Introdução

1.1 Plantas Medicinais e os Fitoterápicos, uma Abordagem Histórica

A história sobre o uso de plantas medicinais se confunde com a história humana e registros antigos têm demonstrado a sabedoria do homem no que tange à utilização destes produtos naturais [1]. Manuscritos, datados de 2600 a.C, encontrados na Mesopotâmia, relatam o uso de grande variedade de substâncias obtidas de plantas para o tratamento de diversas doenças destacando-se os óleos extraídos das espécies de *Cedrus, Comminphora* e de *Papaver.* Outras grandes civilizações deixaram documentos que relatam o uso de diversas plantas medicinais, como o Papiro de Ebers um documento Egípcio (1500 a.C.) e "Matéria Médica" um documento Chinês (1100 a.C) [2].

Ademais, dentro desde contexto histórico, dois personagens gregos se destacam Theophrastus (300 a.C) – com sua "História das Plantas", onde relata as qualidades de ervas medicinais – e Dioscorides (100 d.C) – que registrava devidamente a coleta, o armazenamento e o uso de plantas medicinais durante suas viagens com o exército romano. No início do século XVII houve uma compilação de todos os registros históricos sobre o uso de plantas medicinais, dando origem à publicação da Farmacopeia Londrina, um acervo que se encontra no Reino Unido [2].

Entretanto, os primeiros isolamentos de compostos de origem vegetal, ocorreram entre os séculos 18 e 19. Scheele (1742 – 1786) isolou os ácidos: oxálico, tartárico, cítrico, gálico, entre outros. Sertürner descobriu a morfina (Figura 1) em 1817, e Pelletier e Caventou isolaram estricnina, cafeína e quinina (1818-1821) [3], (Figura 1).

No século XX, durante e após a Segunda Guerra Mundial, ocorreu a era dos antibióticos, produtos naturais obtidos de fungos que apresentam atividade antibacteriana, de espécies dos gêneros tais como: *Penicillium, Cephalosporium* e *Streptomyces*. No pós-guerra, destacam-se também outros produtos de origem de plantas como, por exemplo, a Reserpina (Figura 1), um tranquilizante obtido de espécies do gênero *Rauwolfia*, e Vimblastina e Vincristina (Figura 1), dois quimioterápicos obtidos de espécies do gênero *Catharanthus* [1].

Porém, apenas no final do século XX, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a importância do uso de plantas medicinais pela população mundial, e integrou a medicina tradicional ao seu Programa Internacional de Saúde [4]. Planta medicinal foi definida como sendo qualquer planta que de alguma maneira seja utilizada no tratamento de alguma doença ou sintoma, ou que seja, comprovada cientificamente a sua eficácia, e que sua utilização para fins terapêuticos seja fácil e de baixo custo [5].

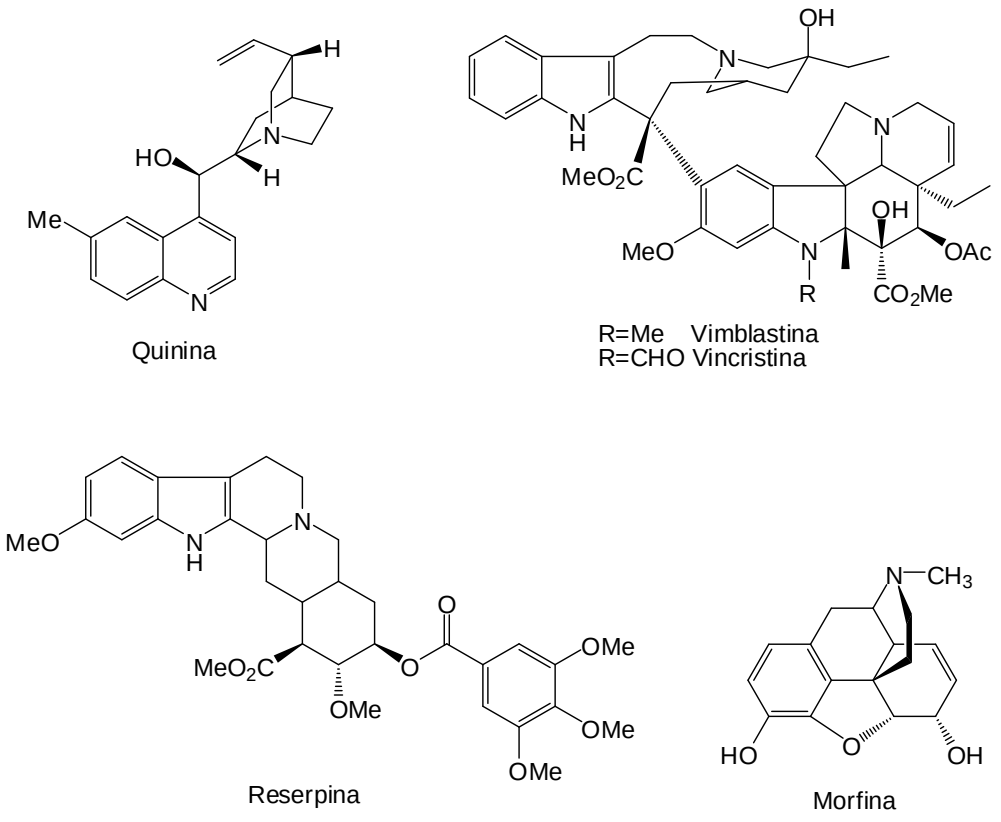


Figura 1 - Alguns compostos bioativos isolados de plantas ou derivados destes.

1.2 Plantas medicinais no Brasil

O uso de Plantas medicinais no tratamento de doenças é cultural no Brasil; esta cultura é passada de geração para geração de forma oral [6], o que torna distinto o uso das plantas medicinais em cada região do país. É comum se encontrar nas cidades brasileiras a comercialização de plantas medicinais em feiras ou mercados municipais, e em muitos casos estas representam o único recurso terapêutico acessível para muitas comunidades [7].

Plantas medicinais são importantes para a investigação farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, não só quando os constituintes das plantas são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matéria prima para a síntese de drogas ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos [8].

Sendo assim, o Brasil torna-se uma referência na busca de plantas medicinais, por ser um dos países que possui a maior biodiversidade vegetativa do mundo, porém a cada ano grande parte desta área vegetativa é desmatada, o que pode levar à extinção de diversas espécies de plantas. O cerrado brasileiro, o segundo maior bioma do país, com área aproximada de dois mil Km^2, enquadra-se nesse contexto, conhecido por sua grande biodiversidade é composto por aproximadamente de 6671 táxons nativos, distribuídos em 170 famílias e 1140 gêneros [9]. O cerrado vem sofrendo desmatamentos nas últimas décadas, estimando-se que cerca de três milhões de hectares deste ecossistema são desmatados por ano, reduzindo a sua porção territorial para 55% do território original [11]. Para tentar assegurar o melhor uso e a não extinção das espécies medicinais da flora brasileira, o governo do país implantou em 2009 o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como grande objetivo buscar a inserção dos medicamentos a base de plantas no Sistema Único de Saúde – SUS, sendo a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária a responsável pela legalização e qualidade dos medicamentos que serão distribuídos gratuitamente à população [12]. Assim, a fitoterapia se constitui uma importante alternativa para o tratamento de doenças em muitos países, principalmente os em desenvolvimento. Encontram-se entre as vantagens desta prática a valorização das tradições populares e a redução na importação de medicamentos, o que gera menos gasto aos cofres públicos [13].

1.3 Família Apocynaceae

Pertencente à ordem Gentiales e à subclasse Asteridae, a família Apocynaceae tem ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, apresentando aproximadamente 410 gêneros e 4.650 espécies [14]. Sua ocorrência no Brasil se estende por todo o território, em diferentes vegetações, apresentando cerca de 850 espécies e 90 gêneros [15].

As espécies da família Apocynaceae apresentam-se como lianas (trepadeiras), arbustos e árvores [14], com grande valor comercial, no aspecto ornamento - devido à beleza e diversidade das espécies- e/ou no interesse medicinal, sendo considerada como uma das mais importantes fontes de constituintes químicos obtidos de fonte vegetal. Muitas espécies desta família são utilizadas na medicina moderna, destacando-se principalmente os gêneros *Allamanda, Alstonia, Aspidosperma, Catharanthus, Hancornia, Himatanthus, Macrosiphonia (Mandevilla), Nerium, Plumeria, Rauwolfia* e *Strophantus* [16].

Substâncias diversas têm sido isoladas dos gêneros dessa família (Figura 2), sendo utilizadas como modelos farmacológicos. Por exemplo, podem-se citar os glicosídeos cardiotônicos de *Strophantus* (estrofantinidina e cimarina), os alcaloides isolados de *Catharanthus* (vimblastina e vincristina), que tem ação antitumoral e alcaloides de *Rauwolfia*, (reserpina, serpentina e serpentinina), utilizados contra casos de hipertensão e arritmia cardíacas [16].

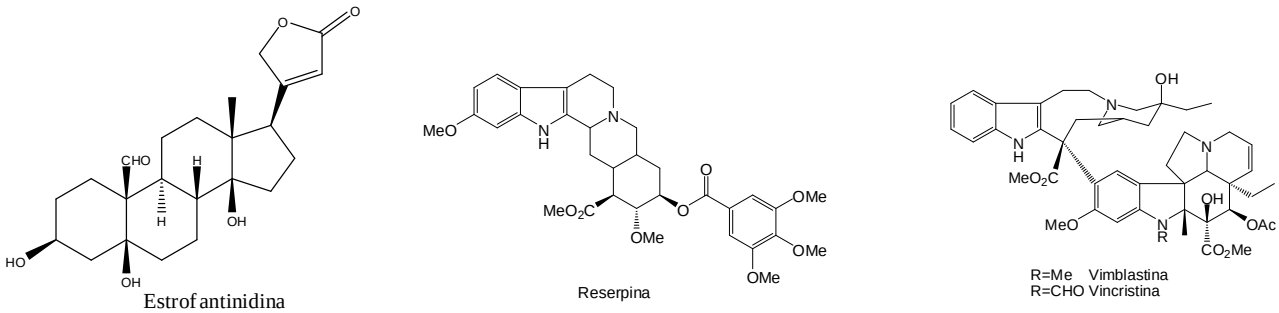


Figura 2 - Estrutura de alguns compostos encontrados em plantas da família Apocynaceae.

Além da grande variedade de alcaloides outros metabolitos secundários têm sido encontrados em espécies dessa família, abrangendo: taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, triterpenos, iridoides, lignanas, pregnanos e os flavonoides, sendo que esta última classe é encontrada com menor frequência [17]. Uma característica desta família é a presença de látex, ou seja, são plantas latescentes [18].

A diversidade química desta família e a existência de espécies cuja composição química ainda é desconhecida, e considerando a importância da família Apocynaceae como fonte de substâncias com atividade farmacológica, tem gerado interesse no estudo químico e avaliação farmacológica de diversas espécies desta família [16,17]. A tabela 1 apresenta algumas espécies pertencentes à família Apocynaceae, e algumas classes de compostos secundários delas obtidos.

Tabela 1. Algumas espécies da família Apocynaceae e classes de constituintes nelas identificadas.

Algumas espécies dos principais gêneros da família Apocynaceae			
Gênero	**Espécie**	**Classes de Metabolitos Secundários Identificados.**	**Referências**
Allamanda			
	A. neriifolia	Iridoides, Lignanas	[19]*;* [20]; [21].
	A. cathertica	Iridoides, lignanas.	[22]
Apocynum			
	A. venetum	Flavonoides, esteroides, Pregnanos.	[23]; [24].
	A. cannabinum	Cardenolideos, pregnanos	[25]
	A. lancifolium	Flavonoides	[26]
Aspidosperma			
	A. parvifolium	Alcoloides, triterpenos, esteróides	[27]
	A. ramiflorum	Alcaloides	[28]
Himatanthus			
	H. articulatus	Esteroides, triterpenos, pregnanos,	[29]
	H. sucuuba	Iridoides; Triterpeno	[30]; [31]; [32];
Nerium			
	N. oleander	Cardenolideos, Triterpenos, Pregnanos	[33]; [34]; [35]; [36]; [37].
Plumeria			
	P. obtusa	Iridoides, Triterpenos	[38]; [39]; [40].
	P. inodora	Triterpenos	[41]
Rauwolfia			
	R. serpentina	Alcaloides	[42]; [43]

1.4 Gênero *Macrosiphonia*

O gênero *Macrosiphonia* é também descrito em publicações com o nome *Mandevilla.* Esta sinonímia se deve ao preceito de monofiletismo (espécies derivadas de uma única espécie ancestral), que fundamentou a proposição de *Macrosiphonia* como sinônimo de *Mandevilla* [44]. Por exemplo, grande parte da literatura sobre *Mandevilla velame* está associada à nomenclatura de *Macrosiphonia velame* [9].

Mandevilla Lindl. é o maior gênero neotropical da família Apocynaceae com cerca de 120 espécies distribuídas do México até a Argentina [45]. No Brasil encontram-se cinco espécies, distribuídas no Sudeste e Centro-Oeste [46]. Seus representantes destacam-se pelo potencial paisagístico (sendo espécies de pequeno porte, arbustos ou subarbustos, com inflorescência branca) e medicinal, utilizando-se principalmente o extrato das raízes tuberosas e o látex que apresentam atividade contra venenos de cobra, e atividade anti-inflamatória [47].

Podem-se destacar três espécies desse gênero, sendo duas utilizadas na medicina popular contra mordidas de cobras e como anti-inflamatório: são elas a *Macrosiphonia velutina* e *Macrosiphonia illustris* [48] e, a terceira, *Macrosiphonia velame,*que é utilizada como anti-inflamatória, antinociceptiva (nocicepção – função que detecta estímulos lesivos, antinociceptivo – seria algo que bloqueia esta função), antissifilítica e antirreumática na medicina popular [49]. Um estudo qualitativo registrou a presença em extratos de *M. velutina* e *M. illustris* de esteroides glicosilados (do tipo pregnano), Velutinol A (da *M. velutina*) e Illustrol (da *M. illustris*), que tem ação anti-inflamatória, e seus extratos, aquoso e etanólico apresentaram atividade contra veneno da serpente jararaca [50]. Pesquisas sobre a espécie *M. velame* relatou por análise qualitativa a presença de substâncias como alcaloides, flavonoides e taninos bem como a ausência de cumarinas [51].

1.5 *Macrosiphonia petraea*

Macrosiphonia petraea (Figura 3), pertencente à família Apocynaceae, é nativa do cerrado, subarbustiva, com 10 a 20 cm de comprimento, com inflorescência uniflora na cor branca, folhas com 1,5 a 3 cm de comprimento e 1 a 2 mm de largura. Ela ocorre nas regiões Sudeste e Centro – Oeste do Brasil, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo conhecida no Brasil pelo nome popular de Velame [46]. No Estado de Mato Grosso do Sul, mateiros/raizeiros indicam a ingestão do chá da raiz da *M. petraea* para o combate de inflamações.



Figura 3 - *Macrophisonia petraea* (Apocynaceae)

1.6 Estudo Fitoquímico

O estudo fitoquímico consiste na investigação dos constituintes químicos (metabólitos secundários) das plantas, por meio do emprego de técnicas de separação e identificação de compostos. O estudo dos constituintes de plantas e uma maneira de se atribuir uma quimiotaxonomia, que consiste em determinar a qual classe as plantas pertencem com base nas substâncias específicas que nelas são encontradas. No que concerne às plantas medicinais, o estudo fitoquímico, com o auxílio de outras pesquisas, pode determinar quais compostos destas plantas podem apresentar atividades biológicas, podendo assim, essas substâncias se tornarem agentes clínicos ou servirem como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos ou semissintéticos [6].

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estudar quimicamente as raízes de *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae).

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar ou elucidar as estruturas dos metabólitos secundários acumulados nas raízes da *M.* petraea;

- Encaminhar extratos e compostos obtidos para testes de genotoxicidade e antigenotoxicidade.

3. Materiais e Métodos

O estudo fitoquímico das raízes da *Macrosiphonia petraea* foi realizado utilizando-se de técnicas cromatográficas para o isolamento dos compostos, e técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (^{1}H) e Carbono (^{13}C) – Uni e Bidimensionais e, Infravermelho (IV) e espectrometria de Massas (baixa e alta resolução) para a caracterização dos compostos.

As técnicas cromatográficas foram cromatografia em coluna por adsorção e/ou exclusão e cromatografia em camada delgada (CCD).

Para a cromatografia em colunas por adsorção foram utilizadas colunas de diferentes tamanhos e alturas de acordo com o perfil cromatográfico em CCDA, (Cromatografia em camada delgada analítica) sendo utilizados dois tipos de fases estacionárias: sílica gel 0,060-0,200 mm com diâmetro de poro de 6,0 nm e sílica gel “Flash” 200-400 mesh (0,035-0,070 mm com diâmetro do poro de 6,0 nm).

Para a cromatografia em coluna por exclusão de tamanho foi utilizada como fase estacionária Sephadex LH-20® com diâmetro de partícula de 25 a 100 μm.

Para as análises em CCDA foram utilizados como fase estacionária sílica gel 60 GF_{254} e sílica gel 60 F_{254} (200μm) em folhas de alumínio de 20 cm X 20 cm da Merck®

Como reveladores foram utilizados, Sulfato de cério [$Ce(SO_4)_2$] – solução a 2% em H_2SO_4, vanilina – 10% m/v em $H_2O/CH_3OH/H_2SO_4$ 45:45:10 v/v/v - usando para ambos, aquecimento para a visualização das manchas - e luz ultravioleta – monitor UV de mão, Modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpada Blackray de 254 e 366 nm, em câmara escura.

Para as técnicas de identificação/caracterização foram utilizados os espectrômetros:

- de RMN – Bruker, modelo DPX-300 a 300/75 MHz, com magneto de 7,05 Tesla e sonda de detecção dual (^1H:300,13 MHz e ^{13}C: 75,468 MHz) para tubos de amostras de 5 mm de diâmetro com sistema de "Lock" de deutério (^2H) e, utilizando como referência interna os sinais de ^1H e ^{13}C do tetrametilsilano e/ou dos solventes deuterados (TMS) clorofórmio ($CDCl_3$) e Metanol (CD_3OD), da marca CIL® (Cambridge Isotope Laboratories, Inc);

- de Massas de baixa resolução obtidos no equipamento SHIMADZU QP-2010 PLUS com coluna Rtx® (crossbond – 5% difenil/ 95% dimetilpolisiloxano) de 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 μm. E massas de alta resolução HRESIMS – micrOTOF-QII, Bruker Compass (os espectros de massas de alta resolução foram obtidos na Universidade de São Paulo, USP-Ribeirão Preto).

- Rotação óptica – foram realizadas em polarímetro digital Perkin-Elmer 341 EM.

3.1 Identificação da planta

A planta em estudo, *Macrosiphonia petraea,* foi coletada no município de Bonito – MS em agosto de 2010 e para a sua identificação foi produzida uma exsicata que foi analisada e identificada pelo Prof. Dr. Arnildo Pott e anexada no herbário da CGMS, da UFMS sob o numero WG 272.

3.2 Preparo do extrato bruto

As raízes, parte da planta de interesse neste estudo, foram trituradas por ação mecânica utilizando um moinho elétrico de quatro facas, e armazenadas em recipiente âmbar à temperatura ambiente, sendo submetidas a extrações sucessivas, com álcool etílico em excesso, realizando filtrações para a separação dos compostos. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida, e posteriormente feita eliminação do solvente orgânico à temperatura ambiente até a secagem do material, originando assim o extrato bruto.

3.3 Fracionamento do Extrato Bruto

O extrato bruto seco foi tratado com solução hidroalcoólica (MeOH:H_2O, 1:1), resultando na solubilização parcial, observando-se a separação de um material, insolúvel neste sistema de solvente, que foi descartado por ter características de material graxo apresentadas no espectro de RMN de ^1H. O material solubilizado foi submetido a partições líquido-líquido utilizando-se inicialmente hexano e, posteriormente, acetato de etila, dando origem a três fases, hexânica, acetato de etila e hidrometanólica. Após a eliminação dos solventes, obtiveram-se os respectivos resíduos, os quais foram armazenados sob temperaturas baixas em refrigeradores (Figura 4).

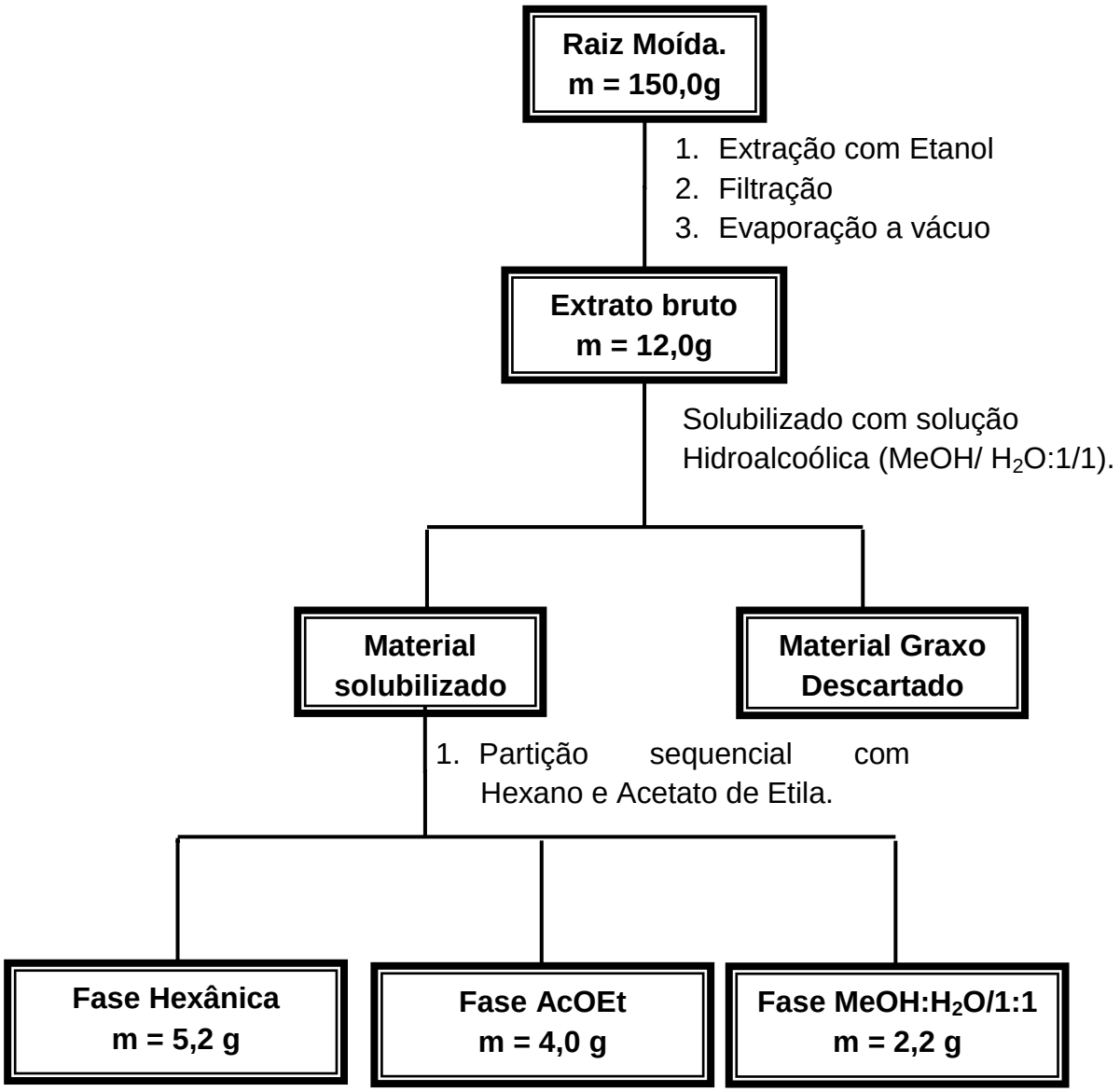


Figura 4 - Fracionamento do extrato bruto para a obtenção das fases a serem estudadas.

3.4 Fracionamento Cromatográfico da Fase Acetato de Etila

A fase em Acetato de etila (AcOEt) foi submetida a extração com $CHCl_3$ (esse procedimento foi adotado devido à não solubilização deste extrato em acetato de etila) e o resíduo obtido dessa extração foi cromatografado em coluna aberta com diâmetro e altura de 3,0 cm e 30,0 cm respectivamente, empregando sílica gel (0,060-0,200 mm) e, como sistema de eluente, $CHCl_3$ e MeOH, puros e em misturas de gradiente de polaridade crescente. A porção insolúvel em $CHCl_3$ foi armazenada em refrigerador para ser estudado posteriormente. O resíduo obtido da extração com $CHCl_3$ foi fracionamento, sendo obtidas 17 frações (150 mL, cada) que foram reunidas em 09 frações, de acordo com o perfil cromatográfico observado em CCDA, as quais foram nomeadas MPA1 a MPA9. Dessas frações, 4 apresentaram serem mais interessantes devido aos perfis cromatográficos e espectroscópicos de RMN ^{1}H e de ^{13}C, sendo elas as frações MPA2, MPA3, MPA5 e MPA8 (Figura 5).

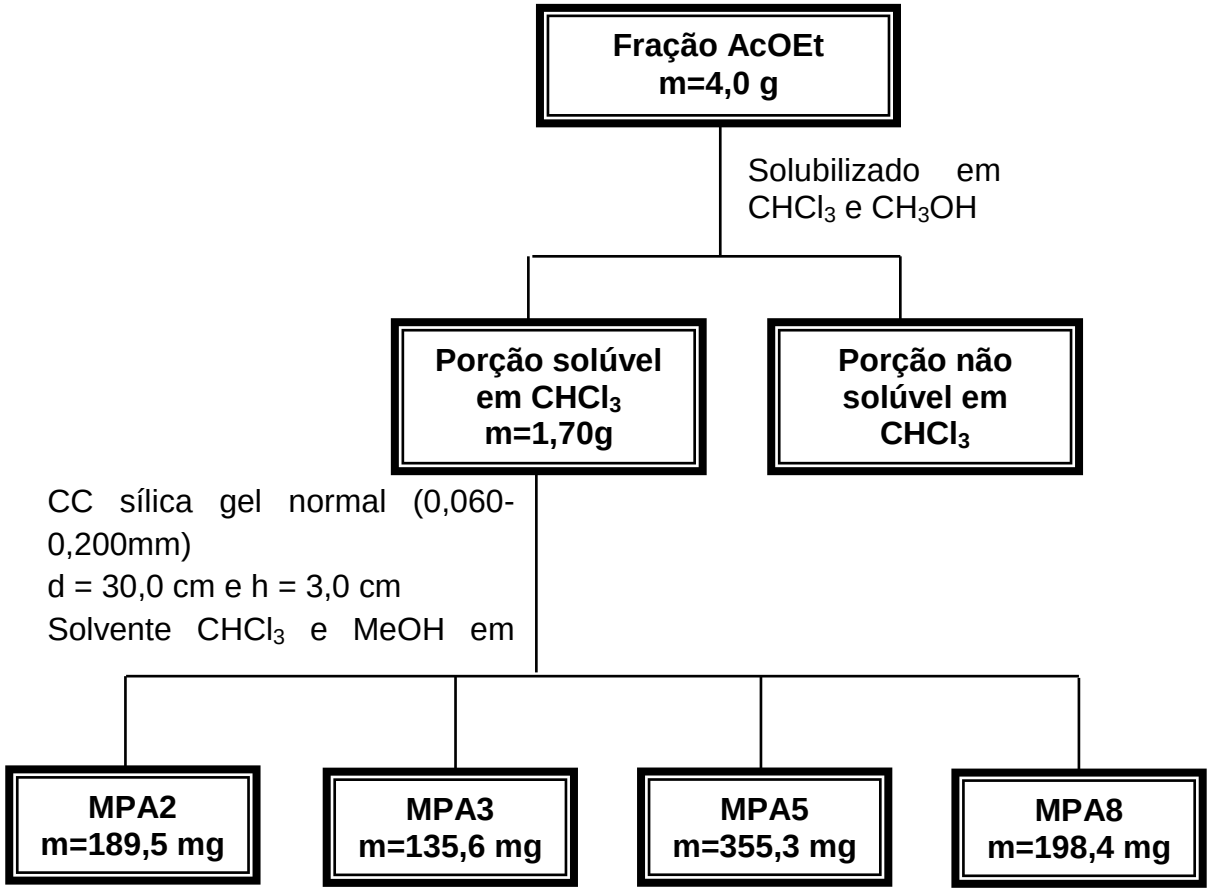


Figura 5 - Fluxograma do fracionamento do material obtido da extração com $CHCl_3$ da fração acetato de etila.

3.4.1 Fracionamento da fração MPA2

Na fração MPA2 foram observados conjuntos de sinais nos espectros de RMN ^{1}H e de ^{13}C referentes a uma mistura de compostos triterpênicos, mostrados na Figura 36 (página 65), onde pode-se identificar o acetato de lupeol (**9**), acetato de α-amirina (**10**) e acetato de β-amirina (**11**) (Figura 6). Embora fosse possível identificar os compostos **9**, **10** e **11** da fração MPA2 pelos valores de deslocamento químicos e intensidades dos sinais no espectro de RMN ^{13}C, a fração MPA2 foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta utilizando de sílica 0,035-0,070 mm/ 6,0 μm de diâmetro de poro, com 2,5 cm e 30,0 cm de diâmetro e altura, respectivamente, utilizando como sistema de eluente $CHCl_3$ e MeOH, com gradiente de polaridade crescente a partir de $CHCl_3$ 100% até $CHCl_3$/MeOH:95/05. Obteve-se 09 frações, sendo que a fração MPA28 foi selecionada devido ao seu perfil cromatográfico em CCDA e espectroscópico (RMN ^{1}H e ^{13}C). Essa fração foi, então submetida a fracionamento em coluna cromatográfica em sílica gel 0,035-0,070 mm/ 6,0 μm de diâmetro de poro, com altura 25,0cm e diâmetro de 1,5 cm, utilizando como sistema de solvente $CHCl_3$/MeOH:95/05, sendo obtidas 05 frações das quais 2 foram selecionadas: fração MPA283 onde foi identificado o composto neridienona A (**1**) e a fração MPA284 onde foi identificada o composto cybisterol (**2**) (Figura 6).

