

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

VIVIANE GOMES DA COSTA ABREU

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS,
CAULE E FLORES DE *Lychnophora pinaster* Mart.**

Belo Horizonte

2009

UFMG/ICEx.DQ.780
D.455

VIVIANE GOMES DA COSTA ABREU

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FOLHAS, CAULE E FLORES DE
Lychnophora pinaster Mart.

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2009

Abreu, Viviane Gomes da Costa
A162e Estudo fitoquímico e biológico das folhas, caule e
2009 flores de *Lychnophora pinaster* Mart../ Viviane Gomes
D da Costa Abreu. 2009.

xx, 111 f. : il.

Orientador: Antônio Flávio De Carvalho Alcântara.

Co-orientadora: Dorila Piló Veloso.

Mestrado (dissertação) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Triterpenos - Teses 3.
Atividade tripomastigota - Teses 4. *Lychnophora*
pinaster - Teses I. Alcântara, Antônio Flávio de
Carvalho, Orientador. II. Veloso, Dorila Piló, Co-
orientador III. Título.

CDU 043



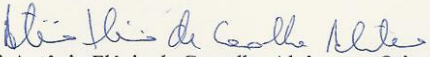
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br




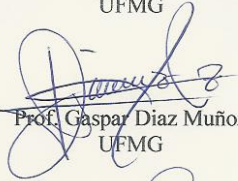
"Estudo Fitoquímico e Biológico das Folhas, Caule e Flores de *Lychnophora
pinaster* Mart"

Viviane Gomes da Costa Abreu

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Orientador
UFMG


Profa. Dorila Piló Veloso - Co-Orientadora
UFMG


Prof. Gaspar Diaz Muñoz
UFMG


Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente à Deus, sem Ele nada seria possível.

Ao meu querido esposo Cleber Otávio.

Aos meus pais, Jayme e Imaculada, e minhas irmãs, Janaína e Joyce.

Aos meus orientadores Dr. Antônio Flávio Carvalho de Alcântara e Dra. Dorila Piló-Veloso.

*“A ciência não é uma ilusão,
mas seria uma ilusão acreditar
que poderemos encontrar noutra lugar
o que ela não nos pode dar. ”*

Sigmund Freud

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente agradeço à Deus, por estar sempre presente em minha vida, e certamente por acreditar nele *superei* todos os obstáculos que encontrei nesta caminhada.

Agradeço imensamente ao meu esposo Cleber Otávio, que durante todo este período esteve ao meu lado, sempre com palavras positivas, amorosas e incentivadoras sem as quais *não* teria forças para continuar em busca de meus sonhos.

Aos meus pais, Jayme e Imaculada, presenças marcantes nesta fase de minha vida, sem as orientações que recebi no início de minha vida estudantil *já* teria chegado onde cheguei. São os responsáveis pelo alicerce educacional.

Às minhas irmãs queridas, Janaína e Joyce, exemplos profissionais, sem o incentivo e apoio recebidos durante este período também *não* chegaria onde cheguei. Tenho por vocês uma profunda admiração.

Ao meu cunhado Maurinho, exemplo de companheirismo e de bondade.

Ao meu orientador Dr. Antônio Flávio Carvalho Alcântara, o qual me acolheu quando aqui cheguei, um exemplo de profissional, paciente e amigo, com quem dividi vários momentos de angústia e sempre com palavras incentivadoras e um bom humor incrível tornava o meu dia realmente incrível. Agradeço a valiosa orientação recebida durante este período.

À Dra. Dorila Piló-Veloso pela co-orientação, uma pessoa de uma sabedoria admirável.

À Dra. Patrícia Machado Oliveira, exemplo de dedicação, agradeço pela imensa contribuição no início do trabalho experimental.

À Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi pela valiosa colaboração nos ensaios microbiológicos.

À Dra. Lucienir Pains Duarte pela valiosa colaboração na obtenção dos espectros de CG/EM.

Ao Dr. Álvaro José Romanha, do Centro de Pesquisas René Rachou, pela imensa contribuição na realização dos ensaios parasitológicos.

Aos professores Dra. Rossimíriam Pereira de Freitas, Dra. Rosemeire Brondi Alves, Dr. Fernando Carazza, Dra. Grácia Divina de Fátima Silva, Dr. José Dias de Souza Filho e Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal pelo imenso apoio dispensado durante o curso de pós-graduação, sem o qual jamais teria conseguido concluir os créditos exigidos.

Ao Alison, amigo valioso, obrigada por toda a sua contribuição neste trabalho.

Ao Thiago, amigo inseparável, obrigada por todo o companheirismo durante todo o curso.

À Letícia, Roberta Cabral e Lívia Apolinário, alunas de iniciação científica, pela imensa contribuição na obtenção dos extratos das diferentes partes da planta.

À Laís, Carolina Kei e Fernanda, alunas de iniciação científica, pelo apoio dispensados.

À Marilda por todo o seu incentivo.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Viviane, Wdeson, Fabiane, Patrícia, Eva e Júlio, todos vocês contribuíram de alguma forma para a realização deste precioso trabalho.

Aos meus colegas da Droga Raia pelo apoio sempre dispensado.

À Paulete e à Kátia pela prontidão e presteza com que nos auxiliam.

À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho que é apenas parte de um sonho maior.

*"Ciência é, antes de tudo, um conjunto de atitudes.
É uma disposição para lidar com fatos
e não com o que foi dito por alguém a respeito deles."
Frederick Skinner*

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório 276 do Departamento de Química da UFMG pela colaboração na determinação dos pontos de fusão.

À equipe do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG pela obtenção dos espectros de absorção na região do Infravermelho.

À equipe do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Departamento de Química da UFMG pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Universidade Federal de Minas Gerais.

*"Não considere nenhuma prática como imutável.
Mude e esteja pronto a mudar novamente.
Não aceite verdade eterna.
Experimente."*

Frederick Skinner

RESUMO

A tripanossomíase, conhecida popularmente como Doença de Chagas, é uma das protozooses de maior incidência e endemia, afetando anualmente de 15 a 20 milhões de pessoas na América. A doença pode tornar-se fatal quando não tratada, sendo a principal causa de cardiopatia na América do Sul. Os medicamentos atualmente utilizados para seu tratamento apresentam sérios graves efeitos colaterais e agem apenas como paliativos na redução da infecção. Estudos etnofarmacológicos indicaram o uso de extratos de espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae) no tratamento dessa doença, além de serem empregados como analgésicos, antiinflamatórios e anti-reumáticos. As folhas, caule e flores de *Lychnophora pinaster* Mart. foram submetidas, separadamente, a extração a frio em etanol, obtendo-se os extratos EFO, ECA e EFL, respectivamente. Esses extratos foram submetidos a fracionamento por CCS e eluição em diferentes solventes. Os fitoconstituintes isolados foram caracterizados por IV, RMN e CG/EM. As frações em hexano e diclorometano do EFO forneceram uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos de C₁₄ a C₁₆, uma mistura de éster derivado do lupeol e do pseudotaraxasterol, uma mistura de 3-*O*-acetil-urs-12-eno, 2-nonadecanona, 2-pentacosanona, 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol, lupeol e α -amirina, éster metílico derivado da α -amirina e uma *O*-alquil- α -amirina. O extrato ECA forneceu uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, acetato de baurenila, friedelina, mistura de α -amirina e lupeol, mistura de estigmasterol e β -sitosterol. A fração em diclorometano do EFL forneceu uma mistura de estigmasterol e β -sitosterol. Testes antimicrobianos do EFO e de suas frações em diclorometano forneceram resultados positivos frente a *Staphylococcus aureus* possibilitando o direcionamento do estudo no intuito de purificar as frações com potentes atividades antimicrobianas. Os ensaios *in vitro* com tripomastigotas sanguíneos apresentaram resultados positivos das frações em acetato de etila do EFO e frações em hexano, acetato de etila e etanol do EFL.

Palavras-chaves: *Lychnophora pinaster*, doença de Chagas, triterpenos, testes antimicrobianos, atividade tripomastigota.

ABSTRACT

The trypanosomiasis, popularly known as Chagas Disease, is a protozoonose of the high incidence and endemic, affecting year 15 to 20 million people in America. The disease can become fatal if not treated, being the main cause of heart disease in South America. The drugs used in treatment of Chagas Disease have serious side effects and act only as a palliative, reducing infection. Ethnopharmacology studies indicated the use of extracts from species of the genus *Lychnophora* (Asteraceae) in the treatment of this disease which also are used as analgesics, anti-inflammatory and anti-rheumatic. The leaves, stem and flowers of *Lychnophora pinaster* Mart. were separately submitted to the extraction with cold ethanol to obtain the EFO, ECA and EFL extracts, respectively. These extracts were subjected to CCS fractionation using for elution for different solvents. The isolated compounds were characterized by IR, NMR and GC/MS. The hexane and dichloromethane EFO fractions gave a mixture of C₁₄ to C₁₆ hydrocarbons; a mixture of esters of lupeol and pseudotaraxasterol, "mixture of 3-*O*-acetyl-urs-12-ene, 2-nonadecanona, 2-pentacosanona, 4,4-dimethyl-cholesta-22-24-dien-5-ol, lupeol and α -amyirin, methyl ester derived from α -amyirin" and an *O*-alkyl- α -amyirin. The ECA extract gave mixture of aliphatic hydrocarbons, acetate baurenyl, friedelin, mixture of α -amyirin and lupeol; mixture of stigmasterol and β -sitosterol. The fraction of EFL in dichloromethane gave a mixture of stigmasterol and β -sitosterol. Submitted to antimicrobial tests, EFO and its fractions in dichloromethane furnished positive results against *Staphylococcus aureus* allowing the direction of the study in order to purify the fractions with potent antimicrobial activities. The *in vitro* tests with blood trypomastigotes showed positive results of EFO (ethyl acetate fraction) and EFL (hexane, ethyl acetate and ethanol fractions).

Key Words: *Lychnophora pinaster*, Chagas Disease, triterpenes, antimicrobial tests, trypomastigote activity.

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
FIGURA A.1	Primeiro caso descrito da Doença de Chagas, em 1909.	2
FIGURA A.2	Forma infectante de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	3
FIGURA A.3	Distribuição geográfica da Doença de Chagas no mundo.	4
FIGURA A.4	Estruturas químicas de substâncias efetivas contra <i>T. cruzi</i> .	6
FIGURA I.1	Lactonas sesquiterpênicas presentes no gênero <i>Lychnophora</i> .	11
FIGURA I.2	Representantes das seis seções do gênero <i>Lychnophora</i> : (a) Seção <i>Lychnophora</i> , (b) Seção <i>Lychnophoriopsis</i> , (c) Seção <i>Lychnophorioides</i> , (d) Seção <i>Sphaeranthus</i> , (e) Seção <i>Chronopappus</i> e (f) Seção <i>Lychnocephaliopsis</i> .	11
FIGURA I.3	Distribuição geográfica do gênero <i>Lychnophora</i> no Brasil.	12
FIGURA I.4	Exemplar de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	14
FIGURA I.5	Estruturas químicas de outros fitoconstituintes isolados anteriormente de <i>L. pinaster</i> .	17
FIGURA III.1	Cromatograma de CG de FOG1-R1.	38
FIGURA III.2	Espectro de RMN de ¹³ C de FOG1-R1 (400 MHz; CDCl ₃).	39
FIGURA III.3	Cromatograma de CG de FOG1-R4.	40
FIGURA III.4	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R4.	41
FIGURA III.5	Espectro de RMN de ¹ H de FOG1-R4 (400 MHz; CDCl ₃).	42
FIGURA III.6	Espectro de RMN de ¹³ C de FOG1-R4 (100 MHz; CDCl ₃).	43

FIGURA III.7	Subespectro DEPT 135° de FOG1-R4 (100 MHz; CDCl ₃).	43
FIGURA III.8	Mapa de contornos HSQC de FOG1-R4 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; CDCl ₃).	44
FIGURA III.9.	Ampliação de correlações do mapa de contornos HSQC de FOG1-R4 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; CDCl ₃).	45
FIGURA III.10	Cromatograma de CG de FOG1-R5.	47
FIGURA III.11	Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 43,112 min do cromatograma de FOG1-R5.	48
FIGURA III.12	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R5	49
FIGURA III.13	Cromatograma de CG de FOG1-R6.	50
FIGURA III.14	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R6.	51
FIGURA III.15	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R6-G6.	52
FIGURA III.16	Espectro de RMN de ¹ H de FOG1-R6-G6 (400 MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA III.17	Espectro de RMN de ¹³ C de FOG1-R6-G6 (100 MHz; CDCl ₃).	54
FIGURA III.18	Subespectro DEPT-135° de FOG1-R6-G6 (100 MHz; CDCl ₃).	54
FIGURA III.19	Mapa de contornos HMQC de FOG1-R6-G6 (¹ H: 400 MHz; ¹³ C: 100 MHz; CDCl ₃).	55
FIGURA III.20	Mapa de contornos COSY de FOG1-R6-G6 (400 MHz; CDCl ₃).	56

FIGURA III.21	Mapa de contornos HMBC de FOG1-R6-G6 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).	57
FIGURA III.22	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R10-G4.	58
FIGURA III.23	Espectro de RMN de ^1H de FOG1-R10-G4 (400 MHz, CDCl_3).	59
FIGURA III.24	Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R10-G4 (100 MHz; CDCl_3).	60
FIGURA III.25	Subespectro DEPT-135° de FOG1-R10-G4 (100 MHz; CDCl_3).	60
FIGURA III.26	Cromatograma de CG de FOG1-R10-G4.	61
FIGURA III.27	Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R11.	62
FIGURA III.28	Cromatograma de CG de FOG1-R11.	63
FIGURA III.29	Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 54,942 min do cromatograma de FOG1-R11.	64
FIGURA III.30	Espectro de massas da substância de tempo de retenção 57,195 min do cromatograma de CG de FOG1-R11.	65
FIGURA III.31	Espectro de RMN de ^1H de FOG1-R11 (400 MHz, CDCl_3).	66
FIGURA III.32	Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R11 (100 MHz; CDCl_3).	67
FIGURA III.33	Subespectro DEPT-135° de FOG1-R11 (100 MHz; CDCl_3).	68
FIGURA III.34	Fitoconstituintes isolados das Folhas de <i>L. pinaster</i> .	72

FIGURA IV.1	Espectro de absorção na região do Infravermelho de CAG5-R1.	72
FIGURA IV.2	Espectro de RMN de ^1H de CAG5-R1 (400 MHz, CDCl_3).	73
FIGURA IV.3	Espectro de RMN de ^{13}C de CAG5-R1 (100 MHz; CDCl_3).	74
FIGURA IV.4	Subespectro DEPT-135° de CAG5-R1 (100 MHz; CDCl_3).	75
FIGURA IV.5	Espectro de RMN de ^1H de CAG5-R2-G2 (400 MHz, CDCl_3).	77
FIGURA IV.6	Espectro de RMN de ^{13}C de CAG5-R2-G2 (100 MHz; CDCl_3).	78
FIGURA IV.7	Subespectro DEPT-135° de CAG5-R2-G2 (100 MHz; CDCl_3).	79
FIGURA IV.8	Espectro de RMN de ^1H de CAG8 (400 MHz, CDCl_3).	81
FIGURA IV.9	Espectro de RMN de ^{13}C de CAG8 (100 MHz; CDCl_3).	82
FIGURA IV.10	Subespectro DEPT-135° de CAG8 (100 MHz; CDCl_3).	82
FIGURA IV.11	Cromatograma de CG de CAG11.	83
FIGURA IV.12	Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 6,487 min do cromatograma de CAG11.	84
FIGURA IV.13	Espectro de RMN de ^1H de CA-G11 (400 MHz, CDCl_3).	85
FIGURA IV.14	Espectro de RMN de ^{13}C de CAG11 (100 MHz; CDCl_3).	86
FIGURA IV.15	Subespectro DEPT-135° de CAG11 (100 MHz; CDCl_3).	87
FIGURA IV.16	Fitoconstituintes isolados do caule de <i>L. pinaster</i> .	89
FIGURA V.1	Espectro de absorção na região do Infravermelho de EEFLG5-R6.	91
FIGURA V.2	Cromatograma de CG de EEFLG5-R6.	92

FIGURA V.3	Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 6,781 min do cromatograma de EEFLG5-R6.	93
FIGURA V.4	Espectro de RMN de ^1H de EEFLG5-R6 (400 MHz, CDCl_3).	94
FIGURA V.5	Expansão da região entre δ_{H} 3,00 e 7,00 do espectro de RMN de ^1H de EEFLG5-R6 (400 MHz, CDCl_3).	94
FIGURA V.6	Espectro de RMN de ^{13}C de EEFLG5-R6 (100 MHz; CDCl_3).	95
FIGURA V.7	Subespectro DEPT-135° de EEFLG5-R6 (100 MHz; CDCl_3).	95

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

		Páginas
TABELA I.1	Classificação taxonômica da espécie <i>Lychnophora pinaster</i>	15
TABELA II.1	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EFO	24
TABELA II.2	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1	25
TABELA II.3	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1-R6	27
TABELA II.4	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1-R10	28
TABELA II.5	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de ECA	29
TABELA II.6	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EEFL	31
TABELA II.7	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EEFLG5	32
TABELA II.8	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFL	33
TABELA II.9	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFLD	33

TABELA II.10	Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFLD ₁₀ H ₁	34
TABELA III.1	Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C de FOG1-R4 e dados da literatura do lupeol e pseudotaraxasterol	46
TABELA III.2	Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C de FOG1-R11 e dados da literatura dos triterpenos α -amirina e lupeol	69
TABELA IV.1	Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C de CAG5-R1 (400 MHz; CDCl ₃) e dados da literatura de acetato de 3 β -OAc, Δ^7 , baurenila	76
TABELA IV.2	Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C de CAG5-R2-G2 (400 MHz; CDCl ₃) e dados da literatura da friedelina (400 MHz, CDCl ₃ , TMS)	80
TABELA IV.3	Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C de CAG11 e dados da literatura do estigmasterol	88
TABELA VI.1	Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> frente a diferentes espécies de bactérias	97
TABELA VI.2	Resultados dos testes microbiológicos de halo de inibição de frações do extrato etanólico das folhas e flores de <i>Lychnophora pinaster</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	98

TABELA VI.3	Resultados de testes de atividade tripanossomicida (redução de parasitas) das frações do extrato etanólico das folhas e flores de <i>Lychnophora pinaster</i> frente a formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	88
ESQUEMA II.1	Preparação dos extratos orgânicos de <i>L. pinaster</i>	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	- Deslocamento Químico
ϕ	- Diâmetro
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica gel
CG	- Cromatografia a gás
CG/EM	- Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
d	- Duplete
dd	- Duplete Duplo
ddd	- Duplo duplete duplo
DEPT-135°	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – ângulo 135°
EM	- Espectrometria de massas
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	- <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
m	- Multiplete
NOESY	- <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
qd	- Quarteto Duplo

RMN de ^{13}C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ^1H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	- Simpleto
sl	- simpleto largo
t	- tripleto
td	- tripleto duplo
TMS	- Tetrametilsilano
t_R	- Tempo de retenção
ATR	- Espectroscopia no infravermelho por Refletância Total Atenuada
DCM	- Diclorometano
AcOEt	- Acetato de Etila
EtOH	- Etanol
MeOH	- Metanol

SUMÁRIO

Páginas

APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I – SOBRE A ESPÉCIE <i>Lychnophora pinaster</i>	9
1. A FAMÍLIA ASTERACEAE.....	10
2. O GÊNERO <i>Lychnophora</i>	10
3. A ESPÉCIE <i>Lychnophora pinaster</i>	13
3.1. Atividade biológica.....	15
3.2. Constituintes químicos isolados anteriormente em <i>Lychnophora pinaster</i>	16
CAPÍTULO II – PARTE EXPERIMENTAL.....	18
1. Materiais.....	19
1.1. Equipamentos.....	19
1.2. Procedimentos cromatográficos.....	20
1.3. Testes microbiológicos.....	21
1.4. Testes parasitológicos.....	21
2. Metodologia fitoquímica.....	21
2.1. Material vegetal.....	21
2.2. Obtenção dos extratos	21
2.3. Fracionamento do extrato etanólico das folhas (EFO).....	23
2.4. Fracionamento do extrato etanólico do caule (ECA).....	29

2.5. Fracionamento do extrato etanólico das flores (EFL-EE).....	31
2.6. Fracionamento do extrato hexânico das flores (HFL-EH).....	33
3. Metodologia biológica.....	34
3.1. Testes antimicrobianos.....	34
3.1.1. Testes de difusão em Agar.....	34
3.1.2. Testes de concentração inibitória mínima.....	35
3.2. Testes parasitológicos.....	36

CAPÍTULO III – ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS

– Resultados e Discussão.....	37
1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R1.....	38
2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R4.....	40
3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R5.....	47
4. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R6.....	49
5. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R6-G6.....	51
6. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R10-G4.....	58
7. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R11.....	62

CAPÍTULO IV – ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE

– Resultados e Discussão.....	71
1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG5-R1.....	72
2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG5-R2-G2.....	77
3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG8.....	81
4. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG11.....	83

CAPÍTULO V – ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FLORES

– Resultados e Discussão.....90

1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE EEFLG5-R6.....91

CAPÍTULO VI - ENSAIOS BIOLÓGICOS

DE EXTRATOS, FRAÇÕES E FITOCONSTITUINTES ISOLADOS DE *L. pinaster*.....96

1. Teste de Atividade Bactericida.....97

2. Testes de atividade tripanossomicida.....99

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....102

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....105

APRESENTAÇÃO

A tripanossomíase consiste em uma das protozooses de maior incidência e endemia na África e América, apresentando-se em duas formas distintas.¹⁻³ A tripanossomíase africana, conhecida como Doença do Sono, afeta anualmente de 20 a 30 mil pessoas. Caso a doença não seja tratada, o índice de mortalidade é muito elevado.² O tratamento é feito de acordo com o estágio em que se encontra a doença e os medicamentos utilizados apresentam respostas adversas sérias, comprometendo a saúde do paciente.³

A tripanossomíase americana, conhecida como Doença de Chagas, foi catalogada por Carlos Chagas em 1909 (Figura A.1) e estende-se por toda a América Central e do Sul, onde são registrados de 15 a 20 milhões de portadores da doença.



Figura A.1. Primeiro caso descrito da Doença de Chagas, em 1909.

No Brasil, as formas de contágio ocorrem fundamentalmente por meio da espécie *Triatoma infestans* do barbeiro (300 mil novos casos anuais), transfusão sanguínea (cerca de 3 mil novos casos anuais) e via transplacentária (congênita), de extrema gravidade devido aos possíveis

efeitos dos medicamentos sobre o embrião ou o feto. Essa doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi* (Figura A.2), parasita encontrado em animais domésticos (principalmente cachorros, gatos e porcos) e selvagens (macacos, morcegos e diversas espécies de roedores).



Figura A.2. Forma infectante de *Trypanosoma cruzi*.

Em humanos, o *T. cruzi* é encontrado na forma amastigota (intracelular) ou tripomastigota (no sangue). O hospedeiro definitivo contamina-se com a forma tripomastigota do parasita que penetra pela mucosa ou pele. O parasita alcança a circulação sistêmica e atinge órgãos vitais, tais como baço, fígado, medula óssea, rins, tecido nervoso, gânglios linfáticos e músculo estriado cardíaco. A fase aguda tem duração de aproximadamente 60 dias, sendo caracterizada pelo espalhamento do parasita para alguns órgãos vitais, entre eles o coração. A infecção pode ser assintomática ou marcada por febre, distensão abdominal e do esôfago, dilatação do fígado e baço e ainda miocardite aguda. Em crianças, esse estágio da doença apresenta um alto índice de mortalidade. A fase crônica é marcada pela perda lenta de tecidos envolvendo os músculos cardíacos e do trato digestivo, podendo persistir por muitos anos. As infecções crônicas resultam

em várias desordens neurológicas, incluindo demência, megacólon e danos no músculo cardíaco.^{1,4}

A Doença de Chagas é a principal causa de cardiopatia na América do Sul, concentrando-se geograficamente nas Américas Central e do Sul (Figura A.3). No Brasil, esta doença atinge alto índice de prevalência em Minas Gerais.⁵ Nesta região, além do barbeiro (vetor), a sua transmissão por transfusão de sangue é significativa, considerando a alta proporção de soros-positivos na população.⁶



Figura A.3. Distribuição geográfica da Doença de Chagas nas Américas.

Segundo dados do Banco Mundial, a doença de Chagas é a enfermidade tropical de maior incidência em todo o continente, superando em conjunto a malária, esquistossomose, hanseníase e leishmaniose. Situa-se na quarta posição entre as doenças de maior prevalência, depois das enfermidades respiratórias agudas, diarreias e AIDS.⁷

A doença torna-se freqüentemente fatal quando não tratada. Nifurtimox (**1**, Figura A.4) é o fármaco mais efetivo contra todas as formas do *T. cruzi*. A combinação de (**1**) com cortisona (**2**, Figura A.4) é capaz de eliminar o parasita do músculo cardíaco. Benzonidazol (**3**, Figura A.4) é outro medicamento que reduz inflamações e destrói também parasitas que se encontram no músculo cardíaco. Primaquine (**4**, Figura A.4) pode destruir o parasita apenas no sangue, não sendo efetiva contra seus estágios celulares e teciduais.⁸ Anfotericina B (**5**, Figura A.4), tricomicina (**6**, Figura A.4), bem como muitos alcalóides β -carbolínicos, flavonóides, naftoquinonas, lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e esteróides têm se mostrados ativos *in vitro* e *in vivo* contra a forma tripomastigota do parasita.⁹ No entanto, a baixa solubilidade em água e necessidade de concentrações elevadas para apresentarem atividade tripanossomicida limitam o uso dessas substâncias em bancos de sangue.¹⁰

Além dos efeitos colaterais, os medicamentos mais empregados no tratamento de indivíduos contaminados pela doença de Chagas agem apenas como paliativos na redução da infecção pelo protozoário, na fase aguda da doença.¹¹ Violeta de genciana (**7**, Figura A.4), na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, tem sido praticamente o único tripanossomicida empregado em bancos de sangue, apesar de provocar microaglutinações, empilhamento de eritrócitos e mudanças na coloração sanguínea, além de requerer temperaturas baixas (próximas a 4 °C) e longos períodos para esterilização total do sangue.¹² Geralmente, os pacientes transfundidos mostram rejeição visual ao tratamento com esse composto, pois essa substância promove alterações da cor do sangue, urina e pele.¹³ Recentemente, o seu uso tornou-se muito limitado após os resultados positivos de atividade carcinogênica e de mutagenicidade observados em testes de toxicidade crônica em camundongos.¹⁴

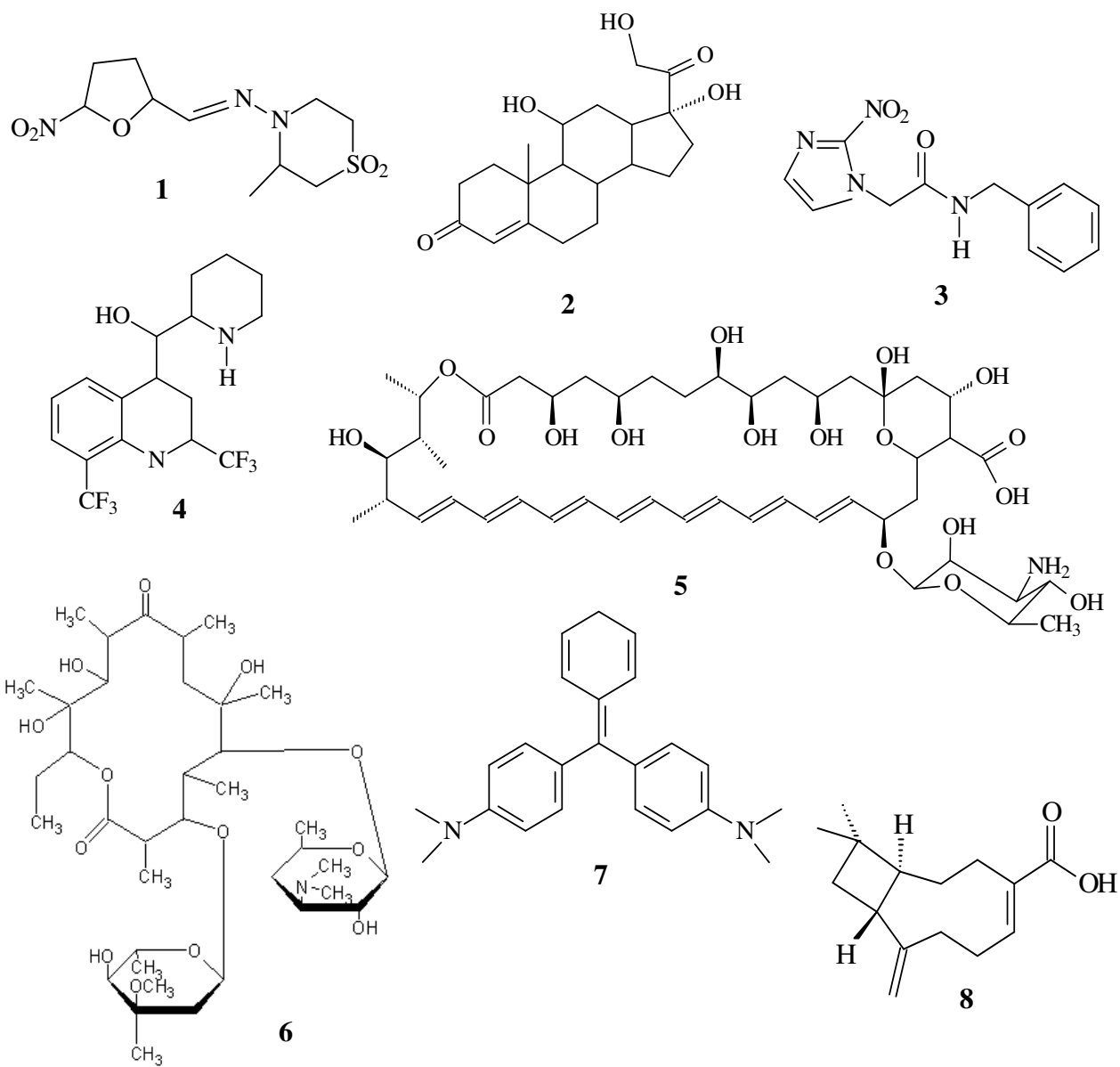


Figura A.4. Estruturas químicas de substâncias efetivas contra *T. cruzi*.

Neste contexto, a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* torna-se importante, sob o ponto de vista de políticas públicas e de saúde. Estudos etnofarmacológicos indicaram que espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae) são utilizadas como analgésicas, antiinflamatórias e anti-reumáticas.¹⁵ Extratos de diversas espécies desse gênero têm sido testados *in vitro* e *in vivo* contra formas sanguíneas de *T. cruzi*¹⁶ e, no caso da espécie *Lychnophora pinaster* Mart., os resultados mostraram-se muito significativos.¹⁷ Desta espécie foi isolado um sesquiterpenóide, o ácido licnofóico (**8**, Figura A.4). Essa substância não apresentou toxicidade frente a larvas *Artemia salina* e nem atividade anti-HIV ou contra células tumorais de mamíferos. Porém, apresentou expressiva atividade tripanossomicida *in vitro*, sem destruir elementos figurados do sangue.¹⁸

Anteriormente, estudos fitoquímicos das partes aéreas, sem serem separadas, de *Lychnophora pinaster* foram descritas na literatura.¹⁹ Apesar dos estudos fitoquímicos das partes aéreas terem sido realizados anteriormente, não existe na literatura um estudo das folhas, caule e flores tratados separadamente, o que justifica o estudo fitoquímico das diferentes partes da planta acompanhado por testes biológicos para identificação de princípios ativos. Assim, no presente trabalho foram feitos separadamente estudos fitoquímicos das folhas, flores e caule de *Lychnophora pinaster* Mart, além de testes antimicrobianos e testes de atividade tripanossomicida de extratos, frações e fitoconstituintes isolados, visando novas alternativas medicamentosas para o tratamento da doença de Chagas.

No Capítulo I é descrito inicialmente um levantamento sobre as principais características de representantes da família Asteraceae e o gênero *Lychnophora* e características morfológicas e classificação taxonômica da espécie *L. pinaster*. Além disso, foram realizados levantamentos

sobre os constituintes químicos isolados em espécies de *Lychnophora*. No Capítulo I é descrito também um levantamento sobre o uso popular da planta em Minas Gerais.

No Capítulo II são apresentados os materiais e equipamentos empregados nas análises de caracterização estrutural dos fitoconstituintes isolados. Em seguida, são descritos os procedimentos experimentais realizados nos testes de atividade antimicrobiana e tripanossomicida do extrato, frações e fitoconstituintes isolados. Finalmente, neste capítulo é detalhada a metodologia fitoquímica para isolamento dos fitoconstituintes das folhas, caule e flores da planta.

O Capítulo III descreve os resultados e discussão do isolamento dos fitoconstituintes das folhas da planta. As análises estruturais dos fitoconstituintes foram realizadas a partir dos dados de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de Massas (CG/EM), espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT 135°) e 2D (COSY, NOESY, HSQC e HMBC). O mesmo foi realizado para as análises estruturais dos fitoconstituintes isolados através do fracionamento cromatográfico do caule e das flores, os quais são descritos, respectivamente, nos Capítulos IV e V.

No Capítulo VI são apresentados os resultados dos ensaios biológicos realizados com extratos, frações e fitoconstituintes isolados da planta. Através desses ensaios foi possível avaliar a atividade antimicrobiana e tripanossomicida dos extratos, frações e fitoconstituintes isolados.

CAPÍTULO I:

SOBRE A ESPÉCIE *Lychnophora pinaster*

1. A FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies.²⁰ São plantas de aspectos extremamente variados, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores.²¹ Cerca de 98% dos gêneros são representados por plantas de pequeno porte e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul.²²

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas.²³ Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários no tratamento e prevenção de várias doenças.²⁴

2. O GÊNERO *Lychnophora*

As plantas do gênero *Lychnophora* (Asteraceae) por apresentarem propriedades anti-inflamatória, analgésica e anti-edematogênica consagradas pela medicina popular, são utilizadas como sucedâneas da *Arnica montana* L., nativa da Europa, cujas propriedades já foram cientificamente comprovadas. A presença de lactonas sesquiterpênicas, como o metacrilato de helenalina (**9**) e tomentosina (**10**, Figura I.1), confere a ação anti-inflamatória a *A. montana* L, justificando assim sua utilização na absorção de hematomas e edemas por meio de tinturas e extrato fluido.²⁵⁻²⁷

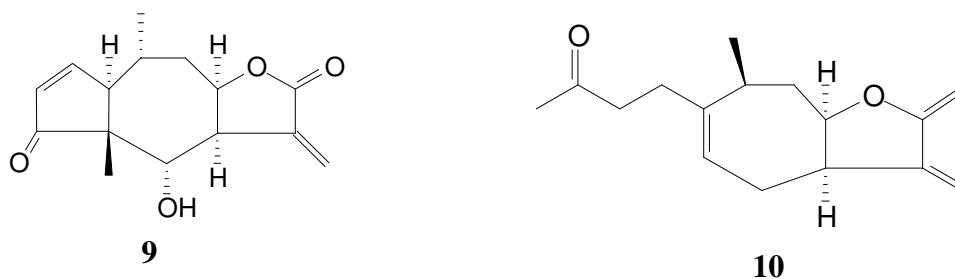


Figura I.1. Lactonas sesquiterpênicas presentes no gênero *Lychnophora*.

O gênero *Lychnophora* é considerado endêmico do Brasil, tendo as suas espécies uma distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás e Minas Gerais.²⁸ A Figura I.2 mostra as subdivisões propostas para o gênero *Lychnophora* em seis seções.²⁸



Figura I.2. Representantes das seis seções do gênero *Lychnophora*: (a) Seção *Lychnophora*, (b) Seção *Lychnophoriopsis*, (c) Seção *Lychnophorioides*, (d) Seção *Sphaeranthus*, (e) Seção *Chronopappus* e (f) Seção *Lychnocephaliopsis*.

Das 32 espécies existentes no Estado de Minas Gerais, 15 estão incluídas na lista de espécies ameaçadas em extinção, entre elas a *Lychnophora pinaster* Mart.²⁹ A Figura I.3 apresenta a distribuição geográfica do gênero *Lychnophora* no Brasil.

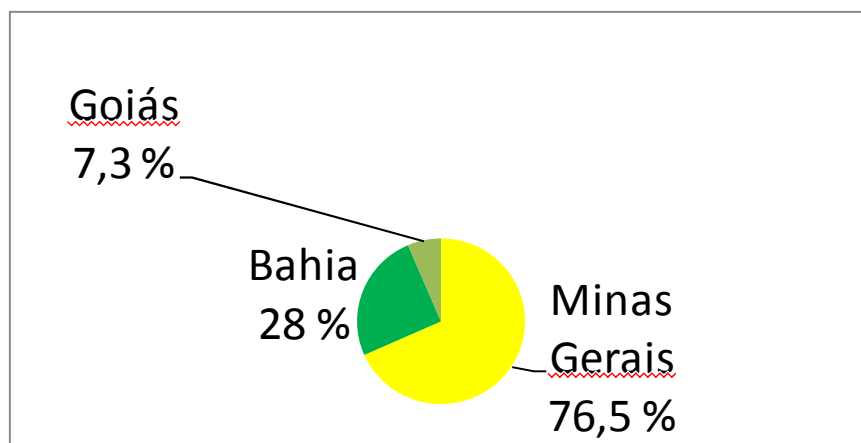


Figura I.3. Distribuição geográfica do gênero *Lychnophora* no Brasil.

Devido à coleta predatória, áreas de distribuição restrita, populações pequenas ou isoladas e destruição do *habitat*, outras espécies de *Lychnophora* encontram-se ameaçadas também de extinção, enquadrando-se em situações de perigo (*L. diamantina* Jones & Coile., *L. gardneri* Sch. Bip. e *L. pohlii* Sch. Bip.), vulneráveis (*L. ericoides* Mart., *L. graomogolense* Semir. e *L. pinaster* Mart.), criticamente em perigo (*L. albertinoides* Gardner., *L. brunioides* Mart. e *L. souzae* H. Rob.) ou provavelmente extintas (*L. humillima* Sch. Bip., *L. reticulata* Gardner. e *L. salicifolia* Mart.).³⁰⁻³²

Algumas espécies do gênero, como *L. ericoides* M. e *L. rosmarinifolia* M. (candeeiro), são utilizadas como madeira de esteios, tornos, lenha e curtume, numa faixa que se estende do

Maranhão até São Paulo incluindo Minas Gerais. A *L. salicifolia* Mart. (pau-de-canela) apresenta a mesma aplicabilidade, sendo encontrada apenas em Minas Gerais.³³

3. A ESPÉCIE *Lychnophora pinaster* Mart.

Lychnophora pinaster Mart., conhecida popularmente como arnica mineira, é uma espécie que apresenta propriedades medicinais e apresenta crescimento arbustivo. Sua ocorrência é restrita a campos rupestres, que se constitui por afloramento de rochas, entre 800 a 2000 m de altitude, sendo considerada endêmica.³² Essa espécie apresenta sinonímia botânica extensa: *Vernonia trichocarpa* Spreng., *Piptocoma lychnophorioides* Less., *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng., *Lychnophora affinis* Gardh., *Lychnophora brunioides* var. *affinis* (Gargh) Baker., *Lychnophora rosmarinus* Pohl. Ex Schultz-Bip, *Lychnophora rosmarinus* var. *eurosmarinus* Schults-Bip, *Lychnophora rosmarinus* var. *normalis* Schults-Bip, *Lychnophora brunioides* var. *pinifolia* Baker., *Lychnophora pumilio* Pohl. e *Lychnophora piptocoma* Schults-Bip. Popularmente, a planta recebe nomenclatura vulgar variada, como arnica mineira, candeia, arnica-da-serra ou, simplesmente, arnica.

A foto de um exemplar de *L. pinaster* é mostrada na Figura I.4. Aquênios de arnica encontram-se em sub-capítulos de capítulos, apresentando papus internos e externos como estrutura de dispersão. A arnica foi estudada quanto aos aspectos da fenologia e reprodução sexuada por considerar importante e urgente a obtenção de informações científicas sobre o seu comportamento em *habitat* natural e seus aspectos reprodutivos. A frutificação ocorre em três fases distintas: após antese e simultaneamente à senescência das flores, aquênios com papus interno presente e aquênios com papus interno ausente, quando em processo de dispersão. A

planta apresenta comportamento fenológico sazonal em relação aos seus aspectos vegetativos, reprodutivos e dispersão dos frutos, em função das variações climáticas. Além disso, maior porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação dos aquênios são possíveis em condições de laboratório, quando se utilizam caixas acrílicas tipo "gerbox", em substrato entre papel mata-borrão e temperaturas alternadas entre 20 e 30 °C.³⁴



Figura I.4. Exemplar de *Lychnophora pinaster* Mart.

