

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE CAROLINE KIATKOSKI

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS E SEMENTES DE
Pterodon emarginatus Vogel E *Pterodon polygalaeflorus* Benth**

CURITIBA

2011

ELAINE CAROLINE KIATKOSKI

ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS E SEMENTES DE
***Pterodon emarginatus* Vogel E *Pterodon polygalaeflorus* Benth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-Orientador: Dr. Lauro Mera de Souza

CURITIBA

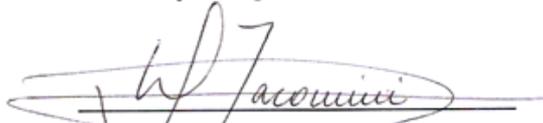
2011

TERMO DE APROVAÇÃO

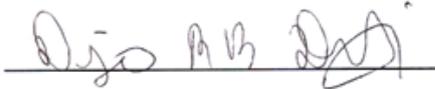
Elaine Caroline Kiatkoski

ESTUDO FITOQUÍMICO DOS FRUTOS E SEMENTES DE *Pterodon emarginatus* Vogel E *Pterodon polygalaeflorus* Benth

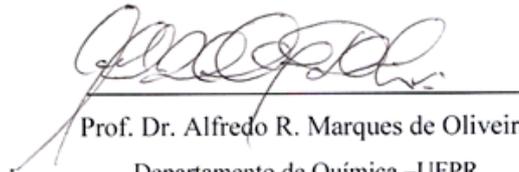
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Marcello Iacomini – Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular -UFPR



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular -UFPR



Prof. Dr. Alfredo R. Marques de Oliveira
Departamento de Química –UFPR

Curitiba, 10 de fevereiro de 2011.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

Co-orientador: Dr. Lauro Mera de Souza

Colaboradora: Dr^a. Yanna Dantas Rattmann

***Dedico este trabalho com todo meu amor e carinho às
pessoas que mais me apóiam para que esta e muitas outras
conquistas se tornem realidade: meus pais, Jandira e
Claudinei, e meu namorado Rafael, amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, e em especial:

Ao meu orientador Prof. Guilherme L. Sasaki por aceitar a proposta de pesquisa e conseqüente realização deste trabalho, por ter confiado em mim e participado do meu crescimento científico e pessoal, sempre incentivando a pesquisa. E também pela realização das análises de RMN.

Ao meu co-orientador Lauro Mera de Souza por se disponibilizar a me orientar, participando ativamente do trabalho com diversas sugestões e idéias, além de todos os ensinamentos e realização das análises por GC-MS, ESI-MS e UPLC.

À pós-doutoranda Yanna Dantas Rattmann pela sua grande colaboração no experimento biológico, e sua pronta disponibilidade em sempre me ajudar. E também à IC Simone por seu grande auxílio durante estes experimentos.

Ao Prof. Marcello Iacomini pelos conselhos e todo apoio, principalmente agora nesta reta final.

Ao Prof. Philip Gorin pelas sugestões de experimentos e empréstimo dos padrões de inositol.

Aos professores do departamento de química, Prof. Anderson Barison e Professor Alfredo R. M. de Oliveira, pelos auxílios prestados ao trabalho.

Aos meus primeiros orientadores, Prof.^a Dionezine de Fátima Navarro, e Prof. Flávio Luiz Beltrame, que me abriram as portas para o mundo da pesquisa.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, e mesmo de longe, sinto que estão mais presentes do que nunca, compartilhando de minhas ansiedades e alegrias, e por me proporcionarem o bem mais precioso que existe, a educação.

Ao meu “namorado”, Rafael por ser meu grande companheiro de todas as horas, que me entende e me apóia. Amo você!

À toda minha família, e em especial à tia Jane, com quem mais tenho convivido, por toda sua torcida, incentivo e ajuda nestes dois anos últimos anos.

Às grandes amigas que conquistei, presentes na minha vida desde o início do mestrado, e desejo que para sempre, Fran, Tati, Nessa e Aline, vocês fizeram a diferença nestes dois anos! Adoro vocês!!!

À pós-doutoranda Fernanda Simas, colega e amiga de laboratório, sempre disposta a ajudar ou simplesmente conversar, sendo uma ótima conselheira e “animadora de ânimos”. Te adoro!

Ao pós-doutorando Arildo José Braz de Oliveira, pelos ensinamentos e sugestões no decorrer de todo o mestrado.

Ao doutorando Arquimedes, sempre disposto a ajudar, agradeço pelas análises de RMN.

A todos os colegas e amigos de laboratório.

À Rosane, por se disponibilizar a me ensinar e realizar as análises por GC.

Aos meus amigos Jana, Mary, Michele, Sudol e Simone, por toda sua amizade, vocês são muito importantes para mim!

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

***"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."***

Leonardo da Vinci

RESUMO

As espécies *Pterodon emarginatus* e *Pterodon polygalaeflorus*, conhecidas como sucupira, são plantas nativas do cerrado brasileiro. Extratos alcoólicos de seus frutos e sementes são popularmente utilizados como antiinflamatórios (principalmente contra reumatismo), sendo que diversos estudos químicos e farmacológicos vem sendo realizados, corroborando seus vários efeitos farmacológicos. Este trabalho apresenta como principal objetivo a detecção e caracterização de metabólitos secundários nos extratos etanólicos dos frutos de *P. emarginatus* e *P. polygalaeflorus*. Os frutos e sementes de ambas as espécies foram submetidos à extração etanólica à quente, originando os extratos brutos EBE (*P. emarginatus*) e EBP (*P. polygalaeflorus*). Estes foram então submetidos à fracionamento líquido-líquido, com hexano, butanol e metanol/água, seguindo esta ordem de polaridade, originando as frações FHE, FBE, FME, FHP, FBP e FMP. Através de análises por GC-MS das amostras trimetilsililadas, para EBE foi identificado o δ -elemeno (R_t 11,716), e os cariofillenos (R_t 12,134 e 12,537); para FHE, o geranilgeraniol (R_t 16,27) e para FME foi observado apenas um composto majoritário (composto **X**), enquanto que FME hidrolisada, reduzida e acetilada e analisada por GC-MS, resultou na detecção arabinose, xilose, galactose e glucose, além de um inositol, e novamente o composto **X**. Este composto foi purificado por cromatografia em coluna, e identificado posteriormente como o D-pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol), através das técnicas de GC-MS, ESI-MS, RMN (^{13}C - δ 60,87, 72,1, 72,7, 73,5, 73,8, 74,4 e δ 84,9) e polarimetria, descrito pela primeira vez para esta espécie. Para EBP e FHP foi detectado o cariofilleno (R_t 12,124); para FMP, xilose pertrimetilsililada (R_t 15,52), glucose pertrimetilsililada (R_t 18,28), sacarose pertrimetilsililada (R_t 23,54). Análises de ESI-MS, para EBE, sugeriram a presença de 7 β -acetoxivouacapano, metil-7 β -acetoxi-6 α -hidroxivouacapano e de mais dois derivados do vouacapano contendo grupos $\text{CH}_3\text{-O-}$ em posições não definidas; e, para no EBP, 6 α , 7 β -dihidroxivouacapano, 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano, 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano. Análises de RMN ^{13}C de FHE, FBE, FHP e FBP, revelaram a presença de diversos sinais compatíveis com a estrutura básica do vouacapano, sendo que a FHP apresentou os deslocamentos químicos compatíveis com o 6 α -acetoxivouacapano e o 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano os quais foram purificados e confirmados, através das técnicas de ESI-MS e RMN. Além disso, devido ao D-pinitol ser citado como um importante composto antiinflamatório, a fração FME, contendo o D-pinitol, foi testada em relação ao seu efeito sobre o quadro de sepse induzido em camundongos, apresentando uma considerável taxa de sobrevivência de 50% na concentração de 70 mg/kg, evidenciando uma potencial aplicação para os frutos de *P. emarginatus*.

Palavras-chave: *Pterodon emarginatus*, *Pterodon polygalaeflorus*, D-pinitol, vouacapano, GC-MS, ESI-MS, RMN.

ABSTRACT

The plant species *Pterodon emarginatus* and *Pterodon polygalaeflorus* known as sucupira, are native to the Brazilian cerrado. Alcoholic extract of its fruits and seeds are popularly used as anti-inflammatory drugs (especially against rheumatism), and the different chemical and pharmacological studies have been carried out, confirming its pharmacological effects. The present work aim the detection and characterization secondary metabolites from ethanol extracts from the fruits of *P. emarginatus* and *P. polygalaeflorus*. The fruits and seeds of both species were extracted with hot ethanol, resulting in the crude extract EBE (*P. emarginatus*) and EPE (*P. polygalaeflorus*). These were then subjected to liquid-liquid fractionation with hexane, buthanol and methanol/water, following this polarity order. This resulted in fractions FHE, FBE, FME, FHP, FMP and FBP. By GC-MS analysis of trimethylsilyl derivatives, it was found δ -elemene (R_t 11.716), and cariofillenes (R_t 12.134 and 12.537) in EBE. In FHE the geranylgeraniol (R_t 16.27)and was found in FME one major compound (named compound **X**). FME was hydrolyzed, reduced, acetylated and analyzed by GC-MS, resulted in the detection arabinose, xylose, galactose, glucose and inositol. Again the compound X was present as main component. This compound was purified by column chromatography and subsequently identified as D-pinitol (3-O-methyl-D-*chiro*-inositol), via GC-MS, ESI-M, NMR, with ^{13}C chemical shifts of: δ 60.87, 72.1, 72.7, 73.5, 73.8, 74.4, 84.9, and polarimetry. This structure had not been previously described to specie *Pterodon emarginatus*. For EBP and FHP was detected cariofillene (R_t 12.124); for FMP, xylose (R_t 15.52), glucose (R_t 18.28), sucrose (R_t 23.54) as trimethylsilyl derivatives. EBE in ESI-MS analysis showed the presence of 7 β -acetoxyvouacapane, methyl-7 β -acetoxy-6 α -hydroxyvouacapane and two derivatives containing CH₃-O- on not defined positions. On EBP the ESI-MS reveled the 6 α ,7 β -dihydroxivouacapane, 6 α -acetoxy-7 β -hydroxyvouacapane, 6 α ,7 β -diacetoxyvouacapane. ^{13}C NMR of FHE, FBE, FHP and FBP, revealed several signals consistent with the vouacapano core. The chemical shifts from FHP were consistent with 6 α -acetoxyvouacapane and 6 α , 7 β -diacetoxivouacapano which were purified and confirmed by ESI-MS and NMR. Moreover, since D-pinitol has been cited as an important anti-inflammatory compound, the fraction FME, containing the D-pinitol was tested for its effect on the signs of sepsis induced in mice, showing a significant survival rate of 50% at a concentration of 70 mg/kg, indicating a potential application for the fruit of *P. emarginatus*.

Keywords: *Pterodon emarginatus*, *Pterodon polygalaeflorus*, D-pinitol, vouacapane, GC-MS, ESI-MS, NMR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– ORIGEM DAS PRINCIPAIS CATEGORIAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM RELAÇÃO ÀS VIAS METABÓLICAS BÁSICAS.....	20
FIGURA 2	– PROCEDIMENTO GERAL DE PARTIÇÃO E PROVÁVEL SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM PLANTAS.....	22
FIGURA 3	– PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS.....	23
FIGURA 4	– ESTRUTURAS DITERPENOS 6 α -HIDROXIVOUCAPAN-7 β -17 β -LACTONA E 6 α ,7 β -DIHIDROXIVOUCAPAN-17 β -OATO METIL ESTER.....	28
FIGURA 5	– FOTOS DE <i>Pterodon emarginatus</i>	29
FIGURA 6	– FOTOS DE <i>Bowdichia virgiloides</i> Kunth.....	30
FIGURA 7	– PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM FRUTOS E SEMENTES DE <i>P.emarginatus</i>	31
FIGURA 8	– FOTOS <i>Pterodon polygalaeflorus</i>	34
FIGURA 9	– SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM FRUTOS/SEMENTES DE <i>P.polygalaeflorus</i>	34
FIGURA 10	– DERIVADOS VOUCAPÂNICOS ENCONTRADOS EM FRUTOS/SEMENTES DE <i>P.polygalaeflorus</i>	35
FIGURA 11	– SEQUÊNCIA PATOGENICA DOS EVENTOS NA SEPSE.....	40
FIGURA 12	– MODELO EXPERIMENTAL DE “LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL – CLP”.....	52
FIGURA 13	– FOTO DA SEMENTE DE <i>P. emarginatus</i> CORTADA AO MEIO.....	54
FIGURA 14	– CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DAS AMOSTRAS EBE, FHE, FBE E FME.....	56
FIGURA 15	– CROMATOGRAMAS (GC-MS) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES TRIMETILSILILADAS DE <i>P. emarginatus</i>	57
FIGURA 16	– ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DAS AMOSTRAS....	58
FIGURA 17	– ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES DE <i>P. emarginatus</i>	59
FIGURA 18	– CROMATOGRAMA (GC-MS) DA FME HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA.....	60
FIGURA 19	– ESPECTROS PARCIAIS DE RMN ¹³ C DE FME E DE SUAS SUBFRAÇÕES (F-2 A F-8).....	62
FIGURA 20	– CROMATOGRAMA (GC-MS) DA SUB-FRAÇÃO F-5 ACETILADA.....	64
FIGURA 21	– ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DA SUB-FRAÇÃO F-5 LITIADA.....	64
FIGURA 22	– (+)-PINITOL (3-O-METIL-D- <i>CHIRO</i> -INOSITOL).....	65
FIGURA 23	– ESPECTROS DE RMN HSQC E HMBC DE F-5 (composto X).....	66
FIGURA 24	– POSSÍVEIS CONFIGURAÇÕES PARA OS INOSITÓIS.....	67
FIGURA 25	– CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 METILADA E OS DOS PADRÕES DE INOSITOL E (G) PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO TÍPICO DOS INOSITÓIS PERMETILADOS.....	68

FIGURA 26 – CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 METILADA E O PADRÃO D-PINITOL METILADO; E OS CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 ACETILADA E DO PADRÃO D-PINITOL ACETILADO.....	69
FIGURA 27 – ESTRUTURAS DO L- <i>CHIRO</i> -INOSITOL, D- <i>CHIRO</i> -INOSITOL E DE SEU CORRESPONDENTE 3-O-METILADO (D-PINITOL).....	70
FIGURA 28 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DAS AMOSTRAS EBP, FHP, FBP E FMP.....	72
FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS (GC-MS) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES TRIMETILSILILADOS DE <i>P. polygalaeflorus</i>	73
FIGURA 30 – ESPECTROS DE ESI-MS ² PARCIAIS EM MODO POSITIVO DAS AMOSTRAS FHE E FBE.....	74
FIGURA 31 – ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS FRAÇÕES DE <i>P. polygalaeflorus</i> FHP, FBP, E FMP.....	75
FIGURA 32 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA (TLC) DAS SUBFRAÇÕES DE FHP OBSERVADAS COM REVELAÇÃO DE EtOH:H ₂ SO ₄ (95:5 v/v) E EM CÂMARA UV EM 365 nm.....	76
FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS DE UPLC-ELS E GC-MS DA FRAÇÃO FHP E DE SUAS SUBFRAÇÕES MAIS PURAS, P-21 E P-95.....	77
FIGURA 34 – ESPECTROS DE RMN ¹³ C E DEPT-135 DAS SUBFRAÇÕES DE FHP, P-21 E P-95, RESPECTIVAMENTE.....	78
FIGURA 35 – ESTRUTURA DO TERPENO 6 α -ACETOXIVOUCAPANO.....	80
FIGURA 36 – ESPECTRO DE ESI-MS ² DO ÍON <i>m/z</i> 351, DA SUBFRAÇÃO P-21....	80
FIGURA 37 – ESPECTRO DE ESI-MS ² DO ÍON <i>m/z</i> 409, DA SUBFRAÇÃO P-95....	81
FIGURA 38 – EFEITOS DA FME SOBRE A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS EM SEPSE.....	82

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DEFINIÇÃO CLÍNICA DE SEPSE.....	36
QUADRO 2 – NOMENCLATURA DAS FRAÇÕES OBTIDAS.....	44
QUADRO 3 – DESIGNAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.....	52
QUADRO 4 – RENDIMENTO (P/P) DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES.....	55
QUADRO 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE FME.....	61
QUADRO 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DETECTADOS NAS SUBFRAÇÕES F-2 A F-7.....	61
QUADRO 7 – ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DE CADA PADRÃO DE <i>CHIRO</i> -INOSITOL E DA SUBFRAÇÃO F-5.....	70
QUADRO 8 – ASSINALAMENTOS DE RMN ¹³ C E DEPT-135 DAS SUBFRAÇÕES DE FHP, P-21 E P-95, RESPECTIVAMENTE.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

Solventes, Reagentes e Grupos Químicos

AcO-	– Grupo acetoxi
AcOH	– Ácido acético
BuOH	– Butanol
BSTFA	– Bistrimetilsilil trifluoroacetamida
C	– Carbono
CDCl ₃	– Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	– Metanol deuterado
CHCl ₃	– Clorofórmio
CH ₃ I	– Iodeto de metila
CuSO ₄	– Sulfato de cobre
DMSO	– Dimetilsulfóxido
EtOAc	– Acetato de etila
EtOH	– Etanol
H	– Hidrogênio
H ₂ O	– Água
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
LiCl	– Cloreto de lítio
MeOH	– Metanol
N ₂	– Nitrogênio
NaBH ₄	– Boroidreto de sódio
NaOH	– Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	– Hidróxido de amônio
n-PrOH	– <i>n</i> -Propanol
TFA	– Ácido trifluoroacético

Extratos e Frações

EBE	– Extrato Bruto de <i>Pterodon emarginatus</i>
EBP	– Extrato Bruto de <i>Pterodon polygalaeflrus</i>
FHE	– Fração Hexano de <i>Pterodon emarginatus</i>
FHP	– Fração Hexano de <i>Pterodon polygalaeflrus</i>
FBE	– Fração Butanol de <i>Pterodon emarginatus</i>
FBP	– Fração Butanol de <i>Pterodon polygalaeflrus</i>
FME	– Fração Metanol:Água de <i>Pterodon emarginatus</i>
FMP	– Fração Metanol:Água de <i>Pterodon polygalaeflrus</i>
F-1	– Fração extraída de FME com CHCl ₃
F-2	– Fração extraída de FME com CHCl ₃ 90% e MeOH 10%
F-3	– Fração extraída de FME com CHCl ₃ 80% e MeOH 20%

- F-4 – Fração extraída de FME com CHCl₃ 70% e MeOH 30%
- F-5 – Fração extraída de FME com CHCl₃ 60% e MeOH 40%
- F-6 – Fração extraída de FME com CHCl₃ 50% e MeOH 50%
- F-7 – Fração extraída de FME com MeOH
- F-8 – Fração extraída de FME com MeOH 50% e H₂O 50%
- F-9 – Fração extraída de FME com H₂O

Métodos analíticos

- API – *Atmospheric Pressure Ionization* (ionização em pressão atmosférica)
- CID – *Collision Induced dissociation* (fragmentação induzida por colisão)
- ELSD – *Evaporative Light Scattering Detector* (espalhamento de luz)
- ESI – *Electrospray Ionization* (ionização por spray de elétrons)
- FID – *Free Induction Decay* (livre decaimento da magnetização induzida)
- GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
- HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
- TOCSY – *TOTAL Correlation Spectroscopy* (espectroscopia de correlação total)
- m/z* – Relação massa/carga
- MS – *Mass Spectrometry* (espectrometria de massas)
- MS² – Espectro de fragmentação de massa (*tandem-MS*)
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- R_f – Fator de retenção
- R_t – Tempo de retenção
- TLC – *Thin Layer Chromatography* (cromatografia em camada delgada)
- UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de ultra eficiência)
- [α]_D – rotação óptica específica

Atividade biológica

- CFL – Tratamento com ceftriaxona + clindamicina
- CLP – *Caecal Ligation and Puncture* (ligadura e perfuração do ceco)
- DEX – Tratamento com dexamentasona
- i.p. – Via intraperitonal
- FO – Falso-operados
- OP – Operados
- s.c. – Via subcutânea
- v.o. – Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO	18
2.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS – PANORAMA GERAL	20
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA Fabaceae (Leguminosae).....	25
2.4 O GÊNERO <i>Pterodon</i>	27
2.5 ASPECTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DE <i>Pterodon emarginatus</i> Benth	28
2.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DE <i>Pterodon polygalaeflorus</i> Benth.....	32
2.7 SEPSE	36
2.7.1 Modelos Experimentais de Sepse.....	37
2.7.2 Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Sepse.....	39
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5 MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	43
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS.....	43
5.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS	43
5.4 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS	44
5.4.1 Hidrólise, Redução e Acetilação	44
5.4.2 Trimetilsililação	45
5.4.3 Metilação	45
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	46
5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	46
5.5.2 Cromatografia em Coluna da FME.....	46
5.5.3 Cromatografia em Coluna da FHP.....	47
5.5.4 Determinação da Rotação Óptica	47
5.5.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	48
5.5.6 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	49
5.5.7 Espectrometria de Massas.....	49
5.5.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	50

5.6 TESTE BIOLÓGICO DA FME	50
5.6.1 Animais	50
5.6.2 Procedimento para Indução da Sepse - CLP	51
5.6.3 Curva de Letalidade	53
5.6.4 Análise Estatística.....	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES	54
6.2 ANÁLISE QUÍMICA DE <i>Pterodon emarginatus</i>	55
6.2.1 Fracionamento da FME	60
6.3 ANÁLISE QUÍMICA DE <i>Pterodon polygalaeflorus</i>	71
6.3.1 Fracionamento da FHP	76
6.4 EFEITO DA FME SOBRE QUADRO DE SEPSE INDUZIDO	81
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXO 1.....	93

1 INTRODUÇÃO

As plantas sempre desempenharam, e continuam a desempenhar um papel fundamental na manutenção da vida humana, não apenas pelo fornecimento de alimentos, mas também por prover outras necessidades como o fornecimento de energia térmica e medicamentos (MELO, 2007). Durante séculos, as plantas foram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003), e o profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O convívio com estes povos e os conhecimentos transmitidos de uma geração para outra trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas, e as inter-relações animais/plantas (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar de seu emprego empírico, as plantas medicinais continuam a ser usadas pela população até hoje e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial recorre às medicinas tradicionais para atender suas necessidades primárias de assistência médica (VERDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Entre os 252 fármacos essenciais selecionados pela OMS, 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos semi-sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais. Inegavelmente, as plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam um papel importante na terapêutica: cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005).

Entretanto, o potencial das plantas como fonte de pesquisa na busca de novos medicamentos é ainda pouquíssimo explorado, pois, de todas as espécies de plantas existentes no mundo, somente uma pequena parcela destas tem sido alvo de investigações fitoquímicas e biológicas, e menos de 2.500 têm sido caracterizadas com relação aos seus metabólitos secundários (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; SHU, 1998).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al*, 2000) sendo de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de medicamentos, visando no futuro à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003).

Fazendo parte deste arsenal vegetal com potencial capacidade terapêutica, e objeto deste estudo, encontram-se as espécies *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon polygalaeflorus* Benth, árvores popularmente conhecidas como sucupira. Pertencem a um pequeno gênero contendo quatro espécies medicinais amplamente distribuídas na região do Cerrado brasileiro, onde todas elas são reconhecidas por suas aplicações terapêuticas (VIEIRA *et al*, 2008).

Extratos alcoólicos dos frutos¹ destas plantas são utilizados na medicina popular como antiinflamatórios, principalmente contra reumatismo, dores de garganta e analgesia em geral. Os óleos dos frutos de pelo menos três espécies têm ação protetora contra a infecção por *Schistosoma mansoni* (EUZÉBIO, 2009), possuindo atividade anti-cercária, fato este que motivou o início das pesquisas com estas espécies (CARVALHO *et al*, 1999). Devido às suas propriedades farmacológicas, as sementes são comumente comercializadas em mercados populares (DUTRA *et al*, 2009).

A fim de validar a prática tradicional, diversos estudos *in vivo* com o óleo dos frutos foram desenvolvidos, corroborando com seus vários efeitos farmacológicos e fisiológicos (VIEIRA *et al*, 2008). Investigações fitoquímicas anteriores revelam a presença de alcalóides na casca, isoflavonas e alguns triterpenos na madeira, e diterpenóides e isoflavonas no óleo da semente (COELHO *et al*, 2005; VIEIRA *et al*, 2008; EUZÉBIO, 2009). Entretanto, não existem estudos abrangentes da composição química das duas espécies. E, além disso, apesar da existência de vários estudos farmacológicos focando atividade antiinflamatória, não existem estudos sobre o comportamento dos extratos destas espécies sobre um quadro de sepse, sendo estas as finalidades deste estudo.

¹ Fruto pterocarpo (sâmara), tendo na parte externa central uma estrutura alveolar cheia de óleo (LORENZI, 2008), erroneamente também chamado de semente, por se tratar de um fruto seco portanto, quando referido o óleo da semente, é do fruto que está se falando.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados, são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas são designadas, respectivamente, como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SIMÕES *et al*, 2004).

Todas as plantas produzem constituintes químicos, os quais fazem parte de suas atividades metabólicas normais. Estes podem ser divididos em metabólitos primários, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos, encontrados em todas as plantas, e os metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Metabólitos secundários não têm uma função óbvia no metabolismo primário vegetal como crescimento, fotossíntese, reprodução, ou outra função primária da célula vegetal. Eles podem possuir um papel ecológico, como atrativos de polinizadores, representando adaptações químicas ao estresse do meio ambiente, ou serem responsáveis pela defesa química da planta contra microrganismos, insetos e predadores maiores, ou mesmo outras plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os estudos destas substâncias foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, devido às suas diversas aplicações (TAIZ; ZEIGER, 2009). O homem utiliza muitos destes compostos como alimentos de alto valor nutritivo (nutracêuticos), temperos, aromas e fragrâncias, óleos vegetais, resinas, inseticidas, matérias-primas agrícolas, bem como medicamentos e outros fins industriais. Estes usos se refletem diretamente sobre os metabólitos secundários que são utilizados comercialmente como compostos biologicamente ativos (produtos farmacêuticos, temperos, fragrâncias, etc.), gerando produtos de alto valor em

pequena quantidade quando comparados aos metabólitos primários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Além disto, os metabólitos secundários, em contraste com os primários, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando sua extração e purificação mais trabalhosa. Estes constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero, e espécie produzem uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Os metabólitos secundários podem ser classificados com base na sua estrutura química (p.ex. possuir anel, com ou sem unidades de açúcar), composição (p.ex. conter ou não nitrogênio), a via pela qual é biossintetizado, origem da planta ou sua solubilidade em vários solventes (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Uma classificação simples inclui três grupos principais:

1. *Terpenoides* (originários da via do mevalonato, compostos quase que inteiramente de carbono e hidrogênio).
2. *Fenólicos* (originários de açúcares simples, contendo anéis benzênicos, hidrogênio, e oxigênio).
3. *Compostos contendo nitrogênio* (ou também contendo enxofre) (SIMÕES *et al*, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Como pode ser visualizado na Figura 1, a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glucose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (SIMÕES *et al*, 2000).