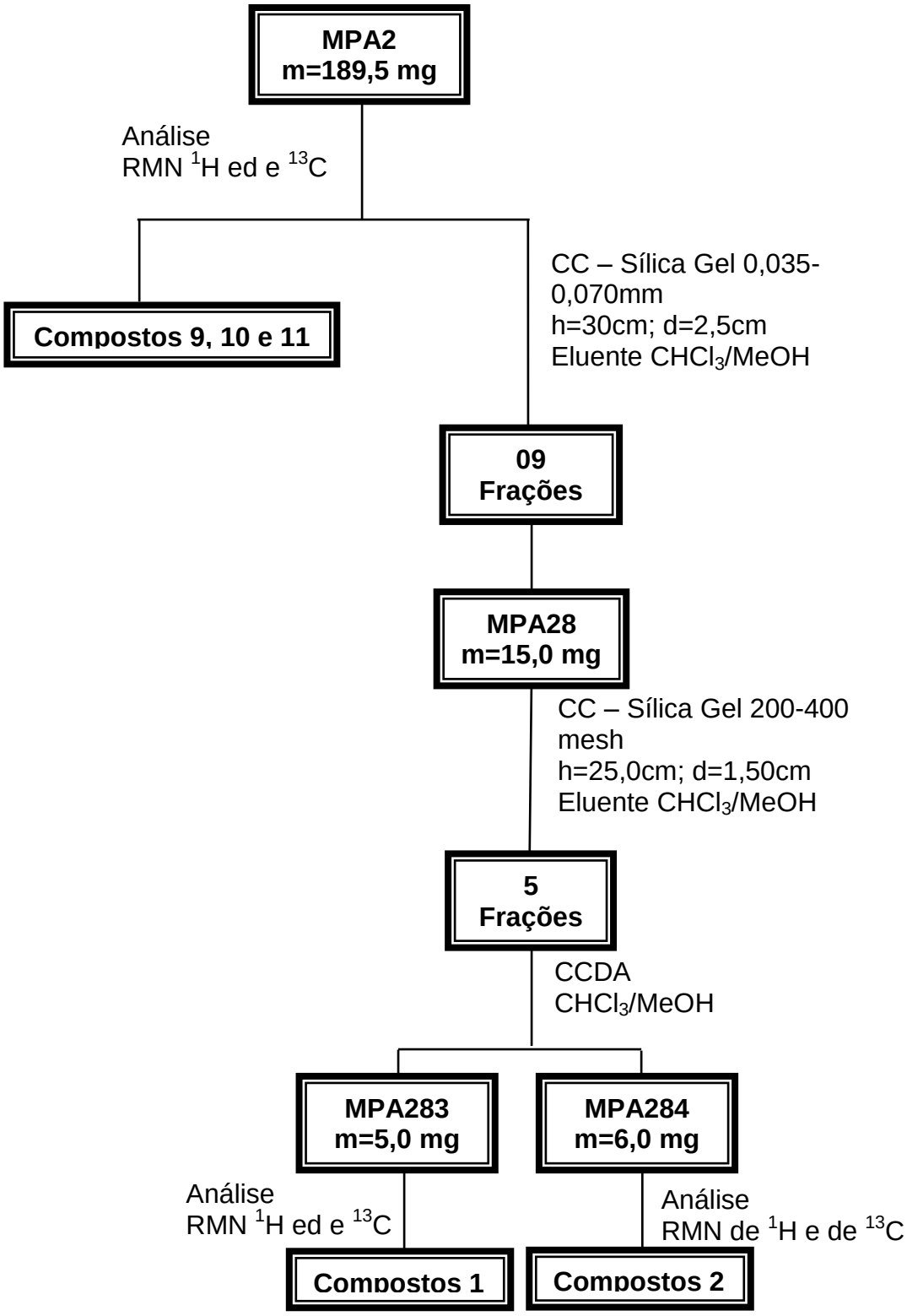


Figura 6 - Fracionamento da fração MPA2

3.4.2 Fracionamento da fração MPA3

A fração MPA3 foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta com Sephadex® – LH 20, com altura de 30,0 cm e diâmetro de 3,0 cm, utilizando como eluente $CHCl_3$ – 100%. Foram obtidas 5 frações, dessas frações foi selecionada a fração MPA32 devido ao perfil cromatográfico em CCDA e dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C. Esta fração foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta com Sephadex® LH – 20, com diâmetro de 1,0 cm e altura de 10,0 cm, usando como eluente $CHCl_3$, obteve-se 05 frações, sendo que na fração MPA322 foi possível identificar o composto pinoresinol (**4**) (Figura 7).

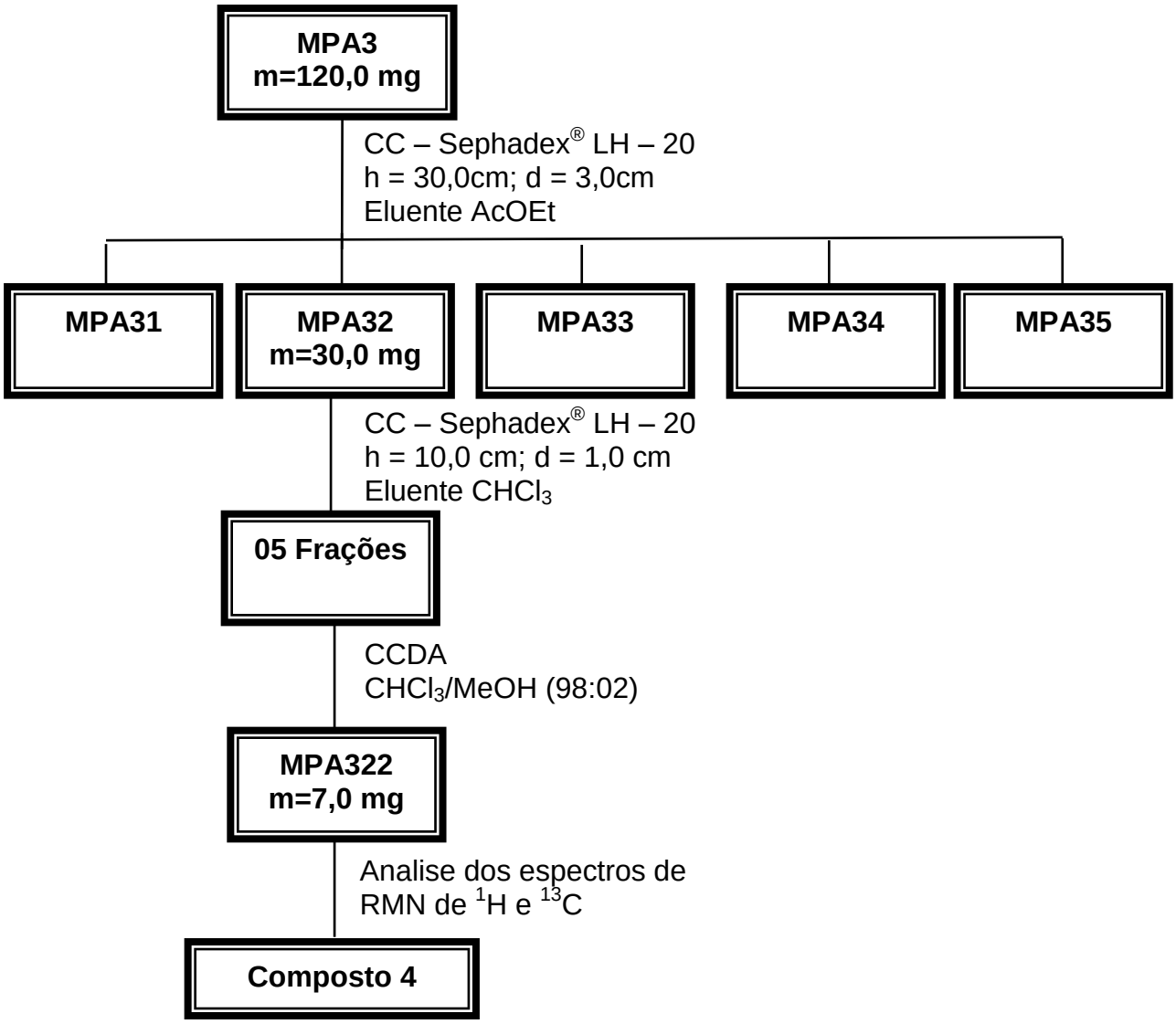


Figura 7 - Fracionamento da fração MPA3.

3.4.3 Fracionamento da fração MPA5

A fração MPA5 foi fracionada utilizando coluna cromatográfica aberta com Sephadex® LH-20 com diâmetro de 3,0 cm e altura de 20,0 cm, utilizando como eluente $CHCl_3$ – 100%, foram obtidas 7 frações, dentre estas, duas frações mostraram-se mais promissoras sendo elas MPA55 da qual obteve-se o composto 8α-hidroxipinoresinol (**5**) e a na fração MPA57 identificou-se o composto ácido 5-hidroxi-octadeca-6(E),8(Z)-dienoico (**3**) (Figura 8).

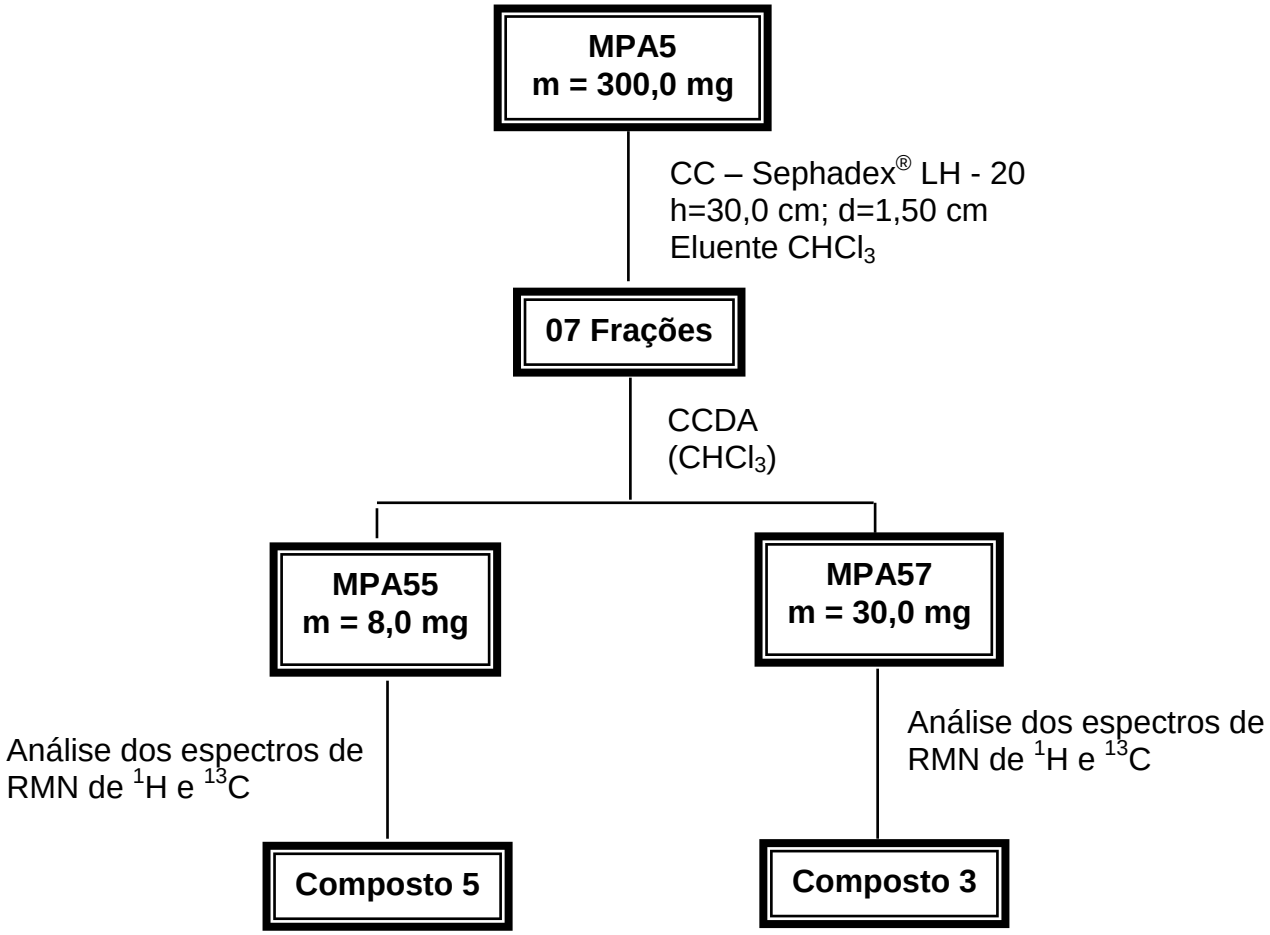


Figura 8 - Fracionamento da fração MPA5

3.4.4 Fracionamento da fração MPA8

Ao solubilizar a fração MPA8 em $CHCl_3$ foi identificada formação de um precipitado que foi separado do sobrenadante e analisado por RMN de ^{1}H e de ^{13}C. A análise dos espectros obtidos mostrou que se tratava de uma mistura de dois compostos que puderam ser identificados como sendo os compostos, ácido arjunólico (**14**) e ácido asiático (**15**) (Figura 9).

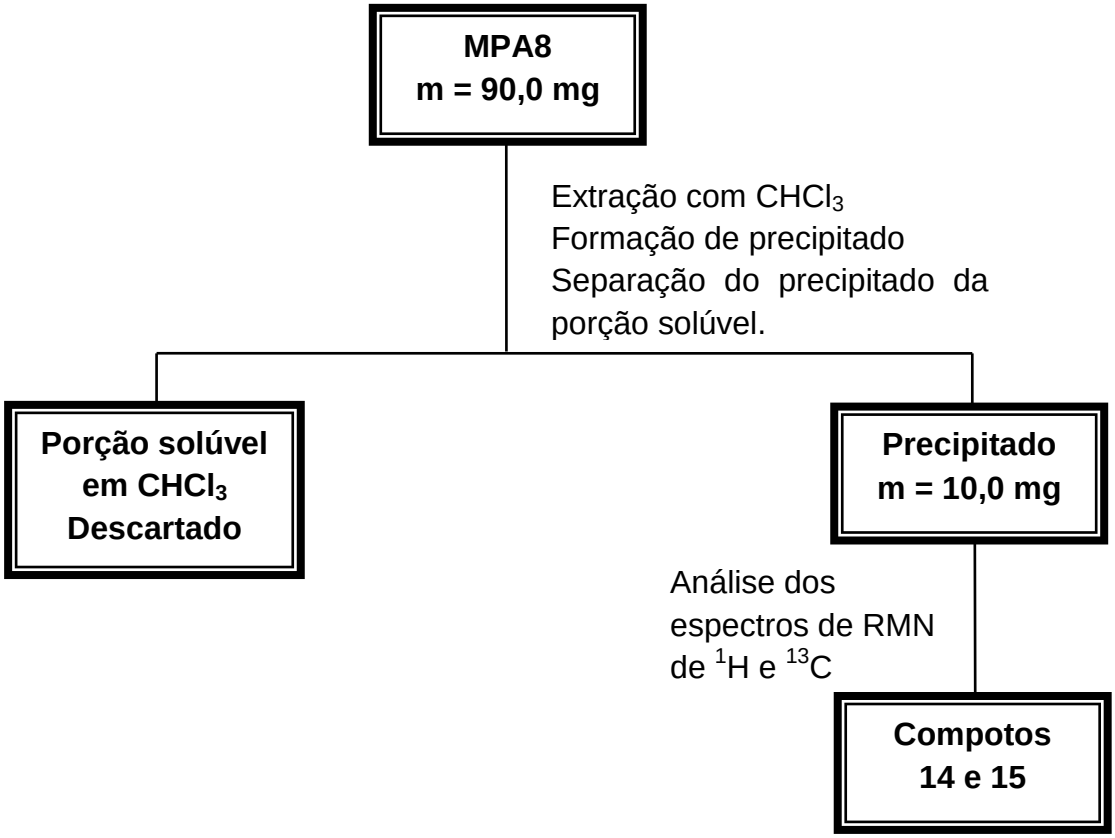


Figura 9 - Separação do precipitado formado na fração MPA8

3.5 Fracionamento Cromatográfico da Fase Hexânica

A fase hexânica foi submetida ao fracionamento cromatográfico utilizando coluna cromatográfica aberta com diâmetro e altura de 5,0 cm e 20,0 cm respectivamente, empregando sílica gel 0,060-0,200 mm/ 6,0μm de diâmetro de poro, utilizando-se como eluente os solventes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (partindo de 100% hexano seguido de Hex:AcOEt/9:1; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; até 100% de AcOEt). Deste processo foram obtidas 22 frações (200 mL, cada), as quais, após análise em cromatografia planar, foram agrupadas em 12 frações, nomeadas de MPH1 a MPH12 (Figura 10). Das 12 frações obtidas, as frações MPH5, MPH6, foram selecionadas para ser estudada, devido ao seu perfil cromatográfico em CCDA e análise parcial dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C.

3.5.1 Fracionamento da fração MPH5

A fração MPH5 foi submetida a uma coluna cromatográfica aberta utilizando Sephadex® LH-20 - com diâmetro de 2,0 cm e altura de 20,0 cm, usando-se como eluente $CHCl_3$. Obteve-se 13 frações, dentre essas a fração MPH511 das quais apresentou-se como uma mistura de três compostos que puderam ser identificados como os compostos lupeol (**6**), α-amirina (**7**) e β-amirina (**8**); (Figura 10).

3.5.2 Fracionamento da Fração MPH6

A fração MPA6 foi cromatografada utilizando coluna aberta, com diâmetro de 3,0 cm e altura de 20,0 cm, empregando sílica gel 0,035-0,070 mm/ 6,0 μm de diâmetro, foi utilizado como sistema de eluente $CHCl_3$:AcOEt 9:1. Foram obtidas 09 frações, que foram nomeadas de MPH61 a MPH69, das quais 2 mostraram ser mais promissoras devido ao seu perfil cromatográfico em CCDA e foram selecionadas para serem estudadas. A fração MPH63 foi analisada e observou-se uma mistura de dois compostos que foram identificados, e como o β-sitosterol (**16**) e estigmasterol (**17**). Para a fração MPH68 foi realizado o fracionamento em coluna cromatográfica aberta utilizando-se Sephadex® LH – 20 (h=10 cm e d=1 cm) e eluente $CHCl_3$; foram obtidas três frações, e na fração MPH682 identificou-se uma mistura de dois compostos: acetato do ácido oleanólico (**12**) e acetato da ácido ursólico (**13**) (Figura 10).

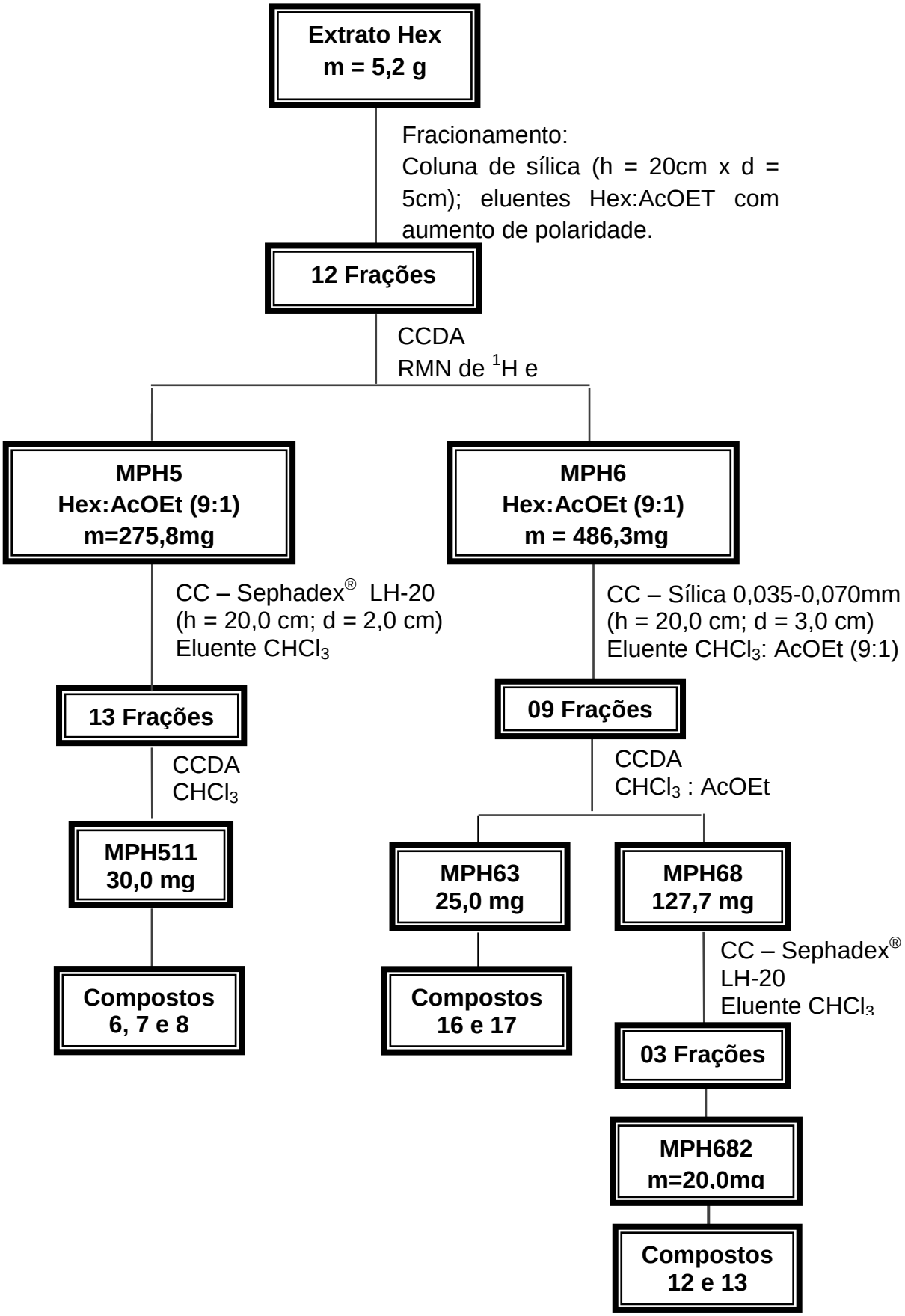


Figura 10 - Fracionamento cromatográfico realizado com as frações obtidas da fase hexânica.

3.6 Teste de Biológico

Diante da utilização da *Macrosiphonia petraea* para o tratamento de inflamações pela ingestão do chá de suas raízes, bem como a falta de informações sobre o potencial mutagênico dessa planta, a avaliação da atividade genotóxica da *M. petraea* é de suma importância para averiguar se há agentes genotóxicos em sua composição química, que possam acarretar alterações nocivas aos indivíduos que a utilizam.

3.6.1 Investigação da Atividade Genotóxica

O teste de genotoxicidade (SMART- *Somatic Mutation And Recombination Test*) foi realizado pela professora Dra. Zaira da Rosa Guterres da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, unidade de Mundo Novo, este teste, que foi desenvolvido por Graf *et al*. (1998) consiste na contagem de mutações em células das asas *Drosophila melanogaster*. O teste SMART tem como vantagem a alta reprodutividade, resultados inequívocos e confiáveis, além do curto período de tempo para a sua realização devido ao curto período geração da *D. melanogaster* [52].

Para a realização do teste foram utilizados dois cruzamentos de *D. melanogaster,* com o objetivo de identificar a possibilidade de bioativação do composto, são eles: [1] cruzamento padrão - ST (fêmeas *flr*^{3} x machos *mwh*); [2] cruzamento de alta bioativação - HB (fêmeas ORR/*flr*^{3} x machos *mwh*), a principal diferença entre estes cruzamentos e a presença de alta atividade das enzimas citocromo P-450, presente no cruzameto HB, que são responsáveis pela ativação e metabolização de promutágenos e procarcinógenos. Este estudo, diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico [1,25 mg/mL; 2,5 mg/mL e 5 mg/mL] obtidos da raiz de *M. petraea*, foram utilizados para tratar as larvas de *D. melanogaster* de terceiro estádio de desenvolvimento obtidas dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB). Como controle negativo utilizou-se o solvente (1% *Tween*-80, 3% de etanol e água) e como controle positivo cloridrato de doxorrubicina – DXR (0,125 mg/mL).

4. Resultados e Discussão

As substâncias obtidas tiveram suas estruturas determinadas principalmente por métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais de ^{1}H e de ^{13}C, e com o auxílio de métodos espectrométricos de Massas (de alta e de baixa resolução).

4.1 Esteroides com esqueleto do tipo pregnanos

4.1.1 Identificação do composto 12β-hidroxipregna-4,6,16-trieno-3,20-diona (neridienona A) (1)

Para substância **1** foram observados no espectro de RMN de ^{1}H (300MHz - $CDCl_3$) [Figura 14] sinais referentes a hidrogênios olefínicos em δ 6,98 (1H, *dd*, *J* = 3,5 e 1,9 Hz, H-16), δ 6,16 (1H, *dd*, *J* = 9,8 e 2,4 Hz, H-7), δ 6,09 (1H, *dl*, *J* = 9,9 Hz, H-6) e δ 5,68 (1H, *s*, H-4) e sinal de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, em δ 3,70 (1 H, *dd*, *J* = 10,1 e 5,2 Hz, H-12). Foram observados três sinais referentes a hidrogênios de metilas em δ 0,94 (3H, *s*, H-18) e δ 1,12 (3H, *s*, H-19) e em δ 2,38 (3H, *s*, H-21), sendo este último sinal de hidrogênio de metila alfa à carbonila. No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) [Figura 15] foram listados 21 sinais, sendo observados 6 sinais na região dos carbono olefínicos, dos quais os que aparecem a δ 124,3; 129,1; 138,7 e 149,0, foram definidos por experimento DEPT 135º como carbonos do tipo CH, enquanto outros dois sinais (δ 155,2 e 162,8) não possuem hidrogênios ligados. Um sinal em δ_C 73,7, evidenciou a presença de um carbono hidroximetínico, enquanto sinais em δ_C 11,7, 16,2 e 26,7 são correspondentes a carbonos metílicos. O espectro de Massas de alta resolução com ionização por elétron “spray” em modo positivo (Figura 16) apresentou íon pseudomolecular a *m/z* 327,1949 $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{26}O_3$ ($C_{21}H_{27}O_3$ - calculado = 327,1953).

Com o auxílio das técnicas de RMN bidimensionais, devido às observações das correlações no experimento HSQC (observação H-C J^1) e HMBC (observando H-C J^2 e J^3), foi possível propor a estrutura que corresponde ao composto **1**. O experimento HSQC mostrou as correlações que permitiram realizar as atribuições

dispostas na Tabela 2. Através das correlações observadas no experimento HMBC foi possível sugerir as posições das metilas, carbonilas e insaturações presentes na estrutura do composto **1**. Destaca-se a seguir algumas correlações relevantes para a definição dos anéis do esqueleto carbônico (Figura 11):

- entre os hidrogênios da metila correspondente a δ_H 0,93 (ligada ao carbono a δ_C 11,7/C-18) e os carbonos a δ_C 52,8 (C/C13), 51,4 (CH/C-14), 73,7 (CH-OH/C-12), 155,2 (C=/C-17);

- entre o hidrogênio a δ_H 1,59 (ligado ao carbono a δ_C 51,4/C-14) e os carbonos a δ_C 31,7 (CH_2/C-15), 34,8 (CH/C-8), 49,0 (CH/C-9), 52,8 (C/C-13) e 73,7 (CH-OH/C-12);

- entre o hidrogênio a δ_H 1,33 (ligado ao carbono a δ_C 49,0/C-9) e o carbono a δ_C 34,8 (CH/C-8);

- entre o hidrogênio a δ_H 3,70 (ligado ao carbono a δ_C 73,7 C-12) e o carbono a δ_C 11,7 (CH_3/C-18).

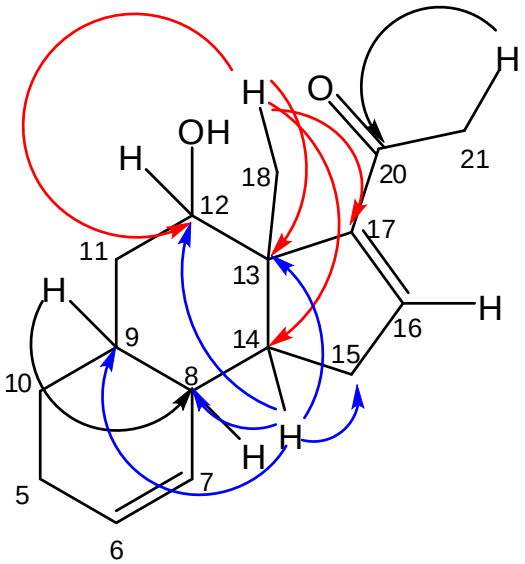


Figura 11 - Correlações observadas no experimento HMBC.

Outras correlações levaram à proposição da estrutura dos anéis A e B, bem como a junção dos anéis B e C (Figura 12):

- entre o hidrogênio a δ_H 1,12 (ligado ao carbono a δ_C 16,2/C-19) e os carbonos a δ_C 36,1 (C/C-10), 33,6 (CH_2/C-1), 49,0 (CH/C-9) e 162,8 (C/C-5);

- entre o hidrogênio a δ_H 5,70 (ligado ao carbono a δ_C 124,3/C-4) e os carbono a δ_C 129,1 (CH/C-6), 36,1 (C/C-10) e 33,9 (CH_2/C-2);

- entre o hidrogênio a δ_H 6,16 (ligado ao carbono a δ_C 129,1 (CH/C-6) e 6,14 (ligado ao carbono a δ_C 138,7 (CH/C-7) e os carbonos a δ_C 34,8 (CH/C-8) e 49,0 (CH/C-9), respectivamente.

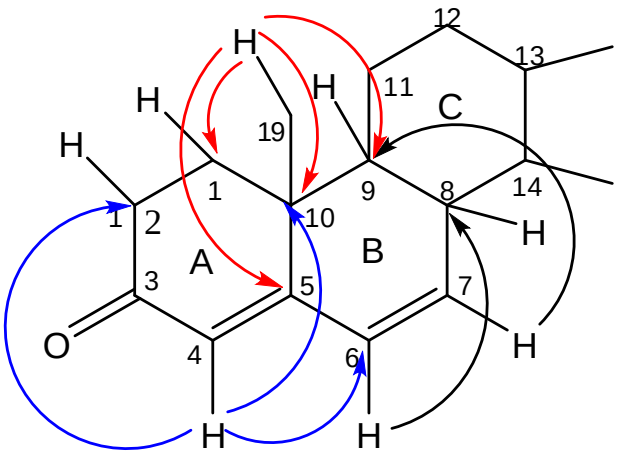
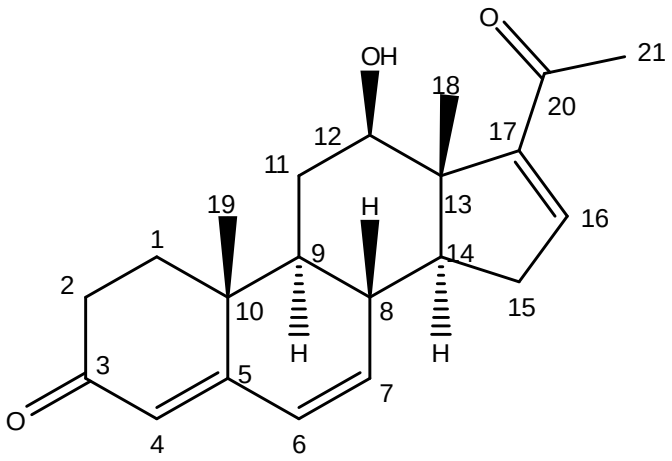


Figura 12 - Principais correlações observadas no experimento HBMC.

Após a proposição da estrutura de **1** pôde-se observar que esta corresponde à de um composto conhecido como neridienona A, que tem como denominação 12β-hidroxipregna-4,6,16-trieno-3,20-diona. A comparação dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Tabela 2) do composto **1** com os dados encontrados na literatura [53] para a neridienona A mostraram boa correlação, confirmando a estrutura proposta.

Este pregnano foi isolado pela primeira vez de raízes de *Nerium oleander*, em 1976 [54], e posteriormente de *Apocynum venetum* var. *basikurumon*, em 1987 [24]

e, novamente de *Nerium oleander* em 1999 [55] e 2007 [36]. Esta substância apresenta atividade anti-inflamatória e é citotóxica para células humanas, sendo, portanto uma candidata à responsável pela atividade genotóxica mencionada para o extrato etanólico de *M. petraea*.



Neridienona A (**1**)

Figura 13 - Estrutura do composto **1 (**neridienona A).

Tabela 2 - Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **1** (neridienona A) em comparação com os dados da literatura [36]; as atribuições são baseadas nas correlações observadas no experimento HSQC.