A Tabela I.1 representa a classificação taxonômica clássica da espécie *Lychnophora pinaster* proposta por Cronquist em 1981.³⁵

Tabela I.1. Classificação taxonômica da espécie *Lychnophora pinaster*

Classe	Magnoliopsida (Angiospermae)
Sub-classe	Magnolidae (Dicotyledonae)
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Asteraceae
Gênero	<i>Lychnophora</i>
Espécie	<i>L. pinaster</i> Mart.

3.1. Atividade biológica

L. pinaster é uma planta medicinal encontrada em Minas Gerais, que possui alto espectro farmacológico, apresentando atividades anestésica, antimicrobiana, anti-reumática, cicatrizante e antiinflamatória, além do uso em casos de contusões, inchaços, hematomas, traumatismos e varizes.³⁶ Os ramos, folhas e flores são utilizados popularmente na forma de infusão, extrato alcoólico, cataplasma ou pomada.³⁷ A administração da *L. pinaster* na forma de florais auxilia a cicatrização e traumatismos do corpo físico, além de ferimentos, contusões, cirurgias e traumas psíquicos.³⁸

As folhas e flores de *L. pinaster* Mart. são utilizadas na medicina popular sob a forma de extrato alcoólico, como antiinflamatório, anestésico e cicatrizante em machucados.³⁶ A partir de *L. pinaster* Mart foi isolado o ácido licnofóico (**8**, Fig. A.4, pg.6), que inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas de *T. cruzi* na concentração de 12 µg/mL.³⁶

3.2. Constituintes químicos isolados anteriormente em *Lychnophora pinaster*^{19,39-40}

Muitos estudos descrevem o isolamento e testes de atividade farmacológica de vários fitoconstituintes de *L. pinaster*, incluindo seus óleos essenciais.³⁹ Outros estudos descrevem o isolamento da rutina (**11**, Figura I.5), um flavonóide inibidor da enzima tirosinase e responsável pela hiperpigmentação da pele. O ácido licnofóico (**8**, Fig. A.4, pg. 6) e seus derivados álcool e éster atuam no combate da forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.⁴⁰

De acordo com a literatura, a lactona sesquiterpênica 15-desoxigoiazenólídeo (**12**), os triterpenos lupeol (**13**), misturas de α - e β -amirina (**14** e **15**) e friedelina (**16**), o flavonóide quercetina (**17**), ácido isoclorogênico (**18**), ácido caféico (**19**), isovitexina (**20**) e vitexina (**21**) foram outros fitoconstituintes isolados de *L. pinaster*,¹⁹ cujas estruturas são apresentadas na Figura I.5.

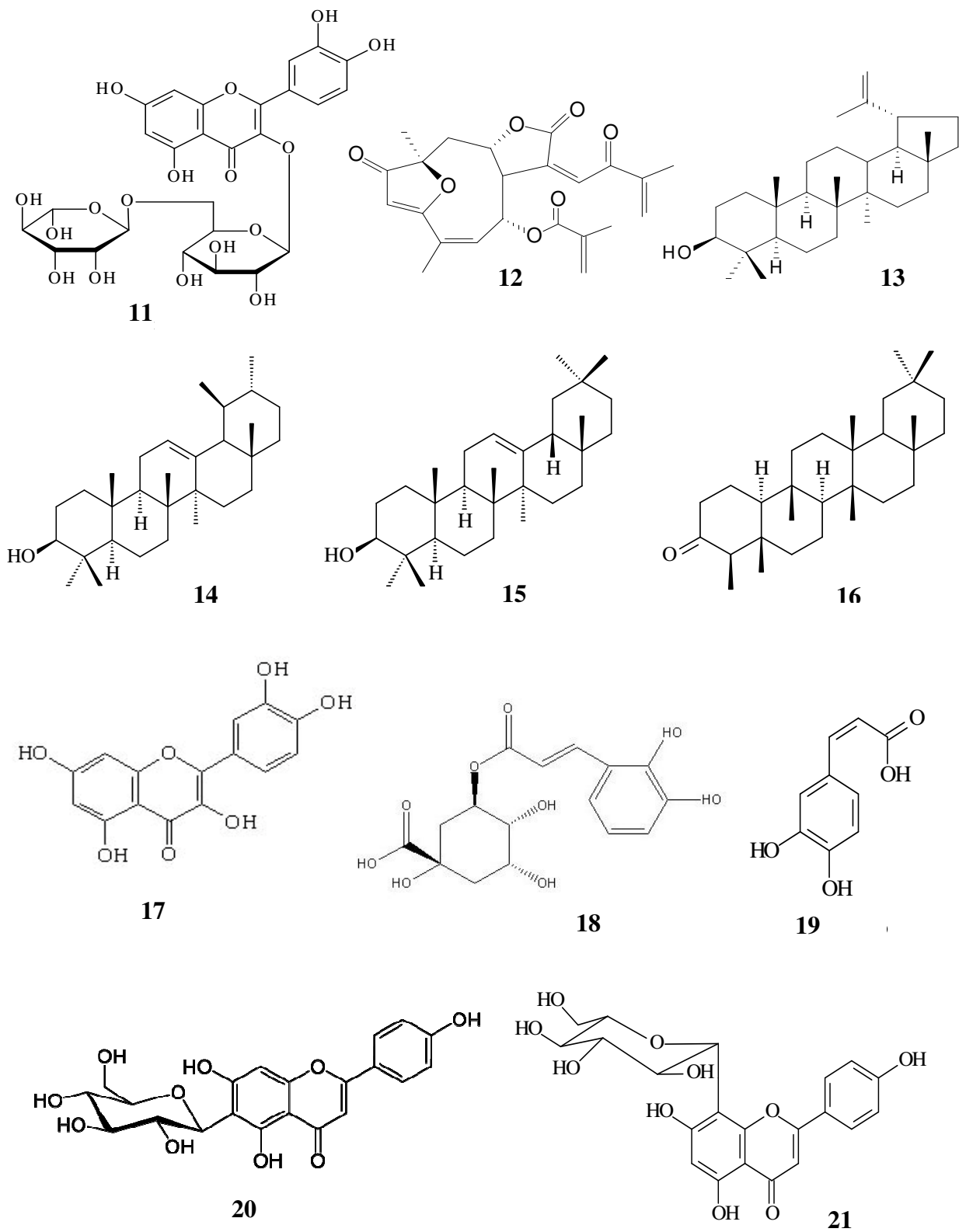


Figura I.5. Estruturas químicas de outros fitoconstituintes isolados de *L. pinaster*.

CAPÍTULO II:

PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais

1.1. Equipamentos

As análises por cromatografia a gás foram realizadas em cromatógrafo a gás (CG) foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890 Series II equipado com detector com ionização em chama (FID). As áreas e os tempos de retenção foram obtidos na estação de tratamento de dados HP ChemStation (HP 3365). Utilizou-se o modo split (50:1), coluna capilar de sílica fundida (30m, diâmetro de 0,32mm, espessura do filme de 0,25 μ m, fase estacionária HP-5).

As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN 4000 acoplado ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons a 70 eV, *targat TIC 20000 counts, Max ion time 25000 μ seg*, eletromultiplicadora a 1500 V, corrente do filamento de 10 μ Amps, vácuo interno de 8 μ Torr, interface 300 °C, *ion trap 150 °C, manifold 45 °C*; coluna 100% polidimetilsiloxano, *crosslink 30 m x 0,25 mm*. O gás de arraste utilizado foi H₂ com fluxo de 1,5 mL/min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram de 300 °C. As injeções foram realizadas no modo “splitless” (1/100) a 300 °C. A identificação das substâncias baseou-se na comparação eletrônica do padrão de fragmentação nos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005).

Os pontos de fusão não corrigidos foram determinados em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer – *Spectrum One* (ATR).

As análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker DPX-200 e DRX-400 linha *ADVANCE*. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo CDCl_3 como solvente.

1.2. Procedimentos cromatográficos

Na cromatografia em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recobertas por sílica-gel 60 G Merck, 0,25 mm de espessura, ativada a 100 °C. Na cromatografia em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro de diversos diâmetros e eluídas normalmente sob pressão atmosférica. A proporção utilizada entre amostra e fase estacionária foi aproximadamente 1:30. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh), Sephadex LH-20 e florisil.

Na cromatografia por exclusão em gel, Sephadex LH-20 foi mantido em contato com o solvente a ser utilizado como fase móvel por 24 h e, em seguida, empacotado em coluna de vidro até a total sedimentação do suporte. Os extratos foram dissolvidos em quantidades suficientes da fase móvel e, então, aplicadas suavemente no topo da coluna até a absorção completa no suporte, seguida por eluição no solvente apropriado⁴¹.

Os reveladores cromatográficos foram irradiação no Ultravioleta (luz UV; $\lambda = 254$ e 366 nm), vapores de iodo e solução vanilina/ácido perclórico. Este último revelador foi preparado pela mistura de partes iguais de uma solução constituída por 1,0 g de vanilina em 100 mL de etanol com outra solução constituída por 3 mL de ácido perclórico (70%) em 97 mL de água. A cromatoplaça foi borrifada pela solução e aquecida em estufa por 10 min a 100 °C.

1.3. Testes microbiológicos

Os bioensaios foram realizados empregando-se bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 11779) e gram-negativas (*Citobacter freundii* ATCC 25723), seguindo o protocolo citado por Takahashi, J. A., *et al.*⁴³

1.4. Testes parasitológicos

Os bioensaios foram realizados empregando-se cepa Y de *Trypanosoma cruzi* a partir de um inóculo de 2,0 a 2,5 x 10⁶ tripomastigotas/mL, a temperaturas entre 4 e 8 °C, com tempo de contato de 24 h.

2. Metodologia fitoquímica

2.1. Material vegetal

A amostra de *Lychnophora pinaster* Mart. foi coletada no Condomínio Retiro das Pedras, Serra da Moeda (Município de Nova Lima, MG – Brasil) em abril de 2007. A identificação botânica do material vegetal foi feita por comparação com exsicata depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o código BHCB:24322.

2.2. Obtenção dos extratos

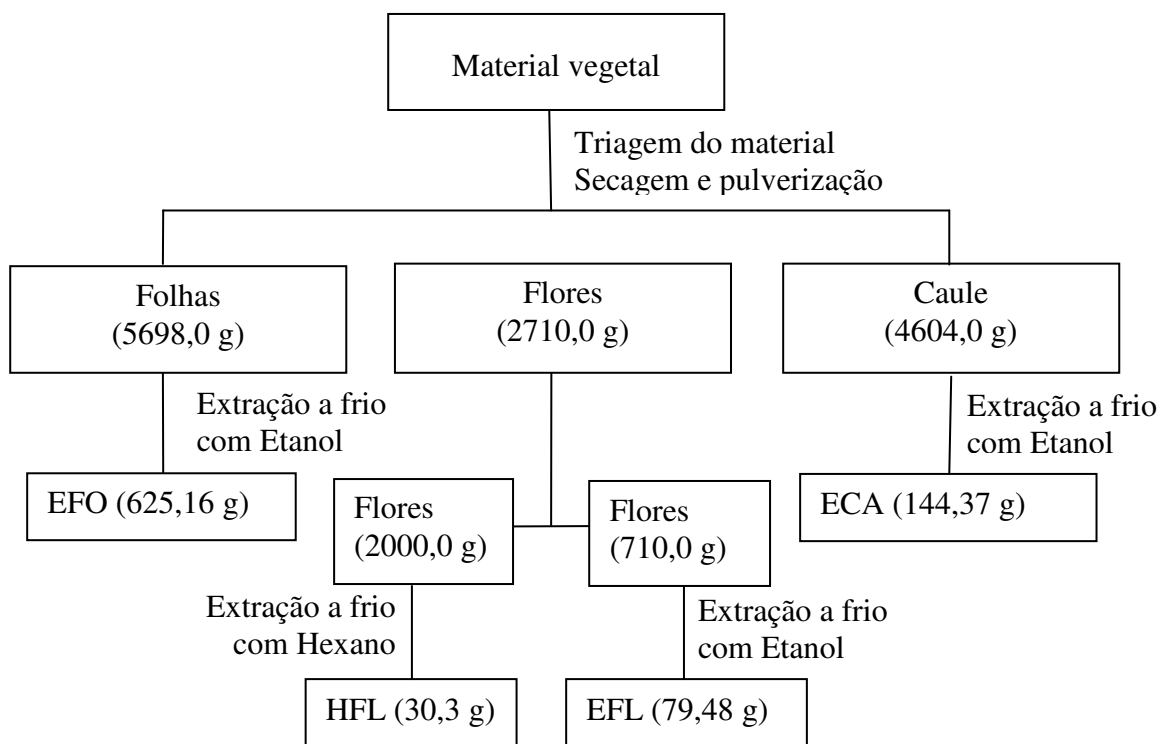
As partes aéreas foram submetidas à secagem em estufa por aproximadamente uma semana, a temperatura média de 60 °C. Durante este processo, o material vegetal foi separado em folhas, caule e flores e pulverizado em moinho de esferas, obtendo-se as massas indicadas no

Esquema II.1, que mostra também a sequência da obtenção dos extratos das diferentes partes da planta.

As folhas pulverizadas (5698,0 g) foram colocadas em um erlenmeyer de 5 L e adicionou-se etanol (EtOH) até submergir todo o material pulverizado. A extração foi realizada à temperatura ambiente (18 a 24 °C) por 7 dias. A mistura foi filtrada em funil de placa de vidro sinterizado. Posteriormente, a solução etanólica das folhas foi concentrada, empregando-se evaporador rotativo a temperatura de aproximadamente 60 °C e obtendo-se, após evaporação do solvente, o extrato etanólico das folhas (EFO; 625,16 g).

O caule pulverizado (4604,0 g) foi submetido a extração em EtOH por 7 dias à temperatura ambiente, obtendo-se, após evaporação do solvente, extrato etanólico do caule (ECA; 144,37 g).

Uma parte das flores pulverizadas (2000,0 g) foi submetida a extração em hexano por 7 dias à temperatura ambiente, obtendo-se, após a evaporação do solvente, o extrato hexânico das flores (HFL; 30,3 g). A outra parte das flores pulverizadas (710,0 g) foi submetida a extração em EtOH por 7 dias à temperatura ambiente, obtendo-se, após a evaporação do solvente, o extrato etanólico das flores (EFL; 79,48 g), sendo obtidos, portanto, dois extratos brutos para as flores.



Esquema II.1. Preparação dos extratos orgânicos de *L. pinaster*.

2.3. Fracionamento do extrato etanólico das folhas (EFO)

EFO foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 108 frações de 250 mL eluídas em hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e metanol (MeOH), em polaridade crescente. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.1.

Tabela II.1. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EFO

Fração	Eluente	Grupo	Massa		Fração	Eluente	Grupo	Massa
1 a 3	Hexano	FOG1	94,92g		59	AcOEt	FOG24	0,26 g
4 a 9		FOG2	9,01 g		60 e 61		FOG25	7,84 g
10		FOG3	7,33 g		62		FOG26	7,17 g
11 e 12		FOG4	1,29 g		63 e 64		FOG27	4,29 g
13 e 14		FOG5	2,59 g		65 e 66		FOG28	0,35 g
15 a 19		FOG6	6,09 g		67 e 68		FOG29	2,89 g
20		FOG7	0,92 g		69 a 76		FOG30	13,21 g
21		FOG8	0,72 g		77 a 81		FOG31	2,48 g
22 e 23	EtOH	FOG9	2,96 g		82 e 83	FOG32	29,76 g	
24		FOG10	1,27 g		84 a 88	FOG33	15,35 g	
25 e 26		FOG11	1,39 g		89	FOG34	1,17 g	
27		FOG12	4,85 g		90 a 92	FOG35	1,73 g	
28 e 29		FOG13	0,62 g		93 e 94	FOG36	2,06 g	
30 e 31		FOG14	1,61 g		95 e 96	FOG37	4,62 g	
32		FOG15	1,51 g		97	FOG38	4,40 g	
33 e 34		FOG16	19,64 g		98 a 101	FOG39	1,20 g	
35 a 39		FOG17	10,03 g		102 e 103	FOG40	1,17 g	
40 a 44		FOG18	1,00 g		104	FOG41	17,81 g	
45	MeOH	FOG19	0,31 g		105	FOG42	2,55 g	
46 a 48		FOG20	7,25 g		106	FOG43	0,73 g	
49 a 51		FOG21	1,36 g		107	FOG44	0,39 g	
52 e 53		DCM	FOG22	8,71 g		108	FOG45	5,44 g
54 a 58			FOG23	2,35 g				

O grupo FOG1 foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 160 frações de 250 mL eluídas em hexano, DCM, AcOEt, EtOH e MeOH, em polaridade crescente. Após análise comparativa por CCD, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.2.

Tabela II.2. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1

Fração	Eluente	Grupo	Massa		Fração	Eluente	Grupo	Massa
1	Hexano	FOG1-R1	5,14 g		41 a 65	Hexano:DCM (4:1)	FOG1-R11	16,89 g
2		FOG1-R2	7,79 g		66 a 78		FOG1-R12 a FOG1-R24	
3		FOG1-R3	3,65 g					
4 a 8		FOG1-R4	4,62 g		79 a 96	Hexano:DCM (2:1)	FOG1-R25 a FOG1-R42	
9		FOG1-R5	1,19 g		97 a 121	DCM	FOG1-R43 a FOG1-R67	
10 a 32		FOG1-R6	7,59 g		122 a 133	DCM:AcOEt (4:1)	FOG1-R68 a FOG1-R79	
33	Hexano:DCM (4:1)	FOG1-R7	0,04 g		134 a 145	DCM:AcOEt (1:1)	FOG1-R80 a FOG1-R91	
34		FOG1-R8	0,15 g		146 a 155	AcOEt	FOG1-R92 a FOG1-R101	
35		FOG1-R9	0,79 g		156 a 159	EtOH	FOG1-R102 a FOG1-R105	
36 a 40		FOG1-R10	11,94 g		160	MeOH	FOG1-R106	0,01 g

Grupo	Massa		Grupo	Massa		Grupo	Massa		Grupo	Massa
FOG1-R12	0,35 g		FOG1-R31	0,24 g		FOG1-R50	0,54 g		FOG1-R69	0,16 g
FOG1-R13	0,30 g		FOG1-R32	0,32 g		FOG1-R51	0,64 g		FOG1-R70	0,15 g
FOG1-R14	0,31 g		FOG1-R33	0,29 g		FOG1-R52	0,52 g		FOG1-R71	3,14 g
FOG1-R15	0,22 g		FOG1-R34	0,27 g		FOG1-R53	0,62 g		FOG1-R72	1,56 g
FOG1-R16	0,30 g		FOG1-R35	0,25 g		FOG1-R54	0,71 g		FOG1-R73	0,61 g
FOG1-R17	0,25 g		FOG1-R36	0,22 g		FOG1-R55	0,41 g		FOG1-R74	0,29 g
FOG1-R18	0,47 g		FOG1-R37	0,19 g		FOG1-R56	0,41 g		FOG1-R75	0,13 g
FOG1-R19	0,41 g		FOG1-R38	0,29 g		FOG1-R57	0,27 g		FOG1-R76	0,14 g
FOG1-R20	0,40 g		FOG1-R39	0,19 g		FOG1-R58	0,26 g		FOG1-R77	0,20 g
FOG1-R21	0,38 g		FOG1-R40	0,23 g		FOG1-R59	0,22 g		FOG1-R78	0,35 g
FOG1-R22	0,30 g		FOG1-R41	0,26 g		FOG1-R60	0,22 g		FOG1-R79	0,22 g
FOG1-R23	0,34 g		FOG1-R42	0,37 g		FOG1-R61	0,33 g		FOG1-R80	0,27 g
FOG1-R24	0,52 g		FOG1-R43	0,18 g		FOG1-R62	0,20 g		FOG1-R81	0,23 g
FOG1-R25	0,39 g		FOG1-R44	0,24 g		FOG1-R63	0,22 g		FOG1-R82	0,72 g
FOG1-R26	0,45 g		FOG1-R45	1,75 g		FOG1-R64	0,18 g		FOG1-R83	0,76 g
FOG1-R27	0,35 g		FOG1-R46	2,28 g		FOG1-R65	0,19 g		FOG1-R84	0,37 g
FOG1-R28	0,27 g		FOG1-R47	1,90 g		FOG1-R66	0,14 g		FOG1-R85	0,28 g
FOG1-R29	0,25 g		FOG1-R48	1,45 g		FOG1-R67	0,14 g		FOG1-R86	0,24 g
FOG1-R30	0,23 g		FOG1-R49	0,31 g		FOG1-R68	0,19 g		FOG1-R87	0,13 g

O grupo FOG1-R1 apresentou-se como um sólido branco foi identificado como sendo:

Hidrocarbonetos C₁₄ e C₁₆: CG t_R = 14,175 e 15,858 min; RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃) δ_C

31,9, 29,7, 29,4, 25,2, 22,7, 16,8 e 14,1.

O grupo FOG1-R4 apresentou-se como um óleo amarelo (4,62 g). Mistura complexa contendo 3-*O*-acetil-lupeol (**22**) e 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol (**23**). CG $t_R = 5,529, 7,155, 7,400, 9,374, 11,344, 13,214, 14,095, 14,986, 15,800, 16,667, 18,728, 19,464, 19,961, 20,817$; IV (cm^{-1}) $\bar{\nu} 2921,7, 2851,8, 1733,2, 1463,4, 1378,9, 1243,7, 1173,9, 1009,1$ e $979,7$. Os dados de RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) encontram-se na Tabela III.1 (p. 46).

O grupo FOG1-R5 foi submetido a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco (1,19 g). 3-*O*-Acetil- α -amirina (**24**): IV (cm^{-1}) $\bar{\nu} 2923,6, 1733,5, 1449,0, 1387,0, 1378,2, 1365,8, 1243,1, 1022,8, 1003,2, 984,8$ e $968,2$; CG/EM $t_R = 43,11$ min, m/z 468 [M^+], 454, 368, 270, 249, 218 (pico base), 203, 189, 175, 147, 135, 95, 69 e 55.

O grupo FOG1-R6 foi submetido à CC de sílica gel, sendo coletadas 178 frações de 50 mL eluídas em hexano e DCM, em polaridade crescente. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.3, pg.27.

Tabela II.3. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1-R6

Fração	Eluente	Grupo	Massa
1 a 19	Hexano	FOG1-R6-G1	0,012 g
20 a 24	Hexano:DCM (9:1)	FOG1-R6-G2	0,540 g
25 a 28		FOG1-R6-G3	0,789 g
29 a 32		FOG1-R6-G4	1,241 g
33 a 35		FOG1-R6-G5	1,457 g
36 a 60		FOG1-R6-G6	1,751 g
61 a 70		Hexano:DCM (4:1)	FOG1-R6-G7
71 a 80	FOG1-R6-G8		0,879 g
81 a 103	Hexano:DCM (3:1)	FOG1-R6-G9	0,458 g
104		FOG1-R6-G10	0,024 g
105 a 123		FOG1-R6-G11	0,487 g
124		FOG1-R6-G12	0,098 g
125 a 157	Hexano:DCM (7:3)	FOG1-R6-G13	0,687 g
158 a 172	Hexano:DCM (1:1)	FOG1-R6-G14	0,789 g
173 a 178	DCM	FOG1-R6-G15	0,879 g

O grupo FOG1-R6-G6 foi submetido a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido cristalino branco (1,751 g). 3-O-Acetil- α -amirina (**24**): p.f.: 171,9 a 176,2 °C; IV (cm⁻¹) ν 2916, 2848,7, 1732,4, 1455,1, 1386,5, 1378,3, 1365,5, 1242,9, 1022,7, 1002,7, 985,0 e 968,1. Os dados de RMN de ¹³C são apresentados na Tabela III.2 (pág. 69).

O grupo FOG1-R10 foi submetido a CC de sílica gel, sendo coletadas 173 frações de 50 mL eluídas em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.4.

Tabela II.4. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de FOG1-R10

Fração	Eluente	Grupo	Massa
1 a 14	Hexano	FOG1-R10-G1	0,126 g
15 a 25	Hexano:DCM (95:5)	FOG1-R10-G2	0,068 g
26 a 33	Hexano:DCM (4:1)	FOG1-R10-G3	0,348 g
34 a 46		FOG1-R10-G4	1,135 g
47 a 51		FOG1-R10-G5	0,625 g
52 a 59		FOG1-R10-G6	1,245 g
60 a 100		FOG1-R10-G7	0,264 g
101 a 105		Hexano:DCM (1:1)	FOG1-R10-G8
106 e 107	FOG1-R10-G9		0,247 g
108 a 113	FOG1-R10-G10		0,262 g
114 a 152	FOG1-R10-G11		0,094 g
153 a 157	DCM	FOG1-R10-G12	0,075 g
158 e 159		FOG1-R10-G13	0,061 g
160 e 161		FOG1-R10-G14	0,054 g
162 a 164	DCM:AcOEt (4:1)	FOG1-R10-G15	0,048 g
165 a 168		FOG1-R10-G16	0,055 g
169 a 173		FOG1-R10-G17	0,380 g

O grupo FOG1-R10-G4 foi submetido a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco (1,135g). 3-*O*-Alquil- α -amirina (**25**): p.f.: 77,0 a 78,2 °C; IV (cm⁻¹) $\bar{\nu}$ 3276, 2926, 2848, 1472, 1462, 1378, 1036, 995, 730 e 719; CG t_R = 12,926, 13,870, 14,842, 15,683, 16,601, 17,499, 18,624, 19,837, 20,606 e 21,202 min. Os dados de RMN de ¹³C são apresentados na Tabela III.2 (pág. 69).

O grupo FOG1-R11 foi submetido a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido branco (16,89 g). Mistura de lupeol (**13**) e α -amirina (**14**) e 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol (**26**): IV (cm⁻¹) $\bar{\nu}$ 3278, 2946, 2918, 2852, 1738, 1464, 1387, 1378, 1359, 1189, 1096, 1036, 992 e 882; CG/EM t_R= 44,528 min (*m/z* 282 [M⁺]), 47,790 min (*m/z* 366 [M⁺]), 54,942 min (*m/z* 412 [M⁺]) e 57,195 min (*m/z* 426 [M⁺]). Os dados de RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃) encontram-se na Tabela III.2 (pág. 69).

2.4. Fracionamento do extrato etanólico do caule (ECA)

O extrato etanólico do caule (ECA) foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel, sendo coletadas 106 frações de 250 mL eluídas em hexano, DCM, AcOEt, EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.5.

Tabela II.5. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de ECA

Fração	Eluente	Grupo	Massa(g)		Fração	Eluente	Grupo	Massa(g)
1	Hexano:DCM (9:1)	CAG1			65 e 66	AcOEt	CAG22	24,6713
2		CAG2	23,2505		67		CAG23	20,4238
3		CAG3			68		CAG24	23,5351
4		CAG4			69		CAG25	38,6300
5		CAG5			70 a 74		CAG26	46,0548
6 a 8	Hexano:DCM (7:3)	CAG6	15,9568		75	AcOEt:EtOH (4:1)	CAG27	41,0802
9 a 13		CAG7	23,4707		76		CAG28	34,9980
14 a 18		CAG8			77 a 82		CAG29	51,6388
18 a 23		CAG9	24,0060		83		CAG30	23,0489
24 a 29		CAG10	24,1072		84		CAG31	27,0037
30 e 31	Hexano:DCM (1:1)	CAG11	23,5979		85	AcOEt:EtOH (3:1)	CAG32	27,3198
32 e 33		CAG12	24,1646		86 a 90		CAG33	33,1140
34 a 39		CAG13	22,9731		91	EtOH	CAG34	16,2791
40 a 43		CAG14	19,9750		92 a 94			
44	DCM	CAG15	20,6674		95	MeOH	CAG35	24,7455
45 a 48		CAG16	23,4330		96		CAG36	23,9413
49 a 55		CAG17	23,4982		97 a 99		CAG37	25,0940
56 a 60	AcOEt	CAG18	22,8186		100 a 106	CAG38	CAG39	44,9209
61		CAG19	21,6370					
62		CAG20	43,9557					
63 e 64		CAG21	25,7580					

O Grupo CAG5 (126,0 mg) foi recristalizado em acetona e submetido a CC de alumina. A primeira fração recolhida (CAG5-R1) apresentou-se como sólido branco (51,4 mg). 3β -OAc, Δ^7 ,baurenila (**27**): p.f.: 267,2 – 275,4 °C; IV (cm^{-1}) $\overline{\nu}$ 2960, 2848, 1736, 1473, 1461, 1376, 1217, 736 e 718; RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ_{H} 5,46 (t, $J = 4,0$ Hz, H-7), 4,56 (dd, $J = 10,5$ e 5,0 Hz, H-3) e 2,10 (s, CH_3). Os dados de RMN de ^{13}C são apresentados na Tabela IV.1 (pág. 76).

A segunda fração recolhida (CAG5-R2-G2) foi submetida à CC de alumina eluída em hexano:DCM (7:3), obtendo-se um sólido branco (34,9 mg). Friedelina (**16**): p.f.: 247,8–249,0 °C; IV (cm^{-1}) ν 2954, 2930, 2848, 1736, 1472, 1462, 1378, 1171, 730 e 719. Os dados de RMN de ^{13}C são apresentados na Tabela IV.2 (pág. 80).

O grupo CAG8 apresentou-se como sólido branco, foi lavado com éter de petróleo e recristalizado em EtOH. Lupeol (**13**) e α -amirina (**14**): p.f.: 234,8 – 238,0 °C. Os dados de RMN de ^{13}C são apresentados na Tabela III.2 (pág. 69).

O grupo CAG11 foi submetido a coluna filtrante para remoção de clorofila, empregando carvão ativo e MeOH. O sólido branco foi submetido a fracionamento por CC de sílica gel eluída com hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas em DCM foram reunidas e submetidas a recristalização em MeOH, fornecendo um sólido cristalino branco. Estigmasterol (**28**) e β -sitosterol (**29**). p.f.: 164,8 – 168,0 °C; CG/EM $t_{\text{R}} = 6,487$ min (m/z 412 [M^+]). Os dados de RMN de ^{13}C são apresentados na Tabela IV.3 (pág. 88).

Os materiais dos demais grupos oriundos do fracionamento cromatográfico do extrato do caule encontram-se em estudos fitoquímicos.

2.5. Fracionamento do extrato etanólico das flores (EEFL)

EEFL foi submetido à CC de sílica gel, sendo coletadas 234 frações de 250 mL eluídas em hexano, DCM, AcOEt, EtOH, MeOH e água, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.6.

Tabela II.6. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EFL

Fração	Eluente	Grupo	Massa
1 a 7	Hexano	EEFLG1	
8 a 17		EEFLG2	
18 e 19	Hexano:DCM (1:1)	EEFLG3	
20 a 22		EEFLG4	1,7610 g
23 e 24		EEFLG5	7,2311 g
25 a 36		EEFLG6	1,1819 g
37 a 42			
43 a 66	DCM		
67 a 69	DCM:AcOEt (9:1)		
70 a 90		EEFLG7	1,7659 g
91 a 115	DCM:AcOEt (3:2)	EEFLG8	
116 a 134	DCM:AcOEt (1:3)	EEFLG9	
135 a 163	AcOEt	EEFLG10	
164 a 209	EtOH	EEFLG11	
210 a 224	MeOH	EEFLG12	
225 a 229	MeOH:água (10:1)	EEFLG13	
230 a 232		EEFLG14	Contaminado por fungo
233 e 234		EEFLG15	

O grupo EEFLG5 apresentou coloração verde musgo, indicando a presença de clorofila. O material foi dissolvido em MeOH, adicionado carvão ativo e, em seguida, aquecido e filtrado em CC de sílica gel. O sólido obtido após evaporação do solvente foi submetido à CC de sílica

gel, sendo obtidas 58 frações de 200 mL eluídas em hexano e DCM, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.7.

Tabela II.7. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EEFLG5

Fração	Eluente	Grupo	Massa (g)
1	Hexano	EEFLG5-R1	
2 e 3	Hexano:DCM (7:3)	EEFLG5-R2	
		EEFLG5-R3	
4 a 52	Hexano:DCM (1:1)	EEFLG5-R4	
		EEFLG5-R5	
		EEFLG5-R6	1,165
		EEFLG5-R7	
53 a 57	Hexano:DCM (1:3)	EEFLG5-R8	
58	DCM	EEFLG5-R9	

O grupo EEFLG5-R6 foi submetido à recristalização com MeOH fornecendo um sólido branco (1,165 g). Estigmasterol (**28**) e β -sitosterol (**29**): p.f.: 171,9 a 176,7 °C; IV (cm⁻¹) $\bar{\nu}$ 3428, 3320, 2950, 2864, 1660, 1640, 1459, 1381, 1367, 1060, 1052, 1023, 970, 958 e 800; CG/EM t_R = 33,584 min, m/z 412, 394, 255, 133, 69, 55 e 41; Os dados de RMN de ¹³C são apresentados na Tabela IV.3 (pág. 88).

2.6. Fracionamento do extrato hexânico das flores (EHFL)

EHFL foi submetido a fracionamento em CC de sílica gel, sendo coletadas 51 frações de 50 mL eluídas em hexano, DCM, AcOEt, EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.8.

Tabela II.8. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFL

ELUENTE	GRUPO	MASSA (g)
Hexano	EHFLH	1,06
DCM	EHFLD	12,84
AcOEt	EHFLA	12,46
EtOH	EHFLE	3,95
MeOH	EHFLM	Contaminado por fungo

O grupo EHFLD apresentou-se como material viscoso e amarelo e foi submetido a CC de sílica gel, sendo coletadas 31 frações de 50 mL eluídas em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.9.

Tabela II.9. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFLD

FRAÇÃO	ELUENTE	GRUPO	MASSA (g)
1 – 4	Hexano:DCM (1:10)	EHFLD ₁₀ H ₁	2,860
5	Hexano:DCM (1:10)	EHFLD ₁₀ H ₂	1,345
6	Hexano:DCM (1:10)	EHFLD ₁₀ H ₃	0,742
7	Hexano:DCM (1:10)	EHFLD ₁₀ H ₄	0,650
8	Hexano:DCM (1:10)	EHFLD ₁₀ H ₅	0,320
9 – 16	DCM	EHFLD ₁	0,840
17 – 23	DCM:AcOEt (8:2)	EHFLD ₈ A ₂ 1	0,743
24 – 25	DCM:AcOEt (8:2)	EHFLD ₈ A ₂ 2	0,562
26 – 27	DCM:AcOEt (8:2)	EHFLD ₈ A ₂ 3	0,822
28 – 31	AcOEt:DCM (8:2)	EHFLD ₂ A ₈ 1	0,711

O grupo EHFLD₁₀H₁ apresentou-se como material viscoso branco e com um perfil cromatográfico muito complexo, sendo, então, submetida a CC de florisil eluída em hexano. Após análise comparativa por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas em grupos, conforme Tabela II.10. O florisil possui características hidrofóbicas e por isso foi utilizado como fase estacionária.⁴²

Tabela II.10. Frações e grupos de frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EHFLD₁₀H₁

FRAÇÃO	ELUENTE	GRUPO	MASSA (g)
1 – 4	Hexano	EHFLH ₁	
5 – 6	Hexano	EHFLH ₂	
7 – 8	Hexano	EHFLH ₃	
9 – 12	Hexano	EHFLH ₄	

Este fracionamento cromatográfico será direcionado para a obtenção do ácido licnofóico, objeto de estudo do projeto de doutorado, portanto os resultados não estão ainda disponíveis.

3. Metodologia biológica

3.1. Testes antimicrobianos

3.1.1. Testes de difusão em ágar

No teste de difusão em Agar,⁴³ as bactérias foram individualmente inoculadas em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio infuso de cérebro e coração (BHI; 37,0 g/L) e, posteriormente, incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 0,5 mL deste material foi transferida a um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril constituída por soluções aquosas de NaCl (9,0 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L). Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e 0,4 mL do inóculo bacteriano. Discos contendo 100 µg da amostra

foram colocados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Um disco contendo o controle positivo (disco impregnado com o antibiótico cloranfenicol) ou o controle negativo (disco impregnado com o solvente utilizado para solubilizar a amostra) foi colocado no centro de cada placa. Foi feita a leitura dos halos de inibição após 24 h de incubação.

3.1.2. Testes de concentração inibitória mínima

No teste de concentração inibitória mínima,⁴⁴ as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo o meio BHI (2,0 mL) e, posteriormente, incubadas em estufa a 37 °C, durante 18 h. Após este período, 0,5 mL desta suspensão bacteriana foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma suspensão compatível com a escala 5 de McFarland (inóculo). Para cada amostra a ser testada, foram usados 10 tubos de ensaio, contendo 1,8 mL do meio de cultura BHI no tubo 1 e 1,0 mL nos demais tubos (tubos 2-10). 200 µL da solução teste (contendo 1,000 mg de cada amostra dissolvidos em 200 µL de DMSO) foram colocados no tubo 1. Sequencialmente, transferiu-se 1 mL do tubo 1 para o tubo 2, depois 1 mL do tubo 2 para o tubo 3 e assim sucessivamente. Desprezou-se 1 mL do tubo 10. Adicionaram-se 100 µL do inóculo em cada tubo de ensaio. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 18 h e a leitura foi realizada. Observou-se a partir de qual tubo a mistura tornou-se turva. A concentração inibitória mínima (CIM) foi atribuída àquela concentração do tubo com a menor diluição e que não apresentou turbidez sendo, portanto, a menor concentração que inibe o crescimento da bactéria teste.

3.2. Testes parasitológicos

Os testes de atividade tripanossomicida foram realizados no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Álvaro José Romanha. Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos contaminados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* para fornecer os tripomastigotas sanguíneos. As amostras (1,000mg) para o teste foram dissolvidas em DMSO (0,2 mL) e misturadas com o sangue contaminado (0,2 mL). Após 24 horas de tempo de contato, um inóculo de $2 - 2,5 \times 10^6$ tripomastigotas/mL e uma incubação entre 4 e 8 °C, as suspensões foram examinadas microscopicamente.

CAPÍTULO III:
ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS

- Resultados e Discussão

1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R1

A amostra do grupo FOG1-R1 apresentou-se como um sólido branco que foi submetido à análise por CG. A Figura III.1 apresenta o cromatograma de CG de FOG1-R1, indicando uma mistura contendo duas substâncias majoritárias. Os dois picos em maiores proporções relativas são registrados em $t_R = 14,175$ e $15,858$ min. A comparação do cromatograma de FOG1-R1 com cromatograma de padrões de hidrocarbonetos indicou que esses picos correspondem a hidrocarbonetos de C_{14} e C_{16} .

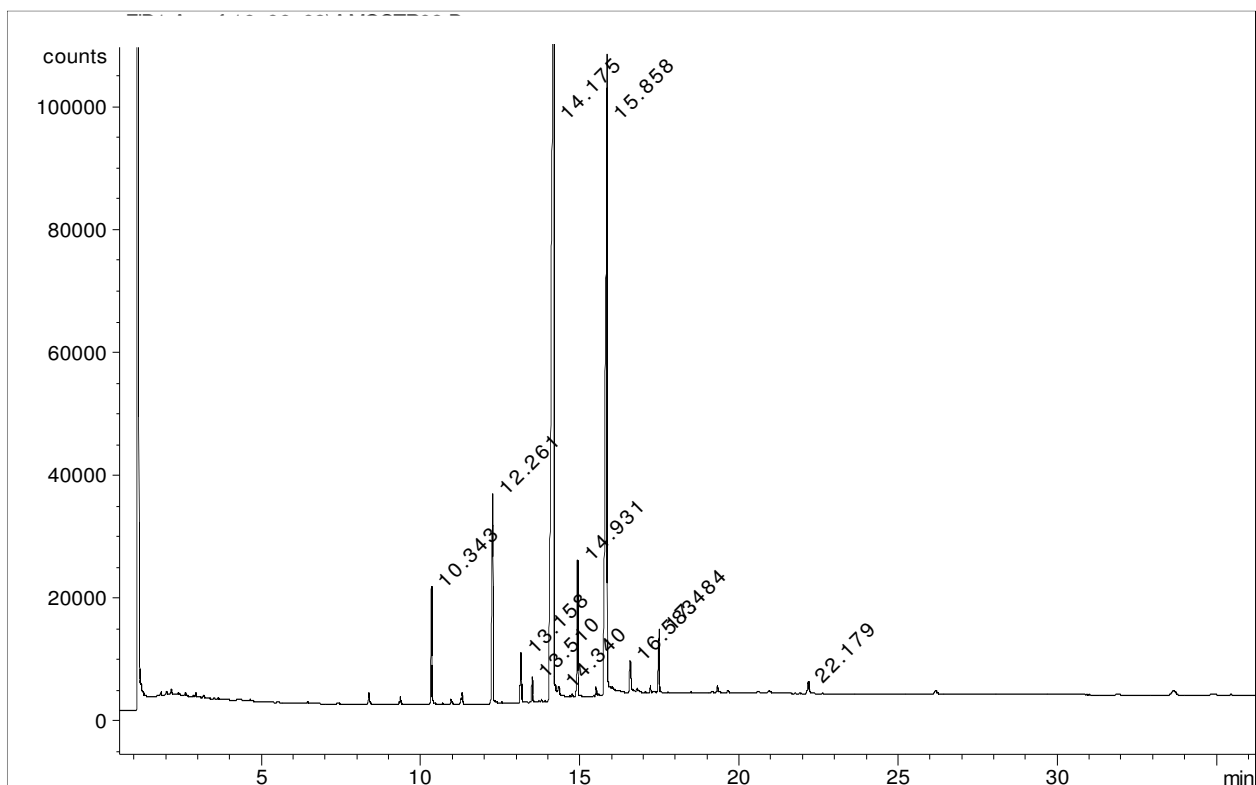


Figura III.1. Cromatograma de CG de FOG1-R1.

