



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

**ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS ESPECIAIS DE CAULE E  
FOLHAS DE *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) E  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Leice Milla Ribeiro de Novais

**Mestrado em Química, Área de Concentração Química Orgânica**

CUIABÁ  
MATO GROSSO – BRASIL  
2017



**LEICE MILLA RIBEIRO DE NOVAIS**

**ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS ESPECIAIS DE CAULE E  
FOLHAS DE *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) E  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração Química Orgânica.

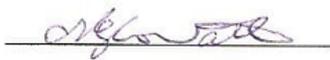
CUIABÁ  
MATO GROSSO – BRASIL  
2017

**LEICE MILLA RIBEIRO DE NOVAIS**

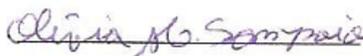
**ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS ESPECIAIS DE CAULE E  
FOLHAS DE *Dulacia eglei* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) E  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

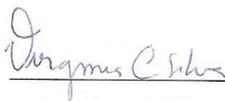
APROVADA: 22 de fevereiro de 2017



Prof. Dr. Mario Geraldo de Carvalho  
(Banca examinadora)



Profa. Dra. Olívia Moreira Sampaio  
(Banca examinadora)



Profa. Dra. Virginia Claudia da Silva  
(Orientadora)

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

N935e Novais, Leice Milla Ribeiro de.  
ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS ESPECIAIS DE CAULE E  
FOLHAS DE *Dulacia egléri* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) E ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA / Leice Milla Ribeiro de Novais. -- 2017  
xviii, 100 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Virginia Claudia da Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso,  
Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em  
Química, Cuiabá, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. *Dulacia egléri*. 2. Olacaceae. 3. *eglerisina*. 4. 3-metoxi-6,7-  
metilenodioxo-4'-hidroxiflavona. 5. Atividade antifúngica. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

*Dedico este trabalho a minha família e amigos, em especial a minha mãe Neide Ribeiro de Novais por todo amor e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus pelas infinitas bênçãos concedidas.

Á minha família, minha mãe Neide R. de Novais, meu padrasto Sebastião R. de Oliveira e á minha irmã Isabela C. O. Novais por todo amor para comigo.

A minha família cuiabana Thiago Neves, Marlene Neves e Valdecir Neves e todos os demais membros por terem me acolhido e incentivado todos esses anos, sem vocês eu não teria conseguido.

Á minha orientadora que me aguenta todos esses anos, por todos os seus ensinamentos acadêmicos e de vida.

Aos professores Drs. Mario Geraldo e Raimundo Braz pela contribuição neste trabalho.

As professoras Tereza A. R. Nascimento, Ivana M. P. Violante e Olívia Sampaio, ao professores Evandro Dall'Oglio, Paulo Teixeira e Leonardo Vasconcelos e aos técnicos Washington Ferreira e Carlos Parizzoto, obrigado pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Luiz Ferreira e Cauane Olivo por todos os momentos, os quais foram além da bancada, desejo á vocês todo o sucesso do mundo.

Aos meus colegas de trabalho, muito obrigada pelos momentos de descontração e pela convivência, em especial, aos amigos: Carlos Henrique, Eduardo, Letícia, Helder, Tamires, Jhuly, Flora, Ana Paula, Mariele, Francyne, Thiara, Kheytianny, Cledson, Isabella, Ana Fábria, Lorena, Wellington, Angélica, Joycy, Gabriele, Renan e Bianca.

Aos amigos Isabella, Jéssica, Camila e Jordânya.

Á todos os professores e técnicos do Departamento de Química, que contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas do mestrado e da graduação.

Á todos (a), que de certa forma contribuíram com este trabalho.

Ao INAU, CNPq, FAPEMAT e CAPES pelo apoio financeiro.

*“A oportunidade favorece a mente bem preparada.”*

*(Louis Pasteur)*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CC</b>	Coluna Clássica
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CCDP</b>	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>COSY</b>	Correlated spectroscopy
<b><i>d</i></b>	Dupleto
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b><i>dd</i></b>	Duplo dupleto
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>EBHEC</b>	Extrato Bruto Hidroetanólico do Caule
<b>EBHEF</b>	Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas
<b>EtOH</b>	Etanol
<b><i>h</i></b>	Altura da coluna
<b>Hex</b>	Hexano
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>Hz</b>	Hertz
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento

<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>PA</b>	Pró-Análise
<b>P&amp;D</b>	Pesquisa e Desenvolvimento
<b>RAC</b>	Resíduo Acetato de etila do Caule
<b>RAF</b>	Resíduo Acetato de etila das Folhas
<b>RDC</b>	Resíduo Diclorometano do Caule
<b>RDF</b>	Resíduo Diclorometano das Folhas
<b>RHC</b>	Resíduo Hexano do Caule
<b>RHF</b>	Resíduo Hexano das Folhas
<b>RHMC</b>	Resíduo Hidrometanólico do Caule
<b>RHMF</b>	Resíduo Hidrometanólico das Folhas
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b><i>s</i></b>	Simpleto
<b><i>s/</i></b>	Simpleto largo
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>UFMT</b>	Universidade Federal de Mato Grosso
<b>UV</b>	Ultra-Violeta
<b>δ</b>	Deslocamento químico
<b>Φ</b>	Diâmetro da coluna
<b>λ</b>	Comprimento de onda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do taxol isolado de <i>Taxus brevifolia</i> Nutt. (Taxaceae).....	2
<b>Figura 2</b> - Metabólitos com funções terapêuticas comprovadas e relatadas na literatura.....	3
<b>Figura 3</b> - Distribuição geográfica da família Olacaceae no mundo.....	4
<b>Figura 4</b> - Distribuição geográfica do gênero <i>Dulacia</i> Vell. no mundo.....	13
<b>Figura 5</b> - Distribuição geográfica de <i>Dulacia egleri</i> .....	16
<b>Figura 6</b> - A espécie <i>Dulacia egleri</i> .....	17
<b>Figura 7</b> - Exemplos de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies e que apresentam potencial atividade antifúngica.....	19
<b>Figura 8</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.....	46
<b>Figura 9</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 2,00-4,00 ppm.....	46
<b>Figura 10</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,96-7,85 ppm.....	47
<b>Figura 11</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.....	47
<b>Figura 12</b> - Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{C}}$ 20-60 ppm.....	48
<b>Figura 13</b> - Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{C}}$ 105-180 ppm.....	48
<b>Figura 14</b> - Espectro de RMN NOESY (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.....	49
<b>Figura 15</b> - Expansão do espectro de RMN NOESY (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 2,2-4,0 ppm.....	49
<b>Figura 16</b> - Expansão do espectro de RMN NOESY (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,8-8,0 ppm.....	50
<b>Figura 17</b> - Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.....	50
<b>Figura 18</b> - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 2,1-4,5 e $\delta_{\text{C}}$ 20-65 ppm.....	51
<b>Figura 19</b> - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre $\delta_{\text{H}}$ 4,6-8,2 e $\delta_{\text{C}}$ 105-135 ppm.....	51

<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de I.....	52
<b>Figura 21</b> - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de I, entre $\delta_H$ 2,1-4,1 e $\delta_C$ 105-160 ppm e principais correlações observadas para I.....	53
<b>Figura 22</b> - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de I, entre $\delta_H$ 5,0-7,3 e $\delta_C$ 20-190 ppm e principais correlações observadas para I.....	54
<b>Figura 23</b> - Expansão do espectro de RMN (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de I, entre $\delta_H$ 7,62-7,96 e $\delta_C$ 110-180 ppm e principais correlações observadas para I.....	55
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II.....	58
<b>Figura 25</b> - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 3,70-4,80 ppm.....	58
<b>Figura 26</b> - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 5,9-8,4 ppm.....	59
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II.....	59
<b>Figura 28</b> - Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_C$ 60-165 ppm.....	60
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II.....	60
<b>Figura 30</b> - Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 3,60-4,45 e $\delta_H$ 3,6-4,4 ppm.....	61
<b>Figura 31</b> - Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 4,3-6,1 e $\delta_H$ 4,0-6,2 ppm.....	61
<b>Figura 32</b> - Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 8,09-8,33 e $\delta_H$ 7,8-8,4 ppm.....	62
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II.....	62
<b>Figura 34</b> - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de II, entre $\delta_H$ 3,80-6,10 e $\delta_C$ 70-140 ppm.....	63
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de III.....	67
<b>Figura 36</b> - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de III, entre $\delta_H$ 4,0-10,5 ppm.....	67

<b>Figura 37</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,1-8,0 ppm.....	68
<b>Figura 38</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III.....	68
<b>Figura 39</b> – Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{C}}$ 60-175 ppm.....	69
<b>Figura 40</b> – Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{C}}$ 151,0-162,0 ppm.....	69
<b>Figura 41</b> – Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III.....	70
<b>Figura 42</b> – Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,7-8,1 e $\delta_{\text{H}}$ 6,4-8,4 ppm.....	70
<b>Figura 43</b> – Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III.....	71
<b>Figura 44</b> - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 3,8-8,0 e $\delta_{\text{C}}$ 60-140 ppm.....	71
<b>Figura 45</b> – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III.....	72
<b>Figura 46</b> - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 3,7-6,3 e $\delta_{\text{C}}$ 125-165 ppm e, principais correlações observadas para III.....	73
<b>Figura 47</b> - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,55-7,15 e $\delta_{\text{C}}$ 100-180 ppm e, principais correlações observadas para III.....	74
<b>Figura 48</b> - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre $\delta_{\text{H}}$ 7,8-10,2 e $\delta_{\text{C}}$ 110-170 ppm e, principais correlações observadas para III.....	75
<b>Figura 49</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV.....	77
<b>Figura 50</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV, entre $\delta_{\text{H}}$ 6,70-7,95 ppm.....	78
<b>Figura 51</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV.....	78
<b>Figura 52</b> – Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV, entre $\delta_{\text{C}}$ 114-174 ppm.....	78
<b>Figura 53</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V.....	81
<b>Figura 54</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{H}}$ 3,70-4,40 ppm.....	82

<b>Figura 55</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{H}}$ 7,90-8,30 ppm.....	82
<b>Figura 56</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V.....	83
<b>Figura 57</b> – Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{C}}$ 60-155 ppm.....	83
<b>Figura 58</b> – Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V.....	84
<b>Figura 59</b> - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{H}}$ 3,6-8,2 e $\delta_{\text{C}}$ 60-150 ppm.....	84
<b>Figura 60</b> – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V.....	85
<b>Figura 61</b> - Expansão do espectro HMBC (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{H}}$ 3,80-4,35 e $\delta_{\text{C}}$ 55-90 ppm e principais correlações observadas para V.....	86
<b>Figura 62</b> - Expansão do mapa de contornos HMBC (500/125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre $\delta_{\text{H}}$ 5,9-8,1 e $\delta_{\text{C}}$ 70-160 ppm e principais correlações observadas para V.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies e que apresentam potencial atividade antifúngica.....	19
<b>Tabela 2</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (I).....	45
<b>Tabela 3</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (II) e comparação com dados da literatura.....	57
<b>Tabela 4</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da substância (III).....	66
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (IV) e comparação com dados da literatura.....	77
<b>Tabela 6</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) da substância (V) e comparação com dados da literatura.....	81
<b>Tabela 7</b> – Avaliação da atividade antifúngica através da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos e resíduos obtidos da espécie <i>Dulacia egleri</i> .....	89

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b> - Fracionamento cromatográfico do EBHEC.....	27
<b>Fluxograma 2</b> – Fracionamento cromatográfico do RHC.....	28
<b>Fluxograma 3</b> – Fracionamento cromatográfico do RDC.....	30
<b>Fluxograma 4</b> - Fracionamento cromatográfico do EBHEF.....	31
<b>Fluxograma 5</b> – Fracionamento cromatográfico do RDF.....	33
<b>Fluxograma 6</b> – Fracionamento cromatográfico do RAF.....	36

## RESUMO

NOVAIS, L. M. R., Universidade Federal de Mato Grosso, Fevereiro de 2017. **ESTUDO QUÍMICO DOS METABÓLITOS ESPECIAIS DE CAULE E FOLHAS DE *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.** Orientadora: Virginia Claudia da Silva.

A espécie *Dulacia egleri* pertence ao gênero *Dulacia*, um dos representantes da família Olacaceae, com cerca de 13 espécies encontradas somente na América do Sul. A espécie em estudo é endêmica do Brasil, sendo conhecida popularmente como “pau-de-rato” e possui como principal característica o forte odor de cebola podre provindo de suas folhas. Este trabalho descreve o isolamento e identificação dos metabólitos especiais de *D. egleri*, além de verificar sua atividade contra cepas fúngicas. O sesquiterpeno aromático egerisina (I) e o nucleosídeo ribavirina (II) foram isolados do caule. Das folhas foram isolados os nucleosídeos ribavirina (II) e adenosina (V), o flavonoide 3-metoxi-6,7-metilenodioxo-4'-hidroxiflavona (III) e o ácido *p*-hidroxibenzóico (IV). Tratando-se da avaliação do potencial antifúngico o resíduo hexano do caule (RHC) mostrou-se ativo contra todas as cepas fúngicas testadas (CIM: 31,5 a 125 µg/mL). Os resíduos diclorometano do caule (RDC) e acetato de etila do caule (RAC) apresentaram significativa inibição contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* com CIM variando entre 62,5 a 250 µg/mL e 31,5 a 125 µg/mL, respectivamente. O resíduo acetato de etila das folhas (RAF) demonstrou-se ativo contra *C. albicans* (CIM: 62,5 µg/mL). Os resíduos diclorometano das folhas (RDF) e hidrometanólico das folhas (RHMF) mostraram-se moderadamente ativos contra todas as cepas fúngicas testadas com CIM variando entre 62,5 a 500 µg/mL. Este estudo contribuiu significativamente para o conhecimento químico e biológico da espécie em estudo.

**Palavras-chave:** *Dulacia egleri*, Olacaceae, egerisina, 3-metoxi-6,7-metilenodioxo-4'-hidroxiflavona, atividade antifúngica.

## ABSTRACT

NOVAIS, L. M. R., Universidade Federal de Mato Grosso, February, 2017. **CHEMICAL STUDY OF SPECIAL METABOLITES OF CAULE AND LEAVES FROM *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer (OLACACEAE) AND ANTIFUNGAL ACTIVITY.** Adviser: Virginia Claudia da Silva

The species *Dulacia egleri* belongs to the genus *Dulacia*, one of the representatives of the family Olacaceae, with about 13 species found only in South America. The species under study is endemic to Brazil, being popularly known as "rat-dick" and has as its main characteristic the strong odor of rotten onion coming from its leaves. This work describes the isolation and identification of the special metabolites of *D. egleri*, as well as its activity against fungal strains. The aromatic sesquiterpene eglersine (**I**) and the nucleoside ribavirin (**II**) were isolated from the stem. The nucleosides ribavirin (**II**) and adenosine (**V**), the flavonoid 3-methoxy-6,7-methylenedioxy-4'-hydroxyflavone (**III**) and the *p*-hydroxybenzoic acid (**IV**) were isolated from the leaves. In the evaluation of the antifungal potential the stem hexane residue (**RHC**) showed to be active against all the fungal strains tested (MIC: 31.5 to 125 µg/mL). The residues dichloromethane from the stem (**RDC**) and ethyl acetate from the stem (**RAC**) showed significant inhibition against *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. neoformans* with MIC ranging from 62.5 to 250 µg/mL and 31,5 to 125 µg/mL, respectively. The leaves ethyl acetate residue (**RAF**) was shown to be active against *C. albicans* (MIC: 62.5 µg/mL). The residues dichloromethane from the leaves (**RDF**) and hydromethanolic from the leaves (**RHMF**) were moderately active against all fungal strains tested with MIC ranging from 62.5 to 500 µg/mL. This study contributed significantly to the chemical and biological knowledge of the species under study.

**Keywords:** *Dulacia egleri*, Olacaceae, eglersine, 3-methoxy-6,7-methylenedioxy-4'-hydroxyflavone, antifungal activity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Generalidades da família Olacaceae .....	4
2.2 O gênero <i>Dulacia</i> Vell. ....	13
2.2.1 Caracterização do gênero <i>Dulacia</i> Vell. ....	13
2.2.2 Constituintes químicos do gênero <i>Dulacia</i> Vell. ....	14
2.2.3 Constituintes químicos do gênero <i>Liriosma</i> Poepp. ....	14
2.3 A espécie <i>Dulacia egleri</i> (Rangel) Sleumer .....	16
2.4 Atividade antifúngica .....	17
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
4.1 Objetivo geral .....	23
4.2 Objetivos específicos .....	23
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
5.1 Reagentes e equipamentos .....	24
5.2 Material botânico de <i>Dulacia egleri</i> .....	25
5.2.1 Secagem e pulverização do caule e folhas de <i>Dulacia egleri</i> ....	25
5.2.2 Obtenção dos extratos bruto do caule e folhas de <i>Dulacia egleri</i> .....	26
5.2.3 Fracionamento cromatográfico do Extrato Bruto Hidroetanólico do Caule (EBHEC).....	26
5.2.3.1 Partição líquido-líquido do EBHEC.....	26
5.2.3.2 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Hexano do Caule (RHC) .....	27
5.2.3.2.1 Fracionamento do grupo HC5 .....	27
5.2.3.3 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Diclorometano do Caule (RDC).....	29
5.2.3.3.1 Fracionamento do grupo DC7 .....	29
5.2.4 Fracionamento cromatográfico do Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas (EBHEF) .....	31

5.2.4.1 Partição líquido-líquido do EBHEF .....	31
5.2.4.2 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Diclorometano das Folhas (RDF) .....	32
5.2.4.2.1 Fracionamento do grupo DF4.....	32
5.2.4.3 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Acetato de etila das Folhas (RAF).....	33
5.2.4.3.1 Fracionamento do grupo AF4.....	34
5.2.4.3.2 Fracionamento do grupo AF6.....	34
5.2.4.3.3 Fracionamento do grupo AF7 .....	35
5.3 Ensaio Biológicos - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> .....	38
5.3.1 Linhagens microbianas .....	38
5.3.2 Meios de cultura.....	38
5.3.3 Manutenção dos microrganismos indicadores .....	38
5.3.4 Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes .....	38
5.3.5 Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
5.3.6 Método de diluição em placas utilizando resazurina como revelador.....	41
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
6.1 Substâncias isoladas e identificadas do caule de <i>Dulacia eglei</i> .....	41
6.2 Substâncias isoladas e identificadas das folhas de <i>Dulacia eglei</i> ....	42
6.3 Identificação estrutural .....	42
6.3.1 Identificação da substância I.....	42
6.3.2 Identificação da substância II.....	56
6.3.3 Identificação da substância III .....	64
6.3.4 Identificação da substância IV .....	76
6.3.5 Identificação da substância V .....	79
6.4 Avaliação do ensaio da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos e resíduos.....	88
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é ratificado como detentor da maior biodiversidade mundial, com ampla extensão territorial, multiplicidade geográfica e climática, sendo coberto pela maior floresta tropical do mundo, grandiosos rios e lagos e, habitado por diferentes tribos indígenas (MOSSRI, 2012).

Dispõe da flora mais rica com aproximadamente 56.000 espécies de plantas distribuídas nos seis principais domínios ecológicos (Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal), correspondendo a aproximadamente um terço de toda a flora mundial (GIULIETTI et al., 2005; KLEIN et al., 2009).

Entre os elementos que constituem essa biodiversidade estão às plantas medicinais, que são empregadas em comunidades tradicionais como remédios caseiros e são consideradas uma das mais antigas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos (FIRMO et al., 2011).

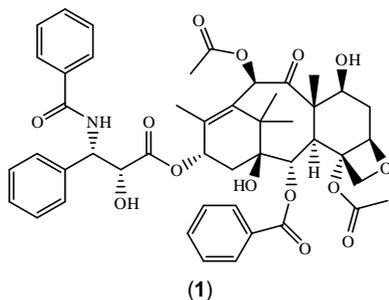
As plantas são as principais contribuintes nas pesquisas de produtos naturais, por conseguinte, ao longo dos anos muitas abordagens evoluíram para a taxonomia destas. Estas incluem classificação morfológica, anatômica e quimiotaxonômica (SINGH, 2016).

A ciência da quimiotaxonomia é empregada na classificação de plantas com base nos seus constituintes. A estrutura química dos metabolitos secundários e suas vias biossintéticas são frequentemente específicas e restritas a organismos taxonomicamente relacionados e, portanto, útil na classificação. Alguns dos principais grupos de classes de compostos incluem alcaloides, óleos voláteis, flavonoides e terpenóides (PUGIALLI et al., 1993; SINGH, 2016).

Além disso, as plantas medicinais têm grande relevância na medicina moderna, pois fornecem fármacos que dificilmente seriam obtidos via síntese química, sendo que os compostos obtidos destas podem ser levemente modificados, tornando-se mais eficazes e/ou menos tóxicos. Entretanto é necessária uma garantia de segurança através de

experimentação clínica demonstrando a eficácia destes medicamentos e, também em relação aos seus efeitos tóxicos, efeitos secundários, interações, contra indicações e mutagenicidade (TUROLLA et al., 2006; FIRMO et al., 2011).

Algumas substâncias providas de fontes naturais possuem estrutura química complexa, impossibilitando assim a sua obtenção sintética, portanto, sendo necessário o isolamento destas de forma natural para subsequente aplicação medicinal. Podemos citar como exemplo o taxol (1) (Figura 1, p. 2) [composto isolado da espécie *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae)], este possui ação anticâncer comprovada, dentre estas: ovário, mama, pulmão, cérebro, garganta e próstata. Apesar da aprovação para aplicação clínica, essa substância possui baixo rendimento quando isolado naturalmente, esse fator uniu pesquisadores do mundo inteiro com o intuito de colaborar com os estudos sintéticos dessa molécula (MACIEL et al., 2007).

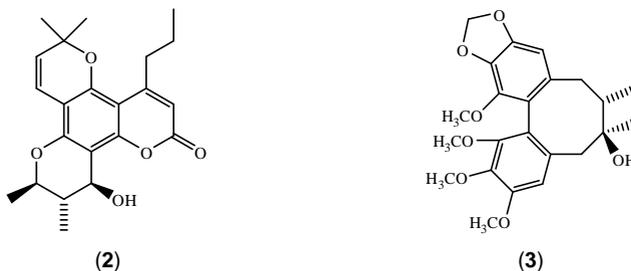


**Figura 1** - Estrutura química do taxol isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae).

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (MACIEL et al., 2007).

A pesquisa destes novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de fontes naturais contribui para a descoberta de diferentes classes de metabólitos bioativos, os quais são empregados no tratamento de diversas doenças, podendo-se citar como exemplos, o (+)-calanolideo A (2)

[cumarina isolada dos galhos de *Calophyllum teysmannii* (Clusiaceae)] que tem mostrado ser um agente ativo contra o vírus HIV-1 e a gomisina-A (3) [lignana isolada das sementes de *Schisandra chinensis* (Schisandraceae)] que apresenta ação hepatoprotetora (Figura 2, p. 3) (PINTO et al., 2002; DAVID et al., 2004).



**Figura 2** - Metabólitos com funções terapêuticas comprovadas e relatadas na literatura.

No mercado brasileiro de fitomedicamentos os investimentos em P&D são ainda germinais, estando restritos a um reduzido número de empresas e, possuindo como barreiras institucionais as normas e critérios para produção e comercialização destes. Além disso, é unanimidade entre os profissionais que atuam nesta linha de pesquisa que apesar de uma massa crítica de pesquisadores qualificados ainda necessita-se de um processo coordenado de todas as áreas envolvidas (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos sintéticos, farmacêuticos, médicos, etc.) (PINTO et al., 2002; KLEIN et al., 2009).

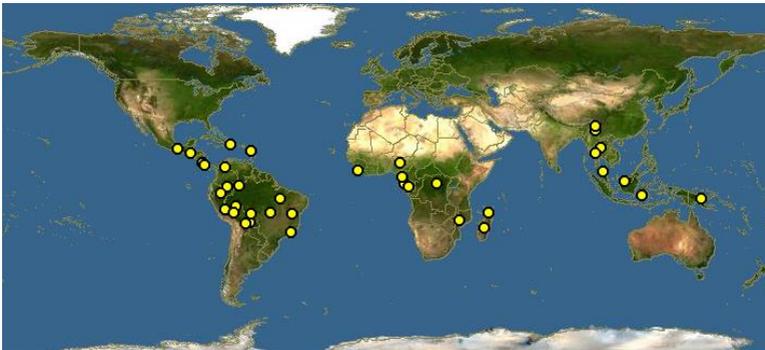
Atualmente, percebe-se um aumento no interesse governamental e profissional em associar o avanço tecnológico ao conhecimento popular e, ao desenvolvimento sustentável visando uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente e humanizada (FIRMO et al., 2011).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Generalidades da família Olacaceae

A família Olacaceae pertence à ordem das Santalales e compreende cerca de 27 gêneros e 180 espécies, distribuída nos trópicos, embora pode ser encontrada em regiões subtropicais. A região neotropical é considerada o centro de diversidade desta família, onde ocorre metade dos gêneros e espécies (Figura 3, p. 4) (RODRIGUES et al., 2002).

É um grupo que possui uma grande diversidade em sua morfologia vegetativa (principalmente das folhas) e reprodutiva, como a soldadura das pétalas, o tipo de ovário e a relação do número estames/pétalas. A ausência de uma uniformidade de caracteres dificulta a identificação das espécies, tornando-se um dos problemas para a sistemática do grupo (SPITZER et al., 1997; CABRAL et al., 1999).



**Figura 3** - Distribuição geográfica da família Olacaceae no mundo.

**Fonte:** <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Olacaceae>.

No Brasil ocorrem espontaneamente 13 gêneros de Olacaceae: *Aptandra* Miers, *Brachynema* Benth., *Cathedra* Miers, *Chanochiton* Benth., *Curupira* G. A. Black, *Douradoa* Sleumer, *Dulacia* Vell., *Heisteria* Jacq., *Minquartia* Aubl., *Olox* L., *Ptychopetalum* Benth., *Tetrastylidium* Engl., *Ximenia* L. e aproximadamente 53 espécies distribuídas em todas as

regiões, podendo ser encontradas desde arbustos, lianas/trepadeiras, incluindo árvores (CABRAL et al., 1999; ROSSI, 2017).

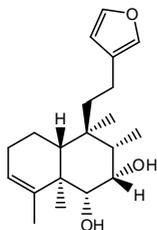
Estudos farmacológicos dos extratos de diversas espécies pertencentes à família Olacaceae apresentaram propriedades biológicas como: atividade antimicrobiana, analgésica, antiparasitária, antitumoral e citotóxica (OMER et al., 2003; LE et al., 2012; ADEOLUWA et al., 2014).

Diversos constituintes químicos concernentes a várias classes de metabólitos especiais já foram encontrados na família como: alcaloides, ácidos graxos, taninos, saponinas, compostos fenólicos, esteroides, flavonoides, triterpenos, sesquiterpenos e peptídeos cíclicos (EL-SEEDI et al., 2005; LE et al., 2012; NAIR et al., 2013; ADEOLUWA et al., 2014).

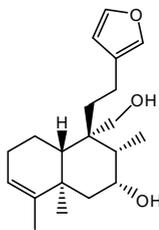
Na medicina popular algumas espécies desta família são utilizadas no tratamento de disenteria, diarreia, sarampo, malária, convulsão, reumatismo, vermífugo e antisséptico (OMER et al., 2003; LE et al., 2012; NAIR et al., 2013; ADEOLUWA et al., 2014).

Dentre os gêneros pertencentes a esta família apenas alguns possuem estudos químicos e biológicos publicados, podendo-se citar o gênero *Ptychopetalum* Benth., onde a espécie *Ptychopetalum olacoides* Benth. (conhecida popularmente como “Marapuama ou Muirapuama”) é utilizada pelos indígenas na região da Amazônia na forma de tônico no tratamento de doenças degenerativas crônicas do sistema nervoso central, como afrodisíaco e contra astenia e neurastenia (SILVA et al., 2004; MENDES et al., 2007).

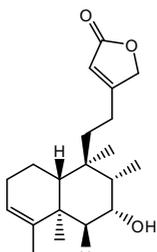
Investigações fitoquímicas do extrato metanólico das cascas de *Ptychopetalum olacoides* resultaram no isolamento de quatro diterpenos  $6\alpha,7\alpha$ -dihidroxianoneno (4),  $7\alpha,20$ -dihidroxianoneno (5),  $7\alpha$ -hidroxisolidagolactona I (6) e ptico- $6\alpha,7\alpha$ -diol (7). Os compostos (4) e (5) mostraram potencial para elevar a atividade do peptídeo NGF (Fator de crescimento neural) em células PC12, sugerindo assim a utilização destes no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças neurodegenerativas (TANG et al., 2009).