C/H	δ^1H	$\delta^{13}C$	
		Composto **1**	Neridienona A
1a **1b**	1,72 (1H, *td*, *J* = 13,5 e 5,2 Hz) 2,01 (1H, *ddd*, *J* = 13,5, 5,2 e 2,4 Hz)	33,6	33,6
2	2,5 (2H, *m*)	33,9	33,9
3	-	199,5	199,4
4	5,7 (1H, *sl*)	124,3	124,3
5	-	162,7	162,7
6	6,16 (1H, *dl*, *J* = 9,8 Hz)	129,1	129,1
7	6,14 (1H, *dd*, *J* = 9,8 e 2,4 Hz)	138,7	138,6
8	2,34 (1H, *td*, *J* = 10,6 e 2,5 Hz)	34,8	34,8
9	1,33 (1H, *dt*, *J* = 10,6 e 3,5 Hz)	49,0	49,0
10	-	36,1	36,1
11	1,92 (2H, *m*)	28,6	28,6
12	3,70 (1H, *dd*, *J* = 11,5 e 5,3 Hz)	73,7	73,2
13	-	52,8	52,8
14	1,59 (1H, *m*)	51,4	51,6
15a **15b**	2,39 (1H, *m*) 2,58 (1H, *ddd*, *J* = 17,0, 7,0 e 3,5 Hz)	31,7	31,7
16	6,99 (1H, *tl*, *J* = 3,5 e 1,9 Hz)	149,0	149,0
17	-	155,2	155,2
18	0,93 (3H, *s*)	11,7	11,5
19	1,12 (3H, *s*)	16,1	16,2
20	-	198,9	198,9
21	2,38 (3H, *s*)	26,8	26,8

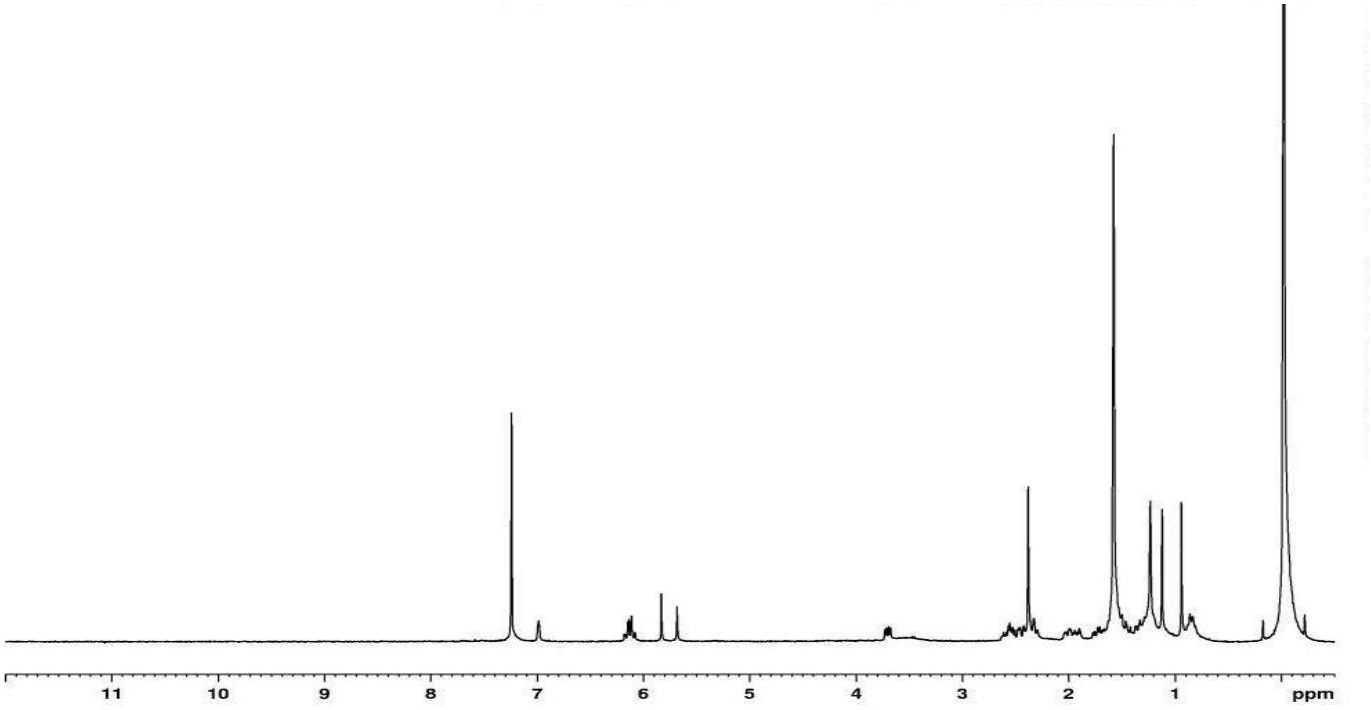


Figura 14 - Espectro de RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) para o composto **1**.

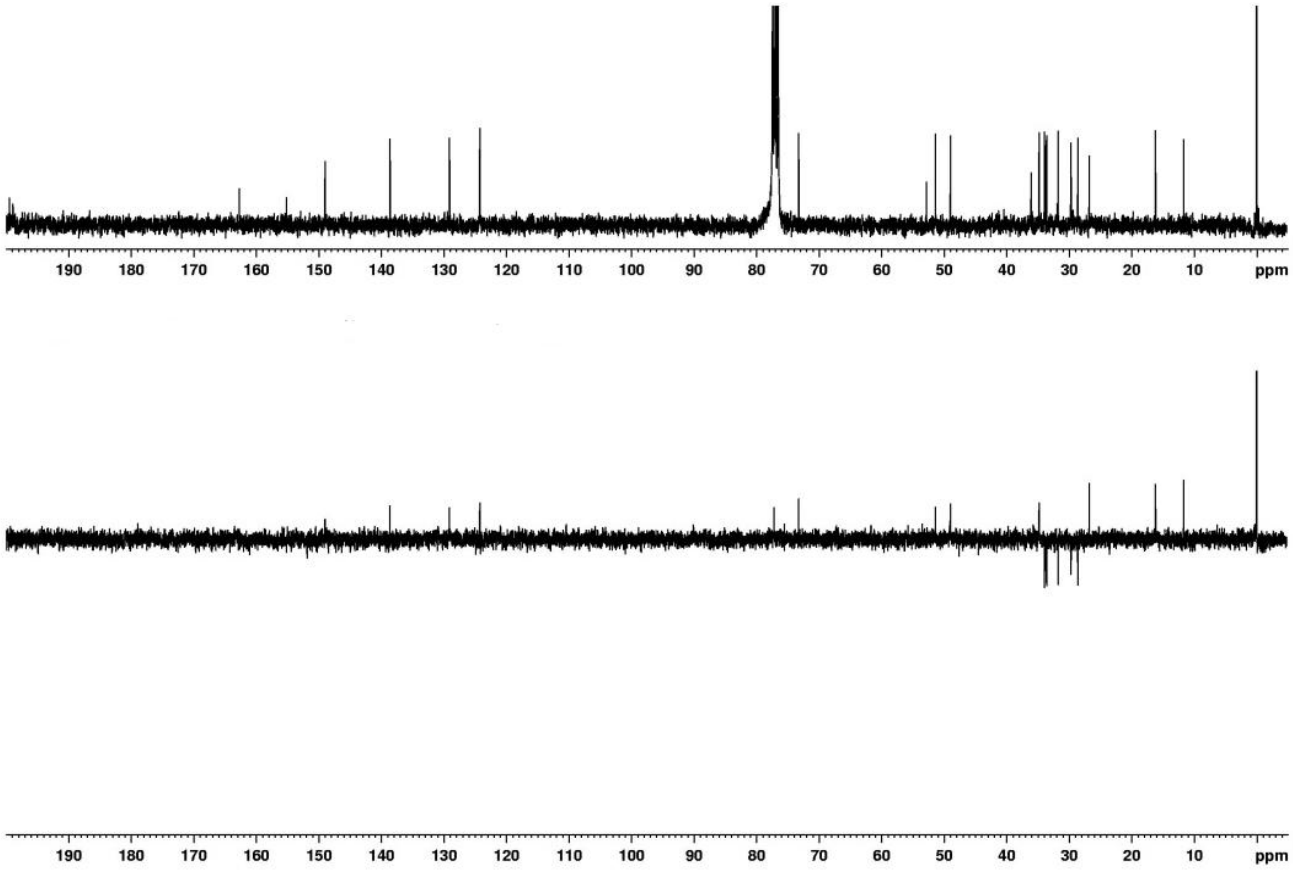


Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C (75MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º para o composto **1**.

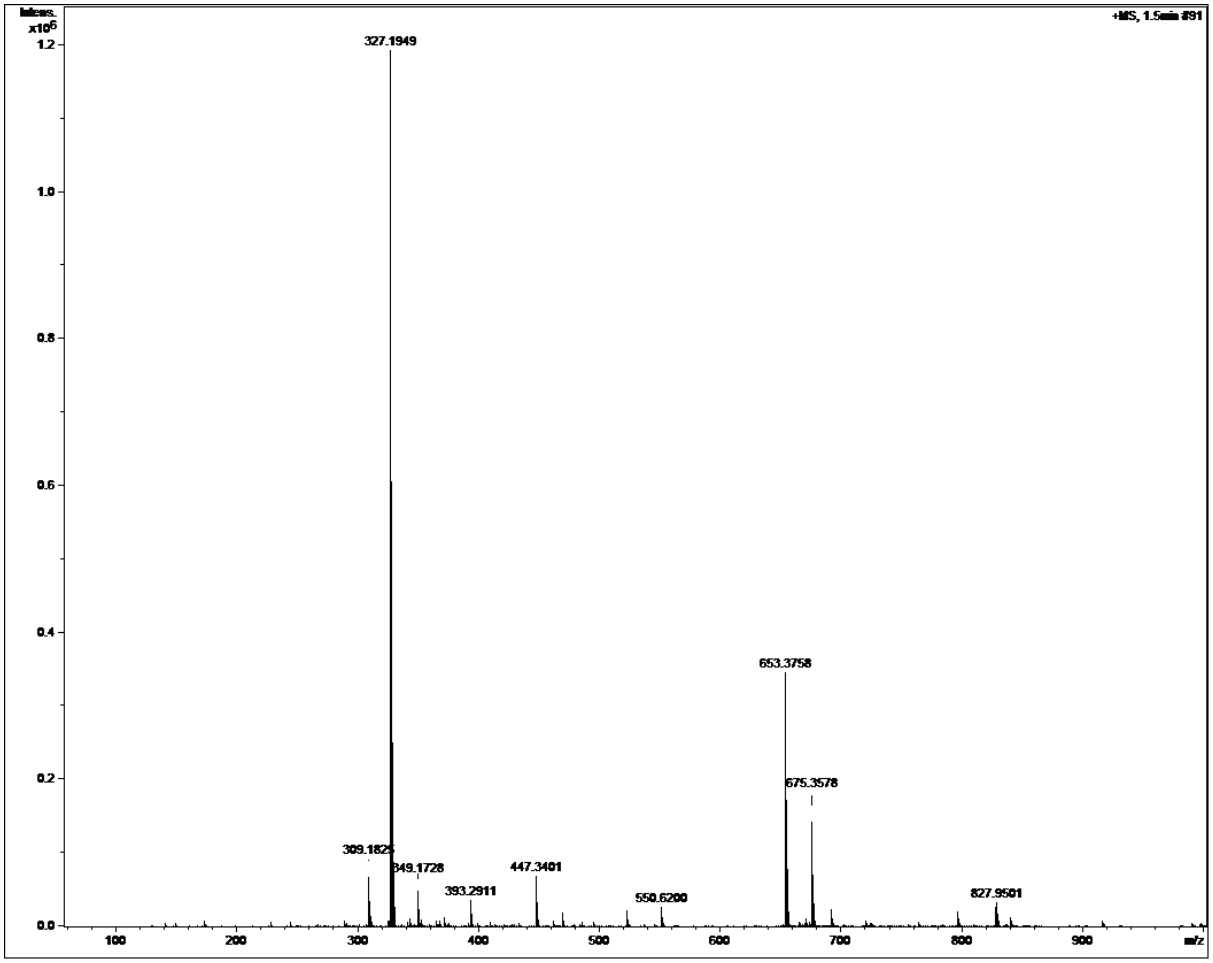


Figura 16 - Espectro de Massas de alta resolução por elétron “spray”, modo positivo, do composto **1**.

4.1.2 Identificação do composto 12α-Hidroxipregna-4,6-dieno-3,20-diona (cybisterol) (2)

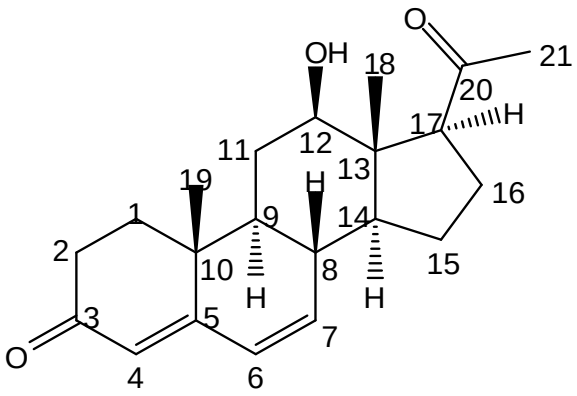
O composto **2** foi obtido em mistura com o composto **1**, porém em proporções diferentes. Como o composto **1** foi obtido puro, foi possível listar os dados de RMN de ^{13}C (Figura 19) e boa parte dos sinais de RMN de ^{1}H (figura 18) do composto **2**. No espectro de RMN de ^{1}H foi possível listar os sinais destacados a seguir. Um multipleto referente a hidrogênios olefínicos em δ_H 6,10 (2H, *m*, H-6 e 7), um sinal em δ_H 5,66 (1H, *s*, H-4) e sinal de hidrogênio ligado a carbono carbinólicos em δ_H 3,49 (1H, *dd*, *J* = 9,0 e 6,0 Hz, H-12), sinais de metilas em δ_H 0,79 (3H, *s*, H-18) e δ_H 1,09 (3H, *s*, H-19) e em δ_H 2,21 (3H, *s*, H-21), sendo este último de hidrogênios de metila alfa à carbonila.

No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **2** foram listados 21 sinais, sendo observados 4 sinais na região dos carbono olefínicos; entre estes, os que aparecem a δ_C 124,1; 128,3; 139,2 foram definidos por experimento DEPT 135º como carbonos do tipo CH, enquanto outro sinal (δ_C 162,9) não se encontra ligado a hidrogênio. Um sinal em δ_C 77,2 evidenciou a presença de um carbono hidroximetínico, enquanto os sinais δ_C 7,9, 16,3 e 30,2 correspondem a carbonos metílicos.

Estes dados evidenciam grande semelhança estrutural entre os compostos **1** e **2**. A comparação entre os dados de RMN de ^{13}C destes compostos mostram duplicidades de parte dos sinais e no espectro do composto **2** observou-se a ausência dos sinais dos carbonos da ligação dupla C16-C17 e a presença de dois sinais adicionais, um de carbono metilênico a δ 24,9 e outro metínico em δ 63,7, os quais foram atribuídos a C-16 e C-17 do composto **2**, respectivamente. Esta diferença estrutural refletiu na diferença de deslocamento químico do carbono carbinólico em C-12 (4,0 ppm).

A comparação dos valores de deslocamento químico dos carbonos de **2** com os de **1,** levaram à proposição de que a primeiro corresponde à 12α-hidroxipregna-4,6-dieno-3,20-diona, conhecido como Cybisterol [24] (Figura 17). A comparação dos dados de RMN de ^{13}C e ^{1}H deste composto com os de **2** mostram boa correlação, sendo as diferenças mais acentuadas atribuídas ao fato dos espectros não terem

sido obtidos no mesmo solvente. O Cybisterol foi identificado inicialmente de secreções defensivas de besouro d'água [56,57] e de duas plantas da família Apocynaceae [54, 24].



Cybisterol (**2**)

Figura 17 – Estrutura do composto **2** (cibysterol)

Tabela 3 - Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C ($CDCl_3$, 300/75 MHz) do 12β-Hidroxipregna-4,6-diene-3,20-diona (cybisterol) (**2**), onde encontram-se corrigidos os valores de deslocamento químico dos carbonos C-4, C-6 e C-7, encontrados no artigo Abe. F; *et al*; (1987) [25].

C/H	**$\delta^{1}H$**	**$\delta^{13}C$**	
		Composto **2**	Cybisterol
1	-	33,8	34,2
2	-	33,9	34,0
3	-	199,5	198,1
4	5,66 (1H, s)	124,1	140,2
5	-	162,9	162,8
6	6,06 (1H, *dl*, *J* = 10,1 Hz)	128,7	124,1
7	6,12 (1H, *dd*, *J* = 10,4 e 2,3 Hz)	139,2	128,3
8	-	36,4	36,8
9	-	51,0	52,1
10	-	35,0	36,1
11	-	28,8	30,6
12	3,49 (H, *dd*, *J* = 10,3 e 4,6 Hz)	77,2	77,9
13	-	48,6	51,2
14	-	48,6	49,1
15	-	23,2	23,8
16	-	24,9	25,3
17	-	63,7	62,4
18	0,79 (3H, *s*)	7,9	8,1
19	1,09 (3H, *s*)	16,3	16,1
20	-	213,8	211,8
21	2,21 (3H, *s*)	30,2	31,8

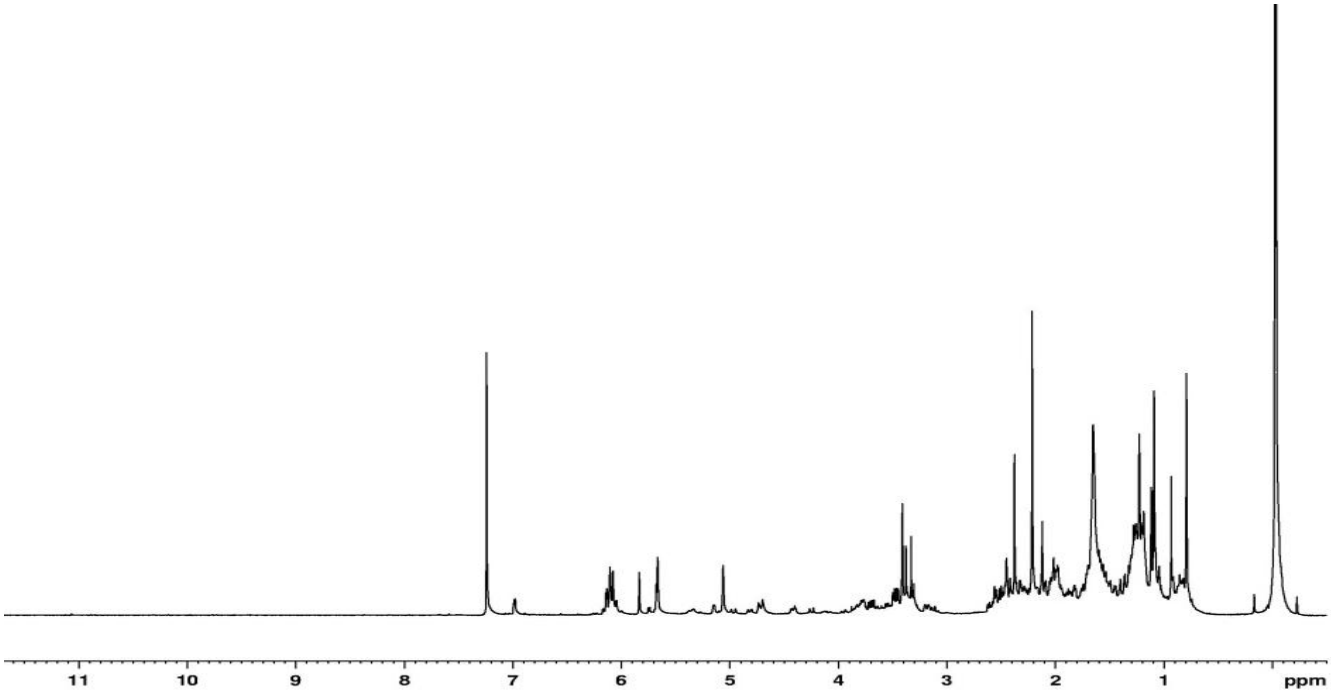


Figura 18 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) para a composto **2.**

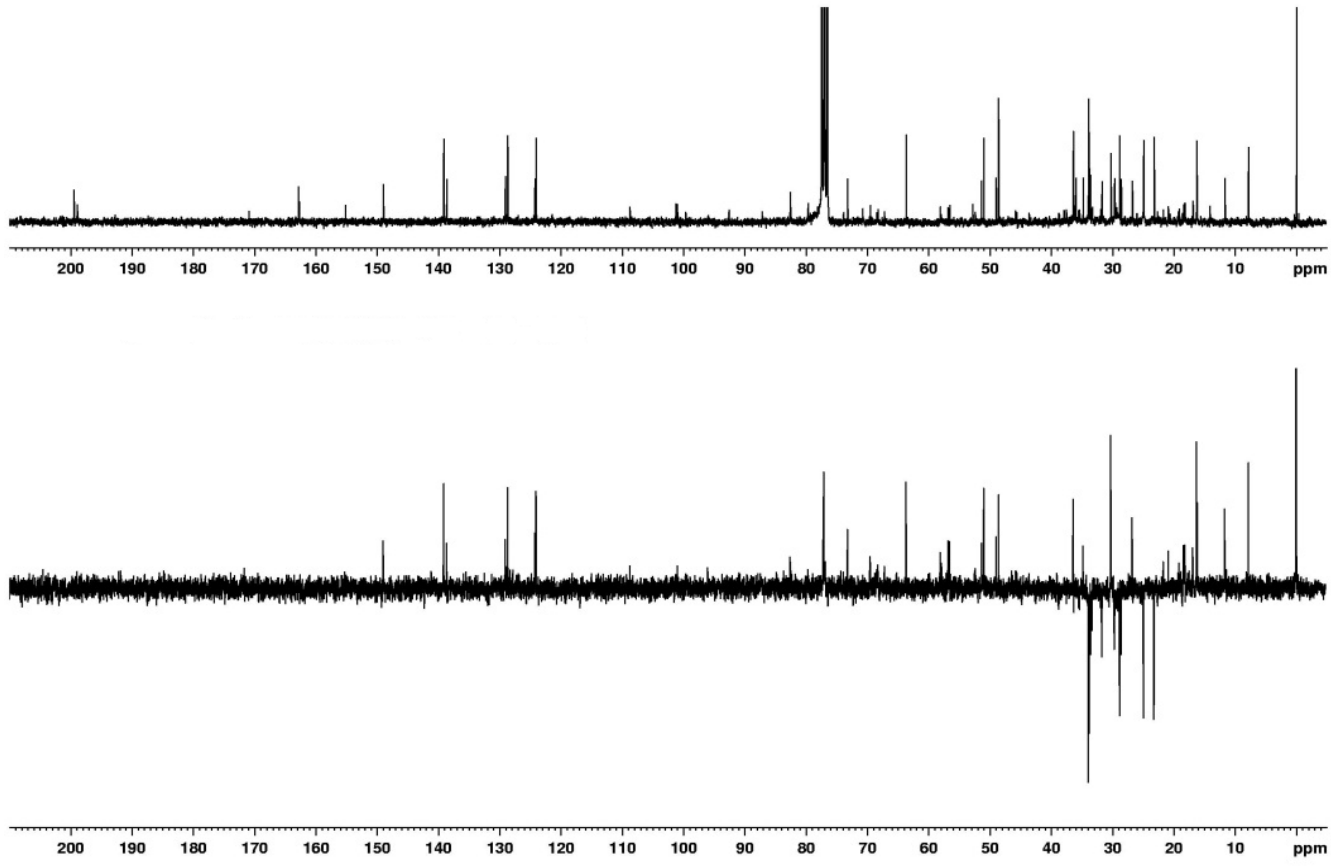
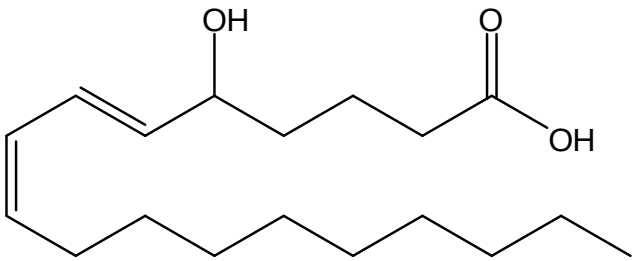


Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º da composto **2**.

4.2 Identificação do composto 3 (ácido 5-hidróxi-octadeca-6(*E*)-8(*Z*)-dienóico)

O compostos **3**, um sólido amarelo, foi identificado com base nas observações realizadas nos espectros de RMN ^{1}H, ^{13}C e DEPT 135º. O espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz/$CDCl_3$) (Figura 21) de **3** apresentou, genericamente, características de substâncias de natureza graxa, sendo observados sinais de hidrogênios olefínicos. Estes sinais apareceram a δ_H 6,48 (1H, *dd*, *J* = 14,5 e 10,7 Hz, H-7), δ_H 5,96 (1H, *t*, *J* = 10,7 Hz, H-8), δ_H 5,65 (1H, *dd*, *J* = 14,5, 6,6 Hz, H-6) e δ_H 5,45 (1H, *ddd*, *J* = 10,7, 8,2 e 7,5 Hz, H-9), compatíveis com hidrogênios de duas ligações duplas, que por análise das constantes de acoplamento (*J*) determinou-se que trata-se de duplas ligações conjugadas, devido ao valor da constante de acoplamento *J* = 10,7 HZ observados entre os hidrogênios com deslocamento químico nos valores de δ_H 6,48 e 5,45. Através das análises das constante de acoplamento também determinou-se que trata-se de uma ligação *trans* (*J* = 14,5 Hz, entre os hidrogênios em δ_H = 6,48 e 5,65) e outra ligação *cis* (*J* = 10,7 Hz, entre os hidrogênios em δ_H 6,48 e 5,45. Observou-se também um sinal de hidrogênio carbinólico δ_H 4,14, *ddl*, *J* = 12,4 e 6,6 Hz, H-5, o qual pôde-se determinar como sendo de uma hidroxila alílica devido ao valor da constante de acoplamento *J* = 6,6 Hz, entre os hidrogênios em δ_H 5,65 e 4.14. No espectro de RMN ^{13}C (75 MHz/ $CDCl_3$) (Figura 22) foram observados sinais para 18 carbonos que, com auxílio do espectro DEPT 135º, foram caracterizados como sendo, cinco metínicos (quatro olefínicos e um hidroximetínico – δ 72,9), onze metilênicos, um metílico e um de carboxila (δ 178,9). O espectro de Massas de alta resolução por elétrons "spray" no modo negativo (Figura 23) apresentou pico íon pseudomolecular *m/z* = 295,2258 $[M–H^+]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{32}O_3$ ($C_{18}H_{31}O_3$ – calculado = 295,2265). Estes dados indicam tratar-se de um ácido graxo com 18 carbonos, possuindo duas ligações duplas conjugadas (uma *cis* e outra *trans*) e uma hidroxila. O valor do deslocamento químico do sinal do hidrogênio carbinólico [4,14, (1H, *ddl*, *J* = 12,4 e 6,6 Hz] e a coincidência de uma das constantes de acoplamento deste (6,6 Hz) com uma das constantes de acoplamento do hidrogênio olefínico a δ 5,65 (1H, *dd*, *J* = 14,5, 6,6 Hz) sugeriu a possibilidade de localização alílica da hidroxila. Uma busca na literatura permitiu observar uma boa correlação entre os dados de RMN de

^{1}H e de ^{13}C do composto **3** com os do ácido 5-hidróxi-octadeca-6(*E*)-8(*Z*)-dienóico [58]. Este composto foi isolado de *Allium neapolitanum* (Apocynaceae) como uma mistura racêmica e, possivelmente, teve origem não enzimática (ou seja, trata-se de um composto que tem sua origem a partir da degradação de outro composto), como os próprios autores admitem. Investigações do metabolismo de derivados de ácidos graxos envolvidos em processos inflamatórios [58] mostraram que o ácido 5*R*-hidróxi-octadeca-6(*E*)-8(*Z*)-dienóico participa destes processos, sendo originado do ácido sebácico. Ambos os isômeros (5*R* e 5*S*) do composto **3** foram sintetizados [59, 60], porém os autores não fornecem os valores de rotação óptica específica e portanto, não foi possível definir a sua configuração.



Ácido 5-hidroxi-octadeca-6(E)-8(Z)-dienoico (**3**)

Figura 20 - Estrutura da substância **3**

Tabela 4 – Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C (300/75 MHz, $CDCl_3$) do composto **3** do do ácido 5-hidróxi-octadeca-6(*E*)-8(*Z*)-dienóico [58].

Nº dos C	**δ ^{1}H**	**δ ^{13}C**	
		Composto **3**	Literatura
1		178,9	177,8
2		33,9	35,1
3		24,6	26,3
4		37,2	38,5
5	4,14 (1H, *ddl*, *J* = 12,4 e 6,6 Hz)	72,9	73,4
6	5,65 (1H, *dd*, *J* = 14,5 e 6,6 Hz)	135,5	137,3
7	6,48 (1H, *dd*, *J* = 14,5 e 11,0 Hz)	125,9	126,5
8	5,96 (1H, *t*, *J* = 11,0 Hz)	127,6	129,4
9	5,45 (1H, *ddd*, *J* = 11,0, 8,2 e 7,5 Hz)	133,1	132,9
10		25,3	28,4
11		27,7	30,7
12		28,9	30,7
13		29,1	30,7
14		29,2	30,7
15		29,2	30,7
16		31,4	33,0
17		22,5	23,7
18	0,89 (3H, *t*, *J* = 6,7 Hz)	14,0	14,0

.

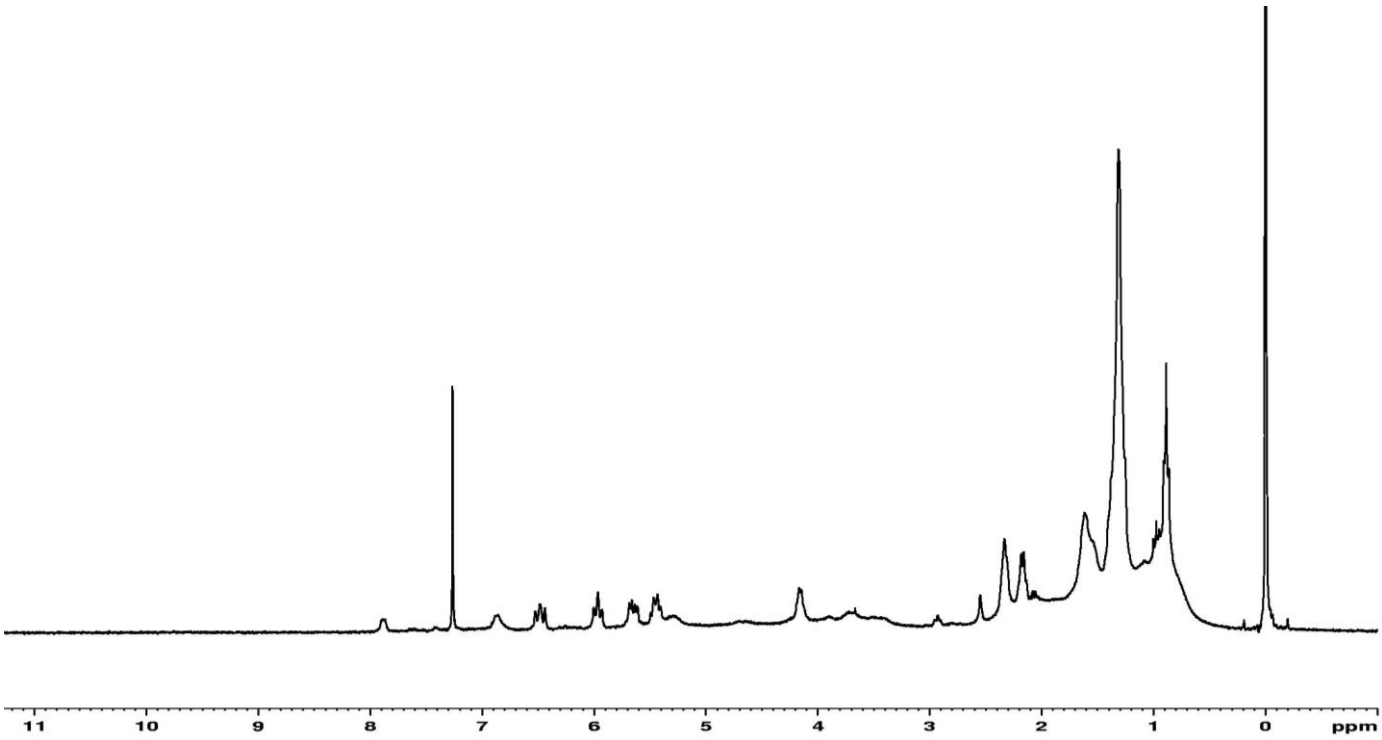


Figura 21 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do compostos **3**.