A Figura III.2 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R1. Os principais sinais de carbono são característicos de hidrocarbonetos alifáticos (δ_{C} 35,0 a 14,0), estando de acordo com as análises por CG.

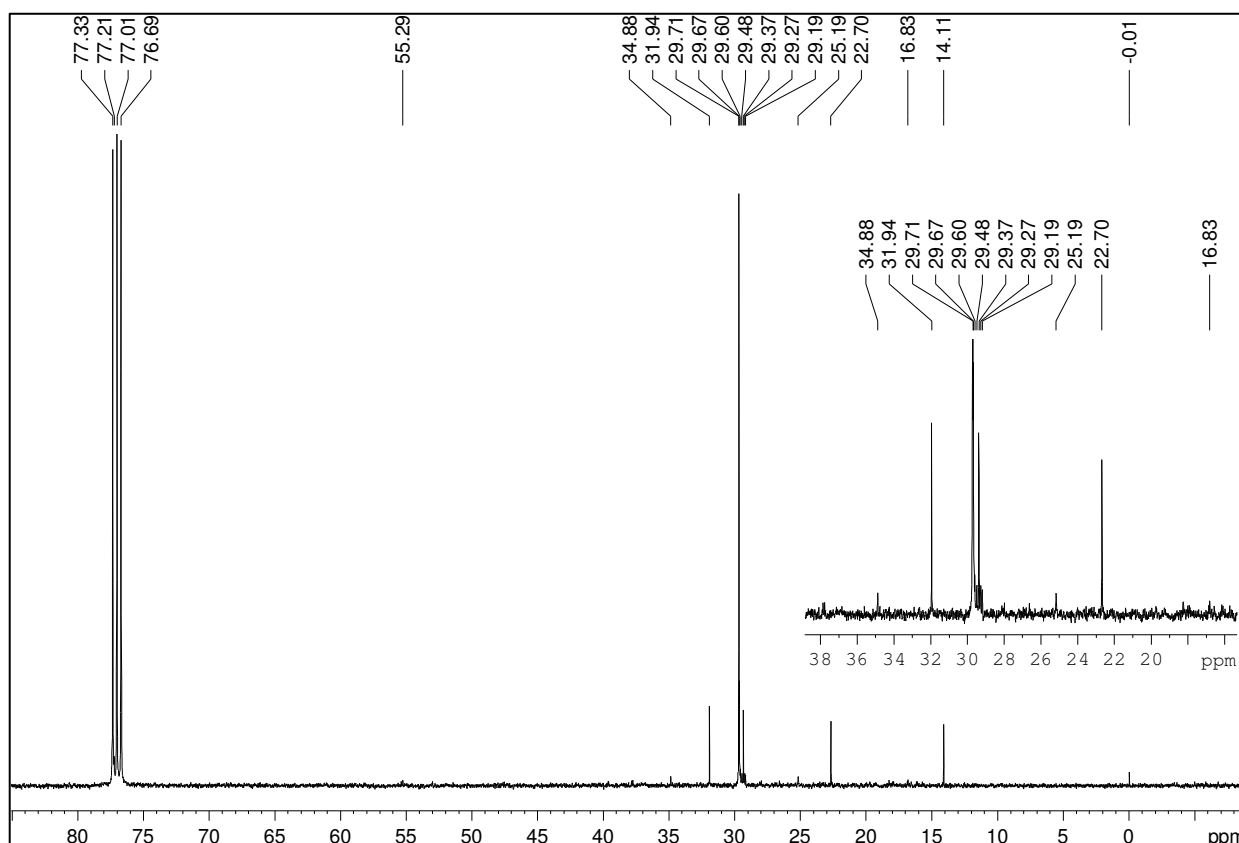


Figura III.2. Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R1 (400 MHz; CDCl_3).

2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R4

A amostra do grupo FOG1-R4 apresentou-se como um sólido ligeiramente amarelado que foi submetido à análise por CG. A Figura III.3 apresenta o cromatograma de CG de FOG1-R4, indicando uma mistura complexa contendo duas substâncias majoritárias. Os dois picos em maiores proporções relativas são registrados em $t_R = 5,529$ e $20,817$ min.

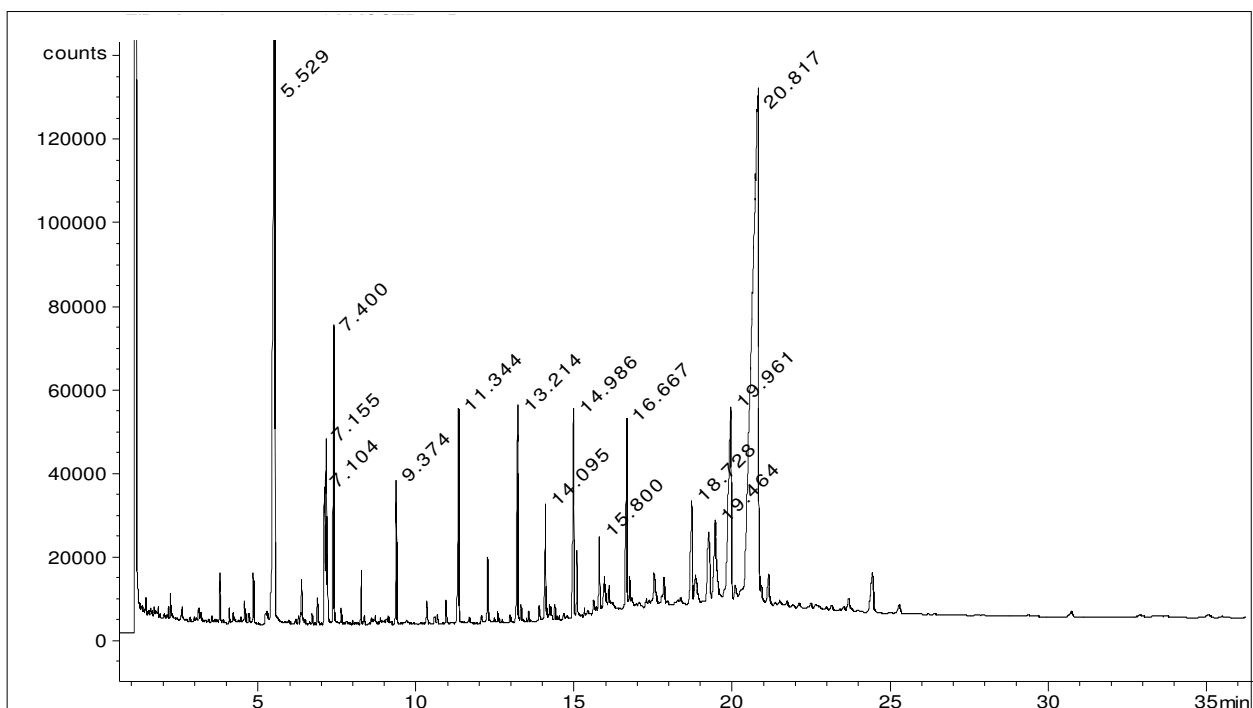


Figura III.3. Cromatograma de CG de FOG1-R4.

A Figura III.4 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R4. As absorções em $2921,7$ e $2851,8$ cm^{-1} são características de estiramentos C–H de grupos alifáticos. A absorção em $1733,2$ cm^{-1} é característica de estiramento C=O de grupos ésteres carboxílicos. As absorções em $1463,4$ e $1378,9$ cm^{-1} são atribuídas a deformações angulares de grupos metilas

e metilenos. As absorções em 1243,7 e 1173,9 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–O assimétrico e simétrico de grupos ésteres carboxílicos.

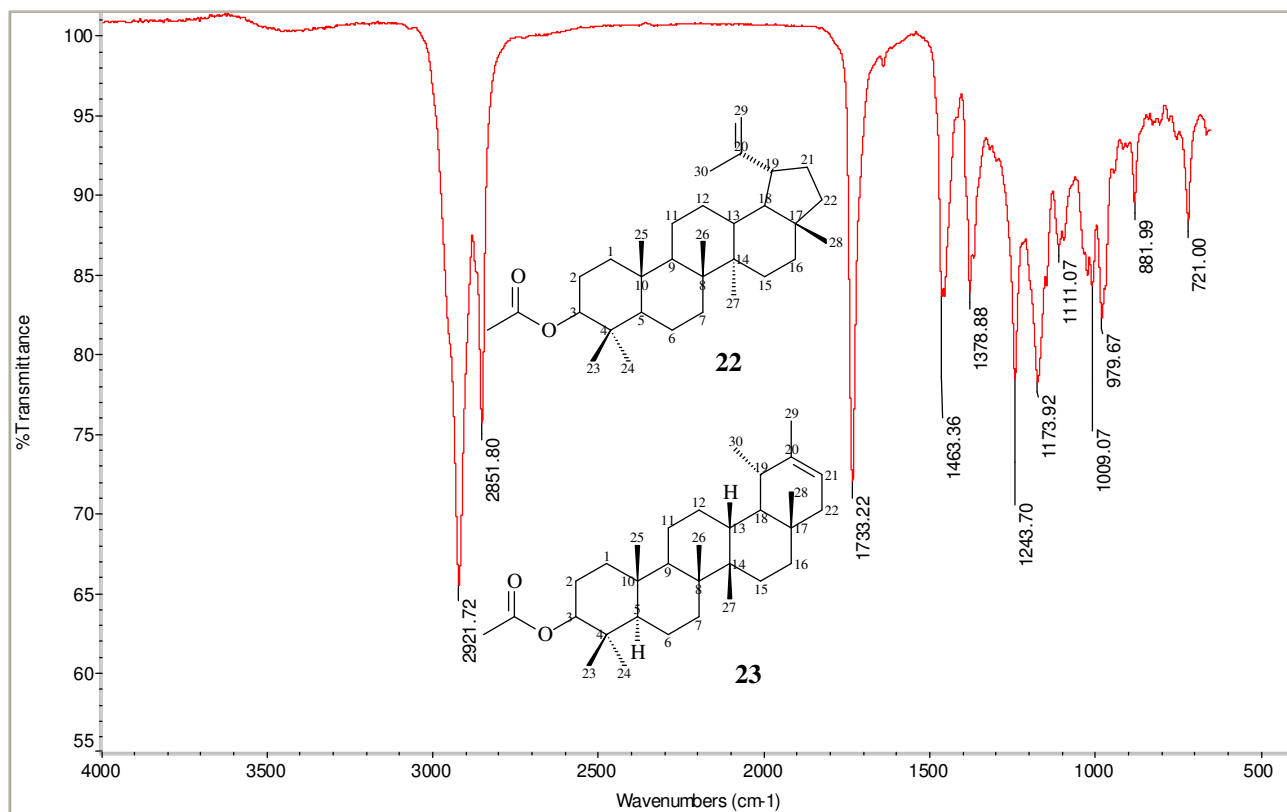


Figura III.4. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R4.

A Figura III.5 apresenta o espectro de RMN de ^1H de FOG1-R4. Os sinais nas regiões entre δ_{H} 5,36 (m) e 5,12 (t) e δ_{H} 4,69 (d) e 4,45 (m) podem ser atribuídos a hidrogênios alquenílicos. O sinal quarteto registrado em δ_{H} 4,12 (dd, $J=7,2$ Hz) pode ser atribuído a hidrogênio ligado a carbono sp^3 oxigenado e adjacente a um grupo metila, característico de grupos acetila. Os sinais registrados entre δ_{H} 2,50 e 0,80 são característicos de átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

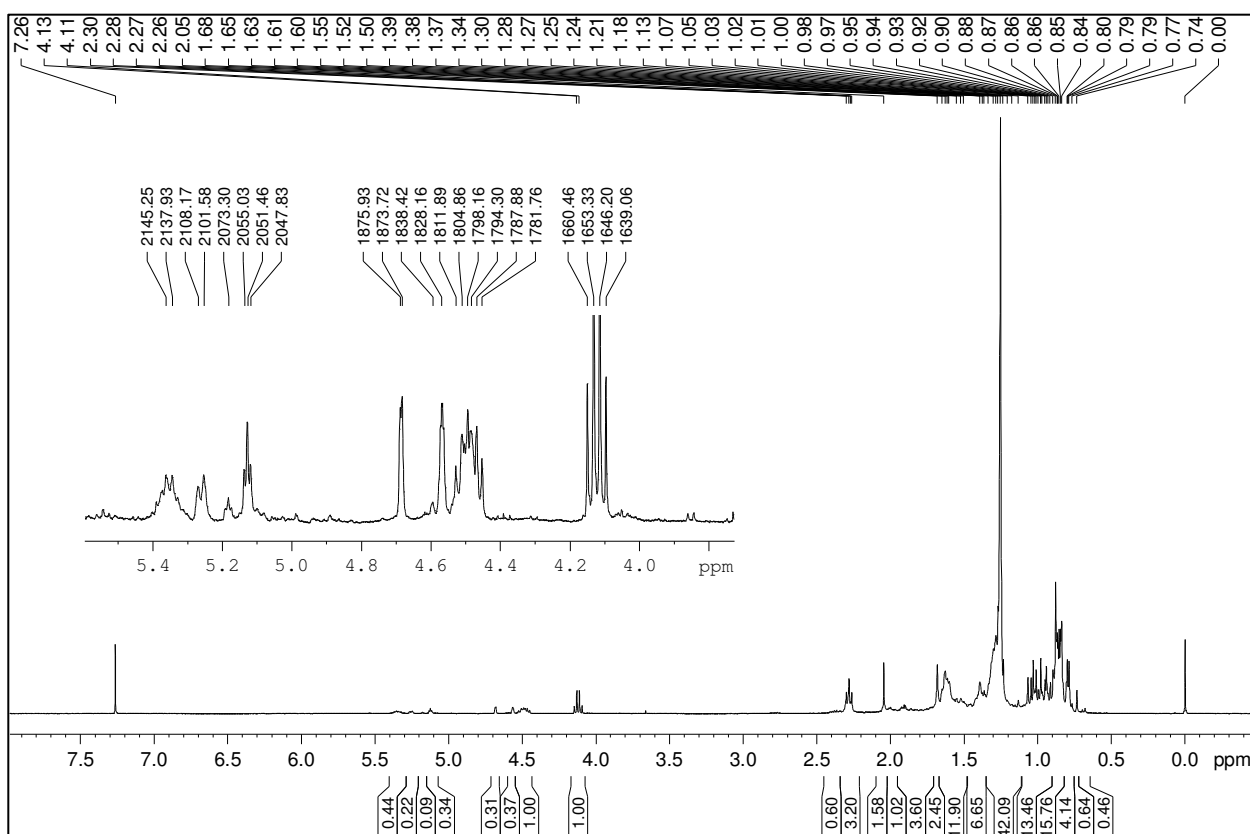


Figura III.5. Espectro de RMN de ¹H de FOG1-R4 (400 MHz; CDCl₃).

As Figuras III.6 e III.7 apresentam o espectro de RMN de ¹³C e subspectro DEPT 135° de FOG1-R4, que foram analisados comparativamente. Os sinais em δ_c 174,11, 174,10 e 171,06 podem ser atribuídos a átomos de carbono de grupos ésteres. Os sinais em δ_c 151,2 e 109,6 são sinais que sugerem derivados do lupeol.⁴⁵ Os sinais em δ_c 139,8 e 118,9 são característicos de derivados do pseudotaraxasterol.⁴⁵ Os sinais registrados em δ_c 81,3 e 80,9 são característicos de carbonos oxigenados em C-3 de ésteres carboxílicos de triterpenos pentacíclicos. O sinal em δ_c 60,4 é característico de carbono adjacente ao carbono oxigenado de grupos etoxila, podendo ser atribuído a outros derivados de pseudotaraxasterol e lupeol em menor quantidade.

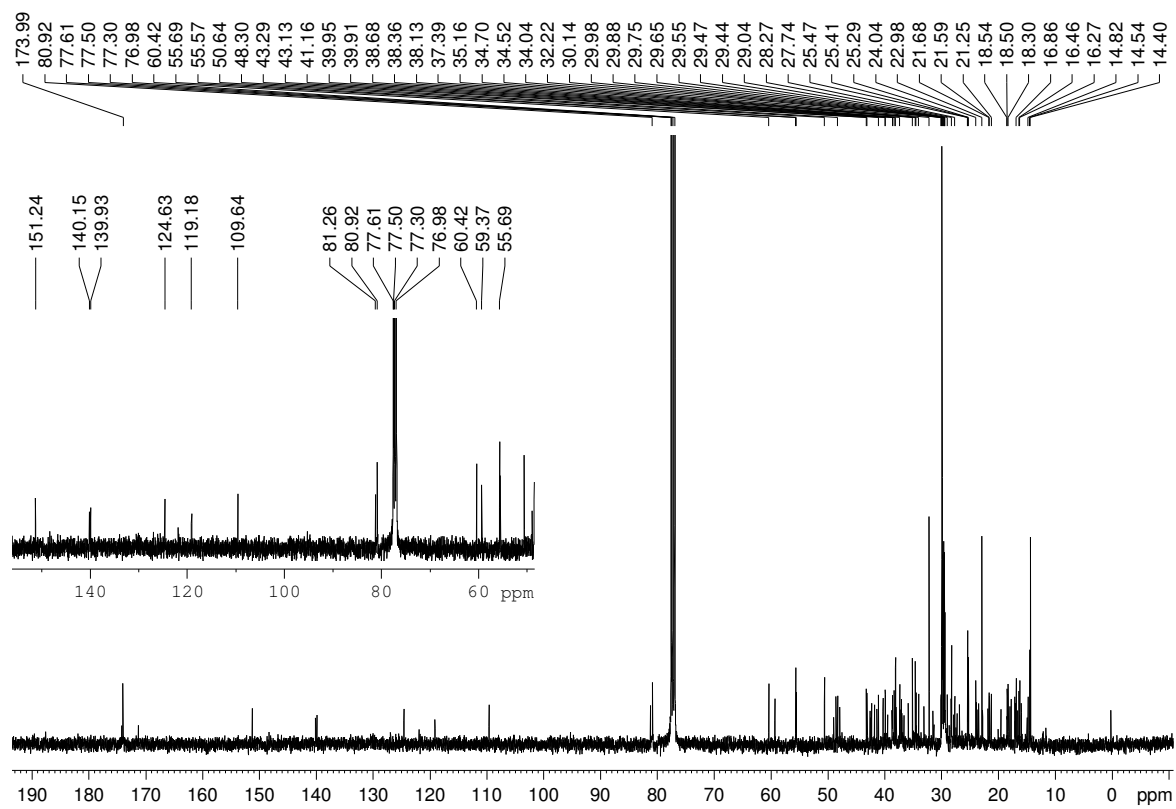


Figura III.6. Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R4 (100 MHz; CDCl_3).

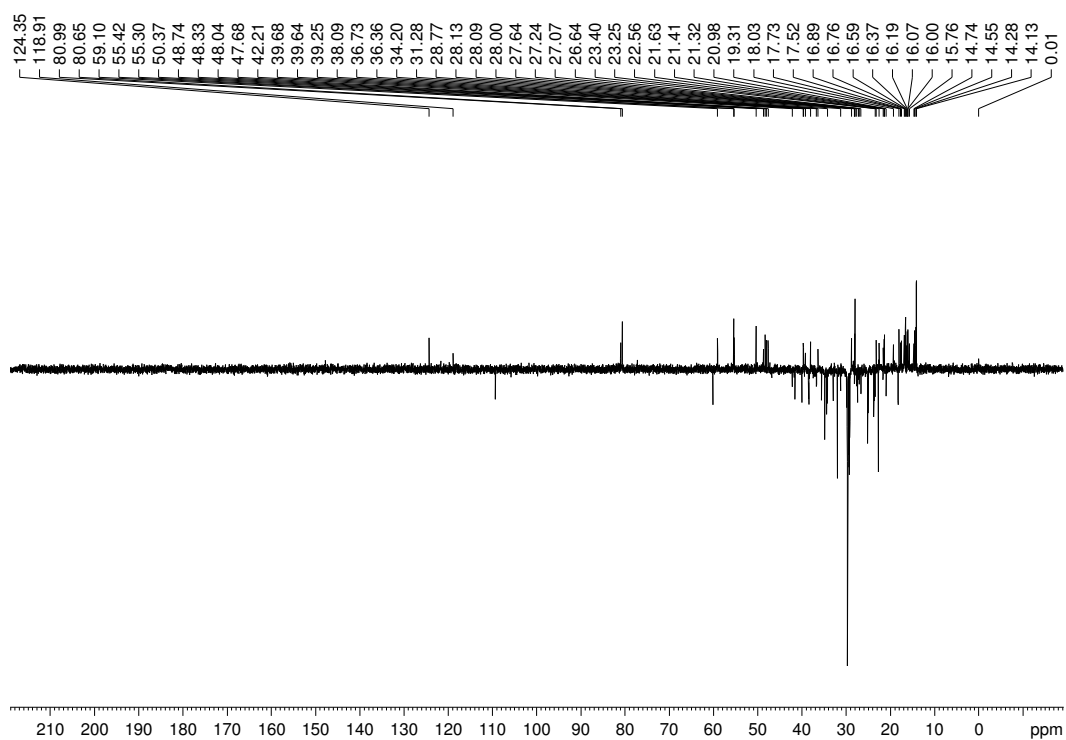


Figura III.7. Subespectro DEPT 135° de FOG1-R4 (100 MHz; CDCl_3).

A Figura III.8 apresenta o mapa de contornos HSQC de FOG1-R4. A correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 4,45 (m) com o sinal de carbono em δ_C 80,9 está de acordo com a proposta de um grupo acetila substituinte em C-3. Porém, os dados disponíveis não permitem indicar em qual substância o grupo etoxila é substituinte. Considerando os sinais analisados e a intensidade, relativamente alta, do sinal atribuído ao carbono do grupo éster carboxílico (δ_C 174,0) pode-se propor que os componentes majoritários da mistura são 3-*O*-acetil-lupeol (**22**) e 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol (**23**).

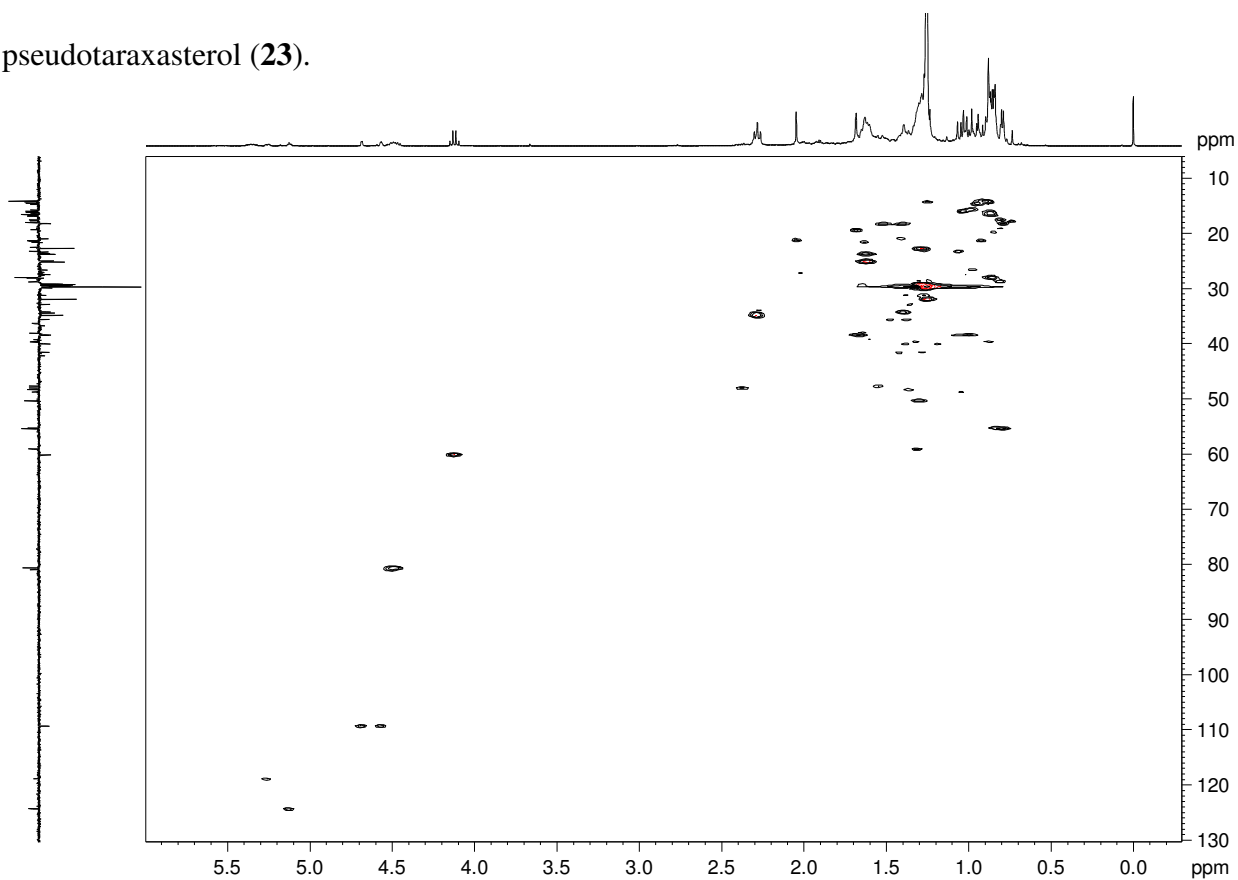
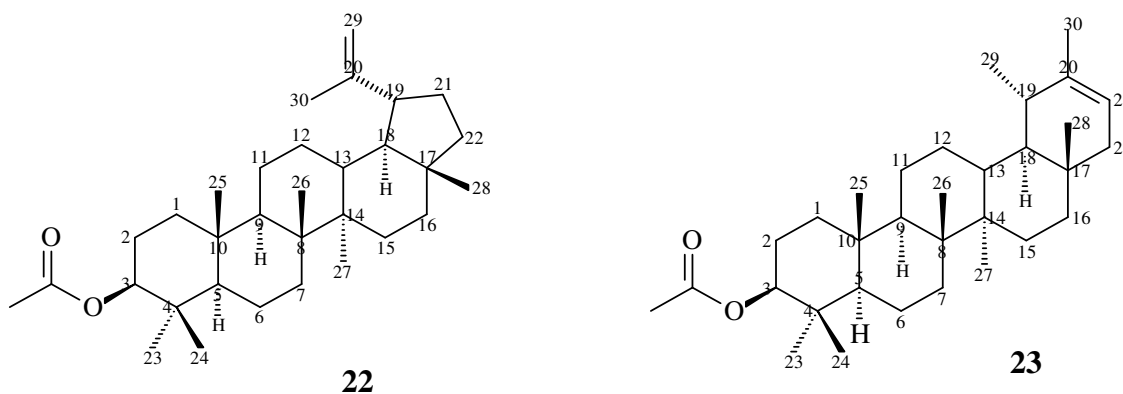


Figura III.8. Mapa de contornos HSQC de FOG1-R4 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).



Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresenta um sinal em δ_{H} 4,12 (dd, $J= 7,2$ Hz) que se encontra correlacionado por HSQC com o sinal de carbono metilênico em δ_{C} 60,4, indicando a presença de um constituinte derivado de **22** e/ou **23** apresentando substituinte em C-3.

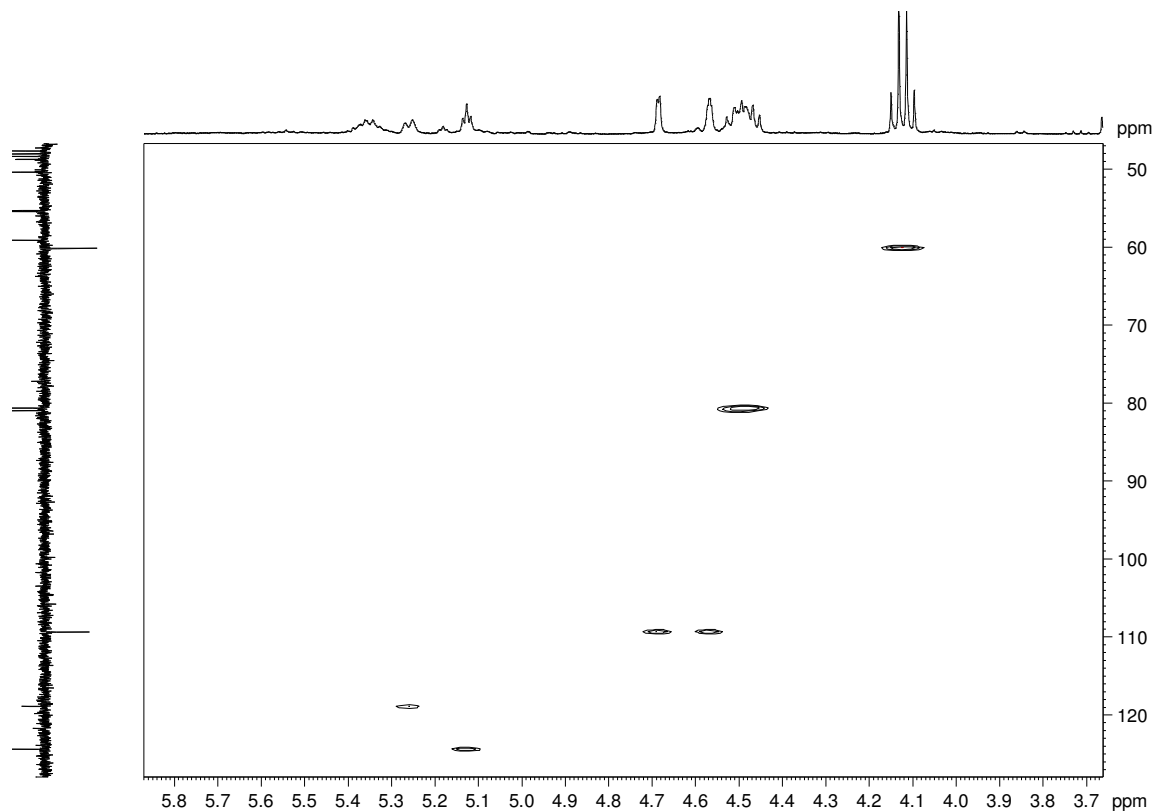
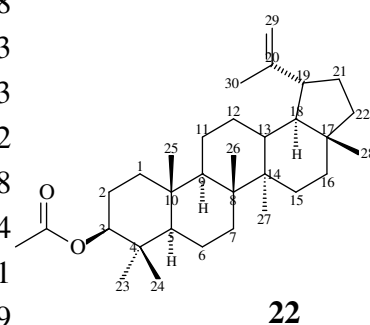
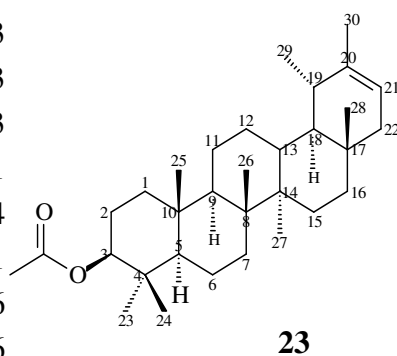


Figura III.9. Ampliação de correlações do mapa de contornos HSQC de FOG1-R4 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

A Tabela III.1 mostra a atribuição dos dados de RMN de ^{13}C de FOG1-R4 baseados na comparação com os dados correspondentes de lupeol e pseudotaraxasterol.⁴⁵ É importante ressaltar que um derivado do pseudotaraxasterol foi anteriormente isolado em *Lychnophora markgravi*⁴⁶ e para o éster do pseudotaraxasterol e do lupeol é a primeira vez que é registrado o isolamento destes na espécie *L. pinaster*.

Tabela III.1. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de FOG1-R4 e dados da literatura do lupeol e pseudotaraxasterol⁴⁵

Carbono	FOG1-R4	pseudotaraxasterol	FOG1-R4	Lupeol
C-1	38,8	38,8	38,8	38,7
C-2	27,7	27,4	27,7	27,4
C-3	80,9	79,0	80,9	78,9
C-4	38,8	38,9	38,8	38,8
C-5	55,6	55,3	55,6	55,3
C-6	18,3	18,3	18,3	18,3
C-7	34,5	34,3	34,5	34,2
C-8	41,2	41,1	41,2	40,8
C-9	50,6	50,4	50,6	50,4
C-10	37,1	37,1	37,1	37,1
C-11	21,6	21,6	21,2	20,9
C-12	27,7	27,6	25,3	25,1
C-13	38,8	39,2	38,0	38,0
C-14	42,4	42,3	42,4	42,8
C-15	26,9	27,0	27,3	27,4
C-16	36,6	36,7	35,2	35,5
C-17	34,5	34,4	43,1	43,0
C-18	48,6	48,7	48,3	48,2
C-19	36,6	36,3	47,9	47,9
C-20	139,9	139,8	151,2	150,9
C-21	118,9	118,9	29,8	29,8
C-22	42,4	42,2	40,3	40,0
C-23	28,3	28,0	28,2	28,0
C-24	15,8	15,4	15,8	15,4
C-25	16,3	16,3	16,2	16,1
C-26	16,0	16,1	16,0	15,9
C-27	14,8	14,8	14,5	14,5
C-28	17,8	17,7	18,0	18,0
C-29	22,8	22,5	109,6	109,3
C-30	21,7	21,7	19,5	19,3



3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R5

A amostra do grupo FOG1-R5 apresentou-se como um sólido branco de fusão na faixa de 238 e 240 °C, não indicando tratar-se de uma mistura complexa de substâncias. A Figura III.10 mostra o cromatograma de CG de FOG1-R5 que apresenta dois picos ($t_R = 41,13$ e $43,11$ min), sendo o último em maior proporção relativa.

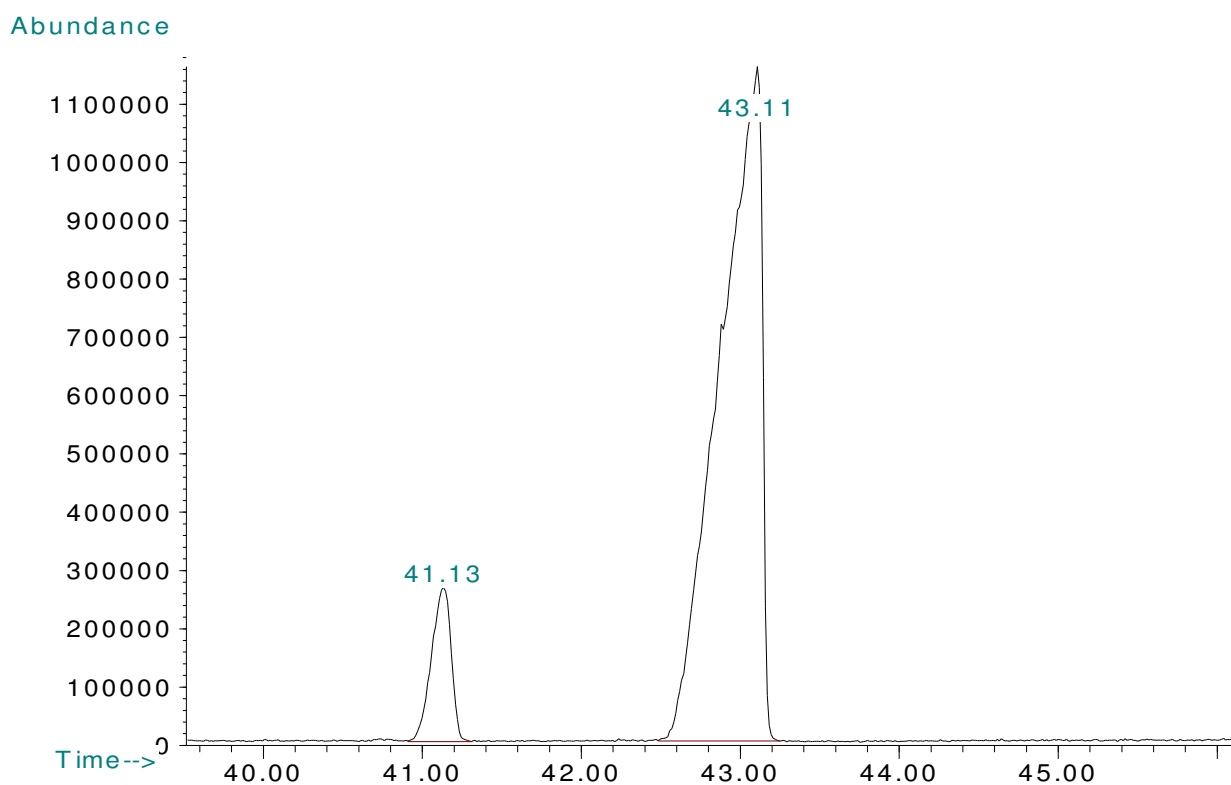


Figura III.10. Cromatograma de CG de FOG1-R5.

A Figura III.11 apresenta o espectro de massas da substância representada pelo pico em $t_R = 43,11$ min do cromatograma de CG de FOG1-R5. A consulta ao banco de dados Wiley sugere tratar-se do triterpeno pentacíclico α -amirina acetilada (**24**) (fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$; massa

molecular 468,36 uma; p.f.: 238 – 240 °C, (p.f. literatura: 231 – 233 °C)⁴⁷, com 93% de probabilidade.

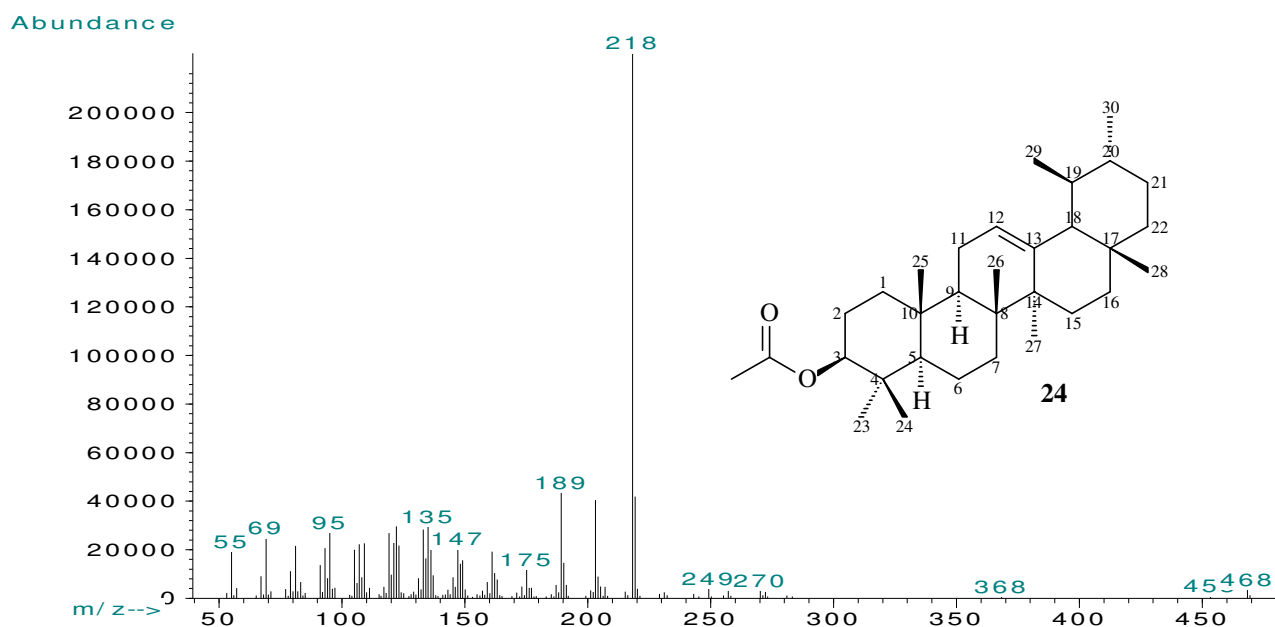


Figura III.11. Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 43,112 min do cromatograma de FOG1-R5.