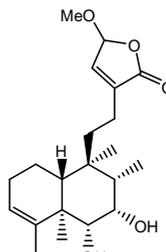
(4)



(5)

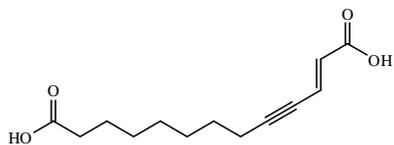


(6)



(7)

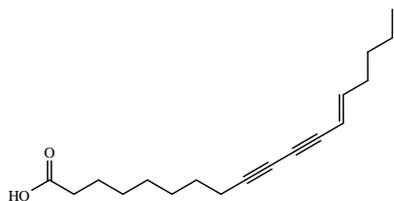
Avaliação fitoquímica das folhas da espécie *Anacolsa pervilleana* pertencente ao gênero *Anacolsa* Blume levaram a obtenção das substâncias anacolosina (**8**), ácido octadeca-9,11,13-trienoico (**9**), ácido (13*E*)-octadec-13-en-9,11-dienoico (**10**), ácido (13*E*)-octadec-13-en-11-inoico (**11**), lupenona (**12**) e β-amirina (**13**). Esta espécie é empregada popularmente no tratamento da esquistossomose, sífilis e para tratar fraquezas em geral. O extrato bruto acetato de etila das folhas desta espécie inibiu completamente o vírus Chikungunya induzindo efeitos citopáticos, sem qualquer resultado adverso. Tratando-se das substâncias isoladas lupenona (**12**) e β-amirina (**13**) estas demonstraram moderada, porém seletiva atividade antiviral, sem apresentar qualquer citotoxicidade (BOURJOT et al., 2012).



(8)



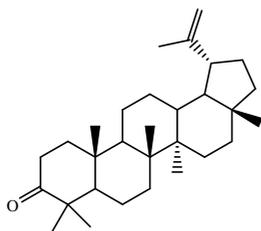
(9)



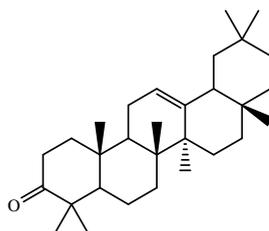
(10)



(11)



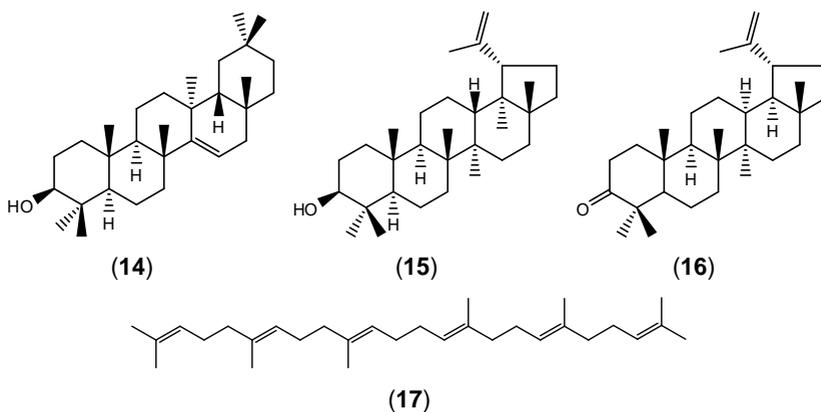
(12)



(13)

Investigação química do extrato diclorometânico das folhas da espécie *Minquartia guianensis* Aubl. alusivo ao gênero *Minquartia* Aubl.

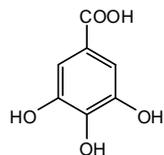
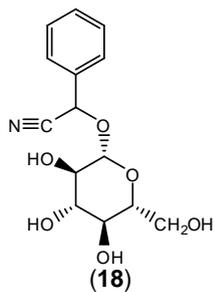
possibilitou o isolamento dos triterpenos taraxerol (**14**), lupeol (**15**), lupenona (**16**) e esqualeno (**17**). Algumas populações indígenas do Equador usam a infusão das cascas desta espécie no tratamento de infecções intestinais causadas por parasitas, contra dores musculares e irritações cutâneas. A literatura destaca estes triterpenos em diversas atividades biológicas, entre as quais sobressaem: cardioprotetora, gastroprotetora, anti-inflamatória, antitumoral, leishmanicida e anti-hiperglicêmica (CURSINO et al., 2009).



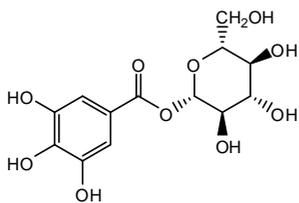
Outro gênero que se destaca dentro desta família é *Ximenia* L., no qual a espécie *Ximenia americana* L. é usada por curandeiros em Mali (África Ocidental) no tratamento de várias doenças infecciosas e inflamatórias, entre elas, infecção na garganta, amenorreia e como tônico (LE et al., 2012).

Pesquisas com o extrato hidroetanólico das folhas desta espécie possibilitaram o isolamento dos constituintes: sambunigrina (**18**), ácido gálico (**19**),  $\beta$ -glicogalino (**20**), 1,6-digaloil- $\beta$ -glicopiranosídeo (**21**), quercetina (**22**), quercitrina (**23**), avicularina (**24**), quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosídeo (**25**), quercetina-3-O-(6''-galoil)- $\beta$ -glicopiranosídeo (**26**) e canferol-3-O-(6''-galoil)- $\beta$ -glicopiranosídeo (**27**) (LE et al., 2012). A substância sambunigrina (**18**) possui toxicidade, provocando diarreia e vômito, portanto dependendo da quantidade deste composto na espécie

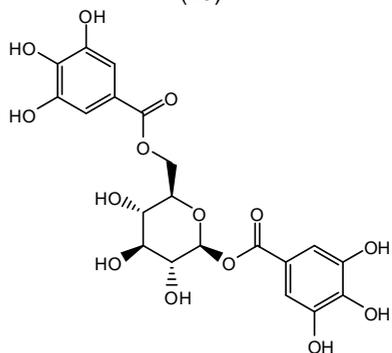
referida, o uso da mesma deve ser proibido na medicina tradicional (BOURJOT et al., 2012).



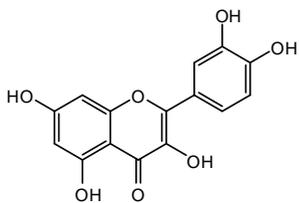
(19)



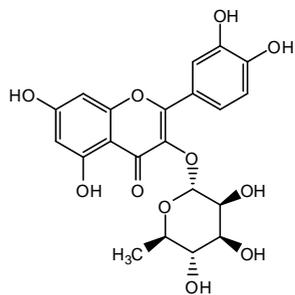
(20)



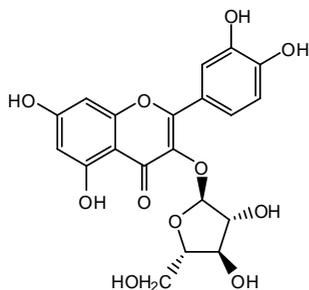
(21)



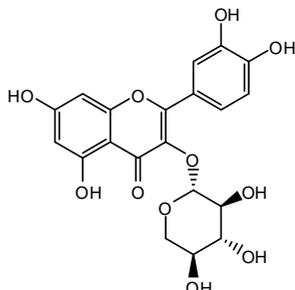
(22)



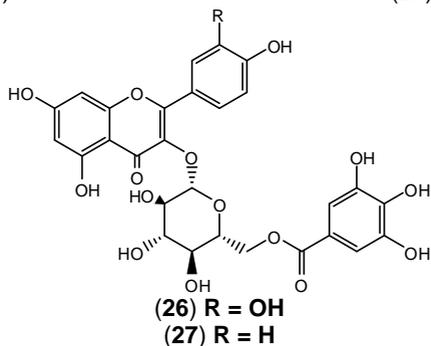
(23)



(24)

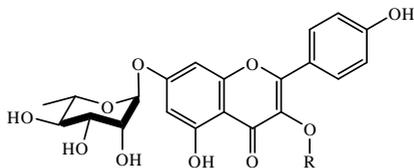


(25)



As folhas da espécie *Olox mannii* Oliv. pertencente ao gênero *Olox* L. são empregadas em diversos países na medicina tradicional para o tratamento de uma variedade de doenças, sendo que na Nigéria a decoção de folhas e raízes dessa planta é usada contra febre, febre amarela e picada de cobra. Estudos biológicos comprovaram as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana da espécie referida (OKOYE et al., 2015; OKOYE et al., 2016).

Estudos químicos relataram o isolamento de novos glicosídeos flavonoides a partir do extrato metanólico das folhas de *Olox mannii* Oliv., sendo estes os flavonoides canferol -3-O-[β-D-glicopiranosil-(1→2)-α-L-arabinofuranosídeo]-7-O-α-L-raminopiranosídeo (28), canferol-3-O-[β-D-arabinopiranosil-(1→4)-α-L-raminopiranosídeo]-7-O-α-L-raminopiranosídeo (29), olamanosídeos D (30) e E (31) (OKOYE et al., 2015; OKOYE et al., 2016).



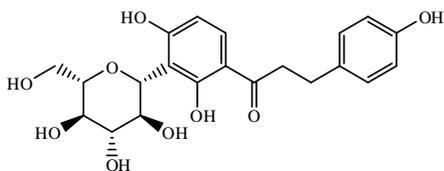
(28) R =  $\beta$ -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinofuranosil

(29) R =  $\beta$ -D-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-raminopiranosil

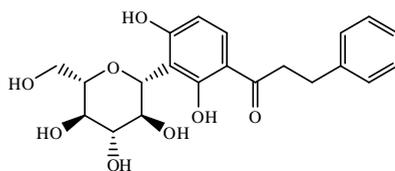
(30) R =  $\alpha$ -L-raminopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinofuranosil

(31) R =  $\alpha$ -L-apiofuranosil (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopiranosil

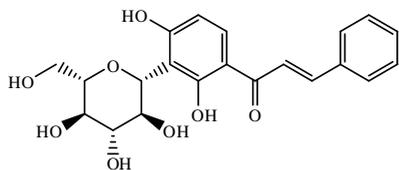
O gênero *Schoepfia*, em especial, a espécie *Schoepfia chinensis* Gardn. & Champ. é uma planta ornamental utilizada na medicina popular chinesa na forma de infusões para tratar enfermidades distintas, dentre estas, fraturas, edemas, icterícia, reumatismo e artrite. Há poucos estudos químicos e biológicos referentes a este gênero, entretanto HUANG e colaboradores (2008) relataram o isolamento de três chalconas C-glicosídicas do extrato etanólico das cascas de *S. chinensis*, cabe enfatizar que estes metabólitos secundários são muito raros na natureza, estes foram denominados schoepfinas A (32), B (33) e C (34), além de outros compostos mais comuns na literatura 4,20,40-triidroxi-3'-C- $\beta$ -glicosilchalcona (35), notofagina (36) e hemifloina (37).



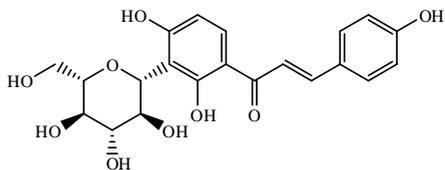
(32)



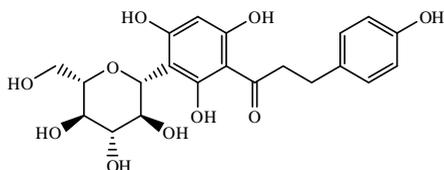
(33)



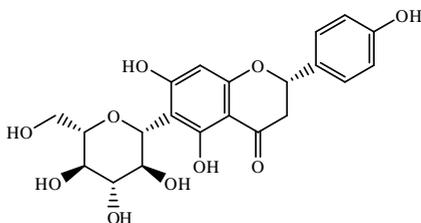
(34)



(35)

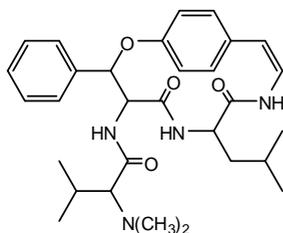


(36)

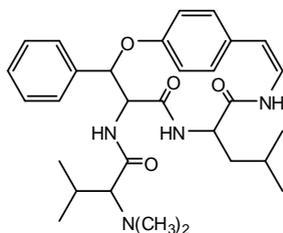


(37)

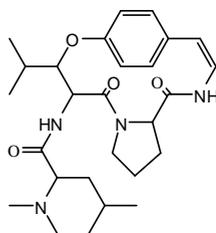
Dentre as diversas classes de metabólitos pertencentes à família Olacaceae os peptídeos cíclicos destacam-se, pois segundo a literatura essas moléculas podem formar complexos com íons de metais alcalinos-terrosos os quais atuam como ionóforos nas plantas, como antibióticos, toxinas, inibidores de ligações das proteínas, inibidores de enzimas, inibidores de nematóides e imunossupressores e, também apresentam atividades antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária (POMILIO et al., 2006). O isolamento destas substâncias foram relatadas no gênero *Heisteria* Jacq., sendo que das cascas da espécie *Heisteria nitida* Engl. obtiveram-se os metabólitos integerrenina (**38**), anorldianina 27-N-óxido (**39**) e anorldianina (**40**) (EL-SEEDI et al., 2005).



(38)



(39)



(40)

Investigações farmacológicas, químicas e biológicas demonstraram a potencialidade de várias espécies de Olacaceae, contudo faz-se necessário a continuidade desses estudos com o intuito de obter novas informações a respeito dessa família, contribuindo assim para o conhecimento da flora brasileira.

## 2.2 O gênero *Dulacia* Vell.

### 2.2.1 Caracterização do gênero *Dulacia* Vell.

O gênero *Dulacia* Vell. foi descrito por Vellozo em 1825 (Tropicos.org, 2017), deste tem-se os sinônimos heterotípicos *Hypocarpus* DC. e *Liriosma* Poepp; possui 13 espécies distribuídas somente na América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela) (Figura 4, p. 13) (The Plant List, 2013; ROSSI, 2017).



**Figura 4** - Distribuição geográfica do gênero *Dulacia* Vell. no mundo.

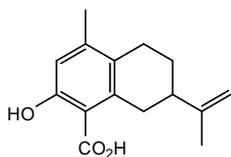
**Fonte:** <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Dulacia>.

O gênero *Dulacia* Vell. é nativo do Brasil, dispondo de cerca de 10 espécies: *Dulacia candida* (Poepp.) Kuntze, *Dulacia egleri* (Bastos) Sleumer, *Dulacia gardneriana* (Benth.) Kuntze, *Dulacia guianensis* (Engl.) Kuntze, *Dulacia inopiflora* (Miers) Kuntze, *Dulacia macrophylla* (Benth.)

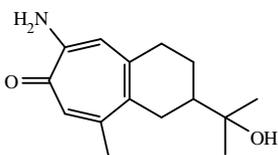
Kuntze, *Dulacia papillosa* (Bastos) Sleumer, *Dulacia pauciflora* (Benth.) Kuntze, *Dulacia redmondii* Steyererm., *Dulacia singularis* Vell, estas estão distribuídas nos estados do Amazonas, Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e no Distrito Federal, sendo que geralmente são encontradas em ambientes florestais atlânticos, amazônicos, caatingas, cerrados e no pantanal (ROSSI, 2017).

### 2.2.2 Constituintes químicos do gênero *Dulacia* Vell.

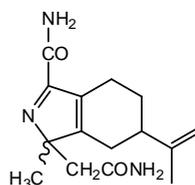
Na literatura há relatos apenas dos estudos químicos da espécie *Dulacia guianensis* (Engl.) Kuntze, que resultaram no isolamento do sesquiterpeno manicol (41) e de uma mistura de alcaloides denominados manicolina A (42) e B (43) das cascas das raízes (POLONSKY et. al., 1981; POLONSKY et. al., 1983; POLONSKY et. al., 1984). Pesquisas recentes relataram o manicol (41) como sendo um potente e específico inibidor da ribonuclease H, enzima responsável especificamente pela clivagem do RNA de híbridos RNA/DNA (CERRITELLI et al., 2009; MA et al., 2014).



(41)



(42)



(43)

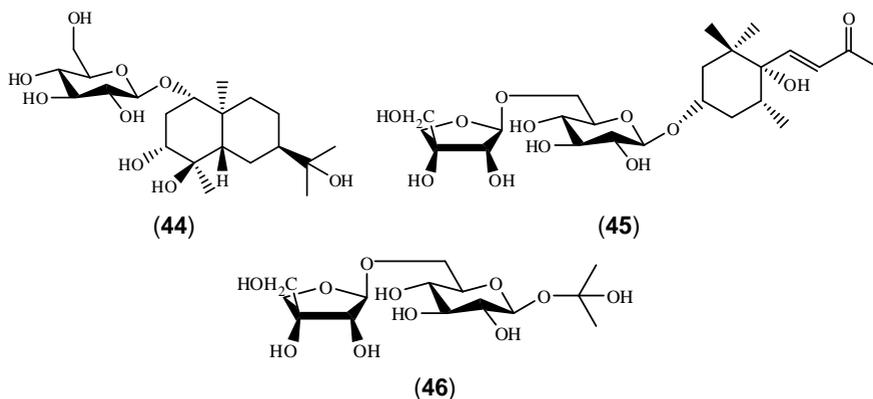
### 2.2.3 Constituintes químicos do gênero *Liriosma* Poepp.

O gênero *Liriosma* foi relatado em 1843 por Poeppig (Tropicos.org, 2015). No Brasil encontram-se 21 espécies pertencentes a este gênero, dentre estas destacam-se: *Liriosma acuta* Miers, *Liriosma candida* Poepp.,

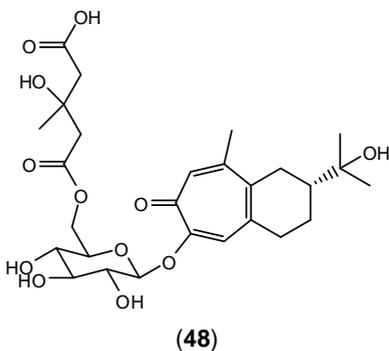
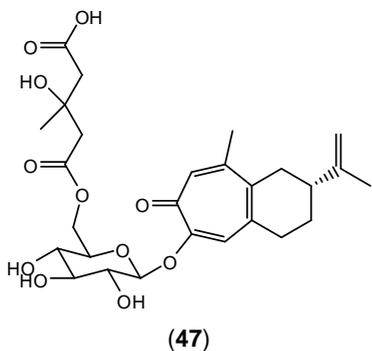
*Liriosma egleri* J. O. Rangel, *Liriosma ovata* Miers e *Liriosma singularis* (Vell.) J. F. Macbr. (MONACHINO, 1961; ROSSI, 2017).

Algumas tribos indígenas preparam infusões das raízes e cascas da espécie *Liriosma ovata* Miers (sinonímia *Dulacia inopiflora* (Miers) Kuntze), conhecida popularmente como “madeira-potente”, empregando-as no tratamento de impotência, problemas neuromusculares, distúrbios no sistema nervoso, reumatismo, astenia cardíaca e gastrointestinal, para prevenir a calvície, além da utilização externa em banhos de massagens e tratamento de doenças de pele. O uso dos extratos desta espécie como antioxidante em preparações farmacêuticas também é encontrado em algumas patentes (PICERNO et al., 2008; MA et al., 2014).

Picerno e colaboradores (2008) analisaram o extrato metanólico das cascas da espécie *Liriosma ovata* Miers, relatando o isolamento dos glicosídeos isoprenoides,  $1\alpha$ -( $\beta$ -D-glicopiranosiloxi)eudesma- $3\alpha,4\beta,11$ -trioi (44),  $3\alpha,6\alpha$ -diidroximegastigman-7-en-9-one-3-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (45) e isopropil- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (46) e, sua significativa atividade anti-inflamatória.



Estudo recente com o extrato metanólico da raiz de *Liriosma ovata* Miers possibilitou o isolamento de dois sesquiterpenoides glicosídicos, liriosmasida A (47) e B (48) (MA et al., 2014).



### 2.3 A espécie *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer

Espécie endêmica do Brasil distribuída nas regiões Norte (Tocantins) e Centro-oeste (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) (Figura 5, p. 16) possui como sinonímia a espécie *Liriosma egleri* J. O. Rangel, sendo conhecida popularmente por “Pau-de-rato”, “Fruta-de-urubu” e “Pau-de-alho”. Possui ocorrência na mata alagável do Araguaia, sendo predominante no interior de caapões do Abobral, mata de “salina”, pimenteiral, mata ciliar, borda de mata, cerradão, solos arenosos e argilosos (POTT & POTT, 1994).



**Figura 5** - Distribuição geográfica de *Dulacia egleri*.

Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublica>.

A espécie *Dulacia egleri* (Figura 6, p. 17) apresenta-se como arbustos ou arvoretas, podendo atingir de 1 a 4 metros de altura, com ramos estriados, possui folhas oblongas, membranáceas, de ápice agudo, com 7 a 8 centímetros de comprimento e 3 a 3,5 centímetros de largura, sendo que estas apresentam forte odor de cebola podre; entretanto, suas flores são perfumadas, apícola e em grande quantidade, aparecendo geralmente no mês de outubro estendendo-se até o mês de dezembro, já seus frutos surgem nos meses de dezembro e janeiro (ICHADO et al., 1977; POTT & POTT, 1994).



**Figura 6** – A espécie *Dulacia egleri*.

**Fonte:** autora.

Em levantamento realizado no *SciFinder Scholar*® (Fevereiro de 2017) verificou-se que não há relatos de estudos químicos ou biológicos referentes a esta espécie.

## **2.4 Atividade antifúngica**

As infecções fúngicas são um enorme problema na saúde mundial, causando também um fardo econômico considerável (CIOCIOLA et al., 2016). Estima-se que existam aproximadamente 600 espécies de

patógenos fúngicos humanos, entre eles, cerca de 20 espécies causam mais de 99% destas, podendo ser classificadas em infecção fúngica superficial e infecção fúngica invasiva (IFI) (LIU et al., 2016).

As IFIs são alarmantes, pois se associam a alta mortalidade em hospedeiros imunocomprometidos, tais como pacientes com AIDS e pacientes submetidos a transplantes de órgãos ou quimioterapia (CIOCIOLA et al., 2016; LIU et al., 2016).

Apesar do aumento da incidência de infecções fúngicas e das restrições dos fármacos antifúngicos existentes, apenas alguns novos antifúngicos foram introduzidos nos últimos anos (CIOCIOLA et al., 2016).

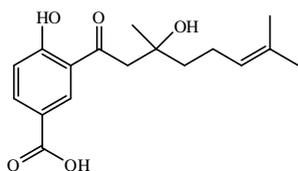
Idealmente, os novos compostos antifúngicos devem ter um amplo espectro de atividade, seletividade, especificidade, diferentes mecanismos de ação, nenhuma resistência cruzada com referência aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, baixo risco para desenvolver resistência, perfil farmacocinético e farmacodinâmico razoável e reduzidos efeitos tóxicos ou secundários (CIOCIOLA et al., 2016; LIU et al., 2016).

As plantas são tidas como fontes naturais de novos compostos de interesse médico e biotecnológico, uma vez que sintetizam uma grande variedade de compostos bioativos (Figura 7, p. 19 e 20; Tabela 1, p. 19). Uma análise das fontes de novos fármacos de 1981 a 2007 revela que quase metade dos medicamentos aprovados desde 1994 baseavam-se em produtos naturais (ARIF et al., 2011). A medicina tradicional é cada vez mais receptiva ao uso de antifúngicos derivados de plantas, até o momento mais de 600 espécies de plantas têm relatos devido as suas propriedades antifúngicas (YASEEN et al., 2014).

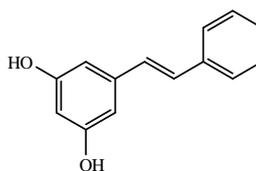
**Tabela 1** - Exemplos de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies e que apresentam potencial atividade antifúngica (ARIF et al., 2011).

<b>Substância* (Classe)</b>	<b>Espécie (Família)</b>
Ácido crassinervico ( <b>49</b> ) (derivado de ácidos fenólicos)	<i>Piper crassinervium</i> (Piperaceae)
Pinosilvina ( <b>50</b> ) (derivado de ácidos fenólicos)	<i>Croton hutchinsonianus</i> (Euphorbiaceae)
Pelalostemumol ( <b>51</b> ) (flavonoide prenilado)	<i>Pelalostemium purpureum</i> (Leguminosae)
Galangina ( <b>52</b> ) (flavonoide)	<i>Helichrysum aureonitens</i> (Asteraceae)
2-(3,4-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-2-il)- 1-metiletil pentanoato ( <b>53</b> ) (alcaloide)	<i>Datura metel</i> (Solanaceae)
Coccolina ( <b>54</b> ) (alcaloide)	<i>Epinetrum villosum</i> (Menispermaceae)
Flindersina ( <b>55</b> ) (alcaloide)	<i>Haplophyllum sieversii</i> (Rutaceae)

\*estruturas mostradas na **Figura 7**

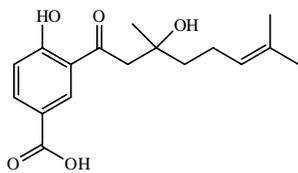


(49)

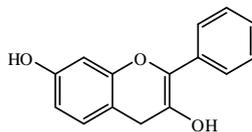


(50)

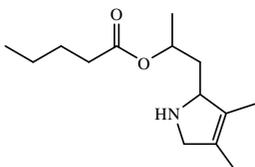
**Figura 7** - Exemplos de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies e que apresentam potencial atividade antifúngica.



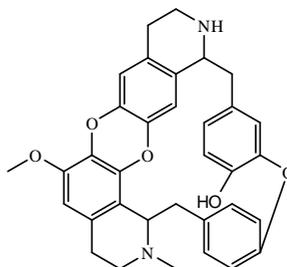
(51)



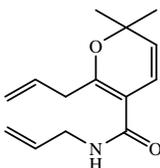
(52)



(53)



(54)



(55)

**Figura 7 (cont.)** - Exemplos de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies e que apresentam potencial atividade antifúngica.

No entanto, os desafios da descoberta antifúngica baseada em produtos naturais incluem principalmente a complexidade estrutural e estereoquímica dos compostos, a dificuldade na síntese química, as modificações estruturais necessárias e as propriedades físico-químicas desfavoráveis para desenvolvimento de fármacos (LIU et al., 2016).

O conjunto atual de agentes antifúngicos disponíveis clinicamente inclui três classes de produtos naturais e quatro classes de produtos químicos sintéticos. Dentre as classes de produtos naturais temos as equinocandinas, por exemplo, a aminocandina (56), que age por inibição da  $\beta$ -1,3-glucanase na parede celular fúngica, embora estas sejam



profunda e grave, qualquer órgão pode ser afetado, entre estes, ocular, pulmonar e cardíaco (LIMA et al., 2016).

A espécie *Candida albicans* é a causadora mais prevalente de infecções fúngicas em seres humanos, com mais de 50% das infecções mucocutânea e sistêmica. Sabe-se que as espécies de *Candida* desenvolvem vários mecanismos que conferem resistência a fármacos antifúngicos, que são bem descritos e caracterizados para células planctônicas (ou de vida livre) (MARIONI et al., 2016).

A criptococose é uma importante infecção fúngica causada por *Cryptococcus neoformans*, na sua forma mais grave esta se manifesta como meningite criptocócica, que é fatal se não tratada. Apesar das melhores práticas atuais de tratamento, a mortalidade é alta e há taxas substanciais de sequelas neurológicas permanentes, incluindo cegueira, convulsões, dor de cabeça, perda de memória e transtornos de personalidade (LAI et al., 2016).

Dado os desafios do desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, o reforço dos fármacos existentes com agentes sinérgicos é uma abordagem alternativa promissora. A sinergia pode aumentar a eficácia e diminuir a dose terapêutica e, ao trabalhar através de mais de um alvo pode retardar o desenvolvimento da resistência (LAI et al., 2016).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores. O grande uso de medicamentos à base de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular trazem consigo a necessidade de pesquisas para o esclarecimento e confirmação de informações sobre as ações das plantas, visando à minimização de efeitos colaterais e toxicológicos, haja visto que esse uso deve ser confiável e seguro.

A quimiotaxonomia cujo objetivo central compreende a utilização de informações químicas para auxiliar na resolução de problemas de origem

taxonômica passou a ser uma ferramenta na otimização e direcionamento de pesquisas que visam à busca de produtos naturais com propriedades farmacológicas. A avaliação do padrão de ocorrência desses metabólitos contribui para o estabelecimento de marcadores químicos que associados com outras características favorecem a robustez dos estudos taxonômicos dos vegetais.