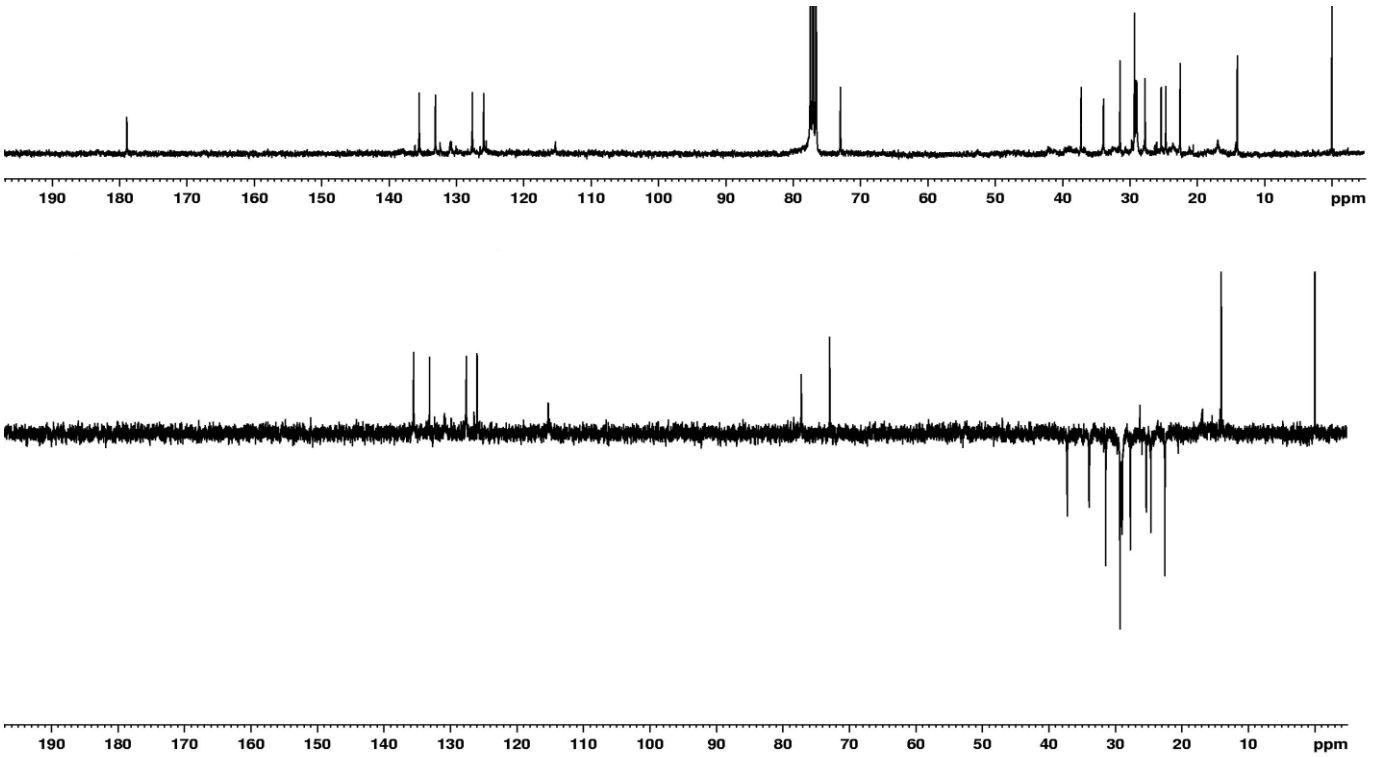


Figura 22 - Espectros de RMN ^{13}C (75 MHz,$CDCl_3$) e DEPT 135º para o composto **3**.

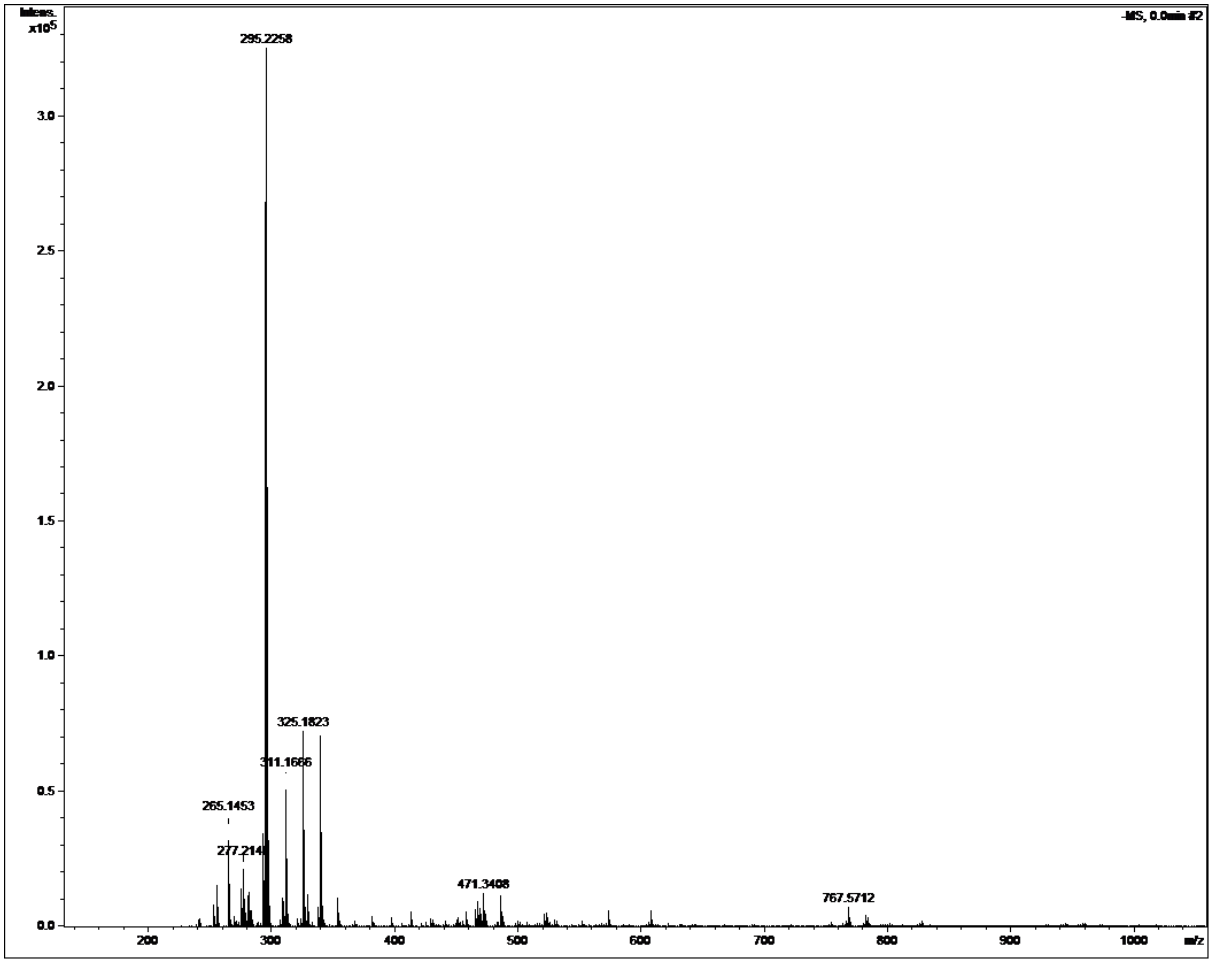


Figura 23 - Espectro de Massas de Alta resolução por elétron “spray” (HRESIMS), modo negativo, do composto **3**.

4.3 Lignóides

Os compostos de esqueleto carbônico do tipo lignoides são formados a partir de duas unidades de fenilpropanoides, unidades C_6-C_3, originadas da via biossintética do ácido chiquímico (Figura 24).

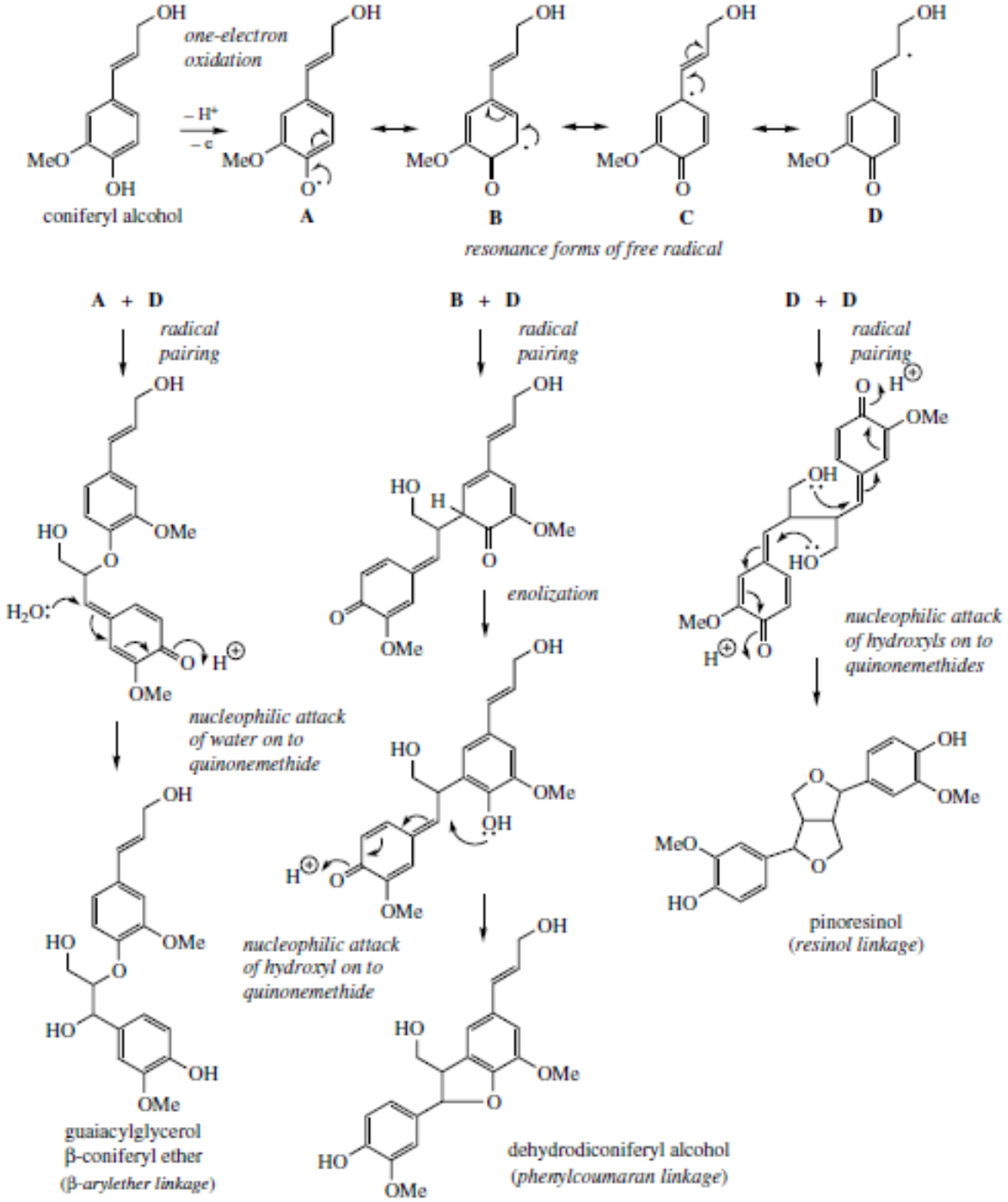


Figura 24 – Esquema simplificado para a rota metabólica para formação das lignanas conforme Dewick [69].

Esta classe de compostos tem uma grande diversidade estrutural e muitos representantes apresentam atividades biológicas, entre elas atividade antitumoral, antiviral e antioxidante [61]. No entanto, as propriedades biológicas das lignanas só começaram a serem reconhecidas a partir de trabalhos do prof. Otto Gottlieb [62]. A lignana mais conhecida é a podofilotoxina (Figura 25), que é citotóxica, mas que ocupa posição destacada na quimioterapia do câncer em função de ser a estrutura a partir da qual são produzidos os medicamentos etoposídeo e teniposídeo, largamente utilizados na farmacologia antitumoral [63].

As lignanas se ligam pela posição 8 e 8’ da cadeia alifática do fenilpropanoides [64], podem ser divididas em subfamílias pelas diferenças estruturais, entre elas dibenzilbutirolactônica – arctigenina (Figura 25), a mais comum dibenzilbutânica – (+)-secoisolariciresinol (Figura 25), as furofurânicas – medioresinol (Figura 25) e as ariltetrahidronaftalena – podofilotoxina [65] (Figura 25). Neste estudo foram identificadas duas lignanas do tipo furofurânicas.

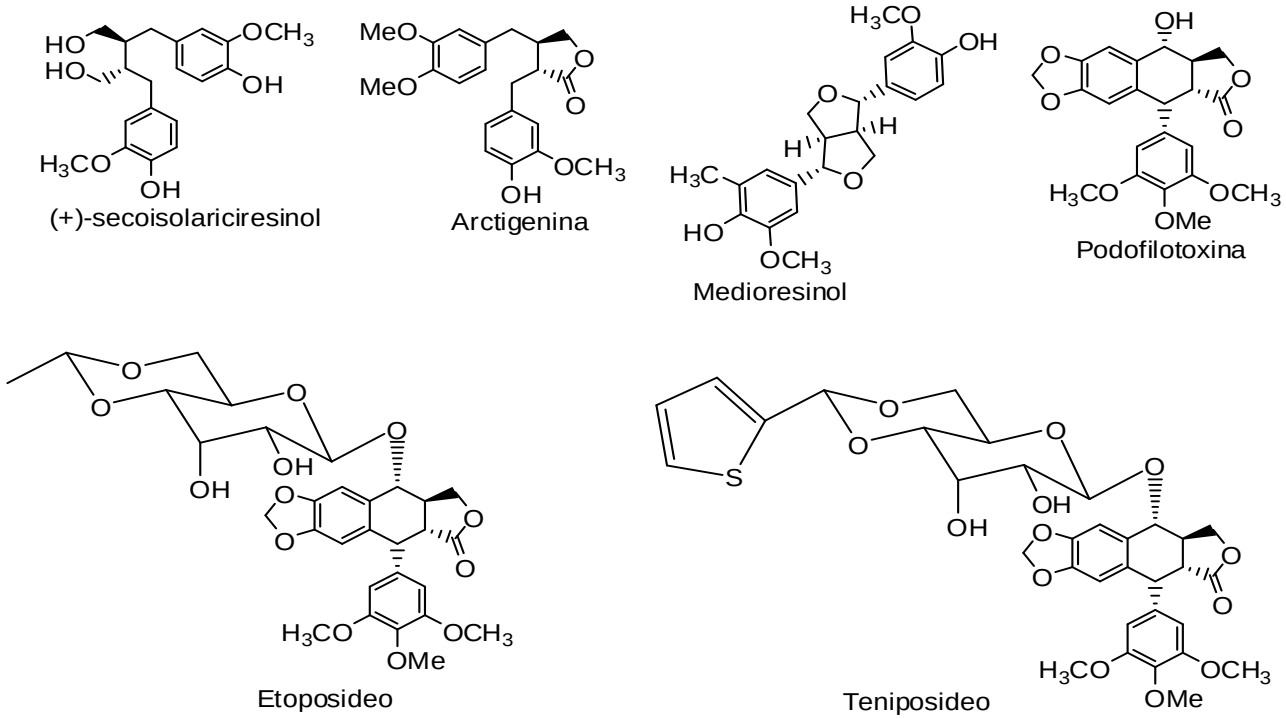
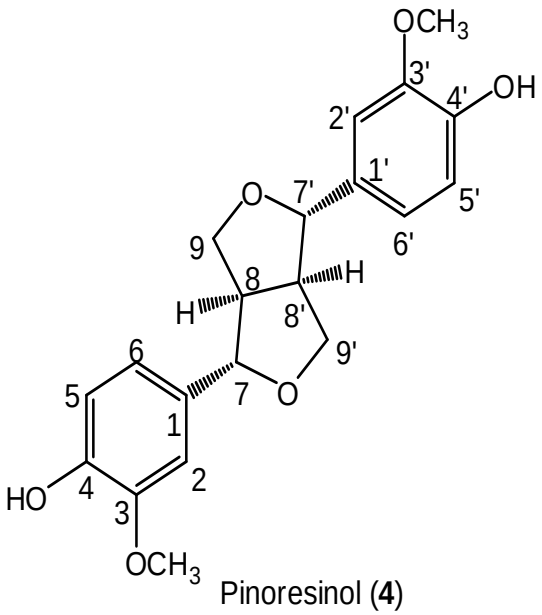


Figura 25 - Exemplos de lignanas.

4.3.1 Identificação do Pinoresinol (4)

O espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 27) de **4** mostrou sinais típicos de anel benzênico 1,2,4 – tri-substituído [δ_H 6,88 (H-2 e 2'); 6,85 (H-5 e 5') e 6,81 (H-6 e 6')] sinal de uma metoxila (δ_H 3,89), sinais de hidrogênios carbinólicos, além de sinais de hidrogênios com núcleos protegidos. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28) de **4** exibiu sinais de carbonos do anel benzênico referido, da metoxila (δ_C 58,9) (Tabela 4), de dois carbonos carbinólicos, um CH (δ_C 85,9) e um CH_2 (δ_C 71,7). Estes dados não permitem compor uma estrutura, sugerindo tratar-se de uma estrutura com duas unidades C_6/C_3 dimerizadas de forma simétrica, ou seja: uma lignana. Comparação com os dados de RMN com dados da literatura (Tabela 5) [66] confirmou que o composto **4** é uma lignana de esqueleto furofurânico conhecida como pinoresinol. Não se encontrar na literatura relatos da presença de lignanas em *Macrosiphonia*, porém esta é uma classe de compostos presente em outros gêneros de Apocynaceae [67].



Pinoresinol (**4**)

Figura 26 - Estrutura do composto **4**.

Tabela 5 – Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **4** e do pinoresinol [66].

Nº do C	$\delta^{13}C$	
	Composto 4	**Pinoresinol**
1 – 1'	132,9	132,8
2 – 2'	108,6	108,6
3 – 3'	145,2	145,2
4 – 4'	146,7	146,7
5 – 5'	114,2	114,3
6 – 6'	119,0	119,0
7 – 7'	85,9	85,8
8 – 8'	54,2	54,1
9 – 9'	71,7	71,6
2 CH_3 – O	56,0	56,0

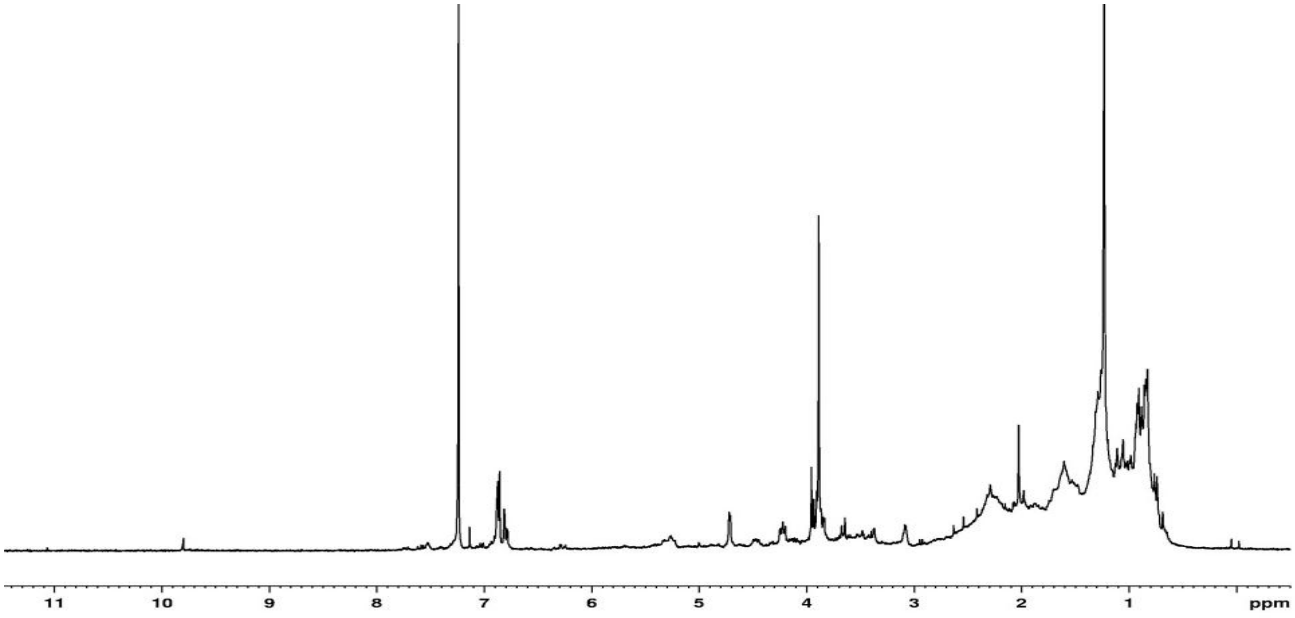


Figura 27 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do composto **4**.

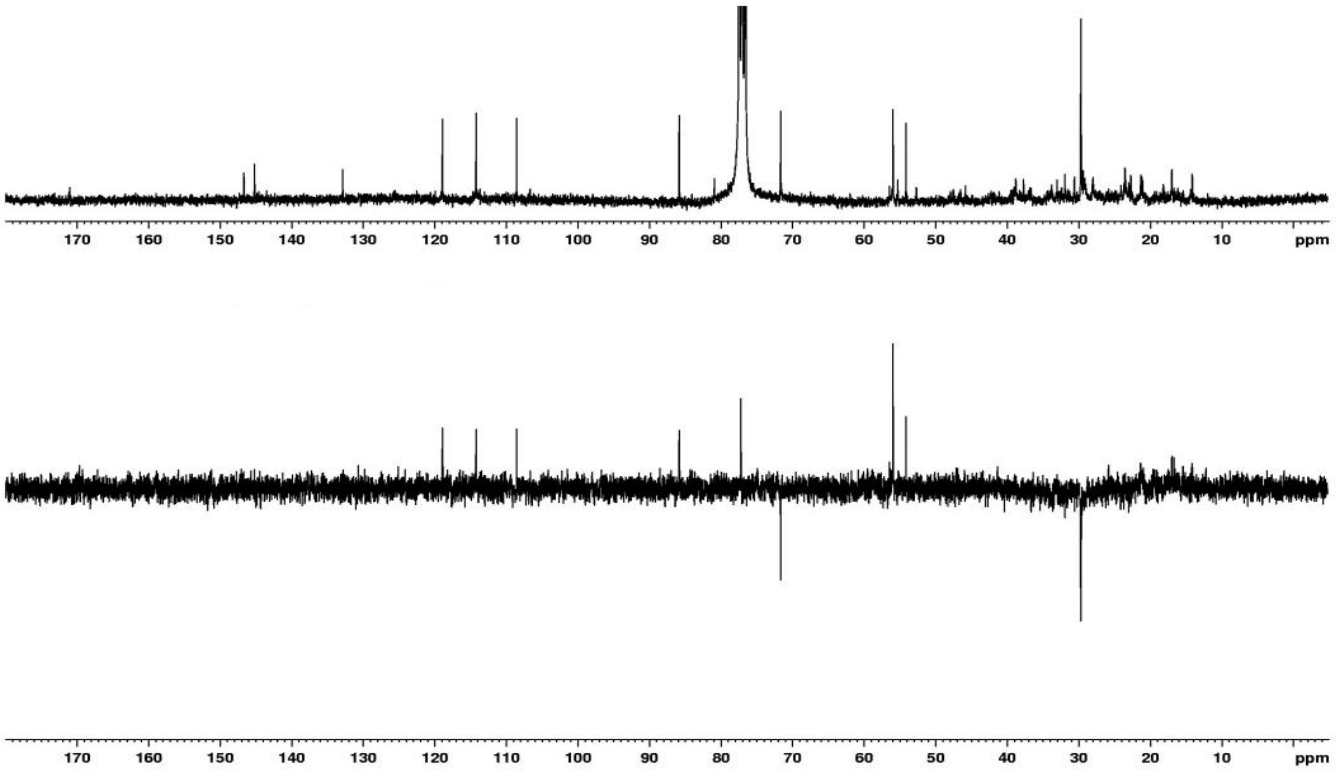
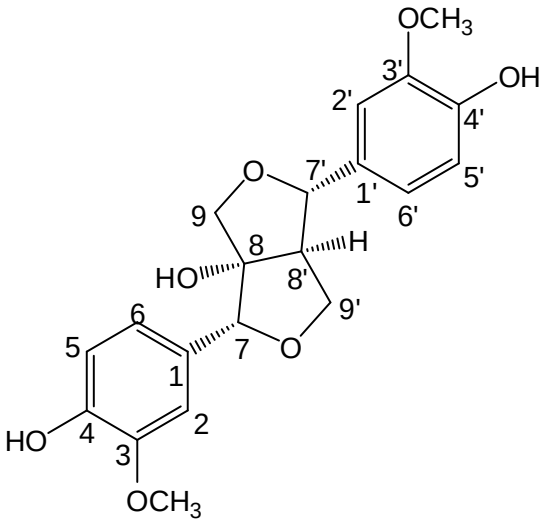


Figura 28 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º, do composto **4**.

4.3.2 Identificação do composto 8α-hidroxipinoresinol (5)

A composto **5**, obtido na fração MPA55, apresentou características espectroscópicas semelhantes às de **4**, indicando tratar-se também de uma lignana, porém sem a estrutura simétrica. No espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 30) observou-se a presença de sinais na região entre δ_H 6,97 e 6,71, característicos de hidrogênios pertencentes a anel aromático, e sinais referentes a hidrogênios de dois grupos metoxílicos δ_H 3,88 (3H, *s*) e δ_H 3,90 (3H, *s*).

No espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$) (Figura 31) foram listados 20 sinais, sendo observados 12 sinais na região de carbonos referentes a sistemas aromáticos (6 CH e 6 C), dois sinais referente a grupos metoxílicos ligado a anel aromático (δ_C 55,9 e 56,0) e observou-se na região referente a carbonos não aromáticos, sinal de apenas um carbono não ligado a oxigênio (CH / δ 69,1) e de um carbono oxigenado não ligado a hidrogênio (C / δ 91,6). Estes dados indicam a possibilidade do composto **5** tratar-se de uma lignana furofurânica hidroxilada na junção dos anéis heterocíclicos (C-8). Comparação dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C de **5** com dados obtidos da literatura (Tabela 6) [68] levaram à identificação de **5** como sendo 8α-hidroxipinoresinol.



8α-hidroxipinoresinol (**5**)

Figura 29 - Estrutura do composto **5**.

Tabela 6 – Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **5** e do 8α-hidroxipinoresinol[68].

Nº dos C	$\delta^{13}C$	
	Composto 5	**8α-hidroxipinoresinol**
1	127,0	127,3
1'	132,0	132,6
2	109,4	109,6
2'	109,0	109,3
3	146,7	146,9
3'	146,9	147,2
4	145,4	145,7
4'	146,0	146,3
5	114,3	114,5
5'	114,6	114,9
6	119,6	119,8
6'	119,7	119,9
7	87,8	88,0
7'	85,8	86,0
8	91,6	91,9
8'	60,1	60,3
9'	71,6	71,9
9	74,7	75,0
CH_3 – O	55,9	56,1
CH_3 – O	56,0	56,2

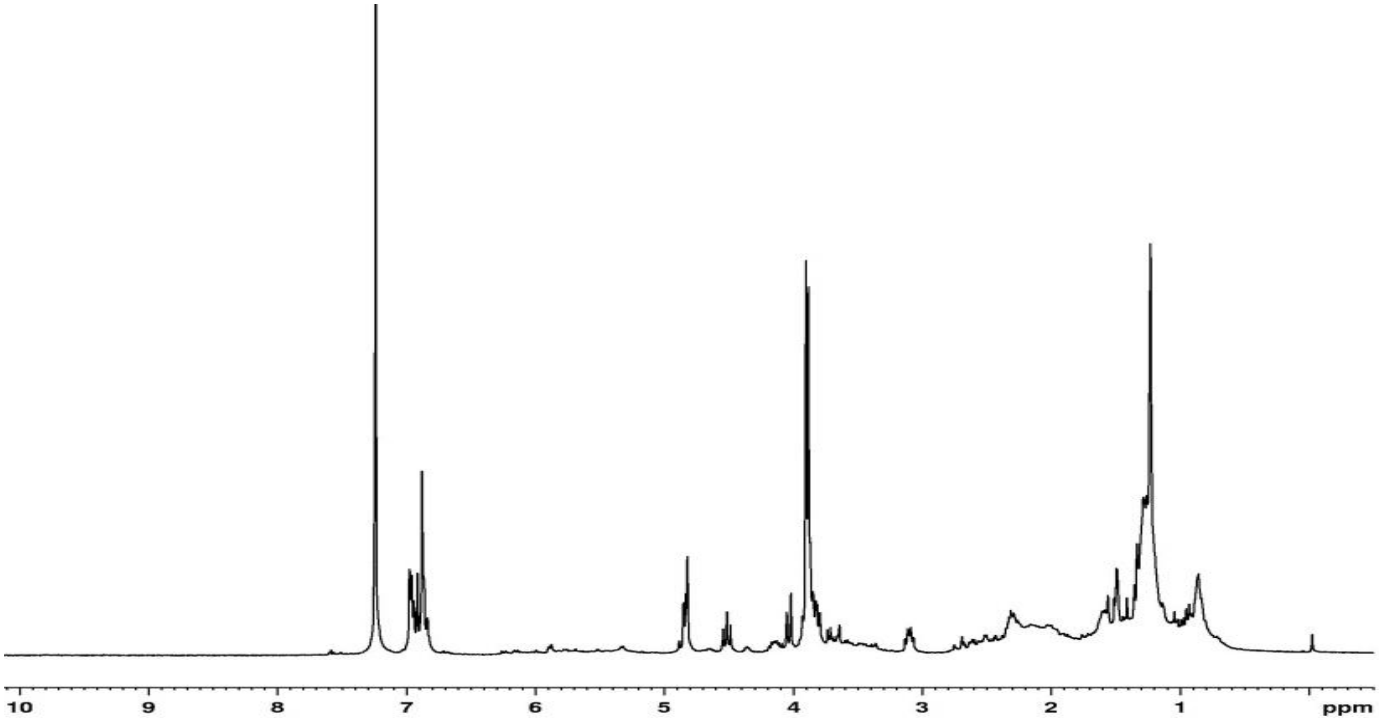


Figura 30 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do composto **5**.