A Figura III.12 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R5. As absorções entre 2900 a 2850 cm^{-1} são características de estiramentos C-H alifáticos. A absorção intensa em 1733 cm^{-1} é atribuída a estiramento C=O de ésteres carboxílicos. As absorções intensas em 1449, 1387 e 1378 cm^{-1} são devidas a deformações angulares de C-H de grupos metilas e metilenos de cadeias alifáticas. As absorções em 1243 e 1022 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente a estiramentos C-O assimétrico e simétrico. As atribuições das absorções no IV estão de acordo com a estrutura da α -amirina acetilada.

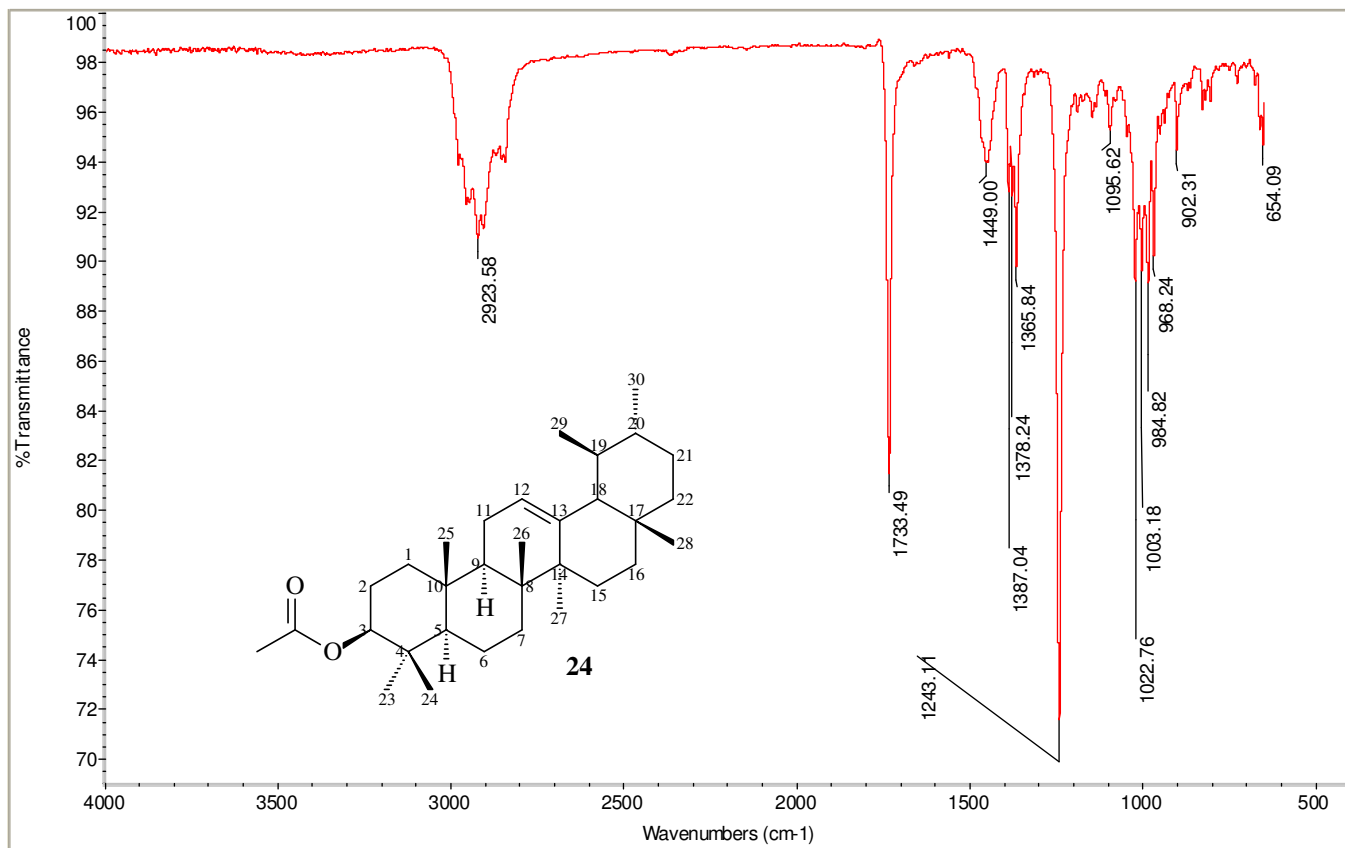


Figura III.12. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R5.

4. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R6

A amostra do grupo FOG1-R6 apresentou-se como um sólido amarelo que foi submetido à análise por CG. A Figura III.13 apresenta o cromatograma CG de FOG1-R6, indicando tratar-se de uma mistura. O cromatograma mostra um pico em $t_R = 10,758$ min do componente principal e três outros picos correspondentes aos componentes minoritários ($t_R = 10,004$ e $11,751$ min).

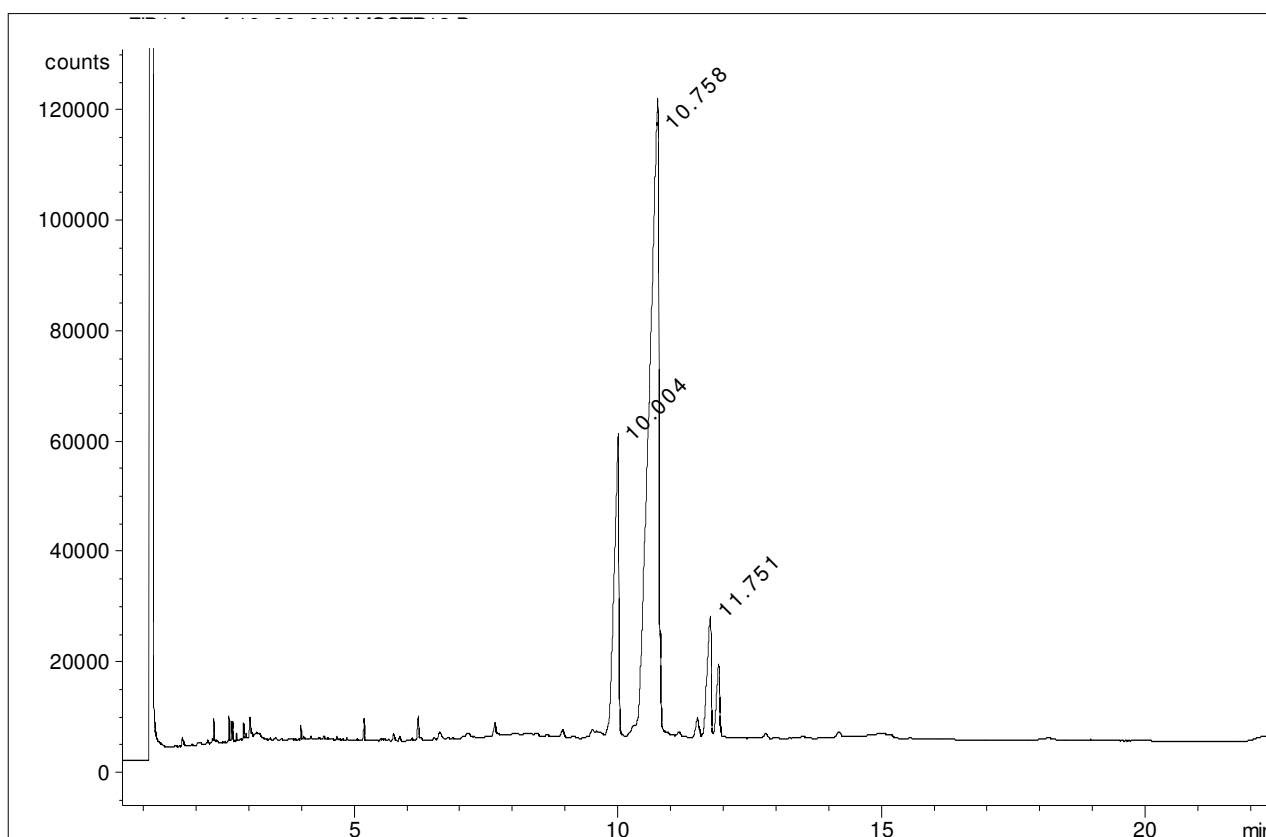


Figura III.13. Cromatograma de CG de FOG1-R6.

A Figura III.14 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R6. As absorções intensas em $2916,0$ e $2848,5\text{ cm}^{-1}$ são típicas de estiramentos C-H alifáticos. A absorção intensa em $1731,3\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a estiramento C=O característica de ésteres carboxílicos. As absorções em $1461,9$ e $1365,8\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a estiramentos C-C e deformações angulares de H-C-H de cadeias alifáticas. As absorções em $1243,7$ e $1023,9\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à estiramentos C-O assimétrico e simétrico, respectivamente. Essas absorções registradas no espectro no IV de FOG1-R6, foram muito similares às registradas no espectro no IV de FOG1-R5 (Fig. III.11, pg.48), sugerindo também uma similaridade estrutural entre os

fitoconstituintes de ambos os grupos de frações, i.e. um derivado 3-*O*-acetila de um triterpeno pentacíclico.

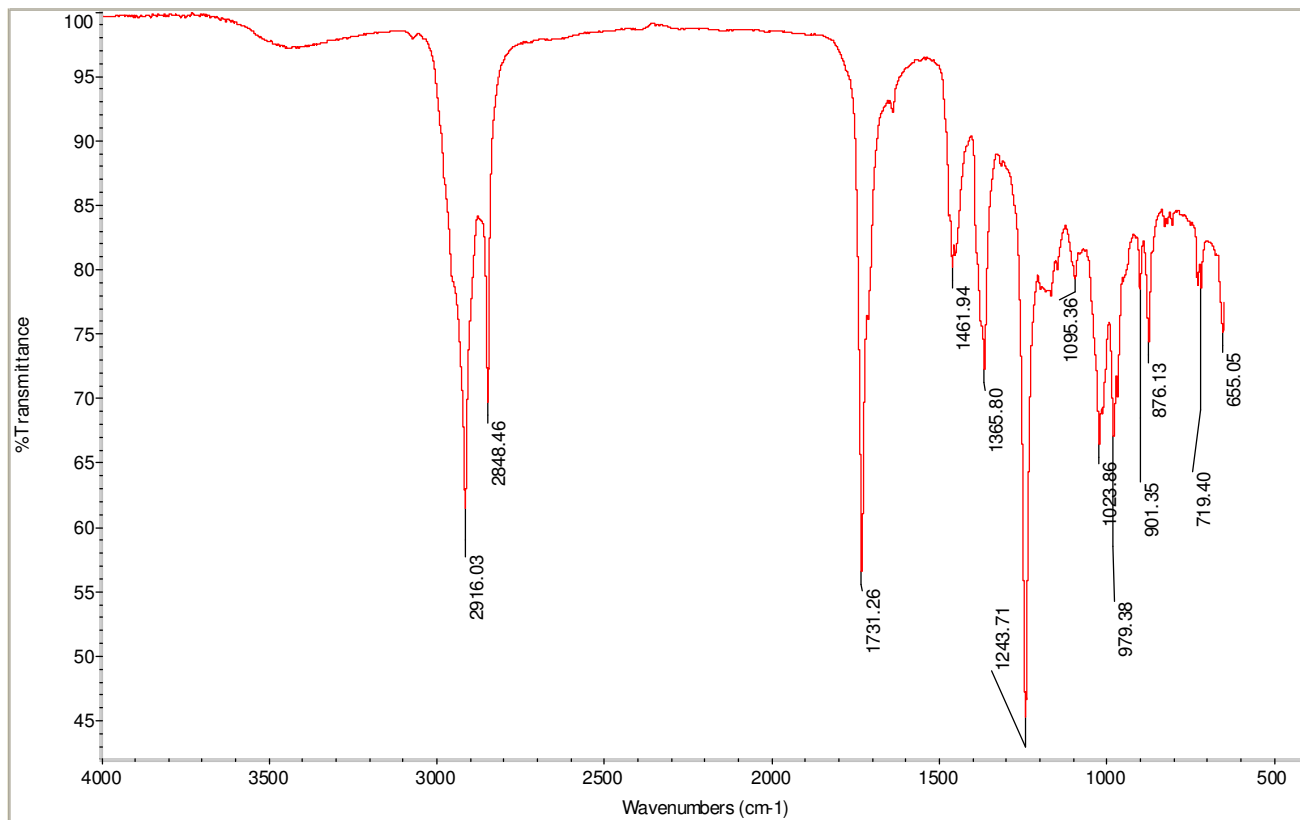


Figura III.14. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R6.

5. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R6-G6

A amostra do grupo FOG1-R6-G6 foi recristalizado em MeOH apresentando-se como um sólido branco, após essa purificação, de fusão na faixa de 171,9 e 176,2 °C. A Figura III.15 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R6-G6. As absorções entre 2950 e 2840 cm⁻¹ são características de estiramentos C-H alifáticos. As absorções menos intensas registradas na região entre 2950 e 2915 cm⁻¹ são características de estiramentos de C sp². A

absorção intensa em $1732,4\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a estiramentos C=O de éster carboxílico. As absorções em $1455,1$, $1386,5$ e $1378,4\text{ cm}^{-1}$ são devidas a estiramentos C–C e deformações angulares de H–C–H de cadeias alifáticas. As absorções em $1242,9$ e $1022,7\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas respectivamente a estiramentos O=C–O assimétrico e simétrico.

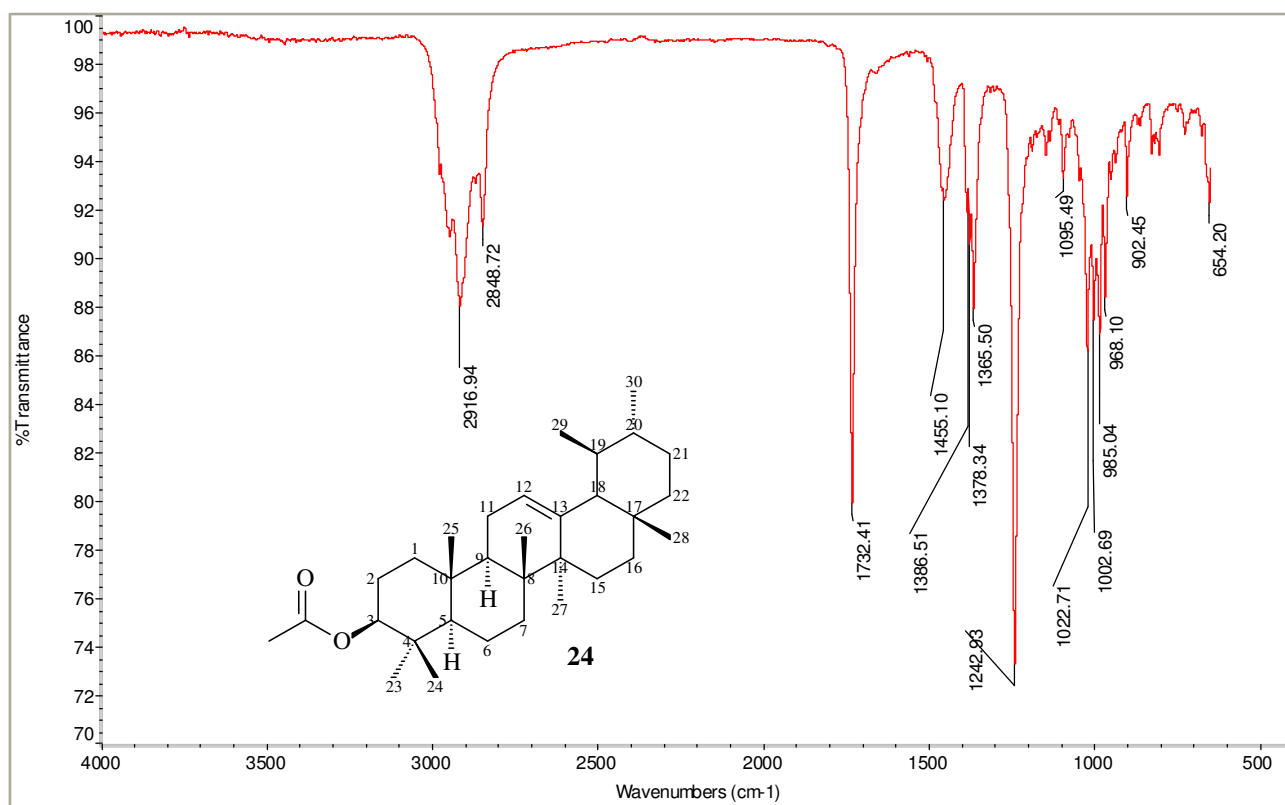


Figura III.15. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R6-G6.

A Figura III.16 mostra o espectro de RMN de ^1H de FOG1-R6-G6. O sinal multipletto largo em $\delta_{\text{H}} 5,16$ é característico de hidrogênio alquênico, e o sinal dupletto duplo alargado em $\delta_{\text{H}} 4,51$ é característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. O sinal simpleto em $\delta_{\text{H}} 2,05$ pode ser atribuído a hidrogênio metílico. Os demais sinais de hidrogênio são registrados entre $\delta_{\text{H}} 1,95$ e $0,80$, característicos de átomos de hidrogênios alifáticos característicos de triterpenos pentacíclicos.

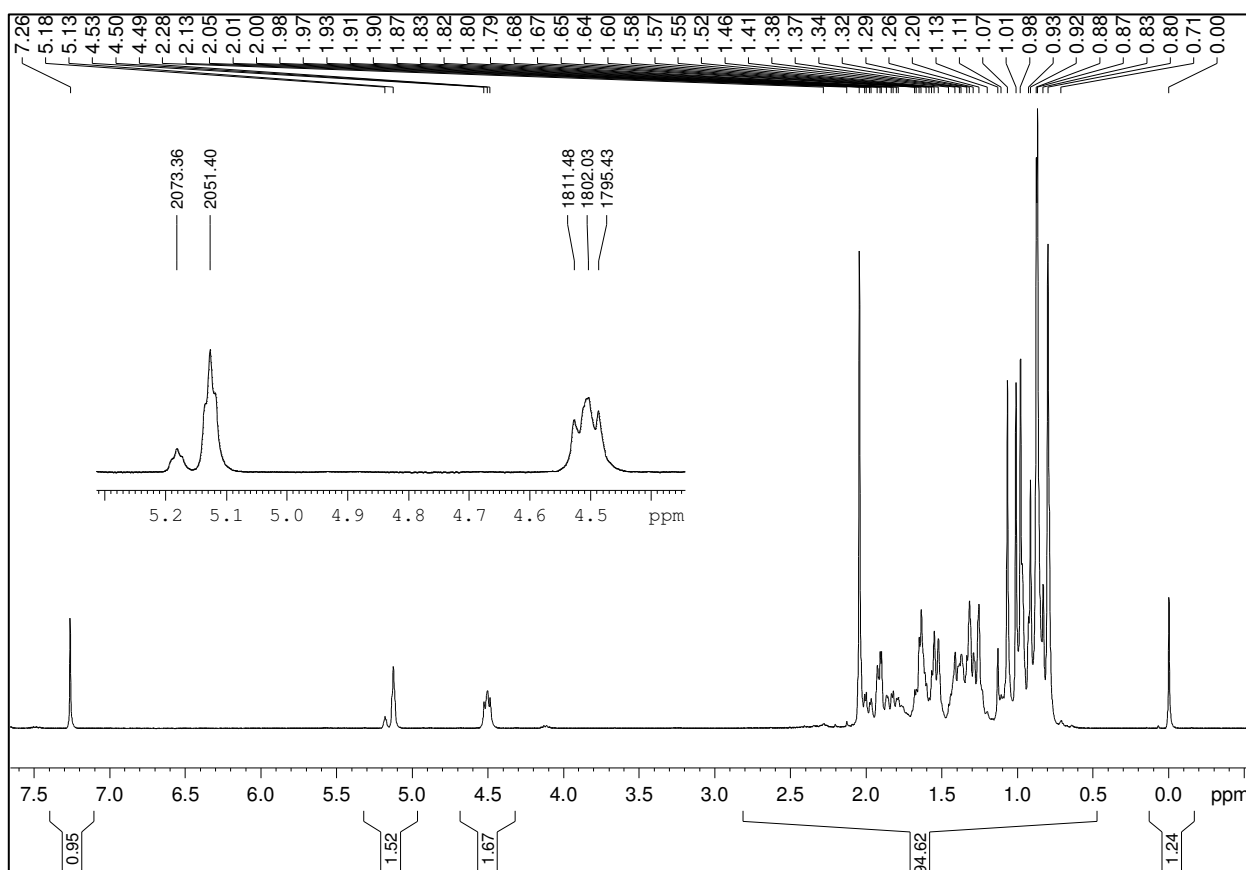


Figura III.16. Espectro de RMN de ^1H de FOG1-R6-G6 (400 MHz, CDCl_3).

As Figuras III.17 e III.18 apresentam o espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de FOG1-R6-G6, que foram analisados comparativamente, propiciando as informações que seguem. O sinal em δ_{C} 171,04 pode ser atribuído a carbono de um grupo éster carboxílico, confirmando o proposto pela análise do espectro de absorção na região do IV (Fig. III.14). O sinal em δ_{C} 139,60 (correspondente a carbono quaternário) e o sinal em δ_{C} 124,31 (correspondente a carbono olefínico) são similares aos dados de RMN de ^{13}C descritos na literatura para a α -amirina (**13**). Portanto, pela análise dos dados de RMN de FOG1-R6-G6 podem ser atribuídos a 3-*O*-acetil- α -amirina (**24**), baseado na Tabela III.2 (pág. 69).

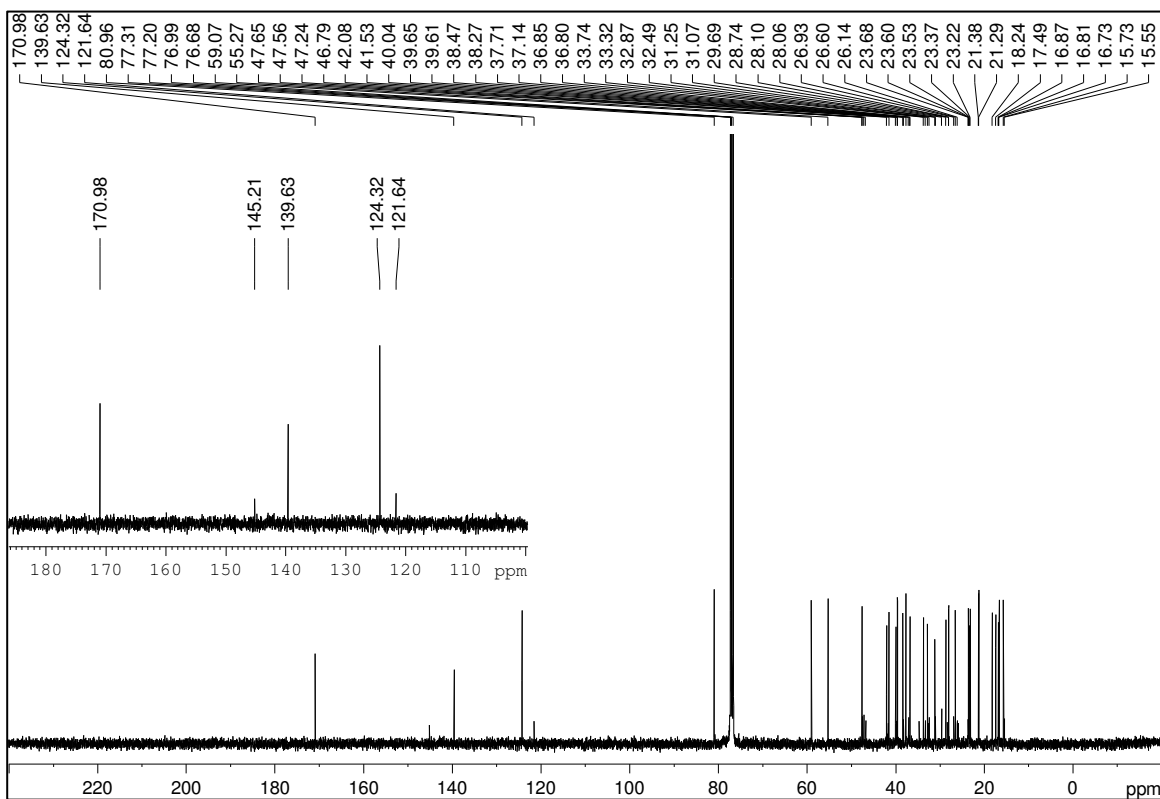


Figura III.17. Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R6-G6 (100 MHz; CDCl_3).

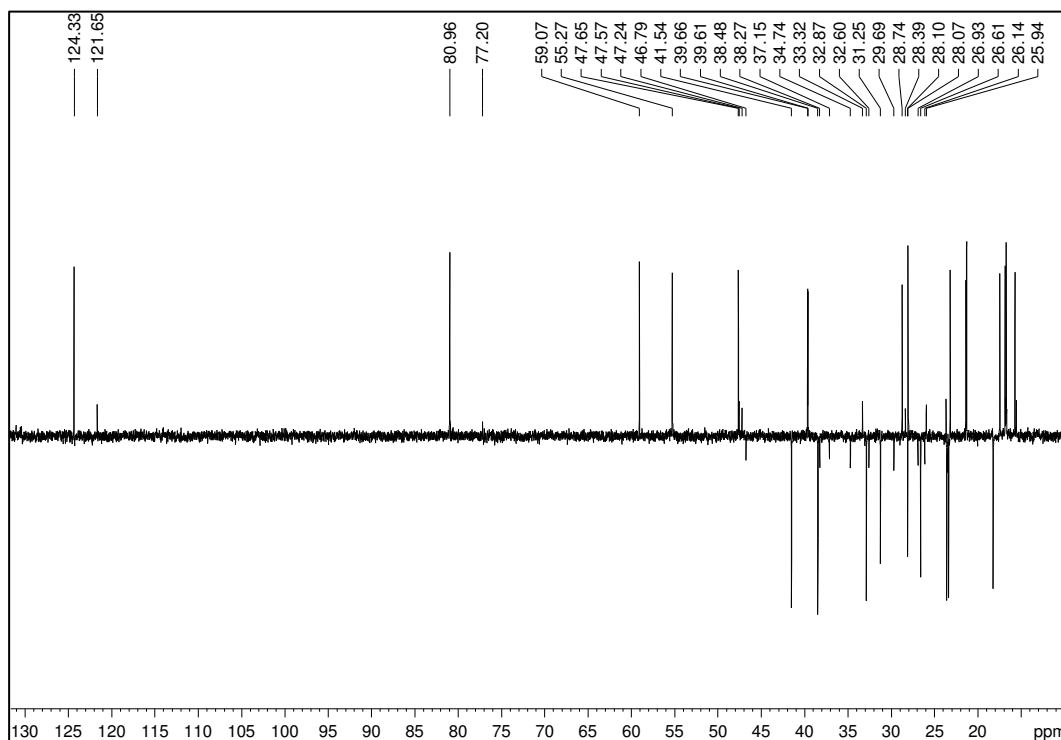


Figura III.18. Subespectro DEPT-135° de FOG1-R6-G6 (100 MHz; CDCl_3).

Para confirmar a estrutura da α -amirina, foram realizadas análises por RMN 2D de FOG1-R6-G6. A Figura III.19 apresenta o mapa de contornos HSQC de FOG1-R6-G6. O sinal simpleto em δ_H 2,05 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 21,3 caracterizando a metila do grupo acetila. O sinal simpleto em δ_H 4,51 correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_C 81,0, característico de carbono carbinólico referente ao C-3.

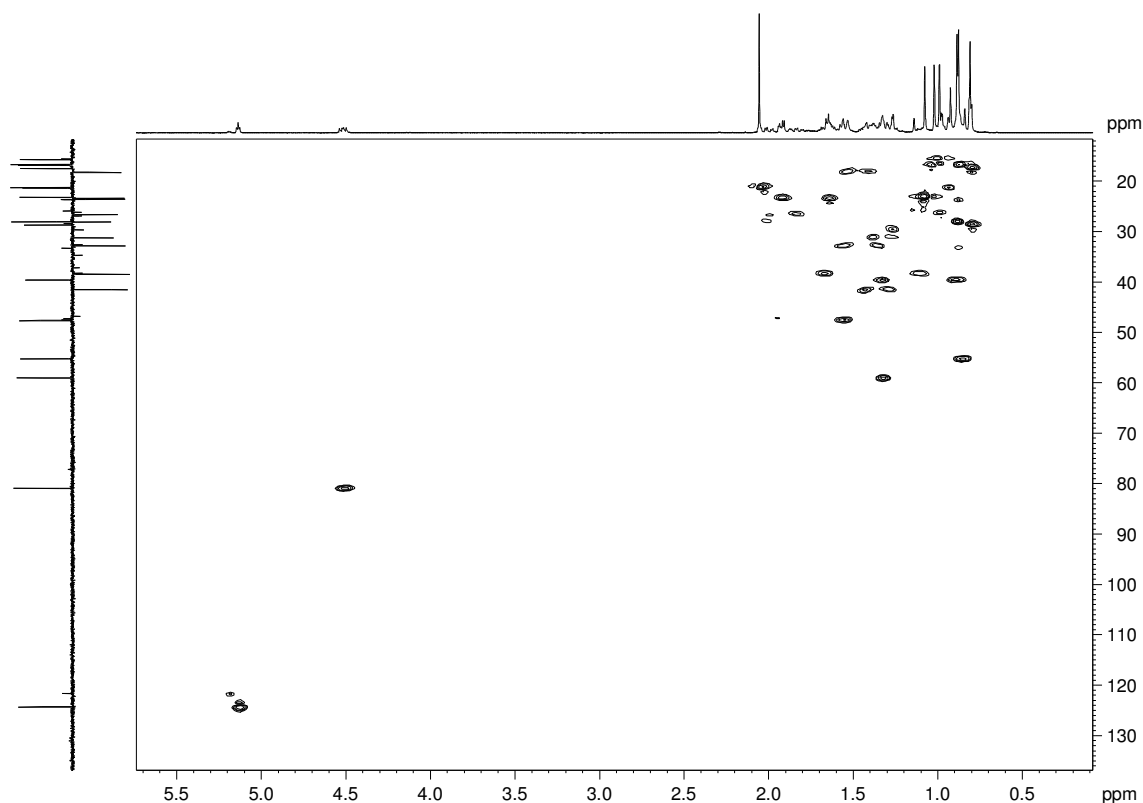


Figura III.19. Mapa de contornos HSQC de FOG1-R6-G6 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

A Figura III.20 mostra o mapa de contornos ^1H - ^1H COSY de FOG1-R6-G6. O sinal em δ_H 2,05 não mostra correlação com nenhum outro sinal de hidrogênio, indicando tratar-se do hidrogênio metílico do grupo acetila.

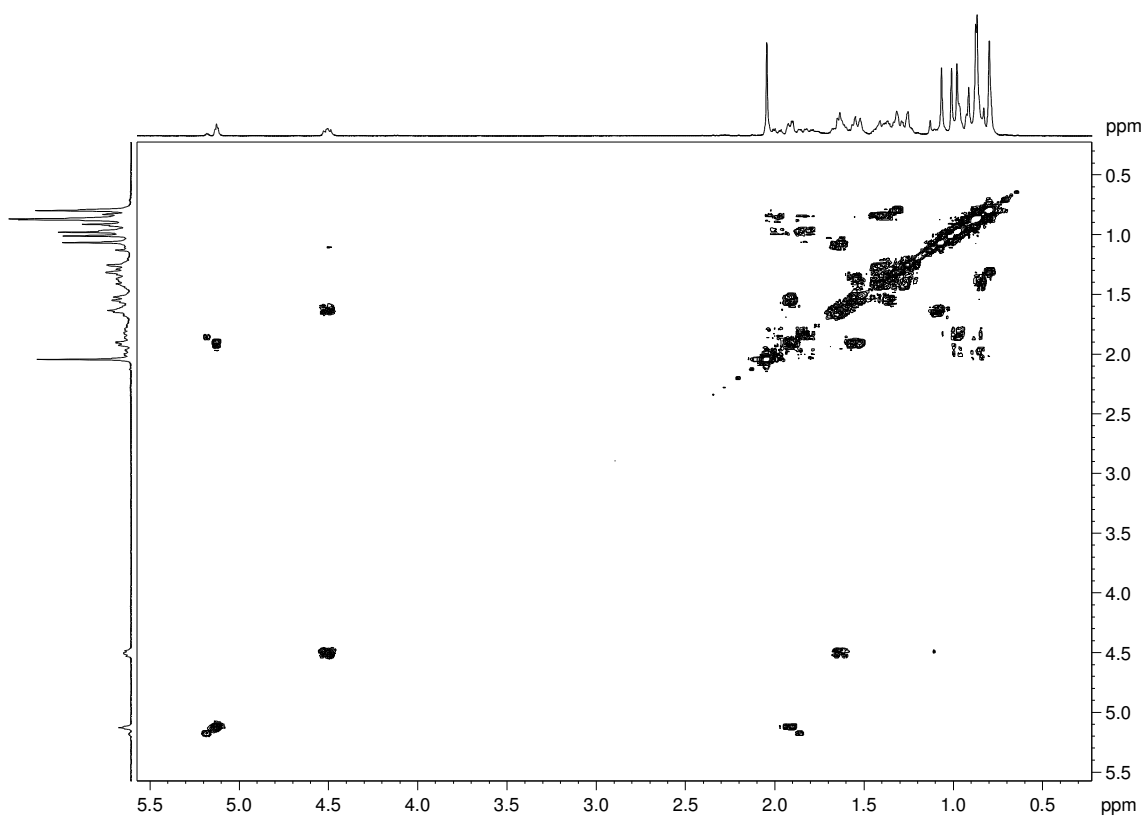


Figura III.20. Mapa de contornos COSY de FOG1-R6-G6 (400 MHz; CDCl_3).

A Figura III.21 apresenta o mapa de contornos ^1H - ^{13}C HMBC de FOG1-R6-G6. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,05 correlaciona-se apenas com o sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 171,4, correlação característica de grupo acetato. Por sua vez, o sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,51 também se correlaciona com o sinal de carbono em δ_{C} 171,4, estabelecendo a posição do grupo éster no carbono C-3. Portanto, as análises por RMN indicaram que o grupo FOG1-R6-G6 trata-se do 3-*O*-acetil- α -amirina (**24**).

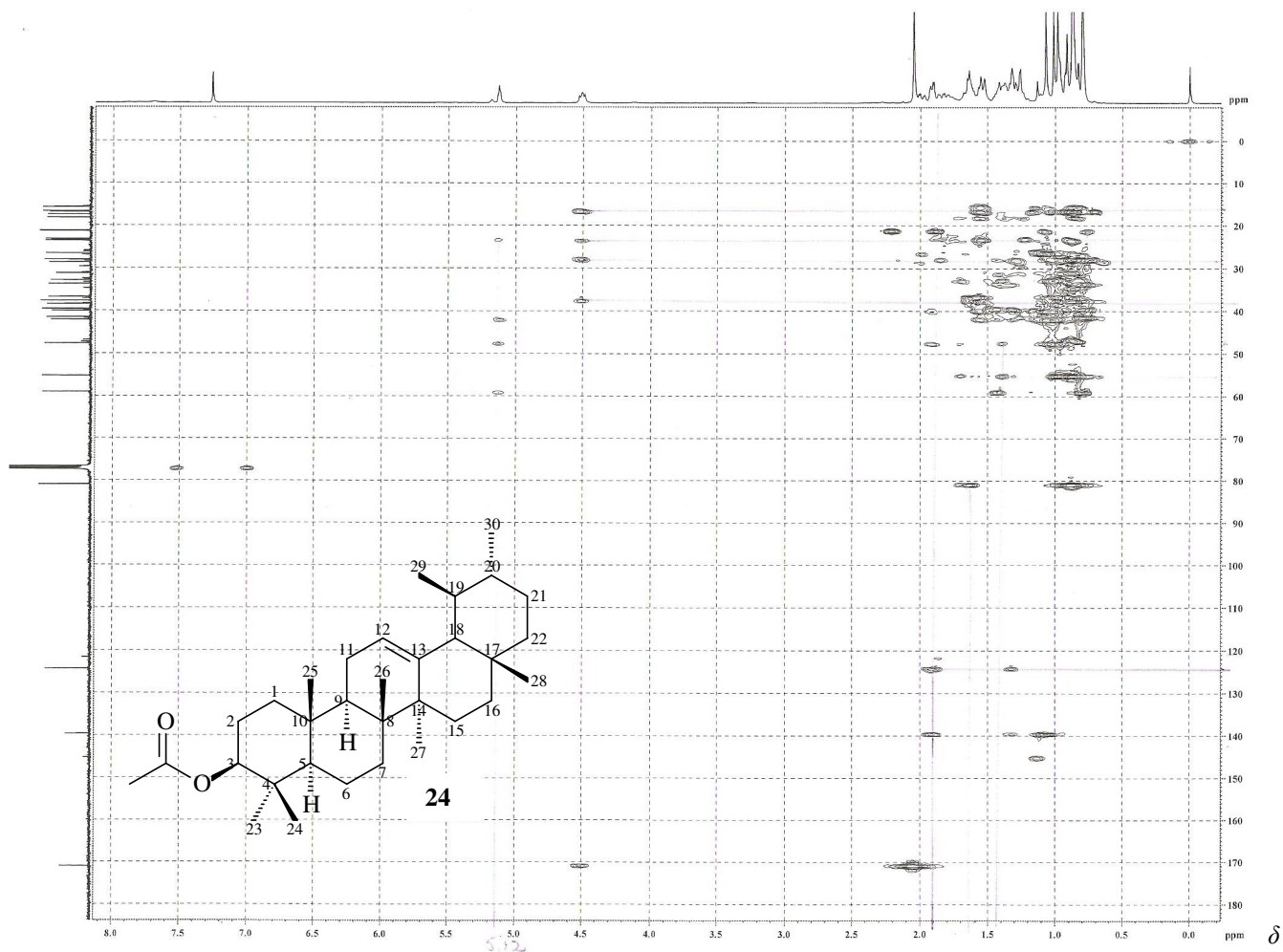


Figura III.21. Mapa de contornos HMBC de FOG1-R6-G6 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3).

A literatura registra a identificação desta substância em algumas espécies de *Lychnophora*, como *L. reticulata*⁴⁶, em *L. pinaster* ainda não há registro da identificação deste fitoconstituente.

6. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R10-G4

A amostra do grupo FOG1-R10-G4 foi recristalizada em MeOH, obtendo-se um sólido branco de fusão na faixa de 77,0 e 78,2 °C, indicando tratar-se um substância com alto grau de pureza. A Figura III.22 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R10-G4. As absorções entre 2916 e 2848 cm^{-1} são típicas de estiramentos C–H alifáticos. As absorções em 1472, 1462 e 1378 cm^{-1} são devidas a deformações angulares de metilas e metilenos. As absorções próximas a 1036 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos O–C–O de éter. A absorção em 719 cm^{-1} é característica de estiramento C–H metilênicos de hidrocarbonetos de cadeia longa.⁵⁴

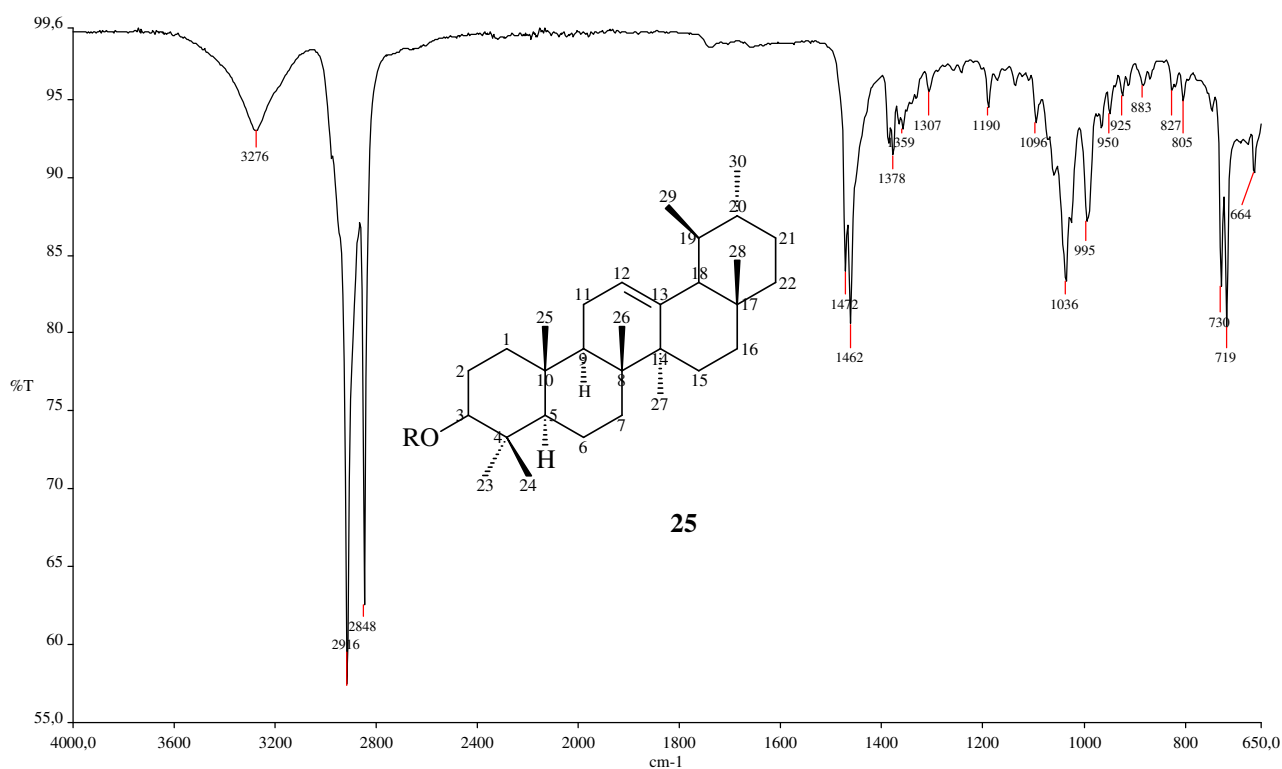


Figura III.22. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R10-G4.

