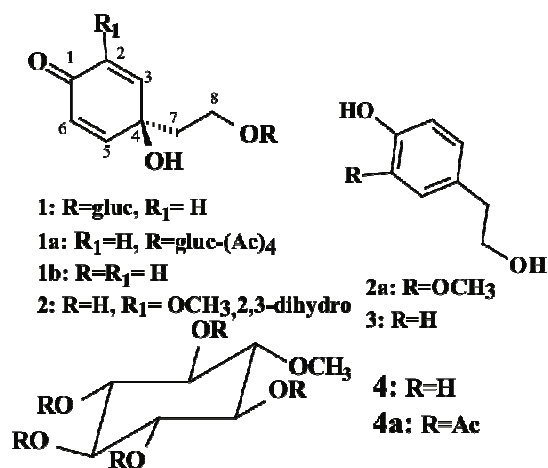


Figure 1. Chemical constituents from *Parahancornia amapa*.

Ouratea hexasperma (Moreira et al., 1999), let us to identify 4 as methyl-myoinositol (mp 214-217 °C). The ¹³C NMR spectrum of the remaining fractions was analyzed and revealed the presence of carbohydrates mixture. This is the first record, in Apocynaceae, of 1-3 which are widespread in families such as Cornaceae, Oleaceae, and Scrophulariaceae (Kenichiro, 2005), Plantaginaceae (Jesen et al., 2005) and Bignoniaceae (Teshima et al., 1996) (Figure 1).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq, CAPES and FAPERJ for grants and financial support.

REFERENCES

- Abdel-Kader MS, Wisse J, Evans R, van der Werf H, Kingston DG 1997. Bioactive Iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *J Nat Prod* 60: 1294-1297.
- Adam G, Khoi NH, Bergner C, Lien NT 1979. Plant growth inhibiting properties of plumeride from *Plumeria obtusifolia*. *Phytochemistry* 18: 1399-1400.
- Barreto AS, Carvalho MG, Nery IA, Gonzaga L, Kaplan MAC 1998. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J Braz Chem Soc* 9: 430-434.
- Carvalho MG, Velloso CRX, Braz-Filho R, Costa WF 2001. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc* 12: 556-559.
- Coppen JJW, Cobb AL 1983. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*. *Phytochemistry* 22: 125-128.
- Hamburger MO, Cordell GA, Ruangrunsi N 1991. Traditional medicinal plants of Thailand XVII Biologically active constituents of *Plumeira rubra*. *J Ethnopharmacol* 33: 289-292.
- Jensen SR, Albach DC, Ohno T, Grayer RJ 2005. *Veronica*: iridoids and cornoside as chemosystematic markers. *Biochem Syst Ecol* 33: 1031-1047.
- Jiménez C, Riguera R 1994. Phenylethanoid glycosides in Plants: Structures and biological activity. *Nat Prod Rep* 11: 591-606.
- Kardono LBS, Soefjan T, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD 1990. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. *J Nat Prod* 53: 1447-1455.
- Kenichiro I 2005. Cytochrome P450 enzymes in biosyntheses of some plant secondary metabolites. *Yakugaku Zasshi* 125: 31-49.
- Khan AI, Erdelmeier CAJ, Sticher O 1992. New phenolic glucosides from the leaves of *Eurya tigan*. *J Nat Prod* 55: 1270-1274.
- Moreira IC, Carvalho MG, Bastos ABFO, Braz-Filho R 1999. A flavone dimer from *Ourtea hexasperma*. *Phytochemistry* 51: 833-838.
- Silva JRA, Rezende CM, Pinto AC, Pinheiro MLB, Cordeiro MC, Tamborini E, Young CM, Bolzani VS 1998. Éster triterpênicos de *Himatanthus succuba* (Spruce) Woodson. *Quim Nova* 21: 702-704.
- Sobrinho DC, Hauptli MB, Appolinário EV, Kollenz CLM, Carvalho MG, Braz-Filho R 1991. Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*. *J Braz Chem Soc* 2: 15-20.
- Teshima K, Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, Lhicochaiphant S, Yamasaki K 1996. Phenylethanoids and cyclohexylethanoids from *Oroxylum indicum*. *J Nat Med* 50: 307.
- Van den Berg ME 1982. *Plantas Medicinais na Amazônia-Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático*. CNPq/PRU/MPEG, Belém-PA, Brasil.
- Veloso MP, Nagem TJ, Oliveira TT 1999. β-Dihidroplumericin acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem Syst Ecol* 27: 669-671.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short Communication

Effects of latex from “Amapazeiro” *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development

Paloma M. Mendonça^{a,*}, Mariana G. Lima^b, Luis R.M. Albuquerque^c, Mario G. Carvalho^c, Margareth M.C. Queiroz^a

^a Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, CEP: 20045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 May 2010
Received in revised form
21 December 2010
Accepted 7 January 2011

Keywords:
Latex
Diptera
Apocynaceae
Chrysomya megacephala
Biological control

ABSTRACT

Nowadays, insect control is usually carried out using chemical insecticides, but insect resistance and other negative side effects have prompted the search for alternatives. Biopesticides provide a positive alternative to synthetic pesticides because they have low impact on the environmental, low toxicity to humans and low costs among other advantages. This research was carried out to evaluate the activity of *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae) lyophilized latex on the post embryonic development of *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). Larvae treated with 1.0% latex showed a shorter post embryonic development period (larval, pupal and newly hatched larvae to adult); whereas larvae treated with 3.0% latex provoked a prolongation of these periods. Viability (53%) was also very low at the newly hatched larvae to adult period for larvae treated with 3.0% latex, indicating that latex from *P. amapa* at high concentrations could change *C. megacephala* post embryonic development.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The *Chrysomya* species are the primary invertebrate consumers of decomposing organic matter (Braack, 1986). The blowfly can survive in different habitats, since they are ecologically diverse. The larvae of these flies are able to develop in various substrates, such as decomposing organic matter, feces, garbage and corpses (Guimarães et al., 1978; Queiroz et al., 1999).

Chrysomya megacephala (F.) (Diptera: Calliphoridae), known as the Oriental latrine blowfly, was introduced into southern Brazil in the 1970s and nowadays is found

throughout the entire continent (Greenberg, 1988; Wells, 1991). This fly has great importance to humans and animals, because larva causes myiasis and adult acts as a physical carrier of pathogens, such as enteroviruses, enterobacteria, protozoan cysts and oocysts, helminths and fungi (Greenberg, 1971, 1973).

Chemical insecticides used for insect control are especially dangerous in urban areas since these products can affect man and others animals, pollute the air, water and even enter the food chain. So along with the appearance of insect resistance and other negative side effects, the search for alternative forms of control has become important.

Efforts are continuously being made to find alternative substances for insect control in order to decrease the use of chemical insecticides. Biopesticides provide an alternative to synthetic pesticides because they have low impact on

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 1846; fax: +55 21 2562 1846.
E-mail address: palomamm@ioc.fiocruz.br (P.M. Mendonça).

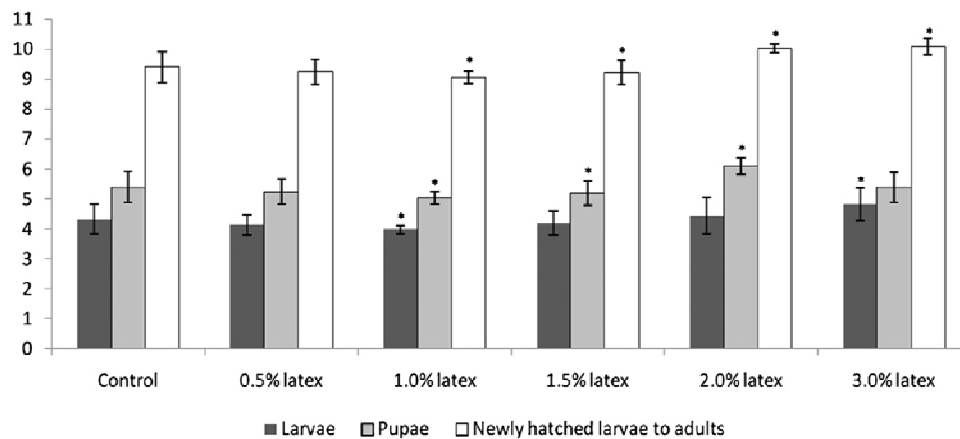


Fig. 1. Duration (day) of larval, pupal and newly hatched larvae to adults development period of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) topically treated with different concentrations of latex extracted from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Significant different from control group.

the environmental, low toxicity to humans, low costs as well as other advantages (Liu et al., 2000).

According to Feinstein (1952), approximately 2000 species of plants representing more than 170 families are said to have insecticidal properties. Plants from the family Apocynaceae are widely used as medicinal plants and as insecticides. Mathew et al. (2009) tested *Saraca indica* (Fabales: Caesalpinaceae), *Clitoria ternates* (Fabales: Fabaceae) and *Nyctanthes arbor-tristis* (Fabales: Oleaceae) against the mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of malaria, lymphatic filariasis and dengue at India (*Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*, respectively) and tests resulted in the identification of the potential plant extracts for mosquito larval control.

Parahancornia amapa (Huber) Ducke is a tree found in the Brazilian Amazon, especially in Amapa state. It is known as “amapa” or “amapazeiro” and the bark and latex are used by the natives as a tonic, anti-syphilitic medicine and to treat digestive diseases (Sobrinho et al., 1991; Monteles and Pinheiro, 2007). Natives also reported its use as an insect repellent. This research evaluates the activity of *P. amapa* lyophilized latex on the post embryonic development of *C. megacephala*.

2. Materials and methods

The Oswaldo Cruz Institute in the state of Rio de Janeiro rears and maintains colonies of *C. megacephala* following the methodology described by Queiroz and Milward-de-Azevedo (1991). The cultures used here were kept in cages at room temperature and were supplied *ad libitum* with water and sugar. Protein in the form of equine meat was given to stimulate oviposition; and the insects readily oviposited on this medium. The new generation was reared following the same methodology and newly hatched larvae from the second laboratory-hatched generation were used in the experiments.

The latex from *P. amapa* was collected from the specimen identified by Benedito Vitor Rabelo (IEPA) in Amapa

state; deposited example (N^o 07231) in the Herbário Amaense (HAMAB). The lyophilized latex from *P. amapa* was diluted in distilled water to obtain the test concentrations. Five different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0%) were used and a control group treated with distilled water.

Latex was applied topically to newly hatched larva bodies using groups of 50 insects (1 μ L/larva). The bioassays were performed in triplicate. Newly hatched larvae were grouped in a Petri dish, covered with absorbing paper moistened with distilled water and the latex was applied using micropipettes on the larvae for 5 min. After treatment, the paper with the larvae were transferred and placed onto equine putrefied meat (50 g), with a proportion of 1 g of meat for each larva, to guarantee enough food for maximum development. After reaching maturity, the larvae spontaneously abandoned the diet and were collected. These larvae were individually weighed and transferred to glass tubes containing vermiculite to one-fourth of their volume and covered with cotton plugs. Daily observations were made until the adults emerged. After emergence, the adults were separated by gender.

The experiments were maintained in acclimatized chambers set at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 10\%$ RH. The results were analyzed by ANOVA ($P \leq 0.05$), the mean values were compared by the Tukey–Kramer test at the 0.05 significance level and the sex ratio was tested by chi-square (Sokal and Rohlf, 1979).

3. Results

In this study, *C. megacephala* treated with 3.0% latex showed an increase in the larval period duration when compared to control group (4.8 and 4.3 days, respectively). On the other hand, larvae treated with 1.0% latex showed a shorter duration of this period (3.9 days) and differed significantly from control group (Fig. 1). Duration of the pupal period was also shorter for flies treated with 1.0% latex and longer in 2.0% latex (5.0 and 6.0 days, respectively), differing from control group (5.4 days) and from the other

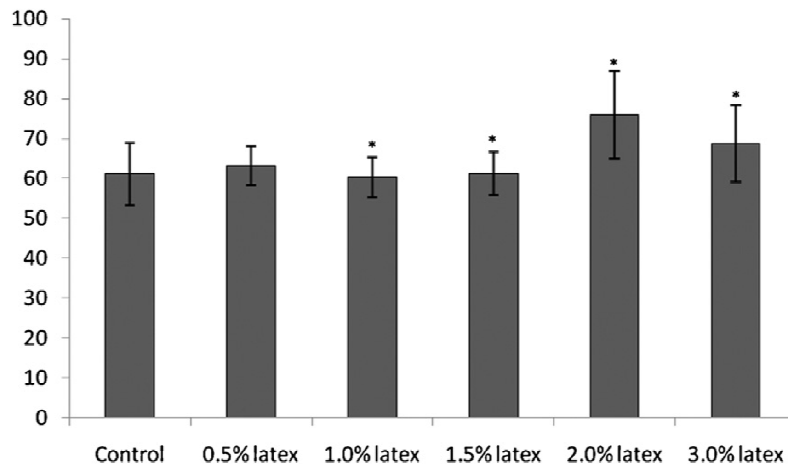


Fig. 2. Larval weight (mg) of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) topically treated with different concentrations of latex extracted from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Significative different from control group.

treatments. These treatments showed no difference among themselves, but all of them were statistically different from control group (Fig. 1). 1.0% latex showed the shortest duration from the newly hatched larvae to the adult period (9.0 days) and 2.0 and 3.0% latex the longest duration for this period (10.0 days for both treatments). Duration of control group was 9.4 days and differed significantly from all the other treatments (Fig. 1).

Fig. 2 shows the results of the weights of the different groups. Larvae from the 1.0% latex group were the lightest (60.2 mg) and from 2.0% latex they were the heaviest (76 mg), while the control group weighed 61 mg.

C. megacephala were specially affected by 3.0% latex where viability was low at the larvae and newly hatched larvae to adult periods (65 and 53%, respectively), while all other treatments and the control group showed viabilities higher than 60% (Fig. 3). 0.5% latex showed the highest viability, for all periods observed, but larvae pupated in the medium (equine meat) used to breed the larvae (Fig. 3).

In this research, all development periods (larval, pupal and newly hatched larvae to adult) were shorter for larvae from the 1.0% latex group and also they weighed less than the other latex concentrations.

4. Discussion

According to d’Almeida et al. (2001), duration and viability from the newly hatched larvae to the adult period seem to be the most efficient parameter to evaluate the substance efficacy, because it prevents distortions between the larval and pupal periods. These periods are strongly influenced by abiotic factors such as temperature, humidity and photoperiod. el-Shazly et al. (1996) tested the effect of an ethanolic extract of leaves from *Nerium oleander* (Apocynaceae) against *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae). This extract delayed larval and pupal duration, suppressed oviposition and decreased adult longevity of survivors, affecting directly on endocrine system of the insects. In

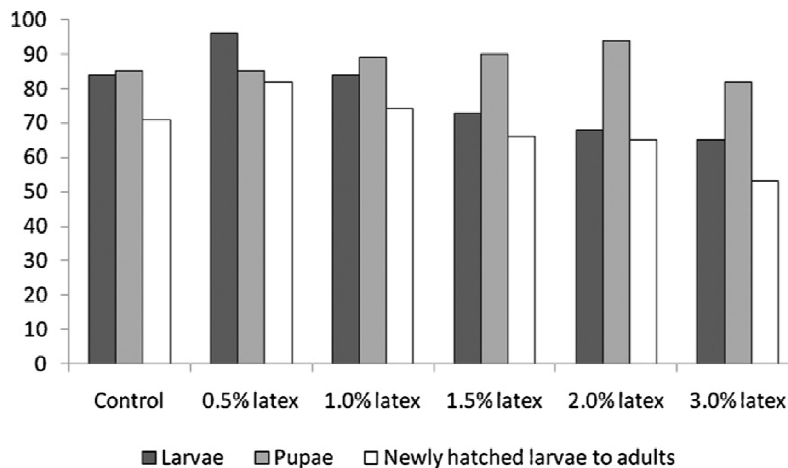


Fig. 3. Viabilities (%) of larval, pupal and newly hatched larvae to adults development period of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) topically treated with different concentrations of latex extracted from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae).

this study, 0.5% latex showed viabilities higher than control group for all development periods observed. The larvae did not leave the medium, they pupate inside the equine meat what avoid the effect of the natural loss occurred during this important process. Under natural conditions, larvae that did not leave the carcass are more susceptible to the effects of predators and parasitoids (Vinson and Iwantsch, 1980) and this effect of the latex from *P. amapa* should be better investigated.

Dipterous larvae usually leave the diet when the quantity of nutrients available is not enough or the competition among larvae is very high. In some cases, larvae stay a longer time on the diet to compensate the low quality or quantity of nutrients (Santos and Borja, 1997). Some substances can alter the insect's endocrine system, by acting directly on growth control and development or on hormone production (Cabral et al., 1999). According to Miyazawa et al. (1994), licarin A, a substance extracted from plants, interferes directly with fruit fly *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) development period.

Some necrophagous diptera are better adapted to pupate even when they have the final weight below the average previously estimated for the other species. According to Von Zuben (1998), the minimum weight necessary for *C. megacephala* to become a pupa is 30.1 mg. All pupae from this research weighed more than the minimum and this explains the high pupal viability found in all treatments.

Results found in this research are in agreement with other authors who have studied the effects of products extracted from plants against the post-embryonic development of muscoids diptera (*Peckia* (*Peckia*) *chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae) and *C. megacephala*) (Cabral et al., 2007a,b). These same authors also found alterations in the life cycle, development period viabilities and morphological alterations, mainly at the higher concentrations, similar to our findings.

In conclusion, an effort has been made to evaluate the role of plant latex in fly control. The results showed that *P. amapa* alters *C. megacephala* development at high concentrations and could influence the pupation at lower concentration. This then opens up the possibility for further investigations using extracts with different solvents and even the pure substance. Some tests in this sense are already in progress.

Acknowledgments

We thank David Graham Straker for his helpful English review. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Fundação Oswaldo Cruz (PAPES V).

References

Braack, L.E.O., 1986. Arthropods associated with carcasses in the northern Kruger National Park. *S. Afr. J. Wildlife Res.* 16, 91–98.

- Cabral, M.M.O., Kelecom, A., Garcia, E.S., 1999. Effects of the lignan pinorensinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*, and of the milkweed bug, *Oncopeltus fuscatus*. *Fitoterapia* 70, 561–567.
- Cabral, M.M.O., Mendonça, P.M., Gomes, C.M.S., Barbosa-Filho, J.M., Queiroz, M.M.C., Mello, R.P., 2007a. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. *Fitoterapia* 78, 20–24.
- Cabral, M.M.O., Mendonça, P.M., Gomes, C.M.S., Barbosa-Filho, J.M., Dias, C.S., Soares, M.J., Queiroz, M.M.C., 2007b. Biological activity of yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 44, 249–255.
- d'Almeida, J.M., Ferro, C.L., Fraga, M.B., 2001. Desenvolvimento Pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em Dietas Artificiais. *Acta Biol. Leopoldensia* 23, 4–7.
- el-Shazly, M.M., Nassar, M.I., el-Sherief, H.A., 1996. Toxic effect of ethanolic extract of *Nerium oleander* (Apocynaceae) leaves against different developmental stages of *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae). *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 26, 461–473.
- Feinstein, L., 1952. Insecticides from plants. In: *Insects: The Year Book of Agriculture*. U.S.D.A. Washington, DC, 229 pp.
- Greenberg, B., 1971. Flies and diseases. In: *Ecology, Classification and Biotic Associations*, vol. I. Princeton University Press, Princeton, 856 pp.
- Greenberg, B., 1973. Flies and diseases. In: *Biology and Diseases Transmission*, vol. II. Princeton University Press, Princeton, 845 pp.
- Greenberg, B., 1988. *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) collected in North America and notes on *Chrysomya* species present in the New World. *J. Med. Entomol.* 25, 199–200.
- Guimarães, J.H., Prado, A.P., Linhares, A.X., 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22, 53–60.
- Liu, S.Q., Shi, J.J., Cao, H., Jia, F.B., Liu, X.Q., Shi, G.L., 2000. Survey of pesticidal component in plant. In: Benjing, L. (Ed.), *Entomology in China in 21st Century*. Science & Technique Press, China.
- Mathew, N., Anitha, M.G., Bala, T.S.L., Sivakumar, S.M., Narmadha, R., Kalyanasundaram, M., 2009. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nyctanthes arbor-tristis* and *Clitoria ternatea* against three mosquito vector species. *Parasitol. Res.* 104, 1017–1025.
- Miyazawa, M., Ishikawa, Y., Kasahara, H., Yamanaka, J., Kameoka, H., 1994. An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia jarvisii*. *Phytochemistry* 35, 611–613.
- Monteiro, R., Pinheiro, C.U.B., 2007. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Rev. Biol. Ciên. Terra* 7, 38–48.
- Queiroz, M.M.C., Milward-de-Azevedo, E.M.V., 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool.* 8, 75–84.
- Queiroz, M.M.C., Norberg, N.A., Maure, E.A.P., Toledo, R.F., Gazeta, G.S., Dutra, A.E.A., Rodrigues-Guimarães, R., 1999. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. *Anais do XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia, México*, 102 pp.
- Santos, M.J.P., Borja, G.E.M., 1997. Estudo comparativo do Desenvolvimento Pós-embriônico de *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Fanniidae) em Diferentes Substratos. *Arq. Biol. Tecnol.* 40, 253–261.
- Sobrinho, D.C., Hauptli, M.B., Appolinário, E.V., Kollenz, C.L.M., Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., 1991. Triterpenoids isolated from *Paruhancornia amapa*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2, 15–20.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1979. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 188 pp.
- Vinson, S.B., Iwantsch, G.F., 1980. Host suitability for insect parasitoids. *Ann. Rev. Entomol.* 25, 397–419.
- Von Zuben, C.J., 1998. Comportamento de Oviposturas Individuais, Percentagem de Ecloração e Peso Larval Mínimo para Pupação em Populações de *Chrysomya megacephala* (F.). *Ann. Entomol. Soc. Bras.* 27, 525–533.
- Wells, J.D., 1991. *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) has reached the continental United States: review of its biology, pest status and spread around the world. *J. Med. Entomol.* 28, 471–473.

CAPÍTULO V

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *OURATEA MICRODONTA* (OCHNACEAE)

V.1 Revisão de literatura

A família *Ochnaceae* compreende 27 gêneros e cerca de 600 espécies, com distribuição pantropical (AMARAL, 1991 apud SALVADOR *et al.*, 2010). No Brasil foram catalogados cerca de 13 gêneros e aproximadamente 120 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). As plantas desta família são essencialmente arbóreas ou arbustivas, menos frequentemente herbáceas (*Sauvagesia*). Além disso, a família *Ochnaceae* é caracterizada por apresentar folhas simples, alternas, com estípulas; flores pentâmeras, dialipétalas, dialissépalas, andróginas, hipóginas; pedicelos articulados; anteras poricidas ou rimosas, estaminódios presentes ou não; gineceu sincárpico; sementes com ou sem albume (SOUZA & LORENZI, 2005).

O gênero *Ouratea* é o maior da família com cerca de 120 espécies presentes em todo o continente americano (região neotropical) (SASTRE, 1988). Segundo Barroso (1991), no Brasil as espécies espalhadas recebem designações específicas como “angelim” (*Ouratea vaccinoides*), “caju bravo” (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia*), “coração de bugre” (*Ouratea parviflora*) e no Nordeste, “batiputá”. Algumas são empregadas na ornamentação urbana, *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefoli*.

Os estudos sobre isolamento e purificação de metabólitos especiais de espécies de *Ochnaceae* conduziram, até o momento, a identificação e elucidação de flavonóides e biflavonóides (MOREIRA *et al.*, 1994, MBING *et al.*, 2003a, 2003b, SUZART *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008), sendo em sua maioria relacionados a estudos de espécies dos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*. A variedade de estruturas de biflavonóides e flavonóides encontradas com frequência em espécies destes gêneros, possibilita a utilização destes compostos como marcadores quimiotaxonômicos destas espécies (TIH *et al.*, 1989 e 1992; LIKHITWITAYAWUID 2001; MESSANGA *et al.*, 2002; MBING *et al.*, 2006).

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de

outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros. Raramente ocorre alteração no padrão de oxigenação dos precursores, sendo garantida a oxigenação em 5, 7 e 4' e raramente uma oxidação adicional em 3'. Podem ocorrer oxidações nas posições 6, 8 ou 3' e quando isso acontece é, certamente, proveniente da outra unidade ligada nessa posição via C-O-C (SUZART *et al.*, 2007). A tabela 7 (páginas 64 e 65) contém uma relação de alguns flavonóides encontrados em espécies de *Ouratea* e as suas estruturas estão representadas na Figura 31 (páginas 66 a 69). Estas observações permitem perceber que os flavonóides constituem a principal classe de metabólitos do gênero *Ouratea*.

Dando continuação ao estudo fitoquímico de espécies deste gênero realizamos neste trabalho o primeiro estudo de *Ouratea microdonta* e incorporamos a este estudo outra contribuição ao conhecimento da Química de Ochnaceae, o trabalho realizado com a espécie, *Salvagesia erecta*, cuja química ainda é pouco conhecida.

Tabela 7. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea*.

Substâncias químicas isoladas	Espécies	Referências
proantocianidina (1)	<i>Ouratea</i> sp.	MARCAL <i>et al.</i> , 1988
catequina (2)	<i>Ouratea</i> sp.	MARCAL <i>et al.</i> , 1988
cianidina (3)	<i>O. affinis</i> , <i>O. calantha</i>	GARTLAN <i>et al.</i> , 1980, GARTLAN <i>et al.</i> , 1980
hexaspermona A (4)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
hexaspermona B (5)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
hexaspermona C (6)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
5,7,4'-trimetoxiisoflavona (7)	<i>O. hexasperma</i> , <i>O. castaneifolia</i> ,	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994, NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2009.
6,6''- bigenkanina (8)	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
7,7''-O-dimetilgastiflavona (9)	<i>O. spectabilis</i> , <i>O. parviflora</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995, FELICIO <i>et al.</i> , 2004
7''-O-metilgathisflavona (10)	<i>O. hexasperma</i> , <i>O. microdonta</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1999, DANIEL <i>et al.</i> , 2005, CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
amentoflavona (11)	<i>O. aquatica</i> , <i>O. castaneifolia</i> , <i>O. cuspidata</i> , <i>O. microdonta</i> , <i>O. multiflora</i> , <i>O. parviflora</i> , <i>O</i> <i>semiserrata</i> , <i>O. staudtii</i> , <i>O.</i> <i>sulcata</i> , <i>Ouratea ferruginea</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967, VELANDIA <i>et al.</i> , 2002, FELICIO <i>et al.</i> , 2004, e 2001 PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005, LIMA <i>et al.</i> , 2006, SUZART <i>et al.</i> , 2007, CARVALHO <i>et</i> <i>al.</i> , 2008, NASCIMENTO <i>et</i> <i>al.</i> , 2009, FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
3-OH-4',5,7-OMe-flavona (6→8'')-3''-OH-3''',4''',5'',7''- OMe-flavona (12)	<i>O. multiflora</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967,
3',6,8-Cl-4',5-OH-7-O-Me- isoflavona (13)	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
3',5',6,8-Cl-4',5-OH-7-O-Me- isoflavona (14)	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5,7-OH-flavona-(4'→O→8'')- 4''',5'',7''-OH-flavona (15)	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5-OH-7-O-Me-flavona- (4'→O→8'')-4''',5'',7''-OH- flavona (16)	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5-OH-7-O-Me-flavona- (4'→O→8'')-5'',7''-OH-4'''-O- Me-flavona (17)	<i>O. semiserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
podocarpusflavona A (18)	<i>O. semiserrata</i> , <i>O. staudtii</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002, ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
rutina (19)	<i>O. semiserrata</i> , <i>O. hexasperma</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002, SUZART <i>et al.</i> , 2007
swertisina (20)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007 SUZART <i>et al.</i> , 2012
swertiajaponina (21)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007 SUZART <i>et al.</i> , 2012
3,4',5-triidroxi-6-ã,ã dimetil-alil-7- O-β-D- glicosil-flavanona (22)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007
3,4',5-triidroxi-6-ã,ã dimetil-alil-7- O-β-D-glicopiranosil-flavona (23)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007
putraflavona (24)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007
5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi- flavona (25)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007

Tabela 7. (continuação)

Substâncias químicas isoladas	Espécies	Referências
vitexina (26)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007 SUZART <i>et al.</i> , 2012
orientina (27)	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007 SUZART <i>et al.</i> , 2012
calodenina B (28)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
flavumona A (29)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
flavumona B (30)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
calodenina C (31)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
lophirona A (32)	<i>O. flava</i> , <i>O. Sulcata</i> , <i>O. staudtii</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003b, PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005, ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
4',5-OMe-6,7-metilenodioxo- isoflavona (33)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
7,7''-O-dimetillanaraflavona (34)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> , 2005
agastiflavona (35)	<i>O. hexasperma</i> ,, <i>O. nigroviolacea</i> , <i>O. staudtii</i> , <i>O. microdonta</i> .	DANIEL <i>et al.</i> , 2005, MBING <i>et al.</i> , 2006, ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007, CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
6-C-glicopiranosil-luteolina (36)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> , 2005
3-O-glicopiranosil-quercetina (37)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> , 2005
8-C-β-D-glicopiranosil 2''-O-β-D- glicopiranosil-luteolina (38)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> , 2005
3,4',5,7-tetraidroxi-3'-metoxi- flavonol (39)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007
5,4',7-triidroxi-3-metoxi-3-β-O- galactopiranosil-flavona (40)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> , 2007
bilobetina (41)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
5,4'-diidroxi-7,3',5'- trimetoxiflavona (42)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2009
7,7''-O-dimetil-amentoflavona (43)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2009
heveaflavona (44)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2009
tetrametilamentoflavona (45)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2009
ouratina A (46)	<i>O. nigroviolacea</i>	MBING <i>et al.</i> , 2006
ouratina B (47)	<i>O. nigroviolacea</i>	MBING <i>et al.</i> , 2006
sulcatona A (48)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
3-hidroxi-2,3-diidroapigenil- (4'→O→3')-diidrocampferol (49)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
lophirona G (50)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003b
epicatequina (51)	<i>O. hexasperma</i> , <i>O. ferruginea</i>	DANIEL <i>et al.</i> , 2005, FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
7-O-metilamentoflavona (52)	<i>O. ferruginea</i>	FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
5,4'-diidroxi-7,5',3'- trimetoxiisoflavona (53)	<i>O. ferruginea</i>	FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
5,4'-diidroxi-7,3'- dimetoxiisoflavona (54)	<i>O. ferruginea</i>	FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
5,7,4'-triidroxi-3',5'- dimetoxiisoflavona (55)	<i>O. ferruginea</i>	FIDELIS <i>et al.</i> , 2012
5-hidroxi-7,5',4',3'- tretametoxiisoflavona (56)	<i>O. ferruginea</i>	FIDELIS <i>et al.</i> , 2012

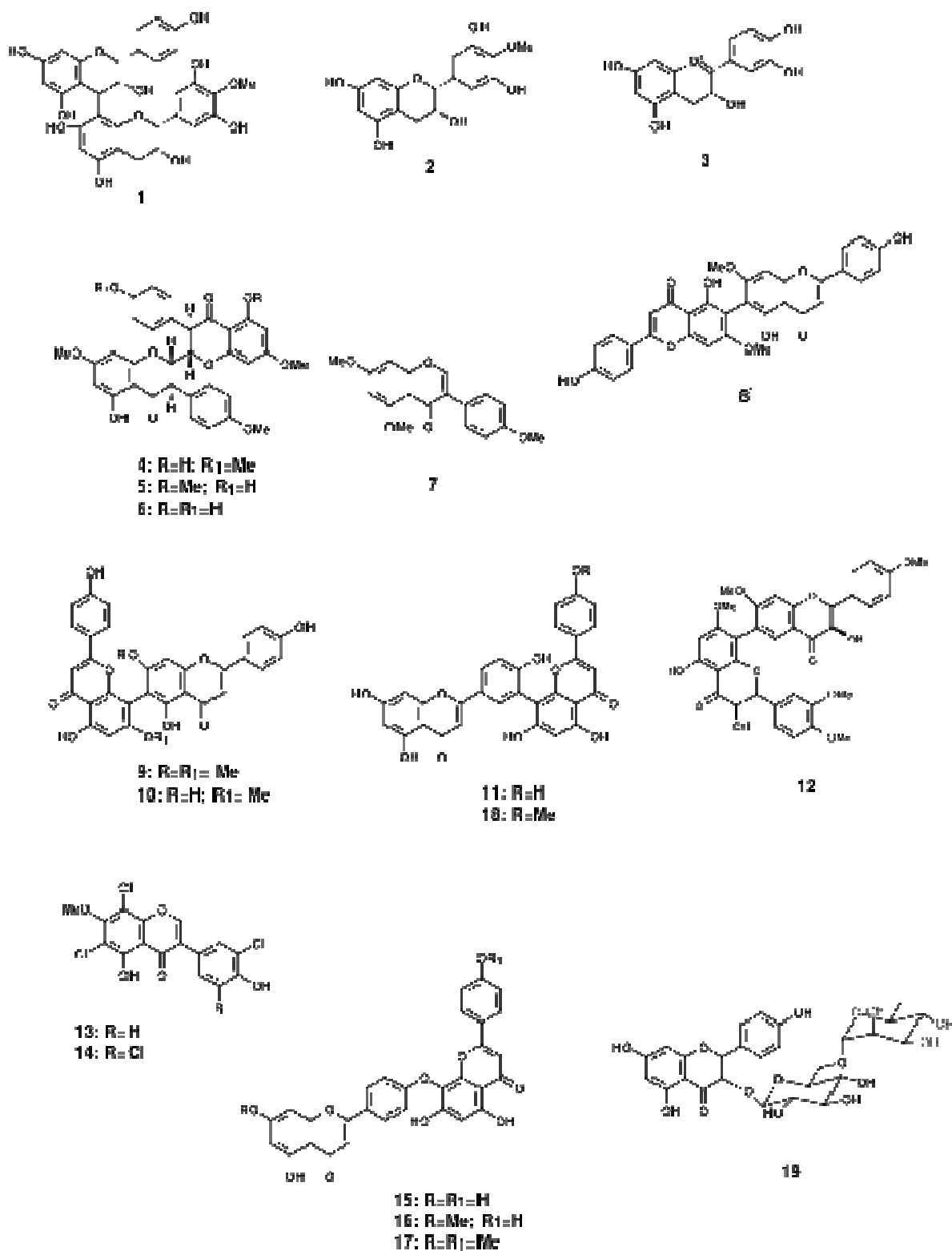


Figura 31. Estruturas de flavonóides encontradas em espécies de *Ouratea*.
(Fonte: Suzart, 2007)

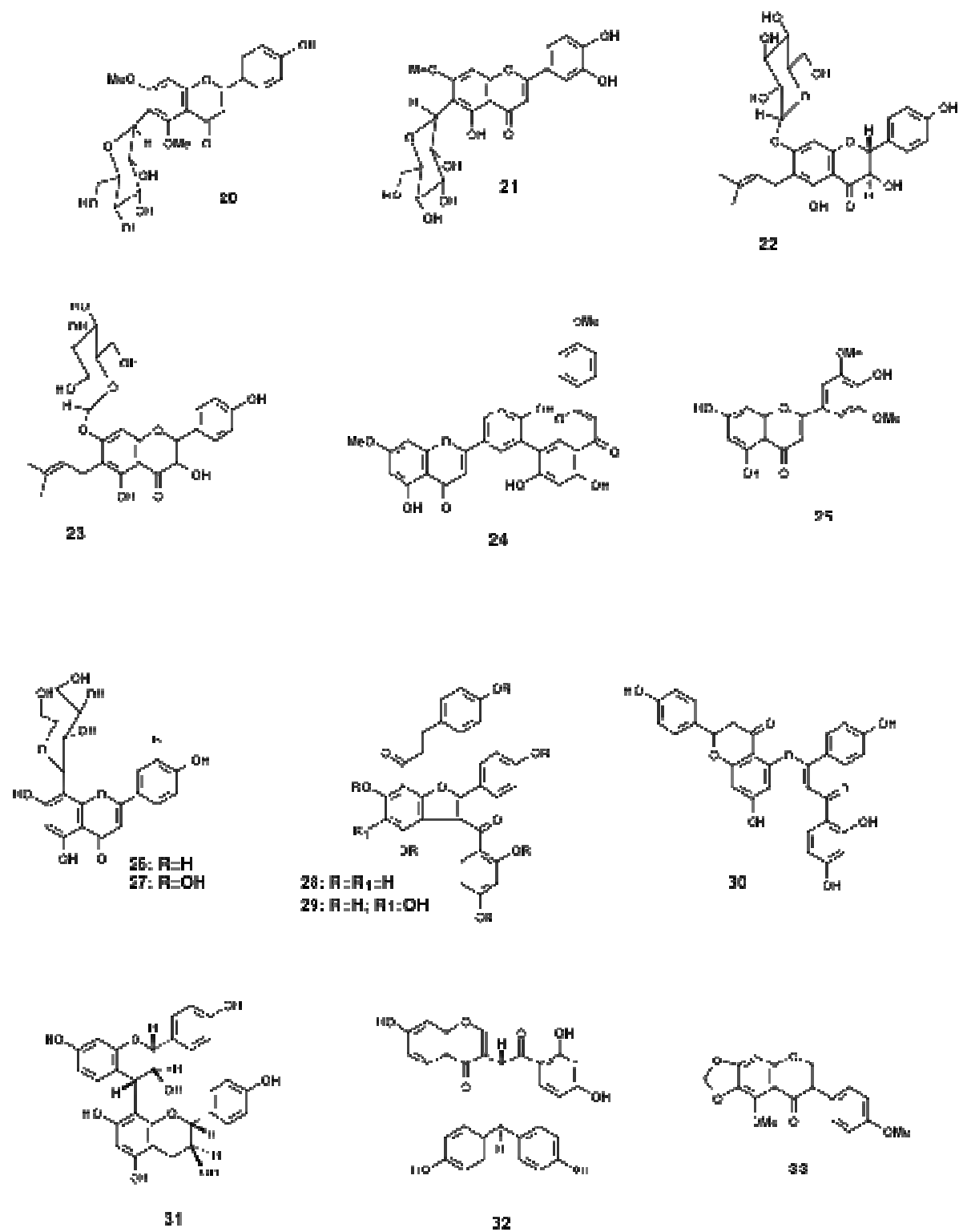


Figura 31. (continuação)
 (Fonte: Suzart, 2007)

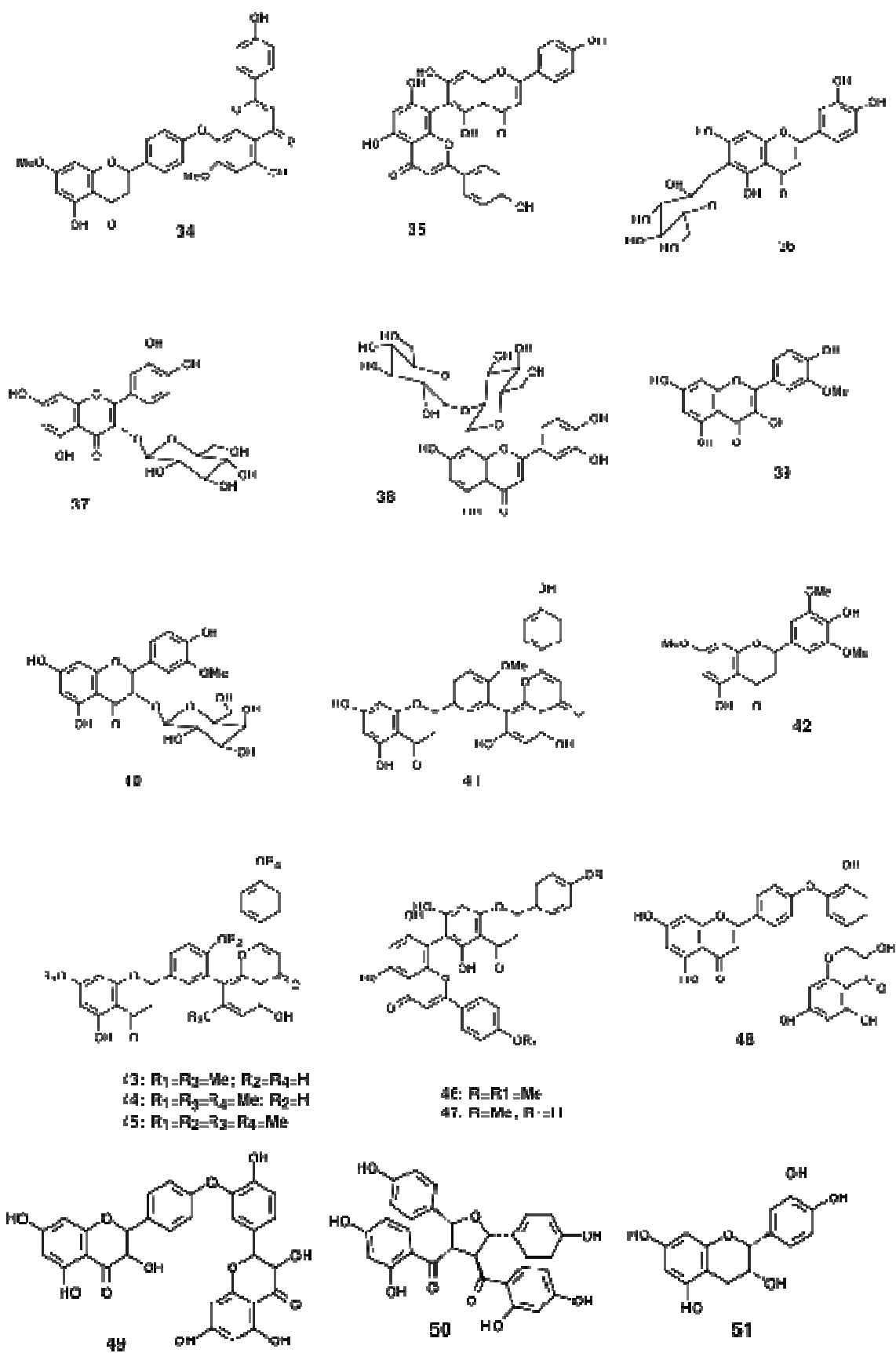


Figura 31. (continuação)
(Fonte: Suzart, 2007)

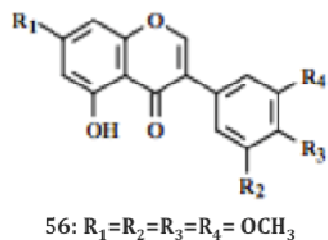
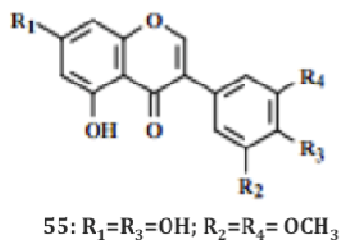
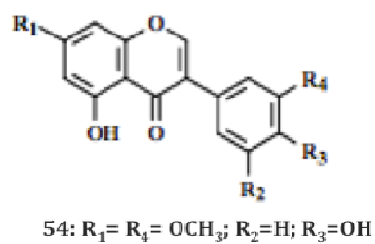
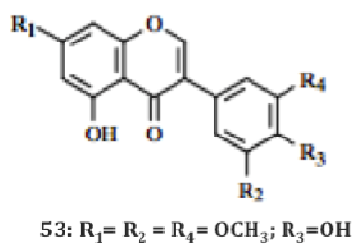
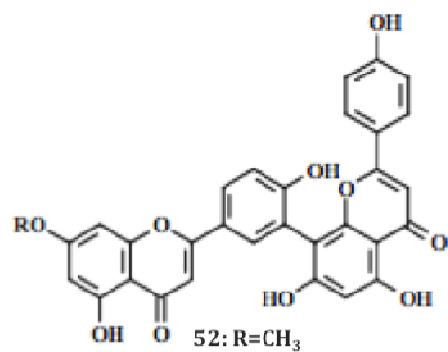


Figura 31. (continuação)
(Fonte: Fidelis *et al.*, 2012)

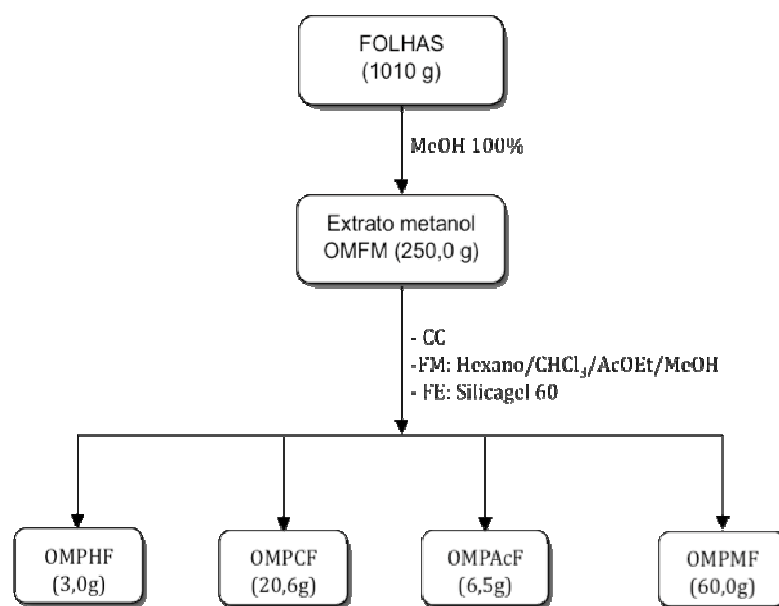
V.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Ouratea microdonta*

Este estudo conduziu ao primeiro trabalho publicado sobre composição química desta espécie vegetal. (ver anexo C no final deste capítulo, página 121)

V.2.1 Isolamento e Purificação dos Constituintes químicos das folhas de *O. microdonta*

O material para estudo foi coletado por Silvana Tavares Rodrigues, no município de Soure (na ilha de Marajó), Pará, Brasil e sua exsicata IAN (n° 180452) encontra-se depositada no Herbário da Embrapa Amazônica Oriental no estado do Pará-Brasil.