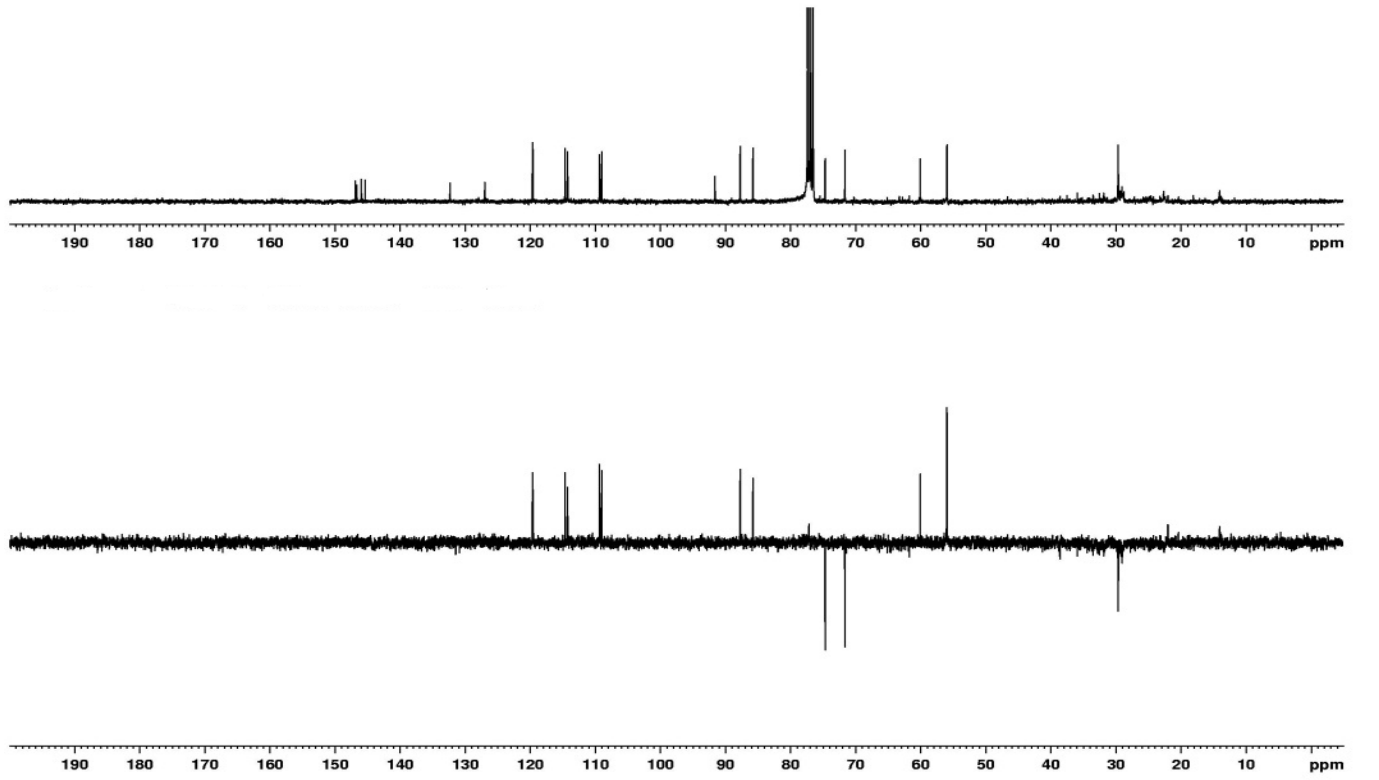


Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º do composto **5**.

4.4 Triterpenoides

Os terpenos pertencem a uma classe de metabólitos secundários bastante diversificados que são originados a partir de unidades de cindo carbonos: IPP (pirofosfato-3-isopentenila) e DMAPP (pirofosfato dimetilalila). Seis unidades destes precursores geram o composto acíclico 2,3-epóxido de esqualeno, o qual, mediante ciclizações e rearranjos originam os diversos esqueletos carbônicos dos triterpenos [69].

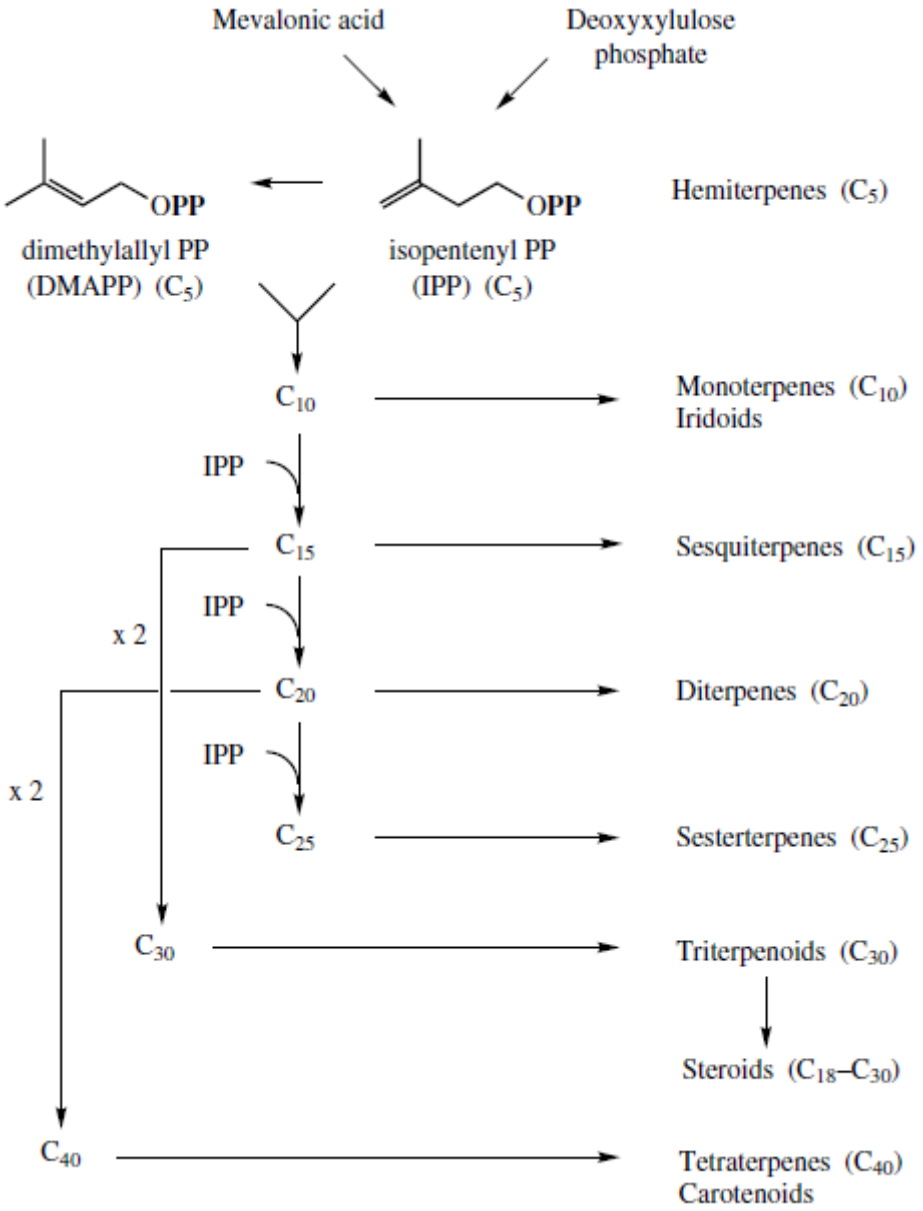


Figura 32: Esquema simplificado para a formação dos metabólicos secundários da classe dos terpenos conforme Dewick [69].

Os compostos do tipo triterpênicos, são encontrados principalmente em famílias de vegetais classificadas como superiores e a diversidade de estruturas para esse tipo de compostos faz com que ele seja uma das classes de metabólitos secundários mais importantes, principalmente com relação a sua ação farmacológica [70].

4.4.1 Identificação dos compostos lupeol (6), α-amirina (7) e β-amirina (8)

Pôde-se determinar a ocorrência de três triterpenos na fase hexânica através de experimentos de RMN de ^{1}H e ^{13}C (300/75 MHz, $CDCl_3$) e pela comparação dos deslocamentos químicos observados para os compostos isolados e outros constantes na literatura [71, 72], além de experimentos de Massas por impacto de elétrons (CG-EM) de baixa resolução.

Para as substâncias **6**, **7** e **8** encontradas na fração MPH511 em mistura, observaram-se no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 34) sinais referentes a hidrogênios olefínicos em δ_H 5,19 (1H, *tl*, H-12), δ_H 5,13 (1H, *tl*, H-12) e δ_H 4,69 (1H, *sl*, H-29a), δ_H 4,57 (1H, *sl*, H-29b), de hidrogênio ligado a carbono carbinólico a δ_H 3,22 (3H, *m*, H-3) e sinais na região entre δ_H 1,07 e δ_H 0,86, correspondentes a hidrogênios metílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35) foram observados três conjuntos de trinta sinais, entre os quais se destacam três grupos de dois sinais relativos a carbonos olefínicos. Um destes pares de sinais aparece a δ 150,9 (C) e 109,3 (CH_2) e correspondem a carbonos olefínicos característicos de esqueleto lupano. Outros dois pares de sinais em δ 145,18 (C) e 121,73 (CH) e δ 139,58 (C) e 124,43 (CH) correspondem a carbonos olefínicos característicos de esqueleto oleanano e ursano, respectivamente. Para os três conjuntos de sinais observa-se a presença de um sinal em δ 79,2-CH, equivalente a três sinais de carbonos, correspondente a carbonos oxigenados. O espectro de Massas de baixa resolução por impacto de elétrons (Anexo 2) apresentou íon molecular [M^+] a *m/z* = 426 para as três substâncias, e a pesquisa na biblioteca integrada ao CG-EM indicou a identificação das substâncias **6**, **7** e **8** como sendo do lupeol, α-amirina e β-amirina, respectivamente. A comparação dos dados de RMN ^{13}C listados, para os três compostos, com a literatura [71 e 72] (Tabela 7) confirmou esta identificação.

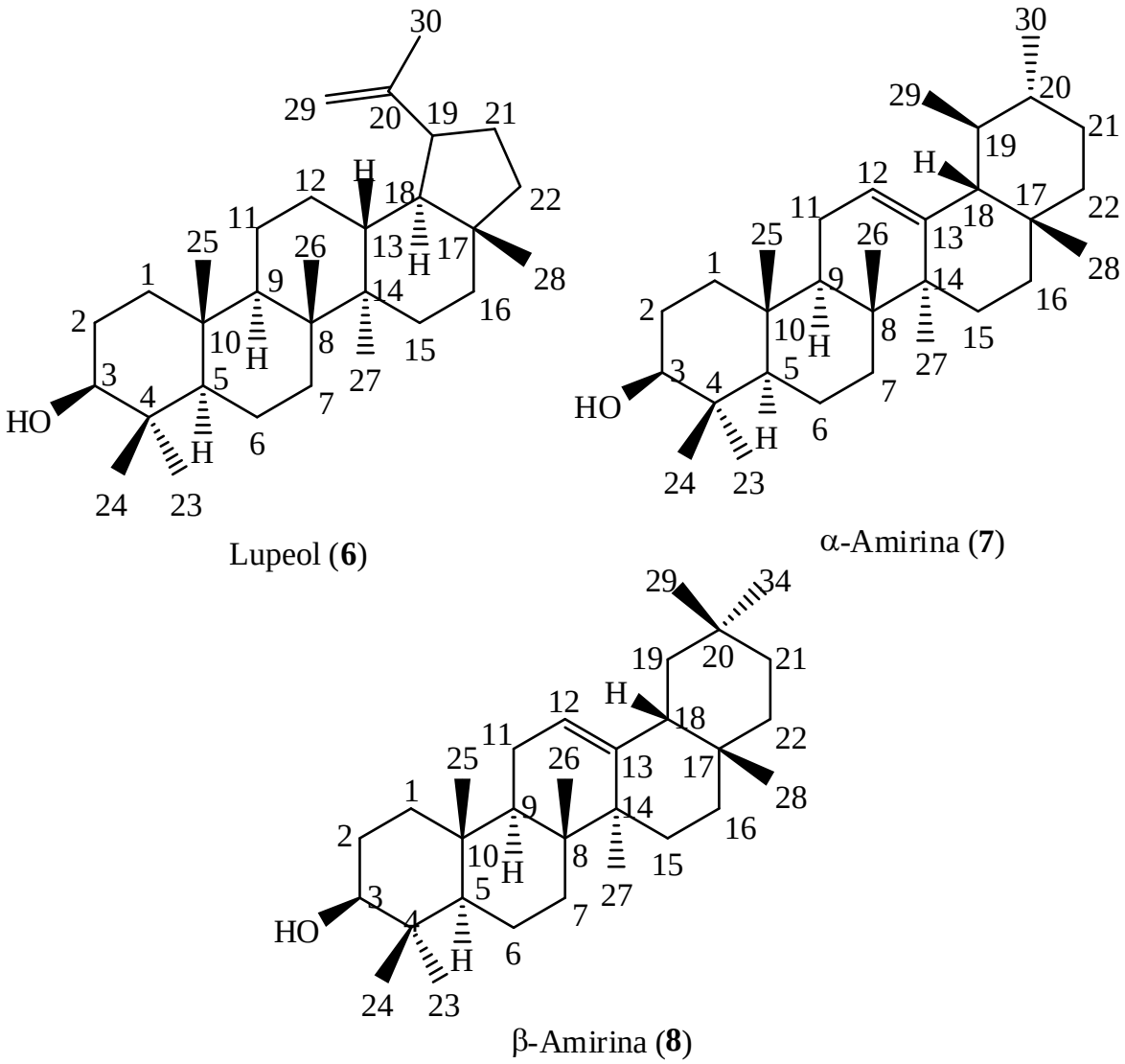


Figura 33 - Estruturas dos compostos **6** (lupeol)**, 7** (α-amirina) e **8** (β-amirina)

Tabela 7 – Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **6**, **7** e **8** e dos triterpenos lupeol, α-amirina e β-amirina [71 e 72].

Nº do C	$\delta^{13}C$					
	Composto 6	**Lupeol**	**Composto 7**	**α-amirina**	**Composto 8**	**β-amirina**
01	38,7	38,7	38,6	38,7	38,6	38,7
02	27,4	27,4	27,3	27,2	27,3	27,3
03	79,0	78,9	79,0	78,3	79,0	79,0
04	38,8	38,8	38,8	38,7	38,8	38,8
05	55,3	55,3	55,2	55,2	55,3	55,3
06	18,3	18,3	18,4	18,3	18,4	18,5
07	34,3	34,2	32,9	32,9	32,7	32,8
08	40,8	40,8	40,0	40,0	38,8	38,8
09	50,4	50,4	47,7	47,7	47,7	47,7
10	37,2	37,1	36,9	36,9	37,2	37,6
11	20,9	20,9	23,3	23,3	23,7	23,6
12	25,2	25,1	124,4	124,3	121,7	121,6
13	38,1	38,0	139,6	139,3	145,2	145,1
14	42,8	42,8	42,1	42,0	41,7	41,8
15	27,4	27,4	28,7	28,7	26,2	26,2
16	35,6	35,5	26,6	26,6	26,9	27,0
17	43,0	43,0	33,7	33,7	32,5	32,5
18	48,3	48,2	59,1	58,9	47,2	47,4
19	48,0	47,9	39,7	39,6	46,8	46,9
20	150,9	150,9	39,6	39,6	31,1	31,1
21	29,9	29,8	31,3	31,2	34,7	34,8
22	40,0	40,0	41,5	41,5	37,2	37,2
23	28,0	28,0	28,1	28,1	28,4	28,2
24	15,4	15,4	15,6	15,6	15,5	15,5
25	16,1	16,1	15,7	15,6	15,6	15,6
26	16,0	15,9	16,9	16,8	16,9	16,9
27	14,5	14,5	23,4	23,3	26,0	26,0
28	18,0	18,0	28,1	28,1	28,4	28,4
29	109,3	109,3	17,5	17,4	33,3	33,3
30	19,3	19,3	21,4	21,3	23,7	23,7

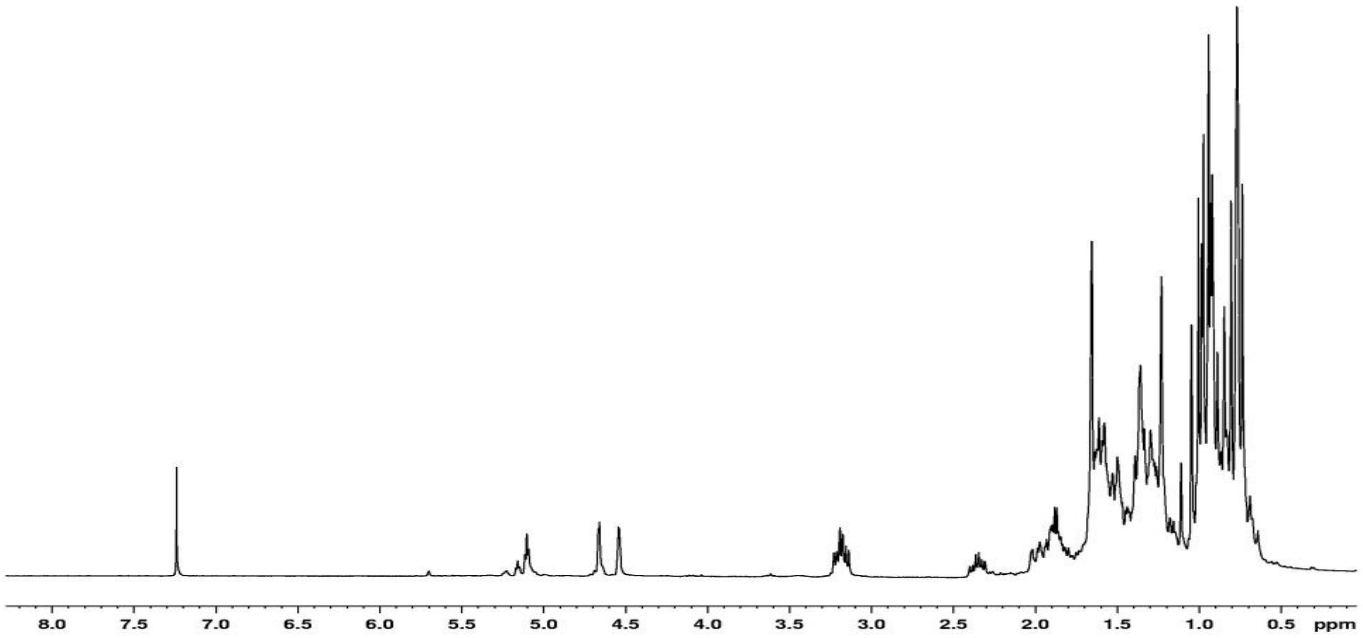


Figura 34 - Espectro de RMN ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) das substâncias **6**, **7** e **8.**

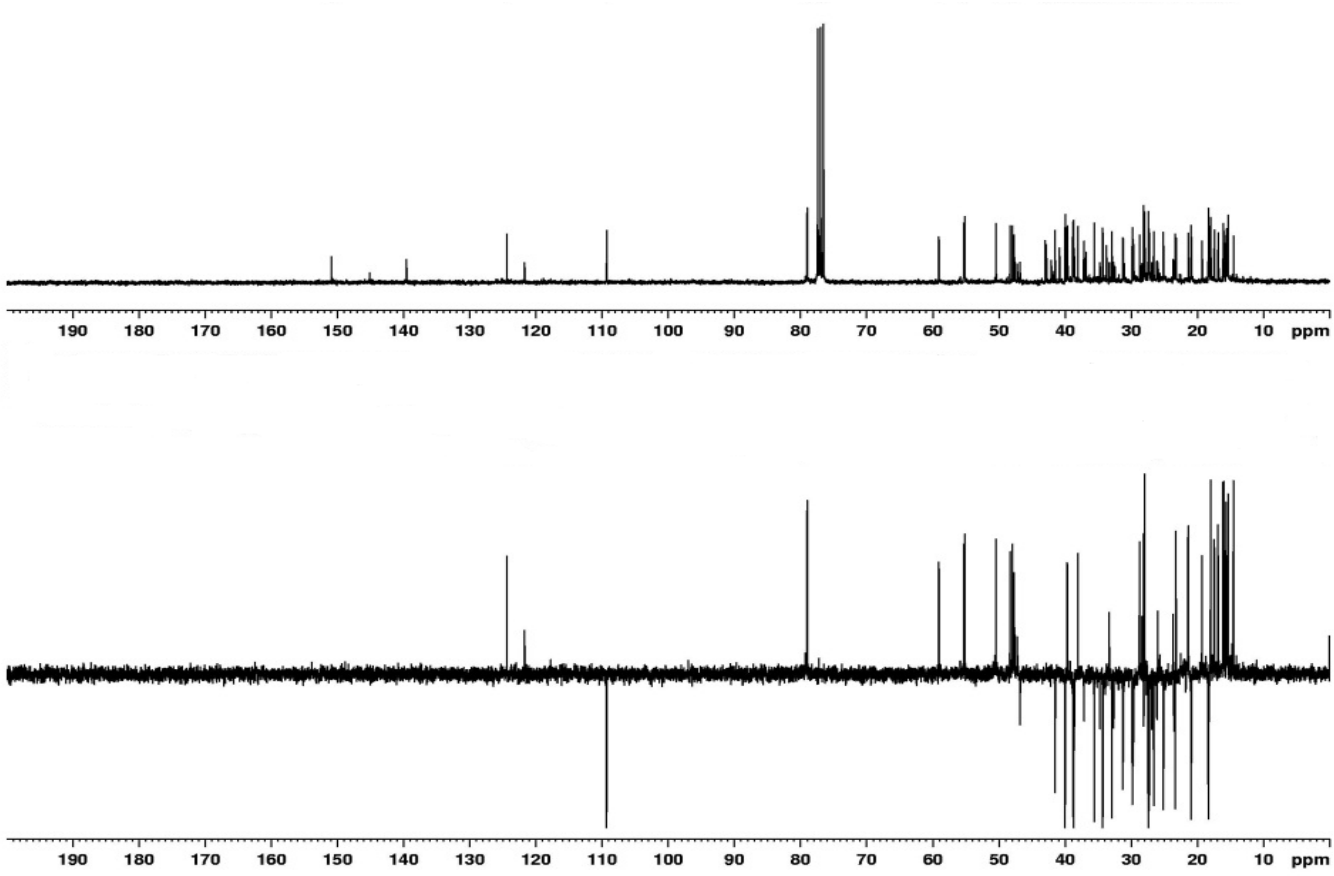


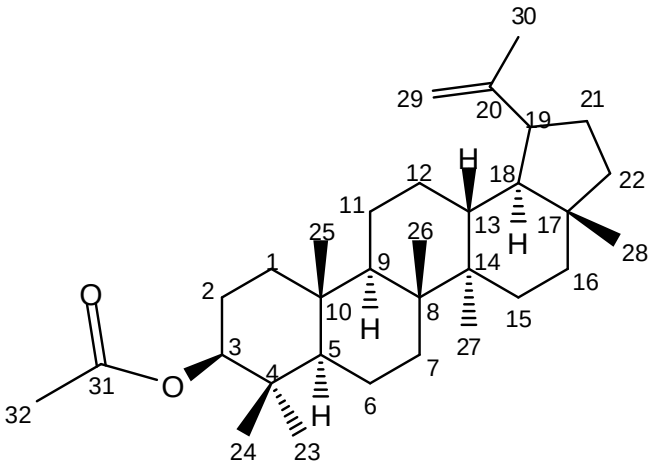
Figura 35 - Espectro de RMN ^{13}C (75MHz,$CDCl_3$) e DEPT 135º, dos compostos **6**, **7** e **8**.

4.4.2 Identificação dos compostos acetato de lupeol (9), acetato de α-amirina (10) e acetato de β-amirina (11)

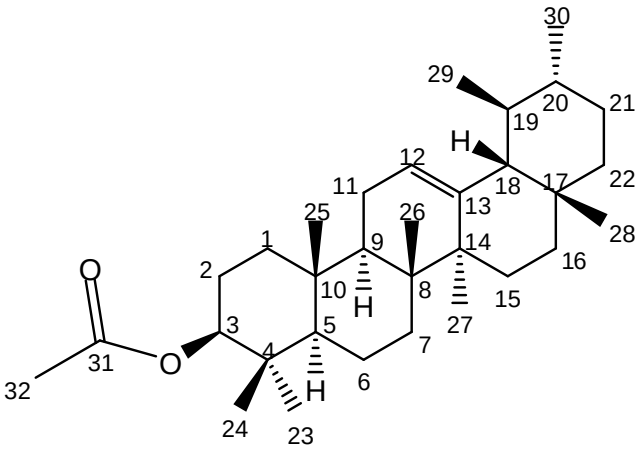
Os compostos **9**, **10** e **11**, obtidos da fração MPA21 em mistura, apresentaram características espectroscópicas muito semelhantes às dos compostos lupeol (**6**), α-amirina (**7**) e β-amirina (**8**), discutidos anteriormente. Em relação a estes, o espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 37) evidenciou a ausência do sinal em δ 3,20 (3H, *m*, H-3) e a presença de sinais em δ 4,45 (3H, *m*, H-3), referente a hidrogênio carbinólico, e em δ 1,92 (9H, *s*), correspondente a metilas α à carboxila. Portanto, os compostos **9**-**11** são triterpenos e os sinais de RMN de ^{1}H mencionados sugerem que se trata de triterpenos acetilados, possivelmente na posição C-3.

O espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 38) revelou na região de carbonos olefínicos três conjuntos de sinais, os quais permitiram definir os esqueletos carbônicos destes compostos: **9** - lupano – δ_C 109,4 (C-29) e 150,9 (C-20); **10** - ursano – δ_C 124,3 (C-12) e 139,6 (C-13) e **11** - oleanano – δ_C 121,6 (C-12) e 145,1 (C-13) . Os sinais em δ_C 80,8 e δ_C 170,8 correspondem aos carbonos carbinólico C-3 e carboxílico da unidade acetato, respectivamente. A expansão do espectro de RMN de ^{13}C permitiu a listagem de todos os sinais (Tabela 8) e levou à identificação segura dos compostos **9**-**11** como sendo os triterpenoides acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina.

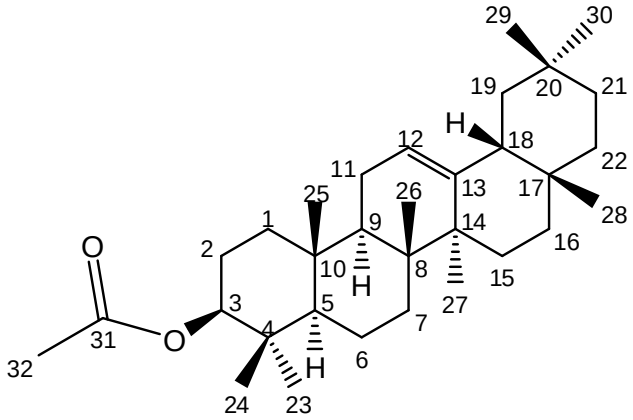
A família Apocynaceae é reconhecida pela produtividade de metabólitos secundários da classe dos triterpenos, tendo vários trabalhos que apresentam a diversidade de triterpenos encontrados nessa família, como por exemplos os trabalhos com as espécies *Himatanthus articulata* [73]*, Aspidosperma ilustres* [74]*, Plumeria obtusa* [75], os quais relatam alguns tipos e a diversidade de esqueletos triterpênicos encontrados nesta família.



Acetato de lupeol (**9**)



Acetato de α-amirina (**10**)



Acetato de β-amirina (**11**)

Figura 36 - Estruturas dos compostos **9**, **10** e **11**.

Tabela 8 – Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **9** , **10** e **11** e dos triterpenoides acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina [71, 76].