As Figuras III.23 a III.25 apresentam respectivamente os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° de FOG1-R10-G4. O espectro de RMN de ^1H de FOG1-R10-G4 mostra um sinal muito intenso em δ_{H} 1,25, característico de átomos de hidrogênio metilênico de grupos alquilas de cadeias longas, o que pode ser confirmado pela análise do espectro na região do IV. Isto pode ser confirmado pelo sinal também intenso registrado no espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° pelo sinal de carbono em δ_{C} 29,3, que pode ser atribuído a vários carbonos metilênicos. Considerando a ausência de sinais na região de carbonila de éster carboxílico e a presença dos sinais em δ_{C} 139,6 e δ_{C} 124,4 no espectro de RMN de ^{13}C pode-se propor que FOG1-R10-G4 trata-se de um derivado *O*-alquilado da α -amirina, i.e. 3-*O*-alquil- α -amirina (**25**).

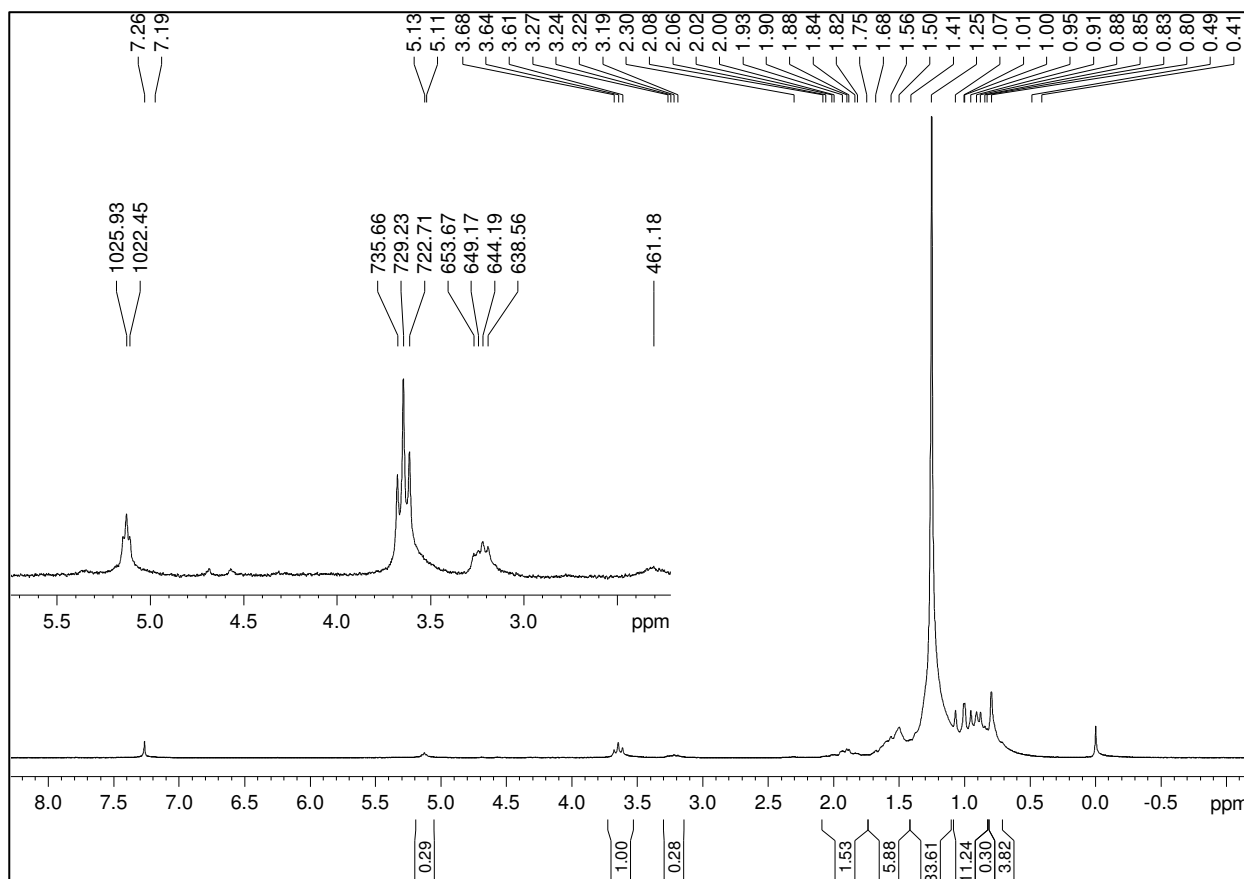


Figura III.23. Espectro de RMN de ^1H de FOG1-R10-G4 (400 MHz, CDCl_3).

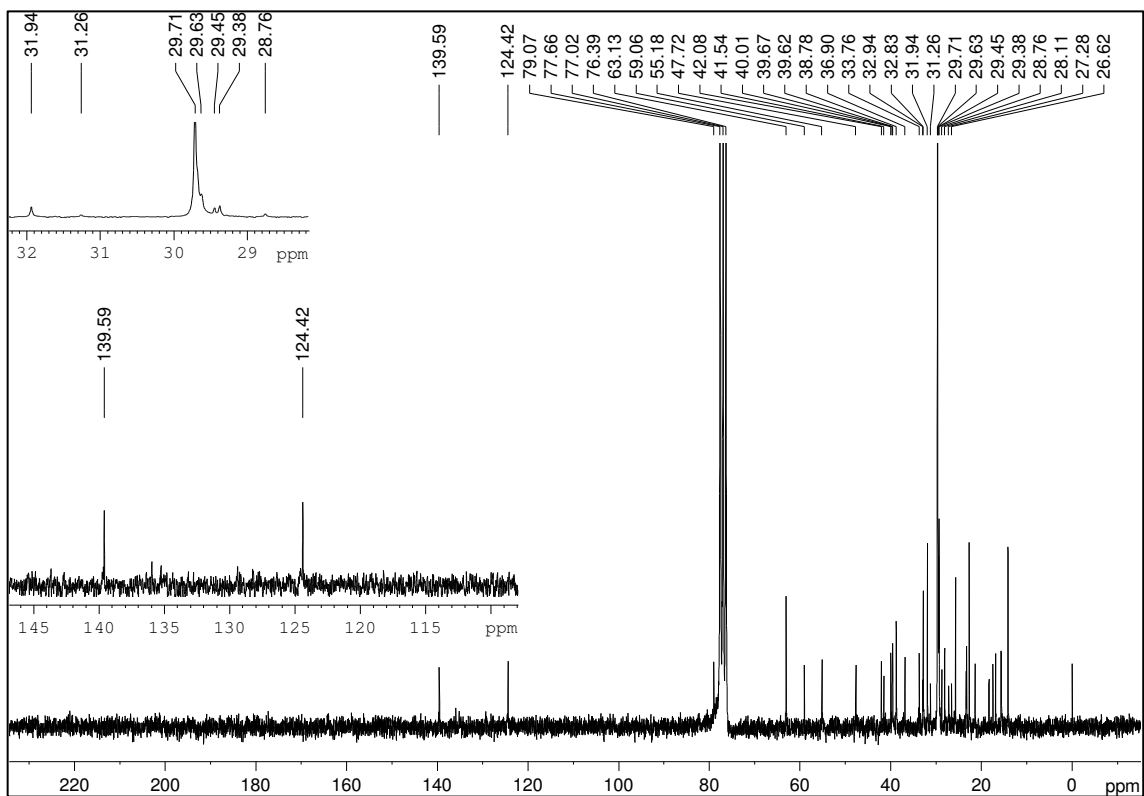


Figura III.24. Espectro de RMN de ¹³C de FOG1-R10-G4 (100 MHz; CDCl₃).

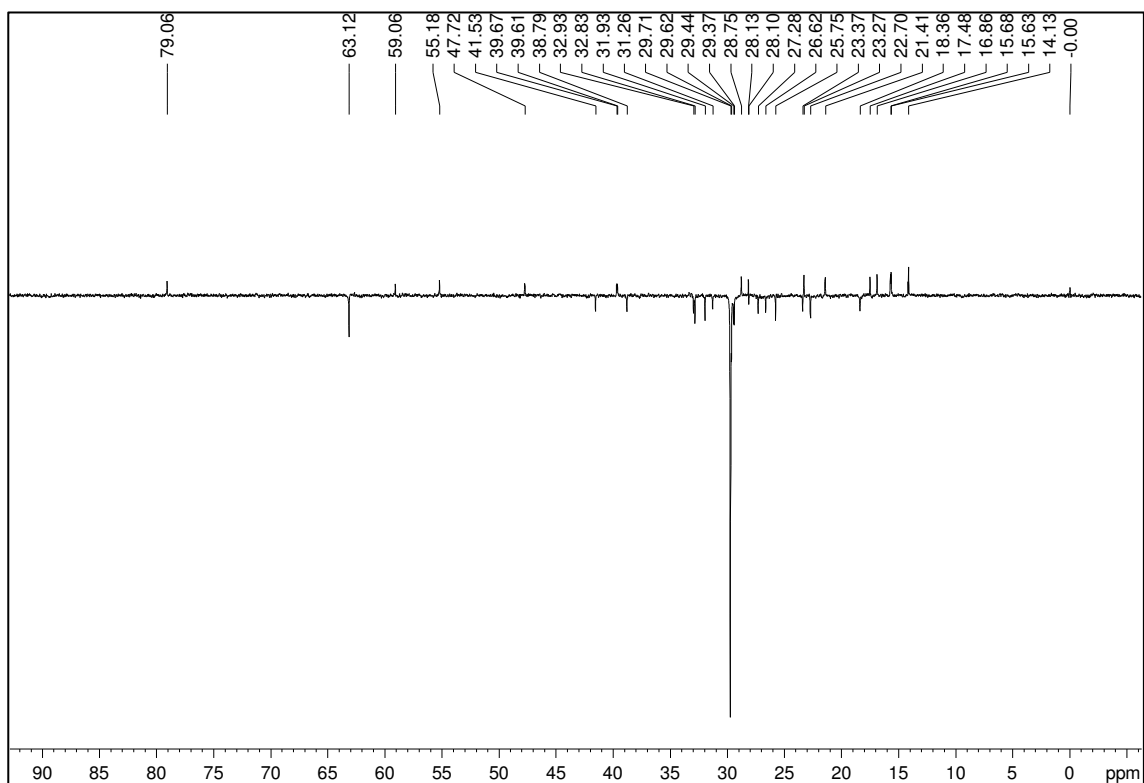


Figura III.25. Subespectro DEPT-135° de FOG1-R10-G4 (100 MHz; CDCl₃).

Análise por CG foi realizada para inferir sobre o grau de pureza da amostra de FOG1-R10-G4. A Figura III.26 apresenta o cromatograma de CG de FOG1-R10-G4. No cromatograma estão registrados vários picos, em $t_R = 14,842, 16,601, 18,624$ e $20,606$ min. Isto pode ser atribuído a presença de contaminantes na coluna do CG, uma vez que pela análise dos dados de RMN pode-se propor a presença de apenas um constituinte.

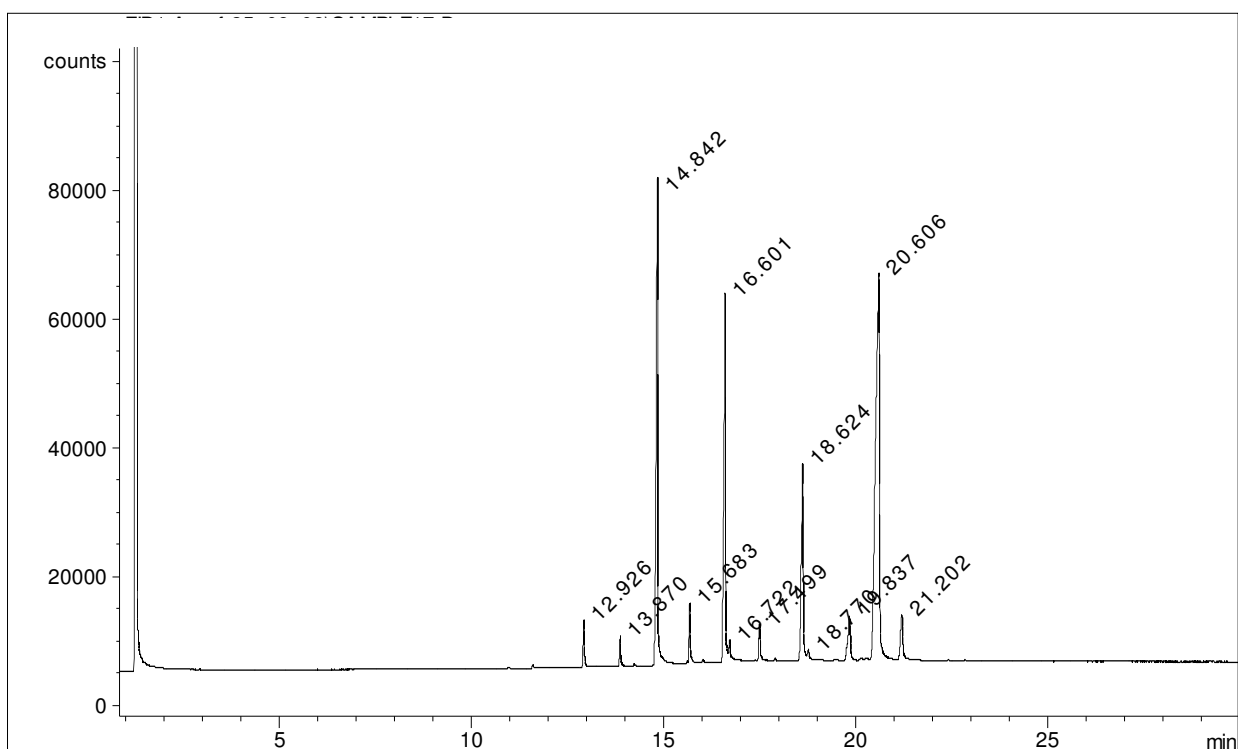


Figura III.26. Cromatograma de CG de FOG1-R10-G4.

7. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FOG1-R11

A amostra do grupo FOG1-R11 apresentou como sólido branco após recristalização em MeOH, com fusão na faixa de 156,8 e 170,3 °C. A Figura III.27 apresenta o espectro de absorção na região do IV de FOG1-R11. A absorção larga em 3278 cm⁻¹ pode ser atribuída a estiramentos de grupo hidroxila em ligação de hidrogênio. As absorções em 2946, 2918 e 2852 cm⁻¹ são características de estiramentos C-H alifáticos. As absorções em 1464, 1387 e 1378 cm⁻¹ são devidas a estiramentos C-C e deformações angulares de H-C-H de cadeias alifáticas. As absorções em 1189 e 1096 cm⁻¹ podem ser atribuídas, respectivamente, a estiramentos C-O-H assimétrico e simétrico. As absorções em 1036 e 992 cm⁻¹ podem ser atribuídas a deformações fora do plano e no plano de C=C-H de grupos alquenílicos.

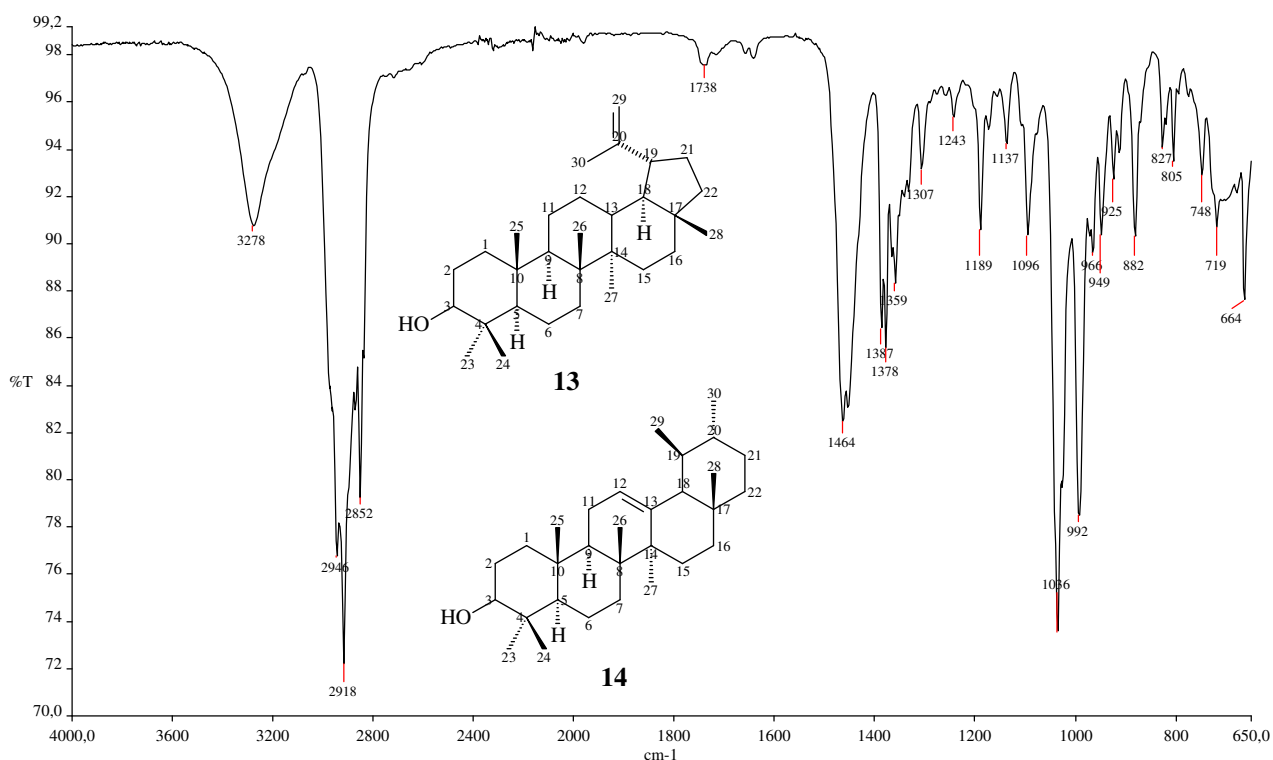


Figura III.27. Espectro de absorção na região do Infravermelho de FOG1-R11.

A Figura III.28 apresenta o cromatograma de CG de FOG1-R11. Vários picos são observados no cromatograma, indicando tratar-se de uma mistura complexa. Os picos mais proeminentes são registrados em $t_R = 44,525, 47,743, 54,933$ e $57,188$ min.

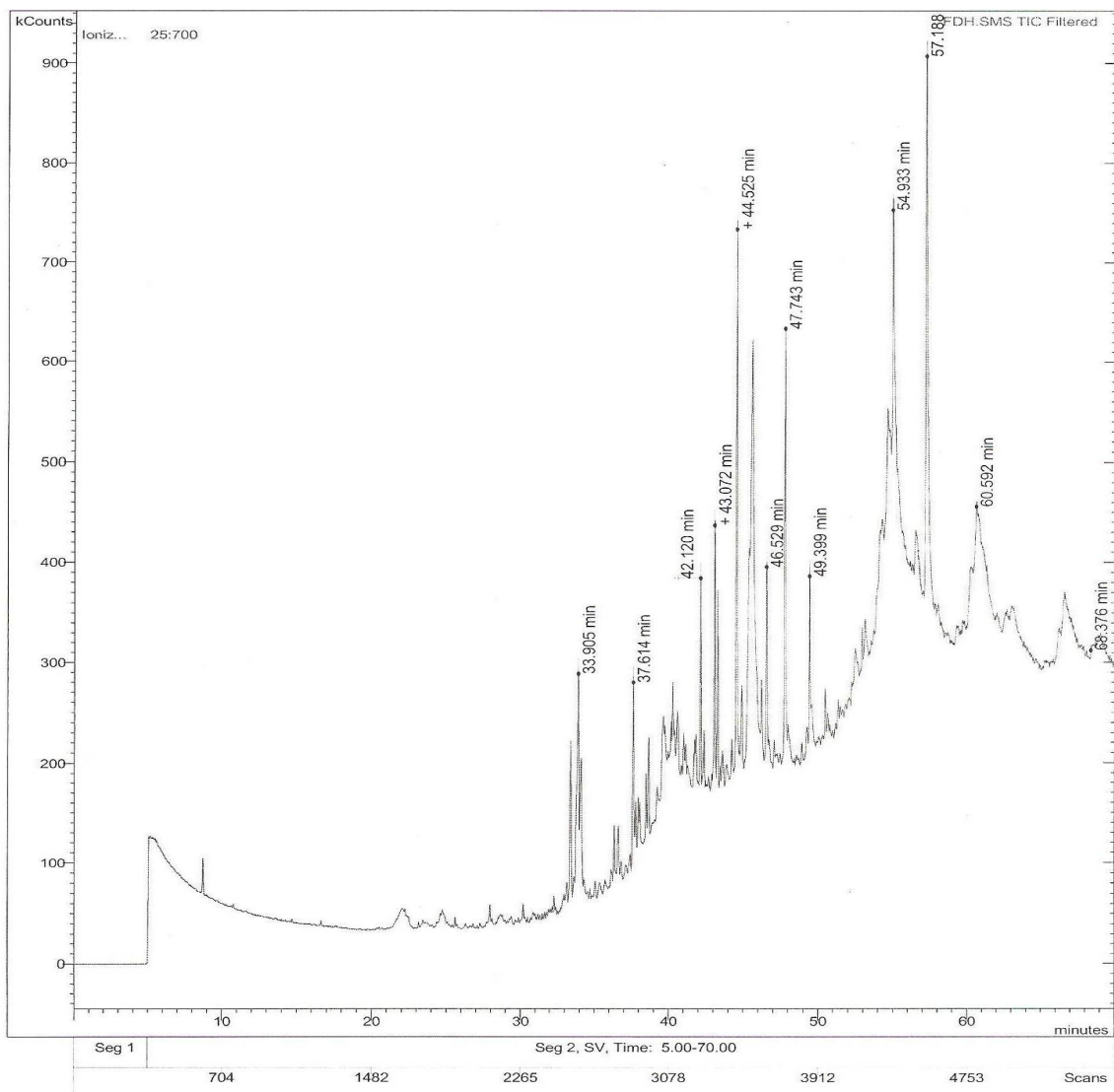


Figura III.28. Cromatograma de CG de FOG1-R11.

A Figura III.29 apresenta o espectro de massas da substância representada pelo pico em t_R = 54,942 min. do cromatograma de CG de FOG1-R11. A consulta ao banco de dados NIST (2005) sugeriu tratar-se do esteróide 4,4-dimetil-cholesta-22,24-dien-6-ol (**26**) ($C_{29}H_{48}O$; M = 412 uma).

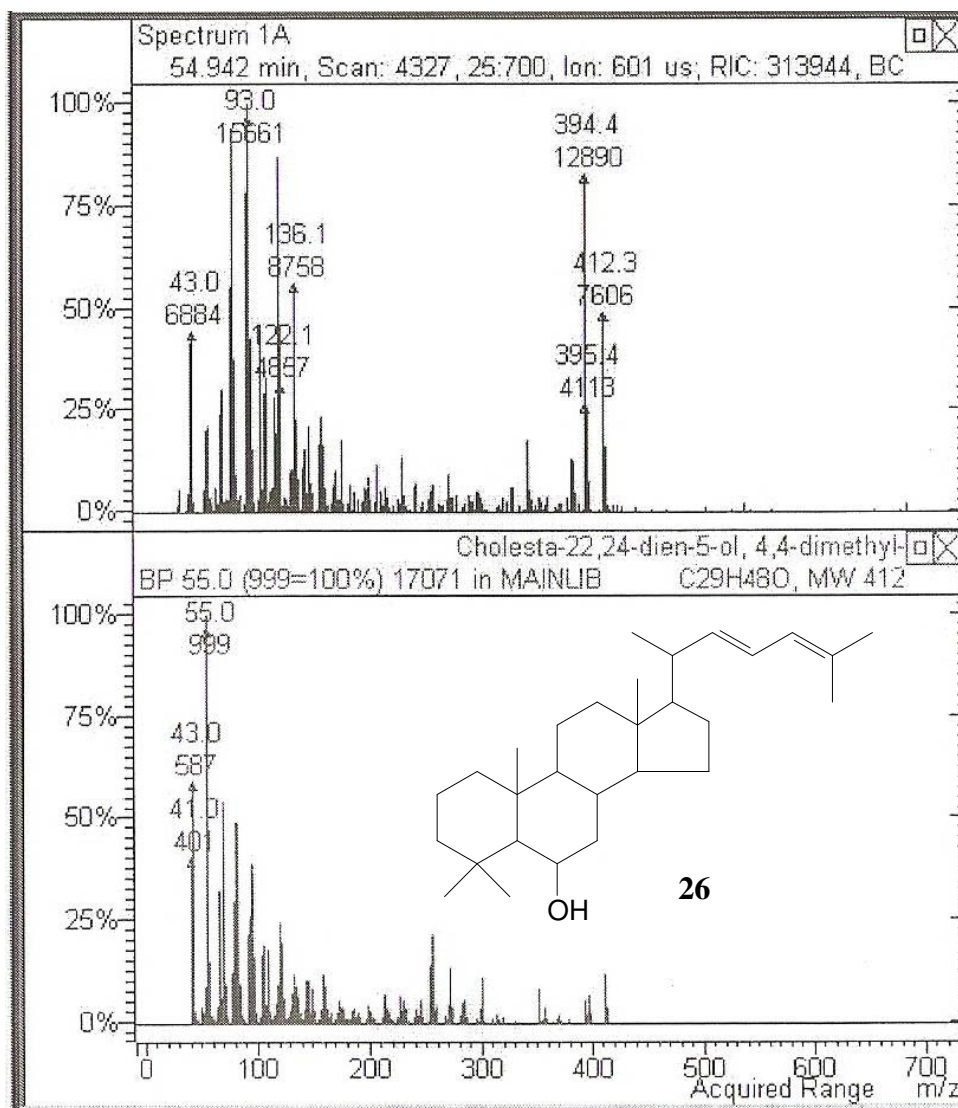


Figura III.29. Espectro de massas da substância de tempo de retenção 54,942 min do cromatograma de CG de FOG1-R11.

A Figura III.30 apresenta o espectro de massas da substância representada pelo pico em t_R = 57,195 min do cromatograma de CG de FOG1-R11. A consulta ao banco de dados NIST (2005) indicou tratar-se do triterpeno pentacíclico α -amirina (**14**; $C_{30}H_{50}O$; $M = 426$ uma).

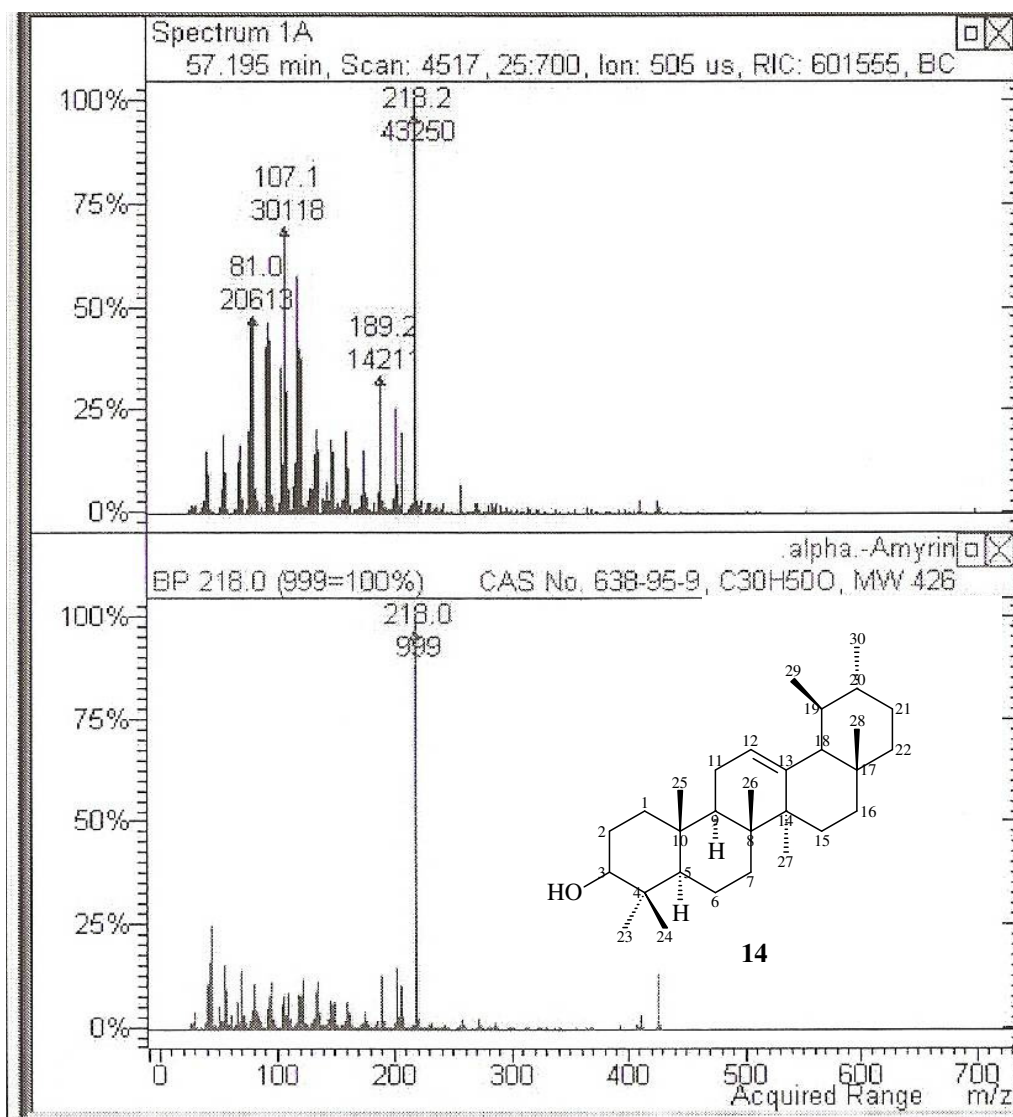


Figura III.30. Espectro de massas da substância de tempo de retenção 57,195 min do cromatograma de CG de FOG1-R11.

A Figura III.31 apresenta o espectro de RMN de ^1H de FOG1-R11. Os sinais multipletos entre δ_{H} 5,17 e 5,10 podem ser atribuídos a hidrogênios alquênícos. Os sinais simples em δ_{H} 4,67 e 4,56 podem ser atribuídos também a hidrogênios alquênícos. O sinal triplo centrado em δ_{H} 3,63 ($J = 13,2$ Hz) e o multiplo registrado entre δ_{H} 3,25 e 3,17 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono carbinólico de diferentes estruturas. Os vários sinais sobrepostos na região entre δ_{H} 2,50 e 0,80 são característicos de hidrogênios alifáticos de triterpenos.

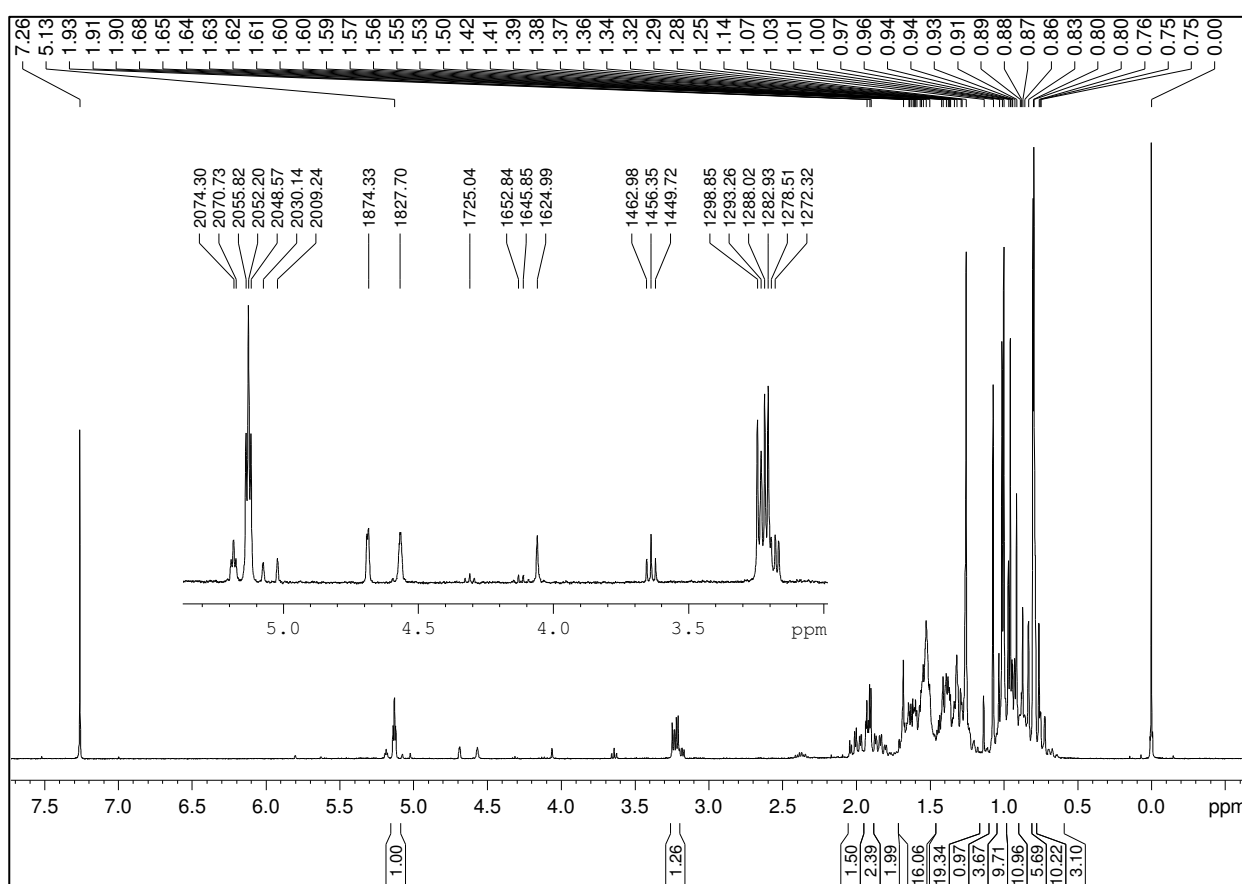


Figura III.31. Espectro de RMN de ^1H de FOG1-R11 (400 MHz, CDCl_3).

As Figuras III.32 e III.33 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de FOG1-R11, que foram analisados comparativamente, propiciando atribuição dos carbonos da molécula. Os sinais em δ_{C} 150,9 (correspondente a carbono não hidrogenado) e 109,3 (correspondente a carbono metilênico) são característicos de triterpenos da série dos lupanos e o sinal em δ_{C} 79,07 pode ser atribuído ao carbono carbinólico C-3 do lupeol (13). Por sua vez, os sinais em δ_{C} 139,60 (correspondente a carbono alquênico não hidrogenado), δ_{C} 124,4 (correspondente a átomos de carbono metínico de grupos alquênlicos) e em δ_{C} 79,07 (correspondente à átomo de carbono carbinólico) são característicos da α -amirina (14).^{45(a)}

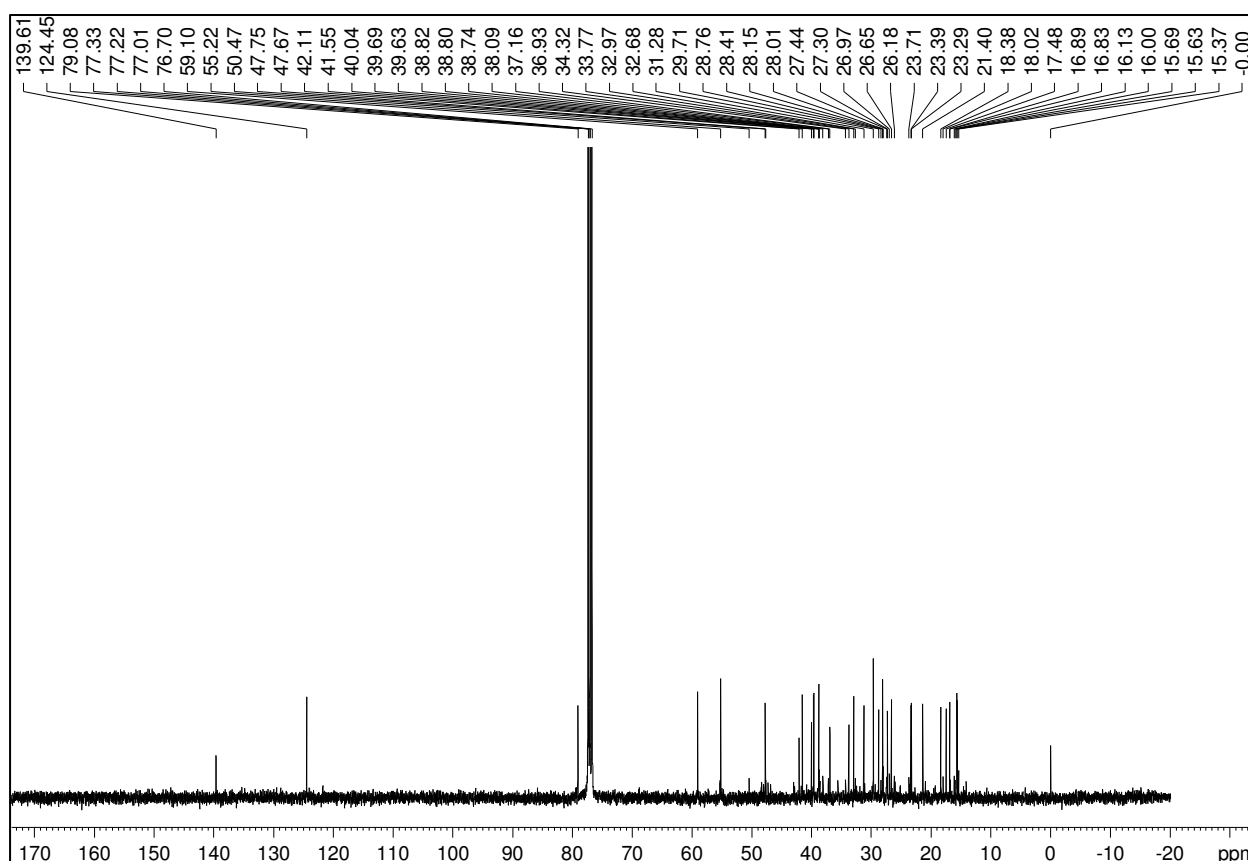


Figura III.32. Espectro de RMN de ^{13}C de FOG1-R11 (100 MHz; CDCl_3).