Folhas secas e moídas (1010,0g) foram submetidas à extração por maceração dinâmica com metanol. A remoção do solvente (metanol) foi feita através da destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40 °C, obtendo-se 250 g de um resíduo seco denominado **Ouratea Microdonta Folha Metanol (OMFM)** que foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com sílica gel flash (230 - 400 mesh), utilizando-se como eluentes os solventes; hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em sistema isocrático de eluição. A partir desse fracionamento, representado no esquema 5 (página 71), foram obtidas as seguintes partições do extrato metanólico das folhas (**OMFM**); **Ouratea Microdonta Partição Hexano Folha, OMPHF** (3,0 g), **Ouratea Microdonta Partição Clorofórmio Folha (OMPCF**, 20,6 g), **Ouratea Microdonta Partição Acetato de etila Folha, OMPAcF** (6,5 g) e **Ouratea Microdonta Partição Metanol Folha, OMPMF** (60,0 g).



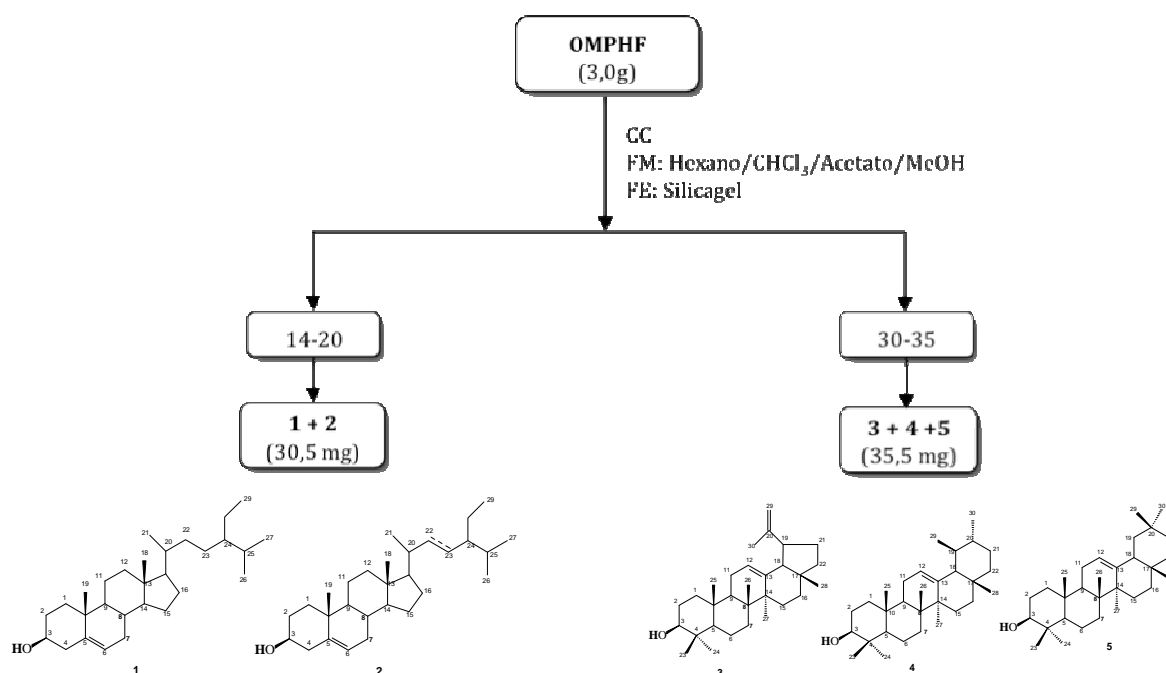
Esquema 5. Fracionamento do extrato metanol das Folha de *Ouratea microdonta*.

V.2.1.1 Processamento da partição OMPHF

A partição **OMPHE** (3,0 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade, originando 50 frações de 100 mL, que após análise realizada por CCDA e revelação com vanilina sulfúrica foram reunidas em novas subfrações.

A subfração 14-20 (30,5 mg) forneceu um sólido branco, solúvel em clorofórmio. A comparação por CCDA da mistura com amostras puras das substâncias isoladas anteriormente e a análise dos dados do espectro de RMN ^1H foi suficiente para definir a mistura como sendo composta pelos triterpenos sitosterol (**1**) e estigmaterol (**2**). Da subfração 30-35 (35,5 mg) foi obtido um precipitado branco definido como uma mistura dos triterpenos lupeol (**3**), α -amirina (**4**) e β -amirina (**5**). As estruturas dos triterpenos existentes na mistura foram identificadas através da comparação dos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura com dados da literatura (SOBRINHO *et al.*, 1991).

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da partição **OMPHE** é mostrado no esquema 6 (página 72).



Esquema 6. Fracionamento da partição **OMPHF** das folhas de *Ouratea microdonta*.

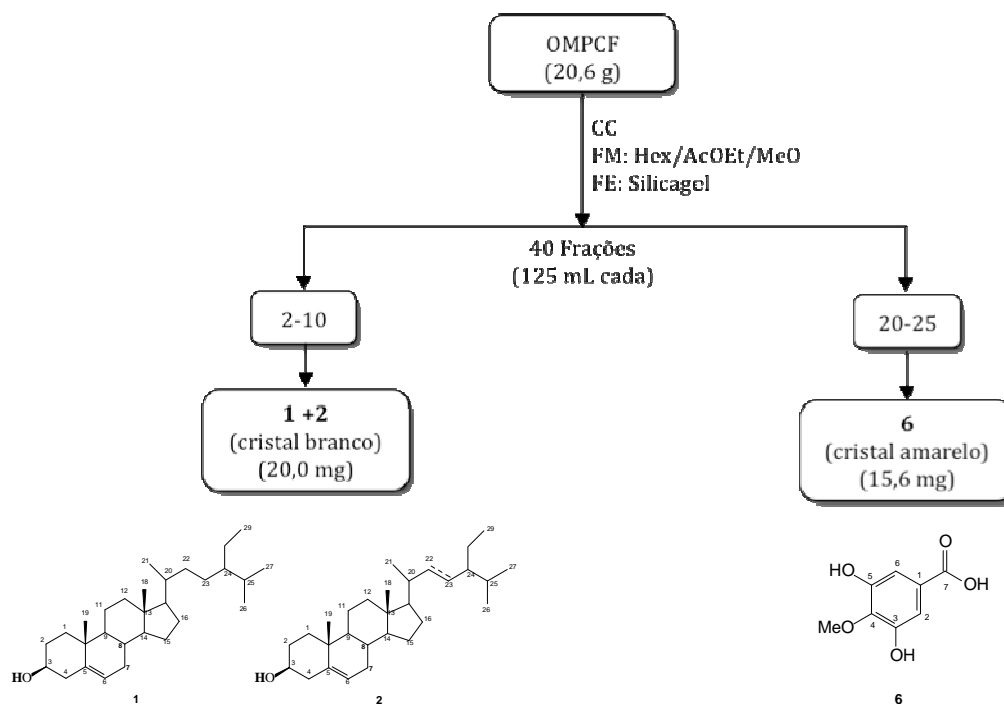
V.2.1.2 Processamento da fração **OMPCF**

A partição **OMPCF** (20,6 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com mistura dos solventes hexano, acetato de etila, metanol em gradiente de polaridades crescentes até metanol 100%, originando 40 frações de 125 mL. Os agrupamentos das frações após análise por CCDA originou novas subfrações.

A subfração 2-10 (20,0 mg) apresentou um cristal incolor em formato de pequenas agulhas, que após sua comparação por CCDA com a mistura dos triterpenos sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**) presente na subfração **OMPHF 14-20**, foi identificado como sendo novamente os triterpenos sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**).

A subfração 20-25 (15,6 mg) forneceu um sólido amarelo com formato de pequenas agulhas, solúvel em clorofórmio (CHCl₃) e com ponto de fusão (pf. 242-244 °C). Após análises por RMN de ¹H e ¹³C e comparação com os dados da literatura (SAXENA *et al.*, 1994) e CG-EM foi possível a sua identificação como sendo o ácido 3,5-diidroxí-4-

metoxibenzoico (**6**). Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da partição **OMPCF** está descrito no esquema 7 (página 73).



Esquema 7. Fracionamento da partição **OMPCF** das folhas de *Ouratea microdonta*.

V.2.1.3 Processamento da fração **OMPAcF**

A partição **OMPAcF** (6,5 g) foi fracionado por cromatografia em uma coluna de sílica gel do tipo flash (sílica gel 230-400 mesh), eluída inicialmente com uma mistura de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (7:3) até MeOH (100%); originando 40 frações de 125 mL cada, que após serem analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram reagrupadas em outras subfrações. As subfrações (7-10, 13-21, 25-35 e 36-40) foram reveladas com solução de $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (1%), indicando a presença de flavonóides.

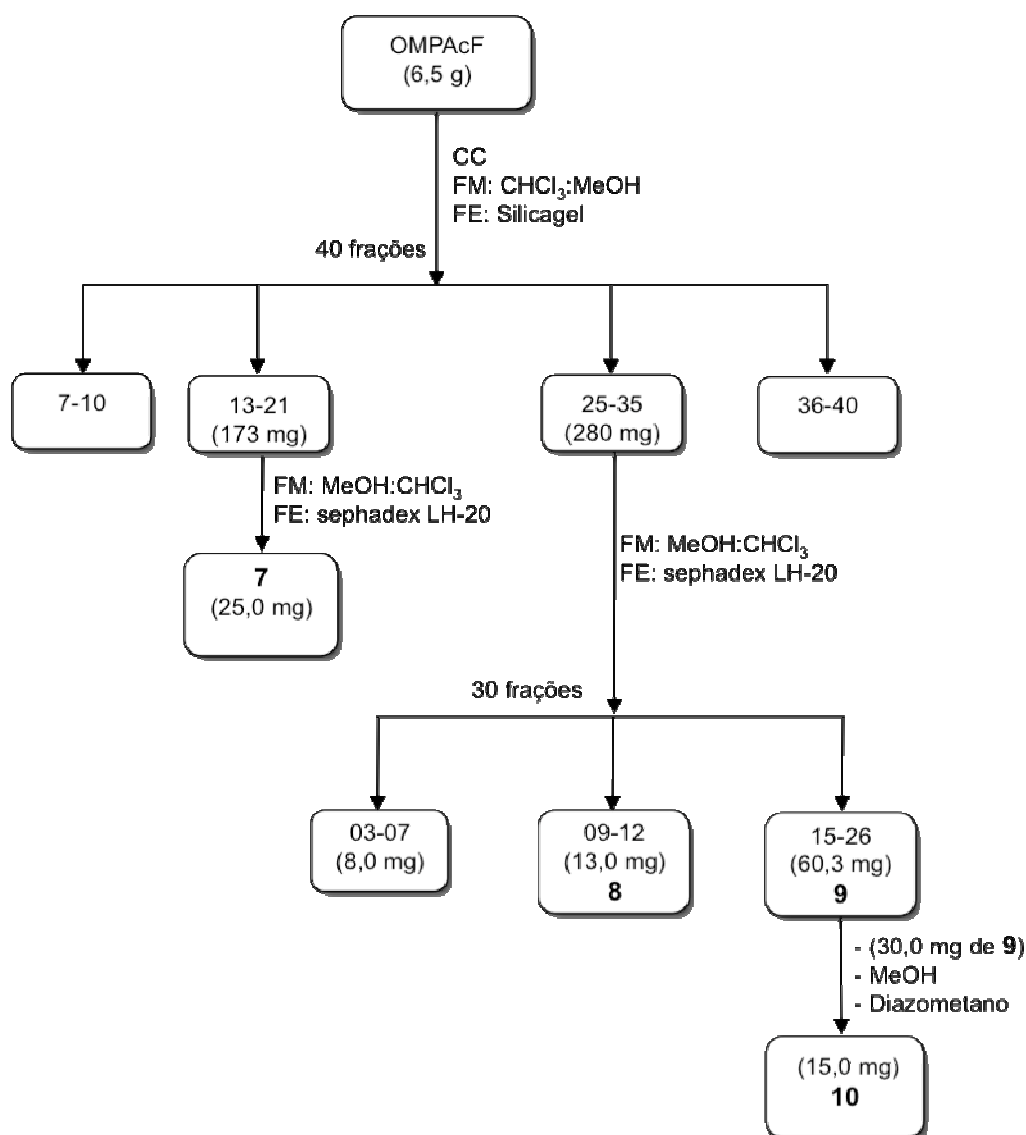
A subfração 13-21 (precipitado amarelo, 173,0 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 utilizando como eluente uma mistura de solventes metanol/clorofórmio (9:1), originando um precipitado amarelo, que após análises por espectroscopia de IV, RMN

^1H e ^{13}C (BBD e DPTQ) e HMQC foi identificado como o biflavonóide amentoflavona (**7**) (25,0 mg) (SUZART *et al.*, 2007; VELANDIA *et al.*, 2002).

A subfração 25-35 (280,0 mg) foi filtrada em uma coluna com Sephadex LH-20, e forneceu 30 frações de 50 mL cada, as frações de 03-07 (8,0 mg), 09-12 (13,0 mg), 15-26 (60,3 mg), foram reunidas após análise por CCDA e revelação com $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%). A evaporação do solvente da fração 09-12 resultou em um sólido amarelado, solúvel em metanol (MeOH) e ponto de fusão 225-227 °C. A análise deste sólido por infravermelho (IV), espectroscopia de RMN ^1H , comparação com um padrão por CCDA e com dados da literatura (DANIEL *et al.*, 2005) permitiu identificar o sólido como sendo o biflavonóide 7"-*O*-metilagatisflavona (**8**). A fração 15-26 (60,3 mg) forneceu um sólido amarelo que foi submetido a espectroscopia de RMN 1D e 2D, e infravermelho (IV), o que possibilitou a sua identificação como sendo o biflavonóide agatisflavona (**9**).

Uma alíquota da fração 15-26 (30,0 mg), ou seja da substância **9** (agatisflavona) foi solubilizada em MeOH e metilada com diazometano, fornecendo o derivado tetrametilagatisflavona (**10**, 15 mg, pf 170-175 °C). Esta estrutura foi definida pela análise do espectro de RMN ^1H e comparação dos dados da literatura (MOREIRA *et al.*, 1999).

A subfração 03-07, apesar de revelar a presença de flavonóides quando submetida a CCDA e revelação com solução de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%), não foi possível realizar a sua separação devido a pouca quantidade de material disponível (8,0 mg). No esquema 8 (página 75) pode-se visualizar melhor o processo resumido de isolamento dos compostos presentes na partição **OMPAcF**.

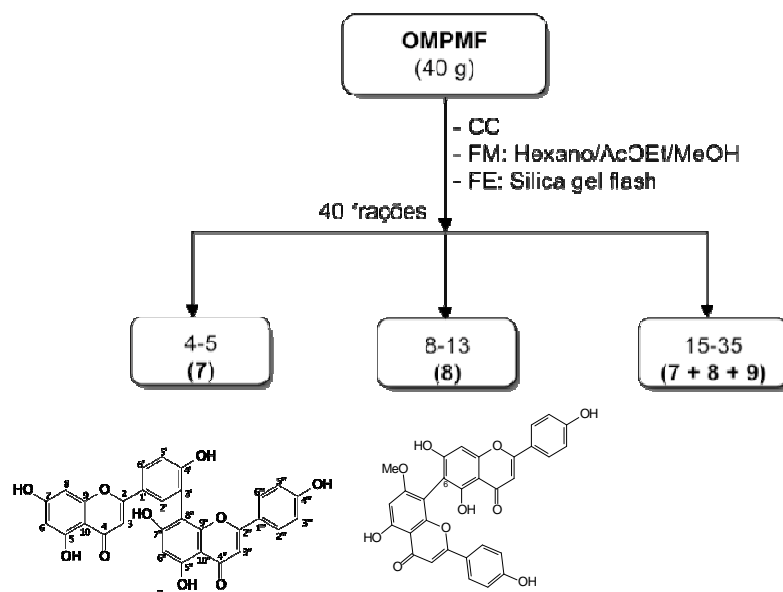


Esquema 8. Fracionamento da partição **OMPAcF** de *Ouratea microdonta*.

V.2.1.4 Processamento da fração **OMPMF**

Uma parte da partição **OMPMF** (40,0g) foi fracionado em uma coluna de sílica gel flash utilizando como eluente inicialmente uma mistura de Hexano/acetato de etila (1:1) até acetato de etila (100 %), depois a polaridade foi sendo aumentada adicionando-se metanol até metanol (100%). Desta coluna foram obtidas aproximadamente 40 frações de 200 mL (cada). As frações 4-5 foram comparadas por CCDA com a amentoflavona (**7**) confirmando novamente a presença desta substância. Nas frações de 8-13 foi identificado novamente o biflavonóide (**8**) (*7''-O*-metilagatisflavona). As demais frações foram comparadas por CCDA,

com os biflavonóides isolados das outras frações, o que permitiu identificar uma mistura dos biflavonóides (7, 8 e 9) com predominância da agatisflavona (9) nestas frações. O processamento resumido da partição **OMPMF** pode ser visualizado no esquema 9 (página 76).



Esquema 9. Fracionamento da partição **OMPMF** de *Ouratea microdonta*.

V.3 Constituintes Químicos Isolados de *Ouratea microdonta*

Estruturas das substâncias isoladas de *Ouratea microdonta* (Figura 32, página 77).

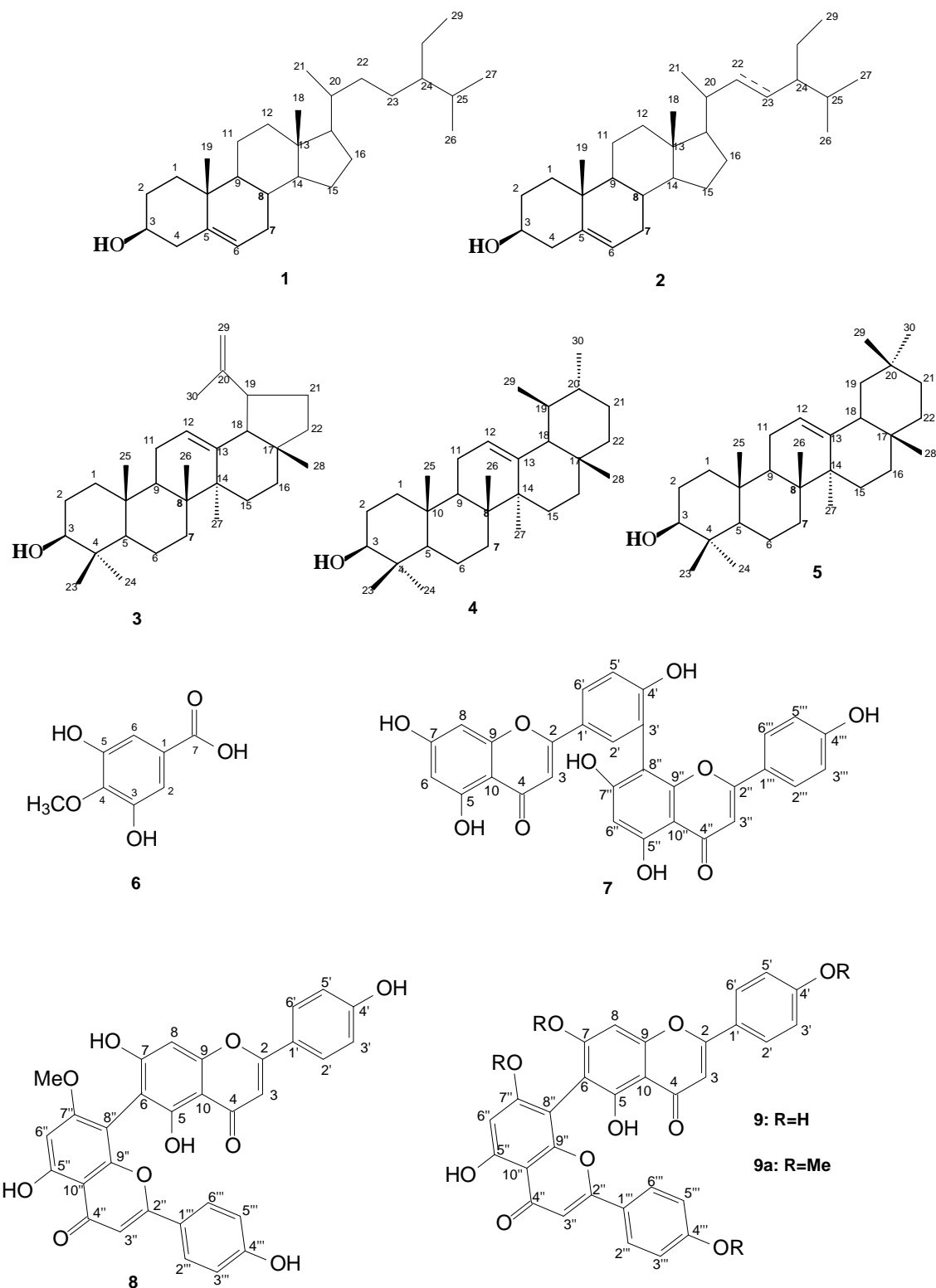


Figura 32. Constituintes isolados de *Ouratea microdonta*.

V.3.1 Determinação estrutural dos constituintes isolados de *Ouratea microdonta*

V.3.1.1 Identificação das substâncias **1** e **2** (sitosterol e estigmasterol).

A mistura das substâncias **1** e **2** (sitosterol e estigmasterol) foi identificada pela análise dos dados espectrais de RMN ^1H . O espectro de RMN ^1H (Figura 33, página 78) apresentou um sinal δ_{H} 5,37 característico dos hidrogênios olefínicos (sl, H-6, **1** e **2**). O sinal em δ_{H} 5,15 (m, H-22 e H-23) permitiu sugerir a presença do estigmasterol (**2**), o sinal em δ_{H} 3,50 foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3 (m, H-3, **1** e **2**), e os sinais δ_{H} 1,0 - 2,20 (m), 1,01 (s), 0,94 (d), 0,88-0,77 (m), 0,70 (s) permitiram identificar a mistura de **1** + **2**. Além disso, foi feita a comparação da mistura de **1** + **2** através de CCDA utilizando as substâncias isoladas de *Jatropha elliptica*, e de *Ouratea floribunda* (GOULART *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 2000) confirmando o observado no espectro de RMN ^1H (Figura 33, página 78).

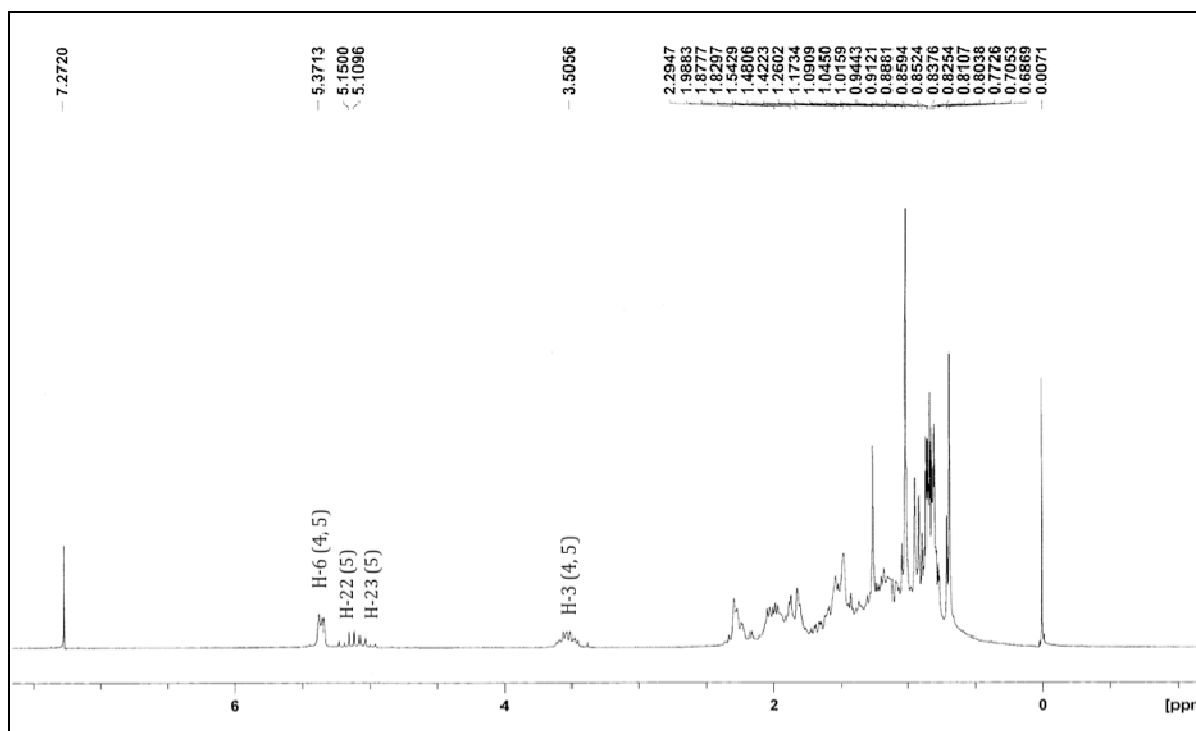


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**).

V.3.1.2 Identificação das substâncias 3, 4 e 5 (Lupeol, α -amirina, β -amirina).

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 34, página 81) da mistura dos triterpenos **3**, **4** e **5**. permitiu identificar os sinais de δ_{H} 5,15-5,20 (H-12, **4** e **5**). Os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos estão representados por dois singletos largos em δ_{H} 4,68 e 4,57 (sl, H-29a e H-29b, **3**), o sinal em δ_{H} 3,18 representa o hidrogênio do carbono metínico oxigenado (m, H-3, **3** + **4** + **5**), em δ_{H} 2,37 aparece um multipletto referente aos hidrogênios 18 e 19 (m, H-18 e H-19, **3** + **4** + **5**). O sinal δ_{H} 1,91 representado por um multipletto (m, H-11, **4** + **5**) e um singletto em δ_{H} 1,68 (s) correspondente à frequência da metila ligada a carbono sp^2 (s, H-30, **1**), finalmente os sinais das metilas em δ_{H} 1,26 e 1,14 à 0,76.

Para confirmação das substâncias presentes na mistura, foi realizada a comparação da mistura com o padrão de cada substância por CCDA. Além disso, os dados obtidos pela análise do espectro de RMN ^{13}C (Figuras 35 e 36, páginas 81 e 82) da mistura foram confrontados com dados da literatura (SOBRINHO *et al.*, 1991; AHMAT AND ATTA-UR-RAHMAN, 1994; CARVALHO *et al.*, 2000) para estas substâncias (Tabela 8, página 80) o que foi suficiente para confirmar a mistura de triterpenos **3**, **4** e **5** como sendo lupeol (**3**), α -amirina (**4**) e β -amirina (**5**).

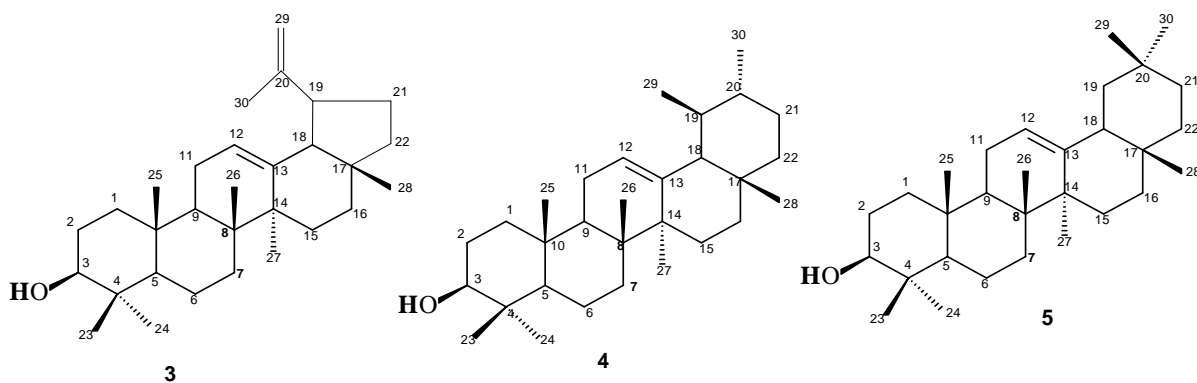


Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C dos triterpenos **3**, **4** e **5** (50 MHz, CDCl_3) comparados com a literatura (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2000).

C	δ_{C}			δ_{C} literatura		
	3	4	5	Lupeol	α -amirina	β -amirina
1	38,8/38,7			38,7	38,7	38,7
2	27,4			27,4	27,2	27,3
3	79,0			78,9	78,8	79,0
4	38,7/38,8			38,8	38,7	38,8
5	55,2/55,2			52,3	55,2	55,3
6	18,3/18,4			18,3	18,3	18,5
7	34,2	33,0	32,9	34,3	32,9	32,8
8	40,8	39,9	38,8	41,1	40,0	38,8
9	50,4	47,7	47,7	50,4	47,7	47,7
10	37,2/37,0/37,2			37,1	36,9	37,6
11	20,9	17,9	13,7	20,9	17,4	23,6
12	25,1	124,4	121,0	25,1	124,3	121,8
13	38,0	139,6	145,0	38,0	139,3	145,3
14	42,8	42,0		42,8	42,0	41,8
15	27,4	28,8	26,4	27,3	28,7	26,2
16	35,6	26,2	27,1	35,6	26,2	27,0
17	42,9	33,9	32,5	43,0	33,7	32,5
18	48,3	59,0	47,2	48,3	58,9	47,3
19	47,9	39,6	47,1	48	39,6	46,9
20	150,9	39,6	31,4	150,9	39,6	31,1
21	29,7	31,4	34,3	29,4	31,2	34,8
22	40,0	42,0	37,2	39,9	41,5	37,2
23	27,9	28,1		27,9	28,1	28,2
24	15,4/15,6			15,3	15,6	15,5
25	15,9	15,6/15,4		15,9	15,6	15,6
26	16,8/16,1/17,2			16,1	16,8	16,9
27	14,5	23,3	26	14,5	23,2	26,0
28	17,9	28,1	28,5	17,9	28,1	28,4
29	109,3	23,5	33,0	109,3	23,2	33,3
30	19,3	21,5	23,7	19,3	21,3	23,7

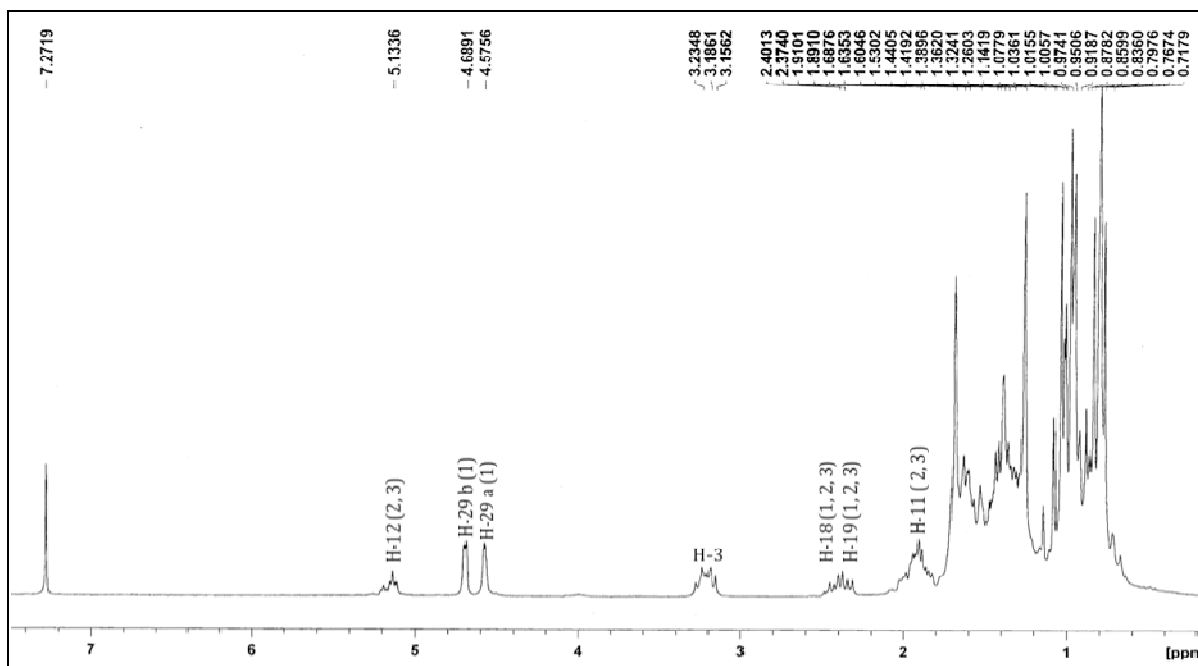


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) dos triterpenos Lupeol (3), α -amirina (4) e β -amirina (5).

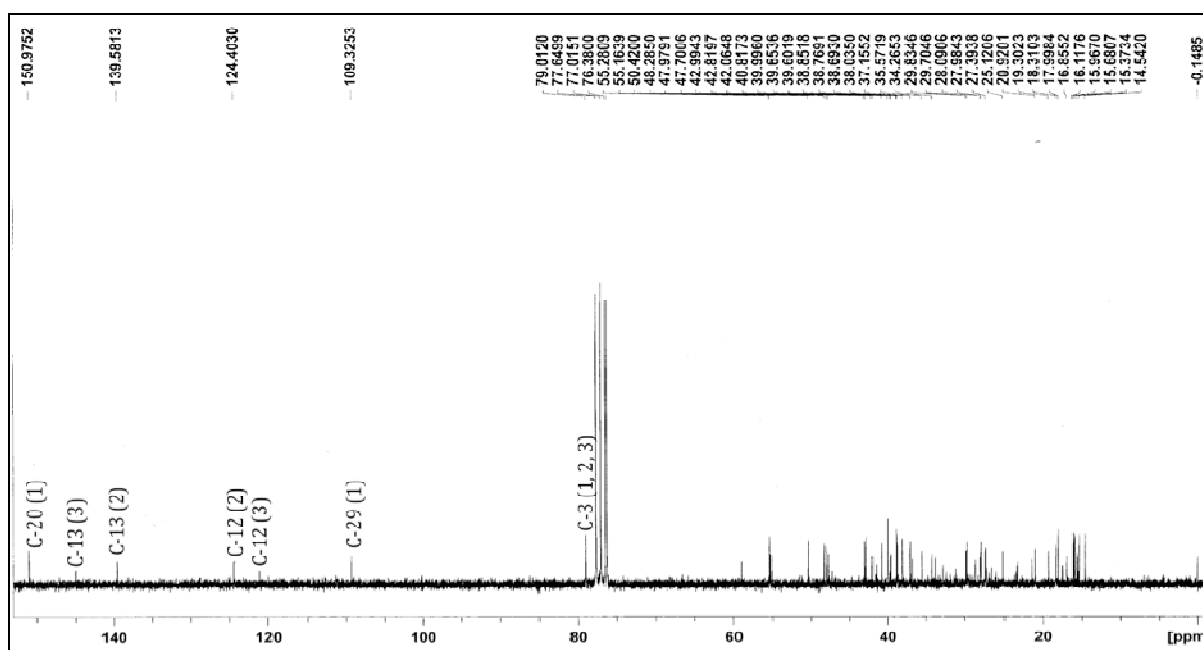


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) dos triterpenos Lupeol (3), α -amirina (4) e β -amirina (5).

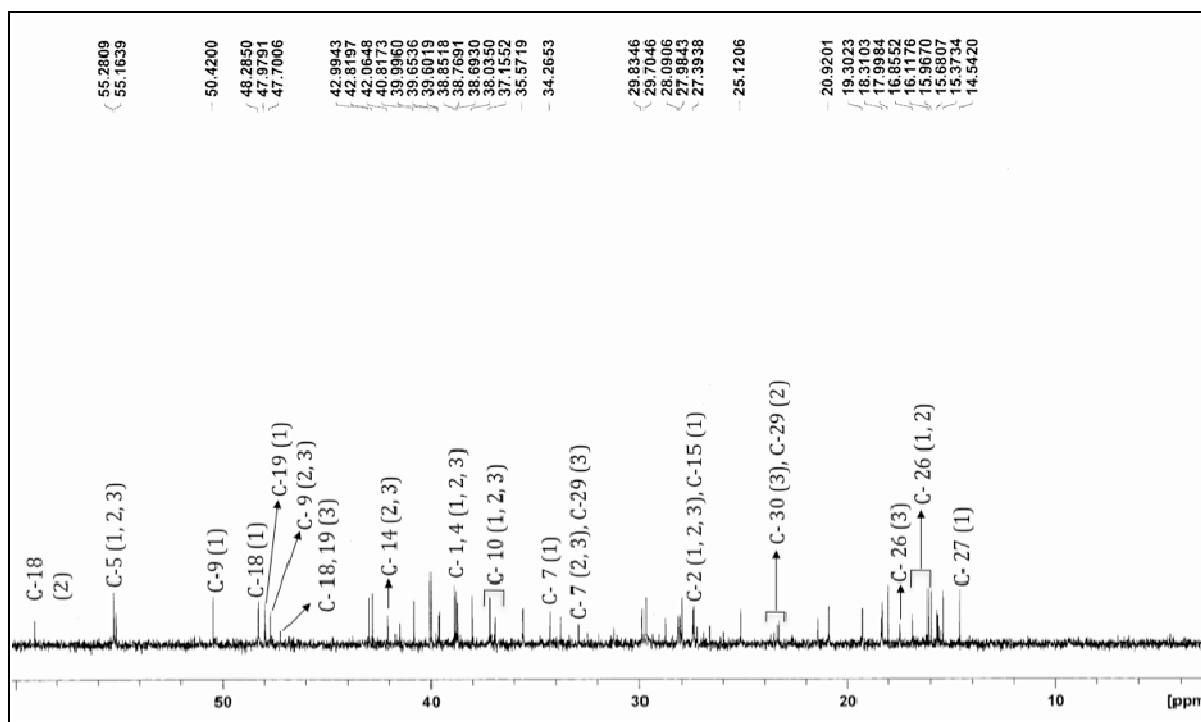
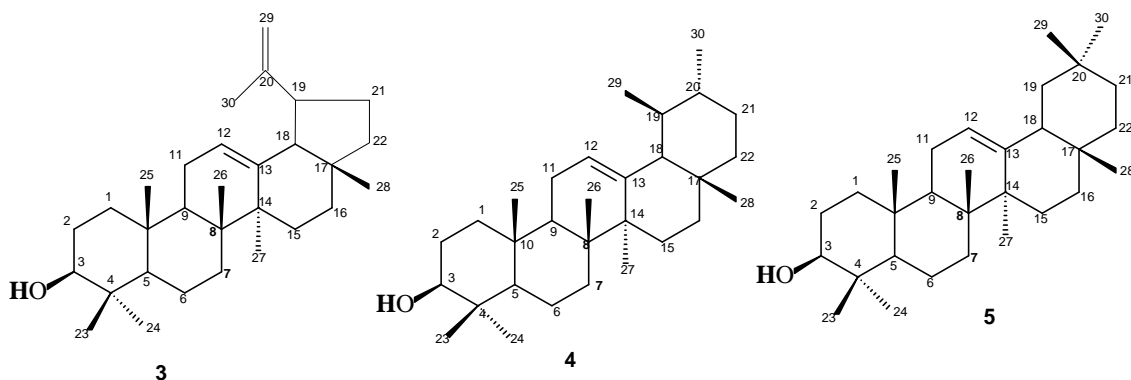


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) dos triterpenos Lupeol (3), α -amirina (4) e β -amirina (5).

V.3.1.3 Identificação da substância 6 (ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico)

A substância **6** foi isolada como um cristal amarelado com formato de pequenas agulhas, solúvel em CHCl_3 . O espectro de RMN ^{13}C da substância **6** (Figuras 37 e 38, página 84) mostrou sinais de δ_c 186,8 (CO_2H , C-7), 157,3 ($=\text{C-O}$ x 2, C-3 e C-5), 152,3 ($=\text{C-O}$, C-4), δ_{CH} 107,3 ($=\text{CH}$ x 2, C-2 e C-6) e δ_{CH_3} 56,7 ($\text{H}_3\text{C-O}$) compatíveis com ácido benzóico, contendo duas hidroxilas (OH) e um grupo metoxila (OCH_3). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (Figura 39, página 85) em δ_{H} 5,9 (s, 2H), 3,8 (s, 3H) e RMN ^{13}C foram comparados com a literatura (SAXENA *et al.*, 1994) (Tabela 9, página 85) e foi possível propor a estrutura do ácido 3,5-diidroxi-4-metoxibenzóico (**6**, pf. 242°C). As diferenças observadas nos deslocamentos químicos em relação a literatura são devidas a utilização de um solvente diferente na obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H (SCOTT, 1972; SAXENA *et al.*, 1994). A análise de uma alíquota da substância **6** no cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas forneceu o cromatograma e espectro de massas da substância **6** (tr = 5,35 min., m/z 169, M^+ , 100%) e os fragmentos m/z 153, 140, 125, 112, 97, 89 e 69 (Figura 40, página 86), cujos valores são compatíveis com a estrutura do ácido 3,5-diidroxi-4-metoxibenzóico. Uma proposta de fragmentação para esta substância encontra-se no esquema 10 (página 86).