Nº do C	$\delta^{13}C$					
	Composto 9	**acetato de lupeol**	**Composto 10**	**acetato de α-amirina**	**Composto 11**	**acetato de β-amirina**
01	38,7	38,7	38,6	38,7	38,6	38,7
02	27,4	27,4	27,3	27,2	27,3	27,3
03	79,0	78,9	79,0	78,3	79,0	79,0
04	38,8	38,8	38,8	38,7	38,8	38,8
05	55,3	55,3	55,2	55,2	55,3	55,3
06	18,3	18,3	18,4	18,3	18,4	18,5
07	34,3	34,2	32,9	32,9	32,7	32,8
08	40,8	40,8	40,0	40,0	38,8	38,8
09	50,4	50,4	47,7	47,7	47,7	47,7
10	37,2	37,1	36,9	36,9	37,2	37,6
11	20,9	20,9	23,3	23,3	23,7	23,6
12	25,2	25,1	124,4	124,3	121,7	121,6
13	38,1	38,0	139,6	139,3	145,2	145,1
14	42,8	42,8	42,1	42,0	41,7	41,8
15	27,4	27,4	28,7	28,7	26,2	26,2
16	35,6	35,5	26,6	26,6	26,9	27,0
17	43,0	43,0	33,7	33,7	32,5	32,5
18	48,3	48,2	59,1	58,9	47,2	47,4
19	48,0	47,9	39,7	39,6	46,8	46,9
20	150,9	150,9	39,6	39,6	31,1	31,1
21	29,9	29,8	31,3	31,2	34,7	34,8
22	40,0	40,0	41,5	41,5	37,2	37,2
23	28,0	28,0	28,1	28,1	28,4	28,2
24	15,4	15,4	15,6	15,6	15,5	15,5
25	16,1	16,1	15,7	15,6	15,6	15,6
26	16,0	15,9	16,9	16,8	16,9	16,9
27	14,5	14,5	23,4	23,3	26,0	26,0
28	18,0	18,0	28,1	28,1	28,4	28,4
29	109,3	109,3	17,5	17,4	33,3	33,3
30	19,3	19,3	21,4	21,3	23,7	23,7
31	170,8	170,4	170,8	170,4	170,8	170,4
32	22,6	21,2	22,6	21,2	22,6	21,2

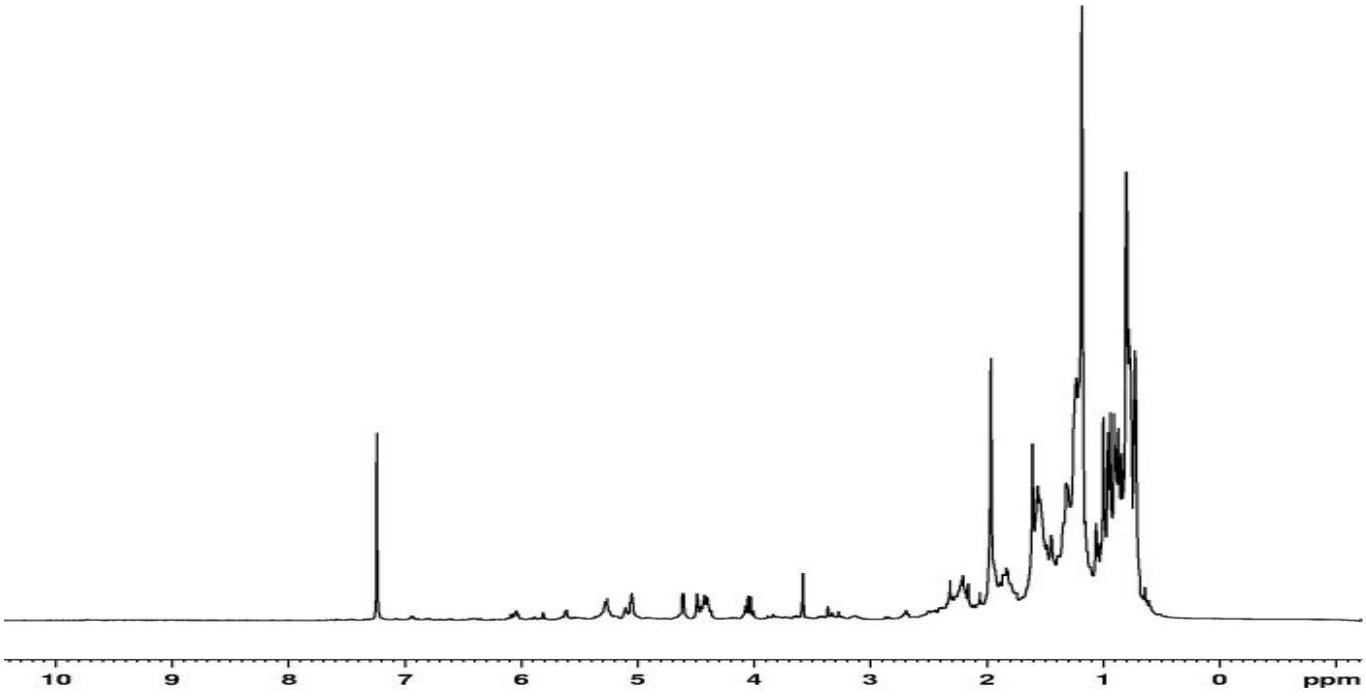


Figura 37 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **9**, **10** e **11.**

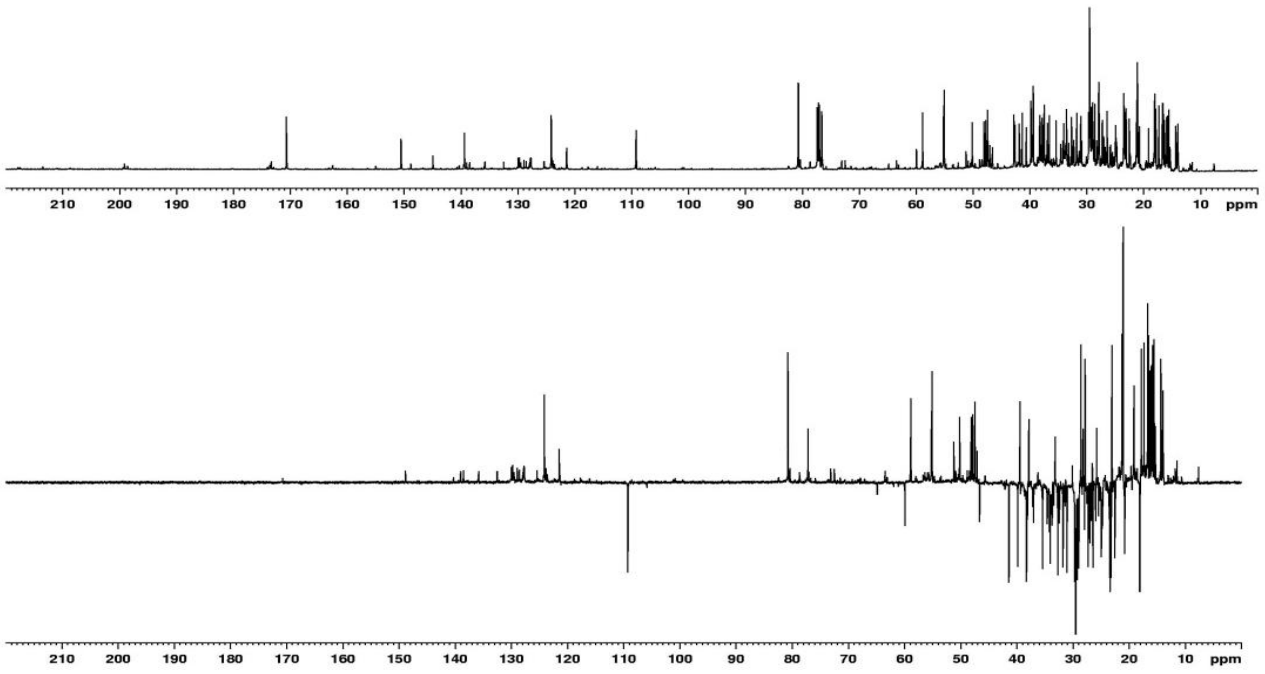


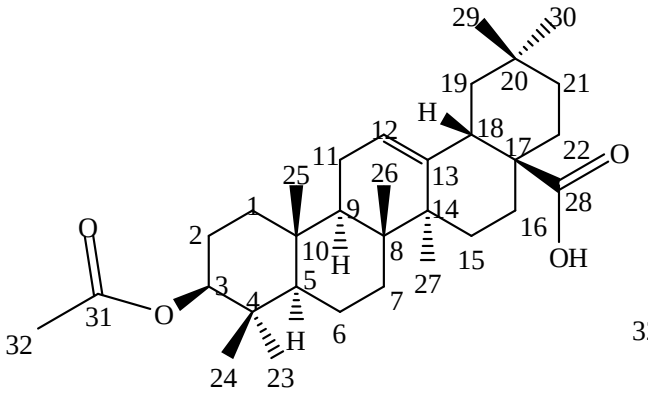
Figura 38 - Espectros de RMN ^{13}C (75 MHz,$CDCl_3$) e DEPT 135º dos compostos **9** a **11**.

4.4.3 Identificação dos compostos acetato do ácido oleanólico (12) e acetato do ácido ursólico (13)

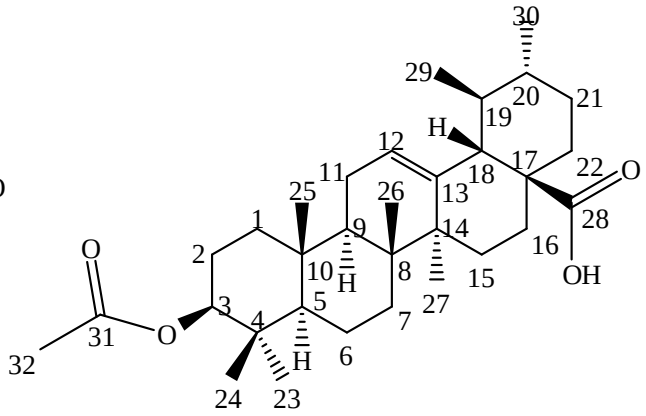
Para as compostos **12** e **13**, obtidos em mistura na fração MPH68, observou-se no espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 40) um perfil indicativo de natureza triterpênica. Destacaram-se os sinais referentes a hidrogênios olefínicos em δ_H 5,25 (1H, *t*, H-12) e δ_H 5,22 (1H, *t*, H-12), sinais de hidrogênios carbinólicos em δ_H 4,47 (2H, *t*, *J* = 6Hz, H-3) e sinal em δ_H 1,95 (6H, *s*), referente a hidrogênios de metila ligada a carboxila; entre δ_H 1,30 e 0,70 observou-se sinais típico de triterpenos, destacando-se vários sinais de metila como singletos.

No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 41) foram listados dois conjuntos de 32 sinais, sendo observados dois pares de sinais na região dos carbonos olefínicos: δ_C 122,5-CH e 143,6-C e em δ_C 125,7-CH e 137,9-C. Estes sinais são característicos dos carbonos das ligações duplas C12/C13 nos triterpenos com esqueletos oleanano e ursano, respectivamente. Observou-se também, um sinal em δ_C 80,9 (CH) com intensidade para dois carbonos, atribuído aos carbonos carbinólicos C-3 para ambas as estruturas, e sinais na região de carbonos de carboxila em δ_C 183,4 e 183,3 e de carbonos de carboxilato em δ_C 171,8; os dois primeiros correspondem a carboxilas de ácido carboxílico, enquanto o último se refere a dois grupos carboxilatos de unidades de acetato. A localização da carboxila de ácido na posição C-17 foi definida, em ambos os casos, pelos valores de deslocamento químico de C-18 (δ 42,7 em **12** e δ 54,3 em **13**), que sofrem significativa variação em função da presença deste grupo funcional em C-17. A presença da unidade acetato em C-3 foi compatível com os valores de δ_H de H-3 (4,47) e de δ_C em 80,9 (C-3).

Estes dados levaram à proposta de que os compostos **12** e **13** (Figura 39) correspondem ao acetato de ácido oleanólico e acetato de ácido ursólico, respectivamente. A comparação dos dados de RMN ^{13}C dos compostos **12** e **13** com os dados obtidos da literatura [77, 78] (Tabela 9) levaram à confirmação da identificação dos compostos como sendo acetato de ácido oleanólico (**12**) e acetato de ácido ursólico (**13**).



Acetato de ácido oleanólico (**12**)



Acetato de ácido ursólico (**13**)

Figura 39 - Estruturas dos compostos **12** (acetato de ácido oleanólico) e **13** (acetato de ácido ursólico).

Tabela 9 - Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **12** e **13** , do acetato de ácido oleanólico e do acetato de ácido ursólico [77, 78].

Nº de C	$\delta^{13}C$			
	Composto 12	**do acetato de ácido oleanólico**	**Composto 13**	**acetato de ácido ursólico**
1	38,2	38,4	38,1	38,7
2	23,3	23,6	23,4	23,5
3	80,9	81,1	80,9	81,1
4	37,7	37,8	37,7	37,9
5	55,3	55,4	55,3	55,4
6	18,2	18,3	18,2	18,3
7	32,5	32,7	32,4	32,9
8	39,3	39,9	39,5	40,0
9	47,4	47,6	47,5	47,7
10	36,9	37,0	36,9	36,9
11	24,1	23,6	23,5	23,3
12	122,5	123,0	125,7	124,3
13	143,6	144,4	137,9	139,3
14	41,8	41,7	41,6	42,0
15	27,7	26,6	29,7	28,7
16	22,9	23,4	27,4	26,6
17	46,5	46,6	47,9	48,1
18	38,8	41,3	52,5	52,8
19	45,8	45,8	40,9	39,1
20	30,7	30,6	39,0	38,8
21	33,8	33,8	30,6	30,7
22	32,8	32,3	36,7	36,7
23	23,6	28,1	33,0	28,2
24	16,1	15,6	17,0	15,5
25	15,5	15,3	15,4	15,7
26	17,1	16,8	17,1	16,9
27	25,9	26,0	23,6	23,6
28	183,1	181,0	183,4	181,0
29	33,6	33,1	16,6	16,9
30	21,2	23,6	21,2	21,2
31	171,0	171,3	171,0	171,3
32	21,3	21,3	21,3	21,3

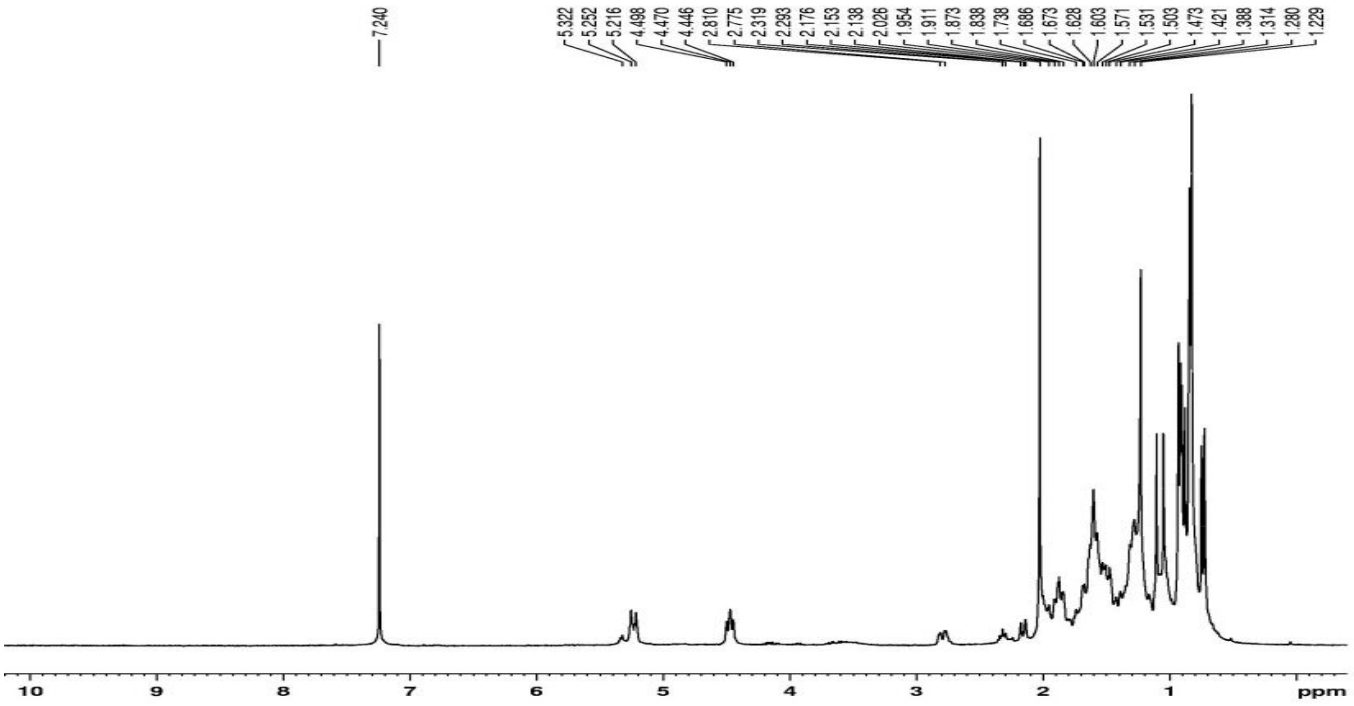


Figura 40 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **12** e **13**

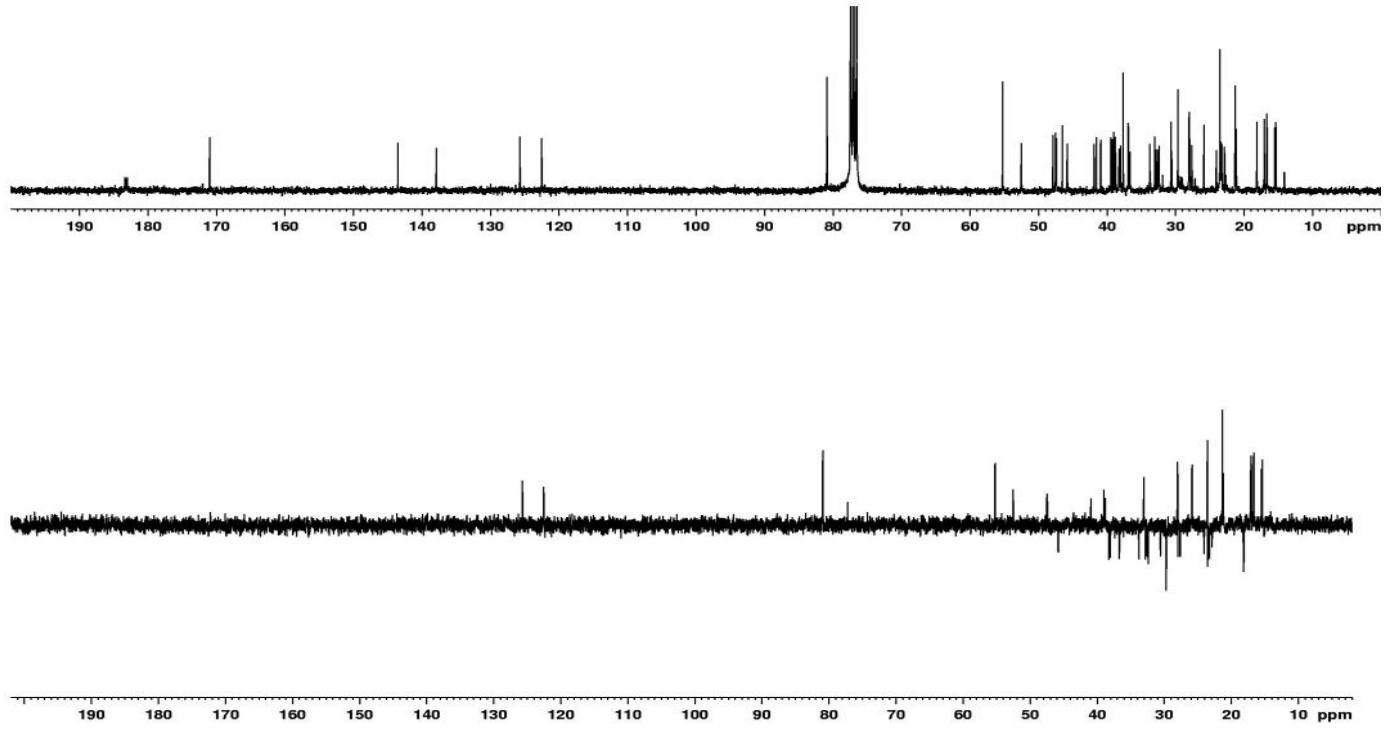
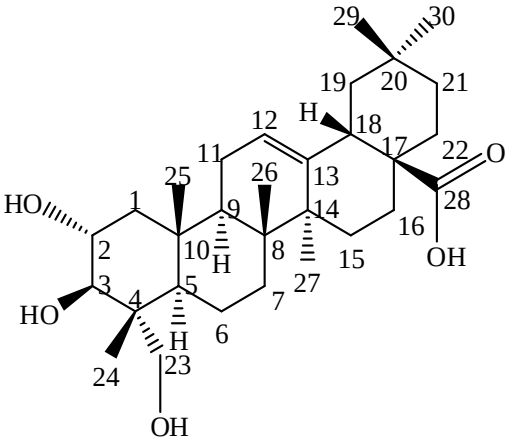


Figura 41 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º dos compostos **12** e **13**.

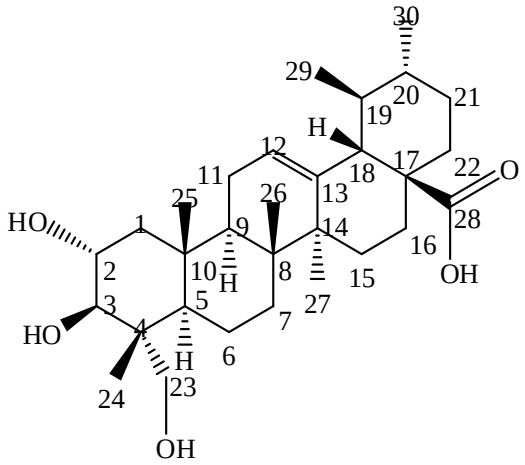
4.4.4 Identificação dos compostos, ácido arjunólico (14) e ácido asiático (15)

Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) (Figura 43) dos compostos **14** e **15,** obtidos em mistura na fração MPA88, indicaram tratar-se de dois triterpenos ácidos. Foram observados no espectro de RMN de ^{1}H os sinais referentes a hidrogênios olefínicos em δ 5,24 (2H, *m*, H-12), sinais de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos em δ 3,69 (2H, *m*, H-2), δ 3,35 (2H, *d*, *J* = 9,1 Hz, H-3), δ 3,50 (2H, *d*, *J* = 11,2 Hz, H-23a) e δ 3,26 (2H, *d*, *J* = 11,2 Hz, H-23b).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) de **14** e **15** foi possível listar dois conjuntos de 30 sinais, referentes a dois triterpenos. Destacam-se os pares de sinais em δ 145,4(C) e 123,4(CH) e δ 139,6 (C) e 126,6 (CH), característicos de esqueletos oleanano e ursano, respectivamente. Observaram-se, também, sinais de carbonos de carboxilas de ácido em δ 181,7 e 181,9 e três sinais de carbonos carbinólicos, sendo dois CH (δ 78,2 e 69,7) e um CH_2 (δ 66,3). As intensidades destes sinais indicaram que estes grupos funcionais estão presentes nas duas estruturas e se localizam no anel A; esta conclusão se deve à coincidência dos sinais dos carbonos localizados nos anéis B, C, D e E. A localização da carboxila em C-17 foi definida, em ambos os casos, pelos valores de deslocamento químico de C-18 (δ 42,7 em **14** e δ 54,3 em **15**), da mesma maneira que para os compostos **12** e **13**. Quanto à localização das hidroxilas, uma busca na literatura mostrou que os dados de RMN ^{1}H e ^{13}C são compatíveis com a presença das mesmas em C-2α, C-3β e C-23, levando à identificação de **14** como sendo o ácido 2α, 3β, 23- tri-hidroxiolean-12-en-28-óico, conhecido também como ácido arjunólico [79] (Figura 42) e de **15** como sendo o ácido 2α, 3β, 23- tri-hidroxiurs-12-en-28-óico, denominado ácido asiático [80] (Figura 42), descritos pela primeira vez no gênero *Macrosiphonia*.



Ácido 2α, 3β, 23-trihidroxiolean-12-en-28oico (**14**)



Ácido 2α, 3β, 23-trihidroxiurs-12-en-28oico (**15**)

Figura 42 - Estruturas dos compostos **14 e 15.**

Tabela 10 - Dados de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75 MHZ) dos compostos **14** e **15** e dos triterpenos ácido arjunólico e ácido asiático [79 e 80].

Nº dos C	$\delta^{13}C$			
	Composto 14	**Ácido arjunólico**	**Composto 15**	**Ácido asiático**
1	47,2	46,3	47,9	46,9
2	69,7	68,8	69,7	69,4
3	78,2	78,2	78,2	78,3
4	44,1	43,5	44,1	44,0
5	48,2	47,8	48,2	48,3
6	19,0	18,4	19,0	20,1
7	33,2	32,8	33,6	33,7
8	39,0	39,7	40,6	41,3
9	48,9	48,1	48,0	47,5
10	39,0	38,3	31,6	28,6
11	24,0	23,8	24,5	24,9
12	123,4	122,5	126,6	126,5
13	145,4	144,8	139,6	139,1
14	43,0	42,1	43,4	43,3
15	28,8	28,2	29,2	29,4
16	24,6	23,6	25,3	25,6
17	47,6	47,6	48,2	48,6
18	42,7	41,6	54,3	54,2
19	45,8	42,1	40,4	40,2
20	30,7	29,9	40,4	40,8
21	31,8	30,8	33,8	31,5
22	34,9	34,1	38,0	38,2
23	66,3	66,4	66,3	66,1
24	13,9	14,2	13,9	14,1
25	17,5	17,2	17,7	17,7
26	17,8	17,4	17,8	18,1
27	26,5	26,0	24,2	24,0
28	181,9	180,3	181,7	181,9
29	33,6	33,1	17,7	17,2
30	24,0	23,7	21,8	21,8

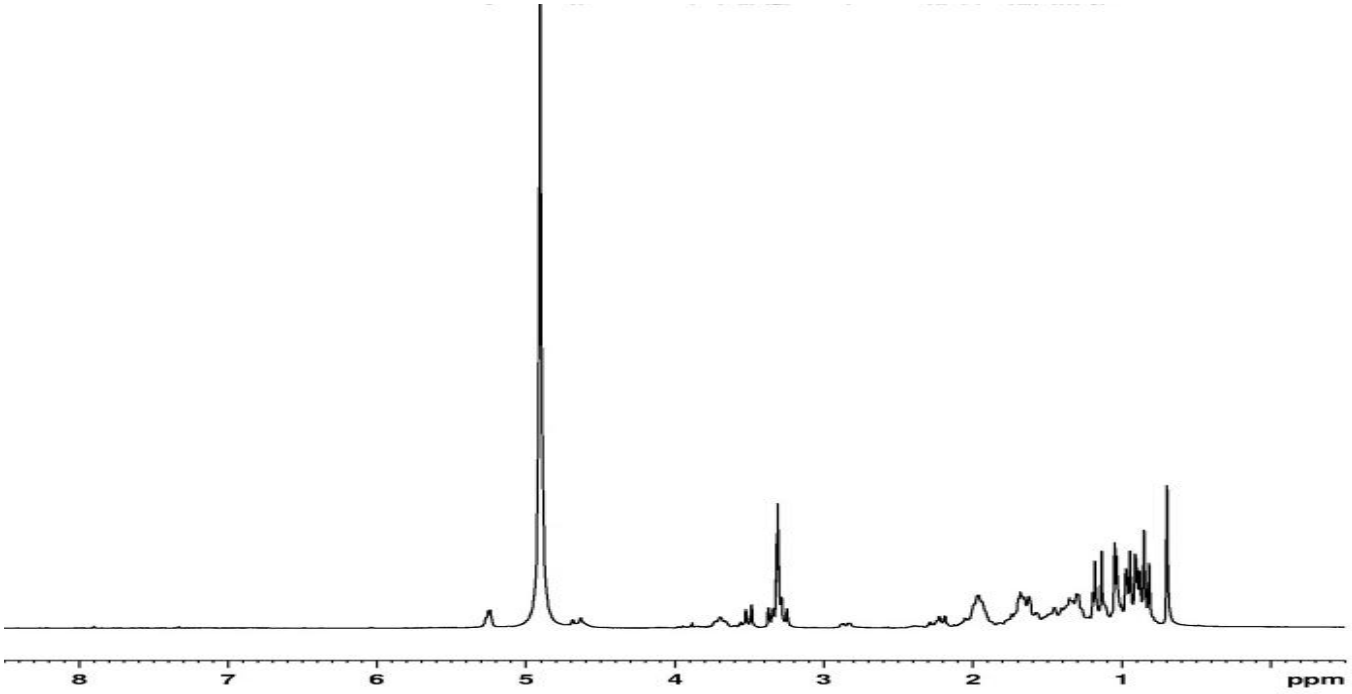


Figura 43 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) dos compostos **14** e **15**.

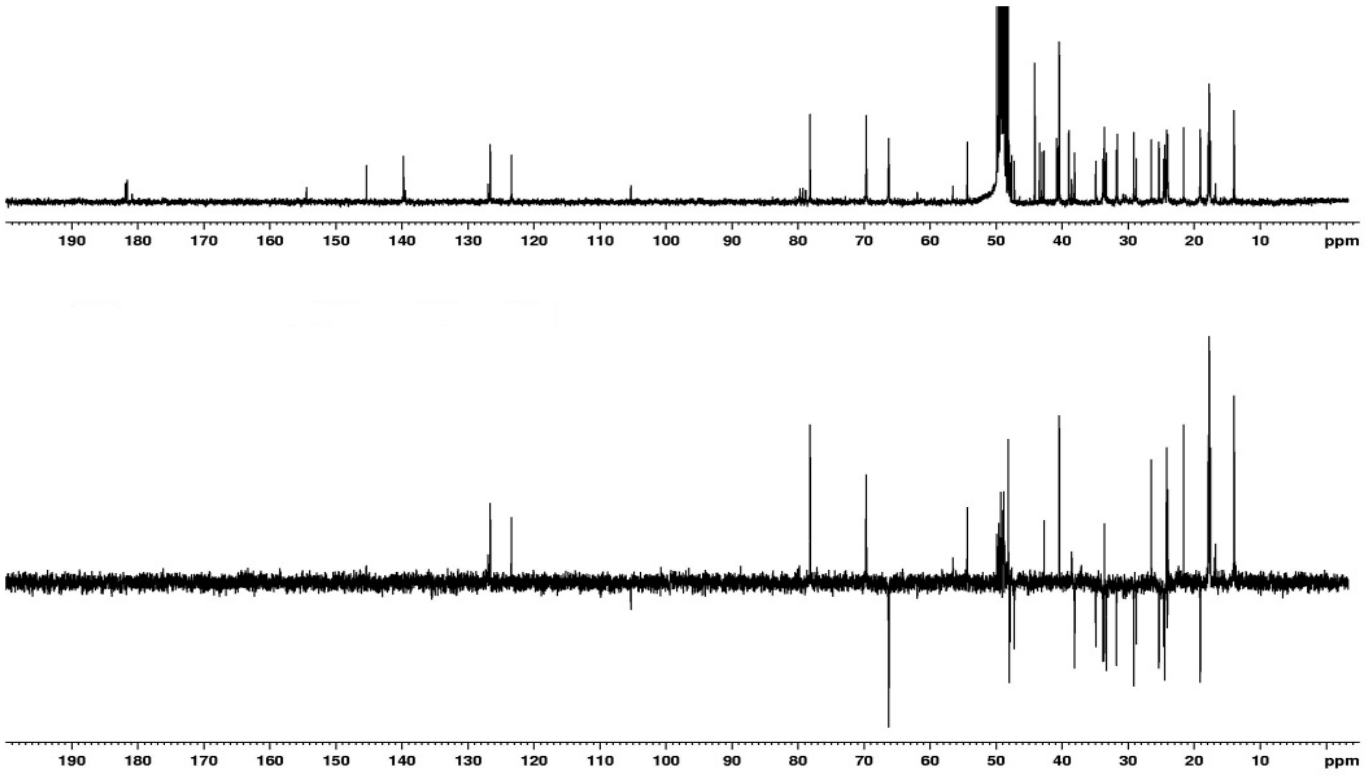


Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) e DEPT 135º dos compostos **14** e **15**.

4.5 Esteroides

Para as substâncias **16** e **17**, obtidas em mistura na fração MPH63 foram observados no espectro de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 46) sinais para hidrogênios olefínicos, em δ 5,33 (2H, *dl*, *J* = 6,0Hz, H-6), 5,13 (1H, *dd*, *J* = 15,0 e 9,0Hz, H-22) e 4,99 (1H, *dd*, *J* = 15,0 e 9,0Hz, H-23) e sinais referentes a hidrogênios carbinólicos olefínicos em e δ 3,50 (2H, *m*, H-3). No espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 47) foi possível listar os sinais referentes a carbonos carbinólicos em δ 71,8, que pelo experimento do DEPT 135º foi identificado como CH, referentes a dois carbonos, e sinais em δ 121,7(CH) e 140,7 (C), referentes a dois carbonos cada. A reunião de todos os dados das substâncias **16** e **17** (Figura 45), juntamente com os dados obtidos da literatura [81] (Tabela 11) permitiu a identificação das mesmas como sendo o β-sitosterol e o estigmasterol, respectivamente.

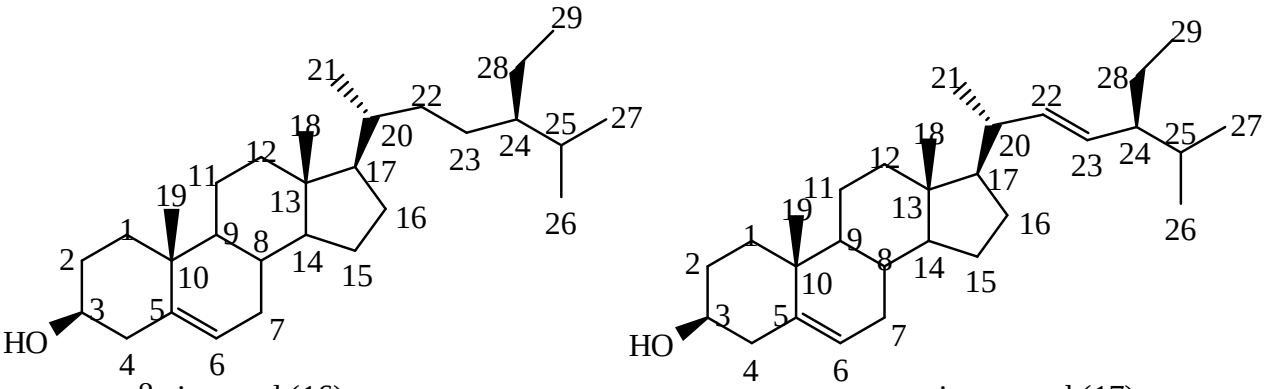


Figura 45 - Estruturas dos compostos **16** e **17**.

Tabela 11 – Dados de RMN ^{13}C (75 MHZ, $CDCl_3$,) dos compostos **16** e 17 e dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol [81].