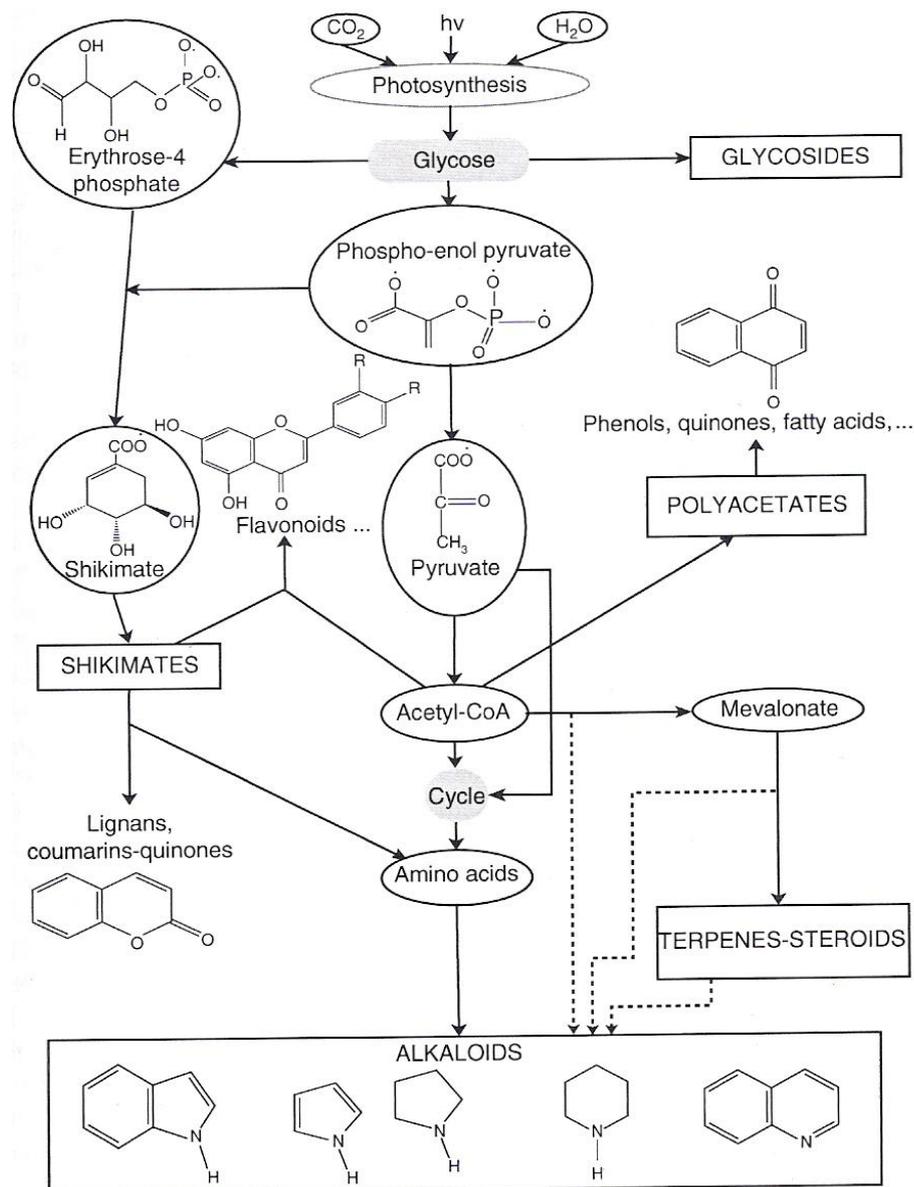


FIGURA 1 - ORIGEM DAS PRINCIPAIS CATEGORIAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM RELAÇÃO ÀS VIAS METABÓLICAS BÁSICAS. FONTE: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, SHERMA, KOWALSKA (2008).

2.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS – PANORAMA GERAL

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). O grande crescimento da pesquisa de produtos naturais nos últimos anos deve-se principalmente ao rápido avanço de técnicas de isolamento e análise dos

compostos bioativos em plantas, e pela facilidade da busca de informações em vários sistemas de bases de dados (NIERO *et al*, 2003).

A primeira etapa da investigação fitoquímica é a coleta do material vegetal. É essencial que a seleção do material coletado seja feita com cuidado, evitando coletar partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação. Deve-se registrar o local, a hora e a data da coleta, já que o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são os seguintes: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Segue-se então a extração, e antes de executá-la deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, como as características do material vegetal, seu grau de divisão, meio extrator (solventes) e a metodologia (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000), nunca sendo descartada a possibilidade de formação de artefatos (NIERO *et al*, 2003). A maneira inicial mais óbvia de preparar corretamente uma amostra é a escolha adequada do solvente de extração (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Geralmente se usam solventes polares como etanol ou metanol para fazer a primeira extração (NIERO *et al*, 2003; HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003), e os fracionamentos posteriores são realizados, permitindo uma divisão mais fina em frações de distintas polaridades (FIGURA 2) (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Atualmente existem diferentes métodos de extração, dentre eles, a turbolização, a maceração e a percolação (extrações à frio); infusão, turbolização e decocção (extrações à quente em sistemas abertos); e extração sob refluxo e a em aparelho de Soxhlet (extrações à quente em sistemas fechados) (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

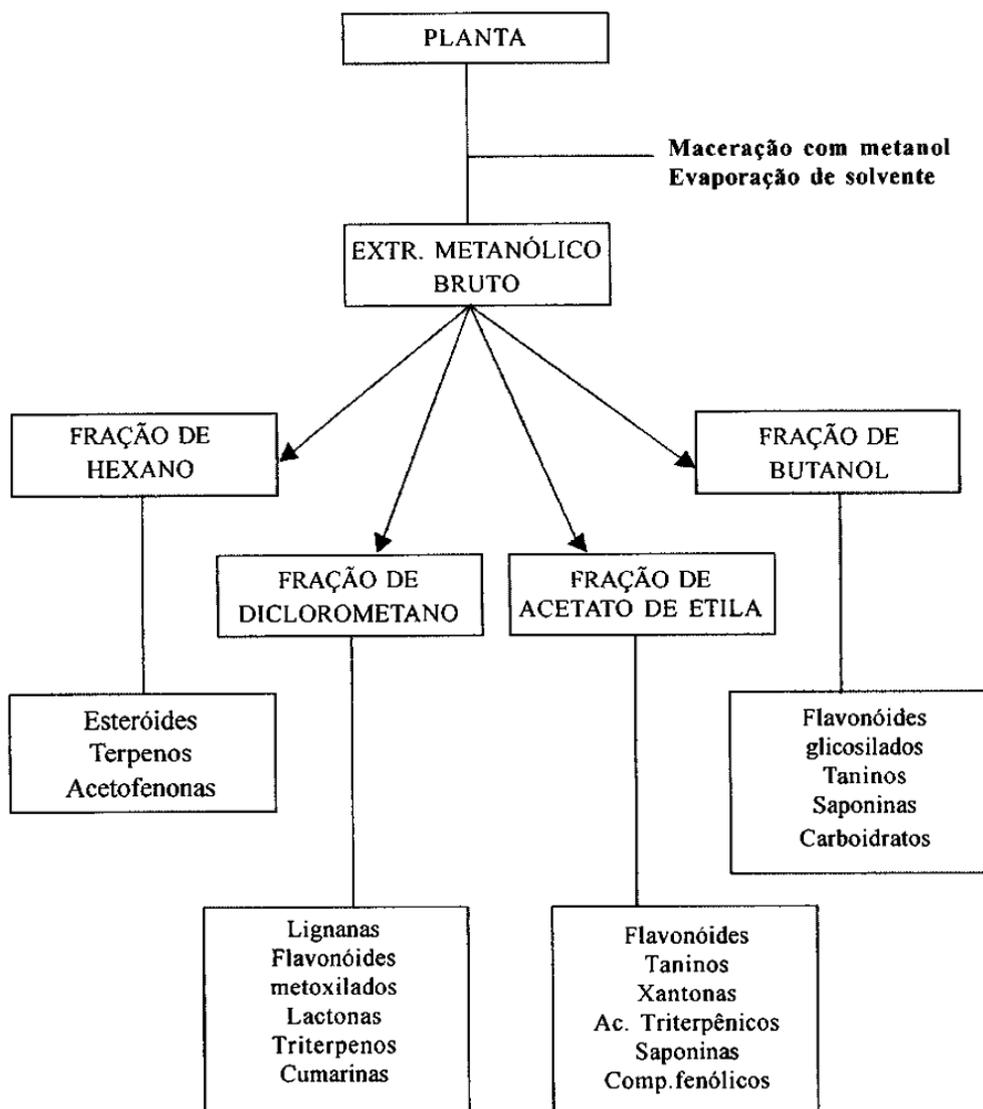


FIGURA 2 – PROCEDIMENTO GERAL DE PARTIÇÃO E PROVÁVEL SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM PLANTAS. FONTE: NIERO *et al*, (2003).

Uma vez obtido o extrato, os métodos de partição entre solventes eliminam grande parte do material indesejável (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Quando se utilizam processos de fracionamento objetivando o isolamento de substâncias ativas, pode ocorrer o monitoramento por ensaios relacionados para a avaliação da atividade biológica (FIGURA 3) (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Para a análise fitoquímica preliminar, classicamente, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela

realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico.

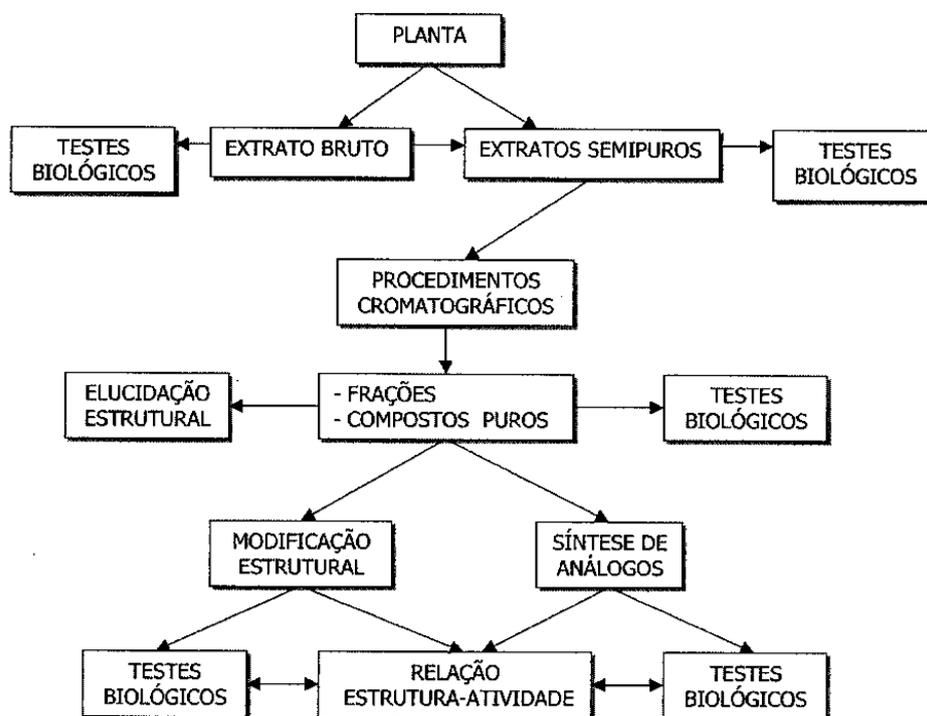


FIGURA 3 – PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS. FONTE: NIERO *et al* (2003).

A realização de reações de caracterização diretamente no extrato bruto pode eventualmente mascarar o resultado. O fracionamento de extrato e a realização dos testes com as frações obtidas possibilitam, geralmente, reações mais nítidas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente, servindo, também, para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Uma das técnicas mais utilizadas em termos de caracterização, detecção e subsequente separação, bem como controle final da pureza do composto isolado, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Pode ser acoplada a detector de radiação Ultra-Violeta (HPLC-UV), que fornece informações a respeito do tipo de constituintes, ou sobre

oxidações. A HPLC associada à espectrofotometria de massas (HPLC-MS) torna-se um método sensível de análise molecular, fornecendo informações sobre o peso molecular dos compostos (NIERO *et al*, 2003). Uma evolução desta técnica ocorre ao se utilizar partículas menores no empacotamento das colunas. A velocidade e capacidade de pico (número de picos resolvidos por unidade de tempo nas separações gradiente) pode ser estendida a novos limites, técnica esta denominada Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Pressão (UPLC – *Ultra-high Pressure Liquid Chromatography* ou *Ultra Performance Liquid Chromatography*). A tecnologia emprega princípios cromatográficos para executar separações utilizando colunas empacotadas com partículas menores e/ou maiores vazões para aumentar a velocidade, com resolução e sensibilidade superiores (SWARTZ, 2005; YARIWAKE; PEREIRA; McCULLAGH, 2006).

Existem também outros métodos de separação, tais como: cromatografia em coluna aberta, para separação de compostos em larga escala, sendo amplamente utilizada; cromatografia de força centrífuga (chromatotron), sistema composto de uma placa circular de cromatografia em camada delgada inclinada, o que permite maior eficácia na coleta de compostos ou frações; cromatografia de contra corrente em gotas, que consiste num tipo de cromatografia líquido-líquido com 200-600 colunas de tubo de vidro silanizados interconectados em série por tubos capilares de teflon, envolvendo campo gravitacional (NIERO *et al*, 2003); cromatografia gasosa (CG), a qual é empregada para separar componentes a partir de misturas de compostos voláteis (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Após o isolamento de constituintes químicos presentes nos extratos, a elucidação estrutural destes compostos se faz necessária. Este procedimento envolve o acúmulo de dados de numerosas fontes e técnicas de análise, cada qual fornecendo alguma informação estrutural. A compreensão destes dados fornece a provável estrutura química do composto de interesse (NIERO *et al*, 2003).

Entre os métodos físicos de análise empregados atualmente estão: a espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta (UV) e no infravermelho (IV), bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). Quando a análise dos dados do composto desconhecido não é conclusiva, e, se este ou um de seus derivados possuir estrutura cristalina, pode-se fazer o estudo de difração de “raio X” (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000; NIERO *et al*, 2003), sendo uma técnica

capaz de determinar o verdadeiro arranjo espacial dos átomos de um composto opticamente ativo, isto é, as diferentes posições que ocupam no espaço ou configuração absoluta (SIMPNETTI; BATISTA; FERREIRA, 1998).

Após verificada a pureza do composto isolado, determinada sua estrutura por métodos espectroscópicos, a síntese total ou parcial deste, bem como preparação de derivados ou análogos, pode ser tomada como etapa seguinte a modulação da atividade biológica e definição da relação estrutura-atividade (NIERO *et al*, 2003).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA Fabaceae (Leguminosae)

A família Fabaceae, também chamada de Leguminosae, é a terceira maior família das Angiospermas, depois da Orchidaceae (orquídeas) e Asteraceae (margaridas, girassóis), e apenas a segunda, após a Poaceae (gramíneas) em termos de importância agrícola e econômica (WOJCIECHOWSKI; MAHN; JONES, 2006). Possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Esta família encontra-se dispersa nas regiões temperadas, frias e também tropicais (CRONQUIST, 1981). São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes, e também muitas trepadeiras, vivendo em diferentes altitudes e latitudes (JOLY, 1998).

As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estípidas às vezes transformadas em espinhos. Podem se apresentar modificadas em gavinhas ou reduzidas a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos variados sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos pecíólulos, que permitem movimentos diurnos (às vezes muito rápidos) às folhas em resposta a variados agentes (JOLY, 1998).

Flores variadas, sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo, pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala pentâmera ou tetrâmera na maioria das vezes com pétalas muito desiguais (JOLY, 1998).

Segundo Polhill (1994, citado por WOJCIECHOWSKI; MAHN; JONES, 2006)² a principal característica unificadora desta família é o fruto, que em geral é legume, seco, deiscente por duas valvas, do tipo lomento segmentando-se, seco e indeiscente, ou ainda de pericarpo mais ou menos carnoso. As sementes às vezes envoltas em mucilagens ou polpa doce, ou com arilo ou testa duríssima. Todas vivem simbioticamente com certas bactérias capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas nos conhecidos nódulos ou raízes (JOLY, 1998).

As leguminosas têm demonstrado sua importância agrícola por milhares de anos, começando com a domesticação de lentilhas (*Lens esculenta*) no Irã datam 9.500 a 8.000 anos atrás, a sua utilização como fonte de alimento durante a pré-história de todo o hemisfério Norte e América do Sul (feijão, mais de 3.000 anos), e sua utilização por parte do Império Romano como fonte de alimento e para a melhoria do solo. (GRAHAM; VANCE, 2003). Atualmente inclui um grande número de espécies domesticadas cultivadas e colhidas para o consumo humano e animal, bem como para produção de óleos, fibras, combustíveis, fertilizantes, madeira, ervas medicinais, produtos químicos e variedades hortícolas (Lewis³ et al. 2005, citado por WOJCIECHOWSKI; MAHN; JONES, 2006).

As leguminosas também são utilizadas tradicionalmente na medicina popular, demonstrando sua importância na medicina moderna, como, por exemplo, o uso das isoflavonas, comumente encontradas nas leguminosas, e que hoje são alvo de estudos para uso em terapia de reposição hormonal na pós-menopausa (GRAHAM; VANCE, 2003).

No Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies. Inúmeras são as espécies utilizadas como ornamentais, sendo esta a principal família utilizada na arborização urbana brasileira. Diversas de suas espécies produzem madeira de excelente qualidade, incluindo as espécies de sucupira (SOUZA; LORENZI, 2005).

A circunscrição de Fabaceae e sua divisão em famílias ou subfamílias distintas tem sido alvo de divergências entre os diferentes autores. Tradicionalmente, é reconhecida como uma família única, possuindo 4 subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Cercideae*, *Mimosoideae* e *Faboideae* (*Papilionoideae*), sendo o gênero *Pterodon* pertencente a esta última (SOUZA; LORENZI, 2005).

² Polhill, R.M. Classification of the Leguminosae. In: **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae** (FA Bisby, J. Buckingham, and JB Harborne, eds.). Chapman and Hall, New York, 1994. p. xxxv–xlviii.

³ LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Royal Botanical Gardens, Kew, UK. 2005.

2.4 O GÊNERO *Pterodon*

O gênero *Pterodon* é amplamente distribuído sobre as savanas do Brasil Central (EUZÉBIO *et al*, 2009) e compreende quatro espécies nativas brasileiras: *P. abruptus* Benth, *P. apparuccuri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth (*P. emarginatus* Vog.) e *P. polygalaeflorus* Benth. Sua distribuição é disjuntiva e populações mistas não foram observados, o que pode indicar algumas características do solo como fator limitante para o seu desenvolvimento (PAIVA *et al*, 2001).

Devido às suas propriedades farmacológicas, os frutos deste gênero (erroneamente chamados de sementes) são comumente comercializadas em mercados populares (DUTRA *et al*, 2009). Inicialmente, estudos científicos deste gênero foram motivados pela evidência de que os óleos das sementes de suas espécies possuíam atividade antimicrobiana e cercaricida (SPINDOLA *et al*, 2009).

A infusão das sementes é popularmente utilizada para dores na coluna, dor de garganta, reumatismo, e até mesmo como tônico (fortificante) e depurativo (SPINDOLA, 2002). Extratos alcoólicos dos frutos destas plantas são utilizados na medicina popular como antiinflamatórios (principalmente contra reumatismo), para dores de garganta e analgesia em geral. Os óleos dos frutos de pelo menos três espécies têm ação protetora contra a infecção por *Schistosoma mansoni* (EUZÉBIO, 2009) inibindo a penetração de cercárias na pele, atividade esta atribuída ao composto 14,15-epoxigeranilgeraniol (CAMPOS *et al*, 1994; DEMUNER *et al*, 1996).

Investigações fitoquímicas anteriores do gênero revelaram a presença de alcalóides na casca, isoflavonas e alguns triterpenos na madeira, e diterpenóides e isoflavonas no óleo da semente (COELHO *et al*, 2005; VIEIRA *et al*, 2008; EUZÉBIO, 2009). Diterpenos 6 α -hidroxivouacapan-7 β -17 β -lactona e 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato metil ester (FIGURA 4), presentes em sementes de *P. emarginatus* e *P. polygalaeflorus*, respectivamente, foram previamente descritos como substâncias associadas às atividades anti-inflamatórias destas espécies (SPINDOLA *et al*, 2009).

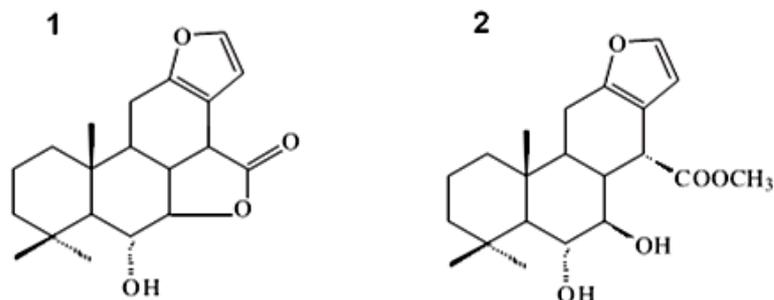


FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS DITERPENOS 6 α -HIDROXIVOUACAPAN-7 β -17 β -LACTONA (1) E 6 α ,7 β -DIHIDROXIVOUACAPAN-17 β -OATO METIL ESTER (2) FONTE: EUZÉBIO *et al* (2009); SPINDOLA *et al* (2009).

2.5 ASPECTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DE *Pterodon emarginatus* Benth

Conhecida popularmente como faveiro, sucupira, sucupira-branca, fava-de-sucupira, fava-de-santo-inácio, e sucupira-lisa, apresenta como sinonímias botânicas *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth., *Acosmium inornatum* (Mohlenbr.) Yakovlev, *Sweetia inornata* Mohlenbr (LORENZI; MATOS, 2008).

P. emarginatus (FIGURA 5) é uma planta de altura de 8-16 m, decídua, heliófita, seletiva xerófila, característica de terrenos secos e arenosos do cerrado e de sua transição para a floresta semidescídua (LORENZI, 2002), sendo nativa dos estados de Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (LORENZI; MATOS, 2008). Sua dispersão é irregular e descontínua, ocorrendo em agrupamentos densos e, muitas vezes até em populações puras (LORENZI, 2002).

Suas folhas são compostas pinadas, com 20-36 folíolos (LORENZI, 2002). Floresce em setembro e outubro (LORENZI, 2008). Suas flores são esbranquiçadas ou róseas, dispostas em panículas axilares e apicais amplas (LORENZI; MATOS, 2008). A maturação dos frutos verifica-se de junho a julho com a planta já quase totalmente despida da folhagem, permanecendo, entretanto, na árvore por mais algum tempo (LORENZI, 2008). Os frutos são vagens tipo sâmara (pterocarpo) arredondadas, indeiscentes e aladas, contendo uma única semente fortemente protegida dentro de um cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa amarga numa estrutura esponjosa como favos de mel. Multiplica-se apenas por sementes (LORENZI, 2008; LORENZI; MATOS, 2008).

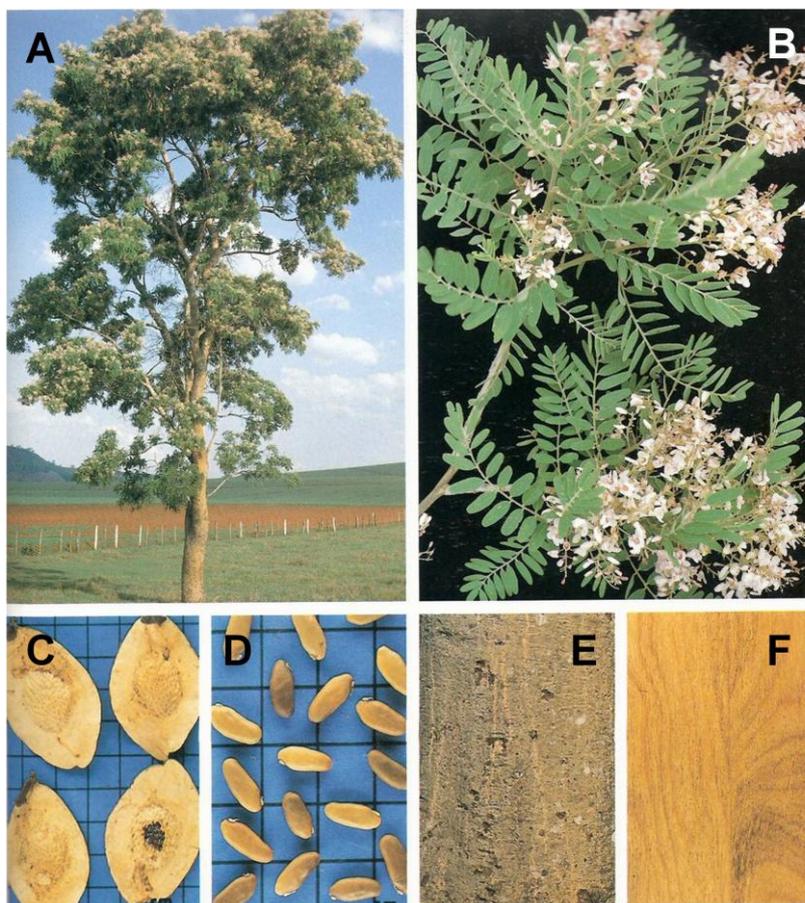


FIGURA 5 – FOTOS DE *Pterodon emarginatus*. (A) Árvore, (B) folhas e flores, (C) frutos, (D) sementes, (E) tronco e (F) madeira. FONTE: adaptado de LORENZI (2002).

A árvore fornece madeira muito dura (LORENZI, 2008), apresentando longa durabilidade mesmo quando em contato com solo e umidade (LORENZI; MATOS, 2008). É utilizada em construção naval e civil, pilares de pontes, postes, dormentes, assoalho de vagões e de carrocerias, carvão e lenha. A árvore é muito ornamental, e apesar de seu lento crescimento, pode ser usada com sucesso na arborização de ruas e praças. Como planta tolerante à luz direta e pouco exigente em solos, não pode faltar nos reflorestamentos mistos destinados a degradadas de preservação (LORENZI, 2002).

Esta planta é freqüentemente confundida em publicações populares sobre medicina tradicional com a espécie *Bowdichia virgiloides* Kunth, morfologicamente bem diferentes, principalmente os frutos, porém com os mesmos nomes populares, cuja foto é apresentada na Figura 6 para evitar dúvidas (LORENZI; MATOS, 2008).

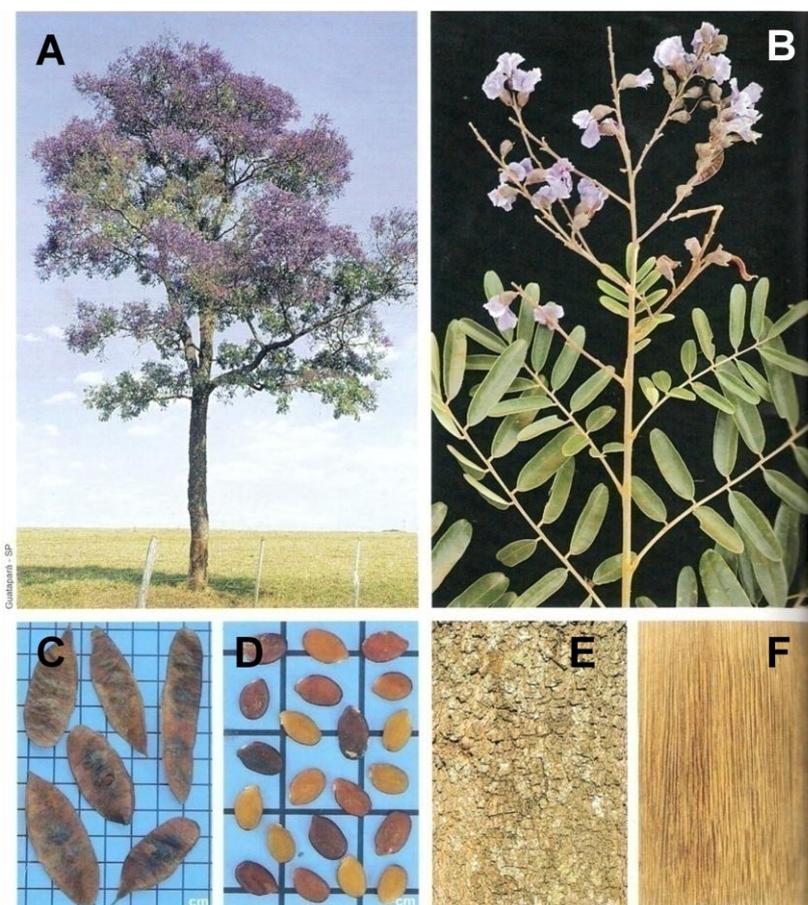


FIGURA 6 – FOTOS DE *Bowdichia virgiloides* Kunth – Espécie com a mesma distribuição geográfica e mesmo nome popular que *Pterodon emarginatus*, e, muita vezes erroneamente utilizada para os mesmos fins. (A) Árvore, (B) folhas e flores, (C) frutos, (D) sementes, (E) tronco e (F) madeira. FONTE: adaptado de LORENZI (2008).

Suas sementes são comercialmente disponíveis no mercado brasileiro de plantas medicinais. Extratos alcoólicos são utilizados na medicina popular como antiinflamatórios, analgésicos e antireumáticos (SPINDOLA et al, 2009), quando ingeridos via oral em pequenas quantidades em intervalos regulares (SABINO et al, 1999), segundo Penna⁴ (1946, citado por SABINO et al, 1999), este último uso é registrado em livros brasileiros de plantas medicinais há muito tempo.