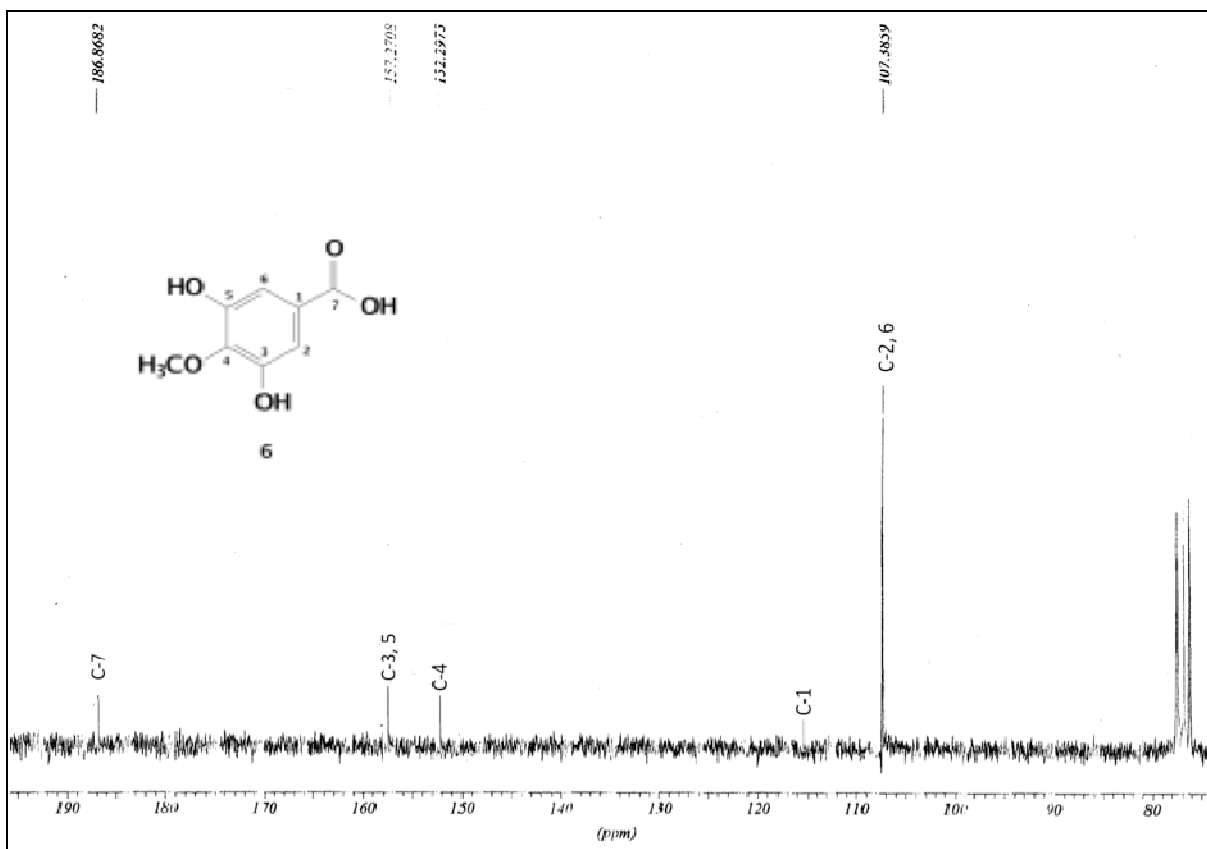


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico (6).

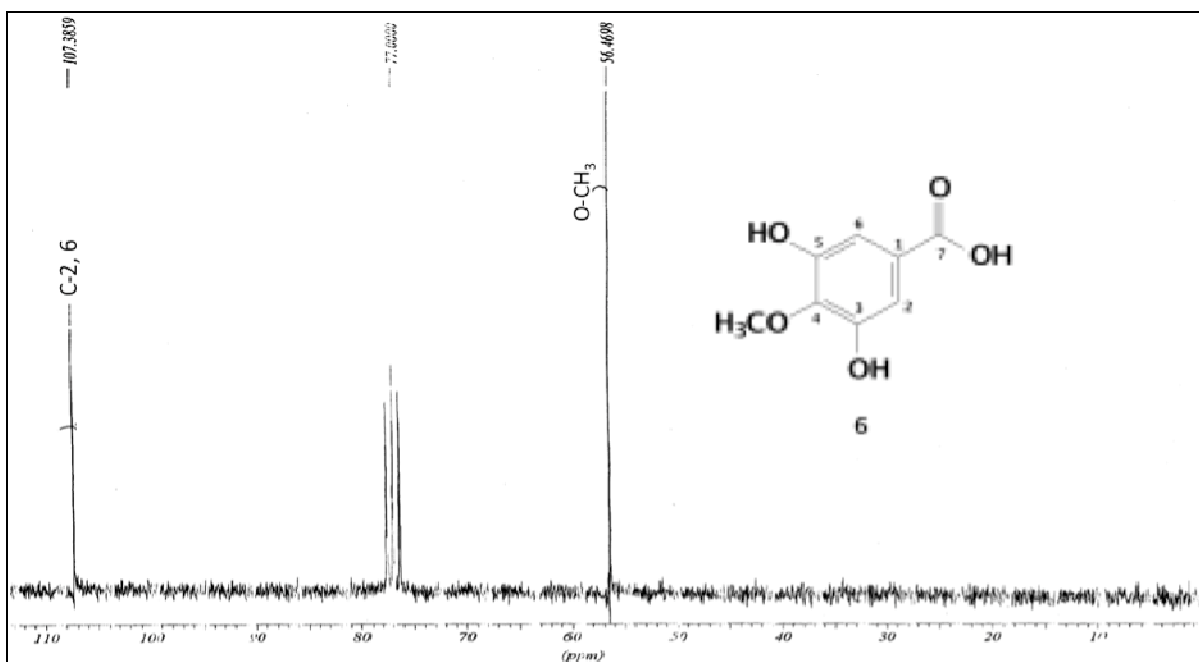


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico (6).

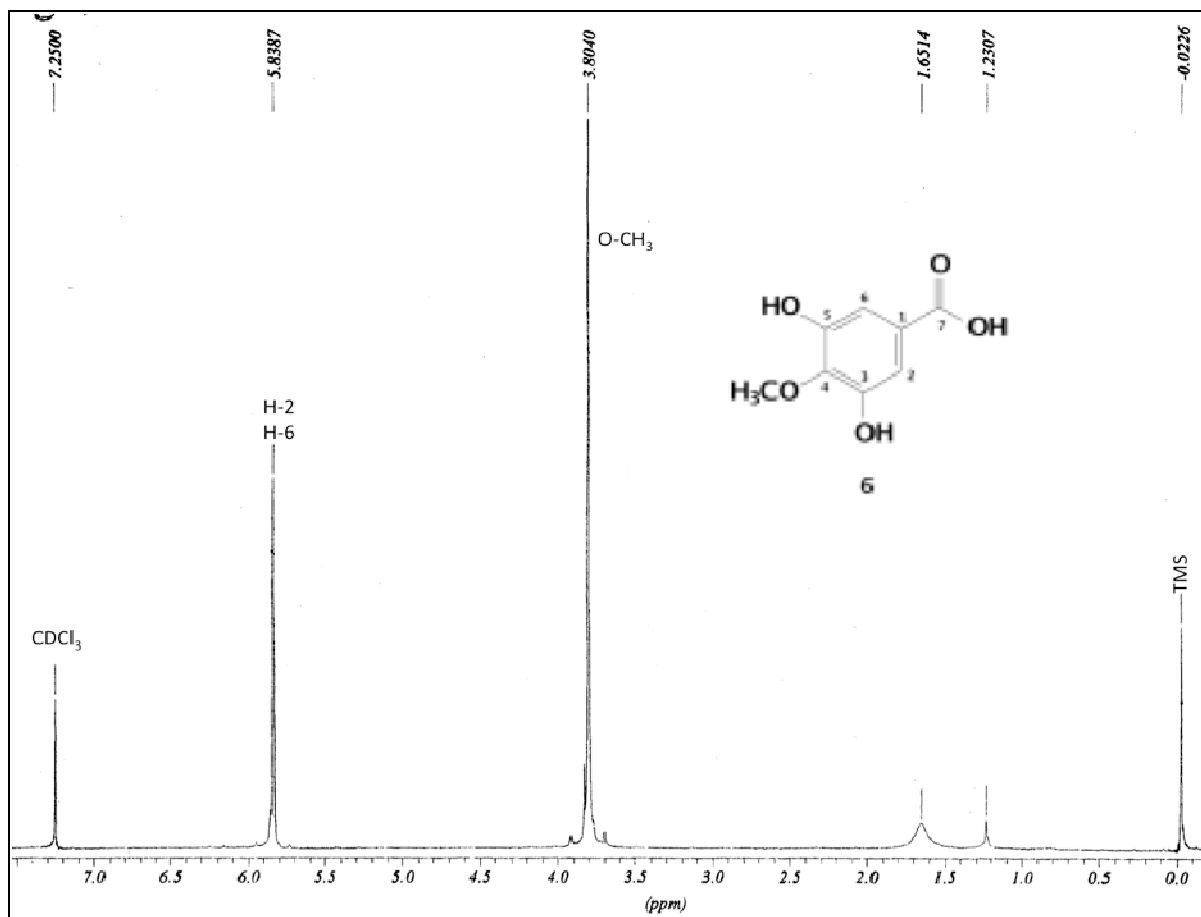


Figura 39. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico (6).

Tabela 9. Dados de RMN ¹³C e ¹H da substância **6** (ácido 3,5-dihidroxi-4-metoxibenzóico) comparados com a literatura (SAXENA *et al.*, 1994).

C	δ_C	δ_C (SAXENA <i>et al.</i> , 1994)	H	δ_H	δ_H (SAXENA <i>et al.</i> , 1994)
1	115,00	121,45	1	-	-
2	107,38	110,04	2	5,83 (s)	7,03 (s)
3	157,27	146,51	3	-	-
4	152,29	139,76	4	-	-
5	157,27	146,51	5	-	-
6	107,38	110,04	6	5,83 (s)	7,03 (s)
7	186,86	169,03		-	-
O-CH ₃	56,46	52,31	O-CH ₃	3,80 (s)	3,81 (s)

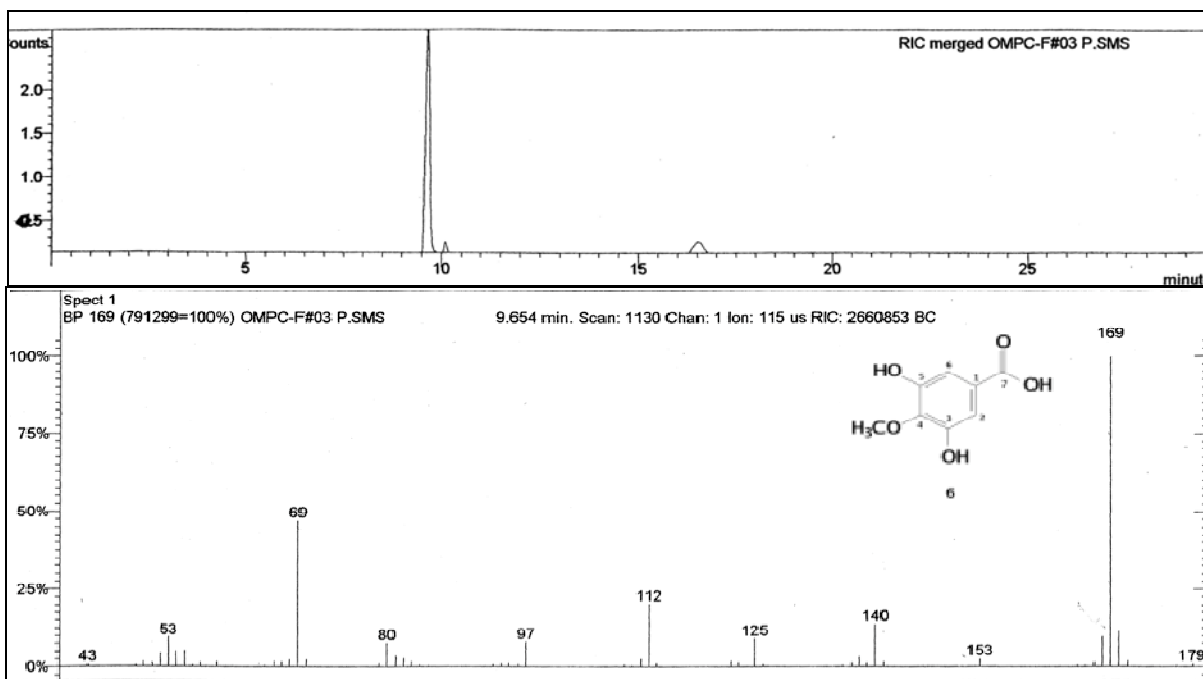
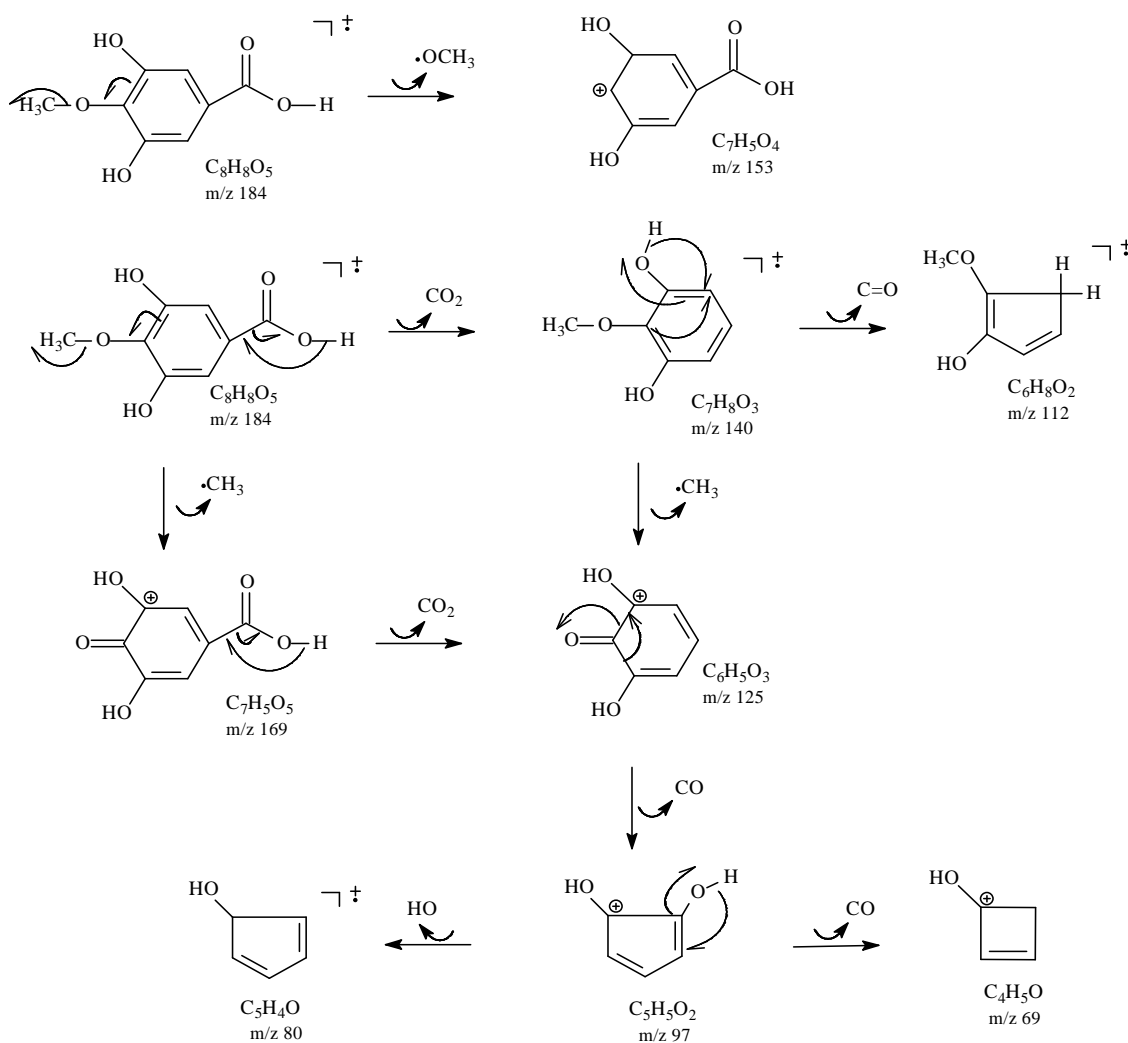


Figura 40. Cromatografia a gás (CG) e espectro de massas (EM) da substância **6**.



Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do composto com tr 9,65 min (substância **6**).

V.3.1.4 Identificação da substância 7 (amentoflavona)

O espectro de absorção na região do IV da substância 7 (Figura 41, página 87) apresentou bandas de absorção para grupo carbonila conjugada e quelada em 1655 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), estiramentos C=C ($\nu_{\text{C=C}}$) para anel aromático em 1609 cm^{-1} , 1499 cm^{-1} e 1425 cm^{-1} , hidroxila em $3172,8\text{ cm}^{-1}$ (estiramento O-H, $\nu_{\text{O-H}}$), confirmada pela presença do estiramento C-O em 1362 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$).

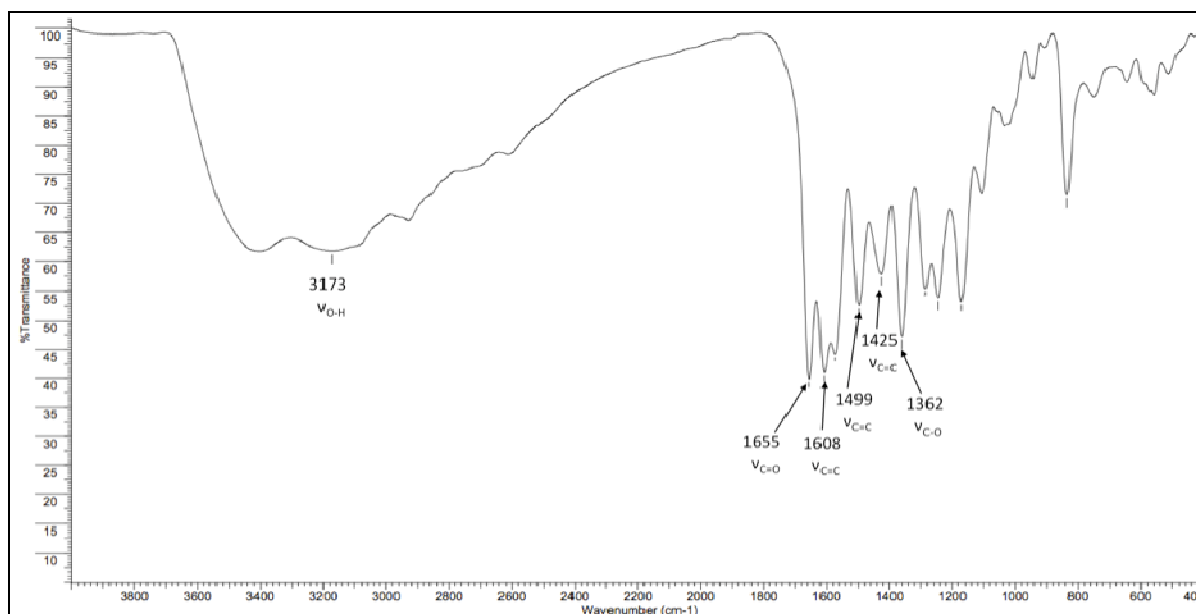


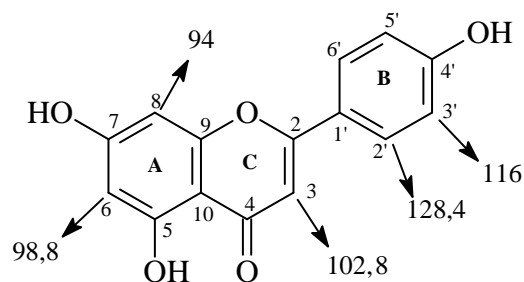
Figura 41. espectro de IV da substância 7 (amentoflavona) com pastilha de KBr.

A estrutura da substância 7 (amentoflavona) foi proposta após análise dos dados espectrais de RMN ^1H , DEPTQ, HMQC e comparação com a literatura (SUZART *et al.*, 2007; VELANDIA *et al.*, 2002). O espectro de RMN ^1H (Figuras 42 e 42.1, páginas 90 e 91) apresentou dois singletos (s) referentes a grupos hidroxila HO-5 e HO-5'' formando ligação de hidrogênio intramolecular em δ_{H} 12,98 e 13,05 ppm, respectivamente, indicativos de biflavonóides. Também foi observado um sinal largo discreto em δ_{H} 10,43 ppm que pode ser atribuído as outras hidroxilas (HO-7, 7'', 4' e 4''') presentes na substância 7. Na região de absorção de hidrogênios em anel aromático foram observados dois dupletos em δ_{H} 6,17 (d, J=

2,0 Hz) atribuído ao hidrogênio 6 (H-6) e δ_H 6,44 (d, J= 2,0 Hz, H-8) que mostram entre si interação *meta* característica de uma unidade de flavonoíde com anel A dioxigenado nas posições 5 e 7. Um sistema ABC representado pelos sinais dos deslocamentos químicos em δ_H 8,02 (s, 1H); 7,98 (sl, 1H) e 7,12 (d, J= 8,4 Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-2', 6' e 5' respectivamente, dois dupletes formando um sistema AA'BB' em δ_H 7,57 (d, J= 8,6 Hz, H-2'' e H-6''); 6,70 (d, J= 8,6 Hz, H-3'' e 5'') e três singletos em δ_H 6,83 (s, H-3''); 6,78 (s, H-3), 6,37 (s, H-6''). A presença do sinal compatível com H-6 (s) e a ausência dos sinais compatíveis com H-3' e H-8'' (s) sugerem que a ligação entre as duas unidades monoméricas de flavonoíde envolvem um carbono do anel A de uma unidade monométrica e outro do anel B da outra unidade permitindo supor a substância **7** como sendo o biflavonoíde amentoflavona.

No espectro de DEPTQ (Figuras 43, 43,1 e 43,2, páginas 91 e 92) foi possível identificar a presença dos sinais de duas carbonilas conjugadas (C-4 e C-4'') em $\delta_{C=O}$ 182,6 ppm (C-4) e 182,2 ppm (C-4''), e mais 28 (vinte e oito) sinais de carbonos aromáticos, sendo 16 (dezesseis) carbonos quaternários (C) e 12 (doze) carbonos metínicos (CH), confirmando o esqueleto de um dímero com trinta carbonos (C₃₀) composto de duas unidades flavonoídicas com quinze carbonos cada (2 x C₁₅), estas primeiras observações referentes ao espectro de DEPTQ e o padrão de oxigenação visto no RMN ¹H possibilitam supor que o biflavonoíde **9** é composto por unidades monoméricas semelhante a flavona conhecida como apigenina (AGRAWAL *et al.*, 1989).

Os sinais δ_C 120,7 (C-3'), δ_C 104,0 (C-8'') referentes aos carbonos envolvidos na ligação entre as unidades monoméricas foram comparados com os dados da literatura para a apigenina (MARKHAN *et al.*, 1987) e podem ser visualizados na tabela 10 (página 89).



Apigenina

Tabela 10: Comparação da apigenina (MARKHAN *et al.*, 1987) com os monômeros que compõem a substância **7**.

C	Substância 7 (monômero 1)	Substância 7 (monômero 2)	Apigenina (MARKHAN <i>et al.</i> , 1987)
2	164,6	164,4 (C-2'')	
3	103,4	103,1 (C-3'')	102,8
4	182,6	182,2 (C-4'')	
5	161,9	163,1 (C-5'')	
6	99,4	99,4 (C-6'')	98,8
7	161,5	161,0 (C-7'')	
8	94,5	104,0 (C-8'')	94,0
9	155,0	160,4 (C-9'')	
10	104,7	104,2 (C-10'')	
1'	121,9	121,2 (C-1''')	
2'	131,9	128,7 (C-2''')	128,4
3'	120,7	116,4 (C-3''')	116,0
4'	157,9	164,1 (C-4''')	
5'	116,9	116,4 (C-5''')	116,0
6'	128,2	128,7 (C-6''')	128,4

Esta análise demonstrou uma diferença nos deslocamentos químicos dos carbonos 3' e 8'' das substâncias comparadas. Para o C-3' foi constatada uma diferença de deslocamento químico $\Delta\delta_C = 4,66$ (δ_C 120,74 (9) – 116,08 (apigenina)) e para o C-8'' $\Delta\delta_C = 10,0$ (δ_C 104,0 (9) – 94 (apigenina)) esta diferença nos deslocamentos químicos deve-se ao fato dos carbonos C-3' e C-8'' de **7** apresentarem-se mais desprotegidos, provavelmente porque estão envolvidos com a ligação entre as unidades monoméricas flavónicas de **7**. No espectro de DEPTQ foi possível identificar ainda a presença do sistema AA'BB' representado pelos sinais de deslocamento químico dos carbonos C-3''' e C-5''' em δ_C 116,3 e C-2''' e C-6''' em δ_C

128,7, além dos carbonos metínicos δ_C 94,5 (C-8), 99,4 (C-6), característico do acoplamento meta do anel A de flavonóides e, finalmente o carbono C-6'' do anel A'' também em δ_C 99,4 ppm.

O espectro de RMN HMQC (Figura 44, página 93) confirmou a ligação entre o C-6/H-6, C-6''/H-6'', C-8/H-8 e possibilitou a correta atribuição dos deslocamentos químicos dos demais carbonos metínicos da substância **7** e de seus respectivos hidrogênios.

Todas as informações descritas acima comparadas com os dados da literatura (Tabela 11, página 94) (VELANDIA *et al.*, 2002) para o biflavonóide amentoflavona, isolado anteriormente de *Ouratea semiserrata* (VELANDIA *et al.*, 2002) e de *Ouratea hexasperma* (SUZART *et al.*, 2007) e ainda, a sua comparação com uma amostra padrão em CCDA corroboram para confirmar que a substância **7** trata-se da **amentoflavona**, como sugerida inicialmente.

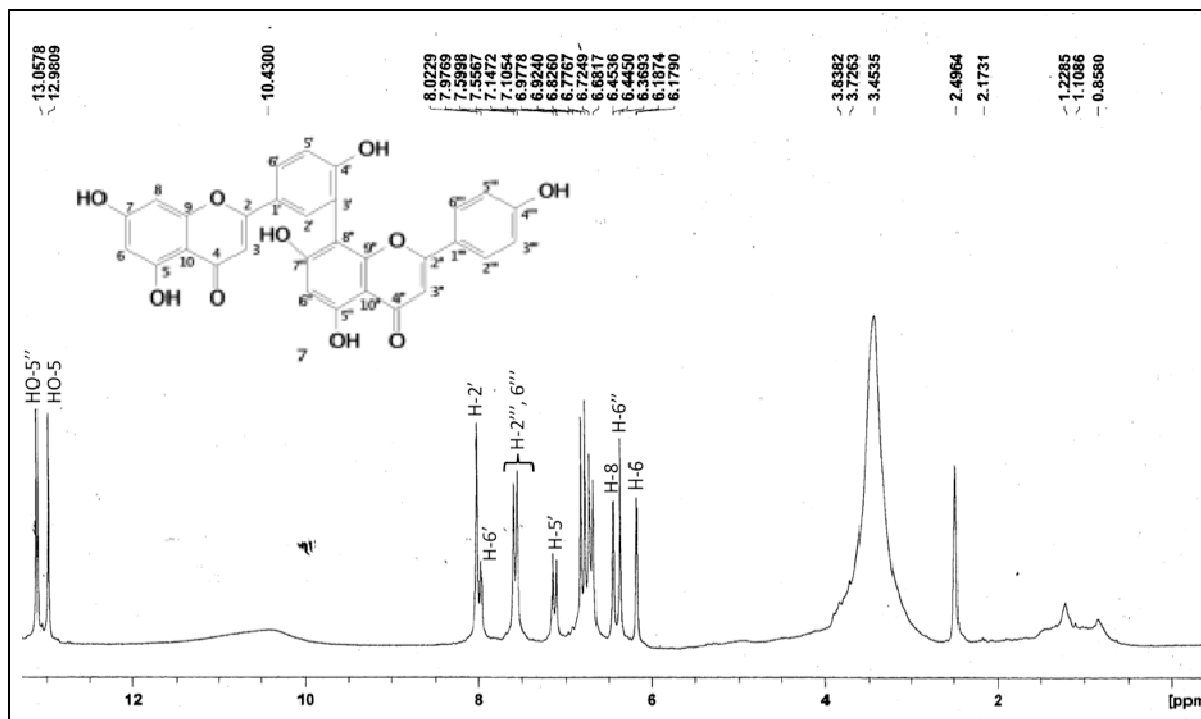


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) da amentoflavona (**7**).

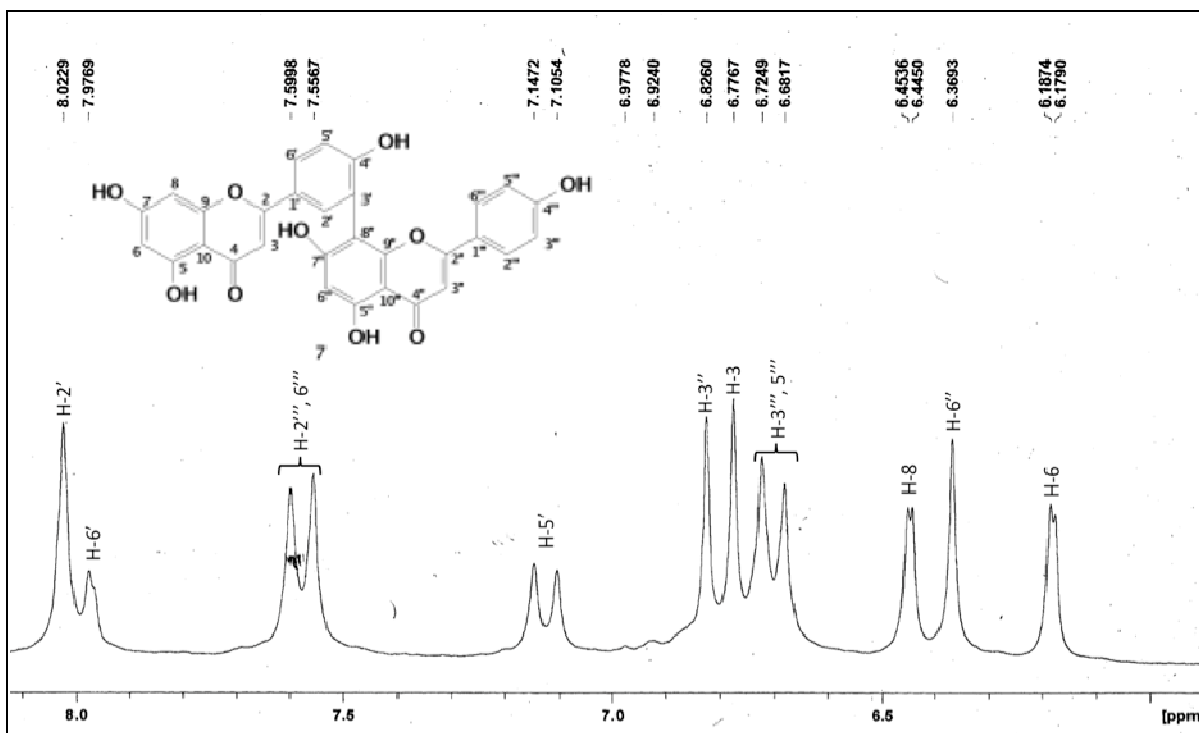


Figura 42.1. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) da amentoflavona (7).

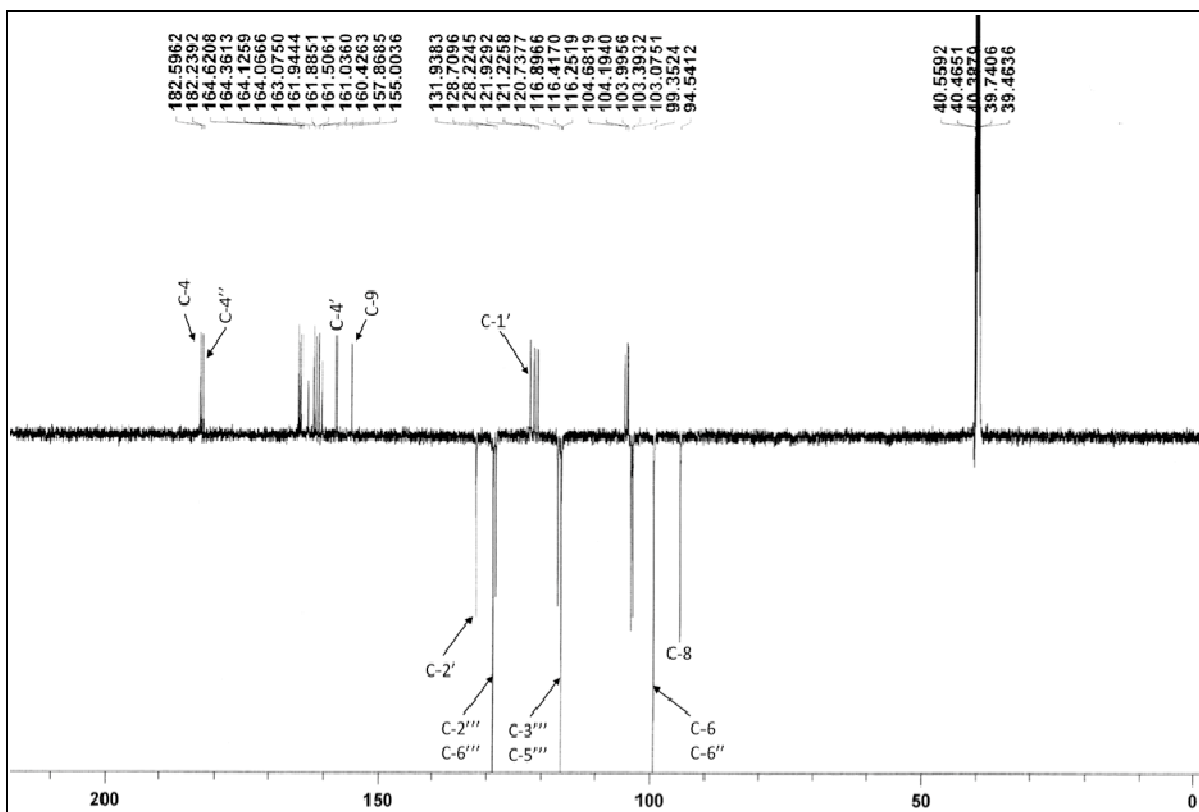


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ) (500 MHz, DMSO-d_6) da amentoflavona (7).

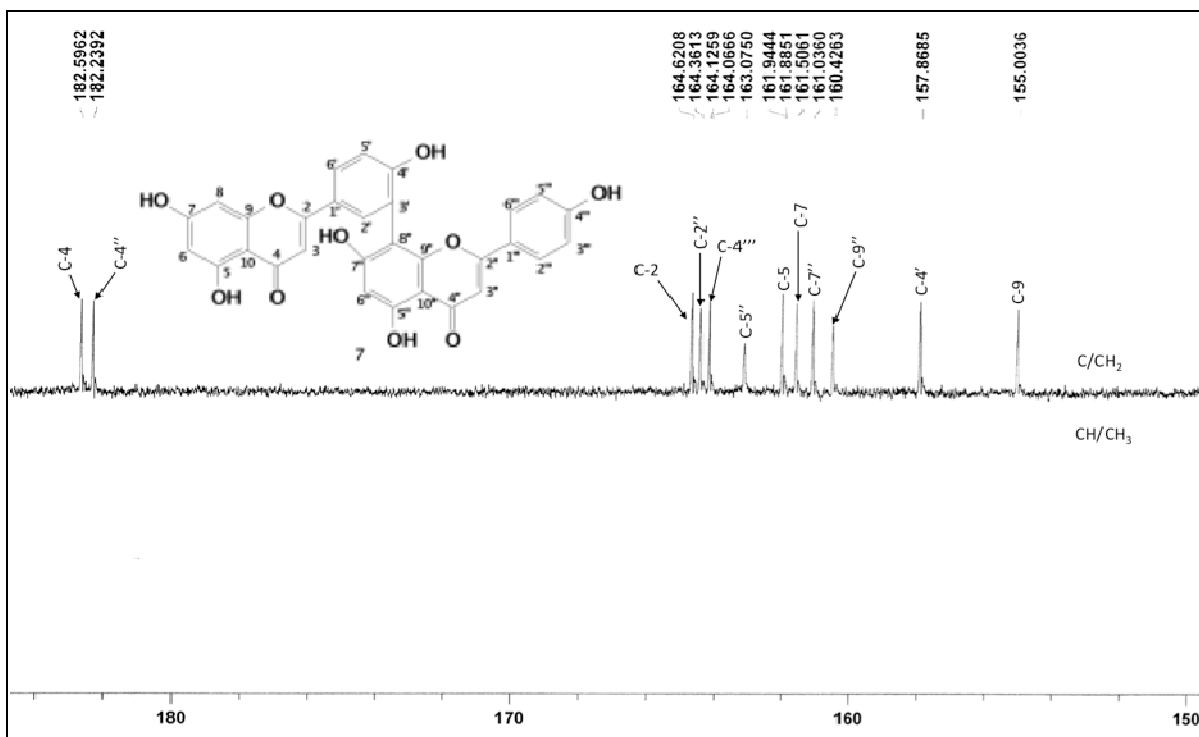


Figura 43.1. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, DMSO- d_6) da amentoflavona (7).

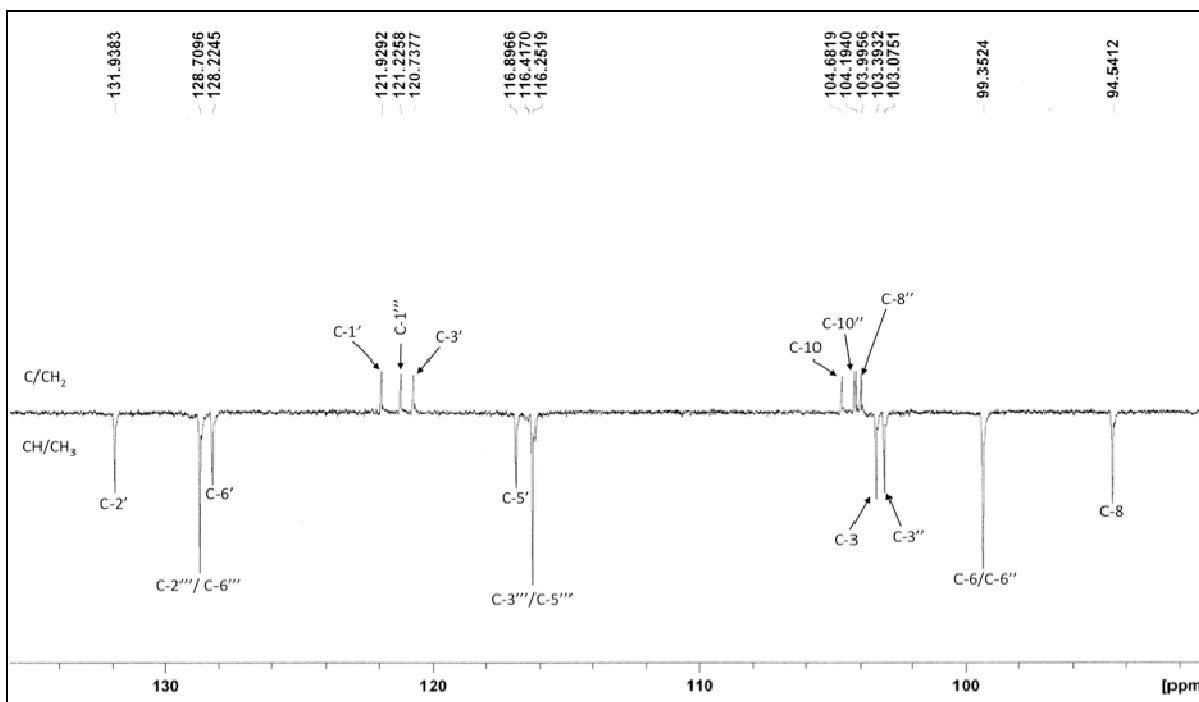


Figura 43.2. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, DMSO- d_6) da amentoflavona (7).

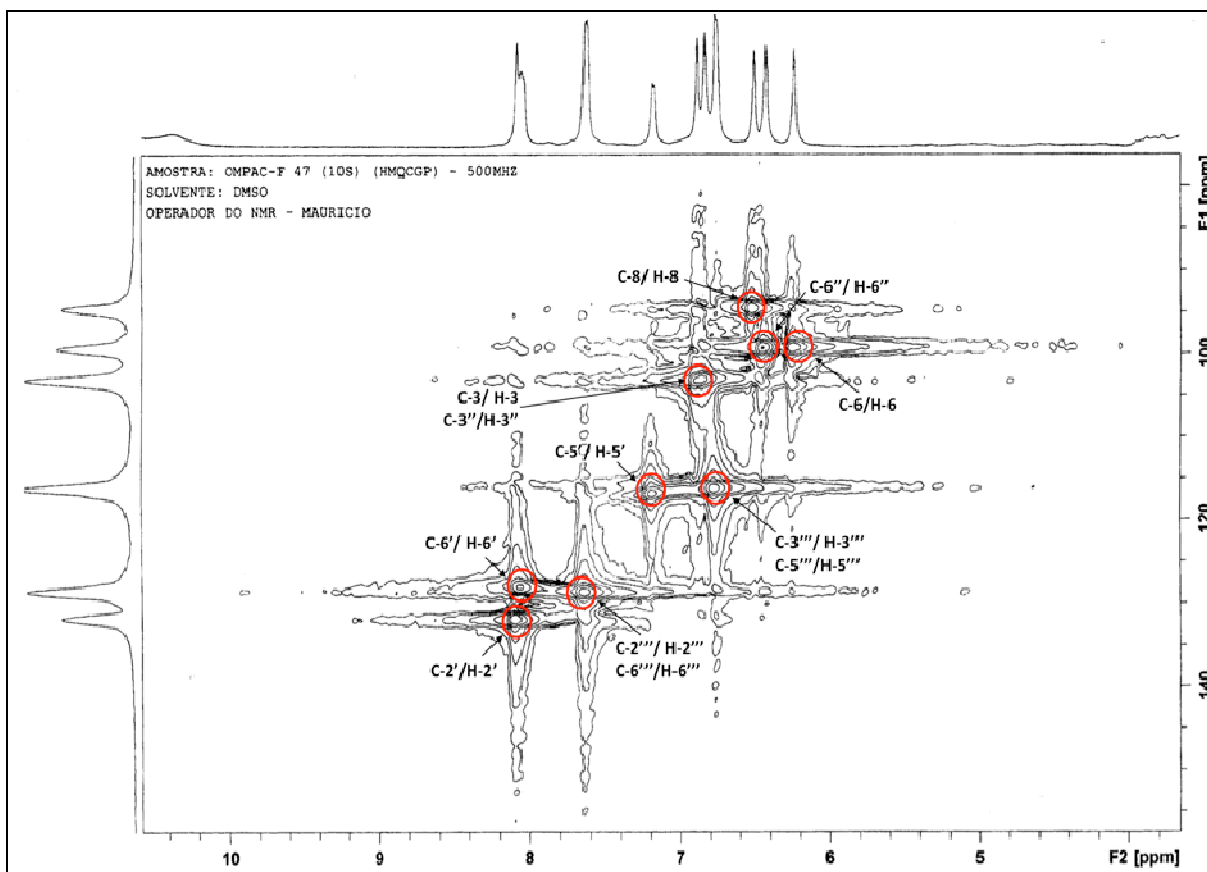
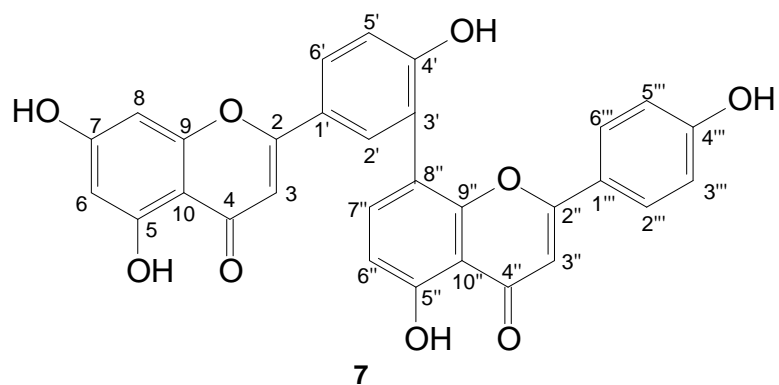


Figura 44. Espectro de RMN HMQC (500 MHz, DMSO- d_6) da amentoflavona (7).

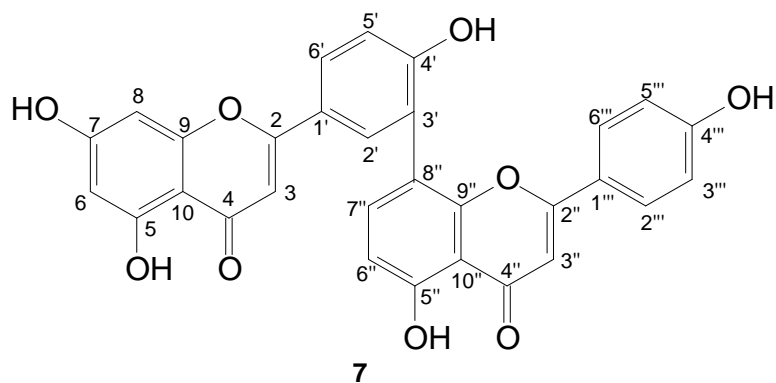


Tabela 11. Dados de RMN ^1H e DEPTQ (200 e 500 MHz) da substância **7** (amentoflavona) comparados com a literatura (VELANDIA *et al.*, 2002).