O potencial terapêutico das plantas brasileiras vem sendo descoberto a cada ano e tem despertado o interesse por parte de pesquisadores no mundo todo. No entanto, a avaliação química e biológica da flora medicinal do Estado de Mato Grosso está sendo efetuada por um número reduzido de grupos de pesquisa.

Considerando-se o potencial da família Olacaceae em termos de substâncias e bioatividade e, a inexistência de pesquisas com a espécie *Dulacia egleri* (Rangel) Sleumer, este trabalho tem como intuito agregar conhecimento sobre o gênero *Dulacia*, além de analisar aspectos químicos e atividades biológicas da espécie em questão.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Realizar o estudo químico do caule e das folhas de *Dulacia egleri* e avaliar o potencial biológico nos ensaios frente a cepas fúngicas.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Efetuar a coleta e identificação da espécie *D. egleri*;
- Realizar secagem e trituração do caule e das folhas de *D. egleri*;
- Preparar extrato bruto hidroetanólico do caule e das folhas de *D. egleri*;
- Executar o fracionamento cromatográfico dos extratos e resíduos do caule e das folhas de *D. egleri*, empregando partição líquido-líquido

com solventes em polaridade crescente, submeter posteriormente estes a análises em diferentes técnicas cromatográficas;

- Isolar e efetuar determinação estrutural dos metabólitos especiais por meio de técnicas espectroscópicas, sendo estas, RMN 1D e 2D;
- Avaliar o potencial antifúngico dos extratos e resíduos contra as cepas *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Reagentes e equipamentos

- Solventes de grau PA das marcas Vetec, Dinâmica e Chemis;
- Colunas de vidro de vários tamanhos e diâmetros, empacotadas com sílica gel 60 (70-230 *mesh* ou 230-400 *mesh*) das marcas Macherey-Nagel e Silicycle, bem como celulose microcristalina da marca Synth e *Sephadex LH-20*, marca GE Healthcare, eluídas a pressão atmosférica;
- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) empregando-se cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Macherel-Nagel e Merck;
- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em placas de vidro 20x20 cm, preparadas a partir da suspensão em água destilada da mistura de 9 g de sílica gel 60 para cromatografia em camada fina da Vetec e 6 g de sílica gel 60 para cromatografia em camada fina com UV 254 da Macherey Nagel. Após secagem em temperatura ambiente as placas foram ativadas por 2 horas a 100°C em estufa;
- Moinho de facas da marca MARCONI, modelo MA 580/E;
- Estufa a vácuo TECNAL, modelo TE-395/1 e estufa da marca FANEM, modelo 315 SE;
- Balanças da marca SHIMADZU, modelo Libror AEG com capacidade para 220 g e TOLEDO com capacidade de 100 kg;

- Rotaevaporador da marca BUCHI vacuum controller V-850;
- As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação com luz no UV ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm) em equipamento Spectroline Model CC-80 e/ou reveladas em cuba com vapores de iodo;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), incluindo os experimentos de 2D, foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance II-500 (500 Hz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) pertencente ao LPQPN-CA/UFMT. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), e dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO}-d_6$ ) da marca Cambridge Isotope Laboratories e água ( $\text{D}_2\text{O}$ ) da marca Sigma-Aldrich e, como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são indicados em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz).

## **5.2 Material botânico de *Dulacia egleri***

O caule e folhas da espécie *D. egleri* foram coletadas no dia 31/05/2015 na Rodovia Transpantaneira KM 33 no município de Poconé ( $16^\circ 51' 242''\text{S}$   $056^\circ 74' 904''\text{W}$ ). Um material testemunho foi depositado no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso sob o número de exsicata 42.853.

### **5.2.1 Secagem e pulverização do caule e folhas de *Dulacia egleri***

Os materiais botânicos de *D. egleri* foram secos em temperatura ambiente e posteriormente pulverizados em moinho de facas, obtendo-se 3,5 kg de pó do caule e 0,64 kg de pó das folhas.

## **5.2.2 Obtenção dos extratos bruto do caule e folhas de *Dulacia egleri***

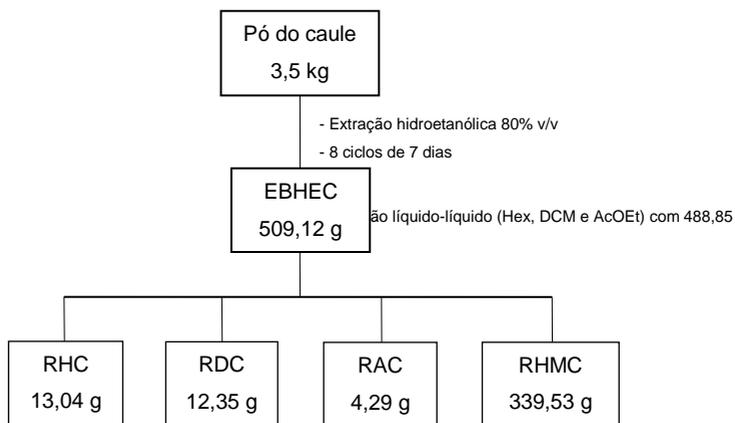
O pó do caule (3,5 kg) e das folhas (0,64 kg) da espécie em estudo foram submetidos à extração á frio (maceração) com solução hidroetanólica a 80% v/v (EtOH 8:2 H<sub>2</sub>O), empregando 14 L e 3 L da mistura extratora, respectivamente, por um período de 8 ciclos de 7 dias.

Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida (~60mbar) á aproximadamente 35°C em rotaevaporador, resultando no extrato bruto hidroetanólico do caule (**EBHEC**; 509,12 g; 14,55%) e das folhas (**EBHEF**; 101,22 g; 15,82%), estes foram acondicionados em cápsulas de porcelana, levados á estufa (37°C) até a secura total, sendo que esta condição foi verificada pela pesagem em dias consecutivos até observar que o peso permaneceu constante.

## **5.2.3 Fracionamento cromatográfico do Extrato Bruto Hidroetanólico do Caule (EBHEC)**

### **5.2.3.1 Partição líquido-líquido do EBHEC**

O **EBHEC** (488,85 g) foi suspenso em 650 mL da mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3) e posteriormente submetido a partição líquido-líquido com os solventes hexano (3x900mL), diclorometano (3x1100mL) e acetato de etila (3x700mL), até a descoloração do solvente empregado. Após evaporação dos solventes e secagem das amostras em estufa (37°C), obtiveram-se os resíduos hexano (**RHC**; 13,04 g; 2,67%), diclorometano (**RDC**; 12,35 g; 2,53%), acetato de etila (**RAC**; 4,29 g; 0,88%) e hidrometanólico (**RHMC**; 339,53 g; 69,45%) (Fluxograma 1, p. 27).



**Fluxograma 1** - Fracionamento cromatográfico do EBHEC.

### 5.2.3.2 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Hexano do Caule (RHC)

O resíduo **RHC** (11,98 g) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 62,7 cm;  $\Phi$ : 5,8 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230 *mesh*; 599,9 g). Os solventes usados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 91 frações de 125 mL, que foram concentradas em rotaevaporador, agrupadas e denominadas de **HC1** á **HC5** (Fluxograma 2, p. 28).

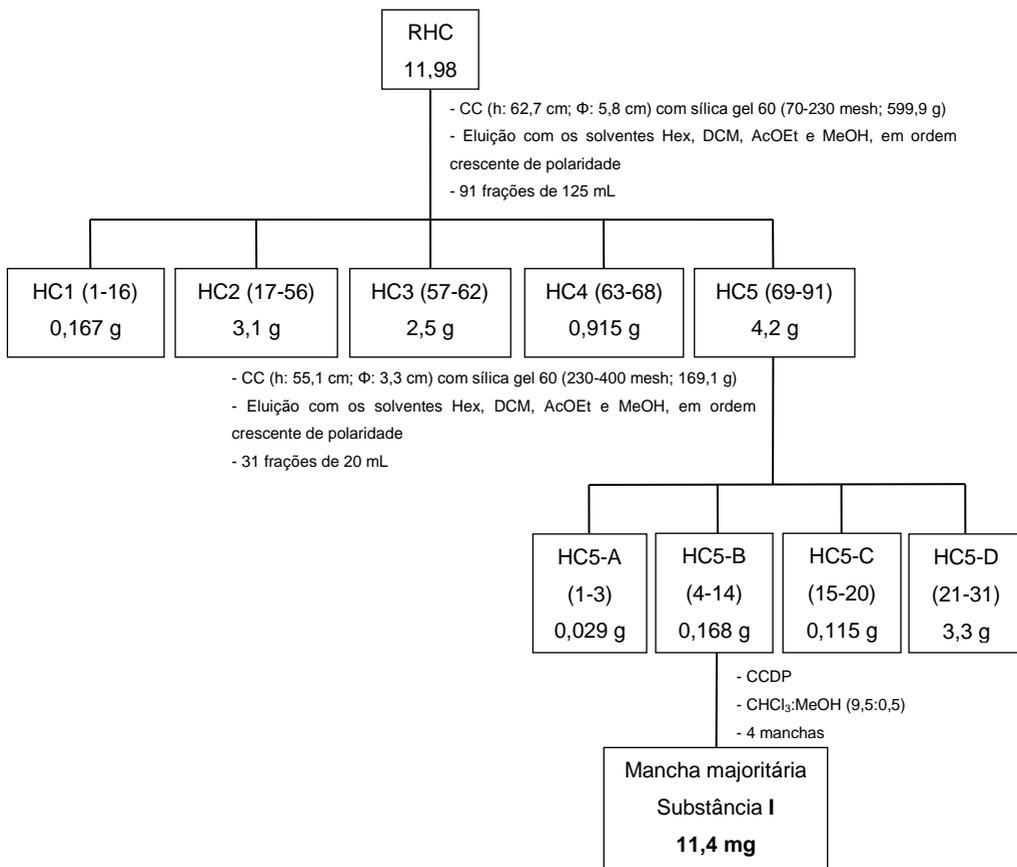
Os grupos **HC1** á **HC4** forma fracionados empregando técnicas cromatográficas, entretanto, não foi possível o isolamento e purificação de metabólitos secundários provindos dos mesmos.

#### 5.2.3.2.1 Fracionamento do grupo HC5

O grupo **HC5** (4,2 g; 35,06%) foi submetido à cromatografia em coluna (h:55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) empregando como fase estacionária sílica gel (230-400 *mesh*; 169,1 g). Os solventes utilizados na eluição foram Hex/ $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ /AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de

polaridade. Foram obtidas 31 frações de 20 mL, estas foram agrupadas após análise por CCDA em diferentes grupos nomeados **HC5-A** á **HC5-D**.

O grupo **HC5-B** (0,168 g; 4,0%) foi analisado através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), sendo eluído com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9,5:0,5) e obtendo-se 4 manchas, cuja majoritária apresentou-se purificada na forma de um precipitado amorfo verde, esta foi encaminhada para análise em RMN 1D e 2D, para determinação da substância **I** (**11,4 mg**) (Fluxograma 2, p. 28).



**Fluxograma 2** – Fracionamento cromatográfico do RHC.

### 5.2.3.3 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Diclorometano do Caule (RDC)

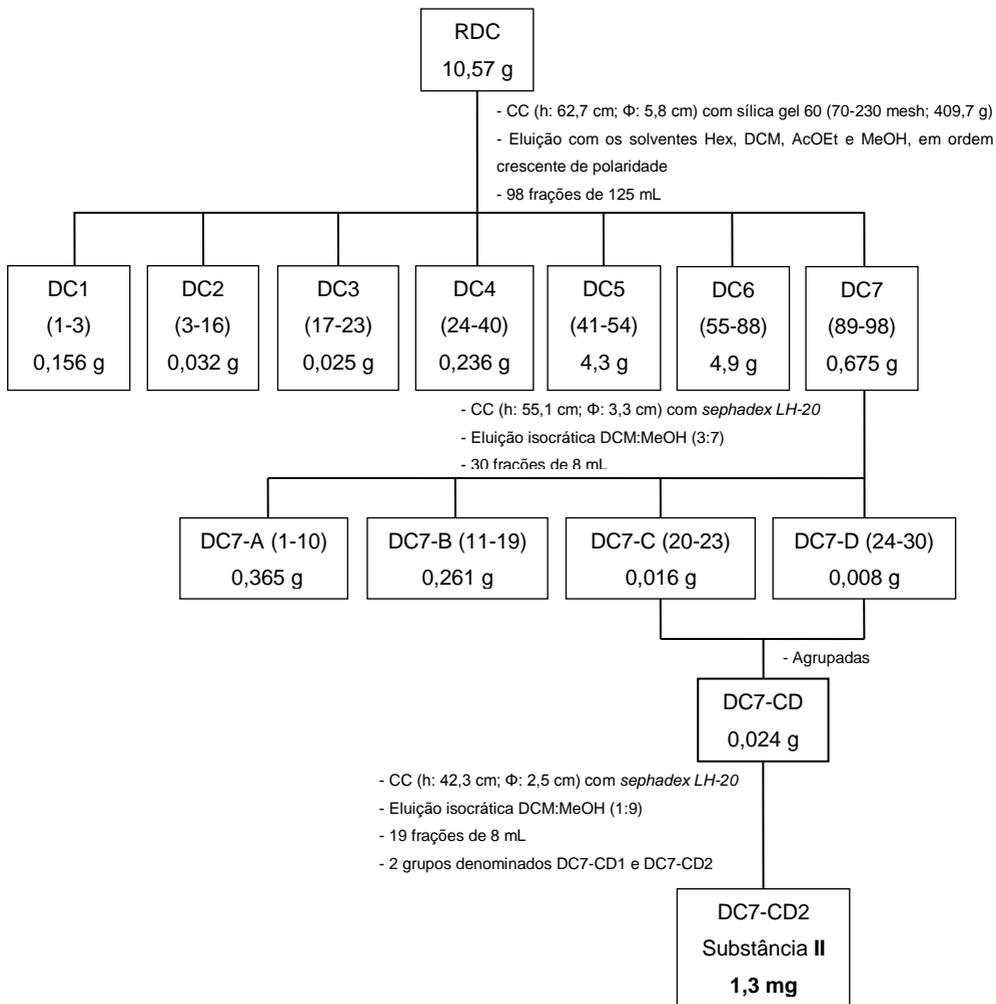
O resíduo **RDC** (10,57 g) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 62,7 cm;  $\Phi$ : 5,8 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh; 409,7 g). Os solventes empregados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 98 frações de 125 mL, as quais foram concentradas em rotaevaporador. As frações foram agrupadas em diferentes grupos e denominadas **DC1** á **DC7** (Fluxograma 3, p. 30).

Os grupos **DC1** á **DC6** forma fracionados através de diversas técnicas cromatográficas, contudo, não obteve-se êxito no isolamento e purificação de metabólitos especiais dos mesmos.

#### 5.2.3.3.1 Fracionamento do grupo DC7

Submeteu-se o grupo **DC7** (0,675 g; 6,38%) à cromatografia em coluna (h: 55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária *Sephadex LH-20* e eluição com um sistema isocrático DCM:MeOH (3:7). Foram obtidas 30 frações de 8 mL, as quais foram secas e agrupadas de acordo com a análise por CCDA em 4 diferentes subgrupos denominados **DC7-A** á **DC7-D**.

Os grupos **DC7-C** (0,016 g; 2,37%) e **DC7-D** (0,008 g; 1,18%) foram reunidos e denominados **DC7-CD** (0,024 g), este foi novamente fracionado em coluna (h: 42,3 cm;  $\Phi$ : 2,5 cm) empregando como fase estacionária *Sephadex LH-20* eluída com um sistema isocrático DCM:MeOH (1:9). Foram obtidas 19 frações de 8 mL, estas foram agrupadas por análise em CCDA em 2 diferentes grupos. A amostra DC7-CD2 apresentou-se purificada resultando em um precipitado amorfo amarelo, sendo submetida á análise em RMN 1D e 2D para determinação da substância **II** (**1,3 mg**) (Fluxograma 3, p. 30).

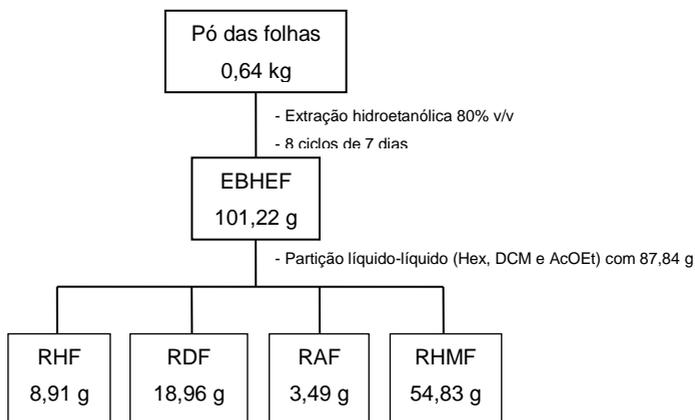


**Fluxograma 3** – Fracionamento cromatográfico do RDC.

## 5.2.4 Fracionamento cromatográfico do Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas (EBHEF)

### 5.2.4.1 Partição líquido-líquido do EBHEF

O **EBHEF** (87,84 g) foi suspenso em 1000 mL da mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3) e posteriormente submetido a partição líquido-líquido com os solventes hexano (3x1500mL), diclorometano (3x800mL) e acetato de etila (3x400mL), até descoloração do solvente utilizado. Após evaporação dos solventes e secagem das amostras em estufa (37 °C), obtiveram-se os resíduos hexano (**RHF**; 8,91 g; 10,14%), diclorometano (**RDF**; 18,96 g; 21,58%), acetato de etila (**RAF**; 3,49 g; 3,97%) e hidrometanólico (**RHMF**; 54,83 g; 62,42%) (Fluxograma 4, p. 31).



**Fluxograma 4** - Fracionamento cromatográfico do EBHEF.

#### 5.2.4.2 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Diclorometano das Folhas (RDF)

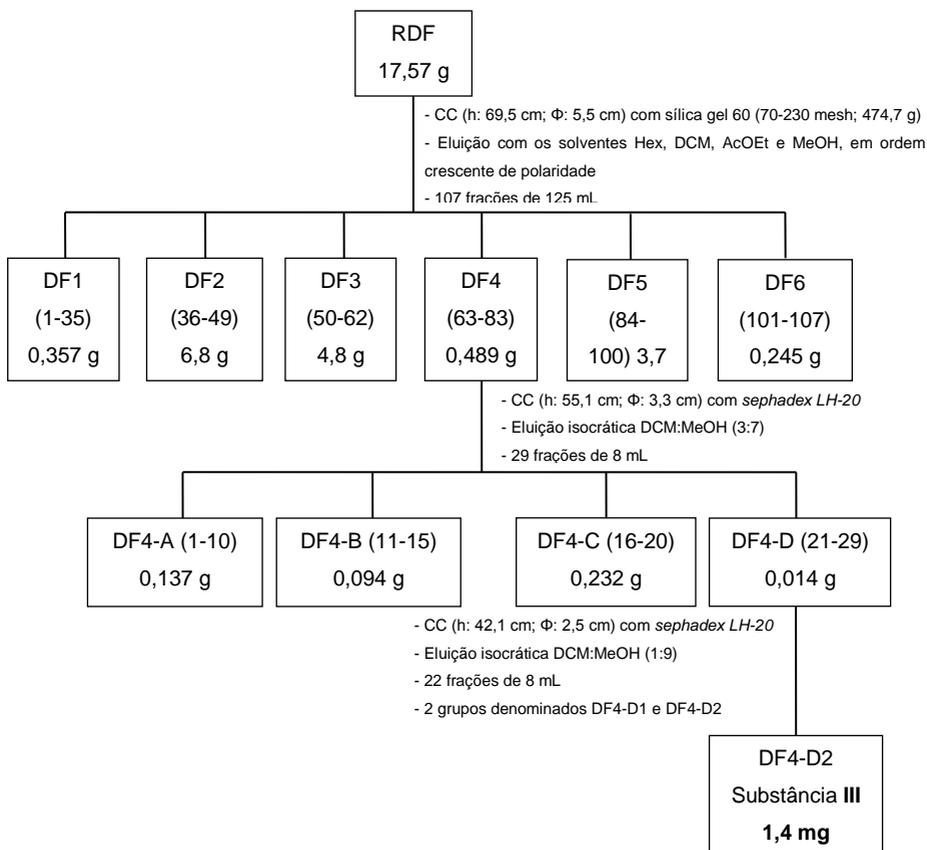
O resíduo **RDF** (17,57 g) foi submetido à cromatografia em coluna (h:69,5 cm;  $\Phi$ : 5,5 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230mesh; 474,7 g). Os solventes usados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 107 frações de 125 mL que foram concentradas em rotaevaporador e agrupadas em 7 diferentes grupos denominados **DF1** a **DF6** (Fluxograma 5, p. 33).

Os grupos **DF1**, **DF2**, **DF3**, **DF5** e **DF6** forma fracionados empregando diferentes técnicas cromatográficas, entretanto, não foi possível o isolamento e purificação de metabólitos secundários provindos dos mesmos.

##### 5.2.4.2.1 Fracionamento do grupo DF4

O grupo **DF4** (0,489 g; 2,78%) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária *Sephadex LH-20* e eluído com DCM:MeOH (3:7). Foram obtidas 29 frações de 8 mL, as quais foram secas em estufa (37 °C) e agrupadas em diferentes subgrupos denominados **DF4-A** a **DF4-D**.

O subgrupo **DF4-D** (0,014 g; 2,86%) foi submetido novamente à cromatografia em coluna (h: 42,1 cm;  $\Phi$ : 2,5 cm) usando *Sephadex LH-20* e eluição com o sistema DCM:MeOH (1:9). Foram obtidas 22 frações de 8mL, as quais foram secas e agrupadas, após análise em CCDA, em 2 diferentes grupos. A amostra DF4-D2 apresentou-se purificada resultando em um precipitado amorfo amarelo, sendo submetida á análise em RMN 1D e 2D para determinação da substância **III (1,4 mg)** (Fluxograma 5, p. 33).



**Fluxograma 5** – Fracionamento cromatográfico do RDF.

### 5.2.4.3 Fracionamento cromatográfico do Resíduo Acetato de etila das Folhas (RAF)

O resíduo **RAF** (2,99 g) foi submetido à cromatografia em coluna (h:55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (70-230mesh; 136,8 g). Os solventes usados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade. Obtiveram-se 73 frações de 125 mL, que foram concentradas em rotaevaporador. As amostras foram agrupadas em 8 diferentes grupos denominados **AF1** a **AF8** (Fluxograma 6, p. 36 e 37).

Os grupos **AF1**, **AF2**, **AF3**, **AF5** e **AF8** forma fracionados através de diversas técnicas cromatográficas, contudo, não obteve-se êxito no isolamento e purificação de metabólitos especiais dos mesmos.

#### 5.2.4.3.1 Fracionamento do grupo AF4

O grupo **AF4** (0,050 g; 1,67%) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 42,1 cm;  $\Phi$ : 2,5 cm) empregando *Sephadex LH-20* e um sistema isocrático DCM:MeOH (3:7). Foram obtidas 36 frações de 8 mL, as quais foram secas em estufa e agrupadas em diferentes subgrupos nomeados **AF4-A** á **AF4-C**.

O subgrupo **AF4-B** (0,012 g; 20,0%) foi submetido à análise em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e eluído com DCM:AcOEt (1:1), obtendo-se 4 manchas, cuja majoritária apresentou-se purificada resultando em um precipitado amorfo amarelo, sendo submetida á análise em RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para determinação da substância **IV** (3,7 mg) (Fluxograma 6, p. 36).

#### 5.2.4.3.2 Fracionamento do grupo AF6

O grupo **AF6** (0,850 g; 28,43%) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária *Sephadex LH-20* e eluída com um sistema isocrático DCM:MeOH (1:1). Foram obtidas 50 amostras de 20 mL, as quais foram secas em estufa (37 °C) e agrupadas, após análise em CCDA, em diferentes subgrupos denominados **AF6-A** á **AF6-C**.

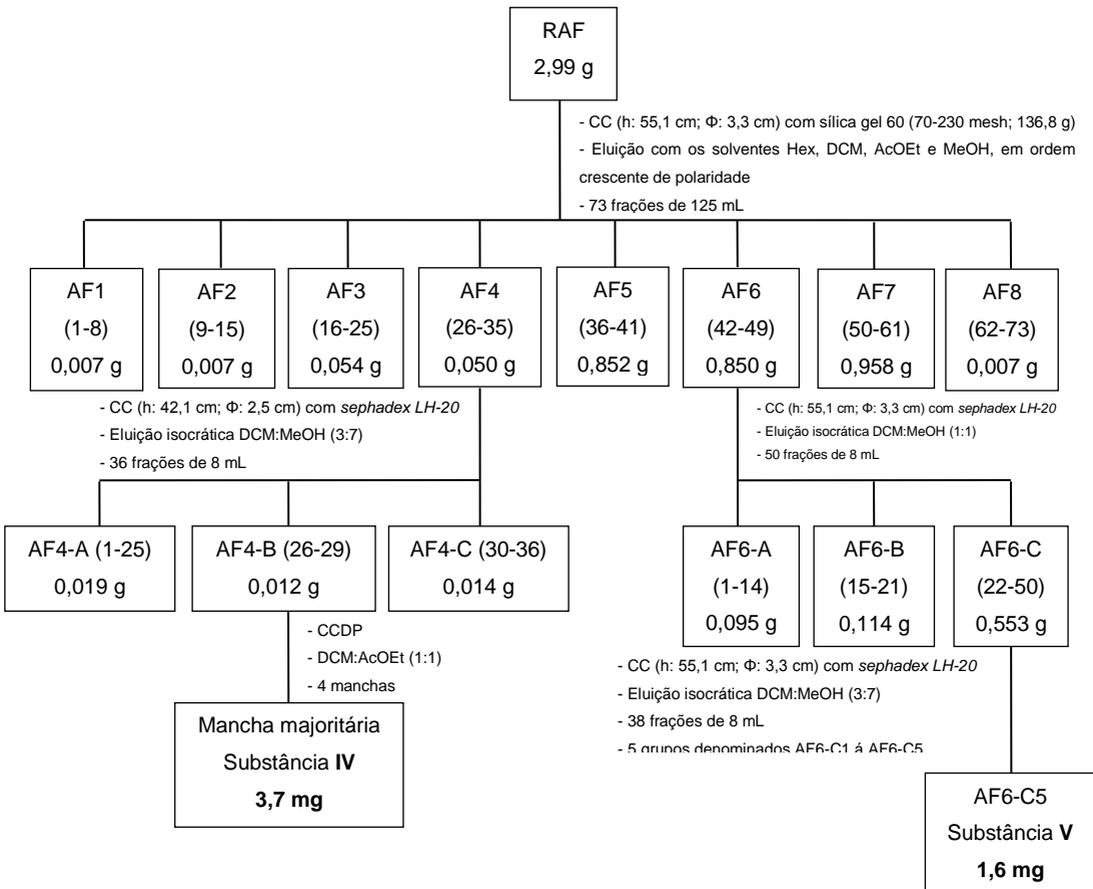
O subgrupo **AF6-C** (0,553 g; 62,06%) foi fracionado em coluna (h:55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária *Sephadex LH-20* e um sistema isocrático DCM:MeOH (3:7). Foram obtidas 38 frações de 8 mL, as quais foram secas e agrupadas, em 5 diferentes grupos. A amostra AF6-C5 apresentou-se purificada resultando em um precipitado amorfo branco,

sendo submetida á análise em RMN 1D e 2D para determinação da substância **V (1,6 mg)** (Fluxograma 6, p. 36).