As principais substâncias isoladas desta espécie são os diterpenos (FIGURA 7), estruturas pertencentes ao grupo dos terpenos, ou terpenóides, os quais constituem a maior classe de metabólitos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir de acetilCoA ou de intermediários glicolíticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

⁴ PENNA, M. **Dicionário Brasileiro de Plantas Medicinais**. 2ª Ed. Livrarias Kosmos: Brasil, p.64-65,1946.

Todos os terpenos derivam-se da união de unidades pentacarbonadas (conhecidas como unidades C₅) que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano. São classificados pelo número destas unidades, que podem possuir extensas modificações metabólicas o que dificulta a identificação dos resíduos originais C₅. Os terpenos de 10 carbonos, são chamados monoterpenos; os de 15 carbonos são os sesquiterpenos e os de 20 carbonos são os diterpenos. Os maiores incluem triterpenos (30 C), tetraterpenos (40 C) e politerpenóides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

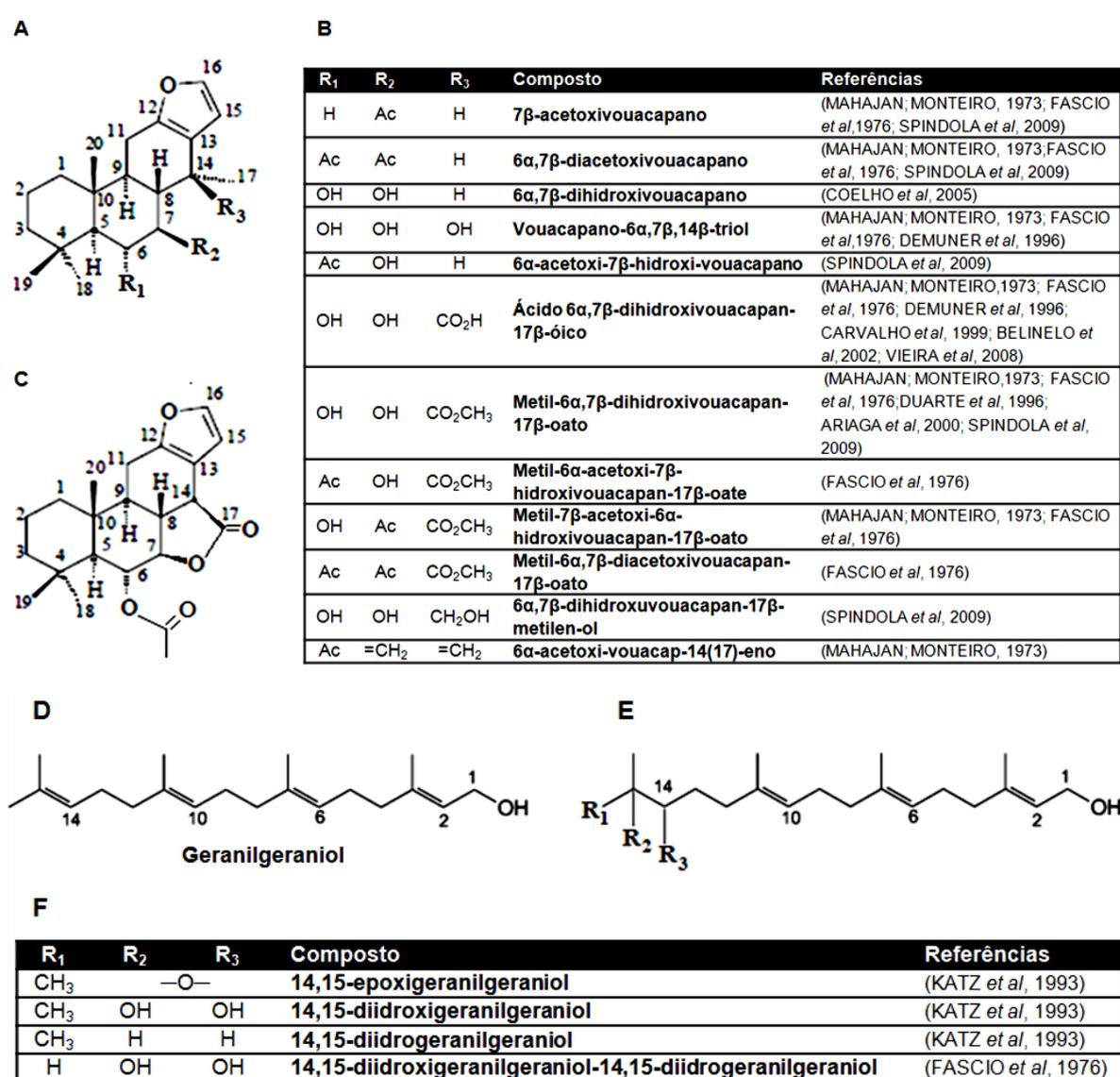


FIGURA 7 – PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM FRUTOS E SEMENTES DE *P.emarginatus* (A) Estrutura fundamental dos diterpenos vouacapânicos. (B) Quadro referente aos substituintes da estrutura A, encontrados nestas espécies. (C) 6α-acetoxi-vouacapan-17β,7β-lactona (MAHAJAN; MONTEIRO, 1973). (D) Geranylgeraniol; (E) Estrutura fundamental dos derivados do geranylgeraniol e (F) Quadro referente aos substituintes da estrutura E, encontrados nestas espécies. FONTE: O autor (2011).

Os diterpenos 14,15-epoxygeranylgeraniol e alguns derivados, isolados de *P. pubescens*, tem sido associados à ação protetora contra infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni*, quando aplicados topicamente em caudas de ratos (COELHO *et al*, 2005).

Segundo Menna-Barreto *et al* (2008), o geranylgeraniol é o principal composto responsável pela atividade anti-*Tripanossoma cruzi* da espécie, contribuindo também com propriedades anti-edematogênicas (COELHO *et al*, 2005).

Devido aos seus usos populares, diversas metodologias já foram utilizadas para comprovar sua atividade antiinflamatória (CARVALHO *et al*, 1999; FALCÃO *et al*, 2005). Silva *et al*. (2004), demonstraram tanto atividade anti-edematogênica tópica quanto aguda do extrato oleoso e de uma fração, rica em sesquiterpenos, da qual foi identificado o composto 6 α ,7 β -diidroxivouacapano. Atividade antiartrite do extrato hidroalcoólico de sementes *P. pubescens* também foi demonstrada, após tratamento oral prolongado de animais com artrite induzida por colágeno II (SABINO *et al*, 1999; COELHO *et al*, 2005). Sugere-se que o ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico possivelmente esteja envolvido com a atividade anti-inflamatória da espécie, uma vez que ele é encontrado em fração ativa (SPINDOLA *et al*, 2009).

Segundo Vieira *et al* (2008) o ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico isolado de *P. pubescens* apresenta atividade antiproliferativa de células de melanoma humano. O diterpeno 6 α -acetóxi-7 β -hidróxi-vouacapano foi eficaz contra uma linhagem de câncer de próstata, apresentando atividade antiproliferativa e citostática (SPINDOLA *et al*, 2009).

Dentre as demais atividades biológicas já estudadas nesta espécie encontram-se: quimioprolifática contra *Schistosoma mansoni* (KATZ *et al*, 1993), citotóxica (SABINO *et al*, 1999), toxicidade subaguda (COELHO *et al*, 2001), antinociceptiva (COELHO *et al*, 2005), antimicrobiana (DUTRA *et al*, 2009; TOLEDO *et al*, 2010) e leishmanicida (DUTRA *et al*, 2009).

2.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DE *Pterodon polygalaeflorus* Benth.

Conhecida popularmente como sucupira, sucupira-lisa, faveiro-azul (LORENZI, 2002), sucupira-branca, faveiro (LORENZI, 2002; BILINELO *et al*, 2002),

apresenta como sinonímia botânica *Commilobium polygalaeflorum* Benth (LORENZI, 2002).

Pterodon polygalaeflorus (FIGURA 8) é uma planta que atinge de 8-18 m de altura, semidescídua, heliófita, seletiva xerófita característica e exclusiva dos cerrados e cerradões da metade do norte do Brasil Central, onde sua freqüência é abundante porém, de dispersão um tanto irregular e descontínua. Possui ocorrência nos estados de Goiás, Tocantins, Piauí, Bahia e região noroeste de Minas Gerais. Ocorre preferencialmente no interior de formações primárias mais ou menos abertas em terrenos argilosos e bem drenados (LORENZI, 2002).

Apresenta folhas compostas pinadas de 12-18 cm de comprimento, com folíolos alternos e opostos, em número de 8-16. Inflorescências em panículas axilares e terminais, com flores de cor violeta. Floresce durante os meses de agosto a outubro. Fruto tipo legume drupáceo e lenhoso de 6,5-7,5 cm de comprimento, o qual amadurece a partir de julho (LORENZI, 2002).

Esta espécie é muito semelhante a *Pterodon emarginatus* (FIGURA 5), distinguindo-se desta pelo maior tamanho dos frutos e dos folíolos, pela cor violeta das flores e pelo menor número de folíolos (LORENZI, 2002).

A madeira, devido à sua extrema dureza, é empregada principalmente para obras externas, como construções pesadas, pontes, vigas, dormentes, carroçarias, postes, cruzetas, etc. A árvore possui características ornamentais para ser usada na arborização paisagística (LORENZI, 2002).

O óleo dos frutos é conhecido popularmente como medicinal (LORENZI, 2002). Infusões alcoólicas de suas sementes são tradicionalmente utilizadas pela população dos estados de Goiás e Minas Gerais para tratar infecções de garganta (DEMUNER *et al*, 1996), sendo também conhecida na medicina popular pelo seu uso contra bronquite, amidalite e como tônico (ARRIAGA *et al*, 2000).

Com relação à sua composição química, diversos diterpenos lineares e furanoditerpenos (derivados do vouacapano (ARRIAGA *et al*, 2000)) foram isolados e identificados de extratos obtidos de sementes de *P. polygalaeflorus* (EVANGELISTA *et al*, 2007), consistindo nas principais substâncias encontradas nesta espécie, assim como na *P. emarginatus*, e estão descritas nas figuras a seguir (FIGURAS 9 e 10). Flavonóides também foram descritos como presentes no caule e frutos da espécie (MARQUES *et al*, 1998; ARRIAGA *et al*, 2000).

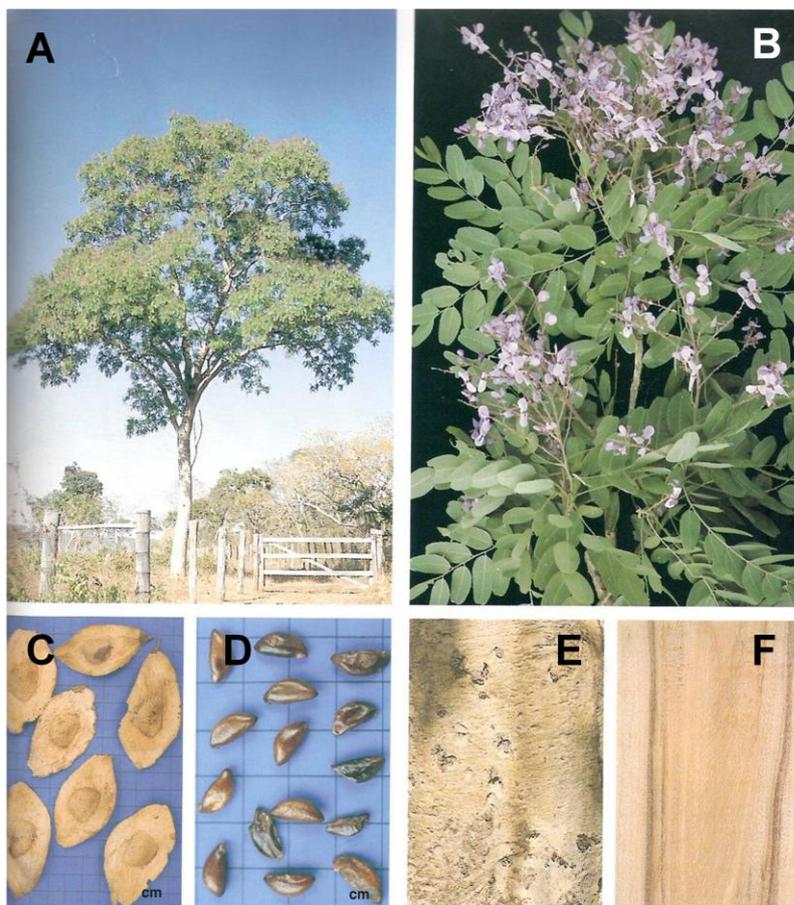


FIGURA 8 – FOTOS DE *Pterodon polygalaeflorus*. (A) Árvore, (B) folhas e flores, (C) frutos, (D) sementes, (E) tronco e (F) madeira. FONTE: adaptado de LORENZI (2002).

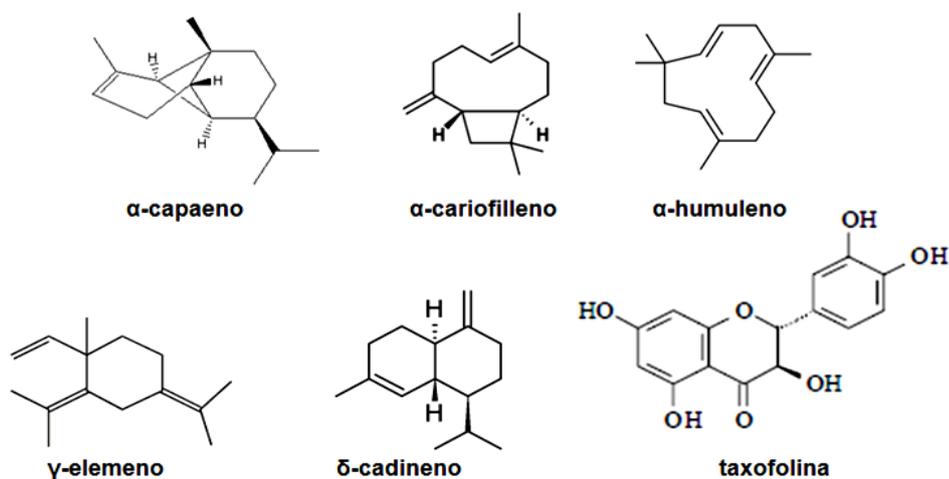


FIGURA 9 – SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM FRUTOS/SEMENTES DE *P. polygalaeflorus*. FONTE: CAMPOS *et al* (1990 In: CARVALHO *et al*, 1999) e ARIAGA *et al* (2000).

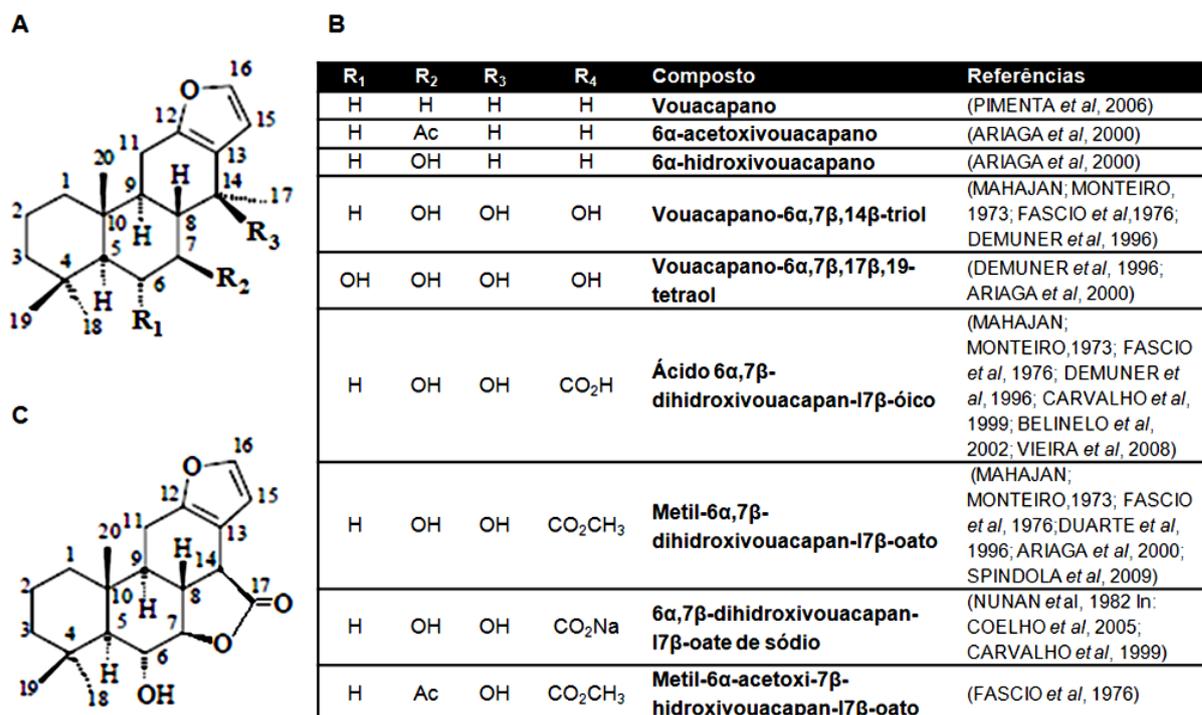


FIGURA 10 – DERIVADOS VOUCAPÂNICOS ENCONTRADOS EM FRUTOS/SEMENTES DE *P.polygalaeflorus*. (A) Estrutura fundamental dos diterpenos voucapânicos. (B) Quadro referente aos substituintes da estrutura A, encontrados nestas espécies. (C) 6 α -hidroxi-vouacapano-7 β ,17 β -lactona (DEMUNER *et al*, 1996). FONTE: O autor (2011).

Algumas destas substâncias têm sido relatadas como responsáveis pelas atividades biológicas descritas. Segundo Bilinelo *et al* (2002), o ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico, furanoditerpeno isolado dos frutos, apresenta atividade analgésica em modelos laboratoriais utilizando roedores. O 6 α -7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato de sódio, isolado do óleo de frutos de *P. polygalaeflorus* Benth, demonstrou possuir atividade anti-inflamatória no edema de pata produzido pela carragenina (CARVALHO *et al*, 1999)

Três diterpenos furânicos (vouacapano, 6 α -acetoxivouacapano e 6 α -hidroxivouacapano) encontrados no extrato hexânico dos frutos de *P. polygalaeflorus*, são considerados promissores agentes larvicidas sobre *Aedes aegypti* (PIMENTA *et al*, 2006).

São encontrados diversos estudos na literatura a respeito da comprovação das atividades biológicas desta espécie, dentre eles, destacam-se a atividade analgésica (BILINELO *et al*, 2002), atividades antinociceptivas (LEAL *et al*, 2000; EVANGELISTA *et al*, 2007), atividade antimicrobiana, larvicida e inibição da enzima acetilcolinesterase, (PIMENTA *et al*, 2006).

2.7 SEPSE

Segundo Nathens e Marshall (1996, In: REPKA, 2009) na antiga Grécia utilizava-se o termo *pepse* para designar o processo de fermentação do vinho ou digestão alimentar, indicando vida e boa saúde; em contraposição, empregava-se o termo *sepse* para descrever situações onde havia putrefação, sendo associado com doença e morte.

O termo sepsé é definido como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), decorrente de infecção, principalmente por bactérias, embora, também, possa ser conseqüência de infecção por fungos, helmintos e vírus (BENJAMIM, 2001). A bacteriologia da sepsé tem evoluído na última década, as bactérias gram-negativas, antigamente a causa mais comum de sepsé, tem sido suplantadas por organismos gram-positivos, que causam agora mais de 50% dos casos (BLOCH, 2007).

A definição de SRIS inclui tanto a sepsé quanto doenças semelhantes, provenientes de causas não infecciosas, como trauma, isquemia, pancreatite e hemorragia. As principais características desta condição encontram-se dispostas no quadro a seguir (QUADRO 1) (BENJAMIM, 2001; BLOCH, 2007).

<p>I. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS)</p> <p>Dois ou mais dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) Temperatura de > 38°C ou < 36°C (2) Freqüência cardíaca > 90 batimentos/min (3) Freqüência respiratória > 20 respirações/min ou PaCO₂ < 32 mmHg (4) Contagem de leucócitos > 12 x 10⁹/l ou < 4 x 10⁹/l, ou > 10% de formas imaturas (bastões)
<p>II. Sepsé</p> <p>SIRS mais evidência de infecção</p>
<p>III. Sepsé grave</p> <p>Sepsé mais disfunção orgânica, hipotensão ou má perfusão (inclusive acidose láctica, oligúria, alteração aguda do estado mental)</p>
<p>IV. Choque séptico</p> <p>Hipotensão (apesar da reposição de fluidos) mais anormalidades por baixa perfusão</p>

QUADRO 1 – DEFINIÇÃO CLÍNICA DE SEPSE. FONTE: adaptado de BLOCH (2007).

Uma das seqüelas da SRIS ou da sepse, que pode vir a surgir, é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que acomete cerca de 30% dos pacientes com sepse, enquanto quase todos desenvolvem disfunção de um órgão. Já choque séptico é uma agravamento do quadro de sepse, caracterizado por acentuadas alterações hemodinâmicas (QUADRO 1) (BENJAMIM, 2001).

A sepse é a décima causa principal de morte nos EUA, com mais de 600.000 casos ocorrendo anualmente, e uma taxa global de letalidade próxima de 20%. As taxas de sepse continuam a se elevar, e intervenções como a disseminação do uso prolongado de cateteres intravasculares, o aumento da implantação de material protético, e a administração de fármacos imunossupressores e agentes quimioterápicos acabam contribuindo para aumentar o risco de infecção e de sepse subsequente (BLOCH, 2007).

Em um quadro de sepse, devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local e generalizada (BENJAMIM, 2001).

As manifestações clínicas da sepse e do choque séptico, tais como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica, derivam da liberação sistêmica de mediadores inflamatórios pelas células de defesa e células endoteliais. Os fatores desencadeadores da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são componentes da parede celular destes organismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias gram-negativas (endotoxinas) (BENJAMIM, 2001).

2.7.1 Modelos Experimentais de Sepse

a) Administração endovenosa de bactéria viva ou de componentes microbianos

A administração endovenosa de LPS (endotoxemia) ou de bactérias como *Escherichia coli* (bacteremia) é amplamente utilizada para o estudo da sepse. É um modelo prático e reprodutível em muitas espécies animais, como ratos,

camundongos, coelhos, cachorros e primatas. Entretanto, a incidência de sepse e choque séptico, na clínica, devido à entrada de uma grande quantidade de LPS ou bactéria na circulação (*bolus*) é muito pequena, levantando a questão se realmente esse modelo mimetiza a evolução de um quadro de sepse (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001).

b) Administração intraperitoneal de bactéria viva ou de componentes microbianos

Esse modelo, também, é muito utilizado para o estudo da sepse, pois reproduz os sinais observados na doença, se aproximando mais do quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação de LPS administrados na cavidade peritoneal, e não diretamente na circulação. Mas, ainda assim, o início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como acontece na maioria dos casos clínicos (BENJAMIM, 2001).

c) Modelos de injúria do intestino com consecutiva liberação de flora microbiana

Os dois métodos melhor descritos são o de ligação e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* - CLP) e o de introdução de cateter no cólon ascendente (*colon ascendens stent peritonitis* - CASP). Estes modelos de injúria com liberação da flora bacteriana são os que mais se assemelham ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesses modelos, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001).

Apesar de estes modelos experimentais estarem próximos a um quadro clínico, a maioria dos estudos em sepse experimental baseia-se nos modelos anteriores (a e b), mas existem dados na literatura comprovando que a patogênese da sepse causada, por exemplo, pela administração de LPS ou bactérias intravenosamente, difere daquela induzida por um foco infeccioso, como acontece em uma peritonite (BENJAMIM, 2001). A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos é devida à quantidade do estímulo, ao local e à forma de administração (em *bolus* ou em liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta

de liberação dos mediadores inflamatórios. Sendo assim, estes modelos de peritonite, apresentam maior relevância para a compreensão da evolução da doença (DEITCH, 1998; BENJAMIM, 2001).

2.7.2 Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Sepses

A atividade biológica das endotoxinas e exotoxinas é decorrente da ativação de sistemas séricos, de células residentes, do endotélio e dos leucócitos. Conseqüentemente, ocorre a liberação de mediadores endógenos (citocinas, radicais reativos do oxigênio e do nitrogênio e mediadores lipídicos), sendo a ativação das células inflamatórias, especialmente dos macrófagos e neutrófilos, um fator importante para o desenvolvimento da sepses (BENJAMIM, 2001).

Até recentemente, a sepses era atribuída apenas à hiperestimulação da resposta inflamatória do hospedeiro, e liberação descontrolada de mediadores da inflamação. Embora, inegavelmente, isso ocorra em um subgrupo de pacientes, as falhas das intervenções médicas que visam bloquear essas respostas sugerem um processo mais complexo (BLOCH, 2007).

Dentre os mediadores endógenos, liberados, primordialmente, pelas células residentes, e, posteriormente, pelas células recrutadas para o foco infeccioso, as citocinas desempenham um papel primordial na resposta do hospedeiro. Citocinas como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-8 e as demais quimiocinas promovem recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ativação com conseqüente aumento da atividade microbicida, sendo a resposta local fundamental para o controle da infecção (FIGURA 11) (BENJAMIM, 2001).

Paralelamente, o organismo responde a agentes infecciosos liberando citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , antagonista no receptor da IL-1 (IL-1ra), além de receptores solúveis para IL-1 (IL-1 tipo II), TNF- α , IL-6 entre outros. Eles tanto contrabalançam as ações dos mediadores pró-inflamatórios, como antagonizam os seus efeitos. Além das citocinas, os mediadores lipídicos (como as prostaglandinas e leucotrienos) e os componentes plasmáticos (fatores de coagulação e complemento) também participam do desenvolvimento da sepses,

induzindo migração e ativação celular, vasodilatação, agregação plaquetária, aumento da permeabilidade vascular, entre outros (BENJAMIM, 2001).

O acúmulo de neutrófilos e sua ativação pelos mediadores descritos acima levam à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), respectivamente (BENJAMIM, 2001). O NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores, apresentando atividade vasodilatadora e também fazendo parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; (BENJAMIM, 2001).

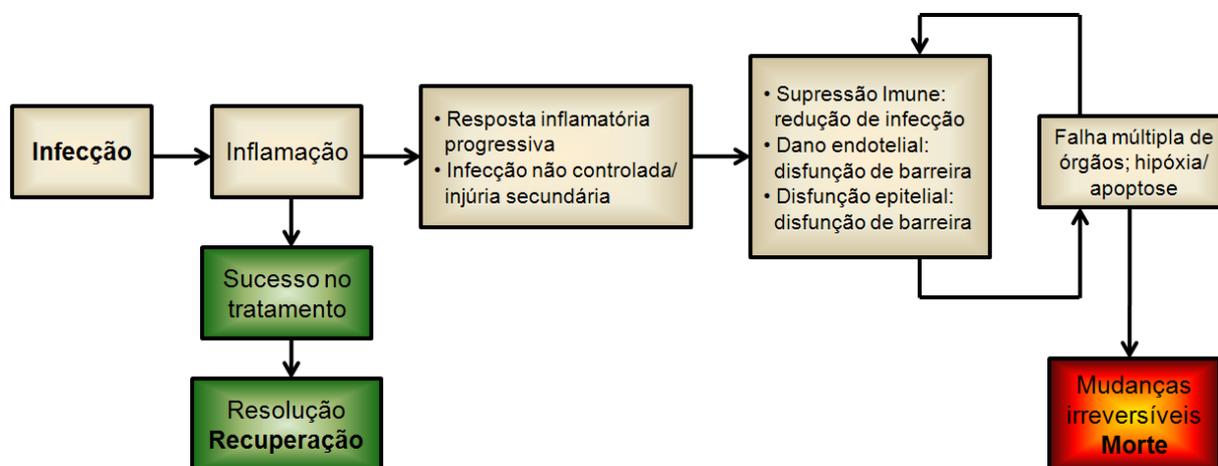


FIGURA 11 – SEQUÊNCIA PATOGÊNICA DOS EVENTOS NA SEPSE. A sepse tipicamente se desenvolve após uma infecção ou uma injúria inflamatória que não está contida e controlada pelo hospedeiro. A desregulação da resposta inflamatória leva a perturbações e danos ao sistema imune do hospedeiro e vários tipos de células. Endotélio e células epiteliais constituem uma barreira importante na contenção da infecção e inflamação. O rompimento da barreira endotelial e epitelial pode permitir uma maior propagação da infecção. Uma disfunção imune generalizada poderia, então, propagar resultando em insuficiência de órgãos, resultando em um estado irrecuperável. FONTE: adaptado de BURAS, HOLZMANN E SITKOVSKY (2005).