C	7		Literatura (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
-	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	164,6	-	163,81	-
3	103,4	6,78 (s, 1H)	102,76	6,79 (s)
4	182,6	-	182,25	-
5	161,9	-	161,57	-
6	99,4	6,17 (d, J=2,0 Hz, 2H)	98,84	6,18 (d, J=2,0, 2H)
7	161,5	-	164,24	-
8	94,5	6,44 (d, J=2,0 Hz, 2H)	94,25	6,46 (d, J=2,0, 2H)
9	155,0	-	157,48	-
10	104,7	-	103,48	-
1'	121,9	-	121,15	-
2'	131,9	8,02 (s,1H)	128,27	8,1-7,9 (m)
3'	120,7	-	120,09	-
4'	157,9	-	159,60	-
5'	116,9	7,12 (d, J=8,4 Hz, 1H)	116,29	7,14 (d, J=9,3)
6'	128,2	7,98 (sl, 1H)	131,42	8,1-7,9 (m)
2''	164,4	-	163,93	-
3''	103,1	6,83 (s, 1H)	103,14	6,84 (s, 1H)
4''	182,2	-	181,85	-
5''	163,1	-	160,66	-
6''	99,4	6,37 (s, 1H)	98,68	6,39 (s, 1H)
7''	161,0	-	161,99	-
8''	104,0	-	104,06	-
9''	160,4	-	154,60	-
10''	104,2	-	103,75	-
1'''	121,2	-	121,52	-
2'''e 6'''	128,7	7,57 (d; J=8,6, 2H)	128,28	7,57 (d, J=8,7, 2H)
3'''e 5'''	116,4	6,70 (d; J=8,6, 2H)	115,93	6,71 (d, J=8,7, 2H)
4'''	164,1	-	161,14	-
HO-5	-	12,98 (s)	-	12,97 (s)
HO-5'	-	13,05 (s)	-	13,10 (s)

III.3.1.5. Identificação da substância 8 (7''-O-metilagatisflavona)

O biflavonóide natural **8** (pf: 226-228 °C) foi identificado com sendo a 7''-O-metilagatisflavona, um derivado da agatisflavona **9**, com a presença de um grupamento metoxila na posição C-7''.

O espectro no IV (Figura 45, página 95) revelou bandas de absorção para grupo hidroxila em 3183 cm⁻¹ (estiramento O-H, ν_{O-H}), confirmada pela presença do estiramento C-O em 1364 cm⁻¹ (ν_{C-O}), estiramento de carbonila cetônica conjugada C=O (1649 cm⁻¹), 1216 cm⁻¹ e 1176 cm⁻¹ (estiramento de éter). Além de estiramentos C=C ($\nu_{C=C}$) em 1598 cm⁻¹, 1505 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ característicos de anel aromático e uma banda de absorção intensa em 835 cm⁻¹ compatível com hidrogênios (2H) vizinhos de um sistema aromático.

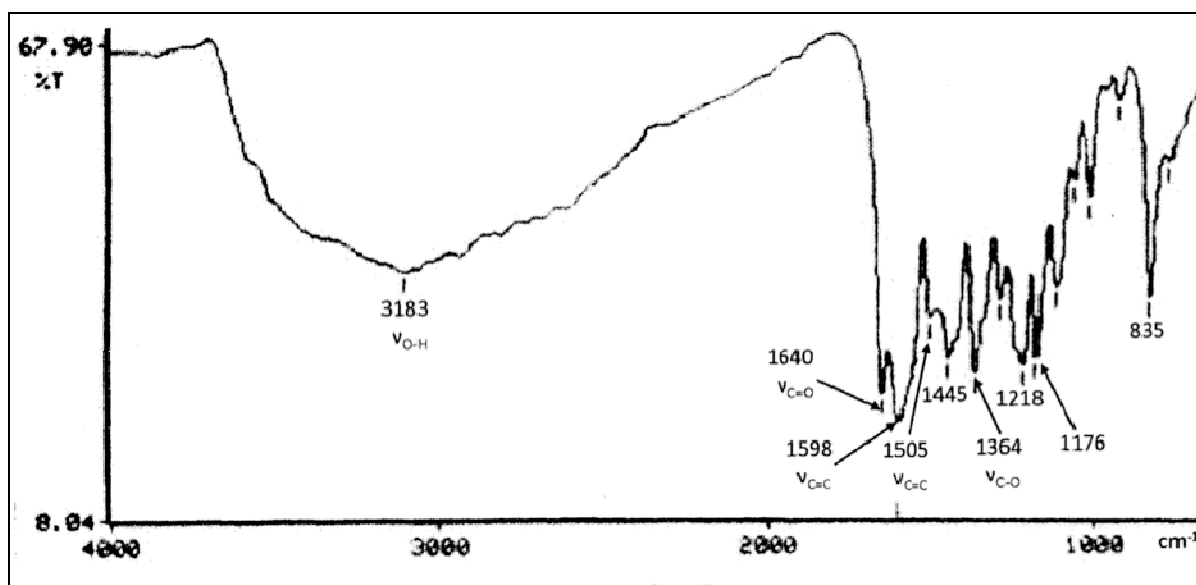


Figura 45. espectro de IV da substância **8** (7''-O-metilagatisflavona) com pastilha de KBr.

O espectro de RMN ¹H (Figura 46, página 96) mostra sinais (dupletos) referentes aos átomos de hidrogênio atribuídos a dois sistemas AA'BB' dos anéis B e B'' em δ_H 7,94 (H- 2' e H-6', $J= 8,76$ Hz), 7,57 (H-2'''e H-6''', $J= 8,84$ Hz), 6,97 (H-3' e H-5', $J= 8,84$ Hz) e 6,77 (H-3''' e H-5''', $J= 8,76$ Hz), três singletos atribuídos aos hidrogênios H-3/3'', H-8 e H-6'' com deslocamentos químico em δ_H 6,69 (2H), 6,63 (1H), 6,60 (1H), respectivamente e uma

metoxila em δ_H 3,88 (s, 3H). A comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da substância **8** com o 7''-*O*-metilagatisflavona, isolado anteriormente de *Ouratea hexasperma* (DANIEL *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 1999) confirmam a proposta estrutural da substância **8** (Tabela 12, página 97).

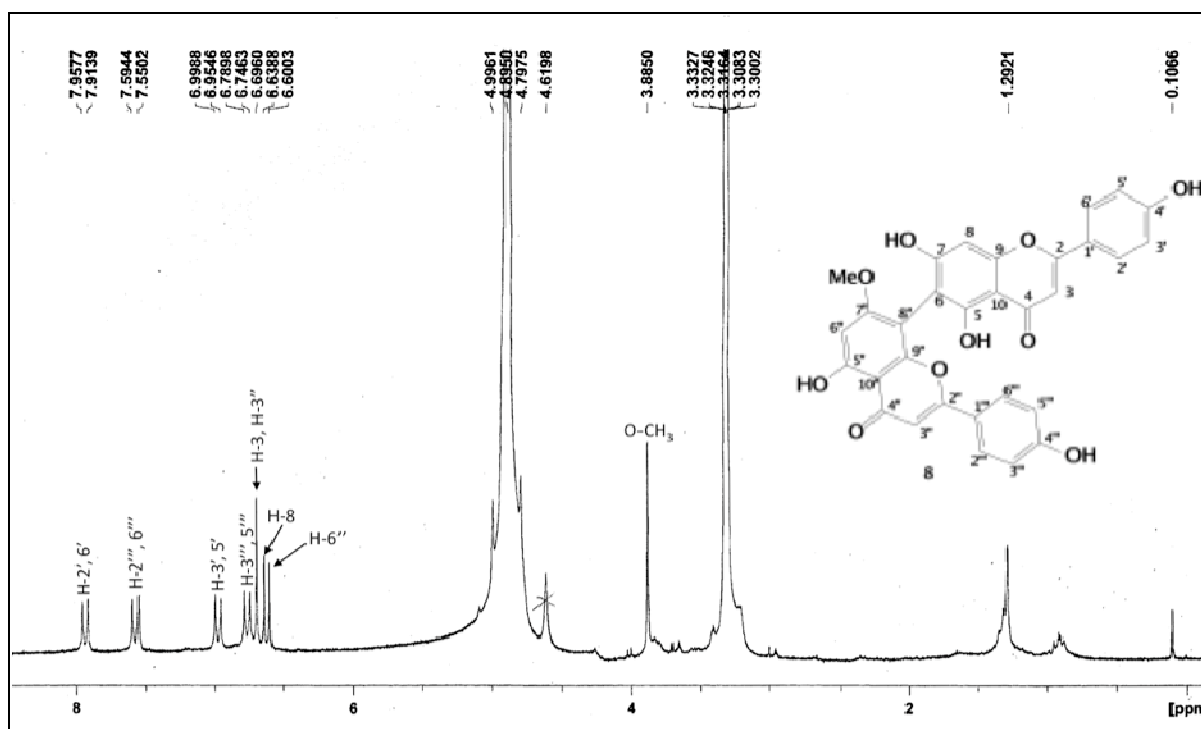


Figura 46. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, D₃CO) 7''-*O*-metilagatisflavona (**8**).

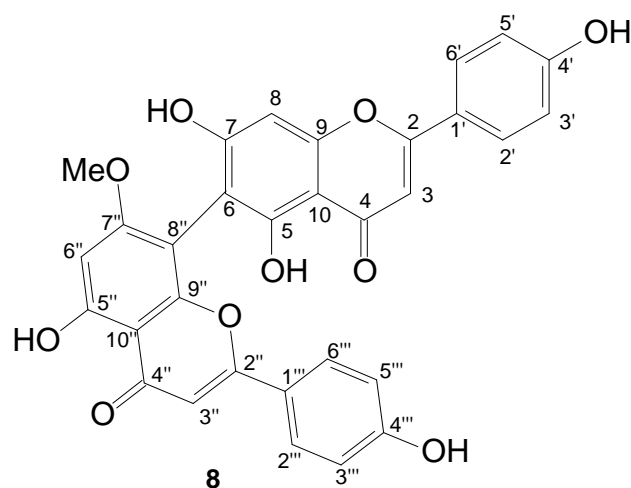


Tabela 12. Dados de RMN ^1H (50 MHz) da substância **8** (7''-O-metilagatisflavona) comparados com a literatura (MOREIRA *et al.*, 1999).

C	Literatura (MOREIRA <i>et al.</i> , 1999)		8 (7''-O-metilagatisflavona)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
2	165,0		
3	104,0	6,65 (s)	6,69 (s)
4	183,5		-
5	161,3		-
6	104,1		-
7	163,1		-
8	94,5	6,80 (s)	6,63 (s)
9	155,5		-
10	105,1		-
1'	123,2		-
2', 6'	129,2	7,94 (d; J=6,8)	7,93 (d; J=8,7)
3', 5'	116,7	7,05 (d; J=6,8)	6,97 (d; J=8,8)
4'	161,8		-
2''	165,2		-
3''	103,6	6,60 (s)	6,69 (s)
4''	183,1		-
5''	163,4		-
6''	96,0	6,54 (s)	6,30 (s)
7''	164,8		-
8''	101,0		-
9''	158,2		-
10''	105,5		-
1'''	123,2		-
2''' e 6'''	129,1	7,62 (d; J=7,1)	7,57 (d; J=8,8)
3''' e 5'''	116,7	6,83 (d; J=7,1)	6,77 (d; J=8,7)
4'''	161,8		-
MeO-7''	56,7	3,88 (s)	3,88 (s)
HO-5	-	13,34 (s)	-
HO-5''	-	13,18 (s)	-

V.3.1.6. Identificação da substância 9 (Agatisflavona) (5,7,4'-triidroxiflavona (6->8'')-5'',7'',4''-triidroxiflavona)

A análise do espectro no IV da substância 9 (Figura 47, página 98) permitiu identificar bandas de absorção em 3420 cm^{-1} característica de grupo hidroxila (estiramento O-H, $\nu_{\text{O-H}}$), 1365 cm^{-1} (estiramento C-O, $\nu_{\text{C-O}}$), estiramento em 1651 cm^{-1} de carbonila conjugada ($\nu_{\text{C=O}}$) e 1603 cm^{-1} (estiramento C=C de anel aromático, $\nu_{\text{C=C}}$).

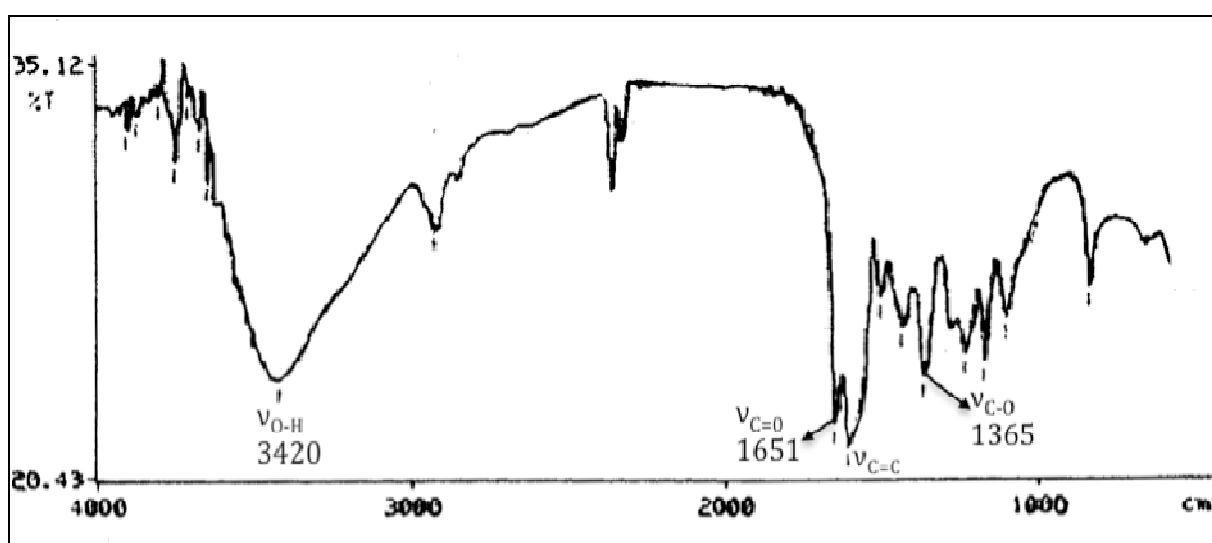


Figura 47. Espectro de IV da substância 9 (Agatisflavona) em pastilha de KBr.

O espectro de RMN ^1H (Figura 48, página 99) apresentou dois dupletos (δ_{H} 7,97 e 7,54 ppm) representando hidrogênios aromáticos desprotegidos que, de acordo com o sinal presente no espectro 2D ($^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY) (Figura 49, página 100) interagem com hidrogênios protegidos representados pelos sinais em δ_{H} 6,96 e 6,73 ppm. Estes sinais representam dois sistemas AA'BB' de um anel aromático para substituído típicos de flavonóides. O valor de δ_{H} dos prótons menos protegidos indica se tratar de um sistema conjugado. Os três sinais presentes no espectro de RMN ^1H (Figura 48, página 99) δ_{H} 6,86 x2 (s, H-3 e H-3''), 6,69 (s, H-8) e 6,35 (s, H-6'') são compatíveis com prótons aromáticos protegidos e os dois singletos em δ_{H} 13,31 e 13,05 ppm (OH-5 e 5'') correspondem aos dois prótons hidroxílicos em ponte com a carbonila.

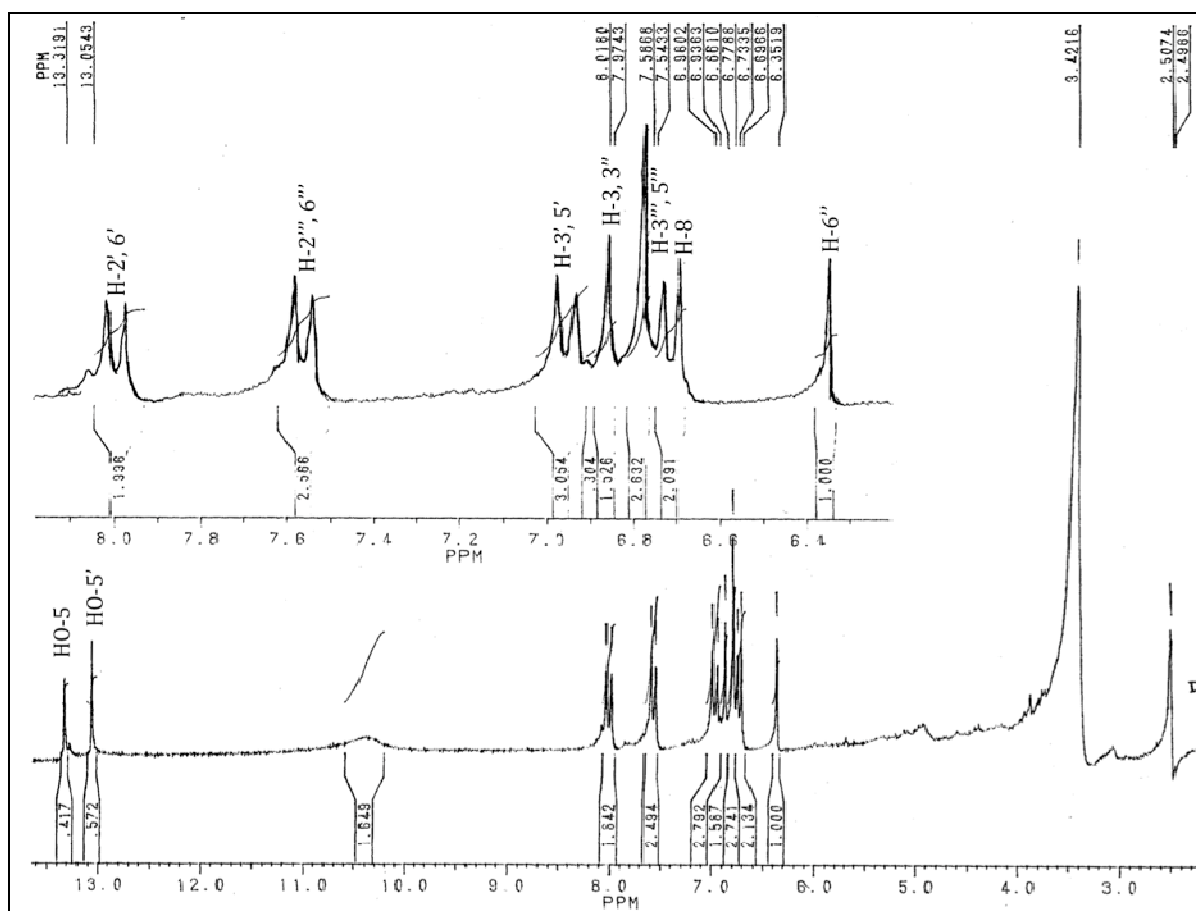
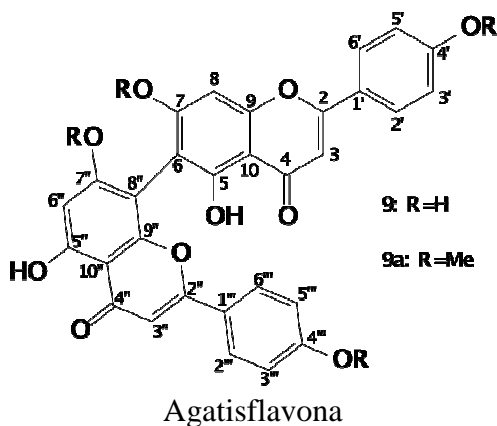


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) da substância **9** (agatisflavona).

A análise dos espectros RMN ^{13}C e DEPT (Figuras 50 e 51, página 101) da substância **9** permitiu identificar a presença dos carbonos metínicos com deslocamento químico em δ_{CH} 128,92 (C-2' e 6'), δ_{CH} 116,13 (C-3' e 5'), δ_{CH} 128,30 (C-2''' e 6''') e δ_{CH} 116,13 (C-3''' e 5''') o que confirma a presença de sistemas AA'BB' observados na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 48, página 99). Os valores dos deslocamentos químicos dos demais carbonos

metínicos C-3'' (δ_{CH} 102,9), C-3 (δ_{CH} 103,0), C-8 (δ_{CH} 93,8) e C-6'' (δ_{CH} 98,9) observados são compatíveis com a estrutura de biflavonoíde com ligação C-6- \rightarrow C-8'' entre os monômeros de flavona, que é uma característica observada no gênero *Ouratea* (SUZART *et al.*, 2007). Esses dados e os sinais adicionais dos carbonos quaternários, entre eles os sinais em δ_C 182,2 (C-4) e 182,0 (C-4'') são compatíveis com carbonilas em ligação de hidrogênio e a comparação com os dados de literatura para o mesmo composto isolado anteriormente de *Ouratea hexasperma* (DANIEL *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 1999) permitiu identificar a substância **9** como sendo o biflavonoíde agatisflavona (5,7,4'-triidroxiflavona (6- \rightarrow 8'')-5'',7'',4'''-triidroxiflavona). A tabela 13 (página 102), evidência as atribuições dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e 1H da substância isolada (**9**) comparados com os dados da literatura (DANIEL *et al.*, 2005).

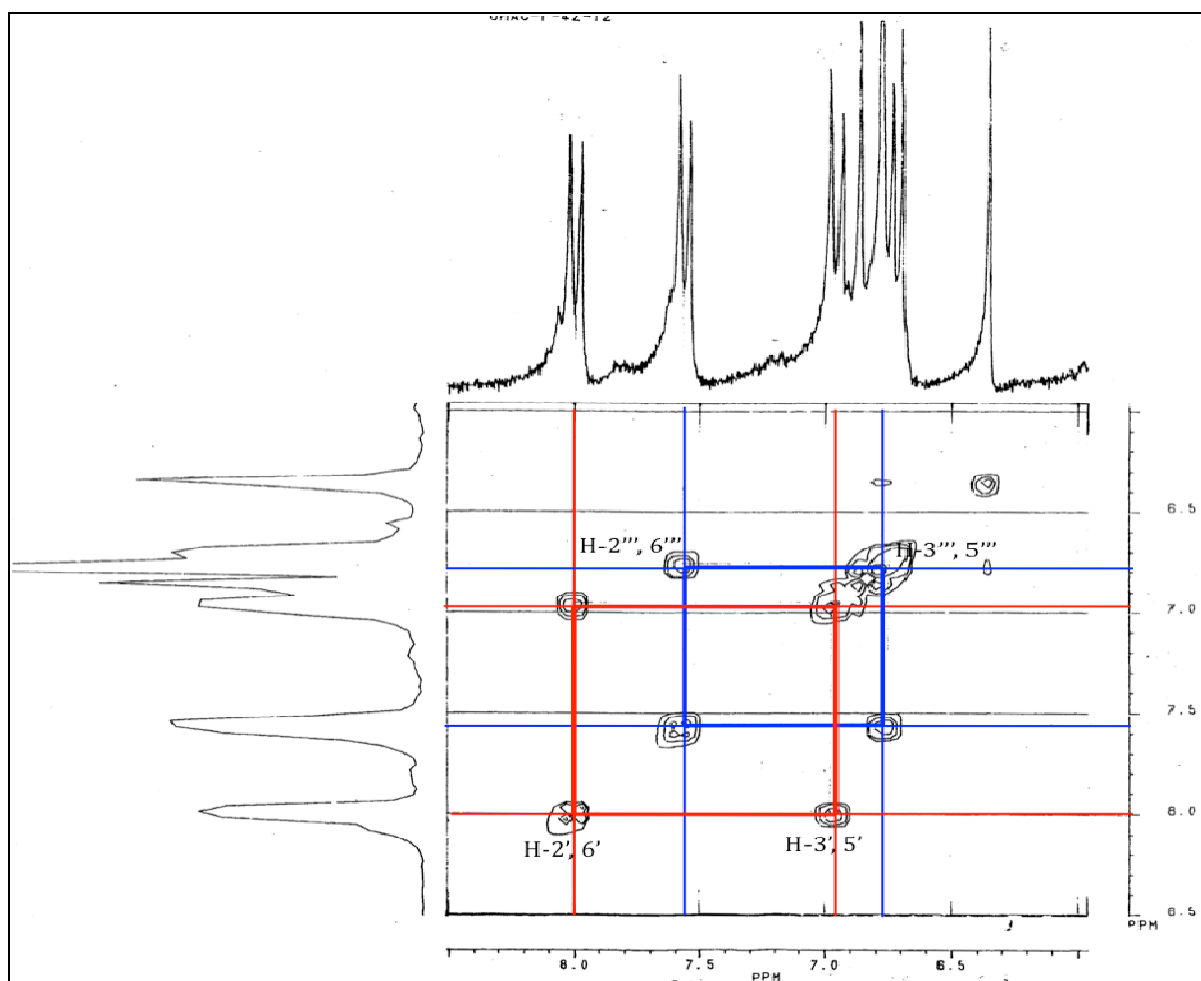


Figura 49. Espectro de RMN de $^1H \times ^1H$ -COSY (200 MHz, DMSO- d_6) da substância **9** (agatisflavona).

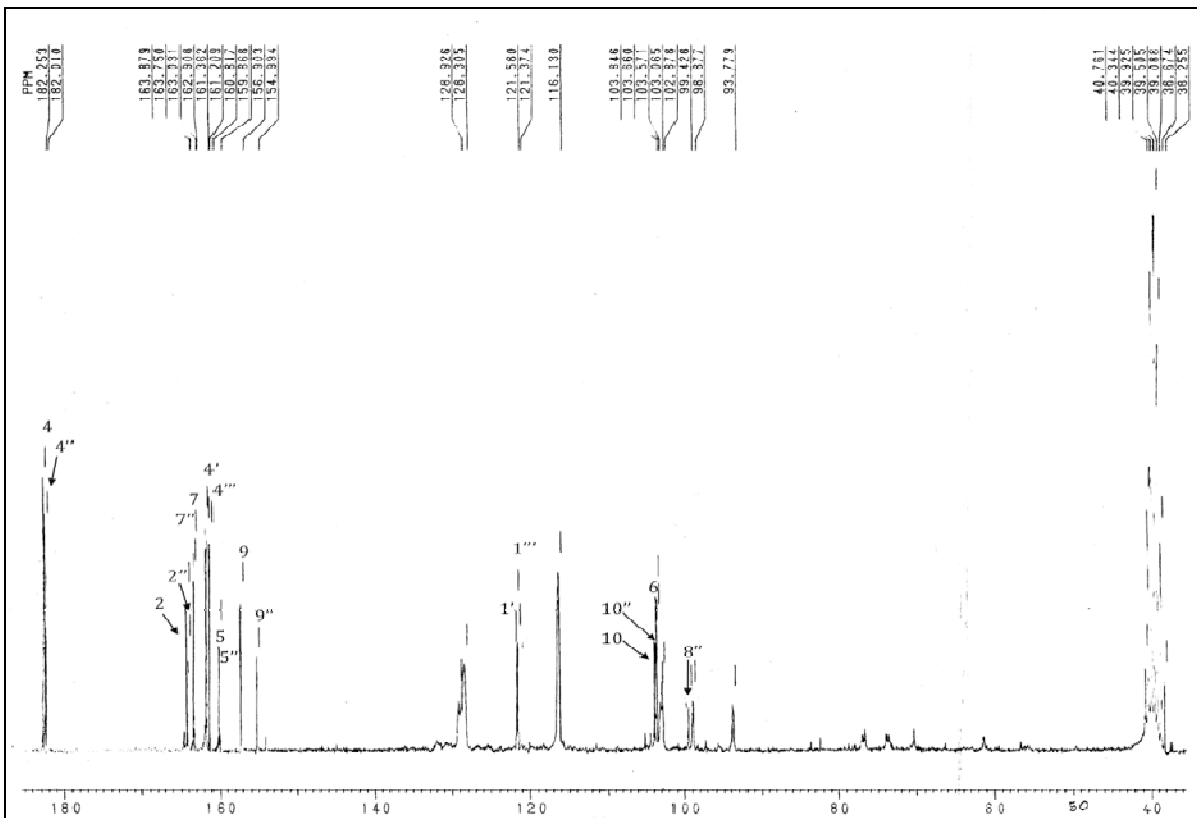


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) agatisflavona (9).

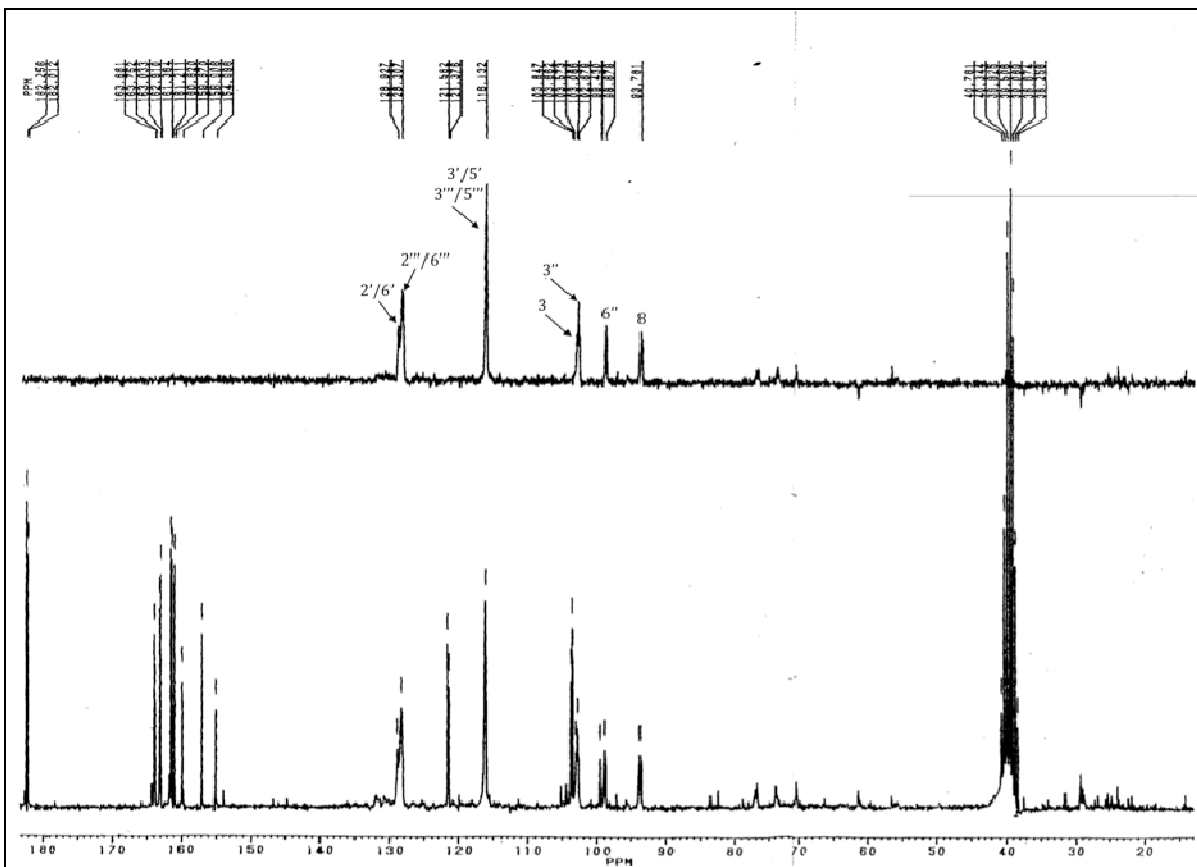


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (50 MHz, DMSO-d_6) agatisflavona (9).

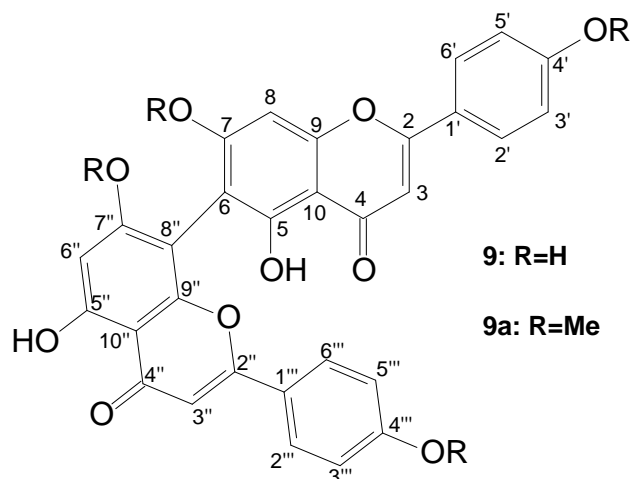


Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C e ^1H da substância 9 (agatisflavona) comparados com a literatura (DANIEL *et al.*, 2005).

C	9		Literatura (DANIEL <i>et al.</i> , 2005)
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	163,9		165,0
3	103,0	6,86 (s)	104,0
4	182,3	-	183,5
5	160,8	-	161,3
6	103,6	-	104,1
7	162,9	-	163,1
8	93,8	6,69 (s)	94,5
9	156,9	-	155,5
10	103,8	-	105,1
1'	121,6	-	123,2
2', 6'	128,9	7,97 (d; J=8,7)	129,2
3', 5'	116,1	6,96 (d; J=8,7)	116,7
4'	161,4	-	161,8
2''	163,7	-	165,2
3''	102,9	6,86 (s)	103,6
4''	182,0	-	183,1
5''	159,9	-	163,4
6''	98,9	6,35 (s)	96,0
7''	163,0	-	164,8
8''	99,4	-	101,0
9''	154,9	-	158,2
10''	103,7	-	105,5
1'''	121,4	-	123,2
2''' e 6'''	128,3	7,54 (d; J=8,7)	129,1
3''' e 5'''	116,1	6,73 (d; J=8,7)	116,7
4'''	161,2	-	161,8
HO-7''	-	-	-
HO-5	-	13,31(s)	-
HO-5''	-	13,05(s)	-

V.3.1.7. Identificação do derivado **10** (tetrametilagatisflavona)

O tratamento da substância **9** (20 mg) com diazometano forneceu o derivado tetrametilado **10**, através da incorporação de grupos metilas nas posições 7, 7'', 4' e 4''. O ponto de fusão do derivado **10** (PF: 170 - 175°C) e os dados do espectro RMN ¹H (Figura 52, página 103) foram compatíveis com dados da literatura (MOREIRA *et al.*, 1999). A mudança significativa no espectro de RMN ¹H de **10**, quando comparada com o biflavonóide natural **9** (agatisflavona) foi o aparecimento de quatro sinais de metoxilas 7, 7'', 4' e 4'' em δ_H 3,82, 3,86, 3,92 e 3,80 ppm. O espectro de RMN ¹H (Figura 52, página 103) revelou ainda sinais para os átomos de hidrogênios H-3''' e H-5''' em δ_H 6,84 (d, $J=8,7$), H-2''', H-6''' em δ_H 7,50 (d, $J=8,7$), H-3' e 5' em δ_H 7,04 (d, $J=8,7$) e H- 2', 6' em δ_H 7,90 (d, $J=8,7$), correspondentes a dois sistemas AA'BB'. Os hidrogênios H-6'', 3'', 3 e 8 estão representados pelos singletos em δ_H 6,53, δ_H 6,57, δ_H 6,67 e δ_H 6,66, respectivamente e as hidroxilas HO-5 e 5'' pelos singletos em δ_H 13,11 e 13,06. A comparação dos dados de RMN ¹H da literatura (MOREIRA *et al.*, 1999) com o derivado **10** está relacionada na tabela 14 (página 104). Esse derivado confirma a proposta da substância **9** (agatisflavona).

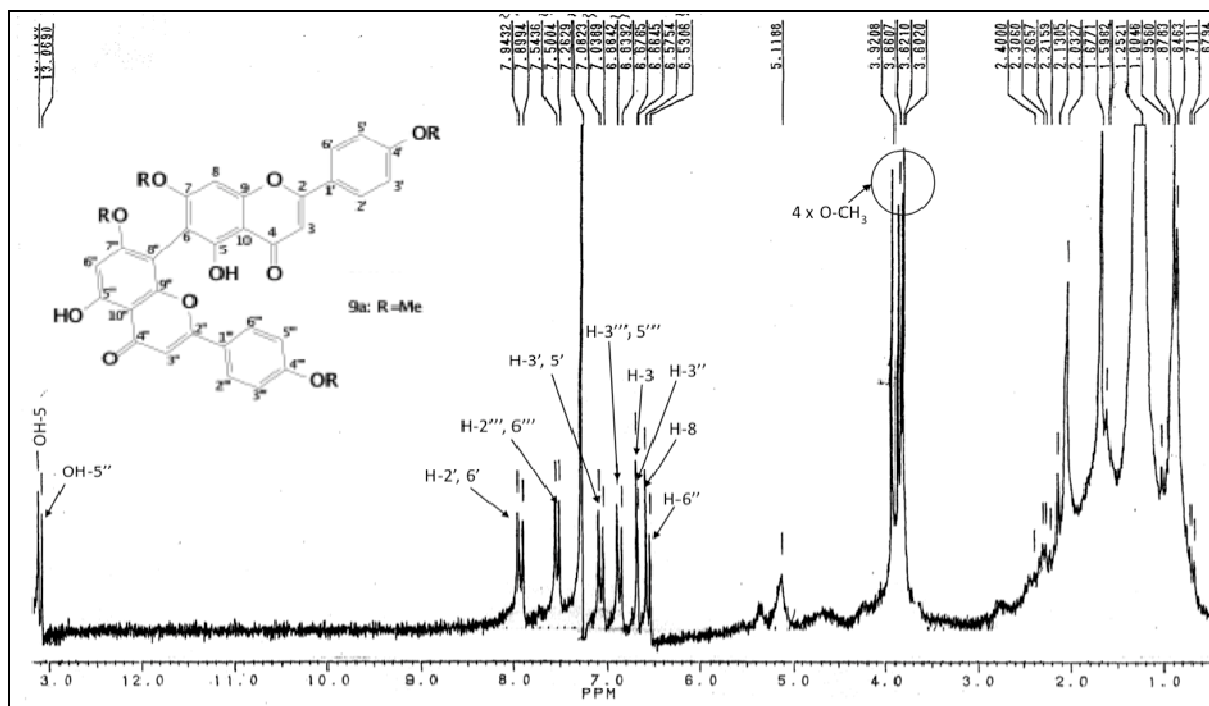
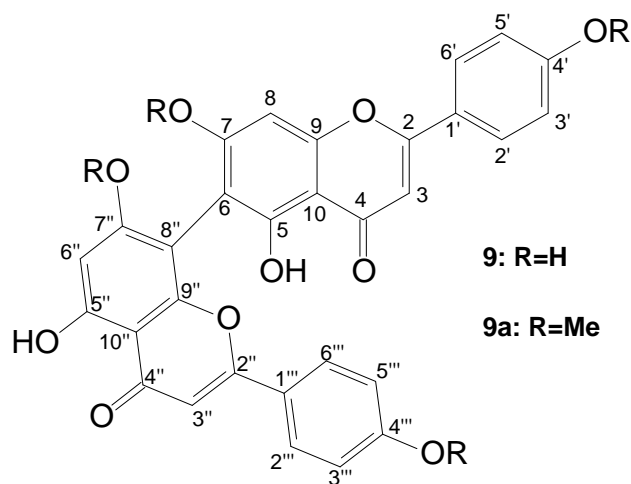


Figura 52. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **10**.



(10: Tetrametilagatisflavona)

Tabela 14. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da substância 10 comparados com a literatura (MOREIRA, *et al.*, 1999).

H	10	MOREIRA, <i>et al.</i> , 1999
	δ_{H}	δ_{H}
3	6,67 (s)	6,65 (s)
8	6,66 (s)	6,51 (s)
2'	7,90 (d, J=8,0)	7,86 (d; J=8,4)
3'	7,05 (d, J=8,0)	6,99 (d; J=8,4)
5'	7,05 (d, J=8,0)	6,99 (d; J=8,4)
6'	7,90 (d, J=8,0)	7,86 (d; J=8,4)
3''	6,57 (s)	6,63 (s)
6''	6,53 (s)	6,48 (s)
2'''	7,52 (d, J=8,0)	7,47 (d; J=8,3)
3'''	6,85 (d, J=8,0)	6,81 (d; J=8,3)
5'''	6,85 (d, J=8,0)	6,81 (d; J=8,3)
6'''	7,52 (d, J=8,0)	7,47 (d; J=8,3)
MeO-4'	3,92 (s)	3,89 (s)
MeO-4'''	3,80 (s)	3,79 (s)
MeO-7''	3,86 (s)	3,83 (s)
MeO-7	3,82 (s)	3,83 (s)
HO-5	13,11 (s)	13,06(s)
HO-5''	13,06 (s)	13,04(s)

V.4 Estereoquímica absoluta dos atropoisômeros dos biflavonóides isolados de *Ouratea microdonta*.

Os espectros de dicroísmo circular (CD) e ultra violeta (UV) (Figura 54 e 55, página 107) da agatisflavona e derivados isolados de *O. microdonta* (CARVALHO *et al.*, 2008) e *Ouratea hexasperma* (MOREIRA *et al.*, 1999) foram comparados com os dados e espectros registrados na literatura para a 4',4''',7,7'''-tetra-*O*-metilcupressuflavona (LI *et al.*, 1997). Isto permitiu definir a configuração absoluta dos atropoisômeros, uma vez que as estruturas possuem os mesmos cromóforos ligados entre si. Não foi encontrada na literatura a curva CD de agatisflavona ou derivados para fazer comparação das propriedades quiróticas.

As figuras 54 e 55 (página 107) mostram as curvas de CD e UV das biflavonas, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, tetrametilagatisflavona isoladas de *Ouratea microdonta* (CARVALHO *et al.*, 2008) e tetrametilagatisflavona, um derivado da 7''-metilagatisflavona isolada de *Ouratea hexasperma* (MOREIRA *et al.*, 1999). Essa análise permitiu definir a estereoquímica absoluta do atropoisômero como *aR*. Os estereoisômeros são representados pelas estruturas abaixo (Figura 53, página 106), cujas imagens correspondem aos atropoisômeros (+) e (-), respectivamente, como representados pela regra da eliticidade direita e esquerda. A tabela 15 (página 106) mostra a comparação dos valores das curvas de CD e UV encontrados neste trabalho com os da literatura (LI *et al.*, 1997) para a 4',4''',7,7'''-tetra-*O*-metilcupressuflavona ([CD(+)₃₆₂]-(*aR*)-(-)₃₂₆-4',4''',7,7'''-tetra-*O*-metilcupressuflavona) (Figura 53a, página 106).

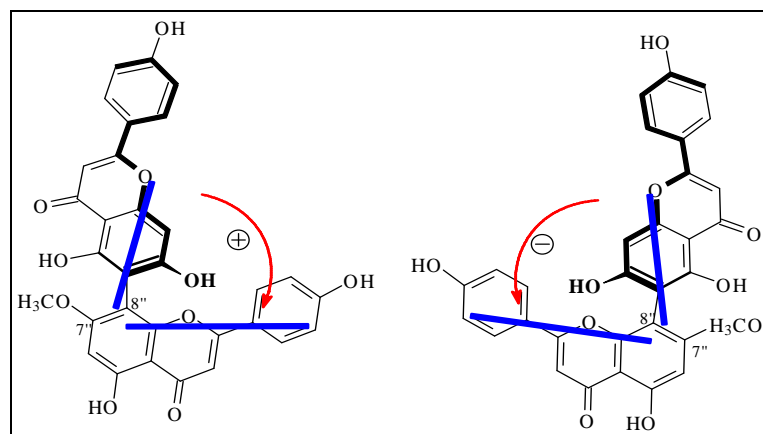


Figura 53. Atropoisômeros CD (+) aR e CD (-) aS para agatisflavona.