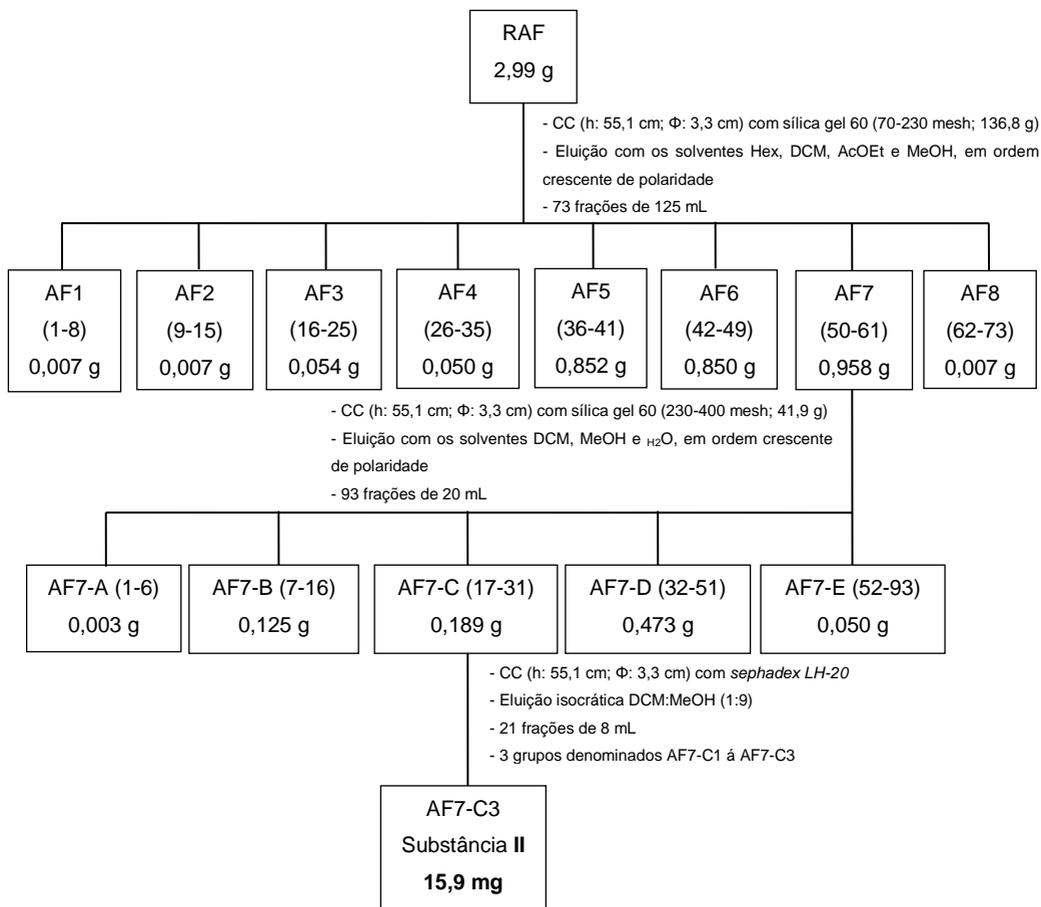
#### **5.2.4.3.3 Fracionamento do grupo AF7**

O grupo **AF7** (0,958 g; 32,04%) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (230-400 *mesh*; 41,9 g). Os solventes empregados na eluição foram DCM/MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 93 amostras de 20 mL, as quais foram agrupadas, após análise em CCDA, em 5 diferentes subgrupos denominados **AF7-A** a **AF7-E**.

O subgrupo **AF7-C** (0,189 g; 19,73%) foi submetido à cromatografia em coluna (h: 55,1 cm;  $\Phi$ : 3,3 cm) utilizando como fase estacionária *Sephadex LH-20* e um sistema isocrático DCM:MeOH (1:9). Foram obtidas 21 frações de 8 mL, as quais foram secas em estufa (37 °C) e agrupadas. A amostra AF7-C3 apresentou-se purificada na forma de um precipitado amorfo amarelo, sendo submetida á análise em RMN 1D e 2D para determinação da substância **II (15,9 mg)** (Fluxograma 6, p. 37).



**Fluxograma 6 – Fracionamento cromatográfico do RAF.**



**Fluxograma 6 (cont.)** – Fracionamento cromatográfico do RAF.

## **5.3 Ensaios Biológicos - Atividade antifúngica *in vitro***

### **5.3.1 Linhagens microbianas**

Os bioensaios de atividade antifúngica foram supervisionados pela Profa. Dra Ivana Maria Póvoa Violante, do Núcleo de pesquisa da Faculdade de Farmácia-Bioquímica, da Universidade de Cuiabá. Nestes foram selecionadas cepas padronizadas originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo estas seis cepas de leveduras: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 9030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 760) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045).

### **5.3.2 Meios de cultura**

No ensaio da atividade antifúngica foram utilizados os meios de Sabouraud (Difco<sup>®</sup>) e RPMI-1640 líquido (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de vermelho de fenol) (Cultilab<sup>®</sup>), tamponado com solução MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0.

### **5.3.3 Manutenção dos microrganismos indicadores**

Os microrganismos foram mantidos congelados a -20 °C em meio BHI (*Brain Heart Infusion* – MERCK<sup>®</sup>), contendo glicerol, com exceção de *C. neoformans* que foi armazenado a -4 °C.

### **5.3.4 Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes**

Os fungos leveduriformes foram repicados em Agar Sabourad dextrosado (Difco<sup>®</sup>) e em seguida, incubados a 37 °C por 24 horas para as

espécies de leveduras do gênero *Candida* e por 48 horas para *C. neoformans*.

Para o preparo do inóculo foram selecionadas entre 4 a 5 colônias de levedura, de aproximadamente 1 mm de diâmetro. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina a 0,85% (NaCl), seguido de agitação vigorosa.

Após este período, foi realizada uma diluição de 1:50 e, posteriormente de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, para se obter uma concentração de células de 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. O inóculo foi então diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando-se à concentração final desejada de inóculo (0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL) (NCCLS, 2002).

### **5.3.5 Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da CIM (NCCLS, 2003), com algumas modificações (MITSCHER et al., 1972; FERESIN et al., 2001; STOPPA et al., 2009).

O método consistiu em preparar diluições sucessivas da amostra a ser testada, em meio de cultura líquido, semear o fungo em estudo e, após incubação, fazer a leitura para se determinar a menor concentração da amostra que inibiu visualmente o crescimento do microrganismo (CIM) (VIOLANTE, 2012).

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados.

Os valores da CIM foram determinados pela diluição dos extratos e resíduos da espécie vegetal em estudo, que foram inicialmente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO 5%), 20 mg extrato e resíduo/1000  $\mu$ L de DMSO, seguida de uma segunda diluição para que obtivesse concentrações de 2000  $\mu$ g/mL.

As amostras (extratos e resíduos) foram colocadas em microplacas de 96 poços e diluídas para obtenção das concentrações finais no interior dos poços de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL.

Em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão do inóculo, com exceção do poço de número 1, onde foram adicionados apenas a amostra e o meio em questão, para observação de uma possível turbidez ou precipitação provocada pela amostra.

No poço 10 foi realizado o controle padrão com o antifúngico anfotericina B (Sigma Chemical Co.®). A Concentração Inibitória Mínima do agente antifúngico utilizado como padrão foi determinada individualmente para cada cepa fúngica, nas mesmas condições padronizadas para as amostras, a fim de controlar a sensibilidade dos microrganismos em questão.

No poço 11 fez-se o controle positivo, para observação do crescimento dos microrganismos. No poço 12 o controle de esterilidade (sem microrganismos).

Para verificar se o diluente (DMSO) não apresentava atividade contra as cepas fúngicas os testes foram realizados em uma concentração que não ultrapassou a 5% em relação ao volume total de cada experimento, não sendo observada nenhuma atividade do DMSO sobre os microrganismos.

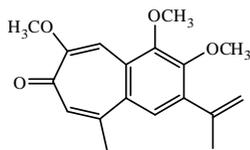
As placas foram incubadas à temperatura de 35 °C, sendo que o tempo estabelecido dependeu da cepa testada, variando de 48 horas para cepas fúngicas do gênero *Candida* e 72 horas para cepas fúngicas do gênero *Cryptococcus*. Após o período de incubação, fez-se a leitura visual para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O crescimento dos microrganismos foi indicado pela presença de turbidez e comparado com o crescimento em cada poço com o crescimento observado no poço 11 (controle positivo). Os testes (diluições) foram realizados em duplicata na mesma placa e repetidos duas vezes em outras duas diferentes placas.

### 5.3.6 Método de diluição em placas utilizando resazurina como revelador

Após a leitura foram colocados 30 µL de resazurina (0,0001g/mL) (Vetec<sup>®</sup>) em solução aquosa esterilizada, em cada compartimento (ALVES et al., 2008; CABRAL et al., 2008). A microplaca foi, então, novamente colocada na estufa a 35 °C. Após 2 horas, foi realizada a análise da mudança de cor. Nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerado como ausência de fungos viáveis.

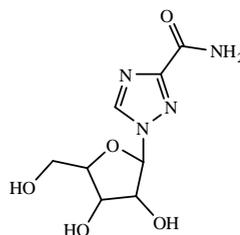
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Substâncias isoladas e identificadas do caule de *Dulacia egleri*



(I) eglersina

**Procedência:** RHC  
**Massa:** 11,4 mg  
**Característica:** precipitado amorfo verde  
**Isolamento:** p. 27  
**Identificação:** p. 42

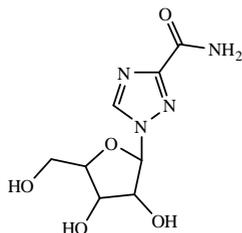


(II) ribavirina

**Procedência:** RDC  
**Massa:** 1,3 mg  
**Característica:** precipitado amorfo amarelo  
**Isolamento:** p. 29  
**Identificação:** p. 56

## 6.2 Substâncias isoladas e identificadas das folhas de

### *Dulacia egleri*



(II) ribavirina

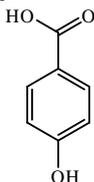
**Procedência:** RAF

**Massa:** 15,9 mg

**Característica:** precipitado amarelo

**Isolamento:** p. 33

**Identificação:** p. 56



(IV) ácido *p*-hidroxibenzóico

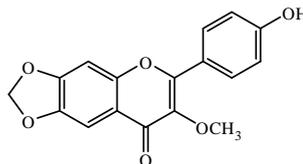
**Procedência:** RAF

**Massa:** 3,7 mg

**Característica:** precipitado amarelo

**Isolamento:** p. 33

**Identificação:** p. 76



(III) 3-metoxi-6,7-metilenodioxo-4'-hidroxiflavona

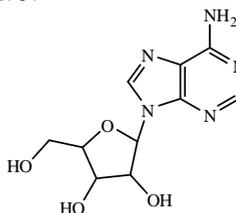
**Procedência:** RDF

**Massa:** 1,4 mg

**Característica:** precipitado amarelo

**Isolamento:** p. 32

**Identificação:** p. 64



(V) adenosina

**Procedência:** RAF

**Massa:** 1,6 mg

**Característica:** precipitado amarelo

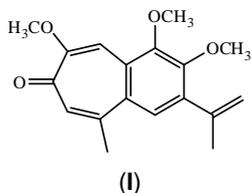
**Isolamento:** p. 33

**Identificação:** p. 79

## 6.3 Identificação estrutural

### 6.3.1 Identificação da substância I

A substância I, isolada na forma de um sólido verde, solúvel em metanol, foi identificada através das análises de espectros de RMN 1D e 2D, como um terpenoide da classe dos sesquiterpenos, sendo este aromático devido aos sinais na região de campo baixo localizados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 8, 9 e 10; p. 46 e 47) observaram-se três sinais de simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,80 (1H, *sl*, H-11), 7,59 (1H, *s*, H-5) e 6,99 (1H, *sl*, H-8) característicos de um sistema aromático. Verificaram-se ainda dois sinais de simpletos largos com  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (1H, *sl*, Ha-13) e 5,15 (1H, *sl*, Hb-13) condizentes com os hidrogênios do grupo vinila. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (3H, *sl*, 2-OCH<sub>3</sub>), 3,88 (3H, *sl*, 10-OCH<sub>3</sub>) e 3,85 (3H, *sl*, 3-OCH<sub>3</sub>) foram atribuídos às metoxilas, além destes verificaram-se sinais com  $\delta_{\text{H}}$  2,57 (3H, *s*, H-15) e 2,12 (3H, *s*, H-14) designados aos hidrogênios metílicos ligados a carbonos  $\text{sp}^2$ .

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 11, 12 e 13; p. 47 e 48) observaram-se dezoito sinais, os quais foram atribuídos aos carbonos quaternários  $\delta_{\text{C}}$  128,48 (C-1), 129,95 (C-6), 143,13 (C-4), 147,86 (C-7), 150,92 (C-2), 151,65 (C-3), 156,14 (C-10), 138,35 (C-12), além do sinal em 181,68 (C-9) referente ao carbono carbonílico. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  108,80 (C-11), 125,11 (C-5) e 132,16 (C-8) foram característicos do sistema aromático. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  115,97 (C-13), 22,00 (C-14) e 26,33 (C-15) referem-se aos carbonos metínicos e metilênicos, respectivamente. Os valores em  $\delta_{\text{C}}$  54,76 (10-OCH<sub>3</sub>), 59,83 (3-OCH<sub>3</sub>) e 60,31 (2-OCH<sub>3</sub>) foram condizentes com as metoxilas presentes na estrutura proposta.

Através da análise do espectro de RMN NOESY (Figuras 14, 15 e 16; p. 49 e 50) foi possível verificar as correlações espaciais entre os H-5 e H-8 com o H-15 e do H-11 com as metoxilas 2-OCH<sub>3</sub> e 10-OCH<sub>3</sub>.

A análise dos espectros de RMN HSQC (Figuras 17, 18 e 19; p. 50 e 51) e HMBC (Figuras 20, 21, 22 e 23; p. 52, 53, 54 e 55) permitiu atribuir e confirmar as conectividades entre os hidrogênios e carbonos.

Pelo espectro de RMN HMBC foi possível verificar as correlações entre H-14 e os C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-12 ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e C-13 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), do H-15 com os C-6 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-7 ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e C-8 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), dos Ha-13 e Hb-13 com C-12 ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e C-14 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), além do Hb-13 com C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), do H-8 com os C-6 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-7 ( $^2J_{\text{HC}}$ ), C-9 ( $^2J_{\text{HC}}$ ), C-10 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-15 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), do H-5 com os C-1 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-3 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-4 ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e C-7 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e, do H-11 com os C-1 ( $^2J_{\text{HC}}$ ), C-2 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-6 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-9 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-10 ( $^2J_{\text{HC}}$ ). Observou-se também no espectro de RMN HMBC as correlações entre a metoxila 10-OCH<sub>3</sub> com os C-10 e C-11 e, da 3-OCH<sub>3</sub> com o C-3, confirmando assim a posição das mesmas.

Após vasta revisão na literatura não foram encontrados relatos desta proposta de estrutura. A tabela 2 abaixo contem os valores de descolamento químico observados nos espectros de RMN 1D e 2D (p. 45). Portanto, este é o primeiro relato dessa substância, sendo esta nomeada eglersina (**I**).

**Tabela 2** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (I).

	Substância (I)		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC $^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$
<b>C</b>			
1	128,48	-	-
2	150,92	-	-
3	151,65	-	-
4	143,13	-	-
6	129,95	-	-
7	147,86	-	-
9	181,68	-	-
10	156,14	-	-
12	138,35	-	-
<b>CH</b>			
5	125,11	7,59 (1H, s)	C-1; C-3; C-4; C-7
8	132,16	6,99 (1H, s)	C-6; C-7; C-9; C-10; C-15
11	108,80	7,80 (1H, s)	C-1; C-2; C-6; C-9; C-10
<b>CH<sub>2</sub></b>			
13	115,97	5,21 (1H, s/, Ha-13) 5,15 (1H, s/, Hb-13)	C-12; C-14; C-4 (Hb-13)
<b>CH<sub>3</sub></b>			
14	22,00	2,12 (3H, s)	C-4; C-12; C-13
15	26,33	2,57 (3H, s)	C-6; C-7; C-8
<b>2-OCH<sub>3</sub></b>	60,31	3,90 (3H, s)	-
<b>3-OCH<sub>3</sub></b>	59,83	3,85 (3H, s)	C-3
<b>10-OCH<sub>3</sub></b>	54,76	3,88 (3H, s)	C-10; C-11

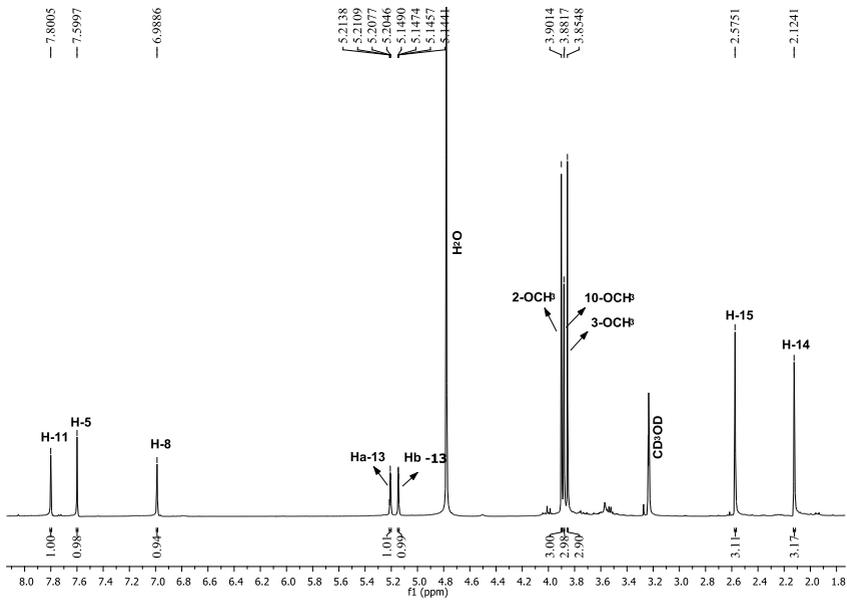


Figura 8 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.

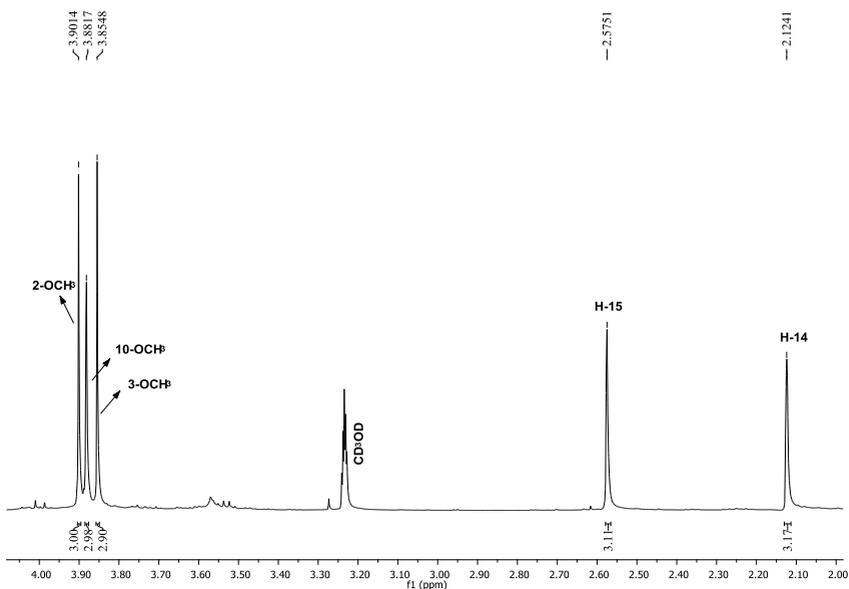


Figura 9 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre  $\delta_{\text{H}}$  2,00-4,00 ppm.

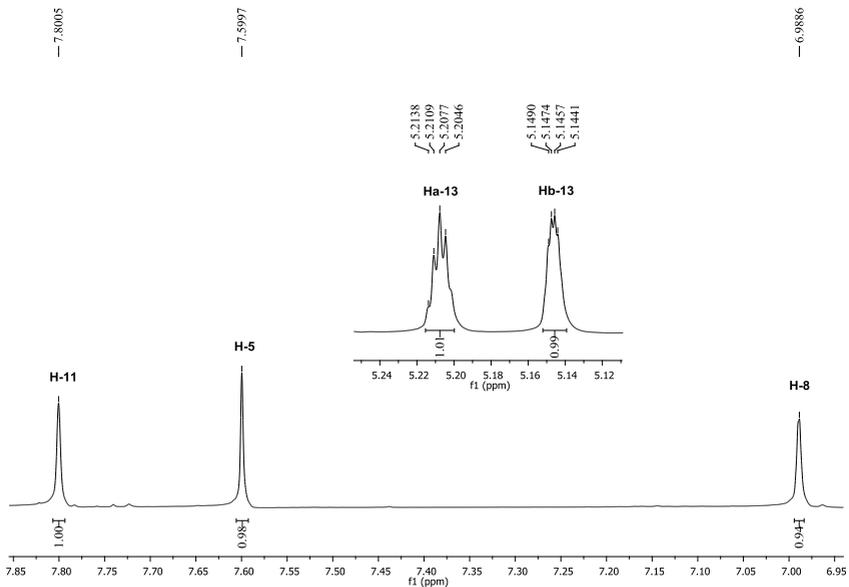


Figura 10 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre  $\delta_{\text{H}}$  6,96-7,85 ppm.

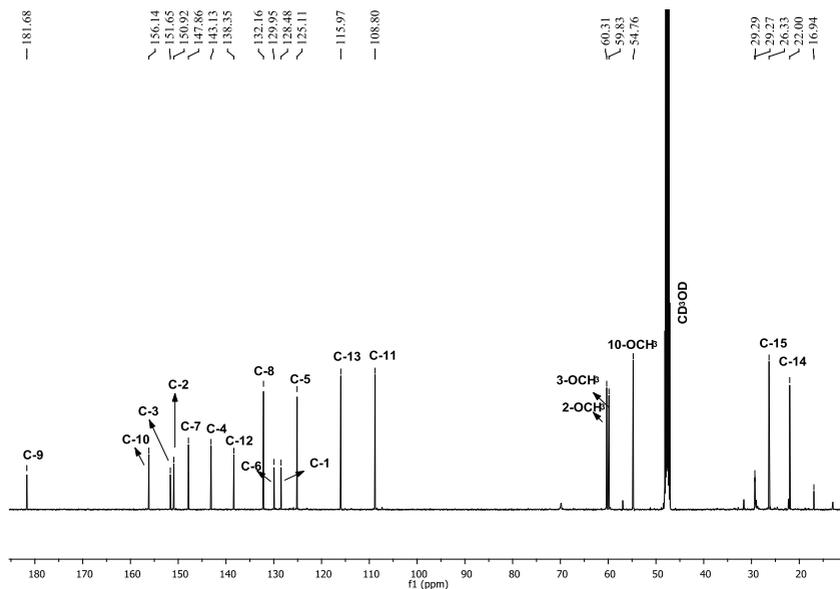


Figura 11 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.

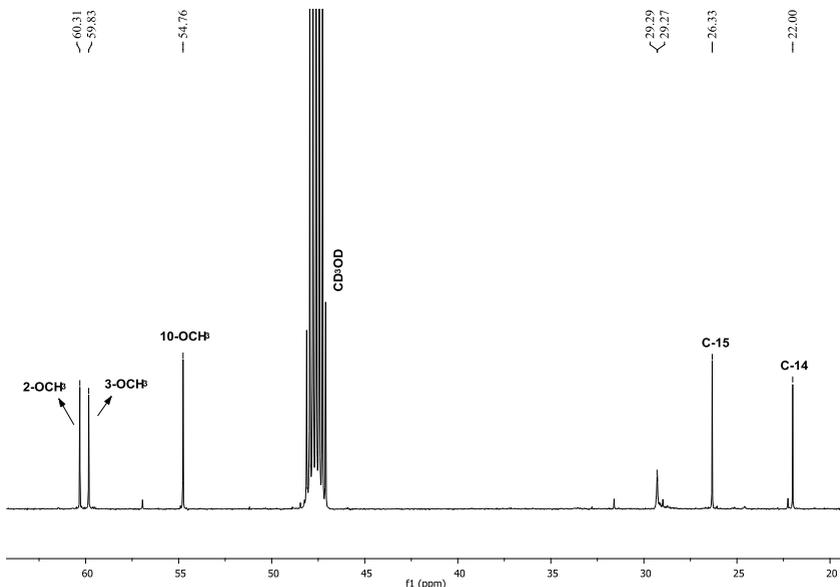


Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre  $\delta_{\text{C}}$  20-60 ppm.

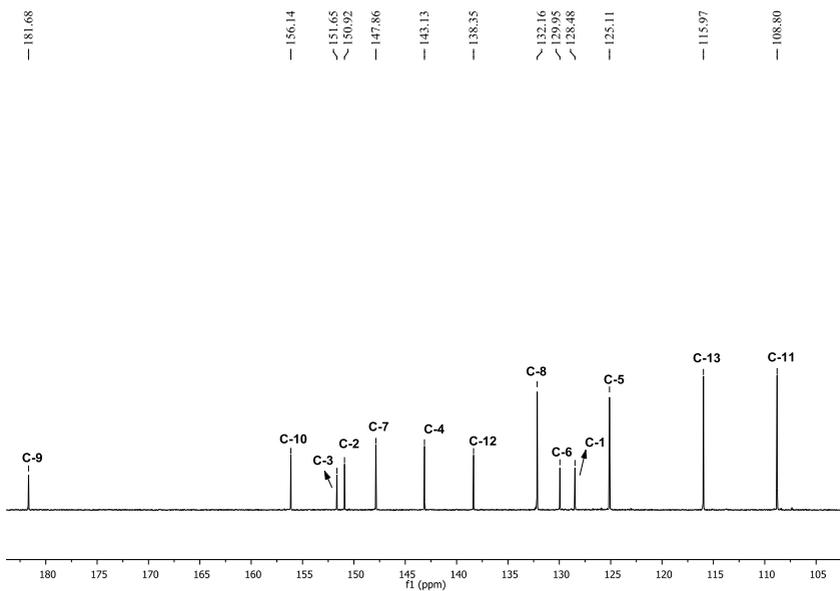
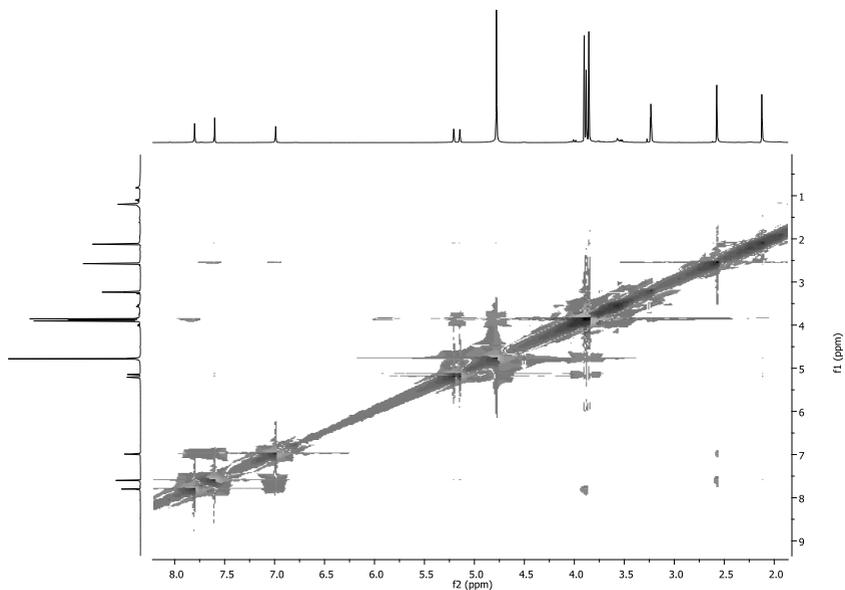
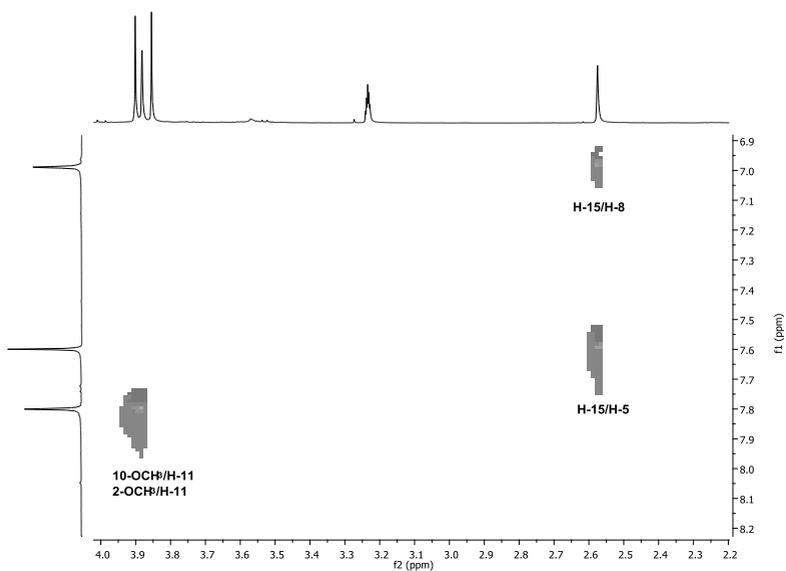


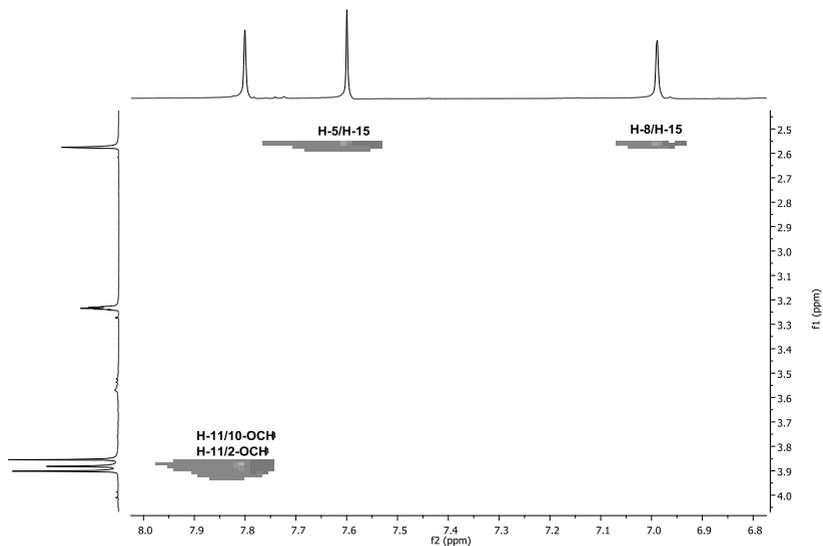
Figura 13 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre  $\delta_{\text{C}}$  105-180 ppm.