Nº de C	$\delta^{13}C$			
	composto 16	**β-sitosterol**	**composto 17**	**estigmasterol**
01	37,2	37,3	37,2	37,2
02	31,7	31,6	31,6	31,6
03	71,8	71,7	71,8	71,8
04	42,3	42,3	42,2	42,3
05	140,7	140,8	140,7	140,7
06	121,7	121,6	121,7	121,7
07	31,9	31,9	31,9	31,9
08	31,9	31,9	31,9	31,9
09	50,3	50,2	50,1	50,1
10	36,5	36,5	36,5	36,5
11	21,1	21,1	21,2	21,2
12	39,8	39,8	39,7	39,6
13	42,3	42,3	42,3	42,3
14	56,9	56,8	56,9	56,8
15	24,3	24,3	24,3	24,3
16	28,9	28,9	28,9	28,9
17	56,0	56,1	56,0	55,9
18	11,9	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,4	19,4	19,4
20	36,1	36,2	40,5	40,5
21	18,8	18,8	21,2	21,2
22	33,9	34,0	138,3	138,3
23	26,1	26,1	129,3	129,2
24	45,8	45,9	51,2	51,2
25	29,1	29,2	31,9	31,9
26	19,8	19,8	21,1	21,0
27	19,0	19,1	19,0	19,0
28	23,1	23,1	25,4	25,4
29	12,2	12,3	12,2	12,2

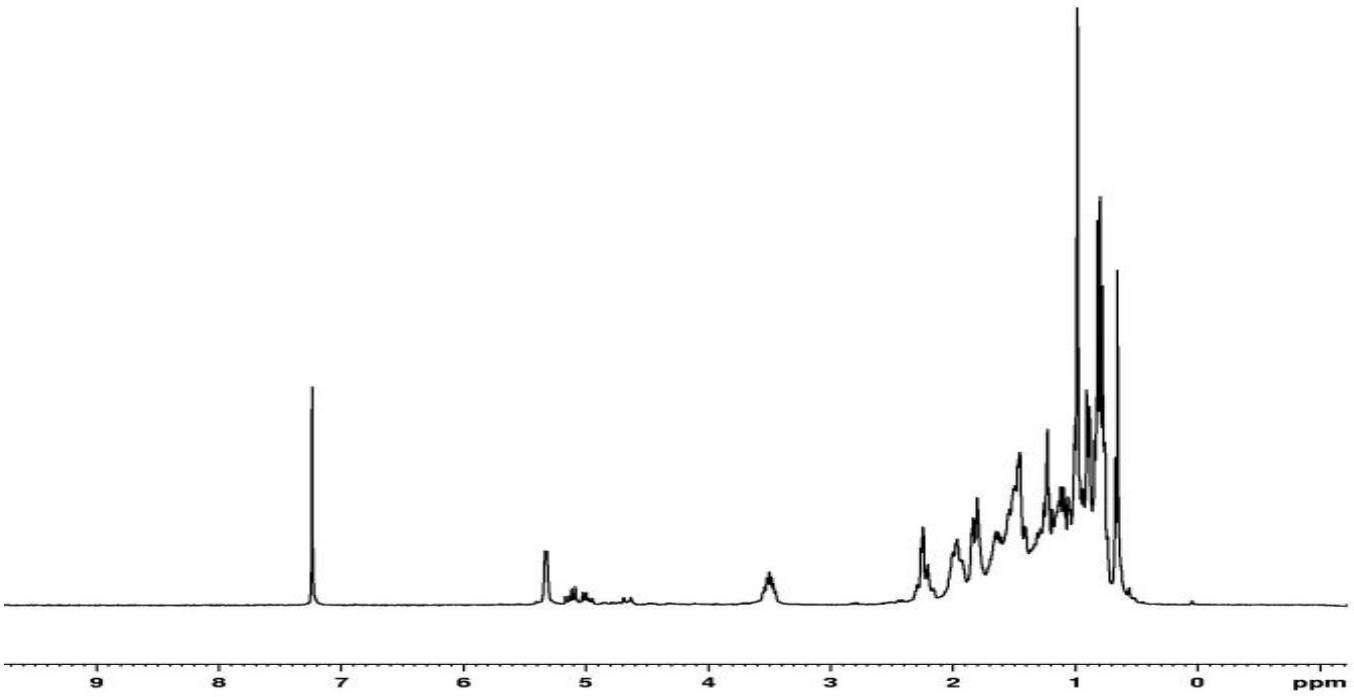


Figura 46 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) dos compostos **16** e **17**.

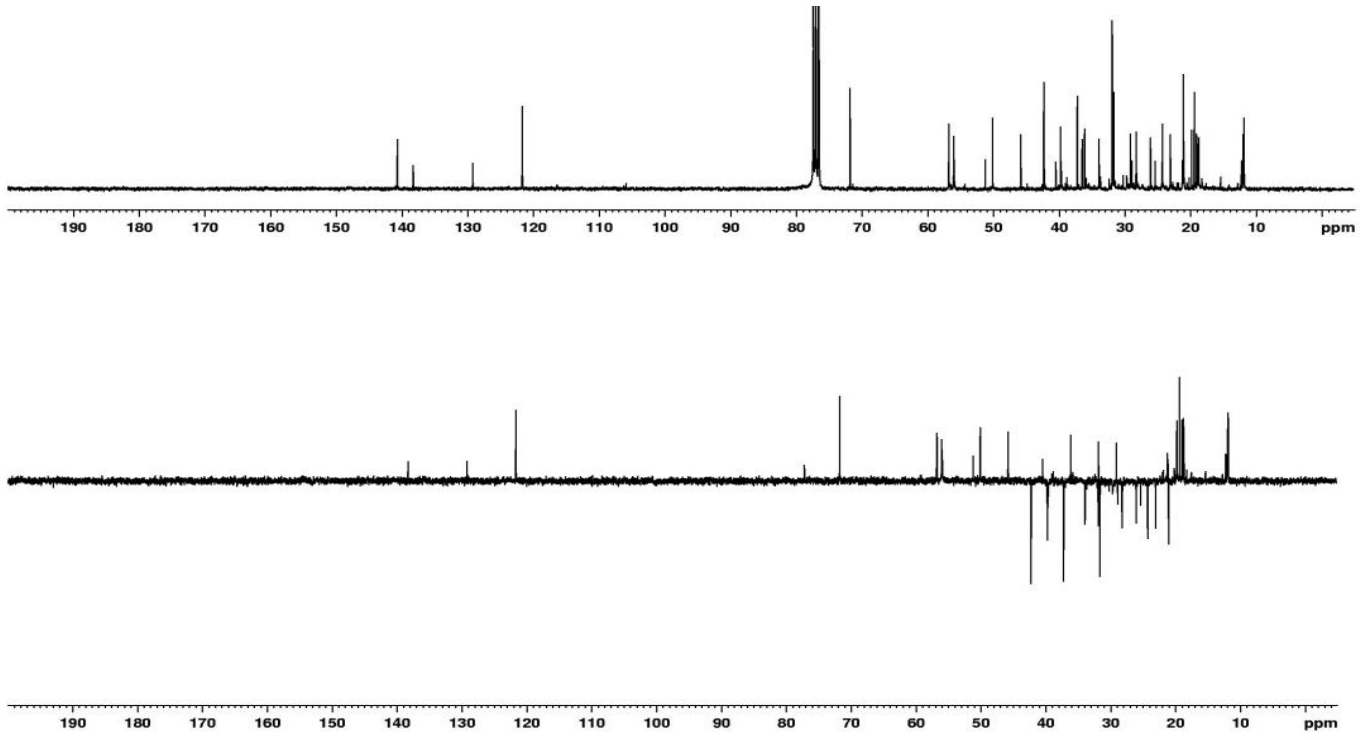


Figura 47 - RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) e DEPT 135º dos compostos **16** e **17**.

4.6 Teste de atividade genotóxica

O perfil genotóxico da *M. petraea* foi delineado pela avaliação dos extratos aquoso e etanólico. Os resultados obtidos para o extrato aquoso apresentaram aumento nas frequências de mutações em todas as concentrações testadas (1,25 e 2,5 mg/mL) no cruzamento padrão (ST) e para o cruzamento de alta bioativação (HB; 1,25, 2,5 e 5,0 mg/mL) quando comparadas às do grupo controle, revelando o efeito genotóxico para este extrato. Além disso, os indivíduos resultantes do cruzamento de alta bioativação (HB) apresentam frequência de mutação quatro vezes maior do que a observada nos indivíduos ST. Este fato indica que os compostos presentes no extrato aquoso após serem bioativados pelas enzimas do citocromo P450 tornam-se potencialmente mais genotóxicos.

Em relação ao extrato etanólico (ExtEtOH), também foi observado aumento nas frequências de mutações em todas as concentrações avaliadas (0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL) para ambos dos cruzamentos (ST e HB), sendo que o cruzamento de alta bioativação (HB) apresentou mutações cerca de 3 vezes maiores que o cruzamento padrão. Nesse sentido, o extrato etanólico apresenta característica semelhante àquelas presentes no extrato aquoso, pois em ambas amostras as enzimas do citocromo P450 potencializaram os eventos mutacionais.

Estes dados sugerem que nas condições experimentais descritas, os extratos aquoso e etanólico obtidos das raízes de *M. petraea*, apresentam atividade genotóxica, a qual é acentuada após sua metabolização (Figura 48).

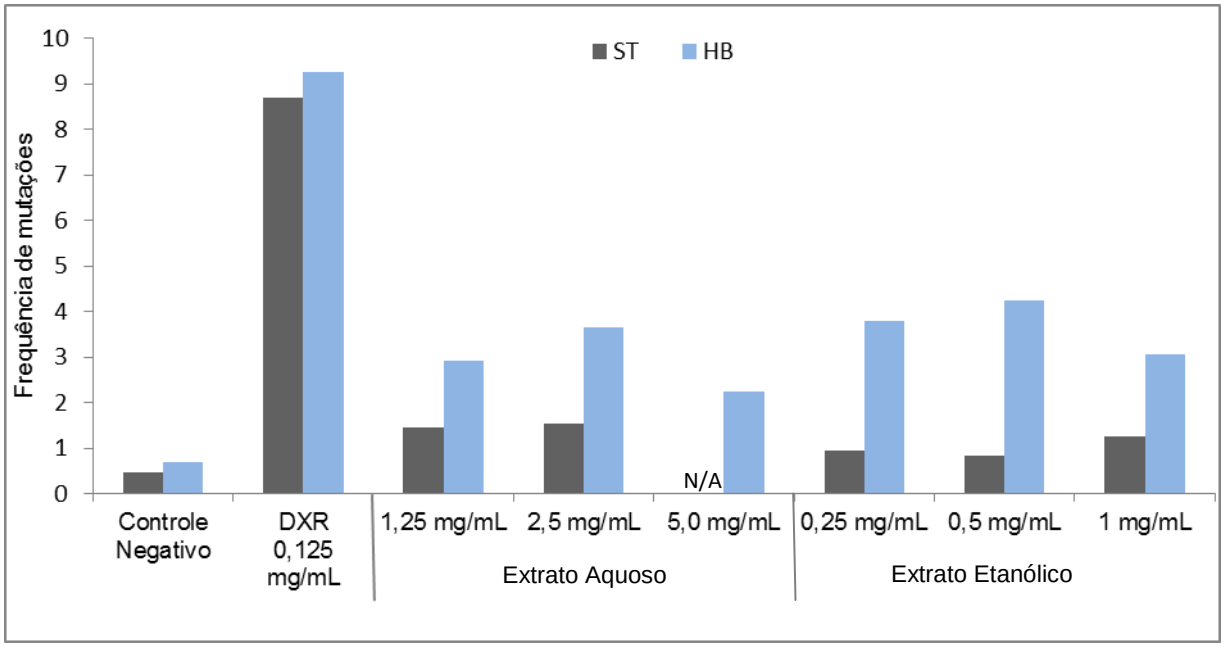


Figura 48 – Gráfico representativo da frequência de mutações em células somáticas de *D. melanogaster* obtidas de ambos os cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico com os extratos aquoso e etanólico das raízes de *M. petraea*, do controle negativo (1% Tween-80, 3% de etanol e água) e controle positivo cloridrato de doxorrubicina (DXR). Amostra não avaliada (N/A).

5. Conclusões

Plantas da família Apocynaceae demostram grande potencial como produtoras de compostos bioativos, muitos deles tóxicos. O gênero *Macrosiphonia* é considerado um dos mais importantes desta família, e abrange algumas espécies consideradas medicinais. No presente trabalho foi investigada a raiz de *M. petraea*, conhecida como velame, a qual é comercializada com fins medicinais, e cujos extratos, etanólico e aquoso, apresentaram atividade genotóxica nas concentrações testadas neste trabalho. Este estudo resultou na identificação de compostos da classe dos triterpenos **6**-**15**, destacando-se o ácido arjunólico (**6**), que possui atividade anti-inflamatória, e o ácido asiático (**7**), duas lignanas (**4** e **5**), um ácido graxo hidroxilado (**3**), o qual consta como sendo dotado de atividade antibacteriana, e dois pregnanos, neridionona A (**1**) e cybisterol (**2**). Esta classe de compostos é precursora dos cardenolídios, um importante grupo de substâncias que abrange alguns com propriedades tóxicas. Os próprios pregnanos são compostos dotados de atividades biológicas e que podem estar envolvidos na ação detectada no extrato etanólico das raízes de *M. petrae*.

Referências

[1] Phillipson, J. D. *Phytochemistry* **2001**, 56, 237–243.

[2] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, M. K. *J. Nat. Prod. Rep*. **2000**, 17, 215–234.

[3] Geissman, T. A.; Crout, D. H. G.; *Organic Chemistry of Secundary Plant Metabolism*. 1st ed. San Francisco: Freemam, Cooper & Company, 1969.

[4] AKERELE, O. *Fitoterapia* **1998**, 5, 355-363.

[5] Cardoso, I. N. *Plantas tóxicas no perímetro urbano de Caxias, Maranhão*. [Monografia.] Caxias: CESC-UEMA. 2004.

[6] Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3th ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2001.

[7] Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F. JR.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. *Quim. Nova,* **2002**, 25, 429-438.

[8] WHO, Quality control methods for medicinal plants materials. Geneva: World Health Organization. **1998**.

[9] Neto, G. G.; Morais, R. G. *Acta bot. bras*. **2003**, 17, 561-584.

[10] Borlaug, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: *R. Bailey (ed.) Global warming and other eco-myths*. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA, 2002, 29-60.

[11] Machado, R. B.; Neto, M. B. R.; Pereira P. G. P.; Caldas E. F.; Gonçlves D. A.; Santos, N. S.; Tabor, K.; Steininger, M. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, 2004.

[12] MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*, 1st ed. Editora MS, Brasília, 2009.

[13] Garlet, T. M. B.; Irgang, B. E. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **2001**, 4, 9-18.

[14] Simpson, M. G. Plant systematic, *Elsevier Academic Press*, **2006**, California, 590p.

[15] Souza, V. C. & Lorenzi, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, *Nova Odessa*, **2005** p-640.

[16] Di Stasi L.C, Hiruma-Lima C.A, Plantas medicinais na Amazõnia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP, p. 375-385, 2002.

[17] Carvalho, M. G.; Cardozo, M. A. R.; Silva, V. C.; Werle, A. A. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **2007**, 36, 127-133.

[18] Cronquist, A.; *The evolution and classification of flowering plants,* 2nd ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

[19] Yu, Y. L.; Li, X. A.; Ke, C. Q.; Tang, C. P.; Yang, X. Z.; Li, X. Q.; Ye, Y. *Chin. Chem. Left.* **2010**, 21, 709-711.

[20] Abe, F.; Yamauchi, T. *Phytochemistry* **1988**, 27, 575-577.

[21] Abe, F.; Mori, T.; Yamauchi, T. *Chem. Pharm, Bull.* **1984**, 32, 2947-2956.

[22] Malheiros, A.; Schuquel, I. T. A.; Vidotti, G. J. *Quim. Nova* **1997**, 20, 457-459.

[23] Eshbakova, K. A.; Aisa, H. A. *Chem. Nat. Compd.* **2011**, 46, 974-975.

[24] Abe, F.; Nagao, T.; Mori, Y.; Yamauchi, T.; Saiki, Y.; *Chem. Pharm. Bull*. **1987**, 35, 4087-4092.

[25] Abe, F.; e Yamauchi, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2028-2031.

[26] Murzagal, U.; Chumbalo, T.; Nurgalie, G.; Tegisbae, E. *Khimiya Prir. Soedin.* **1973**, 3, 431.

[27] Jacome, R.; Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Wagner, H. *Quim. Nova* **2004**, 27, 897-900.

[28] Marques, M. F. S.; Kato, L.; Leitão, H. F.; Reis, F. *Phytochemistry* **1996**, 41, 963-967.

[29] Barreto, A. D.; Carvalho, M. G.; Nery, I. D.; Gonzaga, L.; Kaplan, M. A. C. *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 430-434.

[30] Waltenberger, B.; Rollinger, J. M.; Griesser, U. J.; Stuppner, H.; Gelbrich, T. *Acta Crytallogr, Sect. C-Cryst. Struct. Commun.* **2011**, 67, 409-412.

[31] Sa Barreto, A.; Amaral, A. C. F.; Silva, J. R. D.; Schripsema, J.; Rezende.; Pinto, A. C.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 1133-1135.

[32] Silva, J. R. D.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C.; Pinheiros, M. L. B.; Cordeiro, M. C.; Tamborini, E.; Young, C. M.; Bolzani, V. D. *Quim. Nova* **1998**, 21, 702-704.

[33] Bai, L. M.; Zhao, M.; Toki, A.; Sakai, J.; Yang, X. Y.; Bai, Y. H.; Ando, M.; Hirose, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58, 1088-1092.

[34] Siddiqui, B. S.; Khatoon, N.; Begum, S.; Durrani, S. A. *Nat. Prod. Res.* **2009**, 23, 1603-1608.

[35] Zhao, M.; Bai, L. M.; Wamg, L. y.; *et. al. J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1098-1103.

[36] Bai, L.; Wang, L.; Zhao, A.; Hasegawa, T.; Ogura, H.; Kataoka, T.; Hirose, K.; Sakai, J.; Bai, J.; Ando, M.; *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 14-18.

[37] Fu, L. W.; Zhang, S. J.; Wang, J. L.; Zhao, M.; Sakai, J.; Hasegawa, T.; Mitsui, T.; Kataoka, T.; Oka, S.; Kiuchi, M.; Hirose, K.; Ando, M. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 198-206.

[38] Saleem, M.; Akhtar, N.; Riaz, N.; Ali, M. S.; Jabbar, A. *J. Asin Nat. Prod. Res.* **2011**, 13, 1122-1127.

[39] Ali, F. I.; Hashmi, L. A.; Siddiqui, B. S. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, 3, 125-128.

[40] Siddiqui, B. S.; Ilyas, F.; Rasheer, M.; Begum, S. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2077-2084.

[41] Grignon-Dubois, M.; Rezzonico, B. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, 43, 351-352.

[42] Itoh, A.; Kumashiro, T.; Nagakura, N.; Mizushina, Y.; Nishi, T.; Tanahashi, T. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 848-852.

[43] Ruyter, C. M.; Akram, M.; Illahi, I.; Stockigt, J. *Planta Medica* **1991**,57, 328-330.

[44] Simões, A. O.; Kinoshita, L. S.; Endress, M .E. Novon. **2007**, 17, 87-90.

[45] Simões, A. O.; Endress, M. E.; Niet, V. T.; Kinoshita, L. S.; Conti, E. *American Journal of Botany*, **2004**, 91, 1409-1418.

[46] Barban J. R. *Revisão Taxonômica do Gênero Macrosiphonia Muell. – Arg. (Apocynaceae)*. [Dissertação de Mestrado] Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1985.

[47] Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Br. J. Pharmacol.* **1986**, 88, 937–941.

[48] Neiro R.; Alves R. V.; Cechinel, V. F.; Calixto J. B.; Hawkes J. E. *Planta Med* **2002**, 68, 850-853.

[49] Ribeiro, V. R.; Silva, R. M.; Lima, J. C. S.; Martins, D. T. O. *Braz. J. Pharm. Sci*. **2010**, 46, 515-526.

[50] Mattos, W. M.; Ferreira, J.; Richetti, G. P.; Niero, R.; Yunes, R. A .; Calixto. J. B. *Neuropeptides*. **2006**, 40, 125-132.

[51] Violante, I. M. P.; Souza, I. M.; Venturini, C. L.; Ramalho, A. F. S.; Santos, R. A. N.; Ferrari, M. *Rev. Bras. Farmacogn*. **2009**, 19, 452-457.

[52] Graf, U.; Würgler, F.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B.; Kale, P. G.; *Environ. Mutagen.* **1984**, 6, 153-188.

[53] Bai, L.; Wang, L.; Zhao, A.; Hasegawa, T.; Ogura, H.; Kataoka, T.; Hirose, K.; Sakai, J.; Bai, J.; Ando, M.; *J. Nat. Prod*. **2007**, 70, 14-18.

[54] Abe, F.; Yamauchi, T.; *Phytochemistry* **1976**, 15, 1745-1748.

[55] Huq, M. M.; Jabbar. A.; Rashid, M. A.; Hasan, C. M.; Ito, C.; Furukawa, H.; *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1065-1067.

[56] Chadha, M.; Joshi, N. K.; Mamdapur, V. R. Sipahimalani, A. T. *Tetrahedron* **1970**, 26, 2061-2064.

[57] Schildknecht, H.; Koenig, W.; *Angew. Chem., Int. Ed*. **1968**, 7, 62-63.

[58] O'Donnell, G; Gibbons. Simon. *Phytother. Res*. **2007**, 21, 653-657.

[59] Patel, P.; Cossete, C.; Anumolu, J. R.; Erlemann, K. R.; Grant, G. E.; Rokach, J.; Powell, W. S.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 329, 335-341.

[60] Cossette, C.; Patel, P.; Anumolu, J. R.; Sivendran, S.; Lee, G. J.; Gravel, S.; Graham, F. D.; Lesimple, A.; Maner, O. A.; Rokach, J.; Powell, W. S.; *J. Biol. Chem*. **2008**, 283, 11234-11243.

[61] Macrae, W. D.; Towers, G.H.N. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1207-1220

[62] Gottlieb, O. R. *Revista Acta Amazon*. **1988**, 18, 333.

[63] Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Gilman, A . G. *In: Goodman & Gilman's The Pahrmacological Basis of Therapeutics*; 9th ed; New York: McGraw-Hill, 1996, 1225-1287.

[64] Lobo, A. M.; Lourenço, A. M. *Biossíntese de Produtos Naturais*; 1st ed; Lisboa, IST Press, 2007.

[65] CHU, A.; Dinkova, A.; Davin, L.B.; Bedgar, D. L.; Lewis, N. G. *J. boil. Chem.***1993**, 268, 27026-27033.

[66] Xue, J.; Xie, L.; Liu, B.; Yu, L.; *Chin. J. Nat. Med*. 2010, 8, 414-418.

[67] Carvalho, M. G.; Alves, C. C. F.; Werle, A. A.; Braz-Filho, R. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 497-500.

[68] Yang, M. C.; Lee, K. H.; Kim, K. H.; Choi, S. U.; Lee, K. R.; *Arch Pharm. Res*. **2007**, 30, 1067-1074.

[69] DEWICK, P.M.; *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltda, 2002.

[70] Colona, A. G.; Balba, C. L.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B. M. *Pytochem. Rev*. **2011**, 245-260.

[71] Sobrinho D. C.; Hauptli, M. B.; Appolinário, E. V.; Kollenz, C. L. M.; Carvalho, M. G.; Braz Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc*. **1991**, 2, 15-20.

[72] Balestrin. L.; *et al*.;*Braz. J. Pharmacogn*. **2008**, 18, 230-235.

[73] Barreto, A. D.; Carvalho, M. G.; Nery, I. D.; Gonzaga, L.; Kaplan, M. A. C. *J. Braz. Chem. Soc*. **1998**, 9, 430-434.

[74] Barbosa, L. F.; Mathias, L.; Braz, R.; Vieira, I. J. C. *J. Braz. Chem. Soc*. **2010**, 21, 1434-1438.

[75] Siddiqui, B. S.; Ilyas, F.; Rasheed, M.; Begum, S.; *Phytochemistry* **2004**, 65, 2077-2084.

[76] Li, J.; Lu, J.; Jin, Y-S.; Yang, X-N.; Chen, H-S.; *Chin. J. Nat. Med*. **2008**, 6, 271-274.

[77] Talapatra., S. K.; Sarkar, A. C.; Talapatra, B.; *Phytochemistry* **1981**, 20, 1923-1927.

[78] Kwon, J-H.; Chang, M-J.; Seo, H-W.; Lee, J-H.; Min, B-S.; Na, M.; Kim, J. C.; Woo, M. H.; Choi, J. S.; Lee, H. K.; Bae, K.; *Phytother. Res.* **2008**, 22, 1303-1306.

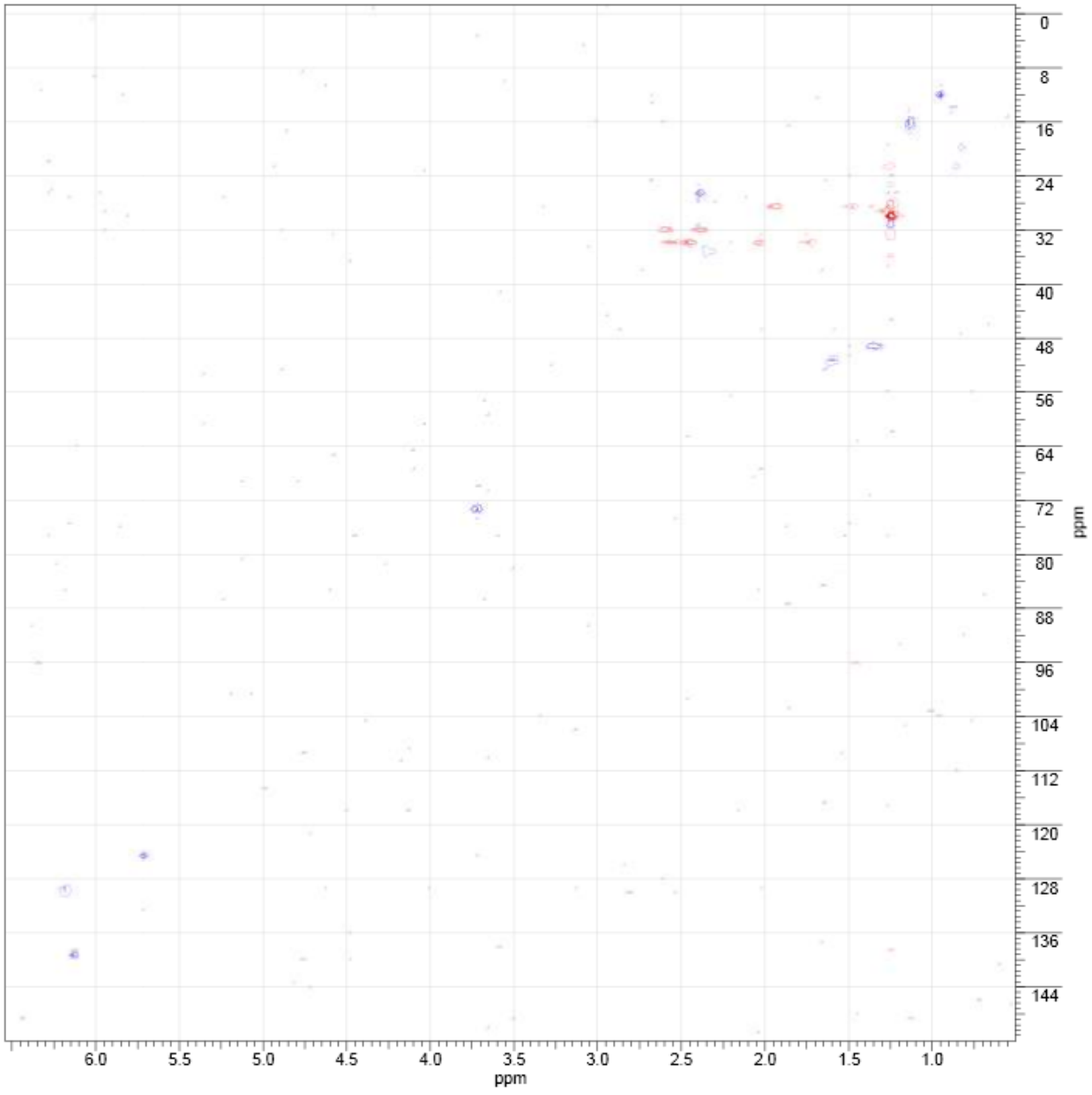
[79] Li, E-N.; Zhou, G-D, Kong, L-Y.; *Chin. J. Nat. Med*. **2009**, 7, 190-192.

[80] Hu, H-B.; Zheng, X-D.; Jian, Y-F.; Liu, J-X.; Zhu, J-H. *Arch. Pharm. Res*. **2011**, 34, 1097-1105**.**

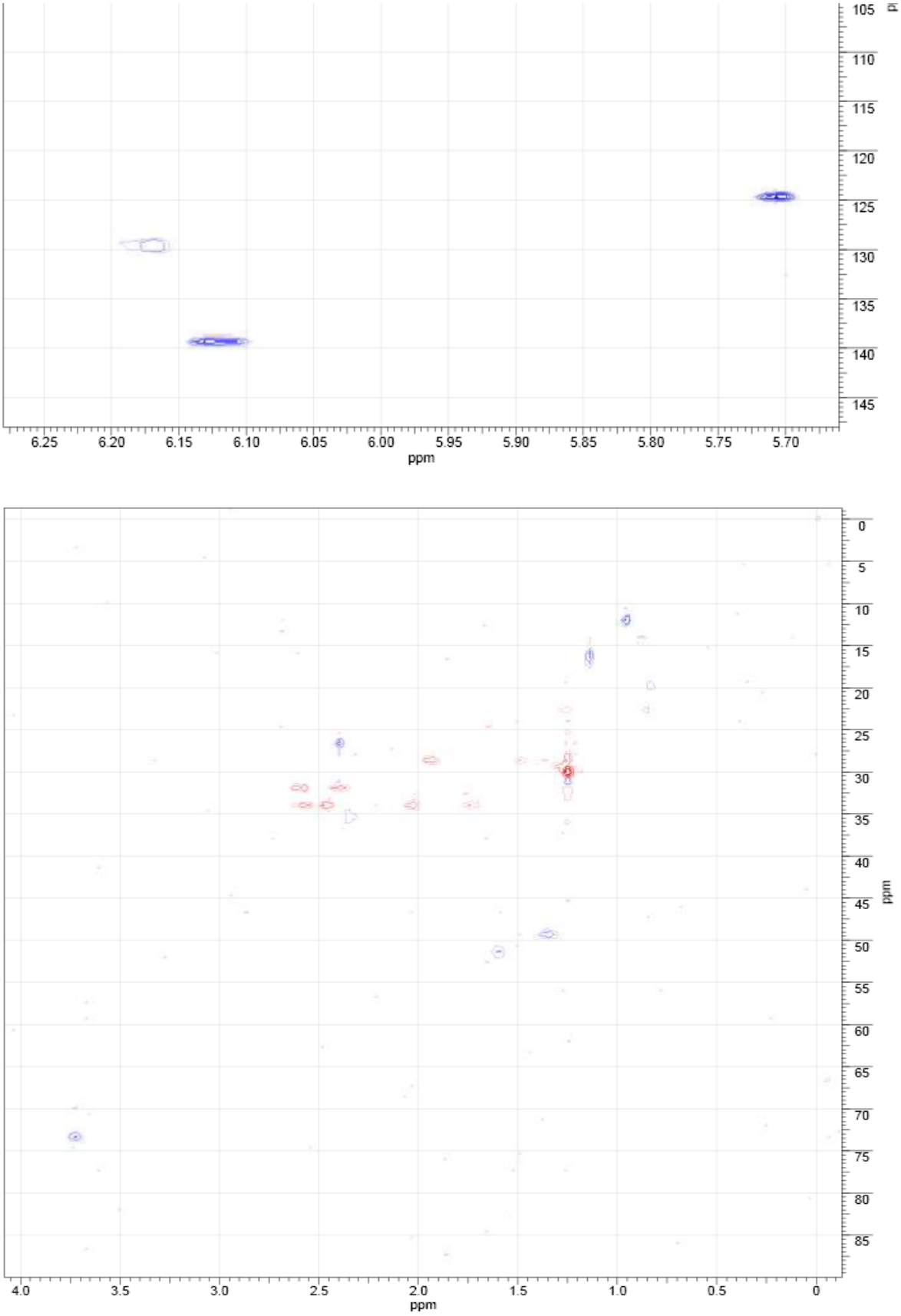
[81] Goularg, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; *Quim. Nova* 1993, 16, 95-100.