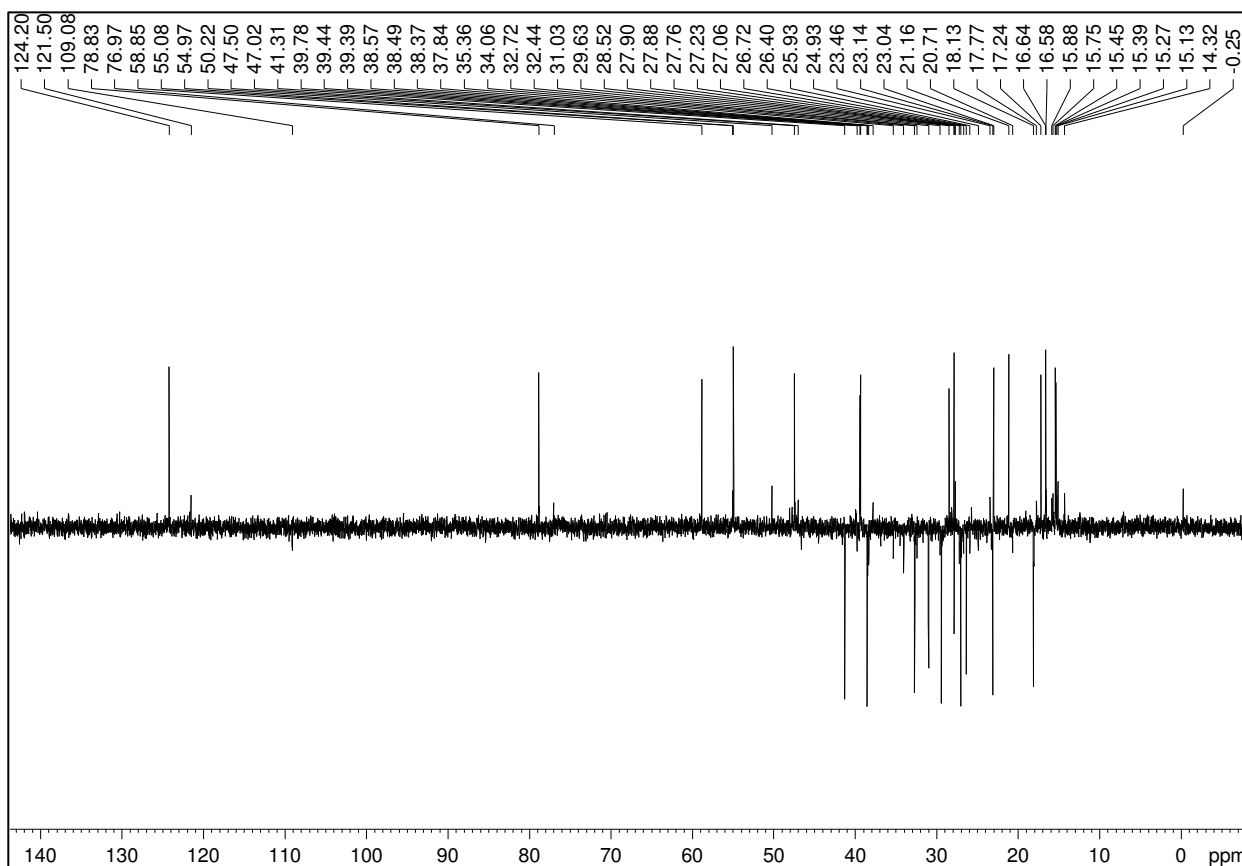


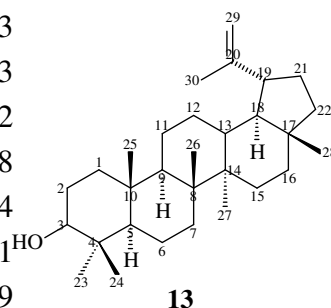
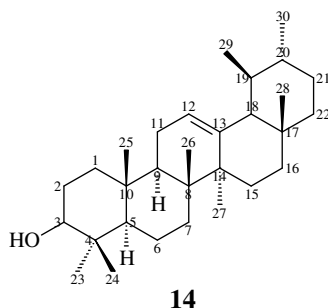
Figura III.33. Subespectro DEPT-135° de FOG1-R11 (100 MHz; CDCl₃).

A Tabela III.2 mostra a atribuição dos dados de RMN de ¹³C de FOG1-R11 baseados na comparação com os dados correspondentes de lupeol e α -amirina descritos na literatura.^{45,48}

Esses dois triterpenos foram anteriormente descritos na espécie *Lychnophora pinaster*.¹⁹

Tabela III.2. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de FOG1-R11 e dados da literatura dos triterpenos α -amirina e lupeol⁴⁵

Carbono	FOG1-R11	α -amirina	FOG1-R11	Lupeol
C-1	38,7	38,7	38,7	38,7
C-2	27,2	27,2	27,4	27,4
C-3	78,3	78,3	79,0	78,9
C-4	38,7	38,7	38,8	38,8
C-5	55,2	55,2	55,2	55,3
C-6	18,3	18,3	18,3	18,3
C-7	32,9	32,9	34,3	34,2
C-8	40,0	40,0	40,8	40,8
C-9	47,7	47,7	50,4	50,4
C-10	36,9	36,9	37,1	37,1
C-11	23,3	23,3	20,9	20,9
C-12	124,4	124,3	25,2	25,1
C-13	139,6	139,3	38,1	38,0
C-14	42,1	42,0	42,8	42,8
C-15	28,7	28,7	27,4	27,4
C-16	26,6	26,6	35,6	35,5
C-17	33,7	33,7	43,0	43,0
C-18	59,0	58,9	48,3	48,2
C-19	39,6	39,6	48,0	47,9
C-20	39,6	39,6	150,9	150,9
C-21	31,2	31,2	29,7	29,8
C-22	41,5	41,5	40,0	40,0
C-23	28,1	28,1	28,1	28,0
C-24	15,6	15,6	15,6	15,4
C-25	15,6	15,6	16,1	16,1
C-26	16,9	16,8	15,9	15,9
C-27	23,3	23,3	14,5	14,5
C-28	28,1	28,1	18,0	18,0
C-29	17,4	17,4	109,3	109,3
C-30	21,4	21,3	19,3	19,3



A Figura III.34 apresenta as estruturas químicas dos fitoconstituintes isolados das folhas de *Lychnophora pinaster*: 3-*O*-acetil-lupeol (**22**), 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol (**23**), 3-*O*-acetil- α -amirina (**24**), lupeol (**13**), α -amirina (**14**), 3-*O*-alquil- α -amirina (**25**), 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol (**26**).

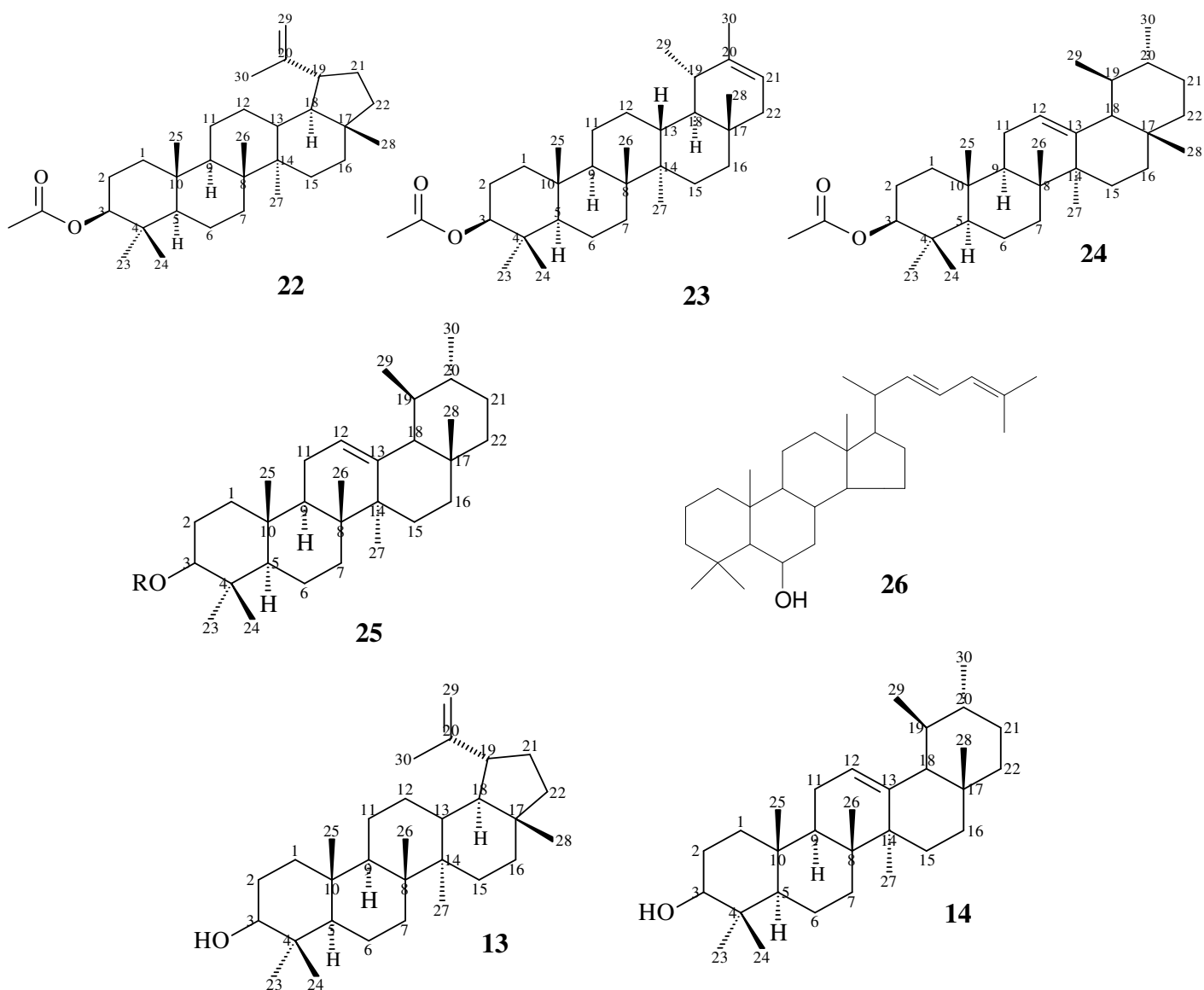


Figura III.34. Fitoconstituintes isolados das Folhas de *L. pinaster*.

CAPÍTULO IV:
ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE
-Resultados e Discussão

1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG5-R1

A amostra do grupo CAG5-R1 apresentou como sólido branco de fusão na faixa de 267,2 a 275,4 °C. A Figura IV.1 apresenta o espectro de absorção na região do IV de CAG5-R1. As absorções em 2950 e 2845 cm^{-1} são características de estiramentos C-H alifáticos. A absorção pouco intensa em 1736 cm^{-1} é atribuída a estiramentos C=O de ésteres. As absorções em 1473, 1461 e 1376 cm^{-1} são atribuídas a deformações angulares de grupos metilas e metilenos.

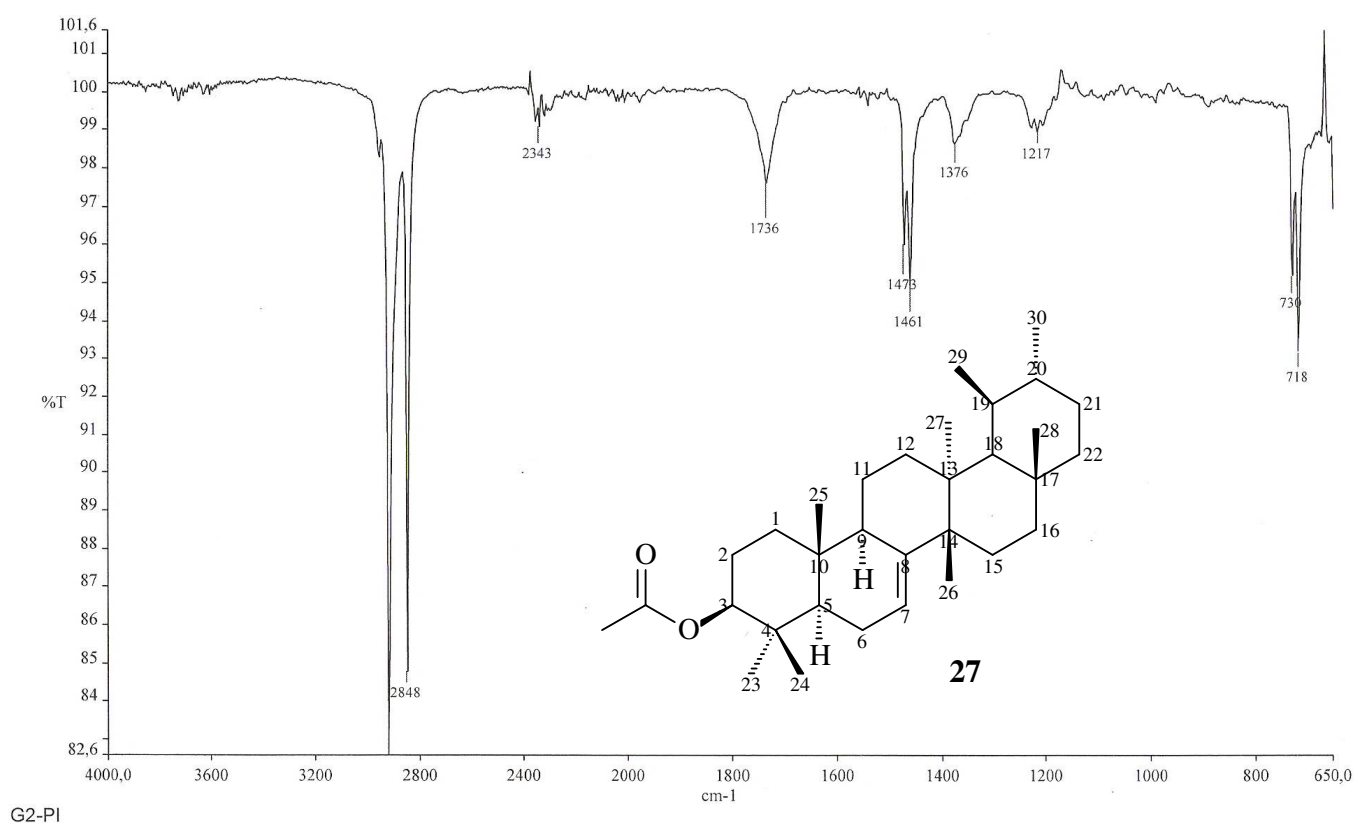


Figura IV.1. Espectro de absorção na região do Infravermelho de CAG5-R1.

No espectro de RMN de ^1H de CAG5-R1 (Figura IV.2), o sinal em δ_{H} 5,46 foi atribuído a hidrogênio alquenílico. O sinal duplete duplo registrado em δ_{H} 4,57 ($J = 10,9$ e $4,5$ Hz) é

atribuído a átomo de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. O sinal em δ_H 2,10 integrando para 3 hidrogênios caracteriza uma metila de um grupo acetila.

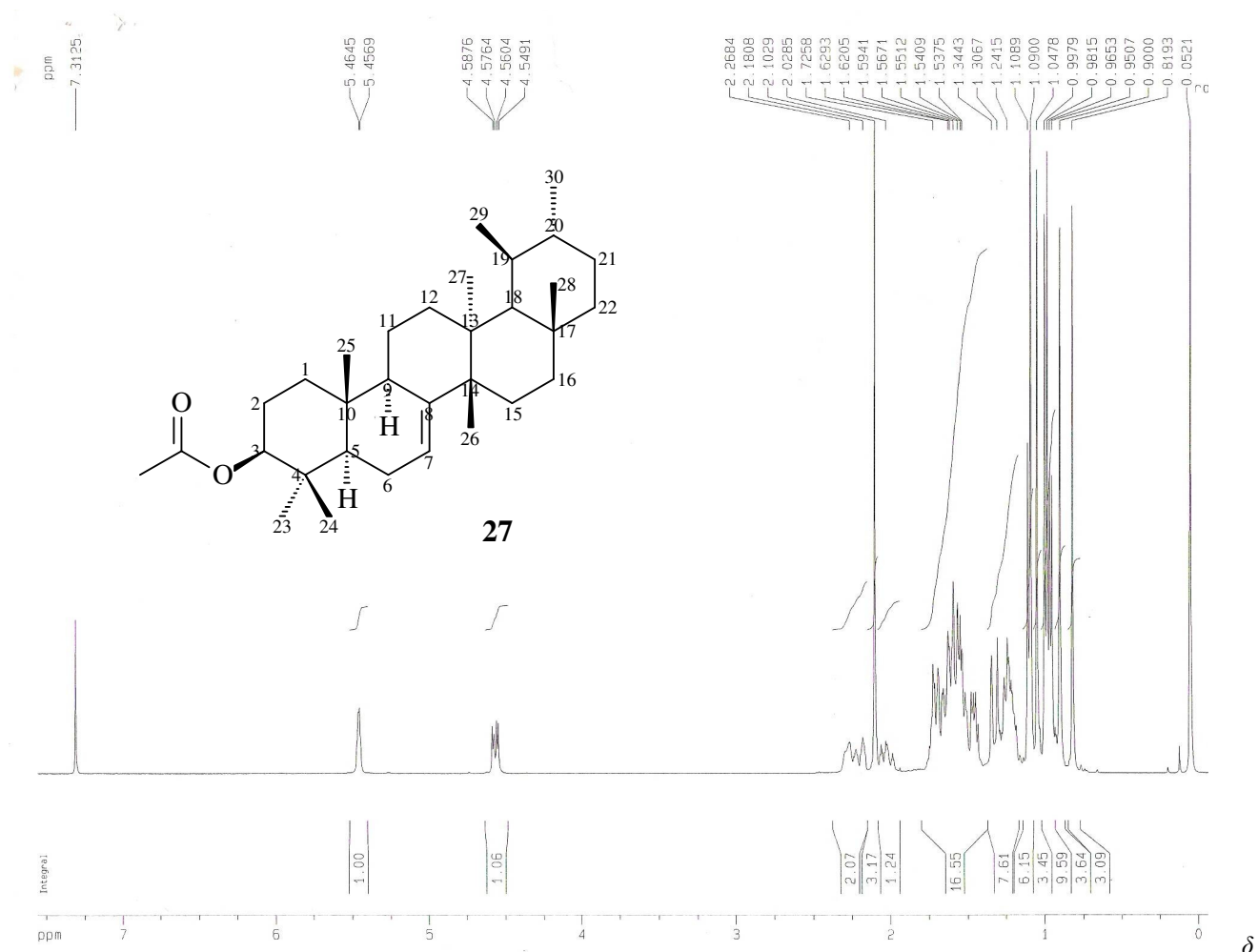


Figura IV.2. Espectro de RMN de 1H de CAG5-R1 (400 MHz, $CDCl_3$).

O espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135° de CAG5-R1 (Figuras IV.3 e IV.4) foram analisados conjuntamente, fornecendo as informações que se seguem. O sinal em δ_C 171,0

é característico de átomo de carbono de éster carboxílico. Os sinais em δ_c 145,5 (correspondente a carbono não hidrogenado) e 116,3 (correspondente a carbono metínico) foram atribuídos a um carbono alquênico. O sinal em δ_c 81,2 foi atribuído a carbono carbinólico. Os demais sinais de carbono registrados entre δ_c 55,0 e 13,1 são característicos de triterpenos.

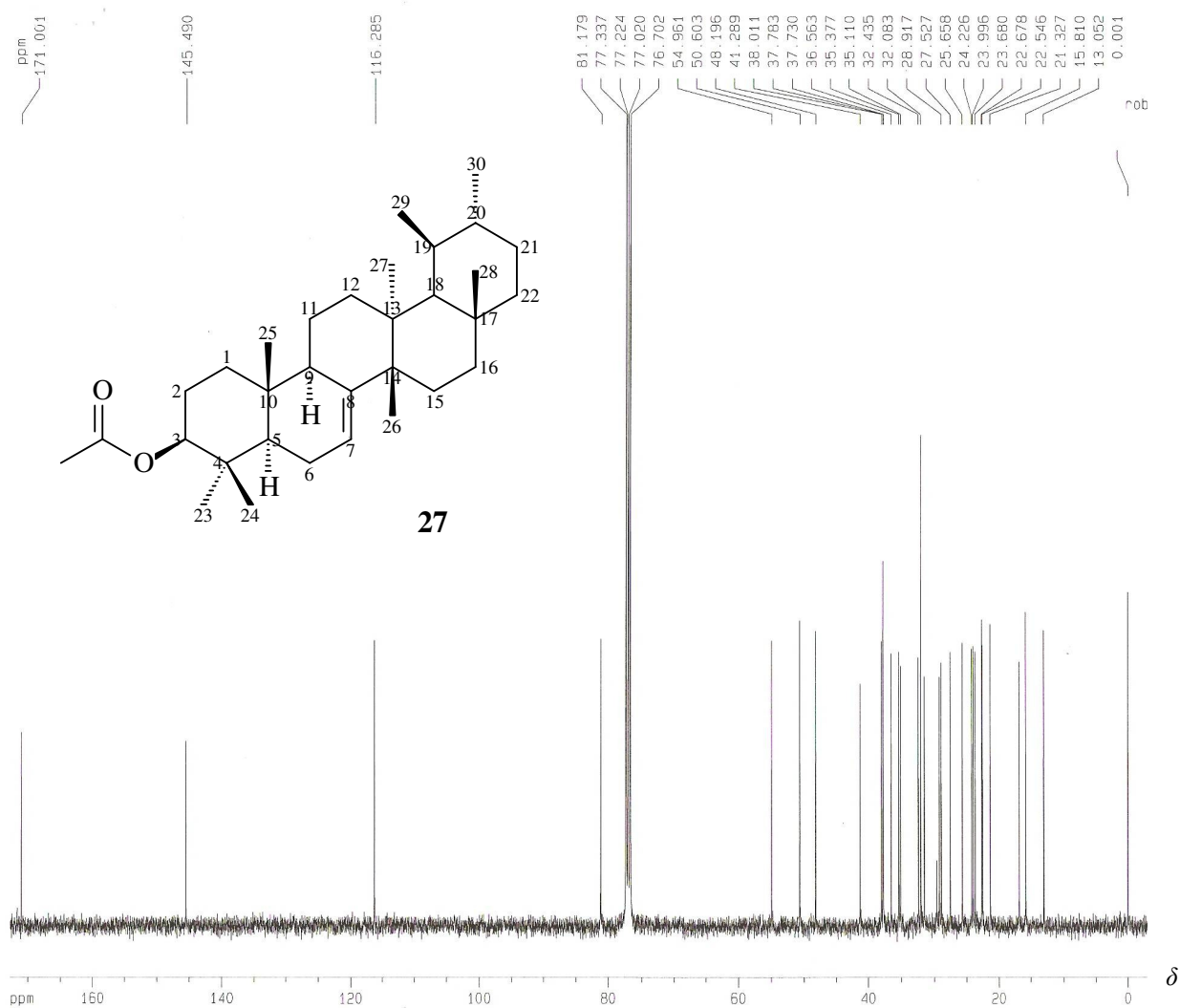


Figura IV.3. Espectro de RMN de ^{13}C de CAG5-R1 (100 MHz; CDCl_3).

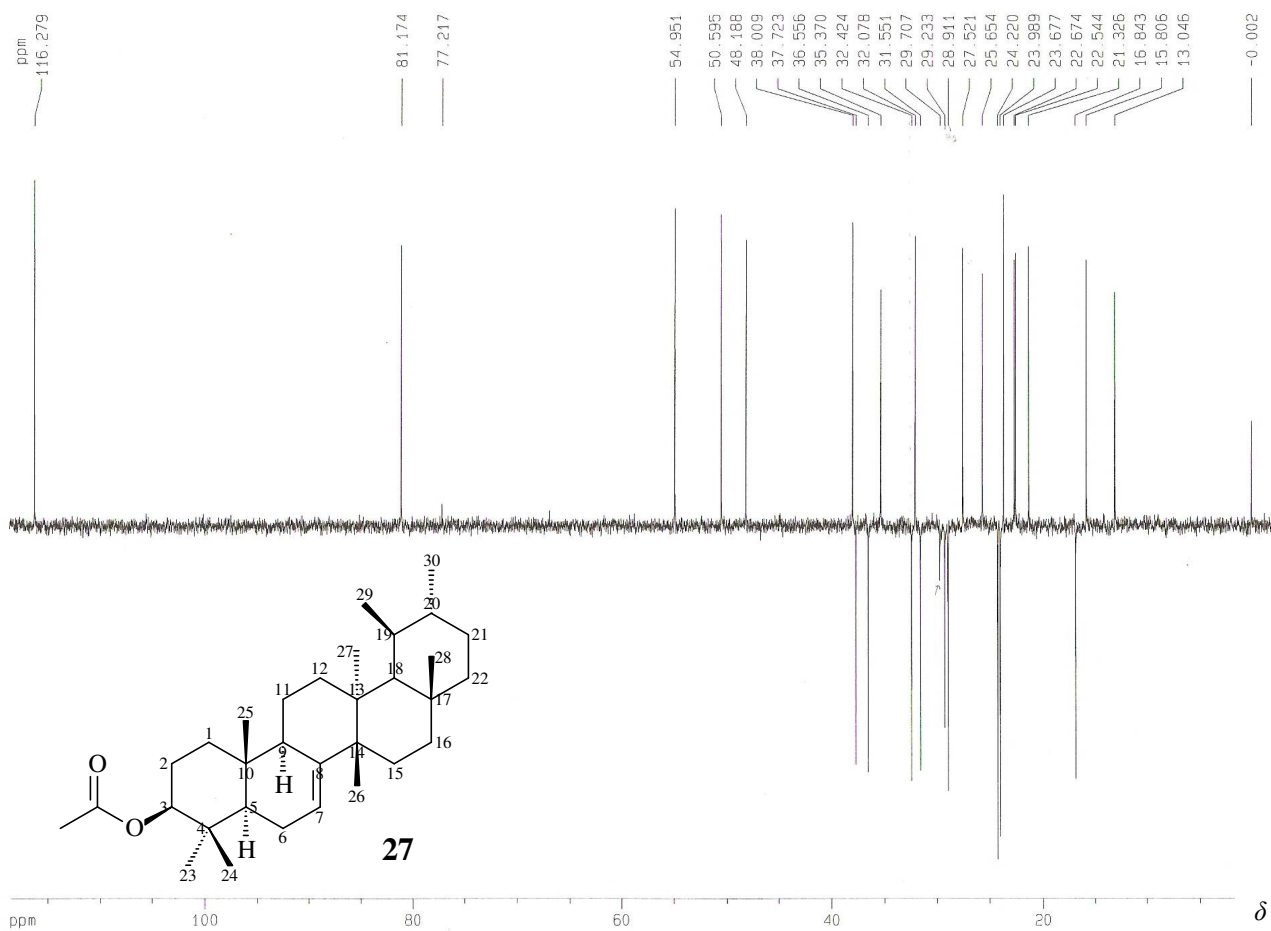
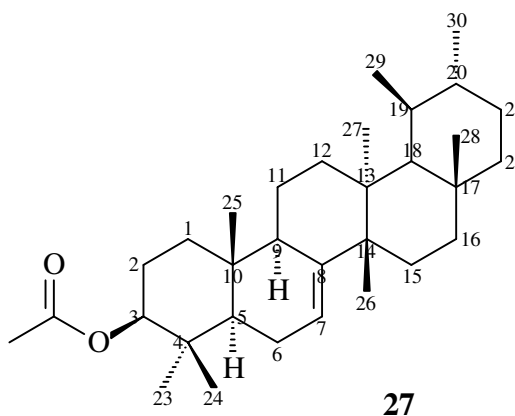


Figura IV.4. Subespectro DEPT-135° de CAG5-R1 (100 MHz; CDCl₃).

A completa atribuição dos dados de RMN de ¹³C de CAG5-R1, baseada na comparação com os dados correspondentes ao acetato de 3β-OAc, Δ⁷, baurenila (**27**)⁴⁵, é apresentada na Tabela IV.1. Essa substância não foi registrada ainda na espécie *Lychnophora pinaster*, apesar de ter sido isolada no gênero.⁴⁹

Tabela IV.1. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de CAG5-R1 (400 MHz; CDCl_3) e dados da literatura de acetato de $3\beta\text{-OAc}$, Δ^7 , baurenila⁴⁵

Carbono	Literatura $3\beta\text{-OAc}$, Δ^7 , baurenila	CAG5-R1	Carbono	Literatura $3\beta\text{-OAc}$, Δ^7 , baurenila	CAG5-R1
C(=O)OR		171,0	C-18	55,0	54,86
C-1	36,5	36,56	C-19	35,4	35,38
C-2	24,2	24,23	C-20	38,0	38,01
C-3	81,1	81,18	C-21	29,2	29,24
C-4	37,8	37,78	C-22	37,8	37,73
C-5	50,0	50,60	C-23	27,5	27,53
C-6	24,0	24,00	C-24	15,8	15,81
C-7	116,2	116,28	C-25	13,0	13,05
C-8	145,4	145,49	C-26	23,6	23,69
C-9	48,2	48,12	C-27	22,7	22,68
C-10	35,1	35,11	C-28	32,1	32,08
C-11	16,9	16,85	C-29	25,6	25,66
C-12	32,5	32,44	C-30	22,5	22,55
C-13	37,8	37,78			
C-14	41,3	41,29			
C-15	28,9	28,91			
C-16	31,5	31,56			
C-17	32,1	32,08			



2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG5-R2-G2

A amostra do grupo CAG5-R2-G2 apresentou como sólido branco de fusão na faixa de 257,8 a 259,0 °C (literatura para friedelina (**16**): 267-269 °C).⁵⁰ A Figura IV.5 apresenta o espectro de RMN de ¹H de CAG5-R2-G2. Os sinais de hidrogênio são registrados apenas entre δ_H 2,36 e 0,72, característicos de átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

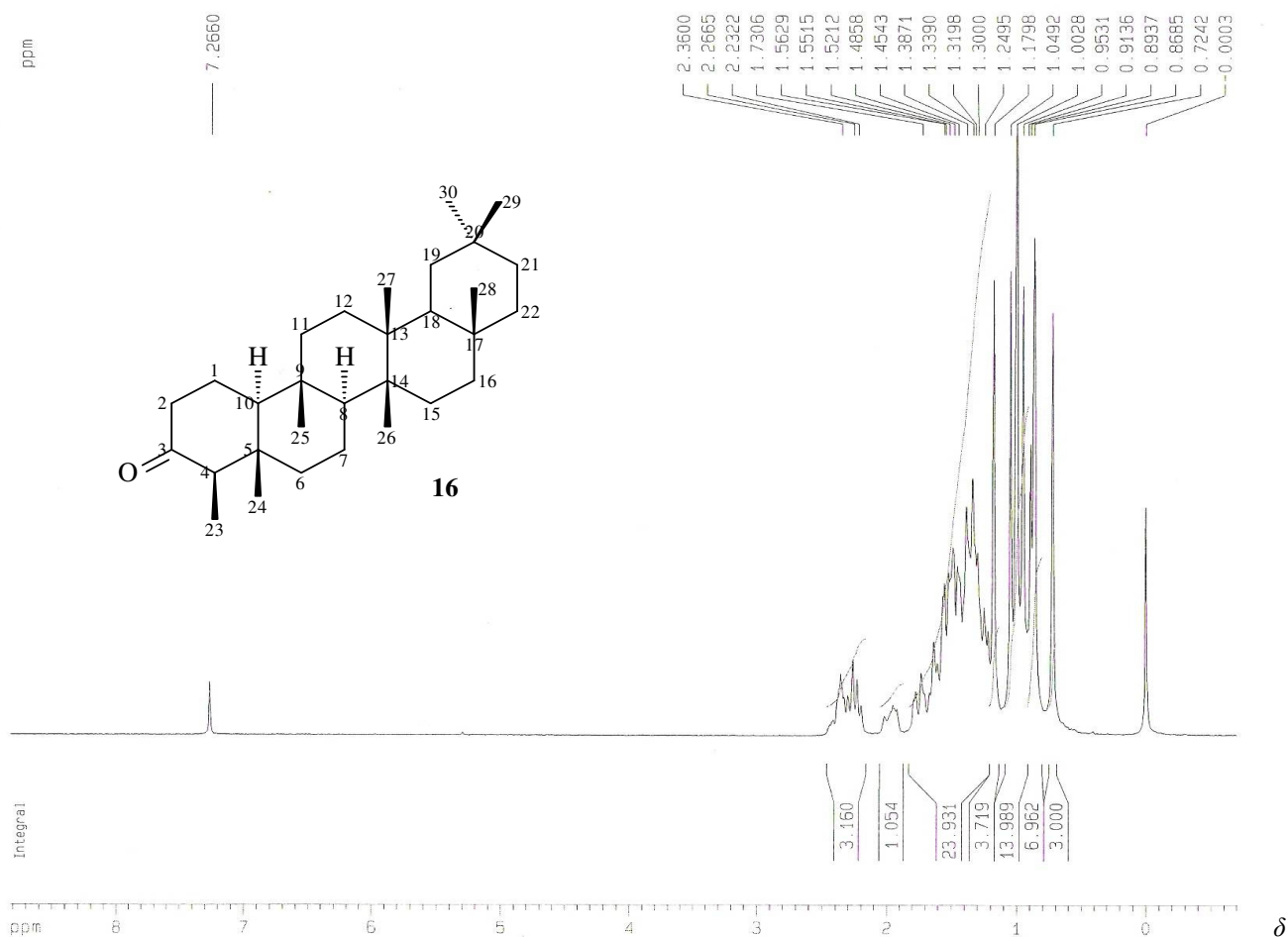


Figura IV.5. Espectro de RMN de ¹H de CAG5-R2-G2 (400 MHz, CDCl₃).

As Figuras IV.6 e IV.7 apresentam, respectivamente, o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135° de CAG5-R2-G2 que foram analisados conjuntamente. O sinal em δ_c 213,3 é característico de carbono carbonílico de cetonas. Os demais sinais de carbono que são registrados entre δ_c 59,5 e 6,8 são característicos de triterpenos.

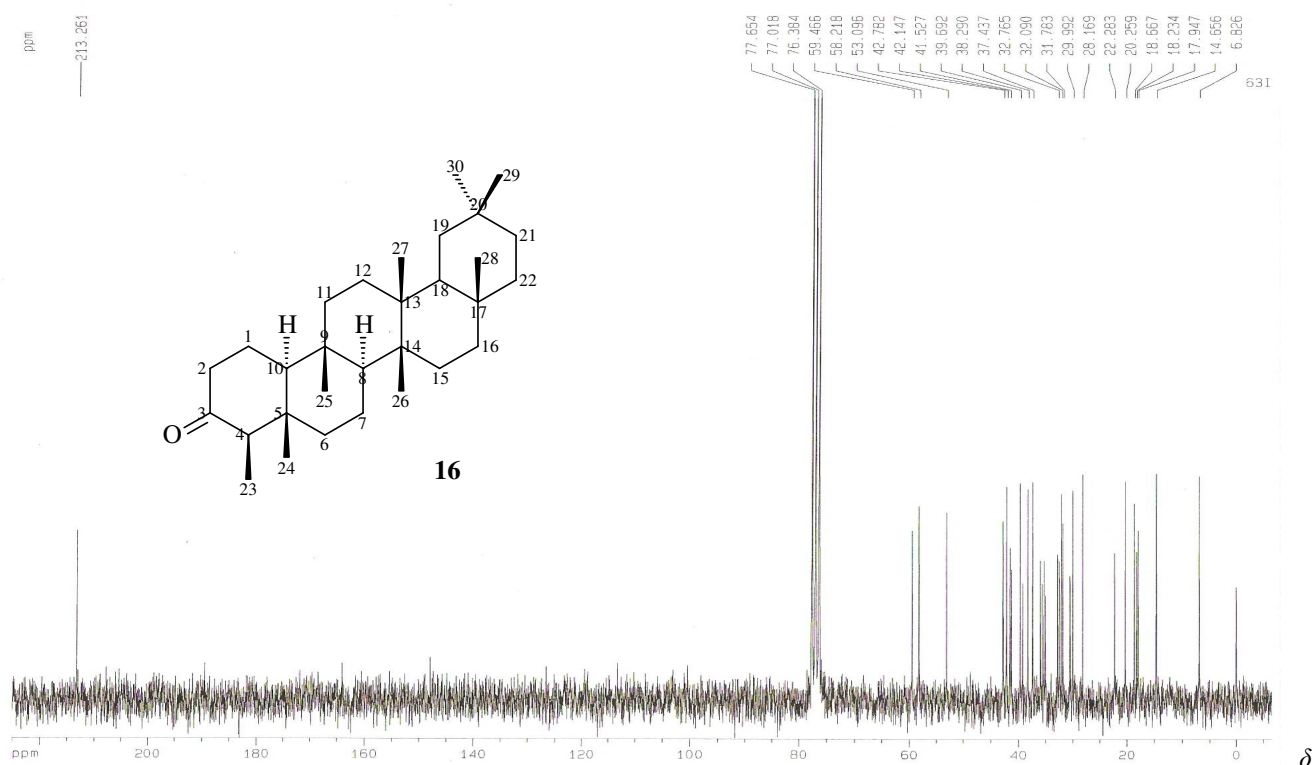


Figura IV.6. Espectro de RMN de ^{13}C de CAG5-R2-G2 (100 MHz; CDCl_3).

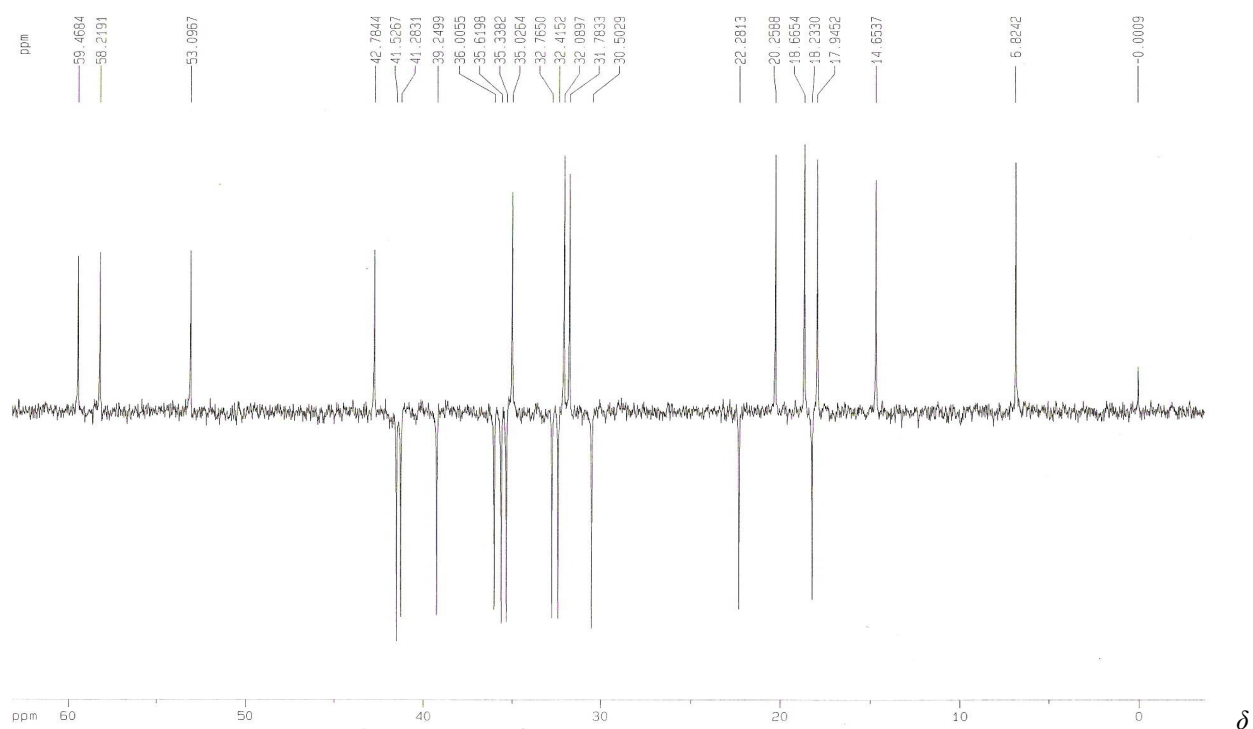
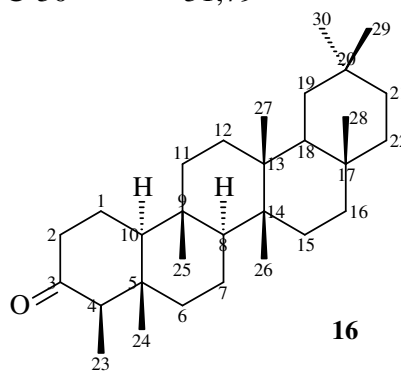


Figura IV.7. Subespectro DEPT-135° de CAG5-R2-G2 (100 MHz; CDCl_3).

A Tabela IV.2 mostra a atribuição dos dados de RMN de ^{13}C de CAG5-R2-G2 baseados na comparação com os dados correspondentes da friedelina⁴⁵.