3 JUSTIFICATIVA

As espécies de sucupira, *Pterodon emarginatus* e *Pterodon polygalaeflorus*, apresentam grande importância na medicina popular, principalmente na região do cerrado brasileiro. Extratos alcoólicos obtidos de seus frutos e sementes são geralmente empregados como agentes antiinflamatórios, principalmente no tratamento de reumatismo. Devido à grande utilização destas espécies pela população, a comercialização de seus frutos (erroneamente chamados de sementes) existe tanto na forma a granel, quanto da forma de chás, cápsulas e pomadas. Sendo necessário o estabelecimento de constantes estudos de ordem química e farmacológica que validem seus extratos e suas utilizações, e forneçam dados para o controle de qualidade, segurança e eficácia destes produtos, conforme é exigido pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão que regulamenta, entre outras atribuições, o uso de medicamentos e fitoterápicos no Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como principal objetivo a detecção e caracterização de metabólitos secundários nos extratos etanólicos dos frutos e sementes de *Pterodon emarginatus* e *Pterodon polygalaeflorus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando-se cumprir a finalidade deste trabalho, o presente estudo apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Extrair e isolar constituintes químicos presentes nos extratos das espécies estudadas por meio de fracionamento cromatográfico.
- Identificar os constituintes químicos a partir de técnicas espectrométricas (GC-MS, UPLC, ESI-MS e RMN).
- Investigar o efeito de extratos das espécies em estudo sobre a letalidade de camundongos em sepse.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos, contendo as sementes (frutos/sementes)⁵ de *Pterodon emarginatus* e *Pterodon polygalaeflorus* foram obtidas através do fornecedor Santoflora Comércio de Ervas Ltda.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

Os frutos/sementes, de cada espécie foram devidamente limpos e em seguida grosseiramente fragmentados com auxílio de um alicate. Os fragmentos dos frutos (contendo as sementes) de *P. emarginatus* (102,48 g) e *P. polygalaeflorus* (82,56 g), separadamente, foram submetidos a um processo de extração etanólica, sob refluxo, em banho com etanol fervente por 2 horas, este processo foi repetido 3 vezes. Após, os materiais foram filtrados e os extratos etanólicos obtidos concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. Obtendo-se assim, o extrato bruto de *P. emarginatus* (EBE) e o extrato bruto de *P. polygalaeflorus* (EBP).

5.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

O fracionamento realizado nos dois extratos brutos foi do tipo líquido-líquido. Primeiramente, os extratos brutos foram dissolvidos em metanol (MeOH), e em mesmo volume, hexano foi adicionado (2 vezes), houve a formação de fase, e a fração hexânica foi coletada. Em seguida, à porção com MeOH foi adicionado butanol (BuOH) (2 vezes) e água, até a formação de fase. As frações foram

⁵ Considerar como os frutos contendo as sementes quando citado no texto: frutos/sementes.

coletadas separadamente e concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, pesadas e armazenadas em recipientes tarados e hermeticamente fechados, protegidos da luz (QUADRO 2).

Material Vegetal	Extrato Bruto	Fração Hexano	Fração Butanol	Fração Metanol:Água
<i>Pterodon emarginatus</i> (Pe)	EBE	FHE	FBE	FME
<i>Pterodon polygalaeflorus</i> (Pp)	EBP	FHP	FBP	FMP

QUADRO 2 – NOMENCLATURA DAS FRAÇÕES OBTIDAS.

5.4 DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS

As modificações químicas a seguir foram realizadas com a principal finalidade de analisar as composições químicas das amostras pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

5.4.1 Hidrólise, Redução e Acetilação

Uma alíquota (1 mg) da FME foi tratada com 500 μL de ácido trifluoracético (TFA) 1 M por 14 horas em estufa a 100°C. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado por evaporação sob fluxo de N_2 a temperatura ambiente.

O produto da hidrólise e foi dissolvido em 200 μL NH_4OH 0,5M, mantido assim por 10 min e reduzido com 1 mg de NaBH_4 a 100°C, pH 9-10, também mantido por 10 minutos. Após, realizou-se a secagem com fluxo de N_2 em temperatura ambiente. À amostra reduzida foram adicionados 100 μL de TFA 1M e novamente levada à evaporação. O ácido bórico residual foi removido por sucessivos ciclos de co-evaporação em MeOH (3 vezes) (SASSAKI *et al*, 2008).

A acetilação foi realizada com uma mistura 200 μL de anidrido acético e piridina (1:1 v/v) a temperatura ambiente (14 horas) formando derivados acetilados,

os quais foram extraídos com clorofórmio (CHCl_3). Os reagentes residuais presentes na fração clorofórmica foram removidos com solução de CuSO_4 5%. Após remoção total, lavou-se uma vez com água, sendo o sulfato de sódio anidro adicionado para desidratação da amostra, que foi filtrada. O CHCl_3 foi evaporado com fluxo de N_2 em temperatura ambiente. Após secar, as amostras acetiladas produzidas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (SASSAKI *et al*, 2008).

5.4.2 Trimetilsililação

A trimetilsililação de 1 mg das amostras foi realizada solubilizando-se em 200 μL de piridina, ao qual foi adicionado 100 μL de bistrimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA). A mistura reacional foi mantida em estufa à 100°C durante 30 minutos e, em seguida, foi adicionado 700 μL de MeOH para a interrupção da reação. As amostras trimetilsililadas foram prontamente analisadas por GC-MS (adaptado SIGMAALDRICH.COM - BSTFA, 2011).

5.4.3 Metilação

A metilação foi realizada adaptando a metodologia de Ciucanu e Kerek (1984), onde 5 mg da amostra foram solubilizados em 1 mL de DMSO e, após completa dissolução, foi adicionado NaOH pulverizado (~200 mg) e 1 mL de CH_3I . A mistura reacional permaneceu sob agitação (em vórtex) durante 30 minutos e, posteriormente, mantida em repouso durante 1 hora. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de H_2O destilada ao sistema (em banho de gelo). A solução foi neutralizada com ácido acético e a amostra metilada foi extraída com clorofórmio. A fase clorofórmica foi lavada 10 vezes com H_2O destilada para remoção dos reagentes residuais e, em seguida, seca à temperatura ambiente. O material metilado foi analisado por GC-MS.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

As frações obtidas foram avaliadas cromatograficamente empregando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*). A TLC é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

Estas análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), espessura de 0,2 mm de sílica, com 11 cm de altura total (10 cm a partir da origem). Sistemas eluentes diferentes foram utilizados como fase móvel de acordo com o tipo de composto a ser analisado, assim como diferentes reveladores. Para terpenos e esteróides, a fase móvel utilizada foi hexano:EtOAc (65:35, v/v) e hexano:EtOAc (75:25, v/v), e a visualização dos compostos foi obtida com EtOH:H₂SO₄ (95:5, v/v) a 100°C (STAHL, 1969). Para monossacarídeos e oligossacarídeos – a fase móvel utilizada foi EtOAc:n-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v) e a visualização dos compostos foi obtida com orcinol-H₂SO₄ a 100 °C (SKIPSKY,1975; SASSAKI et al., 2008).

5.5.2 Cromatografia em Coluna da FME

O fracionamento da fração MeOH:H₂O de *Pterodon emarginatus* (FME) foi realizado através de uma cromatografia em coluna aberta. Para o empacotamento foi utilizada de sílica-gel 60 (0,05-0,2 mm VETEC[®]) e CHCl₃, resultando em uma coluna de 3 cm de altura x 1,6 cm de diâmetro. A amostra (400 mg) foi dissolvida em MeOH (10 mL) e em seguida adsorvida na sílica através da evaporação do solvente em temperatura ambiente, sob agitação com o auxílio de bastão de vidro. A eluição ocorreu com a seqüência das seguintes fases móveis (15 mL de cada): CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1 v/v), CHCl₃:MeOH (8:2 v/v), CHCl₃:MeOH (7:3 v/v), CHCl₃:MeOH (6:4 v/v), CHCl₃:MeOH (1:1 v/v), MeOH, MeOH:H₂O (1:1 v/v), e H₂O. Cada fração,

correspondente a cada fase móvel, foi coletada separadamente e o solvente evaporado à temperatura ambiente.

5.5.3 Cromatografia em Coluna da FHP

O fracionamento da FHP (fração hexânica de *Pterodon polygalaeflorus*) foi realizado através de uma cromatografia em coluna aberta. Para o empacotamento foram utilizados 45 g de sílica-gel 60 (0,05-0,2 mm VETEC[®]) e CHCl₃, resultando em uma coluna de 29 cm de altura x 1,9 cm de diâmetro. A amostra (1 g) foi dissolvida em hexano (10 mL) e em seguida adsorvida na sílica através da evaporação do solvente em temperatura ambiente, sob agitação com o auxílio de bastão de vidro. O material adsorvido na sílica (pastilha) colocado no topo da coluna cromatográfica. A eluição ocorreu a um fluxo de 2 mL/min com 1000 mL de CHCl₃, em seguida a polaridade foi aumentada pela adição de MeOH ao CHCl₃ (v/v): 860 mL de MeOH 1% e 200 mL de MeOH 2%, sendo coletadas frações de 10 em 10 mL. Após, a coluna foi eluída 300 mL de MeOH 10%, e posteriormente com 300 mL de MeOH 100%. O fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada (ver item 5.5.1).

5.5.4 Determinação da Rotação Óptica

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro Rudolph *Research*, modelo Autoplol III. As amostras foram analisadas na concentração de 0,2% (m/v) em H₂O ou CHCl₃ (escolha do solvente adequada para cada amostra), de acordo com a sua solubilidade. Os valores de rotação óptica específica foram obtidos a partir do seguinte cálculo:

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha \times 100}{L \times C}$$

Onde,

α é o ângulo de desvio (observado em graus - valor obtido no polarímetro)

L é o comprimento do tubo cilíndrico do polarímetro em dm (caminho óptico)

C é a concentração da solução em g/100 mL (KOROKOLVAS, 1988).

5.5.5 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas por GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*), da marca Varian (Palo Alto, USA), modelos Saturn 2000R e 4000. A detecção por massas foi feita por de ionização eletrônica (70 eV), com analisador do tipo *Ion Trap*. Foram utilizadas colunas capilares, de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m d.i., com He (5.0 analítico) como gás de arraste com fluxo de 1mL/min. Para cada tipo de análise, foi utilizada uma coluna específica, e programações de temperatura adaptadas, desenvolvidas como segue:

- **Programa A** – Composição monossacarídica: Realizado no GC-MS Saturn 2000R utilizando coluna DB-225 MS, com temperatura de 50 a 230°C a 40°C/min, mantida por 25 min. O injetor foi mantido a 250°C.
- **Programa B** – Derivados metilados: Realizado no GC-MS Saturn 2000R utilizando coluna DB-225 MS, com temperatura de 50 a 210°C a 40°C/min, mantida por 30 min. O injetor foi mantido a 250°C.
- **Programa C** – Derivados trimetilsililado: Realizado no GC-MS Saturn 4000 utilizando coluna VF1-MS, com temperatura de 50 a 300°C a 10°C/min, mantida por 40 min. O injetor foi mantido a 280°C.

5.5.6 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*) foi utilizada para a visualização do processo de fracionamento realizado na amostra FHP. A cromatografia foi realizada em um sistema Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. A detecção foi realizada por detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD – *Evaporative Light Scattering Detector*).

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (~22°C) e a temperatura da coluna foi de 30°C. As separações foram desenvolvidas em coluna C18-BEH (Waters), com 50 mm x 2.1 mm i.d. e 1.7 µm de tamanho da partícula.

A cromatografia foi desenvolvida com gradiente de solventes, utilizando H₂O (solvente A) e acetonitrila (solvente B) acidificados com ácido trifluoroacético (TFA) 8 mMol/L, com um fluxo de 400 µL/min. O gradiente linear foi desenvolvido com aumento da concentração do solvente B, de 5 a 100% em 6 min, mantido até 8 min e retornando para a condição inicial (5% do solvente A) em 8,5 min. A coluna foi reequilibrada por 3 min antes de cada injeção. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio (2 mg/mL), em seguida 50 µL foram diluídos em 950 µL de MeOH. As amostras foram filtradas (0,22 µm), sendo que 10µL de cada amostra foi injetado.

5.5.7 Espectrometria de Massas

As amostras (~100 µg/mL) foram diluídas em MeOH:H₂O (1:1, v/v), foi então adicionada resina catiônica. A amostra foi filtrada, 0,8 mL foi transferido para outro ependorff ao qual foi adicionado 0,2 mL de uma solução de LiCl 20 mM. As amostras foram então submetidas á análise por espectrometria de massas (ESI-MS - *electrospray ionization mass spectrometry*) com ionização positiva em pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*). As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters) com nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação. As análises foram conduzidas por injeção direta das amostras, utilizando uma bomba de infusão (KD-Scientific) a

um fluxo de 10 $\mu\text{L/hora}$. Espectros de MS^2 foram obtidos por fragmentação induzida por colisão (CID - *collision induced dissociation*), usando argônio como gás de colisão. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5 e as análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo.

5.5.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (HMBC, HSQC, e HSQC-TOCSY) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III (Bruker; Karlsruhe, Alemanha) de campo magnético de 9,4 T, observando-se os núcleos de ^1H e ^{13}C a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente, à temperatura de 30°C , em uma sonda multinuclear de observação inversa de 5 mm. Para isso, ~ 30 mg de cada amostra foram solubilizadas em 400 μL de solvente deuterado apropriado (CDCl_3 e CD_3OD) contendo tetrametilsilano (referência interna δ 0). Os espectros foram processados com o auxílio do programa TopSpin ((Bruker; Karlsruhe, Alemanha), aplicando-se multiplicações exponenciais sobre os *free induction decays* (FIDs) adquiridos.

5.6 TESTE BIOLÓGICO DA FME

5.6.1 Animais

Para o experimento, foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (n = 6 a 8), com 7 a 8 semanas de idade e pesos entre 30-35 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração (Nuvital[®], Brasil). Para adaptação, os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização do procedimento. Todos os procedimentos adotados

neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFPR sob o número 430 (Anexo I).

5.6.2 Procedimento para Indução da Sepse - CLP

O procedimento adotado para a indução da sepse foi o de ligadura e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* - CLP) por se tratar de uma metodologia que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos.

Para a cirurgia, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina (100/80 mg/kg, i.p.), a assepsia do abdômen foi realizada com EtOH 70%, e, então, foi realizada uma incisão abdominal. A válvula íleo-cecal foi exposta e ligada em sua região central utilizando um fio cirúrgico. Para evitar a obstrução total da luz do intestino e garantir um padrão de similaridade na ligadura em todos os experimentos, foi utilizada uma cânula de polietileno com cerca de 1,5 mm de diâmetro, colocada ao longo do eixo intestinal no momento da ligadura. A válvula íleo-cecal foi perfurada (3 furos, determinados de acordo com experimentos prévios) com uma agulha (16 G). As perfurações foram confirmadas por uma leve pressão manual, a qual resultou em extravasamento de pequena quantidade de conteúdo intestinal (FIGURA 12). Após este procedimento, o intestino perfurado foi imediatamente recolocado na cavidade abdominal e a incisão foi suturada.

Os animais foram separados em grupos conforme descrito no quadro a seguir (QUADRO 3). Após a cirurgia, todos os animais receberam uma injeção subcutânea de solução salina isotônica (NaCl 0,9%) (1 mL), e foram mantidos em ambiente apropriado durante todo o período do experimento.

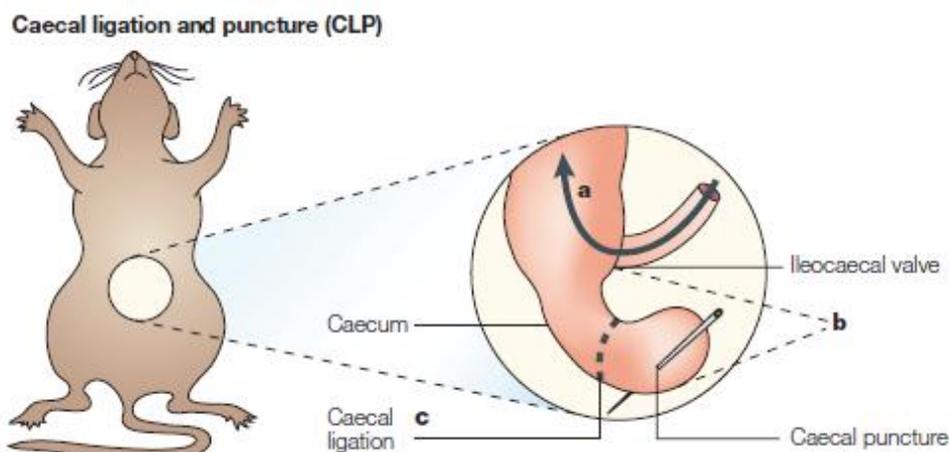


FIGURA 12 – MODELO EXPERIMENTAL DE “LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL – CLP”. O modelo CLP de sepse é induzido através de laparotomia e exposição da junção entre os intestinos grosso e delgado. O intestino delgado junta-se ao intestino grosso ao nível da válvula ileocecal (seta azul - **a**). O ceco se estende inferiormente a uma bolsa cega (**b**), e normalmente o material fecal passa distalmente para o intestino grosso (seta azul). A ligadura cecal (**c**) é realizada abaixo da válvula ileocecal de forma não-obstrutiva. O ceco é ligado, e, através da punção, ocorre o vazamento de material fecal para a cavidade peritoneal, normalmente estéril. FONTE: BURAS, HOLZMANN E SITKOVSKY (2005).

GRUPOS	PROCEDIMENTO
FO (Falso-operados)	Controle sem sepse - animais anestesiados, submetidos à incisão e sutura abdominal, mas não tiveram suas válvulas íleo-cecais perfuradas. Ingestão de água.
OP (Operados)	Controle com sepse - animais submetidos à CLP e ingestão de veículo (H ₂ O:EtOH 95:5 v/v)
DEX (Dexametasona)	Controle anti-inflamatório - animais submetidos à CLP e tratados com dexametasona 0,5 mg/kg.s.c. (DESOUZA e RIBEIRO-DASILVA, 1998). Ingestão de água.
CFL (Cefitriaxona + Clindamicina)	Controle antibiótico - animais submetidos à CLP e tratados com cefitriaxona e clindamicina, ambos 100 mg/kg.s.c. (AZEH, I. <i>et al</i> , 2002). Ingestão de água.
FME 10	Tratamento - animais submetidos à CLP e tratados com FME 10 mg/kg v.o. (FME em solução com veículo H ₂ O:EtOH 95:5 v/v)
FME 30	Tratamento - animais submetidos à CLP e tratados com FME 30 mg/kg v.o. (FME em solução com veículo H ₂ O:EtOH 95:5 v/v)
FME 70	Tratamento - animais submetidos à CLP e tratados com FME 70 mg/kg v.o. (FME em solução com veículo H ₂ O:EtOH 95:5 v/v)

QUADRO 3 – DESIGNAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.

5.6.3 Curva de Letalidade

Uma semana antes do procedimento (item 5.6.2), foi iniciado o tratamento via oral dos diferentes grupos de camundongos, na água de beber. Decorridos os sete dias de pré-tratamento, os animais foram submetidos à CLP, e a letalidade* foi quantificada a cada 12 horas, durante os sete dias seguintes. O tratamento perdurou até o último dia de observação de letalidade. Foram então comparadas as letalidades entre os grupos de animais submetidos aos diferentes tratamentos.

* Cálculo da letalidade:

$$\text{Letalidade (\%)} = 100 - \text{Taxa de sobrevivência (\%)}$$

Onde,

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{(n_{\text{inicial}} - n_{\text{óbitos}}) \times 100}{n_{\text{inicial}}}$$

Em que,

n_{inicial} = número de camundongos inicialmente no grupo (6 a 8) e

$n_{\text{óbitos}}$ = número de camundongos em óbito no grupo, em determinado instante.

5.6.4 Análise Estatística

A avaliação estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O gráfico e a análise estatística foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES

De acordo com a literatura, a população utiliza extratos alcoólicos das sementes de sucupira, tanto *P. emarginatus* quanto *P. polygalaeflorus*, para fins medicinais (SABINO *et al*, 1999; DEMUNER *et al*, 1996), sendo estes extratos obtidos com o uso da cachaça (TOLEDO *et al*, 2010) ou vinho branco (SABINO *et al*, 1999) como líquido extrator. Desta forma, foi realizada a extração etanólica à quente.

Ao serem fragmentados para a extração, os frutos, de ambas as espécies, expõem os seus alvéolos, cheios de óleo amarelado cujo odor possui um aroma floral, descrito como proveniente do geranilgeraniol presente na espécie (TEIXEIRA, 2003) Desta forma, tanto os extratos brutos quanto as frações mais apolares (hexânica e BuOH) apresentaram característica oleosa (FIGURA 13).



FIGURA 13 – FOTO DA SEMENTE DE *Pterodon emarginatus* CORTADA AO MEIO – Evidência da estrutura alveolar contendo o óleo característico da espécie. FONTE: o autor.

As extrações etanólicas realizadas (item 5.2) apresentaram rendimento final de 25,2%, para o extrato bruto de *P. emarginatus* (EBE), e 9,31% para o extrato bruto de *P. polygalaeflorus* (EBP), sendo estas porcentagens relativas à massa inicial de frutos/sementes utilizados para cada extração.

O fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos, em ordem crescente de polaridade, permitiu uma divisão mais fina dos mesmos em frações distintas. O rendimento de cada fração obtida encontra-se no quadro a seguir (QUADRO 3).

Material Vegetal	Fração Hexano	Fração Butanol	Fração Metanol:Água
<i>Pterodon emarginatus</i>	FHE 33,7% g	FBE 64,6 %	FME 1,7 %
<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	FHP 64,3%	FBP 33,6%	FMP 2,1 %

QUADRO 4 – RENDIMENTO (P/P) DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES.

É possível observar o maior rendimento das frações hexano e butanol, tanto para *P. emarginatus* quanto para *P. polygalaeflorus*. Este resultado é totalmente compatível com as composições químicas já conhecidas destas espécies, uma vez que elas apresentam majoritariamente diterpenos, compostos mais apolares que, dependendo de seus substituintes, apresentam alta afinidade pelos solventes hexano ou butanol.

6.2 ANÁLISE QUÍMICA DE *Pterodon emarginatus*

Primeiramente, foi realizada uma varredura no extrato bruto e frações com TLC, utilizando-se como revelador EtOH:H₂SO₄ (95:5, v/v), e fase móvel mais apolar (Hexano:EtOAc - 65:35, v/v) (FIGURA 14 - A e B), afim de se detectar os principais compostos descritos presentes em ambas as espécies, os terpenos. Foram reveladas diversas substâncias, principalmente no extrato bruto (EBE) e nas frações mais apolares (FHE e FBE) com colorações rosáceas e arroxeadas que sugerem a presença dos diterpenos, que já são bastante relatados para a espécie, encontram-se nestas frações (COELHO *et al*, 2005; VIEIRA *et al*, 2008; EUZÉBIO, 2009). Constatou-se que a FME não foi removida da origem, fato esperado, uma vez que esta fração apresenta compostos mais polares. Portanto, FME foi analisada por TLC com fase móvel EtOAc:n-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v), e para sua detecção foi utilizado o revelador orcinol-H₂SO₄ visando a detecção de carboidratos (Figura 14 - C). Os monossacarídeos utilizados como padrões não foram detectados na amostra,

apenas sacarose (R_f 0,37), e outro composto com R_f inferiores (como R_f 0,27; 0,18; 0,125 e 0,08), sugerem a presença de outros oligossacarídeos.

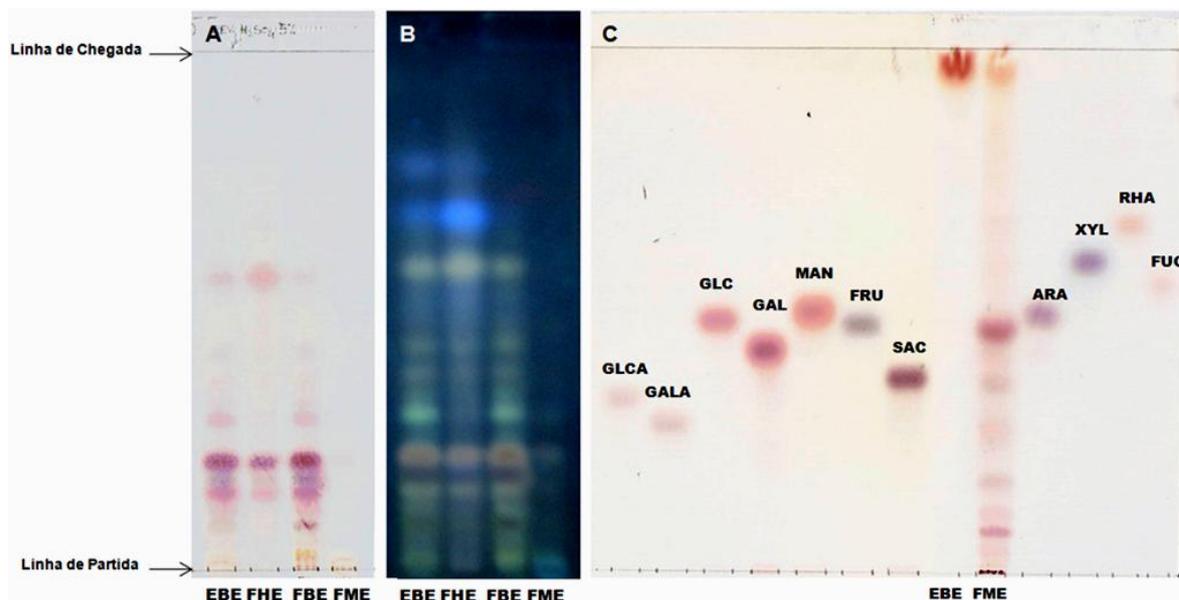


FIGURA 14 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DAS AMOSTRAS EBE, FHE, FBE E FME, (A) Observada com revelador EtOH:H₂SO₄ (95:5 v/v) e fase móvel hexano:EtOAc (65:25 v/v) e (B) em câmara de UV em 365 nm, após esta revelação;(C) Revelada com Orcinol-H₂SO₄ e fase móvel EtOAc:n-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v).

O extrato bruto e suas frações foram submetidos à trimetilsililação, com a finalidade de volatilização de todos os compostos que apresentem –OH livres, para então serem realizadas análises por GC-MS. Como pode ser visualizada na Figura 15, a fração que se apresenta mais purificada e diferenciada em relação ao extrato bruto, é a FME. Também pode ser observado que as frações FHE e FBE apresentam-se como misturas complexas, e perfis de eluição mais semelhantes, quando comparadas à FME.

De acordo com a biblioteca NIST, alguns compostos destas frações puderam ser identificados. No extrato bruto trimetilsililado (EBE-TMS), foi identificado o δ -elemeno, com R_t de 11,716 min, e os cariofillenos, com R_t de 12,134 min e 12,537 min (correspondentes aos isômeros α e β), sendo que estas estruturas já são descritas para a outra espécie deste estudo, *P. polygalaeflorus* (CARVALHO *et al*, 1999; ARIAGA *et al* 2000). Para FME-TMS foi observado um composto majoritário não identificado (R_t 16,89). E, de acordo com dados da literatura, o perfil de

fragmentação do pico de R_t 16,27 da FHE-TMS é compatível com o composto geranilgeraniol (TEIXEIRA, 2003), também já descrito para esta espécie.