Anexo 1

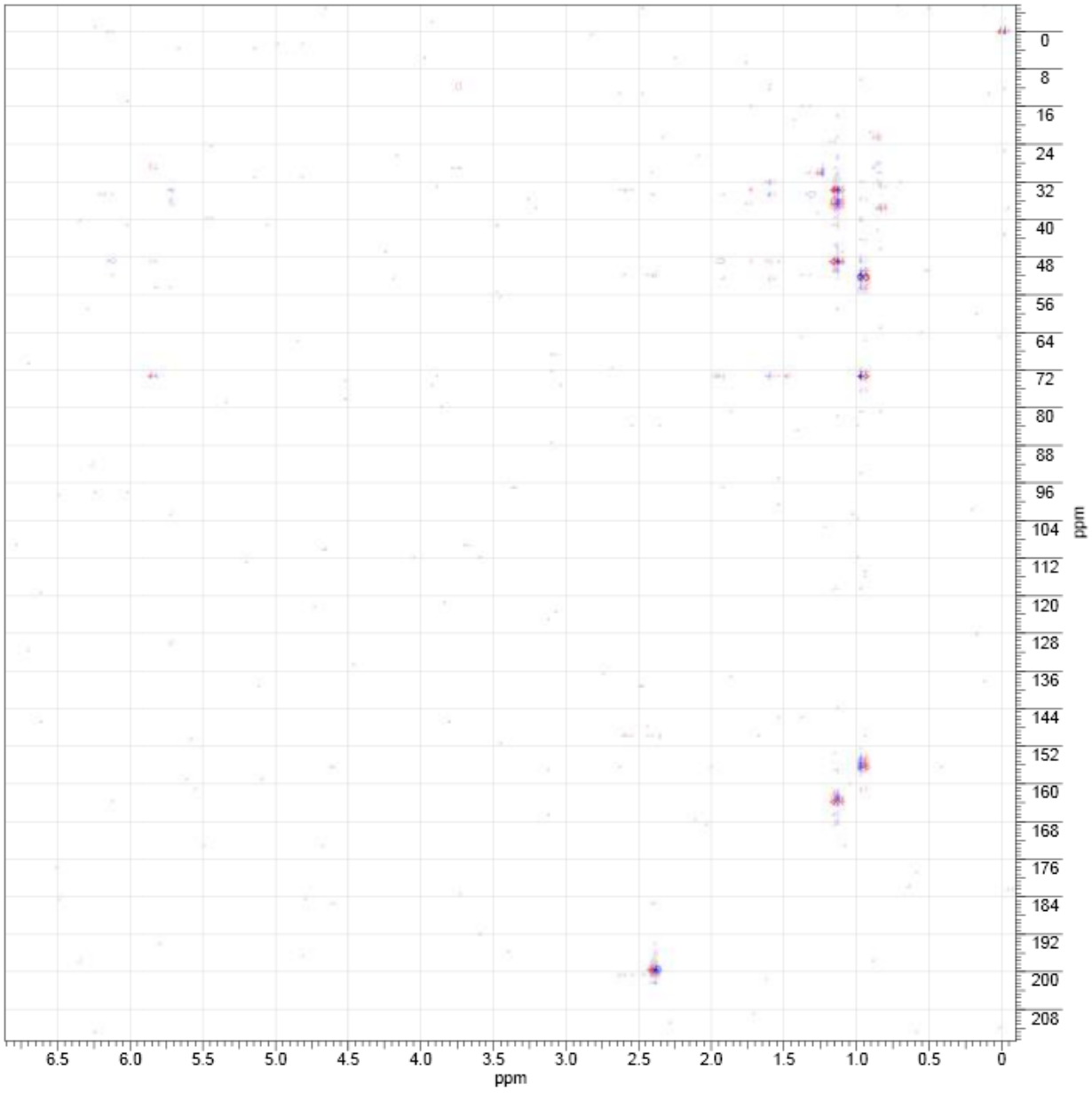
Apresentação dos espectros de RMN bidimensionais, do composto **1** (neridienona A).



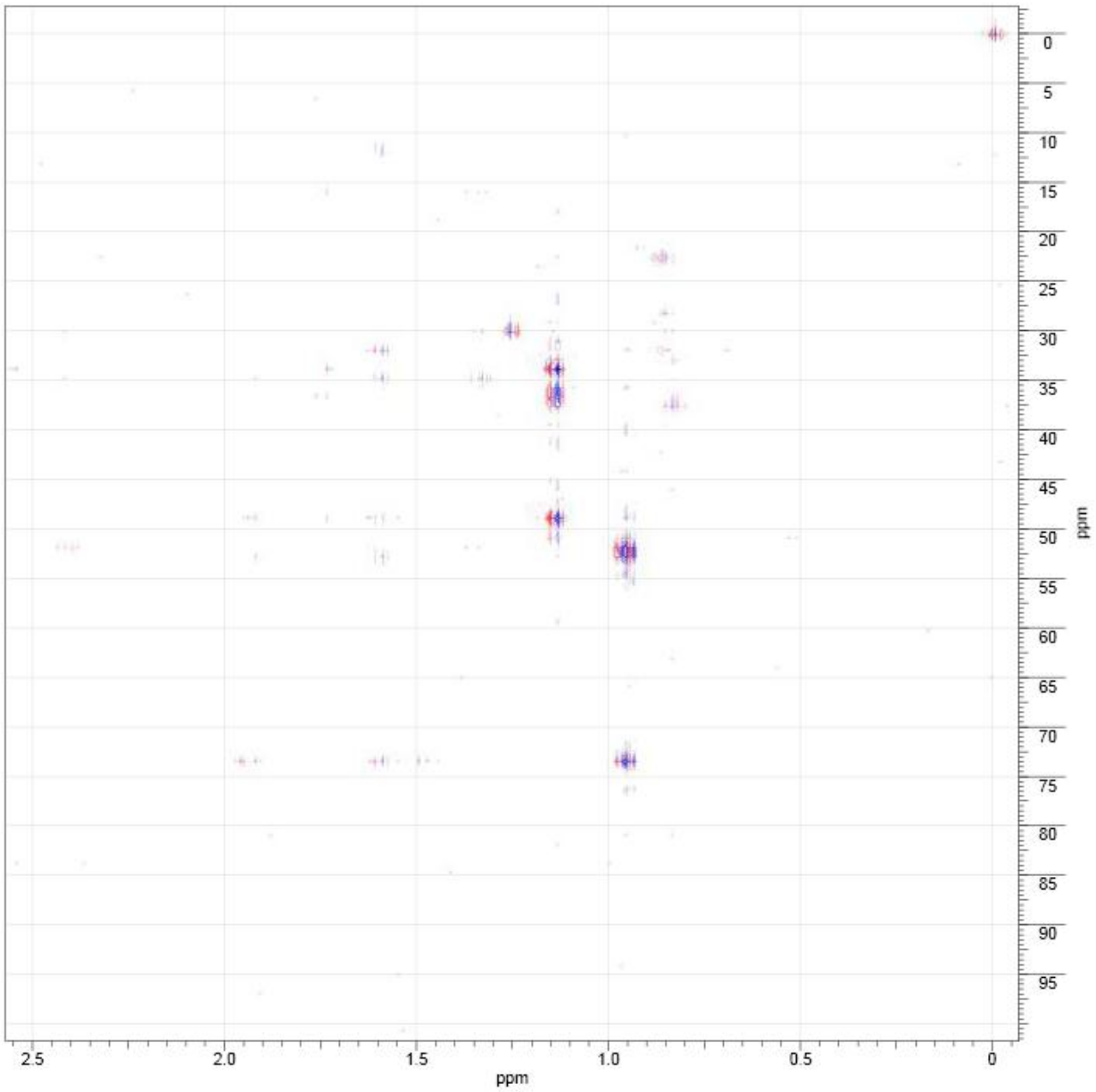
A1a. Espectro do experimento HSQC do composto **1**.



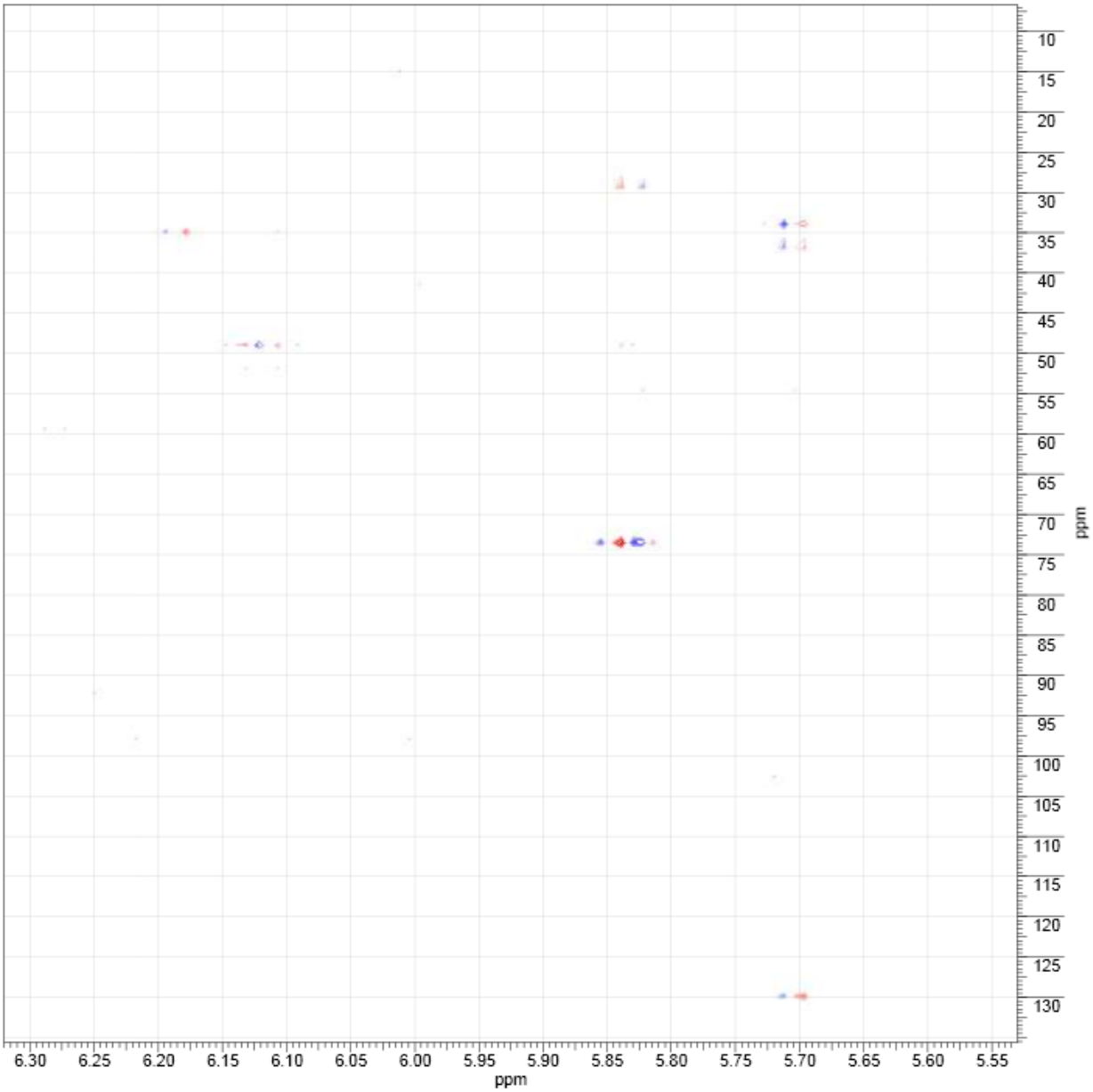
A2a. Ampliações do espectro do experimento HSQC do composto **1**.



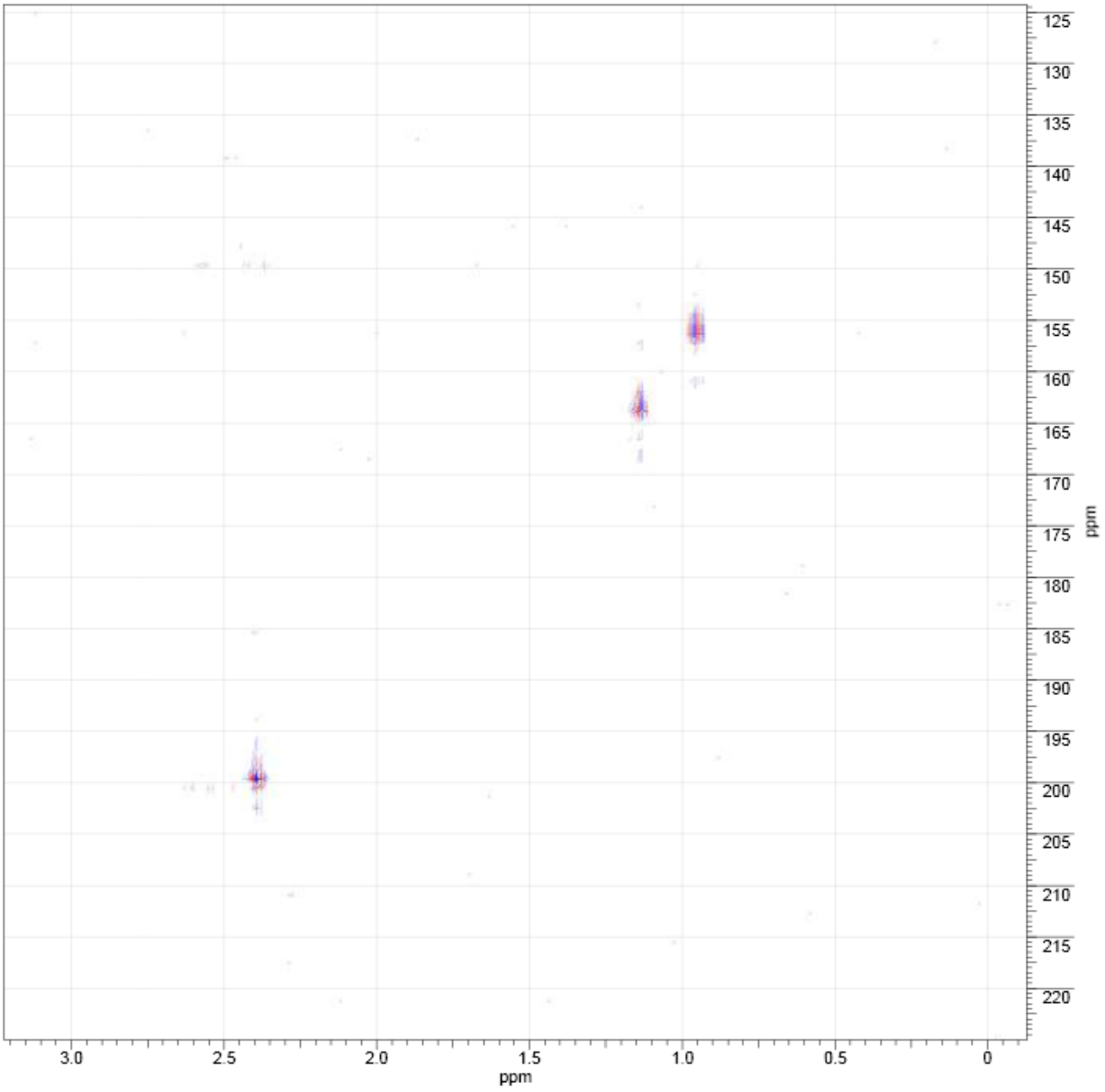
A3a. Espectro do experimento HMBC do composto **1**.



A4a. Ampliação do espectro do experimento HMBC do composto **1**.



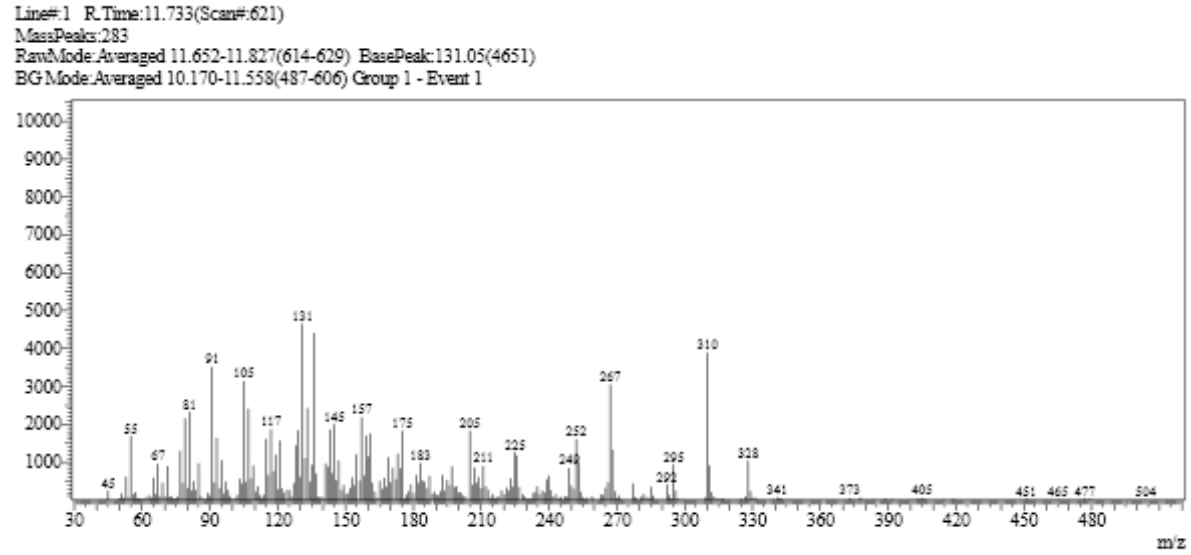
A5a. Ampliação do espectro do experimento HMBC do composto **1**.



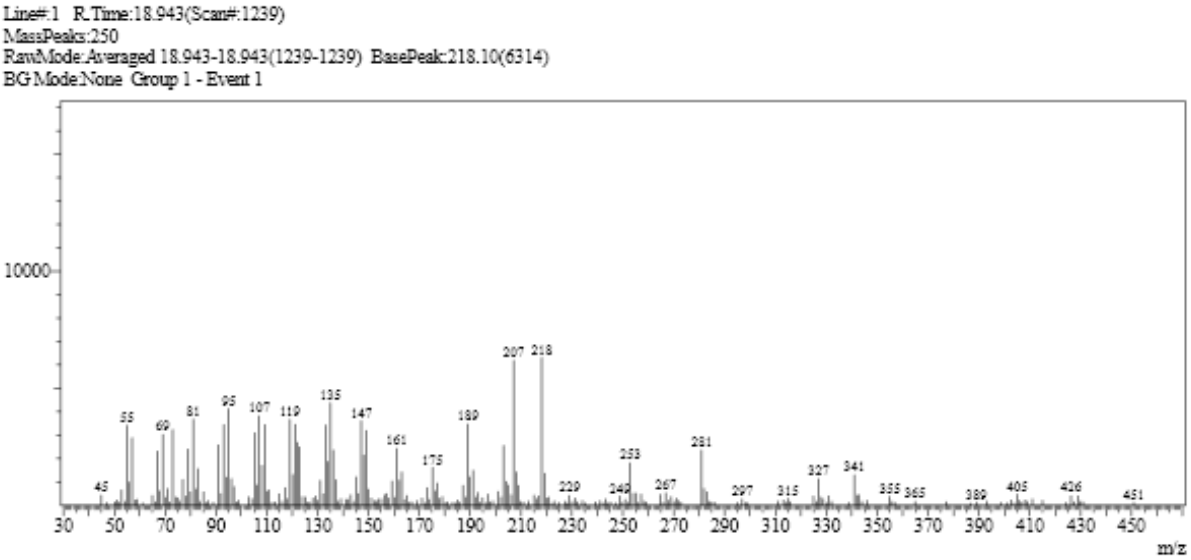
A6a. Ampliação do espectro do experimento HMBC do composto **1**.

Anexo 2

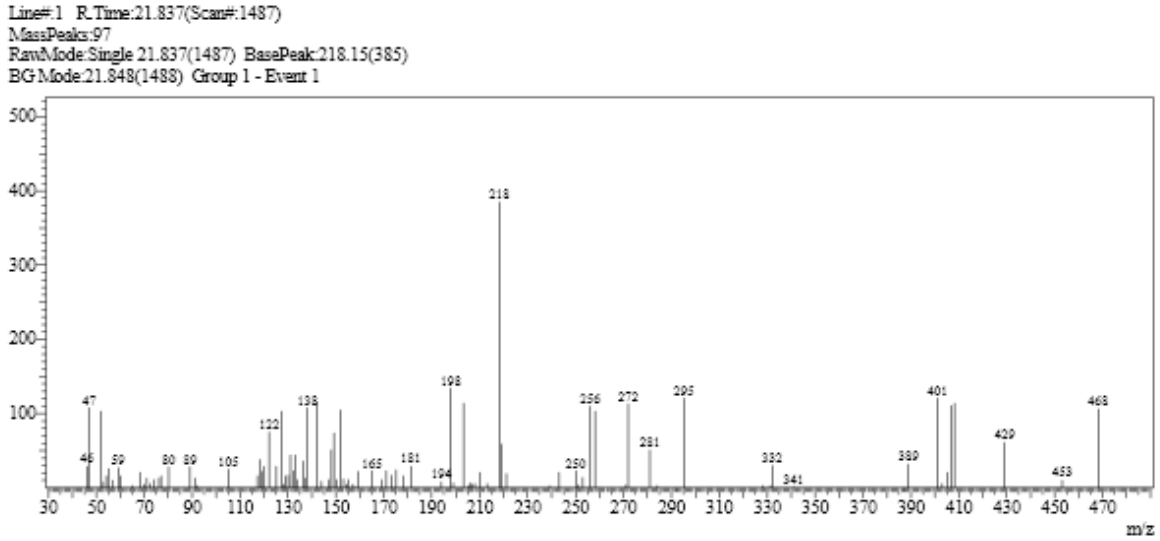
Apresenta os espectros de Massas de baixa resolução dos compostos **2** e de **4** à **17**.



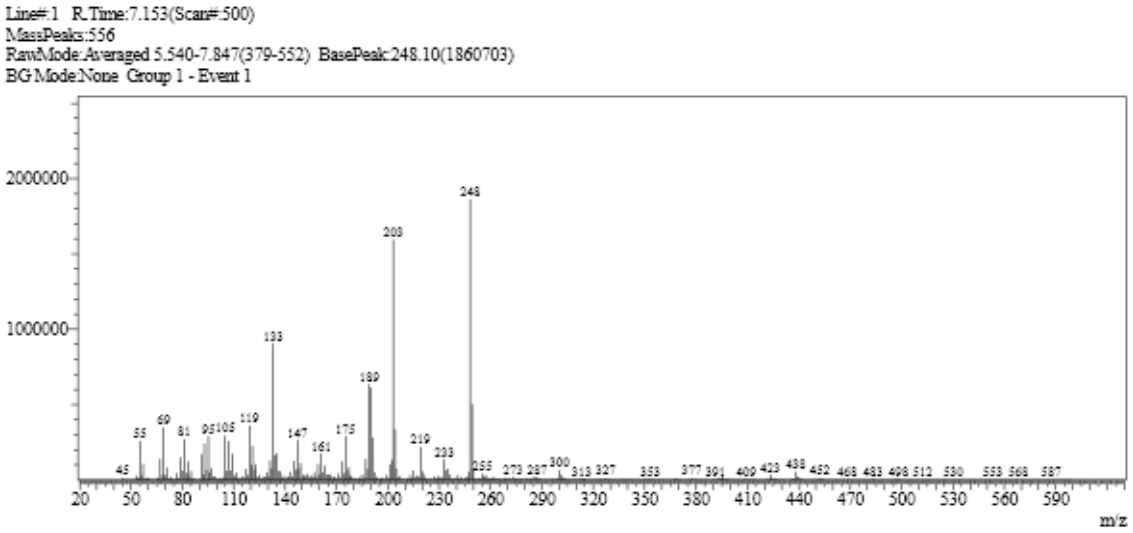
A2a. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , do composto **2**.



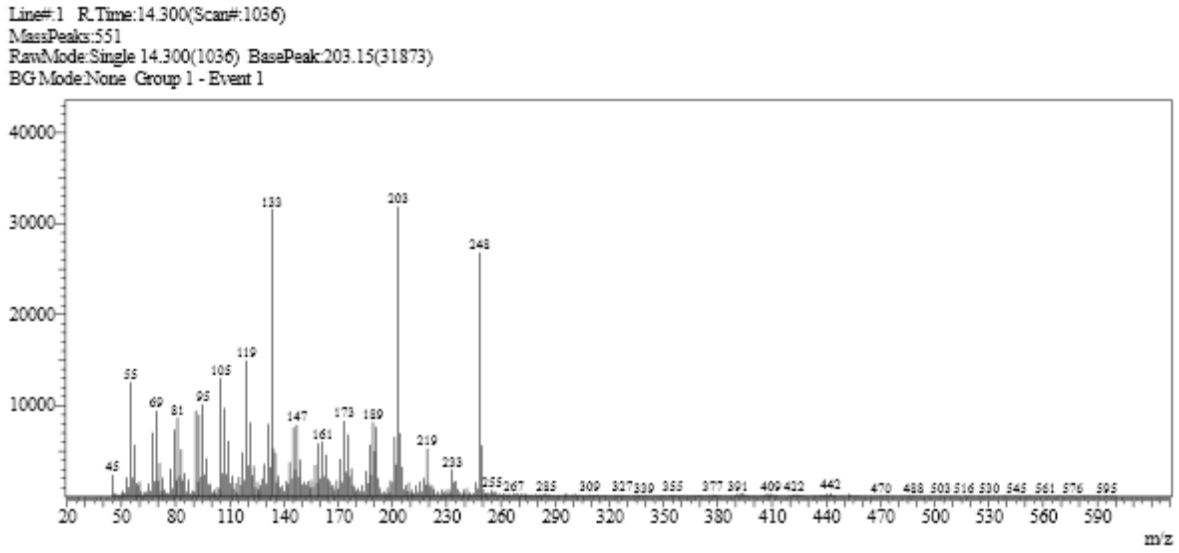
A2b. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , dos compostos **6**, **7** e **8**.



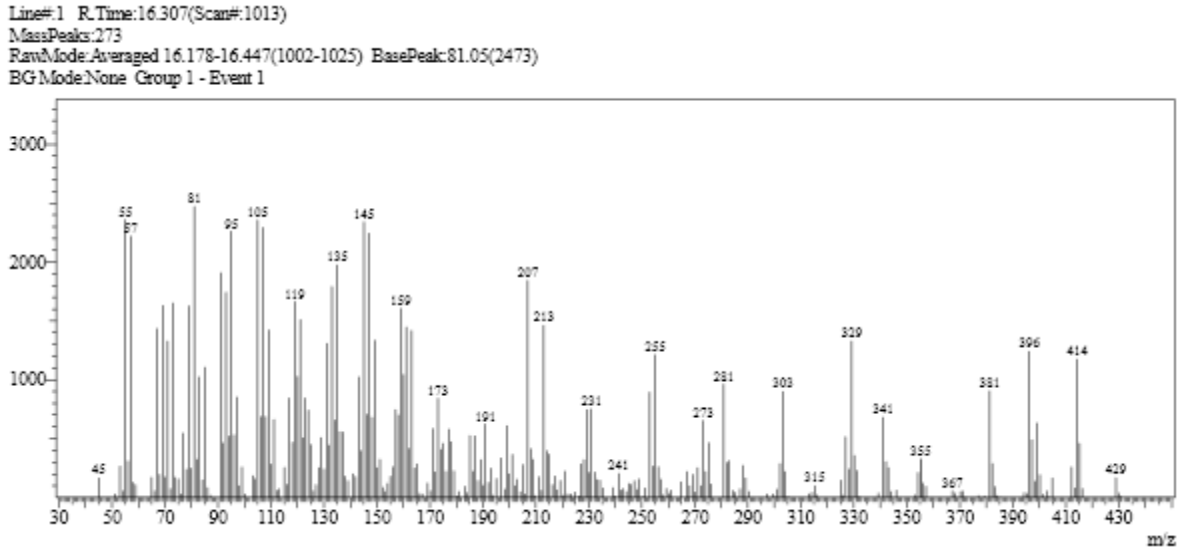
A2c. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , dos compostos **9**, **10** e **11**.



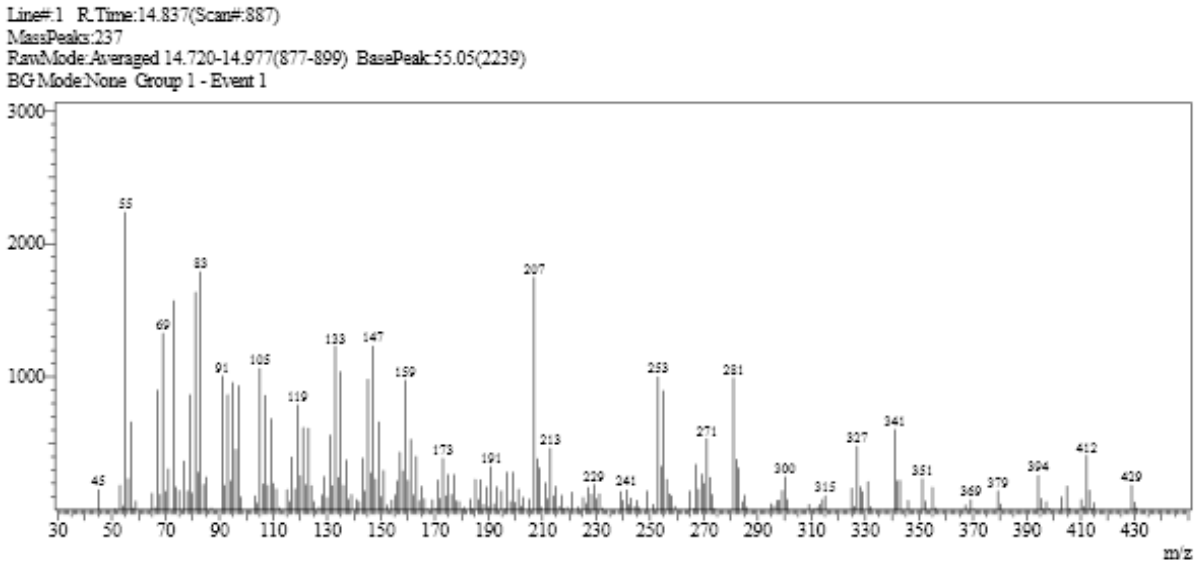
A2d. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , dos compostos **12** e **13**



A2e. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , dos comostos **14** e **15**.



A2f. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , do composto **16**.



A2g. Espectro de Massas de Baixa resolução (CG-EM) , do composto **17**.