Tabela IV.2. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de CAG5-R2-G2 (400 MHz; CDCl_3) baseados na comparação com os dados da literatura da friedelina⁴⁵ (400 MHz, CDCl_3 , TMS)

Carbono	Friedelina	CAG5-R2-G2	Carbono	Friedelina	CAG5-R2-G2
C-1	22,29	22,29	C-18	42,83	42,79
C-2	41,55	41,54	C-19	35,36	35,35
C-3	213,14	213,32	C-20	28,18	28,18
C-4	58,24	58,23	C-21	32,79	32,77
C-5	42,15	42,16	C-22	39,27	39,26
C-6	41,32	41,29	C-23	6,83	6,83
C-7	18,25	18,24	C-24	14,66	14,66
C-8	53,12	53,10	C-25	17,96	17,95
C-9	37,47	37,44	C-26	20,26	20,27
C-10	59,51	59,47	C-27	18,67	18,67
C-11	35,65	35,63	C-28	32,11	32,10
C-12	30,52	30,51	C-29	35,03	35,03
C-13	39,72	39,70	C-30	31,79	31,79
C-14	38,32	38,30			
C-15	32,44	32,42			
C-16	36,03	36,01			
C-17	30,01	30,00			



3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CA-G8

A amostra do grupo CAG8 apresentou como sólido branco de fusão na faixa de 234,8 a 238,0 °C. As Figuras IV.8, IV.9 e IV.10 apresentam respectivamente os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de CA-G8. Os sinais de hidrogênio e de carbono nos espectros de CA-G8 são similares aos espectros correspondentes de FOG1-R11, Figuras III.32 (pág. 67), Figura III.33 (pág. 68) e Figura III.20 (pág. 56), respectivamente. Portanto, pode-se propor que CA-G8 trata-se da mesma mistura de lupeol e α -amirina^{45,48}.

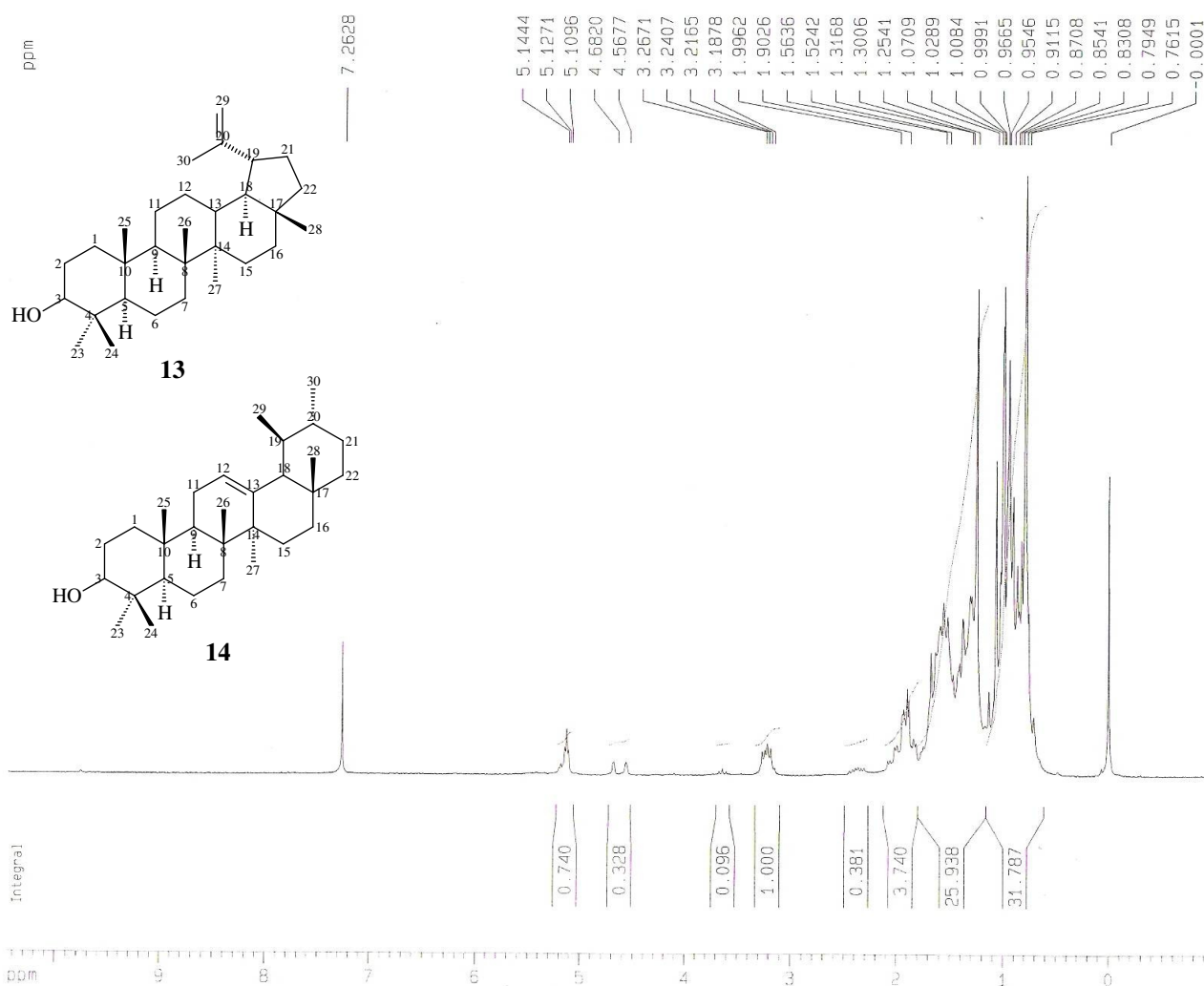


Figura IV.8. Espectro de RMN de ^1H de CAG8 (400 MHz, CDCl_3).

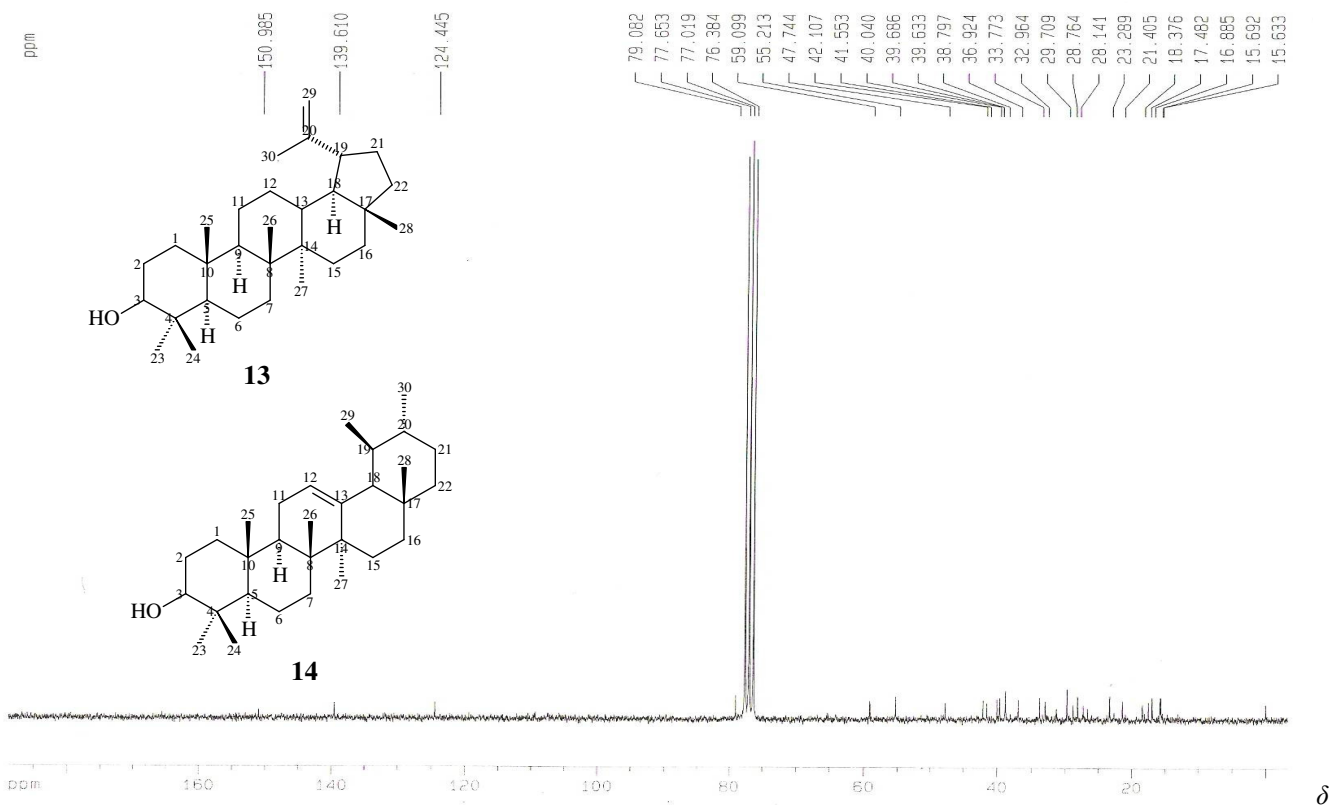


Figura IV.9. Espectro de RMN de ¹³C de CAG8 (100 MHz; CDCl₃).

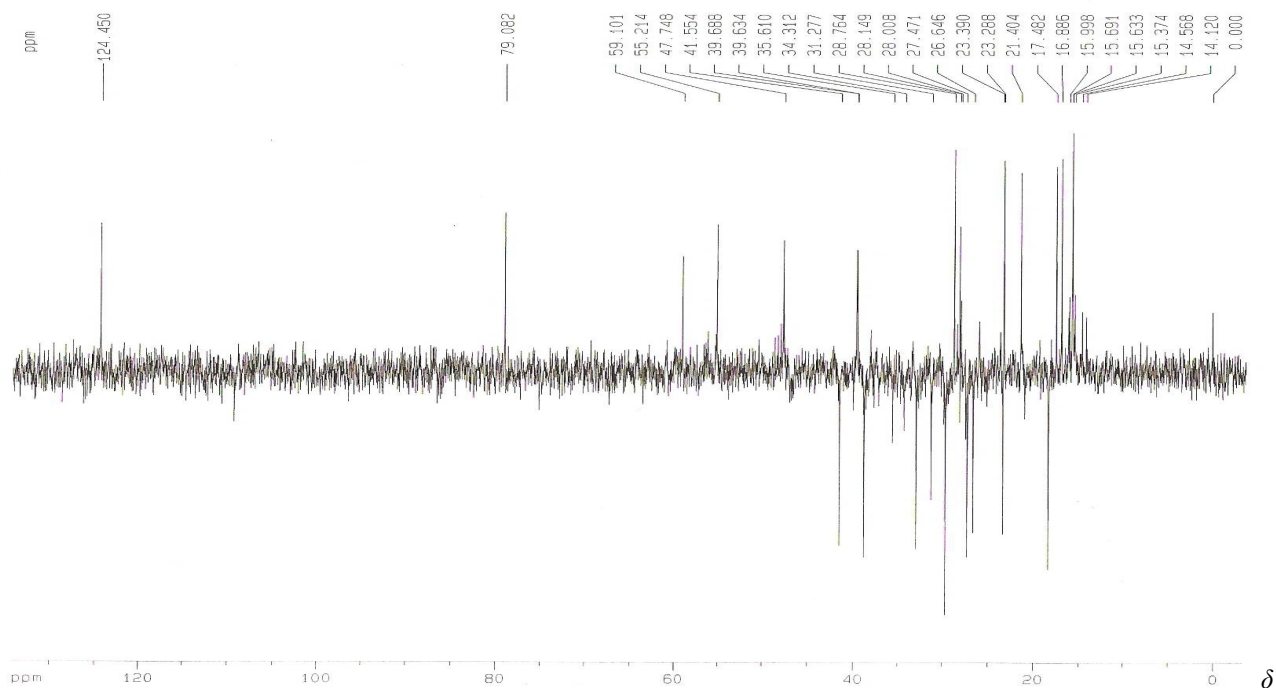


Figura IV.10. Subespectro DEPT-135° de CAG8 (100 MHz; CDCl₃).

4. ANÁLISE ESTRUTURAL DE CAG11

A amostra do grupo CAG11 apresentou-se como sólido branco de fusão na faixa de 164,8 a 168,0 °C (p.f. da literatura para mistura de estigmasterol e β -sitosterol: 171,9-176,2°C)⁴⁹. A Figura IV.11 apresenta o cromatograma de CG de CAG11. O cromatograma de CG de CAG11 mostra um pico em $t_R = 6,487$ min, sendo muito próximo ao registrado na literatura para o estigmasterol⁵¹.

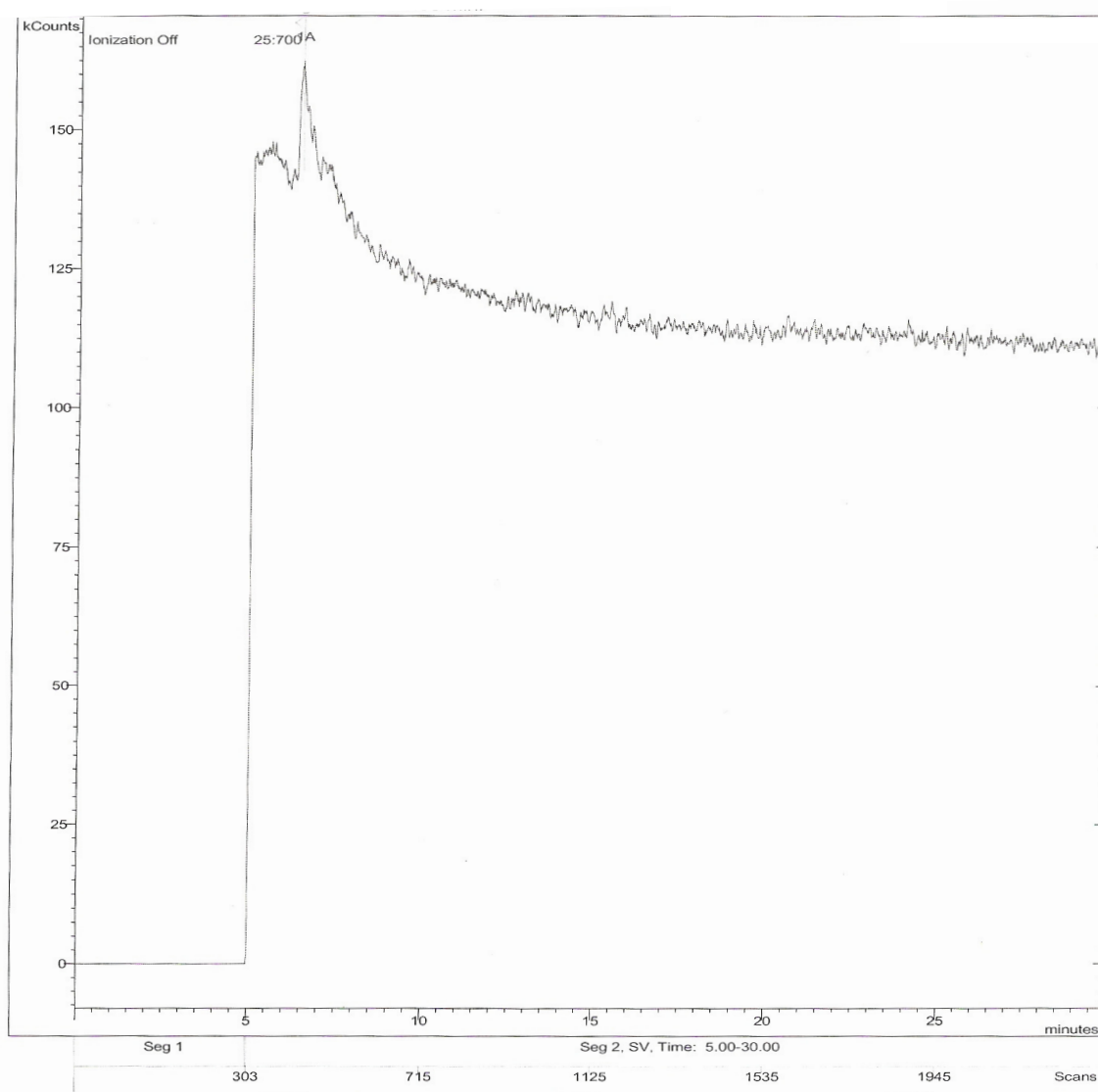


Figura IV.11. Cromatograma de CG de CAG11.

A Figura IV.12 apresenta o espectro de massas da substância representada pelo pico em $t_R = 6,487$ min do cromatograma de CG de CAG11. A consulta ao banco de dados Wiley indicou tratar-se do triterpeno estigmasterol (fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$; massa molecular 412 uma; p.f.: $140\text{ }^\circ\text{C}$)⁵².

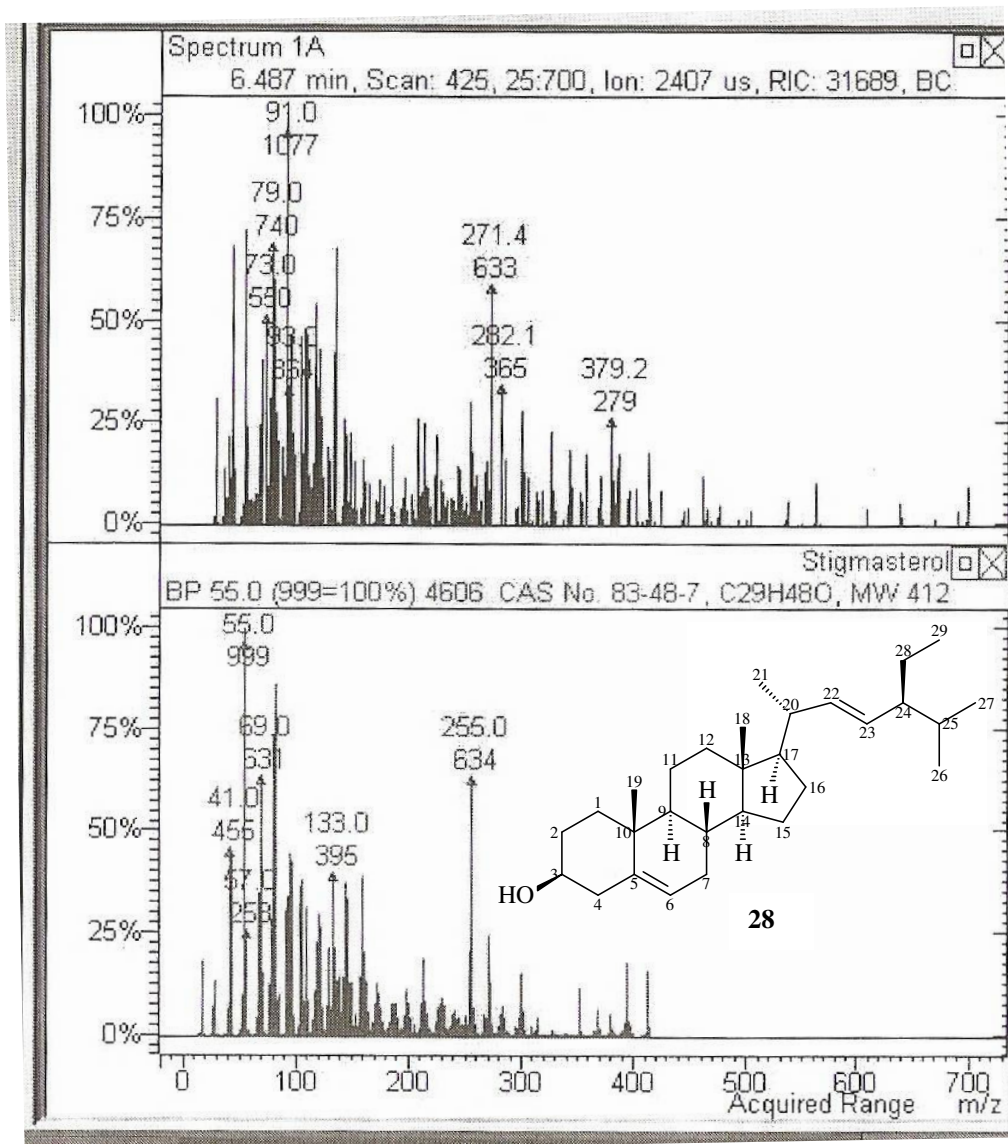


Figura IV.12. Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 6,487 min do cromatograma de CAG11.

A Figura IV.13 apresenta o espectro de RMN de ^1H de CAG11. O sinal multipletto registrado em δ_{H} 5,36 e o sinal dupletto registrado em δ_{H} 5,03 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos alquenílicos. O sinal multipletto registrado em δ_{H} 3,53 pode ser atribuído a átomo de hidrogênio de carbono carbinólico. Os sinais entre δ_{H} 2,29 e 0,68 podem ser atribuídos a átomos de hidrogênio de grupos alifáticos.

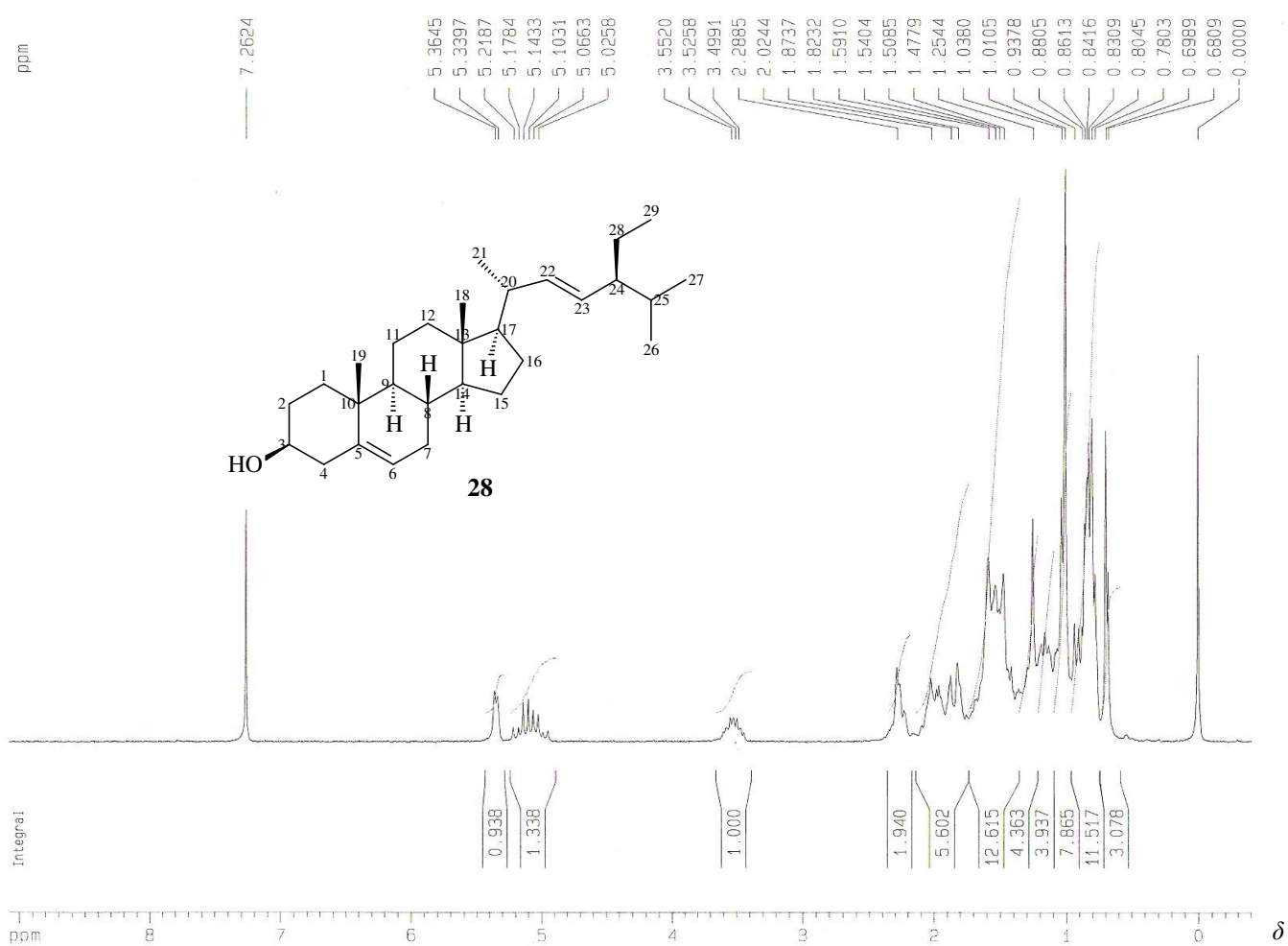


Figura IV.13. Espectro de RMN de ^1H de CA-G11 (400 MHz, CDCl_3).

As Figuras IV.14 e IV.15 apresentam respectivamente o espectro de RMN de ^{13}C e o subspectro DEPT 135° de CA-G11 que foram analisados conjuntamente. O sinal em δ_{C} 140,76 (correspondente a carbono não hidrogenado) e 121,73 (correspondente a carbono metínico) são característicos dos esteróides estigmasterol (**28**) e β -sitosterol (**29**). Porém, os sinais em δ_{C} 138,32 e 129,27 (ambos correspondentes a carbono metínico) são característicos apenas do estigmasterol. O sinal em δ_{C} 71,8 (correspondente a carbono metínico) pode ser atribuído ao carbono carbinólico em C-3 das substâncias (**28**) e (**29**). Os demais sinais entre δ_{C} 56,9 e 11,9 podem ser atribuídos aos átomos de carbono da cadeia alifática desses esteróides.

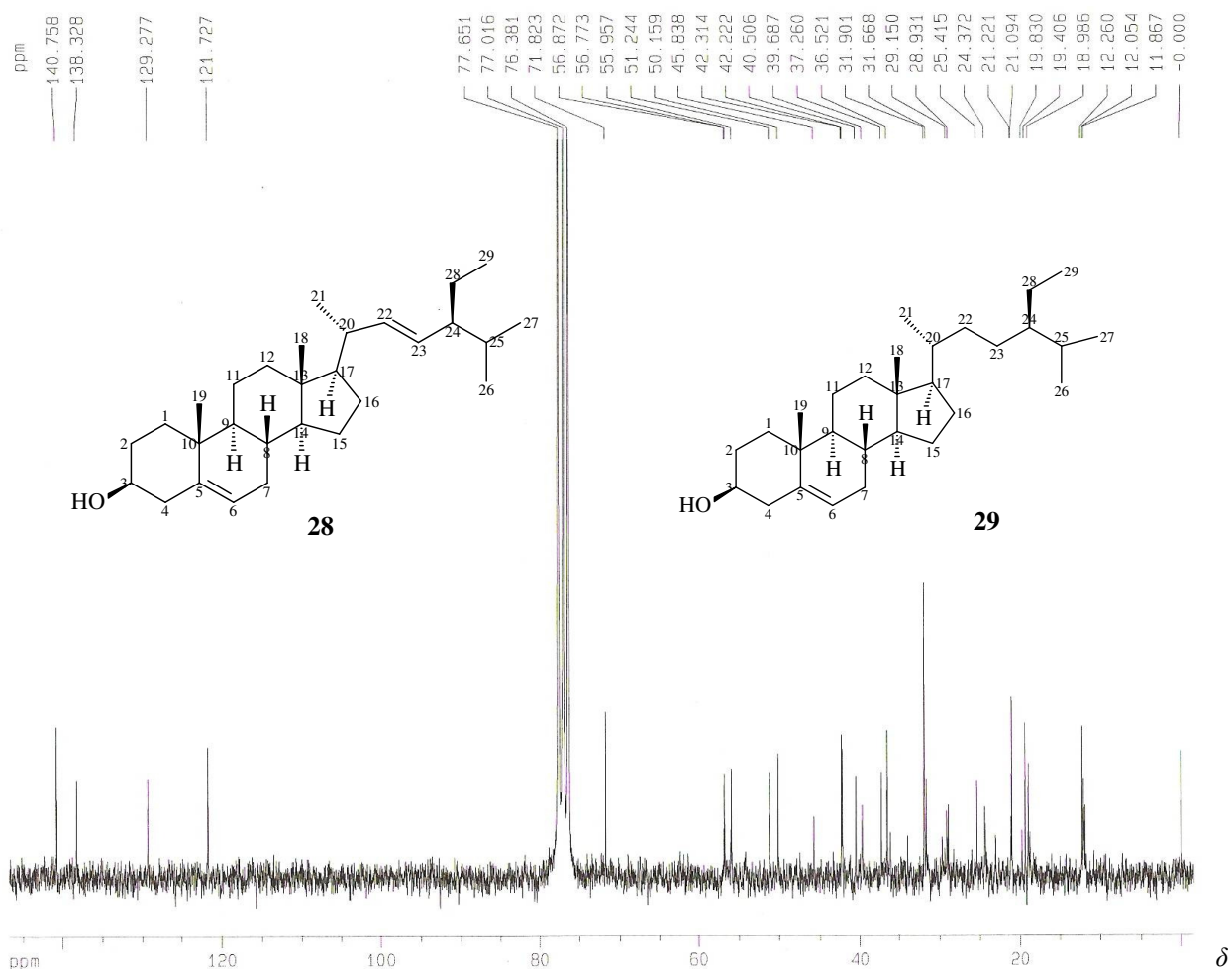


Figura IV.14. Espectro de RMN de ^{13}C de CAG11 (100 MHz; CDCl_3).

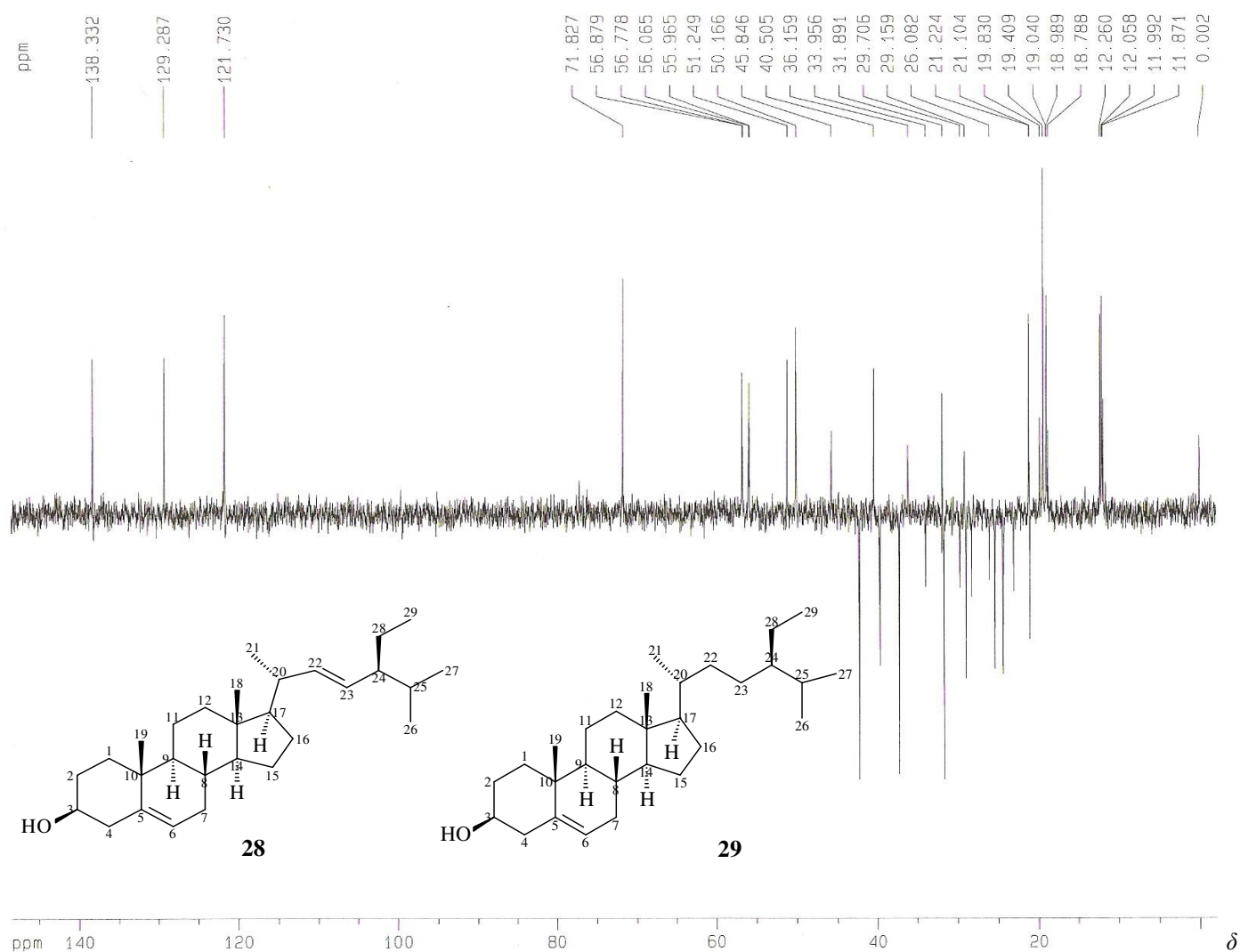
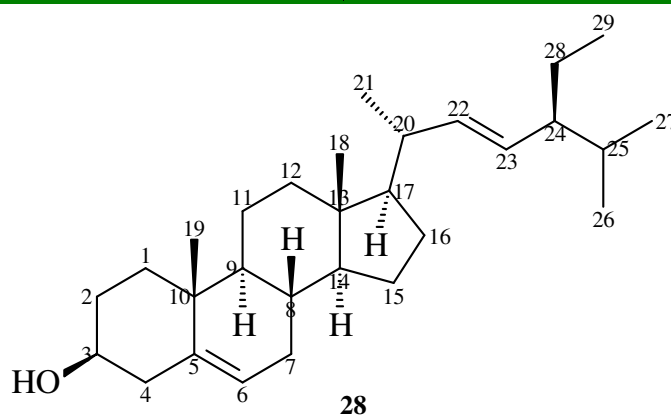


Figura IV.15. Subespectro DEPT-135° de CAG11 (100 MHz; CDCl₃).

A Tabela IV.3 mostra a atribuição dos dados de RMN de ¹³C de CAG11 baseados na comparação com os dados correspondentes do estigmasterol descritos na literatura.⁵³ A partir dos valores de integração dos sinais de H-6 (δ_H 5,36 e 5,34) de ambos os esteróides e de H-22 e H-23 (δ_H 5,18 e 5,05) do estigmasterol dados no espectro de RMN de ¹H de CAG11, a proporção estigmasterol: β -sitosterol é 2,5:1,0.

Tabela IV.3. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de CAG11 e dados da literatura do estigmasterol⁵³ (400MHz, CDCl_3 , TMS)

Carbono	Estigmasterol	CAG11	Carbono	Estigmasterol	CAG11
C-1	37,3 (CH_2)	37,2	C-16	29,0 (CH_2)	29,0
C-2	31,7 (CH_2)	31,7	C-17	56,1 (CH)	56,0
C-3	71,8 (CH)	71,8	C-18	12,1 (CH_3)	12,0
C-4	42,4 (CH_2)	42,2	C-19	19,4 (CH_3)	19,4
C-5	140,8 (C)	140,8	C-20	40,5 (CH)	40,5
C-6	121,7 (CH)	121,7	C-21	21,1 (CH_3)	21,2
C-7	31,9 (CH_2)	31,9	C-22	138,4 (CH)	138,3
C-8	31,9 (CH_2)	31,9	C-23	129,3 (CH)	129,3
C-9	50,2 (CH)	50,1	C-24	51,3 (CH)	51,2
C-10	36,6 (C)	36,5	C-25	31,9 (CH)	31,9
C-11	21,1 (CH_2)	21,1	C-26	21,3 (CH_3)	21,2
C-12	39,7 (CH_2)	39,7	C-27	19,0 (CH_3)	19,0
C-13	42,4 (C)	42,3	C-28	25,4 (CH_2)	25,4
C-14	56,9 (CH)	56,9	C-29	12,3 (CH_3)	12,1
C-15	24,4 (CH_2)	24,4			



A Figura IV.16 apresenta as estruturas químicas dos fitoconstituintes isolados do caule de *Lychnophora pinaster*: 3β -OAc, Δ^7 -baurenila (**27**), friedelina (**16**), mistura de lupeol (**13**) e α -amirina (**14**) e uma mistura de estigmasterol (**28**), β -sitosterol (**29**).

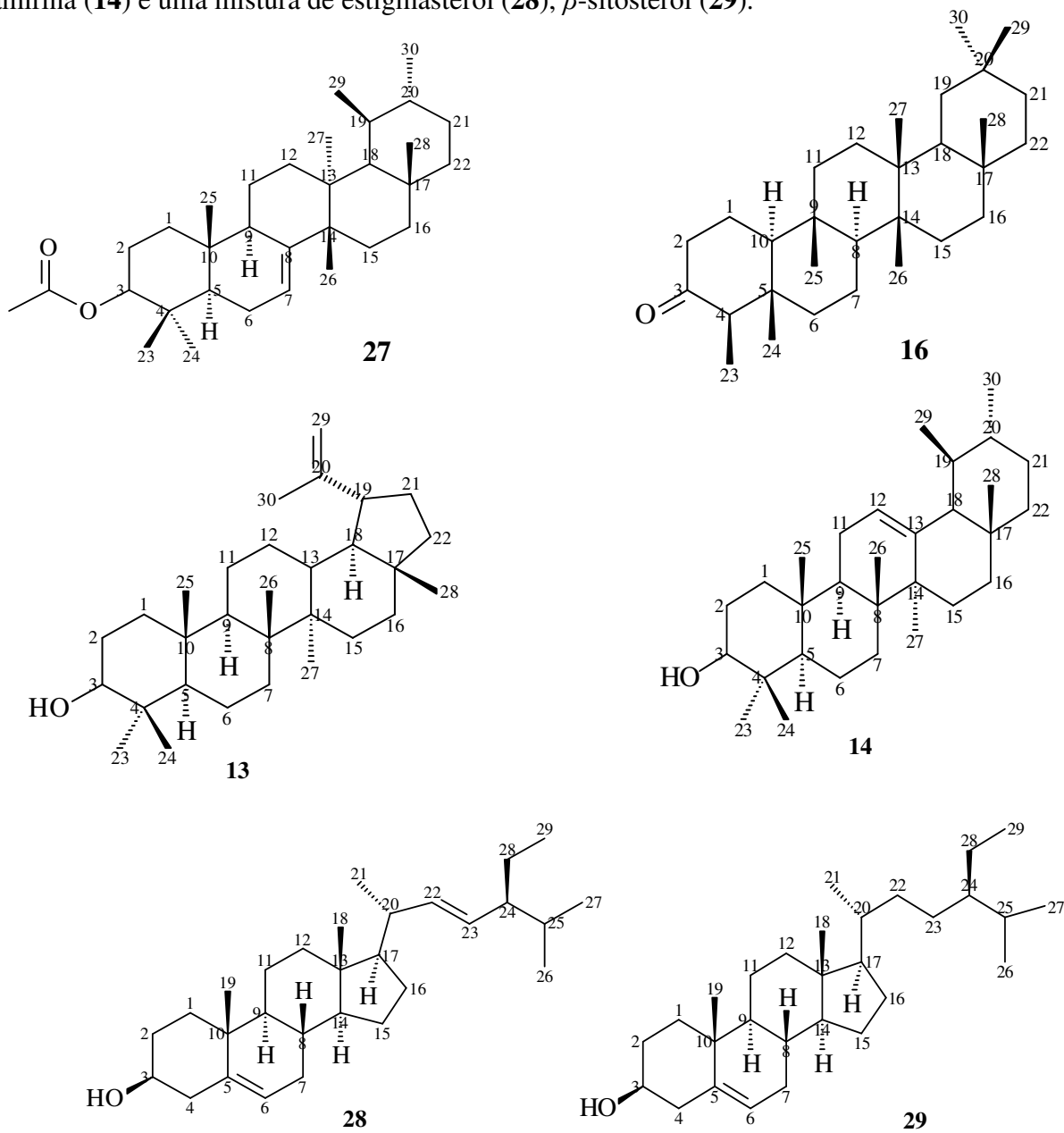


Figura IV.16. Fitoconstituintes isolados do caule de *L. pinaster*.

CAPÍTULO V:
ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FLORES

- Resultados e Discussão

1. ANÁLISE ESTRUTURAL DE EEFLG5-R6

Após recristalização em MeOH, o grupo EEFLG5-R6 apresentou-se como sólido branco de fusão na faixa entre 171,9 e 176,2 °C. A Figura V.1 apresenta o espectro de absorção na região do IV de EEFLG5-R6. A absorção larga na região entre 3450 e 3200 cm^{-1} é característica de estiramentos O–H em ligação de hidrogênio. As absorções entre 2900 a 2850 cm^{-1} são típicas de estiramentos C–H de grupos alifáticos. A absorção em 1640 cm^{-1} é típica de estiramento C=C. As absorções em 1459, 1381 e 1367 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C–C e deformações angulares de H–C–H de cadeias alifáticas. As absorções em 1243 e 1192 cm^{-1} podem ser atribuídas respectivamente a estiramentos C–O assimétrico e simétrico.