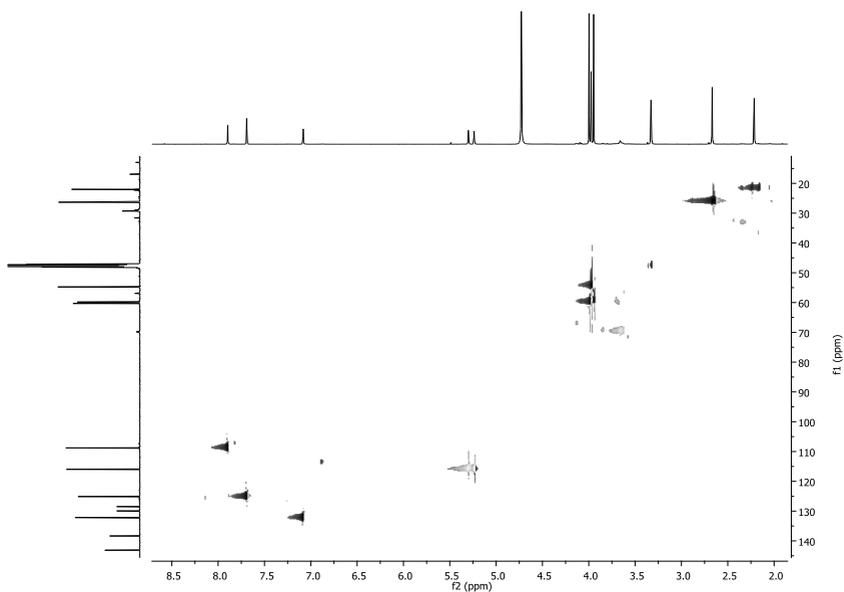
**Figura 14** – Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I.



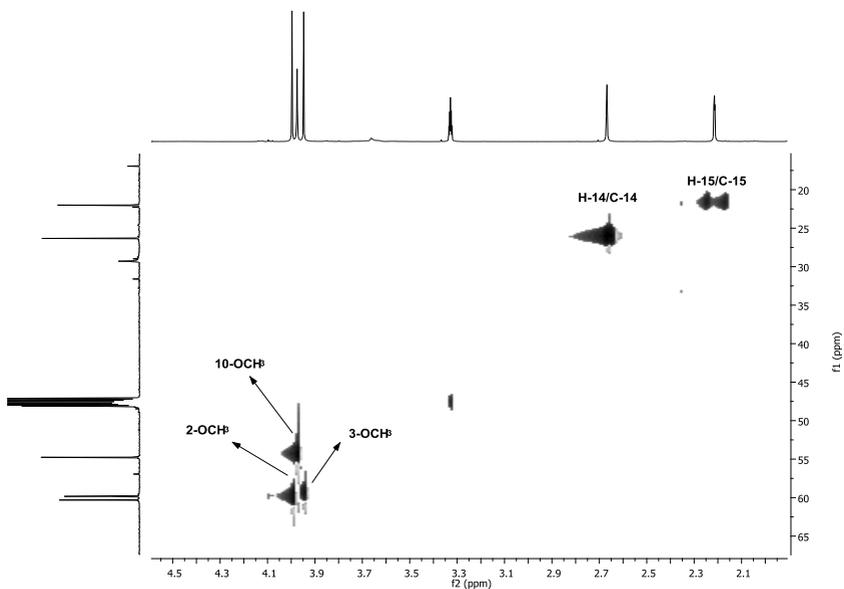
**Figura 15** – Expansão do espectro de RMN NOESY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  2,2-4,0 ppm.



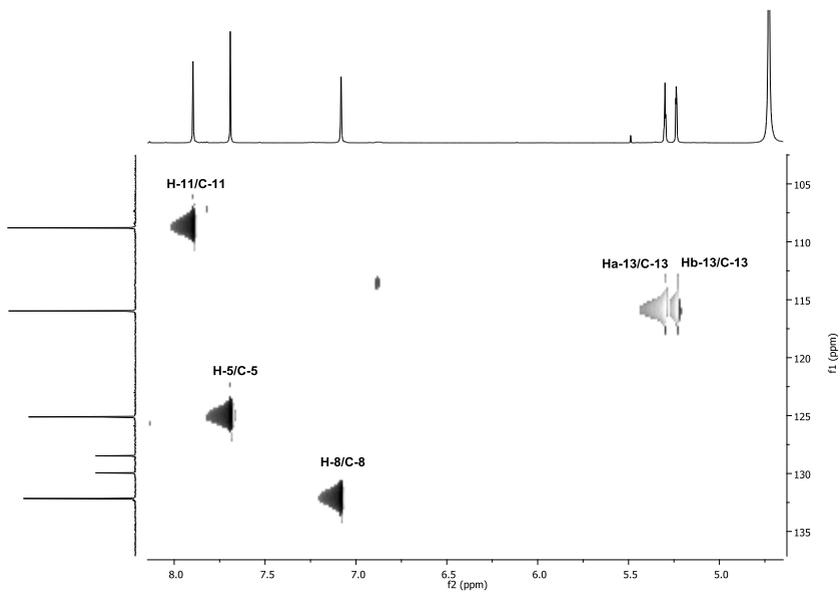
**Figura 16** – Expansão do espectro de RMN NOESY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  6,8-8,0 ppm.



**Figura 17** – Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I.



**Figura 18** - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  2,1-4,5 e  $\delta_C$  20-65 ppm.



**Figura 19** - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  4,6-8,2 e  $\delta_C$  105-135 ppm.

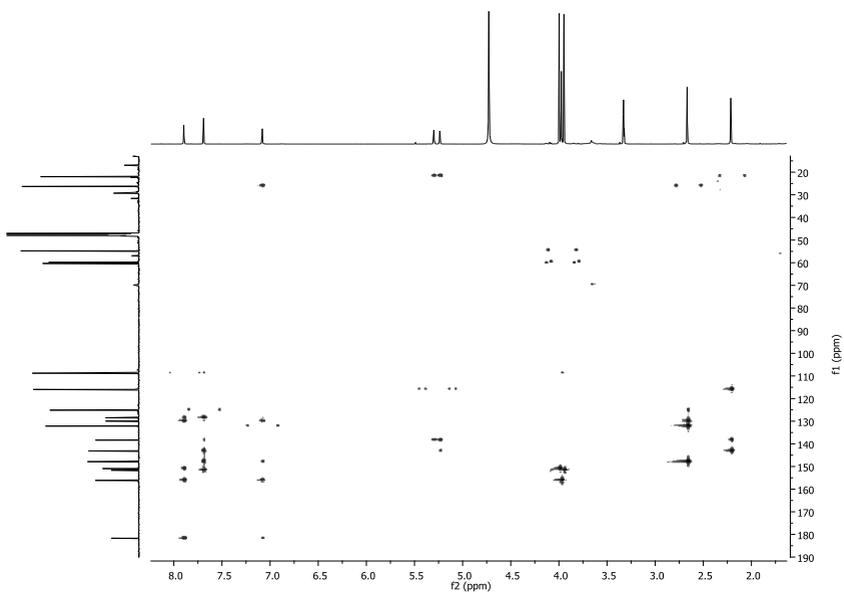
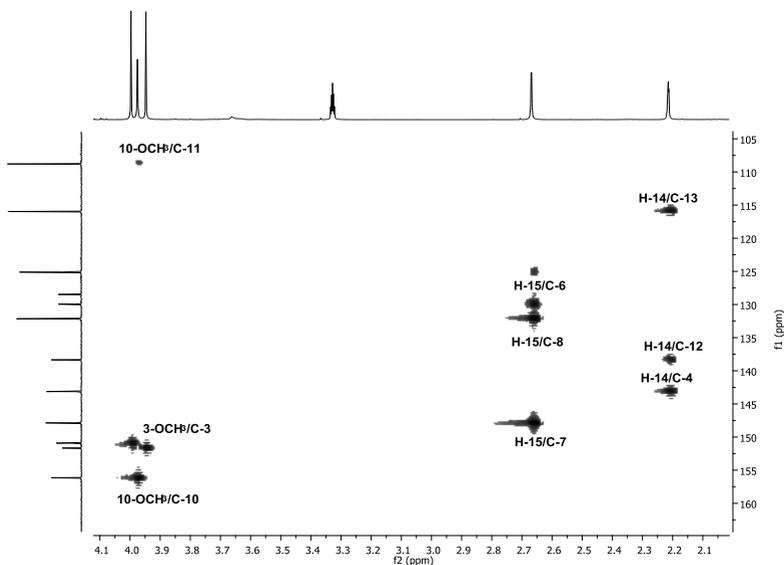
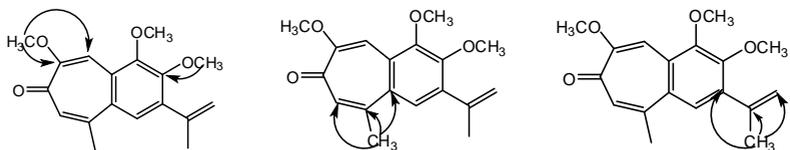
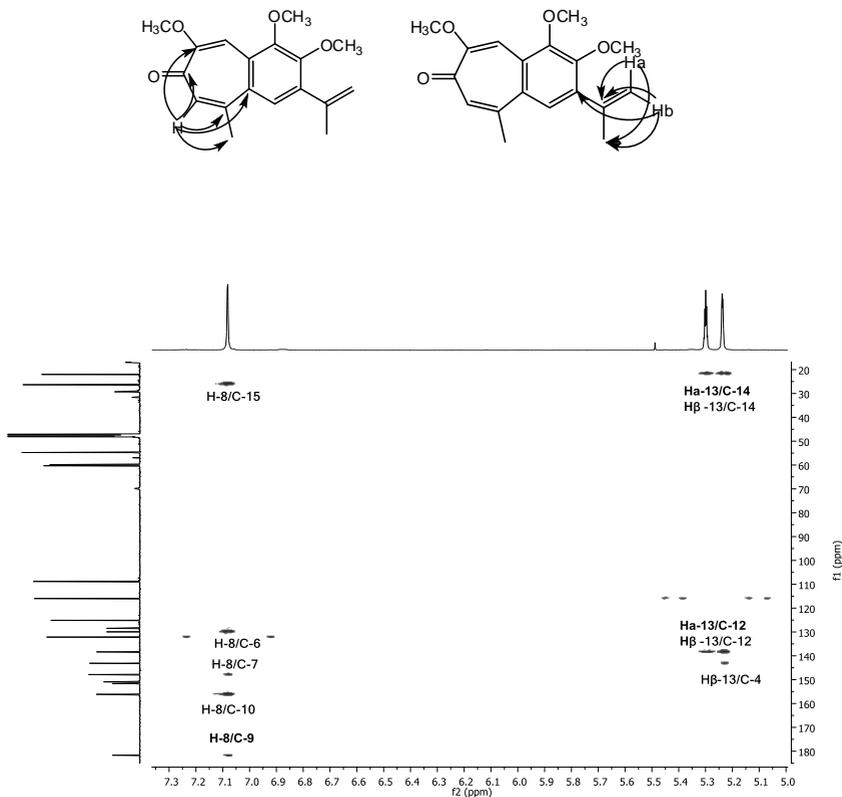


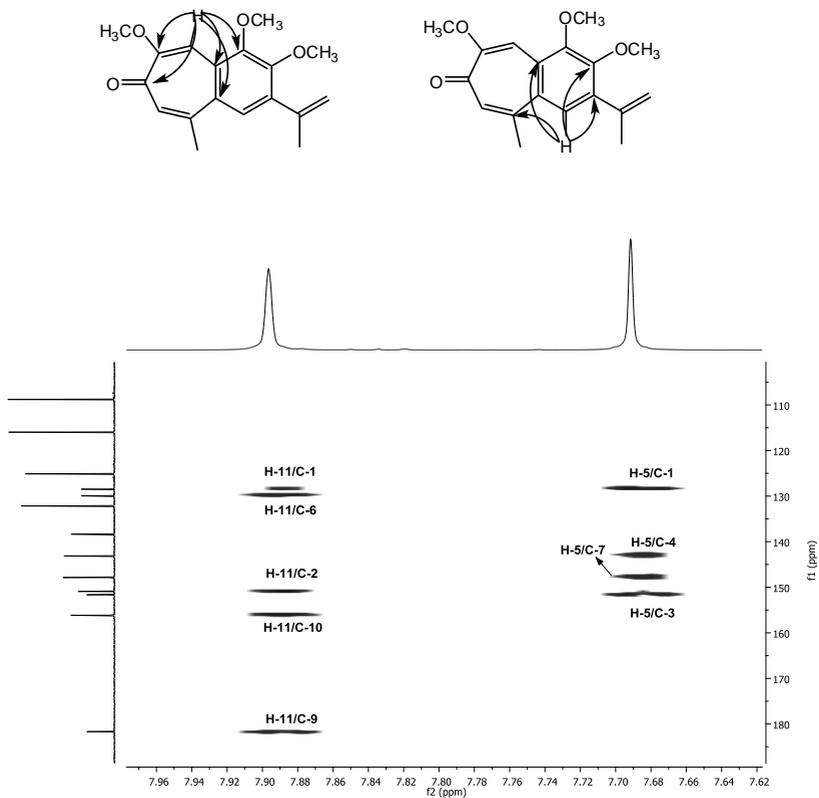
Figura 20 – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I.



**Figura 21** - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de I, entre  $\delta_{\text{H}}$  2,1-4,1 e  $\delta_{\text{C}}$  105-160 ppm e principais correlações observadas para I.



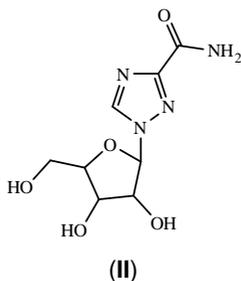
**Figura 22** - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  5,0-7,3 e  $\delta_C$  20-190 ppm e principais correlações observadas para I.



**Figura 23** - Expansão do espectro de RMN (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de I, entre  $\delta_H$  7,62-7,96 e  $\delta_C$  110-180 ppm e principais correlações observadas para I.

### 6.3.2 Identificação da substância II

A substância **II**, isolada na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol, foi identificada através das análises de espectros de RMN 1D e 2D e, comparação com valores descritos na literatura (GRANCHER et al., 2005; LIU et al., 2009), como sendo o nucleosídeo ribavirina.



No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figuras 24, 25 e 26; p. 58 e 59) observaram-se três sinais de simpletos com  $\delta_H$  8,20 (1H, s, H-5), 8,13 (1H, s, -NH) e 8,32 (1H, s, -NH), um duplete em 5,98 (1H, d, J= 6.2 Hz, H-1'), além de vários sinais entre  $\delta_H$  3,76 á 4,34 ppm referentes a unidade glicosídica. Os sinais observados acima de  $\delta_H$  8,0 ppm sugeriram a presença de anel heterocíclico.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figuras 27 e 28; p. 59 e 60) observaram-se oito sinais, sendo que cinco foram atribuídos à unidade glicosídica  $\delta_C$  62,05 (C-5'), 71,22 (C-3'), 74,11 (C-2'), 86,75 (C-4') e 89,87(C-1'). O sinal com  $\delta_C$  140,57 (C-5) foi atribuído ao carbono metínico da estrutura, os outros dois sinais  $\delta_C$  152,27 (C-3) e 162,18 (C-6) foram atribuídos aos carbonos quaternários, sendo que este último é compatível com grupo amida.

O espectro de RMN COSY (Figuras 29, 30, 31 e 32; p. 60, 61 e 62) confirmou as correlações entre os hidrogênios de -NH, dos acoplamentos

entre H-1' e H-2', do H-2' com H-3', dos H-3' e H-4', do H-4' com H-5', além do acoplamento germinal dos hidrogênios H-5'.

Pelo espectro de RMN HMBC (Figuras 33 e 34; p. 62 e 63) foi possível identificar a correlação do H-1' com os C-2' ( $^2J_{\text{HC}}$ ) e C-5 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), do H-2' com C-1' ( $^2J_{\text{HC}}$ ), do H-3' com C-1' ( $^3J_{\text{HC}}$ ), além do H-5' com C-3' ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-4' ( $^2J_{\text{HC}}$ ), confirmando assim a ligação do anel á unidade glicosídica.

A tabela com os valores de deslocamento químico da substância **II** e sua comparação com dados da literatura estão relacionadas abaixo (Tabela 3, p. 57).

**Tabela 3** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (**II**) e comparação com dados da literatura (GRANCHER et al., 2005; LIU et al., 2009).

	Substância ( <b>II</b> )			Literatura (DMSO- $d_6$ , 400 MHz e $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>					
3	152,27	-	-	156,84	-
6	162,18	-	-	163,13	-
<b>CH</b>					
5	140,57	8,20 (1H, s)		146,52	8,86 (1H, s)
1'	89,87	5,98 (1H, <i>d</i> , J= 6.4 Hz)	C-2'; C-5	91,89	5,81 (1H, <i>d</i> , J= 3.8 Hz)
2'	74,11	4,76 (1H, <i>dd</i> , J= 1.1, 5.2 Hz)	C-1'	74,91	4,35 (1H, <i>q</i> , J= 4.8 Hz)
3'	71,22	4,34 (1H, <i>dd</i> , J= 2.6, 5.0 Hz)	C-1'	70,45	4,13 (1H, <i>q</i> , J= 5.2 Hz)
4'	86,75	4,19 (1H, <i>q</i> , J= 2.5 Hz)	-	85,40	3,95 (1H, <i>q</i> , J= 4.6 Hz)
<b>CH<sub>2</sub></b>					
5'	62,05	3,90 (1H, <i>dd</i> , J= 2.5, 12.5 Hz) 3,76 (1H, <i>dd</i> , J= 2.6, 12.5 Hz)	C-3'; C-4'	61,56	3,60–3,65 (1H, <i>m</i> ) 3,48–3,53 (1H, <i>m</i> )
<b>-NH<sub>2</sub></b>	-	8,13 (1H, s) 8,32 (1H, s)	-	-	7,59 (1H, s) 7,80(1H, s)

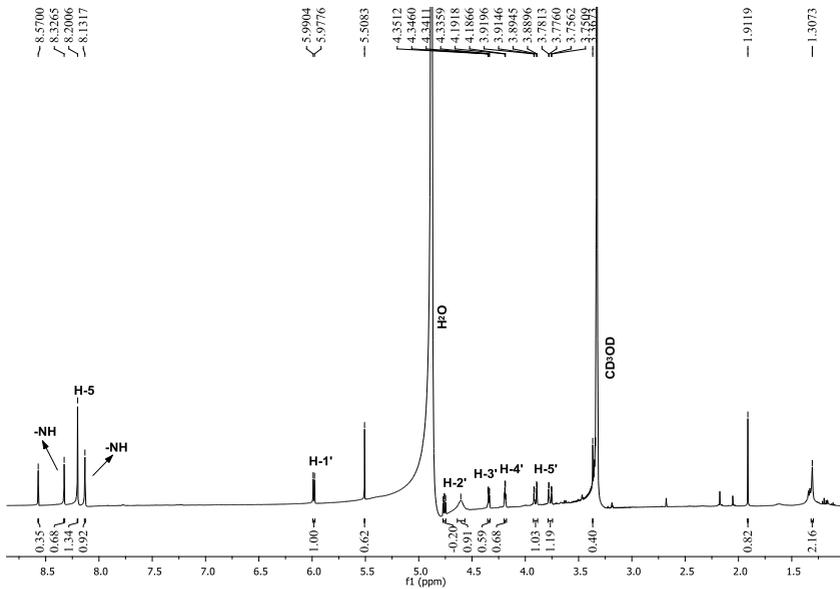


Figura 24 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II.

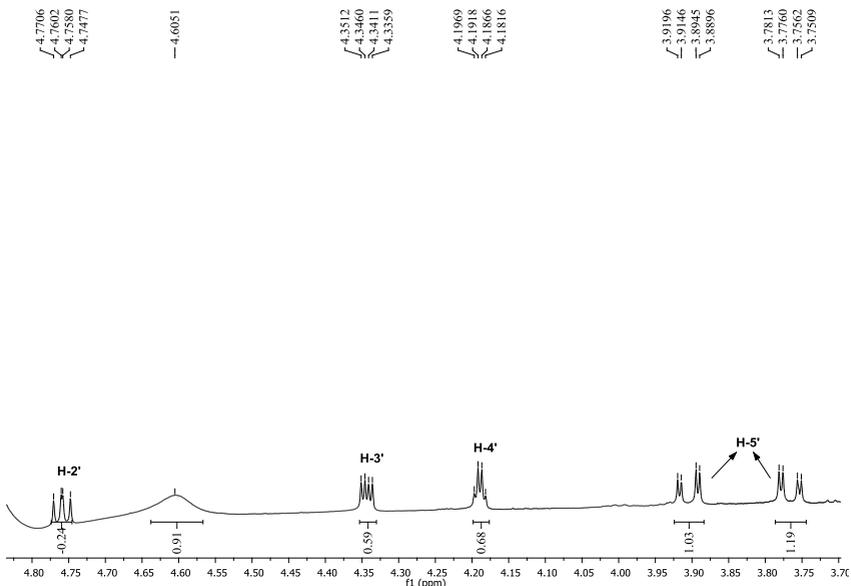


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II, entre  $\delta_{\text{H}}$  3,70-4,80 ppm.

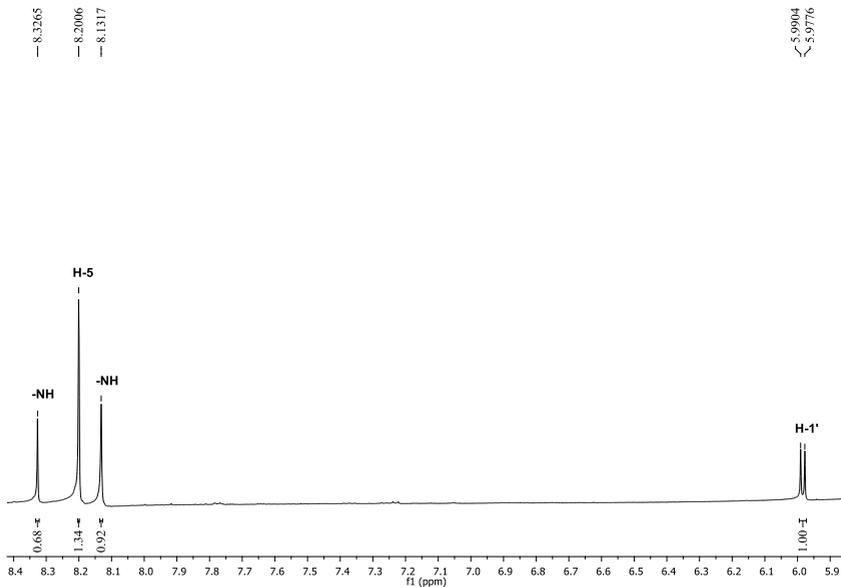


Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II, entre  $\delta_{\text{H}}$  5,9-8,4 ppm.

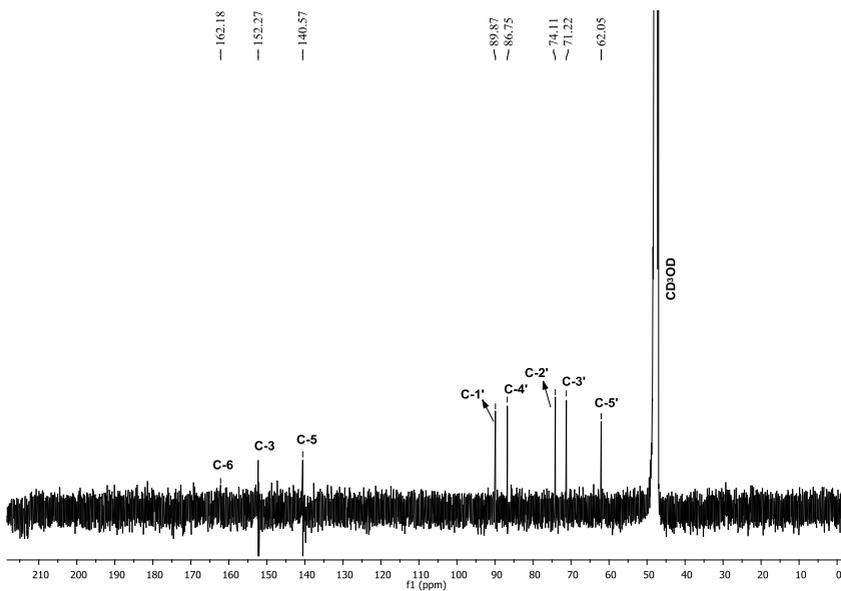


Figura 27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II.

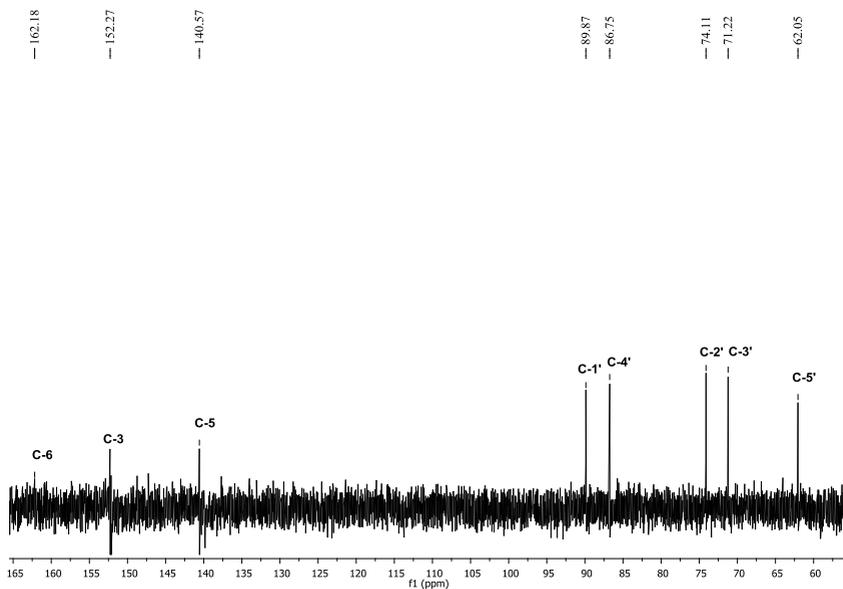


Figura 28 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II, entre  $\delta_{\text{C}}$  60-165 ppm.