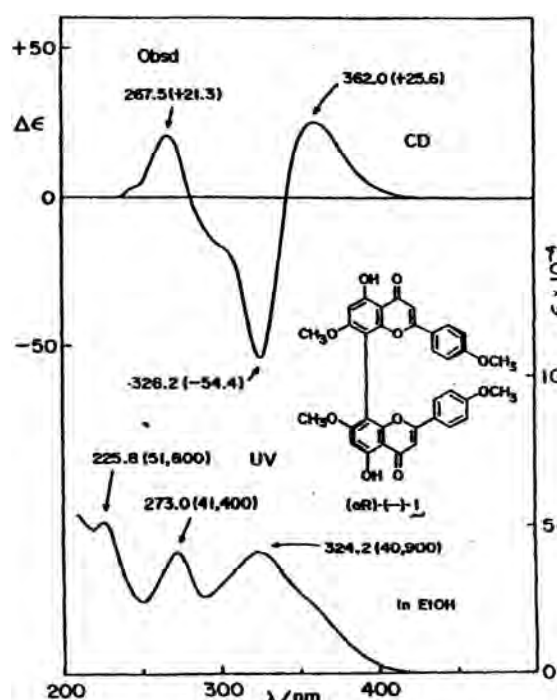


Figura 53a. Curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) da biflavona, 4',4''',7,7'''-tetra-*O*-metilcupressuflavona (Fonte: LI *et al.*, 1997).

Tabela 15. comparação dos valores das curvas de CD e UV encontrados neste trabalho com os da literatura para a 4',4''',7,7'''-tetra-*O*-metilcupressuflavona (LI *et al.*, 1997).

Substância	Dados das curvas de CD
4',4''',7,7'''-tetra- <i>O</i> -metilcupressuflavona (LI <i>et al.</i> , 1997)	$\lambda_{\text{máx.}}$ 362,0nm (+25,6), 350 (0,0); 326,2 (-54,4), 280 (0,0); 267,5 (+21,3), 225 (0,0)
7''- <i>O</i> -metilagatisflavona (<i>O. microdonta</i>)	$\lambda_{\text{máx.}}$ 360,0nm (+6,5), 335 (0,0); 315 (-12,5), 275 (0,0); 261 (+14,5), 242 (0,0)
Agatisflavona (<i>O. microdonta</i>)	$\lambda_{\text{máx.}}$ 355,0nm (+5,0), 345 (0,0); 315 (-25), 275 (0,0); 260 (+23), 245 (0,0)
Tetrametilagatisflavona (<i>O. microdonta</i>)	$\lambda_{\text{máx.}}$ 350,0nm (+7,0), 330 (0,0); 315 (-15), 275 (0,0); 260 (+14), 240 (0,0)
Tetrametilagatisflavona (<i>O. hexasperma</i>)	$\lambda_{\text{máx.}}$ 355,0nm (+7,0), 340 (0,0); 310 (-13), 272 (0,0); 260 (+15), 240 (0,0)

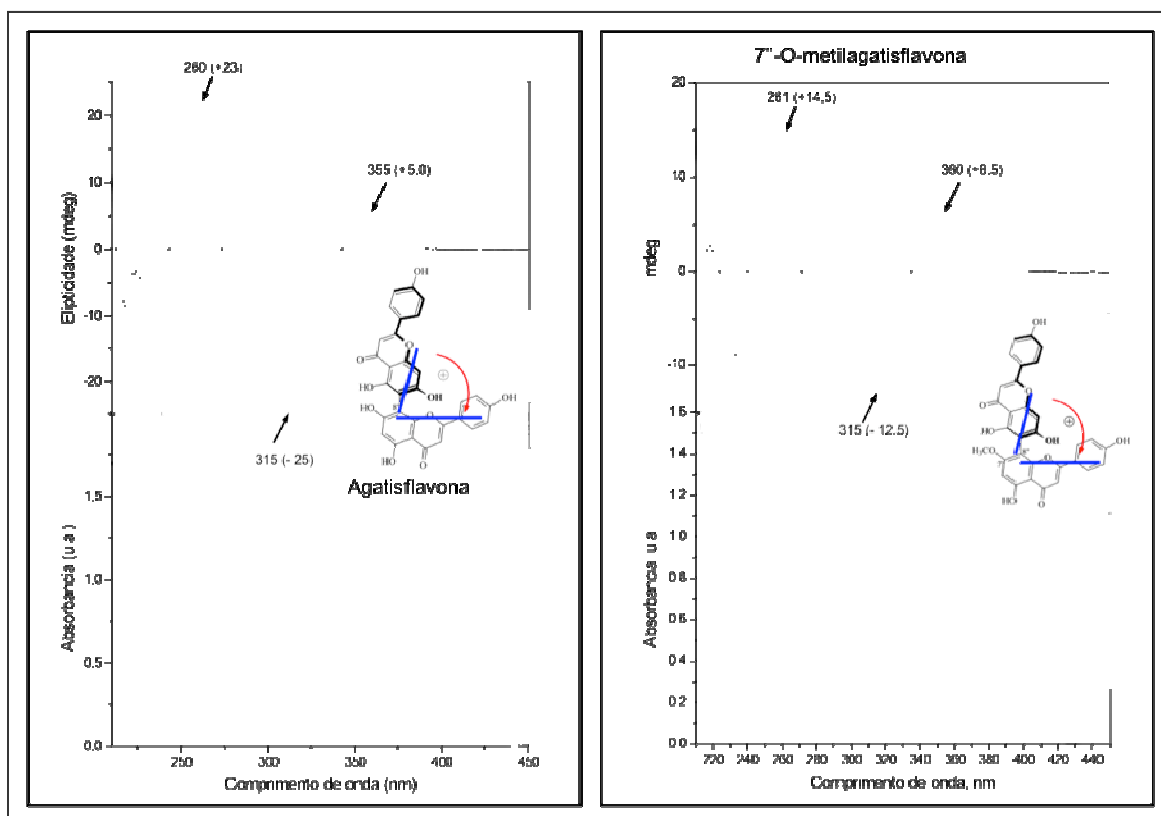


Figura 54. Curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) das biflavonas, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, isoladas de *Ouratea microdonta*.

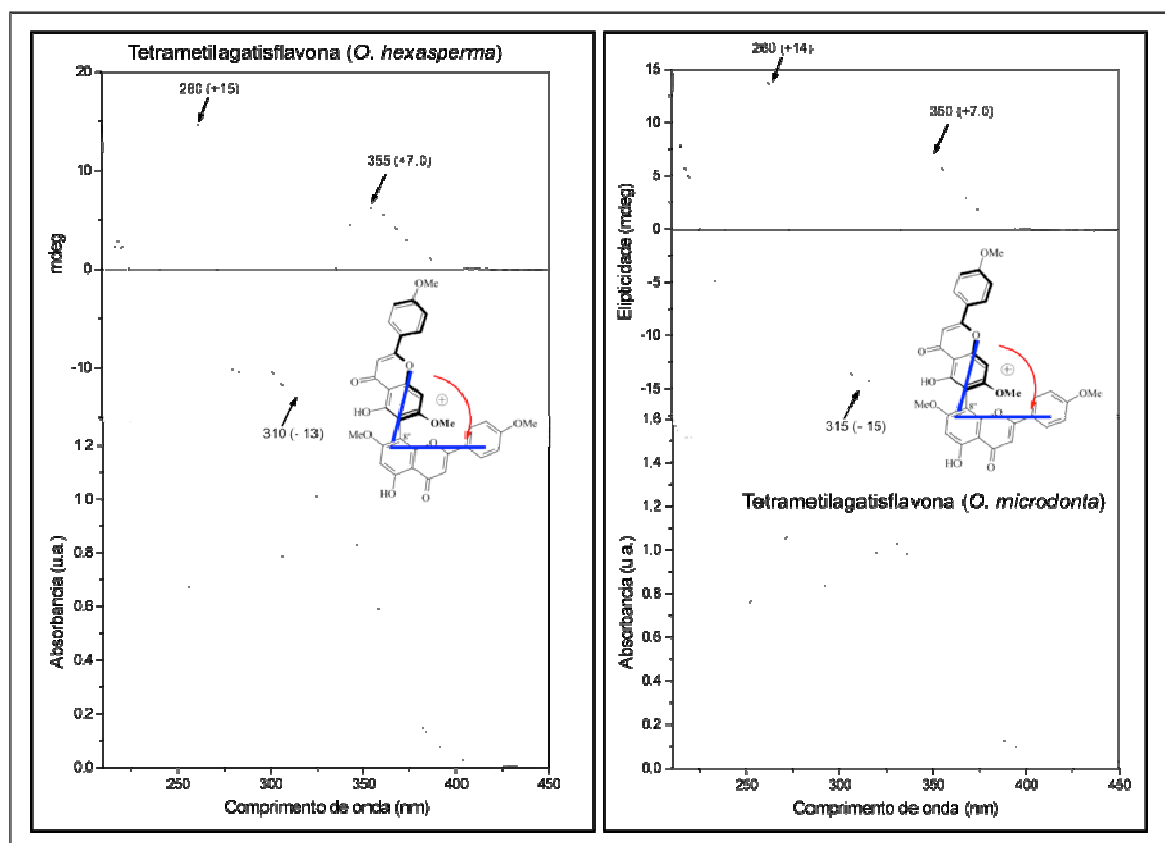


Figura 55. Curvas de Dicroísmo circular (CD) e Ultra violeta (UV) da biflavona, tetrametilagatisflavona (*Ouratea microdonta* e *Ouratea Hexasperma*).

V.5 Atividade moluscicida dos extratos de folhas de *Ouratea microdonta*

O gênero *Biomphalaria* pertence ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae (BRASIL, 2007). Esta espécie é considerada a principal hospedeira do *Schistosoma mansoni*, por apresentar ampla distribuição geográfica, ocorrendo em quase em todo território nacional. Além disso, sua distribuição está quase sempre associada à distribuição da esquistossomíase mansônica (Xistose, barriga d'água e doença dos caramujos) (BARBOSA, 1995; BRASIL, 2007).

Alguns ensaios realizados visando o controle do hospedeiro intermediário forneceram poucas informações sobre os impactos que substâncias promissoras possam representar para outras espécies de animais e plantas que vivem no mesmo ambiente natural dos moluscos. Muitas substâncias tóxicas ao ambiente, são consideradas promissoras, mas representam um risco ambiental considerável, caso estejam disponíveis para outros organismos em ambientes naturais (SANTOS *et al.*, 1990). Por conta disso, existe a necessidade de se realizem ensaios de toxicologia ambiental, relativos às substâncias potencialmente promissoras, visando uma avaliação estruturada das possíveis estratégias para o controle racional de hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (SAMBON, 1907), através do uso de produtos naturais oriundos da imensa diversidade botânica brasileira.

Alguns estudos para verificação de atividade moluscicida foram realizados com *Ouratea fieldingiana* (Ochnaceae) e “batiputá” (ROUQUAYROL, 1984; KLOSS & MCCULLOUGH, 1983; SOUSA *et al.*, 1970).

Devido a grande importância do controle de moluscos hospedeiros de *S. mansoni*, os resultados obtidos com outras espécies do gênero *Ouratea* e disponibilidade de colaboração para fazer testes de atividade moluscicida de extratos de plantas, resolveu-se fazer o estudo com extratos *O. microdonta*. O presente estudo tem por objetivos: avaliar o possível potencial moluscicida dos extratos de *O. microdonta* através de bioensaios com *B. glabrata* e verificar

os efeitos tardios dos moluscos sobreviventes, sobre a reprodução (número de massas ovíferas) e mortalidade.

V.5.1 Avaliação do potencial moluscicida de *Ouratea microdonta* (Ochnaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) e verificação de efeitos tardios nos moluscos sobreviventes aos bioensaios

Esta parte do estudo foi feita em colaboração com pesquisadores e professores do Instituto Biologia da UFRRJ-Departamento de Biologia Animal, Seropédica, Rio de Janeiro.

V.5.1.1. Criação e manutenção de linhagem de *Biomphalaria glabrata*

Os bioensaios foram realizados com espécimes descendentes, não infectadas, de moluscos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) linhagem BH (Belo Horizonte-Minas Gerais) criados em laboratório, obtidos junto ao Departamento de Malacologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos-RJ.

Os moluscos foram mantidos em aquários de vidro com água isenta de cloro por 24 horas, em temperatura ambiente. Adicionou-se nos aquários, mistura de 1 kg de argila, 500g de farinha de ostra e 1 colher de carbonato de cálcio, para suprir as necessidades dos moluscos de ferro e cálcio para hemolinfa e concha, respectivamente. Como alimentação receberam alface fresca “in natura”, previamente lavada em solução de ácido acético 0,05% V/V.

Para prevenção da colonização por protozoários, os aquários e os moluscos foram lavados periodicamente com solução de ácido acético 0,05% e posteriormente com água corrente.

V.5.1.2 Avaliação Moluscicida

Os experimentos foram realizados no laboratório de Ecologia de Helmintos localizado no Departamento de Biologia Animal – Anexo II (Pavilhão Hugo de Souza Lopes), Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

Os testes para verificação da atividade moluscicida consistem basicamente na introdução de substâncias ou extratos de plantas em um recipiente que contenha os moluscos, observando-se posteriormente o percentual de mortalidade dos moluscos com a planta testada.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995) recomenda um método padrão para o *screening* da atividade moluscicida em laboratório (MARSTON & HOSTETTMANN, 1991), porém na prática é muito difícil devido a diferentes fatores, entre eles o local de manutenção dos moluscos, e a qualidade da água (HOSTETTMANN, 1985). Neste estudo utilizou-se um método modificado e adaptado de Silva, 2002.

V.5.1.3 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções estoque contendo 100mg/L (100 ppm) dos extratos: Ouratea Microdonta Partição Metanol Folha (OMPM-F), Ouratea Microdonta Partição Clorofórmio Folha (OMPC-F), Ouratea Microdonta Partição Acetato de etila Folha (OMPAC-F) e Ouratea Microdonta Galho Metanol (OMGM).

V.5.1.4 Execução do teste

Os bioensaios foram realizados em triplicata, com moluscos de duas classes de diâmetro de concha: classe I (4-8 mm) e classe II (9-13 mm), os quais juntamente com seus respectivos controles foram mantidos sob condições experimentais. Para os ensaios cinco

moluscos de cada classe de tamanho foram transferidos para recipientes contendo 125 mL da solução estoque (100ppm) dos diferentes extratos e mais 3 mL de DMSO (utilizado para solubilizar os extratos), o número total de moluscos utilizados pode ser verificado na tabela 16 (página 112). O controle foi feito com 3mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água isenta de cloro. Nos testes preliminares, observou-se que a utilização do solvente DMSO nos extratos, não acarretou nenhuma reação aos moluscos, não influenciando, assim, nos resultados obtidos.

Depois de 24 h imersos nas soluções os moluscos foram transferidos para uma placa de Petri para verificação se respondiam aos estímulos provocados com espátulas e confirmação da mortalidade. Os moluscos sobreviventes foram transferidos para recipientes contendo água isenta de cloro e alimentados *ad libitum* com alface (*Lactuca sativa* L.) *in natura*, sendo observados em intervalos de 24, 48 e 72h. Procedimento idêntico foi adotado para o grupo controle. O número total de moluscos foi registrado e expresso em % de mortalidade.

Os moluscos sobreviventes aos bioensaios com os extratos **OMPMF** e **OMGM** foram separados em aquários de acordo com os extratos utilizados e as classes de tamanho.

Estes moluscos foram observados ao longo de 48 dias e durante este período foram alimentados *ad libitum* com alface *in natura* previamente lavada em solução de ácido acético 0,05% v/v. Os aquários eram examinados com intervalos de seis dias para a quantificação de massas ovígeras e a remoção dos moluscos mortos.

Tabela 16. Número de espécimes de *Biomphalaria glabrata* utilizados nos bioensaios com *O. microdonta*.

Concentração mg/L	Extrato	Classe de tamanho dos moluscos (mm) *	Moluscos/ Recipiente	Triplicata	Moluscos/ concentração	
100 ppm	OMGM	I	5	X 3	15	
		II	5	X 3	15	
	OMPM-F	I	5	X 3	15	
		II	5	X 3	15	
	OMPC-F	I	5	X 3	15	
		II	5	X 3	15	
	OMPAc-F	I	5	X 3	15	
		II	5	X 3	15	
	Controle		I	5	X 1	5
			II	5	X 1	5
Total					130 moluscos	

* Classe I: 4-8 mm e Classe II: 9-13 mm

V.5.1.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados para cada concentração testada e também nas classes de tamanho dos moluscos que foram analisados separadamente, por extrato e comparativamente, entre os extratos, utilizando-se os testes de análise de variância (ANOVA), e teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas, pelo programa Graph Pad Instat ®.

V.5.1.6 Resultados

Os resultados obtidos nos bioensaios realizados com espécimes de *B. glabrata* das classes de tamanho de concha I e II para verificação de atividade moluscicida de *O. microdonta* no período de 72 horas podem ser verificados na Tabela 17 (página 113).

Em até 48h, o extrato **OMGM** determinou 13,4% de mortalidade para os moluscos da classe I e 40,0% para os moluscos da classe II. Com o extrato **OMPM-F** verificou-se 6,7% de

mortalidade para os moluscos da classe I. Entretanto, não foi verificada mortalidade para os moluscos da classe II. O extrato **OMPC-F** determinou 13,3% para os moluscos da classe I e 6,7% de mortalidade para os moluscos da classe II. Já com o extrato **OMPac-F** verificou-se 6,7% de mortalidade para os moluscos da classe I. Porém, não se observou mortalidade para os moluscos da classe II. Estes resultados foram considerados inferiores ao padrão estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993) que estabelece uma mortalidade acima de 90% para que uma planta seja considerada com potencial moluscicida nas concentrações de 20ppm para substâncias puras e 100ppm para extratos.

Tanto os extratos **OMPC-F** e **OMPac-F**, quanto os extratos **OMGM** e **OMPM-F**, não apresentaram elevados percentuais de mortalidade, nas primeiras 24 horas de observação. O que motivou a continuação das observações por um período de tempo maior para verificar a possibilidade de efeitos tardios nos moluscos sobreviventes aos bioensaios.

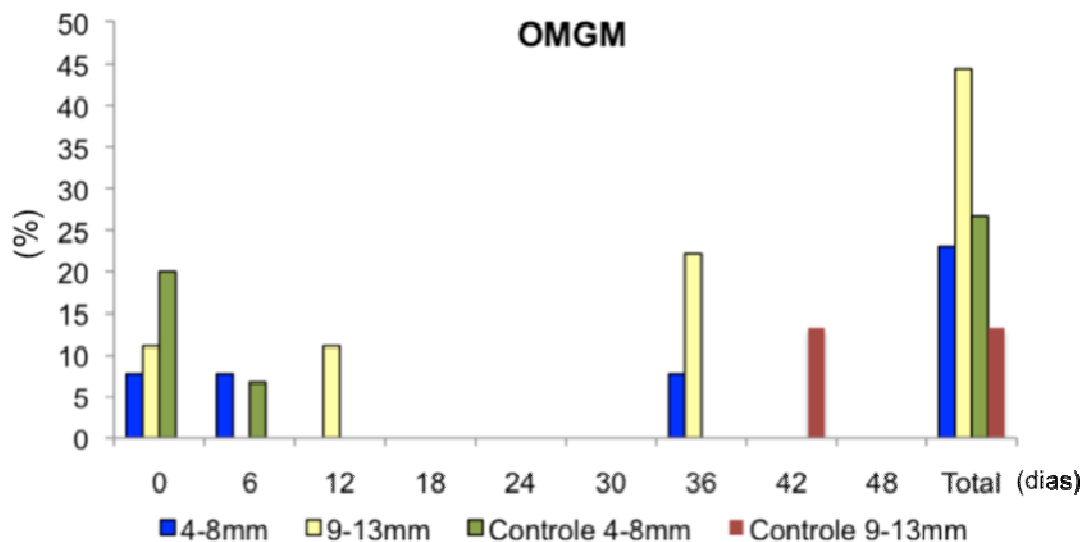
Tabela 17. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos de *O. microdonta* durante a realização dos bioensaios.

Tempo (h)	Extratos									
	Controle		OMGM		OMPM-F		OMPC-F		OMPac-F	
	Classes de diâmetro de concha (mm)**									
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
24	0,0	0,0	6,7	13,3	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0
48	0,0	0,0	6,7	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0	6,7	6,7	6,7	0,0
Total (%)	0,0	0,0	13,4	40,0	6,7	0,0	13,4	6,7	6,7	0,0

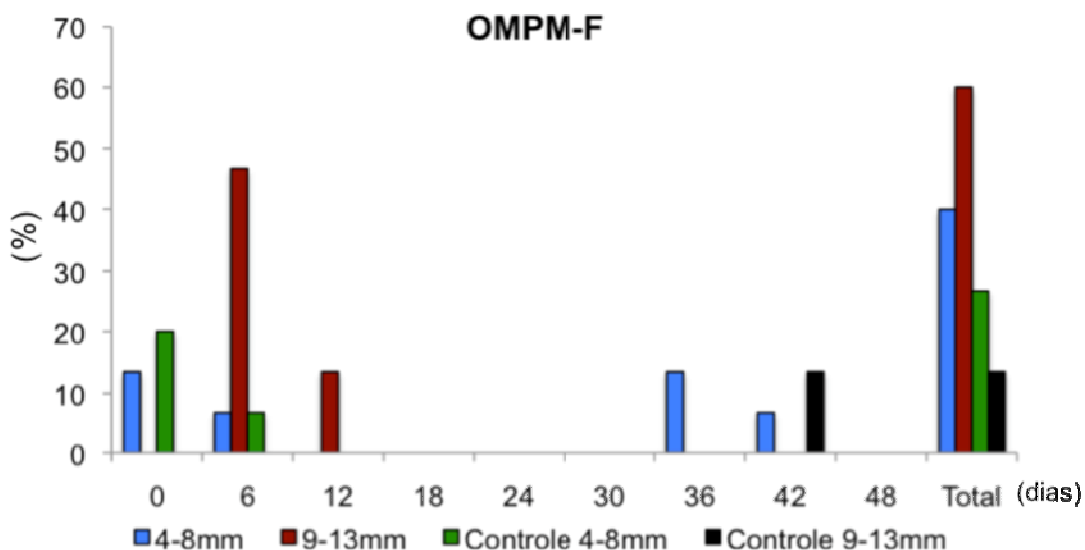
** Classe I – 4-8 mm e Classe II – 9-13 mm

Os efeitos tardios dos extratos **OMGM** e **OMPM-F** sobre a taxa de mortalidade dos moluscos sobreviventes aos bioensaios agrupados nas duas classes de tamanho podem ser

verificados nas Figuras 56 e 57 (página 114). Os maiores percentuais de mortalidade, ao final do período de observação, foram verificados entre os moluscos da classe II (9-13mm) para ambos os extratos testados.



Figuras 56. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* (Classe I e II) exposta ao extrato OMGM e grupo controle durante 48 dias de observação.



Figuras 57. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* (Classe I e II) exposta ao extrato OMPM-F e durante 48 dias de observação.

A análise estatística da taxa de mortalidade tanto por classe de diâmetro de concha quanto por extrato utilizado não evidenciou diferença significativa (Tabelas 18 e 19, página

115). Esses resultados são semelhantes aqueles obtidos por Xavier (2010) a partir da observação, durante 60 dias, de moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae).

Tabela 18. Análise estatística por classe de diâmetro de concha da taxa de mortalidade dos moluscos sobreviventes ao bioensaio durante 48 dias de observação.

Tratamentos	Diâmetro da concha	
	Classe I (4-8mm)	Classe II (9-13mm)
	X ± SD	X ± SD
OMGM	2,57 ± 3,850 ^a	4,93 ± 8,064 ^a
OMPM-F	4,44 ± 5,764 ^a	6,67 ± 15,644 ^a
Controle	2,97 ± 6,761 ^a	1,48 ± 4,433 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si

Tabela 19. Análise estatística por extrato da taxa de mortalidade dos moluscos sobreviventes ao bioensaio durante 48 dias de observação.

Diâmetro da concha	Extratos utilizados	
	OMCM	OMFPM
	X ± SD	X ± SD
Classe I (4-8 mm)	2,57 ± 3,850 ^a	4,42 ± 5,726 ^a
Classe II (9-13 mm)	2,97 ± 6,761 ^a	2,97 ± 6,761 ^a

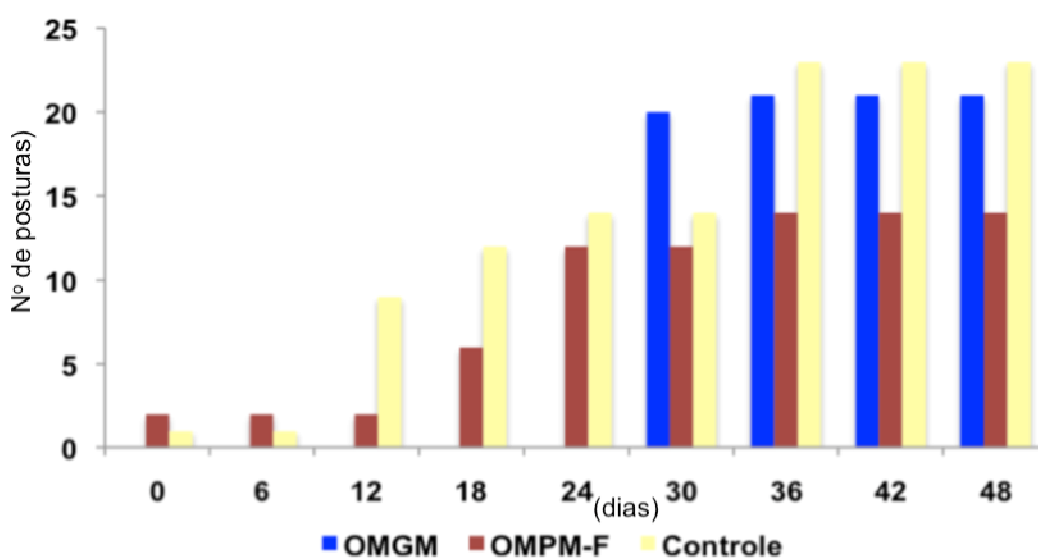
Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si.

A comparação dos resultados apresentados neste trabalho com aqueles obtidos por Xavier (2010) é relevante porque, embora sejam plantas de famílias diferentes, não foram encontrados trabalhos com o enfoque para a atividade moluscicida de *O. microdonta*, tampouco a observação tardia, de moluscos submetidos aos extratos dessa espécie vegetal. Dessa forma, o presente estudo se constitui em um trabalho pioneiro com *O. microdonta* visando o controle de *B. glabrata*.

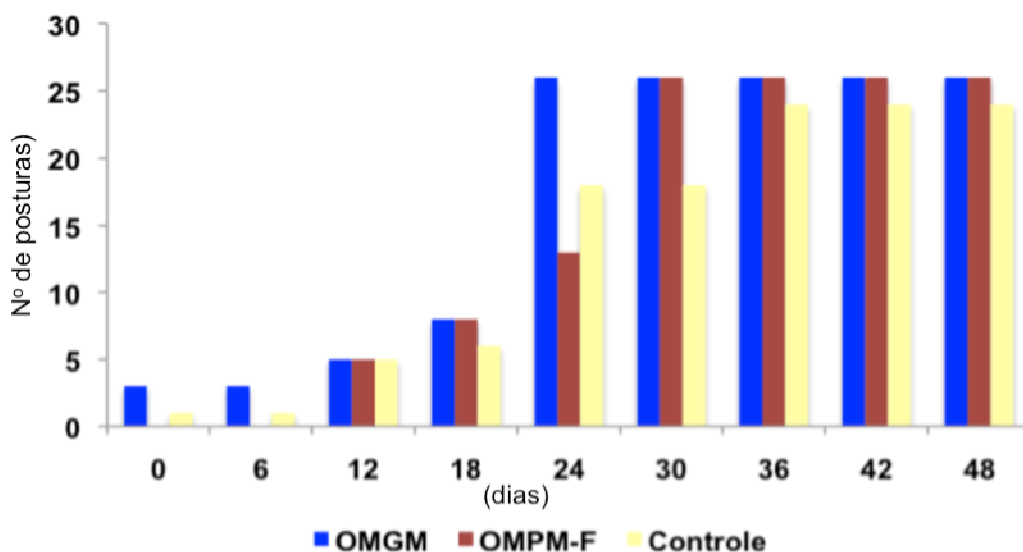
De acordo com a figura 58 (página 116), os moluscos da classe I expostos ao extrato **OMPM-F** realizaram um número menor de posturas quando comparados aos moluscos expostos ao extrato **OMGM** e do grupo controle. Os moluscos submetidos ao extrato

OMGM apresentaram oviposição tardia, somente a partir do 30º dia de observação, em relação aos moluscos submetidos ao extrato **OMPM-F** e do grupo controle.

Na Figura 59 (página 116), observa-se que os moluscos da classe II do grupo controle realizaram um número menor de posturas quando comparados aos moluscos submetidos aos extratos **OMGM** e **OMPM-F** e que os moluscos submetidos ao extrato **OMFM-F** só realizaram posturas a partir do 12º dia de observação.



Figuras 58. Números de posturas realizadas por *Biomphalaria glabrata* (classe I) expostas aos extratos **OMGM**, **OMPM-F** e grupo controle durante 48 dias de observação.



Figuras 59. Números de posturas realizadas por *Biomphalaria glabrata* (classe II) expostas aos extratos **OMGM**, **OMPM-F** e grupo controle durante 48 dias de observação.

A análise estatística não evidenciou diferença significativa para o número de posturas realizadas pelos moluscos sobreviventes aos bioensaios ao longo de 48 dias de observação tanto por classe de diâmetro de concha quanto por extrato utilizado; tão pouco dos grupos testados com o grupo controle, conforme verificado na tabela 20 (página 117).

Tabela 20. Número de massas ovígeras liberadas por *B. glabrata* sobreviventes aos bioensaios com *O. microdonta* durante 48 dias de observação.

Tratamentos	Número de massas ovígeras/Diâmetro da concha **	
	Classe I	Classe II
	X ± SD	X ± SD
OMGM	9,22 ± 10,940 ^{a,A}	16,57 ± 11,293 ^{a,A}
OMPM-F	8,67 ± 5,568 ^{a,A}	14,44 ± 11,642 ^{a,A}
Controle	13,33 ± 8,703 ^{a,A}	13,44 ± 10,076 ^{a,A}

** Classe I – 4-8 mm e Classe II – 9-13 mm

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

Devido à escassez de trabalhos científicos envolvendo a utilização de *O. microdonta* em bioensaios para a avaliação de atividade moluscicida, utilizou-se artigos que propuseram o mesmo objetivo do presente estudo, no entanto, utilizando outras espécies vegetais.

Biomphalaria glabrata quando submetida ao extrato hexânico de *Anacardium occidentale* L. (castanha-de caju) apresenta redução de 2,5 a 7 vezes o número de massas ovígeras/molusco, em relação ao grupo controle (SOUZA, 1992).

Mello-Silva (2005) utilizou a CL₅₀ de *E. splendens* var. *hislopii* para avaliar a biologia reprodutiva de *B. glabrata* sobrevivente ao bioensaio, durante cinco semanas. Verificando uma redução de 52,01% no número total de massas ovígeras do grupo tratado para o grupo controle.

Analogamente, aos trabalhos de Souza (1992) e Mello-Silva (2005), o presente estudo verificou que a partir, do 36º dia, que o grupo controle da classe I, apresentou maior número

de massas ovíferas, quando comparado aos grupos testados. Embora, os resultados não tenham apresentado diferença significativa.

Com os moluscos da classe II, verificaram-se os maiores números de massas ovíferas, quando comparados ao grupo controle, de mesma classe de tamanho. Resultados semelhantes foram obtidos por Corrêa (2006), que avaliou a biologia reprodutiva de *B. glabrata* após 24h de observação, em bioensaios com extratos a 100ppm obtido com o pó da casca do caule de *Pterodon emarginatus* (Vogel) e *Croton urucurana* (Baill). Neste trabalho realizado (CORRÊA, 2006) os moluscos expostos ao bioensaio apresentaram um maior número de massas ovíferas durante as oito semanas de observação, quando comparados com o grupo controle.

V.5.1.7 Conclusões

Os extratos de **OMGM** (Ouratea microdonta Galho Metanol) e **OMPM-F** (Ouratea microdonta Partição Metanol Folha) ao longo de 72 horas, apresentaram baixa atividade moluscicida. Foi verificada pequena influência dos extratos sobre o percentual de mortalidade, e reprodução (número de massas ovíferas) dos moluscos sobreviventes aos bioensaios. Contudo, este é o primeiro registro da utilização desta espécie vegetal em bioensaios para avaliação da atividade moluscicida e novos testes com outras partes da planta precisam ser realizados.

V.6 Artigos publicados da *Ouratea microdonta*

CARVALHO, M. G. DE; ALBUQUERQUE, L. R. M.; MENDES, L. DE S.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (OCHNACEAE). *Rev. Latinoam de Quimica*, v. 63, n. 1, p. 71, 2008.

ANEXOS

Anexo C. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of <i>Ouratea microdonta</i> Engl. (Ochnaceae).....	121
---	-----

BIFLAVONOIDS AND TERPENOIDS ISOLATED FROM THE LEAVES OF *Ouratea microdonta* Engl. (OCHNACEAE)

MÁRIO G. DE CARVALHO^{a*}, LUIZ ROBERTO M. DE ALBUQUERQUE^a, LUCIANE DE S. MENDES^a, GISELLE M. S. P. GUILHON^b AND SILVANE T. RODRIGUES^c

(Received Septiembre 2008; Accepted October 2008)

ABSTRACT

From the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae) sitosterol, stigmasterol, lupeol, α - and β -amyrin, 4-methoxy-2,5-dihydroxy-benzoic acid, and the biflavonoids, agathisflavone, 7^o-methyl-agathisflavone, and amentoflavone were identified. Their structures were established by NMR spectral data analysis, comparison with literature data and with authentic samples.

Key words: *Ouratea microdonta*, Ochnaceae, biflavonoids, terpenoids.

RESUMEN

De las hojas de *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae) fueron aislados sitosterol, estigmasterol, lupeol, α - y β -amyrina, ácido 4-metoxi-2,5-dihidroxi-benzoico, y los biflavonoides, agatisflavona, 7^o-metil-agatisflavona, y amentoflavona. Las estructuras fueron establecidas usando interpretación de datos espectrales de RMN así como por comparación con los datos de la literatura y con una muestra autentica.

INTRODUCTION

Previous phytochemical and pharmacological investigations of *Ouratea* species (Ochnaceae) have shown the presence of terpenoids, isoflavonoids, flavonoid glycosides and more frequently biflavonoids which are considered as chemical markers for this genus (Suzart *et al.*, 2007). DNA topoisomerase inhibition, cytotoxic and antitumoral activities of biflavonoids (Carvalho *et al.*, 2002; Grynberg *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 2007) have been described

as well as other pharmacological activities of extracts from *Ouratea* species (Cortes *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2001; Sampaio and Oliveira, 1975). This paper describes the first phytochemical study of *Ouratea microdonta*, as an additional source of biflavonoids, that shows antitumor activity on human cancer cell lines (Daniel *et al.*, 2007; Grynberg *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002).

*Departamento de Química, ICE-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 KM. 07, 23890-000-Seropédica-RJ, Brazil; Fone/fax:(21)2682.2807; e-mail: mgeraldo@ufrj.br

^bFaculda de de Química -ICEN, Universidade Federal do Pará, Belém-PA-Brazil,

^cEmbrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

EXPERIMENTAL

General Procedure

Melting points have not been corrected. ^1H (200.0 MHz) and ^{13}C (50.3 MHz) NMR spectra were recorded on a Brüker AC 200 spectrometer using DMSO-d_6 , D_3COD or CDCl_3 with TMS as internal standard. Column chromatography with silica gel (Vetec and Aldrich 0.05-0.20 mm) and Sephadex LH-20 (Sigma, USA); for silica gel TLC plates w/UV254, aluminum backed (Merck and Sorbent) were used to analyze the fractions collected from column chromatography (CC) with visualization under UV (254 and 366 nm), with $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%), Lieberman-Burchard and/or Godin reagents or exposure to iodine vapor.

Processing of the Plant Material

The leaves and branches of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae) were collected in the Marajó Island, municipality of Soure, State of Pará, Brazil. It was identified by Silvano T. Rodriguez, a voucher specimen (N^o IAN-21438) was deposited at the herbarium IAN of Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brazil.

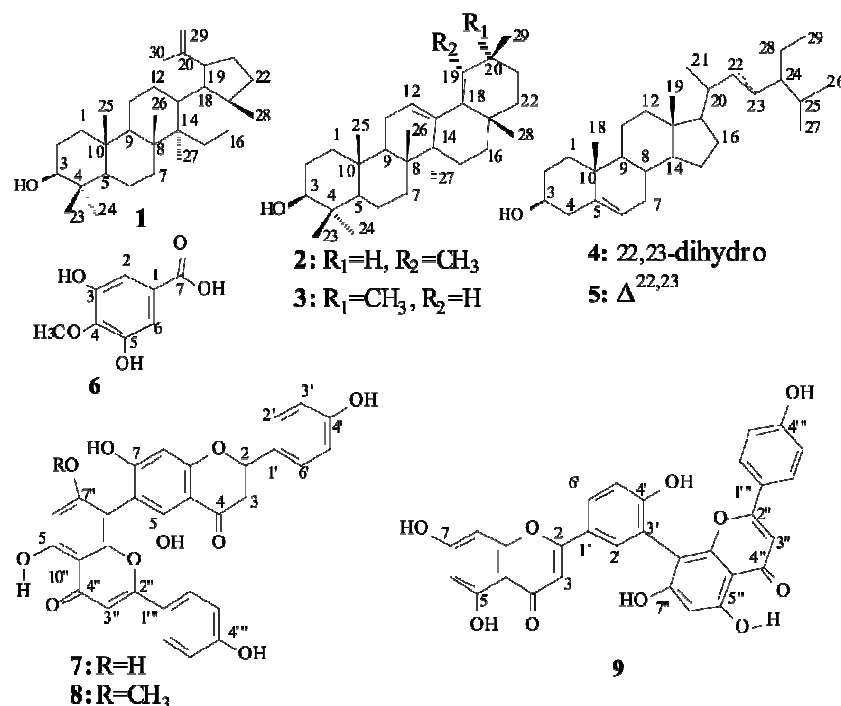
The dried and powdered leaves (1.0 Kg) were extracted with methanol at room temperature and the solvent was removed under vacuum furnishing a residue named OMF (250.0 g). The crude methanol residue (200.0 g) was submitted to CC on silica gel with C_6H_{12} , CHCl_3 , AcOEt and MeOH yielding the fractions OMFH (3.0 g), OMFC (20.6 g), OMFAc (6.5 g) and OMFm (60.0 g), respectively. These fractions were analyzed by TLC plate and fractionated on silica gel and/or Sephadex LH-20 column using adequate eluents. The subfractions analysis let us to identify steroids, triterpenes, a benzoic acid derivative and three biflavonoids. The fraction OMFH was chromatographed on a silica gel column eluted with hexane and increasing the polarity with CHCl_3 to

Hexane: CHCl_3 (7:3). Twenty fractions were collected and analyzed by TLC plate. Fractions 5-10 furnished a mixture of lupeol, α - and β -amyrin (**1** + **2** + **3**, 30.5 mg, containing **3** as principal component) and the fraction 11-13 yielded only β -amyrin (**3**, MP 256-258 °C, 50.6 mg). OMFC was fractionated on a silica gel column using mixtures of hexane methanol in increasing polarity to methanol 100 %. The first fractions (2-10) yielded a precipitate identified as a mixture of sitosterol and stigmasterol (**4**+ **5**, 20.0 mg); fractions 12-15 was crystallized from methanol to yield the triterpene lupeol (**1**, 10.0 mg); fractions 20-25 yielded a gum identified as 4-methoxy-2,5-dihydroxy-benzoic acid (**6**, 50.6 mg). Fraction OMFAc was fractionated on a silica gel column using mixtures of CHCl_3 and MeOH; forty fractions were collected and analyzed by TLC plate. Three groups of them (7-10, 13-20, 25-30) were revealed with AlCl_3 indicating the presence of flavonoids. Those groups of fractions were filtered on Sephadex LH20 and yielded biflavonoids, agathisflavone (**7**, 15.0 mg), 7"-methyl-agathisflavone (**8**, 20.0 mg) and amentoflavone (**9**, 12.0 mg), respectively. The same procedure was used with the fraction OMFm and the first fractions yielded agathisflavone (**7**).

RESULTS AND DISCUSSION

The chromatographic fractionation of the extracts from the leaves of *Ouratea microdonta* let to isolation and identification of the mixture of lupeol α - and β -amyrin (**1** + **2** + **3**), a mixture of sitosterol and stigmasterol (**4** + **5**), 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid (**6**) and three biflavonoids, agathisflavone (**7**), 7"-methyl-agathisflavone (**8**) and amentoflavone (**9**). The structures of the substances were proposed from ^1H and ^{13}C NMR spectra analysis.

The ^1H NMR spectrum of the mixture of triterpenes (**1-3**) shows signals at δ_{H} 5.19 and 5.15 (t, H-12, **2** and **3**), 4.68 and 4.57



(br s, of H-29a and H-29b, **1**), 3.18 (m, H-3, **1+2+3**), 2.39 (m, H-18 and 19, **1+2+3**), 1.91 (m, H-11, **2+3**), 1.67 (s, H-30, **1**) and signals at δ_{H} 1.26 and 1.14-0.74 of methyl groups. The analysis of ^{13}C NMR spectra (BBD and DEPT) of compounds **1-3** using the same procedure of Olea and Roque (1990), the comparison with spectra data of literature for these substances (Ahmat and Atta-ur-Rahman, 1994; Sobrinho *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 1994) and the analysis by TLC, let us to confirm the mixture of these compounds.

The ^1H NMR spectrum of **4 + 5** shows signals at δ_{H} 5.37 (br d, H-6, **4** and **5**), 5.15 (m, H-22, 23, **5**), 3.50 (m, H-3, **4** and **5**), 2.20-1.0 (m), 1.01 (s), 0.94 (d), 0.88-0.77 (m), 0.70 (s). A sample of the mixture **4 + 5** was compared by TLC with these substances isolated from *Jatropha elliptica*, and from *Ouratea floribunda* (Goulart *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1994).

The ^{13}C NMR spectra of **6** (in DMSO- d_6) shows signals at δ_{C} 186.8 (CO_2H), 157.3 ($=\text{C}-\text{Ox}2$), 152.3 ($=\text{C}-\text{O}$), δ_{CH} 107.3 ($=\text{CHx}2$) and δ_{CH_3} at 56.7 ($\text{H}_3\text{C}-\text{O}$) compatible with benzoic acid containing two hydroxyl and one methoxyl groups. The signals detected at δ_{H} 5.9 (s, 2H), 3.8 (s, 3H) in the ^1H NMR let us to propose the structure of 3,5-dihydroxy-4-methoxy-benzoic acid for **6** that were similar to those of literature (Saxena *et al.*, 1984). The difference in those data is according to the solvents effects (Scott, 1972; Saxena *et al.*, 1984). The anti-angiogenic activity in endothelial cells of this compound, known as 4-OMGA has been previously reported (Saxena *et al.*, 1984).

The analysis of ^1H NMR (including $^1\text{Hx}^1\text{H}-\text{COSY}$) and ^{13}C NMR (BBD and DEPT) spectra of **7**, let us to identify two AA'BB' systems from the signals at δ_{H} 7.89 (d, 8.0), 6.94 (d, 8.0), 7.54 (8.4), 6.73 (8.4) and at δ_{CH} 128.9, 116.1, 128.3, 116.1. The δ singlet at

δ_{H} 13.54 and 13.31 (HO-5), 6.34 (1H), 6.58 (1H) and 6.66 (2H) in the ^1H NMR spectrum and the signals at δ_{CH} 102.9 (C-3), 103.0 (C-3), 93.8 (C-8) and 98.9 (C-6) in the ^{13}C NMR spectra, were compatible with the structure of two flavone moieties with the link C-6→C-8 (Suzart *et al.*, 2007). These data and the additional signals of quaternary carbons detected in the ^{13}C NMR spectra were compared with those of the compound isolated from *Ouratea hexasperma* (Daniel *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 1999) let us to identify **7** as agathisflavone. Twenty mg of **7** was dissolved on methanol and excess of diazomethane solution in ether was added to obtain the tetramethyl derivative **7a** [δ_{H} : 13.11 (s, 1H), 13.06 (s, 1H), 7.90 (d, 8Hz, 2H), 5.52 (d, 8Hz, 2H), 7.05 (d, 8Hz, 2H), 6.85 (d, 8Hz, 2H), 6.67 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.92, 3.86, 3.82, 3.80 (4xs, 3H)]. This derivative was used to confirm the proposed biflavone structure.