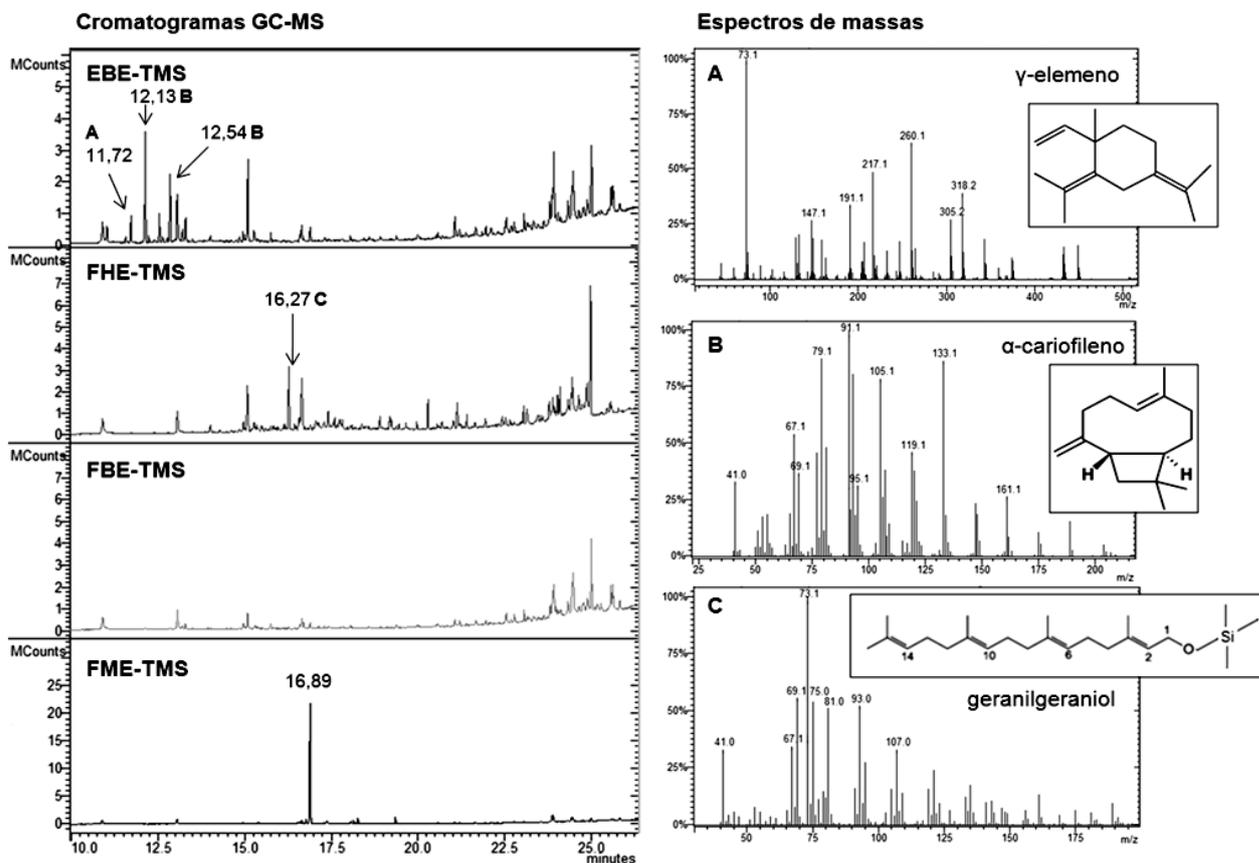
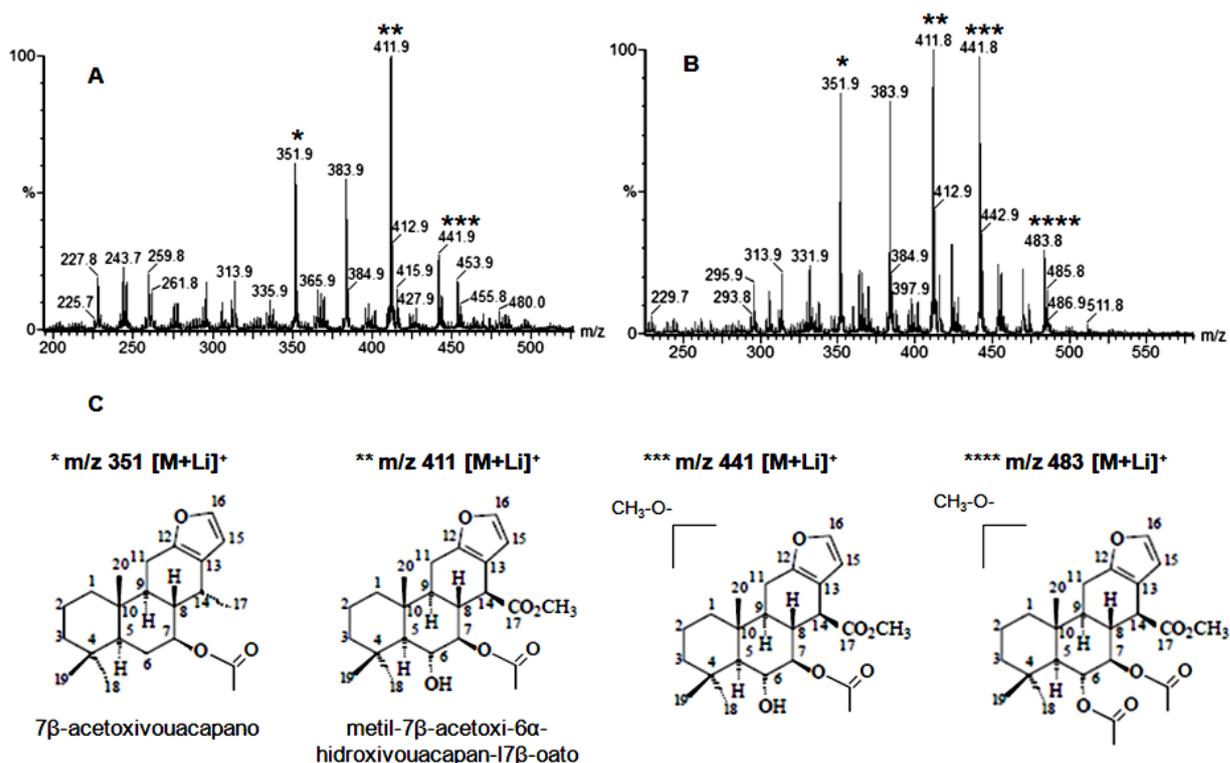


FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS (GC-MS) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES TRIMETILSILILADAS DE *P. emarginatus*. (A) Fragmentação correspondente ao pico de R_t 11,72, de EBE-TMS, identificado como o δ -elemeno. (B) Fragmentação correspondente aos picos de R_t 12,13 e 12,54, de EBE-TMS, identificado como da família dos cariofilenos. (C) Fragmentação correspondente ao pico de R_t 16,27, de FHE, identificado como o geranilgeraniol. Método empregado: Programa C

Foram realizadas análises por ESI-MS das frações não derivatizadas, sendo que alguns compostos foram detectados, como pode ser visualizado na Figura 16. Para a FHE (FIGURA 16 A), o íon de m/z 351 $[M+Li]^+$ é compatível com a razão massa/carga do 7 β -acetoxivouacapano, e m/z 411 $[M+Li]^+$ compatível com metil-7 β -acetoxi-6 α -hidroxivouacapan-17 β -oato.

Observa-se que a FBE (FIGURA 16 B) apresenta um perfil bem semelhante de razões massa/carga em relação à fração anterior (FHE), apenas com intensidades diferenciadas, e, além dos compostos já citados, a FBE possui um composto com m/z 441 $[M+Li]^+$, o qual não foi identificado, mas por apresentar uma diferença de 30 unidades de massa em relação ao íon m/z 411, poderia ser um

derivado contendo um grupo metoxil (-O-CH₃) extra. Como este composto não está descrito para a espécie, é necessária uma purificação para sua confirmação. Então, como já evidenciado por TLC, estas duas frações apresentam composições químicas semelhantes.



D

Íon (m/z)	Principais íon-fragmentos (m/z)	Composto Identificado
351	333.6, 159.3	7β-acetoxivouacapano (SPINDOLA <i>et al</i> , 2009)
411.8	351.2, 333.2, 159.3,	Metil-7β-acetoxi-6α-hidroxivouacapano-17β-oato (FASCIO <i>et al</i> , 1976)
441	303.6, 255.7, 159.6, 144.9, 105, 67.6	Não descrito
483	363.5, 303.6, 255.9, 171.4, 159.3, 67.5	Não descrito

FIGURA 16 – ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DAS AMOSTRAS (A) FHE (B) FBE, (C) Estruturas propostas para os íons m/z 351, m/z 411, m/z 441 e m/z 483 e (D) Quadro apresentando os principais íons-fragmento dos compostos detectados.

As frações também foram analisadas por RMN ¹³C. Conforme anteriormente observado nos espectros de ESI-MS (FIGURA 16), os espectros RMN ¹³C de FHE e FBE apresentam semelhanças entre si, com diversos deslocamentos compatíveis à estrutura básica do vouacapano (FIGURA 17). Substituintes comumente

encontrados nestes diterpenos são os radicais hidroxil (-OH), acetoxil (-O-Ac) e metoxil (-O-CH₃) (ARIAGA *et al*, 2000). Conforme sugerido pelos espectros de ESI-MS, os espectros de RMN ¹³C demonstraram a presença de sinais característicos destes substituintes: Dentre os sinais presentes na FHE e FBE, destaca-se o deslocamento em 176 ppm, que indica a presença de grupo carboxílico, já δ 52,2, indica a presença de -O-CH₃; o δ 72,9 é característico de C-OH; δ 75,8 é característico de C-O-Ac (ARIAGA *et al*, 2000; OMENA *et al*, 2006).

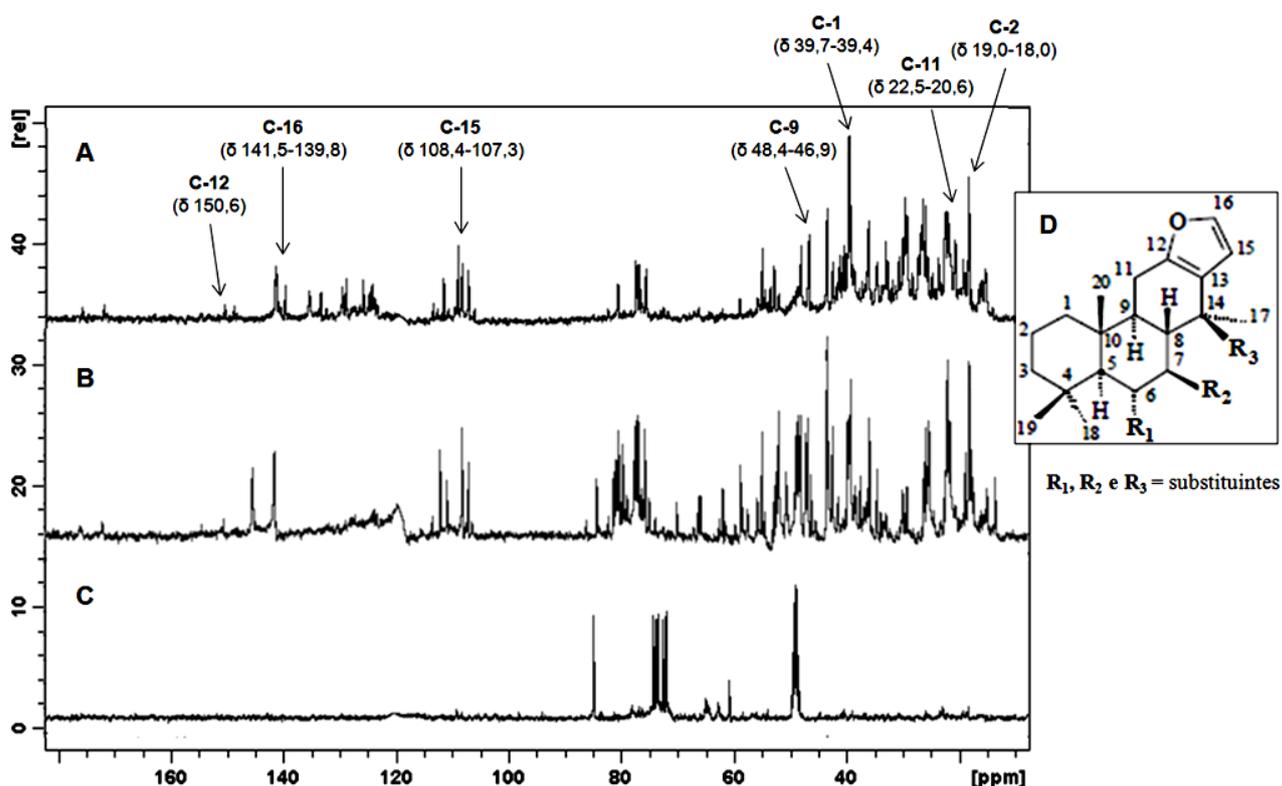


FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN ¹³C DAS FRAÇÕES DE *P. emarginatus* (A) FHE, (B) FBE, (C) FME e (D) Esqueleto básico das estruturas derivadas do vouacapano descritas para estas espécies. Destaque para os deslocamentos pertencentes ao estrutura básico dos vouacapanos.

Diferentemente das frações anteriores, o espectro de RMN ¹³C da FME (FIGURA 17 C) não apresentou sinais característicos do vouacapano, e sim poucos deslocamentos com intensidades semelhantes, indicando serem referentes a uma mesma substância (composto X). Este resultado corrobora com o obtido anteriormente na análise por GC-MS (FIGURA 15 – FME-TMS). Conforme observado em seu espectro, a FME apresenta os seguintes deslocamentos: δ 60,87,

72,1, 72,7, 73,5, 73,8, 74,4 e 84,9, região característica de correlações de ^{13}C para alcoóis (C-OH) (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

Conforme sugerido pelo experimento de RMN ^{13}C , o composto majoritário de FME apresenta diversos grupos -OH. Além disso, a análise por TLC mostrou a presença de oligossacarídeos, portanto esta fração foi hidrolisada, reduzida e acetilada e analisada por GC-MS (FIGURA 17). De acordo com os valores de R_t e perfis de fragmentação, foram identificados os seguintes monossacarídeos: arabinose, xilose, galactose e glucose, além de inositol, e um composto majoritário desconhecido em 16,52 min, o qual apresentou um perfil de fragmentação (FIGURA 18-B) não reconhecido pelo banco de dados (biblioteca NIST), denominado de composto X.

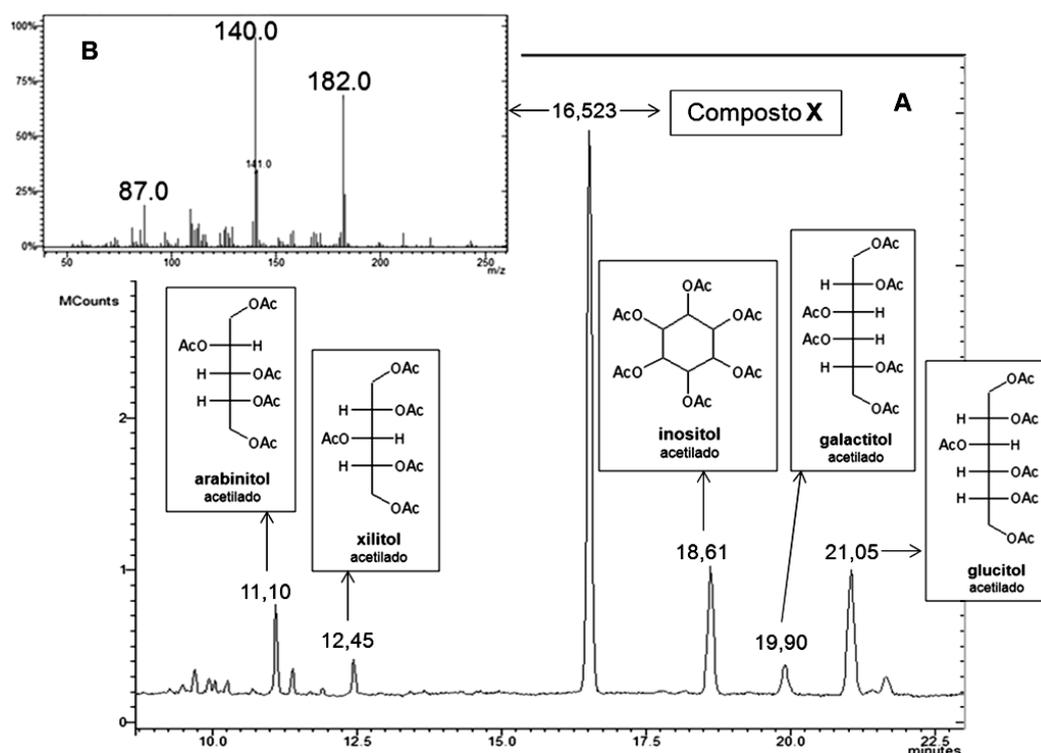


FIGURA 18 – (A) CROMATOGRAMA (GC-MS) DA FME HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA; E (B) Espectro de massas (M^2) da substância de R_t 16,523 min. Método empregado: Programa A.

6.2.1 Fracionamento da FME

Visando a caracterização estrutural do composto majoritário de Fração MeOH:H₂O de *Pterodon emarginatus* - FME (composto X), optou-se pela realização

de um fracionamento cromatográfico (item 5.5.2). Foram utilizados 400 mg da FME, que originou 9 frações, as quais apresentam seus rendimentos dispostos no quadro a seguir (QUADRO 5).

Fase Móvel	Subfração	Rendimento
CHCl ₃ 100%	F-1	0,7 mg
CHCl ₃ 90% MeOH 10%	F-2	56,3 mg
CHCl ₃ 80% MeOH 20%	F-3	56,5 mg
CHCl ₃ 70% MeOH 30%	F-4	26,9 mg
CHCl ₃ 60% MeOH 40%	F-5	74,9 mg
CHCl ₃ 50% MeOH 50%	F-6	22,7 mg
MeOH 100%	F-7	36,5 mg
MeOH 50% H ₂ O 50%	F-8	12,9 mg
H ₂ O 100%	F-9	2,9 mg

QUADRO 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE FME.

As frações obtidas foram primeiramente submetidas à análise espectroscópica de RMN ¹³C (FIGURA 19) a fim de se comparar seus espectros com o da fração de origem, e, assim, gerar dados espectrais que possibilitem a identificação do composto desconhecido

Além dos deslocamentos dos solventes, δ 49,15 para metanol deuterado (CD₃OD) e δ 77,23 para clorofórmio deuterado (CDCl₃), as subfrações de FME apresentaram os deslocamentos químicos dispostos no quadro a seguir (QUADRO 6).

Subfração	Deslocamentos em ppm (δ)
F-2	110,1; 108,7; 82,6; 72,9; 78,5; 78,2; 77,1; 77,0; 56,4; 49,5; 48,4; 47,9; 44,9; 44,0; 40,9; 40,2; 39,6; 37,6; 24,0; 23,4; 19,7 e 19,4
F-3	110,0; 108,7; 104,7; 79,0; 78,7; 78,4; 77,2; 67,6; 57,3; 56,4; 50,0; 48,3; 44,9; 40,9; 37,4; 31,6; 26,9; 23,7; 23,4; 22,1; 19,6 e 19,2
F-4	83,5; 73,2; 72,8; 72,5; 72,1; 71,9; 71,2; 63,8; 62,0; 60,4 e 56,3
F-5	84,0; 73,5; 72,9; 72,5; 72,2; 71,5; 64,4; 62,4 e 60,7
F-6	97,8; 93,6; 84,4; 77,6; 76,0; 74,6; 74,3; 73,9; 73,3; 73,0; 72,8; 72,4; 71,0; 64,7; 62,6 e 60,7
F-7	94,4; 93,4; 84,2; 83,8; 78,3; 78,0; 76,4; 75,7; 75,2; 74,1; 73,9; 73,4; 73,1; 72,6; 72,2; 71,6; 71,2; 70,7; 69,8; 68,4; 67,4; 64,1; 63,6; 62,3; 62,0; 54,4; 41,7 e 38,5

QUADRO 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DETECTADOS NAS SUBFRAÇÕES F-2 A F-7.

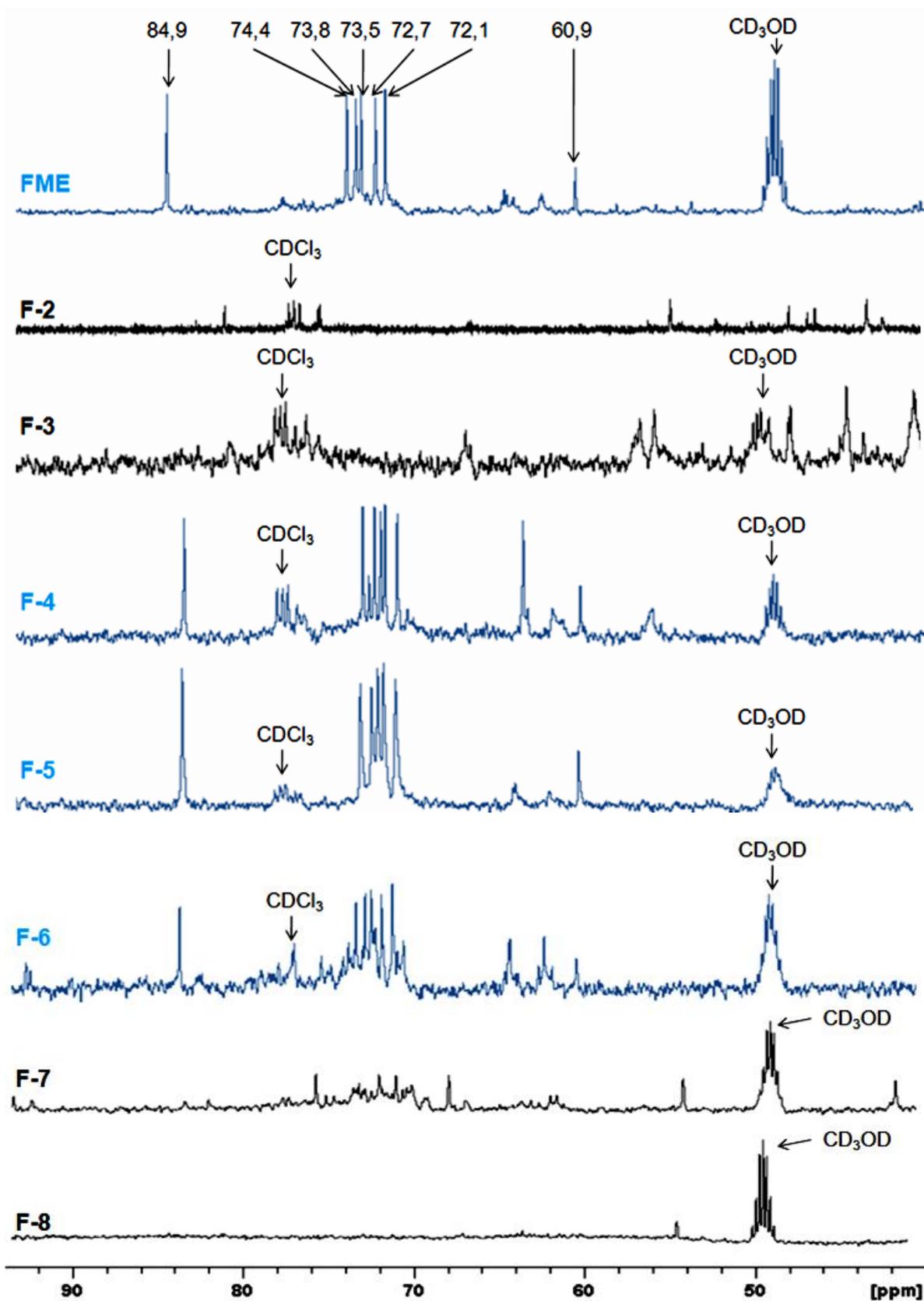


FIGURA 19 – ESPECTROS PARCIAIS DE RMN ^{13}C DE FME E DE SUAS SUBFRAÇÕES (F-2 A F-8). Destaque em azul para as amostras que apresentam os espectros de RMN ^{13}C semelhantes entre si.

De acordo com os assinalamentos, o espectro de RMN ^{13}C que se apresenta mais semelhante com a fração de origem (FME) é o da subfração 5 (F-5), e embora estes deslocamentos também estejam presentes em F-4 e F-6, a F-5 foi a subfração que apresentou somente os principais deslocamentos da FME, sendo o espectro mais consistente com um composto puro, pois todos os sinais apresentam intensidades semelhantes.

Conforme realizado para a FME, F-5 foi submetida à hidrólise, redução, acetilação, e análise por GC-MS. Seu perfil cromatográfico demonstrou que a F-5 é composta, basicamente, por duas substâncias principais (FIGURA 20). A primeira substância, com tempo de retenção (R_t) de 11,10 min, apresentou como principais íon-fragmentos m/z 217, 187, 145, 115 e 85, característicos de arabinitol pentaacetato. Já a segunda substância, de R_t de 16,52 min, apresenta como principais íon-fragmentos m/z 344, 182, 140 e m/z 81, não identificada apenas com estes dados mas, cabe ressaltar que o composto de interesse foi confirmado como presente na fração F-5.

A fim de se elucidar o composto **X**, foi realizada uma análise de ESI-MS (FIGURA 21), obtendo-se como íon molecular m/z 201 $[\text{M}+\text{Li}]^+$, sendo também observada a formação de *cluster* através do íon m/z 395 $[2\text{M}+\text{Li}]^+$. Com este resultado foi determinado que o composto **X** apresenta a massa molecular nominal de 194 Da.

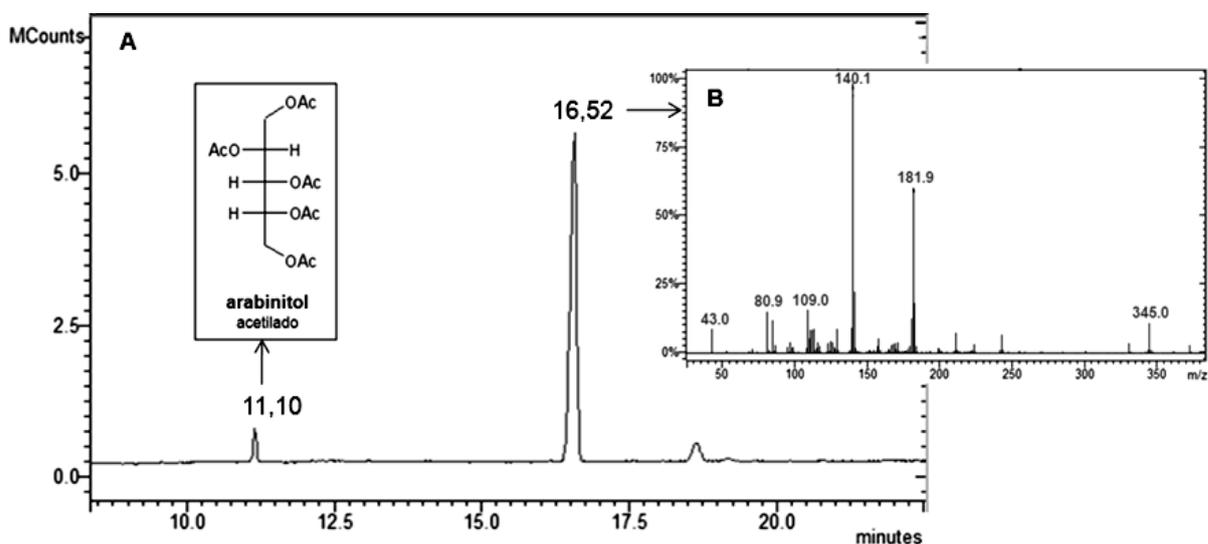


FIGURA 20 – (A) CROMATOGRAMA (GC-MS) DA SUB-FRAÇÃO F-5 ACETILADA E (B) ESPECTRO DE MASSAS (M^2) DA SUBSTÂNCIA DE R_t 16,52. Método empregado: Programa A.