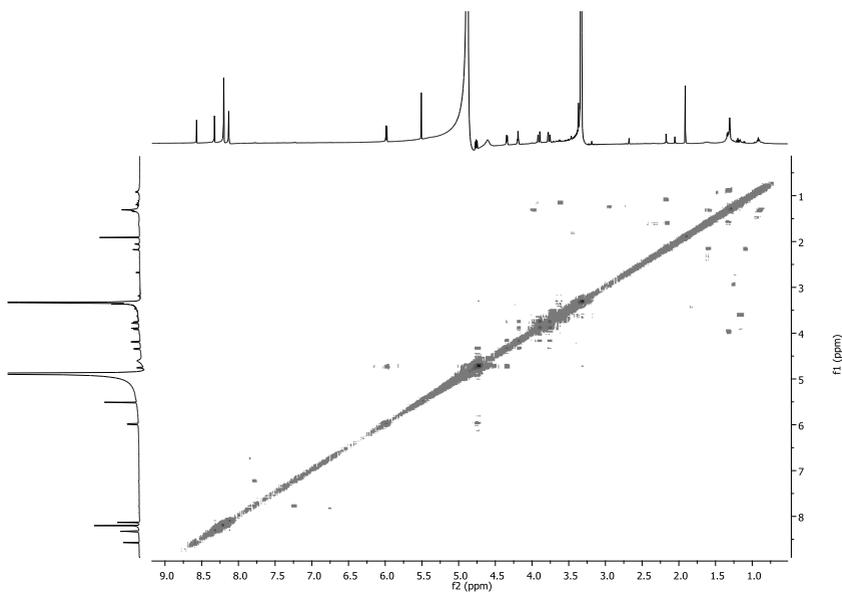
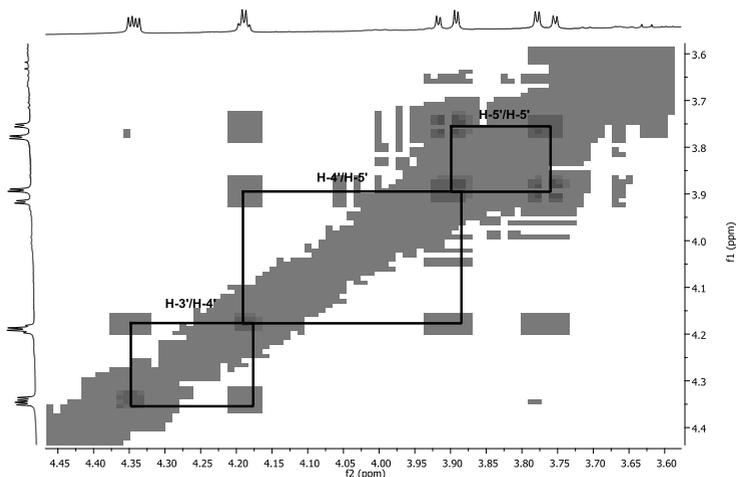
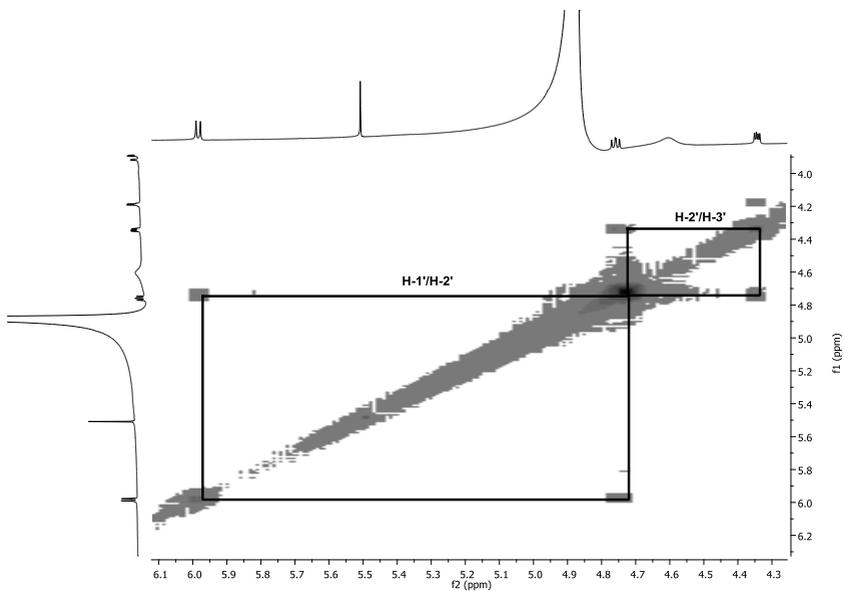


Figura 29 – Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II.



**Figura 30** – Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II, entre  $\delta_{\text{H}}$  3,60-4,45 e  $\delta_{\text{H}}$  3,6-4,4 ppm.



**Figura 31** – Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de II, entre  $\delta_{\text{H}}$  4,3-6,1 e  $\delta_{\text{H}}$  4,0-6,2 ppm.

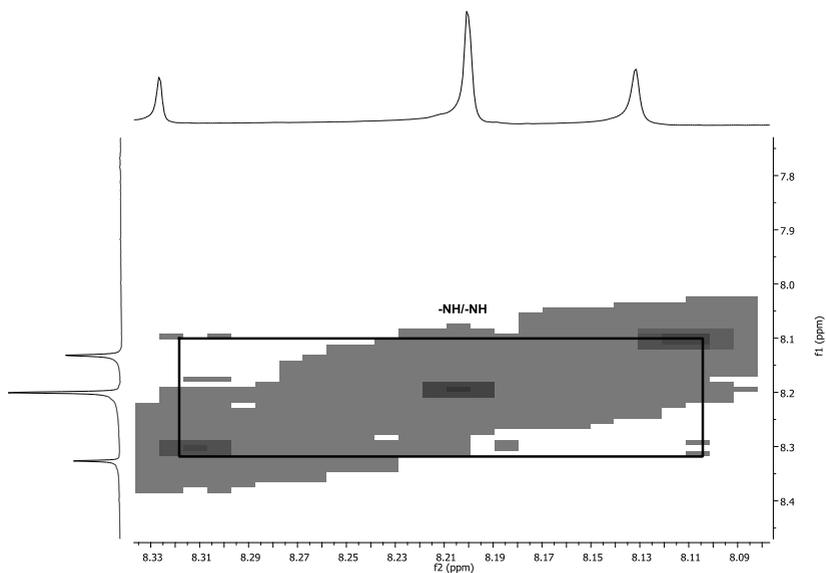


Figura 32 – Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de II, entre  $\delta_H$  8,09-8,33 e  $\delta_H$  7,8-8,4 ppm.

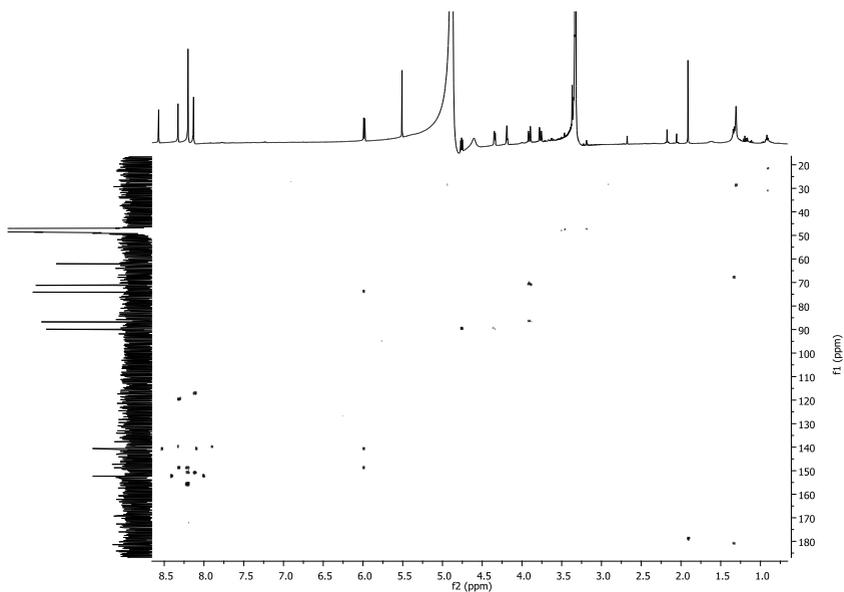
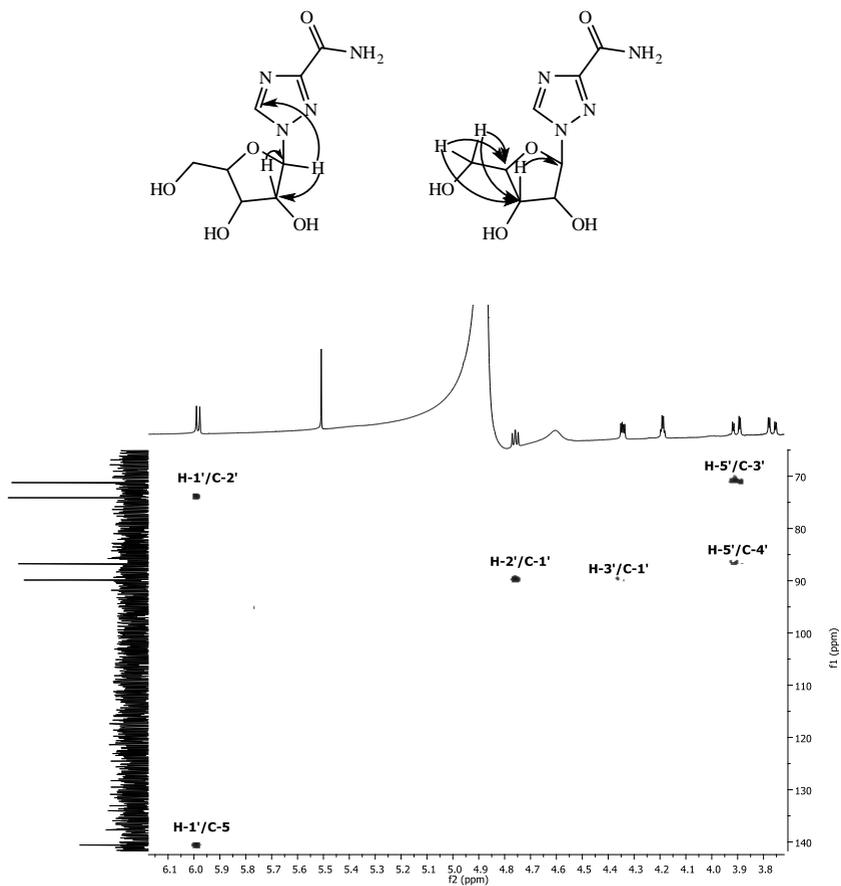


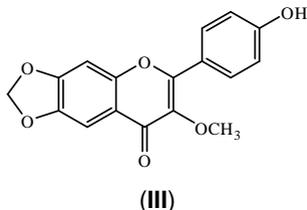
Figura 33 – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de II.



**Figura 34** - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz,  $CD_3OD$ ) de II, entre  $\delta_H$  3,80-6,10 e  $\delta_C$  70-140 ppm.

### 6.3.3 Identificação da substância III

A substância III, isolada na forma de um sólido amarelo, solúvel em dimetilsulfóxido, foi identificada através das análises de espectros de RMN 1D e 2D.



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 35, 36, e 37; p. 67 e 68) observou-se a presença de dois sinais de dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,87 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2'/H-6') e 6,91 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3'/H-5') referentes aos hidrogênios com acoplamento em *orto* e um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  10,23 (1H, *s*, -OH), ambos pertencentes ao anel B do esqueleto flavonoídico. Verificaram-se ainda dois sinais de simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,12 (1H, *s*, H-8) e 6,62 (1H, *s*, H-5) atribuídos ao anel A, além de um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,17 (2H, *s*, O-CH<sub>2</sub>-O, H-11) que indicou um anel do tipo metilenodioxí. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (3H, *s*, -OCH<sub>3</sub>) foi atribuído devido a ausência de sinal para H-3 (simpleto entre 6,80 e 6,40 ppm) corroborando para a proposta do grupamento metoxi em C-3 (SILVA et al., 2005).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 38, 39 e 40; p. 68 e 69) apresentou quinze sinais, que foram atribuídos segundo o valor de seu deslocamento químico aos respectivos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  94,39 (C-8), 105,98 (C-5), 112,98 (C-10) e 121,75 (C-1'), além dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  61,31 (-OCH<sub>3</sub>), 103,0 (C-11), 136,19 (C-6), 152,94 (C-7), 140,63 (C-3), 154,31 (C-9), 160,95 (C-4') e 161,04 (C-2) referentes á carbonos oxigenados, justificando o esqueleto de uma flavona substituída nas posições 3, 6, 7 e 4'. O sinal centrado em  $\delta_{\text{C}}$  176,32 ppm foi relacionado ao grupo carbonila (C-4) e os

sinais em  $\delta_c$  116,31 e 128,33 ppm foram atribuídos aos carbonos C-3'/5' e C-2'/6', respectivamente, sendo estes valores característicos de um sistema AA'BB' em anel aromático.

A análise do espectro de RMN COSY (Figuras 41 e 42; p. 70) confirmou o acoplamento entre os sinais de hidrogênios do sistema AA'BB' do anel B do esqueleto flavonoídico.

Os espectros de RMN HSQC (Figuras 43 e 44; p. 71) e HMBC permitiram atribuir e confirmar as conectividades entre os hidrogênios e carbonos na estrutura.

Pelo espectro de RMN HMBC (Figuras 45, 46, 47 e 48; p. 72, 73, 74 e 75) foi possível verificar as correlações entre o H-11 e os C-6 ( $^2J_{HC}$ ) e C7 ( $^2J_{HC}$ ) confirmando a posição do anel metilenodioxí e, a posição do grupo hidroxí (-OH) pelo acoplamento deste com os C-3' ( $^3J_{HC}$ ), C-5' ( $^3J_{HC}$ ) e C-4' ( $^2J_{HC}$ ). Também foram observadas as correlações entre os hidrogênios do sistema aromático, sendo estas, do H-5 com os C-4 ( $^3J_{HC}$ ) e C-10 ( $^2J_{HC}$ ), do H-3' com os C-1' ( $^3J_{HC}$ ), C-4' ( $^2J_{HC}$ ) e C-5' ( $^3J_{HC}$ ), do H-5' com os C-1' ( $^3J_{HC}$ ), C-3' ( $^3J_{CH}$ ) e C-4' ( $^2J_{HC}$ ), do H-8 com os C-6 ( $^3J_{HC}$ ), C-7 ( $^2J_{HC}$ ) e C-10 ( $^3J_{HC}$ ), do H-2' com os C-2 ( $^3J_{HC}$ ), C-3' ( $^2J_{HC}$ ) e C-6' ( $^3J_{HC}$ ), do H-6' com os C-2 ( $^3J_{HC}$ ), C-2' ( $^3J_{HC}$ ) e C-5' ( $^2J_{HC}$ ), além de confirmar a posição da -OCH<sub>3</sub> pelo acoplamento desta com o C-3 ( $^3J_{HC}$ ).

Após ampla revisão na literatura, não foram encontradas descrições desta proposta de estrutura. A tabela 4 abaixo contem os valores de descolamento químico observados nos espectros de RMN 1D e 2D (p. 66). Com isso, este é o primeiro relato dessa substância, sendo esta denominada 3-metoxi-6,7-metilenodioxí-4'-hidroxiflavona (III).

**Tabela 4** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância (III).

	Substância (III)		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$
<b>C</b>			
2	161,04	-	-
3	140,63	-	-
4	176,32	-	-
6	136,19	-	-
7	152,94	-	-
9	154,31	-	-
10	112,98	-	-
1'	121,75	-	-
4'	160,95	-	-
<b>CH</b>			
5	105,98	6,62 (1H, s)	C-4; C-10
8	94,39	7,12 (1H, s)	C-6; C-7; C-10
2'	128,33	7,87 (2H, d, J= 8.8 Hz)	C-2; C-3'; C-6'
3'	116,31	6,91 (2H, d, J= 8.8 Hz)	C-1'; C-4'; C-5'
5'	116,31	6,91 (2H, d, J= 8.8 Hz)	C-1'; C-3'; C-4'
6'	128,33	7,87 (2H, d, J= 8.8 Hz)	C-2; C-2'; C-5'
<b>CH<sub>2</sub></b>			
11	103,0	6,17 (2H, s)	C-6; C7
<b>-OH</b>	-	10,23 (1H, s)	C-3'; C-5'; C-4'
<b>-OCH<sub>3</sub></b>	61,31	3,91 (3H, s)	C-3

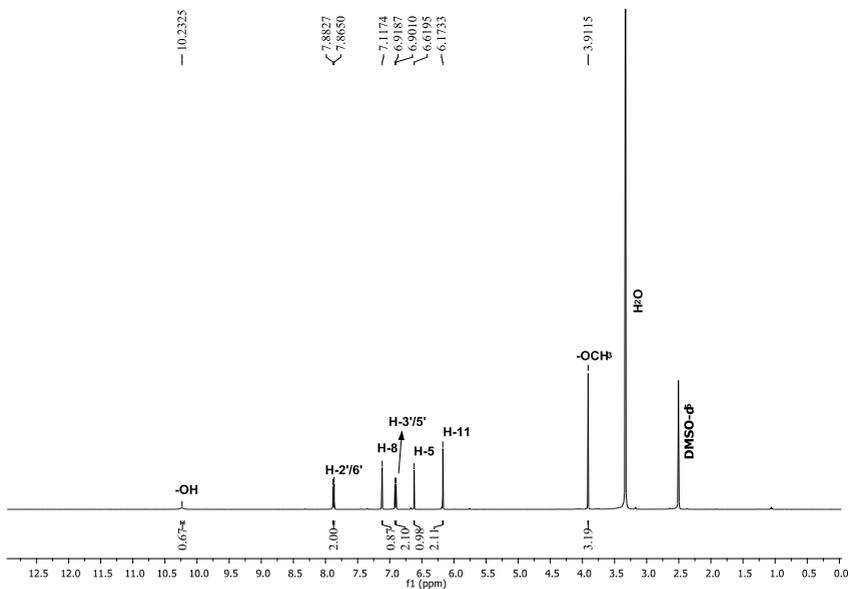


Figura 35 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III.

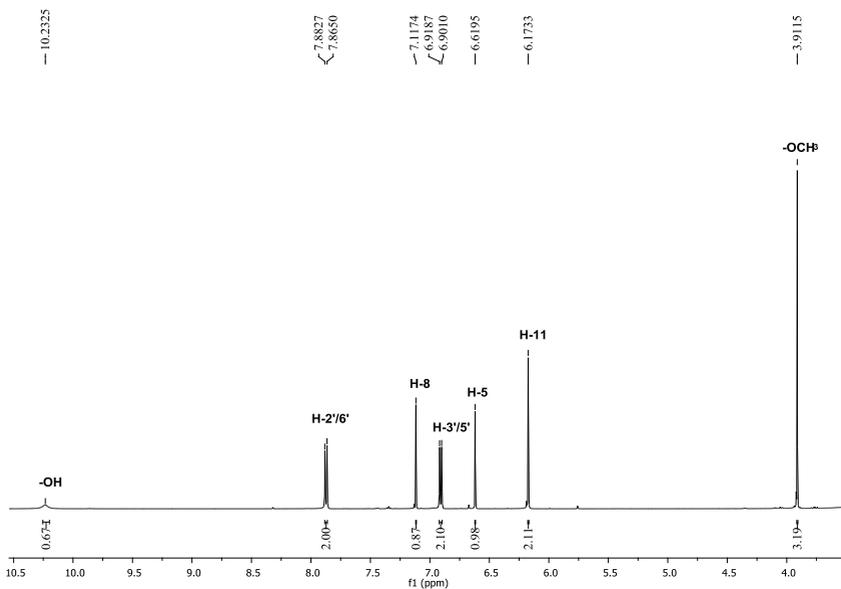


Figura 36 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III, entre  $\delta_{\text{H}}$  4,0-10,5 ppm.

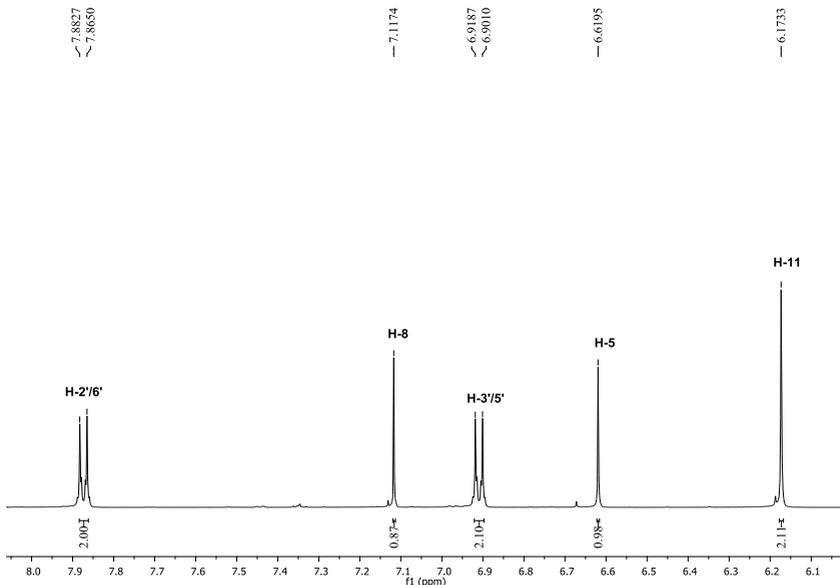


Figura 37 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III, entre  $\delta_{\text{H}}$  6,1-8,0 ppm.

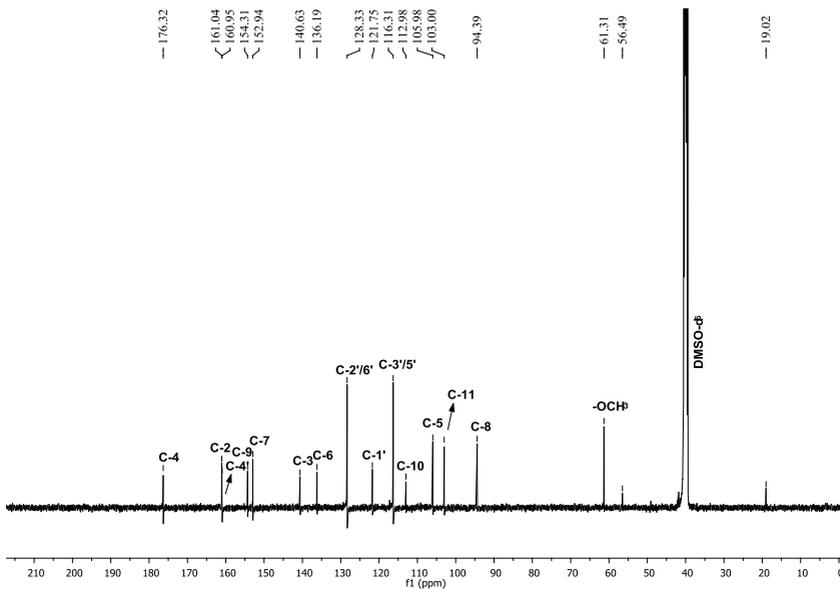
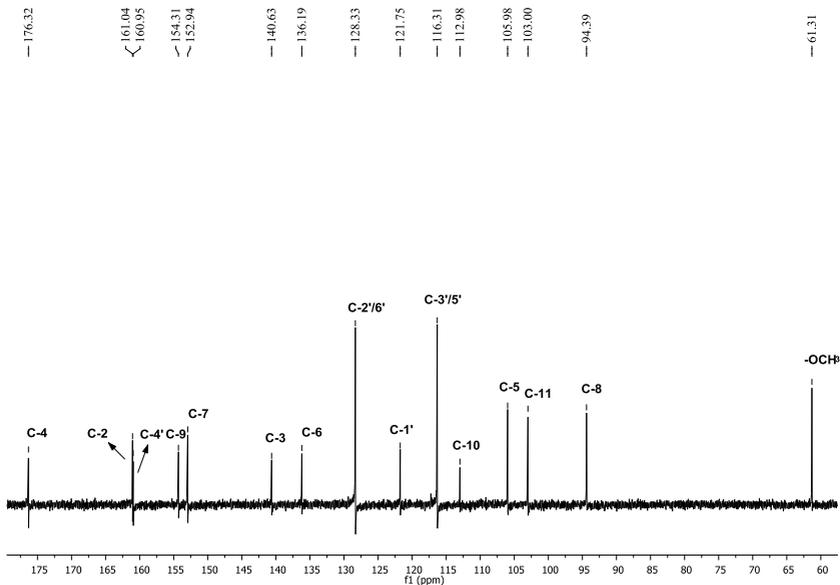
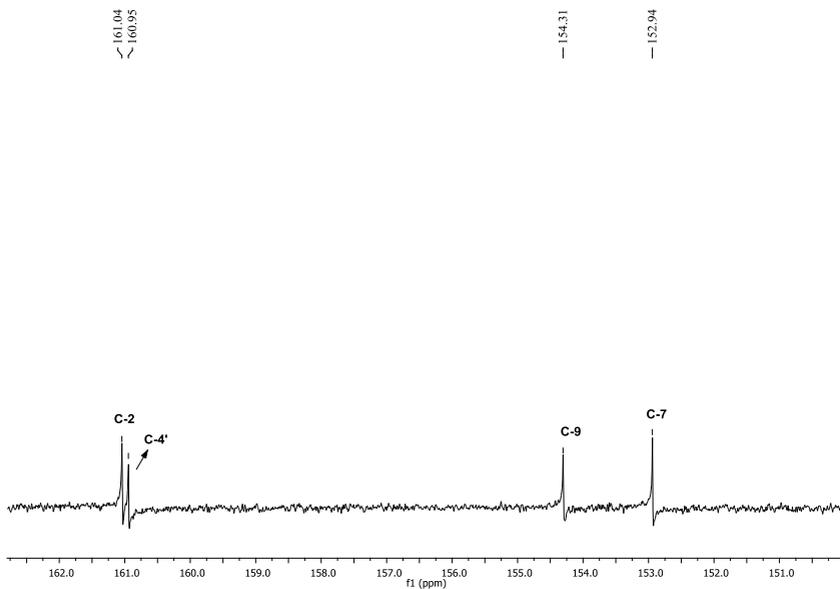


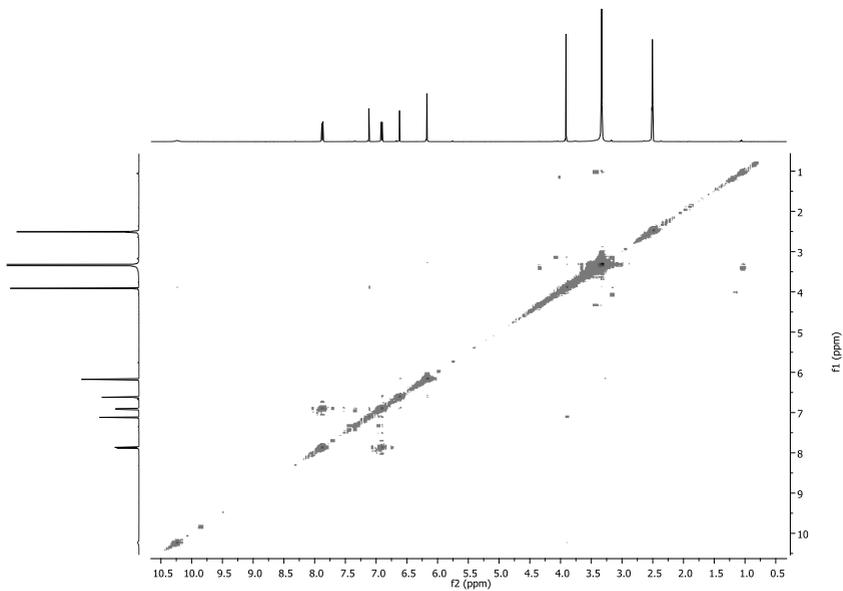
Figura 38 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III.



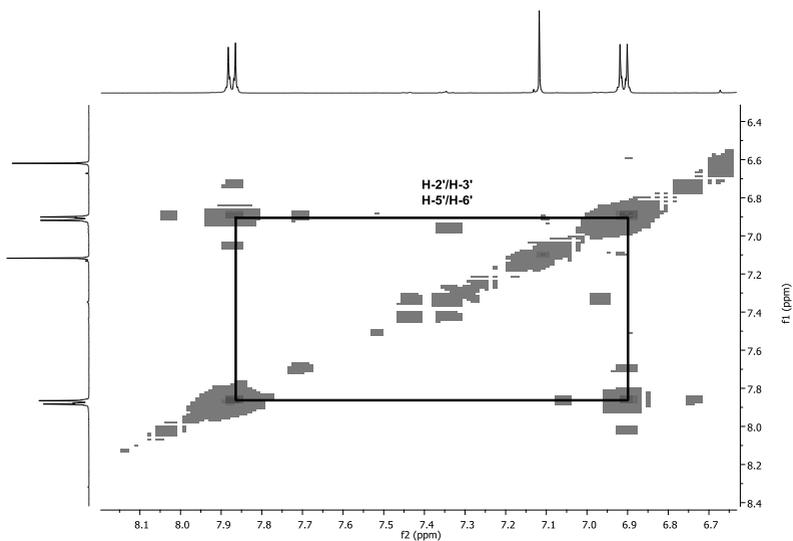
**Figura 39** – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III, entre  $\delta_{\text{C}}$  60-175 ppm.



**Figura 40** – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de III, entre  $\delta_{\text{C}}$  151,0-162,0 ppm.



**Figura 41** – Espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de III.



**Figura 42** – Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de III, entre  $\delta_{\text{H}}$  6,7-8,1 e  $\delta_{\text{H}}$  6,4-8,4 ppm.