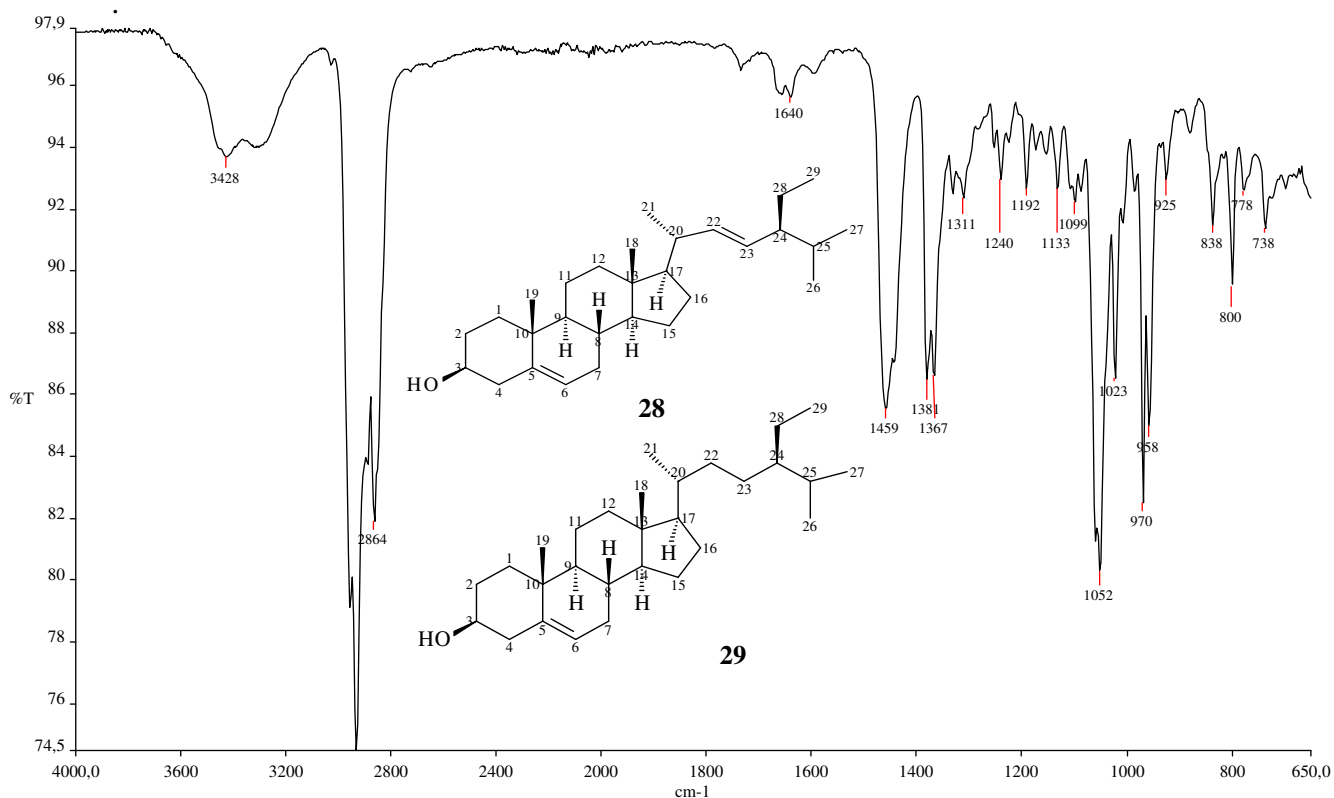


Figura V.1. Espectro de absorção na região do Infravermelho de EEFLG5-R6.

A Figura V.2 apresenta o cromatograma de CG de EEFLG5-R6. O cromatograma de CG de EEFLG5-R6 mostra, dentre outros, um pico em $t_R = 6,781$ min. O espectro de massas da substância representada por este pico (Figura V.3) indica tratar-se do estigmasterol (**28**), conforme consulta ao banco de dados Wiley.

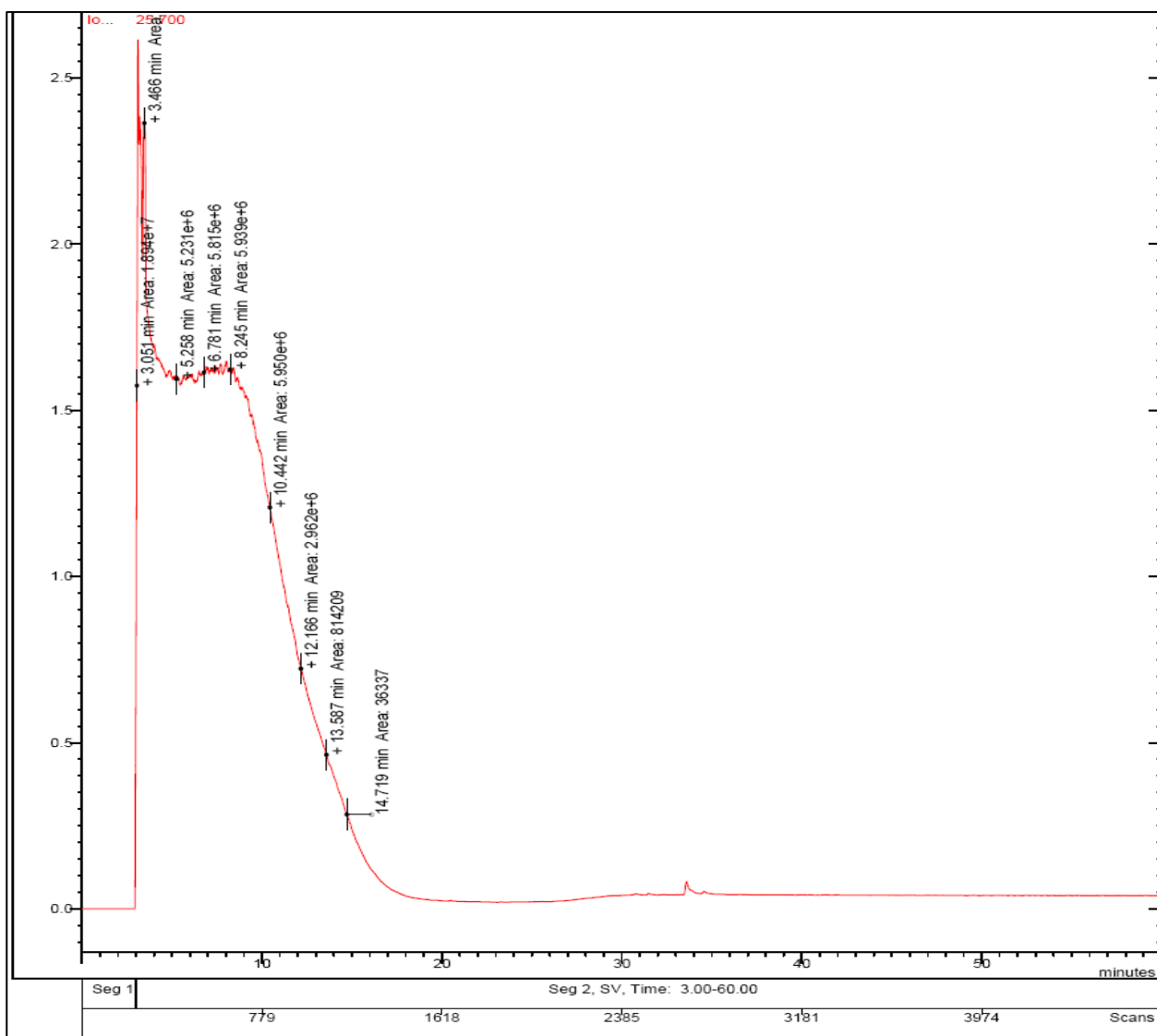


Figura V.2. Cromatograma de CG de EEFLG5-R6.

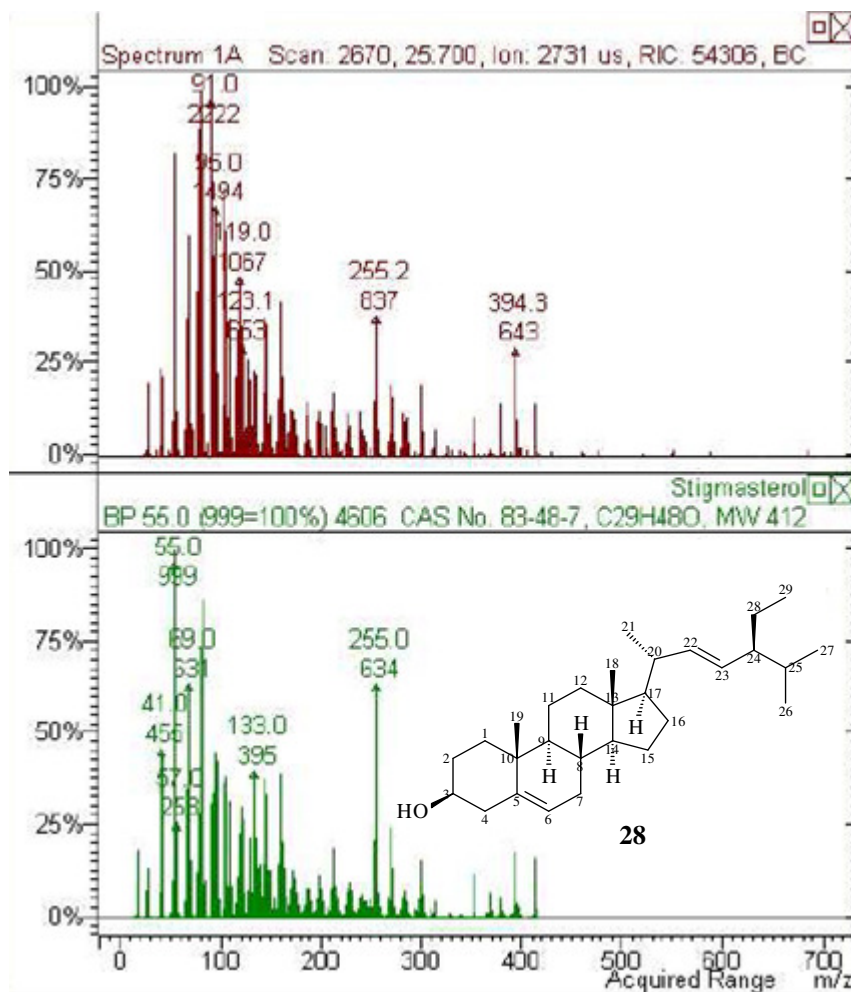


Figura V.3. Espectro de Massas da substância de tempo de retenção 6,781 min do cromatograma de EEFLG5-R6.

As Figuras V.4, V.5, V.6 e V.7 mostram, respectivamente, os espectros de RMN de ^1H , sua expansão, o espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT 135° de EEFLG5-R6. Os sinais de hidrogênio e de carbono nos espectros de EEFLG5-R6 são similares àsquelas dos espectros correspondentes de CA-G11, Figuras IV.14 (pág. 86), Figura IV.15 (pág. 87) e IV.16 (pág. 89), respectivamente. Portanto, pode-se propor que EEFLG5-R6 trata-se de uma mistura de estigmasterol; β -sitosterol.

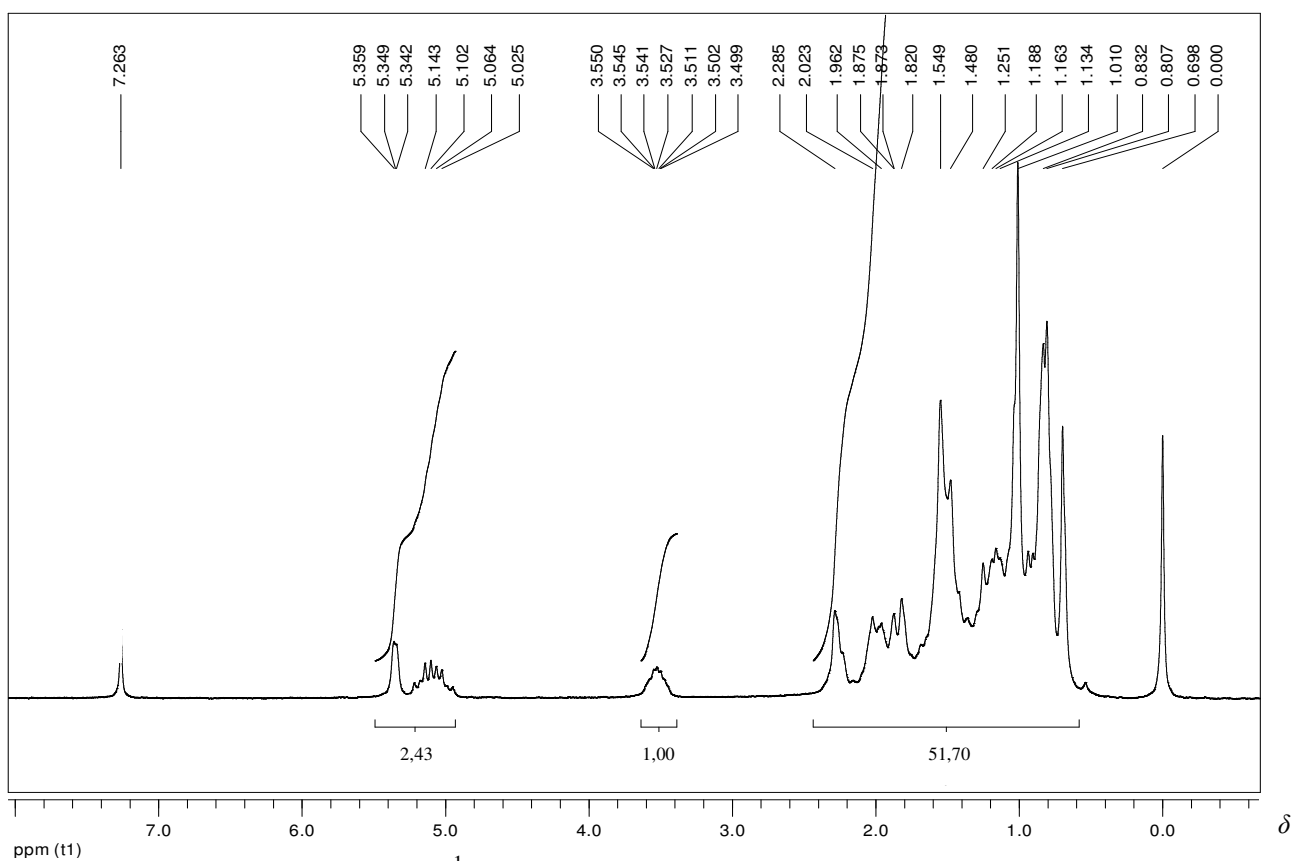


Figura V.4. Espectro de RMN de ^1H de EEFLG5-R6 (400 MHz, CDCl_3).

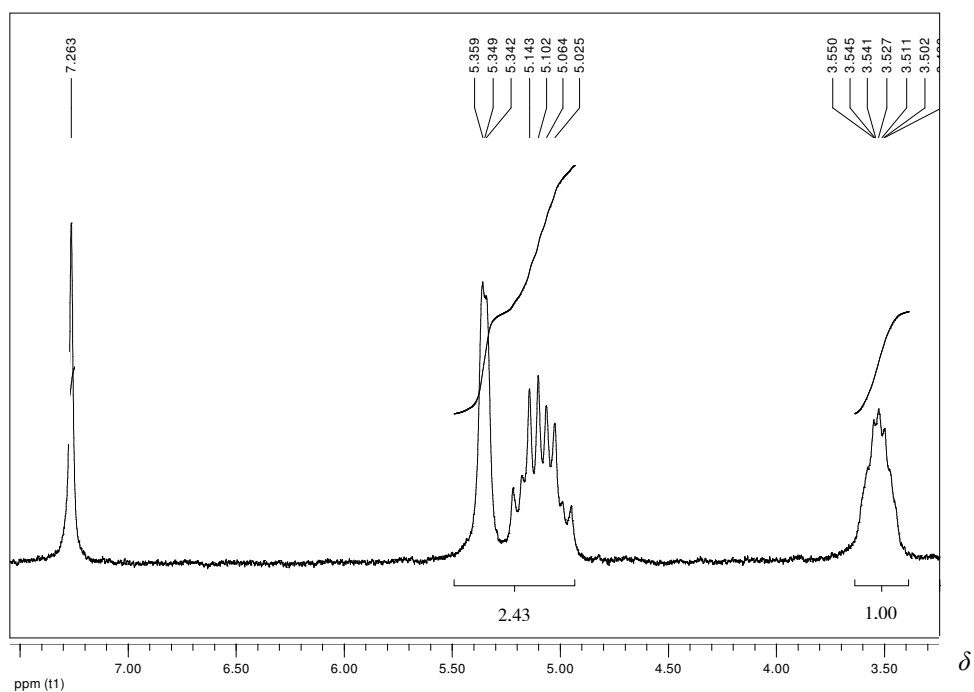


Figura V.5. Expansão da região entre δ_{H} 3,00 e 7,00 do espectro de RMN de ^1H de EEFLG5-R6 (400 MHz, CDCl_3).

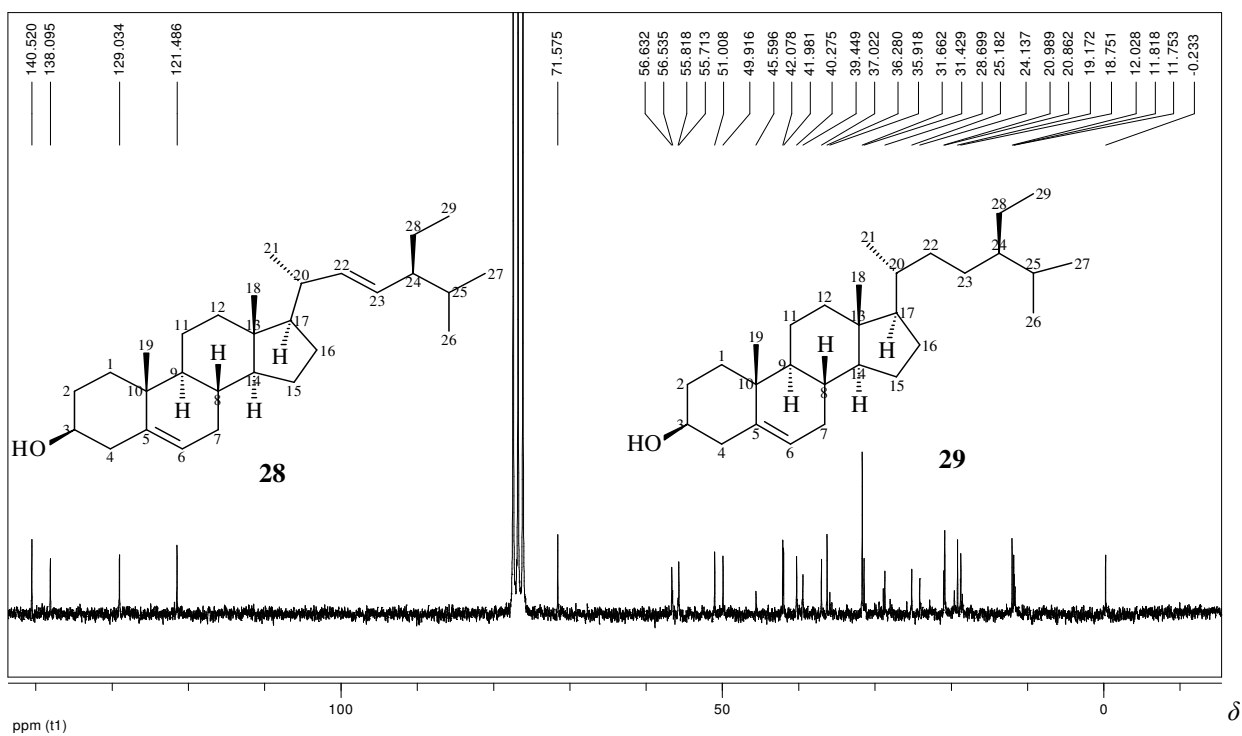


Figura V.6. Espectro de RMN de ^{13}C de EEFLG5-R6 (100 MHz; CDCl_3).

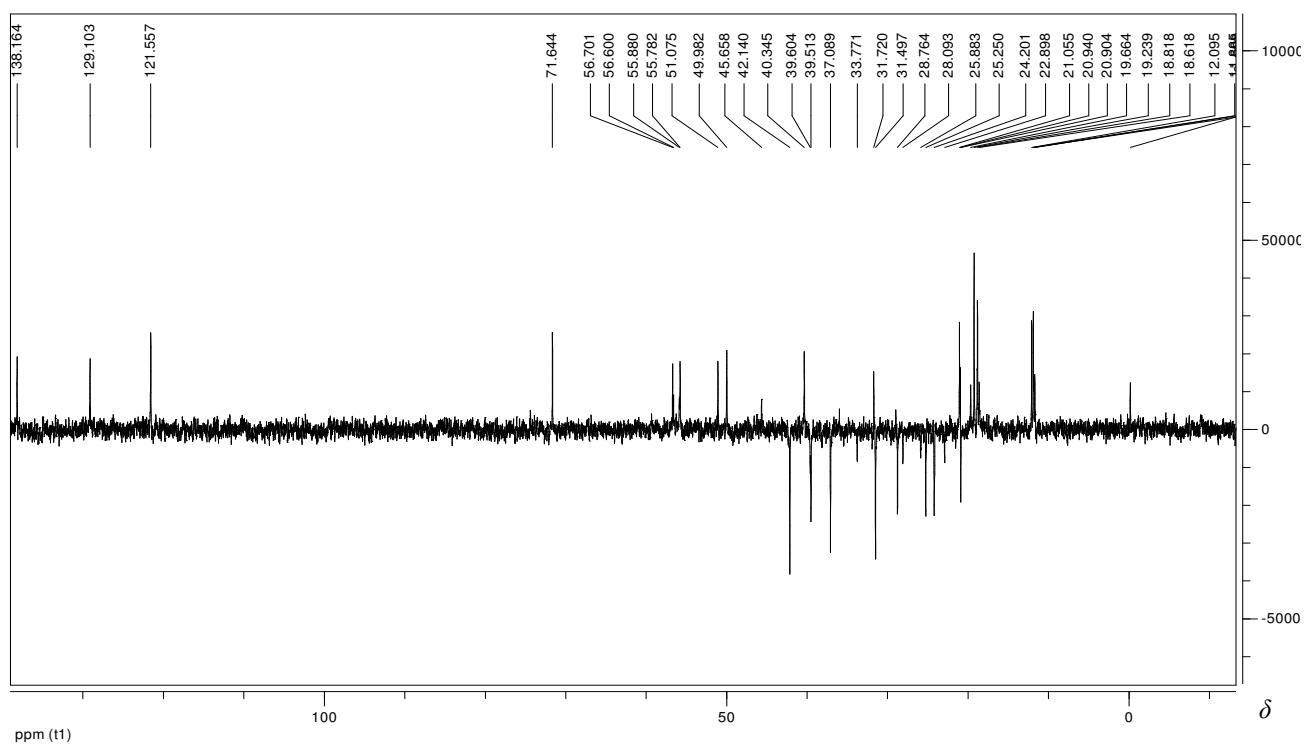


Figura V.7. Subespectro DEPT-135° de EEFLG5-R6 (100 MHz; CDCl_3).

CAPÍTULO VI:

**ENSAIOS BIOLÓGICOS DE EXTRATOS,
FRAÇÕES E FITOCONSTITUINTES ISOLADOS**

DE *L. pinaster*

1. Teste de Atividade Bactericida

O extrato etanólico bruto das folhas de *L. pinaster* foi submetido aos testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima, como descrito na parte experimental. A Tabela VI.1 apresenta os resultados de testes de atividade antimicrobiana com diferentes espécies de bactérias para esse extrato. Os testes não indicaram atividade bactericida do extrato etanólico das folhas frente a *Bacillus cereus* e *Citobacter freundii*. Porém, esse extrato apresentou uma atividade bactericida significativamente expressiva frente a *Staphylococcus aureus*.

Tabela VI.1. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição do extrato etanólico bruto das folhas de *Lychnophora pinaster* frente a diferentes espécies de bactérias

Bactéria utilizada	Halo de Inibição (cm)	Halo de Inibição (cm) Controle
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	18	22
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11779	Negativo	20
<i>Citobacter freundii</i> ATCC 25723	Negativo	27

Controle: Cloranfenicol 30µg

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto das folhas e flores foi biomonitorado por testes de atividade bactericida. As frações obtidas pelo fracionamento

cromatográfico do extrato etanólico empregando diferentes sistemas de eluição, com gradiente crescente de polaridade, foram submetidas aos testes de difusão em ágar. A Tabela VI.2 apresenta os resultados dos testes de atividade bactericida de frações do extrato etanólico das folhas e flores frente a *Staphylococcus aureus*. Apenas as frações das folhas obtidas com DCM e as frações das flores obtidas com AcOEt foram positivas frente a *S. aureus*. Esta bactéria pode ser considerada como uma das mais virulentas do seu gênero, uma vez que a intoxicação estafilocócica pode ser tornar fatal quando não tratada.⁵⁴

Tabela VI.2. Resultados de testes microbiológicos de halo de inibição de frações do extrato etanólico das folhas e flores de *Lychnophora pinaster* frente a *Staphylococcus aureus*

Frações	Halo de Inibição (cm)
FO-Hexano	Negativo
FO-Diclorometano	13
FO-Acetato de Etila	Negativo
FO-Metanol	Negativo
FL- Hexano	Negativo
FL-Diclorometano	Negativo
FL-Acetato de Etila	11
FL-Metanol	Negativo

Controle: Cloranfenicol 30µg

2. Testes de atividade tripanossomicida

Para os ensaios parasitológicos foram utilizados camundongos contaminados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* para fornecer os tripomastigotas sanguíneos. As amostras para o teste foram dissolvidas em DMSO (0,2 mL) e misturadas com sangue contaminado (0,2 mL). Foi utilizado DMSO e violeta de genciana como controles. Após 24 h de tempo de contato, um inóculo de $2 - 2,5 \times 10^6$ tripomastigotas / mL foi adicionado e submetido a incubação entre 4 e 8 °C. As suspensões em seguida foram examinadas microscopicamente.

Os resultados dos testes de atividade tripanossomicida das frações do extrato etanólico das folhas e flores frente a *Trypanosoma cruzi* são apresentados na Tabela VI.3.

Tabela VI.3. Resultados de testes de atividade tripanossomicida (redução de parasitas) das frações do extrato etanólico das folhas e flores de *Lychnophora pinaster* frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÃO (µg / mL)	REDUÇÃO DE PARASITAS (%)	SOLUBILIDADE (Água / DMSO*)
Controle sem substância a ser testada		0	
Violeta de Genciana	12.5	51	Solúvel
DMSO	2,5 %	1	
EHFLD	500	0	* Pouco. solúvel / presença de precipitado
FO-Hexano	500	0	*Insolúvel
FO-EE bruto	500	2	*Solúvel
FO-Acetato de Etila	500	4	*Solúvel
EHFLH	500	3	* Pouco. solúvel / presença de precipitado
FO-Diclorometano	500	1	*Solúvel
EHFLE	500	11	* Pouco. solúvel / presença de precipitado
EHFLA	500	15	*Solúvel
FOG1-R10-G4	500	13	* Pouco. solúvel / presença de precipitado
FOG1-R11	500	5	* Pouco. solúvel / presença de precipitado

Diante do resultado positivo para EHFLA e da boa solubilidade em DMSO, um fracionamento cromatográfico está sendo realizado no intuito de aumentar a atividade tripanossomícida mediante aumento da concentração dos fitoconstituintes ativos.

CONCLUSÕES

E

PERSPECTIVAS

1. Estudos Fitoquímicos

A partir dos estudos fitoquímicos de *L. pinaster* realizados, até o momento, foi possível a identificação de vários fitoconstituintes provenientes do fracionamento cromatográfico das diferentes partes da planta. Essa identificação, apesar da obtenção de misturas oriundas do fracionamento dos diferentes extratos, foi possibilitada pela análise dos dados de IV, RMN e EM, comparados com dados da literatura. Assim, verificou-se que nas folhas de *L. pinaster*, dentre outros, sobressaem os triterpenos pentacíclicos 3-*O*-acetil-lupeol (**22**), 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol (**23**), 3-*O*-acetil- α -amirina (**24**), lupeol (**13**), α -amirina (**14**), 3-*O*-alquil- α -amirina (**25**), 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol (**26**), além de misturas de hidrocarbonetos alifáticos de C₁₄ a C₁₆.

Como constituintes do caule identificou-se 3 β -OAc, Δ^7 -baurenila (**27**), friedelina (**16**), lupeol (**13**), α -amirina (**14**) e os esteróides estigmasterol (**28**), β -sitosterol (**29**). Esses dois últimos fitoconstituintes foram isolados também do extrato das flores. Portanto, as frações isoladas de diferentes extratos de *L. pinaster* constituídos de misturas, possibilitou a identificação de várias substâncias já descritas na literatura. É importante ressaltar que 3-*O*-acetil-lupeol (**22**), 3-*O*-acetil-pseudotaraxasterol (**23**) e 3 β -OAc, Δ^7 -baurenila (**27**), 3-*O*-acetil- α -amirina (**24**), 3-*O*-alquil- α -amirina (**25**) e 4,4-dimetil-cholesta-22-24-dien-5-ol (**26**) foram pela primeira vez identificadas nesta espécie vegetal. Estes resultados dão importância e justificam a continuidade do trabalho fitoquímico, com a análise das frações apolares, bem como o estudo das frações polares que não foram estudadas ainda.

2. Estudos Biológicos

A partir dos resultados obtidos até o momento observou-se que as frações eluídas em DCM das folhas e as frações eluídas em AcOEt das flores foram ativas frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, uma das bactérias mais virulentas e com grande capacidade de produzir abscessos em infecções localizadas ou metastáticas. Estes resultados justificam a continuidade do estudo de avaliação da atividade antimicrobiana de *L. pinaster*.

Dos extratos de *L. pinaster* testados contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, as frações eluídas em AcOEt do extrato hexânico das flores (EHFLA) apresentaram resultados satisfatórios. As frações eluídas em EtOH provenientes do extrato hexânico das flores e a substância FOG1-R10-G4 (3-*O*-alquil- α -amirina) também foram ativas frente à tripomastigotas de *T. cruzi*, mas não apresentaram boa solubilidade em água/DMSO. Estes resultados preliminares confirmam a atividade tripanossomicida descrita para a planta e justificam a continuidade do estudo fitoquímico das folhas, caule e flores de *L. pinaster* para o isolamento de novos fitoconstituintes ativos, bem como a investigação da relação estrutura química e atividade biológica.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

1. Foye, W.O., Lemke, T.L., Willians, D.A., *Principles of Medicinal Chemistry*. Willians & Wilkins, Media, USA, **1995**.
2. http://www.pt.wikipedia.org/tripanosom%c3%adpse_africana. Acesso em **10/01/2008**.
3. <http://www.drugs.com/mmx> e <http://www.buenasalud.com/enc>. Acesso em **10/01/2008**.
4. Macadan, R.F., Willianson, J.; *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1974**, 68, 301.
5. Maya, L, Rodríguez, A., Pino, L., Pabón, A., Ferreira, J., Pauani, M., Repetto, Y., Morillo, A.; *Biology. Research.* **2004**, 37, 61.
6. Souza, A.G., Valério-Wanderley, D.M.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) **1984**, 79, 125.
7. <http://www.who.int/tdr/grants/workplans>. Acesso em **10/01/2008**.
8. Chung, M. C. Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP. **1996**, 196p.
9. (a) Hammond, D.J., Cover, B., Gutteridge, W.E.; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **1984**, 78, 91; (b) Hammond, D.H., Croft, S.L.; *Acta Tropica*, **1986**, 43, 367; (c) Chiari, E., Oliveira, A.B.; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, 85, 372.
10. Nussenzweig, V., Sonntag, R., Biancalana, A., Freitas, J.L.P., Amato-Neto, V., Kloetzel, J.; *Hospital* (Rio de Janeiro) **1953**, 4, 731.
11. (a) Brener, Z.; *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1979**; (b) Organização Pan-Americana de Saúde, Organização Mundial de Saúde; *Las condiciones de salud en las Américas*. Washington, **1994**; (c) Reynolds, J.E.F., Martindale, W.; *Martindale: the extra pharmacopoeia*. Pharmaceutical Press, Londres, **1982**; (d) U. S. National Library of Medicine:

- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo>. Acesso em **10/01/2008**; (e) Rassi, A., Amato-Neto, V., Siqueira, A., M.S.B. Leite; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1998**, *31*, 249.
12. (a) Rezende, J.M., Zupelli, V., Bufutto, M.G.; *Rev. Goiana de Med.* **1965**, *11*, 35; (b) Santana, H., Zaia, D.A.M., Corio, P., El-Haber, F., Louarn, G.; *Química Nova*. **2006**, *29*, 194.
13. Thomas M., MacPhee, D.G.; *Mutation Res.* **1984**, *14*, 165.
14. (a) Dias, J.C.P.; *Parasitol. Today*. **1987**, *3*, 336; (b) Martins, A.V.; *Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1982**.
15. (a) Bohlmann, F., Zdero, C.; *Phytochemistry*. **1980**, *19*, 2381; (b) Bohlmann, F., Zdero, C.; *Phytochemistry* **1982**, *21*, 685; (c) Cunha, W.R., Lopes, J.L.C., Vichnewski, W.; *15ª Reunião Anual da SBQ (Caxambu-MG)*. **1992**, PN-72; (d) Martins, C.F.P., Eichler, A.G.; *Flora Brasiliensis* *6*, 154/1873; (e) Chiari, E., Duarte, D.S., Raslan, D.S., Saúde, D.A., Perry, K.S.P., Boaventura, M.A.D., Grandi, T.S.M., Stehmann, J.R., Anjos, A.M.G., Oliveira, A.B.; *Phytotherapy Res.* **1996**, *10*, 636.
16. (a) International Code of Botanical Nomenclature, Utrech. Frans A. Stafflen. **1981**, 430; (b) Duarte, D.S., Raslan, D.S.; *16ª. Reunião Anual da SBQ (Caxambu-MG)*. **1993**, PN-59. (c) Cerqueira, M.B.S.; Souza, J.T.; Júnior, R.A.; Peixoto, A.B.F.; *Ciência e Cultura*. **1987**, *39*, 551.
17. (a) Bohlmann, F. ; Jakupovic, J.; *Plant Syst. Evol.* **1990**, *4*, 3; (b) Duarte, D.S.; Raslan, D.S.; Chiari, E.; Oliveira, A.B.. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* **1993**, *88*, 240; (c) Duarte, D.S.; Saúde, D.A.; Raslan, D.S.; Boaventura, M.A.D.; Perry, K.S.P. *Acta Horticulturae*. **1999**, *501*, 145.

18. Oliveira, A.B.; Saúde, D.A.; Perry, K.S.P.; Duarte, D.S.; Raslan, D.S.; Boaventura, M.A.D.; Chiari, E. *Phytotherapy Res.* **1996**, *10*, 292.
19. Duarte, D. S. Estudo químico-biológico de *Lychnophora pinaster* Mart. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, MG. **1993**, 99p.
20. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>. Acesso em **27/06/2009**.
21. Heywood, V. H. *Flowering plants of the world*, Oxford University Press: New York, **1993**.
22. Joly, A. B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*, 7ª ed., Cia Editora Nacional: São Paulo, **1967**.
23. Zomlefer, W. B.; *Guide to flowering plant families*, Chapel Hill & London: Carolina, USA, **1994**.
24. Emerenciano, V. P.; Militão, J. S. L. T.; Campos, C. C.; Romofe, P.; Kaplan, M. A. C.; Zambon, M.; Brant, A. J. C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 947.
25. Santos, C. A. M. *Plantas medicinais (Herbarium, flora et scientia)*, 2ed. Cone: São Paulo, **1988**.
26. Maciel, R. L.; Moreira-Campos, L. M.; Silva, B. C.; Brandão, M. G. L. *Rev. Bras. Farmacog.* **2006**, *16*, 1.
27. <http://www.memorias.ioc.fiocruz.br/Nitric%20SyposiumIpostersOIs4.html>. Acesso em **20/01/2008**.
28. Semir, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, SP. **1991**. 305 p.
29. <http://www.biodiversitas.org.br/cepf>. Acesso em **29/12/2008**.

30. Mendonça, M. P.; Luis, L. V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Fundação Biodiversas – Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte: Belo Horizonte, **2000**.
31. <http://www.biobiversitas.org.br/mg-especies-ameacadas-pdf>. Acesso em **21/01/08**.
32. Melo, P.R.B.; Oliveira, J. A.; Pinto, J.E.B.P.; Castro, E. M.; Vieira, A. R.; Evangelista, J. R. *E. Ciência e Agrotecnologia*, Lavras. **2007**, *31*, 1.
33. Correa, M. Pio. Flora do Brasil: Algumas plantas úteis, suas aplicações e distribuição geográfica. *Typografia da estatística*: Rio de Janeiro, **1909**.
34. Silva, S. M. P. Aspectos da fenologia e da reprodução sexuada da arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) Asteraceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, MG. **1994**, 45p.
35. Cronquist, A. An integrated system of classification of flowering plants: *The New York botanical garden*. New York: Columbia University, **1981**.
36. Silveira, D.; Wagner, H.; Chiari, E.; Lombardi, J.A.; Assunção, A.C.; Raslan, D.S. *Rev. bras. farmacogn.* **2005**, *15*, 4.
37. http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0688.pdf. Acesso em **01/06/09**.
38. http://www.floraisdasgeres.com.br/kit_completo.htm. Acesso em **20/01/08**.
39. Júnior, A.C.O.; Faquin, V.; Pinto, J.E.B.P.; Sobrinho, R.R.L.; Bertolucci, S.K.V. *Hortic. Bras.* **2005**, *23*, 3.
40. Alcântara, A.F.C.; Silveira, D.; Chiari, E.; Oliveira, A.B.; Guimarães, J.E.; Raslan, D.S. *Ecl. Quim.* **2005**, *30*, 37.
41. Salituro, G. M.; Dufresne, C. *Natural Products Isolation, Humana Press: Totowa, NJ.* **1998**.

42. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. *Química Nova*. **2009**, *32*, 1.
43. Takahashi, J. A.; Pereira, C. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D.; Silva, L. G. F. E. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 21.
44. (a) <http://br.news.yahoo.com/050218/31/ru6t.html>. Acesso em **18/05/2008**; (b) Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2053.
45. (a) Mahato, S. B., Kundu, A. P. *Phytochemistry*. **1994**, *37*, 6; (b) Olea, R. S. G.; Roque, N. F. *Química Nova*. **1990**, *13*, 4; (c) Breitmaier, E. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry*. New York: Chapman & Hall, **1993**, 265p.; (d) Silva, C.A.M. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Ponteria gardnerieé (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, DF. **2007**, 197p.
46. Sartori, F. T.; Sacilotto, A. C. B. C.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; Vichnewski, W. *Bioch. System. and Ecol.* **2002**, *30*, 6.
47. (a) Laakso, P. W.; *Mass. Inst. Technol, Suomen Kemistilehti B.* **1958**, *31B*, 165-9; (b) Ayres, C.C.; Escórcio, S. P.; Costa, D. A.; Chaves, M. H.; Júnior, G. M. V.; Cavalheiro, A. J. *Química Nova*. **2008**, *31*, 6; (c) Lee, K.L.; Lin, Y.M.; WV, T. S.; Zhang, D.C.; Yamagishi, T.; Hall, I. H.; WU, R. Y. *Planta Medica*. **1988**, *54*.
48. Ravinder, M. A.; Ramachandram, R. *Pharmazie*. **2000**, *55*, 5.
49. (a) Huang, Y. L.; Chen, C. C.; Hsu, H. Y. *Taiwan Yaoxue Zazhi*. **1984**, *36*, 4; (b) Teixeira, E.W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A. *Química Nova*. **2006**, *29*, 2; (c) Sengupta, P.; Khastgir, H. N. *Tetrahedron*. **1963**, *19*.
50. Cano, A.; Bucio, J. L.; Espinoza, M.; Ruiz-Cancino, A. *Rev. Quim. Mex.* **2000**, *44*, 155.

51. Duarte, D. S. Estudo químico Bio-monitorado de *Lychnophora pinaster* Mart (Asteraceae) e de *Macfadyena Unguis-cat* L. A. Gentry (Bignoniaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, MG. **1999**, 177p.
52. Ract, J. N. R.; Gioielli, L.A. *Química Nova*. **2008**, *31*, 8.
53. (a) Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Piló-Veloso, D.; Demuner, A. J.; Howarth, O. *Eclat. Quím.* **1998**, *2*; (b) Paula, V. F. *Estudo Químico e da Interação Inseto-Planta em Ochroma lagopus Swartz*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, MG. **1995**, 134p.
54. Silverstein, R. M.; Webster, F.X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Rio de Janeiro, RJ. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. **2000**, 459p.