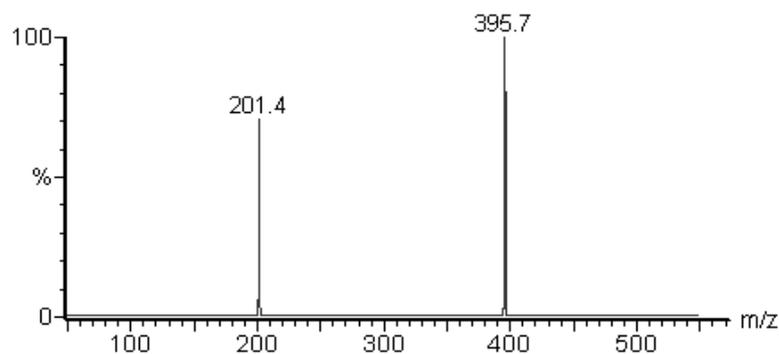


FIGURA 21 – ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DA SUB-FRAÇÃO F-5 LITIADA.

De acordo os dados obtidos por RMN ^{13}C , sugere-se que o composto **X** possui diversos grupos hidroxila (-OH). Esta característica, somada à massa molecular de 194 Da é compatível com o esperado para um metil-hexosídeo, no entanto, os deslocamentos de RMN ^{13}C de F-5 não indicaram a presença de carbono anomérico, o qual apresenta deslocamentos químicos típicos entre δ 98-110 (BREITMAIER E VOELTER, 1990), sendo que o sinal do carbono mais desblindado da amostra ocorre em δ 84. Este composto também poderia ser confundido com um açúcar redutor, com grupo metílico em outra posição. Contudo, para isso seriam esperados dois sinais de carbonos anoméricos (α e β) entre δ 90-100 (BREITMAIER E VOELTER, 1990).

Com estes resultados levantou-se a suspeita de que a fração F-5 continha um composto semelhante a um monossacarídeo (hexose) metilado. Polialcoóis cíclicos como os inositóis (hexitóis) apresentam a mesma massa molecular de uma hexose, e se mono-metilado poderia produzir um íon de m/z 201 $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Segundo Jain *et al* (2007), o composto (+)-pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol) (FIGURA 22), um derivado metilado do inositol, apresenta massa molecular 194 Da, compatível com os dados obtidos para a F-5, na qual observou-se o íon litiado m/z 201 (194+Li). Além disso, o autor descreve os deslocamentos de RMN ^{13}C (CD_3OD) para esta estrutura: δ 85,73 (C-3), 74,33 (C-1), 73,76 (C-5), 73,47 (C-2), 72,56 (C-4), 72,04 (C-6) e 60,80 (OMe), compatíveis com os dados encontrados para a sub-fração F-5.

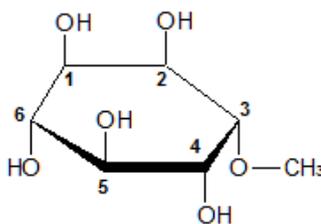


FIGURA 22 – (+)-PINITOL (3-O-METIL-D-CHIRO-INOSITOL). FONTE: adaptado de IUPAC (1968).

Então, foram realizados experimentos de RMN DEPT-135, HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), HSQC-TOCSY (*Totally Correlated Spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) para a obtenção de dados espectrais do composto **X** (FIGURA 23).

No experimento de DEPT-135, para confirmar a presença de carbonos secundários ($-\text{CH}_2-$) e carbonos quaternários ($>\text{C}<$), não houve inversão de sinal, ou seja, nenhum dos carbonos é CH_2 , e também não foi evidenciado o desaparecimento de nenhum sinal, sugerindo a ausência de $>\text{C}<$ na estrutura. O deslocamento de RMN ^1H em 3,58 ppm resultou em um singlete, e a integração de sua área demonstrou ser três vezes maior que os demais deslocamentos presentes no espectro, sendo esta uma característica de grupos $-\text{CH}_3$. Este hidrogênio apresentou correlação, no experimento de HSQC, com o carbono δ 60,8, indicando a sua ligação direta. E, através do deslocamento deste carbono (δ 60,8), é possível sugerir que o mesmo pode estar formando uma ligação do tipo éter ($-\text{O}-\text{CH}_3$).

Foi possível também demonstrar as correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de todos os sinais do espectro de HSQC, sendo possível a visualização dos deslocamentos dos hidrogênios e carbonos diretamente ligados.

Além disso, no experimento de HMBC foi possível detectar o deslocamento dos carbonos vizinhos aos hidrogênios assinalados, como, o acoplamento $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em δ 3,58 / 84,9, indicando que este é o deslocamento químico do carbono ligado diretamente ao grupo metoxil ($-\text{O}-\text{CH}_3$). O δ 3,59, apresenta como carbonos vizinhos δ 84,9 e δ 72,7, estando então o C δ 74,4 (HSQC) ligado a dois outros carbonos além do hidrogênio δ 3,59 e da $-\text{OH}$.

Através do experimento de HSQC-TOCSY foi possível confirmar que o composto **X** trata-se de um ciclitol, pois os sinais 73,5, 72,9, 72,5, 72,2 e 71,5, estão todos correlacionados entre si, situação que ocorre quando os carbonos estão ligados na forma de ciclo (anel).

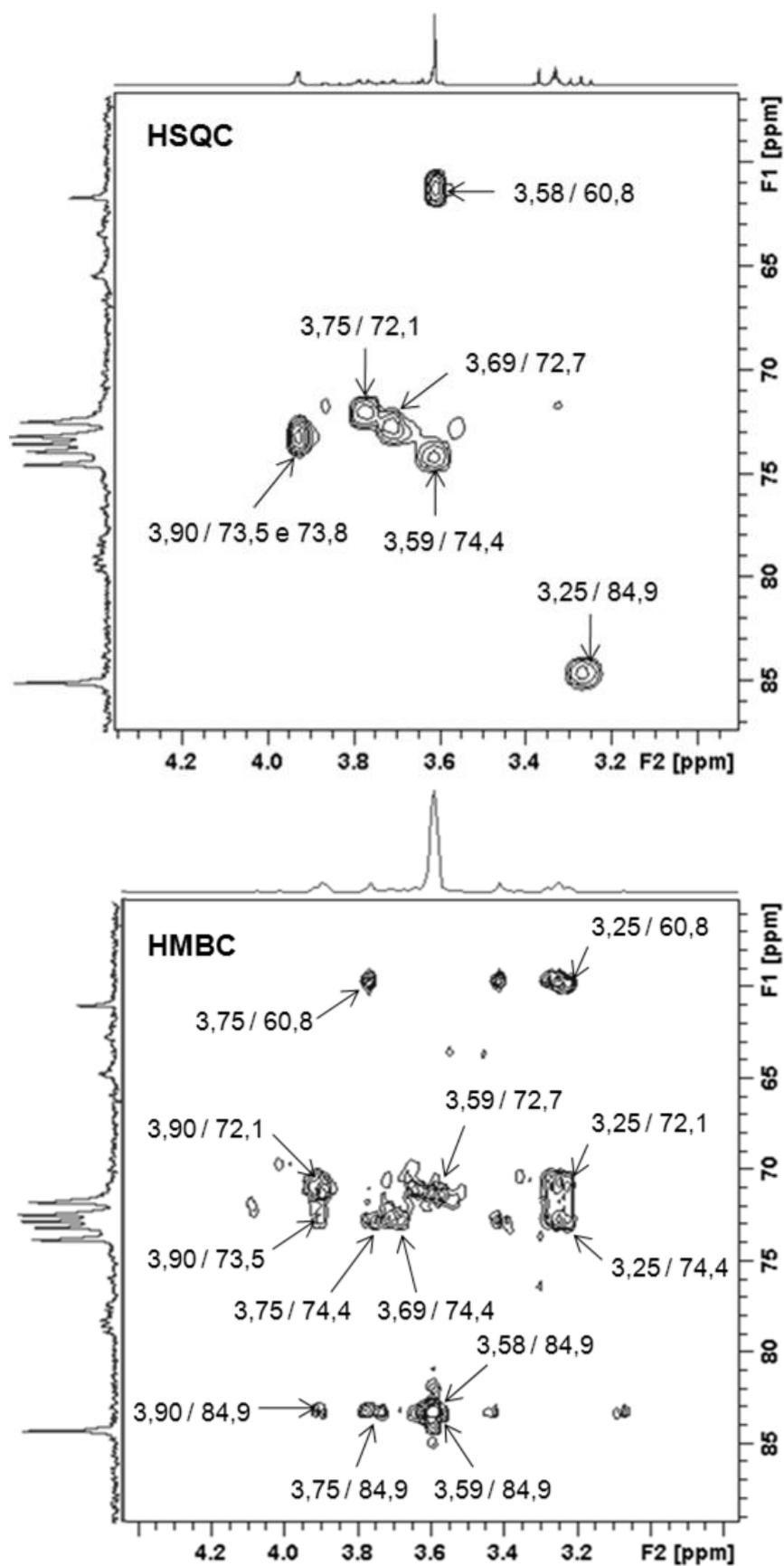


FIGURA 23 – ESPECTROS DE RMN HSQC E HMBC DE F-5 (composto X).

Então, através dos experimentos realizados, sugere-se que o composto **X** pertence à classe dos inositóis contendo um grupo metoxil (-O-CH₃) em uma de suas posições. Assim como os monossacarídeos, os inositóis (1,2,3,4,5,6-ciclohexano-hexóis) podem apresentar diversas configurações em seus carbonos (todos assimétricos), relacionadas à orientação axial/equatorial de suas hidroxilas, resultando em diferentes tipos de inositóis, descritos a seguir (FIGURA 24) (IUPAC, 1968).

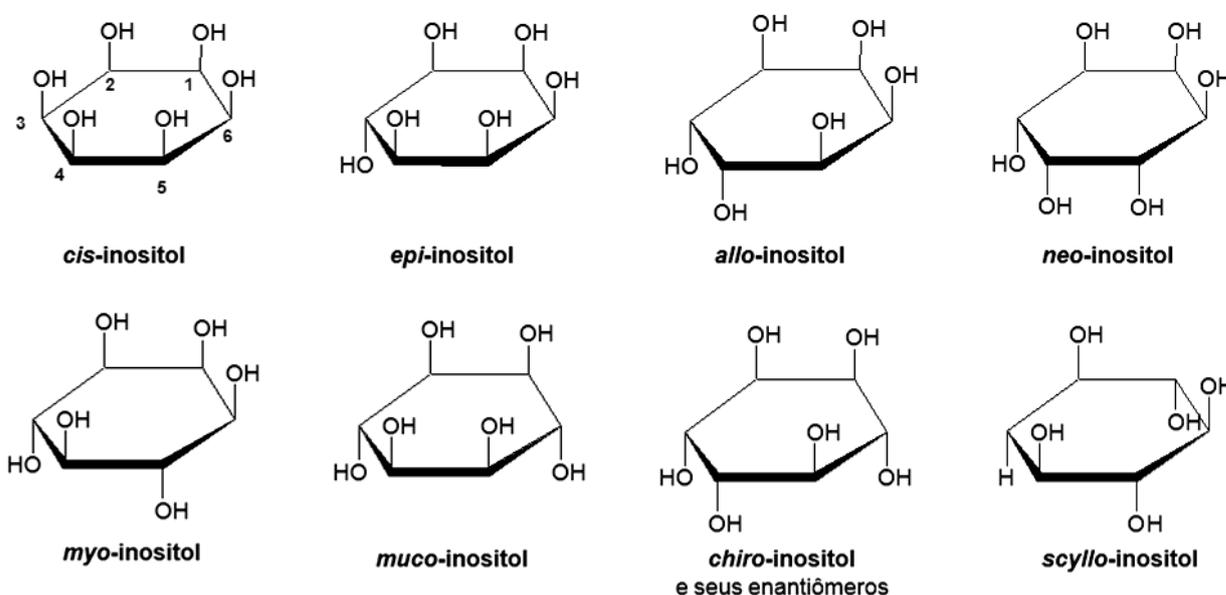


FIGURA 24 – POSSÍVEIS CONFIGURAÇÕES ENCONTRADAS PARA OS INOSITÓIS. FONTE: adaptado de IUPAC (1968).

Como, inicialmente, não se dispunha do padrão de D-pinitol, F5 juntamente com os padrões disponíveis (L-*chiro*-inositol, *cis*-inositol, *neo*-inositol, *myo*-inositol e *scyllo*-inositol) foram metilados. Com isto, embora não sendo possível determinar a posição do grupo CH₃, foi possível determinar de qual tipo de inositol o composto **X** é derivado. Os padrões e a amostra F-5 foram analisados por GC-MS, como pode ser visto na Figura 25, há uma correspondência entre o pico de amostra F-5 com aquele formado pelo L-*chiro*-inositol (R_t 8,71 min), bem como não só ambos, mas todas as amostras metiladas (F-5 e padrões) apresentaram mesmo perfil de fragmentação de massas, demonstrando que o composto **X** é derivado do *chiro*-inositol.

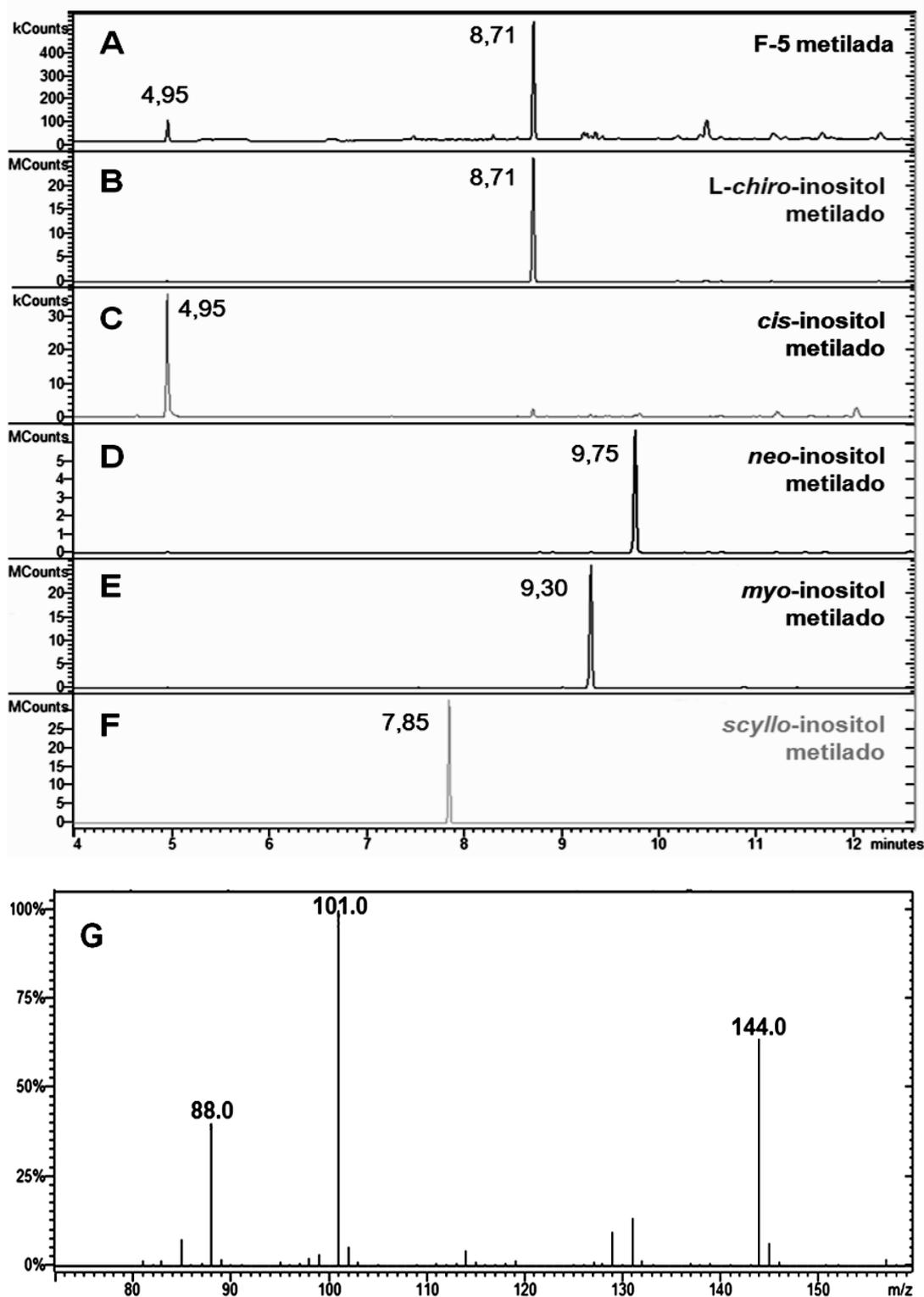


FIGURA 25 – (A - F) CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 METILADA E OS DOS PADRÕES DE INOSITOL E (G) ESPECTRO DE MASSAS (M^2) TÍPICO DOS INOSITÓIS PERMETILADOS. Método empregado: Programa B.

O composto **X** foi identificado como sendo um derivado metilado do *chiro*-inositol, foi então adquirido o padrão de D-pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol) (*Sigma*-

Aldrich[®]). O D-pinitol foi metilado e também comparado com a amostra F-5 metilada, confirmando a correspondência entre os picos e suas fragmentações (FIGURA 26 A e B). Como a metilação não é um método adequado para a identificação da posição do grupo metoxil (-O-CH₃), optou-se então pela acetilação de ambos (amostra F-5 e padrão D-pinitol). Conforme a Figura 26 C e D, pode ser observada a correspondência entre a amostra e o D-pinitol, tanto em relação ao R_t quanto ao perfil de fragmentação (já mostrado anteriormente nas Figuras 18 e 20), resultado que confirma que o composto **X** é o pinitol (3-O-metil-*chiro*-inositol).

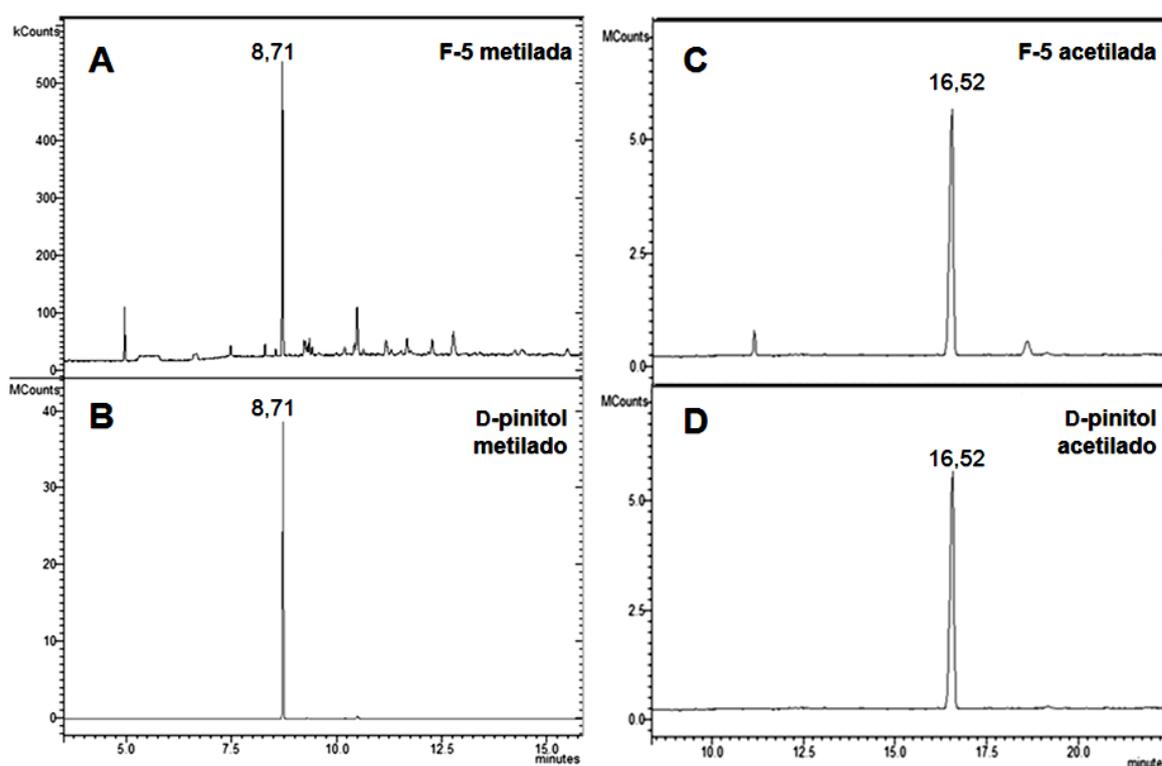


FIGURA 26 – (A) CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 METILADA E O (B) PADRÃO D-PINITOL METILADO Método empregado: Programa B; (C) CROMATOGRAMAS (GC-MS) DA AMOSTRA F-5 ACETILADA E O (D) PADRÃO D-PINITOL ACETILADO. Método empregado: Programa A.

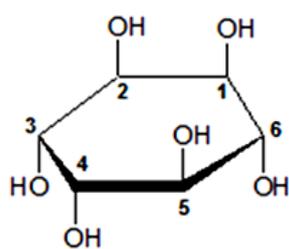
No entanto, de acordo com os dados obtidos até o momento, o composto **X** foi analisado em relação ao L-*chiro*-inositol e ao D-pinitol (FIGURA 25 B e 26 B), não sendo possível obter sua configuração absoluta pelo método empregado. Para confirmar a qual série (D ou L) o composto pertence, foi determinada a atividade óptica das amostras (D-pinitol, L-*chiro*-inositol, e F-5 sem derivatização e metilados). De acordo com o Quadro 7 pode-se concluir que o composto **X** trata-se de um D-3-

O-metil-*chiro*-inositol (FIGURA 27), pois a sua rotação óptica específica apresenta mesmo sinal que a do D-pinitol não derivatizado e metilado. As variações dos valores observados podem ser explicadas pelo fato de a amostra F-5, embora com alto grau de pureza, ainda apresenta outros compostos que poderiam estar alterando o desvio da luz, enquanto que o D-pinitol é um padrão comercial puro.

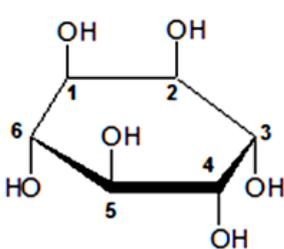
Amostra (2 mg/mL)	Ângulo de desvio observado α	Rotação óptica específica $[\alpha]_D$
F-5	+0,088	+44
F-5 metilada	+0,026	+13
D-pinitol	+0,104	+52
D-pinitol metilado	+0,097	+48,5
L- <i>chiro</i> -inositol	-0,142	-71
L- <i>chiro</i> -inositol metilado	-0,068	-34

QUADRO 7 – ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DE CADA PADRÃO DE *CHIRO*-INOSITOL E DA SUBFRAÇÃO F-5.

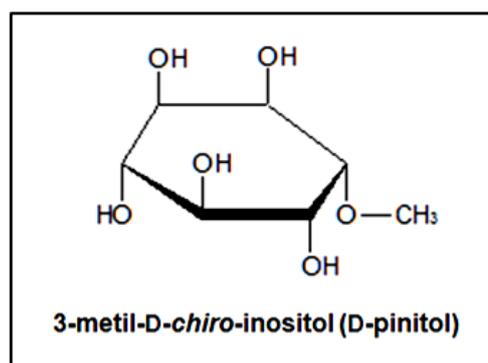
Confirmado então o composto **X** (composto majoritário da F-5), os espectros de RMN HSQC e HMBC do padrão de D-pinitol e da subfração F-5 foram confrontados, resultando em correspondência total dos deslocamentos químicos encontrados. Este é o primeiro relato do composto D-pinitol para a espécie *Pterodon emarginatus*.



L-*chiro*-inositol



D-*chiro*-inositol



3-metil-D-*chiro*-inositol (D-pinitol)

FIGURA 27 – ESTRUTURAS DO L-*CHIRO*-INOSITOL, D-*CHIRO*-INOSITOL E DE SEU CORRESPONDENTE 3-O-METILADO (D-PINITOL). FONTE: adaptado de BREITMAIER e VOELTER (1990).

O D-pinitol é um ciclitol abundante em algumas plantas sendo um componente importante das famílias Pinaceae, Leguminosae e Caryophyllaceae

(NGUYEN e LAMANT, 1988). Sua rota biosintética tem sido elucidada nas gimnospermas e em plantas leguminosas, incluindo o *myo*-inositol como seu precursor (NGUYEN e LAMANT, 1988; LOEWUS e MURTHY, 2000). Seu papel fisiológico parece estar relacionado à adaptação das plantas a condições osmóticas drásticas, sendo um soluto orgânico osmoticamente ativo: o D-pinitol é um dos mais importantes constituintes de numerosas espécies de mangue, e grandes quantidades têm sido relatadas em folhas do arbusto de jojoba (*Simmondsia chinensis*) no deserto (NGUYEN e LAMANT, 1988; CARVALHO *et al*, 2006).

É um conhecido agente anti-diabético, que pode ter aplicação no tratamento de câncer e AIDS (Ostlund e Sherman, 1996⁶ In: BATES, JONES, BAILEY, 2000). Ele exerce um efeito semelhante à insulina, resultando em níveis mais baixos de açúcar no sangue e aumento da disponibilidade de glicose para o metabolismo celular (BATES, JONES, BAILEY, 2000) e aumenta a retenção de creatinina pelas células musculares (GREENWOOD *et al*, 2001). O D-pinitol, portanto, parece desempenhar um papel na regulação da energia celular, resultando em níveis de energia maiores e redução da fadiga (VAN WYK e ALBRECHT, 2008). Além destas propriedades, este composto também é descrito como anti-inflamatório (SINGH *et al*, 2000) e larvicida (CHAUBAL *et al*, 2005), corroborando com as atividades biológicas já descritas para tanto para *P. emarginatus*.

6.3 ANÁLISE QUÍMICA DE *Pterodon polygalaeflorus*

Assim como para *P. emarginatus*, foi realizada uma varredura no extrato bruto e frações de *P. polygalaeflorus* com TLC, utilizando-se como revelador EtOH:H₂SO₄ (95:5, v/v), e fase móvel mais apolar (Hexano:EtOAc - 65:35, v/v) (FIGURA 28 - A e B). Assim como na *P. emarginatus*, a TLC do extrato bruto (EBP) e as suas frações FHP e FBP, indicaram a presença de terpenos, devido ao desenvolvimento de colorações rosáceas e arroxeadas das manchas, como já descrito para a espécie (COELHO *et al*, 2005; VIEIRA *et al*, 2008; EUZÉBIO, 2009).

⁶ OSTLUND, R.E., SHERMAN, W.R., 1996 (filed 4 March). Pinitol and derivatives there of for the treatment of metabolic disorders. United States Patent no. 5,8827,896.

A fração contendo os compostos de maior polaridade, FMP, foi analisada por TLC com fase móvel EtOAc:*n*-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v), e para sua detecção foi utilizado o revelador orcinol-H₂SO₄ visando a detecção de carboidratos (Figura 27 C). Foi detectado na amostra, o monossacarídeo xilose (Xyl) de R_f 0,60, glucose (Glc) de R_f 0,48, sacarose (R_f 0,37), assim como outros oligossacarídeos com R_f inferiores (como R_f 0,27; 0,18; 0,125 e 0,08), que também sugerem a presença de outros oligossacarídeos, assim como na *P. emarginatus*.