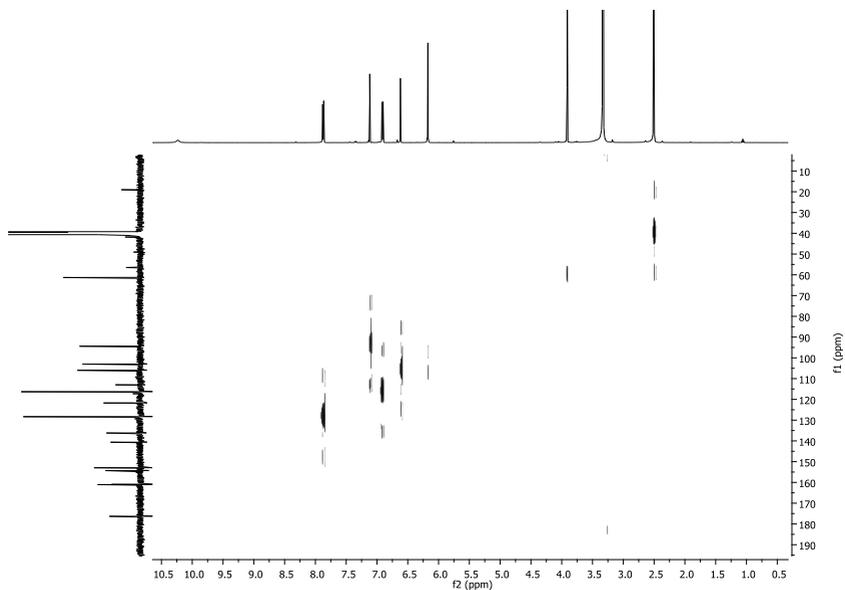


Figura 43 – Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III.

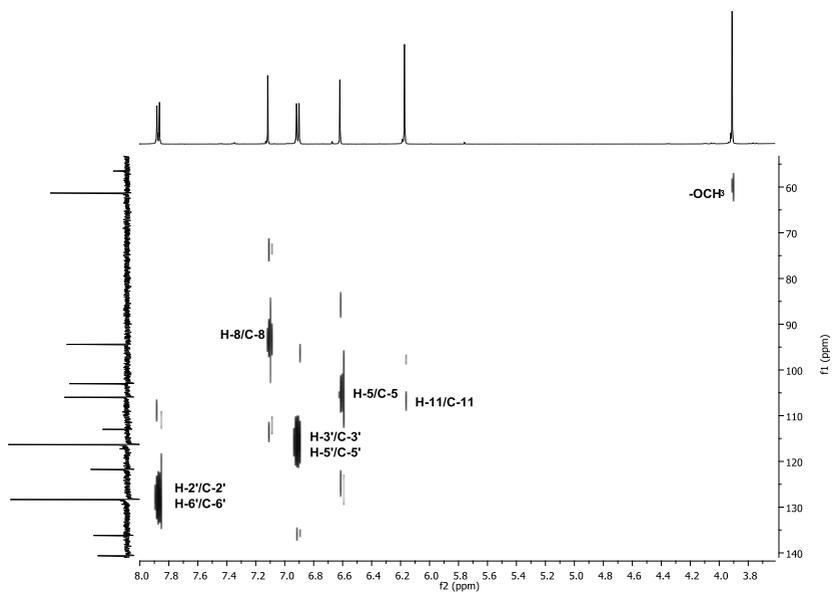


Figura 44 - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre  $\delta_H$  3,8-8,0 e  $\delta_C$  60-140 ppm.

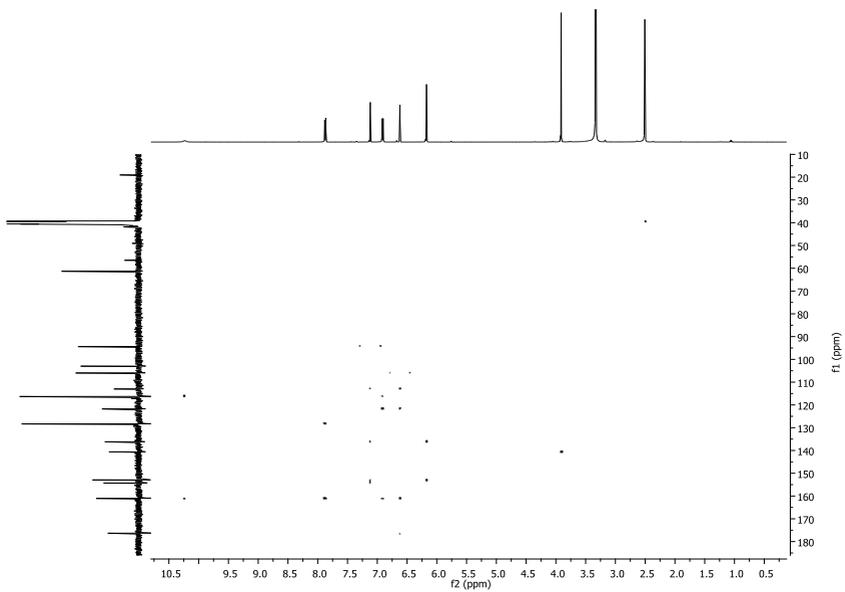
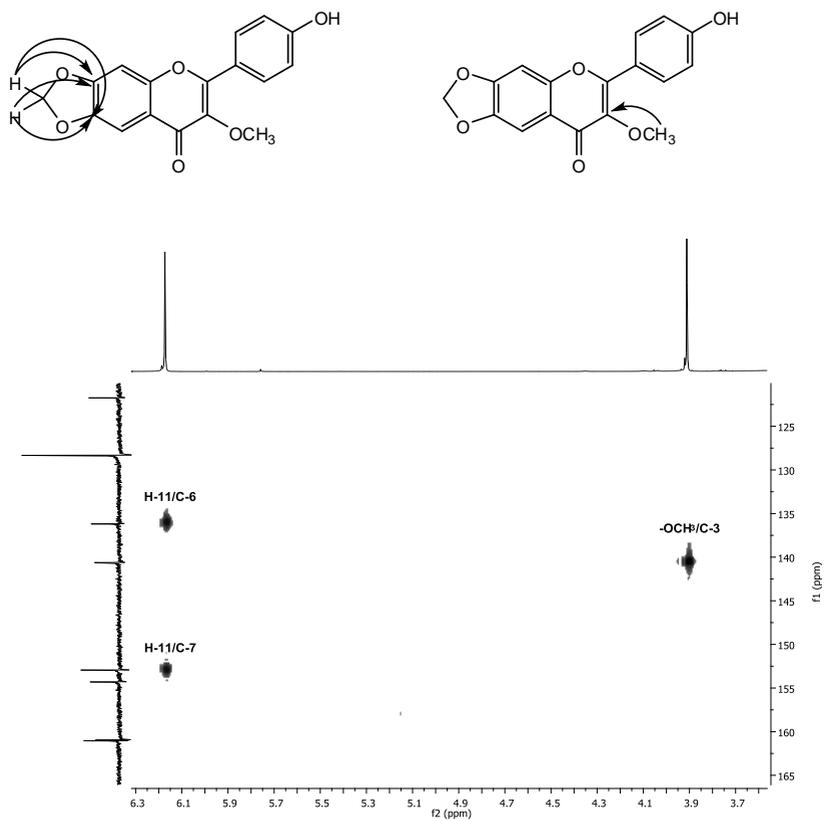
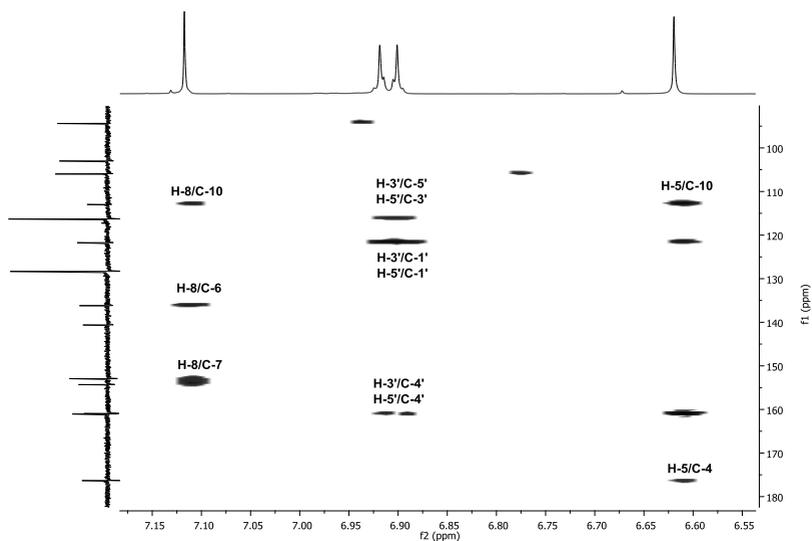
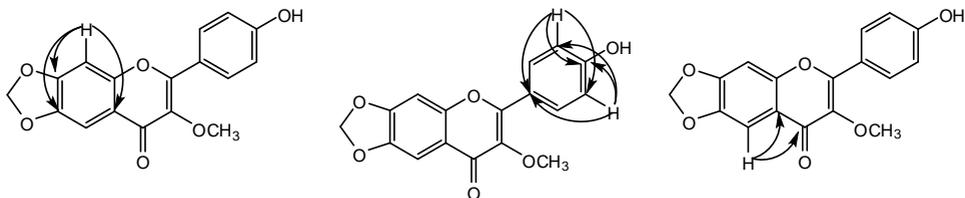


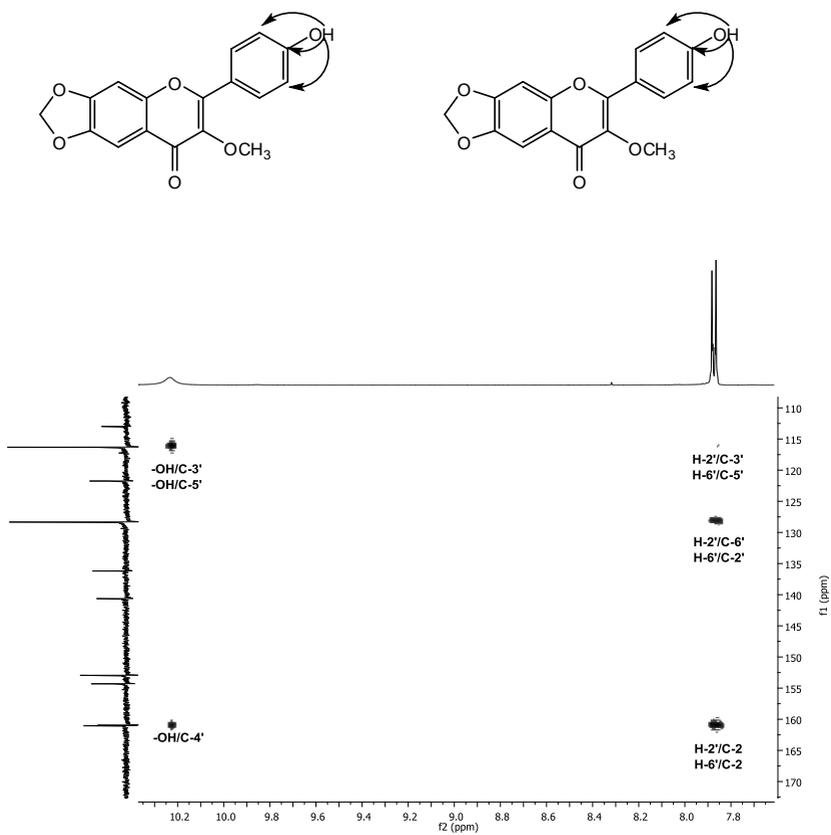
Figura 45 – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de III.



**Figura 46** - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de III, entre  $\delta_H$  3,7-6,3 e  $\delta_C$  125-165 ppm e, principais correlações observadas para III.



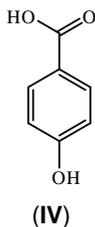
**Figura 47** - Expansão do espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre  $\delta_H$  6,55-7,15 e  $\delta_C$  100-180 ppm e, principais correlações observadas para III.



**Figura 48** - Expansão do espectro de HMBC (500/125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de III, entre  $\delta_H$  7,8-10,2 e  $\delta_C$  110-170 ppm e, principais correlações observadas para III.

### 6.3.4 Identificação da substância IV

A substância **IV**, isolada na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol, foi identificada através das análises de espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e, comparação com os valores descritos na literatura (YAYLI et al., 2003), como sendo o ácido *p*-hidroxibenzoico.

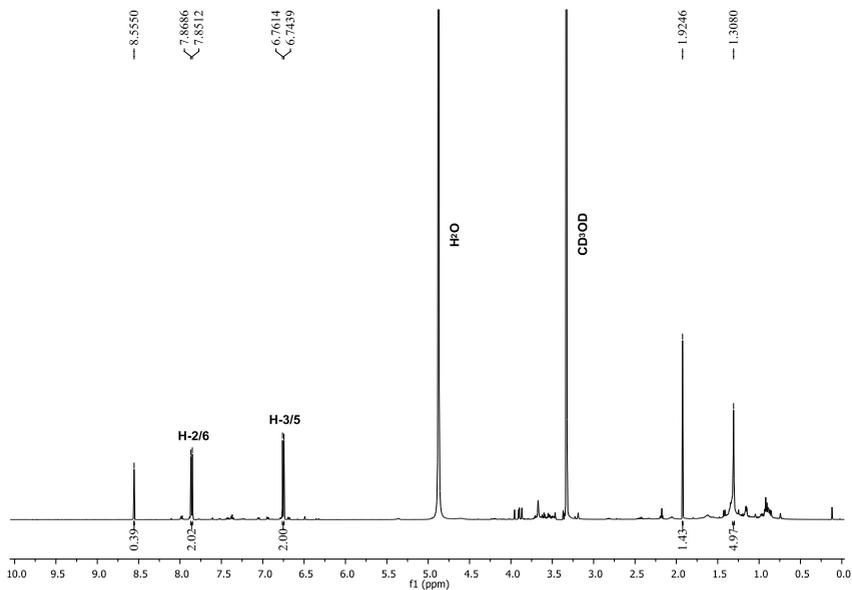


No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 49 e 50; p. 77 e 78) observaram-se dois sinais de dupletos com  $\delta_{\text{H}}$  7,86 (2H, *d*,  $J = 8.7$  Hz, H-2/H-6) e 6,75 (2H, *d*,  $J = 8.7$  Hz, H-3/H-5), estes sinais acoplam-se em *orto*, evidenciando a presença de um anel aromático 1,4 dissustituído.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 51 e 52; p. 78 e 79) o sistema AA'BB' pode ser confirmado pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  130,98 (C-2/6) e 113,90 (C-3/5). Os valores de deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  159,80 ppm é compatível com o carbono fenólico (C-4) e o  $\delta_{\text{C}}$  127,34 ppm é coerente com o carbono quaternário (C-1). A presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  174,70 ppm no espectro confirma a existência do grupo carboxílico (C-7,COOH) (Tabela 5, p. 77).

**Tabela 5** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância (**IV**) e comparação com dados da literatura (YAYLI et al., 2003).

C	Substância ( <b>IV</b> )		Literatura ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 e 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	127,34	-	122,91	-
2	130,98	7,86 (2H, <i>d</i> , J= 8.7 Hz)	132,98	7,86 (2H, <i>d</i> , J= 8.8 Hz)
3	113,90	6,75 (2H, <i>d</i> , J= 8.7 Hz)	115,99	6,80 (2H, <i>d</i> , J= 8.8 Hz)
4	159,80	-	163,30	-
5	113,90	6,75 (2H, <i>d</i> , J= 8.7 Hz)	115,99	6,80 (2H, <i>d</i> , J= 8.8 Hz)
6	130,98	7,86 (2H, <i>d</i> , J= 8.7 Hz)	132,98	7,86 (2H, <i>d</i> , J= 8.8 Hz)
7 (COOH)	174,70	-	179,18	-



**Figura 49** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **IV**.

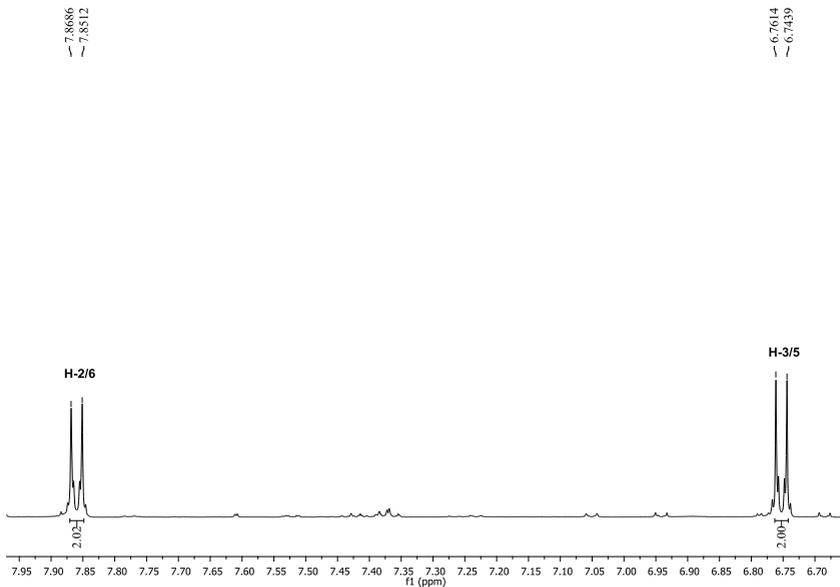


Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV, entre  $\delta_{\text{H}}$  6,70-7,95 ppm.

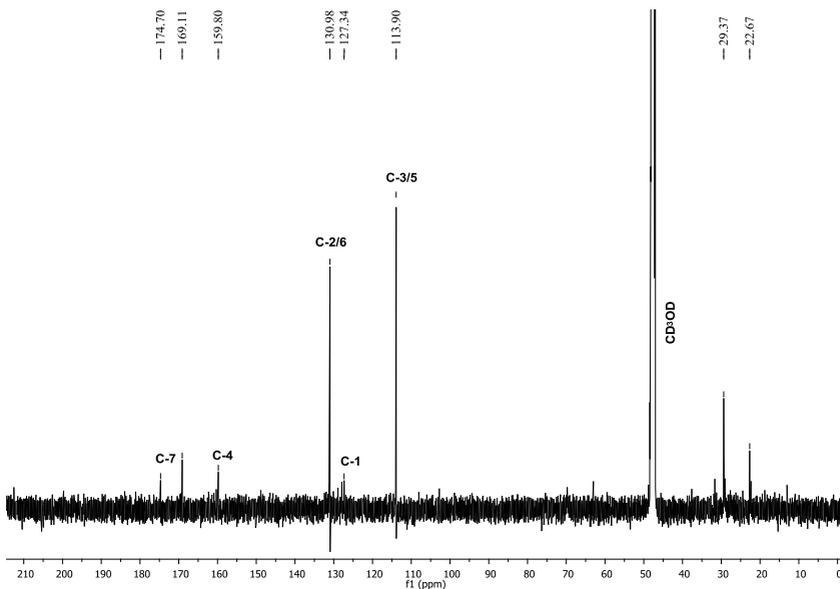


Figura 51 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV.

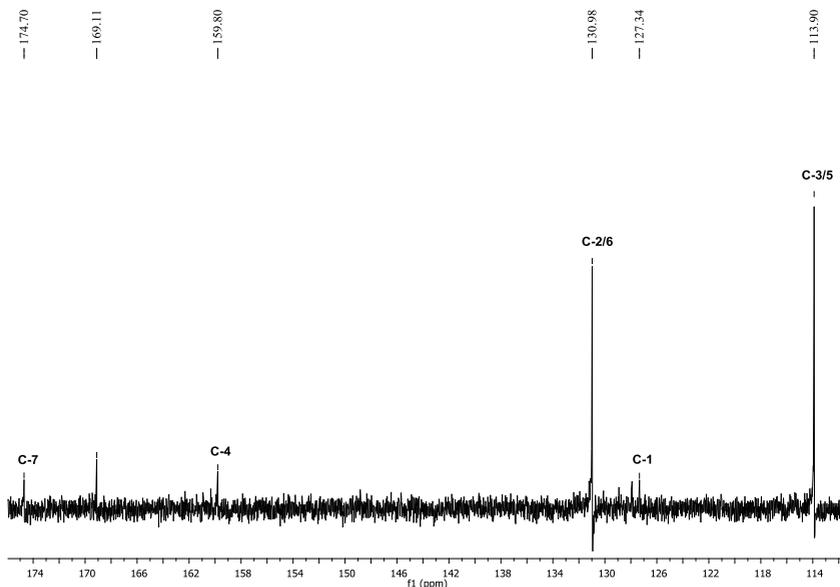
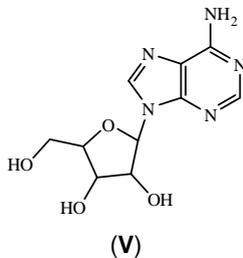


Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de IV, entre  $\delta_{\text{C}}$  114-174 ppm.

### 6.3.5 Identificação da substância V

A substância **V**, isolada na forma de um sólido branco, solúvel em água, foi identificada através das análises de espectros de RMN 1D e 2D e, comparação com os valores descritos na literatura (YING et al., 2013), como sendo o nucleosídeo adenosina.



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 53, 54 e 55; p. 81 e 82) observaram-se três sinais de simpletos  $\delta_{\text{H}}$  8,13 (2H, *sl*, -NH<sub>2</sub>), 8,14 (1H, *sl*, H-2) e 8,24 (1H, *sl*, H-8), um duplete em 5,98 (1H, *d*, J= 6.2 Hz, H-1'), além de vários sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  3,73 a 4,34 ppm. Os sinais observados acima de  $\delta_{\text{H}}$  8,0 ppm foram sugestivos para anéis heterocíclicos.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 56 e 57; p. 83) foram observados dez sinais, sendo que cinco foram atribuídos à unidade glicosídica  $\delta_{\text{C}}$  61,48 (C-5'), 70,62 (C-3'), 73,60 (C-2'), 85,84 (C-4') e 88,29 (C-1') e os outros cinco para o sistema heterocíclico aromático nitrogenado  $\delta_{\text{C}}$  121,11 (C-5), 140,61 (C-8), 148,51 (C-4), 152,44 (C-2) e 155,74 (C-6).

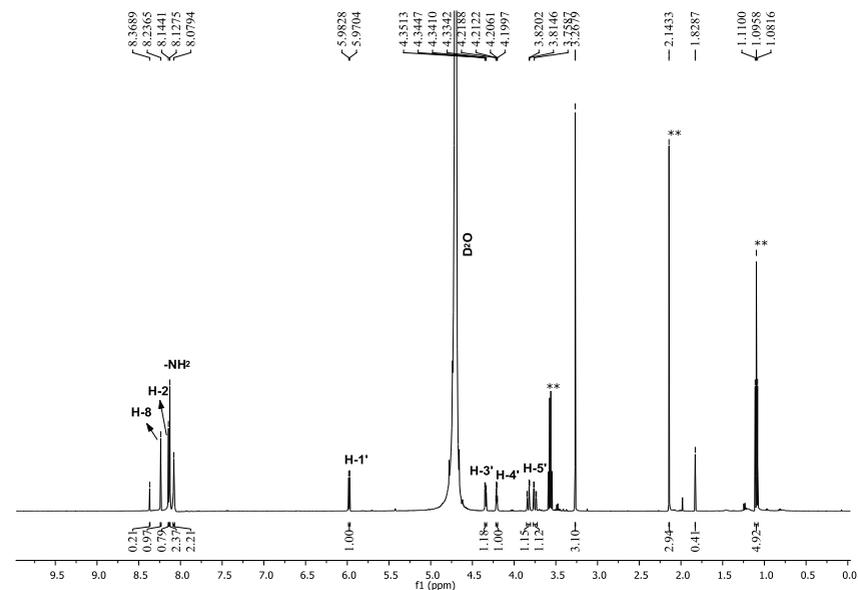
Os experimentos de RMN HSQC (Figuras 58 e 59; p. 84) e HMBC (Figuras 60, 61 e 62; p. 85, 86 e 87) permitiram atribuir e constatar os hidrogênios e carbonos pertencentes à estrutura do nucleosídeo.

A análise do espectro de RMN HMBC permitiu identificar a correlação do H-1' com os carbonos C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ), C-8 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-2' ( $^2J_{\text{HC}}$ ), dos H-5' com os C-3' ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-4' ( $^2J_{\text{HC}}$ ), além do H-3' com os C-1' ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-5' ( $^3J_{\text{HC}}$ ), confirmando assim a ligação deste anel a unidade glicosídica. Observaram-se também as correlações do H-8 com os C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-5 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e, do H-2 com o C-4 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) e C-6 ( $^3J_{\text{HC}}$ ) (Tabela 6; p. 81).

**Tabela 6** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) da substância (**V**) e comparação com dados da literatura (YING et al., 2013).

	Substância ( <b>V</b> )			$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$		
<b>C</b>					
4	148,51	-	-	149,5	-
5	121,11	-	-	119,8	-
6	155,74	-	-	156,6	-
<b>CH</b>					
2	152,44	8,14 (1H, <i>s</i> )	C-4; C-6	152,9	8,14 (1H, <i>s</i> )
8	140,61	8,24 (1H, <i>s</i> )	C-4; C-5	140,4	8,36 (1H, <i>s</i> )
1'	88,29	5,98 (1H, <i>d</i> , J= 6.2 Hz)	C-4; C-8; C-2'	88,4	5,88 (1H, <i>d</i> , J= 6.0 Hz)
2'	73,60	*	-	73,9	4,61 (1H, <i>t</i> , J= 3.0 Hz)
3'	70,62	4,34 (1H, <i>dd</i> , J= 3.3, 5.5 Hz)	C-1'; C-5'	71,1	4,15 (1H, <i>dd</i> , J= 3.0, 4.5 Hz)
4'	85,84	4,21 (1H, <i>dd</i> , J= 3.3, 6.3 Hz)	-	86,4	3,97 (1H, <i>d</i> , J= 3.0 Hz)
<b>CH<sub>2</sub></b>					
5'	61,48	3,83 (1H, <i>dd</i> , J= 2.8, 12.9 Hz) 3,75 (1H, <i>dd</i> , J= 2.5, 12.8 Hz)	C-3'; C-4'	61,9	3,68 (1H, <i>dd</i> , J= 4.0, 12.5 Hz) 3,56 (1H, <i>dd</i> , J= 4.0, 12.5 Hz)

\*Sinal sobreposto pelo sinal da  $\text{D}_2\text{O}$



\*\* impureza do solvente

**Figura 53** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de **V**.

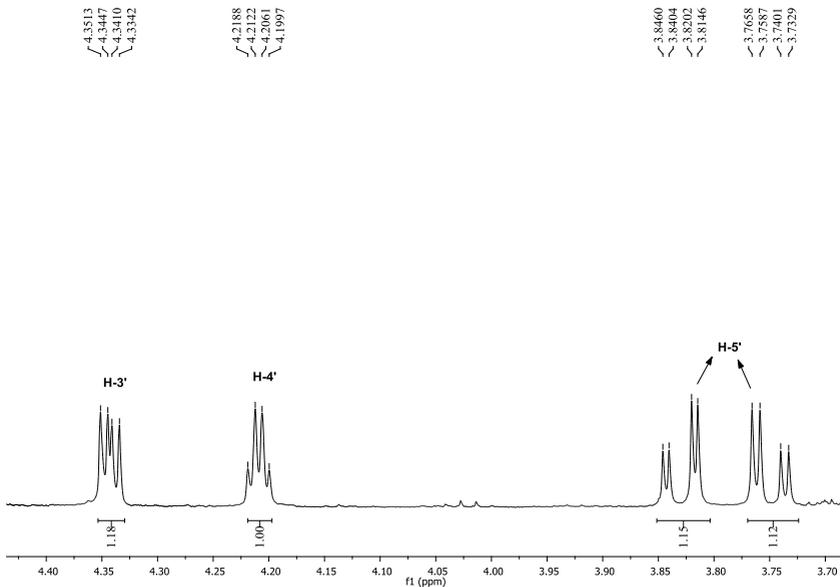


Figura 54 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre  $\delta_{\text{H}}$  3,70-4,40 ppm.

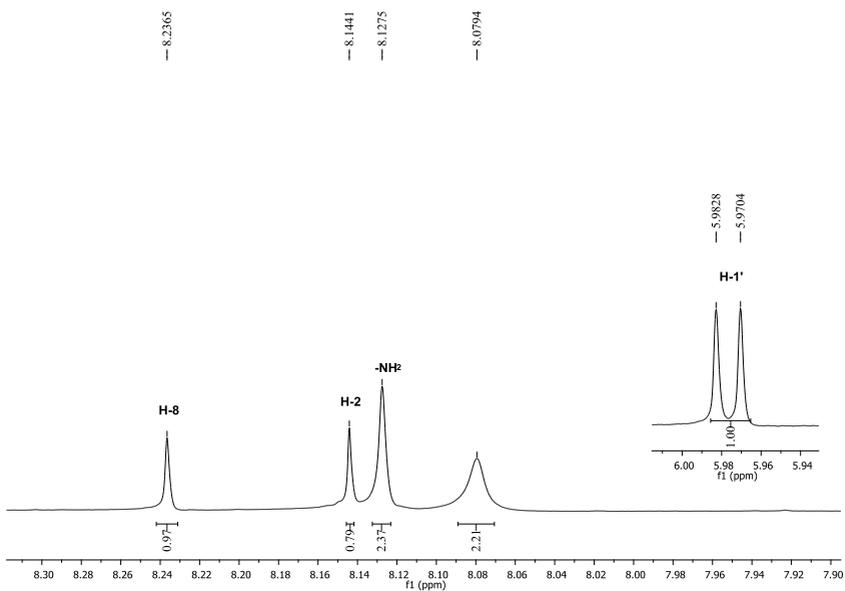


Figura 55 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre  $\delta_{\text{H}}$  7,90-8,30 ppm.