The biflavone **8** show the NMR spectra similar to those of **7** containing an additional signal of methoxyl group at δ_{H} 3.88. These data and mp 226-228 °C were identical to those of 7"-methyl-agathisflavone, isolated from *Ouratea hexasperma* (Daniel *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 1999).

The structure of **9** was proposed by the analysis of ^1H and ^{13}C (BBD and DEPT) NMR spectra. The ^1H NMR spectra presented two singlets at δ_{H} 13.05 and 12.98, of HO-5 of flavone, two doublets at 7.57 and 6.78 ($J = 8.6$ Hz, 2H), of AA'BB' system, one ABC system represented by the signals at 7.99 (br d, 8.0Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.12 (d, 8.0Hz, 1H), two hydrogen meta coupled [δ_{H} 6.17 and 6.45 (d, 2Hz)] and three singlets of 1H at δ_{H} 6.36, 6.68, 6.72. These data and the carbon-13 chemical shifts were compared with those of biflavonoids isolated from *Ouratea semiserrata* and were identical to amentoflavone (Velandia *et al.*, 2002).

These proposed structures were confirmed by comparison with authentic sample of agathisflavone, 7"-metilagathisflavone and amentoflavone by silica gel TLC plate using $\text{CHCl}_3/\text{H}_3\text{CCOCH}_3$ (7.5:2.5) and $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (7:1) as eluents.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CNPq, CAPES and FAPERJ for scholarship and financial support.

REFERENCES

- Ahmad, V.U. and Atta-ur-Rahman (1994) Pentacyclic triterpenes, vol. 2 in Handbook of Natural Products Data. Elsevier, N.Y. pp 21, 717.
- Carvalho, M.G. de, Velandia, J.R., Oliveira, M.C.C de, Echevarria, A., Braz-Filho, R., Grynborg, N.F. (2002) Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumour Activities of Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochanceae). In Phytochemical and Pharmacology II of the Series "Recent Progress in Medicinal Plants", Majumdar, DK, Govil, JN, Singh, VK eds., SCI Tech Publishing LLC: Texas, USA v.8, pp 77-92.
- Cortes, S.F., Veladares, J.Y., Oliveira, A.B. de, Lemos, S.V., Barbosa, M.P.T., Braga, F.C. (2002) Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proantho-cianidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata*. *Planta Med.* **68**: 412-415.
- Carvalho, M.G. de, Carvalho, G.J.A. de and Braz-Filho, R. (2000) Chemical Constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Atranorin and its New Acetyl Derivative, *J.Braz. Chem. Soc.* **11**: 143-147.
- Daniel, J.F. de S., Alves, C.C.F., Grivicich, I., Rocha, A.B. da, Carvalho, M.G. de (2007) Anti-

CAPÍTULO VI
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *SAUVAGESIA*
***ERECTA* (OCHNACEAE)**



Fonte: disponível em: www.Plantsystematics.org

VI.1 Revisão de literatura

VI.1.1 Aspectos botânicos e generalidades sobre a características do gênero *Sauvagesia*

A espécie do gênero *Sauvagesia L.* é pantropical e pertence a família da *Ochnaceae*. O gênero *Sauvagesia L.* inclui cerca de 37 espécies, sendo que 20 ocorrem no Brasil (Sastre 1997). As espécies deste gênero possuem geralmente galhos vermelhos, com folhas lanceoladas e com margem nitidamente serrada, estipulas axilares, opostas muito ciliadas, as flores apresentam-se isoladas, alvas nas cores branca e rosa e seus frutos possuem forma de cápsulas (SALVADOR *et al.*, 2005 e 2010).

Sauvagesia erecta (Figura 60, página 127) é conhecida popularmente como “Erva de São Martinho” sendo empregada na medicina popular como adstringente, contra oftalmias, diarreias, servindo também como diurético, e comumente utilizado também na forma de infusão contra a tosse, bronquite e resfriados.

Esta planta possui caule sub-cilíndrico, glabro; folhas brevíssimo pecioladas, inteiras, lanceoladas, agudas, serradas, membranáceas, espessadas na margem, de 9-22 mm de comprimento e 2-8 mm de largura; estípulas opostas muito ciliadas; flores isoladas, de 2-3 na axial da folhas; flores alvas, com pedicelos de 6-12 mm de comprimento, glabros e curvos, 5 sépalas ovaladas, com 3-5 mm de comprimento membranáceas (SALVADOR *et al.*, 2005 e 2010).

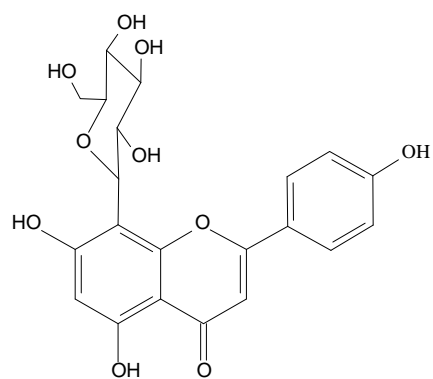
A realização do estudo químico desta espécie poderia revelar a presença de flavonóides e biflavonóides, já que a família *Ochnaceae* possui um grande potencial para bioprodução desta classe de compostos, além de outras substâncias com importantes atividades farmacológicas.

Até o momento na literatura existe apenas um trabalho sobre o estudo químico do espécie em questão (ALEXIS *et al.*, 1971) e neste foram identificados os flavonoídes glicosilados; vitexina (I), vicenina-2 (II), isoorientina (III) e orientina (IV) (Figura 61, página

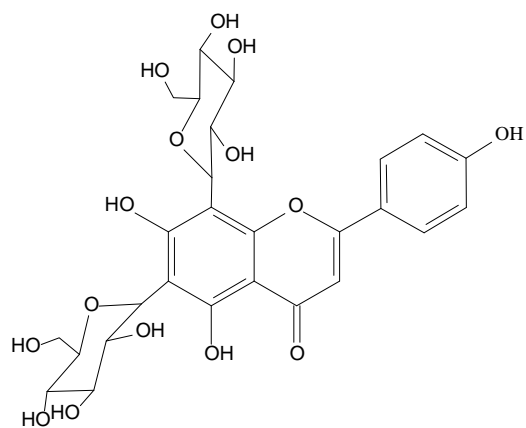
128). Estes compostos foram isolados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e identificados comparando-se os fatores de retenção, por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), das substâncias isoladas com padrões puros e espectrofotometria de ultra violeta. Desta forma preveu-se realizar o primeiro estudo fitoquímico desta espécie, utilizando técnicas cromatográficas e análise por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e CG-EM das estruturas dos constituintes químicas isolados de *Sauvagesia erecta*.



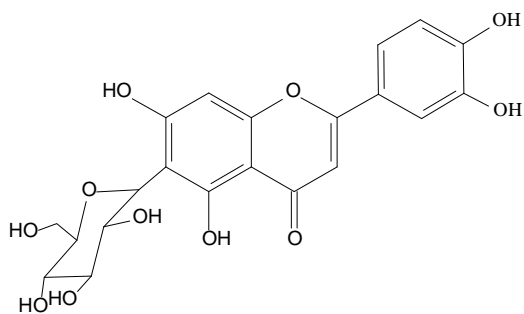
Figura 60. *Sauvagesia erecta* (Fontes: Disponível em: [www. Plantsystematics.org](http://www.Plantsystematics.org) e www. scoth.ots.unicamp.br)



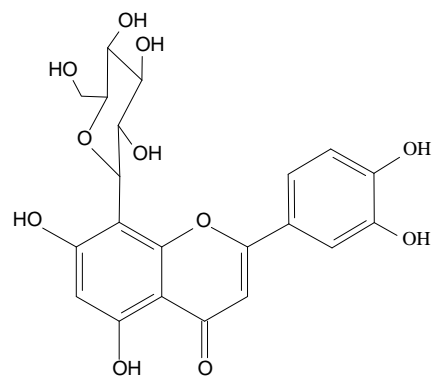
I. Vitexina



II. Vicenina-2



III. Isoorientina



IV. Orientina

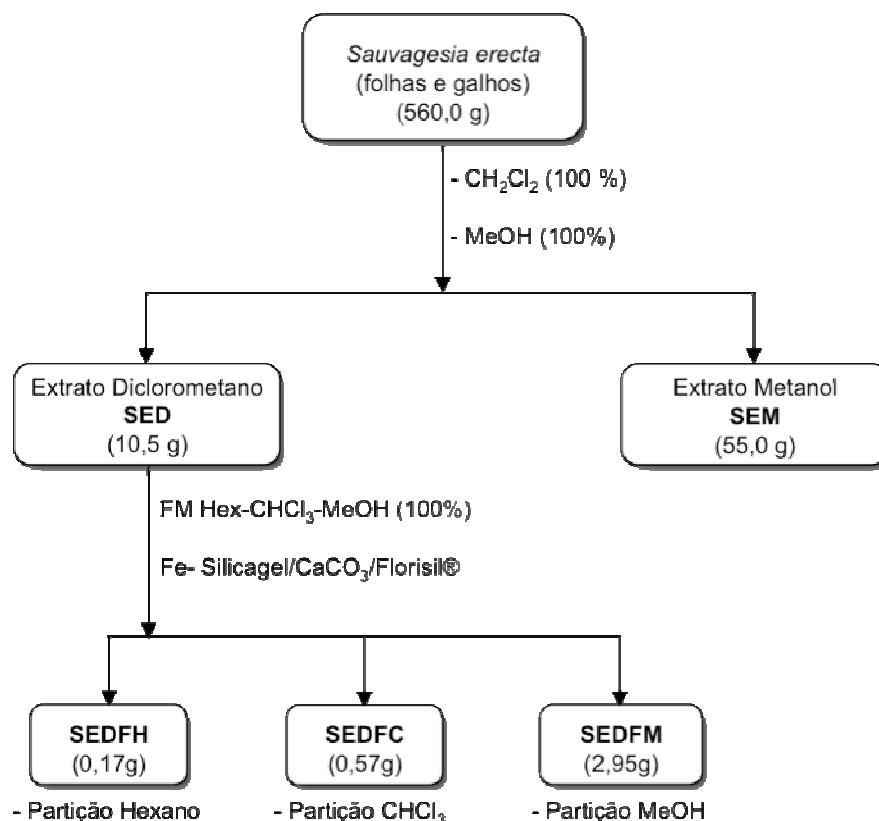
Figura 61. Constituintes químicos identificados em *Sauvagesia erecta*.

VI.2 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Sauvagesia erecta*

O espécime de *Sauvagesia erecta* utilizado neste estudo foi coletado no município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, e excicata (n° 7672) encontra-se depositada no Herbário OUPR-UFOP.

Neste estudo foram utilizadas o caule e folhas da espécie. As partes secas e moídas (560,0g) foram submetidas à extração por maceração dinâmica com diclorometano e metanol. A remoção do solvente foi feita através de destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a temperatura de 60 °C, obtendo-se os resíduos denominados **Sauvagesia Erecta Diclorometano, SED** (10,5g) e **Sauvagesia Erecta Metanol, SEM** (55,0g).

O extrato bruto **Sauvagesia Erecta Diclorometano (SED)** (10,5g) foi filtrado em um funil de separação de 2,0 L empacotado com sílicagel, CaCO₃, e Florisil®, sendo eluído em com hexano, clorofórmio e metanol, em ordem de polaridade crescente fornecendo respectivamente, as partições: **Sauvagesia Erecta Diclorometano Folhas Hexano, SEDFH** (0,17g), **Sauvagesia Erecta Diclorometano Folhas Clorofórmio, SEDFC** (0,57g), **Sauvagesia Erecta Diclorometano Folhas Metanol, SEDFM** (2,95g). O processo resumido de obtenção dos extratos, e fracionamento do extrato **SED** pode ser melhor visualizado no esquema 11 (página 130).



Esquema 11. Preparo e partição dos extratos de *Sauvagesia erecta*.

VI.2.1 Processamento da Partição SEDFC

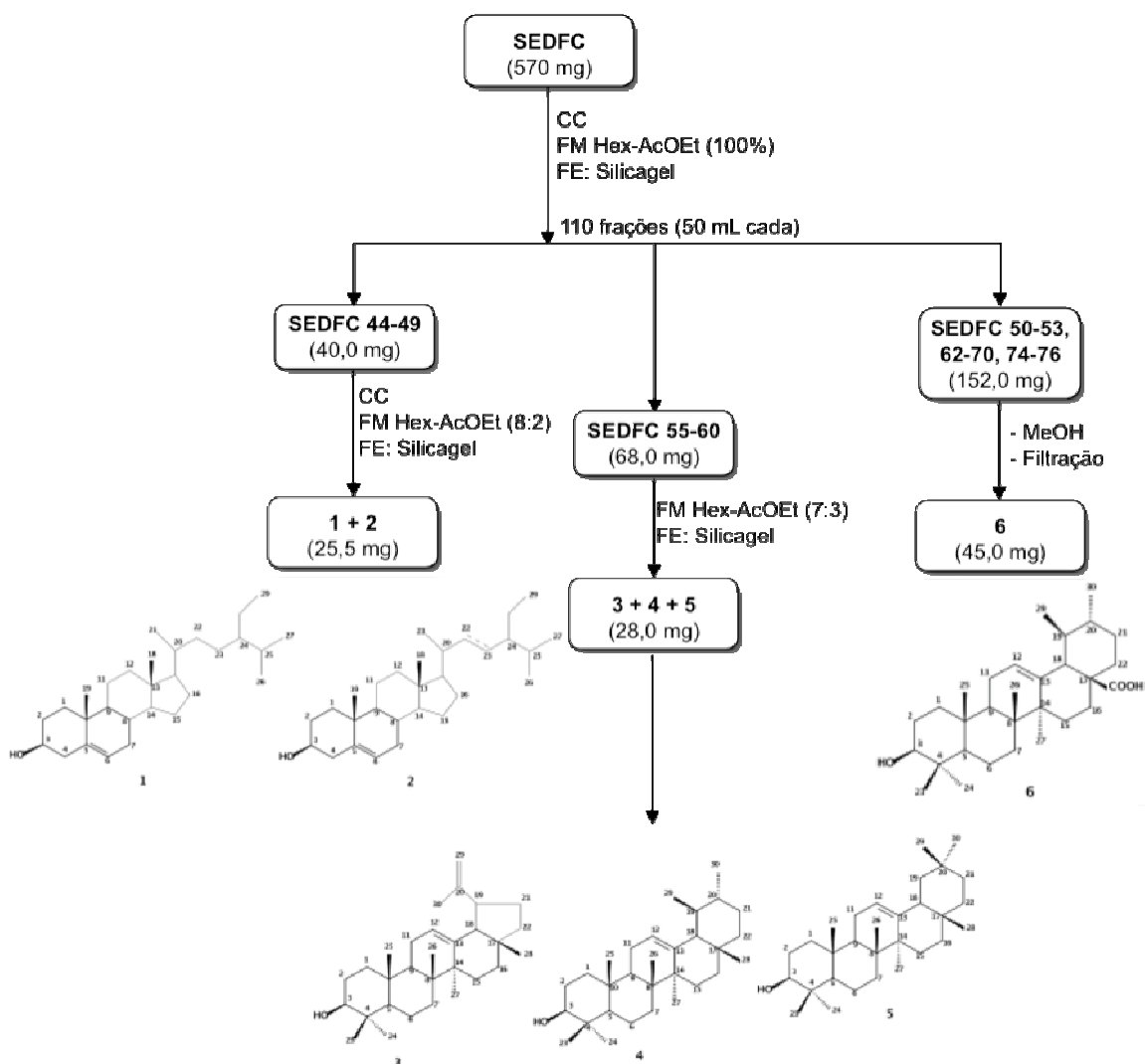
A partição **SEDFC** (0,57g) foi fracionada em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel, sendo eluída com gradientes de hexano e acetato de etila, começando com hexano 100% até acetato de etila 100%, fornecendo 110 frações de 50 mL cada. Estas foram analisadas por CCDA e reveladas com reagente Liebermann-Burchard apresentando coloração variando de rosa a roxo que caracteriza a presença de terpenos nas frações. Após esta análise as frações foram reunidas em novas subfrações levando-se em conta, o Fator de Retenção e a coloração apresentada.

A subfração **SEDFC 44-49** (40,0 mg) foi purificada em uma pequena coluna com sílica gel eluída com uma mistura de hexano/acetato de etila (8:2), fornecendo um sólido transparente, solúvel em CHCl_3 , identificado como sendo uma mistura dos triterpenos sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**) (25,5 mg), sendo que sua identificação foi possível após

comparação por CCDA dos tempos de retenção (TR) com padrão conhecido de sitosterol e estigmasterol, além da análise dos dados de RMN ^1H da mistura comparados com a literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).

A subfração **SEDFC 55-60** (68,0mg) foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel como fase estacionária e hexano/acetato, como fase móvel, forneceu 12 frações de 50 mL as frações 4-9 (28,0 mg) foram reunidas e forneceram um sólido branco, solúvel em CHCl_3 . Este sólido foi Identificado como sendo uma mistura dos triterpenos Lupeol (**3**) α -amirina (**4**) e β -amirina (**5**). Sua identificação foi realizada por análise de espectroscopia de RMN ^1H e comparação com a literatura e por CCDA com padrões das substâncias, Lupeol (**3**) α -amirina (**4**) e β -amirina (**5**), isoladas em outros trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa de produtos naturais da UFRRJ.

As frações 50-53, 62-70 e 74-76 foram reunidas em uma subfração **SEDFC-P** (152mg) a qual foi adicionado metanol, ocorrendo a formação de um precipitado branco. Após a filtração da subfração **SEDFC-P** foi possível separar o precipitado, solúvel em piridina (45,0 mg, pf. 200-210 °C), identificado como sendo o triterpeno conhecido como ácido ursólico (**6**). A identificação foi feita analisando-se os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ) e comparando esses dados com os encontrados na literatura para o ácido ursólico (KRIWACKI & PINTER, 1989). O processamento resumido da partição **SEDFC** pode ser visualizado no esquema 12 da página 132.



Esquema 12. Fracionamento da partição SEDFC de *Sauvagesia erecta*.

VI.2.2 Processamento da partição SEDFM

A partição SEDFM (2,95g) foi processada por cromatografia em coluna de sílica gel obtendo-se 200 frações de 50 mL cada. Foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e metanol em grau crescente de polaridade começando com hexano até metanol (100%). As frações 1-25 e 30-35 foram reunidas e novamente purificadas em coluna de sílica gel com eluição isocrática utilizando uma mistura de hexano-acetato de etila (9:1), obtendo-se 20 frações, reunidas após serem analisadas por CCDA, e revelação com Liebermann-Burchard da seguinte forma: 1-8, 9-13, 14-16, 17-20. Em todas as frações analisadas com Liebermann-

Burchard foi verificada uma coloração variando de rosa-roxo indicando a presença de terpenos, exceto as frações de 17-20.

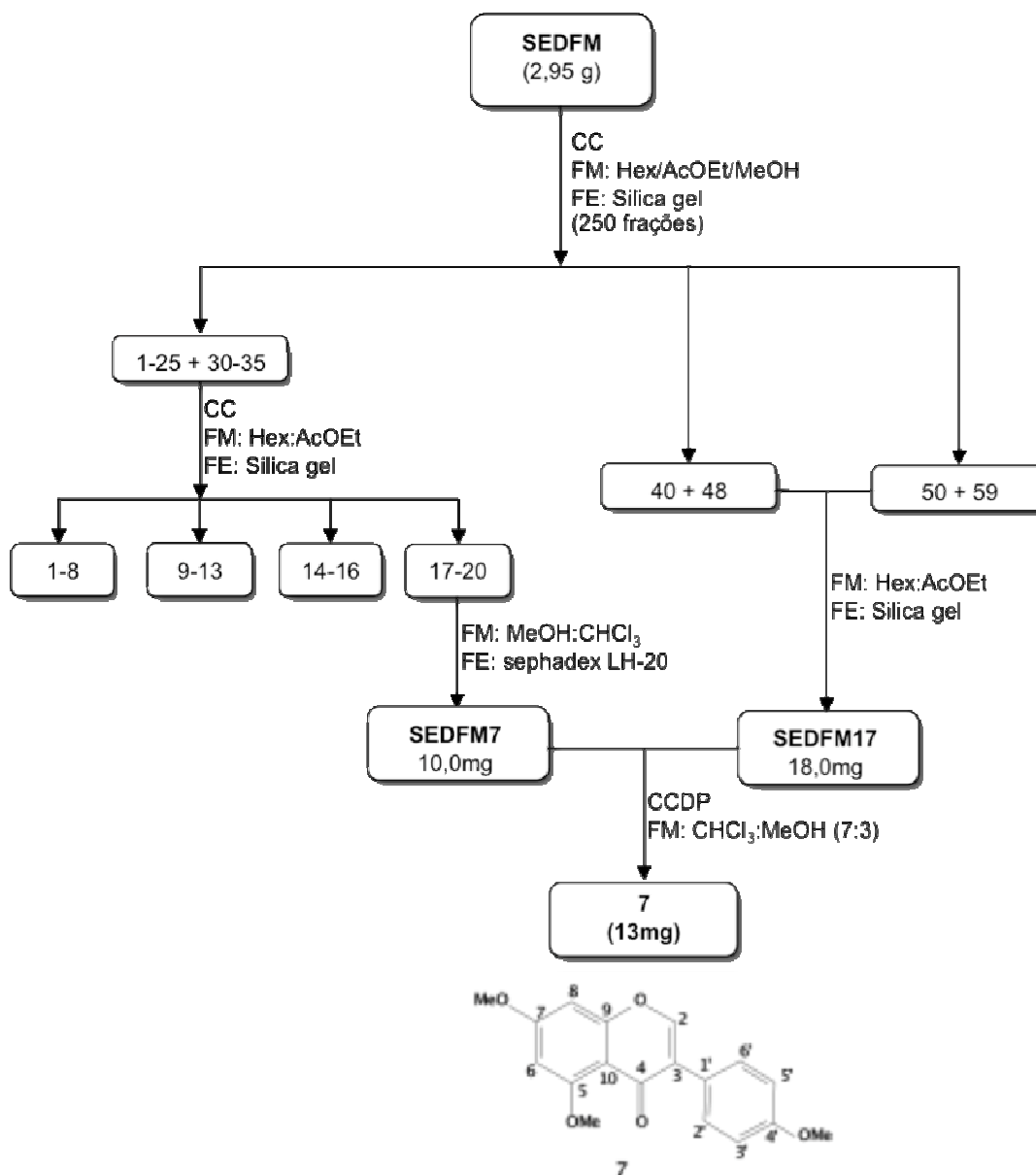
A subfração 14-16 forneceu um precipitado branco solúvel em metanol (5,4 mg), sendo que a análise em CCDA revelou a presença de uma mistura de 4 compostos, tornando-se muito complicada a sua purificação, desta forma esta fração foi desprezada.

A subfração 17-20 foi filtrada em coluna empacotada com sephadex[®] LH-20 eluída de forma isocrática com uma mistura de metanol (MeOH) e clorofórmio (CHCl₃) (9:1) e forneceu a subfração **SEDFM-7** (10,0mg)

As frações 40-48 e 50-70 foram reunidas após análise por CCDA e cromatografadas em coluna de sílica gel utilizando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila na proporção de 8:2 (hexano/acetato) fornecendo 30 subfrações e entre elas a subfração **SEDFM-17** (18,0mg).

As subfrações **SEDFM-7** (10,0mg) e **SEDFM-17** (18,0mg) após serem analisadas por CCDA e reveladas com solução de AlCl₃-EtOH (1%), foram reunidas e fracionadas por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando como eluente uma mistura de CHCl₃/MeOH (7:3). Este procedimento forneceu um sólido amorfo levemente amarelado (13,0mg) que foi identificado como a isoflavona 5,7,4'-trimetoxisoflavona (**7**, pf. 158-160 °C). A estrutura desta substância foi determinada através da análise dos dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (AGRAWAL *et al.*, 1989)

As frações **130 - 200** foram analisadas por CCDA e reveladas com solução de cloreto de alumínio, sendo que a coloração amarelada sugere a presença de compostos fenólicos, foram então reunidas e cromatografadas em coluna empacotadas com Sephadex LH-20, obtendo-se subfrações com comportamentos muito semelhantes, porém em quantidades muito diminutas. Algumas destas frações foram encaminhadas para análise por RMN ¹H, na tentativa de se encontrar um composto majoritário, o que não foi observado. No esquema 13 (página 134) encontra-se um resumo do trabalho de fracionamento da partição **SEDFM**.



Esquema 13. Fracionamento da partição SEDFM de *Sauvagesia erecta*.

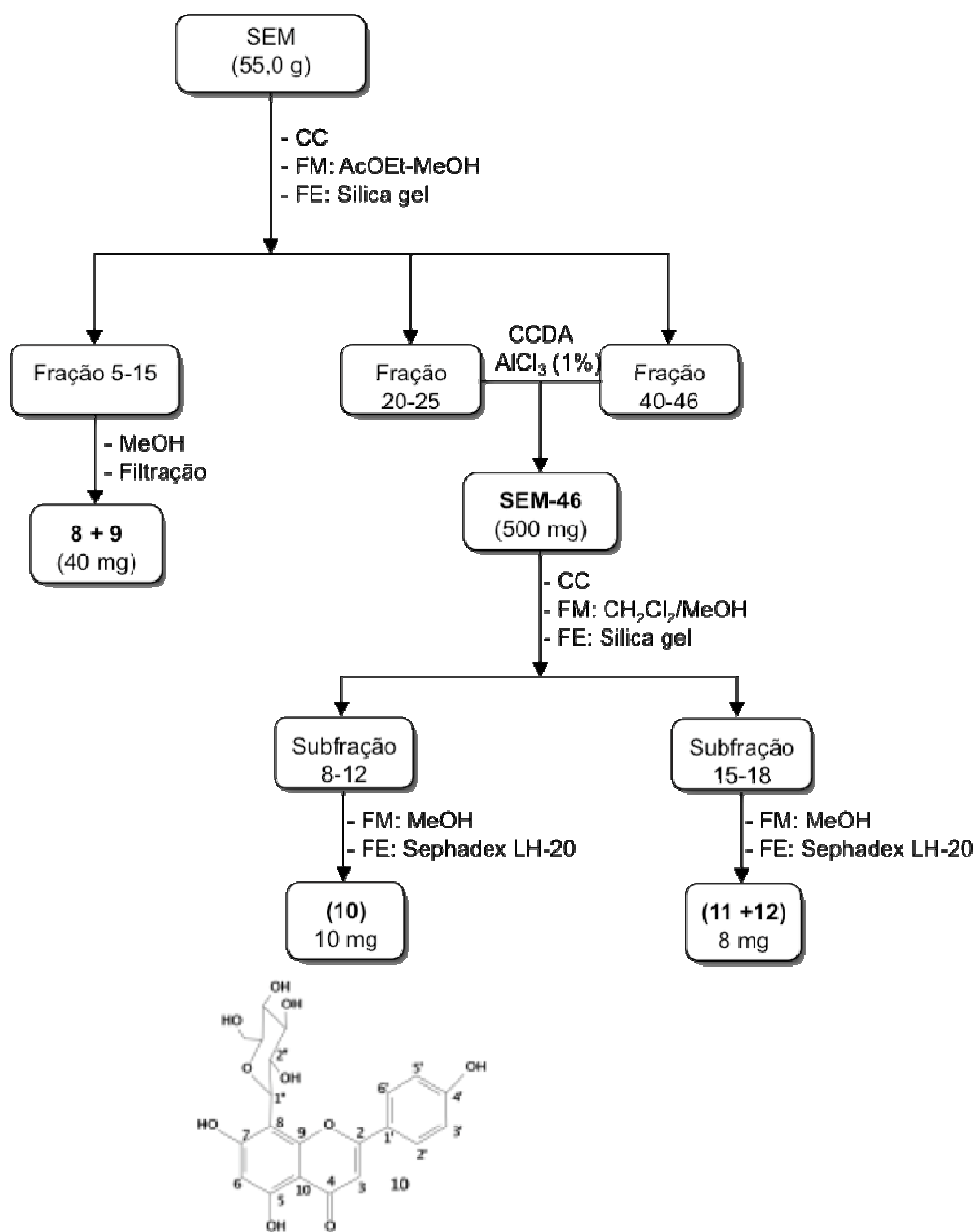
VI.2.3 Processamento do extrato metanólico da *Sauvagesia erecta* - SEM

O extrato bruto metanólico de *Sauvagesia erecta*, SEM (55,0g), foi cromatografado em coluna de sílica gel do tipo flash, e eluído de forma gradiente utilizando com solventes acetato de etila e metanol, começando com acetato de etila (100%) até metanol (100%), obtendo-se 100 frações de 50 mL cada. Após análise por CCDA as frações de 5-15 foram reunidas em uma única subfração, a esta foi adicionado metanol resultando na formação de

um precipitado branco insolúvel, que foi filtrado a vácuo resultando em um sólido branco solúvel apenas em piridina. A identificação deste sólido branco foi possível pela análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990), sendo assim identificados como uma mistura dos esteróides glicosilados: 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol (**8**) e 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil estigmasterol (**9**) (60,0mg, pf. 300-302 °C).

As frações 25-32 e 40-46 foram reunidas originado a subfração SEM-46, esta foi recromatografada em coluna de sílica gel, eluída de forma gradiente com diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH) até 100% metanol, obtendo-se 20 frações de 50 mL cada. A subfração 8-12 (50,0mg) foi submetida a filtração em uma coluna com sephadex LH-20 e forneceu um sólido amarelo solúvel em DMSO, identificado após análise e comparação dos dados dos espectros de RMN 1D e 2D obtidos com os encontrados na literatura (ZHOU *et al.*, 2005), como sendo o flavonóide glicosilado vitexina (**10**) (10,4mg). A subfração 15-18 foi submetida a filtração em sephadex LH-20 e resultou em uma mistura das substâncias (11 e 12), estas ainda se encontram em processo de análise para determinação de suas corretas estruturas e devem ser adicionadas a publicação do artigo sobre este espécime (*S. erecta*).

Todo o trabalho de fracionamento do extrato metanólico de *S. erecta* esta representado no esquema 14 (página 136).



Esquema 14. Fracionamento do extrato metanólico de *Sauvagesia erecta* - SEM.

VI.3 Constituintes Químicos Isolados de *Sauvagesia erecta*

As estruturas químicas dos compostos isolados de *S. erecta* neste trabalho, estão representadas na Figura 62 (página 137).

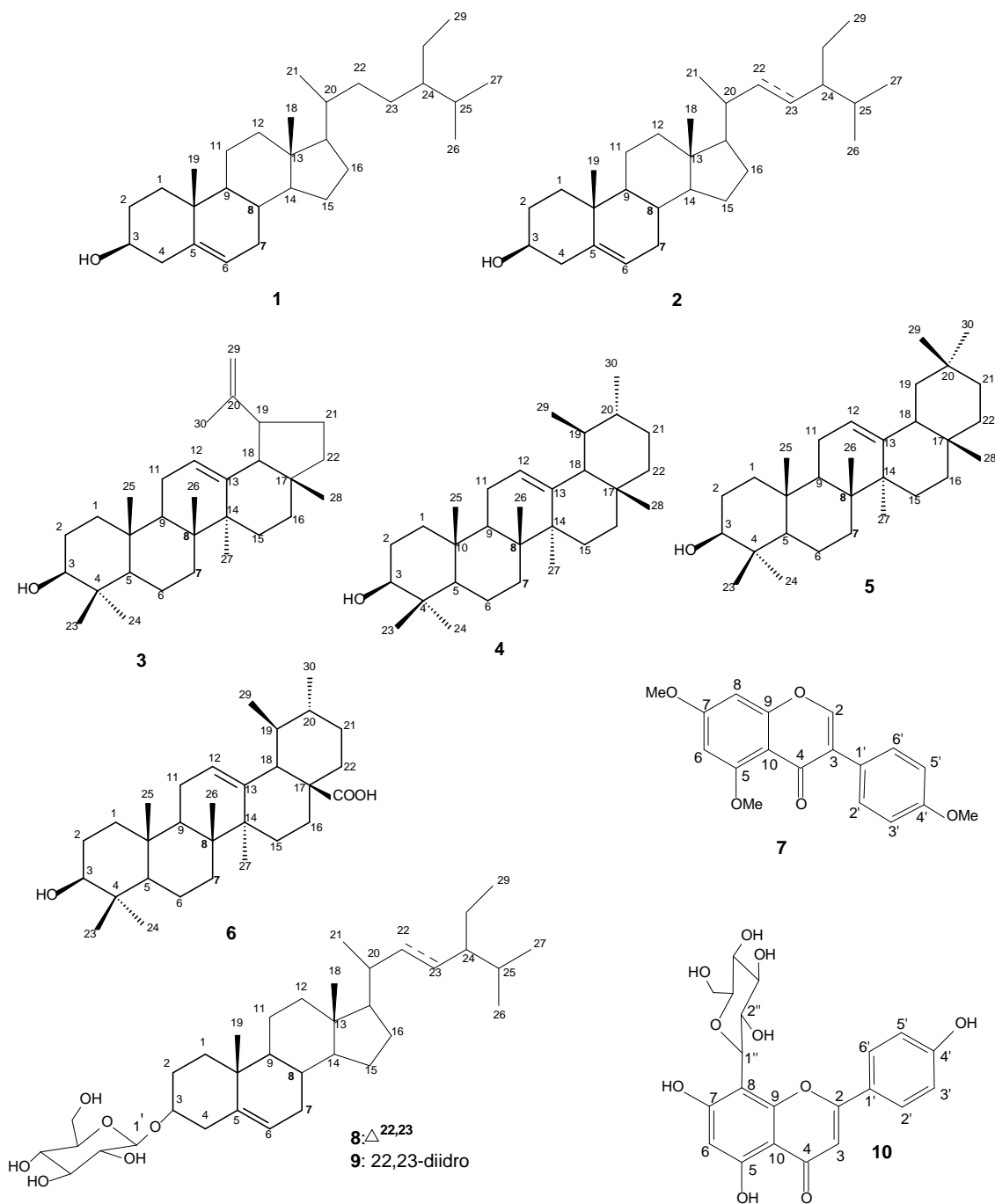


Figura 62. Constituintes isolados de *S. erecta*

VI.4 Determinação estrutural dos constituintes isolados de *S. erecta*

VI.4.1 Identificação das substâncias (1) e (2) (mistura de sitosterol e estigmasterol)

A mistura das substâncias **1** e **2** (sitosterol e estigmasterol) já foi identificada e discutida nos capítulos anteriores. Os sinais do espectro de RMN ^1H (Figura 63, página 138) e a comparação da mistura de **1** + **2** através de CCDA utilizando as substâncias isoladas e discutidas anteriormente confirmam a proposta inicial. Ou seja as substâncias **1** e **2** são os triterpenos sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**)

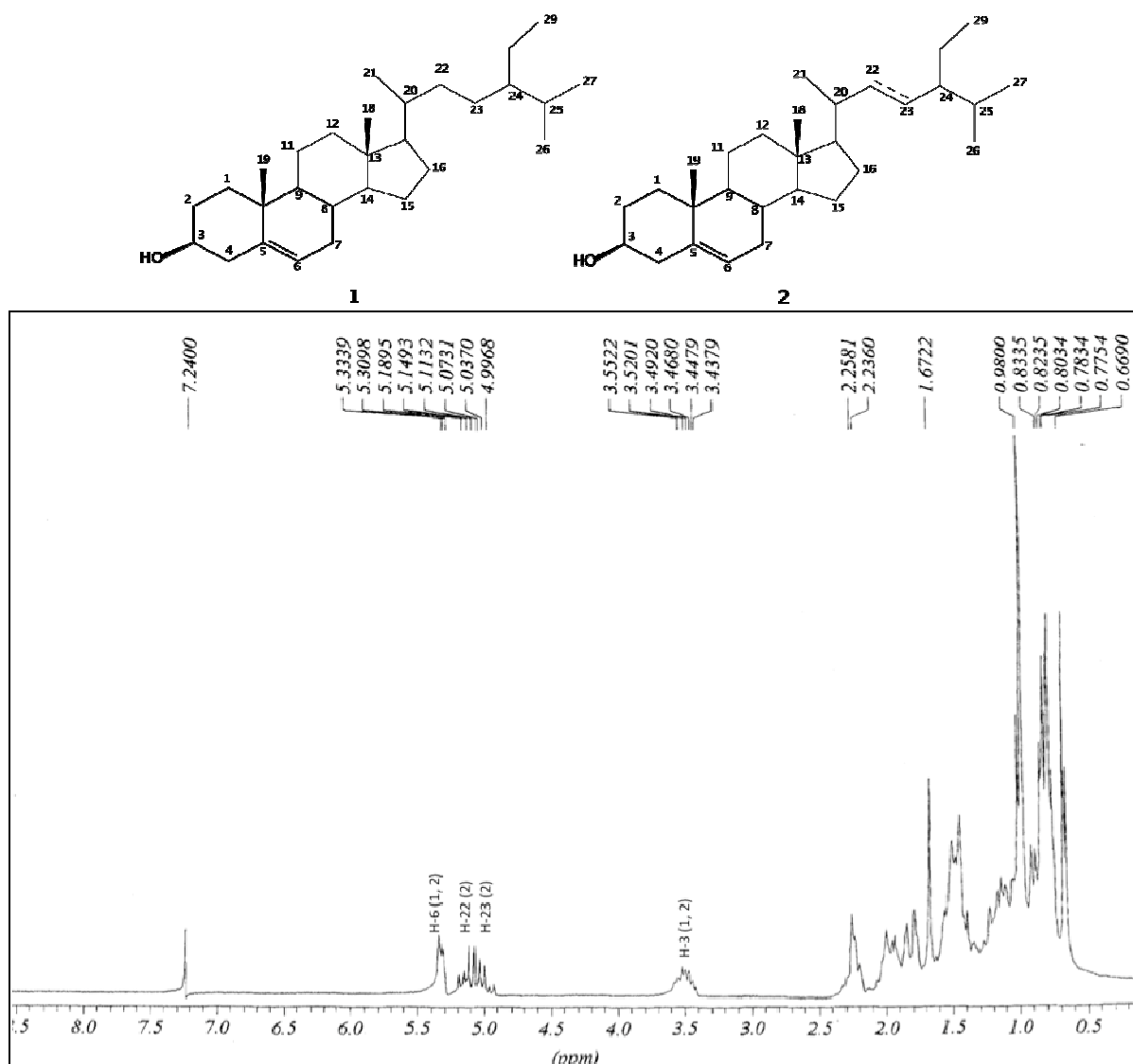


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) das substâncias **1** e **2** (sitosterol e estigmasterol)

VI.4.2. Identificação das substâncias **3**, **4** e **5** (lupeol, α -amirina, β -amirina)

A identificação do sólido branco solúvel em CHCl_3 , obtido da partição diclorometano de *Sauvagesia erecta* como sendo a mistura dos terpenos **3**, **4** e **5** (pf. 180-185 °C) foi realizado utilizando-se os dados obtidos no espectro de RMN ^1H (Figura 64, página 140). A presença dos sinais dos hidrogênios olefínicos em: δ_{H} 4,67 (d, $J=2,15\text{Hz}$) e δ_{H} 4,55 (d, $J=1,0\text{Hz}$) dos hidrogênios H29a e H29b característicos da substância **1** (lupeol), em δ_{H} 5,17 (m) e δ_{H} 5,11 (m) próprios do hidrogênio (H-12) das substâncias **4** e **5** respectivamente. Além desses sinais é possível reconhecer no espectro de RMN ^1H os sinais das metilas ligadas a carbono sp^3 em δ_{H} 0,74-1,12 ppm das substâncias **3**, **4** e **5** e de uma metila ligada a carbono sp^2 (H-30) pertencente a substância **3** em δ_{H} 1,67 ppm, e ainda o multiplete (m) referente ao hidrogênio carbinólico H-3 de **3**, **4** e **5** em δ_{H} 3,18 (m).

A utilização de padrões dos terpenos lupeol, α -amirina, β -amirina para comparação com a mistura de **3**, **4** e **5** por CCDA, a comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de ^1H com os encontrados na literatura (OLIVEIRA, 2002; VELLOSO, 1998) e também com espectros desta mesma mistura já discutidos no capítulo anterior, permitiu identificar de forma inequívoca os três compostos da mistura como sendo lupeol (**3**), α -amira (**4**) e β -amirina (**5**).

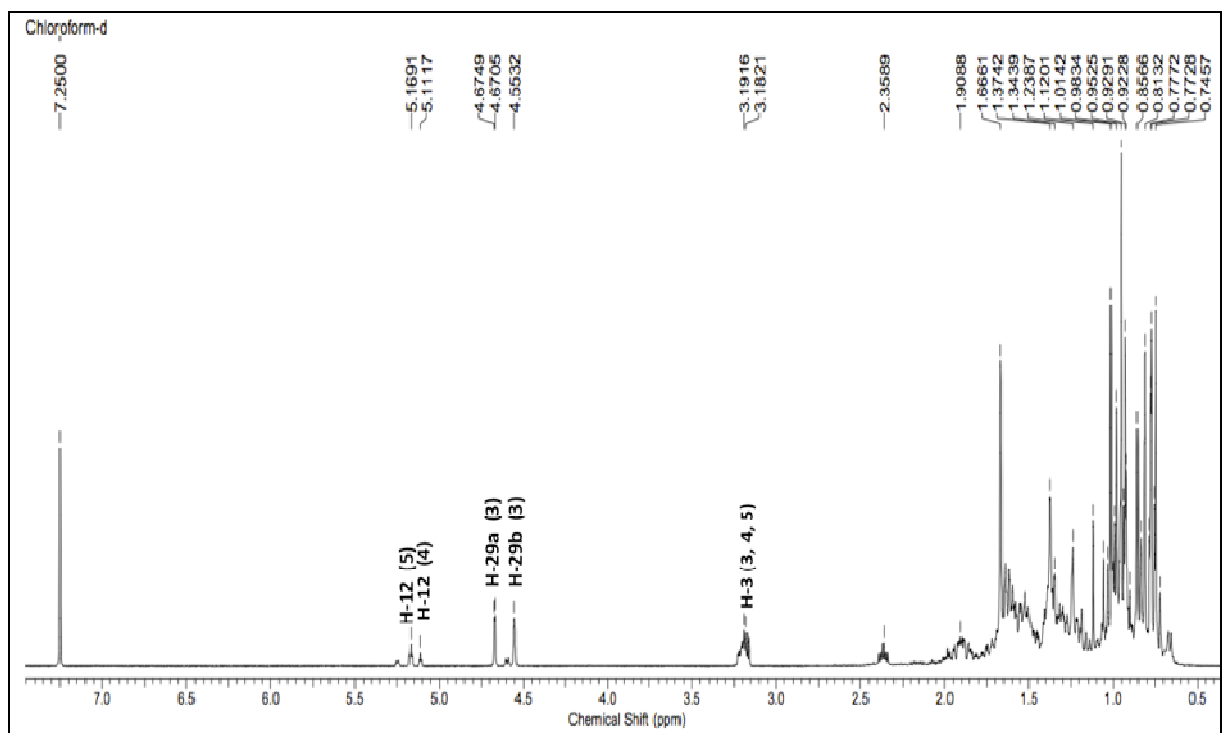
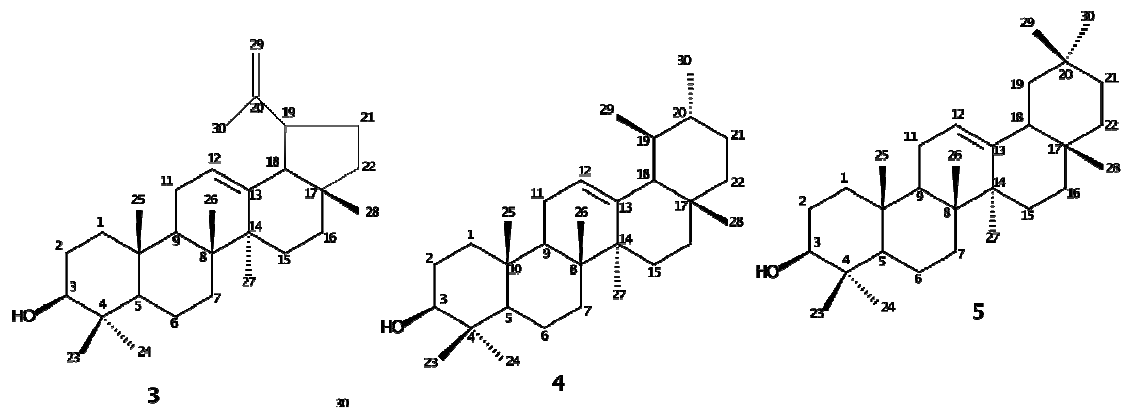


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias **3**, **4** e **5** (lupeol, α -amirina e β -amirina).