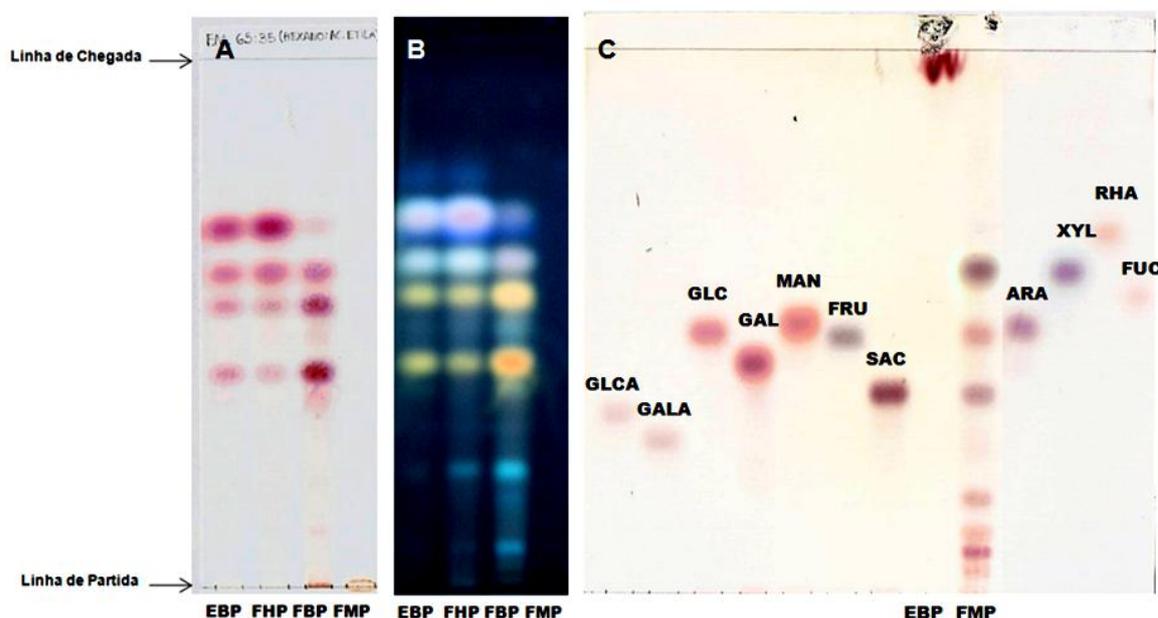


FIGURA 28 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DAS AMOSTRAS EBP, FHP, FBP E FMP, (A) Observada com revelador EtOH:H₂SO₄ (95:5 v/v) e fase móvel hexano:EtOAc (65:25 v/v) e (B) em câmara de UV em 365 nm, após esta revelação;(C) Revelada com Orcinol-H₂SO₄ e fase móvel EtOAc:*n*-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v).

O extrato bruto e suas frações foram submetidos à trimetilsililação, a fim de volatilizar todos os compostos que contenham hidroxilas (-OH) livres, para então serem realizadas análises por GC-MS. Como observado na Figura 29, a fração FMP se apresenta mais purificada em relação às demais. Para *P. emarginatus*, isto também foi observado, mas a FME apresenta-se mais pura que FMP. Também pode ser observado que as frações FHE e FBE apresentam-se como misturas complexas, com perfis de eluição mais semelhantes entre si e com o do extrato bruto.

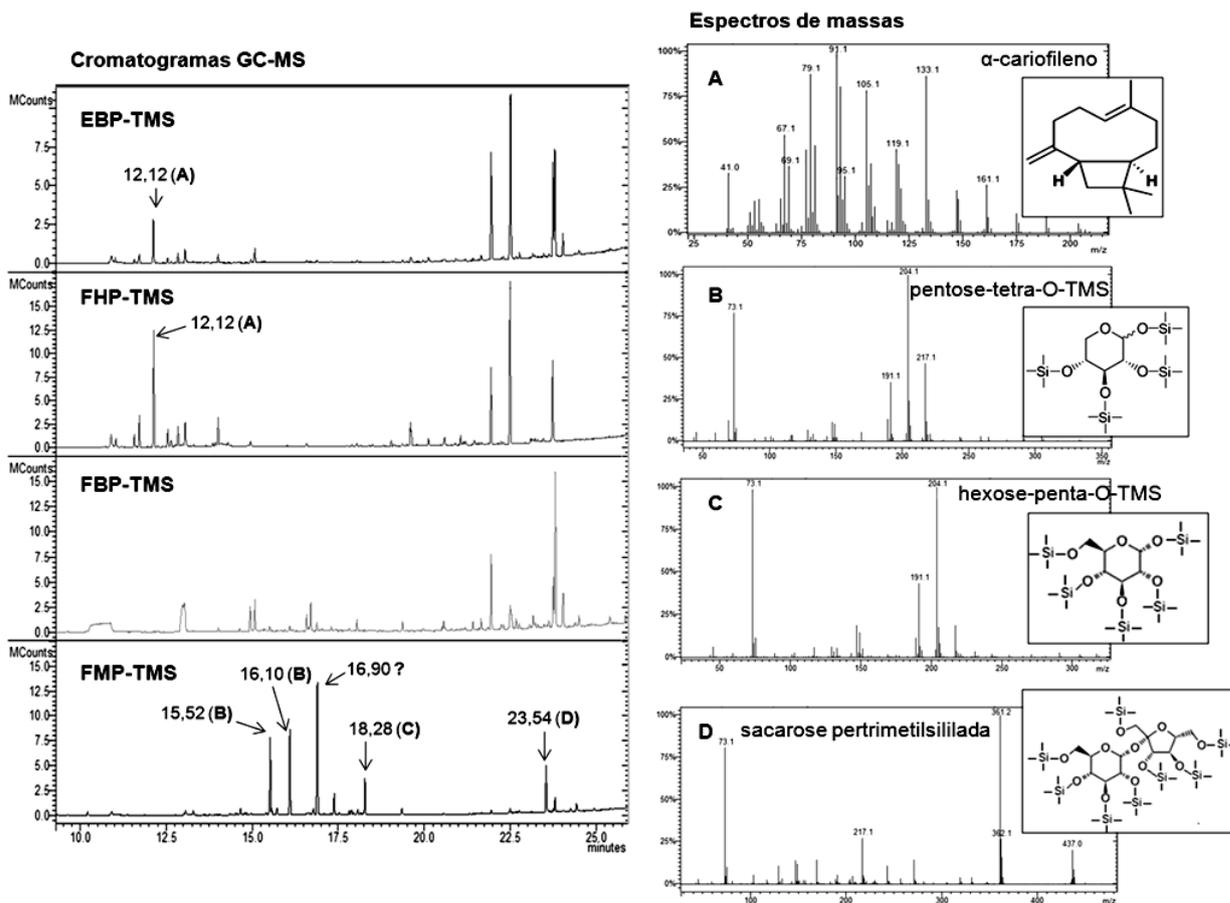
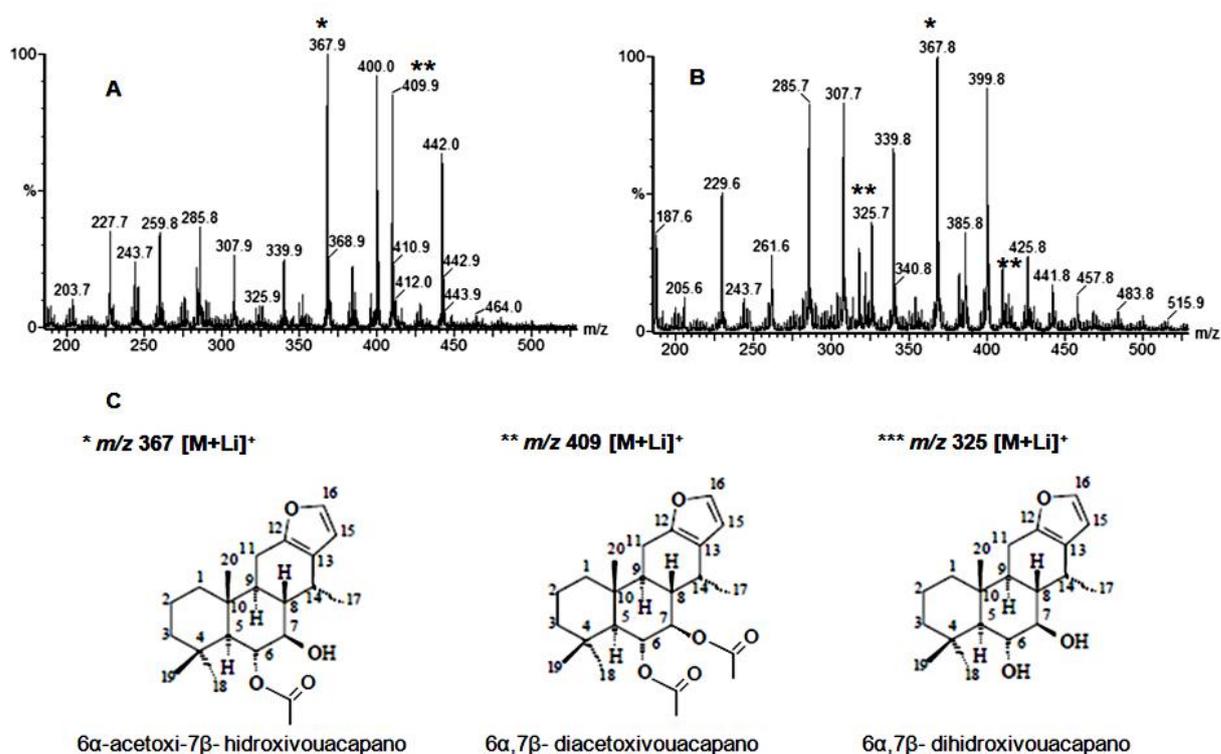


FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS (GC-MS) DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES TRIMETILSILILADOS DE *P. polygalaeiflorus*. (A) Fragmentação correspondente ao pico de R_t 12,12, de EBP-TMS e FHP-TMS, identificado como cariofilleno. (B) Fragmentação correspondente ao pico de R_t 15,52, de FMP-TMS, sendo identificado xilose pertrimetilsililada. (C) Fragmentação correspondente ao pico de R_t 18,28, de FMP-TMS, sendo identificado glucose pertrimetilsililada e (D) Fragmentação do pico de R_t 23,54, de FMP-TMS, identificado como sacarose pertrimetilsililada. Método empregado: Programa C.

Através da biblioteca NIST, alguns compostos destas amostras puderam ser identificados. No extrato bruto trimetilsililado (EBP-TMS) e na fração hexânica trimetilsililada (FHP-TMS), foi detectado o cariofilleno (α ou β), com R_t de 12,124 min, já anteriormente descrito para esta espécie (CARVALHO *et al*, 1999; ARIAGA *et al* 2000). Para a FMP-TMS, foram identificados os seguintes compostos: pentose-tetra-O-TMS (R_t 15,52), possivelmente xilose, hexose-penta-O-TMS (R_t 18,28), possivelmente glucose, e sacarose pertrimetilsililada (R_t 23,54), dados estes que confirmam o resultado obtido por TLC (FIGURA 28 C). Ainda para a FMP-TMS, foi observado um composto majoritário não identificado pela biblioteca (R_t 16,90), que coincide com a fragmentação correspondentes ao D-pinitol caracterizado na FME-

TMS, sugerindo-se então a presença deste composto também para a espécie de *P. polygalaeflorus*.

Também foram realizadas análises por ESI-MS das frações obtidas. Assim, como pode ser visualizado na Figura 30, alguns compostos já descritos na literatura foram detectados. Observam-se espectros bem semelhantes entre as frações FHP e FBP, já evidenciado por outras técnicas como TLC e GC-MS. O íon de m/z 325 $[M+Li]^+$ é compatível com a m/z do 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano, o íon de m/z 367 $[M+Li]^+$ é compatível com a m/z do 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano, e o íon m/z 409 $[M+Li]^+$ é compatível com a m/z do 6 α , 7 β -diacetoxivouacapano.



D

Íon (m/z)	Principais fragmentos (m/z)	Composto Identificado
325	Não produziu fragmentos	6 α , 7 β -dihidroxivouacapano (COELHO <i>et al</i> , 20005)
367	307.6, 145.1, 67.5	6 α -acetoxi-7 β - hidroxivouacapano (SPINDOLA <i>et al</i> , 2009)
409	349.4, 289.5 145.2, 67.6	6 α , 7 β -diacetoxivouacapano (SPINDOLA <i>et al</i> , 2009)

FIGURA 30 – ESPECTROS DE ESI-MS² PARCIAIS EM MODO POSITIVO DAS AMOSTRAS (A) FHE (B) FBE, (C) Estruturas propostas para os íons m/z 325, m/z 367 e m/z 409 E (D) Quadro apresentando os principais íons-fragmento dos compostos detectados.

As frações foram submetidas a análise de RMN ^{13}C , e, conforme também observado nos espectros de ESI-MS (FIGURA 30), os espectros de RMN ^{13}C das frações FHP e FBP apresentam-se semelhantes (FIGURA 31), com diversos deslocamentos compatíveis com a estrutura básica do vouacapano. Como já citado anteriormente, os substituintes comumente encontrados nestes diterpenos são radicais hidroxil (-OH), acetoxil (-O-Ac) e metoxil (-O-CH₃). Conforme sugerido pelos espectros de ESI-MS, os espectros de RMN ^{13}C confirmam sua presença, demonstrado através de seus deslocamentos químicos como: 170,7, que indica a presença de grupo -O-Ac, δ 72,9 característico de C-OH, por exemplo (ARRIAGA *et al*, 2000; OMENA *et al*, 2006).

Assim como na FME, o espectro de ^{13}C da FMP (FIGURA 31 C) não apresentou os sinais característicos do vouacapano. Apesar de não possuir um espectro característico de uma única substância como a FME, também apresentou os sinais característicos do D-pinitol (δ 60,87, 72,1, 72,7, 73,5, 73,8, 74,4 e 84,9). Este dado, aliado ao já anteriormente obtido por GC-MS (FIGURA 29) corroboram a presença deste composto também na espécie *P. polygalaeflorus*.

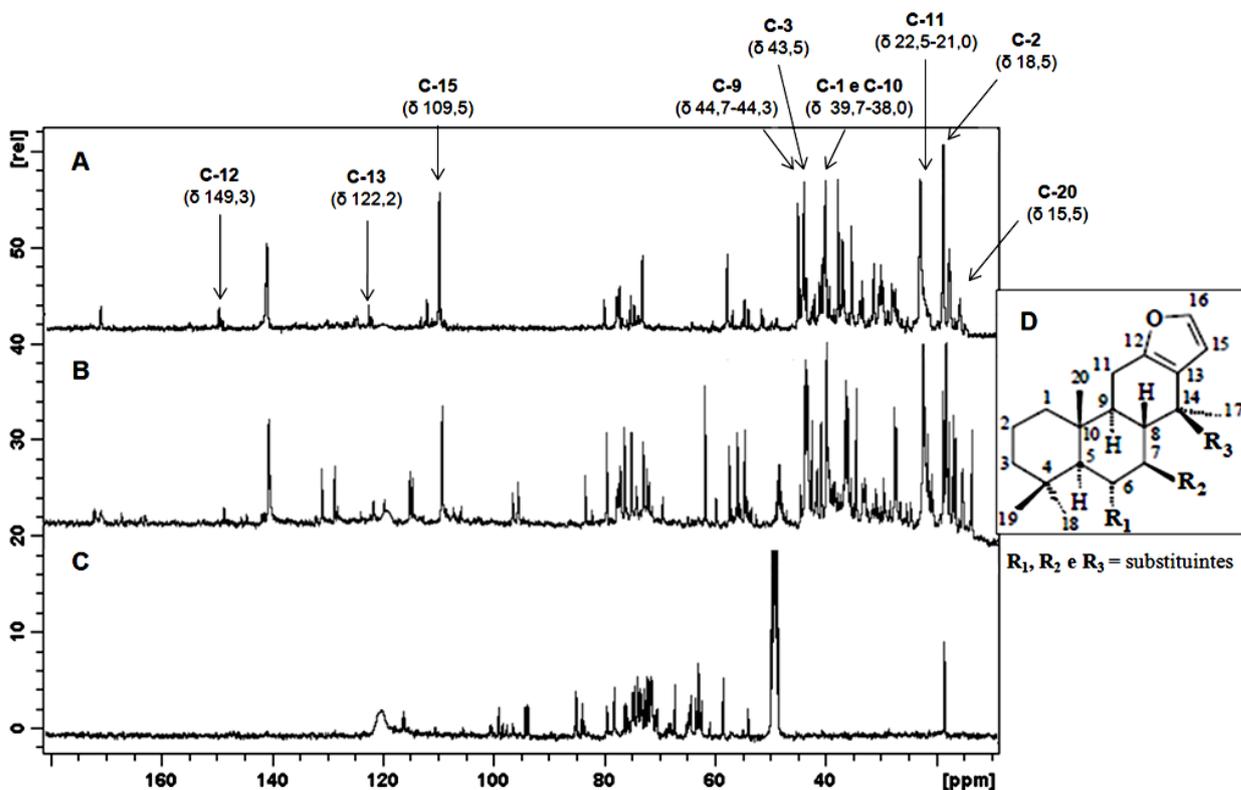


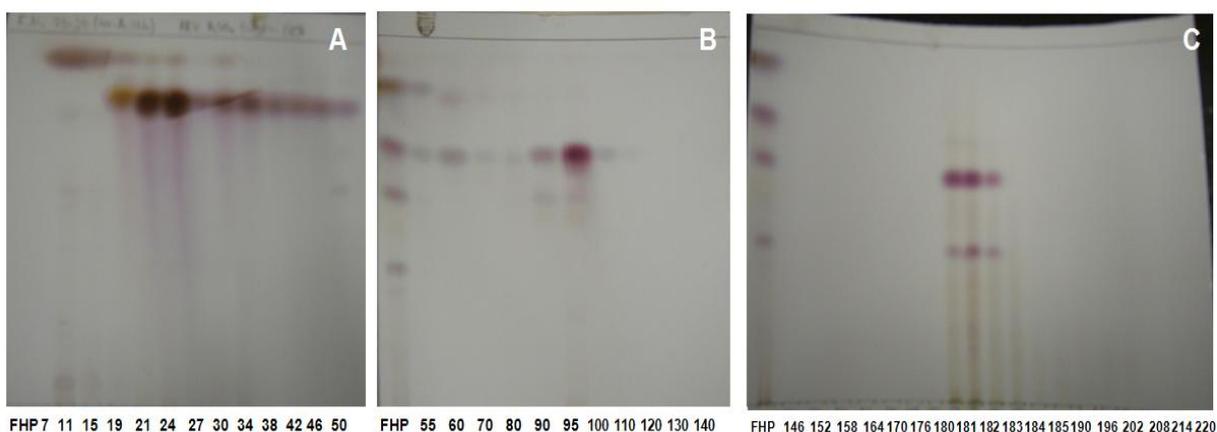
FIGURA 31 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES DE *P. polygalaeflorus* (A) FHP, (B) FBP, (C) FMP E (D) Esqueleto básico das estruturas derivadas do vouacapano descritas para estas espécies.

Curiosamente, o espectro de RMN ^{13}C da FHP apresentou todos deslocamentos químicos compatíveis com a estrutura do 6 α -acetoxivouacapano (ARRIAGA *et al*, 2000), sendo esta fração alvo de maiores investigações.

6.3.1 Fracionamento da FHP

O fracionamento da fração hexânica de *Pterodon polygalaeflorus* (FHP) realizado em coluna cromatográfica aberta, resultou em 250 subfrações e foi monitorado por cromatografia em camada delgada (TLC), a qual foi revelada com EtOH:H₂SO₄ (95:5 v/v) (FIGURA 32).

Fase Móvel – Hexano:EtOAc (75:25) Revelador – EtOH:H₂SO₄ (95:5, v/v)



Visualização da TLC, após revelação, em Câmara de UV(365nm)

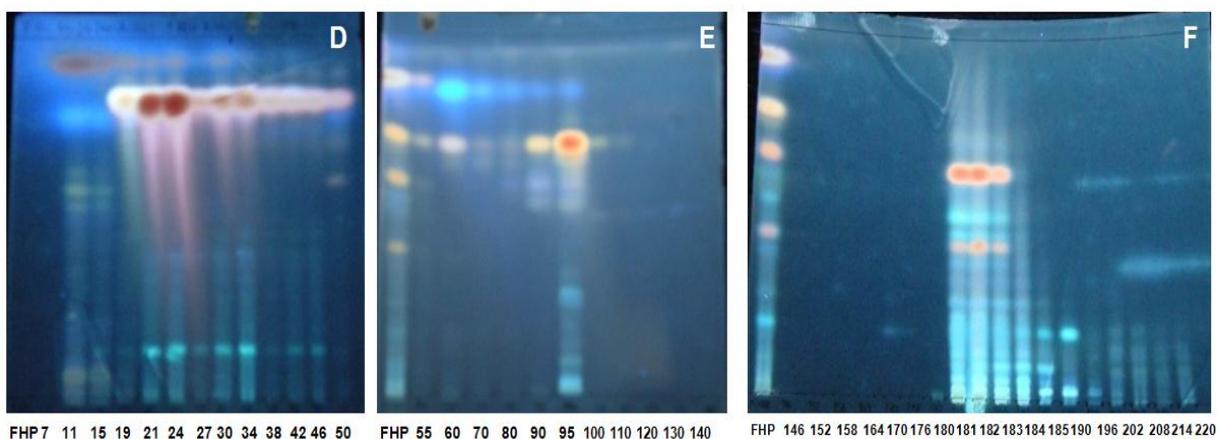


FIGURA 32 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA (TLC) DAS SUBFRAÇÕES DE FHP OBSERVADAS COM REVELAÇÃO DE EtOH:H₂SO₄ (95:5 v/v) E EM CÂMARA UV EM 365 nm. Os números abaixo das TLCs indicam o número das subfrações de FHP.

O fracionamento também foi acompanhado por UPLC-ELSD, onde as subfrações P-21 (21^o amostra coletada) e P-95 (95^o amostra coletada) apresentaram alto grau de pureza e foram então submetidas à análise por GC-MS (FIGURA 33). Os cromatogramas obtidos por UPLC indicam que na P-21 foi obtida a substância de Rt 6,02 e, na P-95, a de Rt 5,50. Já nos cromatogramas de GC-MS, 2 substâncias (R_t 34,85 e 35,91) permaneceram na subfração P-21, e a substância de R_t 38,41 na P-95, sendo que os compostos não foram identificados pela biblioteca NIST.

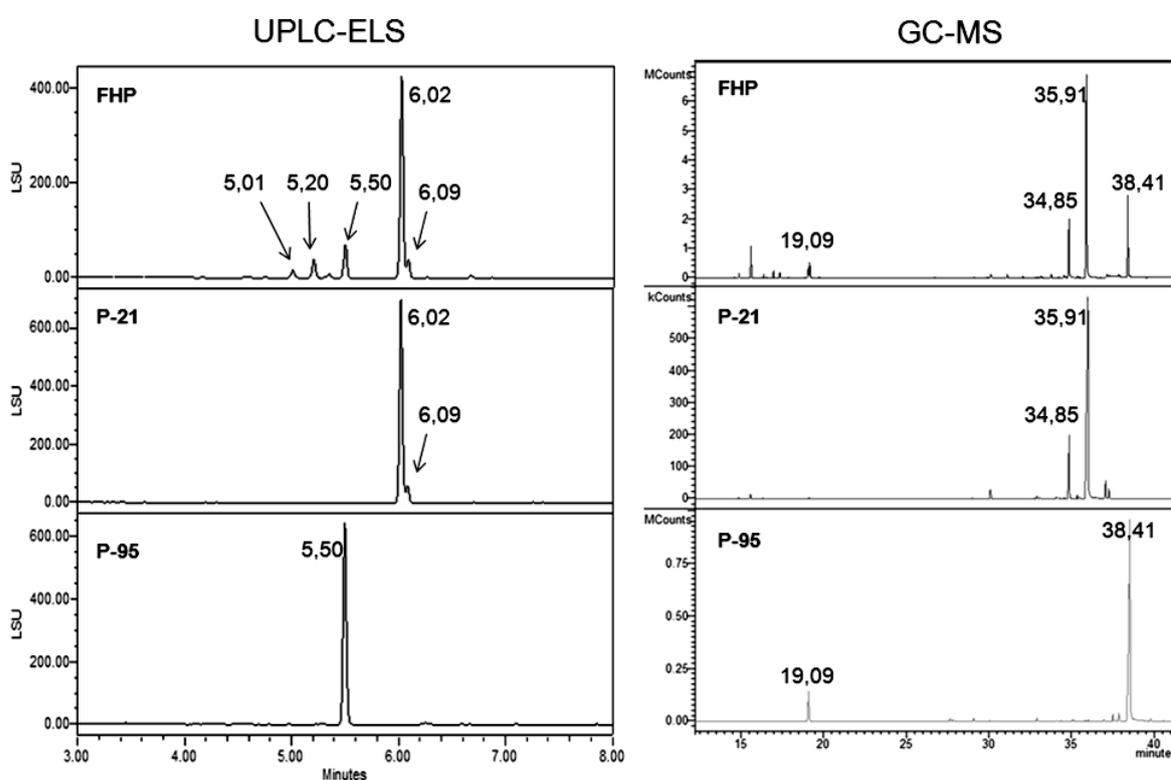


FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS DE UPLC-ELS E GC-MS DA FRAÇÃO FHP E DE SUAS SUBFRAÇÕES MAIS PURAS, P-21 E P-95. Na coluna da direita, UPLC-ELS das amostras da e à esquerda, GC-MS das amostras obtidas a partir do método: Programa C.

Encontradas estas duas amostras (P-21 e P-95), mais purificadas de FHP, a etapa seguinte foi a realização de análise por RMN ¹³C e DEPT 135, para a caracterização estrutural das mesmas (FIGURA 34).

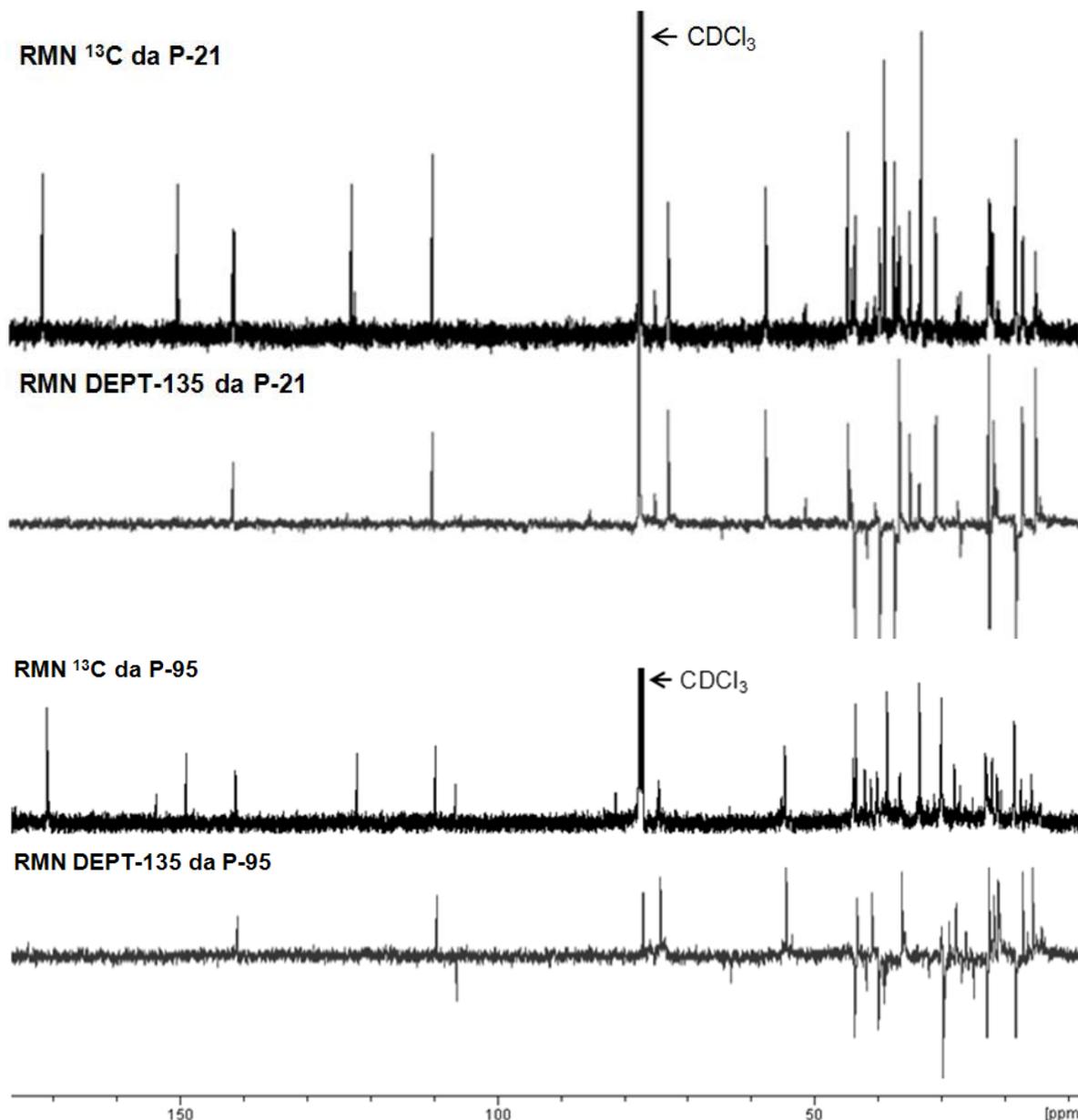


FIGURA 34 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C E DEPT-135 DAS SUBFRAÇÕES DE FHP, P-21 E P-95, RESPECTIVAMENTE.