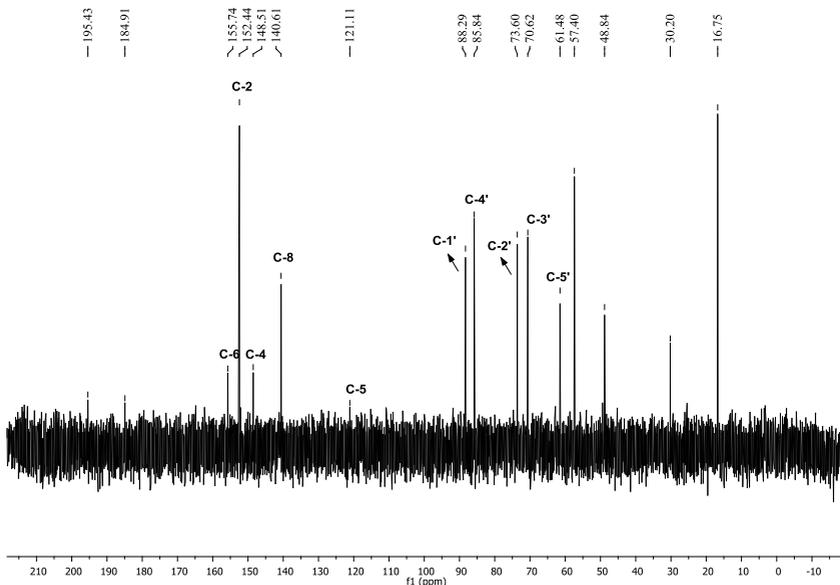


Figura 56 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de V.

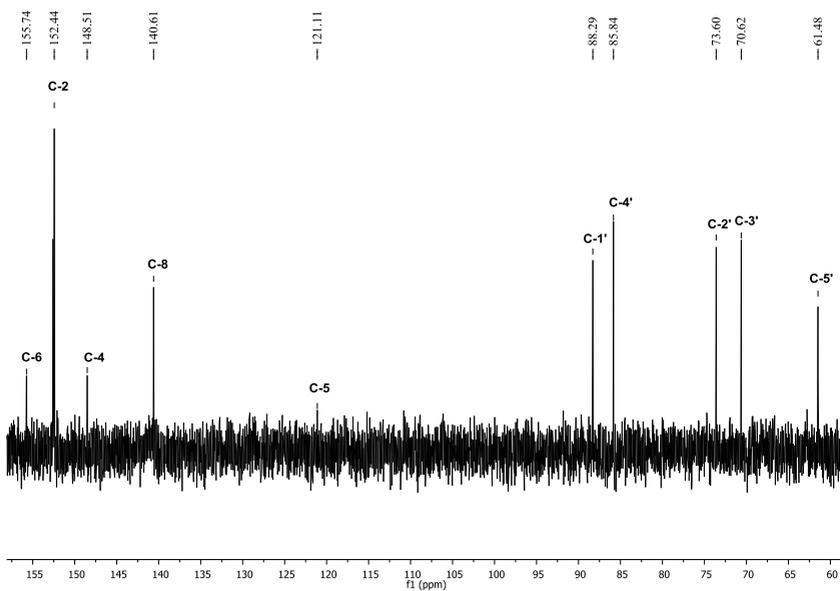
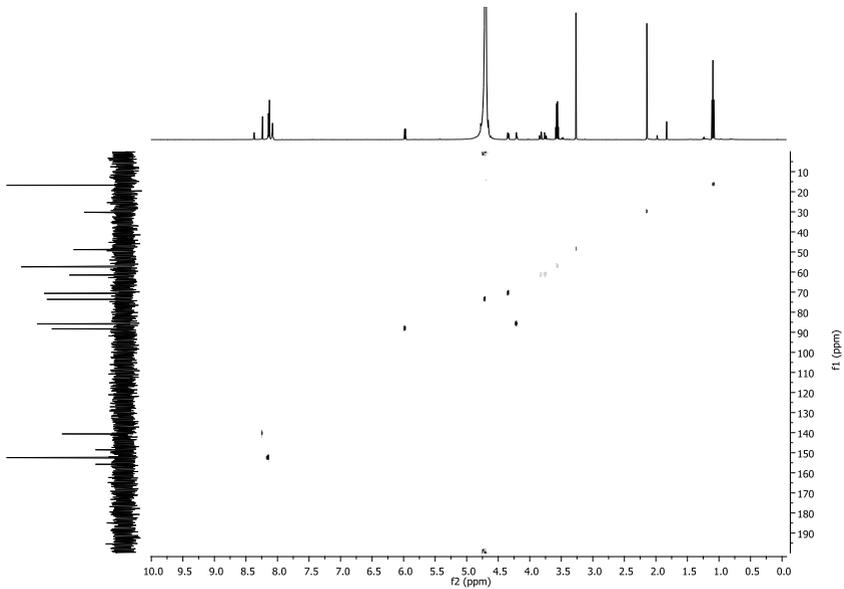
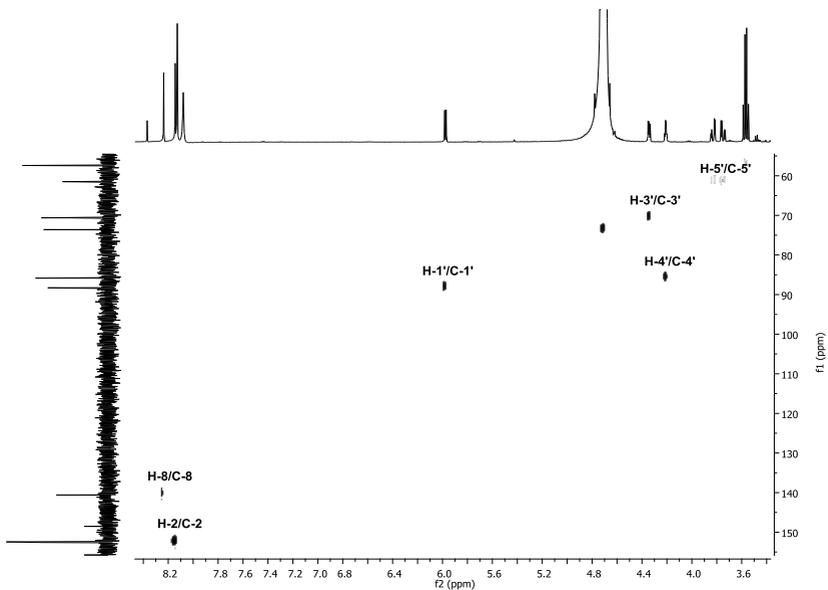


Figura 57 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de V, entre  $\delta_c$  60-155 ppm.



**Figura 58** – Espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O) de V.



**Figura 59** - Expansão do espectro de RMN HSQC (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O) de V, entre  $\delta_H$  3,6-8,2 e  $\delta_C$  60-150 ppm.

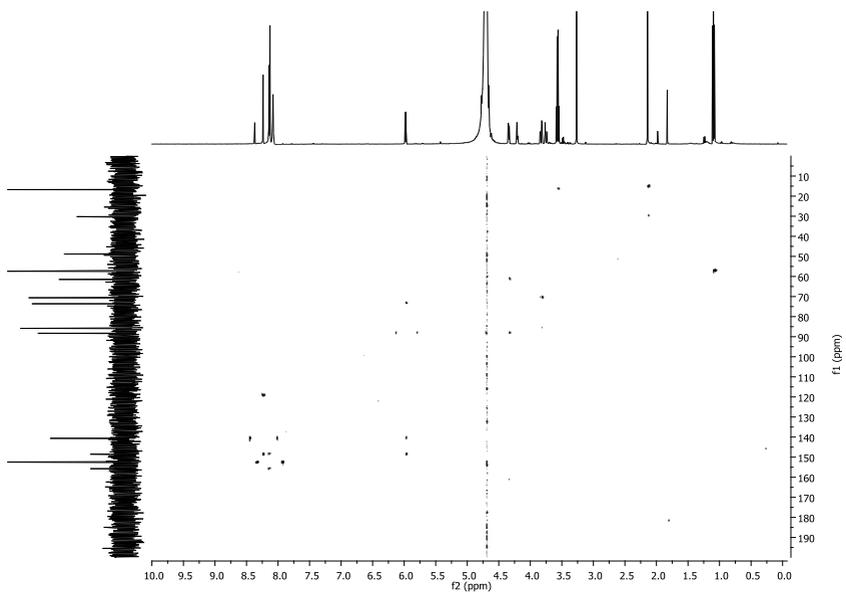
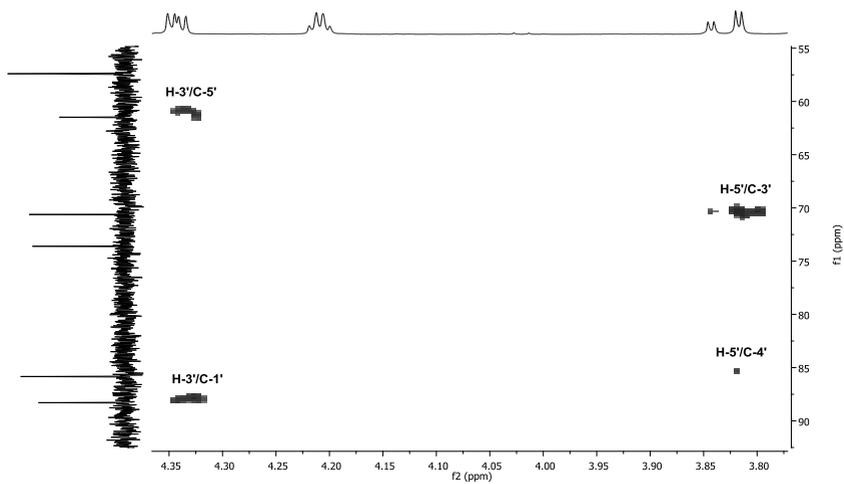
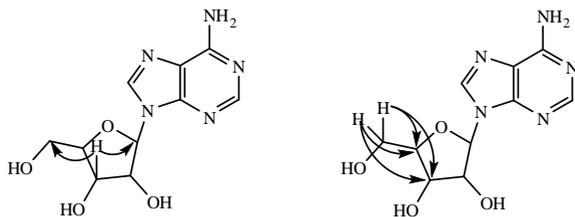
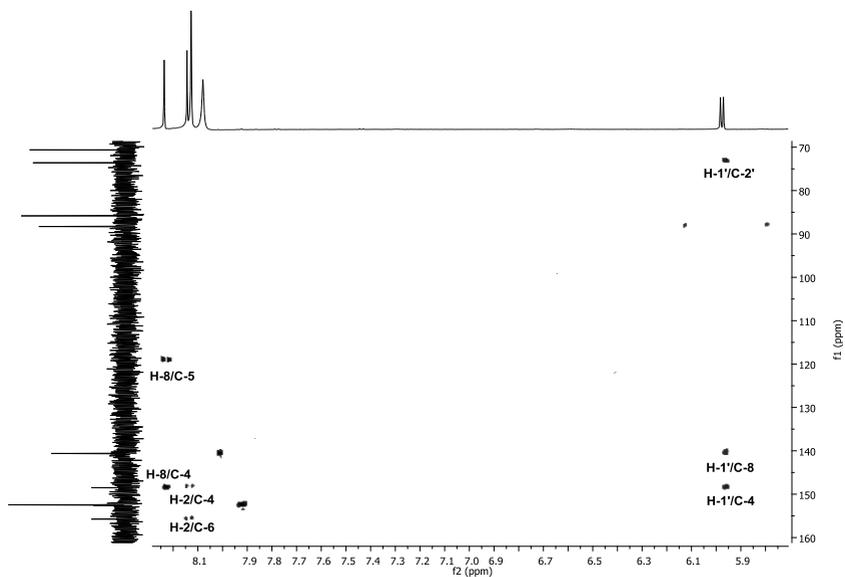
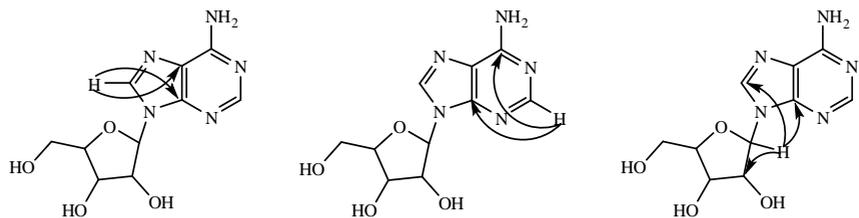


Figura 60 – Espectro de RMN HMBC (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O) de V.



**Figura 61** - Expansão do espectro HMBC (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O) de V, entre  $\delta_H$  3,80-4,35 e  $\delta_C$  55-90 ppm e principais correlações observadas para V.



**Figura 62** - Expansão do mapa de contornos HMBC (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O) de V<sub>1</sub> entre  $\delta_H$  5,9-8,1 e  $\delta_C$  70-160 ppm e principais correlações observadas para V.

#### 6.4 Avaliação do ensaio da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos e resíduos

Estudos sobre as atividades antifúngicas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países, tais como o Brasil, que possui uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para esta finalidade (DUARTE, 2006).

Segundo Violante (2012) não existe um consenso sobre o padrão de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros qualificam com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições elevados. Duarte e colaboradores (2004) sugeriram uma classificação para produtos vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição: CIM até 500 µg/mL; inibição moderada: CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição: CIM acima de 1600 µg/mL.

Como o uso popular de plantas não é suficiente para avaliar a eficácia no tratamento das enfermidades foi delineado como um dos objetivos deste trabalho a avaliação da atividade antifúngica dos extratos e resíduos de *Dulacia egleri* empregando-se o método da microdiluição em caldo. Os resultados estão resumidos na **Tabela 7** (p. 89).

O **EBHEC** e o **RHC** mostraram-se ativos frente todas as cepas fúngicas testadas, com CIM variando entre 250 e 500 µg/mL e 31,5 a 125 µg/mL, respectivamente, sendo que, o **RHC** mostrou maior atividade contra *C. albicans* (CIM: 31,5 µg/mL).

Tratando-se dos resíduos **RDC** e **RAC**, estes não se mostraram ativos contra *C. parapsilosis* (CIM > 1000 µg/mL), entretanto o **RDC** apresentou moderada inibição contra todas as demais cepas com CIM variando entre 62,5 a 500 µg/mL e o **RAC** apresentou significativa inibição contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* com CIM: 31,5 a 125 µg/mL e fraca inibição contra *C. glabrata* com CIM: 1000 µg/mL.

O **RHMC** mostrou-se ativo contra as cepas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com CIM: 250 a 500 µg/mL.

O **EBHEF** apresentou CIM: 500 e 1000 µg/mL frente *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Verificou-se também que o **RHF** mostrou fraca inibição contra *C. tropicalis* (CIM: 1000 µg/mL) e o **RAF** demonstrou-se ativo contra *C. albicans* (CIM: 62,5 µg/mL).

Os **RDF** e **RHMF** mostraram significativo potencial contra todas as cepas fúngicas testadas com CIM variando entre CIM: 62,5 e 500 µg/mL.

A atividade apresentada pelos extratos e resíduos de *D. egléri* pode estar relacionada com os metabólitos isolados e identificados neste estudo, bem como na sinergia entre os demais compostos existentes nesta espécie.

**Tabela 7** – Avaliação da atividade antifúngica através da CIM (µg/mL) dos extratos e resíduos obtidos da espécie *Dulacia egléri*.

Microrganismos	EBHEC	RHC	RDC	RAC	RHMC	EBHEF	RHF	RDF	RAF	RHMF	ANFO B
<i>C. albicans</i>	500	31,25	62,5	31,25	500	500	>1000	62,5	62,5	500	0,50
<i>C. glabrata</i>	250	62,5	500	1000	>1000	>1000	>1000	250	1000	500	0,25
<i>C. krusei</i>	500	62,5	250	125	500	>1000	>1000	125	>1000	250	0,50
<i>C. parapsilosis</i>	500	125	>1000	>1000	500	>1000	>1000	125	>1000	250	0,25
<i>C. tropicalis</i>	250	62,5	62,5	62,5	250	1000	1000	500	>1000	500	0,25
<i>C. neoformans</i>	500	125	62,5	62,5	>1000	>1000	>1000	250	>1000	500	0,25

EBHEC – Extrato Bruto Hidroetanólico do Caule; RHC – Resíduo Hexano do Caule; RDC – Resíduo Diclorometano do Caule; RAC – Resíduo Acetato de etila do Caule; RHMC – Resíduo Hidrometanólico do Caule; EBHEF – Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas; RHF – Resíduo Hexano das Folhas; RDF – Resíduo Diclorometano das Folhas; RAF – Resíduo Acetato de etila das Folhas; RHMF – Resíduo Hidrometanólico das Folhas; ANF B - anfotericina B

## 7. CONCLUSÕES

- A investigação química do extrato bruto hidroetanólico do caule resultou no isolamento e identificação do sesquiterpeno aromático eglerisina (I) e do nucleosídeo ribavirina (II).
- O estudo químico do extrato bruto hidroetanólico das folhas levou ao isolamento e identificação dos nucleosídeos ribavirina (II) e adenosina (V), do flavonoide 3-metoxi-6,7-metilenodioxo-4'-hidroxiflavona (III) e do ácido *p*-hidroxibenzóico (IV).
- Os extratos e resíduos foram submetidos à avaliação da atividade antifúngica. O extrato bruto hidroetanólico do caule (EBHEC), o resíduo hexano do caule (RHC), o resíduo diclorometano das folhas (RDF) e o resíduo hidrometanólico das folhas (RHMF) mostraram-se ativos contra todas as cepas fúngicas testadas. Observou-se também significativa atividade dos resíduos hexano das folhas (RHF) e acetato de etila das folhas (RAF) contra as cepas *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente. O resíduo hidrometanólico do caule (RHMC) mostrou moderada atividade contra as cepas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e, o extrato bruto hidroetanólico das folhas (EBHEF) apresentou moderada atividade frente a *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Este é o primeiro relato de estudo químico e biológico desta espécie, sendo assim, todos os metabólitos isolados estão sendo descritos pela primeira vez na mesma, estando na maioria em acordo com o perfil químico da família. Além disso, este trabalho relata pela primeira vez o isolamento das substâncias eglerisina (I) e 3-metoxi-6,7-metilenodioxo-4'-hidroxiflavona (III) na literatura. Portanto, este trabalho colabora não somente para o conhecimento da espécie em estudo, bem como para a família Olacaceae, a qual possui poucos estudos descritos na literatura.

Pode-se considerar que o conjunto dos resultados obtidos neste trabalho contribui significativamente para o conhecimento químico-biológico da flora brasileira, mais especificamente de espécies ocorrentes na região mato-grossense.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. C.; FURTADO, N. A. J. C.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

ADEOLUWA, O. A.; ADERIBIGBE, A. O.; OLONODE, E. T. Antinociceptive property of *Olox subscorpioidea* Oliv.(Olacaceae) extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 353–357, 2014.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: anti-fungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, p. 283-311, 2011.

BARBOSA, W. L.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. S.; SILVA JR., J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BOURJOT, M.; LEYSSEN, P.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J.; CANARD, B.; RASOANAIVO, P.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON M. Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1076–1080, 2012.

CABRAL, I.S.R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência: Área Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz e Queiróz, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

CABRAL, S.; AGRA, M. F. Flora paraibana: Olacaceae Mirb. Ex Dc. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 13, n. 1/2, p. 1-11, 1999.

CERRITELLI, S. M.; CROUCH, R. J. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 1494–1505, 2009.

CIOCIOLA, T.; GIOVATI, L.; CONTI, S.; MAGLIANI, W.; SANTINOLI, C.; POLONELLI, L. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1413–1433, 2016.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; JUNIOR, O. L. P.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181–186, 2009.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVIS, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, 2006.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMEILINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolícos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 6-8, 2004.

EL-SEEDI, H. R.; LARSSON, S.; BACKLUND, A. Chemosystematic value of cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida* (Olacaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 831-839, 2005.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S. N.; ZACCHINO, S. A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 103–107, 2001.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, p. 90-95, 2011.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Biodiversidade**, v. 1, n. 1, p. 53, 2005.

GRANCHER, N.; KEDZIEREWICZ, F.; VENARD, V.; MARSURA, A.; FINANCE, C.; LE FAOU, A. Physicochemical study of ribavirin complexes with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 51, p. 149–157, 2005.

HUANG, C. F.; GAN, X. W.; BAI, H. Y.; MA, L.; HU, L. H. Schoepfin A, B, C: three new chalcone C-glycosides from *Schoepfia chinensis*. **Natural Product Research**, v. 22, n. 7, p. 623–627, 2008.

ICHADO, C. L. F.; COSTA, C. G.; ABREU, C. L. B. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro - Volume XX. **Ministério da Agricultura**, Brasil, 1977.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

LAI, Y.-W.; CAMPBELL, L. T.; WILKINS, M. R.; PANG, C. N. I.; CHEN, S.; CARTER, D. A. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1-7, 2016.

LE, N. H. T.; MALTERUD, K. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; NERGARD, C. S.; WANGENSTEENA, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 858–862, 2012.

LIMA, V.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; SANTOS, E. S.; MORAIS, L. P.; TINTINO, S. R.; FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L. S.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 56-61, 2016.

LIU, N.; WANG, C.; SU, H.; ZHANG, W.; SHENG, C. Strategies in the discovery of novel antifungal scaffolds. **Future Medicinal Chemistry**, p. 1-20, 2016.

LIU, W.-Y.; LI, H.-Y.; ZHAO, B.-X.; SHIN, D.-S.; LIAN, S.; MIAO, J.-Y. Synthesis of novel ribavirin hydrazone derivatives and anti-proliferative activity against A549 lung cancer cells. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1270–1275, 2009.

MA, J.; PAWAR, R. S.; GRUNDEL, E.; MAZZOLA, E. P.; RIDGE, C. D.; MASAOKA, T.; LE GRICE, S. F. J.; WILSON, J.; BEUTLER, J. A.;

KRYNITSKY, A. J. Sesquiterpenoid tropolone glycosides from *Liriosma ovata*. **Journal of Natural Products**, 2014.

MACIEL, M. A. M.; GOMES, F. E. S.; PINTO, A. C.; PINTO, A. C.; CÓLUS, I. M. S.; MAGALHÃES, N. S. S.; GRYNBER, N. F.; ECHEVARRI, A. Aspectos sobre produtos naturais: descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. **Fitos**, v. 3, n. 1, p. 38-59, 2007.

MARIONI, J.; SILVA, M. A.; CABRERA, J. L.; MONTOYA, S. C.; PARAJE, M. G. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1321–1328, 2016.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, 493–500, 2007.

MITSCHER, L. A.; BEAL, J. L.; BATHALA, M. S. Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-161, 1972.

MONACHINO, J. A new *Liriosma* from Roraima. **Brittonia**, v. 13, p. 113-115, 1961.

MONTES, E. G.; AMARO-LUIS, J. M. Icosandrin, a novel peltogynoid from the fruits of *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae). **Natural Product Research**, p. 1-8, 2015.

MOSSRI, B. B. Biodiversidade e indústria: informações para uma gestão responsável. p. 54, Brasília: CNI, 2012.

NAIR, J. J.; MULAUDZI, R. B.; CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN STADEN, J. Antigonococcal activity of *Ximenia caffra* Sond. (Olacaceae) and identification of the active principle. **South African Journal of Botany**, n. 86, p. 111–115, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Método de referência para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbio: Norma Aprovada. 6 ed. Norma M7-A6. 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em: 01 de fevereiro de 2017.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma Aprovada. 2ed. Norma M27-A2. 2002. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em: 01 de fevereiro de 2017.

OKOYE, F. B. C.; NGWOKE, K. G.; DEBBAB, A.; OSADEBEB, P. O.; PROKSCHA, P. Olamannosides D and E: further kaempferol triglycosides from *Olax mannii* leaves. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 152–155, 2016.

OKOYE, F. B. C.; SAWADOGO, W. R.; SENDKER, J.; ALY, A. H.; QUANDT, B.; WRAY, V.; HENSEL, A.; ESIMONE, C. O.; DEBBAB, A.; DIEDERICH, M.; PROKSCH, P. Flavonoid glycosides from *Olax mannii*: structure elucidation and effect on the nuclear factor kappa B pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 27–34, 2015.

OMER, M. E. F. A.; ELNIMA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 122–126, 2003.

PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; RASTRELLI, L.; PICCINELLI, A.; AQUINO, R. Isoprenoid glycosides from *Liriosma ovata*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 265–268, 2008.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO N. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POLONSKY, J.; BELOEIL, J.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C. Manicol: a sesquiterpenoid hydroxytropolone from *Dulacia guianensis*; a revised structure (x-ray analysis). **Tetrahedron**, v. 39, n. 16, p. 2647-2655, 1983.

POLONSKY, J.; VARENNE, J.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C.; JACQUEMIN, H.; FOURNET, A. Isolation and structure (X-Ray analysis) of manicoline A, a new  $\alpha$ -aminotropone from *Dulacia guianensis* (Olacaceae). **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, p. 731-732, 1981.

POLONSKY, J.; VARENNE, J.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C.; JACQUEMIN, H.; FOURNET, A. Structure (X-Ray analysis) of manicoline B, a mixture of two diastereoisomers of a new alkaloid from *Dulacia guianensis* (Olacaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 22, p. 2359-2362, 1984.

POMILIO, A. B.; BATTISTA, M. E.; VITALE, A. A. Naturally-occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 16, p. 2075-2121, 2006.

POTT, A.; POTT, V. Plantas do Pantanal. **EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal**. Brasília, 1994.

PUGIALLI, H. R. L.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Quimiotaxonomia da superordem Zingiberiflorae (SensuU Dahlgren) I. flavonoides como

marcadores quimiosistemáticos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 135-148, 1993.

RODRIGUES, E. A.; ROSSI, L. 2002. Olacaceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, São Paulo, v. 2, p. 213-218, 2002.

ROSSI, L. Olacaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB175>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2017.

SILVA, A. L.; PIATOA, A. L. S.; BARDINI, S.; NETTOB, C. A.; NUNESC, D. S.; ELISABETSKYA, E. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, 199–203, 2004.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosídeo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, 2005.

SINGH, R. Chemotaxonomy: A tool for plant classification. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 4, n. 2, p. 90-93, 2016.

SPITZER, V.; TOMBERGB, W.; HARTMANNB, R.; AICHHOLZC, R. Analysis of the seed oil of *Heisteria silvanii* (Olacaceae) – a rich source of a novel C<sub>18</sub> acetylenic fatty acid. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1189-1200, 1997.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE E SILVA, M. L.; MARTINS, H. G.; FURTADO, N. A. J. Estudo

comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, p. 498-502, 2009.

TANG, W.; KUBO, M.; HARADA, K.; HIOKI, H.; FUKUYAMA, Y. Novel NGF-potentiating diterpenoids from a Brazilian medicinal plant *Ptychopetalum olacoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 882–886, 2009.

The Plant List (2013). Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Olacaceae/Dulacia/>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2017.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/40036360>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2017.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VIOLANTE, I.M.P. Avaliação das Atividades Biológicas e Estudo Químico de *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. 2012. 201p. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

YAYLI, N.; YILDIRIM, N.; USTA, A.; OZKURT, S.; AKGÜN, V. Chemical constituents of *Campanula lactiflora*. **Turkish Journal Chemistry**, v. 27, p. 749-755, 2003.

YASEEN, M.; IRSHAD, N.; QAYYUM, M. I.; KAMAL, Y. Evaluation of antibacterial and cholinomimetic activities of different extracts of *Conyza*

*bonariensis*. **Indian Journal of Advances in Plant Research**, v. 1, n. 4, p. 37-40, 2014.

YING, Y.-M.; SHAN, W.-G.; LIU, W.-H.; ZHAN, Z.-J. Studies on the metabolites of a fungal endophyte *Penicillium* sp. HS-5 from *Huperzia serrata*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 3, 1208-1210, 2013.