VI.4.3 Identificação da substância (6) Ácido ursólico

A substância **6** foi isolada na forma de um sólido branco com ponto de fusão 250-252 °C. A análise do espectro de RMN ^1H da substância **6** (Figuras 65 e 66, página 143) revelou sinais em δ_{H} 5,48 ppm, relativo ao hidrogênio olefínico H-12 (m) em δ_{H} 3,46 (m) atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3. O sinal do duplete em δ_{H} 2,62 (d, $J=11,3$ Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio metínico desprotegido H-18. Foram também observados sinais correspondentes as metilas em δ_{H} 1,24 (s, Me-23, 3H), δ_{H} 1,21 (s, Me-27, 3H) δ_{H} 1,05 (s, Me-26, 3H), δ_{H} 1,02 (s, Me-24, 3H), δ_{H} 0,99 (d, Me-29, 3H), δ_{H} 0,94 (d, Me-30, 3H), δ_{H} 0,88 (s, Me-25, 3H) e um sinal largo em δ_{H} 5,02 (sl) atribuído ao hidrogênio da hidroxila do álcool secundário (OH-3).

O espectro de RMN DEPTQ (Figuras 67 e 68, página 144) apresentou sinais correspondentes a 30 carbonos distribuídos da seguinte forma; 7 quaternários (C), sendo 1 destes sinais atribuído a carbonila (C=O) do ácido carboxílico (-COOH) presente na estrutura da substância **6** (δ_{C} 179,87 ppm, C-28), 7 metínico (CH), 9 metilênicos (CH₂) e 7 metilas (CH₃). Destes, podemos destacar os sinais em δ_{C} 139,22, atribuído ao C-13 e δ_{CH} 125,84 (CH-12) referentes a dupla ligação entre ambos. O valor do deslocamento químico do C-13 (δ_{C} 139,22) é compatível com o esqueleto de triterpeno da série ursano, esse valor deve-se ao efeito γ de proteção do grupo metila (CH₃-29) ligado ao carbono 19 (C-19) uma característica deste tipo de esqueleto triterpênico.

Após a análise dos dados espectroscópicos de ^1H e DEPTQ e comparação do ponto de fusão com valores relatados na literatura (KRIWACKI & PINTER, 1989) permitiram confirmar a estrutura proposta para **6** como sendo o ácido ursólico (ácido 3- β -hidroxi-12-ursen-28-óico). Os dados estão apresentados na tabela 21 (página 142).

Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **6** comparados com os encontrados na literatura para o ácido ursólico (KRIWACKI & PINTER, 1989).

C	Substância isolada (6)		Ácido Ursólico (KRIWACKI & PINTER, 1989)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	39,04		39,1	0,95a; 0,12b
2	28,07		28,1	1,82
3	78,08	3,46 (m)	78,1	3,46
4	39,34		39,5	-
5	55,78		55,8	0,88
6	18,75		18,8	1,56a; 1,33b
7	33,54		33,6	1,55a; 1,35b
8	39,92		40,0	
9	48,00		48,1	1,62
10	37,24		37,3	
11	23,59		23,6	1,94
12	125,60	5,48 (m)	125,6	5,50
13	139,22		139,2	
14	42,45		42,5	
15	28,65		28,7	1,26a; 2,33b
16	24,87		24,8	2,12a; 1,97b
17	42,45		47,9	-
18	53,49	2,63 (d, J=11,3 Hz, 1H)	53,5	2,62
19	39,45		39,5	1,45
20	39,37		39,3	0,93
21	31,04		31,0	1,40
22	37,40		37,5	1,95
23	28,79	1,24 (3H)	28,8	1,23
24	16,56	1,02 (3H)	16,5	1,01
25	15,65	0,88 (3H)	15,6	0,87
26	17,42	1,05 (3H)	17,5	1,04
27	23,98	1,21 (3H)	23,9	1,21
28	179,87	-	179,9	-
29	17,51	0,99 (3H)	17,5	0,98
30	21,41	0,94 (3H)	21,4	0,93
HO-3	-	5,02 (sl)	-	-

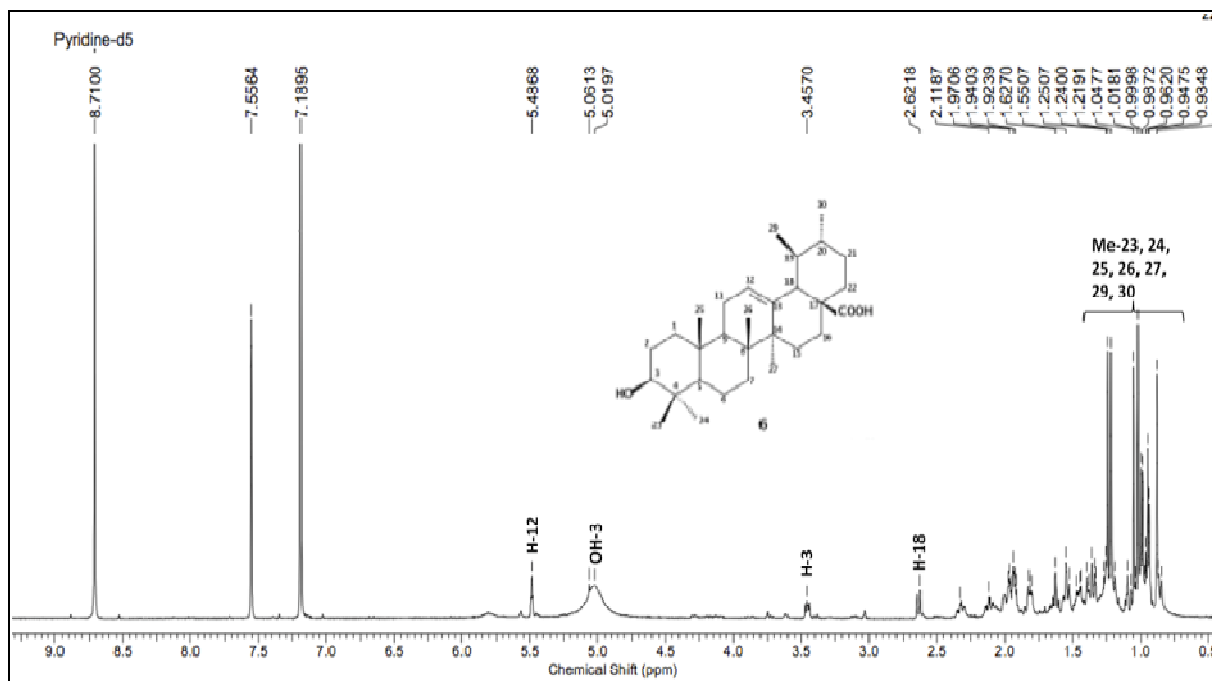


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Piridina- d_5) de **6**.

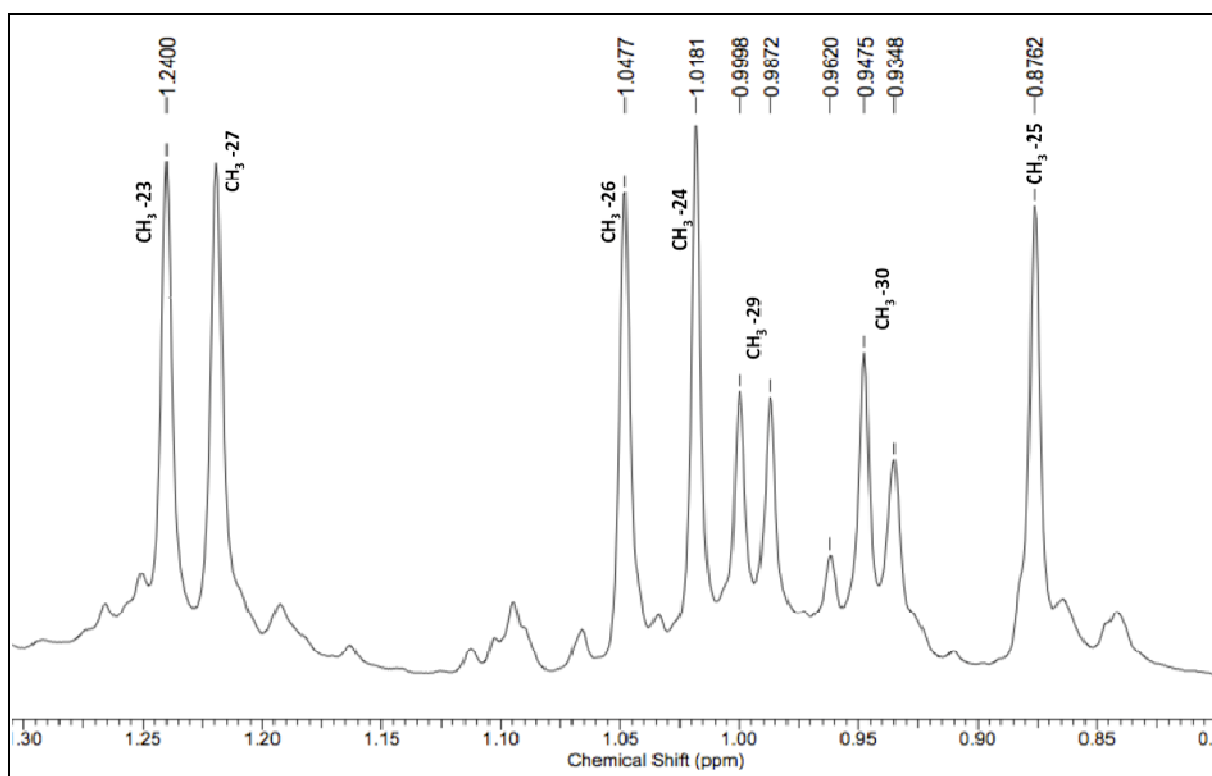


Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Piridina- d_5) de **6**.

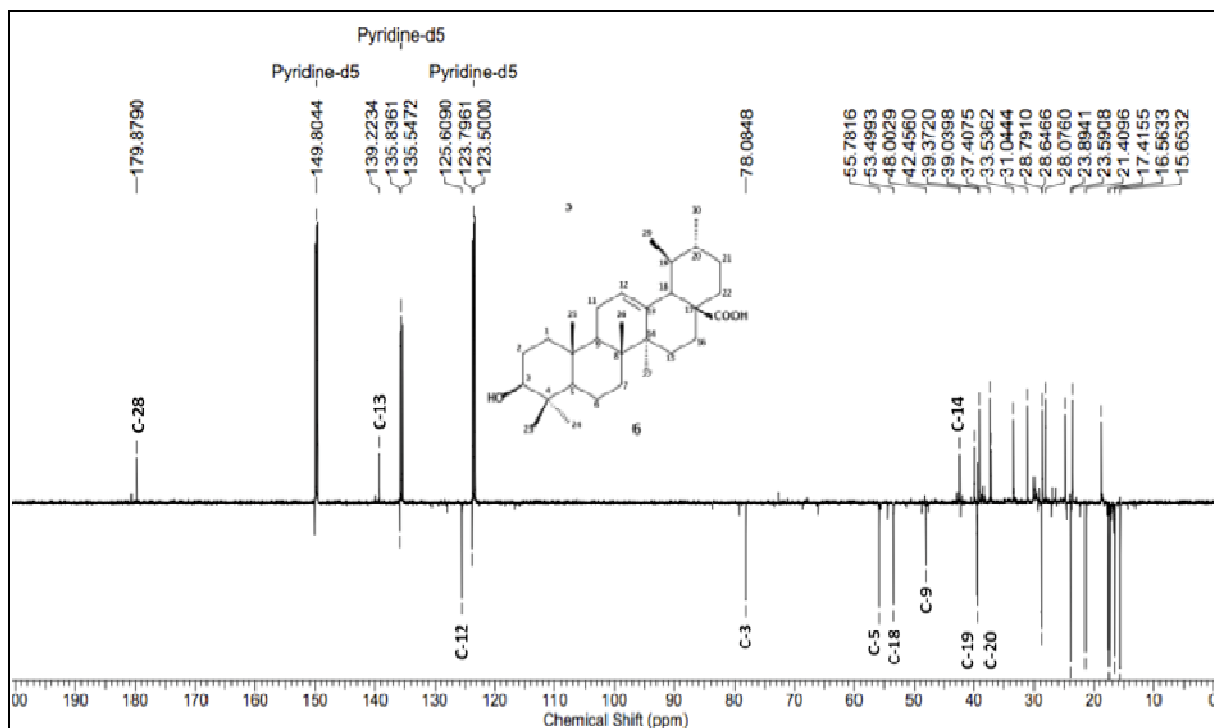


Figura 67. Espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, Piridina-d₅) de **6**.

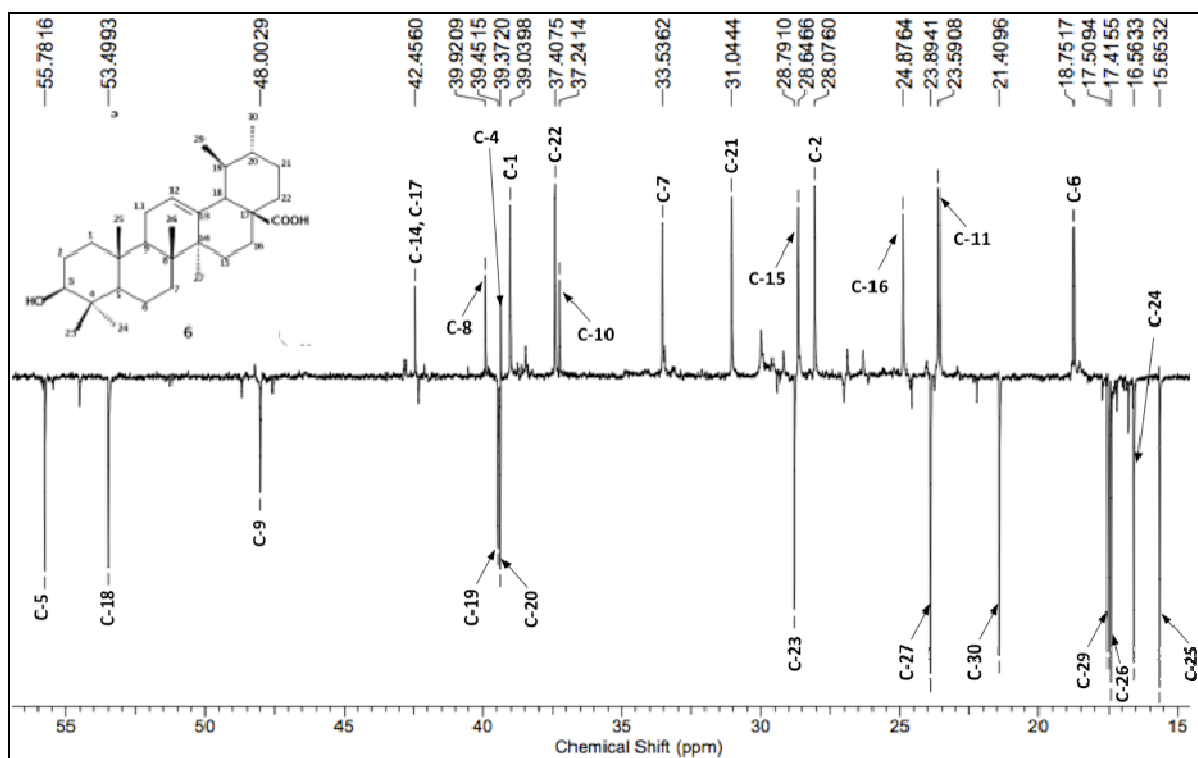


Figura 68. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (500 MHz, Piridina-d₅) de **6**.

VI.4.5 Identificação da substância 7 (5, 7, 4' - trimetoxisoflavona)

O espectro de RMN de ^1H (Figura 69, página 147) da substância 7, um sólido amarelado solúvel em CHCl_3 , apresenta dois sinais em δ_{H} : 7,42 ppm (d, 2H, H-2' e H-6') e δ_{H} : 6,89 ppm (d, 2H, H-3' e H-5') que correspondem a um sistema AA'BB' de um anel aromático conjugado. Adicionalmente é possível distinguir mais três sinais de prótons, 6,33 ppm (d, 1H) e 6,41 ppm (d, 1H) referentes aos hidrogênios protegidos H-6 e H-8 respectivamente e um sinal em 7,73 ppm (s, 1H) referente ao H-2. Esta primeira análise sugeriu um esqueleto do tipo isoflavona, pois não foi identificado o sinal do H-3 no anel C, logo a ligação entre o anel C e B deve estar ocorrendo no C-3 do anel C.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 70 e 71, página 147-148) apresentou os deslocamentos químicos para os carbonos aromáticos protegidos C-6 (δ_{C} 96,0 ppm) e C-8 (δ_{C} 92,4 ppm), e o sinal em δ_{C} 113,6 ppm referente aos carbonos C-3' e C-5' vizinhos a metoxila, os carbonos C-3 em δ_{C} 125 ppm e C-2 em δ_{C} 150,1 ppm confirmam a substituição do anel C em C-3 (Tabela 22, página 146). É possível distinguir ainda os sinais em δ_{C} 56,1, 55,6 e 55,2 ppm das metoxilas 4'-OMe, 5-OMe e 7-OMe respectivamente. Esses dados foram comparados com a literatura (AGRAWAL *et al.*, 1989) o que permitiu propor a estrutura da substância (7) como sendo o flavonóide 5, 7, 4' - trimetoxisoflavona.

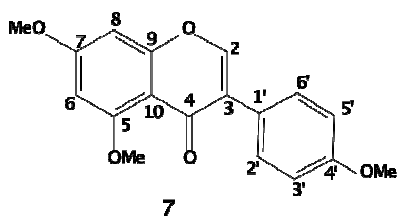


Tabela 22. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz) da substância **7** (5, 7, 4'-trimetoxisoflavona).

C	Substância (7) 5, 7, 4'-trimetoxisoflavona		Literatura (AGRAWAL, <i>et al.</i> , 1989)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	150,1	7,73(s)	150,6	7,73(s)
3	124,5	-	125,1	-
4	175,6	-	174,1	-
5	161,3	-	161,0	-
6	96,0	6,33(d)	96,2	6,36(d, J= 2,2)
7	163,9	-	163,8	-
8	92,4	6,42(d)	92,9	6,46(d, J= 2,2)
9	159,0	-	159,1	-
10	112,5	-	109,1	-
1'	124,0	-	124,4	-
2'/6'	130,3	7,42(d)	130,3	7,42(d, J= 8,8)
3'/5'	113,6	6,89(d)	113,4	6,91(d, J= 8,8)
4'	159,5	-	159,4	-
4'-OMe	56,1	3,78(s)	56,1	3,83(s)
5-OMe	55,6	3,88(s)	55,8	3,94(s)
7-OMe	55,2	3,85(s)	55,1	3,89(s)

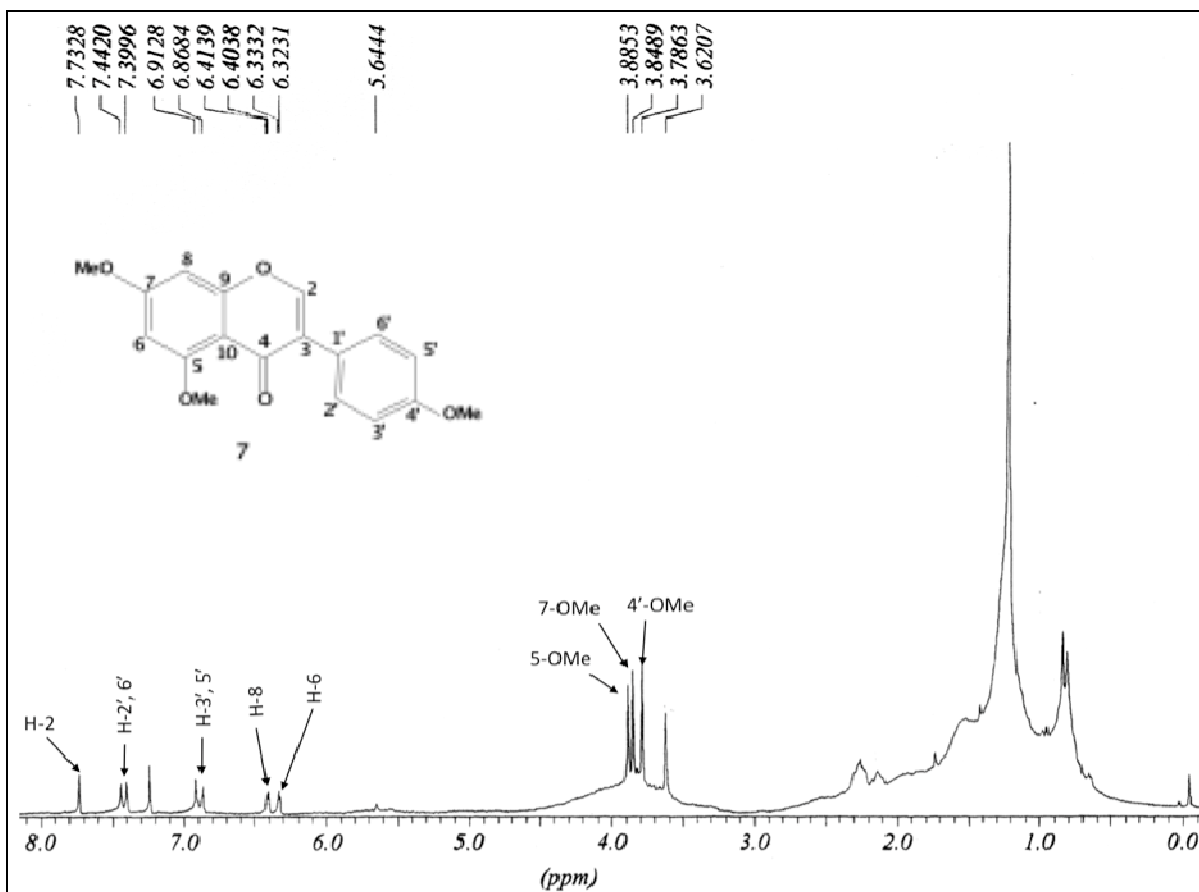


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 7.

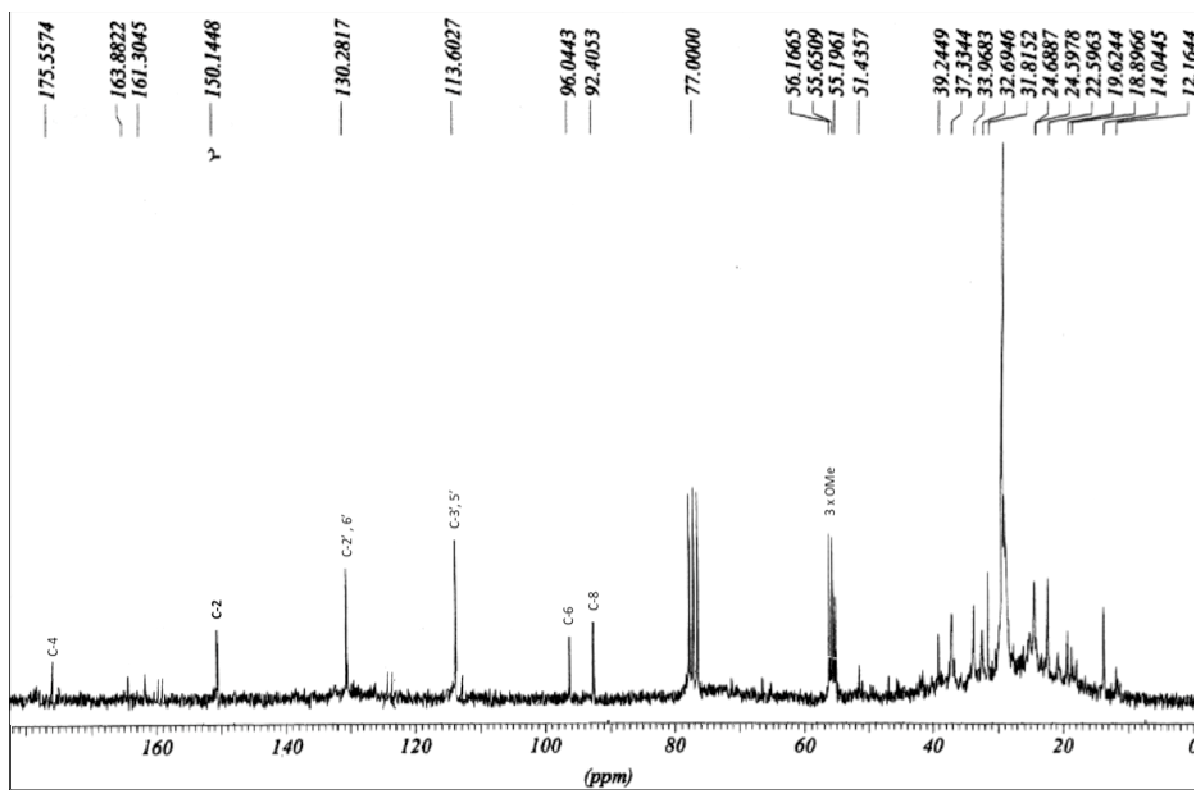


Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de 7.

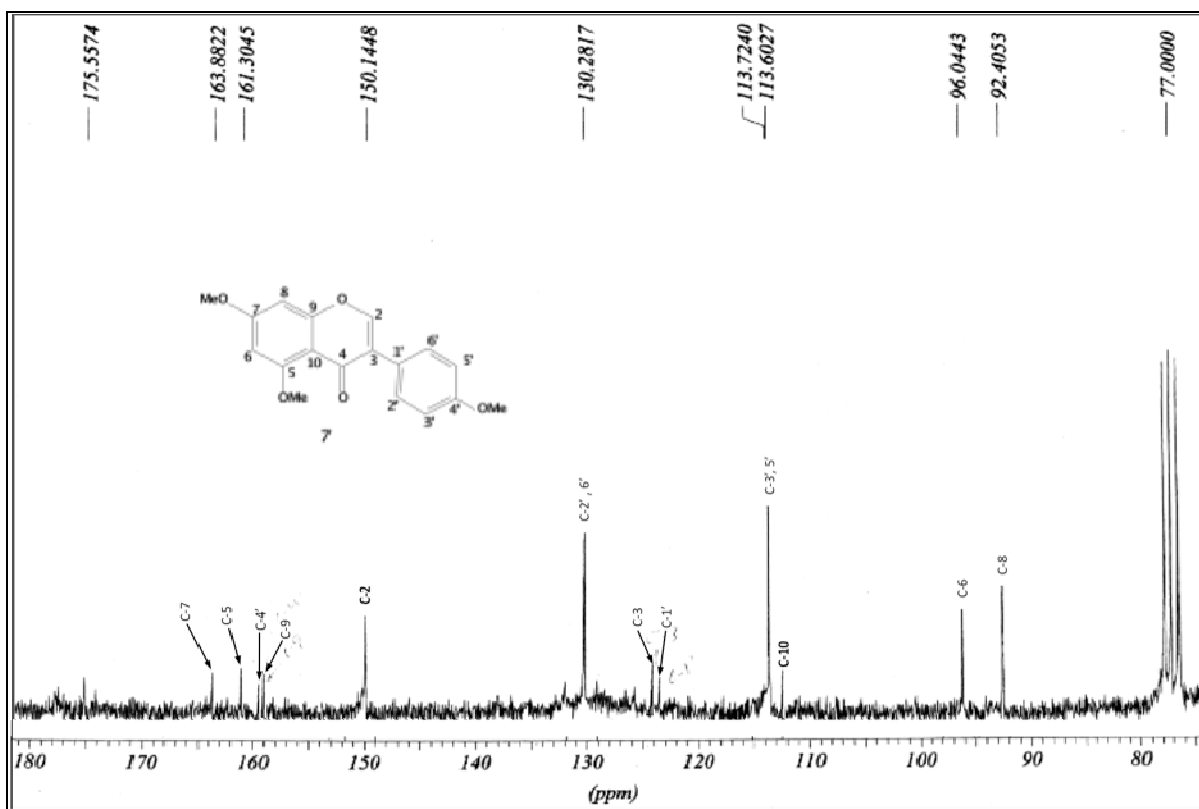


Figura 71. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de 7.

VI.4.6 Identificação das substâncias **8** e **9** (3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol e 3-β-O-β-D-glicopiranosil estigmasterol)

O espectro de RMN ^1H (Figura 72, página 152) da mistura das substâncias **8** e **9** (3-β-O-glicopiranosil-β-sitosterol e 3-β-O-glicopiranosil-β-estigmasterol) apresentou uma série de sinais entre 3,5-5,1ppm compatíveis com uma unidade de carboidrato. Esta unidade pode ser definida devido a presença do dubleto em δ 5,04 (d, $J=7,6$ Hz) que representa o hidrogênio anomérico (H-1', **8** e **9**) do carboidrato. O espectro de RMN ^1H também apresentou sinais compatíveis com um esqueleto esteroidal entre δ_{H} 0,64-1,07 correspondentes a grupos metílicos (CH_3 -18, 19, 21, 26, 27, 29) de **8** e **9**, e em δ_{H} 5,33 (s, 1H) referente ao hidrogênio vinílico H-6 (**8** e **9**). O sinal em δ_{H} 5,19 (m, H-22 e H-23, **9**) permitiu sugerir a presença do esqueleto do esteroide estigmasterol. A presença da unidade de açúcar e do esqueleto de esteroide sugerem que a mistura de **8** e **9** sejam a 3-β-O-glicopiranosil-β-sitosterol (**8**) e 3-β-O-glicopiranosil-β-estigmasterol (**9**).

Nos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 73 e 74, páginas 152-153) foram observados sinais entre δ_{CH} 78,7 - 71,7 ppm atribuídos aos carbonos metínicos C-3', C-5', C-2' e C-4' (**8** e **9**) e em δ_{CH} 62,9 ppm do carbono metilênico C-6' (**8** e **9**), confirmando a presença de uma unidade de glicose. Além desses sinais, foi observado um sinal em δ_{CH} 102,6 ppm do carbono C-1' (**8** e **9**) da unidade de açúcar ligada ao esteroide. A presença dos esteróides foi confirmada pelos sinais correspondentes aos carbonos olefínicos C-5 (**8** e **9**) em δ_{C} 141,0 ppm e C-6 (**8** e **9**) em δ_{CH} 122,0 ppm, um sinal em δ_{CH} 78,2 atribuído ao carbono carbinólico C-3 (**8** e **9**) e outros sinais entre δ_{C} 12,0-56,6 ppm representando o resto do esqueleto do esteroide. Os sinais em δ_{CH} 139,9 ppm e δ_{CH} 129,5 ppm confirmam a presença dos carbonos olefínicos C-22 e C-23 do esteroide estigmasterol. A identificação desses sinais e a comparação dos dados de ^1H e ^{13}C dessas substâncias com os registrados na literatura (Tabela 23 e 24, página 150 e 151) (KOJIMA *et al.*, 1990) permitiram identificar a mistura de **8** e **9** como o 3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (**8**) e 3-β-O-β-D-glicopiranosil estigmasterol (**9**).

Tabela 23. Dados de RMN ^1H de **8** e **9** comparados com os encontrados na literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).

C	Isoladas		Literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)	
	8	9	3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol	3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1			-	-
2			-	-
3	3,97 (m)	3,97 (m)	3,97 (m)	3,97 (m)
4	2,70 (m), 2,46 (m)	2,70 (m), 2,46 (m)	2,38 (4a, m), 2,63 (4b, m)	2,38 (4a, m), 2,63 (4b, m)
5			-	-
6	5,33 (s)	5,33 (s)	-	-
7			-	-
8			-	-
9			-	-
10			-	-
11			-	-
12			-	-
13			-	-
14			-	-
15			-	-
16			-	-
17			-	-
18	0,64 (s)	0,66 (s)	0,66 (s)	0,67 (s)
19	0,97	0,97	0,94 (s)	0,94 (s)
20			-	-
21	1,05	1,07	0,99 (d)	1,07 (d)
22	-	5,19 (m)	-	-
23	-	5,16 (m)	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	0,89	0,92	0,90 (d)	0,91 (d)
27	0,87	0,86	0,87 (d)	0,86 (d)
28	-	-	-	-
29	0,89	0,87	0,89 (t)	0,87 (t)
1'	5,04 (d, J=7,6 Hz)	5,04 (d, J=7,6 Hz)	4,95 (d)	4,95 (d)
2'	-	4,05 (m)		4,08 (t)
3'	-	4,28 (m)		4,28 (t)
4'	4,29	4,29	4,31 (t)	4,31 (t)
5'		4,03		4,03 (m)
6'	4,54 (6'a)	4,54 (6'a) 4,43 (6'b)	4,59 (6'a, dd)	4,59 (6'a, dd) 4,42 (6'b, dd)

Tabela 24. Dados de RMN ^{13}C de **8** e **9** comparados com os encontrados na literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).

C	Isoladas		Literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)	
	8	9	3- β -O- β -D- glicopiranosil sitosterol	3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,5	37,5	37,6	37,6
2	30,3	30,1	30,3	30,3
3	78,2	78,2	78,3	78,3
4	39,4	39,4	39,4	39,4
5	141,0	141,0	141,0	141,0
6	122,0	122,0	122,0	122,0
7	32,2	32,2	32,2	32,2
8	32,1	32,1	32,1	32,1
9	50,4	50,4	50,4	50,4
10	37,0	37,0	37,0	37,0
11	21,4	21,4	21,4	21,4
12	40,0	39,9	40,0	39,9
13	42,6	42,4	42,6	42,4
14	57,0	57,0	57,0	57,1
15	24,6	24,6	24,6	24,7
16	28,6	29,4	28,7	29,4
17	56,3	56,1	56,3	56,2
18	12,0	12,2	12,0	12,3
19	19,3	19,3	19,3	19,3
20	36,5	40,9	36,5	40,9
21	19,1	21,5	19,1	21,7
22	34,3	139,9	34,3	138,9
23	26,4	129,5	26,4	129,5
24	46,5	51,5	46,1	51,5
25	29,5	32,2	29,5	32,2
26	19,5	21,4	19,5	21,4
27	20,0	20,0	20,1	20,1
28	23,5	25,8	23,4	25,8
29	12,2	12,6	12,2	12,6
1'	102,6	102,6	102,6	102,6
2'	75,4	75,4	75,4	75,4
3'	78,7	78,7	78,7	78,7
4'	71,7	71,7	71,7	71,7
5'	78,5	78,5	78,5	78,5
6'	62,9	62,9	62,9	62,9

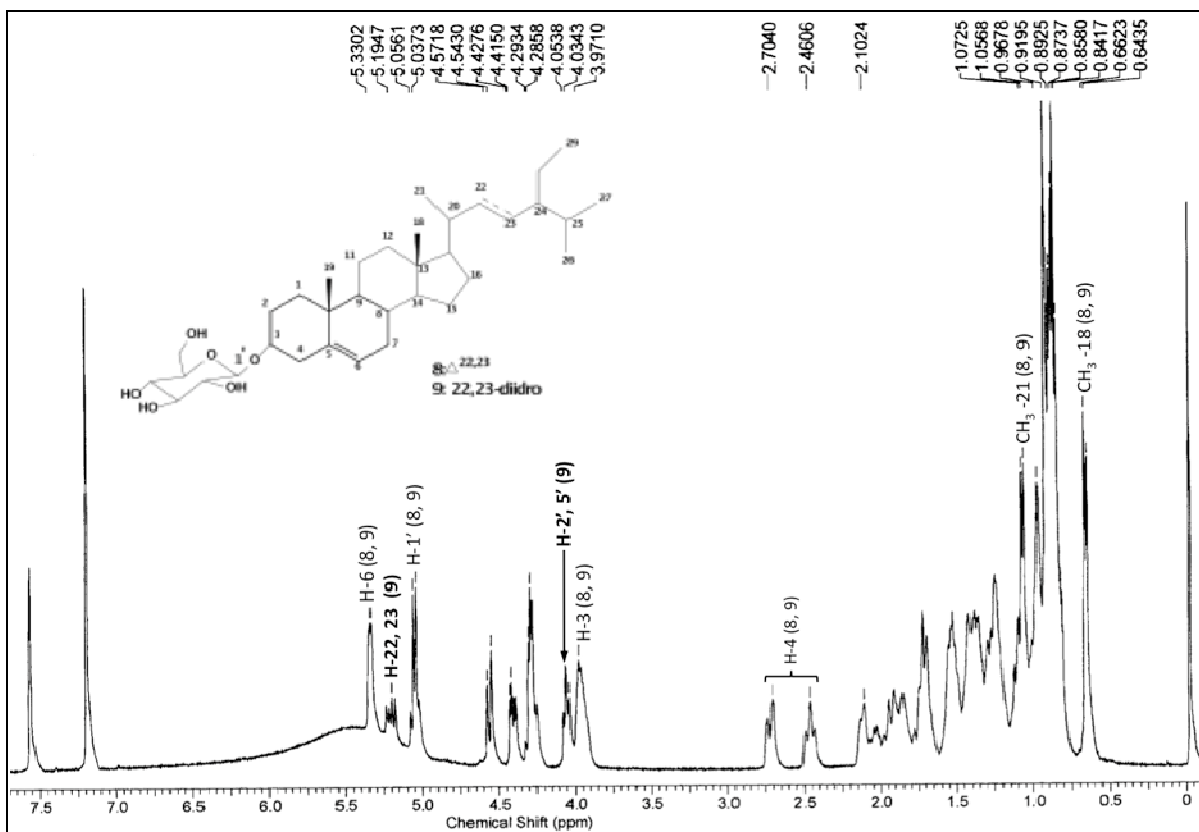


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Piridina- d_5) substâncias **8** e **9** (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol).

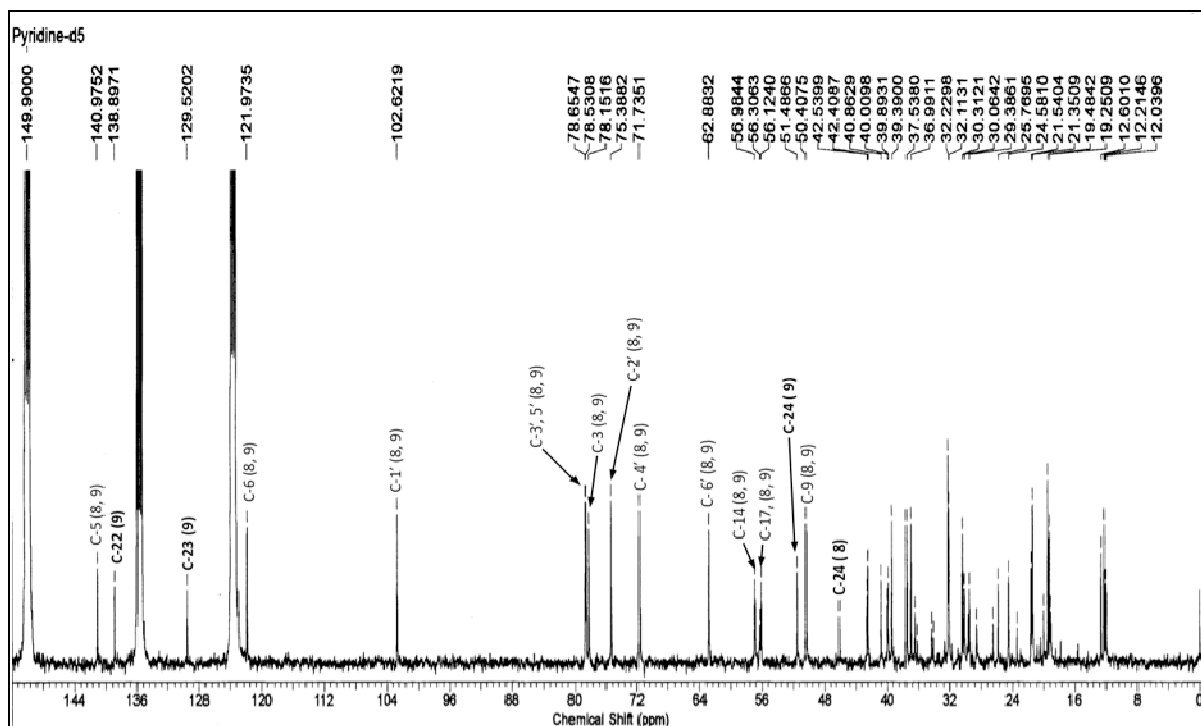


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, Piridina- d_5) substâncias **8** e **9** (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol).

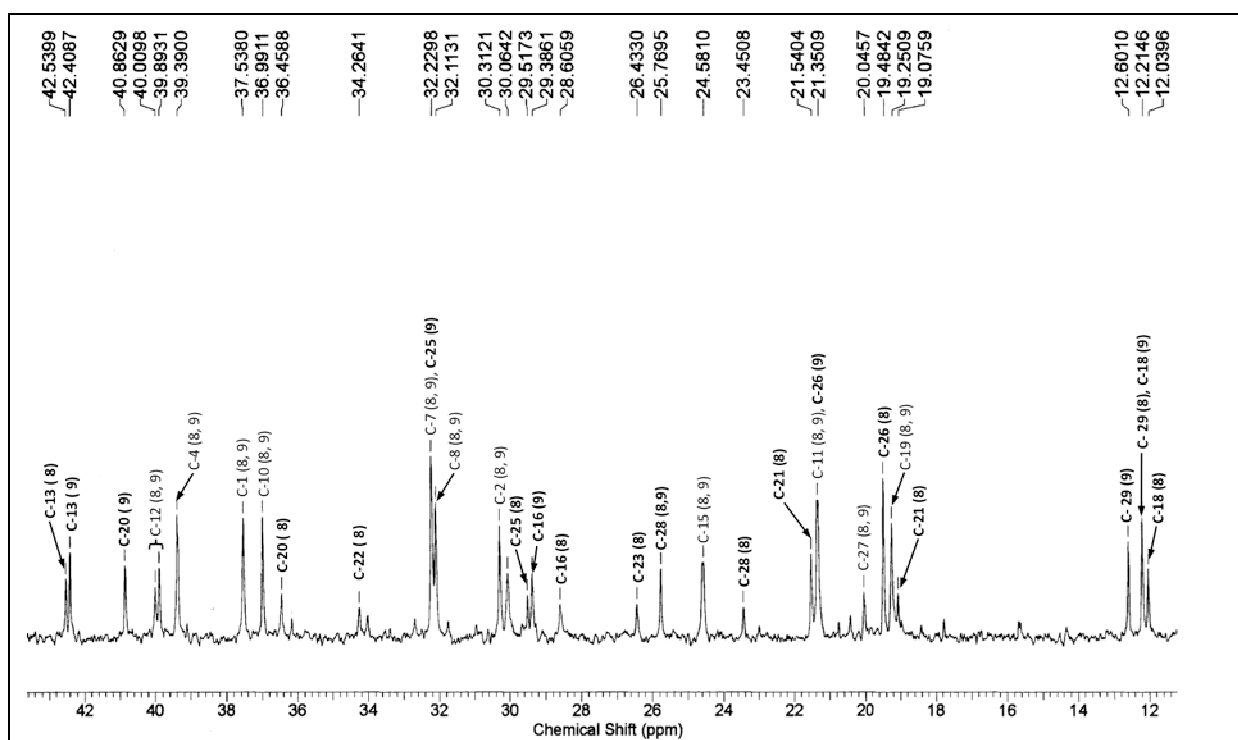
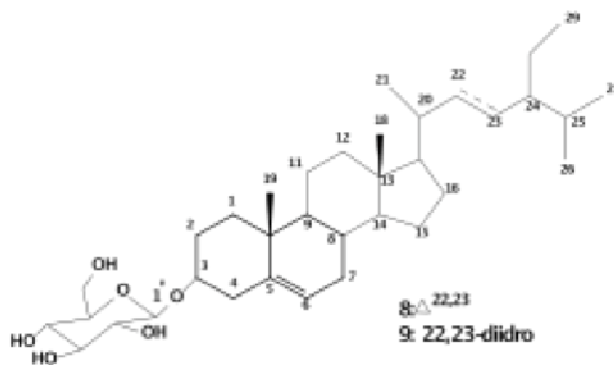


Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C (Expansão, 50 MHz, Piridina- d_5) da substâncias **8** e **9** (3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil estigmasterol).

VI.4.7 Identificação da substância (10) vitexina

A substância (10) foi purificada na forma de um sólido amarelo com ponto de fusão entre 275-278 °C. A análise por CCDA utilizando-se como revelador cloreto de alumínio (AlCl_3) indicou a presença de um flavonóide. A análise do espectro de IV (Figura 75, página 156) obtido da substância (10) revelou a presença de bandas de absorção em 3381 cm^{-1} e 3256 cm^{-1} de grupos hidroxila (estiramento $\nu_{\text{O-H}}$), 1653 cm^{-1} para carbonila conjugada (estiramento C=O , $\nu_{\text{C=O}}$), em 1615 cm^{-1} , 1567 cm^{-1} e 1506 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$) características de anel aromático, 2920 cm^{-1} (estiramento C-H, $\nu_{\text{C-H}}$), 1092 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} para estiramento C-O ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H (Figura 76, página 156) apresentou sinais de hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 6,76$ (s, 1H) e $\delta_{\text{H}} 6,25$ (s, 1H) atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente. Um sistema AA'BB' de anel aromático representado por 2 (dois) dupletos em $\delta_{\text{H}} 8,01$ (d, 8,8Hz, H-2' e H-6') e $\delta_{\text{H}} 6,89$ (d, 9,6Hz, H-3' e H-5'), 1 (um) sinal em $\delta_{\text{H}} 4,70$ (d, 10,8Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'' de um C-glicosídeo. Além dos sinais em $\delta_{\text{H}} 3,79$ (m, H-2'') do glicosídeo e $\delta_{\text{H}} 13,17$ de hidroxila (OH) em ponte (quelada).

O espectro de RMN DEPTQ (Figuras 77 e 78, páginas 157) mostrou nove (9) sinais de carbono metínicos (CH), nove (9) sinais de carbono quaternários (C) contando com o sinal do carbono carbonílico (C=O) que aparece em $\delta_{\text{C}} 182,25$ ppm, e uma sinal para carbono metilénico (CH_2). Os sinais em $\delta_{\text{CH}} 82,31$ (C-5''), $79,09$ (C-3''), $73,80$ (C-1''), $71,29$ (C-2''), $70,94$ (C-4'') e $\delta_{\text{CH}_2} 61,70$ (C-6'') confirmaram a presença de um substituinte glicosil na molécula. O valor do deslocamento químico do H-1'' do carboidrato em $\delta_{\text{H}} 4,70$ ppm e a ausência de um sinal em $\delta_{\text{CH}} (\pm 94\text{ ppm})$ no espectro de RMN DEPTQ (Figuras 77 e 78, páginas 157) permitiu propor uma unidade C-glicosídica substituída em 8 na flavona. O espectro de RMN HMQC (Figuras 79 e 80, página 158) confirmou a ligação entre o C-6 e o H-6 e a presença da unidade de açúcar como substituinte no carbono C-8 do anel A da

flavona. Além disso permitiu a correta atribuição dos deslocamentos químicos de H e C da substância **10** (vitexina)

Os deslocamentos químicos atribuídos ao espectro de RMN ^1H e ^{13}C para o composto isolado foram comparados com dados registrados na literatura (ZHOU *et al.*, 2005) e são apresentados na tabela 25 (página 155).

Tabela 25. Dados de RMN ^1H de **10** comparados com os encontrados na literatura para vitexina (ZHOU *et al.*, 2005).

C	Substância isolada (10)		Literatura (ZHOU, <i>et al.</i> , 2005)	
	δ_{H}	δ_{C}		δ_{C}
1	-	-	-	-
2	-	164,43	-	164,98
3	6,76 (s, 1H)	102,91	6,94 (s, 1H)	102,51
4 (C=O)	-	182,52		182,73
5	-	156,40		155,64
6	6,25 (s, 1H)	98,59	6,44 (s, 1H)	98,45
7	-	163,04		162,31
8	-	105,01		104,56
9	-	160,88		160,28
10	-	104,49		104,07
1'	-	122,06		122,07
2',6'	8,01 (d, 8,8Hz, 2H)	129,45	8,26 (d, 8,7Hz, 2H)	128,99
3',5'	6,89 (d, 9,6Hz, 2H)	116,25	7,05 (d, 8,7Hz, 2H)	115,01
4'	-	161,57		161,32
1''	4,70 (d, 10,8Hz, 1H)	73,81	4,94 (d, 9,8Hz, 1H)	71,93
2''	3,79 (m)	71,29	-	71,03
3''	-	79,09	-	79,01
4''	-	70,95	-	70,20
5''	-	82,31	-	81,29
6''	-	61,70	-	61,36
OH-5	13,17 (s, 1H)	-	13,17 (s, 1H)	-
OH-7	-		10,83 (s, 1H)	
OH-4'	-		10,35 (s, 1H)	

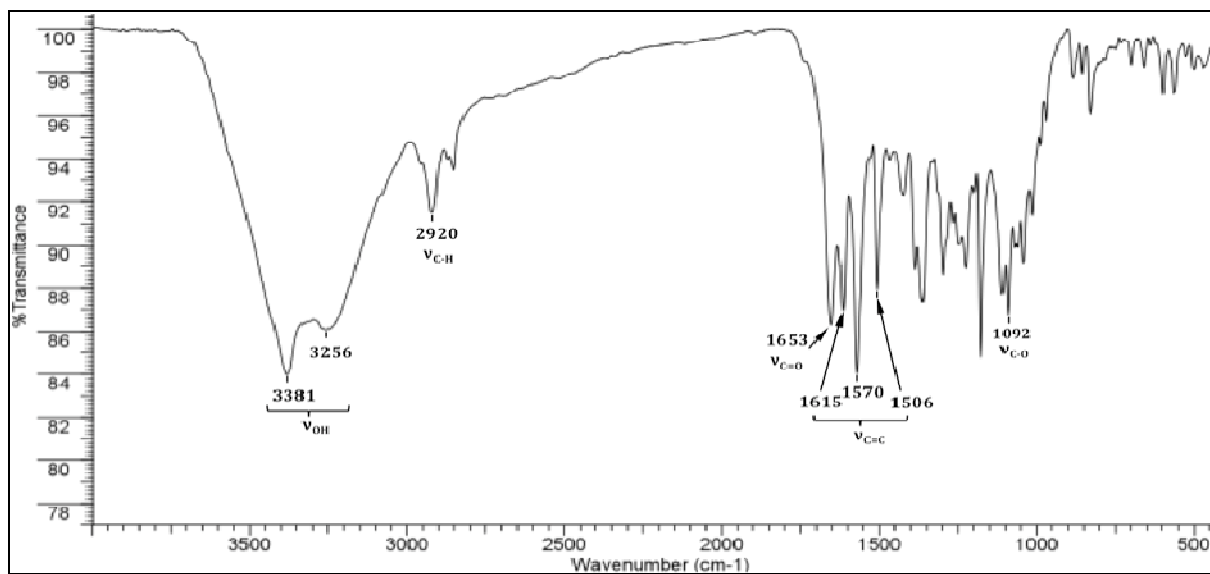


Figura 75. espectro de IV da substância **10** (vitexina) com pastilha de KBr.

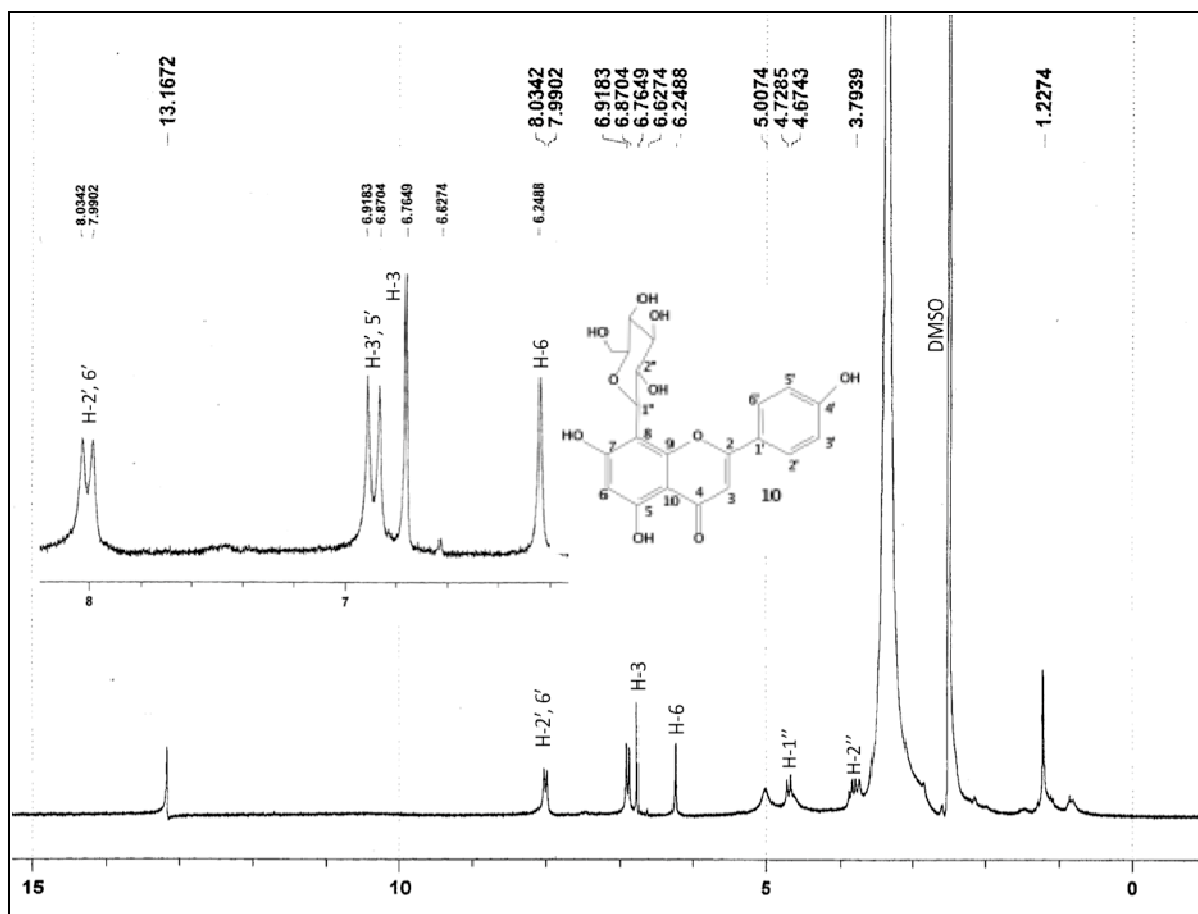


Figura 76. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO- d₆) da substância **10** (vitexina).

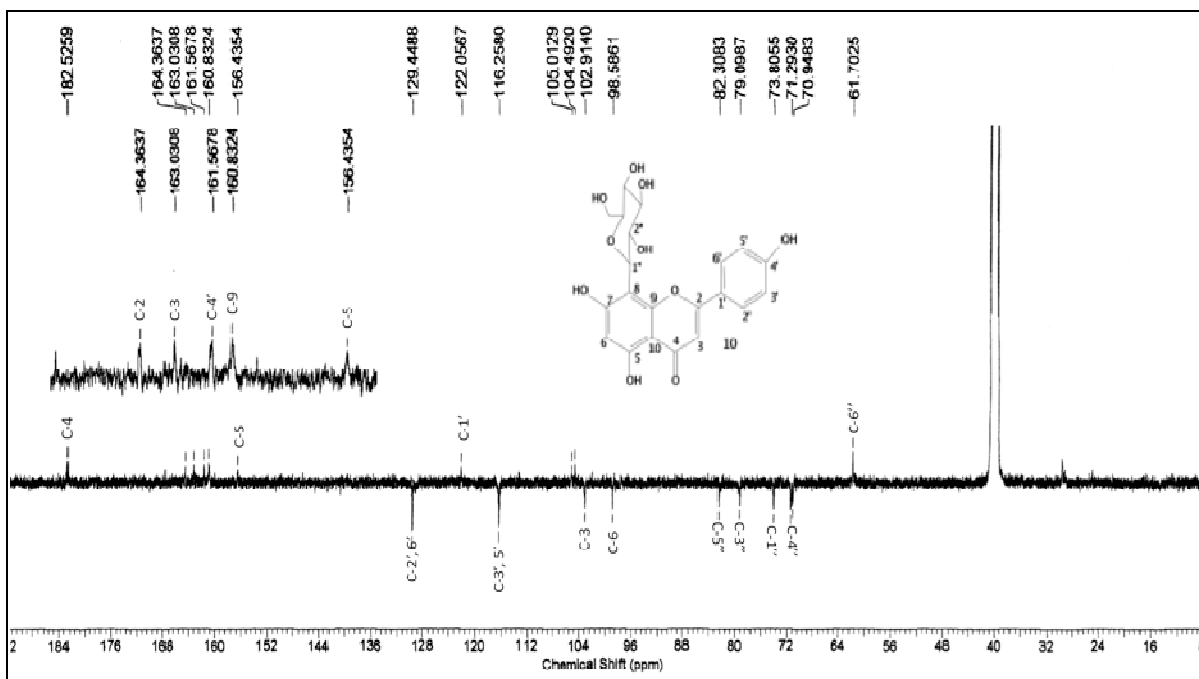


Figura 77. Espectro de RMN de DEPTQ (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 10.

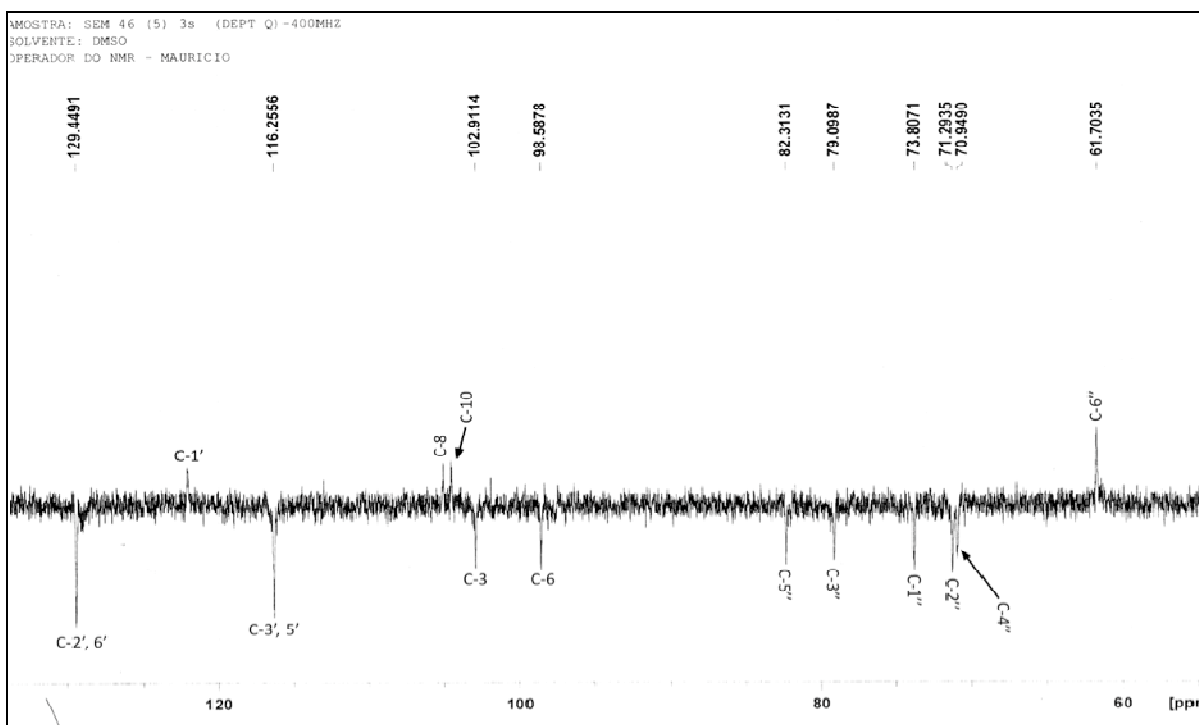


Figura 78. Expansão do espectro de DEPTQ (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 10.

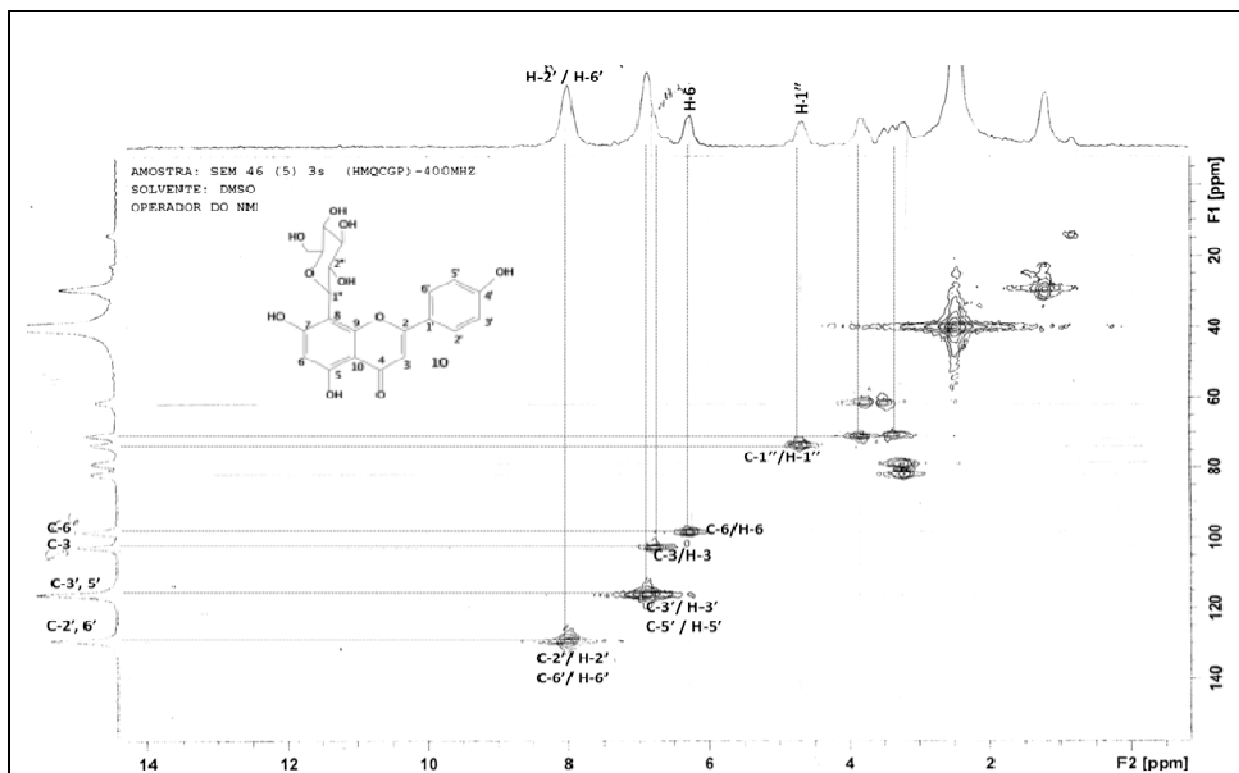


Figura 79. Espectro de RMN de HMQC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **10**.

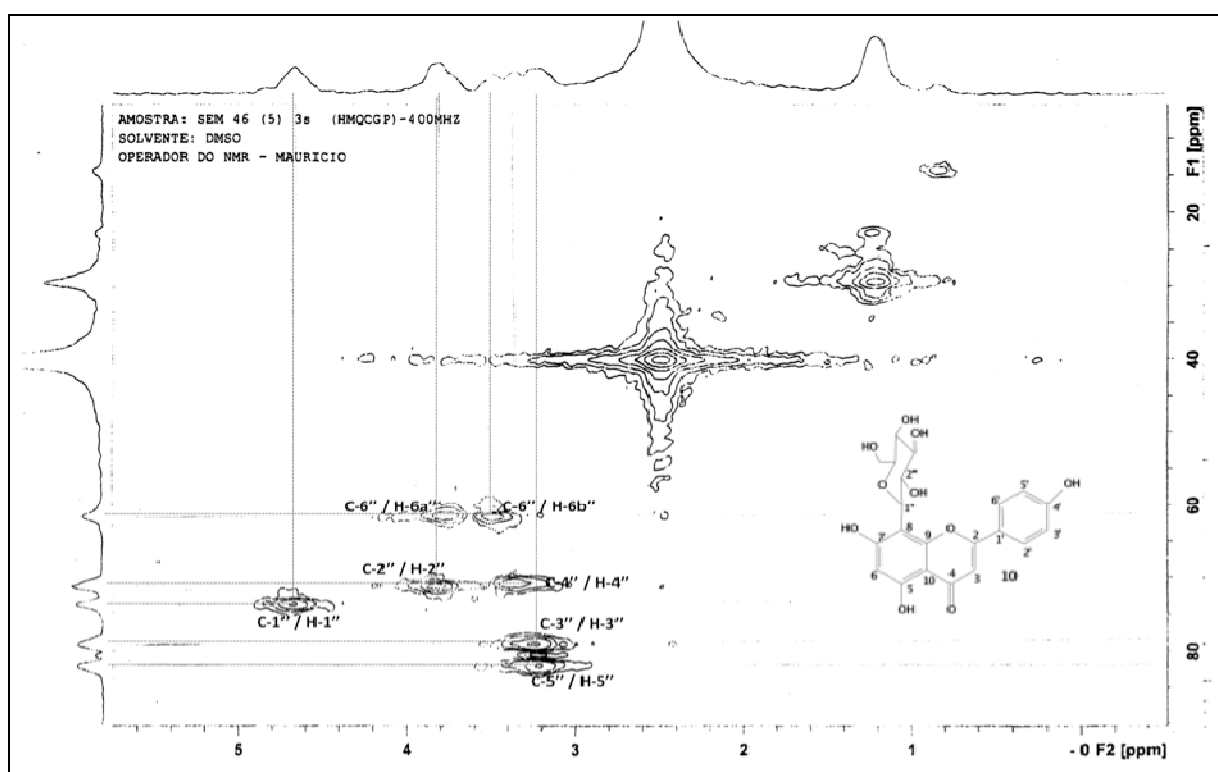


Figura 80. Expansão do espectro de RMN de HMQC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **10**.

VII CONCLUSÕES

Esses são os primeiros resultados de estudo fitoquímico das duas espécies *Ouratea microdonta* e *Sauvagesia erecta* ambas pertencentes a família das *Ochnaceae*.

Foram identificadas 9 substâncias de *Ouratea microdonta*, além do lupeol e da mistura de esteroides, foram isoladas os biflavonóides: agatisflavona, 7-*O*-metilagatisflavona e amentoflavona que são considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero.

O derivado tetrametilagatisflavona serviu para definir a estrutura desta biflavona.

Estudos adicionais com *Sauvagesia erecta* devem ser feitos para certificar a ausência de biflavonóide nos extratos estudados. Esta espécie apresenta flavonóides glicosilados. Além de esteróides, triterpenos, esteróides glicosilados, isolaram-se dois flavonóides, uma isoflavona e a vitexina.

O estudo do látex de *Parahancornia amapa* conduziu à identificação de triterpenos, derivados acil lupeol e nas frações polares uma grande quantidade da dienona conhecida como cornosídeo. A ausência de iridóides nas frações polares deste material, confirma as substâncias isoladas em estudos anteriores e indica uma diferença química entre a espécie estudada (*P. amapa*) e *Himatantus articulata* que é rica em iridóides.

Os extratos e frações do látex de *Parahancornia amapa* exibiram um promissor potencial inseticida e carrapaticida e avaliações adicionais com os componentes puros devem ser feitas para confirmar estas propriedades.

Os extratos de *Ouratea microdonta*, apresentaram baixa atividade moluscicida ao longo de 72 horas de avaliação. A influência dos extratos sobre o percentual de mortalidade e reprodução (número de massas ovíferas) dos moluscos sobreviventes aos bioensaios também foi baixa. Contudo este é o primeiro registro da utilização desta espécie vegetal em bioensaios para avaliação da atividade moluscicida e novos testes com outras partes da planta precisam ser realizados.

VIII. REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; WERFF, H. Van der, KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.*, v. 60, p. 1294-1297, **1997**.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. *Carbon-13 NMR of Flavonoids - Studies in organic chemistry 39*; AGRAWAL, P.K., ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, v. 39, p. 201, **1989**.
- AHAMAD, V. U.; ATTA-UR-RAHMAN. Pentaciclic triterpenes, Handbook of Natural Products Data. Elsevier, N.Y., v.2, p.21-717, **1994**.
- ALEXIS, M. N.; PARIS, R. R.; FAUGERAS, G.; JACQUEMIN, H. Plantes de la Guyane Française v. – Sur les polyphénols du *Sauvagesia erecta* L. *Ochnaceae. Planta medicinales et phytothérapie*, Tome XII, n. 1, p.36-41, **1971**.
- ALVES, C. C. F. Metabólitos especiais isolados de *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), do látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae). Seropédica, RJ, **2003**, 197 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- AMARAL, M. C. E. Phylogenetische systematik der Ochnaceae. *Botanische Jahrbuecher Fuer Systematik*, v.113, n.1, p. 105-196, **1991**.
- BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 314, **1995**.
- BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G.; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KLAPAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, n. 5, p. 430-434, **1998**.
- BARRETO, A. S. Estudo químico de *Himatanthus articulata* (Vahl) Woodson. Itaguaí, RJ, 1994. 139 p. Dissertação (Mestrado em Química, Orgânica-Fitoquímica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **1994**.
- BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 3, **1991**.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos), p. 178, **2007**.
- BREITMAIER, E.; VOELTER, W.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*, New York third, completely revised edition, **1989**.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. *Carbon-13 NMR spectroscopy – High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*. 3th Ed., VCH: Weinheim, p.515, **1989**.

BRUNETON, J. (1993). “Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants”, Lavoisier Publ. Inc., New York, USA. 2nd ed.; Translated by C.K. Hatton **1995**.

CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P. Biological activity of neolignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*. *Fitoterapia*, v. 78, p. 20–24, **2007a**.

CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DIAS, C. S.; SOARES, M. J.; QUEIROZ, M. M. C. Biological activity of yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* v. 44, p. 249– 255, **2007b**.

CARVALHO, M. G. DE., DE CARVALHO G. J. A. de, BRAZ-FILHO; R; chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of Atranorin and new acetyl derivate *J. Braz. Chem. Soc.* V. 11, n.2 p. 143-147, **2000**.

CARVALHO, M. G. de; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 2, n. 4, p. 555-559, **2001**.

CARVALHO, M. G. DE; J. R. VELANDIA, M. C. C. DE OLIVEIRA, A. ECHEVARRIA, R. BRAZ-FILHO AND N. GRYNBERG. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumour Activities of Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochnaceae) in *Recent Progress in Medicinal Plants, Phytochemistry & Pharmacology II*, D.K. Majumar, J.N. GOVIL & V.K. SINGH EDS, SCI Tech Publishing LLC Texas, USA, v. 8, p.77-92, **2002**.

CARVALHO, M. G. DE; DANIEL, J. F. S. ¹H and ¹³C-NMR Assignments of Two New Derivatives from Lanaraflavone, a 4'-O-8" Biflavone Dimer from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae) *Ann. Magn. Reson.* v.4, n.1, p. 29, **2005**.

CARVALHO, M. G. DE; OLIVEIRA, M.C.; GRYNBERG, N. F.; BRIOSSO, P. S. A. Biflavonoid from *Luxemburgia nobilis* as inhibitor of DNA topoisomerases. *Planta Med.*, v. 71, p. 563, **2005**.

CARVALHO, M. G. DE; ROCHA, J. G. DA; CAVATTI L. C.; SUZART, L. R.; CORNELIUS, M. T. F.; DA SILVA, V. C.; CRDOZO, M. A. R. Determinação Estrutural de Flavonóides com Análise de Espectros de RMN ¹H 1D e Reação com Diazometano. *Ver. Univ. Rural. Ser. Ciên. Ex. e da Terra*, v.25, n.46, **2006**.

CARVALHO, M. G. DE; GOMES, M. S. R.; PEREIRA, A. H. F.; DANIEL, J. F. S.; SCHRIPSEMA, J. Carbon-13 and proton NMR assignments of a new agathisflavone derivative. *Magn. Reson. Chem.*, v. 44, n. 35, **2006**.

CARVALHO, M. G. de; ALBUQUERQUE, L. R. M.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, p. 667-669, Dez. **2008**.

CARVALHO, M. G. de; ALBUQUERQUE, L. R. M. de; MENDES A, L. de S.; GUILHON, G M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae). *Rev. Latinoamer. Quím.* v. 36, n. 3, p. 71-75, **2008**

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive, Natural Products - Detection, Isolation and Structural Determination, CRC Press, London, **1993**.

CORRÊA, M, C, R. A avaliação das plantas *Pterodon emarginatus* Vogel 1837, *Magonia pubescens* St. Hil, e *Croton urucurana* Baill 1864, sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e cercaricida sobre *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), p. 85, **2006**.

D'ALMEIDA, J. M.; FERRO, C. L.; FRAGA, M. B. Desenvolvimento Pós-embrionário de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em Dietas Artificiais. *Acta Biol. Leopoldensia*, v. 23, p. 4 -7, **2001**.

DANIEL, J. F. S; CARVALHO, M. G. DE; CARDOSO R. S.; AGRA, M. DE F.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, p.634-638, **2005**.

DANIEL, J. F. S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; ROCHAI, A. B. DA; CARVALHO, M. G. DE. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines *Indian J. Pharmacol.*, v. 39, n.4, p.184, **2007**.

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

ESPINDOLA J. A. A.; CARVALHO, G. J. A. DE; RODRIGUES, E. P.; CARVALHO M. G. DE; LIMA, M. E. F.; SOUZA, S. R. DE; Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. *Floresta e Ambiente*, v. 13, n. 1, p. 53-60, **2006**.

FELÍCIO J. D.; GONÇALEZ,E.; BRAGGIO, M. M.; CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A; LINS, A P.; Inibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*, *Planta Medica* v. 61, p. 217-220, **1995**.

FELÍCIO, J. D.; ROSSI, M. H.; PARK, H. R.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; DAVID,J. M.; CORDEIRO, I; Biflavonoids from *Ouratea multiflora*,; *Fitoterapia* v. 72, p. 453-455, **2001**.

FELÍCIO, J. D.; ROSSI, M. H.; BRAGGIO M. M.; GONÇALZ, E., PAK, A.; CORDEIRO, I.; FELÍCIO; R. C.; Chemical constituents from *Ouratea paviflora*, *Biochem. Syst. And Ecology*, v.32, p. 79-81,**2004**.

FIDELIS, Q. C.; CASTRO, R. N.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T.; SALLES, C. M. C. DE; SALLES, J. B. DE; CARVALHO, M. G. DE. Flavonoids and Other Compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as Anticancer and Chemopreventive Agents, *Molecules*, v.17, p. 7989-8000, **2012**.

GARTLAN, S.; MCKEY D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSAKER, T. T.; A comparative study of the phytochemistry of two African rain florests. *Biochem. Syst. Ecol.* , V. 8, p. 401-422. **1980**.

GOMES, C. M. S.; D'ALMEIDA, J. M.; SANTOS, J. A. A. Avaliação do efeito do látex de *Euphorbia splendens* Var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae), no desenvolvimento pós-embrionário de *Peckia chrysostoma* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae), em condições de laboratório. *Entomologia y Vectores*, v. 10, n. 1. **2003**.

GOTTLIEB, O.R.; MORS, W.A. "Fitoquímica Amazônica: uma apreciação em perspectiva" *Interciência*, v. 3, n. 4, p. 252, **1978**.

GOULART, M. O. F., SANT'ANA, A. E. G., LIMA, R. A. de, CAVALCANTE, S. H., CARVALHO, M. G. de, BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituintes Químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B, *Quim. Nova*, v.16, n.2, p.95-100, **1993**.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, **2007**.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311-335, **2012**.

HOSTETTMANN, K. & MARSTON, A. Antifungal, moluscicidal and cytotoxic compounds from plants used in traditional medicine. In: Biologically Active Natural Products. *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* (Hostettmann & Lea, eds). Oxford: Clarendon Press, p. 65-83. **1985**.

HU, C Q.; CHEN, K.; SHI, Q.; KILKUSKIE, R. E.; CHEMG, Y. C.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat. Prod.*, v. 57, n.1, p.42, **1994**.

KHAN, A. I.; ERDELMEIER, C. A. J.; STICHER, O. New phenolic glucosides from the leaves of *Eurya tigan*. *Journal Nat. Prod.*, v. 55, p. 1270-1274, **1992**.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. S. Plant Molluscicides. *Planta Medica*, v. 46, p. 195-209. **1982**.

KOJIMA, H; SATO, N.; ATANO, A., OGURA, H.; Constituents of the Labiatae plants. 5. sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29 n. 7 p. 2351-2355 **1990**.

KRIWACKI, R. W.; PITNER, T. P. Current aspects of practical two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: applications to structure elucidation. *Pharm. Research*, v. 6, n. 7, p. 531-554, **1989**.

KUO, Y.; KUO, L. Y. Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, v. 44, n.7, p.1275, **1997**.

LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSERICHAI, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T.; Flavonoids from *Ochna integerrima*, *Phytochemistry*, v. 56, p. 353-357, **2001**.

LI, HONG-YU; NEHIRA, T.; HAGIWARA, M.; HARADA, N. Total synthesis and absolute stereochemistry of the natural atropoisomer of the biflavone 4',4'',7,7''-Tetra-O-methylcupressuflavone. *American Chemical Society*, v. 62, n.21, p. 7222-7227, **1997**.

LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.*, v. 65, n.120, **1999**.

LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; MAR, A.; CHEN, F. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.11, p. 2101, **2001**.

LIMA, J. D. de; FONSECA, M. do S. R.; NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. de; Estudo químico de duas espécies de *Ouratea* da Amazônia. 29º RASBQ, PN-121, **2006**.

LUNZ, A. M.; CARVALHO, M. G. DE; CARVALHO, A. G. DE; JORGE, A. C.; GOMES M. S. R. Prospecção Fitoquímica de Três Leguminosas e Associação com Incidência de *Coleópteros Xilófagos*. *Floresta e Ambiente*, v.14, n. 06, **2007**.

MARCAL, P. Q.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; XAVIER, L. F.; Antimicrobial active of the oil of the fruit of *Ouratea parviflora* Baill (Ochnaceae). *Laboratorio de Tecnologia Farmac.*, UFPB CCS, v. 8 n.3 19-21, 1986. Resumo do *Chemical Abstracts* vol 108: 91748n, p. 399, **1988**.

MARKHAM, K. R.; SHEPPARD, C.; GEIGER, H. Carbon-13 NMR Studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. *Phytochemistry*, v.26, p. 3335-3337, p. 19-134, **1987**.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Assays for molluscicidal, cercaricidal, schistotomicidal and piscicidal activities. In: *Methods in Plants Biochemistry* (Dey, P. M. and Harbone, J. B. eds). *London: Academic Press*, v. 6, p. 153-178, **1991**.

MATHEW, N.; ANITHA, M.G.; BALA, T.S.L.; SIVAKUMAR, S.M.; NARMADHA, R.; KALYANASUNDARUM, M. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nystanthes arbortristis* and *Clitoria ternatea* against three mosquito vector species. *Parasitol. Res.*, v. 104, p. 1017-1025, **2009**.

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

MBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. GHOGOMU T. R.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND A.; BODO, B.; Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark; *Phytochemistry*, v.63, p.427-431, **2003a**.

MBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of *Ouratea flava*. *Biochem Syst Ecol*, v. 31, p. 215-217, **2003b**.

MBING, J. N.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATECHADÉ, A. de T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; MBAFOR, J. T.; TIH, G. R.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.;

GUEIFFIER, A. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2666–2670, **2006**.

MENDONÇA, P. M.; LIMA, M. G.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; CARVALHO, M. G.; QUEIROZ, M. M. Effects of latex from "Amapazeiro" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. *Veterinary Parasitology*, v.178, p. 379-382, **2011**.

MELLO-SILVA, C. C. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, p.85, **2005**.

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B.; Triflavonoids of *Ochna calodendron*, *Phytochemistry*, V. 59, p. 435. **2002**.

MONACHE F. D.; ALBUQUERQUE, I. L.DE; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M.; A new catechin and a dimeric proantocianidin from *Ouratea* species; *Tetrahedron Letters*, **1967**, 8 (43) p. 4211-42144. 1967. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 68:104905u, p 10120, **1968**.

MOREIRA, I. C.; DE CARVALHO, M. G.; BASTOS A B. F.; BRAZ-FILHO, R.; A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*, *Phytochemistry*, v. 51, p.833-838 **1999**.

MOREIRA I. C.; SOBRINHO, D. C.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; Isoflavanone dimers Hexaspermone A, B, and C from *Ouratea hexasperma*, *Phytochemistry*, v. 35, n. 6 p. 1567-1572 **1994**.

NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SILVA, M. N. da; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. de. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* v. 19, n. 4, p. 823-827, **2009**.

OLDIGES, M. & TAKORS, R. Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 92, p. 173-96, **2005**.

OLIVEIRA , M. C. C.; DE CARVALHO, M. G. SILVA, C. J.; WERLE, A. A.; New biflavonoids and Other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL) *J. Braz. Chem. Soc.*, v.13, n. 1 p. 119123, **2002**.

PATIL V.; BORASE H. P.; BIPINCHANDRA K. S.; RAHUL B. S. Larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Plumeria rubra* plant latex against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res*, v. 110, p. 1815–1822, **2012**.

PEGNYEMB, D. E.;MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. de T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1922–1926, **2005**

PEZZUTO J. M. "COMENTARY, Plant-Derived Anticancer Agents" Elsevier Science Inc. *Biochem. Pharmacol.*, v. 53, n. 2, p.121, **1997**.

PINTO, Z. T.; MARGARETH, M. C. Q.; JÚLIO, V. B. Efficiency of the latex from *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E. Br.) Ursch & Leandri, Euphorbiaceae, in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev. Brasileira de farmacognosia*, v. 21, n.3, **2011**.

QUEIROZ, M. M. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool*, v. 8, p. 75-84, **1991**.

RAPINI, A. Sistemática: estudos em *Asclepiadoideae* (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, **2000**.

RIBEIRO, G. D. Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades. *Embrapa Rondônia*, Porto Velho, RO, 179p., **2010**.

ROUQUAYROL, M. Z. Atividade Moluscicida de Plantas do Nordeste Brasileiro. *R.C.C.S*, Julho **1984**.

SALVADOR, G. S.; CERVI, A. C.; BROTTTO, M. L.; SANTOS, É. P. A família Ochnaceae DC. no estado do Paraná, Brasil. *Acta botanica brasilia*. v. 24, n. 2, p. 423-434, **2010**.

SALVADOR, G. S., CERVI, A. C., SANTOS, E. P. dos, Flórula do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Estado do Paraná, Brasil: Ochnaceae. *Estud. Biol.*, v. 27, n. 61, p. 13, **2005**.

SANTOS, F. D.; SARTI, S. J.; BASTOS, J. K.; SOUZA, C. D.; LEITÃO, H. F.; ABREU, J. E. Quimioprofilaxia da Esquistossomose: Atividade Moluscicida de Produtos Naturais-ensaios com caramujos adultos e desova. *Rev. Bras. Farm.*, v.71, n. 1, p. 18-23, **1990**.

SANTOS, M. J. P.; MOYA-BORJA, G. E. Estudo comparado do desenvolvimento pós-embrionário de *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Fanniidae), em diferentes substratos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p. 253-261, **1997**.

SASTRE, C. Studies os the Flora of the Guianas 34. Synopsis generic *Ouratea Aublet* (ochnaceae). *Bulletin Du Muséum National d'Histoire Naturelle*, Paris 4ed., série 10, section B, Adansônia 1: 47-67, **1988**.

SAXENA, G., MCCUTCHEON, A.R., FARMER, S., TOWERS, G.H.N., Hancock, R.E.W. Antimi-icrobial Constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 42, n.2, p.95-99, **1994**.

SCOTT, K.N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J. of the Am.Chem.Soc.*, v. 94, n. 24, p. 8564-8568, **1972**.

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

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triperpênicos de *Himatanthus sucuruba* (Spruce) Woodson. *Química Nova*, v.21, n.6, p. 702-704, **1998**.

SILVA, T. M. S; Estudo químico de espécie de *Solanum* (Solanaceae). Tese Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2002**.

SILVA, S. L. C.; ALVES, C. C. F.; BORBA, H. R.; CARVALHO, M. G. DE; BOMFIM, T. C. B. DO. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos de *Luxemburgia octandra* st. hill. em camundongos naturalmente infectados com *Aspicularis tetraptera* e *Vampirolepis nana*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.14, n.3, p.106, **2005**.

SILVA, M. DA S.; SHANLEY, P.; MELO T.; CARMENITA R., NASI. R. From conflict of use to multiple use: Forest management innovations by small holders in Amazonian logging frontiers. *Forest Ecology and Management*, v. 268, p. 70–80, **2012**.

SOBRINHO, D. C., HAUPTLI, M. B.; APPOLINARIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO M. G.; BRAZ-FILHO, R.; Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapá*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 2, n.1, p. 15-20, **1991**.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. *W. H. Freeman and Co.*, San Francisco, 188 p., **1979**.

SOUSA, M. P. DE.; ROUQUAYROL, M. Z.; SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.51, p. 1-9, **1970**.

SOUZA, C. P. de. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 34, n. 5, p. 459-466, **1992**.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Editora Plantarum, Nova Odessa. **2005**.

SUZART, L.R.; DANIEL, J.F. de S.; CARVALHO, M.G. de; KAPLAN, M.A.C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos de espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). *Quím. Nova*, v. 30, n. 4, p. 984-987, **2007**.

SUZART, L.R.; DANIEL, J.F. de S.; CARVALHO, M.G. de; KAPLAN, M.A.C.; CAVATTI, L. C. Chemical Constituents from the Inflorescences of *Ouratea hexasperma*. *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 48, n. 3, July, **2012**.

TIH A.; MARTIN M. T.; TIH, R. G.; VUIDEPOT, I.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B.; Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of *Lophira alata*, *Phytochemistry*, v.31, n. 10 p. 3595-3599 **1992**.

TIH R. G.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B.; Structure of Lophirones B and C, biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*, *Phytochemistry* , v. 28, n. 5 p. 1557-1559 **1989**.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas Medicinais na Amazônia - Contribuição ao seu conhecimento sistemático. CNPq/PRU/MPEG, Belém-PA, Brasil, **1982**.

VANDERLEI, M. F.; SILVA, M. S.; GOTTILIEB, H. E.; BRAZ-FILHO, R. Iridoids and Triterpenes from *Himatanthus phagedaenica*: The complete Assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of two iridoid glycosides. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.2, n. 2, p. 51-55, **1991**.

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

VELLOSO, C. R. X.; Triterpenos isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos isolados de *Pinus caribaea* var. bahamensis Barr et Golf, Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **1998**.

VELOSO, M. P.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T. de. β-Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 27, p. 669-671, **1999**.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. "Análise do Metaboloma", *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, v.9, n.36, p.58-69, **2006**.

VILLAS-BÔAS, S. G., MAS, S., AKESSON, M., JORN, S. & NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spect Rev*, v. 24, p. 613-646, **2004**.

VOGEL, A. I. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. 5th ed., Longman, England, 1989. p. 433.

XAVIER, V. B. Atividade biológica dos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, **2010**.

XU, H. X.; ZENG, F. Q.; WAN, M.; SIM, K. Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, v. 59, n. 7, p. 643-645, **1994**.

WANGER, H.; WOLFF, P. "New Natural Products and Plant Drug with a Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity" Springer-Verlag, Berlin, **1977**.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of Schistosomiasis: Second Report of the Who Expert Committee, World Health Organization, Geneva. *Who Technical Report Series*, n. 830, p.86, **1993**.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicide screening and evaluation. *Bulletin World Health Organization*, v. 33, p. 565-581, **1995**.

ZHOU, X., PENG, J.; FAN, GUORONG; WU, Y; Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 1092 p. 216-221, **2005**.

ZINTCHEM, A. A.; ATCHADÉ, A. T.; GHOGOMU, R.; MBAFOR, J. T.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae), *Biochem Syst Ecol*, v, 35, p. 255-256, **2007**