Analisando-se os espectros de RMN ^{13}C e DEPT-135 nota-se a semelhança do perfil de deslocamentos das duas subfrações, provavelmente tratando-se de substâncias semelhantes. O deslocamento de 170,41, característico de ácidos carboxílicos e ésteres, indica o deslocamento da carboxila (do grupo AcO-) ligada ao C-6; o C-13 apresenta o deslocamento de 122,14, característico de carbono participante de dupla ligação; já o C-12, além de estar participando desta mesma ligação, também está ligado à um O, o que desloca seu sinal para valores mais altos, como 149,48 (ARIAGA *et al*, 2000; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007); os

demais deslocamentos descritos para esta estrutura encontram-se dispostos no quadro a seguir (QUADRO 8). De acordo, com os deslocamentos encontrados para a amostra P-21, confirmou-se presença dos deslocamentos correspondentes à todos os carbonos do diterpeno 6 α -acetoxivouacapano (FIGURA 35), já descrito anteriormente para a composição química desta espécie.

P-21			P-95		
RMN ¹³ C δ (ppm)	Interpretação DEPT-135	Conclusão	RMN ¹³ C δ (ppm)	Interpretação DEPT-135	Conclusão
15,3	-	C-20	15,5	-	C-20
15,4	-				
17,3	-		17,1	-	
17,4	-	C-17	17,2	-	C-17
18,4	-H ₂ C-	C-2 e C-6	18,2	-H ₂ C-	C-2 e C-6
21,9	-		20,3	-	
			21,00	-	
22,0	-	-CH ₃ do AcO- em C-6	21,7	-	-CH ₃ do AcO- em C-6
22,5	-H ₂ C-	C-11	22,7	-H ₂ C-	C-11
22,6	-	C-19	24,9	-H ₂ C-	
22,7	-		26,7	-H ₂ C-	
			27,7	-	
30,1	-	C-14	29,7	-H ₂ C-	
			31,9	-H ₂ C-	
			32,7	-H ₂ C-	
33,0	-	C-4	33,1	-	C-4
35,0	-	C-8			
36,6	-		36,2	-	
36,9	-				
37,4	-H ₂ C-	C-7 e C-18	38,2	-H ₂ C-	
38,9	-	C-10	38,9	-H ₂ C-	C-10
39,7	-H ₂ C-	C-1	39,8	-H ₂ C-	C-1
			40,9	-	
			41,8	-H ₂ C-	
			43,2		
43,5	-H ₂ C-	C-3	43,6	-H ₂ C-	C-3
44,1	-				
44,6	-	C-9			
57,4	-	C-5	54,3	-	C-5
72,7	-		74,1	-	
77,0	-		80,0	>C<	
			106,2	-H ₂ C-	
109,5	-	C-15	109,4	-	C-15
122,4	>C<		121,8	>C<	
140,5	-	C-16	140,9	-	C-16
149,3	>C<		148,6	>C<	
			153,4	>C<	
170,4	>C<		170,5	>C<	

QUADRO 8 – ASSINALAMENTOS DE RMN ¹³C E DEPT-135 DAS SUBFRAÇÕES DE FHP, P-21 E P-95, RESPECTIVAMENTE, DESTACANDO-SE A QUAL CARBONO DO 6 α -ACETOXIVOUACAPANO CADA DESLOCAMENTO PERTENCE (ARIAGA *et al*, 2000). -H₂C- = carbono secundário; >C< = carbono quaternário.

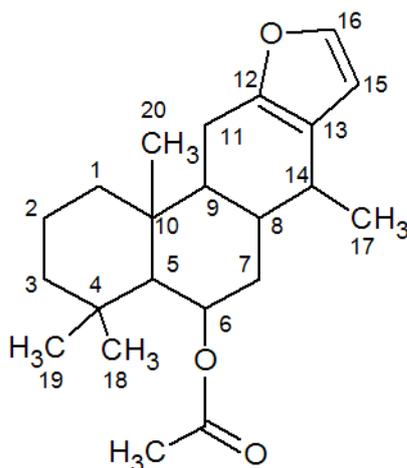


FIGURA 35 – ESTRUTURA DO TERPENO 6 α -ACETOXIVOUCAPANO. FONTE: adaptado ARIAGA (2000).

A presença do 6 α -acetoxivouacapano na P-21 também é sugerida de acordo com as massas encontradas por ESI-MS (FIGURA 36). O íon observado apareceu com a m/z 351 $[M+Li]^+$, e quando fragmentado gerou como principais íons m/z 291 $[M-AcOH+Li]^+$ e m/z 67 $[AcOH+Li]^+$, confirmando assim sua estrutura.

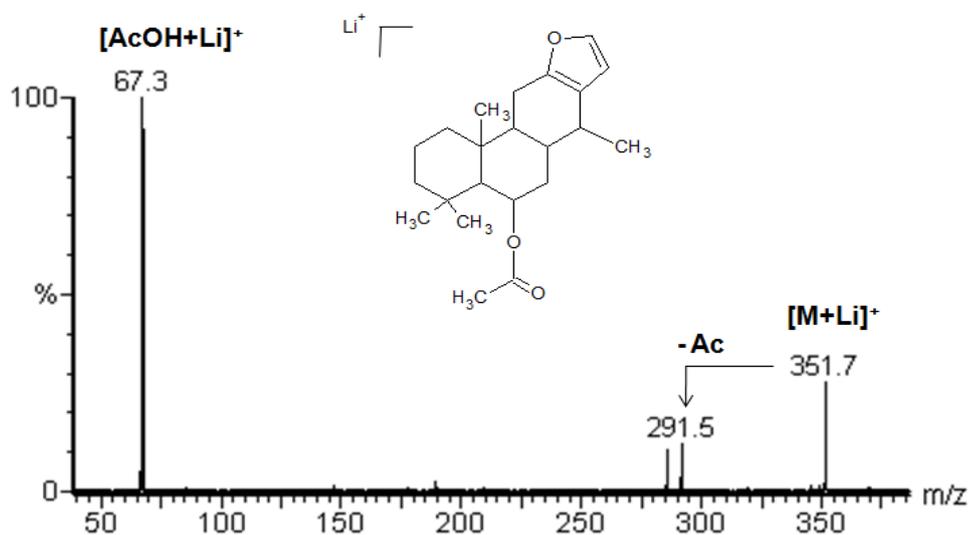


FIGURA 36 – ESPECTRO DE ESI-MS² DO ÍON m/z 351, DA SUBFRAÇÃO P-21.

Em relação à P-95, foi obtido um íon de m/z 409 $[M+Li]^+$, consistente com o 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano. Seu espectro de fragmentação (FIGURA 37) confirmou a presença de dois grupos acetoxi através da formação dos íons de m/z 349, com

perde de 60 unidades de massa seguido pelo íon 289, que também sofreu uma perda de 60 unidades de massa em relação ao m/z 349. Durante o processo de fragmentação, ocorre a transferência de um H^+ para o grupo acetato, formando o ácido acético (AcOH) que pode ser observado, com aduto de Li, no fragmento de m/z 67. Como resultado da transferência de H^+ , ocorre a formação de uma dupla ligação entre o carbono que está perdendo o acetil e um de seus vizinhos.

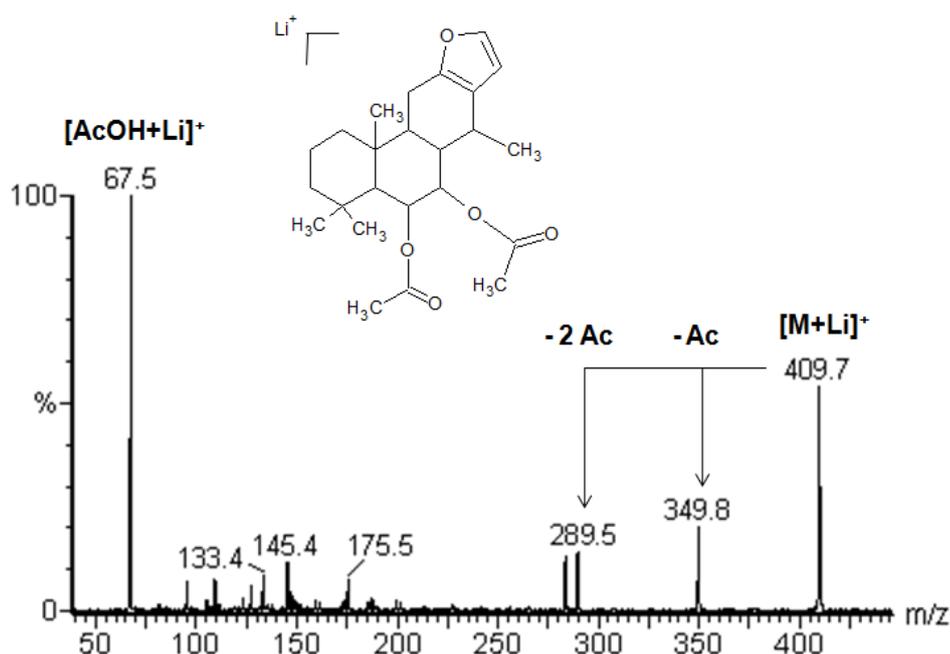


FIGURA 37 – ESPECTRO DE ESI-MS² DO ÍON m/z 409, DA SUBFRAÇÃO P-95.

6.4 EFEITO DA FME SOBRE QUADRO DE SEPSE INDUZIDO

Para a realização deste experimento, foi escolhida a fração MeOH:H₂O de *P. emarginatus*, por se tratar de um fração mais purificada contendo o D-pinitol, caracterizado pela primeira vez nesta espécie, e devido às propriedades já descritas para este composto (item 6.2.1). De acordo com a Figura 38, são observados diferentes perfis de letalidade entre os grupos de animais submetidos aos diversos tratamentos (QUADRO 3).

Nenhuma morte foi observada no grupo dos animais falso-operados (FO), o que indica que só a realização de incisão seguida de sutura abdominal não causou a

morte dos camundongos. E, inversamente, o grupo OP (operados e tratados com o veículo – H₂O:EtOH 95:5 v/v), apresentaram sinais de sepse severa, como redução da mobilidade, apatia, conjuntivite, diarreia, piloereção e secreção nasal. A mortalidade destes animais correspondeu a 100% nas primeiras 84 horas (3,5 dias) após a indução da sepse por CLP. Assim, os grupos FO e OP resultaram nas reações esperadas, comprovando que é o procedimento de CLP que causa o desenvolvimento do quadro de sepse, e, conseqüente letalidade nos camundongos.

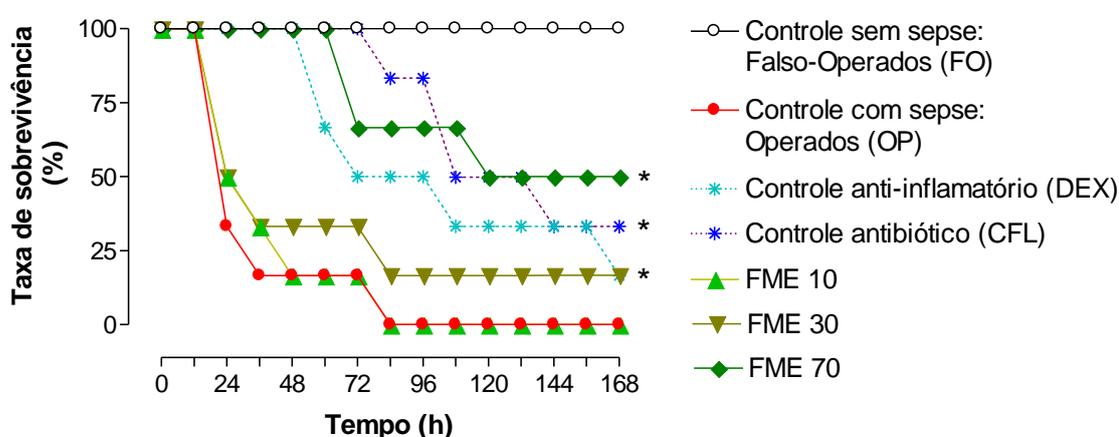


FIGURA 38. EFEITOS DA FME SOBRE A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS EM SEPSE. (A) Os animais foram randomicamente divididos em sete grupos. Todos os grupos, exceto o grupo Falso-operado, foram submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) para indução da sepse. O veículo (água + etanol 5%), a fração nas doses de 10, 30 e 70 mg/kg foram administrados pela via oral (na água de beber) sete dias antes e depois da CLP. Os controles positivos dexametasona 0,5 mg/kg e os antibióticos (clindamicina + ceftriaxona 100 mg/kg) foram administrados pela via subcutânea uma vez ao dia, durante o mesmo período de tratamento dos demais grupos. (B) Médias da letalidade do experimento representado no gráfico A. A taxa de sobrevivência dos camundongos foi avaliada a cada 12 horas durante os 7 dias (ou 168 horas) após a CLP. N= 6 a 8; p<0,05 em comparação ao grupo veículo.

Ambos os controles antiinflamatório (dexametasona 0,5 mg/kg) e antibiótico (ceftriaxona + clindamicina, ambos 100 mg/kg) retardaram o início da mortalidade dos animais com sepse e, resultaram na sobrevivência de 16,7 e 33,3 %, respectivamente, ao final do período de observação.

O tratamento com a FME (Fração MeOH:H₂O de *Pterodon emarginatus*) na dose de 10 mg/kg não apresentou efeito significativo em relação ao grupo controle OP, exceto nos primeiros 2 dias após a indução da sepse, quando apresentou menor mortalidade. Já nas doses de 30 e 70 mg/kg, FME foi eficaz na redução da

mortalidade, apresentando taxas de sobrevivência de 16,7% e 50%, respectivamente, ao final do período de observação (7º dia após a CLP). Desta forma, observa-se a relação de dose dependência da FME em relação aos diferentes tratamentos.

Considerando-se a composição química da FME (iem 6.2), sendo o D-pinitol seu composto majoritário, o resultado positivo desta fração na taxa de sobrevivência dos camundongos submetidos à CLP é justificável, uma vez que o mesmo já possui atividades biológicas descritas na literatura que podem ser correlacionadas ao tratamento da sepse.

Em modelos animais experimentais de inflamação, o D-pinitol demonstrou ser eficaz contra edema de pata induzido por carragenina (SINGH *et al*, 2001), e contra a inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina em modelo murino de asma (LEE *et al*, 2007). De acordo com Lee *et al* (2007), o estudo do efeito do D-pinitol na maturação e imunoestimulação de células dendríticas, revelou que o composto prejudica a secreção da IL-12 (interleucina pró-inflamatória) e não afeta a produção de IL-10 (interleucina anti-inflamatória) durante a maturação destas células induzidas por LPS.

Segundo com Sethi (2008), o D-pinitol é capaz de suprimir a ativação do fator de transcrição nuclear fator- κ B (NF- κ B). Este fator está presente no citoplasma de todas as células e a maioria das substâncias cancerígenas, agentes inflamatórios, e os promotores de tumor, incluindo cigarro, o éster de forbol, ácido ocadaico, e fator de necrose tumoral (TNF), ativam o NF- κ B. A inibição da ativação deste fator resulta na regulação de produtos de genes envolvidos na inflamação (p.ex. cicloxigenase-2, citocinas pró-inflamatórias), portanto explicando a habilidade do D-pinitol para suprimir as respostas inflamatórias celulares.

Sendo a sepse uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), envolvendo uma série de reações, como a liberação de mediadores e ativação de macrófagos e neutrófilos (BENJAMIM, 2001), estas evidências de atividades biológicas corroboram com os resultados encontrados neste trabalho.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

Através da técnica de GC-MS detectou-se a presença de alguns compostos já descritos na literatura para *Pterodon emarginatus* e *Pterodon polygalaeflorus*, como o sesquiterpeno cariofilleno, presente em ambos os extratos brutos, EBE (*P. emarginatus*) e EBP (*P. polygalaeflorus*), e também na FHP (fração hexânica de *P. polygalaeflorus*); o sesquiterpeno elemeno detectado na EBE e o diterpeno geranilgeraniol na FHE.

Além disso, para a fração FME (fração MeOH/H₂O de *P. emarginatus*) trimetilisililada foi observado apenas um composto majoritário que, posteriormente, com o auxílio de fracionamento cromatográfico, análises de RMN, ESI-MS e polarimetria, foi identificado como o D-pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol), derivado do *myo*-inositol descrito pela primeira vez para *P. emarginatus*. Na FME hidrolisada, reduzida e acetilada foi detectado arabinose, xilose, galactose e glucose, além de um inositol. Para a FMP foi observado xilose, glucose, sacarose, e um composto que apresentou o mesmo perfil de fragmentação do D-pinitol.

Através de análises de ESI-MS, foi possível a detecção de derivados do vouacapano, também já descritos na literatura. Para EBE, sugere-se a presença de 7 β -acetoxivouacapano, metil-7 β -acetoxi-6 α -hidroxivouacapan-17 β -oato e de mais dois derivados contendo grupos CH₃-O- em posições não definidas, ambas estruturas não foram relatadas anteriormente. Em *P. polygalaeflorus* (EBP), foram encontrados o 6 α , 7 β -dihroxivouacapano, o 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano e o 6 α , 7 β -diacetoxivouacapano.

As análises de RMN ¹³C das frações mais apolares, de ambas as espécies, amostras FHE, FBE, FHP e FBP revelaram a presença de diversos deslocamentos químicos compatíveis com a estrutura básica do vouacapano. Já os dados de RMN ¹³C da FME, não apresentaram os sinais característicos do vouacapano, e sim deslocamentos químicos de uma estrutura cíclica contendo grupos hidroxila, confirmando a presença do D-pinitol observado por GC-MS. Sinais de tal estrutura também foram encontrados para a fração polar de *P. polygalaeflorus* (FMP).

Em *P. polygalaeflorus*, duas estruturas derivadas do vouacapano foram isoladas por cromatografia em coluna e caracterizadas. Com m/z 351 [M+Li]⁺, foi

caracterizado o 6 α -acetoxivouacapano, e com m/z 409 [M+Li]⁺, o 6 α ,7 β -diacetoxivouacapano, os quais foram confirmados por análises de RMN ¹³C.

Como o D-pinitol é citado na literatura por apresentar atividade antiinflamatória, a FME, sua fração de origem, foi testada quanto ao seu efeito sobre o quadro de sepse induzido por CLP em camundongos, resultando em uma taxa de sobrevivência de 50% na maior concentração testada (70 mg/kg), evidenciando uma potencial aplicação para os frutos de *P. emarginatus*.

REFERÊNCIAS

- ARIAGA, A. M. C. et al. Further Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. vol. 11, n. 2, p. 187-190, 2000.
- AZEH, I. et al. Protein synthesis inhibiting clindamycin improves outcome in a mouse model of *Staphylococcus aureus* sepsis compared with the cell wall active ceftriaxone. **Critical Care Medicine**. vol. 30, n. 7, 2002.
- BATES, S. H.; JONES, R. B.; BAILEY, C. J. Insulin-like effect of pinitol. **British Journal of Pharmacology**. 130, p.1944-1948, 2000.
- BELINELO, V. J. et al. Synthesis of 6 α ,7 β -Dihydroxyvouacapan-17 β -oic Acid Derivatives. Part IV: Mannich Base Derivatives and its Activities on the Electrically Stimulated Guinea-pig Ileum Preparation. **Journal of Brazilian Chemical Society**. vol. 13, n. 6, p. 830-837, 2002.
- BENJAMIM, C. F. **Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse**. In: SIMPÓSIO: MEDICINA INTENSIVA – 3ª PARTE (Capítulo II). 34, p.18-26, jan/mar 2001.
- BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry**. 3 Ed. New York: VCH, 1990.
- BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.
- BLOCH, K. C. Doenças infecciosas. In: McPHEE, S. J.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença – Uma introdução à Medicina Clínica**. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p. 50-74.
- SIGMAALDRICH.COM – BSTFA: Product Specification. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/General_Information/bstfa.Par.0001.File.tmp/bstfa.pdf>. Acesso em: 23/01/11.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**. vol 4, p.854-865, october, 2005.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**. 64, p.127–133, 1999.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão preto. v. 33. P. 179-189, 2000.

CARVALHO, J. S. B. *et al.* Acúmulo de solutos orgânicos em genótipos de bananeira (*Musa spp.*) sob estresse salino *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, MG, vol. 2, n. 1, p. 1-52, 2006.

CHAUBAL, R. *et al.* Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol – a bioactive carbohydrate. **Chemistry & Biodiversity**. vol.2, 2005.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

COELHO, L. P. *et al.* Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth seeds. **Journal of Ethnopharmacology**. 98, p.109–116, 2005.

COELHO, M. G. P. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**. 77, p. 159–164, 2001.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. do. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.3, p. 272-278, jul/set. 2005.

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

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**. vol. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.

DEMUNER, A. J. *et al.* Structure and Plant Growth Regulatory Activity of New Diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 8, 1996.

DESOUZA, I. A.; RIBEIRO-DASILVA, G. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. **European Journal of Pharmacology**. vol. 363, p.189–195, 1998.

DUARTE, I. D. G. *et al.* Evidence of the involvement of biogenic amines the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**. 55, p.13-18, 1996.

DUTRA, R.C. *et al.* Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, 19(2A). p. 429-435, abr./jun. 2009.

EUZÉBIO, F. P. G. *et al.* Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oicacid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**. 37, p. 96–100, 2009.

EVANGELISTA, G. L. *et al.* Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**. 109, p. 515–522, 2007.

FALCÃO, H. de S. *et al.* Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(4), p.381-391, out./dez. 2005.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000. p.163-179.

FASCIO, M. *et al.* Diterpenoids furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**. vol. 15, p. 201-203, 1976.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**. vol. 46, n. 3, jul/set 2000.

GOBBO Neto, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**. vol. 30. n. 2. São Paulo. mar/abr 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08/01/11.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. Legumes: importância e limitações a uma maior utilização. **Plant Physiol**. 131, p. 872-877, 2003.

GREENWOOD, M. *et al.* D-pinitol augments whole body creatine retention in man. **Journal of Exercise Physiology**. vol. 4, n. 4, nov. 2001.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CON) and Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of cyclitols: tentative rules. **European Journal of Biochemistry**. vol. 5, n. 1, p.1-12, 1968.

JAIN, R. *et al.* Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of *Tamarindus indica* Linn. **Journal of Natural Medicines**. 61, p. 355-356, 2007.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KATZ, N. *et al.* Atividade quimioprolifática na esquistossomose mansoni de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 35 (2), p. 183-191, mar./abr. 1993.

KOROKOLVAS, A. **Análise farmacêutica**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**. 70, p. 151–159, 2000.

LEE, J. S. *et al.* D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. **International Immunopharmacology**. 7, p. 791–804, 2007.

LEE, J. S. *et al.* D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. **FEBS Letters**. vol. 581, p. 57–64, 2007.

LOEWUS, F. A.; MURTHY P. P. N. Review: *myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**. 150, p.1–19, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4ª Ed. Vol. 02. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2ª Ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

MAHAJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New Diterpenoids from *Pterodon ernarginatus* Vog. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*. p. 520-525, 1973.

MARQUES, D. D. *et al.* Isoflavonoids and Triterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. vol. 9, n. 3, p. 295-301, 1998.

MELO, J. G. de. **Controle de qualidade e prioridades de conservação de plantas medicinais comercializadas no Brasil**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F. S. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology Research**. 103, p.111–117, 2008.

NIERO, R. *et al.* Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003, p.11- 53.

NGUYEN, A.; LAMANT, A. Pinitol and *myo*-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. **Phytochemistry**. vol 27, n. 11, p. 3423-3427, 1988.

OMENA, M. C. de. Larvicidal Diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. vol. 6, n. 2, p. 216-222, 2006.

PAIVA, E. A. S. e *et al.* Occurrence and structure of extrafloral nectaries in *Pterodon pubescens* Benth. and *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 219-224, fev. 2001.

PIMENTA, A. T. A *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeiflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16(4): p.501-505, out./dez. 2006.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam. v.39. p. 603-613, 2001.

REPKA, J. C. D. **Efeitos da reação inflamatória induzida pela endotoxina de *Escherichia coli* na cicatrização colônica em ratos wistar**. 120 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SABINO, K.C.C. *et al.* *In vitro* and *in vivo* toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. **Toxicology Letters**. nº 108, p. 27-35, 1999.

SABINO, K.C.C. *et al.* Successful Treatment of Collagen-induced Arthritis in Mice with a Hydroalcohol Extract of Seeds of *Pterodon pubescens*. **Phytotherapy Research**. 13, p. 613–615, 1999.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., & IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. US: CRC Press, 2008. v. 99, p. 255–276.

SETHI, G *et al.* Pinitol targets nuclear factor- κ B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**. 7, p. 1604-1614, 2008.

SHU, Y. -Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**. Columbus. v.161. p. 1053-1071, 1998.

SILVA, M. C. C. *et al.* Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 55, p. 135-141, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de Ricardo Bicca de Aencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2004.

SIMONETTI, M. P. B.; BATISTA, R. A.; FERREIRA, F. M. C. Estereoisomeria: A Interface da Tecnologia Industrial de Medicamentos e da Racionalização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 48, n. 5, p. 390-399, set/ out 1998.

SINGH, R. K. *et al.* Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. **Fitoterapia**. 72, p. 168-170, 2001.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipds. **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da Flora Brasileira**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SPINDOLA, H.M. *et al.* Identificação de princípios ativos envolvidos na atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antiproliferativa do óleo de sementes de ***Pterodon pubescens* Benth. (leguminosae-Papilonoidea)**. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, 2002, Poços de Caldas. Disponível em < <http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0172-1.pdf>>. Acesso em: 08/11/2011.

SPINDOLA, H.M. *et al.* Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective in vitro Anticancer Activity for Prostate Cell Line. **Journal of Brazilian Chemical Society**. vol. 20, No. 3, p.569-575, 2009.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1969.

SWARTZ, M. E. **Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction**. Separation Science Redefined, may 2005. Disponível em: <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc/242005/164646/article.pdf>>. Acesso em: 08/01/2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução Eliane Romanato Santarém *et al.* 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEIXEIRA, D. F. **Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (Urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira branca) em *Aedes aegypti***. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

TOLEDO, C. E. M. Antimicrobial and cytotoxicactivities of medicinal plants of the Brazilian cerrado; using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**. Accepted Manuscript, date: 7/10/2010.

VAN WYK, B-E.; ALBRECHT, C. A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 119, p. 620–629, 2008.

VERDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, jan./dez. 2006.

VIEGAS, C. Jr; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.

VIEIRA, C. R. *et al.* Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth seed oil and its active principle on human melanoma cells. **Phytomedicine**. n.15, p.528–532, 2008.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. Vol.99. Chromatographic Science Series, 2008

WOJCIECHOWSKI, M. F.; MAHN, J.; JONES, B. Fabaceae: legumes. Versão de 14/06/2006 em The Tree of Life Web Project. Disponível em: <<http://tolweb.org/Fabaceae/21093>>. Acesso em: 08/01/2011.

YARIWAKE, J. H.; PEREIRA, C. A. M.; McCULLAGH, M. **Análise de extratos de Passiflora por UPLC (cromatografia líquida de ultra-alta pressão)**. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0242-1.pdf>>. Acesso em: 08/01/2011.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 430

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

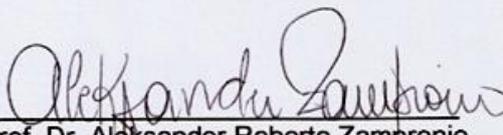
PROCESSO: 23075.121046/2010-73

APROVADO: 02/03/2010 – R.O. 01/2010

TÍTULO: Desenvolvimento de técnicas de análise estrutural e ensaios farmacológicos de produtos naturais obtidos de plantas medicinais utilizadas no Brasil

AUTORES: Marcello Iacomini, Yanna Dantas Rattmann, Lauro Mera de Souza, Guilherme Lanzi Sassaki, Lucimara Mach C. Cordeiro, Thales Ricardo Cipriani, Valérie Schini Kerth, Maria Consuelo A. Marques, José Eduardo da Silva Santos, Adair Roberto Soares dos Santos

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA