

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE

Vatairea guianensis AUBL. (FABACEAE)

Ronilson Freitas de Souza
Mara Silvia Pinheiro Arruda



Ronilson Freitas de Souza
Mara Silvia Pinheiro Arruda

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DA ESPÉCIE *Vatairea guianensis* AUBL. (FABACEAE)**

Atena Editora
Ponta Grossa
2017

2017 by Ronilson Freitas de Souza e Mara Silvia Pinheiro Arruda

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira

Edição de Arte e Capa: Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho (UnB)

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior (UFAL)

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto (UFPEL)

Prof^a Dr^a Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua (UNIR)

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson (UTFPR)

Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior (UEPG)

Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves (UFT)

Prof. Dr. Takeshy Tachizawa (FACCAMP)

Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes (Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatric)

Prof. Dr. Carlos Javier Mosquera Suárez (UDISTRITAL/Bogotá-Colombia)

Prof. Dr. Gilmei Francisco Fleck (UNIOESTE)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

S729e

Souza, Ronilson Freitas de.

Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da espécie *Vatairea guianensis* AUBL. (FABACEAE) / Ronilson Freitas de Souza, Mara Silvia Pinheiro Arruda. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2017. 157 p. : il. ; 11.363 kbytes

Formato: PDF

ISBN 978-85-93243-27-1

DOI 10.22533/at.ed.2713005

Inclui bibliografia.

1. *Vatairea guianensis* - Composição. I. Arruda, Mara Silvia Pinheiro. II. Título.

CDD-583.322

O conteúdo do texto em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2017

Proibida a reprodução parcial ou total desta obra sem autorização da Atena Editora

www.atenaeditora.com.br

E-mail: contato@atenaeditora.com.br

Aos meus familiares com os quais compartilhei momentos de alegria e de ansiedade. Em especial a minha mãe Maria Freitas de Souza e a meu pai Rogério Batista de Souza, por todo apoio, lição de vida e ensinamentos, e de forma muito especial, pelo o amor, carinho, dedicação, incentivo, confiança e seus exemplos de fé, perseverança, otimismo, responsabilidade e honestidade. E também ao meu filho Samuel Souza de Souza, pessoa esta que me encoraja a interpretar a vida de modo diferente e especial.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela companhia, perseverança, vida com saúde, felicidades e conquistas.

A Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Química e aos Laboratórios: Central de Extração, LabCrol, LabLsisBio e LDI/UEPA/UFPA/Marcello Candia, pela parceria e pelo espaço concedido para realização deste trabalho.

A minha orientadora professora Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda, pela orientação, colaboração, sabedoria, compreensão, amizade, dedicação, confiança, carinho, incentivo e responsabilidade com a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao professor Dr. Milton Nascimento da Silva da Faculdade de Química (ICEN/UFPA) pelos ensinamentos em cromatografia líquida de alta eficiência e pelas correções e sugestões durante exame de qualificação deste trabalho.

A professora Dra. Joyce Kelly da Silva da Faculdade de Biotecnologia (ICB/UFPA) pela colaboração na análise da atividade antioxidante e pelas correções e sugestões durante exame de qualificação deste trabalho.

Ao prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos da Faculdade de Química (ICEN/UFPA) pelas correções e sugestões durante exame de qualificação deste trabalho.

Aos professores Dr. Claudio Guedes Salgado e Dr. Moises Batista da Silva e a Dra. Daniella Paternostro de Araújo do Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFPA/Marcello Candia, pela colaboração na análise da atividade antifúngica.

Ao Professor Dr. Alberdan Silva Santos da Faculdade de Química (ICEN/UFPA) pela colaboração na análise da atividade antifúngica.

Ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela colaboração para obtenção dos espectros de massas de alta resolução (HRESITOF-MS).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química: Milton Nascimento da Silva, Alberto Cardoso Arruda, Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon, Lourivaldo da Silva Santos, Cláudio Nahum Alves, Heronides Adonias Dantas Filho pelos ensinamentos prestados nas respectivas disciplinas e durante todo o doutoramento.

Aos colegas de grupo pelas opiniões e discussões que muitos contribuíram com sucesso deste trabalho: Victor Marinho, Ivoneide Barros, Nádia Couto, Odirleny Carneiro, Wandson Pinheiro, Dandara Leal, Kyouk Portilho, Jesiel Silva, Jammerson Faro, Consuelo Yumiko, Raimundo Neto, Geilson Silva, Manolo Freitas, Débora Arruda, Ewerton Silva, Ana Carolina, Michelle Vaz, DalGLISH Gomes, Sônia Pamplona e Geyse Sampaio.

A CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de uma bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Duas estradas se bifurcaram no
meio da minha vida,
Ouvi um sábio dizer.
Peguei a estrada menos usada.
E isso fez toda a diferença cada noite e cada dia.
Larry Norman*

*Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem
ensino. Esses que-fazer-se encontram um no
corpo do outro. Enquanto ensino continuo
buscando, procurando. Ensino porque busco,
porque indaguei, porque indago e me indago.
Pesquisei para constatar, constatando,
intervenho, intervindo educo e me educo.
Pesquisei para conhecer e comunicar ou anunciar
a novidade.
Paulo Freire*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 OBJETIVOS.....	09
2.1 Objetivo Geral.....	09
2.2 Objetivos Específicos.....	09
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 Plantas medicinais.....	10
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Vatairea</i> e a espécie <i>Vatairea guianensis</i>	13
3.3 Infecções Fúngicas e Agentes Antifúngicos.....	15
3.4 Teste de Sensibilidade às Drogas Antifúngicas.....	18
3.5 Atividade Antifúngica de Plantas.....	21
3.6 Atividade Antioxidante.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Material.....	27
4.2 Metodologias do estudo Fitoquímico.....	28
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	28
4.2.2 Perfis cromatográficos.....	28
4.2.3 Obtenção dos extratos etanólicos brutos das folhas e do alburno.....	29
4.2.4 Fracionamento da fase hexânica (FHex-FOL) obtida da partição do extrato etanólico das folhas e isolamento das substâncias S1 a S12	30
4.2.5 Fracionamento da fase hexânica (FHex-ALB) da partição do extrato etanólico do alburno e isolamento das substâncias S13 a S18	36
4.3 Metodologias para Avaliação das Atividades Biológicas.....	38
4.3.1 Atividade antifúngica pelo método de difusão em disco e pelo método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC).....	38
4.3.2 Atividade antifúngica pelo método de Microdiluição em Caldo para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	39
4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Análise cromatográfica e espectrométrica dos extratos etanólicos de <i>V. guianensis</i>	41
5.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>V. guianensis</i>	43
5.2.1 Elucidação estrutural da mistura de S1-S5	44
5.2.2 Elucidação estrutural de S9	52
5.2.3 Elucidação estrutural de S10	61
5.2.4 Elucidação estrutural de S11	69
5.2.5 Elucidação estrutural de S12	76
5.2.6 Elucidação estrutural de S6	84
5.2.7 Elucidação estrutural de S7	91
5.2.8 Elucidação estrutural de S8	98

5.3 Elucidação estrutural da substâncias isoladas do alburno de <i>V. guianensis</i>.....	105
5.3.1 Elucidação estrutural de S13 e S14	105
5.3.2 Elucidação estrutural da mistura S15 e S16	109
5.3.3 Elucidação estrutural de S17	113
5.3.4 Elucidação estrutural de S18	113
5.4 Resultados das atividades biológicas de <i>V. guianensis</i>.....	133
5.4.1 Teste de difusão em disco e método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC).....	133
5.4.2 Concentração Inibitória Mínima.....	137
5.4.3 Resultados da atividade antioxidante.....	140
6 CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS.....	144

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são exploradas pelo homem há mais de 5 mil anos na forma de extratos, elixires, emplastos, chás, banhos, e garrafadas entre outras formulações farmacêuticas, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. As antigas civilizações usavam extratos de plantas como fontes de fármacos naturais, para tratamento, cura e prevenção de diversos males de diversas etiologias causadas ao homem, sem qualquer conhecimento da composição química destes extratos (SANTOS et al., 2012a) e também, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia. Ainda hoje, populações tradicionais (índios, caboclos, população rural, ribeirinhos e quilombolas) utilizam as plantas medicinais para este fim, baseadas apenas na experimentação empírica, envolvendo a miscigenação de conhecimentos europeus, indígenas e africanos (DE LA CRUZ, 2008), sendo pouco esclarecido o mecanismo de ação nos sistemas biológicos, visto a carência de estudos nessa área (BASTOS et al., 2012).

No Brasil, cerca de 80% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, a maioria tendo como base o conhecimento da medicina tradicional indígena, quilombola e comunidades tradicionais e/ou através de transmissão oral entre gerações, ou até mesmo recebem orientações de uso nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). É válido ressaltar que esta prática incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

Neste contexto, muitas pesquisas, em todo o Brasil, estão voltadas para a busca de metabólitos secundários de plantas com propriedades biológicas e/ou validação científica do uso de plantas medicinais utilizadas pela população brasileira.

Um gênero de plantas promissor que vem sendo estudado desde 2010 no Laboratório Central de Extração (Programa de Pós-Graduação em Química- UFPA), como possível fornecedor de moléculas bioativas, é o *Vatairea*, o qual faz parte da família Fabaceae. Dentre as espécies deste gênero, *Vatairea guianensis* Aubl. foi selecionada para o presente estudo com base em investigações etnofarmacológicas sobre uso terapêutico por comunidades ribeirinhas da Amazônia relatada na literatura (LIMA, 1982; SANTOS et al., 2012b).

Os órgãos vegetais desta espécie são popularmente usados, sob a forma de tintura alcoólica, para o tratamento de diversos tipos de problemas dermatológicos como sarna, dermatofitoses humanas, *Tinea corporea* (impingem), *Pitiríase versicolor* (pano branco), coceira e lesões na pele (PIEADADE; WOLTER FILHO, 1988; SANTOS et al., 2012b). Entretanto, estas observações farmacológicas, necessitam de investigações científicas, juntamente com caracterização química desta espécie, para que se possa justificar ou não o uso popular da planta.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar a composição química e as atividades biológicas dos extratos obtidos de *Vatairea guianensis*, visando dar fundamentação científica ao uso popular desta espécie.

2.2 Específicos

- Isolar e purificar os constituintes químicos dos extratos etanólicos das folhas e do alburno *V. guianensis*;
- Identificar as estruturas químicas utilizando-se métodos espectrométricos (RMN e EM);
- Avaliar as atividades antifúngica e antioxidante dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas das folhas e do alburno *V. guianensis*;
- Contribuir com informações químicas do gênero *Vatairea*.

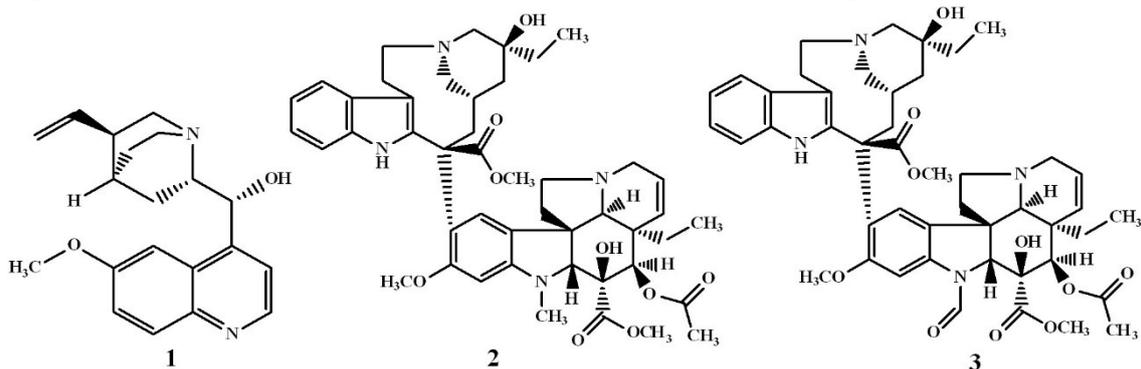
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

O reino vegetal se mostra responsável pela maior parcela dos metabólitos secundários conhecidos e divulgados na literatura e desde os primórdios das civilizações, tem contribuído significativamente para o fornecimento de substâncias úteis, para o tratamento das enfermidades que acometem os seres humanos (MONTANARI; BOLZANI, 2001; PHILLIPSON; ANDERSON, 1989). Esses fatos explicam o interesse crescente das indústrias farmacêuticas, por matéria prima de origem natural, estimulando a pesquisa de plantas medicinais e com o aprimoramento de métodos espectrométricos de Ressonância magnética nuclear e Espectrometria de Massa, a química orgânica deu um grande passo para a elucidação estrutural de substâncias obtidas de extratos de plantas (SANTOS et al., 2012a), aliado com o estudo de suas propriedades farmacológicas com fins de tratamento, cura e prevenção. Como exemplo tem-se o uso da substância quinina (1) (Fig. 1) ao invés de utilizar o extrato de Quina. A preferência pelo uso de composto puro que possibilita uma composição constante das formulações e maior eficácia e segurança, impulsionou a busca por substâncias naturais extraídas de plantas e a síntese de substâncias a partir de princípios ativos como o caso do ácido acetilsalicílico, baseada na salicina obtida da espécie *Salix alba* L. (DE LA CRUZ, 2008).

Estima-se que cerca de 40% de todos os medicamentos modernos, hoje disponíveis no mercado farmacêutico, tiveram origem direta ou indiretamente, em fontes naturais. Em alguns casos, como de certas classes de produtos farmacêuticos, tais como medicamentos antitumorais, este percentual chega a 60% e 78% das drogas antibacterianas disponíveis no mercado, as quais são derivadas de produtos naturais (DE LA CRUZ, 2008). Como exemplos há as substâncias vimblastina (2) e vincristina (3) (Fig. 1), isoladas da planta conhecida como Vinca (*Catharanthus roseus*) que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010).

Figura 1 - Estruturas moleculares de substâncias isolados de espécies vegetais.



Fonte: Autor (2014).

Na Tabela 1 está descrita uma relação de princípio ativo, isolado a partir de extratos vegetais utilizados pela humanidade para curar suas enfermidades. Tais descobertas se deram através da combinação de informações adquiridas junto à comunidade que fazem uso de plantas medicinais com estudos fitoquímicos, farmacológicos e agrônômicos realizados em laboratórios especializados (BRASILEIRO et al., 2008).

Tabela 1 - Fitofármacos desenvolvidos através de abordagem etnofarmacológica.

Fitofármaco	Uso medicinal	Vegetal
Ajmalina	Arritmia cardíaca	<i>Rauvolfia spp.</i>
Aspirina	Analgésico, antiinflamatório	<i>Filipendula ulmaria</i>
Atropina	Oftalmológico	<i>Atropa belladonna</i>
Benzoina	Desinfetante oral	<i>Styrax tonkinensis</i>
Cafeína	Estimulante	<i>Camellia sinensis</i>
Cânfora	Dor reumática	<i>Cinnamomum camphora</i>
Cáscara	Purgativo	<i>Rhamnus purshiana</i>
Cocaína	Anestésico oftalmológico	<i>Eryroxylum coca</i>
Codeína	Analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
Colchicina	Gota	<i>Colchicum autumnale</i>
Demecolcina	Leucemia	<i>Colchicum autumnale</i>
Deserpidina	Hipertensão	<i>Rauvolfia canescens</i>
Dicoumarol	Trombose	<i>Melilotus officinalis</i>
Digitoxina	Fibrilação atrial	<i>Digitalis purpurea</i>
Digoxina	Fibrilação atrial	<i>Digitalis purpurea</i>
Efedrina	Broncodilatador	<i>Ephedra sinica</i>
Emetina	Disenteria	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
Escopolamina	Anticolinérgico	<i>Datura stramonium</i>
Estigmasterol	Precursor esteroidal	<i>Physostigma venenosum</i>
Estrofantina	Insuficiência cardíaca	<i>Strophanthus gratus</i>
Eugenol	Dor de dentes	<i>Syzygium aromaticum</i>
Fisostigmina	Glaucoma	<i>Physostigma venenosum</i>
Forskolina	Ativa os sistemas geradores de AMP cíclico	<i>Coleus forskohlii</i>

Galotaninas	Hemorroidas	<i>Hamamelis virginiana</i>
Ginkgolido A	Doenças vasculares periféricas	<i>Ginkg biloba</i>
Hiosciamina	Anticolinérgico	<i>Hyoscyamus niger</i>
Ipecac	Emético	<i>Cephalis ipecacuanha</i>
Ipratropium	Broncodilatador	<i>Hyoscyamus niger</i>
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
Noscarpina	Antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
Papaína	Atenuar muco	<i>Carica papaya</i>
Papaverina	Antiespasmódico	<i>Papaver somniferum</i>
Picrotoxina	Antídoto contra barbitúricos	<i>Anamirta cocculus</i>
Pilocarpina	Glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Podofilotoxina	Condiloma	<i>Podophyllum peltatum</i>
Proscillaridina	Malfunção cardíaca	<i>Drimia marítima</i>
Protoveratrina	Hipertensão	<i>Varatrum álbum</i>
Pseudoefedrina	Rinite	<i>Efhedra sinica</i>
Psoralen	Vitiligo	<i>Psoralea corylifolia</i>
Quinidina	Arritmia cardíaca	<i>Cinchona pubescens</i>
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona pubescens</i>
Rescinamina	Hipertensão	<i>Rauvolfia serpentina</i>
Reserpina	Hipertensão	<i>Rauvolfia serpentina</i>

Fonte: Sarti (2008).

Estes dados mostram que os membros do reino Plantae representam uma fonte muito importante de substâncias bioativas que podem ser usadas no desenvolvimento de novos medicamentos, por isso que, uma boa parte da população mundial faz uso de plantas medicinais para tratar infecções e uma variedade de doenças, devido à sua abundância na natureza e facilidade de obtenção (AHMAD et al., 1998), aliado ao fato das dificuldades de acesso aos serviços de saúde pela população economicamente desfavorecida e/ou inacessibilidade geográfica aos postos de assistência à saúde pública.

Segundo a OMS, cerca de 70-95% da população de reduzido poder aquisitivo dos países em desenvolvimento, especialmente da Ásia, África, América Latina e do Oriente Médio, que não tem acesso à medicina moderna, utiliza medicamentos tradicionais ou preparações à base de plantas medicinais para atender às suas necessidades de cuidados primários de saúde através dos saberes científicos e não científicos. O uso desses medicamentos tradicionais pela população se dá por meio de prescrição médica, automedicação ou como remédios caseiros, dentre outras formas (ROBINSON; ZHANG, 2011). Ainda segundo a OMS, as práticas da medicina tradicional expandiram-se globalmente na última década do século passado e ganharam popularidade.

3.2 Considerações sobre o gênero *Vatairea* e a espécie *Vatairea guianensis*

Vatairea é um gênero neotropical, e distribuído no Brasil nos domínios fitogeográficos Amazônico, Cerrado e Mata Atlântica. Na região Norte está presente em todos os Estados. O gênero inclui apenas sete espécies arbóreas: *V. Erythrocarpa*, *V. fusca*, *V. guianensis*, *V. Heteroptera*, *V. Macrocarpa*, *V. Paraensis* e *V. Sericea* (CARDOSO, 2013).

Dentre as espécies citadas destaca-se a *V. guianensis*, uma planta medicinal nativa da Amazônia Oriental, com ampla distribuição nos estados do Amazonas, Pará e Amapá (FORZZA; LEITMAN, 2010; CARDOSO, 2013), e nestas regiões é conhecida popularmente como “fava de impingem”, “faveira amarela” e “faveira grande do igapó” (CORRÊA, 1982).

A espécie *V. guianensis* (Fig. 2) é uma árvore mediana, raramente de grande porte, possuindo de 8 a 25 metros de altura. É encontrada em áreas de florestas sazonalmente inundáveis de igapó, várzea e floresta de restinga baixa, também encontrada com menor frequência na interface da várzea com a terra firme e na terra firme. É uma espécie de fácil propagação, tanto por semente como por estacas, a semente alcança um poder germinativo de até 71% num lapso de 18 a 25 dias (CORRÊA, 1982; LIMA, 1982).

Figura 2 – Foto da espécie *Vatairea guianensis* Aubl.



Fonte: Autor (2014).

Existem poucos relatos científicos sobre o potencial biológico de *V. guianensis*. O extrato hidroalcoólico dos frutos interferiu de maneira positiva sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos, diminuindo a intensidade da reação inflamatória e estimulando a síntese de colágeno, tendo apresentado ainda baixa toxicidade aguda por via oral em camundongos (SILVA et al., 2011a) e, também, os frutos apresentaram ação antiparasitária *in vitro* sobre *Leishmania amazonenses* (OTOBELLI et al., 2009). Além, de apresentarem atividade antibacteriana sobre cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella sp.*) (SILVA et al., 2011b). O extrato aquoso também se apresentou ativo contra cepas de *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2013). Estes são os únicos estudos sobre atividades biológicas da espécie *V. guianensis*.

Através de pesquisas bibliográficas verificou-se que existem poucos relatos de investigações fitoquímicas sobre o gênero *Vatairea* quando comparado com outros da família Fabaceae.

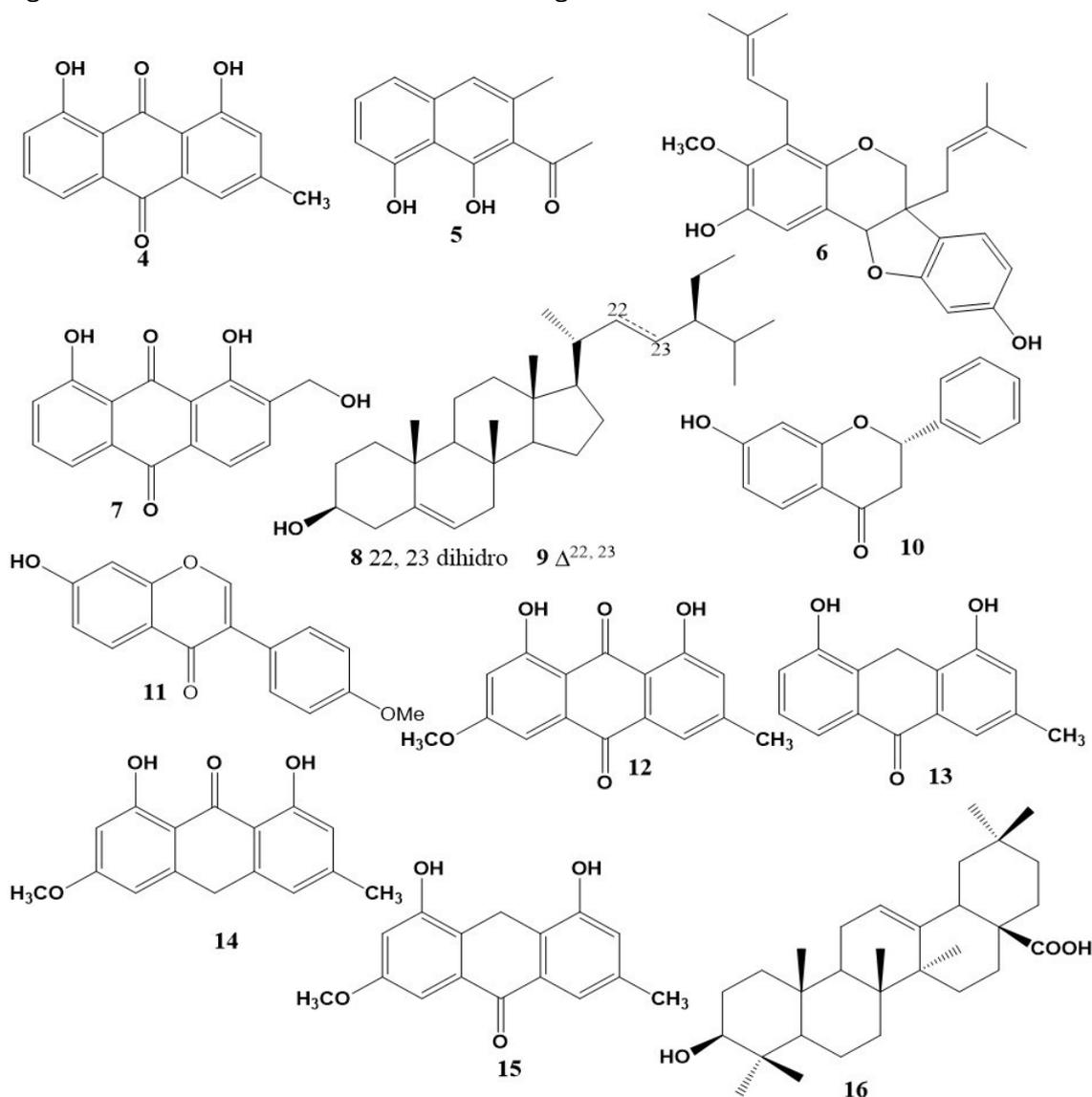
Estudos químicos do gênero *Vatairea* revelaram a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das antraquinonas, antronas, triterpenos, esteroides e flavonoides (Fig. 3). Para as espécies *V. Sericea* e *V. fusca* não há relatos que estudo fitoquímico, no entanto, para as espécies *V. Macrocarpa* e *V. paraensis* há relato do isolamento da antraquinona crisofanol (4) registrado por Formiga et al. (1975). O pesquisador Santana (2013) descreve a ocorrência de dianellidina (5) e do pterocarpano vatacarpina (6) para *V. Macrocarpa*. Para a espécie *V. Heteroptera*, foi registrado o isolamento de crisofanol (4), emodina (7), ácidos graxos saturados com C₂₄ e C₂₆, sitosterol (8), estigmasterol (9), (2S)-7-hidroxi-flavanona (10) e formononetina (11) (FORMIGA et al., 1975).

Para a espécie *V. guianensis*, há relatos do isolamento das substâncias crisofanol (4), fisciona (12), emodina (7), ácido 9-antronacrisofânico (13), 9-antronafisciona (14), 10-antronafisciona (15), ácido oleanólico (16) e a lactona do ácido diidromacaerinico (SIMATUPANG et al., 1967; PIEDADE; WOLTER FILHO, 1988). Esses relatos de investigações fitoquímicas envolveram cerne, frutos e casca do caule desta espécie.

Em face das propriedades antifúngicas, indicada através de estudos etnofarmacológicos, aliados a diversidade de atividades biológicas apresentadas pelas classes de metabolitos secundários já registrados para o gênero *Vatairea*, apontam para o grande potencial químico-biológico da espécie *V. guianensis*, principalmente voltada para o combate à micro-organismos causadores de doenças da pele, considerando que o tratamento das dermatofitoses humanas não é sempre efetivo, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, o que evidencia a limitada eficácia destes compostos, além de apresentarem alta toxicidade (MEIS; VERWEIJ, 2001; WOODFOLK, 2005). Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais efetivos, e sobretudo, mais seguros que os existentes. Além das infecções em humanos, os

animais também podem ser atacados esporadicamente por fungos dermatófitos muito difíceis de serem tratados (FENNER et al., 2006).

Figura 3 – Estruturas das substâncias isoladas do gênero *Vatairea*.



Fonte: Autor (2014).

3.3 Infecções Fúngicas e Agentes Antifúngicos

Muitos fungos apresentam potencial patogênico para os humanos. De acordo com os tecidos e órgãos afetados, as micoses são classificadas em micoses superficiais e cutâneas, micoses subcutâneas, micoses sistêmicas e oportunistas (MORAES; PAES; HOLANDA, 2014). As micoses superficiais são infecções causadas por fungos que atingem pele, pelos, unhas e mucosas. As micoses cutâneas se caracterizam por serem causadas por fungos que invadem toda a espessura da capa

córnea da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos (MORAES; PAES; HOLANDA, 2014).

A candidíase, também denominada candidose, é infecção causada por fungos do gênero *Candida*, e está comprovado que as espécies de *Candida* constituem o grupo mais importante de patógenos fúngicos oportunistas. *Candida* spp. É a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas, além de causar uma variedade de infecções que variam de micose superficial a micoses profundas (DHANASEKARAN et al., 2014).

Embora mais de 100 espécies de *Candida* já tenham sido descritas, apenas algumas têm sido implicadas com infecções clínicas. *Candida albicans* é a espécie isolada com mais frequência de material clínico e responde, em geral, por 90 a 100% de isolados mucosos e 50 a 70% dos isolados de infecções sanguíneas. Outras espécies têm sido também identificadas como patógenos humanos: *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa*. *Candida* spp. Pode provocar infecção cutânea localizada em áreas nas quais a superfície da pele é ocluída e úmida (p. ex., região inguinal, axilas, membranas dos dedos dos pés e dobras da mama). Essas infecções se apresentam como um exantema, com prurido e lesões vesiculopustulares eritematosas (GOMPERTZ et al., 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

As micoses sistêmicas são originadas principalmente pela inalação de propágulos fúngicos levados do solo pelos ventos, este tipo de infecção fúngica pode envolver órgãos internos ou acometer todo organismo do hospedeiro, produzindo variado quadro anatomopatológico (GOMPERTZ et al., 2008).

As micoses subcutâneas englobam um grupo de doenças causadas por um grupo diversificado de fungos e que atingem preferencialmente a derme e o tecido celular subcutâneo, produzindo reação inflamatória granulomatosa. Fazem parte deste grupo esporotricose, paracoccidioidomicose, feo e hialohifomicoses, histoplasmose, coccidiomicose, blastomicose norte-americana, criptococose, rinosporidiose, micetomas e zigomicoses, além da doença de Jorge Lobo (lobomicose), encontrada quase exclusivamente na Região Amazônica e da cromoblastomicose, com distribuição mundial, mas com alta prevalência no Estado do Pará (SALGADO, 2007).

Dentre os fungos causadores deste tipo de micose, destaca-se o fungo dematiáceo *Fonsecaea pedrosoi*, o principal agente etiológico da cromoblastomicose ou doença de Lane-Medlar-Pedroso, caracterizada pela presença de lesões verrucosas, normalmente confinadas a pele e aos tecidos subcutâneos (SALGADO, 2007, HAMZA et al., 2003). Predominante em áreas tropicais e subtropicais, esta doença é normalmente descrita nos braços e pernas e a maioria dos pacientes têm uma história de trauma causado por madeira ou vegetação, e mais de 80% são trabalhadores rurais (TORRES-GUERRERO et al., 2012) que estão constantemente em contato com o solo. Mais de 80% dos casos brasileiros têm lesões localizadas nos membros inferiores, enquanto que no Japão a maioria dos casos possui lesões no tórax e membros superiores (SALGADO, 2007).

Cromoblastomicose (CBM) é extremamente difícil de tratar, inclui uma combinação de drogas antifúngicas e excisão cirúrgica, no entanto, o diagnóstico incorreto, recaídas e interrupção terapêutica são frequentes, causando um elevado percentual de morbidade (BONIFAZ; PAREDES-SOLIS; SAUL, 2004). Diante do exposto, ainda é a CBM a patologia fúngica mais relevante dentro do quadro das doenças infecciosas que compõem o vasto quadro nosológico da população rural brasileira, devido a sua capacidade de morbidade (RIBEIRO et al., 2006). A terapia medicamentosa por pelo menos seis meses pode resultar em uma resposta clínica favorável, mas as recaídas durante ou após terapia são comuns. Em lesões precoces ou pequenas, quando possível, devem ser tratadas por exérese cirúrgica (RIBEIRO et al., 2006).

No tratamento das micoses com drogas antifúngicas, devem ser cuidadosamente considerados os seguintes aspectos: tipo de micose e seu agente etiológico, estado geral do paciente e os antifúngicos que são relativamente limitados. No referente aos antifúngicos, deve-se conhecer o seu mecanismo de ação, o espectro, as vias de administração e os efeitos colaterais (GOMPERTZ et al., 2008).

As drogas antifúngicas podem ser divididas em três categorias: aquelas que alteram a membrana celular, as que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como a síntese de RNA, DNA ou proteínas e as novas drogas que agem na parede celular, as equinocandinas, que são derivados semissintéticos da pneumocandinas B₀, um lipopeptídeo. Convém salientar a nova droga caspofungina que age na parede celular. As mais utilizadas são os derivados poliênicos, imidazólicos, pirimidínicos, sulfamídicos, benzofurânicos e outros compostos como iodetos, tiosulfatos, sulfetos e tolnaftatos, com graus variável de sucesso (GOMPERTZ et al., 2008).

Os principais antifúngicos utilizados no combate de fungos causadores de micoses estão resumidos na Quadro 1.

Quadro 1 – Principais antifúngicos utilizados no tratamento das micoses.

Micoses	Antifúngicos
Pitíriase versicolor	Hipossulfito de sódio, sulfeto de selênio, cetoconazol, tolclato, tolnaftato e itraconazol
Piedras	Solução de bicloreto de mercúrio, mercúrio amoniacal e álcool sublimado
Tinha negra	Solução de enxofre, ácido salicílico e tintura de iodo
Dermatofitoses	Griseofulvina, tolclato, tolnaftato, clotrimazol, miconazol, cetoconazol, tiabendazol, itraconazol e terbinafina
Esporotricose	Iodeto de potássio, anfotericina B e itraconazol
Cromoblastomicose	Anfotericina B, 5-fluorocitosina e itraconazol
Maduromicose	Sulfonamidas e Anfotericina B
Paracoccidioidomicose	Sulfametoxazol-trimetoprina, anfotericina B, cetoconazol, miconazol e itraconazol

Histoplasmose	Sulfomidas, anfotericina B e cetoconazol
Criptococose	Anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e voriconazol
Candidíase	Nistatina, violeta de genciana, miconazol, anfotericina B, cetoconazol, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina
Zigomicose	Anfotericina B
Doença de Jorge Lobo	Ausência de antifúngicos eficazes
Ceratomicose	Natamicina, anfotericina B, nistatina e piramacina
Otomicose	Sulfanilamida e acetato de metacresil
Aspergilose	Anfotericina B e itraconazol

Fonte: Trabulsi; Alterthum (2008).

Tanto a frequência de infecções fúngicas invasivas como a resistência à terapêutica antifúngica continua a aumentar, apesar da introdução de novos testes de susceptibilidade de agentes antifúngicos (PFALLER; DIEKEMA, 2010). Podemos definir resistência antifúngica quando o agente etiológico é inibido por uma concentração antimicrobiana que é mais elevada do que poderia ser alcançado de forma segura com a dosagem normal (PFALLER, 2012).

Resistência aos agentes antifúngicos tem implicações importantes na morbidade e mortalidade associadas com micoses. As consequências clínicas desta resistência podem ser observadas na insuficiência do tratamento e mudanças na prevalência de espécies fúngicas. Os fungos são organismos que apresentam grande plasticidade no que diz respeito às mudanças ambientais e mecanismos de resistência aos principais grupos de agentes antifúngicos (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

Dentre as cinco espécies de *Candida* spp mais comuns, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* permanecem suscetíveis aos agentes antifúngicos poliênicos (p. ex. nistatina, anfotericina B), a azólicos (p. ex. cetoconazol, itraconazol, fluconazol) e derivados azólicos recentes como voriconazol e posaconazol, além da classe equinocandinas, no entanto, *C. glabrata* e *C. krusei* são resistente ao fluconazol, a literatura também relata a resistência de *C. krusei* para anfotericina B. Novos triazóis, tais como voriconazol e posaconazol, e as equinocandinas são ativos contra estas duas espécies (SHAO; HUANG; HSUEH, 2007; KATHIRAVAN et al., 2012). No entanto, há relatos, de uma reduzida sensibilidade ou resistência de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* a equinocandinas (PFALLER, 2012).

3.4 Teste de Sensibilidade às Substâncias Antifúngicas

Vários testes são empregados no estudo da sensibilidade/resistência aos antifúngicos e diferentes critérios de interpretação são utilizados. O documento M38-A2 (CLSI, 2008) do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (www.clsi.org)

aprovado como método de referência, têm sido empregado como importante instrumento de trabalho para os laboratórios e especificam a preparação, tamanho do inóculo, os meios de cultivo, o tempo e a temperatura de incubação, a formulação do meio e os critérios para a determinação da concentração inibitória mínima (CLSI, 2008). Atualmente, a técnica de escolha é a da microdiluição por sua maior facilidade na preparação dos testes.

Os agentes mais frequentemente usados para solubilizar as substâncias antifúngicas são: dimetilsulfóxido de qualidade analítica (DMSO), álcool etílico, polietilenoglicol e carboxi-metil-celulose. Quando esses solventes são utilizados, recomenda-se preparar uma série de diluições da solução padrão do antifúngico, a 100 vezes a concentração final, no mesmo solvente. Esse procedimento impede os artefatos de diluição resultantes da precipitação de produtos de baixa solubilidade no meio aquoso, além de permitir reduzir a concentração final do solvente para 1% (CLSI, 2008).

Neste teste de sensibilidade das substâncias antifúngicas, é utilizado meio de cultivo sintético RPMI-1640, este é considerado satisfatório para ensaios com fungos, sendo utilizado para padronização desta norma. Os meios de cultivo devem ser tamponados até um pH de $7,0 \pm 0,1$ em temperatura de 25°C . A fórmula desse meio é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do Meio RPMI-1640

Constituinte	g/L de água	Constituinte	g/L de água
L-arginina (base livre)	0,200	Biotina	0,0002
L-aspargina (anidra)	0,050	D-pantotênico	0,00025
ácido L-aspártico	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cistina • 2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B12	0,000005
L-lisina • HCl	0,040	Nitrato de cálcio • H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutationa, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883	Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

Fonte: CLSI (2008).

A Tabela 3 apresenta as faixas de precisão de concentração inibitória mínima (CIM) para um único teste de controle. Em geral, um dentre 20 valores de CIM, numa série de 20 testes consecutivos, pode estar fora do controle (ex., fora da faixa definida) devido a variações aleatórias do teste. Dois resultados fora do controle consecutivos, ou mais de 2 resultados fora-do-controle em 20 testes de controle consecutivos exigem medidas corretivas. Toda vez que se tomar medidas corretivas, a contagem de 20 testes consecutivos recomeça (CLSI, 2008b).

Tabela 3 – Limites de CIM recomendados para duas cepas de referência e controle de qualidade para testes de diluição em caldo

Organismo	Agente Antifúngico	Faixa de CIM* (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC® MYA-3633	Anfotericina B	1-4	48
	Itraconazol	0,06-0,5	48
	Voriconazol	0,015-0,12	48
	Posaconazol	0,03-0,25	48
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019	Anidulafungina	<0,015	24
	Anfotericina B	0,5-4,0	48
	5FC	0,12-0,5	48
	Fluconazol	1,0-4,0	48
	Itraconazol	0,12-0,5	48
	Cetoconazol	0,06-0,5	48
	Voriconazol	0,03-0,25	48
	Ravuconazol	0,03-0,25	48
	Posaconazol	0,06-0,25	48
	Anidulafungina	0,5-2,0	48
	Caspofungina	0,5-4,0	48
<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258	Micafungina	0,5-4,0	48
	Anfotericina B	1,0-4,0	48
	5FC	8,0-32	48
	Fluconazol	16-128	48
	Itraconazol	0,25-1,0	48
	Cetoconazol	0,25-1,0	48
	Voriconazol	0,12-1,0	48
	Ravuconazol	0,25-1,0	48
	Posaconazol	0,12-1,0	48
	Anidulafungina	0,03-0,12	48
	Caspofungina	0,25-1,0	48
Micafungina	0,12-0,5	48	

Fonte: CLSI (2008).

3.5 Atividade Antifúngica de Plantas

Atualmente as drogas antifúngicas disponíveis não atendem à crescente demanda de infecções fúngicas complexas associadas a resistência dessas drogas. O desenvolvimento de novas drogas antifúngicas tem sido constantemente requerido na terapia clínica (TANG et al., 2010). Uma alternativa é buscar agentes antifúngicos de origem vegetal, e os levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais e o estudo fitoquímico direcionados para o combate a infecções antifúngicas são essenciais na descoberta de novos compostos candidatos para o desenvolvimento de novas drogas capazes de combater essas enfermidades.

Com base em observações de práticas terapêuticas tradicionais de populações ribeirinhas do Amazonas, Santos et al. (2012b) registrou as seguintes espécies de plantas usadas no combate de doenças da pele causados por fungos: *Xanthosoma* sp (Mão-aberta), *Bixa orellana* L (Urucum), *Calophyllum brasiliense* Cambess (Jacareúba), *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers (Lacre), *Cassia leiandra* Benth (Ingá-mari), *Vatairea guianensis* Aubl. (Faveira/ fava), *Chelonanthus grandiflorus* (Aubl.) Chodat & Hassl (Tabaco-de-lagarto), *Lophanthera longifolia* (Kunth) Griseb. (Cuiarana), *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba), *Portulaca pilosa* L. (Amor-crescido), *Scoparia dulcis* L. (Vassourinha), *Capsicum chinense* Jacq. (Pimenta-malagueta). No entanto, a maioria destas espécies ainda requer estudos científicos para comprovar seu uso popular, assim como sua toxicidade.

A investigação dos recursos naturais visando obter produtos ativos contra *Candida* spp. Aumentou significativamente nos últimos 10 anos, com o estudo de aproximadamente 258 espécies de plantas, de 94 famílias. Muitas plantas de biomas brasileiros, como o Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, têm sido utilizados como medicamentos naturais por comunidades locais no tratamento de doenças tropicais, incluindo infecções fúngicas e bacterianas (ALVES et al., 2000, DUARTE et al., 2005).

O estudo de vegetais permite detectar extratos, frações ou substâncias com atividade antifúngica. Quando se trata de extratos vegetais, uma grande variedade de métodos é aplicada para detectar ação fungicida *in vitro* (ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição) (RIOS; RECIO; VILAR, 1998, VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). Levando-se em consideração o grande número de trabalhos de avaliação de atividade antifúngica em extratos e/ou substâncias isoladas que são publicados, observa-se que o método de disco difusão em ágar, descrito originalmente por Bauer et al. (1966), é o mais utilizado como método de triagem, a fim de verificar quais amostras apresentam atividade, baseados na presença ou ausência de um halo de inibição, levando em consideração o tamanho do halo. Em seguida, os resultados devem estar correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), as quais devem ser verificadas por métodos padronizados recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Na Tabela 4 estão descritos alguns resultados de concentração inibitória mínima de extratos de espécies botânicas estudadas recentemente quanto ao seu

potencial antifúngico. E na Tabela 5 estão relatos os resultados de CIM para algumas substâncias (Fig. 4) obtidas de plantas e avaliadas quanto ao seu potencial antifúngico.

Tabela 4 – Atividade antifúngica de extratos de plantas frente a espécies de fungos patógenos a humanos.

Espécies vegetais	Atividade antifúngica (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsolis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
<i>Ziziphus joazeiro</i> ^a	25	-	-	400
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> ^a	12,5	-	-	200
<i>Campomanesia eugenioides</i> ^b	0,24	15,6	7,8	-
<i>Luehea paniculata</i> ^b	0,98	62,5	500	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> ^b	0,49	3,9	15,6	-
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> ^b	31,25	> 1000	>1000	-

Legenda: ^aCruz et al. (2007); ^bMoura-Costa et al. (2012).

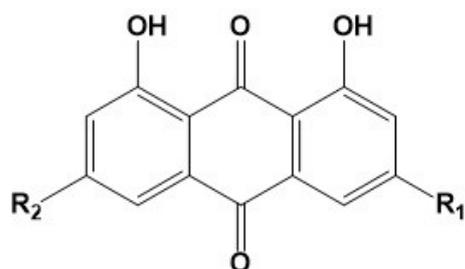
Fonte: Autor (2014).

Tabela 5 – Atividade antifúngica (CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de substâncias isoladas de plantas frente a espécies de fungos patógenos a humanos.

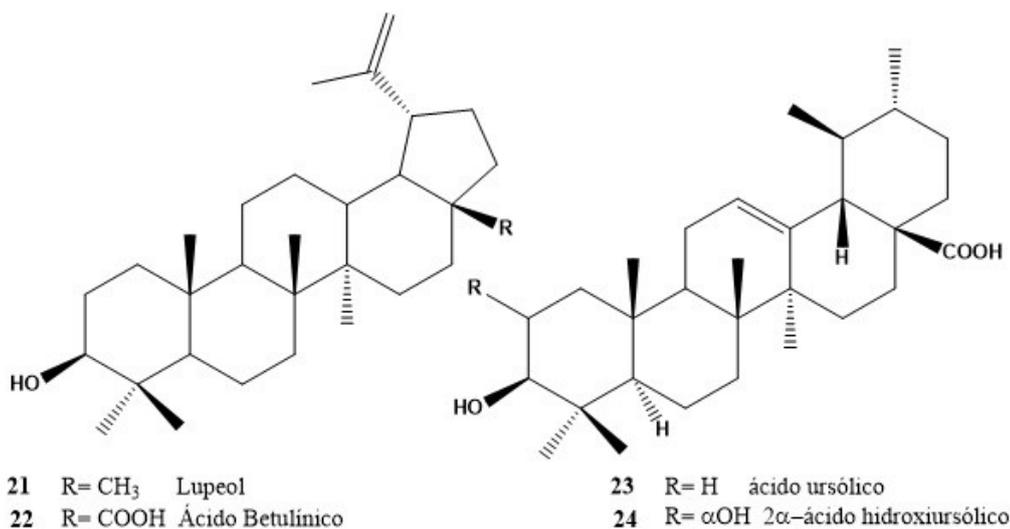
Fungos	Substâncias							
	17 ^a	18 ^a	19 ^a	20 ^a	21 ^b	22 ^b	23 ^b	24 ^b
<i>Candida albicans</i>	50	50	50	50	250	16	63	32
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50	50		50	180	32	63	32
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	25	25	50	25				
<i>Aspergillus fumigatus</i>				50	93,5	24	24	32
<i>Candida guilliermondi</i>					94	15,6	15,6	11,7
<i>Candida spicata</i>					250	47	63	63

Legenda: ^aValores descritos por Agarwal et al. (2000); ^bValores descritos por Shai et al. (2008). 17: Reína, 18: Fisiona, 19: Aloe-emodina Reína; 20: Crisofanol, 21: Lupeol, 22: Ácido betulinico, 23: Ácido ursólico e 24: Ácido hidroxiursólico.

Figura 4 – Substâncias com atividades antifúngicas descritas na literatura.



- | | | | |
|----|------------------------------|---------------------|--------------------|
| 17 | $R_1 = \text{COOH}$ | $R_2 = \text{H}$ | Reína |
| 18 | $R_1 = \text{OCH}_3$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | Fisiona |
| 19 | $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ | $R_2 = \text{H}$ | Aloe-emodina Reína |
| 20 | $R_1 = \text{CH}_3$ | $R_2 = \text{H}$ | Crisofanol |



- | | | |
|----|-----------------------|-----------------------------------|
| 21 | $R = \text{CH}_3$ | Lupeol |
| 22 | $R = \text{COOH}$ | Ácido Betulínico |
| 23 | $R = \text{H}$ | ácido ursólico |
| 24 | $R = \alpha\text{OH}$ | 2 α -ácido hidroxiursólico |

Fonte: Autor (2014).

3.6 Atividade Antioxidante

Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio têm um papel importante nas reações bioquímicas e fisiológicas do corpo humano. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo e se não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo* podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (DROGE, 2002, MOLYNEUX, 2004; HUANG et al., 2005). Estudos anteriores indicaram um papel fundamental para os radicais livres como principais contribuintes para o envelhecimento e as doenças degenerativas do envelhecimento, como o declínio do sistema imunológico, câncer, catarata, disfunção cerebral e doença cardiovascular (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

Antioxidantes são substâncias, quando presentes em baixas concentrações, compatíveis ao substrato oxidante, retardam ou inibem as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000, HALLIWELL, 1995).

Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), estes são utilizados desde do início do século 20. Por causa do risco carcinogênico dos antioxidantes sintéticos, estudos recentes vêm demonstrando grande interesse nos antioxidantes naturais (VELIOGLU et al., 1998). Dentre os antioxidantes naturais destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno (RICE-EVANS; MILLE; PAGANGA, 1996), principalmente nos polifenóis presentes em plantas medicinais e alimentícias, pois são eficientes no combate e prevenção das doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo (PACKER; HIRAMATSU; YOSHIKAWA, 1999). Dentre os produtos naturais de origem vegetal com atividade antioxidante, os mais estudados são os flavonoides (RE et al., 1999).

Vários trabalhos científicos já foram realizados evidenciando as importantes atividades antioxidantes apresentadas pelos flavonoides (LIU et al., 2011, Xi et al., 2014, LUO et al., 2014) os quais atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonoides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado; reatividade em frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

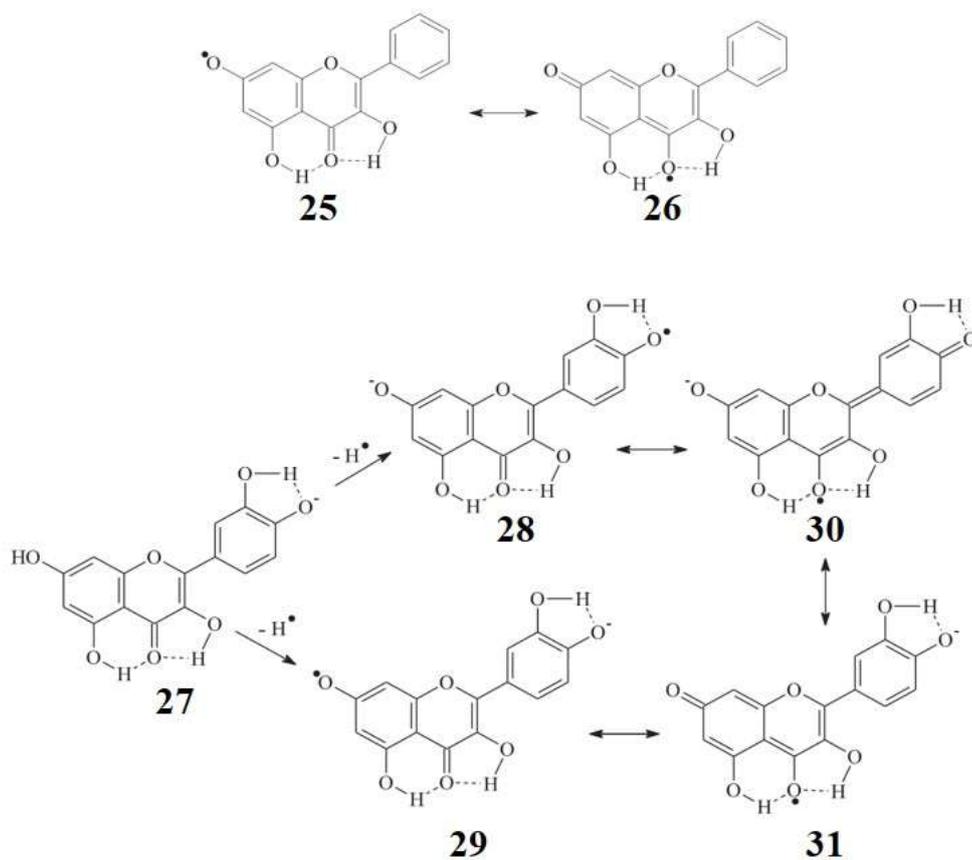
A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Flavonoides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa, por ex. a 5-hidroxi-flavona tem atividade abaixo dos limites de detecção. Flavonoides possuindo apenas uma hidroxila em 3, 6, 3' ou 4', assim como flavanonas apresentando apenas uma hidroxila em 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 6-OH também mostram fraca atividade. A 7-hidroxi-flavanona representa uma exceção, que pode ser justificada pela tendência maior da 7-OH em doar H^{*} devido à estabilização do radical formado por deslocalização com a carbonila em C-4 como mostrado na Figura 5 (estruturas 25 e 26) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os flavonoides, devido ao seu caráter fracamente ácido encontram-se, em geral, parcialmente ionizados, o que aumenta a estabilidade na posição C-4' e favorece a deslocalização do elétron desemparelhado do radical formado entre os

anéis A, B e C [por ex., quercetina parcialmente ionizada em C-4' (27)]. A doação do H radicalar para o radical livre ocorre principalmente nas posições C-4' (28) e C-7 (29). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais 28, 30 e 31, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio (PIETTA, 2000, RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

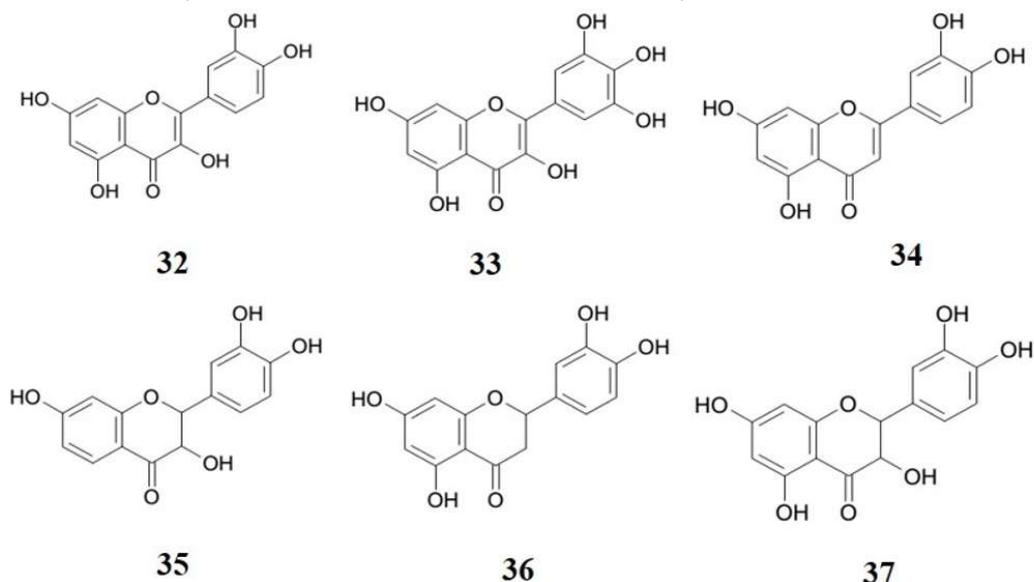
Os flavonoides com múltiplas hidroxilas (Fig. 6) possuem alta capacidade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathiona, ácido úrico e bilirrubina (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997, YANG et al., 2001).

Figura 5 - Mecanismo da estabilização elétron desemparelhados dos flavonoides.



Fonte: Barreiros; David; David, (2006).

Figura 6 - Substâncias pertencentes a classe dos flavonoides com potencial antioxidante.

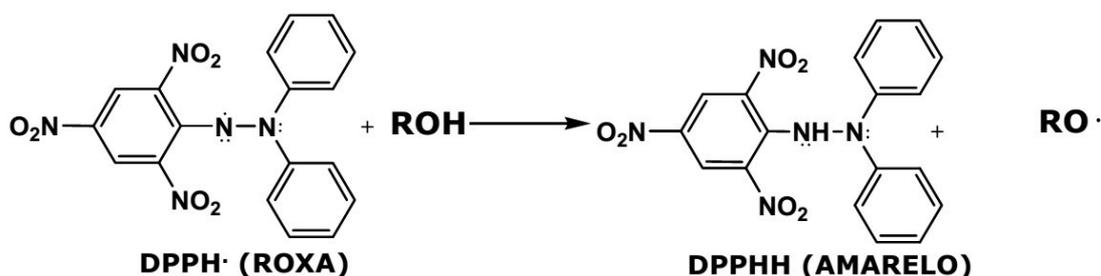


Legenda: Quercetina (32), Miricetina (33), Luteolina (34), Fustina (35), Eriodictiol (36), Taxifolina (37).
 Fonte: Barreiros; David; David (2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente ativas, na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ALVES et al. 2010). Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos, frações e substâncias isoladas de plantas (AMIÉ et al., 2003). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância a 517 nm. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

Figura 7 - Reação do DPPH.



Fonte: Amié et al. (2003)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensionais. Os espectros de RMN foram obtidos no espectrômetro Varian®, modelo Mercury Plus, operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm), tendo como referência interna o sinal do solvente deuterado. Os solventes utilizados foram CDCl_3 , CD_3OD e acetona- d_6 .

No processo de separação dos componentes de extratos e frações por cromatografia clássica foram utilizadas colunas cromatográficas (CC) de vidro, as quais foram escolhidas de acordo com a quantidade de material a ser adsorvido, com fase estacionária de sílica-gel 60 de granulometria 70–230 Mesh ($\phi= 0,063\text{--}0,20$ mm) da Maherey-Nagel® (MN). O acompanhamento da cromatografia em coluna foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica-gel 60/UV₂₅₄, de 0,2 mm de espessura e preparadas sobre folhas de alumínio, de procedência da MN®.

Para a visualização da fluorescência dos compostos nas CCDs, utilizou-se irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm. Posteriormente, as cromatoplasmas foram derivatizadas com reveladores químicos específicos para cada grupo de metabólitos, por meio de um borrifador automático de reagentes, modelo TLC/HPTLC *Sprayer*, acoplado a uma bomba compressora de ar, marca Camag®. Estas foram aquecidas à temperatura de 100 °C utilizando uma placa aquecedora com controle de temperatura, modelo TLC *Plate Heater*, da marca Camag®.

Na separação dos constituintes químicos das frações por cromatografia líquida foram utilizados os cromatógrafos líquidos de alta eficiência (HPLC): i) analítico, da marca Shimadzu (Tokyo- Japão), modelo Prominence, composto por uma bomba modelo LC-20AT com válvula solenoide com quatro canais, detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, degaseificador de membrana modelo DGU-20A, auto injetor de amostras modelo SIL-20A, interface de comunicação modelo CBM-20A acoplado a um microcomputador Pentium IV com software de integração LC/solution; ii) semipreparativo, da marca Varian Polaris®, composto por duas bombas, modelo Pro Star 210-215, detector com duplo canal de absorvância na região do ultravioleta e do visível, modelo Pro Star 325, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 500 μL . Interface de comunicação Varian, modelo RS-485/422 LCs acoplado a um microcomputador Pentium IV com software de integração Star WS Winxp.

As colunas cromatográficas utilizadas em HPLC foram: fase estacionária Gemini C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μm de d.i.) usada em escala analítica e Gemini C₁₈ (250 mm x 10 mm, 5 μm de d.i.) usada em escala semipreparativa, ambas da marca Phenomenex®.

O “clean-up” das amostras para injeção em HPLC foi realizado em cartucho de fase reversa (Strata C₁₈-E, Phenomenex®, Torrance, CA, USA), de 50 mg/1 mL (escala analítica) e de 500 mg/6 mL (escala semi-preparativa), ambos da marca Phenomenex®, seguido de filtração em filtro de seringa de nylon com 0,45 µm de tamanho de poro, 0,22 mm, da marca CRS® (*Chromatography Research Supplies*); e as soluções das amostras foram condicionadas em *vials* de 2,0 mL.

A água ultrapura utilizada na composição das fases móveis, foi obtida em um sistema Millipore Direct-Q3 (18,2 MΩ.cm) (Beadford, MA, USA). Os solventes, grau HPLC (Tedia® Brazil), foram utilizados após filtrados a vácuo em um sistema de filtração Phenomenex, com um funil de 250 mL e frasco coletor de 1 L, utilizando-se membranas de Nylon Phenomenex com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm e posteriormente, desgaseificados em um ultrassom, modelo 2510, marca Branson®.

4.2 Metodologias do Estudo Fitoquímico

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material botânico alburno (3,0 kg), raízes (3,0 kg), folhas (3,0 kg) e caule (2,8 kg) foi coletado por parataxônomo (Sr. Manoel Cordeiro) da Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém-Pará, na área do lote 15, próximo da Feira da Central de Abastecimento do Pará (CEASA) e identificado por especialista da mesma instituição, onde foi depositada uma exsicata no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental com as seguintes informações: Herbário IAN – nº de registro – 187050.

4.2.2 Perfis cromatográficos

Para análise dos perfis cromatográficos, as amostras foram extraídas da seguinte forma: 1,0 g de material botânico (raízes, alburno, folhas ou caules) seco e moído foi extraído com 20,0 mL de etanol 95% v/v por 24 horas, repetindo-se o ciclo, e as soluções resultantes foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo.

Em seguida, 10 mg de cada extrato foi solubilizado em uma mistura de H₂O:ACN (2:8), e submetido à etapa de “clean-up” por extração em fase sólida (SPE), empregando-se cartucho Strata C₁₈-E de fase reversa. Neste procedimento o cartucho (50,0 mg de adsorvente) foi condicionado com 1,0 mL de acetonitrila seguido de 1,0 mL de água; a suspensão com o extrato foi introduzida no cartucho e eluída com 2,0 mL de H₂O:ACN (2:8), e em seguida foi filtrada utilizando-se filtro de seringa de nylon com porosidade 0,45 µm e diâmetro igual a 22 mm, e posteriormente analisada por HPLC-UV/DAD.

A obtenção dos perfis cromatográficos das amostras foi adaptada a partir de metodologia proposta por Snyder; Kikerland; Glajch, (1997), onde 20 µL de cada solução dos extratos obtidos foram injetados em HPLC utilizando coluna C₁₈ e

gradiente amplo composto por H₂O:ACN, variando linearmente de 5-100% o modificador orgânico, por 60 minutos, usando vazão de 1,0 mL por minuto e detector de absorvância operando em varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

4.2.3 Obtenção dos extratos etanólicos brutos das folhas e do alburno

As folhas e alburno foram as partes da espécie *V. guianensis* escolhidas para dar prosseguimento ao estudo segundo discussão apresentada no item 5.1.

O material botânico foi seco em estufa de ar quente circulante a temperatura constante de 45 °C. Após peso constante o material foi triturado em moinho de facas e martelos, resultando em 1,0 kg folhas e 1,3 kg de alburno. O material foi submetido a extração com etanol por maceração, por um período de 24 horas, a uma proporção de 95% v/v, a uma razão de 1,0 kg de material seco e moído para 20 L de solvente. Após esse período de extração, repetiu-se o ciclo. Foram obtidos 180,0 g de extrato etanólico das folhas (rendimento igual 18% m/m) e 56,0 g de extrato etanólico do alburno (rendimento igual 4,3% m/m).

Uma porção dos extratos obtidos [Extr. EtOH (folhas) = 50 g e Extr. EtOH (alburno) = 40g] foram submetidos a partições líquido-líquido com diferentes solventes (Figs. 8 e 9), que deram origem às fases de partição, cujos rendimentos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Rendimentos obtidos para as fases dos extratos de alburno e folhas de *V. guianensis*.

Extrato	Massa (g)		
	FHex	FAcOEt	Fhidroalcoólica
Extrato etanólico (Folhas) (50 g)	15,0%	44,0%	40,0%
Extrato etanólico (alburno) (40 g)	3,7%	36,0%	32,0%

Figura 8 - Fluxograma da partição líquido - líquido do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*.

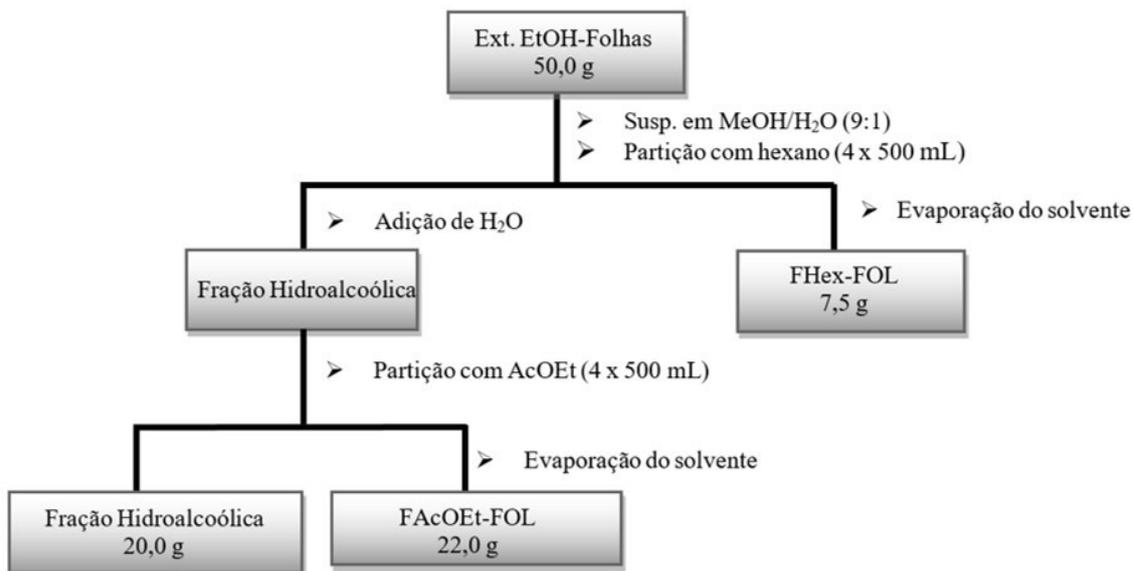
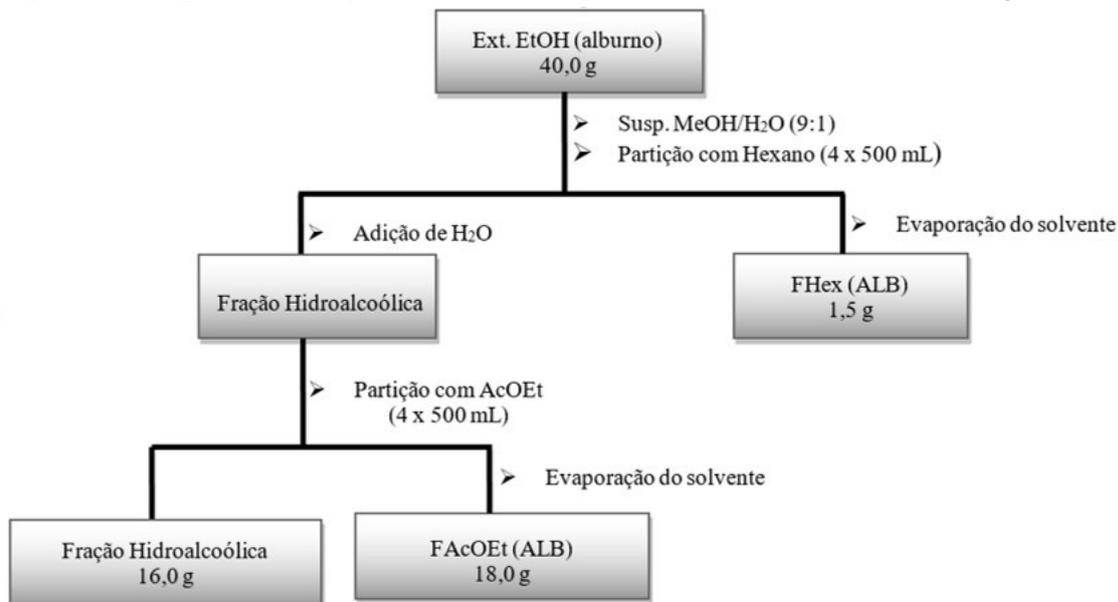


Figura 9 - Fluxograma da partição líquido - líquido do extrato etanólico do alburno de *V. guianensis*.



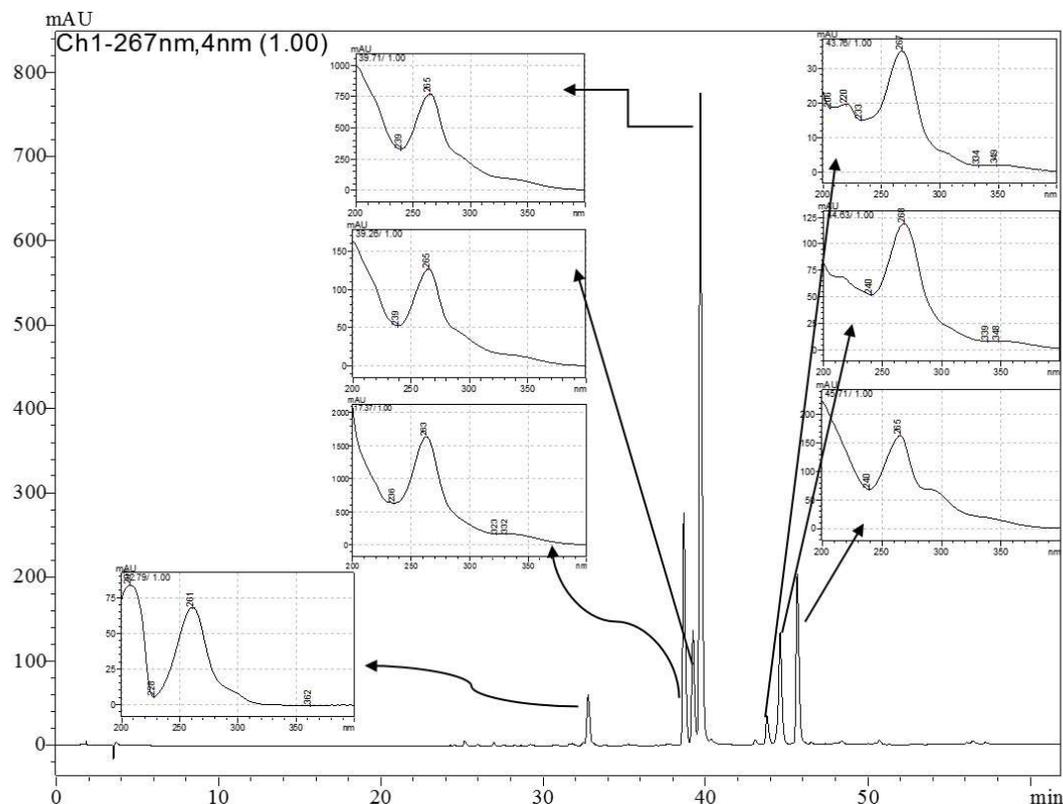
4.2.4 Fracionamento da fase hexânica (FHex-FOL) obtida da partição do extrato etanólico das folhas e isolamento das substâncias **S1** a **S12**

A fase hexânica das folhas (7,0 g), obtida conforme a figura 8 foi avaliada por HPLC, no modo analítico para verificação da complexidade e composição da mesma (Fig 10).

Diante do exposto, foi feito o fracionamento da fase hexânica em coluna cromatográfica filtrante, utilizando como eluentes misturas de hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, coletando-se 8 frações (FHex-

FOL-1 a 8), de 250 mL cada, conforme dados apresentados na figura 11, as quais foram analisadas por CCDC e RMN de ^1H .

Figura 10 – Cromatograma - Gradiente de ampla extensão da fase hexânica das folhas de *V. guianensis*, λ : 267 nm. Para cada pico são mostrados os respectivos espectros no Ultravioleta.

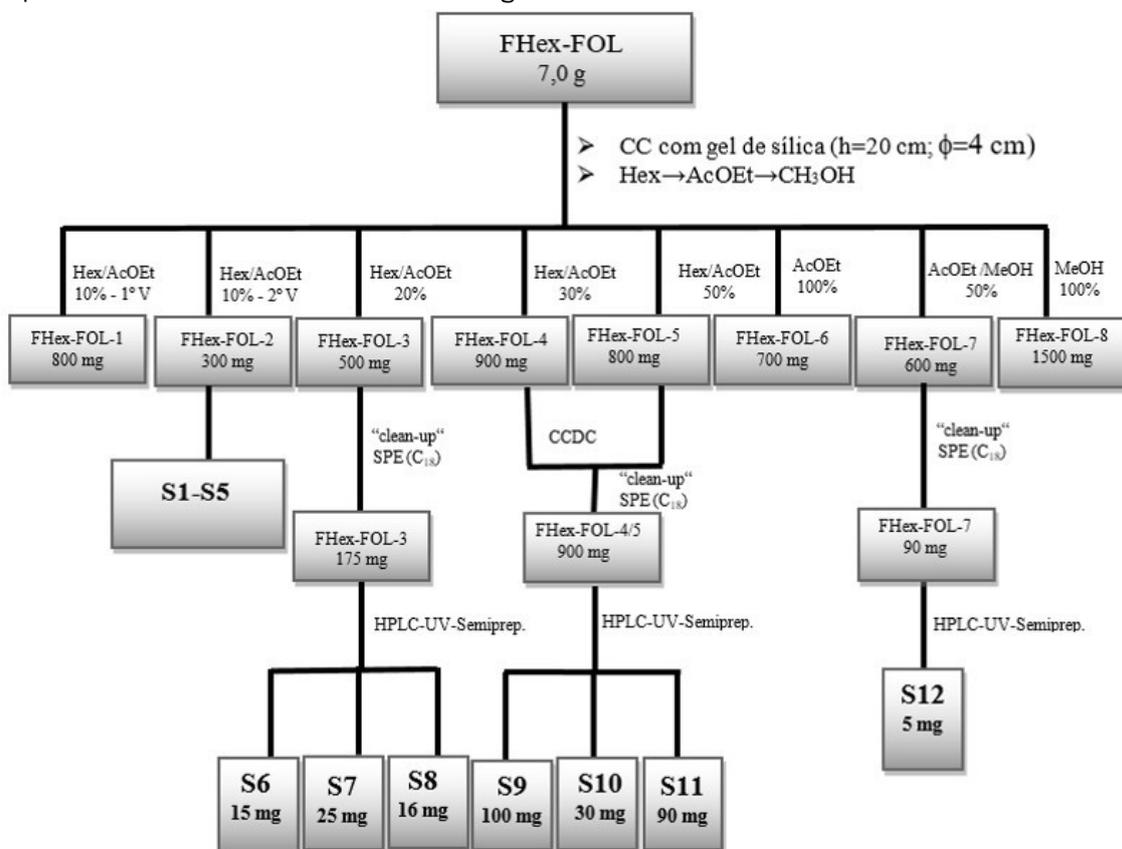


Os perfis cromatográficos e espectrométricos de algumas frações obtidas revelaram a presença de sinais característicos de isoflavonoides. Diante da simplicidade exibida nas CCDC (menor número de substâncias derivatizadas em NP (difенилборилоxiетилamina)-PEG (polietilenoglicol 4000) e da presença de poucas substâncias adsorvidas fortemente nas cromatoplasas (alta polaridade), optou-se em prosseguir o estudo cromatográfico com as frações FHex-FOL-3, FHex-FOL-4/5 e FHex-FOL-7.

A segunda fração eluída com Hex/AcOEt 10%, ao ser analisada por CCD, RMN ^1H e ^{13}C , foi possível identificar uma mistura de triptenos pentacíclicos, codificados como **S1- S5**.

As frações FHex-FOL-3, 4/5 e 7 foram submetidas a experimentos de otimização de separação em HPLC-analítico para posterior utilização e separação por HPLC-semipreparativo. Os perfis cromatográficos das três frações foram obtidos conforme procedimento descrito no item 4.2.2.

Figura 11 - Fluxograma do fracionamento da fase hexânica (FHex-FOL) obtida da partição líquido - líquido do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*.

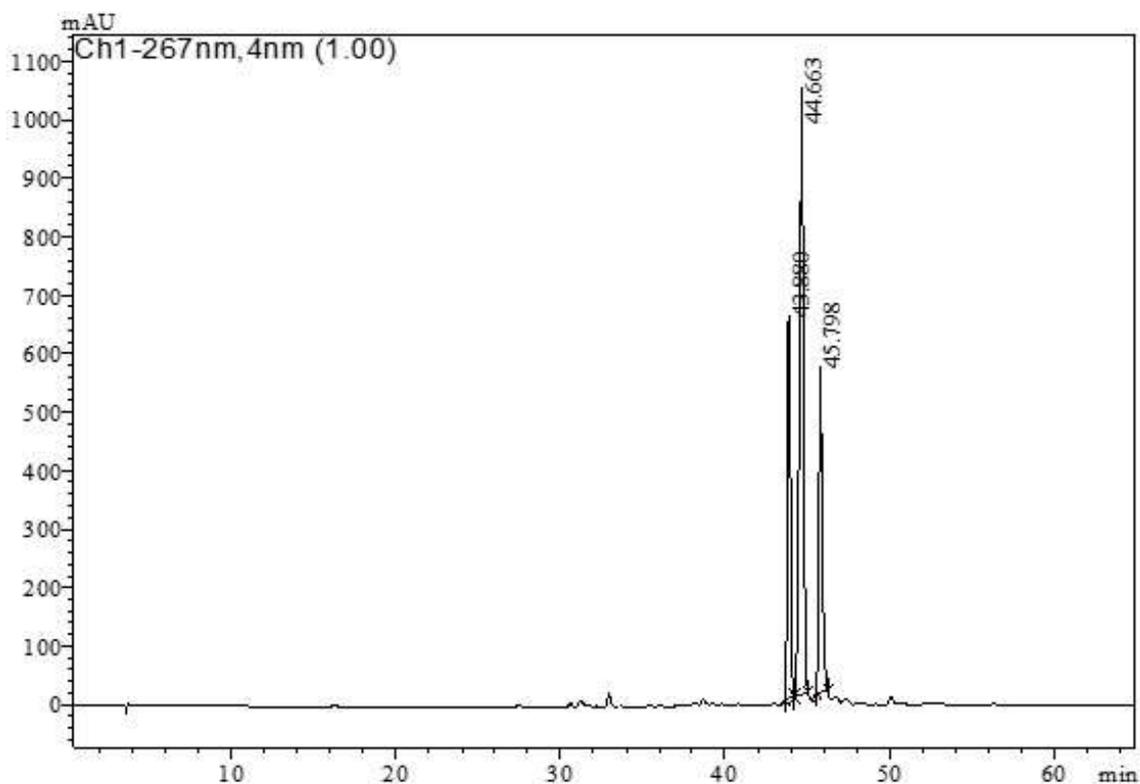


Iniciou-se a otimização do método cromatográfico em fase reversa, a partir de uma eluição gradiente, na qual se empregam, como constituintes da fase móvel, H₂O (solvente A) e como solvente orgânico ACN (solvente B), em misturas, com proporções que variam com o aumento da concentração do modificador orgânico em função do tempo.

Os procedimentos adotados, neste trabalho, seguiram a proposta apresentada por Snyder; Dolan (1996), que descrevem um método, via HPLC, como proposta para a eluição inicial da amostra em estudo, podendo-se prever, por este método, qual o modo de separação, se gradiente ou isocrático, será mais apropriado para a separação dos constituintes de uma determinada amostra. Deste modo, com base na proposta de Snyder; Dolan (1996), iniciou-se a otimização realizando um gradiente de ampla extensão, eluindo a fração FHex-FOL-3 (Fig 12), após tratamento por SPE e solubilização em ACN, variou-se a força da fase móvel (% de B) em água, de 5 a 100%, por 60 minutos.

Os intervalos entre as bandas cromatográficas correspondentes aos analitos de interesse variaram entre 43,880 e 45,798 min. Uma vez selecionada a faixa de interesse, iniciou-se os experimentos isocráticos para a otimização dos parâmetros de separação do extrato, buscando um método que permitisse o isolamento em escala semipreparativa.

Figura 12 - Cromatograma - Gradiente de ampla extensão da fase hexânica das folhas de *V. guianensis*, $\lambda = 267$ nm.



Como a relação $(T_{rz} - T_{ra})/T_g$ apresentou valor menor que 0,4, ou seja, $(43,880 - 45,798)/60 = 0,031$; a separação pode ser realizada em modo isocrático. Baseado no tempo de retenção do último pico (45,798 minutos), pode-se estipular o % de B em eluição isocrática (Tabela 7). Neste caso para os picos de interesse, a fase móvel inicial correspondente foi de 62% de ACN para uma eluição isocrática. Nesta proposta, buscam-se os ajustes na seletividade desejada para os analitos mantendo-se o fator de retenção (k) constante. Logo, as alterações na seletividade foram feitas levando-se em consideração as interações do soluto com o solvente. Porém o que se percebeu foi que o fator de separação (α) entre os picos de interesse não foram satisfatórios.

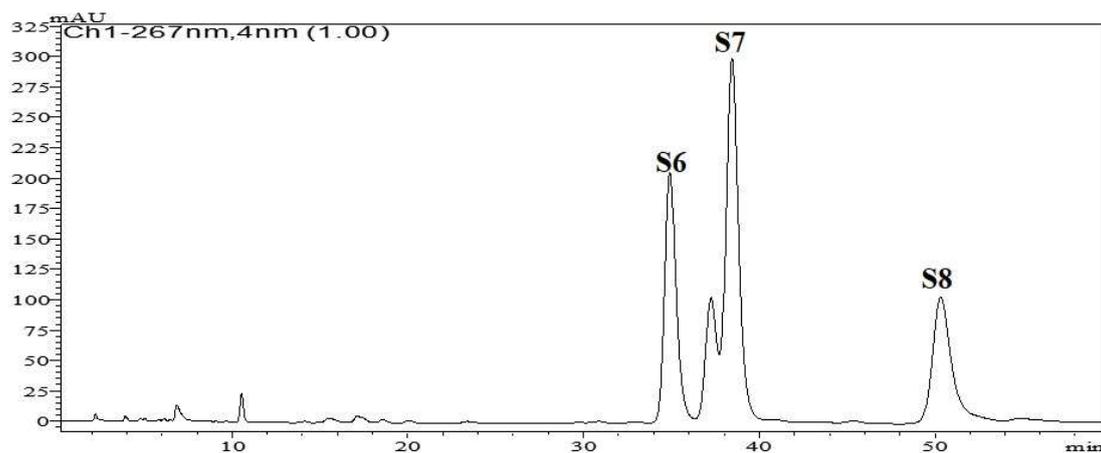
Dando continuidade à otimização do método de forma a obter as melhores condições para o isolamento em HPLC-UV para a fração FHex-FOL-3, realizou-se um experimento diminuindo a força do solvente B e a melhor condição obtida foi em sistema isocrático $H_2O:ACN$ 1:1 (Fig.13), com comprimento de onda de 267 nm. Quando submetida à HPLC-semipreparativo, com fluxo de $4,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, concentração = $14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a fração FHex-FOL-3, apresentou três picos majoritários: em $t_r = 35,0$ min (substância **S6**), em $t_r = 39,0$ min (substância **S7**) e em $t_r = 51,0$ min (substância **S8**).

Tabela 7 - Estimativa do % do solvente B (ACN) para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda T_z e do gradiente inicial.

T_z (min)	K = 5 (% de ACN)	K = 10 (% de ACN)	K = 20 (% de ACN)
5	6	0	-
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	60	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	-	100	94

Legenda: Condições: coluna 15 x 0,46 cm; gradiente 5-100% de ACN em 60 min; vazão 2 mL.min⁻¹

Figura 13 - Cromatograma obtido via HPLC-UV, no modo analítico, da fração FHex-FOL-3 com detecção de $\lambda = 267$ nm.



O perfil cromatográfico da fração FHex-FOL-4/5 mostrado na Figura 14 também foi submetida a experimentos de otimização em HPLC-UV analítico para posterior utilização e separação por HPLC-semipreparativo. A melhor condição para tal separação foi obtida com a fase móvel na composição de H₂O:ACN 1:1, obtendo-se o cromatograma da Figura 15. Quando submetida à HPLC-semipreparativo, com fluxo de 4,7 mL.min⁻¹, concentração = 10 mg.mL⁻¹, a fração FHex-FOL-3/4, exibiu três picos: em $t_r = 17,3$ min (substância **S9**), em $t_r = 18,8$ min (substância **S10**) e em $t_r = 20,0$ min (substância **S11**).

Figura 14 - Cromatograma - Gradiente de ampla extensão da fração FHex-FOL-4/5, $\lambda = 280$ nm.

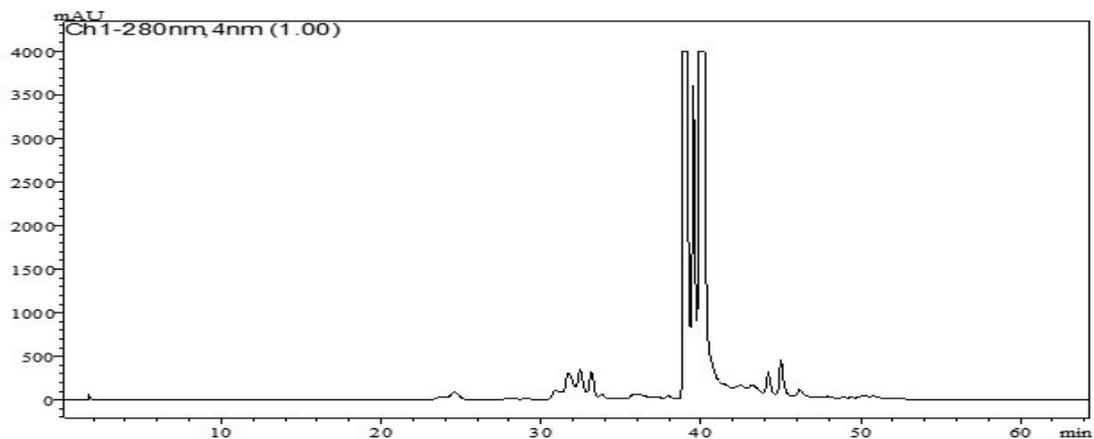
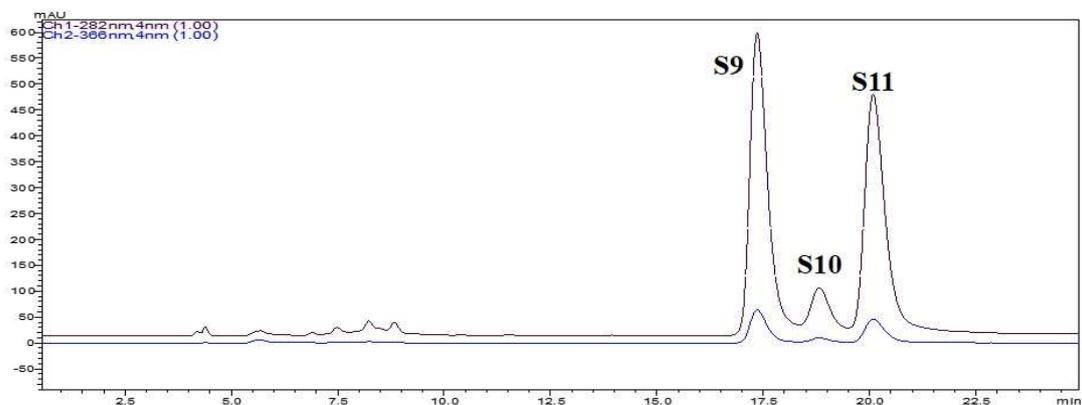
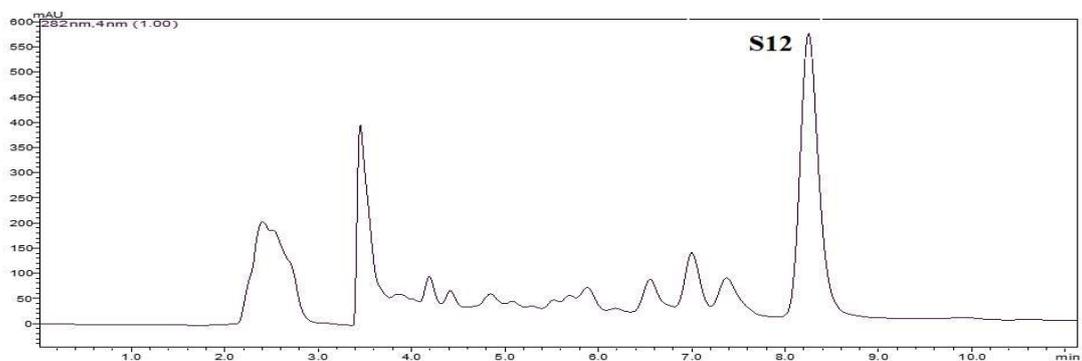


Figura 15 - Cromatograma obtido via HPLC-UV, no modo analítico, da fração FHex-FOL-4/5 em eluição isocrática, $\lambda = 282$ nm.



A otimização para o isolamento em HPLC-UV da fração FHex-FOL-6 foi obtida em sistema isocrático $H_2O:ACN$ 65:35 com comprimento de onda de 282 nm, cujo cromatograma é mostrado na figura 16. Quando submetida à HPLC-semipreparativa, com fluxo de $4,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\text{conc} = 14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a fração FHex-FOL-7, apresentou um o pico majoritário em $t_r = 8,3$ min (substância **S12**).

Figura 16 - Cromatograma obtido via HPLC-UV, no modo analítico, da fração FHex-FOL-7 em eluição isocrática, $\lambda = 282$ nm.



4.2.5 Fracionamento da fase hexânica (FHex-ALB) da partição do extrato etanólico do albúrico e isolamento das substâncias **S13** a **S18**

A fase hexânica do albúrico foi avaliada por HPLC-UV, no modo analítico para verificação da complexidade e composição da mesma (Fig 17) e foi verificada uma alta resolução do cromatograma com dois picos majoritários.

A fase hexânica do extrato etanólico albúrico (1,5 g), obtido conforme o fluxograma da figura 9 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluentes misturas de hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se sete frações (FHex-ALB-1 a 7) (Fig. 19). As frações foram monitoradas por CCDC e reveladas com VAS (vanilina-ácido sulfúrico), NP/PEG (difetilboriloxietilamina, polietilenoglicol 4000) e luz UV. Com base nos dados espectrométricos de RMN ^1H das frações FHex-ALB-3, FHex-ALB-4 e FHex-ALB-7, observou-se que elas continham substâncias majoritárias em mistura, as quais foram purificadas por recristalização com metanol, obtendo-se as substâncias **S13** (50,0 mg), **S14** (50,0 mg) e **S5** (20,0 mg), respectivamente.

À fração FHex-ALB-6 foi adicionada uma mistura de água - acetonitrila (2:8) promovendo a precipitação de um sólido amorfo, que após ser analisado por CCDC usando como revelador VAS, além de análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , possibilitou a identificação de uma mistura dos esteroides **S15** e **S16** (100 mg). O sobrenadante desta fração foi concentrado e o resíduo obtido (200 mg) foi submetido ao fracionamento em HPLC semipreparativo, no modo de eluição isocrático com água - acetonitrila (1:1), fluxo de $4,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, visualizado a 282 nm (Figura 18), usando uma coluna C_{18} Gemini da Phenomenex[®] (250 × 10 mm, 10 μ), resultando no isolamento das substâncias **S17** (10 mg) e **S18** (14 mg), que exibiram, no cromatograma, os picos majoritários com tempos de retenção 7,2 min (substância **S17**) e 9,8 min (substância **S18**). As substâncias foram identificadas através de métodos espectroscópicos usuais de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.

Figura 17 - Cromatograma - Gradiente de ampla extensão da fase hexânica do albúrico de *V. guianensis*, $\lambda = 266$ e 254 nm. Para os picos majoritários foram mostrados os respectivos espectros no Ultravioleta.

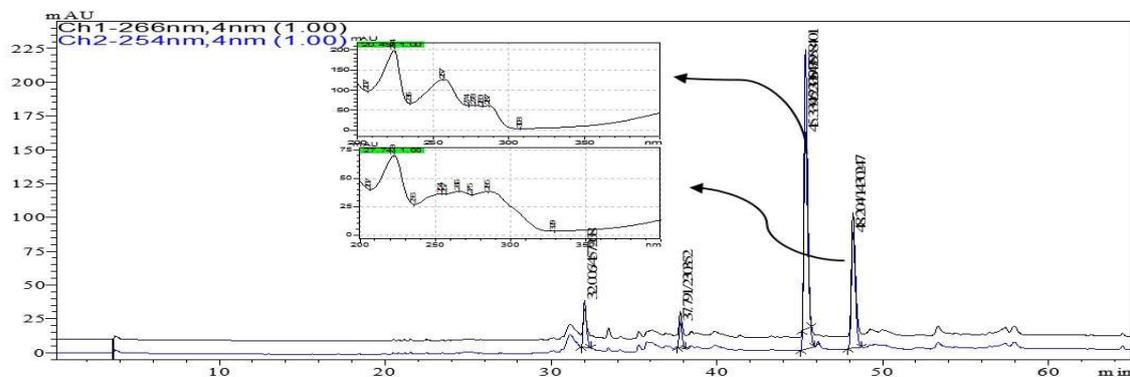


Figura 18 - Cromatograma obtido via HPLC-UV, no modo analítico, da fração FHex-FOL-5 (sobrenadante) em eluição isocrática, $\lambda = 282 \text{ nm}$.

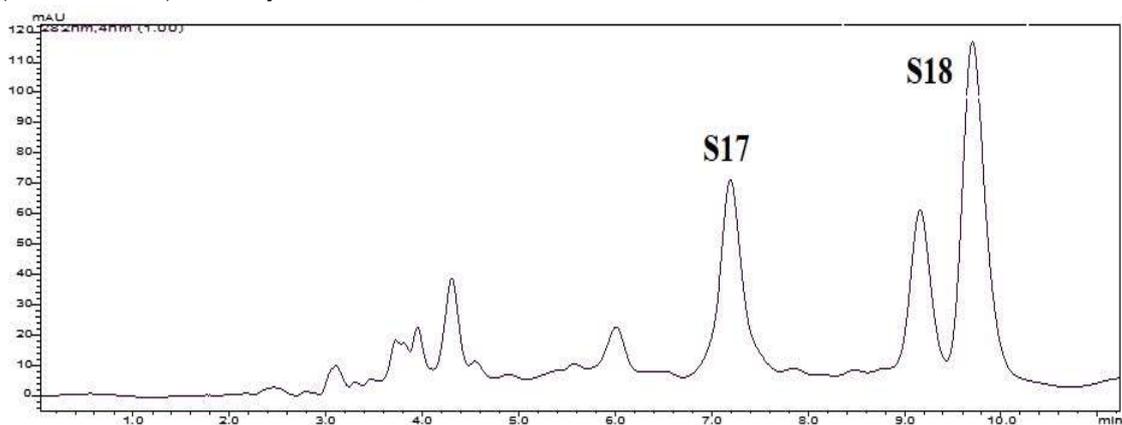
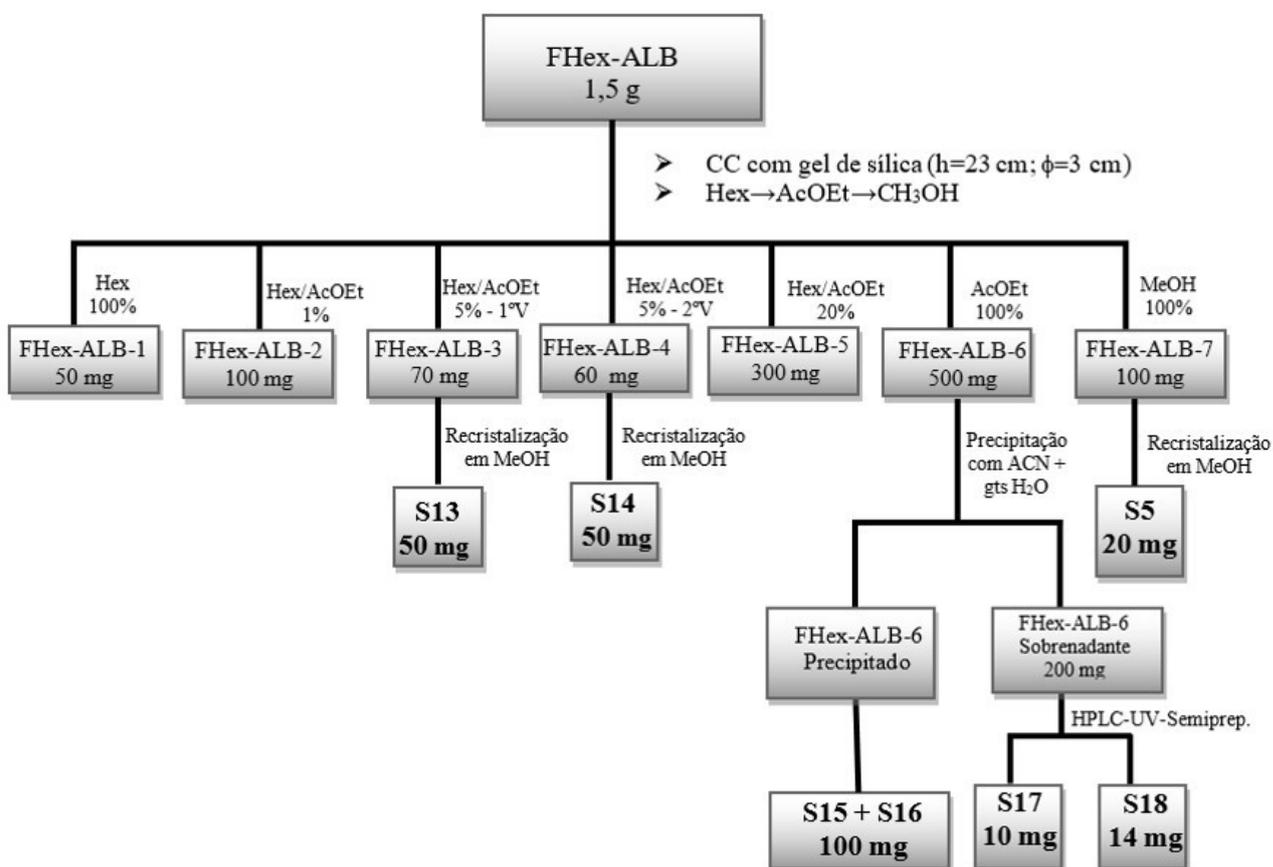


Figura 19 - Fluxograma do fracionamento da fase hexânica da partição líquido - líquido do extrato etanólico do albumo de *V. guianensis*



4.3 Metodologias para Avaliação das Atividades Biológicas

4.3.1 Atividade antifúngica pelo método de difusão em disco e pelo método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC)

Estes testes foram realizados no Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Química Fina (PPGQ-UFPA), sob supervisão do Prof. Dr. Alberdan Silva Santos.

Para a execução dos ensaios foram utilizadas as cepas: *Candida guilliermondii* (IOC 2889), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), *Trichoderma aureoviride* (IOC 3963) e *Microsporium gypseum* (IOC 2733).

Na etapa de triagem empregou-se o método de difusão em disco descrito por Bauer et al. (1966), determinando quais os extratos, frações e substâncias puras apresentavam ou não efeito antifúngico. Para tanto, procedeu-se a aplicação de 20 µL da amostra a ser avaliada em um disco de papel de filtro esterilizado (5 mm), nas concentrações de 20,0 mg.mL⁻¹ para os extratos brutos e frações e 10,0 mg.mL⁻¹ para as substâncias puras. Em seguida, os discos foram dispostos em placas de Petri esterilizadas e devidamente identificadas, contendo meio de cultivo e microrganismo. Na mesma placa foram colocados um controle positivo contendo 20 µL de um antimicótico (nitrato de miconazol a 20,0 mg.mL⁻¹) e um controle negativo contendo apenas o solvente de dissolução da amostra.

As placas foram incubadas à temperatura de crescimento do microrganismo e observadas a cada 24 horas. A atividade é considerada positiva quando há observação de zonas de inibição do desenvolvimento microbiano, que foram mensuradas em termos de diâmetro do halo, com o auxílio de régua e comparado ao controle positivo. Os testes foram realizados em duplicata para cada cepa indicadora utilizada.

Para as amostras testes que se mostraram ativas na triagem preliminar, procedeu-se à determinação quantitativa pelo método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC) segundo Herrera (2001).

Foram preparadas soluções na concentração de 20,0 mg.mL⁻¹ para os extratos brutos e frações e 10,0 mg.mL⁻¹ para as substâncias puras. A partir dessas soluções retirou-se 100 µL e transferiu-se para as placas de Petri contendo meio de cultura GPY (2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura). As amostras a serem avaliadas foram espalhadas com o auxílio da alça de *Drigalsky* até secagem das mesmas. Após secas, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C para evaporação do solvente, por 12 horas. Alíquotas de 100 µL da suspensão de microrganismos foram semeadas na superfície do meio de cultura com o auxílio da alça de *Drigalsky* e semeadas em placas que não continham extrato, fração ou substância para comparação e controle de crescimento dos fungos. As placas contendo amostra e microrganismos e as placas contendo apenas microrganismos foram incubadas a 27 °C e as leituras de crescimento das colônias foram realizadas, a cada 24 horas, em um contador de colônias manual. Os testes foram realizados

em duplicata e a partir da leitura de crescimento dos microrganismos (UFC/72 horas) foi calculada a atividade relativa.

4.3.2 Avaliação da atividade antifúngica pelo método de Microdiluição em Caldo para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A atividade antifúngica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *V. guianensis* foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo, com base no documento M38-A2 (CLSI, 2008).

A primeira etapa do método consistiu em pesar 6,4 mg do material a ser testado (extrato, fração e/ou substâncias isoladas) e solubilizar em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a atingir uma solução estoque na concentração de 6400 µg.mL⁻¹. Em seguida, foram preparadas diluições 1:50 em RPMI tamponado com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma®), atingindo o intervalo de concentrações de 128 a 0,25 µg.mL⁻¹ após diluição. Posteriormente, 100 µL de cada solução foram distribuídos, em placa de microtitulação com 96 poços, desde a coluna 2 até a 11, correspondendo cada coluna a uma concentração.

Para a realização dos testes de sensibilidade foram avaliadas as seguintes cepas de referência: *Candida Albicans* (INGOS 40175), *Candida Krusei* (ATCC 6258) e *Candida dubliniensis* (CBS 798 7) e ainda dois isolados clínicos de *Fonsecaea pedrosoi*, pertencentes ao Laboratório de Dermato-Imunologia. Estas cepas foram cultivadas em ágar batata-dextrose (Sigma-aldrich, EUA) por 10 dias a 35°C. A suspensão de inóculo foi preparada por raspagem suave da superfície da colônia usando um swab estéril umedecido com solução salina, contendo 0,05% Tween 40 e a suspensão foi homogeneizada em vortex por cerca de 5 minutos. As partículas pesadas na suspensão de células foram deixadas em repouso por 3 a 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e a densidade celular ajustada entre 0,15 a 0,17 (68 a 71% de transmitância) por espectrofotômetro (530 nm). Esta suspensão foi diluída 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI-1640, tamponado com MOPS.

Alíquotas de 100 µL da suspensão de conídio foram colocadas nos poços das placas contendo os extratos, frações e substância isolada. Desta forma, a concentração final analisada foi de 64 a 0,125 µg.mL⁻¹. Em cada placa foram colocados os inóculo a serem analisados sendo a coluna 1, como controle de esterilidade do meio do teste, pois foi colocado somente o meio RPMI tamponado com MOPS, sem antifúngico e sem fungo. A coluna 12 funcionou com controle do crescimento sendo preparado com 100 µL de RPMI tamponado com MOPS e 100 µL de inóculo.

O ensaio de sensibilidade *in vitro* foi realizado em placas estéreis de 96 poços com o fundo em U, como descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M38-A2. A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada após 5 dias de incubação a 30 °C, sendo definida como a mínima concentração do fármaco capaz de reduzir em 100% o crescimento visual do fungo quando

comparado com o controle do crescimento, bem como gerar uma diferença estatística significativa na leitura de DO a 530 nm em leitor de microplaca (Dynex Technologies, Chantilly, EUA) quando comparado com os grupos onde houve crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada a partir das diluições onde não se identificou crescimento fúngico visível, retirando-se uma alíquota de 100 µL dos poços e semeando-se na superfície de ágar Sabouraud. A leitura foi feita após 5 dias de incubação a 30 °C e a CFM foi definida como a menor concentração de extrato, fração ou substância isolada em estudo capaz de causar a morte do inoculo inicial (RASHED et al., 2014). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada pelo método de captura de radicais DPPH•. Este método tem por base a redução da absorbância do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a 517 nm, pela ação de compostos redutores de radicais livres. Para realização dos testes preparou-se uma solução de DPPH• (85% de pureza da marca Fluka®) a 60 µM em MeOH, com absorbância inicial de aproximadamente $0,62 \pm 0,02$ ($\lambda = 517$ nm), à temperatura ambiente.

Para o preparo da solução-mãe, os extratos foram solubilizados em metanol e colocados em ultrassom por 15 min. As concentrações destas soluções foram de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a partir dessas foram feitas sucessivas diluições de acordo com a reatividade das amostras. A mistura reacional na cubeta, para todas as amostras, foi composta pela adição de 1950 µL da solução do radical DPPH• em 50 µL das amostras diluídas, em várias concentrações, de modo a se obter uma curva de inibição. No teste com o branco as amostras foram substituídas por metanol.

A absorbância das amostras foi lida de maneira a observar o efeito da concentração sobre o radical DPPH• e a leitura da absorbância foi anotada no primeiro minuto ($t = 0$) e monitorada, a cada 5 min, até quando a absorbância se manteve constante.

Os valores das absorbâncias foram convertidos para porcentagem de atividade antioxidante (%) usando a seguinte fórmula:

$$\text{Ativ. Antiox. (\%)} = [1 - (\text{Abs}_A / \text{Abs}_B)] \times 100$$

Onde: Abs_A e Abs_B são as absorbâncias da amostra e do controle (branco) no término da reação, respectivamente.

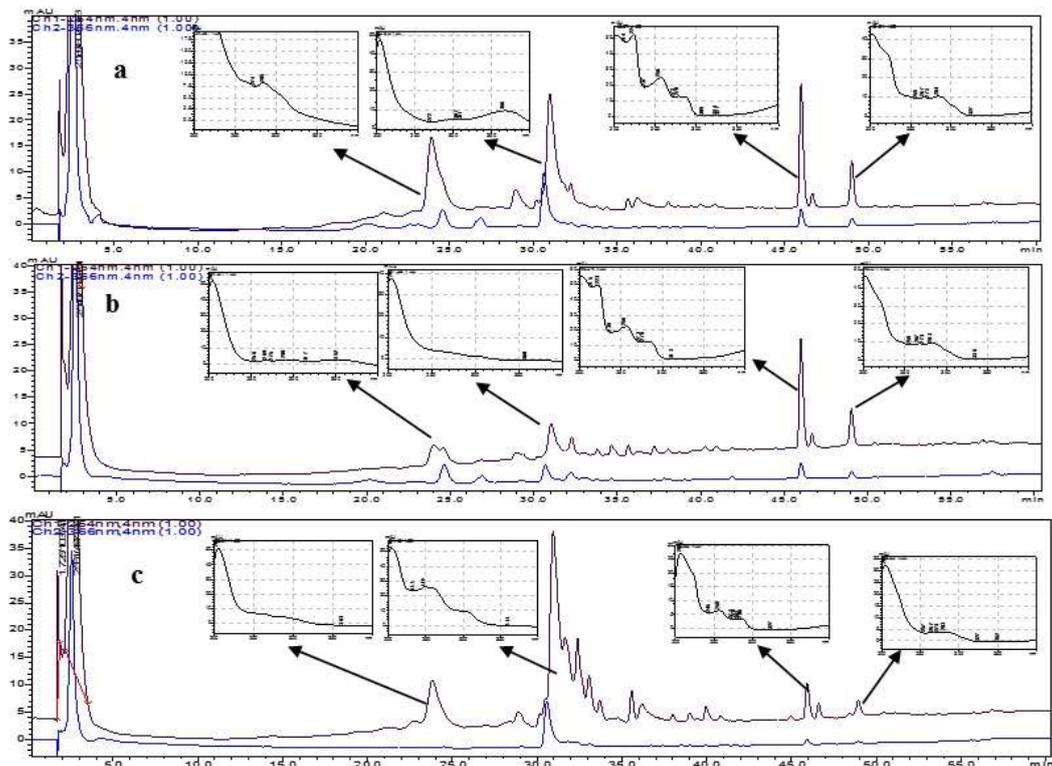
A atividade de sequestro do radical DPPH• também foi expressa por meio da concentração do extrato ou substâncias isoladas necessárias para reduzir a 50% do radical DPPH• (SILVA et al. 2010). Os valores da CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram obtidos por regressão linear ($P < 0,05$) utilizando os valores de concentração das amostras versus a inibição em intervalo linearmente proporcional.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise cromatográfica e espectrométrica dos extratos etanólicos de *V. guianensis*

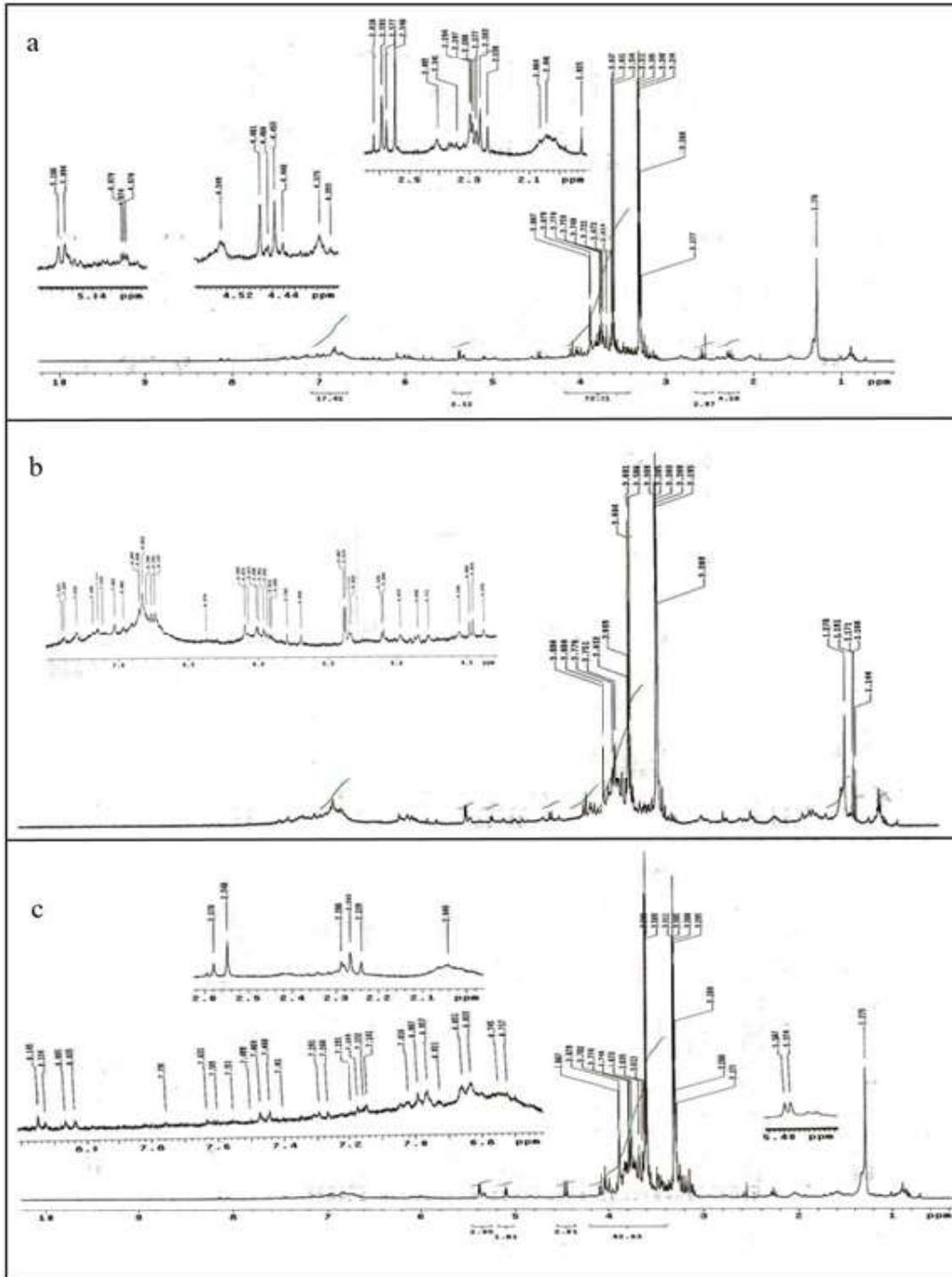
Os cromatogramas obtidos dos extratos dos diferentes órgãos de *V. guianensis*, nota-se semelhanças entre os extratos etanólicos do alburno, caule e raiz (Fig. 20 – “a”, “b” e “c”) no que diz respeito à composição química (bandas de absorção no UV) e tempos de retenção, apresentando picos majoritários em $t_r = 23,9$ min, $t_r = 30,9$ min, $t_r = 45,9$ min e $t_r = 49,0$ min. Com base nessas informações cromatográficas associadas com dados espectrométricos de RMN ^1H desses extratos (Fig. 21 – (a), (b) e (c)), confirmou-se similaridades no perfil cromatográfico e espectrométrico dos seguintes órgãos da planta: alburno, caule e raiz.

Figura 20 - Cromatogramas obtido via HPLC-UV dos extratos EtOH de *V. guianensis* no modo gradiente de ampla extensão, $\lambda = 254$ e 366 nm. Para os picos majoritarios ou de interesse são mostrados os respectivos espectros no Ultravioleta.



Legenda: a - alburno, b – raiz, c -Caule

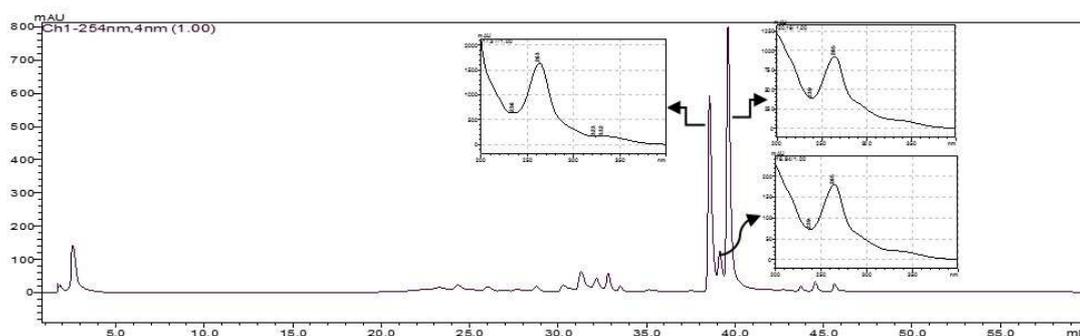
Figura 21 - Espectros de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) dos extratos etanólicos de *V. guianensis*.



Legenda: a - alburno, b - Raiz, c - Caule.

O perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas (Fig. 22) apresentou-se menos complexo em relação aos demais órgãos, exibindo três picos majoritários em $t_r = 38,0$ min, $t_r = 39,0$ min e $t_r = 40,0$ min. Os espectros no UV dos três picos majoritários apresentaram máximo de absorção variando de 260-265 nm (Fig. 22), indicativas de presença de isoflavonoide ou esqueleto flavonônico (RUKACHAISIRIKUL et al., 2002; AHN et al., 2003).

Figura 22 - Cromatogramas obtido via HPLC-UV, no modo analítico do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis* no modo gradiente de ampla extensão, $\lambda = 254$ nm. Para os picos majoritários ou de interesse são mostrados os respectivos espectros no Ultravioleta.

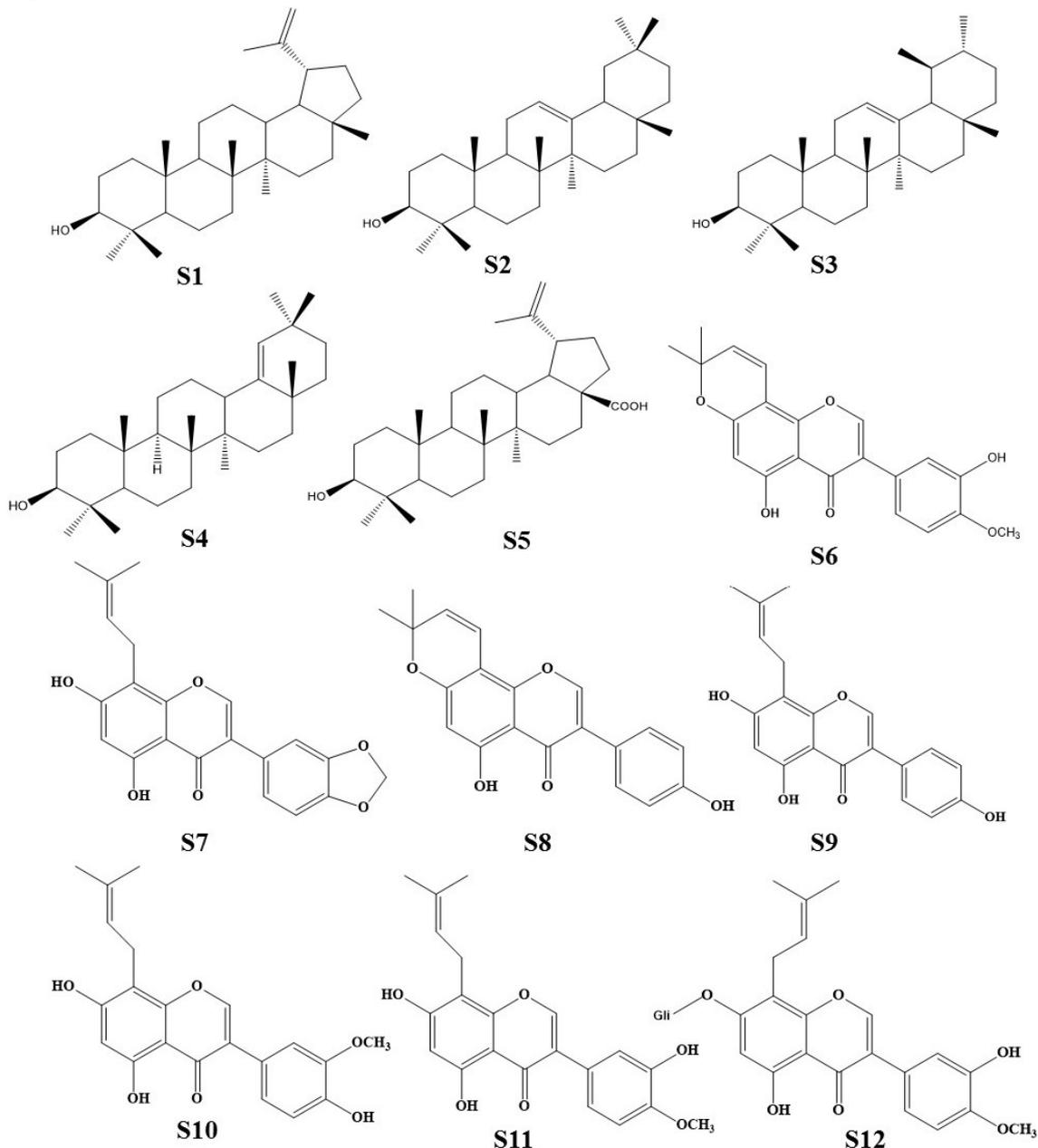


Diante desses dados cromatográficos e espectrométricos passou-se a considerar, para continuidade dos estudos químico-biológicos, os seguintes órgãos vegetais de *V. guianensis*: alburno e folhas. Dentre os similares, o alburno foi escolhido pois apresentou uma intensidade maior dos picos majoritários comuns tanto no caule como na raiz, sugerindo assim uma maior concentração desses metabólitos neste órgão.

5.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *V. guianensis*

O fracionamento do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis* levou ao isolamento de doze substâncias (Fig. 23), cinco triterpenos identificados em mistura (**S1** - **S5**) e sete isoflavonoides (**S6** - **S12**). As estruturas moleculares dos novos produtos naturais (**S7**, **S8**, **S11** e **S12**) foram determinadas através da análise detalhada de seus dados espectroscópicos de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, NOE-diff e técnicas bidimensionais com correlações Homonucleares e Heteronucleares a uma ou a várias ligações), espectrometria de massas (EM) e comparação com dados obtidos da literatura de substâncias idênticas e/ou similares. As substâncias **S7** e **S8** são conhecidas como produtos de síntese, no entanto, este trabalho acrescenta dados espectroscópicos ainda não relatados na literatura. Ressalta-se ainda, que todas essas substâncias estão sendo descritas pela primeira vez no gênero, contribuindo, portanto, para o estudo químico do gênero *Vatairea*.

Figura 23 - Estruturas das substâncias isoladas das folhas de *V. guianensis*.



5.2.1 Elucidação estrutural da mistura de S1-S5

O estudo fitoquímico da fração FHex-FOL-2 obtida do fracionamento da fase hexânica das folhas de *V. guianensis* resultou na obtenção de uma mistura de triterpenos: lupeol (**S1**), α -amirina (**S2**), β -amirina (**S3**), germanicol (**S4**) e ácido betulínico (**S5**). As estruturas dessas substâncias foram determinadas com base em análises de RMN ^1H (Figs. 24-27) e ^{13}C (Figs. 28-31) e comparação com dados da literatura. O ácido betulínico (**S5**) também foi isolado como um pó incolor amorfo (20 mg) da fração FHex-ALB-7 da fase hexânica do alburno de *V. guianensis* e foi identificado através da análise dos dados de RMN de ^1H (Figs. 32 e 33) e ^{13}C (Fig.

34) além de comparação com dados da literatura (HABILA et al., 2010). Destaca-se que estas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Vatairea*. Os dados de RMN de ^{13}C das substâncias lupeol (**S1**), α -amirina (**S2**), β -amirina (**S3**), germanicol (**S4**) e ácido betulínico (**S5**) juntamente com os dados da literatura, estão descritos na Tabela 8.

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H de **S1-S5**, 300 MHz, CDCl_3 .

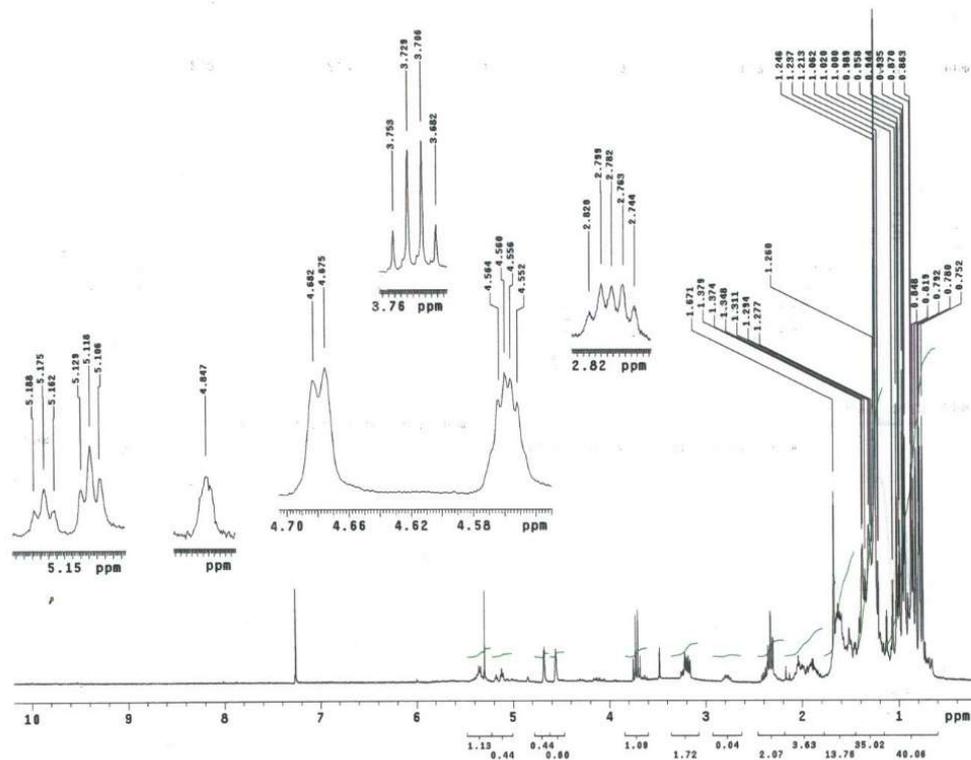
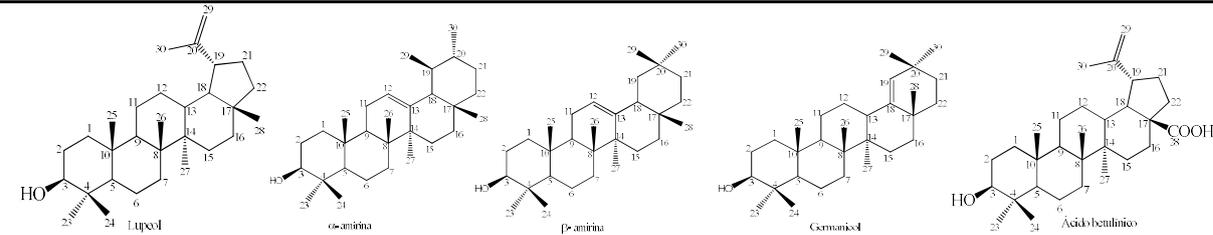


Tabela 8 - Dados de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) dos triterpenos isolados das folhas de *V. guianensis* juntamente com os dados da literatura.



C	aS1	S1	bS2	S2	bS3	S3	bS4	S4	cS5	S5
1	38,7	38,7	38,7	38,6	38,7	38,5	38,5	38,5	38,6	38,5
2	27,4	27,4	27,2	27,1	27,3	27,1	27,4	27,4	27,2	27,6
3	78,9	79,0	78,3	79,0	79,0	79,0	79,0	79,0	78,4	78,6
4	38,8	38,8	38,7	38,7	38,8	38,8	39,0	38,9	38,7	38,6
5	55,3	55,2	55,2	55,1	55,3	55,1	55,7	55,4	55,2	55,1
6	18,3	18,3	18,3	18,3	18,5	18,3	18,3	18,3	18,2	18,0
7	34,2	34,2	32,9	32,8	32,8	32,7	34,7	34,6	34,2	34,1
8	40,8	40,7	40,0	39,0	38,8	38,8	40,8	40,6	40,6	40,4
9	50,4	50,3	47,7	47,6	47,7	47,5	51,3	51,1	50,4	50,3
10	37,1	37,1	36,9	36,8	37,6	37,6	37,3	37,3	37,0	36,9
11	20,9	20,8	23,3	23,4	23,6	23,6	21,2	21,0	20,7	20,6
12	25,1	25,0	124,3	124,3	121,8	121,6	26,2	26,1	25,4	25,3
13	38,0	38,0	139,3	139,5	145,1	145,1	39,0	38,9	38,1	38,1
14	42,8	42,7	42,0	42,0	41,8	41,8	43,4	43,2	42,3	42,2
15	27,4	27,4	28,7	28,7	26,2	26,1	27,6	27,4	30,5	30,3
16	35,5	35,5	26,6	26,5	27,0	27,1	37,7	37,6	32,2	32,0
17	43,0	43,0	33,7	33,8	32,5	32,5	34,4	34,3	55,9	56,0
18	48,2	48,2	58,9	59,0	47,4	47,5	142,8	142,7	46,8	46,7
19	47,9	47,9	39,6	39,6	46,9	46,7	129,8	129,6	49,0	49,0
20	150,9	150,9	39,6	39,5	31,1	31,0	32,3	32,3	150,7	150,5
21	29,8	29,7	31,2	31,2	34,8	34,6	33,4	33,3	29,6	29,4
22	40,0	40,0	41,5	41,4	37,2	37,2	37,4	37,3	37,0	36,9
23	28,0	27,9	28,1	28,0	28,2	28,3	28,0	28,0	27,6	26,7
24	15,4	15,3	15,6	15,6	15,5	15,5	15,4	15,4	15,4	15,1
25	16,1	16,1	15,6	15,6	15,6	15,6	16,1	16,0	15,9	15,6
26	15,9	15,9	16,8	16,7	16,9	16,8	16,7	16,6	16,0	15,8
27	14,5	14,5	23,3	23,3	26,0	26,1	14,6	14,5	14,5	14,4
28	18,0	18,0	28,1	28,0	28,4	28,3	25,3	25,2	178,4	178,9
29	109,3	109,3	17,4	17,4	33,3	33,3	31,3	31,3	109,2	109,2
30	19,3	19,2	21,3	21,3	23,7	23,6	29,2	29,1	19,2	19,0

Legenda: ^a Souza et al. (2001); ^b Mahato; Kundu (1194); ^c Habila et al. (2010).

Figura 25 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **S1-S5**, 300 MHz, CDCl_3 , na região de (0,727-1,404 ppm).

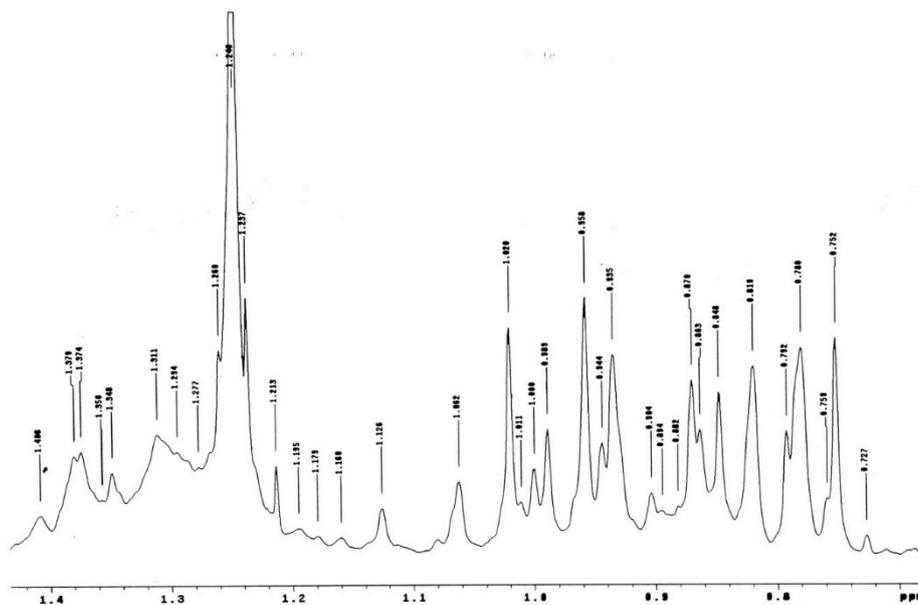


Figura 26 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **S1-S5**, 300 MHz, CDCl_3 , na região de (1,179-1,671 ppm).

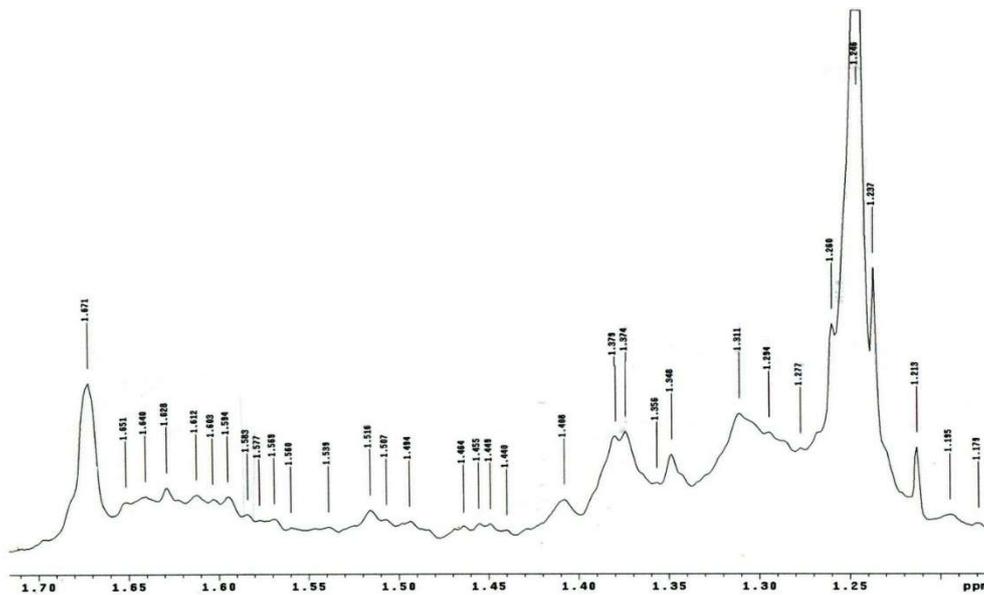


Figura 27 - Expansão do espectro de RMN ¹H de **S1-S5**, 300 MHz, CDCl₃, na região de (1,747-5,363 ppm).

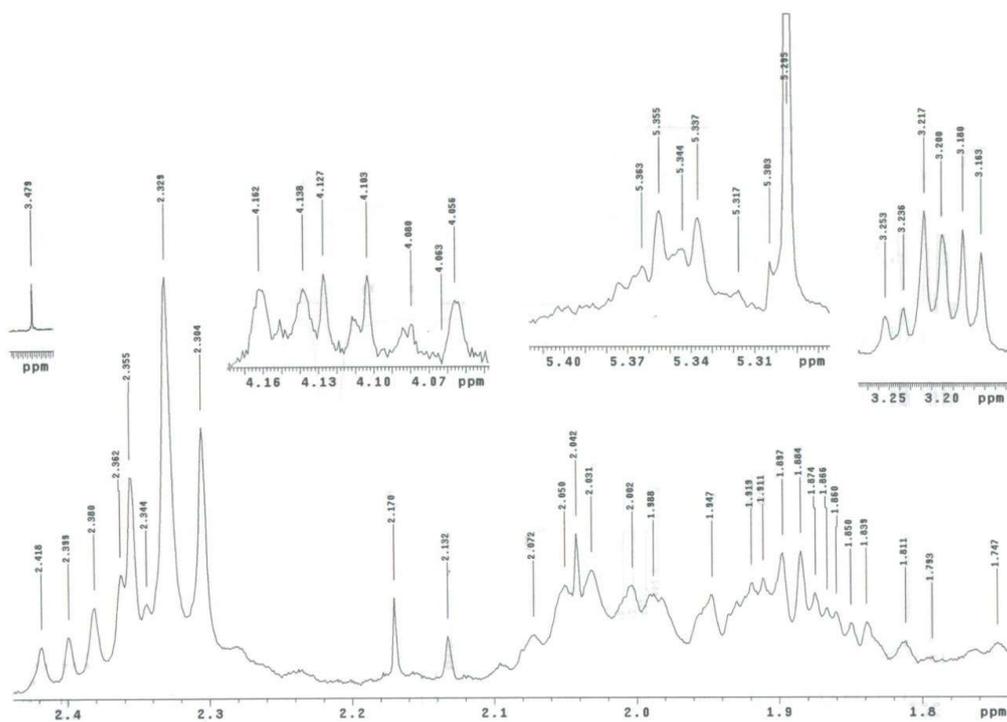


Figura 28 - Espectro de RMN ¹³C de **S1-S5**, 75 MHz, CDCl₃.

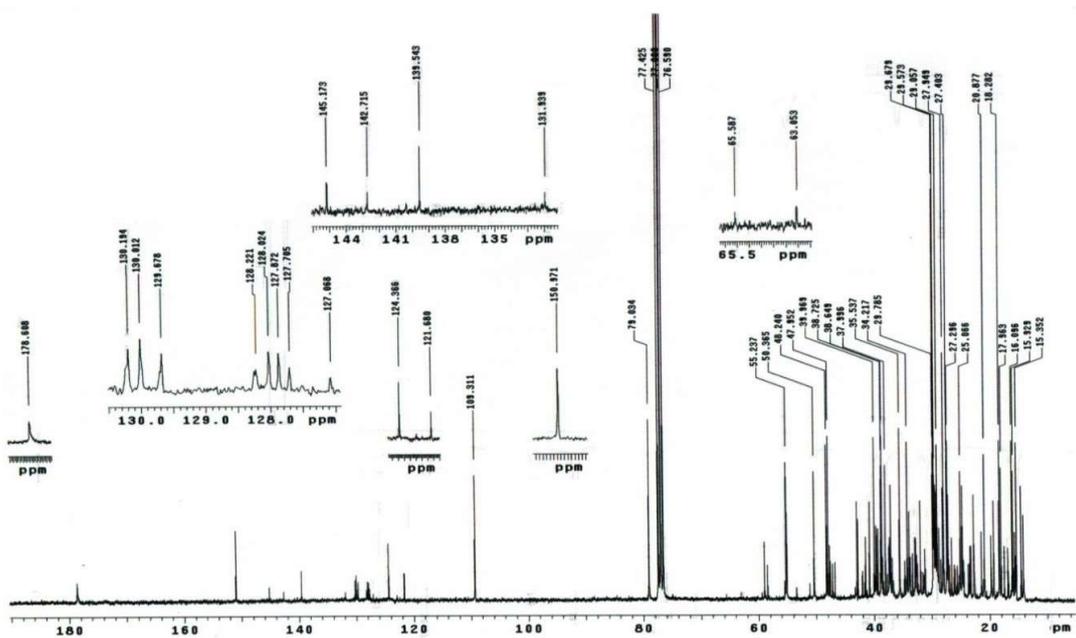


Figura 29 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S1-S5**, 75 MHz, CDCl_3 , na região de (14,123-29,785 ppm).

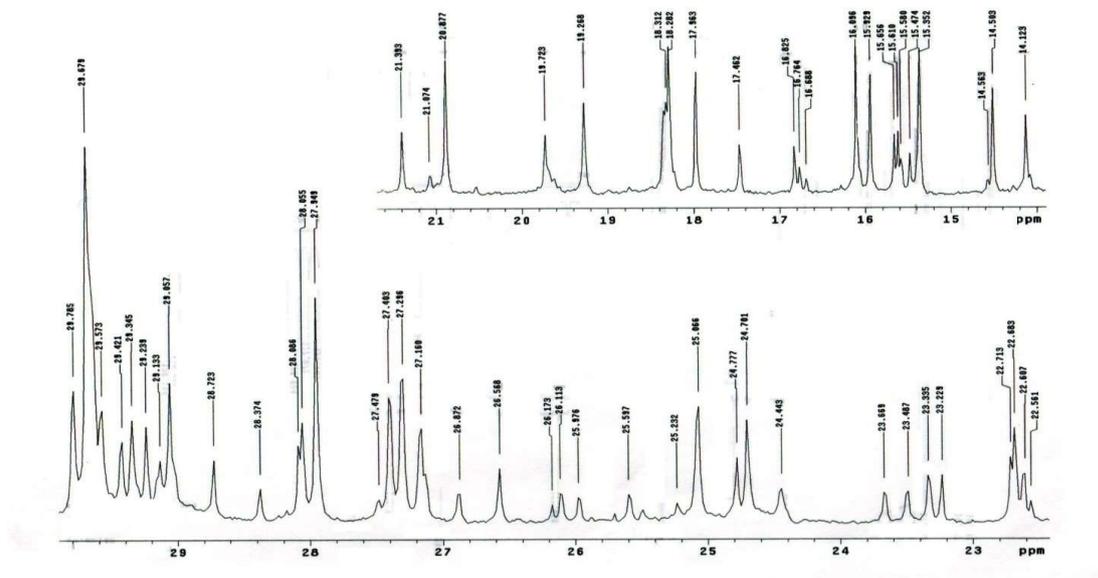


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S1-S5**, 75 MHz, CDCl_3 , na região de (31,060-43,277 ppm).

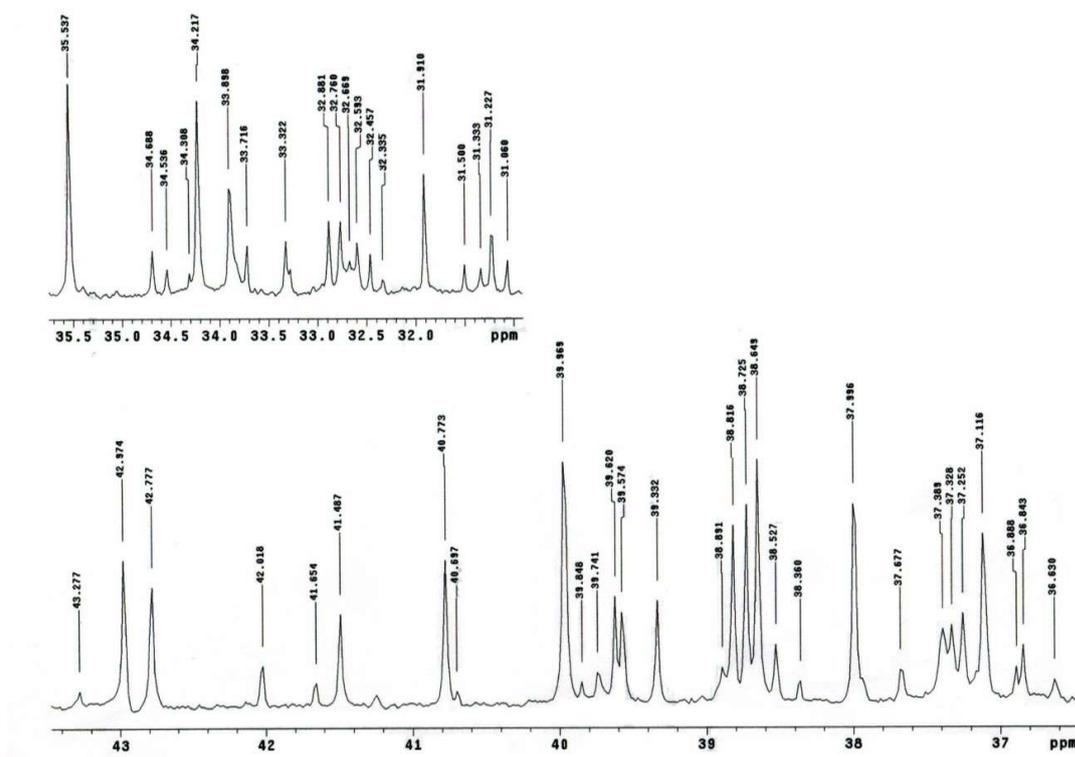


Figura 31 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S1-S5**, 75 MHz, CDCl_3 , na região de (46,768-79,079 ppm).

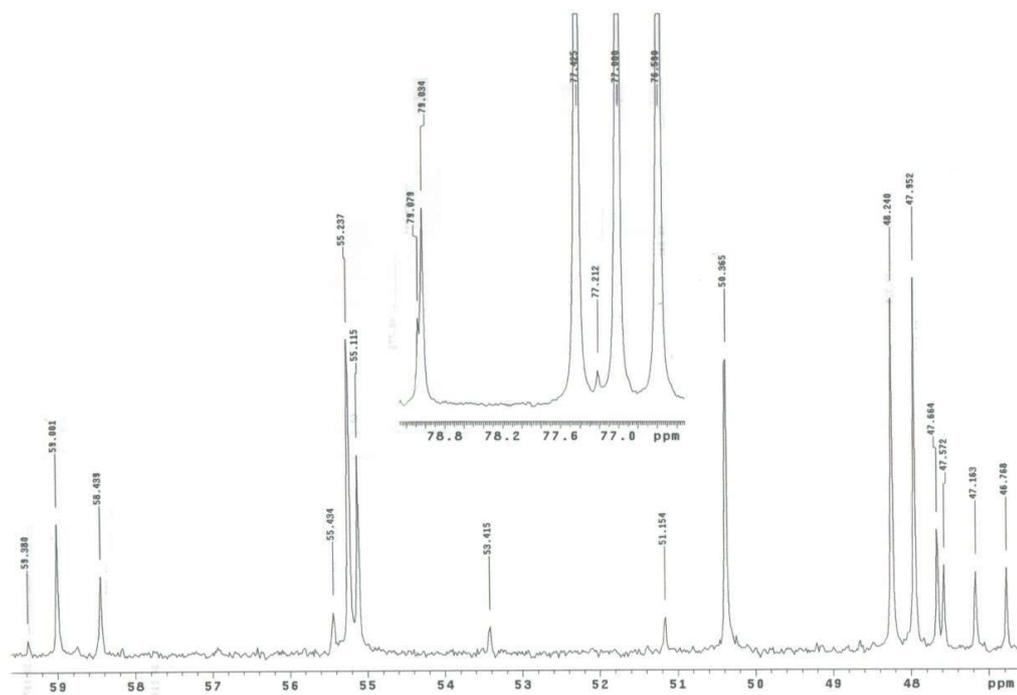


Figura 32 - Espectro de RMN ^1H de **S5**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

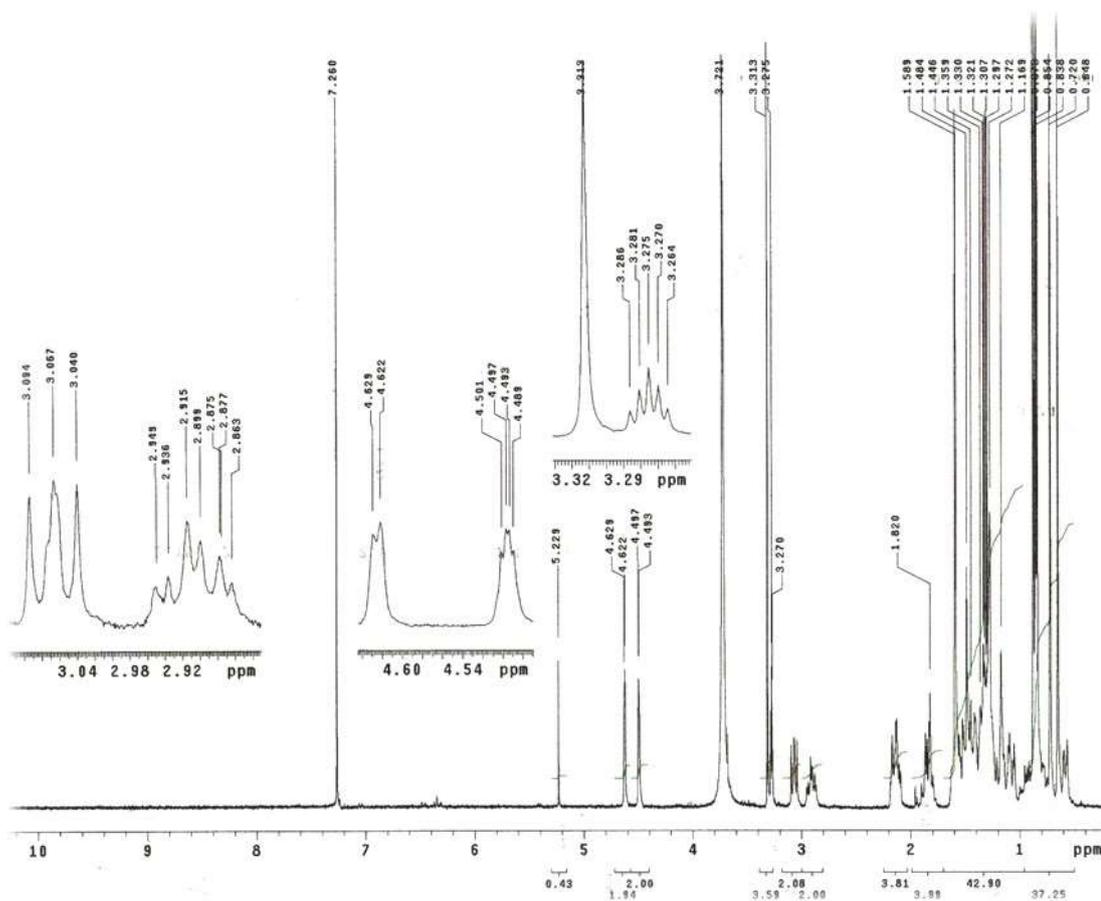


Figura 33 - Expansão do espectro de RMN ¹H de **S5**, 300 MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD.

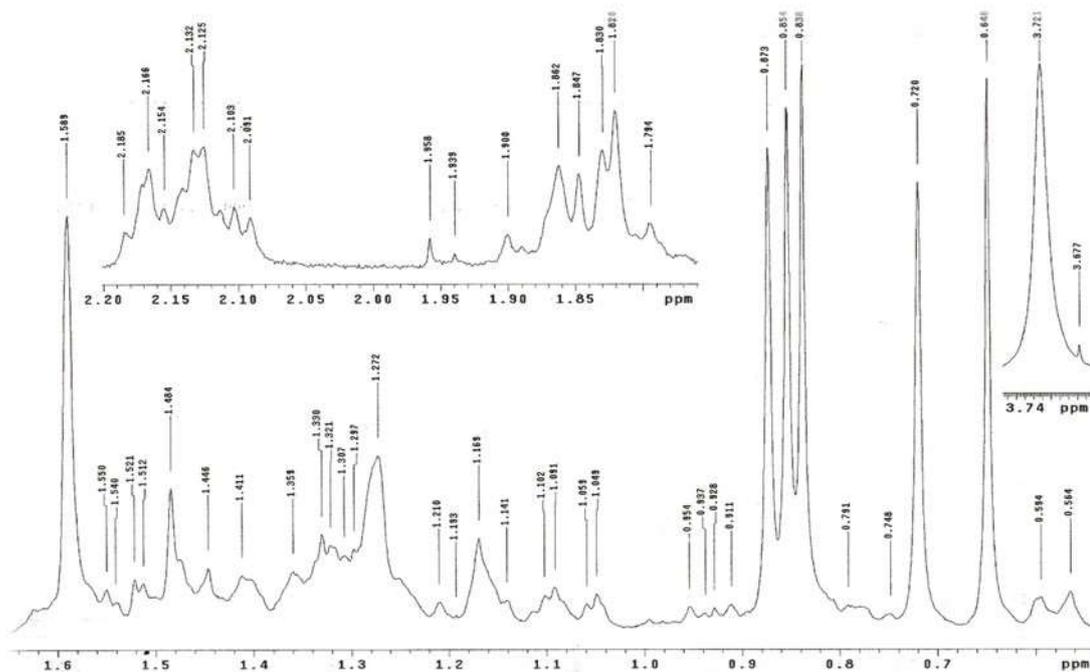
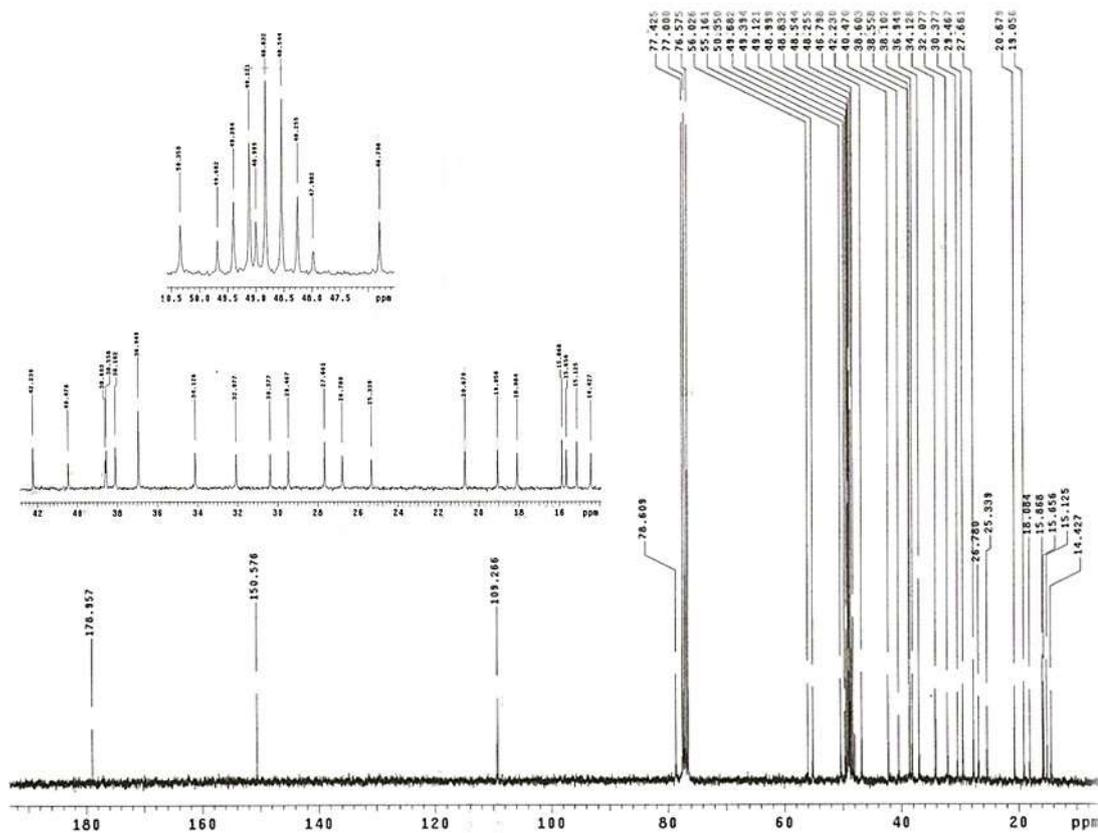


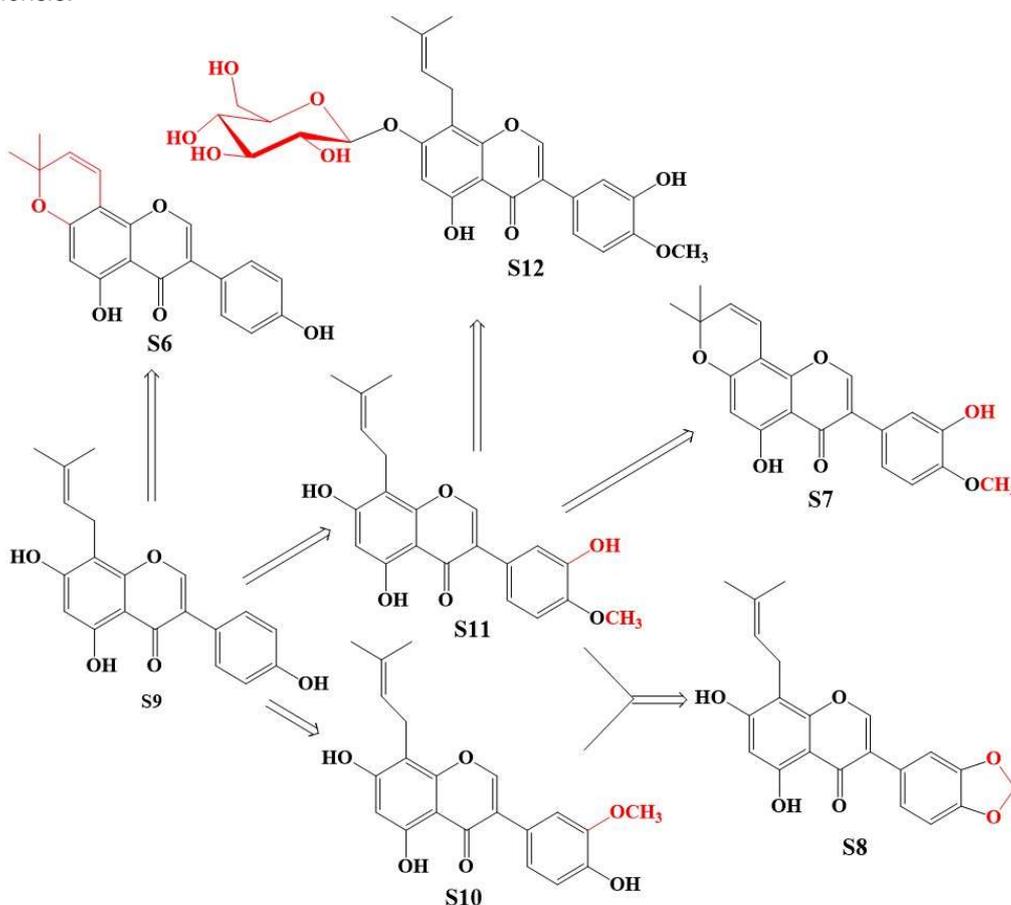
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³C de **S5**, 75 MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD.



5.2.2 Elucidação estrutural de **S9**

A substância **S9** foi a escolhida para iniciar a discussão da determinação estrutural das substâncias pertencentes a classe das isoflavonas (**S6** - **S12**) isoladas de *V. guianensis*, pois acredita-se, com base na origem biossintética dos flavonoides (DEWICK, 2009), que esta substância é a precursora das demais isoflavonas isoladas neste trabalho (Fig. 35), além do mais, apresenta dados espectrais completos e tem estrutura similar às novas substâncias registradas neste trabalho.

Figura 35 - Esquema geral de proposta biossintética das isoflavonas isoladas das folhas de *V. guianensis*.



A substância **S9** apresentou-se na forma de cristais branco, a qual foi isolada tanto da fase hexânica, como também da fase acetato de etila obtidas do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis* e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de massas, RMN 1D e 2D, na origem biossintética dos flavonoides (DEWICK, 2009) e por comparação com dados disponíveis na literatura.

O espectro de massas de baixa resolução (Fig. 37) mostrou o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 339,37 correspondentes à fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_5$. O espectro de UV (Fig. 38) de **S9** apresentou os máximos de absorção em 236, 263 e 323 nm, indicativos de presença de isoflavonoide ou esqueleto flavonônico

(RUKACHAISIRIKUL et al., 2002; AHN et al., 2003, NAZIR et al., 2008). Os espectros de RMN de ^1H (Figs. 39 e 40) e ^{13}C (Figs. 41 e 42) da substância **S9** apresentam sinais característicos referentes à classe estrutural das isoflavonas (BANDEIRA et al., 2011), como a presença de um singlete em δ_{H} 8,23 na região espectral de desblindagem, atribuído ao hidrogênio (H-2) ligado a carbono sp^2 oxigenado, o qual exibe no experimento de HSQC (Fig. 43), correlação $^1J_{\text{C,H}}$ com um carbono em δ_{C} 154,3, atribuído a C-2.

Adicionalmente, foi observado no espectro de RMN ^1H , um conjunto de sinais em [δ_{H} 6,89 (*d*, *J* 8,7 Hz; H-3'/5') e 7,45 (*d*, *J* 8,7 Hz, H-2'/6')] com deslocamentos químicos compatíveis com estruturas que apresentam um núcleo flavonoídico 1',4'-dissubstituído do tipo AA'XX' (ERASTO; BOJASE-MOLETA; MAJINDA, 2004; BENAVIDES et al., 2007), comumente relacionado ao anel B dos flavonoides; foi observado também um singlete em δ_{H} 6,36, integrando para um hidrogênio, característico de anel A de isoflavonoide com padrão de penta substituição.

O espectro de RMN ^{13}C (Figs. 41 e 42) de **S9** mostrou 18 linhas espectrais. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT (Fig. 44) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: sete carbonos metínicos, dois metílicos, um metilênico e dez carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em δ_{C} 181,9, correspondente a carbonila quelada, a qual foi confirmada no espectro de RMN ^1H por apresentar sinal em δ_{H} 12,97 referente à grupo hidroxila (C-5-OH) formando ligação de hidrogênio com a carbonila. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 162,2; 161,4; 158,3; 156,2 e 154,3 foram compatíveis com cinco átomos de carbonos aromáticos oxigenados. O espectro de HSQC (Fig. 43), possibilitou atribuir os deslocamentos dos hidrogênios em δ_{H} 8,23 (H-2), 7,45 (H-2'/6'), 6,89 (H-3'/5') e 6,36 (H-6) aos carbonos em δ_{C} 154,3 (C-2), 131,1 (C-2'/6'), 115,8 (C-3'/5') e 99,3 (C-6), respectivamente.

No espectro de RMN de ^1H observou-se ainda, sinais característicos de uma unidade isoprênica: um dubleto em δ_{H} 3,42, integrando para dois hidrogênios, que exibe correlação, no experimento de COSY- $^1\text{H} \times ^1\text{H}$. (Fig. 45), com um multiplete em δ_{H} 5,23. Este, por sua vez, integra para um único hidrogênio e que, pelo seu deslocamento químico sugere ser um hidrogênio olefínico (AHN et al., 2003).

No experimento de HSQC (Fig. 43) os sinais em δ_{H} 3,42 e 5,23 correlacionam-se com os sinais em δ_{C} 21,9 e 123,0, respectivamente. Por meio do experimento de HMBC (expansão 1, Fig. 46), podem ser vistos correlações $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ do sinal em δ_{H} 3,42 com os sinais em δ_{C} 123,0 e 131,9. Desta forma, o sinal em δ_{H} 3,42 foi atribuído a H-1'', que mostrou correlação com o sinal em δ_{C} 123,0, o qual corresponde ao carbono em que o hidrogênio em δ_{H} 5,23 está ligado (C-2''). Assim, o sinal em δ_{H} 5,23 foi atribuído ao hidrogênio H-2''. A correlação $^3J_{\text{C,H}}$ observada entre o sinal relativo a H-1'' (δ_{H} 3,42) e o sinal de carbono totalmente substituído em δ_{C} 131,9 (confirmado por HSQC) permitiu atribuir este sinal a C-3''. Pode ser verificado ainda no espectro de RMN de ^1H que há dois singletos em δ_{H} 1,79 e 1,64, integrando para três hidrogênios cada, os quais correlacionam-se com os carbonos em δ_{C} 25,8 e 17,8, respectivamente, como pode ser visto no espectro de HSQC (Fig. 43). No experimento

de HMBC (expansão 1, Fig. 46) pode-se constatar que os sinais em δ_H 1,79 (Me_{cis}) e δ_H 1,64 (Me_{trans}) correlacionam-se a ${}^2,3J_{C,H}$ com os sinais em δ_C 123,0 (C-2'') e 131,9 (C-3''), confirmando serem os sinais em δ_H 1,79 e 1,64 relativos as metilas 4'' e 5'', respectivamente.

A análise da expansão 2 do espectro de correlação HMBC (Fig.47) mostrou o sinal em δ_H 8,23 (H-2) correlacionando a ${}^3J_{C,H}$ com o carbono carbonílico em δ_C 181,9, atribuído a C-4, e ainda com um carbono oxidado em δ_C 156,2 atribuído a C-8a. Nesta expansão observa-se ainda correlações ${}^2,3J_{C,H}$ do sinal em δ_H 8,23 com os sinais relativos a carbonos não hidrogenados em δ_C 123,0 e 123,5 atribuídos a C-3 e C-1', respectivamente.

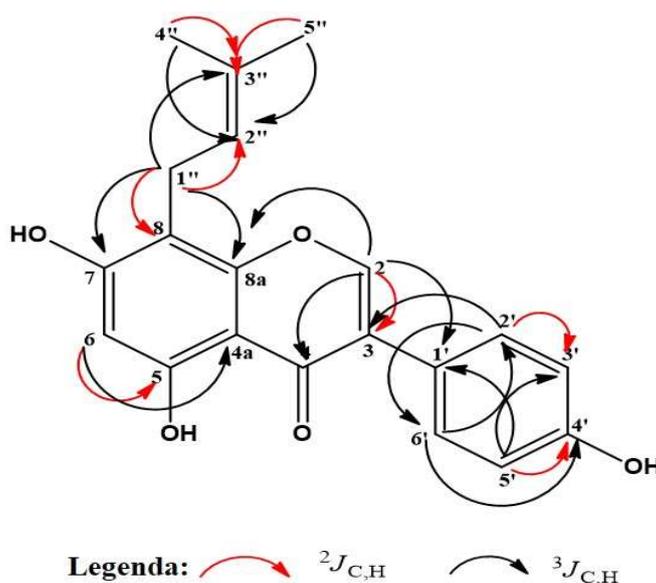
A análise da expansão 1 do espectro HMBC (Fig. 46) foi de fundamental importância para a localização inequívoca da unidade isoprênica. O acoplamento a três ligações do sinal de hidrogênio em δ_H 3,42 (H-1'') com o sinal referente ao carbono em δ_C 156,2 (C-8a) e em δ_C 162,2 (C-7), foi suficiente para deduzir que o grupo se encontra localizado no C-8 do anel A da isoflavona. Ainda nesta expansão é possível visualizar uma correlação ${}^2J_{C,H}$ do H-1'' (δ_H 3,42) com o sinal referente ao carbono C-8 em δ_C 107,0.

Na expansão 2 do espectro de correlação HMBC (Fig. 47), visualizou-se o sinal em δ_H 6,36 (H-6) correlacionando a ${}^2J_{C,H}$ com o carbono aromático oxidado em δ_C 161,4, o qual foi atribuído a C-5, e a ${}^3J_{C,H}$ com um carbono totalmente substituído em δ_C 106,0, atribuído a C-4a.

Continuando a análise da expansão 2 (Fig. 47) observou-se as correlações a ${}^3J_{C,H}$ do sinal em δ_H 7,45, referente a H-2'/6', com o carbono aromático oxidado em δ_C 158,3 atribuído a C-4' e ao carbono em em δ_C 123,0 atribuído a C-3.

Na figura 36 são evidenciadas as principais correlações observadas no espectro de correlação HMBC para **S9**.

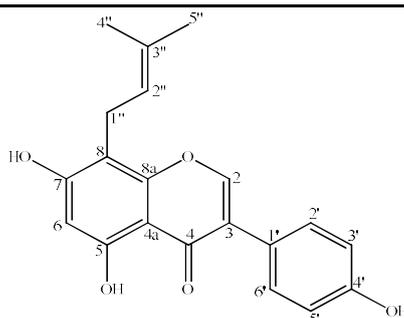
Figura 36 - Correlações ${}^2,3J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC para **S9**.



Segundo estas análises e comparação com os dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C de **S9** com os da literatura (AL-MAHARIK; BTTING, 2003), foi possível identificar essa substância como a lupiwighteona.

A Tabela 9 mostra os dados espectrométricos importantes na identificação da estrutura de **S9**. Esta substância apresenta importantes ações anti-inflamatórias como relatada por Paoletti et al. (2009), além de ser considerado o fitoestrógeno mais potente conhecido atualidade (WÄTJEN et al., 2007).

Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **S9** (acetona d_6 , 300 e 75 MHz) e comparação com dados da literatura.



Posição	Lupiwighteona isolada (S9)		Lupiwighteona da literatura*	
	$\delta_{\text{H}}, J \text{ Hz}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, J \text{ Hz}$	δ_{C}
2	8,23 (s)	154,3	8,25 (s)	155,7
3		123,0		122,6
4		181,9		181,4
4a		106,0		105,7
5		161,4		160,9
6	6,36 (s)	99,3	6,37 (s)	98,8
7		162,2		161,6
8		107,0		106,6
8a		156,2		153,8
1'		123,5		123,1
2'/6'	7,45 (d, J 8,7)	131,1	7,47 (d, J 9,0)	130,6
3'/5'	6,89 (d, J 8,7)	115,8	6,90 (d, J 9,0)	115,4
4'		158,3		157,8
1''	3,42 (d, J 6,6)	21,9	3,45 (d, J 6,9)	21,5
2''	5,23 (m)	123,0	5,23 (m, J 1,5 e 6,9)	122,5
3''		131,9		131,5
4'' (Me _{cis})	1,79 (s)	17,8	1,81 (s)	17,3
5'' (Me _{trans})	1,64 (s)	25,8	1,66 (s)	25,3
OH-quelada	12,97		12,97	

Legenda: *Al-Maharik; Btting (2003).

Figura 37 - Espectro de massas de baixa resolução de **S9**.

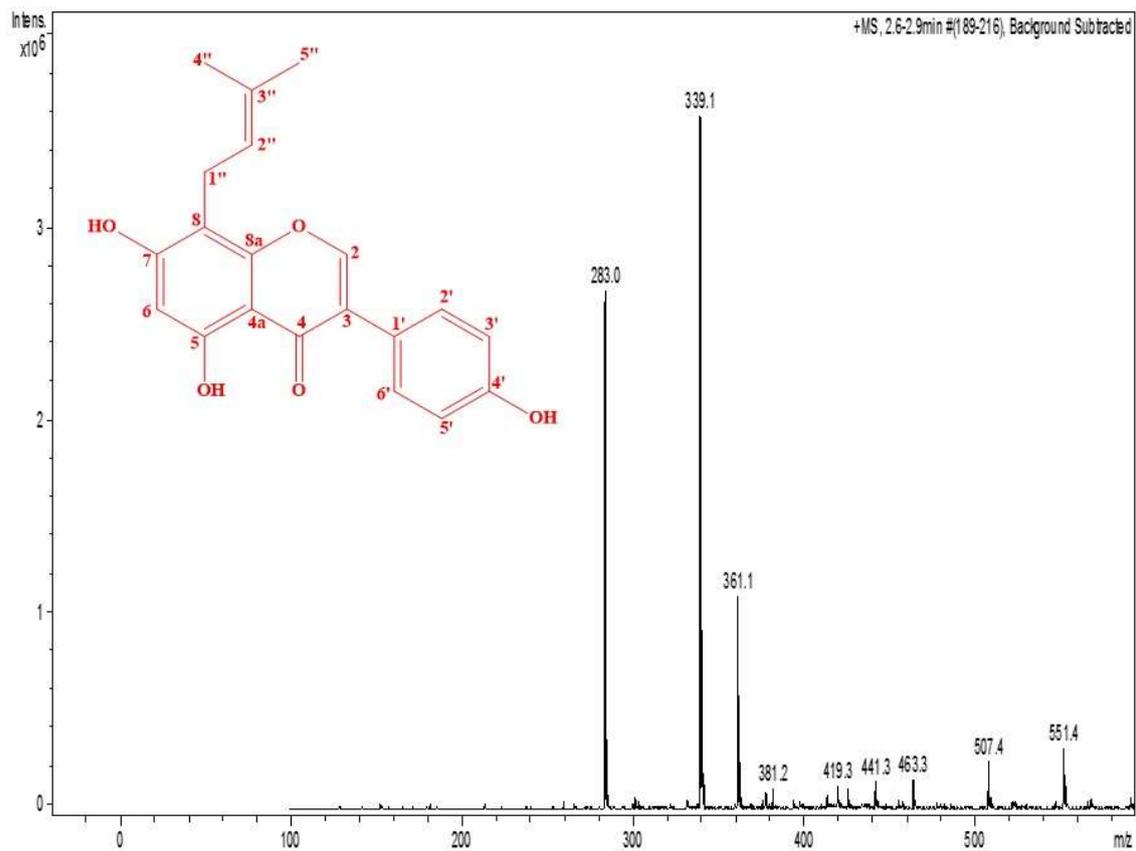


Figura 38 - Espectro de UV de **S9**, λ_{\max} /nm (H₂O:ACN).

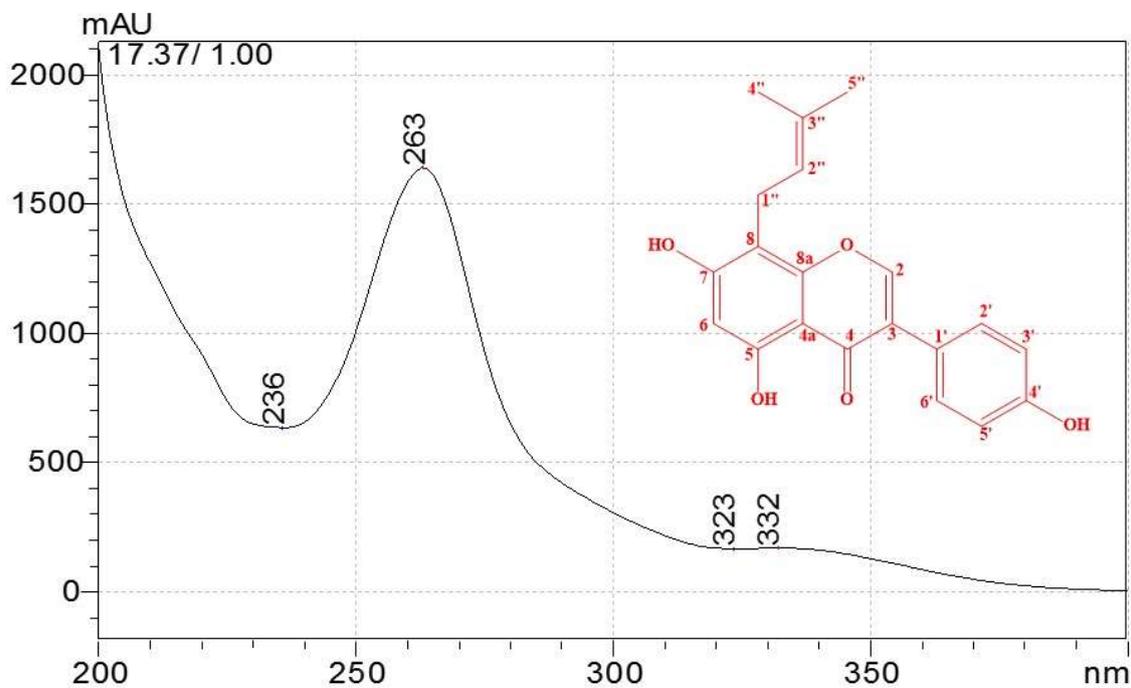


Figura 39 - Espectro de RMN ^1H de **S9**, 300 MHz, acetona d_6 .

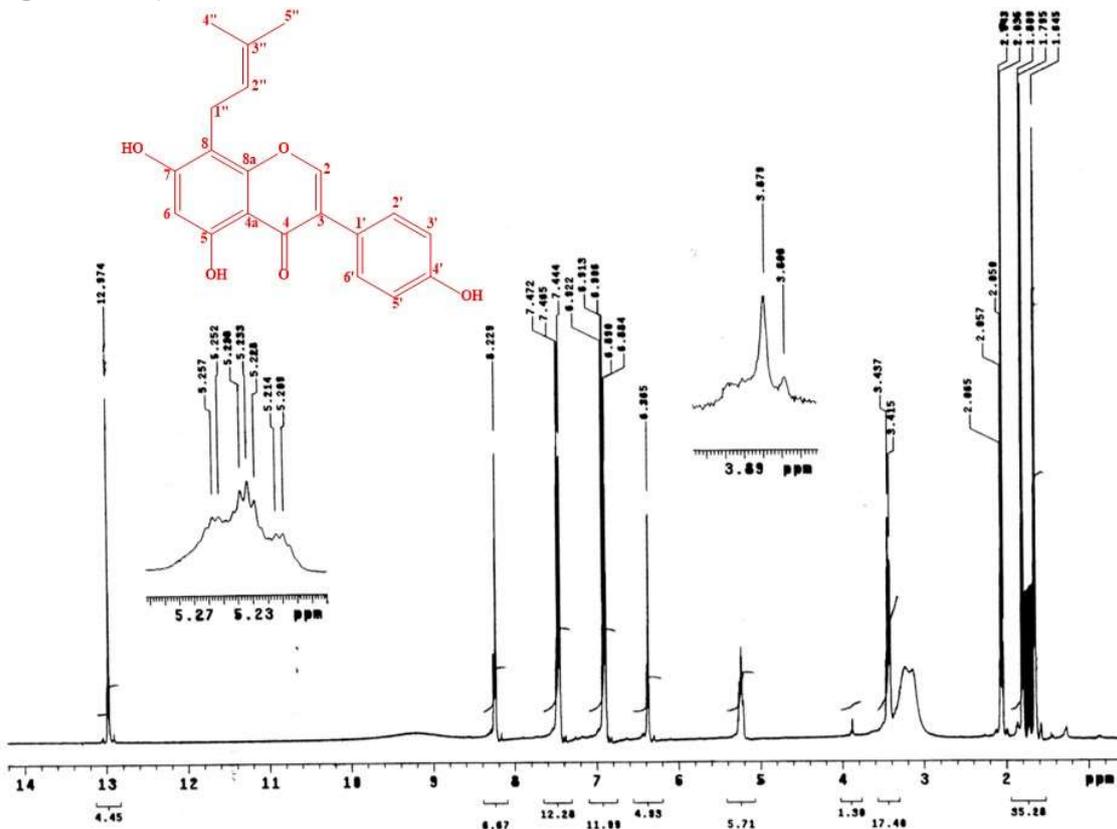


Figura 40 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **S9**, 300 MHz, acetona d_6 .

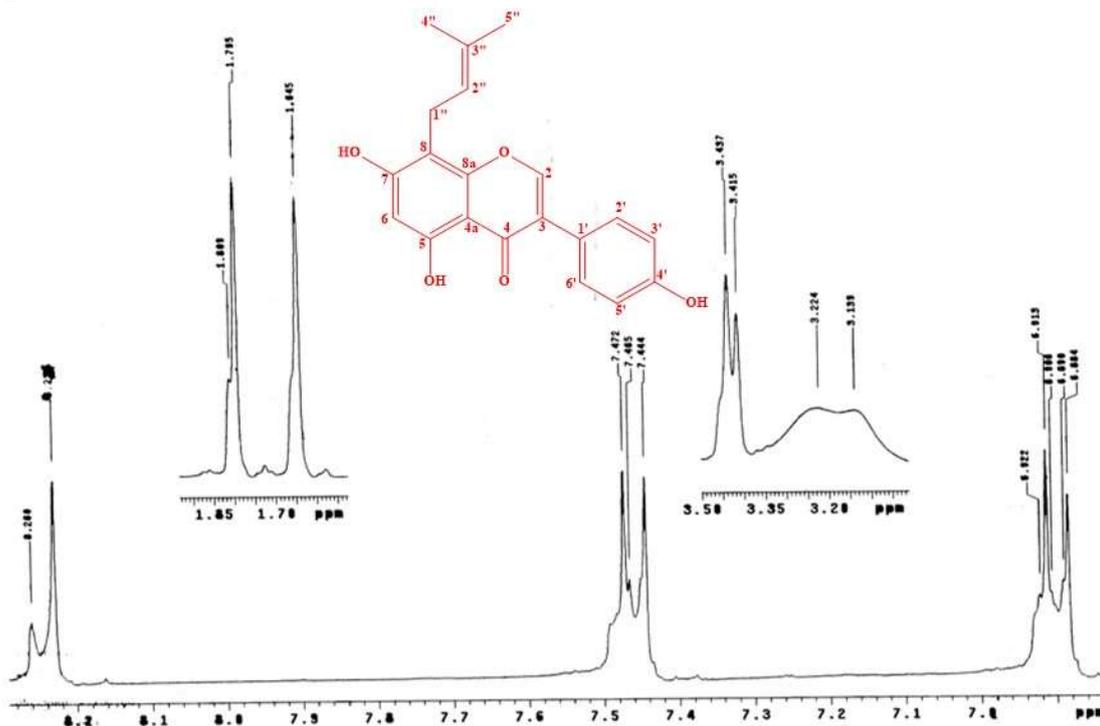


Figura 41 - Espectro de RMN ^{13}C de **S9**, 75 MHz, acetona d_6 .

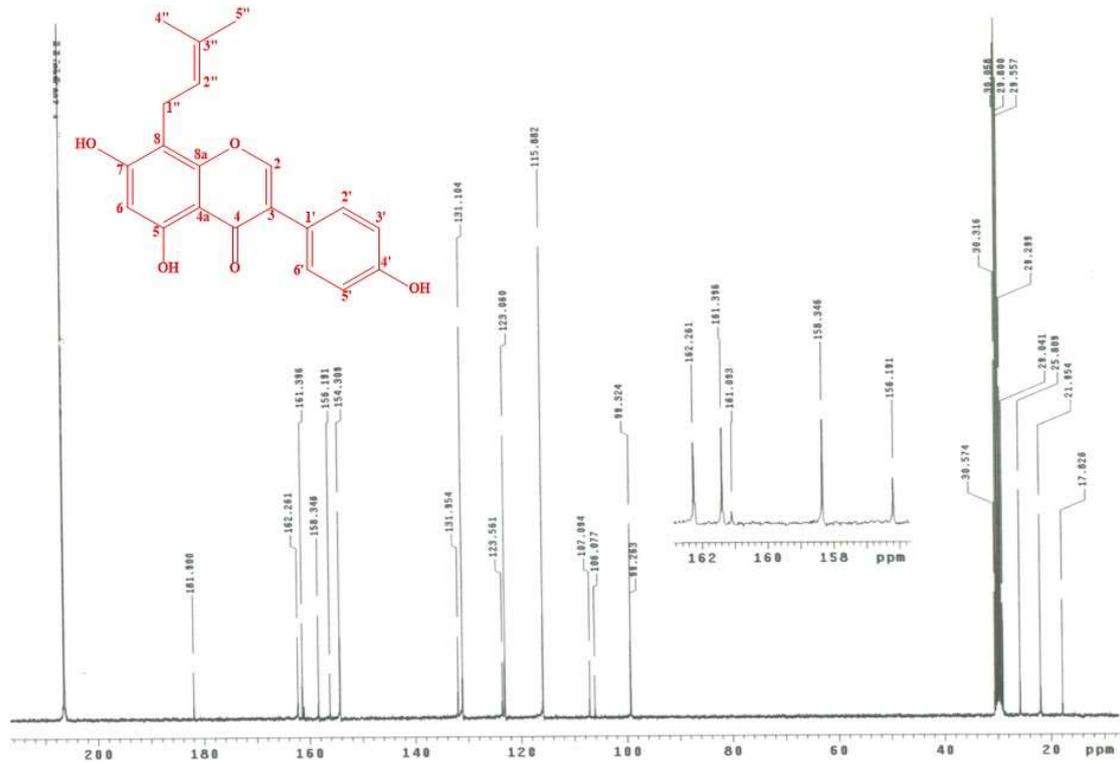


Figura 42 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S9**, 75 MHz, acetona d_6 .

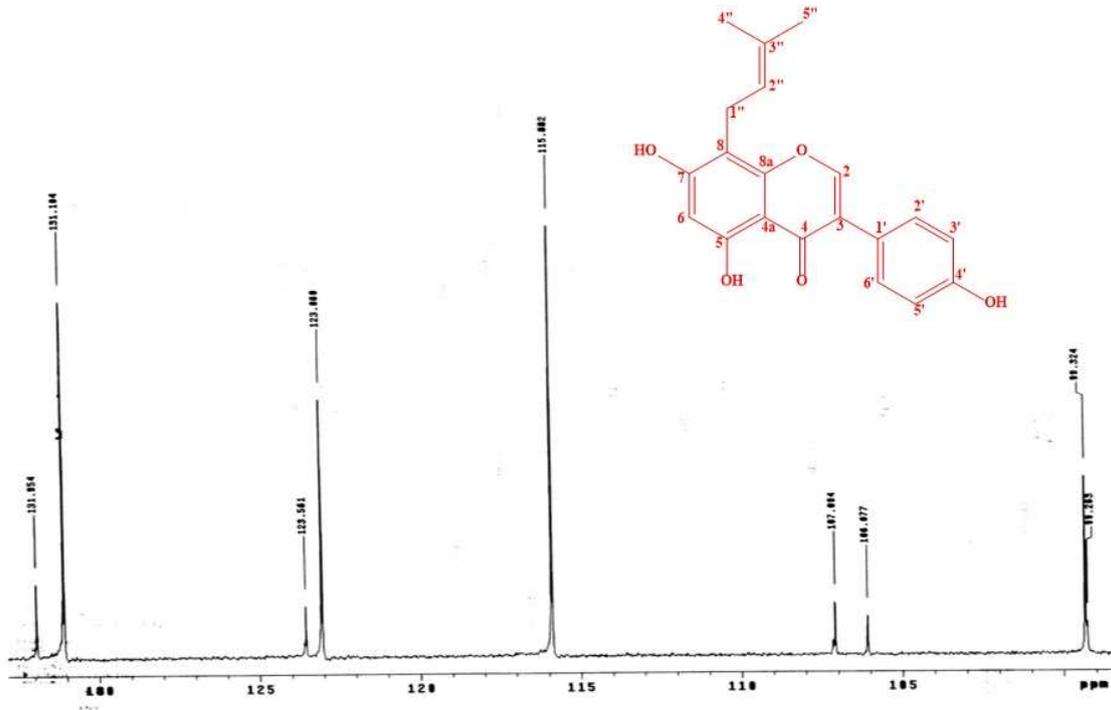


Figura 43 - Mapa de correlação heteronuclear HSQC de **S9**, ^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 .

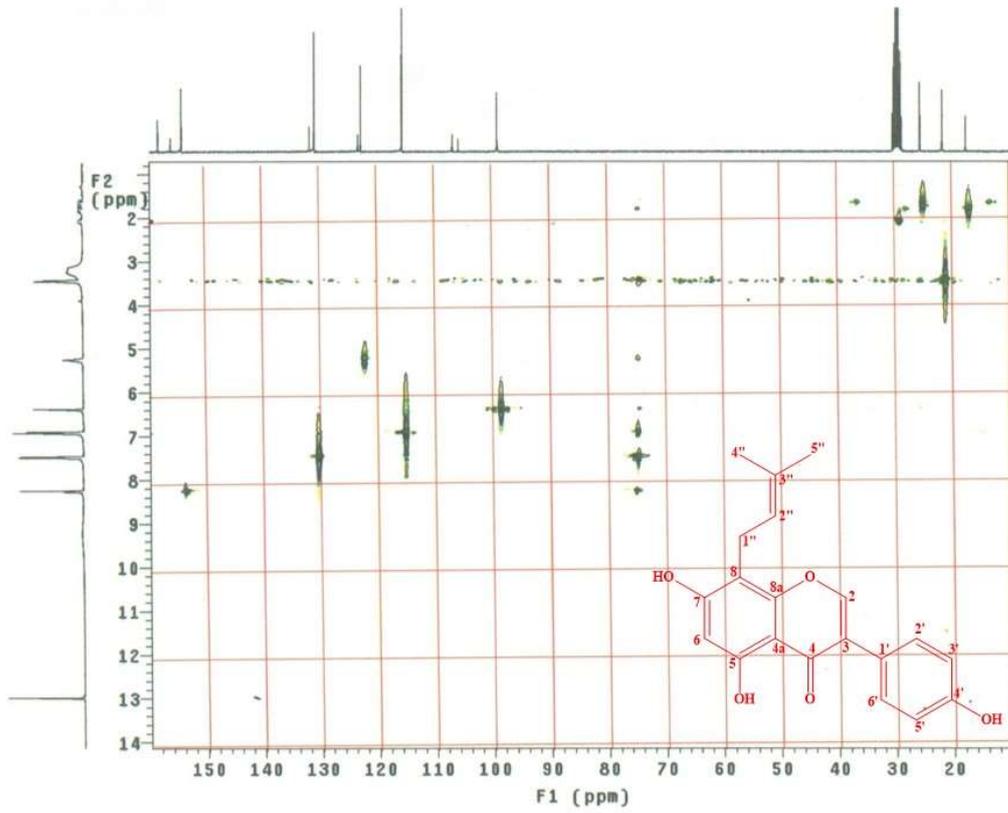


Figura 44 - Espectro de DEPT de **S9**, ^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 .

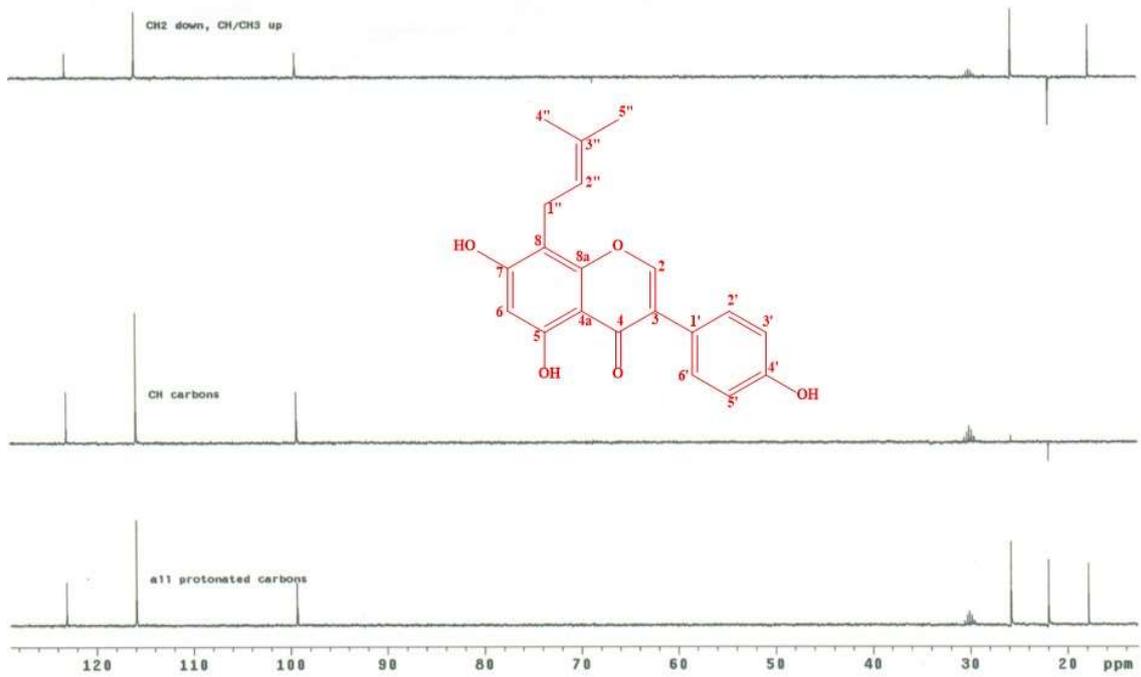


Figura 45 - Mapa de correlação homonuclear COSY - ^1H x ^1H de **S9**, 300 MHz, acetona d_6 .

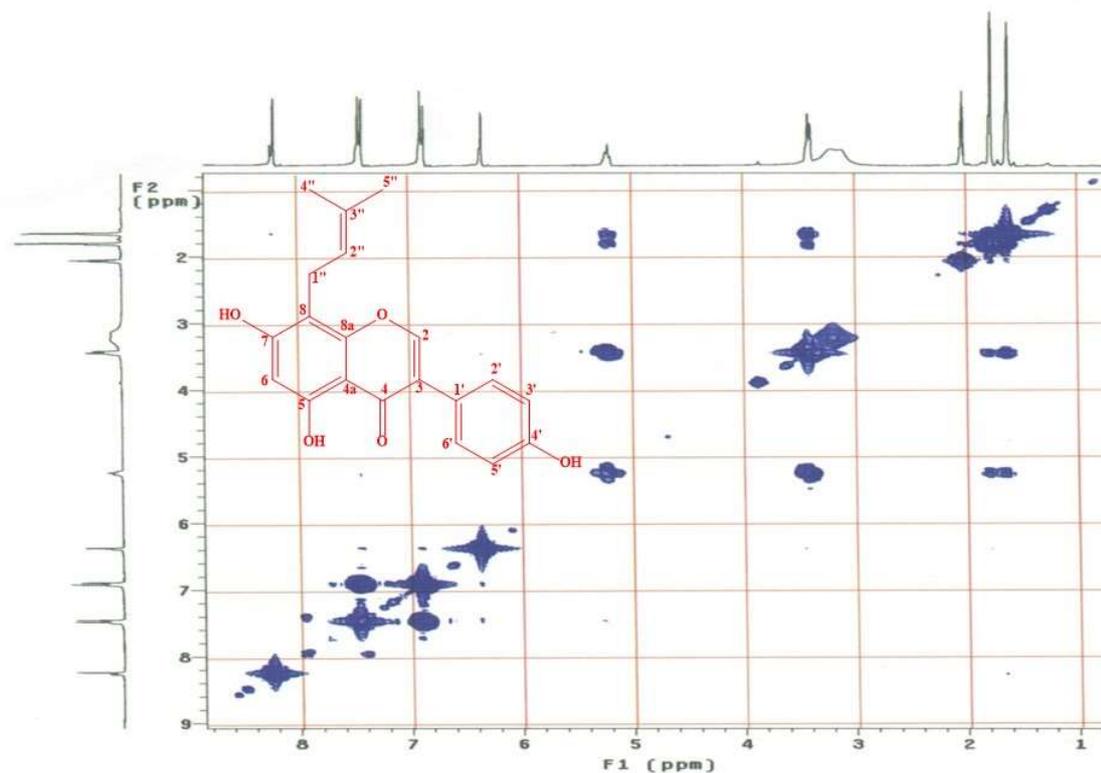


Figura 46 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S9**, ^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (1,0 - 4,0 ppm) x (90 - 172 ppm).

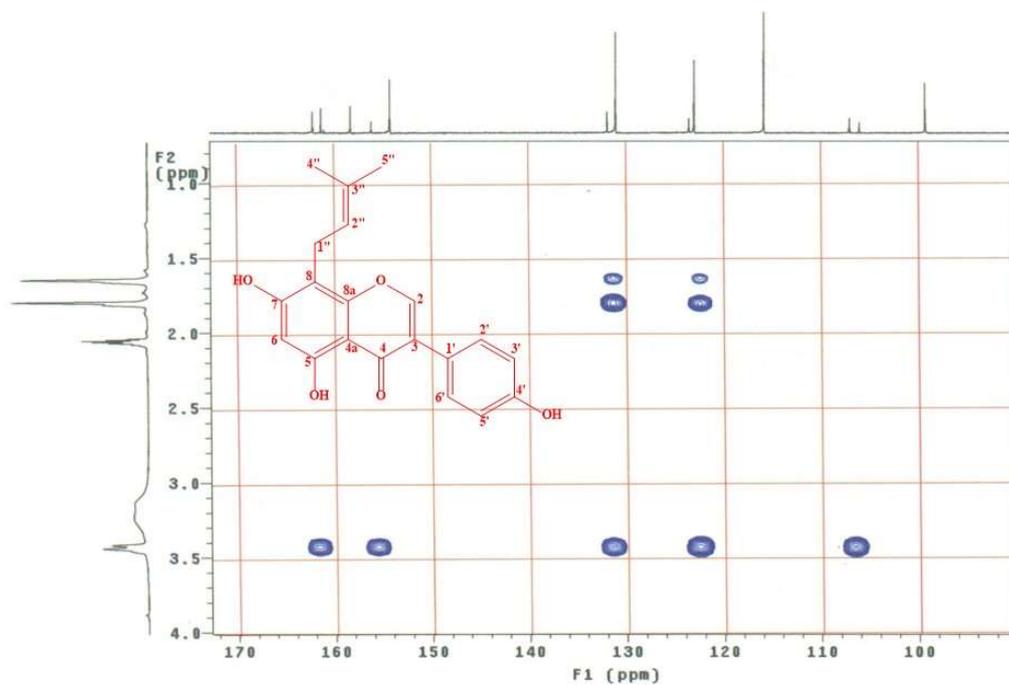
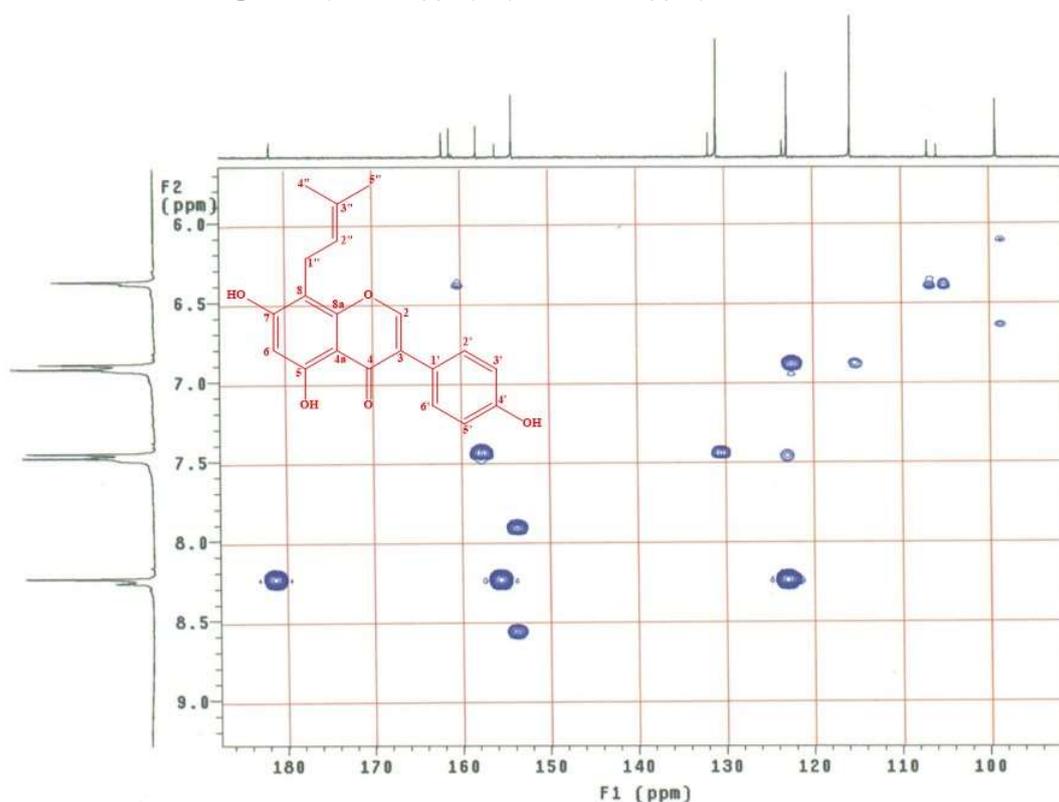


Figura 47 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de S9, ^1H : 300 MHz e ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (1,0-4,0 ppm) x (90,0-172,0 ppm).



5.2.3 Elucidação estrutural de S10

A substância **S10** apresentou-se como um sólido amarelo claro isolado da fase hexânica e também da fase acetato de etila, obtidas do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de HRESITOF-MS, RMN 1D e 2D e por meio de comparações de dados de substâncias semelhantes relatados na literatura (AL-MAHARIK; BTTING, 2003).

O espectro de UV (Fig. 49) de **S10** apresentou os máximos de absorção em 239 e 265 nm. O Espectro de massas de alta resolução (HRESITOF-MS) (Fig. 50) mostrou o pico do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 369,1338 correspondentes à fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$. Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (Fig. 51) da substância **S10**, sinais bastante semelhantes aos mostrados para a Lupiwighteona (S9) (item 5.2.2), ou seja, sinais típicos de isoflavonas (BANDEIRA et al., 2011), como um singleto em δ_{H} 8,10 (H-2), bem como os sinais de RMN de ^{13}C em δ_{C} 155,5 (C-2), 123,8 (C-3) e 182,5 (C-4). Outras semelhanças observadas no espectro de RMN de ^1H , são a presença de sinais característicos de uma unidade isoprênica (prenila) [δ_{H} 1,65 (s, 3H-4'', Me_{trans}), 1,78 (s, 3H-5'', Me_{cis}), 3,37 (d, 2H, J 6,9 Hz, H-1'') e 5,18 (m, 1H, H-2'')]. Foi observado também um singleto em δ_{H} 6,24, integrando para um hidrogênio, característico de anel A de flavonoide com padrão de penta substituição, similar ao anel A de S9.

Adicionalmente, neste espectro observou-se a presença de um núcleo flavonoídico 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX, onde observa-se um sinal dubleto relativo a um H *orto* acoplado, em δ_H 6,82 (J 8,1 Hz, H-5'), um dubleto largo relacionado a um H *orto-meta* acoplado, em 6,94 (J 8,1 Hz, H-6'), além de um singleto largo em δ_H 7,14 (H-2'), atribuído a um H *meta* acoplado. Todos os acoplamentos foram confirmados através da análise do experimento COSY - $^1H \times ^1H$. (Fig. 52).

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 53) da substância **S10** exibiu 21 sinais, os quais foram atribuídos a vinte e um átomos de carbono, sendo estas atribuições realizadas com o auxílio da análise dos espectros de DEPT (Fig. 54), HETCOR (Fig. 55) e HMBC (Fig. 56).

Na expansão do espectro de correlação HMBC (Fig. 57), visualizou-se que o sinal em δ_H 3,37 referente a H-1" da prenila mostrou correlações a $^3J_{C,H}$ com C-8a (δ_C 156,7) e C-7 (δ_C 163,2), indicando que o grupo prenila está localizado na posição C-8, semelhante ao observado para S9. Todas as correlações são mostradas na Figura 48.

O espectro de RMN de 1H (Fig. 51) apresentou um singleto em δ_H 3,87 (3H), referente ao grupo OMe, o qual exibe no experimento de HETCOR (Fig. 55), correlação a $^1J_{C,H}$ com um sinal de carbono em δ_C 56,4. As correlações a $^{2,3}J_{C,H}$ dos hidrogênios do grupo OMe com os carbonos aromáticos oxidados em δ_C 147,8 (C-3') e 148,7 (C-4') é um indicativo da localização deste grupo em C-3' do anel B aromático, ressalta-se que os deslocamentos de C-3' e C-4', podem estar trocados. No entanto, a localização também foi confirmada através do experimento de NOE-diff (Fig. 58), que ao irradiar o sinal do grupo metoxílico (δ_H 3,87), apresentou efeito NOE com o sinal de H-2' (δ_H 7,14), não deixando dúvidas que o grupo OMe está ligado na posição 3'.

Após análise dos dados espectrais e comparações com dados de substâncias de estrutura semelhante descritos na literatura, foi possível identificar **S10** como sendo 3'-metoxi-8-prenilrobol (5,7,4'-trihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-3'-metoxi-isoflavona). Esta substância só foi relatada uma única vez para a planta *Wyethia mollis* (BOHM, CHOY, LEE, 1989), no entanto, os dados de HRESITOF-MS, RMN 1H e ^{13}C estão sendo relatados pela vez neste trabalho (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **S10** (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e suas principais correlações a $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ no espectro de HMBC.

Posição	δ_{H} , J Hz	δ_{C}	$^{\text{a}}\text{HMBC } ^2J_{\text{C,H}}$	$^{\text{b}}\text{HMBC } ^3J_{\text{C,H}}$
2	8,1 (s)	155,0		C-4, C-8 ^a , C-1'
3		123,8		
4		182,5		
4a		106,2		
5		161,3		
6	6,24 (s)	99,5	C-5;	C-4 ^a
7		163,2		
8		107,8		
8a		156,7		
1'		124,3		
2'	7,14 (sl)	116,1	C-3'	C-3, C-6', C-4'
3'		147,8 ^a		
4'		148,7 ^a		
5'	6,82 (d, J 8,1)	113,9		C-3', C-1'
6'	6,94 (dl, J 8,1)	122,8		C-4', C-2'
1''	3,37 (d, J 6,9)	22,2	C-2''	C-7, C-8, C-3''
2''	5,18 (m, J 1,2 e 6,7)	123,4		C-4'', C-5''
3''		131,4		
4''	1,65 (sl)	25,9	C-3''	
5''	1,78 (sl)	17,9	C-3''	
OMe-3'	3,87 (s)	56,4		

Legenda: ^aOs valores podem ser trocados; ^bCorrelações no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C são de hidrogênio especificado (s) para os carbonos indicados.

Figura 48 - Correlações $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ observadas no espectro de HMBC de **S10**.

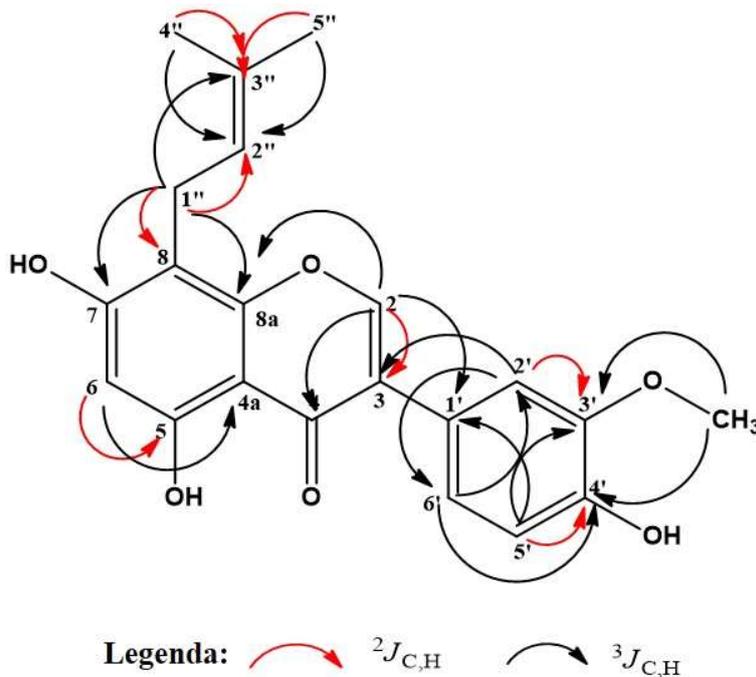


Figura 49 - Espectro de UV de **S10**, λ_{max} /nm (H₂O:ACN).

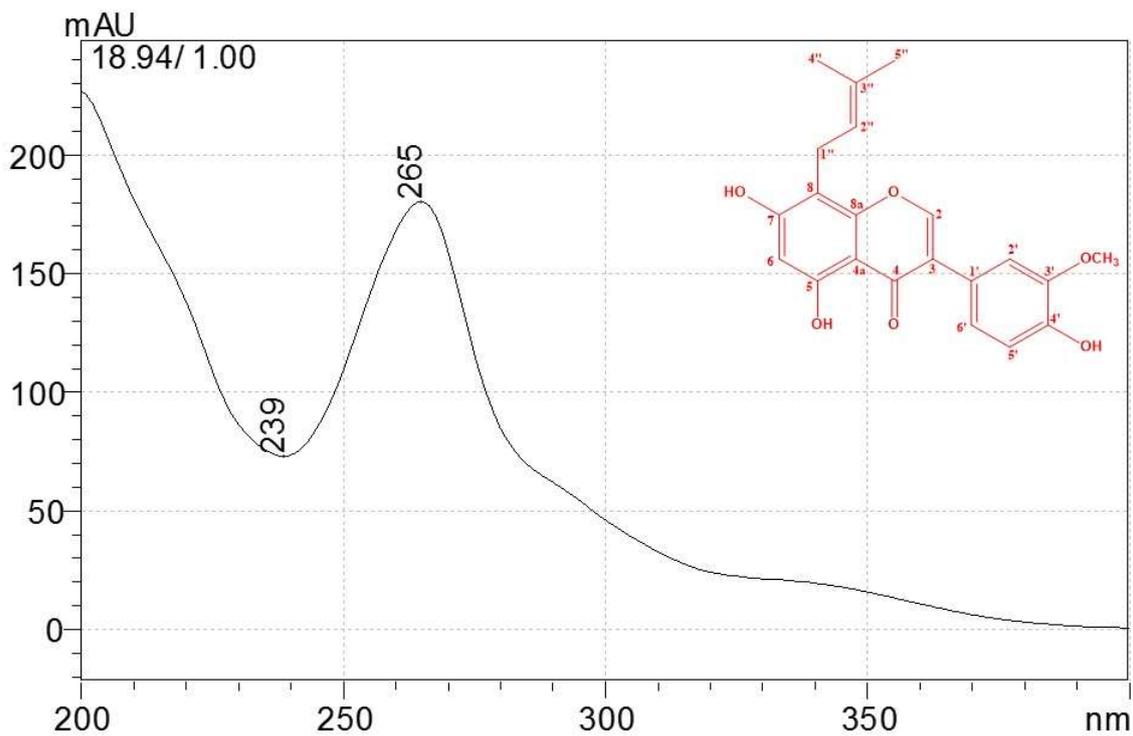


Figura 50 - Espectro de HRESITOF-MS de **S10**.

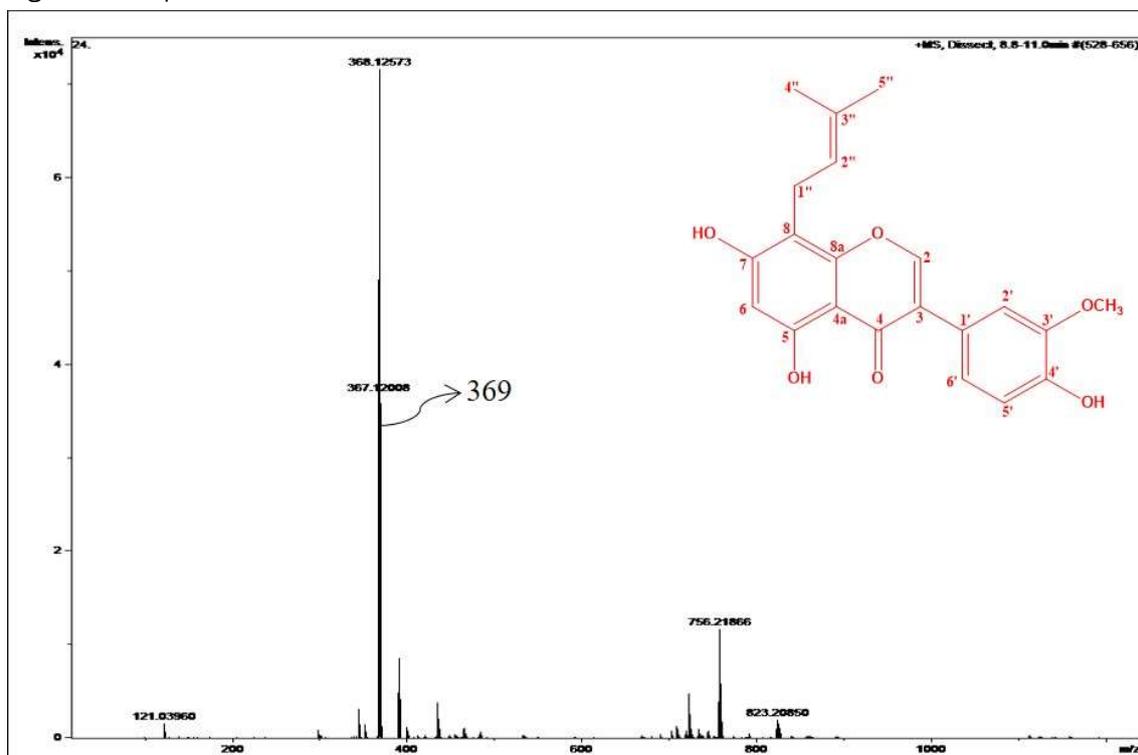


Figura 51 - Espectro de RMN ^1H de **S10**, 300 MHz, CD_3OD .

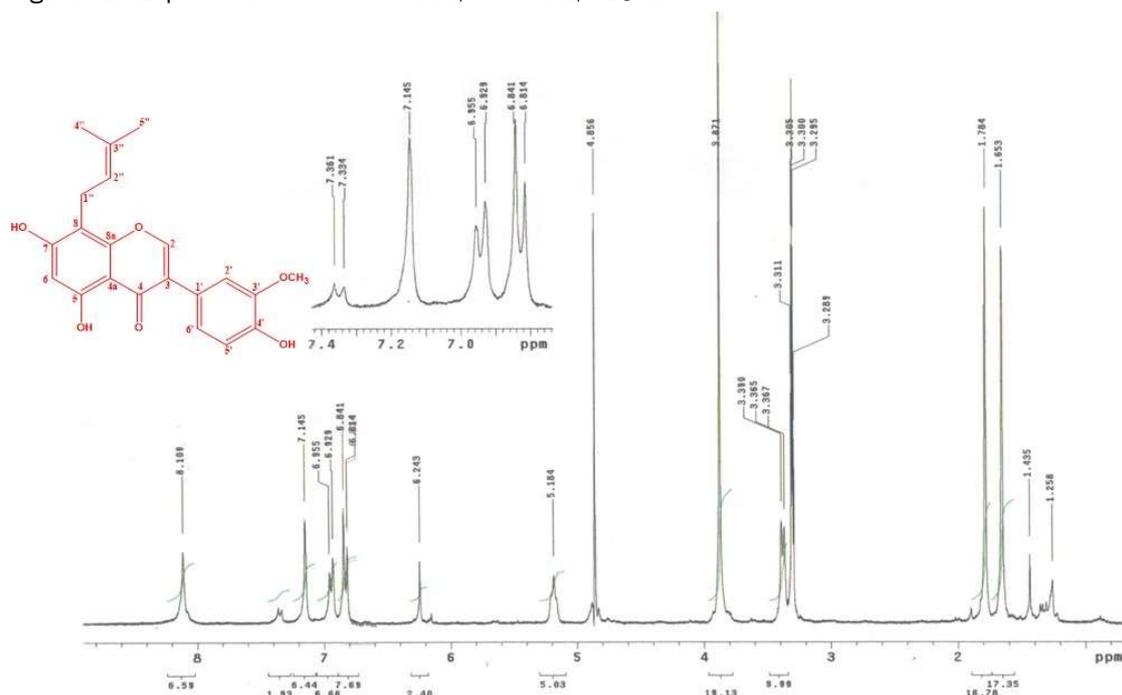


Figura 52 - Mapa de correlação homonuclear COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **S10**, 300 MHz, CD_3OD .

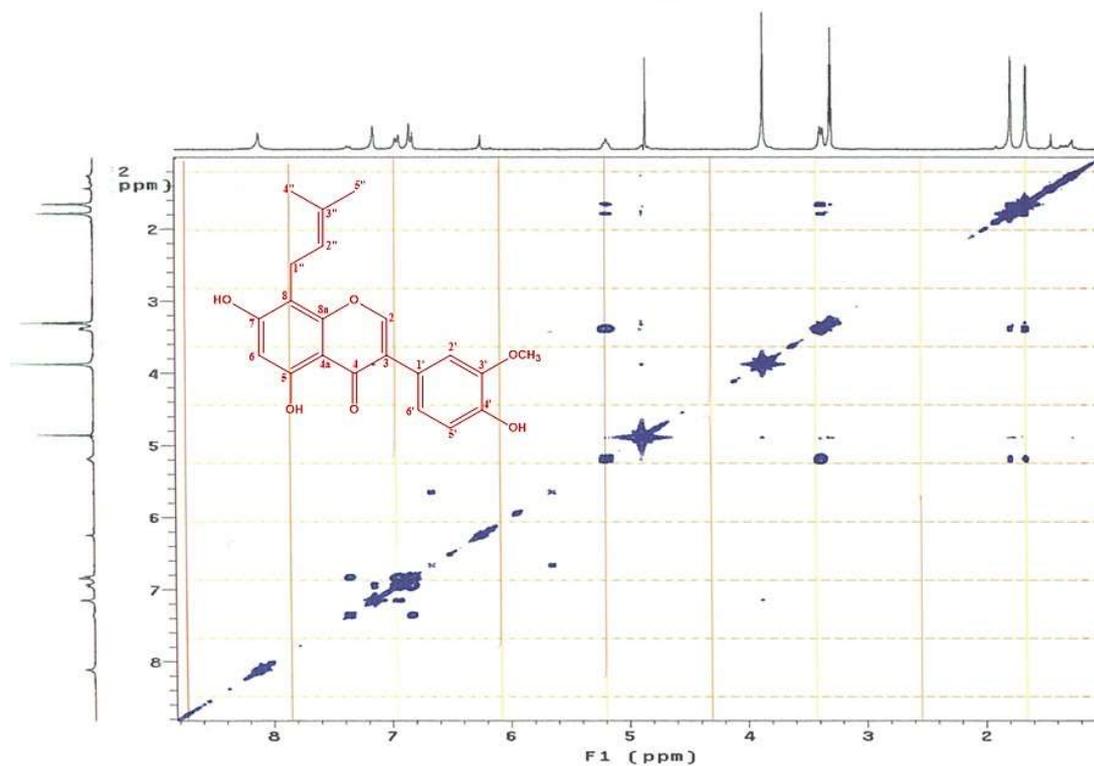


Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C de **S10**, 75 MHz, CD_3OD .

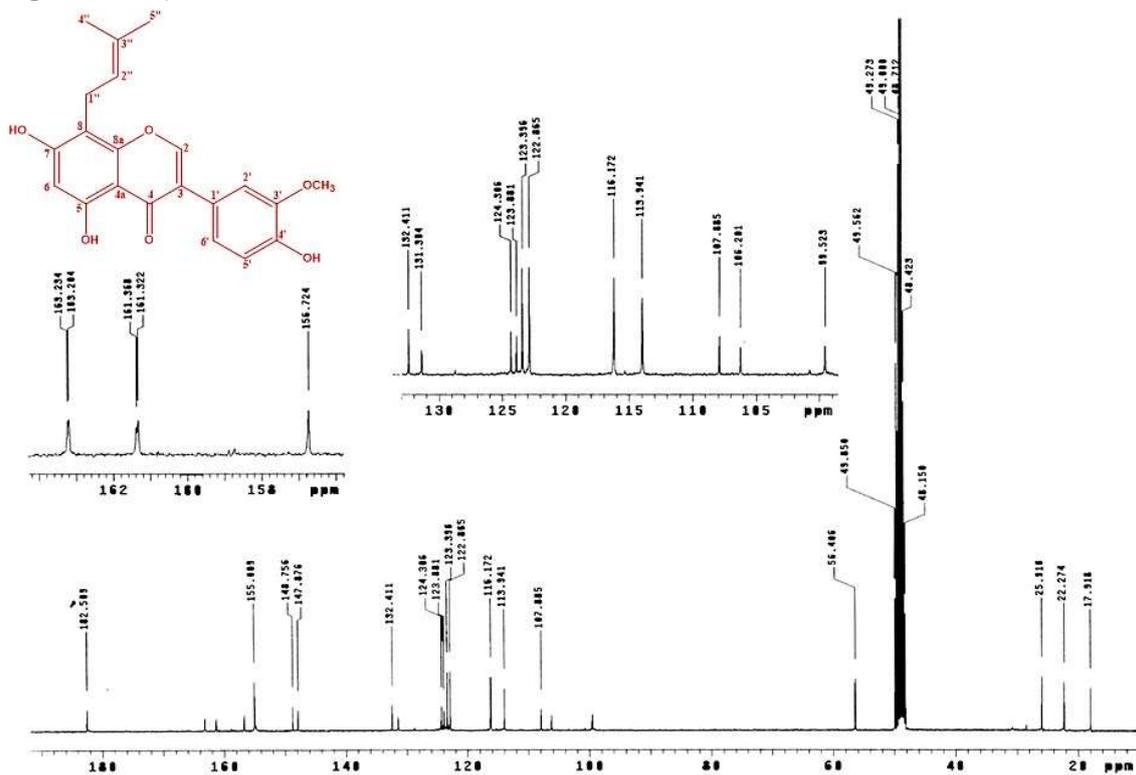


Figura 54 - Espectro de DEPT de **S10**, 75 MHz, CD_3OD .

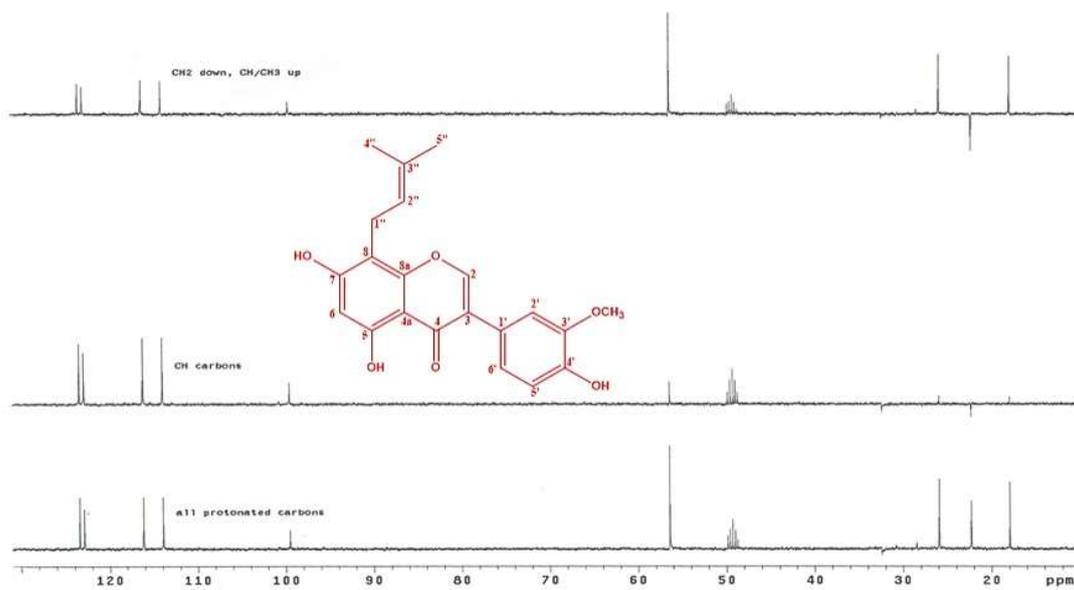


Figura 55 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S10**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD .

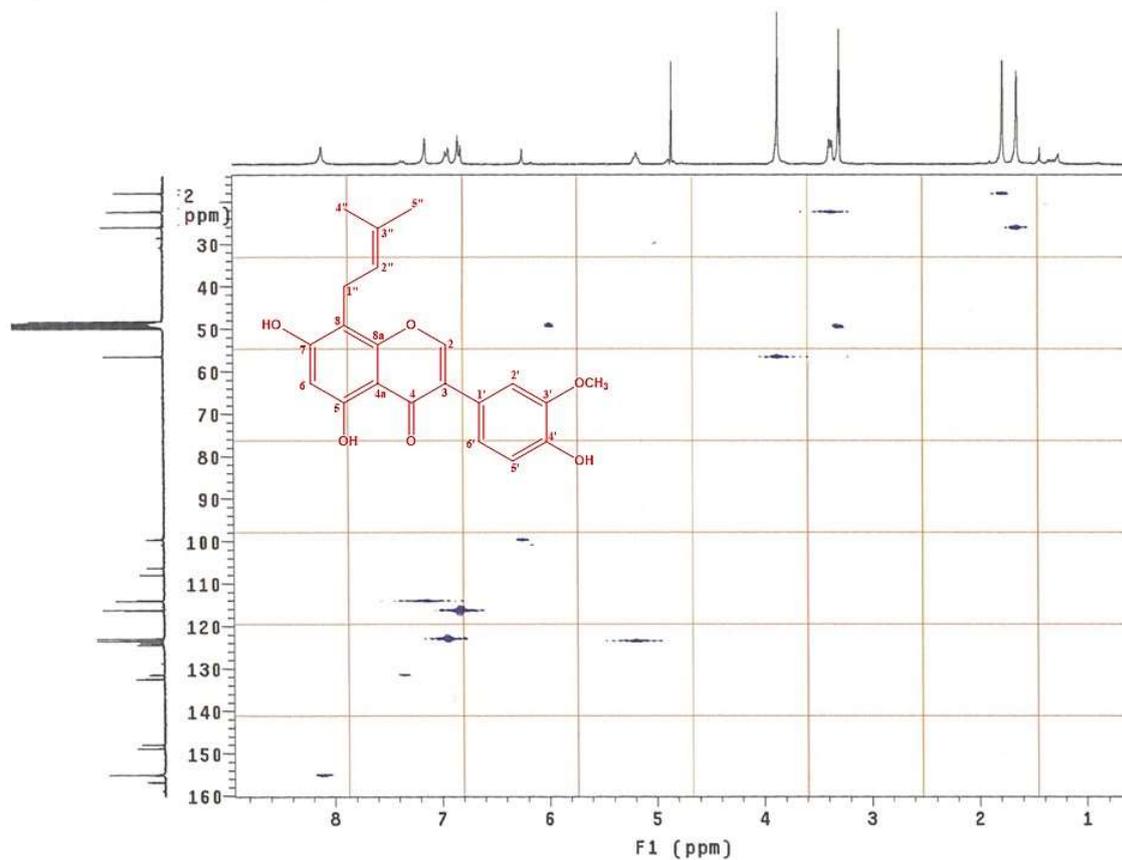


Figura 56 - Mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S10**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD .

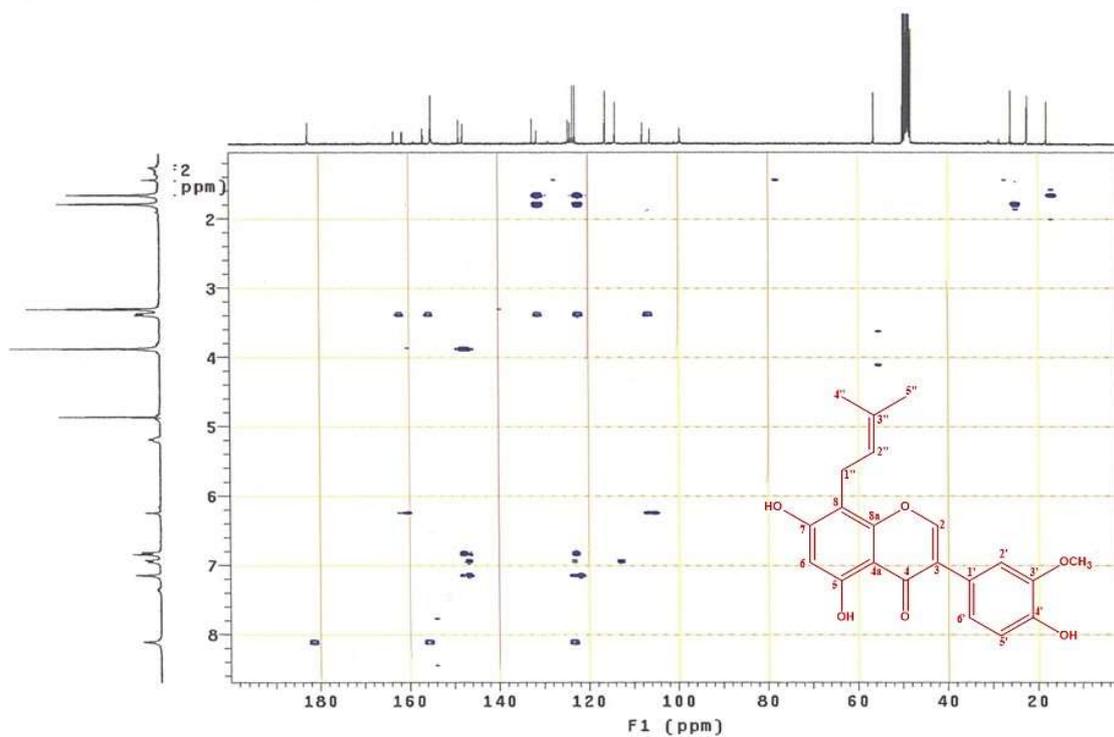


Figura 57 - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S10**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD , na região de (1,1-4,3 ppm) x (96,0-170,0 ppm).

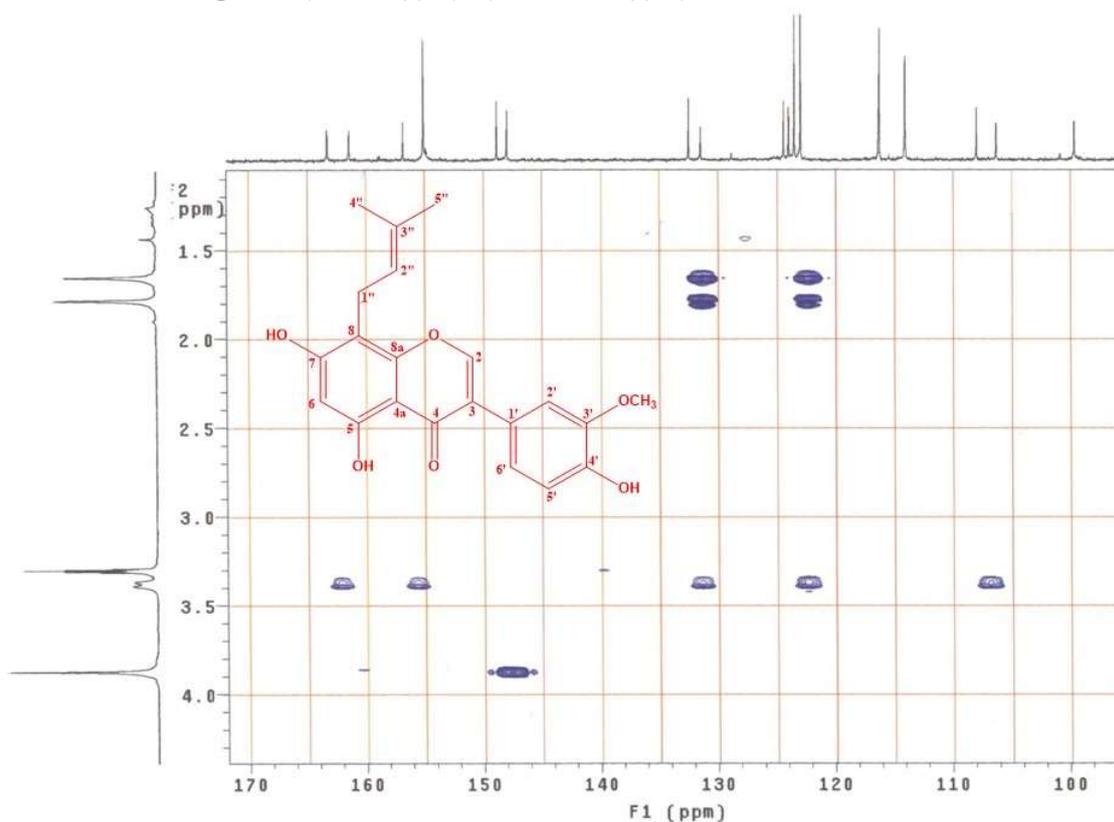
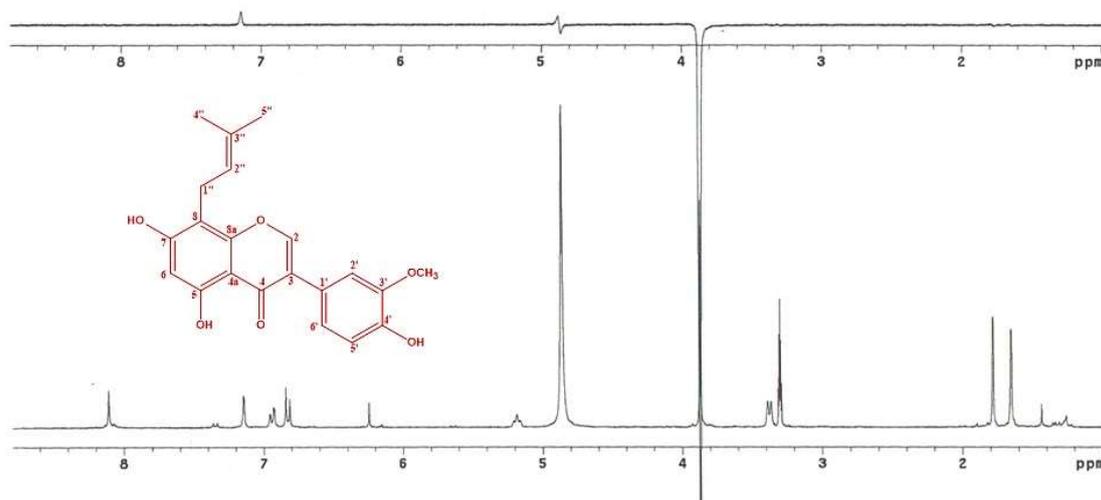


Figura 58 - Espectro de NOE diferencial por irradiação dos hidrogênios do grupo metoxílico de **S10**, 300 MHz, CD_3OD .



5.2.4 Elucidação estrutural de **S11**

A substância **S11**, apresentou-se como um sólido amarelo claro isolado tanto da fase hexânica, como do acetato de etila, obtidas do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos dados de massas de alta resolução (HRESITOF-MS), RMN 1D e 2D e por comparação de dados de substâncias semelhantes relatadas na literatura (AL-MAHARIK; BTTING, 2003). O espectro no UV (Fig. 60) de **S11** apresentou os máximos de absorção em 239 e 265 nm, similar aos apresentados por **S10**. O espectro de massas de alta resolução (HRESITOF-MS) (Fig. 61) mostrou o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 369,13703, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$. Pode-se observar nos espectros de RMN de 1H (Fig. 62) e de RMN ^{13}C (Fig. 63) de **S11** os seguintes sinais: em δ_H 7,85 (H-2), δ_C 152,9 (C-2) e 122,7 (C-3)] semelhantes aos mostrados tanto para a Lupiwighteona (S9) (item 5.2.2) como para a 3'-metoxi-8-prenilrobol (**S10**) (item 5.2.3).

Adicionalmente, o espectro de RMN de 1H apresentou na região de hidrogênios aromáticos, um dubleto em δ_H 6,84 (J 8,4 Hz), integrando para um hidrogênio *orto* posicionado; um duplo dubleto em δ_H 6,93 (J 8,4 e 1,9 Hz), integrando para um hidrogênio, com acoplamentos *orto-meta* e um dubleto *meta* em δ_H 6,99 (J 1,9 Hz), integrando para um hidrogênio *meta* acoplado, evidenciando a presença de um sistema 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX, semelhante ao padrão de substituição ao anel B da substância **S10**; e um singleto em δ_H 6,24, integrando para um hidrogênio, característico de anel A de isoflavonoide pentassubstituído, similar a S9 e **S10**. Outra similaridade observada foram os sinais característicos do grupo prenila em δ_H 3,35 (2H, *d*, J 8,4 Hz, H-1"), 5,15 (1H, *t*, J 6,7 Hz, H- 2"), 1,62 (3H, *s*, Me_{trans}) e 1,73 (3H, *s*, Me_{cis}).

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 63) da substância **S11** exibiu 21 sinais, os quais, com auxílio da análise dos espectros DEPT (Fig. 64), HETCOR (Fig. 65) e HMBC (Figs. 66-68), foram atribuídos a vinte e um átomos de carbono (Tabela 11).

Assim como discutido nos itens 5.2.2 e 5.2.3, a localização do grupo prenila no carbono C-8, ocorreu através da correlação a $^3J_{C,H}$ do sinal em δ_H 3,35 (H-1") com os sinais em δ_C 155,2 (C-8a) e δ_C 161,5 (C-7), observados na expansão 2 do espectro de HMBC (Fig. 67). Todas as correlações são mostradas na Figura 59.

A localização do grupo OMe em C-4' do anel B, foi suportado pela combinação do padrão de substituição no anel B aromático (1',3',4'-trissubstituído) observada no espectro de RMN de 1H , bem como através das correlações a $^{2,3}J_{C,H}$ dos sinais em δ_H 6,93 (H-6') e 3,83 (OMe-4') com o carbono aromático oxidado em δ_C 147,2 (C-4') e os sinais de H-5' (δ_H 6,84) e H-2' (δ_H 6,99) com o outro carbono aromático oxidado a δ_C 145,5 (C-3'). Esta localização, também foi confirmada pelo experimento NOE-diff, onde verificou-se que ao irradiar o sinal em δ_H 3,83 (OMe-4') mostrou efeito NOE com o sinal em δ_H 6,84 (H-5') (Fig. 69), e ao irradiar o sinal de H-5' (d_{orto} δ_H 6,84), apresentou NOE com os sinais do grupo metoxílico (δ_H 3,83) e de H-6' ($dd_{orto-meta}$, δ_H 6,93) (Fig. 70). A partir dos dados espectroscópicos discutidos acima, a substância

S11 foi determinada como sendo um novo produto natural, denominado de 5,7,3'-trihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-4'-metoxi-isoflavona.

Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para **S11** (CDCl_3 + gotas CD_3OD , 300 e 75 MHz) e as principais correlações observadas no espectro de HMBC.

Posição	δ_{H} , J Hz	δ_{C}	$^{\text{a}}\text{HMBC } ^2J_{\text{C,H}}$	$^{\text{a}}\text{HMBC } ^3J_{\text{C,H}}$
2	7,85 (s)	152,9		C-4, C-8a
3		122,7		
4		180,9		
4 ^a		105,1		
5		159,4		
6	6,24 (s)	98,6	C-5	C-4a
7		161,5		
8		106,7		
8 ^a		155,2		
1'		123,6		
2'	6,99 (d, J 1,9)	115,5	C-3'	C-3, C-6', C-4'
3'		145,5		
4'		147,2		
5'	6,84 (d, J 8,4)	111,0		C-3', C-1'
6'	6,93 (dd, J 1,9 e 8,4)	120,5		C-4', C-2'
1''	3,35 (d, J 8,4)	21,1	C-2''	C-7, C-8, C-3''
2''	5,15 (t, J 6,7)	121,8		C-4'', C-5''
3''		131,8		
4''	1,62 (sl)	25,4	C-3''	
5''	1,73 (sl)	17,4	C-3''	
OCH_3 -4'	3,83 (s)	55,6		

Legenda: ^a Correlações no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C são de hidrogênio especificado (s) para os carbonos indicados.

Figura 59 - Correlações $^{2,3}J_{\text{C,H}}$ observadas no espectro de HMBC de **S11**.

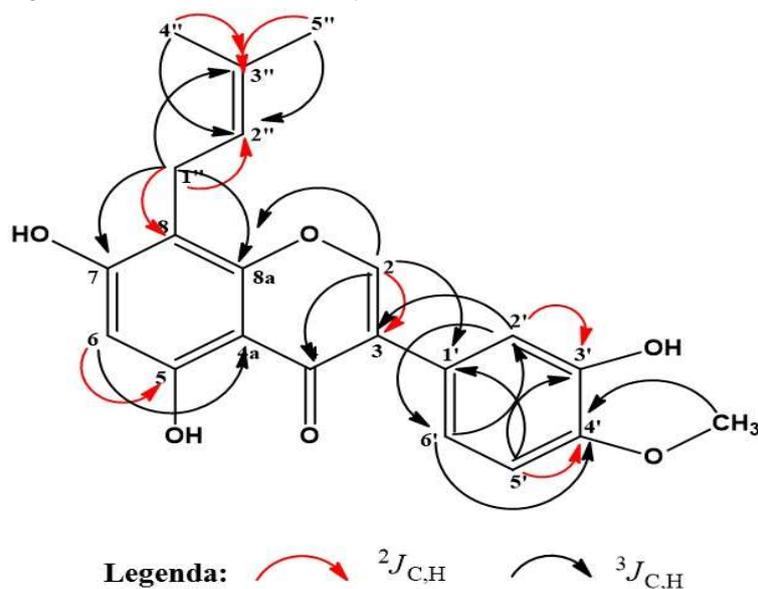


Figura 60 - Espectro de UV de **S11**, λ_{\max} /nm (H₂O:ACN).

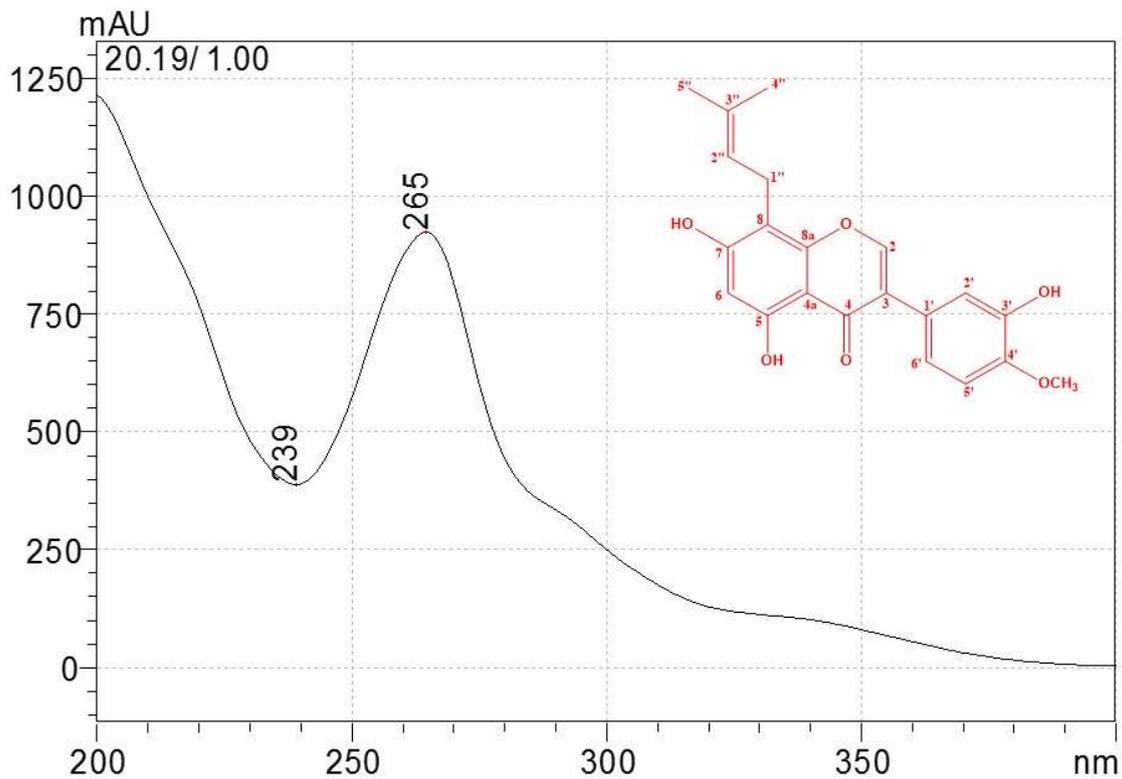


Figura 61 - Espectro de HRESITOF-MS de **S11**.

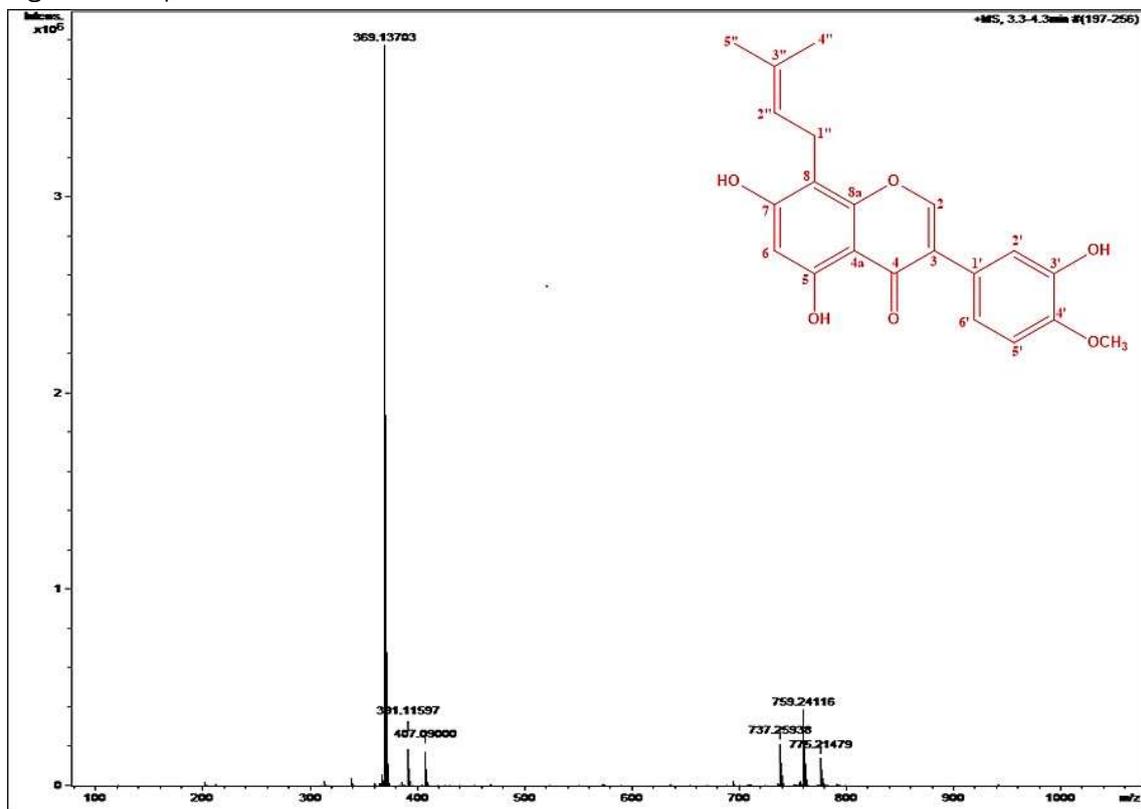


Figura 62 - Espectro de RMN ^1H de **S11**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

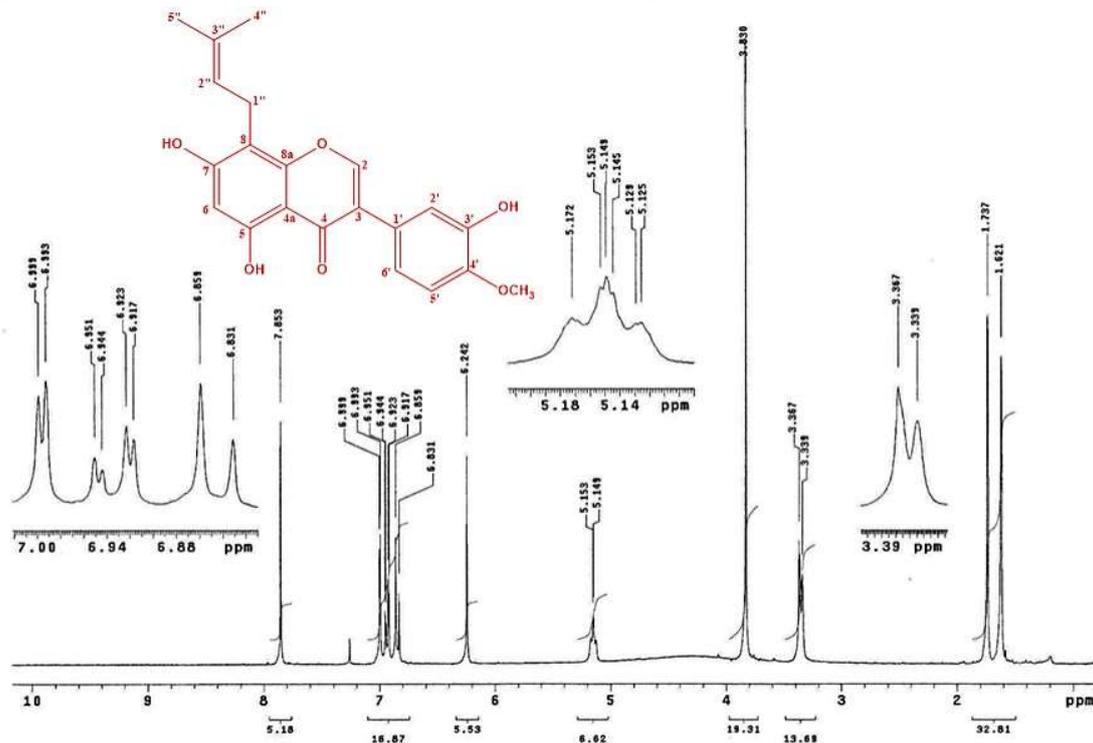


Figura 63 - Espectro de RMN ^{13}C de **S11**, 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

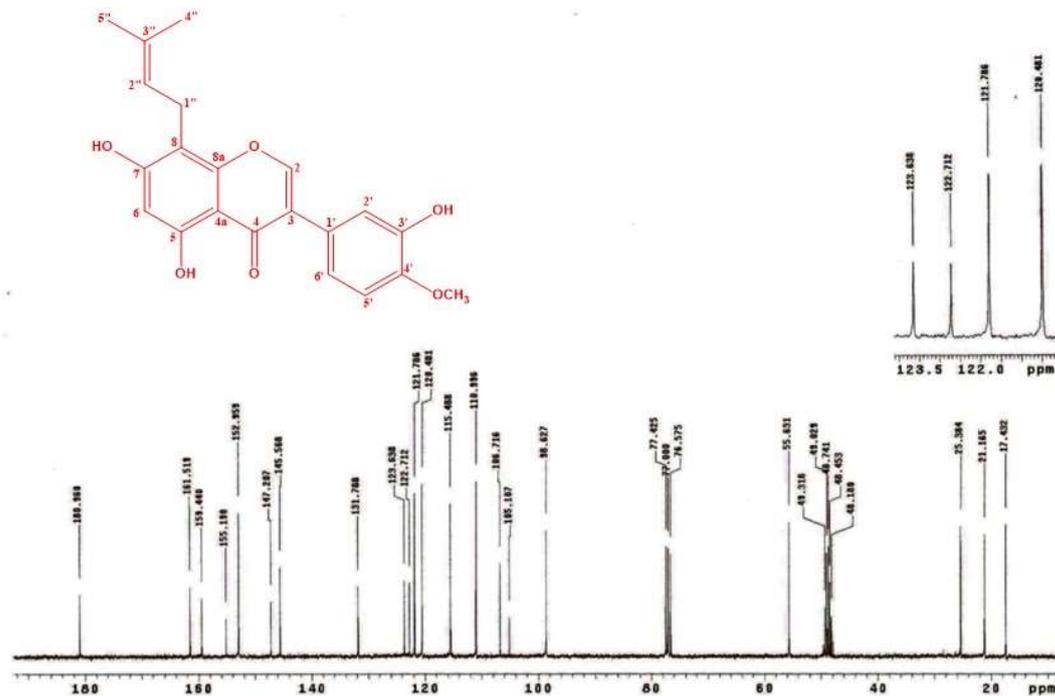


Figura 64 - Espectro de DEPT de **S11**, 75 MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD.

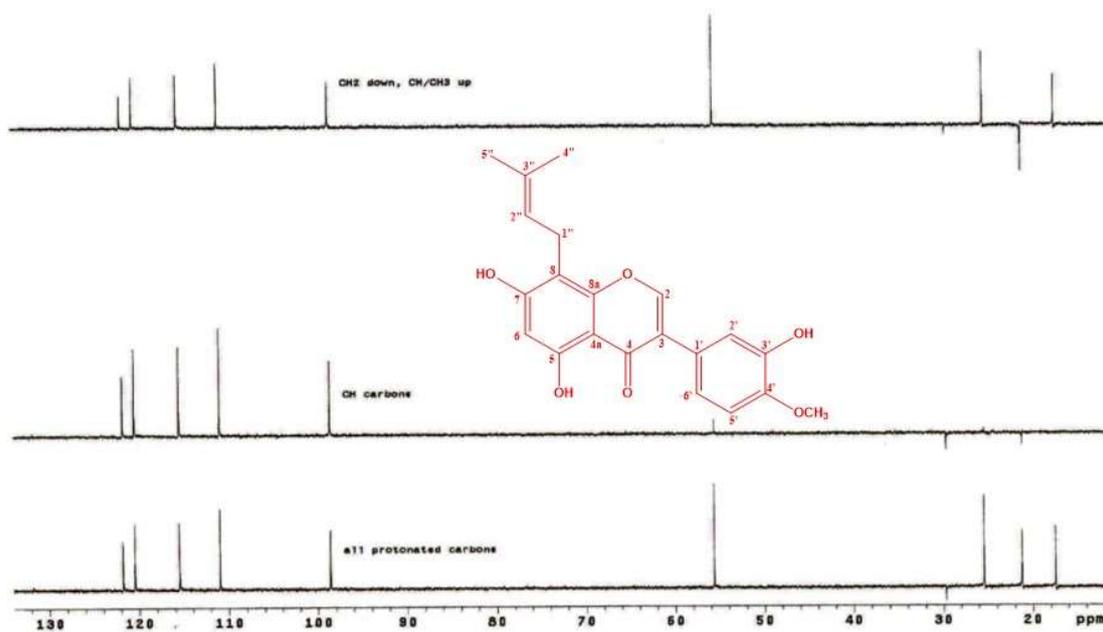


Figura 65 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S11**, ¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD.

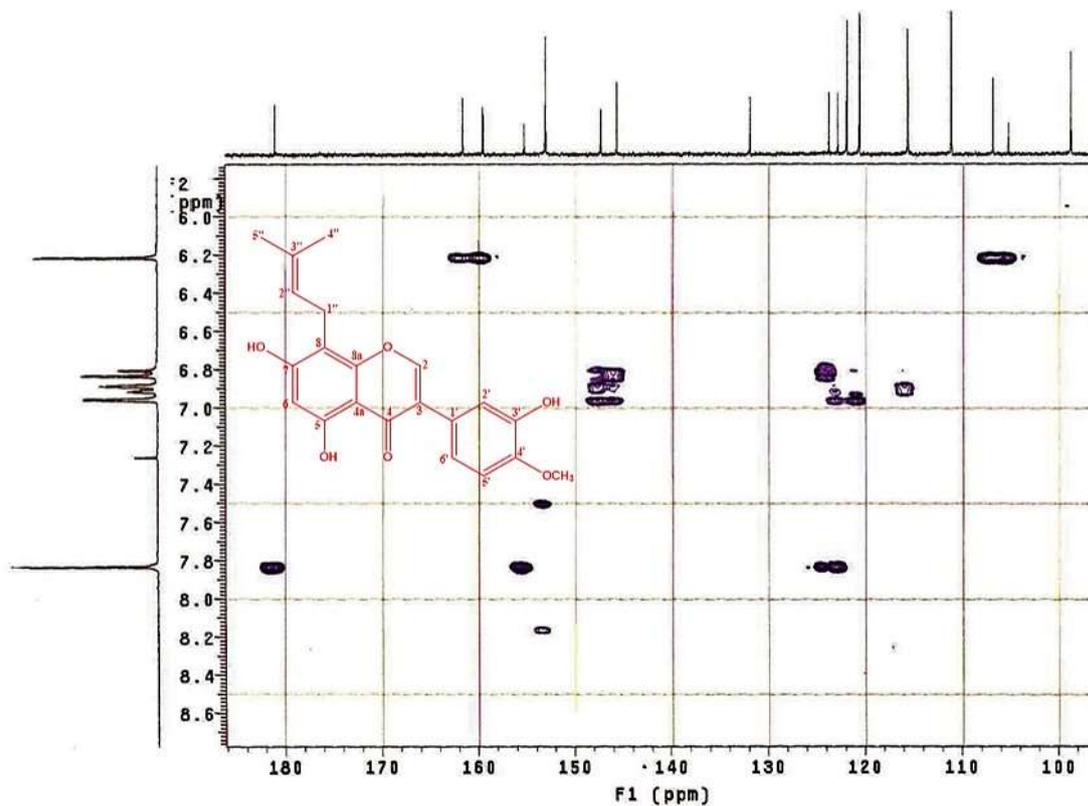


Figura 66 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S11**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD , na região de (6,0-8,6 ppm) x (98,0-183,0 ppm).

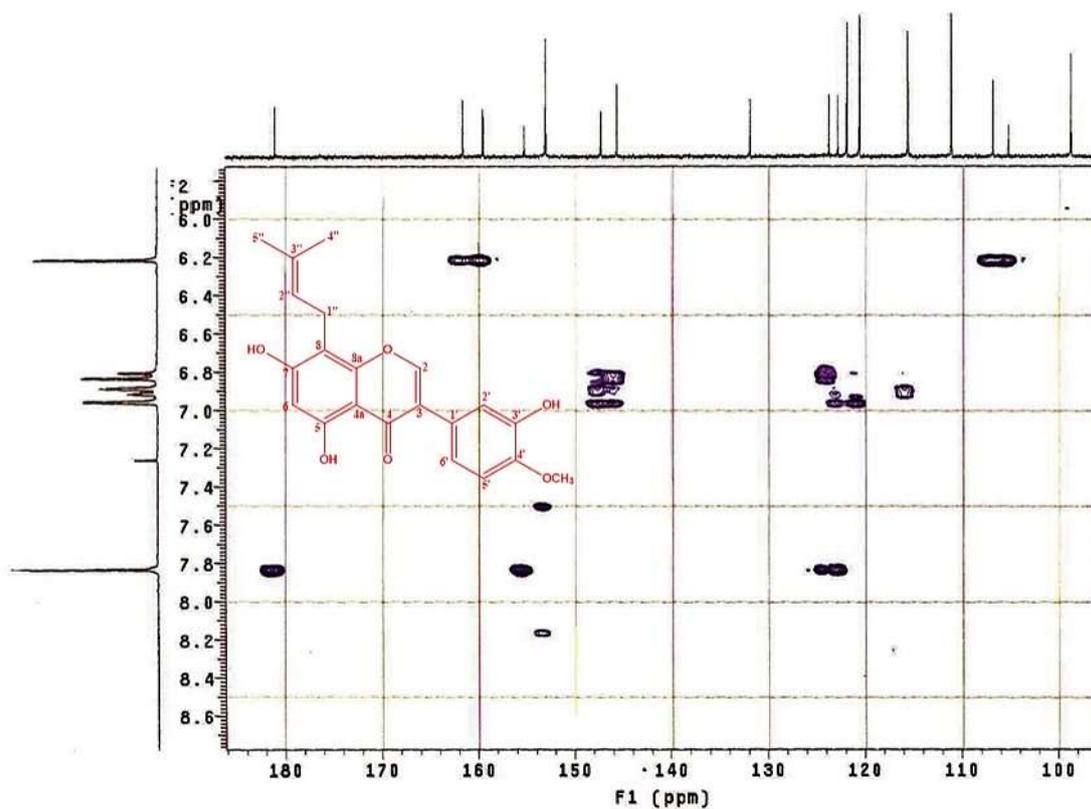


Figura 67 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S11**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD , na região de (1,3-3,6 ppm) x (98,0-165,0 ppm).

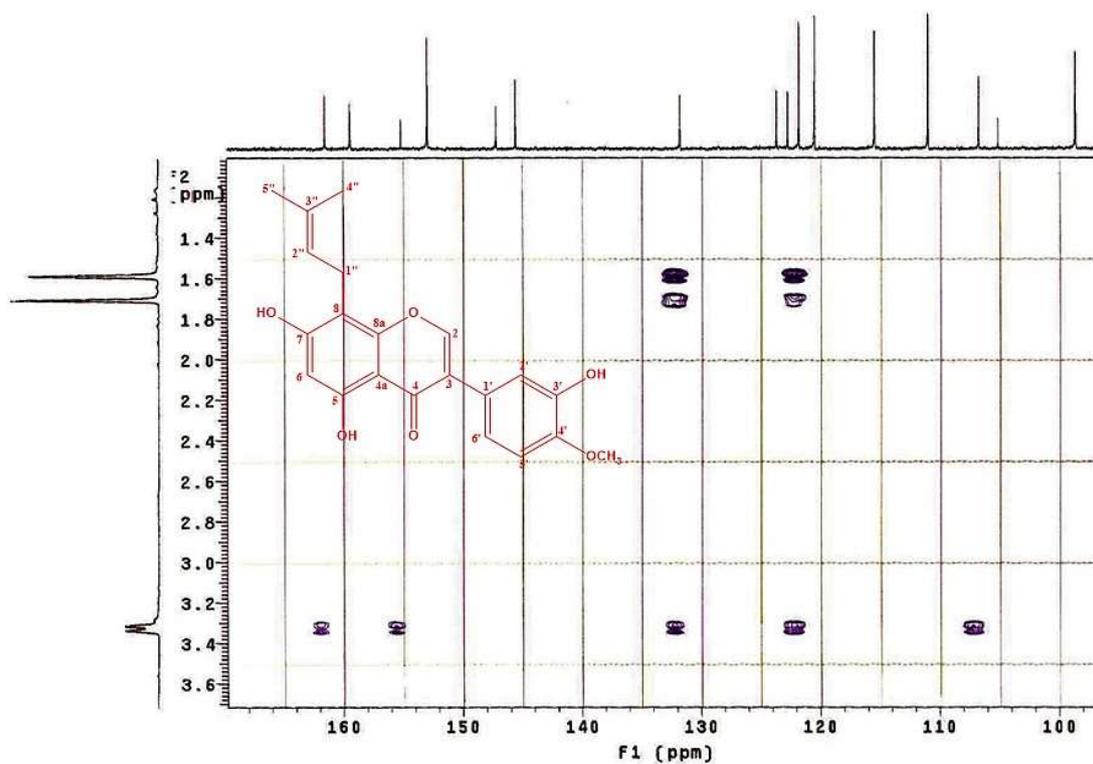


Figura 68 - Expansão 3 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S11**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD , na região de (6,6-7,2 ppm) x (112,0-149,0 ppm).

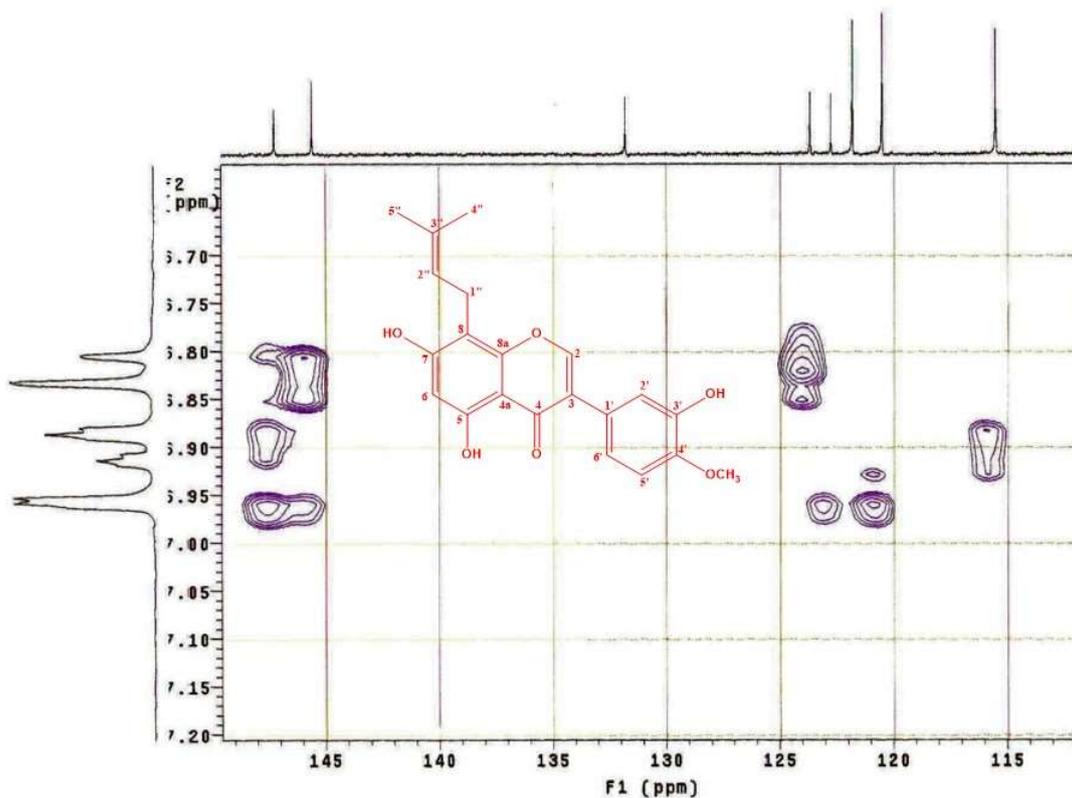


Figura 69 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar os hidrogênios do grupo metoxílico (δ_{H} 3,83, OMe-4') de **S11**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

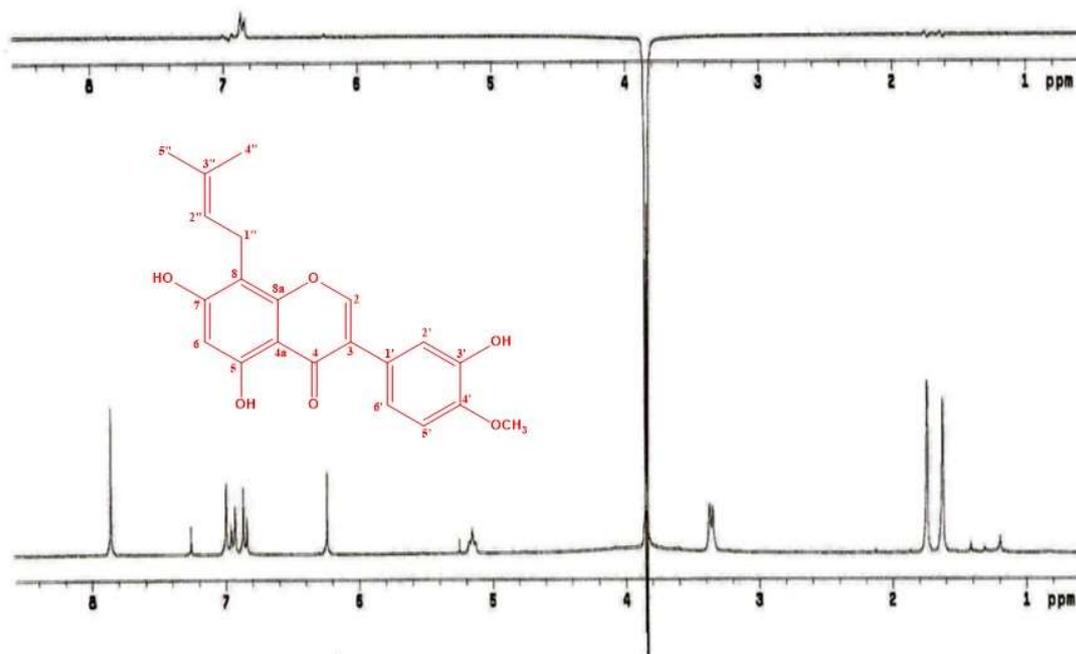
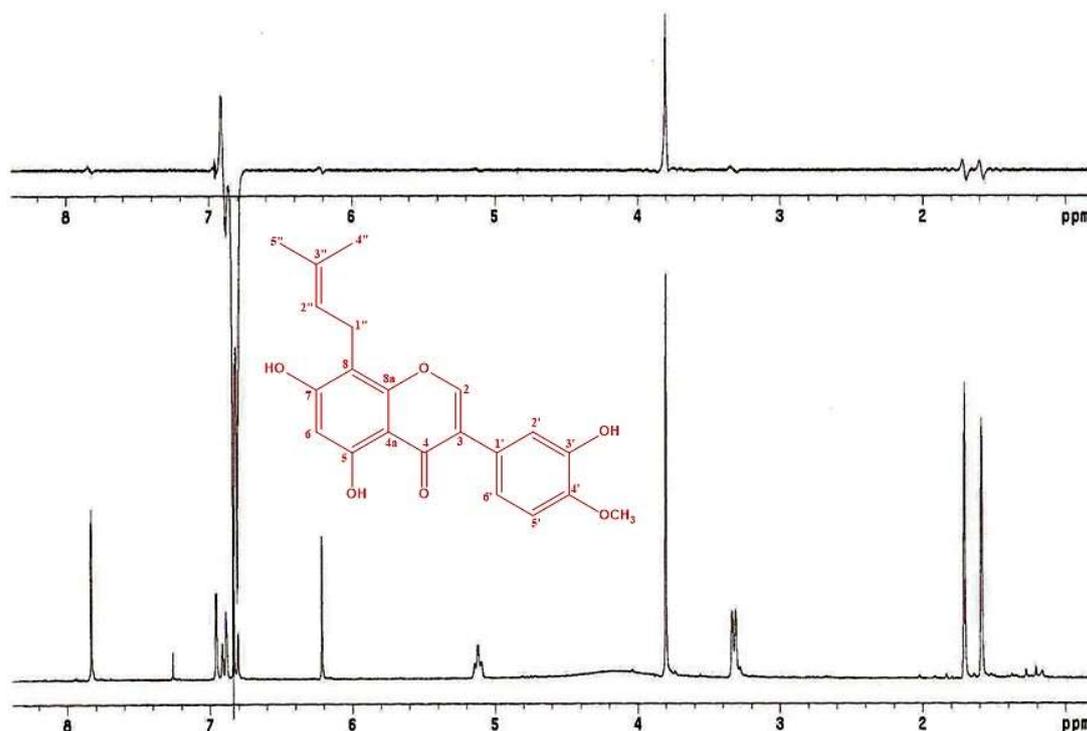


Figura 70 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar o sinal de H-5' ($d_{\text{orto}} \delta_{\text{H}}$ 6,84) de **S11**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .



5.2.5 Elucidação estrutural de **S12**

A substância **S12** apresentou-se como um sólido amorfo avermelhado e foi isolado da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos dados de massas de alta resolução (HRESITOF-MS), RMN 1D e 2D e por comparação com dados de substâncias já descritas nos itens 5.2.3 e 5.2.4, bem como com substâncias semelhantes mencionados na literatura (AL-MAHARIK; BTTING, 2003).

O espectro no UV (Fig. 72) de **S12** apresentou os máximos de absorção em 228, 238 e 263 nm. O Espectro de massas de alta resolução (HRESITOF-MS) (Fig. 73) mostrou o pico do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 531,18615 correspondentes à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ e confirmada pelos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 12). Os espectros de RMN de ^1H (Fig. 74) e ^{13}C (Fig. 75) de **S12** mostraram um perfil próximo daqueles observados para as isoflavonas **S9**, **S10** e **S11**, mostrando sinais em δ_{H} 8,20 (H-2) e δ_{C} 155,5 (C-2) correlacionados a $^1J_{\text{C,H}}$ no espectro de HETCOR (Fig. 76). Adicionalmente, o espectro de RMN ^1H apresentou na região dos aromáticos um dubleto em δ_{H} 7,06 (J 1,8 Hz, 1H) e um multipletto em 6,78-6,99 (2H), com deslocamentos químicos compatíveis com estruturas que apresentam um núcleo flavonoídico 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX para o anel B, já discutidas neste trabalho para **S10** e **S11**. Além dos sinais já relacionados com o

esqueleto de isoflavonas, há o sinal de uma carbonila (δ_c 182,7) quelada ao grupo C-5-OH (NARA et al., 2011; XIAOLI et al., 2006).

A penta substituição do anel A foi demonstrada, com base no sinal singlete em δ_H 6,64 (1H). Também foram observados sinais no espectro de RMN de 1H (Fig. 74) correspondentes a um grupo OMe [δ_H 3,88 (s, 3H)], a um grupo prenila [δ_H 3,60 (*d*, 2H, *J* 7,2 Hz, H-1''), 5,22 (*t*, 1H, *J* 7,2 Hz, H-2''), 1,82 (s, 3H, H-4'') e 1,66 (s, 3H, H-5'')] e a uma unidade de glicose [δ_H 5,05 (*d*, *J* 7,2 Hz, H-1''') e 3,41-3,75 (*m*, H-2'''- H-6''')]. A unidade de glicose foi identificada através de comparação com os dados de RMN da literatura (MARIN et al., 2004). Através dos dados de RMN de 1H e da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico H-1''' (δ_H 5,05, *J* 7,2 Hz) foi possível determinar a natureza da ligação da ose ao núcleo flavonoídico, que se trata do β -D-glicopiranosídeo (OZDEN et al., 1998). Todos os acoplamentos foram confirmados através da análise do espectro de COSY- $^1H \times ^1H$, (Fig. 77).

Com base na análise dos dados do espectro de RMN ^{13}C e com o auxílio dos espectros de HETCOR (Fig. 76) e HMBC (Fig. 78) (Tabela 12), foi possível atribuir os deslocamentos para os átomos de carbono dos grupos OMe (δ_c 56,4) e prenila [δ_c 22,5 (C-1''), 123,6 (C-2''), 132,6 (C-3''), 18,0 (C-4''- Me_{cis}), 25,9 (C-5''- Me_{trans})], bem como para a unidade de glicose [δ_c 101,8 (C-1'''), 78,3 (C-5'''), 78,2 (C-3'''), 74,9 (C-2'''), 71,1 (C-4'''), 62,3 (C-6''')]. A localização do grupo prenila em C-8 foi definido pelas correlações a $^3J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC (Fig. 79) a partir do sinal em δ_c 156,0 (C-8a) com os sinais em δ_H 8,20 (H-2) e 3,60 (H-1'').

Adicionalmente, observa-se no espectro HMBC (Fig. 80) correlações existentes entre os sinais de C-7 (δ_c 162,1) e de H-6 (δ_H 6,64) e H-1''' (δ_H 5,05) da unidade de glicose, indicando que o resíduo de β -D-glicose está ligado na posição C-7 do anel A da isoflavona. Todas as correlações são mostradas na Figura 71.

A localização dos grupos OMe e OH em C-4' e C-3' do anel B, respectivamente, foi sustentado pela combinação do padrão de substituição no anel B aromático (1',3',4'-trissubstituído) exibido no espectro RMN 1H com os efeitos NOE observados no espectro NOE-diff (Fig. 81), que revelaram interações espaciais entre H-5' e OMe-4'. Portanto, **S12** foi identificada como 5,3'-diidroxil-4'-metoxi-7-O- β -glicopiranosídeo-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona, uma nova isoflavona glicosilada.

Figura 71 - Correlações $^{2,3}J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC de **S12**.

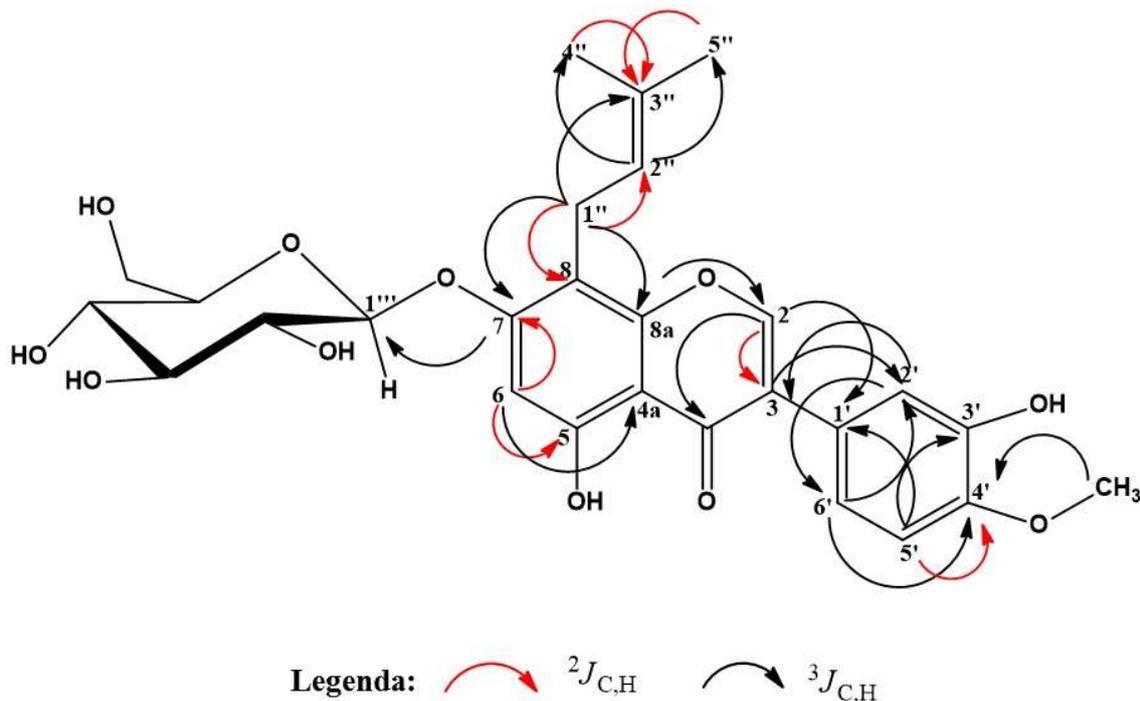


Tabela 12 - Dados de RMN 1H e ^{13}C para **S12** (CD_3OD , 300 e 75 MHz) e as principais correlações observadas no espectro de HMBC.

Posição	δ_H , J Hz	δ_C	b HMBC $^{2,3}J_{C,H}$
2	8,20 (s)	155,5	
3		125,0 ^a	H-2
4		182,7	H-2
4a		107,8	H-6
5		162,0	H-6
6	6,64 (s)	99,7	
7		162,1	H-6, H-1'''
8		110,4	H-6, H-1''
8a		156,0	H-2, H-1''
1'		124,4 ^a	H-2', H-5', H-6'
2'	7,06 (d, J 1,8)	117,3	H-6'
3'		147,4	
4'		149,3	H-2', OMe-4'

5'	6,78-6,99 (m)	112,6	
6'	6,78-6,99 (m)	121,6	H-2'
1''	3,60 (d, J 7,2)	22,5	
2''	5,22 (tl, J 7,2)	123,6	H-1'', H-4'', H-5''
3''		132,6	H-1'', H-4'', H-5''
4'' (Me _{cis})	1,82 (s)	18,0	H-5''
5'' (Me _{trans})	1,66 (s)	25,9	H-4''
OMe-4'	3,88 (s)	56,4	
1''' (Gli)	5,05 (d, J 7,2)	101,8	
2''' (Gli)	3,41-3,75 (m)	74,9	
3''' (Gli)	3,41-3,75 (m)	78,2	
4''' (Gli)	3,41-3,75 (m)	71,1	
5''' (Gli)	3,41-3,75 (m)	78,3	
6''' (Gli)	3,41-3,75 (m)	62,3	

Legenda: ^aOs valores podem ser trocados. ^bCorrelações no espectro de HMBC ¹H-¹³C são de hidrogênios indicados para os carbono especificado(s).

Figura 72 - Espectro de UV de **S12**, λ_{\max} /nm (H₂O:ACN).

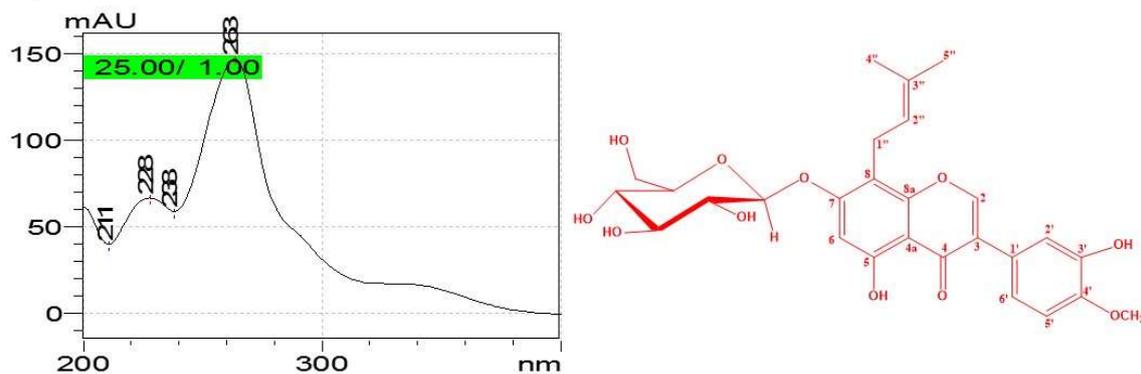


Figura 73 - Espectro de HRESITOF-MS de **S12**.

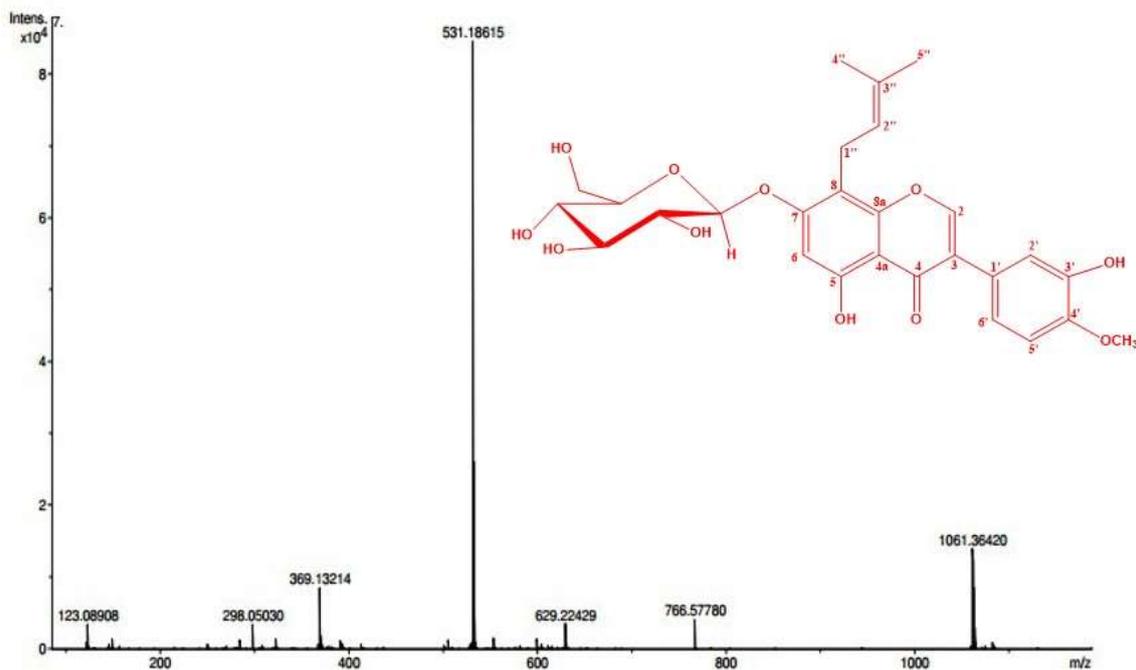


Figura 74 - Espectro de RMN ^1H de **S12**, 300 MHz, CD_3OD .

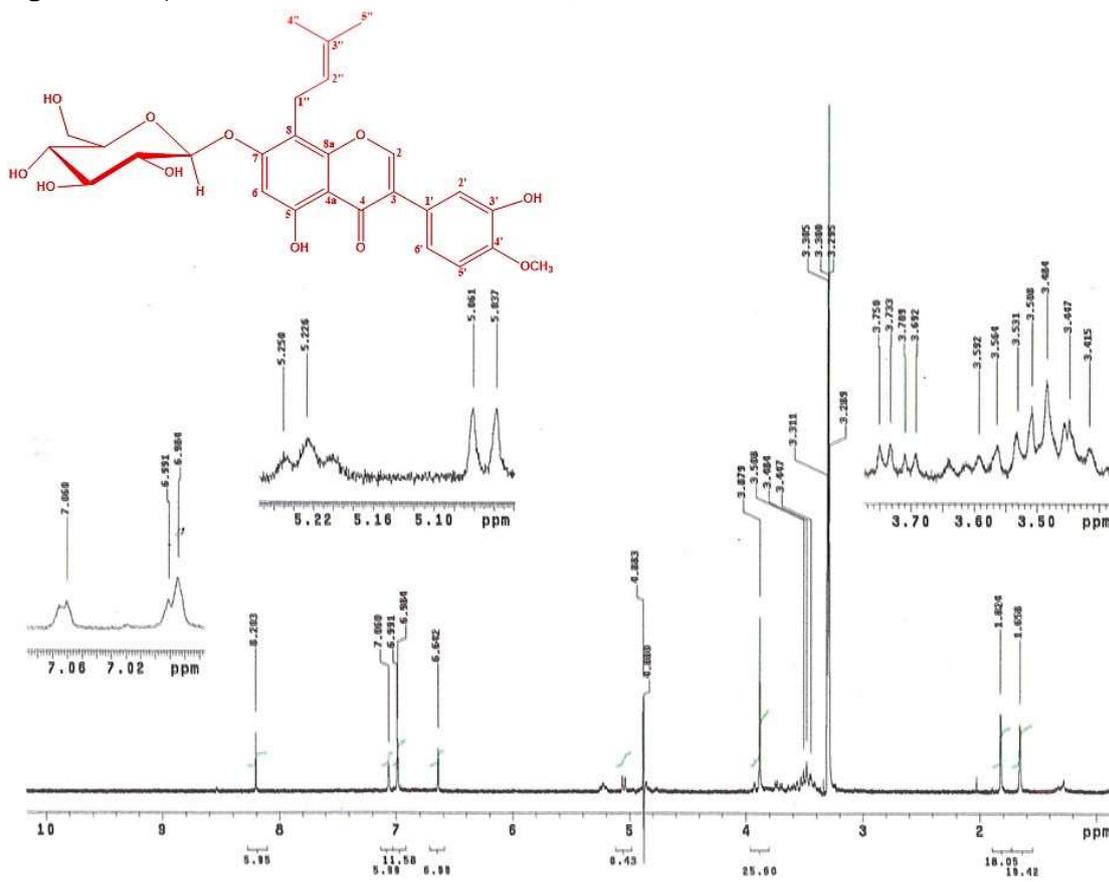


Figura 75 - Espectro de RMN ^{13}C de **S12**, 75 MHz, CD_3OD .

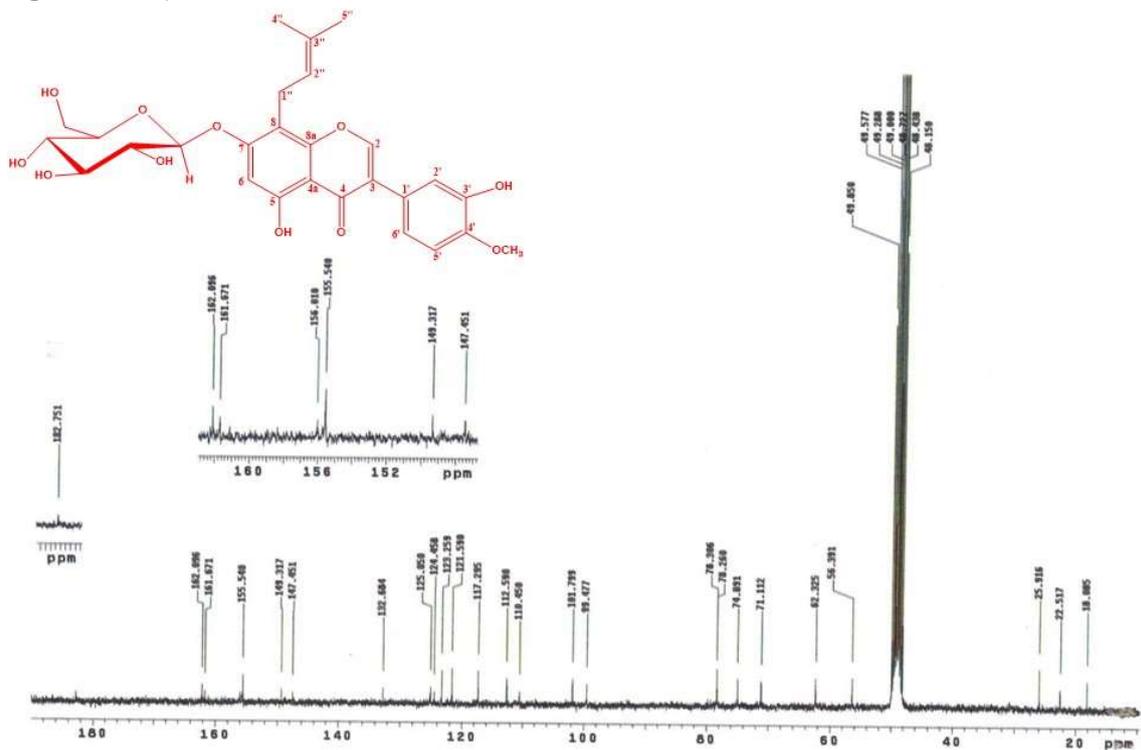


Figura 76 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S12**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD .

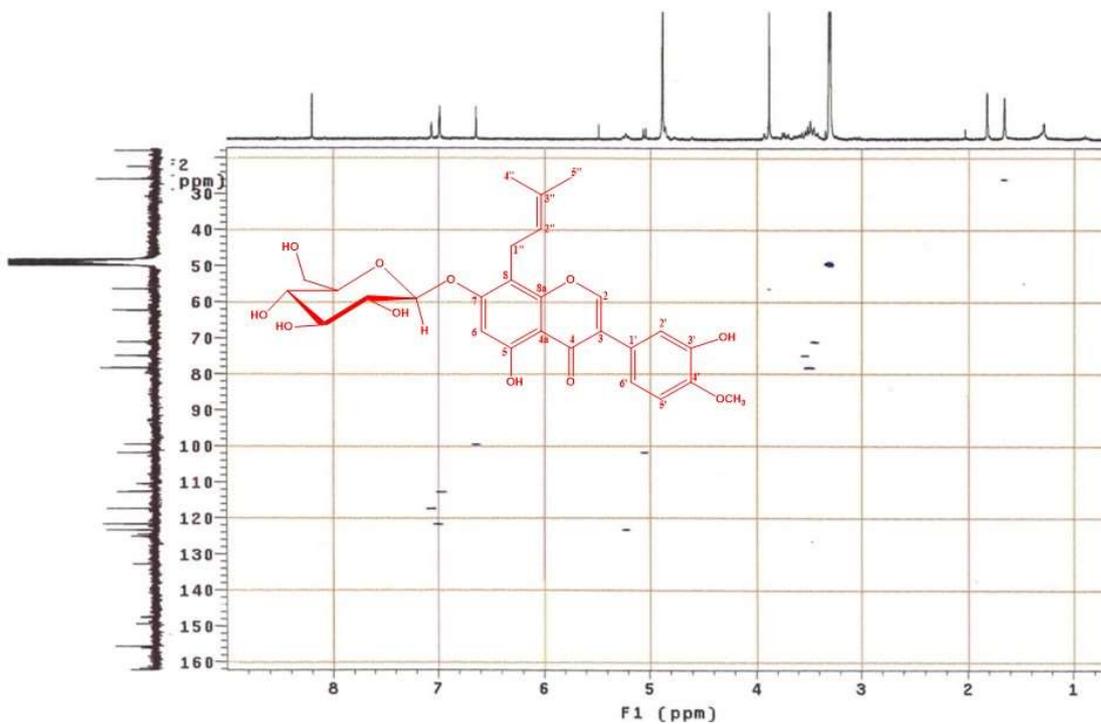


Figura 77 - Mapa de correlação homonuclear COSY - ^1H x ^1H de **S12**, 300 MHz, CD_3OD .

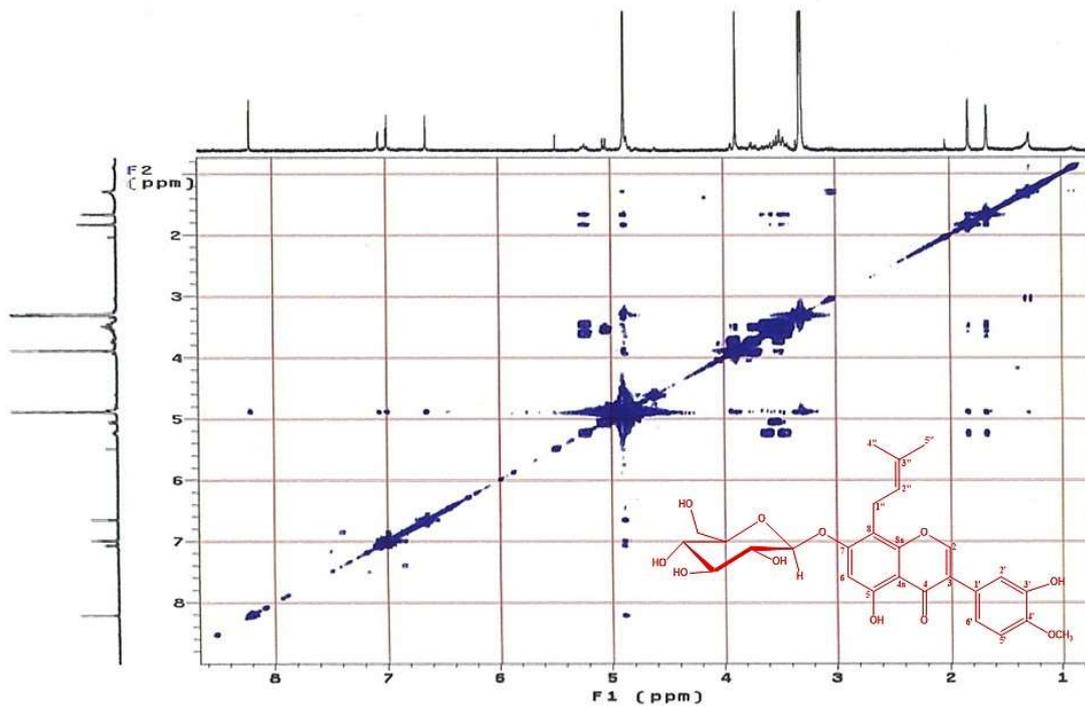


Figura 78 - Mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S12**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD .

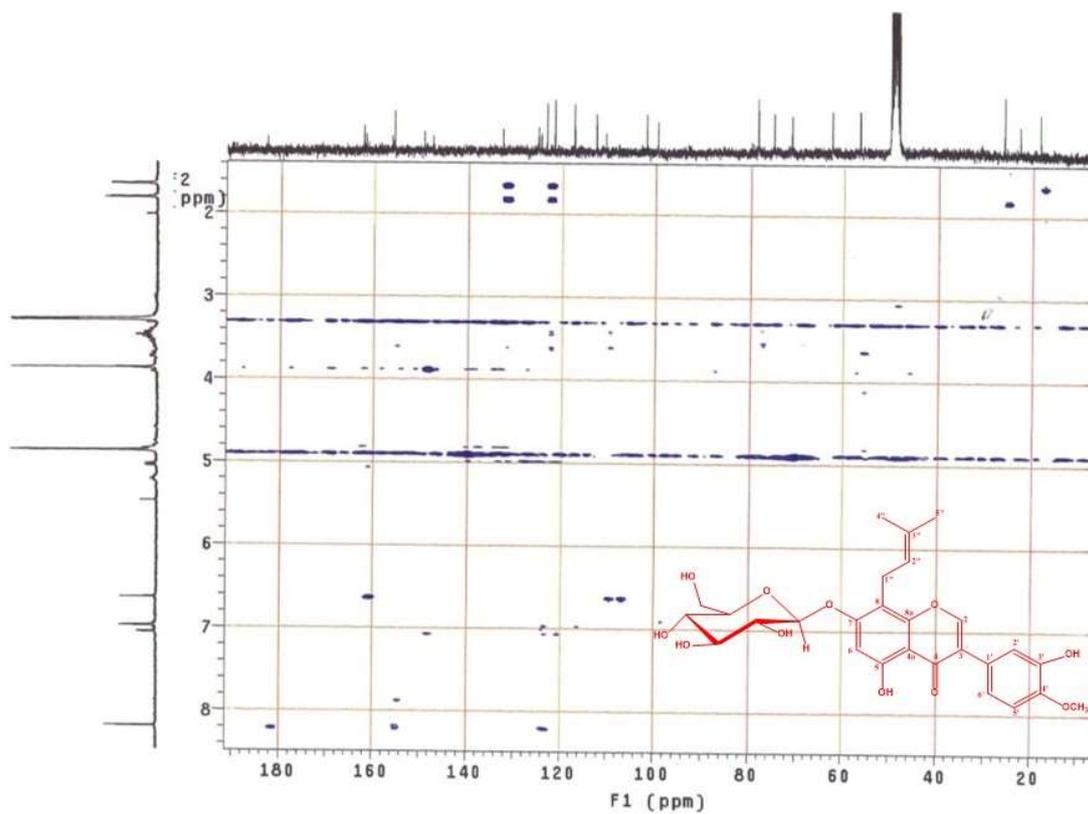


Figura 79 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S12**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD , na região de (3,4-4,3 ppm) x (42,0-190,0 ppm).

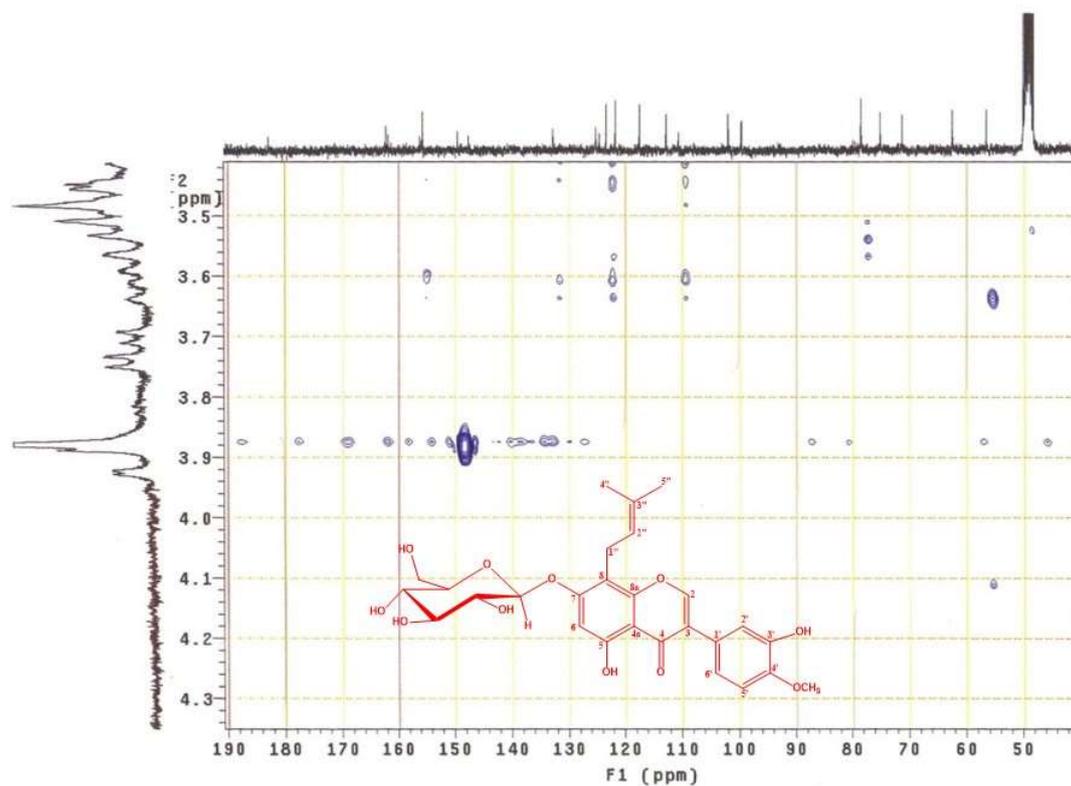


Figura 80 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S12**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CD_3OD , na região de (6,2-8,4 ppm) x (102,0-190,0 ppm).

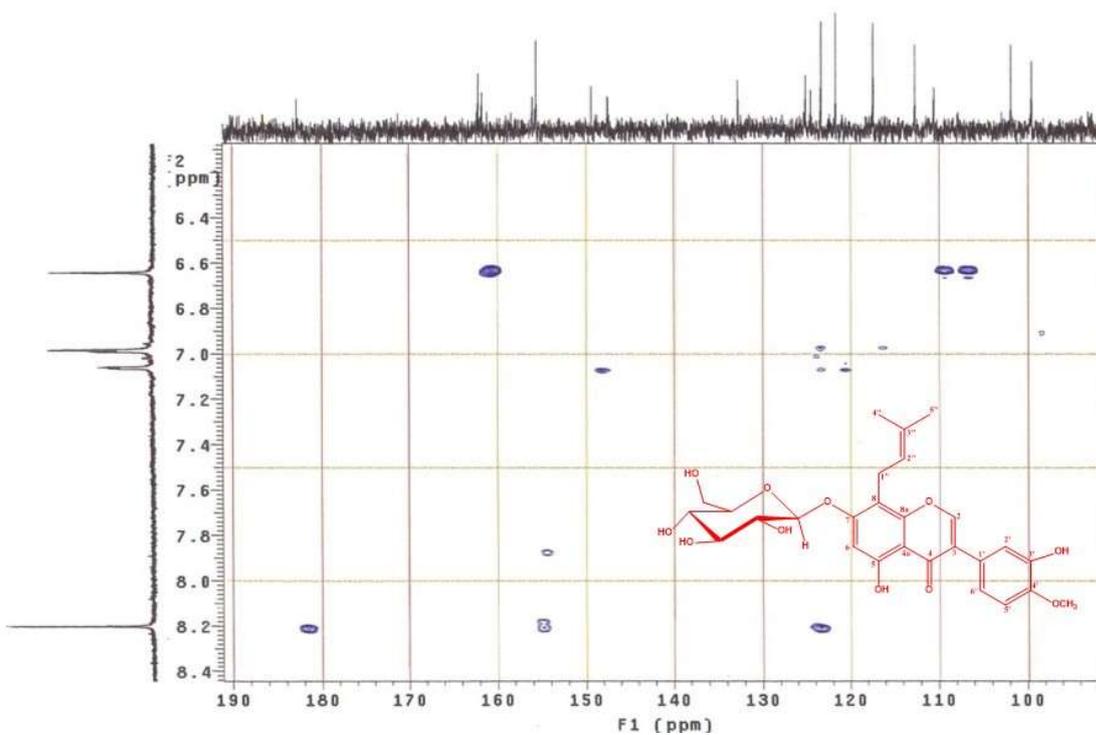
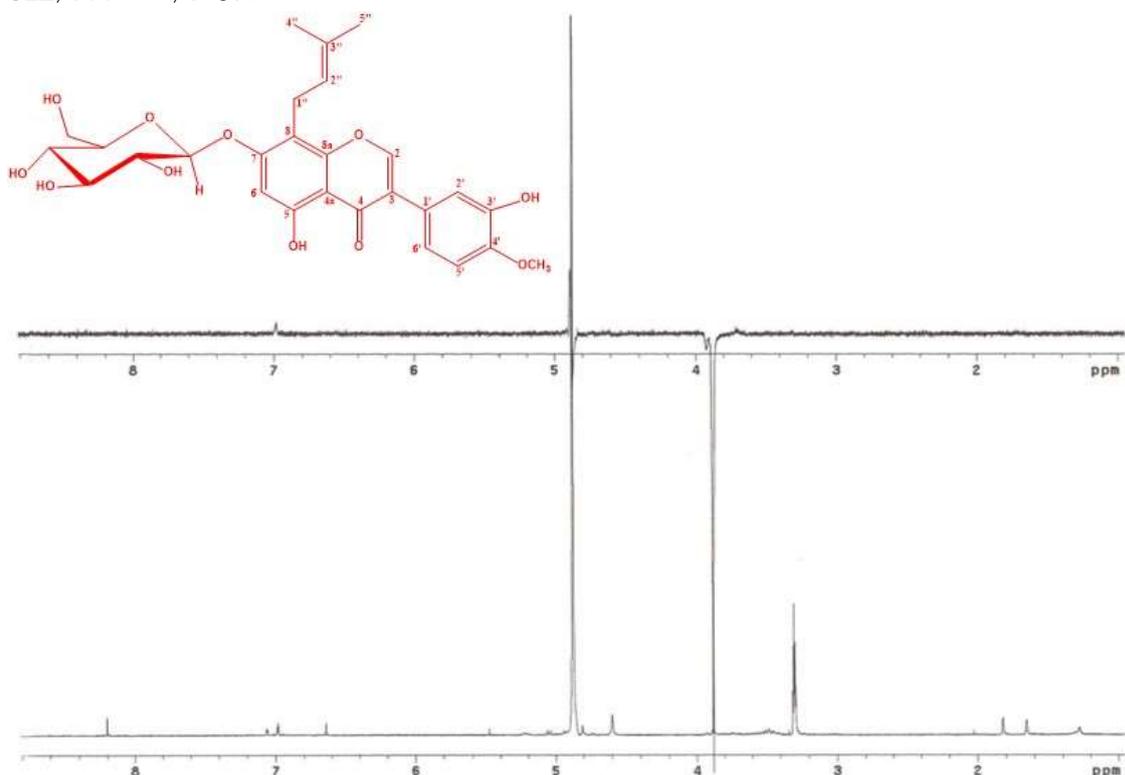


Figura 81 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar os hidrogênios do grupo metoxílico (δ_H 3,88) de **S12**, 300 MHz, CD_3OD .



5.2.6 Elucidação estrutural de **S6**

A substância **S6** foi isolada como um óleo incolor da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de RMN 1D e 2D e por meio de comparações com dados relatados previamente na literatura (MÁXIMO et al., 2002). Pode-se observar nos espectros de RMN de 1H (Fig. 82) e ^{13}C (Fig. 83) de **S6** sinais semelhantes aos mostrados para a Lupiwighteona (**S9**) (item 5.2.2), ou seja, sinais típicos de isoflavonas (BANDEIRA et al., 2011), singletos em δ_H 7,88 (H-2) e δ_H 12,89 (C-5-OH), além de sinais em δ_C 152,4 (C-2), 123,6 (C-3) e 181,0 (C-4).

O espectro de RMN de 1H (Fig. 82) também mostrou sinais relativos a dois hidrogênios olefínicos *cis*-acoplados em δ_H 5,59 (*d*, $J_{H-3''/H-4''} = 10,2$ Hz) e 6,68 (*d*, $J_{H-4''/H-3''} = 10,2$ Hz) que, associados aos singletos relativos aos grupos *gem*-dimetílicos em δ_H 1,47 (5''-Me e 6''-Me) permitiram caracterizar a presença do anel do 2,2-dimetilpirano fundido a anel aromático (BALDOQUI et al., 1999). Com auxílio do espectro de HSQC (Figs. 84 e 85) foi possível atribuir os sinais de carbono em δ_C 127,5 (C-3''), 114,5 (C-4'') e 28,2 (C-5''/C-6'') aos carbonos deste anel, cuja ligação no anel A nas posições C-7 e C-8 foi comprovada através da análise no espectro de HMBC (expansão 1, Fig. 86), onde observou-se correlação a $^{2,3}J_{C,H}$ entre C-6 (δ_C 100,3) e C-5-OH (δ_H 12,89) e entre C-7 (δ_C 159,6) e H-4'' (δ_H 6,68), confirmando

assim a estrutura angular de **S6**. Todos os acoplamentos foram confirmados no espectro de COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (Fig. 87).

Adicionalmente, o espectro de RMN de ^1H mostrou dois dubletos correspondentes a quatro hidrogênios aromáticos com constantes de acoplamento vicinais característicos do anel B 1',4'-dissubstituído da isoflavona, e um sinal de singlete em δ_{H} 7,88 relacionado a hidrogênio aromático no anel A. Todos os sinais de RMN de ^{13}C de **S6** foram atribuídas a partir da análise dos espectros de DEPT (Fig. 88), HSQC e HMBC (Figs. 89-91), onde podem ser observados na Tabela 13. A partir do espectro de HSQC (Fig. 84 e 85) os desvios químicos dos átomos de carbono hidrogenados foram atribuídas, como se segue: δ_{C} 152,4 (C-2), 130,3 (C-2'/ C-6'), 127,5 (C-3''), 115,6 (C-3'/C-5'), 114,5 (C-4''), 100,3 (C-6), 28,2 (C-5''/ C-6''). A partir do espectro HMBC (Fig. 91) foi possível determinar os deslocamentos químicos de C-8 (δ_{C} 101,1) e C-4a (δ_{C} 106,0) e atribuir todos os sinais restantes aos correspondentes carbonos não hidrogenados.

O conjunto desses dados, associado às informações disponíveis na literatura (MÁXIMO et al., 2002), permitiu identificar **S6** como a 5,4'-diidroxí-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-isoflavona, conhecida vulgarmente pelo nome de derrona. Este composto já foi isolado de fontes naturais, no entanto, é relatada pela primeira vez partir o gênero *Vatairea*.

Figura 82 - Espectro de RMN ^1H de **S6**, 300 MHz, CDCl_3 .

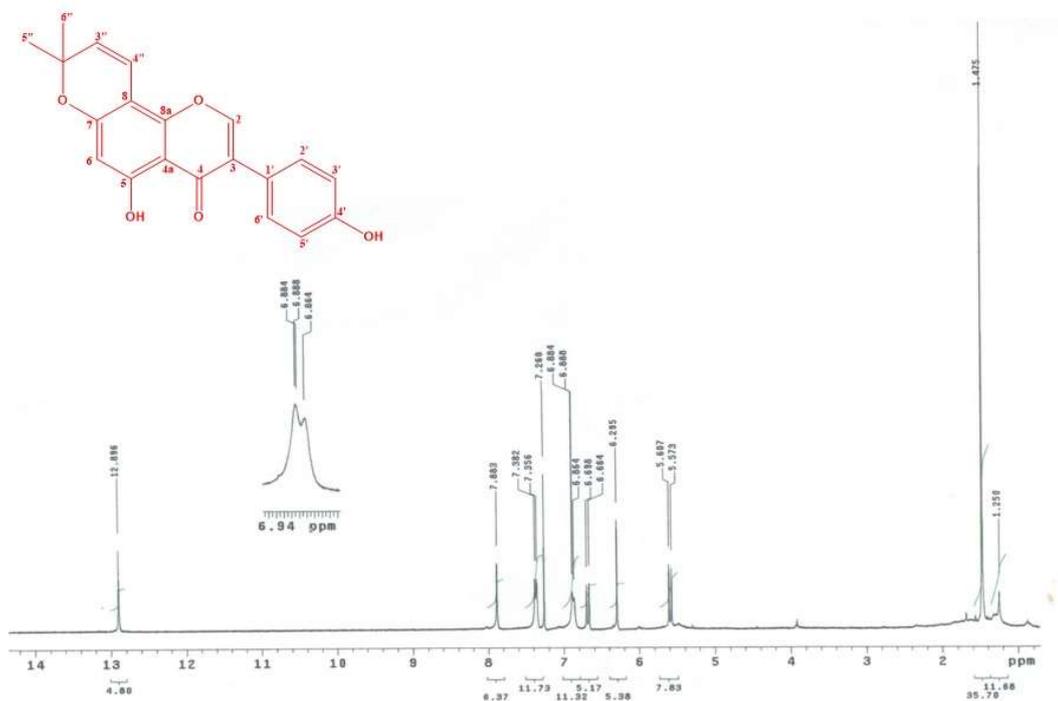
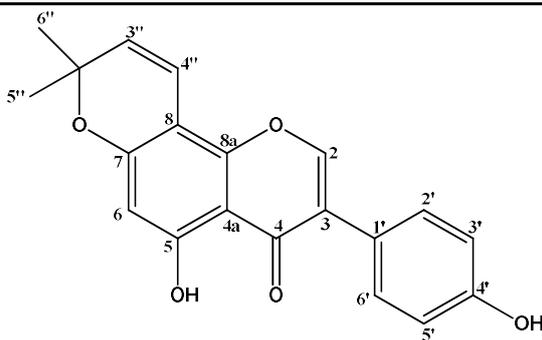


Tabela 13 - Dados de RMN ¹H e ¹³C para **S6** (CDCl₃, 300 e 75 MHz) e comparação com dados da literatura.



Posição	Derrona isolada (S6)		Derrona da literatura*	
	$\delta_H, J \text{ Hz}$	δ_C	$\delta_H, J \text{ Hz}$	δ_C
2	7,88 (s)	152,4	7,88 (s)	152,6
3		123,6		123,7
4		181,0		181,2
4a		106,0		106,1
5		162,1		162,5
6	6,29 (s)	100,3	6,30 (s)	100,4
7		159,6		159,8
8		101,1		101,2
8a		152,2		152,6
1'		122,7		123,1
2'/6'	7,36 (d, J 7,8)	130,3	7,40 (d, J 8,0)	130,5
3'/5'	6,87 (d, J 6)	115,5	6,87 (d, J 8,4)	115,7
4'		156,0		156,1
2''		78,1		78,1
3''	5,59 (d, J 10,2)	127,5	5,9 (d, J 10)	127,6
4''	6,68 (d, J 10,2)	114,5	6,83 (d, J 10)	114,7
5'' - Me	1,47 (s)	28,5	1,47 (s)	28,1
6'' - Me	1,47 (s)	28,5	1,47 (s)	28,1
5-OH-quelada	12,89 (s)		12,89 (s)	

Legenda: * Máximo et al. (2002).

Figura 83 - Espectro de RMN ^{13}C de **S6**, 75 MHz, CDCl_3 .

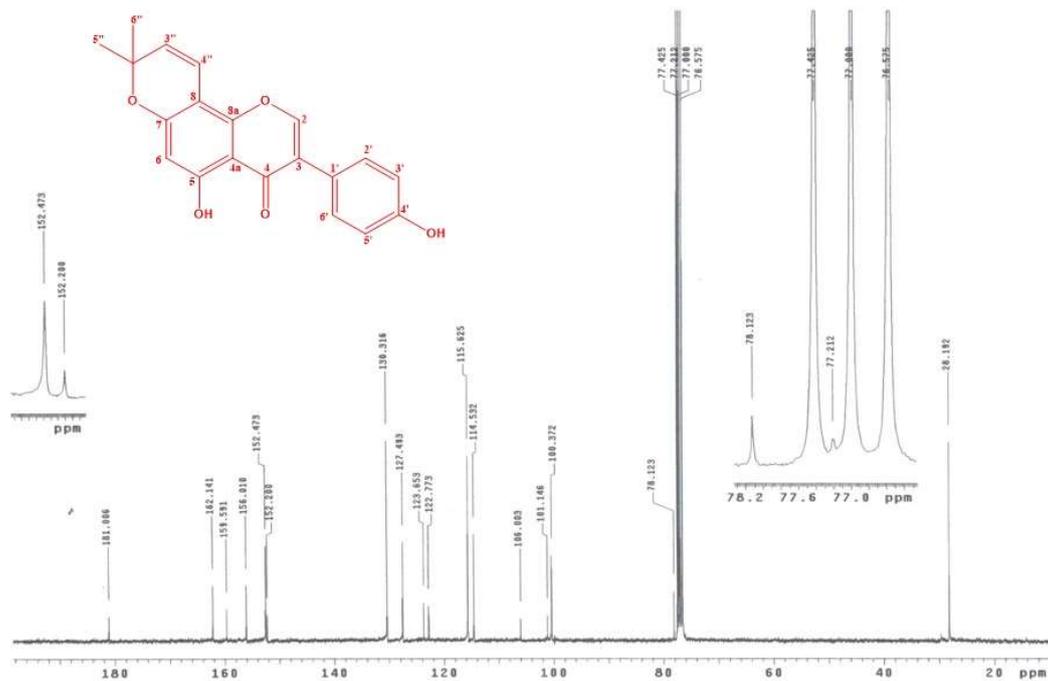


Figura 84 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HSQC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (0,6-2,2 ppm) x (10,0-160,0 ppm).

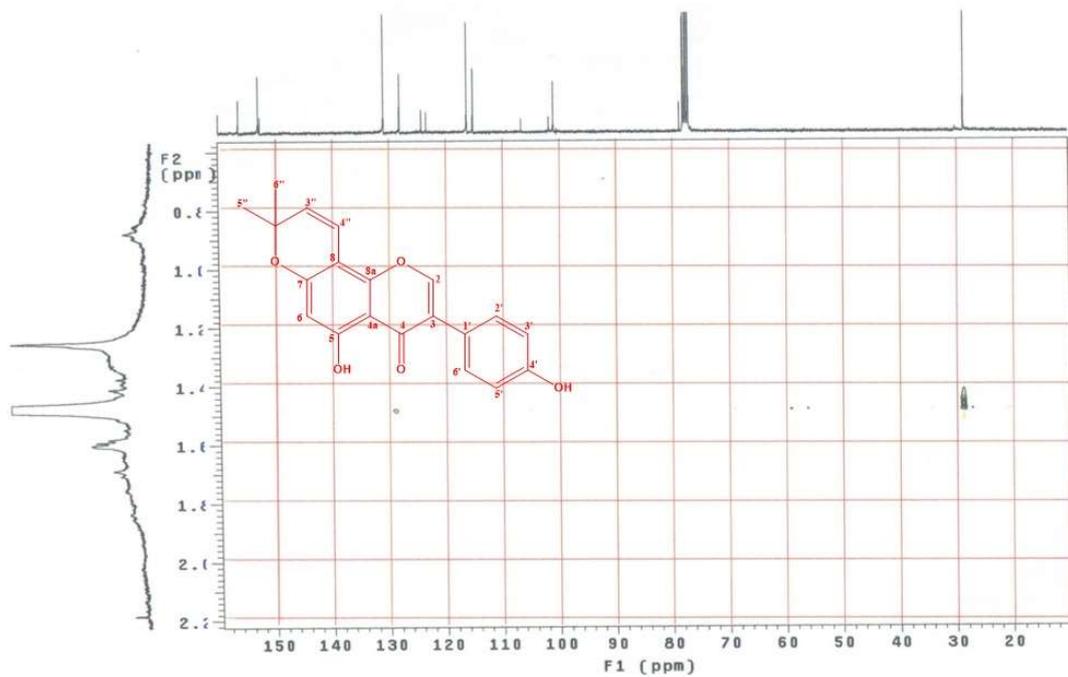


Figura 85 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HSQC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,4-8,5 ppm) x (99,0-159,0 ppm).

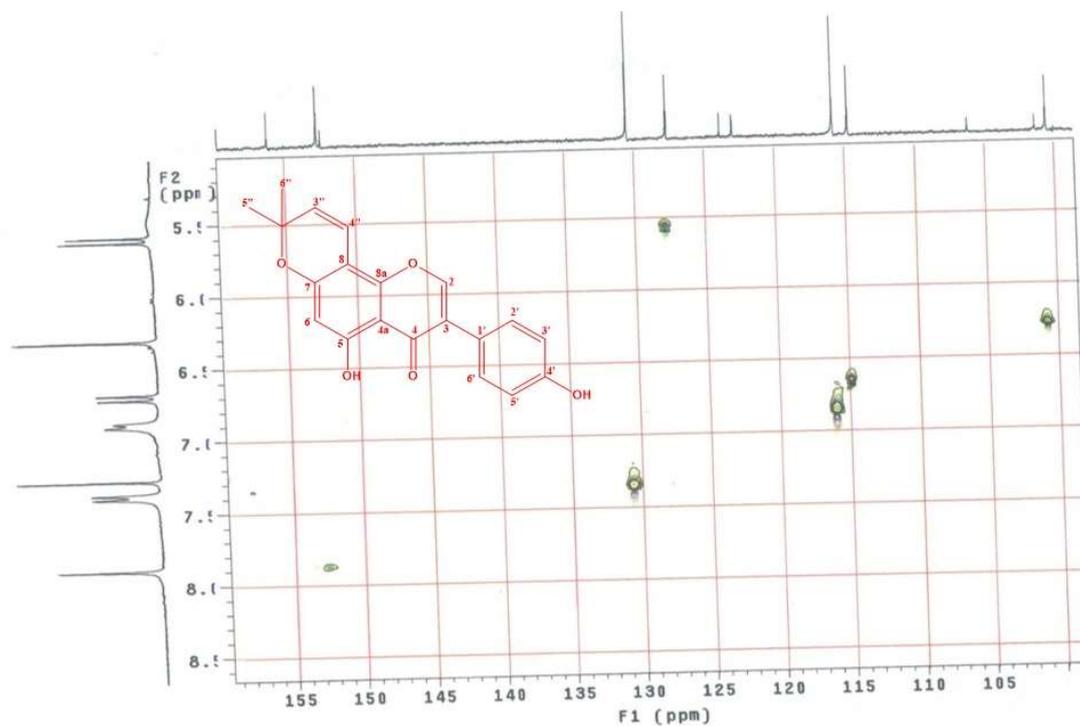


Figura 86 - Expansão 4 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,0-14,0 ppm) x (20,0-184,0 ppm).

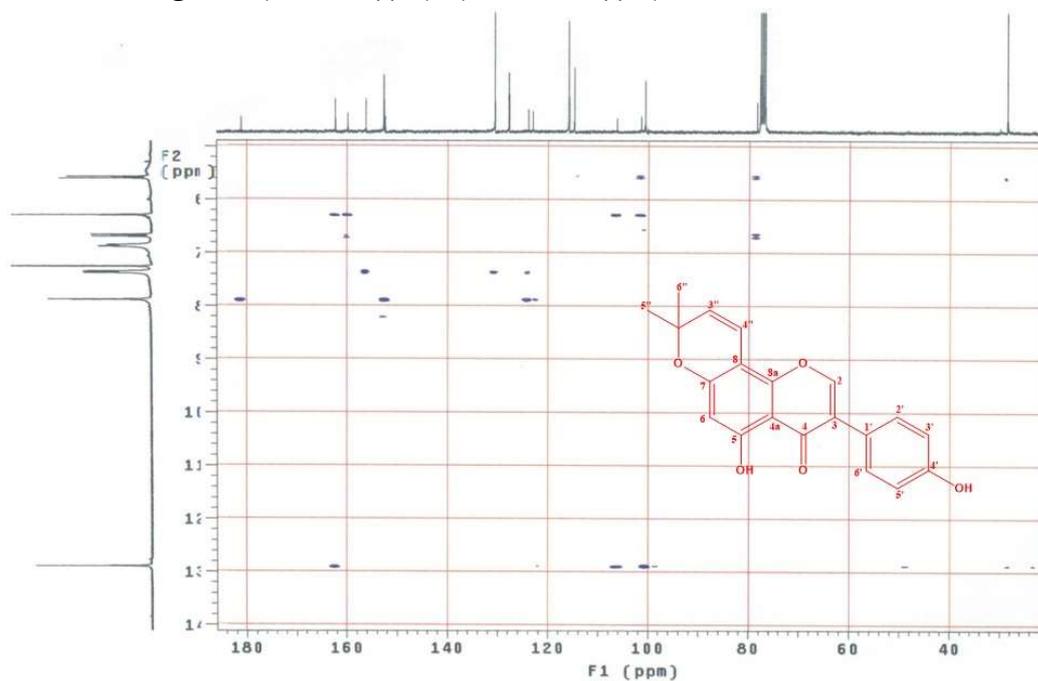


Figura 87 - Mapa de correlação homonuclear COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **S6**, 300 MHz, CDCl_3 .

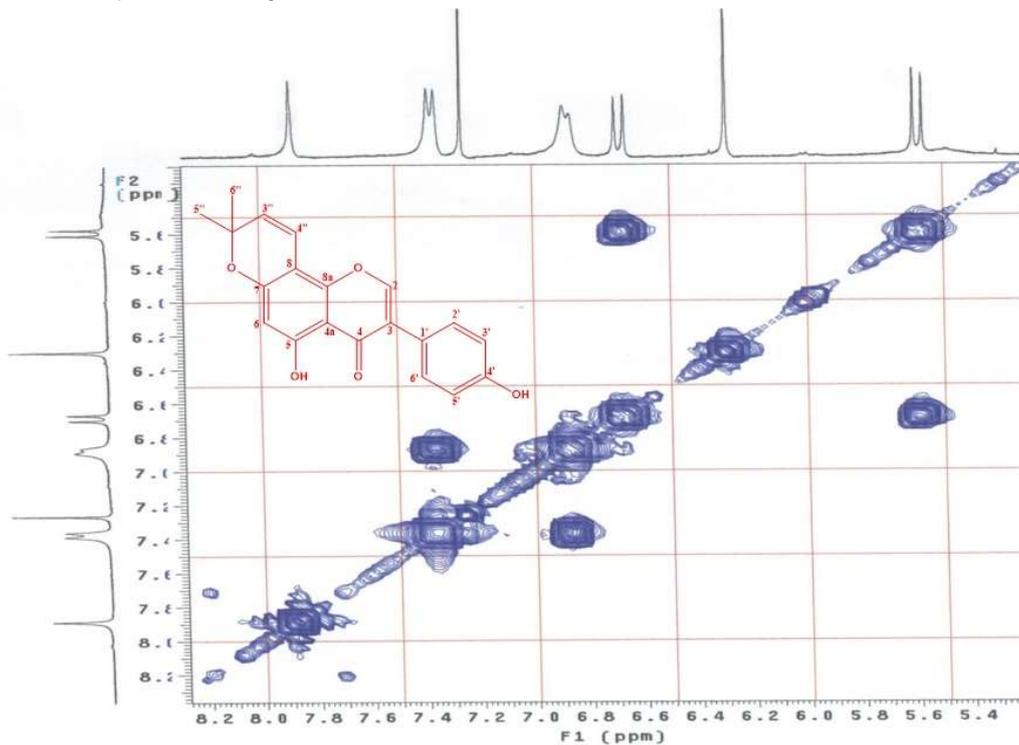


Figura 88 - Espectro de DEPT de **S6**, 75 MHz, CDCl_3 .

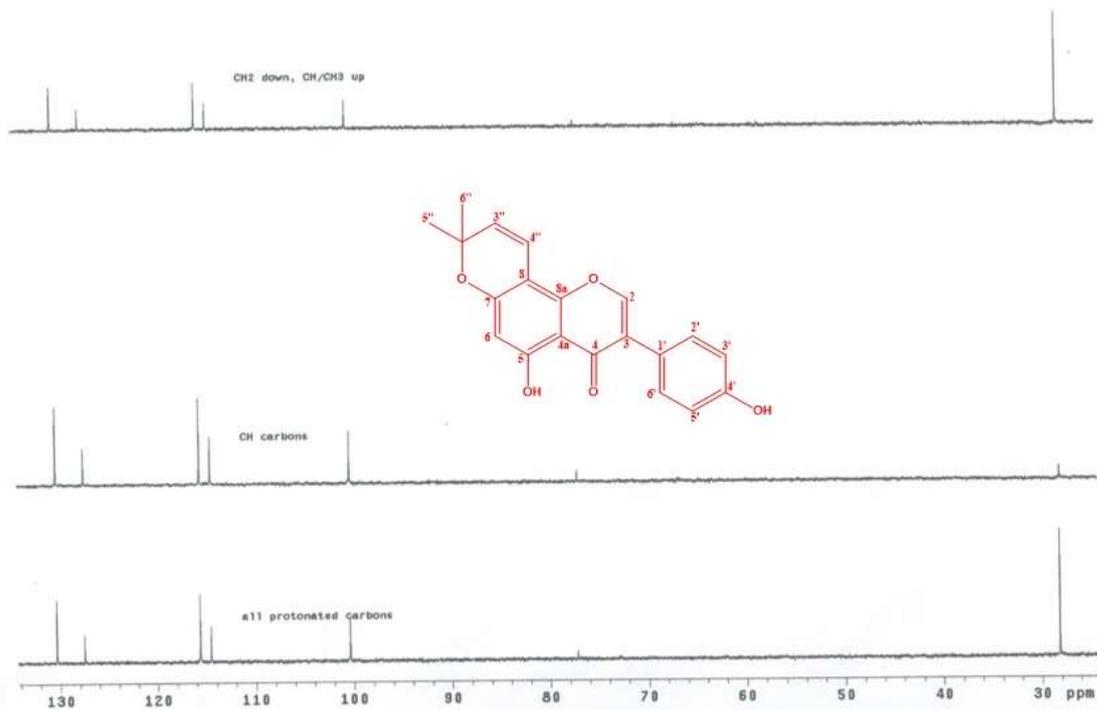


Figura 89 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (0,6-2,6 ppm) x (40,0-182,0 ppm).

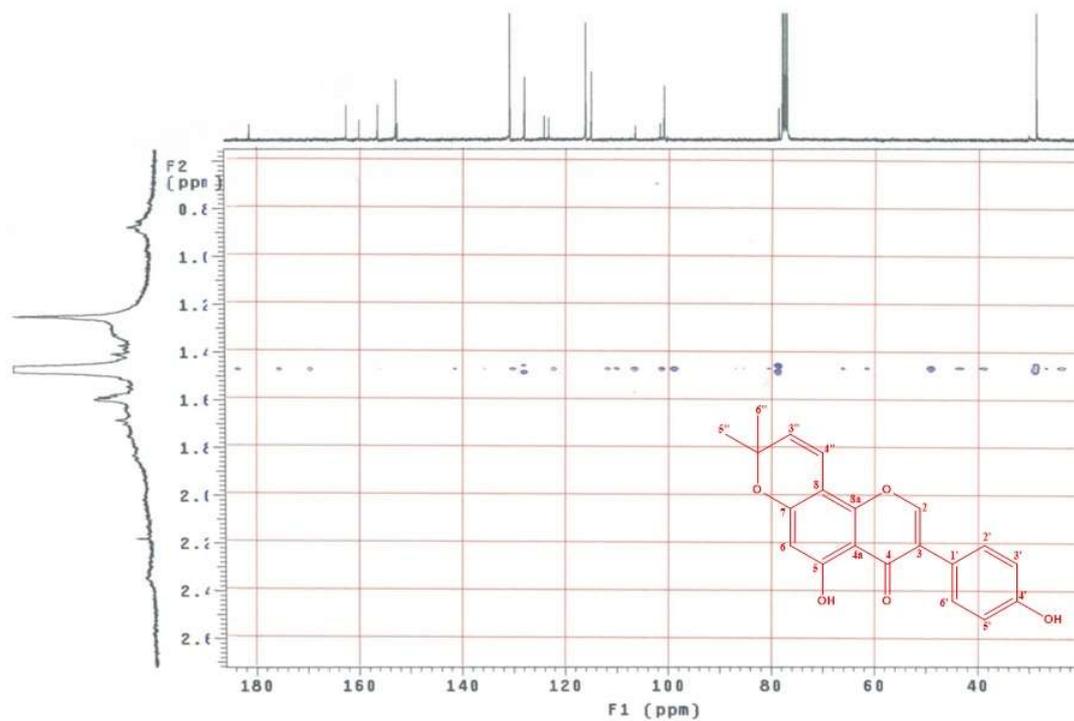


Figura 90 - Expansão 3 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,4-8,5 ppm) x (120,0-185,0 ppm).

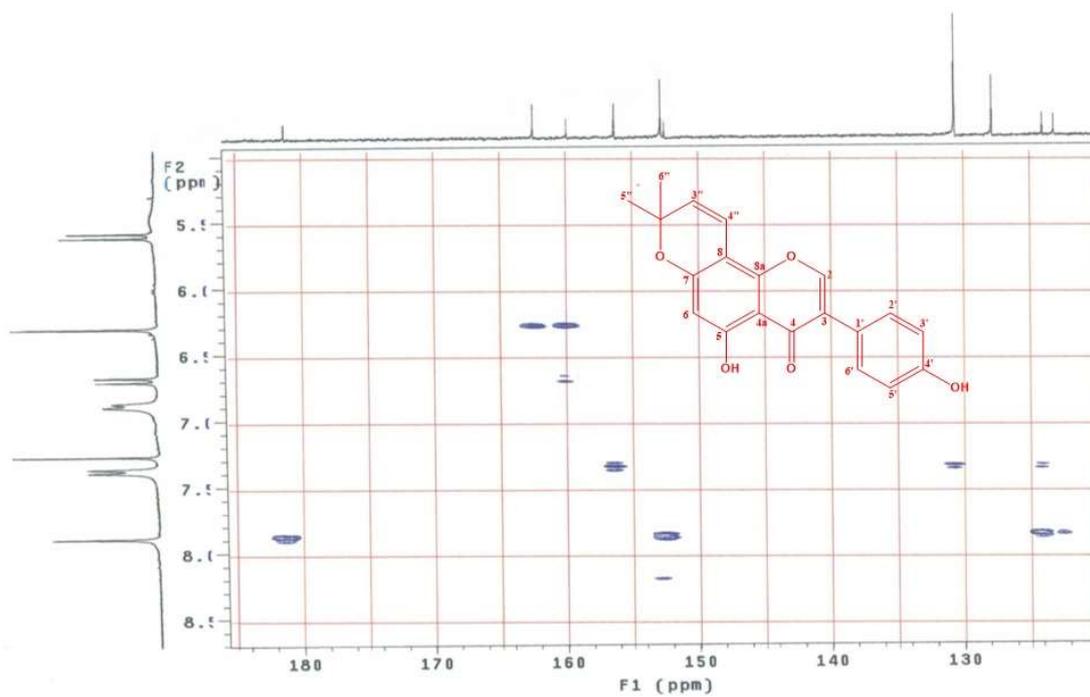
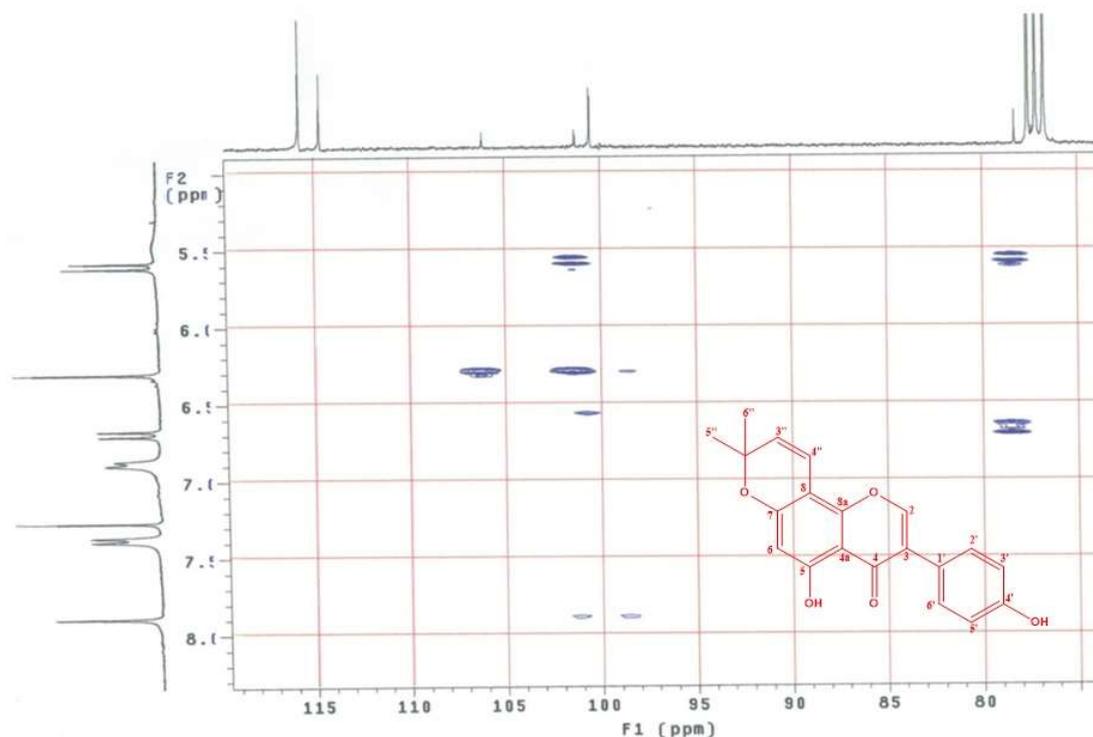


Figura 91 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S6**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,4-8,0 ppm) x (75,0-120,0 ppm).



5.2.7 Elucidação estrutural de **S7**

A substância **S7** foi isolada como um sólido amorfo verde da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de espectros de HRESITOF-MS, RMN 1D e 2D, e por comparação com dados da literatura (TSUKAYAMA; KAWAMURA; TAHARA, 1992).

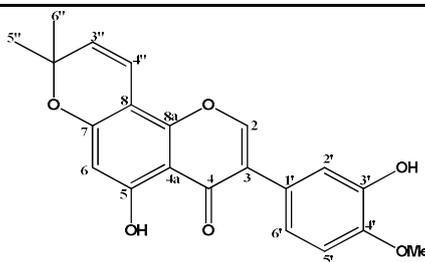
O espectro no UV (Fig. 92) de **S7** apresentou os máximos de absorção em 237, 269 e 337 nm. O Espectro de massas de alta resolução (HRESITOF-MS) (Fig. 93) mostrou o pico do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 367,11901 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$. Esta substância apresentou sinais típicos de isoflavonas (BANDEIRA et al., 2011), em δ_{H} 7,87 (H-2), δ_{C} 152,5 (C-2), 123,7 (C-3) e 180,8 (C-4). Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (Fig. 94) para **S7** sinais na reg

ião aromática em δ_{H} 6,91 (1H, *d*, J 8,1 Hz), 7,03 (1H, *dl*, J 8,1 Hz) e 7,06 (1H, *sl*), indicando um sistema de *spin* 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX no anel B, e estes dados são semelhantes aos de RMN ^1H das substâncias **S10**, **S11** e **S12**. Adicionalmente, observou-se um singlete em δ_{H} 6,28 (H-6) correspondente a um único hidrogênio aromático de um anel aromático A penta substituído, semelhante aos dados apresentados para a derrona (**S6**). Os sinais observados em δ_{H} 5,58 e 6,67 (1H cada, *d*, J 9,9 Hz) e 1,47 (6H, *s*) revelou a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno ligado a um anel aromático, enquanto que os singletos a δ_{H} 12,95 e

3,91 indicaram a presença de uma hidroxila quelada ao grupo carbonila e um grupo OMe ligado a um anel aromático, respectivamente. Todos os acoplamentos foram confirmados através de análise do espectro COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (Fig. 95).

Os dados de RMN ^{13}C (Fig. 96), auxiliados com os experimentos de HETCOR (Fig. 97) e HMBC (Figs. 98 e 99) permitiu atribuir os deslocamentos dos carbonos de **S7**, onde estão mostrados na Tabela 14. O anel 2,2-dimetilcromeno ligado ao anel A em C-7 e C-8 foi deduzida pelas correlações a $^3J_{\text{C,H}}$ dos sinais de H-2 (δ_{H} 7,87) e H-4'' (δ_{H} 6,67) com o sinal de C-8a (δ_{C} 152,1) observados no espectro de HMBC (Fig. 98, Tabela 14), bem como, as correlações a $^2J_{\text{C,H}}$ entre os sinais de H-6 (δ_{H} 6,28) e C-5-OH (δ_{H} 12,95) com o de C-5 (δ_{C} 162,2). A localização dos grupos hidroxila e metoxila em C-3' e C-4' do anel B, respectivamente, foi deduzida pelas correlações a $^3J_{\text{C,H}}$ de H-6' (δ_{H} 7,03) e OMe-4' (δ_{H} 3,91) com o carbono oxidado em C-4' (δ_{C} 146,8), sendo esta localização também foi confirmada pelo efeito NOE observado no espectro de NOE-diff (Fig. 100), que revelou interações espaciais entre H-5' (δ_{H} 6,91) e OMe-4' (δ_{H} 3,91). A partir dos dados discutidos acima, podemos concluir que a substância **S7** é a 5,3'-diidroxil-4'-metoxi-2'',2''-dimetilpirano(5'',6'':8,7)-isoflavona, aqui, isolado pela primeira vez a partir de uma fonte natural, embora já tenha sido obtido por síntese (TSUKAYAMA; KAWAMURA; TAHARA, 1992). Também se ressalta que os dados espectroscópicos completos estão sendo registrados pela primeira vez neste trabalho.

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e principais correlações observadas no espectro de HMBC para **S7** (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).



Posição	δ_{H} , J Hz	* δ_{H}	δ_{C}	$^b\text{HMBC } ^{2,3}J_{\text{C,H}}$
2	7,87 (s)	7,70 (s)	152,5	
3			123,7 ^a	H-2, H-2', H-6'
4			180,8	H-2
4a			106,0	H-6, 5-OH
5			162,2	H-6, 5-OH
6	6,28 (s)	6,15 (s)	100,3	5-OH
7			159,5	H-6, H-4''
8			101,1	H-6, H-3'', H-4''
8a			152,1	H-2, H-4''
1'			123,5 ^a	H-2, H-2', H-5', H-6'
2'	7,06 (sl)	6,8-6,95	115,0	H-6'

3'			145,6	H-2', H-5'
4'			146,8	H-2', H-5', H-6', OMe
5'	6,91 (d, J 8,1)	6,8-6,95	110,7	
6'	7,03 (dl, J 8,1)	6,8-6,95	120,9	H-2'
2''			78,0	H-3'', H-4'', 2Me-2''
3''	5,58 (d, J 9,9)	5,61(d)	127,4	2Me-2''
4''	6,67 (d, J 9,9)	6,5 (d)	114,5	
2Me-	1,47 (s)	1,41 (s)	28,2	
5''/6''				
4'-OMe	3,91 (s)	3,79 (s)	56,0	
5-OH	12,95 (s)	12,9 (s)		

Legenda: *Tsukayama; Kawamura; Tahara, (1992). ^a os valores podem ser trocados. ^b Correlações no espectro de HMBC ¹H -¹³C são de hidrogênios indicados para os carbono especificado(s).

Figura 92 - Espectro de UV de **S7**, λ_{max}/nm (H₂O:ACN).

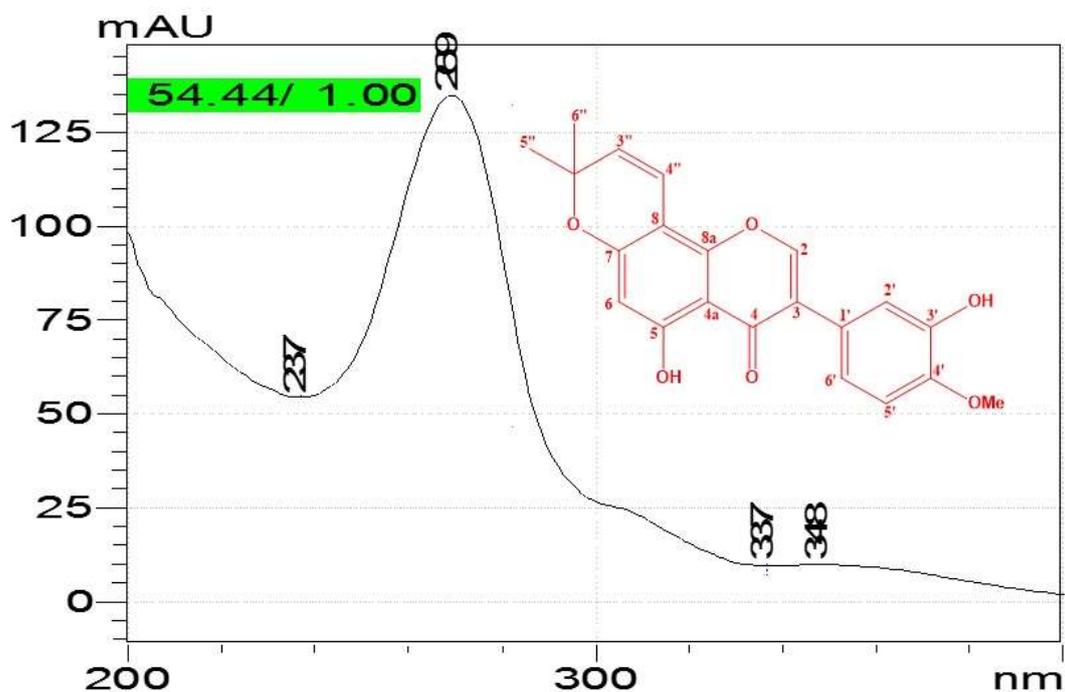


Figura 93 - Espectro de HRESITOF-MS de **S7**.

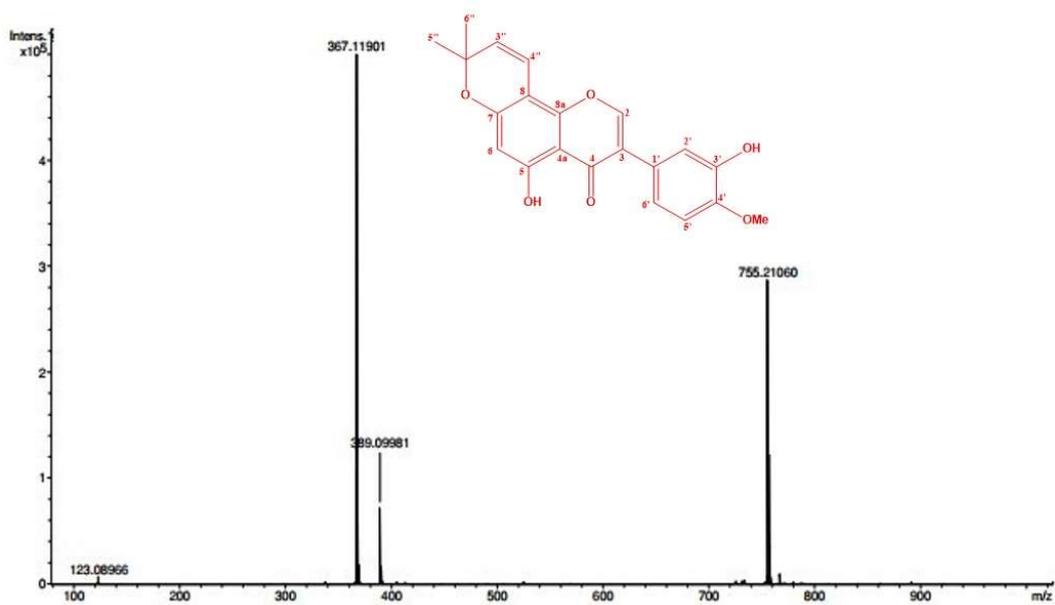


Figura 94 - Espectro de RMN ^1H de **S7**, 300 MHz, CDCl_3 .

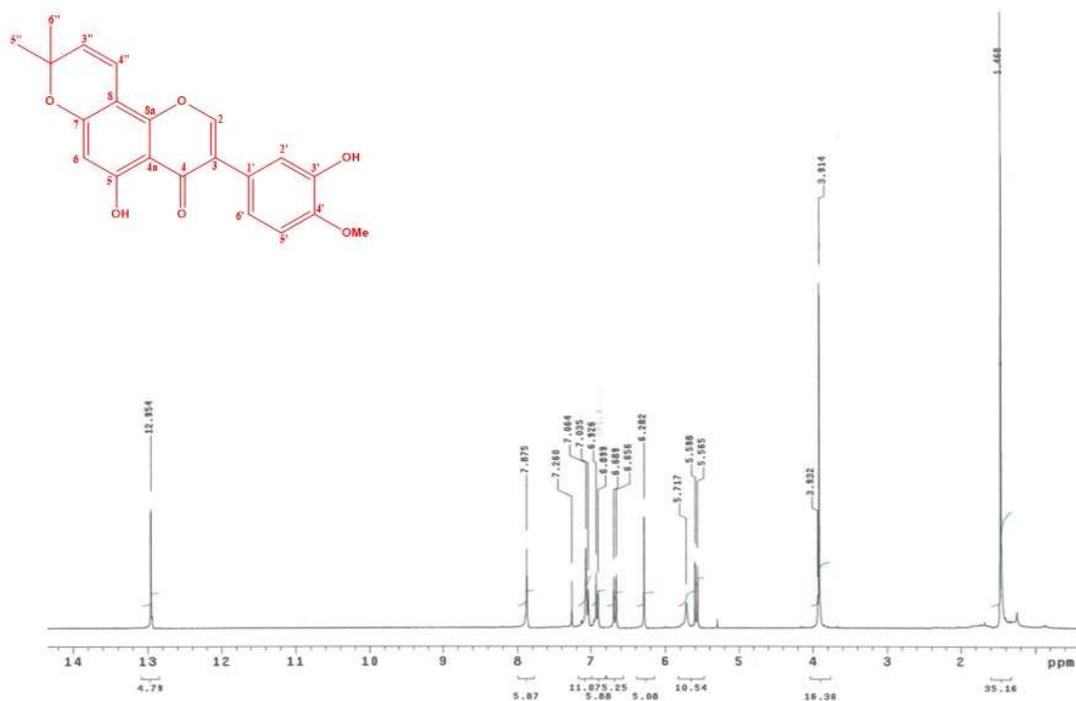


Figura 95 - Mapa de correlação homonuclear COSY - ^1H x ^1H de **S7**, 300 MHz, CDCl_3 .

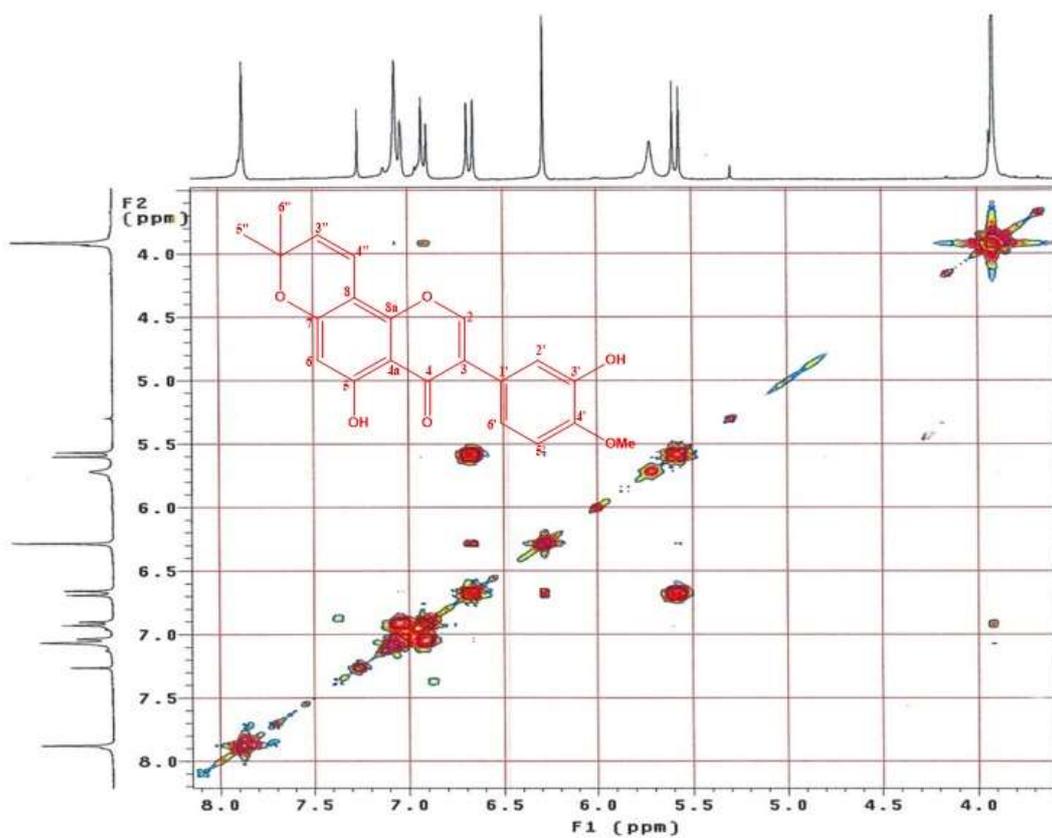


Figura 96 - Espectro de RMN ^{13}C de **S7**, 75 MHz, CDCl_3 .

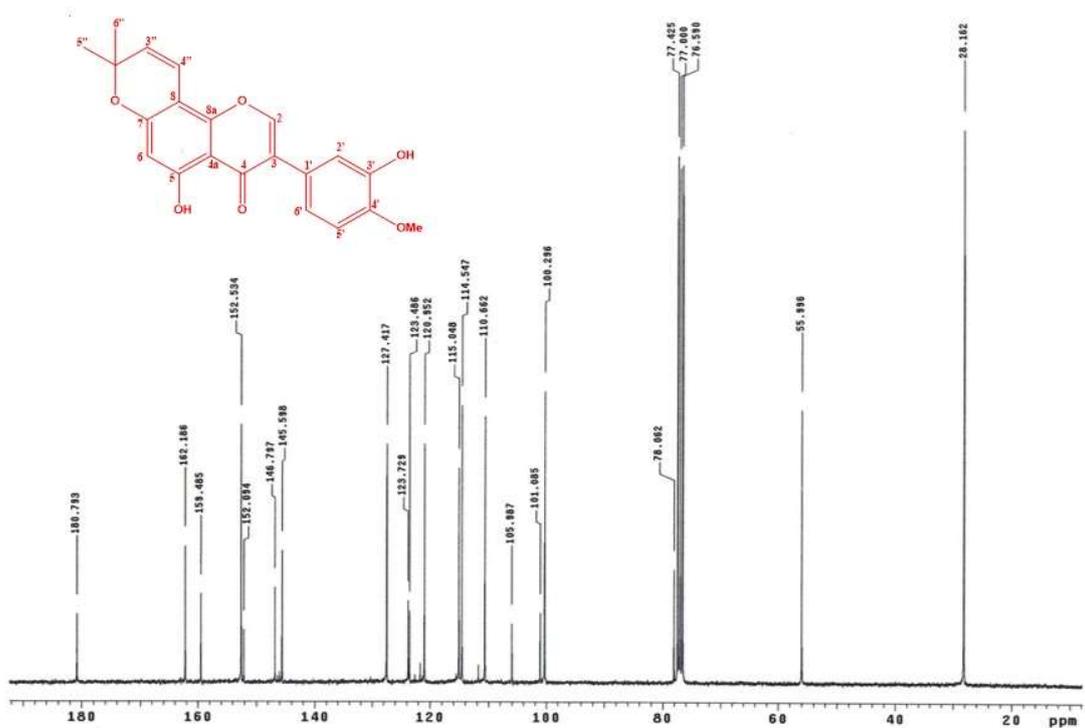


Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S7**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 .

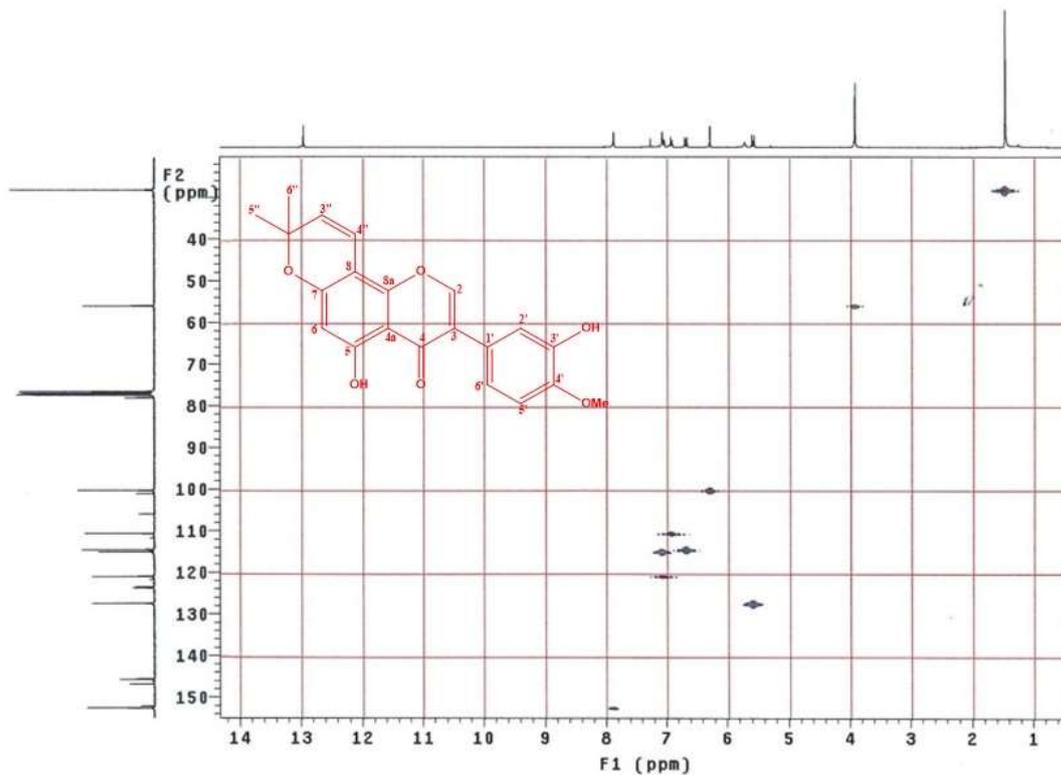


Figura 98 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S7**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,0-14,0 ppm) x (50,0-190,0 ppm).

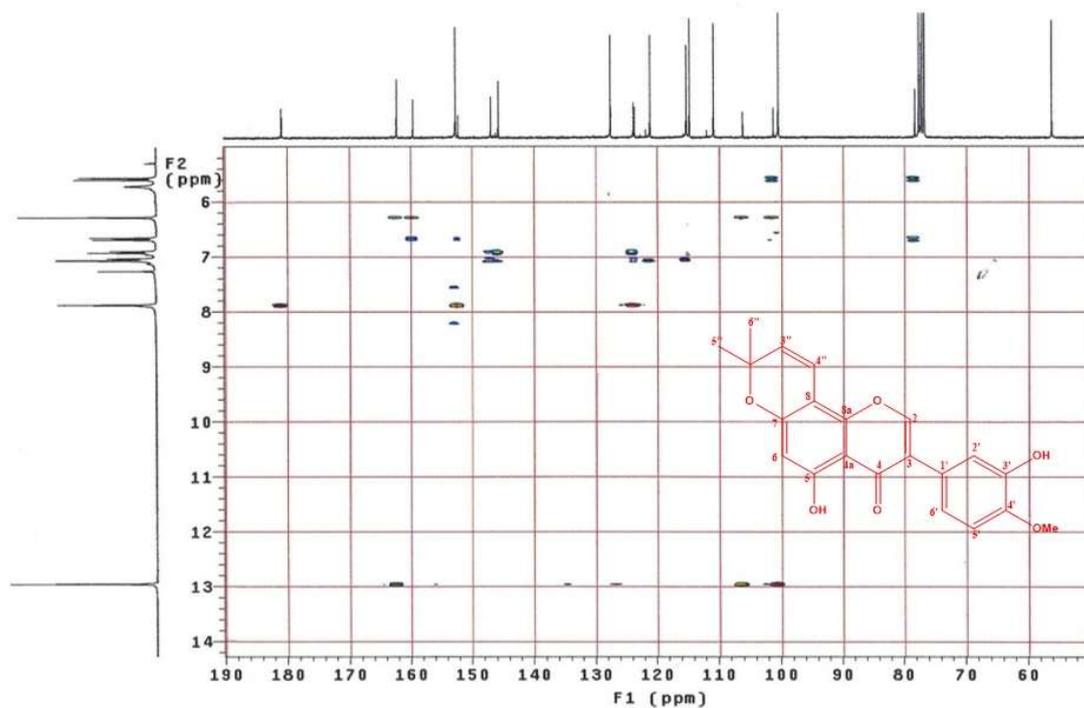


Figura 99 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S7**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (1,0-5,0 ppm) x (20,0-180,0 ppm).

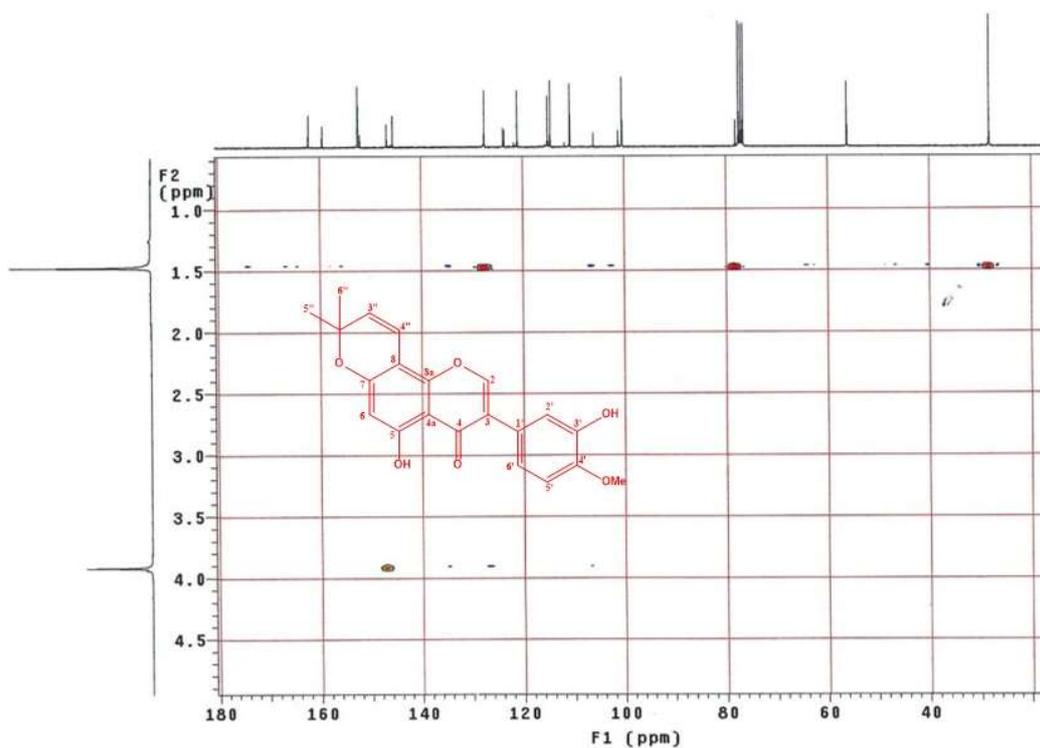
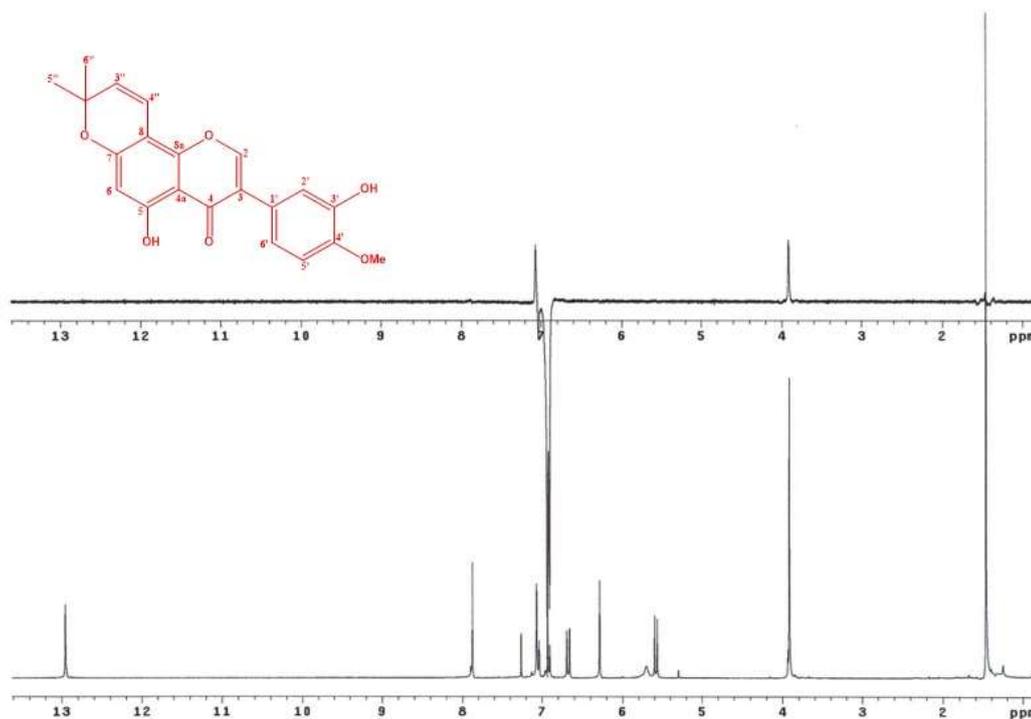


Figura 100 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar o dupletto δ_{H} 6,91 referente ao H-5' de **S7**, 300 MHz, CDCl_3 .



5.2.8 Elucidação estrutural de **S8**

A substância **S8**, apresentou-se como um sólido amorfo amarelo, a qual foi isolada da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *V. guianensis*, e teve sua estrutura identificada com base nos espectros de HRESITOF-MS, RMN 1D e 2D, na origem biossintética dos flavonoides (DEWICK, 2009) e por comparação com dados da literatura de substâncias similares.

O espectro no UV (Fig. 102) de **S8** apresentou os máximos de absorção em 239, 265 e 300 nm. O Espectro de massas de alta resolução (HRESITOF-MS) (Fig. 103) mostrou o pico do íon molecular $[M+1]^+$ em m/z 367,11723 correspondentes à fórmula molecular $C_{21}H_{18}O_6$. O sinal observado no espectro de RMN de 1H (Fig. 104) em δ_H 7,90 e no espectro de ^{13}C (Fig. 105) em δ_C 152,8 são característicos do esqueleto estrutural das isoflavanas já discutidas neste trabalho.

Adicionalmente, o espectro de RMN de 1H (Fig. 104) exibiu sinais em δ_H 6,86 (*d*, *J* 7,8 Hz, H-5'), 6,94 (*dd*, *J* 7,8 e 1,5 Hz, H-6') e 7,03 (*d*, *J* 1,5 Hz, H-2'), evidenciando a presença de um sistema 1',3',4'-trissubstituído do tipo ABX, relacionado ao anel B, bem como um singlete em δ_H 6,29 (1H), caracterizando o padrão de penta substituição do anel A. Observou-se ainda neste espectro, um sinal singlete referente ao grupo metilenodioxílico em δ_H 5,99 (2H), o qual, com auxílio do espectro HETCOR (Fig. 106), foi possível atribuir o sinal em δ_C 101,2, para o carbono deste grupo.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 105) de **S8** mostrou 21 linhas espectrais. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C , HETCOR e HMBC, permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: seis carbonos metínicos, dois metílicos, dois metilênicos e onze carbonos não-hidrogenados, sendo o sinal em δ_C 181,0, correspondente a uma carbonila quelada, a qual foi confirmada no espectro de RMN 1H por apresentar sinal em δ_H 12,81 referente à grupo hidroxila formando ligação de hidrogênio com a carbonila. Enquanto que os deslocamentos químicos em δ_C 160,8; 160,4; 154,9; 152,8; 147,8 e 147,7 foram compatíveis com átomos de carbonos aromáticos oxigenados. O espectro de HETCOR (Fig. 106), possibilitou atribuir os deslocamentos dos hidrogênios em δ_H 7,90 (H-2), 7,03 (H-2'), 6,94 (H-6'), 6,86 (H-5') e 6,29 (H-6) aos carbonos em δ_C 152,8 (C-2), 109,6 (C-2'), 122,4 (C-6'), 108,4 (C-5') e 99,6 (C-6), respectivamente.

No espectro de RMN de 1H observou-se ainda, sinais característicos de um grupo C-prenila [δ_H 3,46 (*d*, *J* 6,9 Hz, H-1''), 5,22 (*tl*, *J* 6,9 Hz, H-2''), 1,74 (*s*, Me_{trans}) e 1,82 (*s*, Me_{cis})]. Todos os acoplamentos foram confirmados através de análise do espectro COSY 1H - 1H (Fig.107).

O posicionamento da unidade isoprênica foi confirmada na posição C-8, com base nas correlações $^3J_{C,H}$ no experimento de HMBC (expansão 1, Fig. 108) do sinal em δ_H 7,91 (H-2) e 3,46 (H-1'') com o sinal em δ_C 155,0 (C-8a). Por outro lado, as correlações $^2,^3J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC do sinal em δ_H 7,02 (H-2') e 6,86 (H-5') com o sinal em δ_C 147,8 e 147,7 (C-3'/C-4') confirmando assim a posição do grupo metilenodioxílico entre C-3' e C-4'. Os demais assinalamentos dos carbonos

e hidrogênios de **S8** foram realizados com base nas análises dos espectros de HMBC (Figs. 109 e 110). Todas as correlações são mostradas na Figura 101.

A reunião de todas estas informações espectrais, permitiu elucidar de forma inequívoca a estrutura de **S8** como sendo a 5,7-diidroxi-3',4'-metilenodioxil-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona. Esta substância é um novo produto natural, no entanto já foi relatada como produto de síntese por Hastings; Hadden; Blagg, (2008). Porém, destaca-se que os dados espectrométricos de **S8** estão sendo relatados pela primeira vez neste trabalho. Estes mesmos pesquisadores ainda registraram uma significativa atividade para **S8** contra linhagens de células cancerosas de mama (MCF-7) e cólon (HCT-116). A Tabela 15 mostra os dados espectrométricos importantes na determinação estrutural de **S8**.

Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e principais correlações observadas no espectro de HMBC para **S8** (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

Posição	δ_{H} , J Hz	δ_{C}	$^{\text{b}}\text{HMBC } ^2J_{\text{C,H}}$	$^{\text{b}}\text{HMBC } ^3J_{\text{C,H}}$
2	7,90 (s)	152,8	C-3	C-4, C-8a, C-1'
3		124,3		
4		181,0		
4a		105,4		
5		160,4		
6	6,29 (s)	99,6	C-5	C-4a
7		160,8		
8		106,0		
8a		154,9		
1'		123,3		
2'	7,03 (d, J 1,5 Hz)	109,6	C-3'	C-3', C-6'
3'		147,8 ^a		
4'		147,7 ^a		
5'	6,86 (d, J 7,8 Hz)	108,4	C-4'	C-3', C-1'
6'	6,94 (dd, J 1,5 e 7,8 Hz)	122,4		C-4', C-2'
1''	3,46 (d, J 6,9 Hz)	21,5	C-2'', C-8	C-7, C-8 ^a , C-3''
2''	5,22 (tl, J 6,9 Hz)	121,1		
3''v		134,7		
4'' (Me _{cis})	1,82 (s)	17,8	C-3''	C-2''
5'' (Me _{trans})	1,74 (s)	25,8	C-3''	C-2''
-OCH ₂ O-	5,99 (s)	101,2		
OH-quelada	12,80			

Legenda: ^a valores podem estar trocados, ^b Correlações no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C são de hidrogênio especificado (s) para os carbonos indicados.

Figura 101 - Correlações $^{2,3}J_{C,H}$ observadas no espectro de HMBC de **S8**.

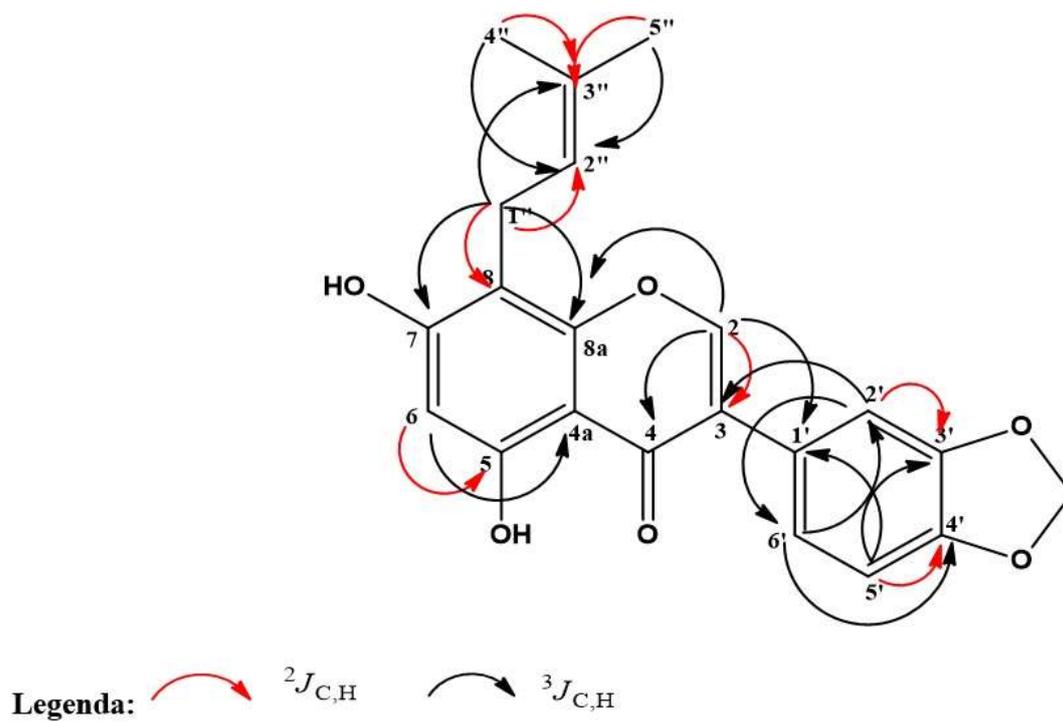


Figura 102 - Espectro de UV de **S8**, λ_{max}/nm (H₂O:ACN).

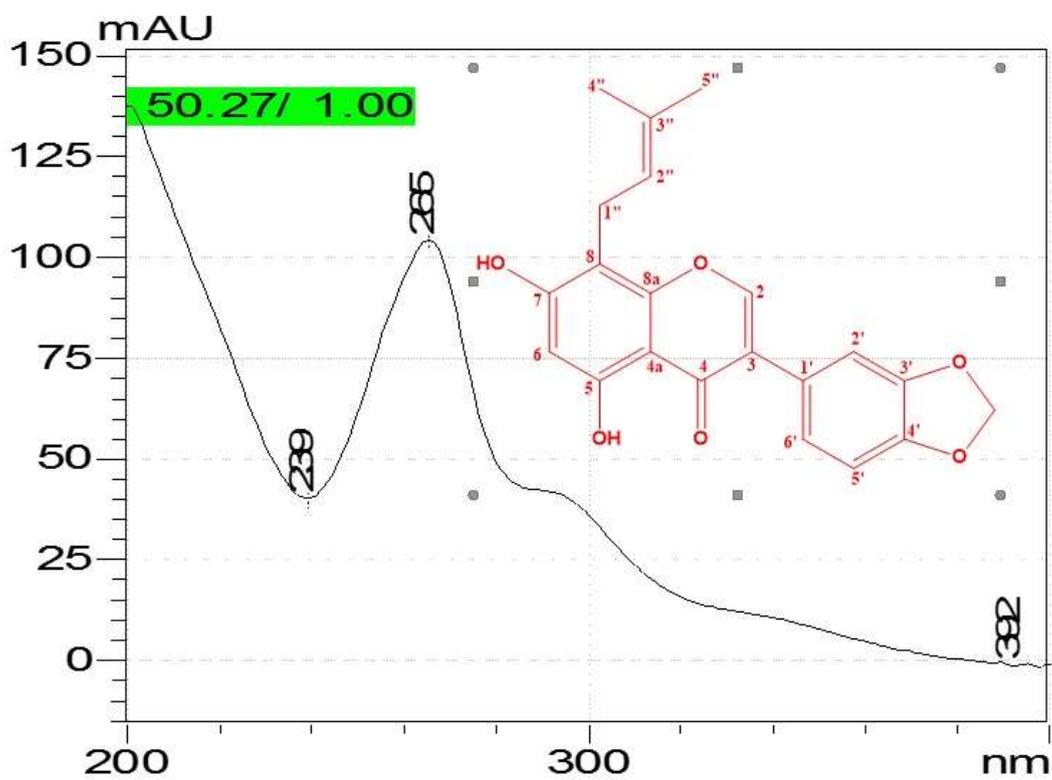


Figura 103 - Espectro de HRESITOF-MS de **S8**.

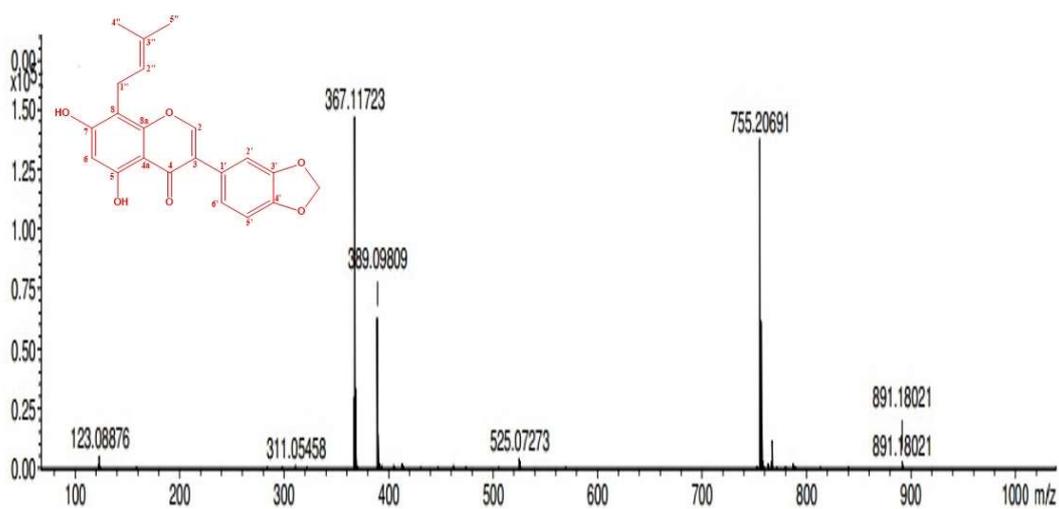


Figura 104 - Espectro de RMN ¹H de **S8**, 300 MHz, CDCl₃.

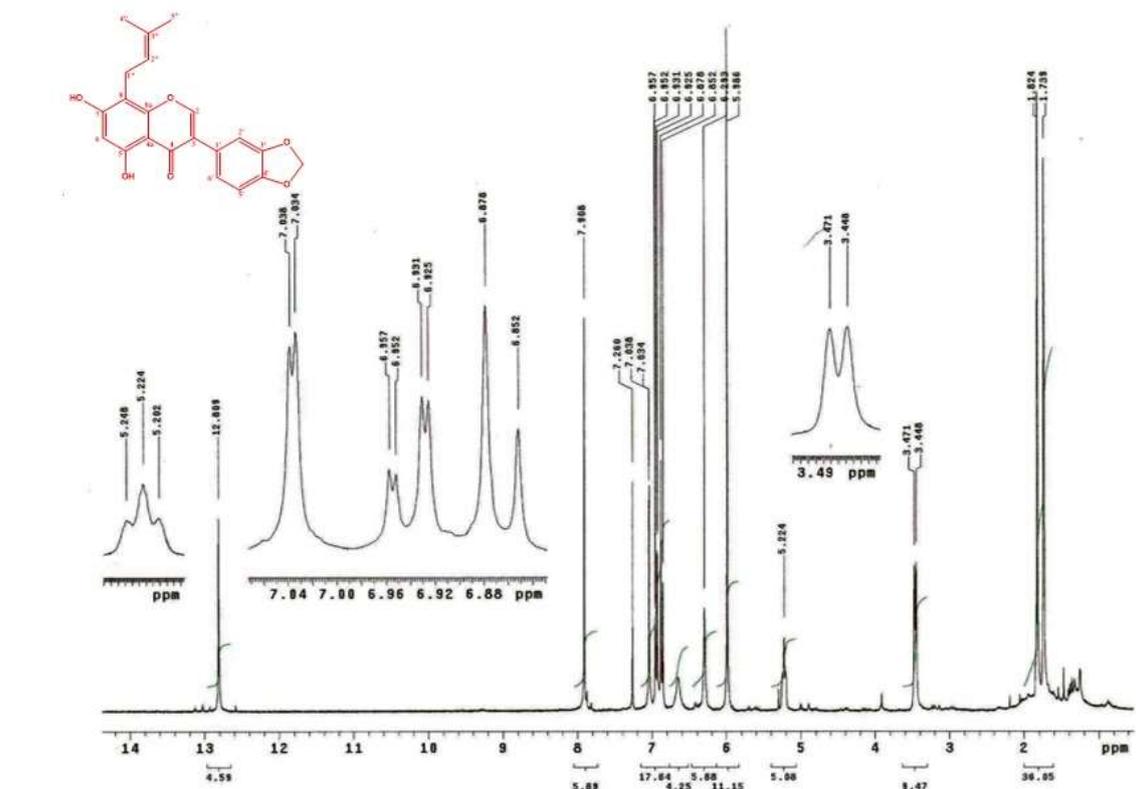


Figura 105 - Espectro de RMN ^{13}C de **S8**, 75 MHz, CDCl_3 .

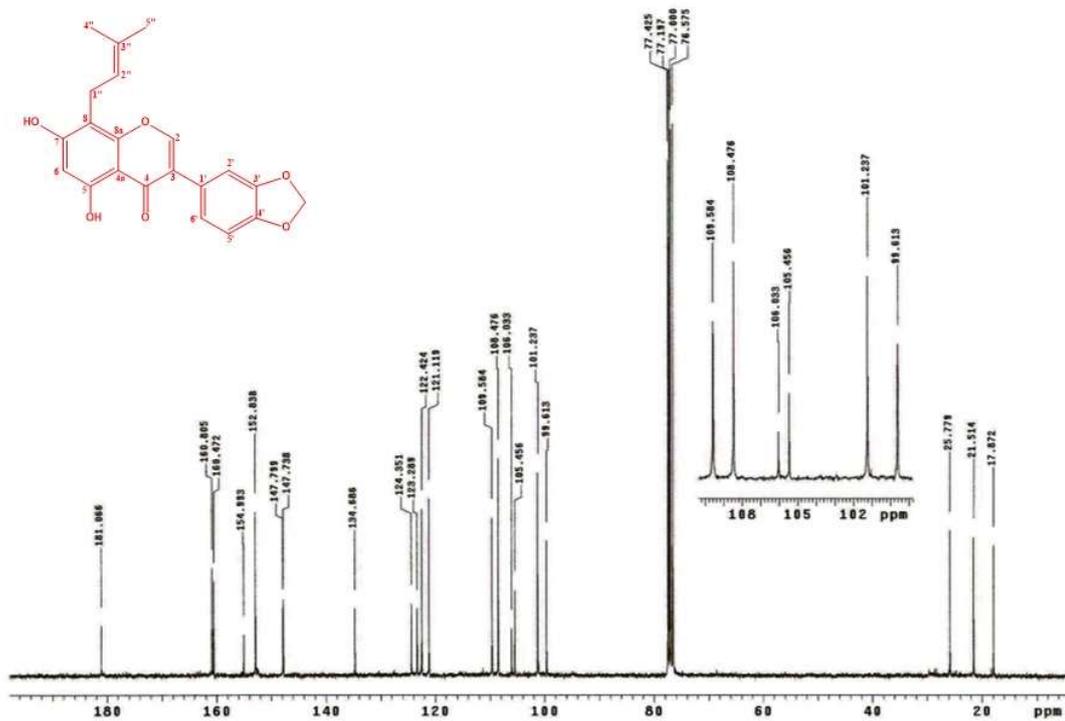


Figura 106 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S8**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 .

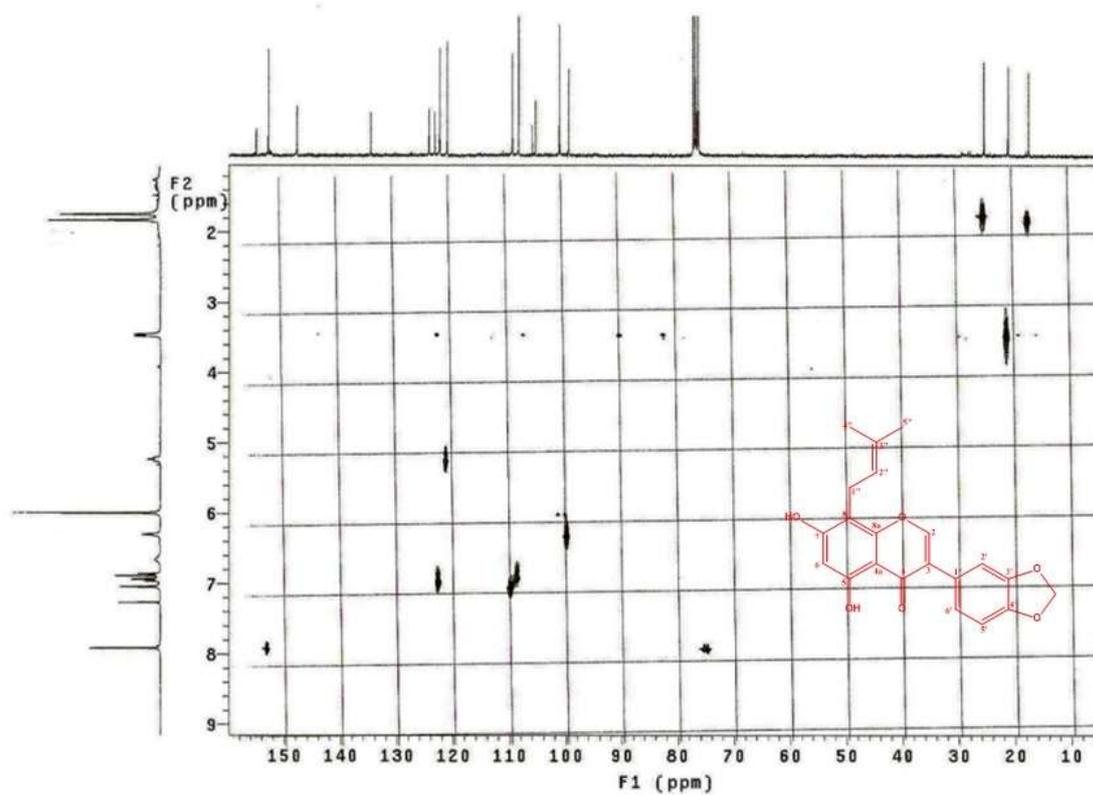


Figura 107 - Mapa de correlação homonuclear COSY - ^1H x ^1H de **S8**, 300 MHz, CDCl_3 .

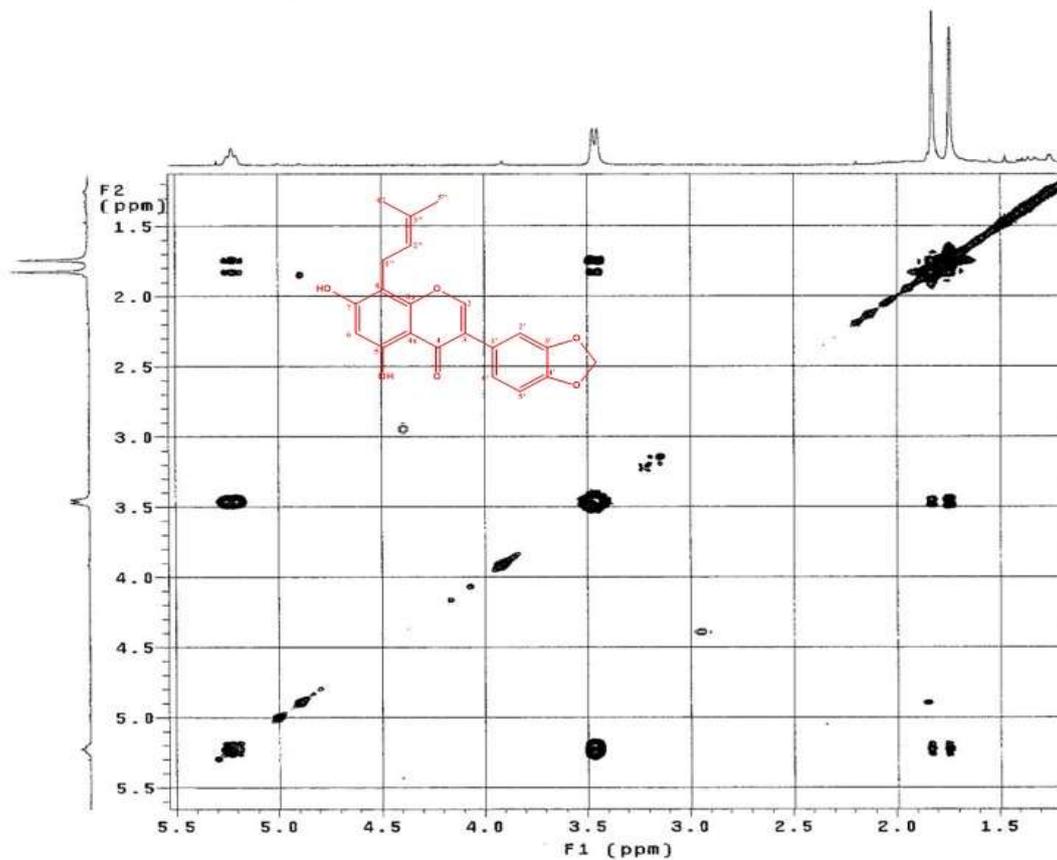


Figura 108 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S8**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (3,2-8,5 ppm) x (142,0-185,0 ppm).

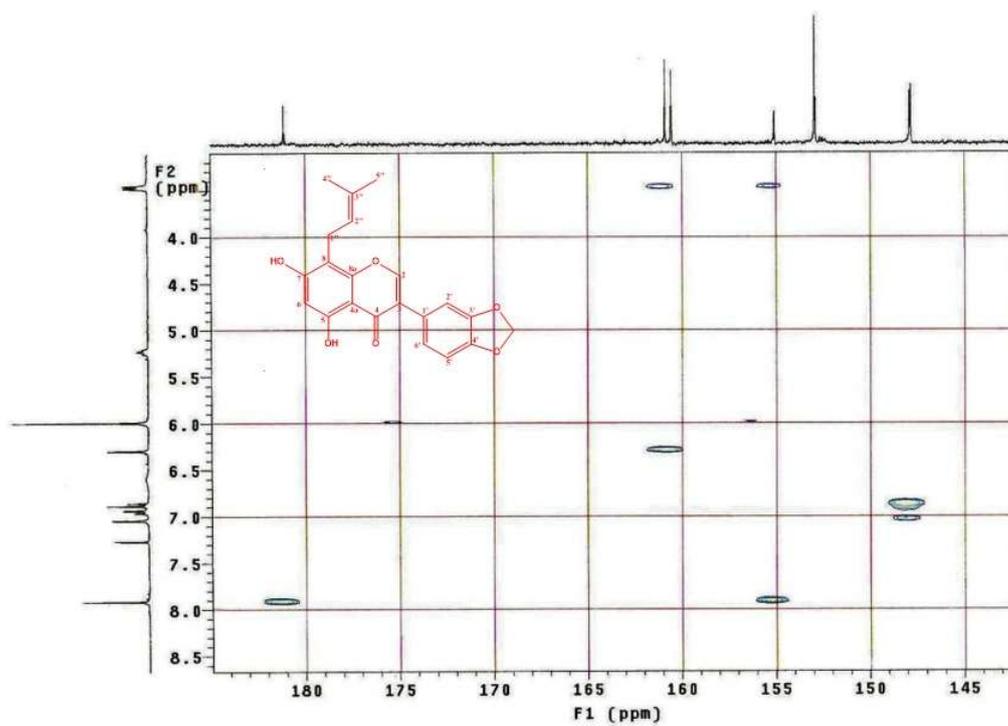


Figura 109 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S8**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (1,1-4,1 ppm) x (98,0-185,0 ppm).

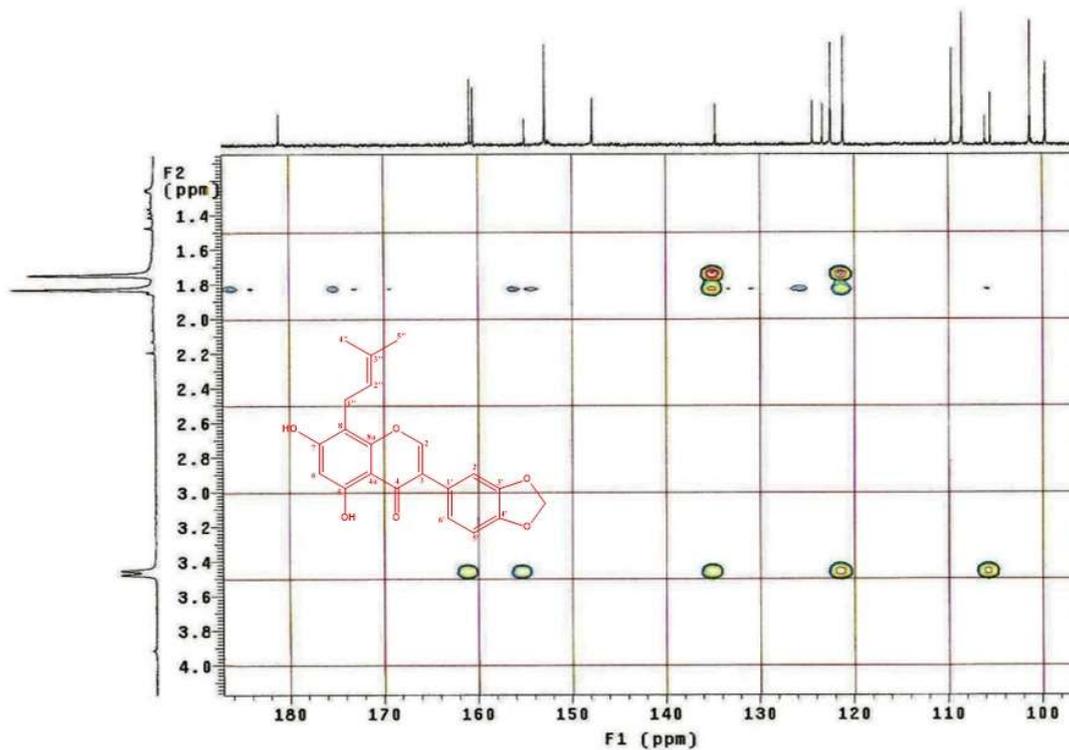
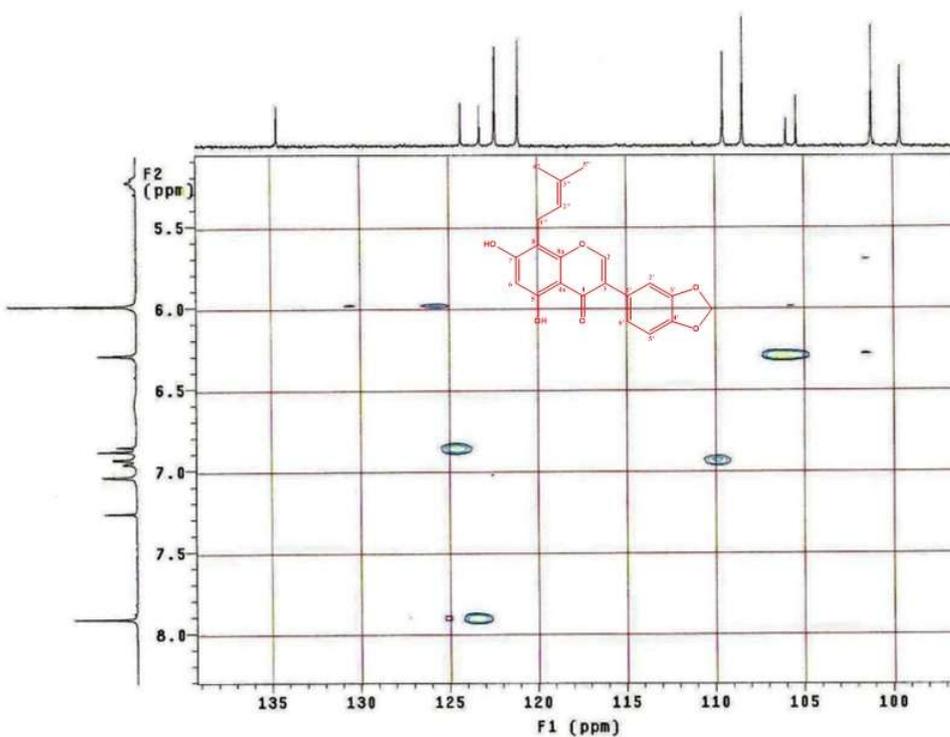


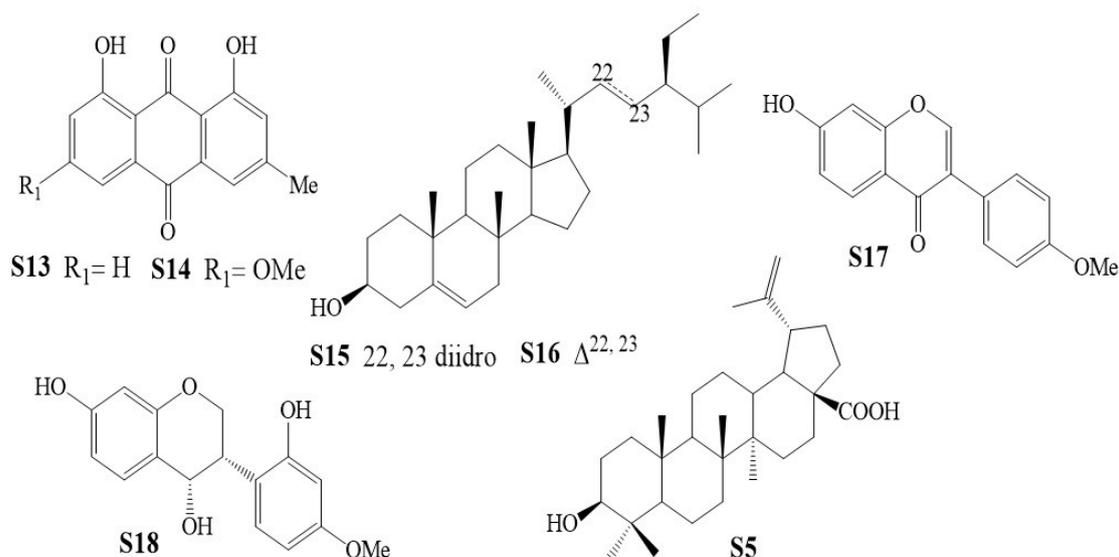
Figura 110 - Expansão 3 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S8**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 , na região de (5,1-8,3 ppm) x (98,0-139,0 ppm).



5.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do alburno de *V. guianensis*

O estudo fitoquímico do alburno de *V. guianensis* resultou no isolamento e identificação estrutural de substâncias pertencentes às classes das antraquinonas (**S13** e **S14**), fitoesteróis em mistura (**S15** e **S16**), isoflavonoides (**S17** e **S18**), além de triterpeno pentacíclico (**S5**) (Fig. 111), cujas estruturas foram determinadas com base na análise dos dados espectrais de RMN 1D e 2D, além de comparação com dados disponíveis na literatura.

Figura 111 - Estruturas das substâncias isoladas do alburno de *V. guianensis*.



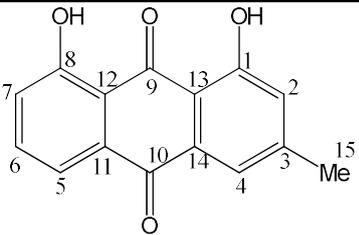
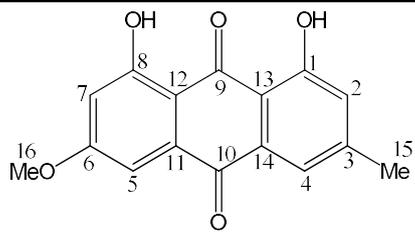
5.3.1 Elucidação estrutural de **S13** e **S14**

Os espectros de RMN ¹H das substâncias **S13** (Fig. 112) e **S14** (Fig. 114) apresentaram bastante similaridade, exibindo sinais típicos de antraquinonas contendo grupo Me ligado a anel aromático (MOREIRA et al., 2006), como os singletos referentes ao grupo Me aromático em δ_H 2,47 (**S13**) e 2,45 (**S14**), singletos relativos a duas hidroxilas queladas a grupo carbonila em δ_H 12,03 e 12,14 (**S13**) e 12,13 e 12,32 (**S14**), além dos sinais de hidrogênios aromáticos, que para a substância **S13** aparecem em δ_H 7,83 (1H, *dd*, *J* 7,8 e 1,2 Hz), 7,28 (1H, *dd*, *J* 8,7 e 1,2 Hz) e 7,68 (1H, *dd*, *J* 8,7 e 7,8 Hz), caracterizando um anel aromático 1,2,3-trissubstituído, além dos sinais multipletos em δ_H 7,65 e 7,10 (1H cada), referentes a hidrogênios com acoplamento *meta* e a longa distância com grupo Me, conforme mostrado no espectro de ¹H. Enquanto para a substância **S14**, os sinais de H aromáticos são visualizados em δ_H 7,37 e 6,69 (*d*, *J* 2,7 Hz, 1H cada), típico de anel 1,2,3,5-tetrassubstituído e em δ_H 7,63 e 7,08 (*m*, 1H cada), atribuídos a dois

hidrogênios acoplado *meta* e a longa distância com grupo Me, conforme mostrado no espectro de ^1H . Também para a substância **S14** observa-se um sinal singlete em δ_{H} 3,94 (3H), atribuído a um grupo OMe. Os dados de RMN ^{13}C para as duas carbonilas de **S13** (δ_{C} 192,5 e 182,0), (Fig. 113) e de **S14** (δ_{C} 190,7 e 182,0) (Fig. 115), são típicos de esqueleto antraquinona, onde um grupo carbonila está quelado à OH e o outro não (OTTOBELLI et al., 2011, MOREIRA et al., 2006). A comparação dos dados RMN de **S13** e **S14** com os da literatura (OTTOBELLI et al., 2011) permitiu identificar a estrutura de **S13** como sendo 1,8-diidroxi-3-metil-antraquinona (crisofanol) e de (**S14**) como 1,8-diidroxi-3-metil-6-metoxiantraquinona (fisciona).

O isolamento das substâncias **S13** e **S14**, já havia sido relatado na literatura em estudos anteriores com a espécie (PIEIDADE; WOLTER FILHO, 1988; OTTOBELLI et al., 2011). Este fato é importante, pois é sugestivo de que estas substâncias podem ser consideradas como marcadoras para a espécie *V. guianensis*. Os dados de RMN ^{13}C de **S13** e de **S14** foram comparados com os encontrados na literatura, havendo coincidência ou grande semelhança entre eles, como estão registrados na Tabela 16. Em estudos realizados por García-Sosa et al. (2007) atribui a atividade antimicrobiana do extrato metanólico da raiz *Colubrina greggii* ao crisofanol.

Tabela 16 - Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Crisofanol (**S13**) e Fisciona (**S14**) em comparação com os dados da literatura.

					
		*S13	S13	*S14	S14
C	δ_{C}				
1	162,7		162,6	161,3	162,4
2	124,4		124,3	124,0	124,5
3	149,3		149,3	149,1	148,4
4	121,4		121,3	120,4	121,3
5	119,9		119,9	109,8	108,2
6	136,9		136,9	166,1	166,5
7	124,5		124,5	107,6	106,7
8	162,5		162,3	164,4	165,1
9	192,5		192,5	191,6	190,7
10	181,9		182,0	181,2	182,0
11	133,6		133,6	133,3	135,2
12	115,9		115,8	115,8	113,6
13	113,7		113,7	113,9	110,2
14	133,3		133,2	132,8	133,1
15-	21,6		22,7	21,6	22,1
Me					

Legenda: *Ottobelli et al. (2011).

Figura 112 - Espectro de RMN ¹H de **S13**, 300 MHz, CDCl₃.

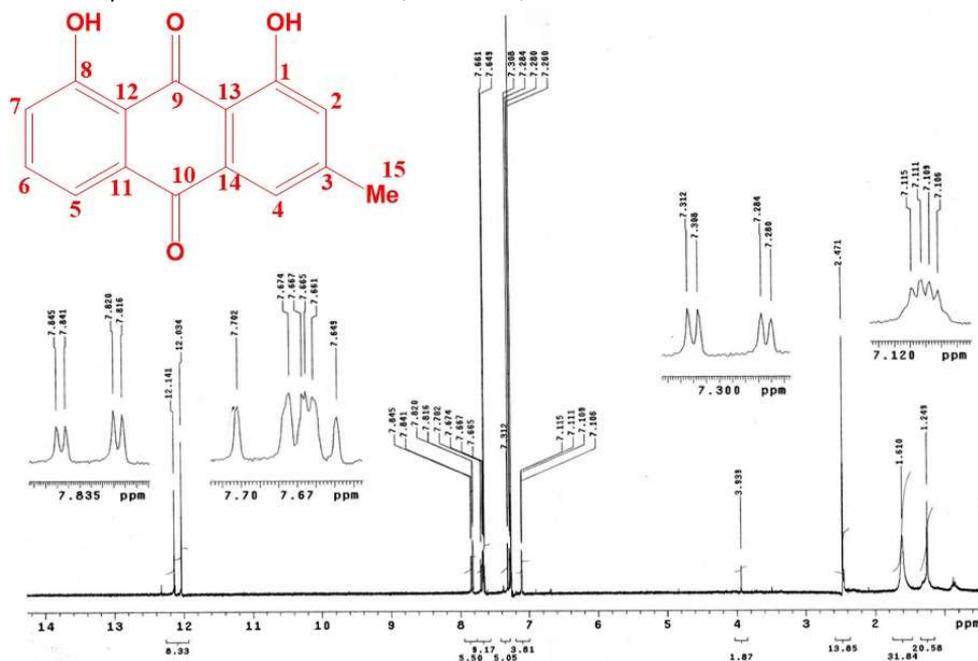


Figura 113 - Espectro de RMN ¹³C de **S13**, 75 MHz, CDCl₃.

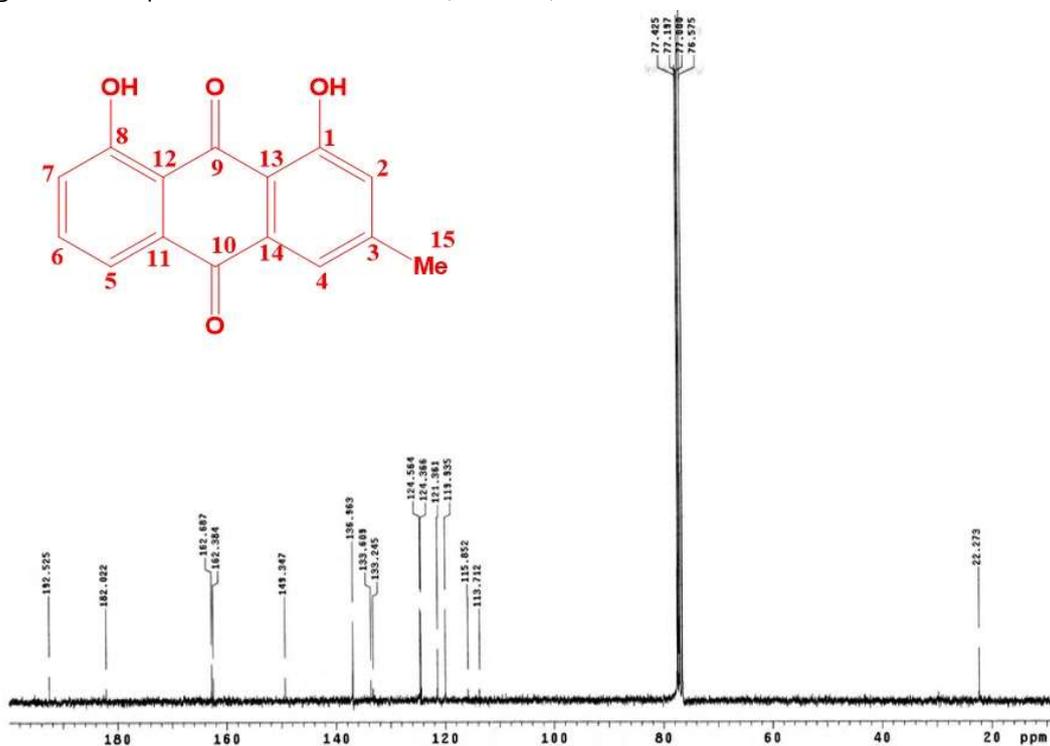


Figura 114 - Espectro de RMN ^1H de **S14**, 300 MHz, CDCl_3 .

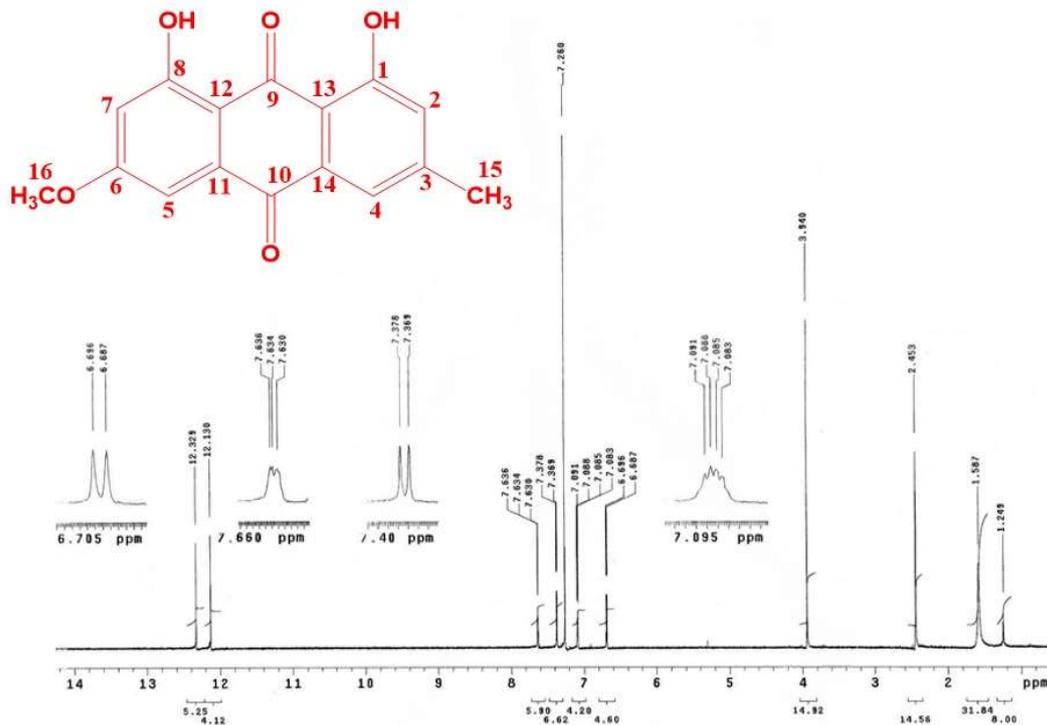
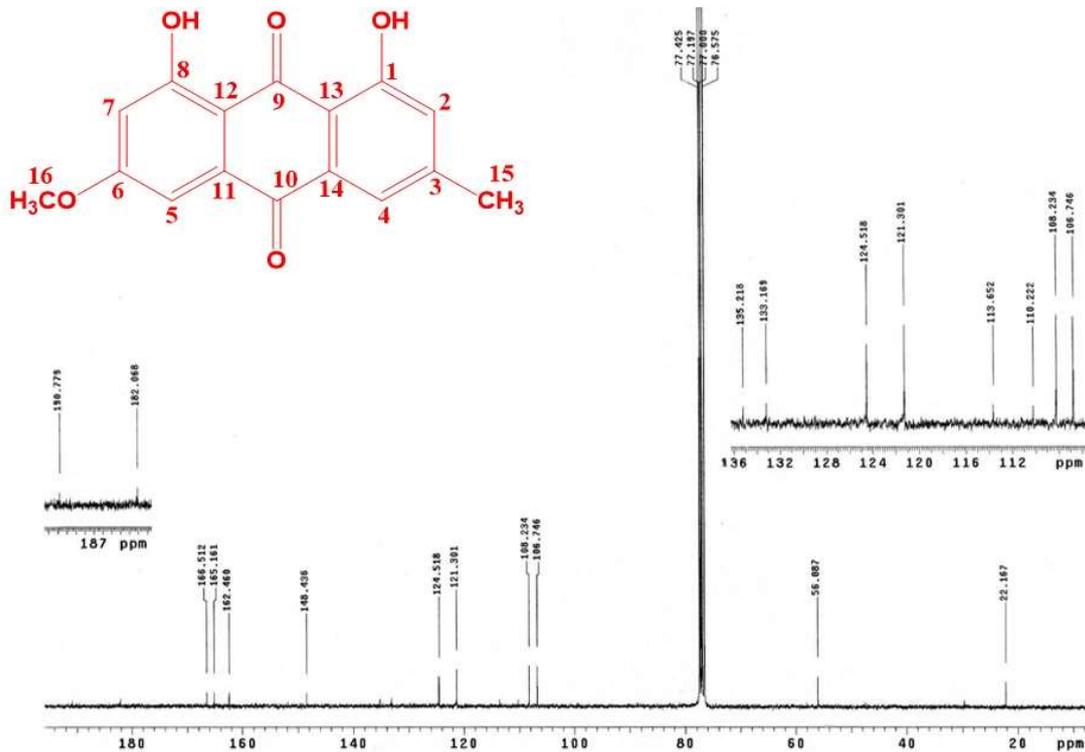


Figura 115 - Espectro de RMN ^{13}C de **S14**, 75 MHz, CDCl_3 .



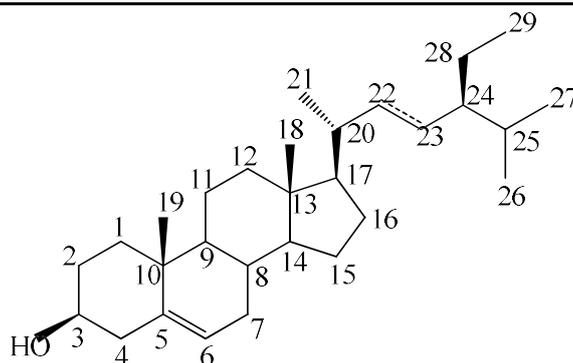
5.3.2 Elucidação estrutural da mistura **S15** e **S16**

As substâncias **S15** e **S16** foram isoladas em mistura da fase hexânica (Fração FHex-ALB-6) do alburno de *V. guianensis*. O espectro de RMN de ^1H (Figs. 116 e 117) dessa mistura apresenta sinais típicos dos esteroides sitosterol (**S15**) e estigmasterol (**S16**), como o multiplete em δ_{H} 3,51, atribuído ao hidrogênio oximetílico H-3, além de vários sinais nas regiões entre δ_{H} 0,67-1,00, atribuídos aos hidrogênios de grupos metilas, e entre δ_{H} 1,00-2,00, referentes a hidrogênios metilênicos, bem como um dubleto largo em δ_{H} 5,35 (J 4,8 Hz) relacionado ao hidrogênio olefínico H-6. Neste espectro ainda pode-se verificar a presença de sinais relativos aos hidrogênios olefínicos do estigmasterol (**S16**), em δ_{H} 5,13 (dd , J 8,4 e 15,0 Hz, H-22) e 5,01 (dd , J 8,7 e 15,0 Hz, H-23). Os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H de **S15** e **S16** coincidem com os dados registrados na literatura para o sitosterol e estigmasterol (NÉS; NORTON; BENSON, 1992; AHMED; AHMAD; MALIK, 1992).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figs. 118 e 119) da mistura de **S15** e **S16** exhibe sinais que confirmam a presença dos esteroides sitosterol e estigmasterol, como por exemplo quatro sinais na região de carbonos olefínicos em δ_{C} 140,7; 138,3; 129,2 e 121,7. Segundo dados da literatura, sinais em δ_{C} 121,7 e 140,7 são característicos de esteroides com uma dupla ligação entre C-5 e C-6, como ocorre nas estruturas do sitosterol (**S15**) e do estigmasterol (**S16**) (AHMED; AHMAD; MALIK, 1992; GOULART et al., 1993), e os sinais em δ_{C} 129,2 e 138,3 ppm são característicos de uma dupla ligação entre C-22 e C-23 como ocorre na estrutura do estigmasterol (**S16**) (GOULART et al., 1993). Os dados de RMN de ^{13}C estão descritos na Tabela 17. As multiplicidades dos carbonos foram confirmadas pelo experimento de DEPT (Figs. 120 e 121).

Os esteroides sitosterol (**S15**) e o estigmasterol (**S16**), por serem de larga ocorrência no reino vegetal, não contribuem para distinguirem o perfil químico da espécie, no entanto, está sendo relatadas pela primeira vez em *V. guianensis*, sendo que no gênero *Vatairea* já foram isolados de *V. heteroptera* (FORMIGA et al., 1975).

Tabela 17 - Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do sitosterol (**S15**) e do estigmasterol (**S16**) comparados com os dados da literatura.



S15 22, 23 dihidro **S16** $\Delta^{22,23}$

C	S15*	S15	δ_c	S16*	S16
1	37,2	37,2		37,3	37,2
2	31,6	31,6		31,6	31,6
3	71,8	71,7		71,8	71,7
4	42,5	42,2		42,3	42,1
5	140,8	140,7		140,8	140,7
6	121,7	121,7		121,6	121,7
7	31,8	31,8		31,9	31,8
8	31,9	31,8		31,9	31,8
9	50,1	50,0		50,2	50,0
10	36,5	36,4		36,5	36,4
11	21,1	21,2		21,1	21,2
12	39,7	39,7		39,7	39,6
13	42,3	42,2		42,3	42,2
14	56,7	56,7		56,9	56,8
15	24,3	24,2		24,3	24,3
16	28,2	28,2		28,9	28,9
17	56,0	56,0		56,0	56,0
18	11,9	11,9		12,0	12,0
19	19,4	19,3		19,4	19,3
20	36,1	36,1		40,5	40,5
21	18,8	18,7		21,1	21,1
22	33,9	33,8		138,2	138,3
23	26,0	26,0		129,2	129,2
24	45,8	45,7		51,2	51,2
25	29,1	29,0		31,9	31,8
26	19,8	19,7		21,2	19,2
27	19,1	18,9		19,0	18,9
28	23,0	23,0		25,4	25,4
29	12,0	12,0		12,2	12,2

Legenda: * Nés; Norton; Benson (1992); Ahmed; Ahmad; Malik (1992).

Figura 116 - Espectro de RMN ^1H de **S15** e **S16**, 300 MHz, CDCl_3 .

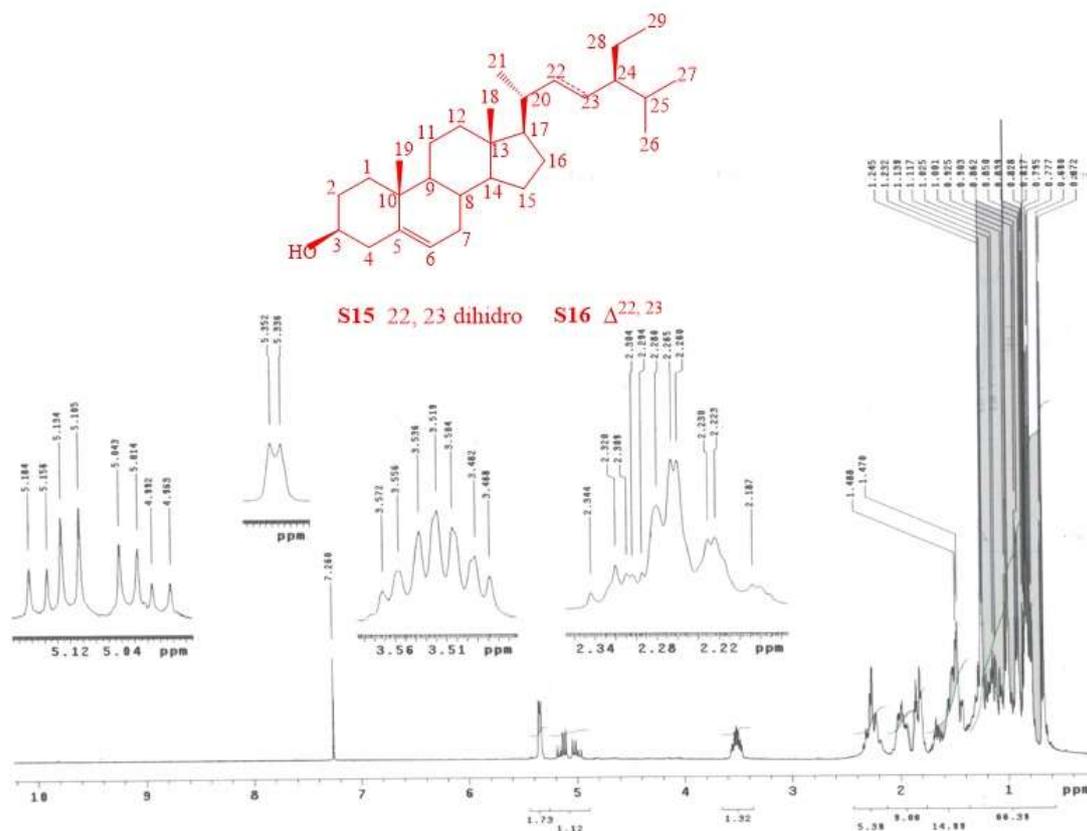


Figura 117 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **S15** e **S16**, 300 MHz, CDCl_3 .

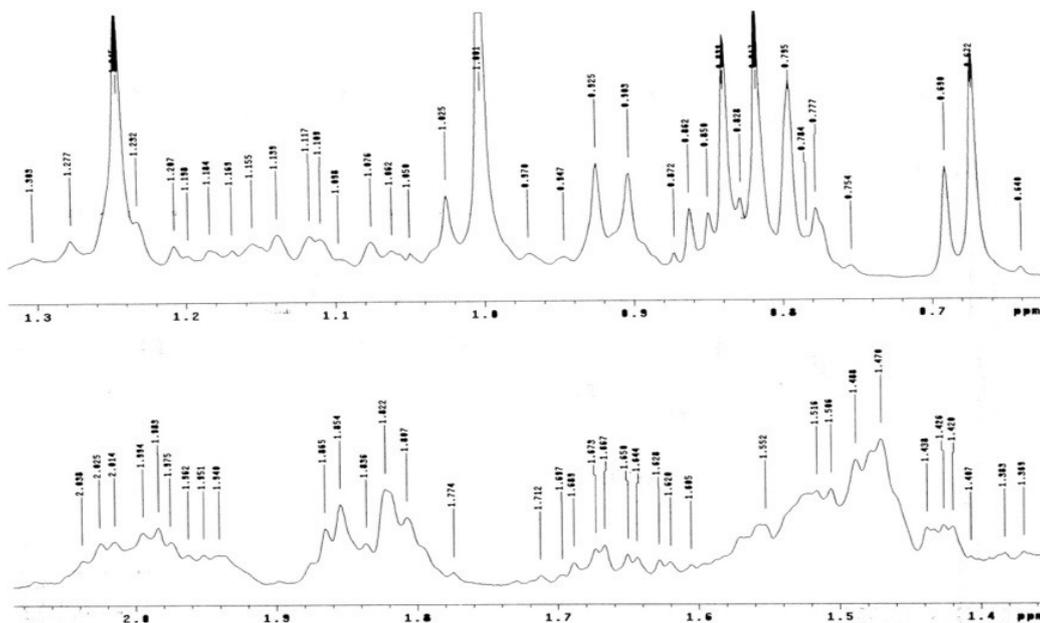


Figura 118 - Espectro de RMN ^{13}C de **S15** e **S16**, 75 MHz, CDCl_3 .

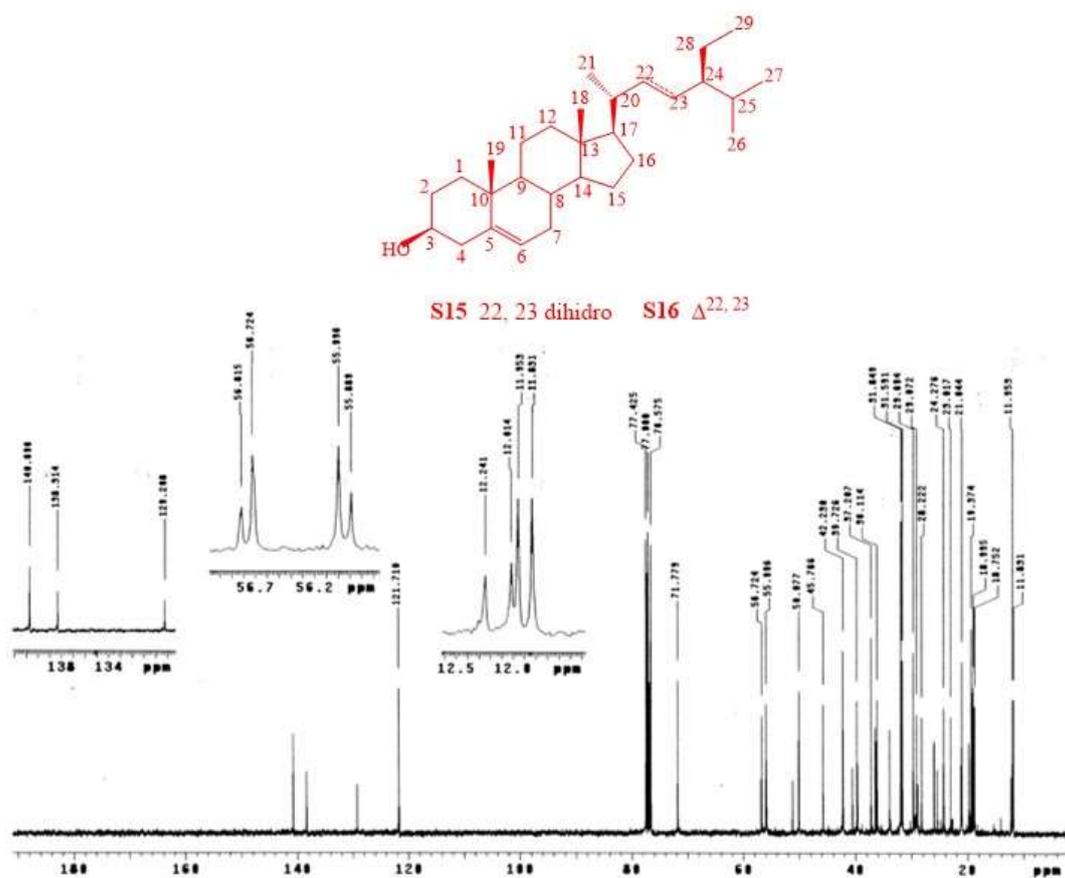


Figura 119 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **S15** e **S16**, 75 MHz, CDCl_3 .

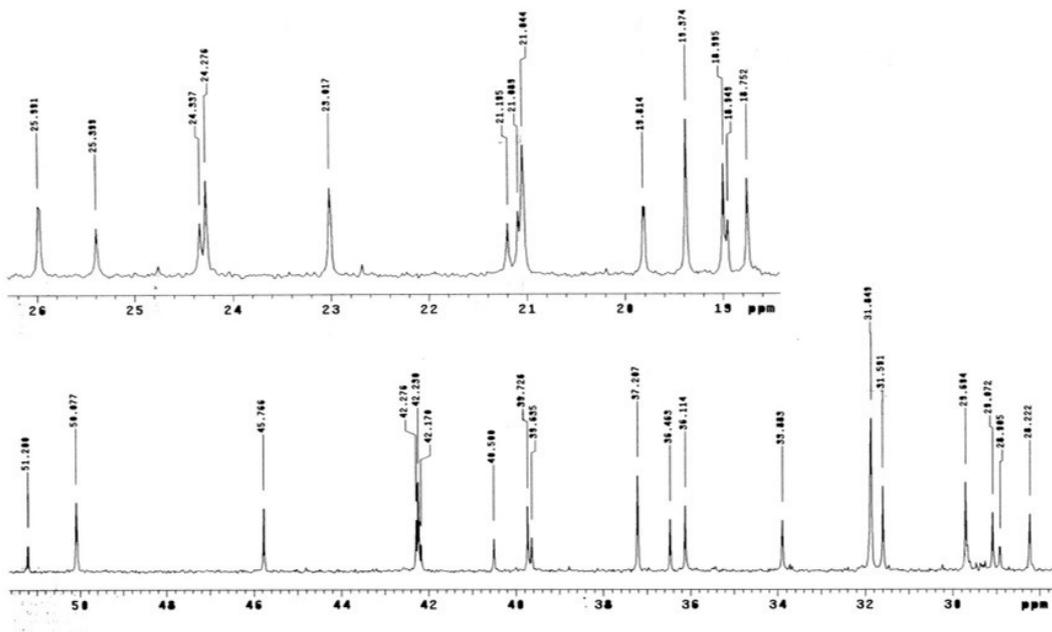


Figura 120 - Espectro de DEPT de **S15** e **S16**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, de 75 MHz, CDCl_3 .

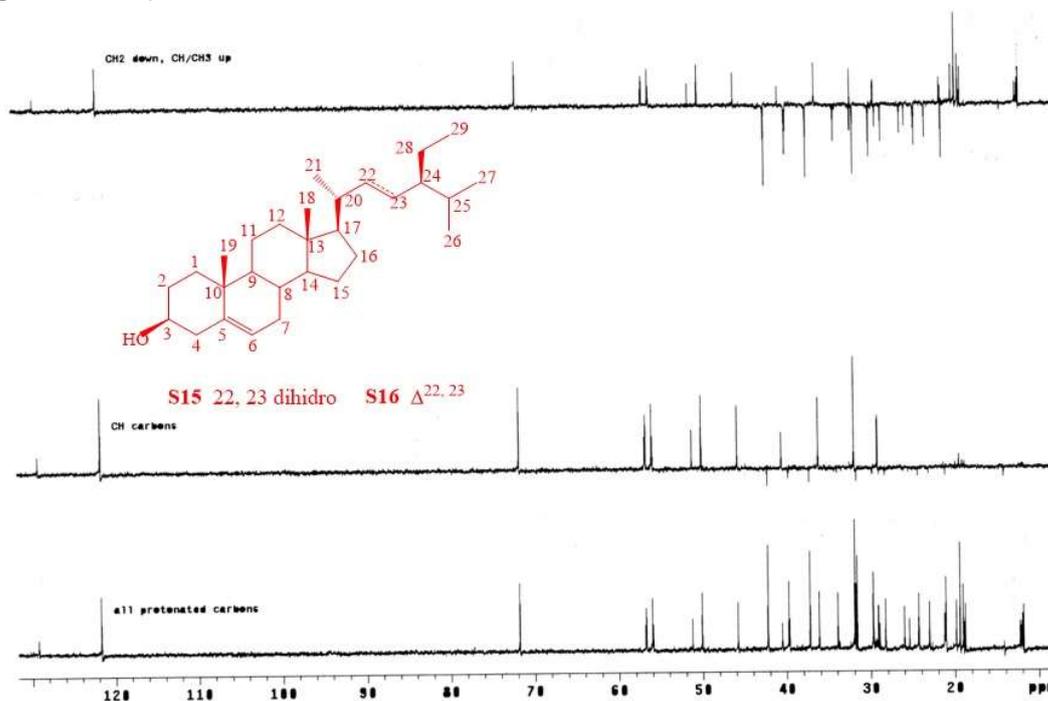
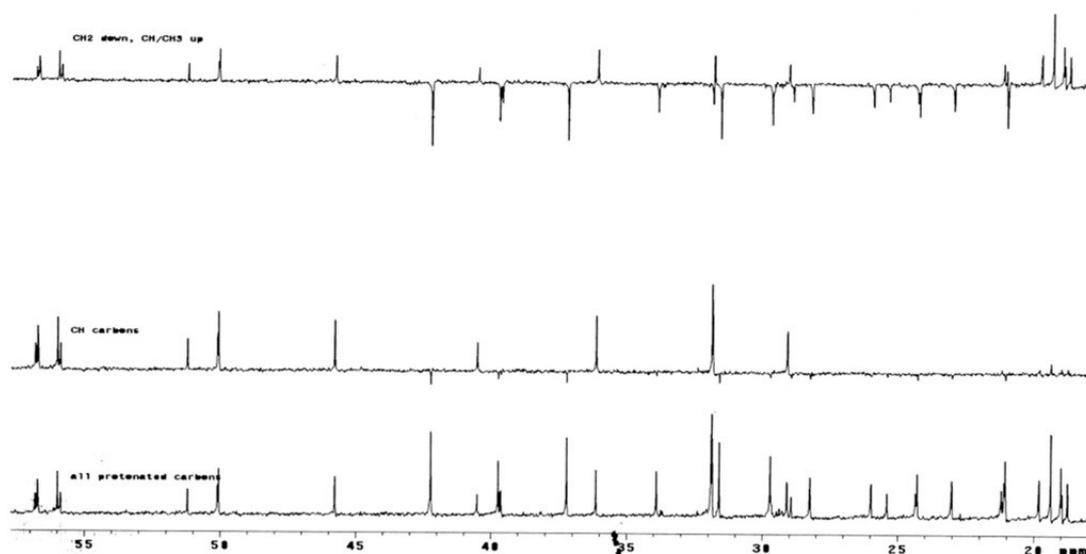


Figura 121 - Expansão do espectro de DEPT de **S15** e **S16**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, de 75 MHz, CDCl_3 .



5.3.3 Elucidação estrutural de **S17**

A substância **S17**, isolada na forma de cristais amarelos claros, foi identificada como um isoflavonoide com base nos sinais característicos observados nos espectros de RMN ^1H (BANDEIRA et al., 2011), em δ_{H} 7,84 (s, H-2) e ^{13}C , em δ_{C}

152,4 (C-2). A identificação das posições dos substituintes nos anéis A e B foram obtidas por análise dos valores de *J* dos sinais de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN ¹H (Fig. 122). Os sinais em δ_H 7,38 (*d*, *J* 9,0 Hz; H-2'/6') e 6,87 (*d*, *J* 9,0 Hz, H-3'/5') foram relacionados ao sistema de *spin* AA'XX' no anel B (1',4'-dissubstituído), similar ao padrão de substituição encontrado para a substância **S9** (item 5.2.2). O espectro de RMN de ¹H exibiu ainda um dubleto *orto* em δ_H 8,00 (*J* 9,0 Hz, H-5), um duplo dubleto com acoplamentos *orto-meta* em δ_H 6,83 (*J* 9,0 e 2,1 Hz, H-6) e um dubleto *meta* em δ_H 6,75 (*J* 2,1 Hz, H-8), evidenciando a presença de um sistema 1,2,4-trissubstituído relacionado ao anel A de um flavonoide. Todos os acoplamentos foram confirmados pelo experimento de correlação homonuclear COSY-¹H x ¹H (Fig. 123). O espectro de RMN de ¹³C (Fig. 124) de **S17** exibiu quatorze sinais referentes aos dezesseis carbonos da estrutura da substância e as atribuições foram auxiliadas pelos espectros HETCOR e HMBC (Figs. 125-127). Pode ser observado ainda no espectro de ¹H, um sinal singlete em δ_H 3,75 (3H) atribuído a um OMe. A localização deste grupo em C-4' no anel B foi determinada a partir do experimento de NOE-diff, o qual mostrou efeito NOE entre o sinal singlete em δ_H 3,75 e o dubleto em δ_H 6,87 (H-3'/5') (Figs.128 e 129). O conjunto desses dados, associado às informações disponíveis na literatura (YAHARA et al., 1989), permitiu identificar a substância **S17** como 7-hidroxi, 4'-metoxi-isoflavona, conhecida pelo nome usual de formononetina. Os dados de RMN de ¹H e ¹³C estão descritos na Tabela 18. Recentes pesquisas revelaram que essa substância aumentou significativamente a citotoxicidade do quimioterápico epirrubicina contra células tumorais do tipo HeLa (LO; WANG, 2013).

Tabela 18 - Dados de RMN ¹H e ¹³C para **S17** (CDCl₃ + gts CD₃OD, 300 e 75 MHz) e comparação com dados da literatura (em acetona d₆).

The chemical structure shows the isoflavone skeleton. The A-ring (left) has a hydroxyl group at C-7 and is numbered 4a, 5, 6, 7, 8, 8a. The B-ring (right) has a methoxy group at C-4' and is numbered 1', 2', 3', 4', 5', 6'. The C-ring (middle) is numbered 2, 3, 4 and contains a carbonyl group at C-4.

Posição	Formononetina isolada (S17)		Formononetina literatura*	
	δ _H , <i>J</i> Hz	δ _C	δ _H	δ _C
2	7,84 (<i>s</i>)	152,4	8,24	152,9
3		124,3		124,3
4		176,5		174,4
4 ^a		117,0		116,7
5	8,0 (<i>d</i> , <i>J</i> 9,0)	127,5		129,2
6	6,83 (<i>dd</i> , <i>J</i> 9,0 e 2,1)	115,0	6,7-8,15	115,1
7		159,2		158,9
8	6,75 (<i>d</i> , <i>J</i> 2,1)	102,2	6,7-8,15	102,1
8 ^a		158,0		157,5
1'		124,0		123,2

2'/6'	7,38 (d, J 9,0)	130,0		130,0
3'/5'	6,87 (d, J 9,0)	113,7	6,7-8,15	113,5
4'		162,4		162,6
OMe-4'	3,75(s)	55,1	3,76	55,0

Legenda: * Yahara et al. (1989).

Figura 122 - Espectro de RMN ¹H de **S17**, 300 MHz, CDCl₃ + gotas CD₃OD.

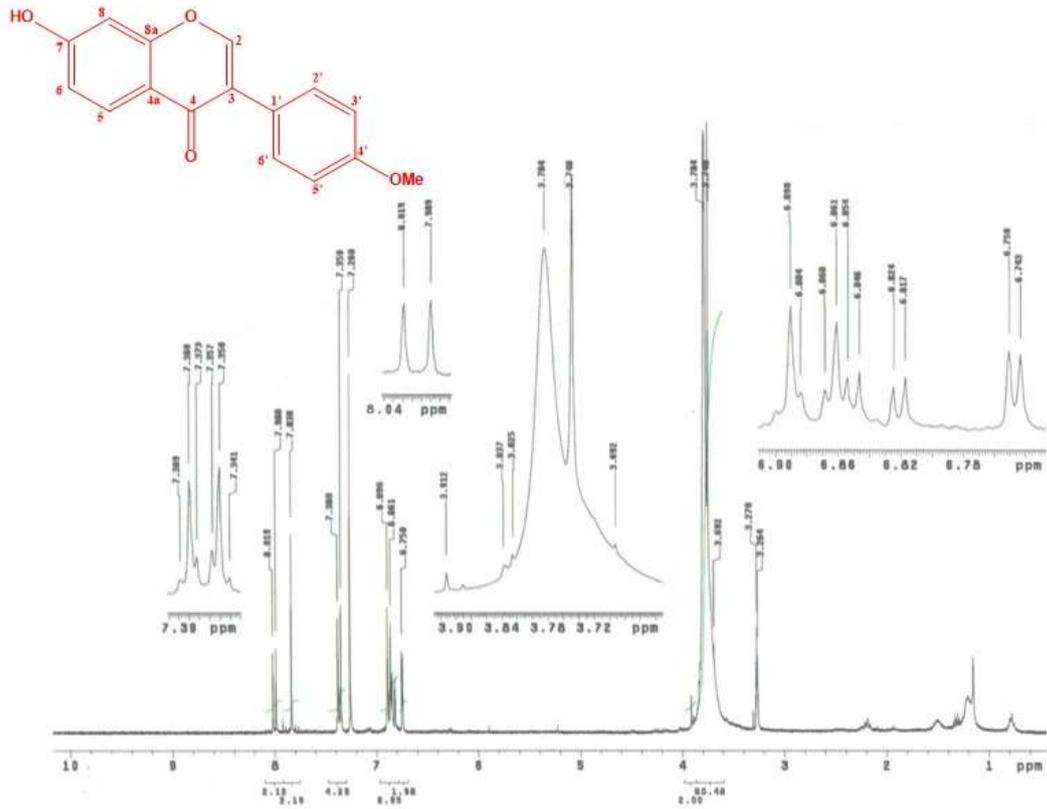


Figura 123 - Mapa de correlação homonuclear COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **S17**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

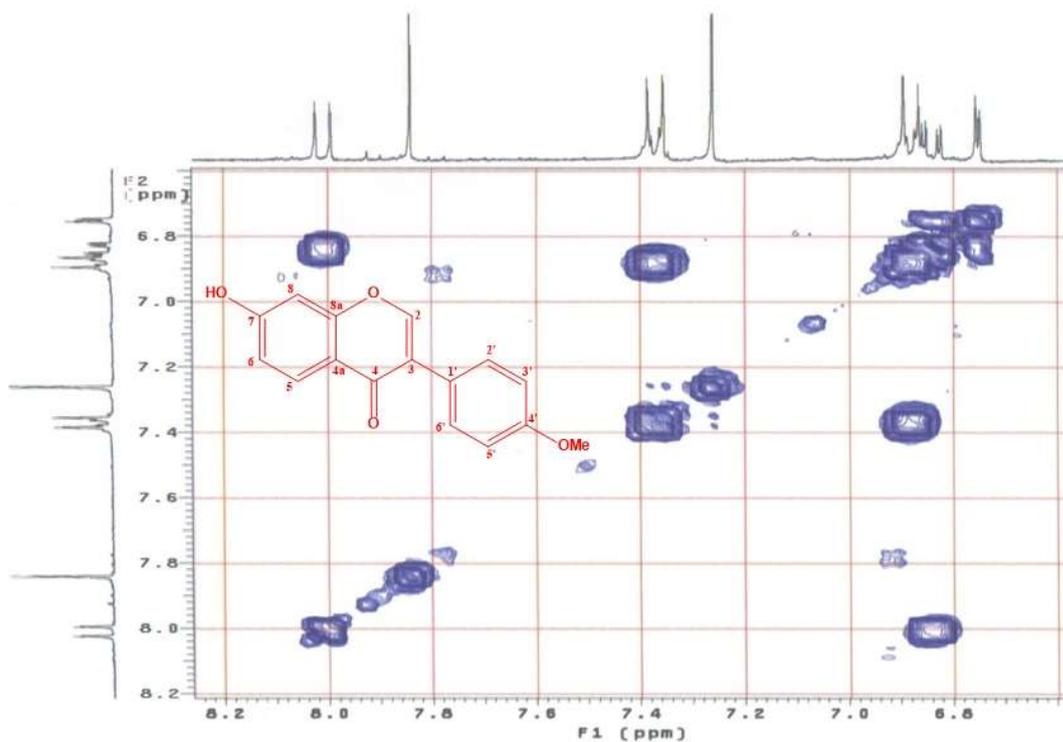


Figura 124 - Espectro de RMN ^{13}C de **S17**, 75 MHz, CDCl_3 + gotas CD_3OD .

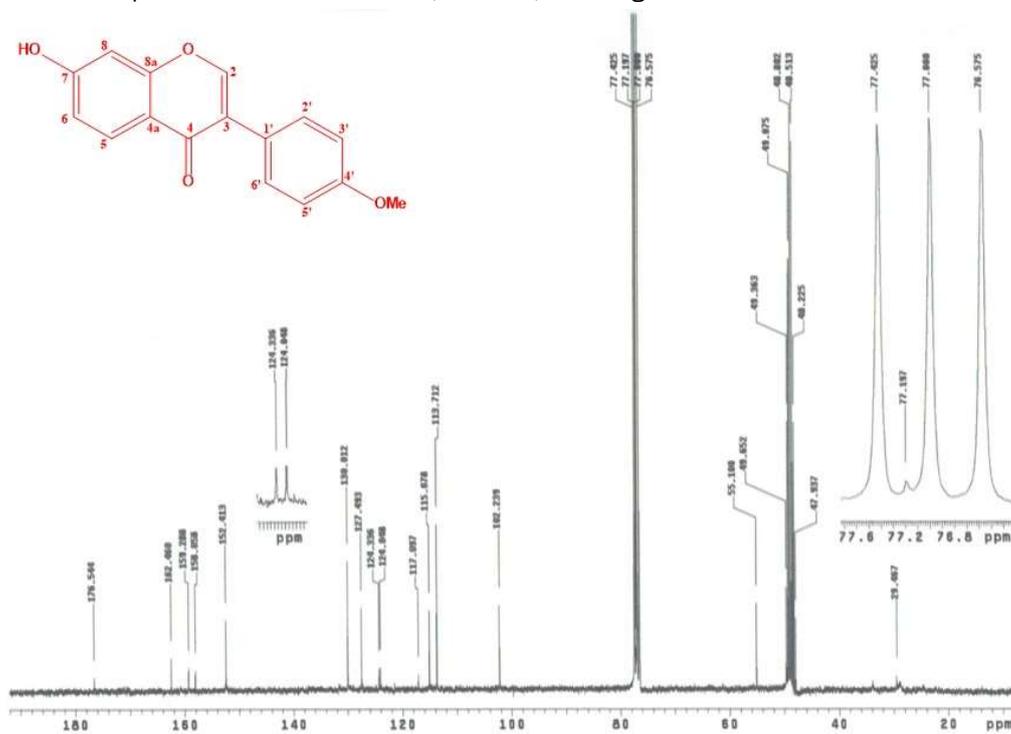


Figura 125 - Mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S17**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

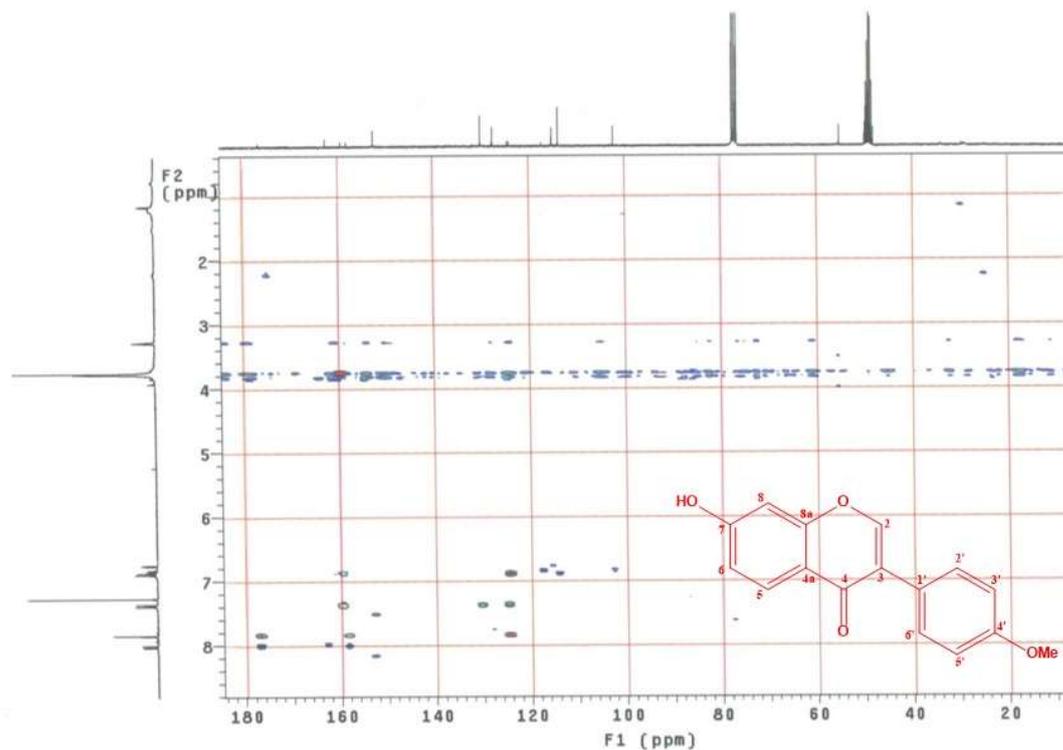


Figura 126 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S17**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD , na região de (6,6-8,1 ppm) x (75,0-135,0 ppm).

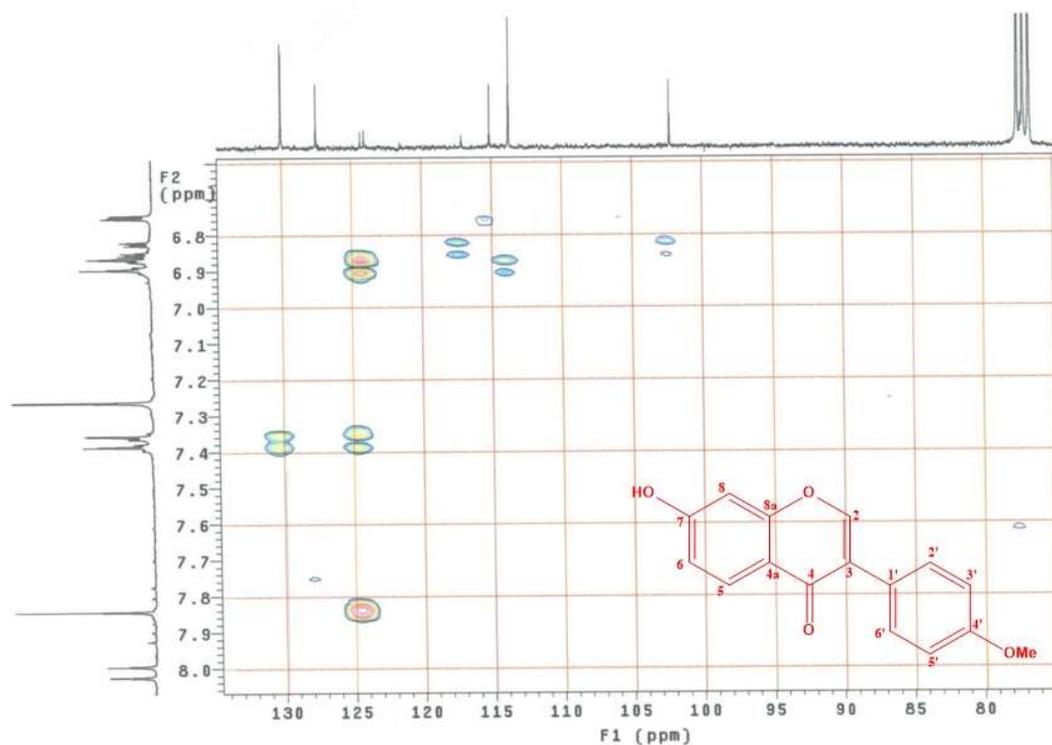


Figura 127 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S17**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD , na região de (6,5-8,4 ppm) x (146,0-184,0 ppm).

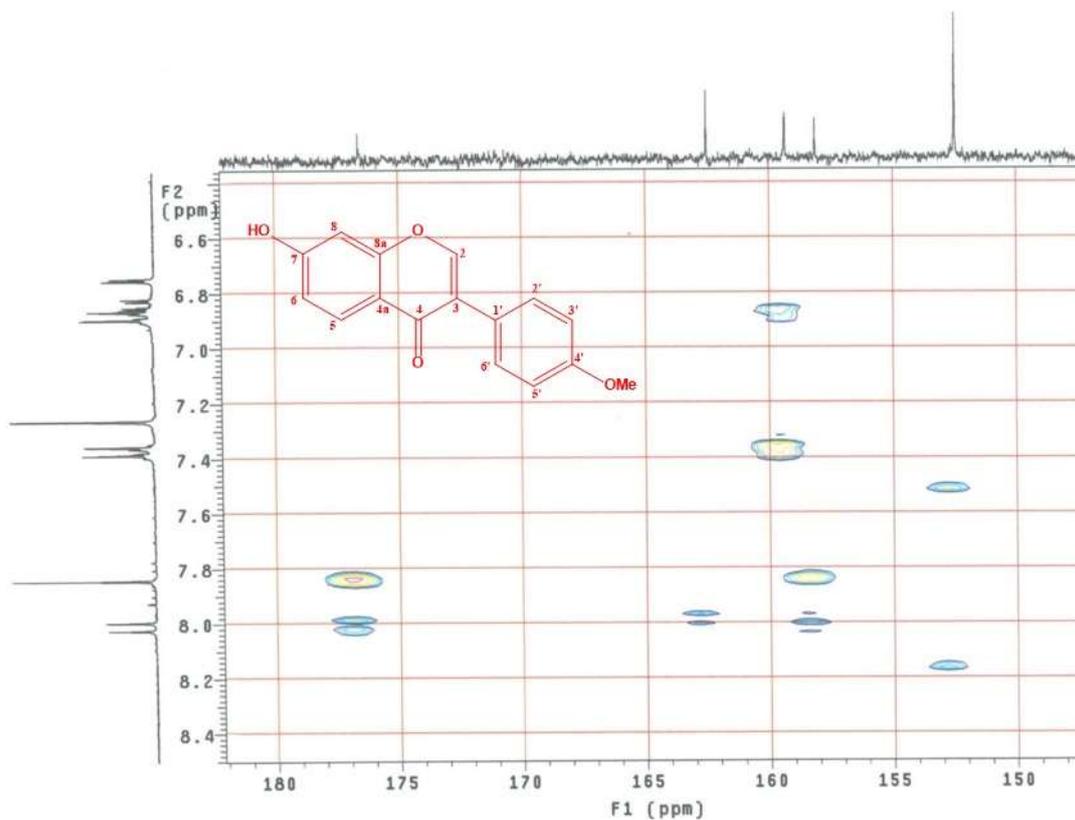


Figura 128 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar os hidrogênios do grupo metoxílico (δ_{H} 3,75) de **S17**, 300 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD .

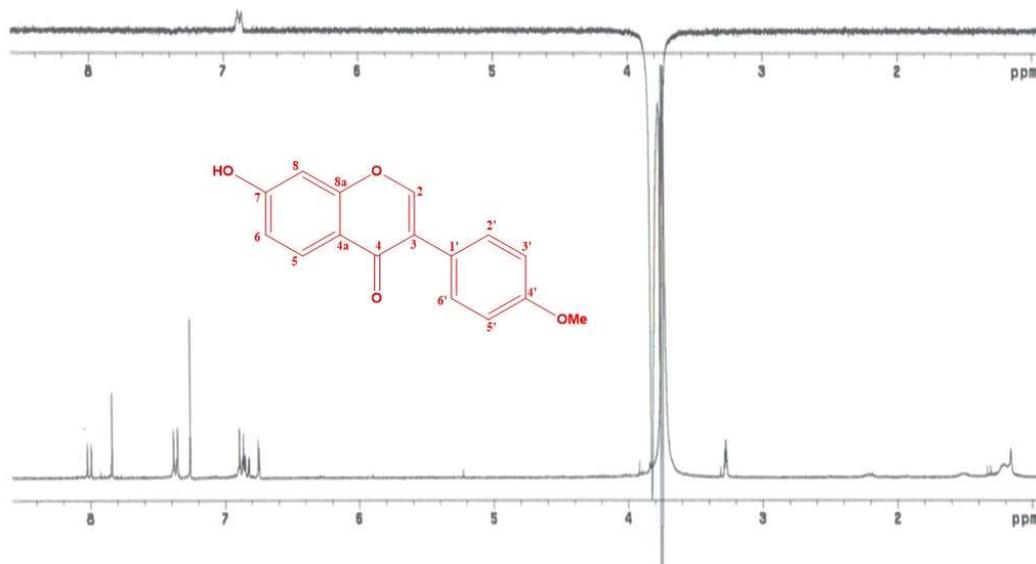
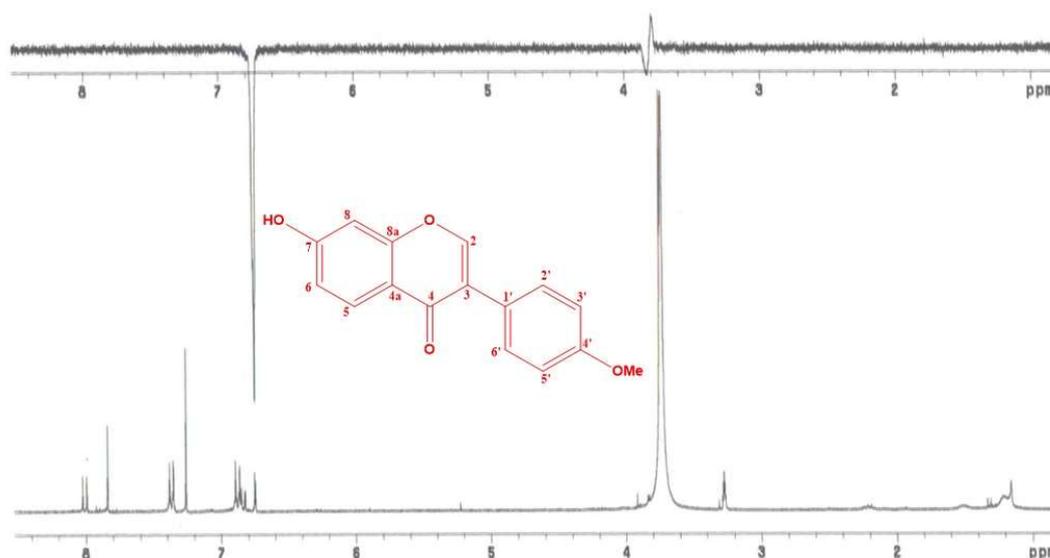


Figura 129 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar o dupletto em δ_H 6,87 (H-3'/5') de **S17**, 300 MHz, $CDCl_3$ + gotas de CD_3OD .



5.3.4 Elucidação estrutural de **S18**

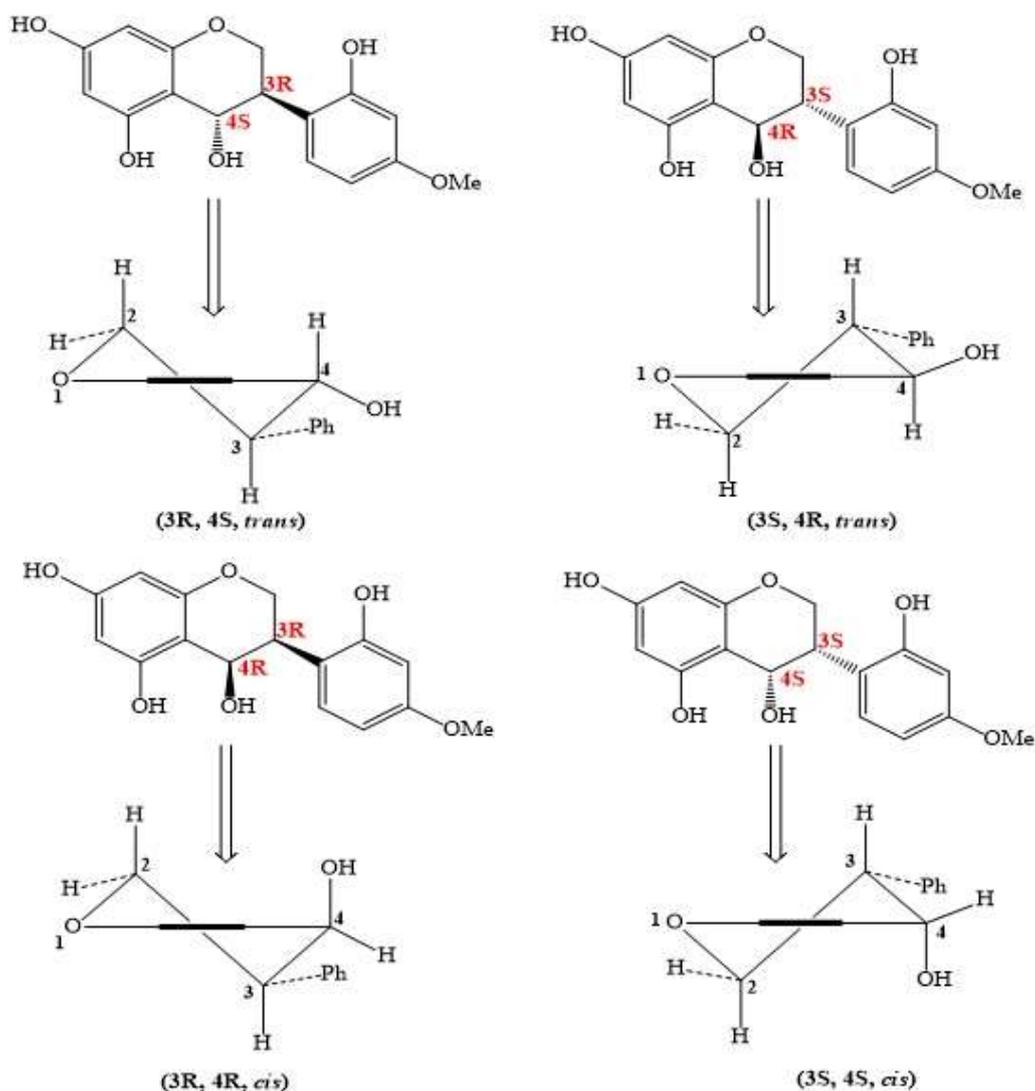
A substância **S18**, isolada na forma de um sólido amorfo marron, foi identificada como um isoflavonoide com base nos sinais característicos observados nos espectros de RMN 1H (BANDEIRA et al., 2011), sua identificação ocorreu com base nos dados de RMN uni e bidimensional e por comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN de 1H (Fig. 133 e 134) da substância **S18** mostrou um par de duplo dupletto em δ_H 3,58 (J 10,8 e 5,1 Hz, H-2 β) e 4,26 (J 16,0 e 10,8 Hz, H-2 α), um multipletto em δ_H 3,61 (H-3), além de um dupletto em δ_H 5,50 (J 6,0 Hz, H-4). Estes sinais são característicos de um esqueleto de isoflavan-4-ol (AHMED; KHALEDUZZAMAN; ISLAM, 1990). Esse espectro apresentou, também, sinais de hidrogênios aromáticos caracterizando dois sistemas de *spins* AMX em δ_H 6,35 (*d*, J 2,4 Hz, 1H), 6,55 (*dd*, J 8,1 e 2,4 Hz, 1H) e 7,32 (*d*, J 8,1 Hz, 1H), e em δ_H 6,37 (*d*, J 2,4 Hz, 1H), 6,44 (*dd*, J 8,4 e 2,4 Hz, 1H) e 7,22 (*d*, J 8,4 Hz, 1H), indicando um anel A 7,4a,8a-trissubstituído e anel B 1',2',4'-trissubstituído ou 1',3',4'-trissubstituído. Todos os acoplamentos foram confirmados pelo espectro de COSY- 1H x 1H (Figs. 135 e 136). Pode ser observado ainda, um sinal singletto de um grupo OMe em δ_H 3,74. O espectro de RMN ^{13}C apresentou dezesseis sinais (Fig. 137), que corroborado pelos espectros de DEPT (Fig. 138) e HETCOR (Figs. 139 e 140), permitiu inferir a presença de seis carbonos aromáticos hidrogenados, quatro carbonos aromáticos oxigenados, dois carbonos aromáticos não hidrogenados não oxidados, um oximetilênico, um oximetínico, um metínico alifático e um metoxílico. A presença de sinais típicos de carbonos aromáticos entre δ_C 162,0 e 97,1, juntamente com os sinais de carbono oximetínico em δ_C 79,3 (C-4), de oximetilênico em δ_C 67,0 (C-2) e

metínico em δ_c 40,3 (C-3), reforçam a indicação de que **S18** tem um esqueleto do tipo isoflavan-4-ol (BOJASE; WANJALA; MAJINDA, 2001).

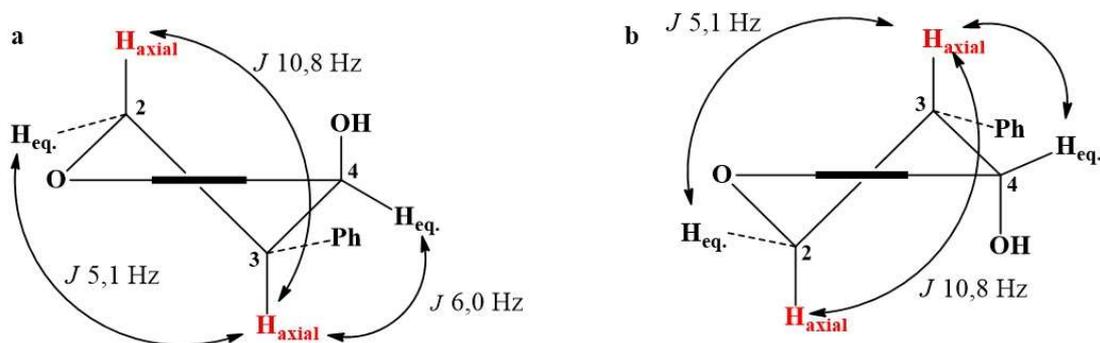
A definição de um dos conjuntos de sinais AMX [δ_H 6,37 (*d*, *J* 2,4 Hz), 6,44 (*dd*, *J* 8,4 e 2,4 Hz) e 7,22 (*d*, *J* 8,4 Hz)] para o anel B se deu pela correlação $^3J_{C,H}$ observada no espectro de HMBC (Fig. 141, Tabela 19) entre os sinais atribuídos a H-6' (δ_H 7,22) e a C-3 (δ_c 40,3). A localização do grupo OMe em C-4' do anel B, foi deduzida pelo experimento de NOE-diff, pois ao irradiar os hidrogênios do grupo OMe (δ_H 3,74), observou-se efeito NOE com os hidrogênios relacionados aos sinais em δ_H 6,44 (H-5') e 6,37 (H-3') (Fig. 146). Esta informação permitiu atribuir o sinal de carbono aromático oxidado em δ_c 162,0 a C-4' devido à correlação $^3J_{C,H}$ observada no espectro de HMBC (Fig. 143 e 144, Tabela 19), entre esse sinal e o do grupo OMe em δ_H 3,74. O espectro de HMBC (Fig. 142), possibilitou também atribuir os sinais dos outros carbonos aromáticos oxidados devido às correlações $^{2,3}J_{C,H}$ observadas, conforme mostrado na Tabela 19. Com base nos dados espectrais foi possível elucidar a estrutura de **S18**, como 7,2'-diidroxí-4'-metoxi-isoflavan-4-ol. No entanto, com base apenas nessas informações, ainda pode-se propor quatro estereoisômeros possíveis para 7,2'-diidroxí-4'-metoxi-isoflavan-4-ol, mostrados na Figura 130.

Figura 130 - Estereoisômeros de 7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol.



A estereoquímica relativa entre C-3 e C-4 foi proposta com base na análise das constantes de acoplamento entre H-3_{axial}/H-4_{equatorial} (J 6,0 Hz), H-2_{equatorial}/H-3_{axial} (J 5,1 Hz) e H-2_{axial}/H-3_{axial} (J 10,8 Hz), e estes valores são condizentes com uma relação *cis* entre os substituintes de C-3 e C-4 (WON et al., 2008), (Fig. 131). A configuração relativa *cis* foi confirmada usando o espectro de NOE-diff, visto que não foi observado efeito NOE entre os hidrogênios que exibem os sinais em δ_H 4,26 (H-2_{axial}) e 5,50 (H-4_{equatorial}) (Figs. 147 e 148, Tabela 19), indicando assim, a posição axial do grupo OH em C-4 e, conseqüentemente, a posição equatorial do anel aromático B em C-3 (Fig. 131).

Figura 131 - Conformações cadeira dos estereoisômeros *cis*-7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol.



Legenda: a – (3R, 4R)-*Cis*-7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol

b – (3S, 4S)-*Cis*-7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol

Com base nos dados apresentados foi possível elucidar a estrutura de **S18**, bem como propor a estereoquímica relativa para C-3 e C-4, e por isso, **S18** foi denominada de *cis*-7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S18** foram comparados com os dados relatados previamente para o bolusanthol D, um isoflavanol isolado da casca do caule de *Bolusanthus speciosus* (BOJASE; WANJALA; MAJINDA, 2001), mostrando grande semelhança nos deslocamentos químicos, porém algumas diferenças nos valores de constante de acoplamento, o que nos leva a propor que a estrutura **S18** apresenta estereoquímica relativa *cis* entre C-3 e C-4, diferindo do bolusanthol D, que exibe estereoquímica *trans*, portanto **S18** representa um novo produto natural.

As substâncias **S17** e **S18** pertencem a classe dos isoflavonoides, e como foram isoladas do mesmo órgão vegetal (alburno), acredita-se também que o conjunto de enzimas responsáveis pela biossíntese dessas substâncias são semelhantes, assim propõe-se que a substância **S17** seja a precursora de **S18**, conforme esquema mostrado na Figura 132.

Figura 132 - Sugestão de rota biossintética do *cis*-7,2'-diidroxi-4'-metoxi-isoflavan-4-ol (**S18**) a partir da formononetina (**S17**).

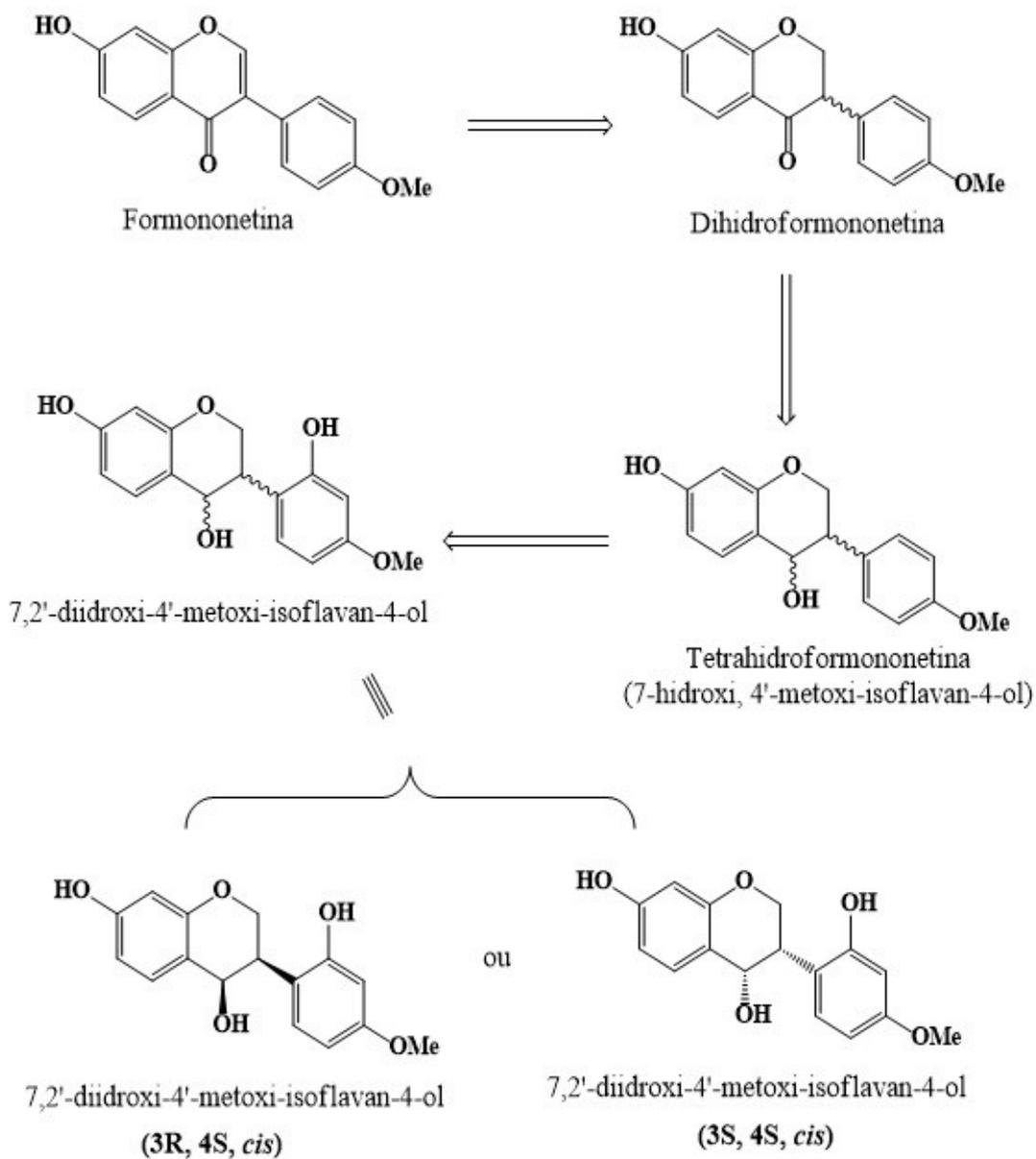
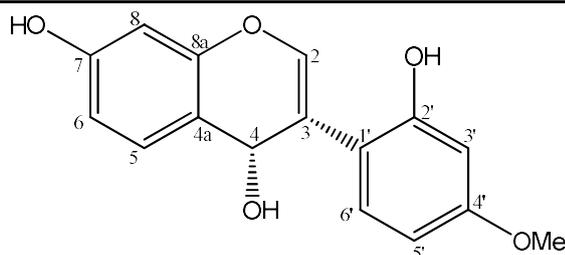


Tabela 19 - Dados de RMN uni e bidimensionais para **S18** em acetona d_6 e comparação com dados da literatura para o bolusanthol D.



Posição	δ_H	* δ_H	δ_C	* δ_C	HMBC ^a	COSY	NOE-diff
2	(β) 3,58 (<i>dd, J</i> 10,8 e 5,1)	3,59 (<i>dd, J</i> 9,8 e 10,2)			C-2, C-3, C-4, C-1'	H-2 α , H-3	
	(α) 4,26 (<i>dd, J</i> 16,0 e 10,8)	4,28 (<i>dd, J</i> 6,1 e 9,8)	67,0	66,5	C-3, C-4, C-8a	H-2 β , H-3	H-3
3	3,61 (<i>m</i>)	3,61 (<i>ddd, J</i> 5,7; 6,1 e 10,2)	40,3	39,9	C-1', C-2'	H-4, H-2 α	
4	5,50 (<i>d, J</i> 6,0)	5,52 (<i>d, J</i> 5,7)	79,3	79,1	C-1', C-2, C-3, C-4a, C-5, C-8a	H-3	H-3
4a			112,7	111,9			
5	7,32 (<i>d, J</i> 8,1)	7,34 (<i>d, J</i> 8,4)	133,0	132,2	C-4, C-7, C-8a	H-6	H-6
6	6,55 (<i>dd, J</i> 8,1 e 2,4)	6,57, (<i>dd, J</i> 2,4 e 8,4)	110,4	110,0	C-4a, C-8	H-5	H-5, OH-7
7			159,6	159,1			
8	6,35 (<i>d, J</i> 2,4)	6,36 (<i>d, J</i> 2,4)	103,8	103,4	C-6, C-7, C-8a		
8a			157,6	157,0			
1'			120,3	119,8			
2'			161,7	161,3			
3'	6,37 (<i>d, J</i> 2,4)	6,39 (<i>d, J</i> 2,3)	97,0	96,7	C-1', C-2', C-4'		
4'			162,0	161,7			
5'	6,44 (<i>dd, J</i> 8,4 e 2,4)	6,46 (<i>dd, J</i> 2,3 e 8,4)	106,7	106,4	C-1', C-3'	H-5'	H-6', OMe-4'
6'	7,22 (<i>d, J</i> 8,4)	7,24 (<i>d, J</i> 8,4)	125,8	125,4	C-3, C-2'	H-6'	H-5'
OMe-4'	3,74 (<i>s</i>)	3,76 (<i>s</i>)	55,6	54,9			H-3', H-5'
OH-7	8,66 (<i>s</i>)				C-6, C-8		H-6, H-8

Legenda: ^a Correlações no espectro de HMBC 1H - ^{13}C são de hidrogênio especificado (s) para os carbonos indicados. *Dados descritos por Bojase; Wanjala; Majinda (2001) em acetona d_6 .

Figura 133 - Espectro de RMN ^1H de **S18**, 300 MHz, acetona d_6 .

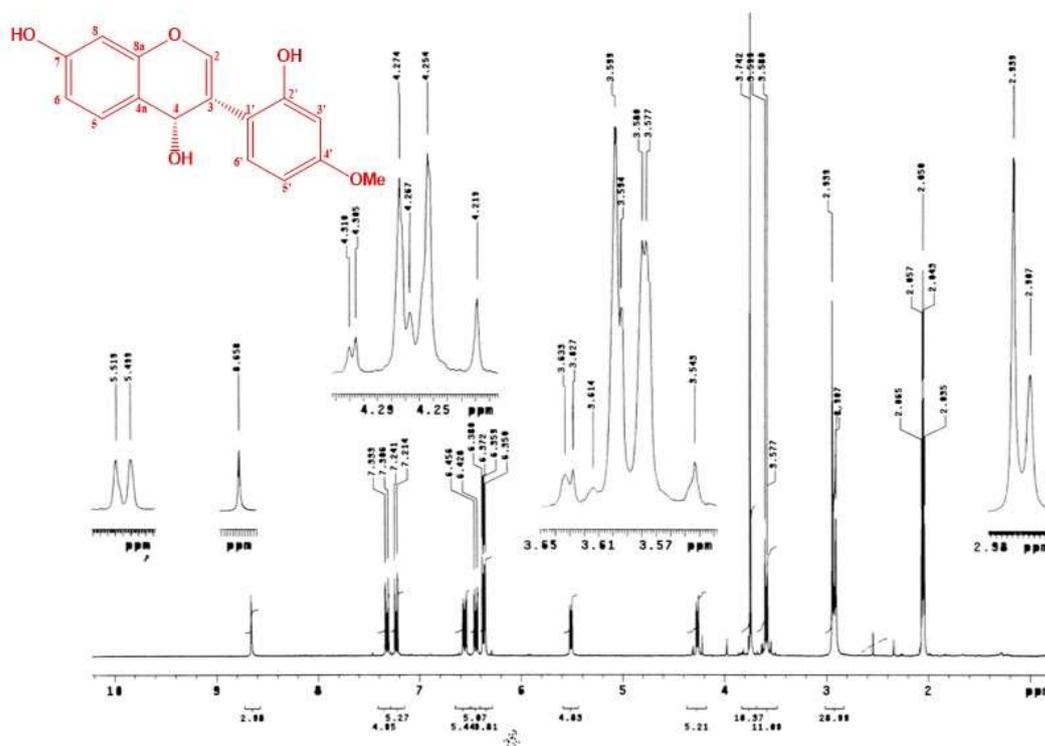


Figura 134 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **S18**, 300 MHz, acetona d_6 .

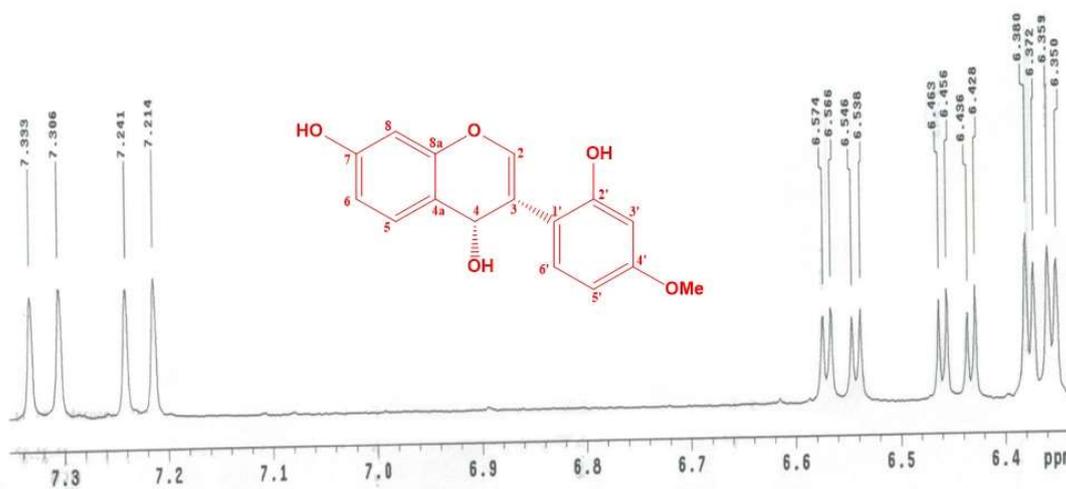


Figura 135 - Mapa de correlação homonuclear COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **S18**, 300 MHz, acetona d_6 .

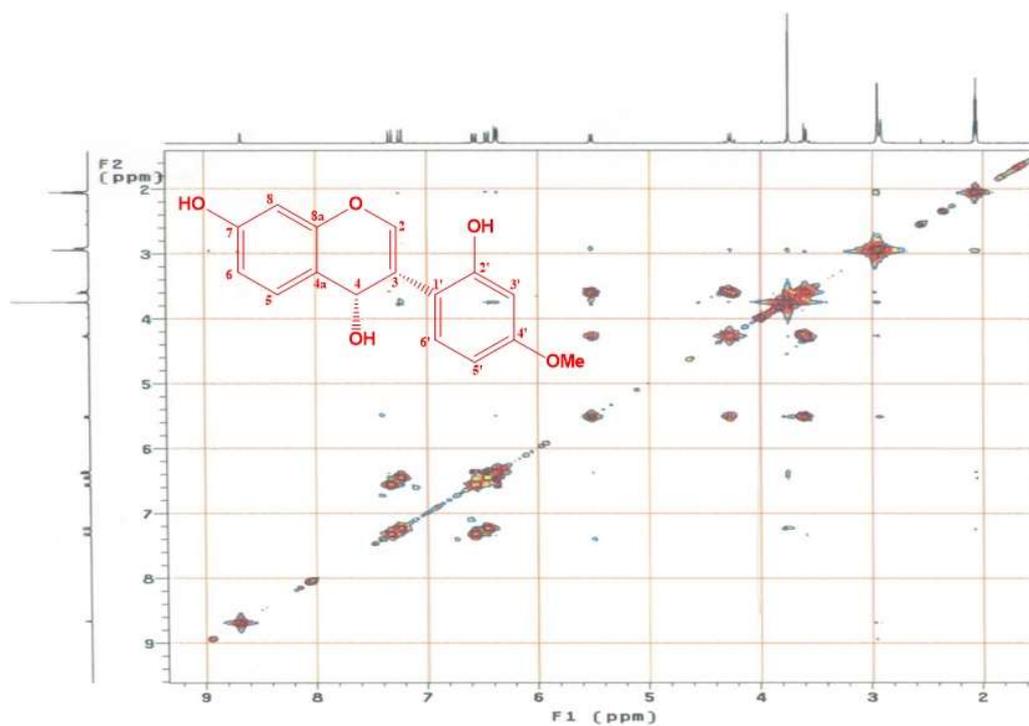


Figura 136 - Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY - $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **S18**, 300 MHz, acetona d_6 .

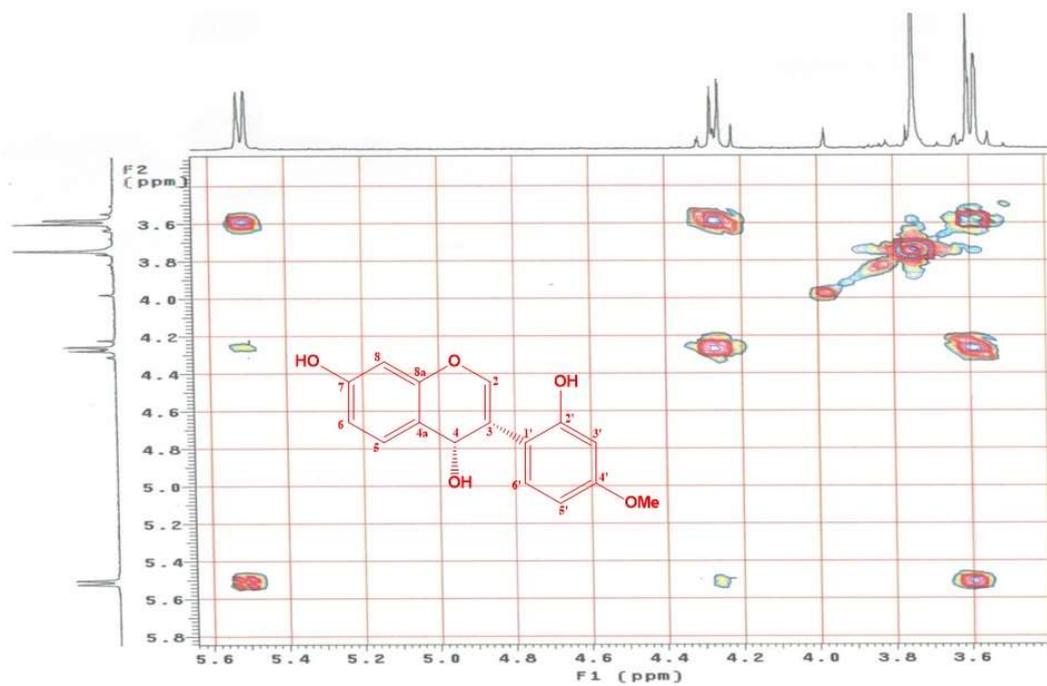


Figura 137 - Espectro de RMN ^{13}C de **S18**, 75 MHz, acetona d_6 .

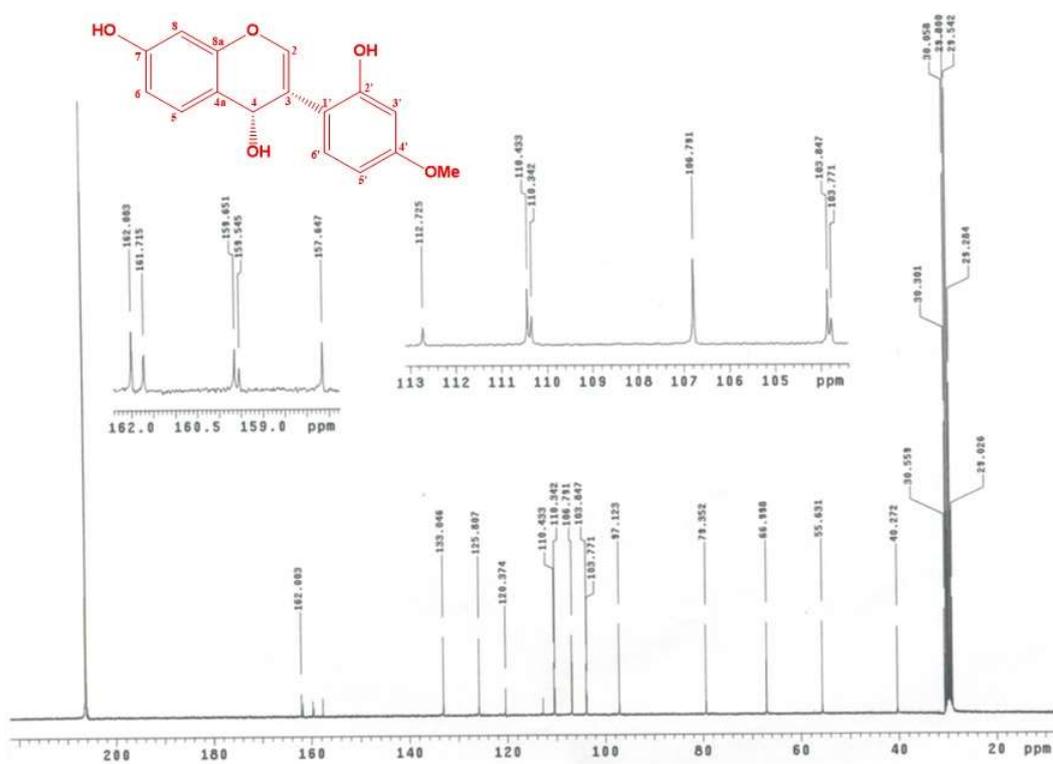


Figura 138 - Espectro de DEPT de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 .

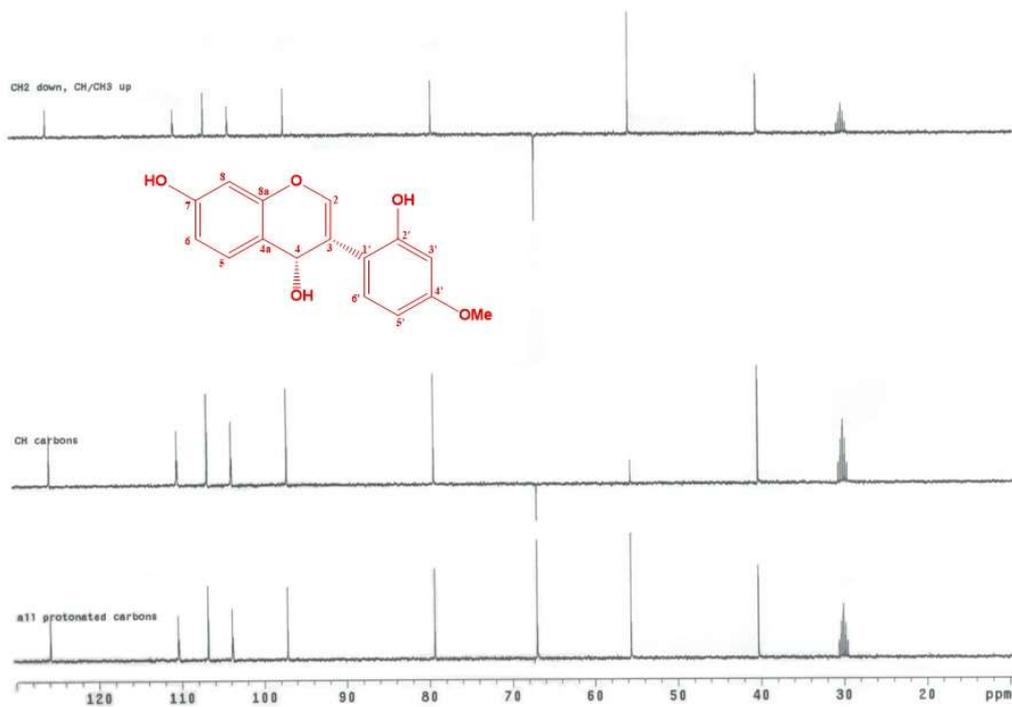


Figura 139 - Mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 .

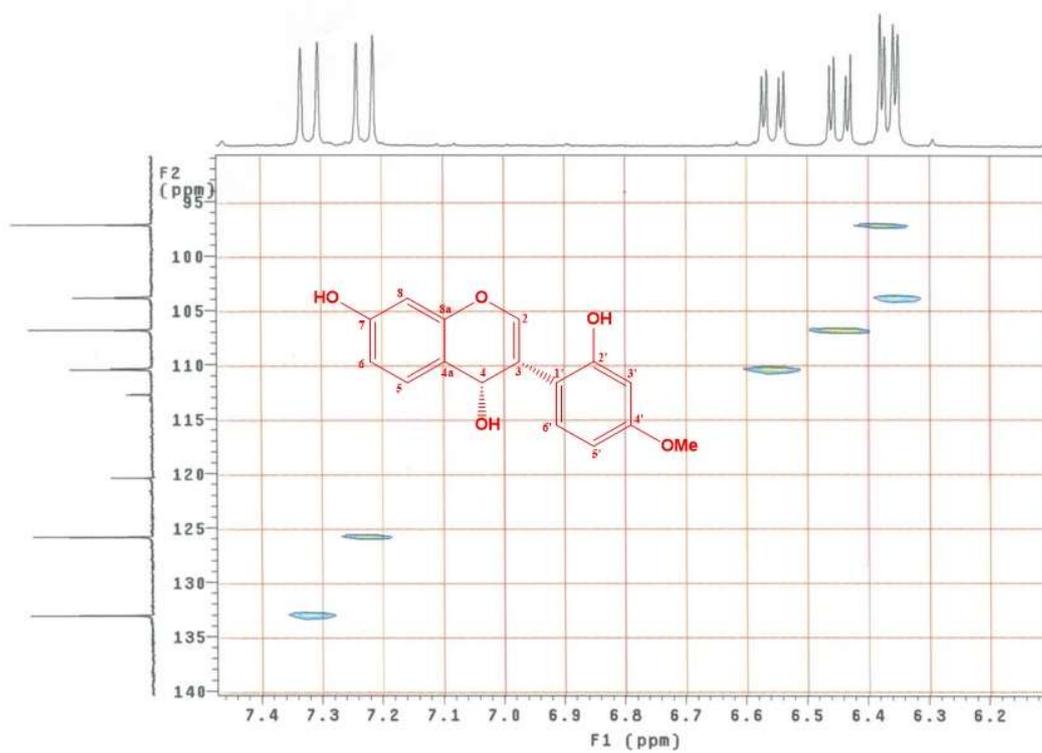


Figura 140 - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HETCOR de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 .

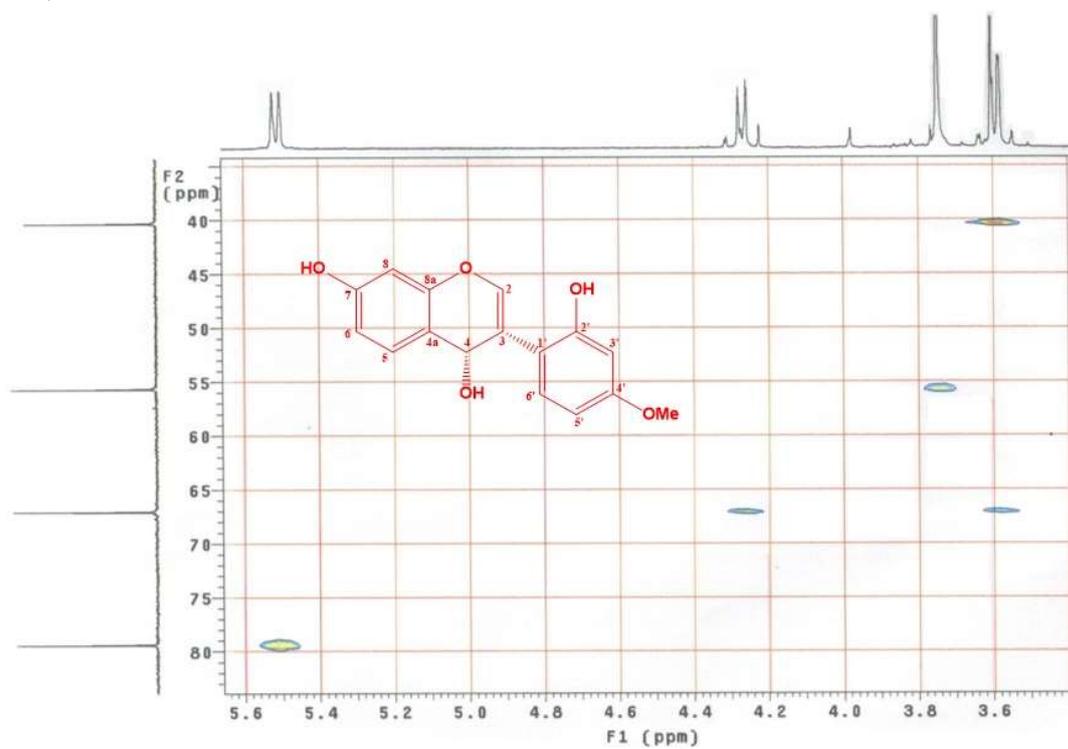


Figura 141 - Expansão 1 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (3,5-8,0 ppm) x (35,0-85,0 ppm).

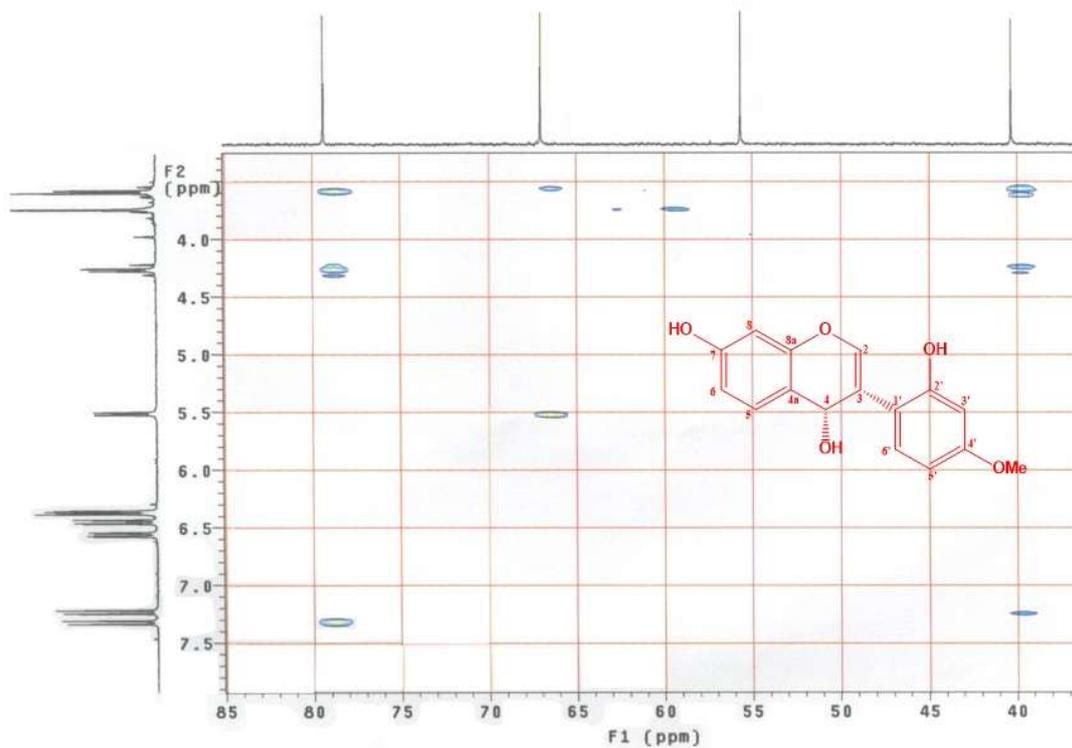


Figura 142 - Expansão 2 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (3,4-5,8 ppm) x (95,0-168,0 ppm).

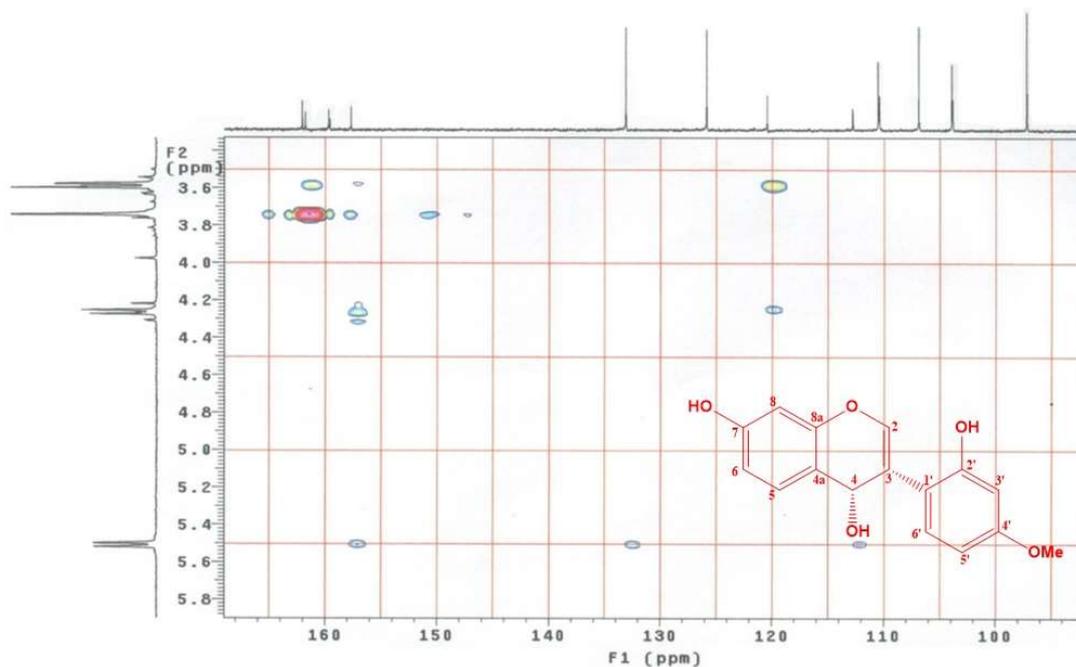


Figura 143 - Expansão 3 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (3,1-4,5 ppm) x (38,0-176,0 ppm).

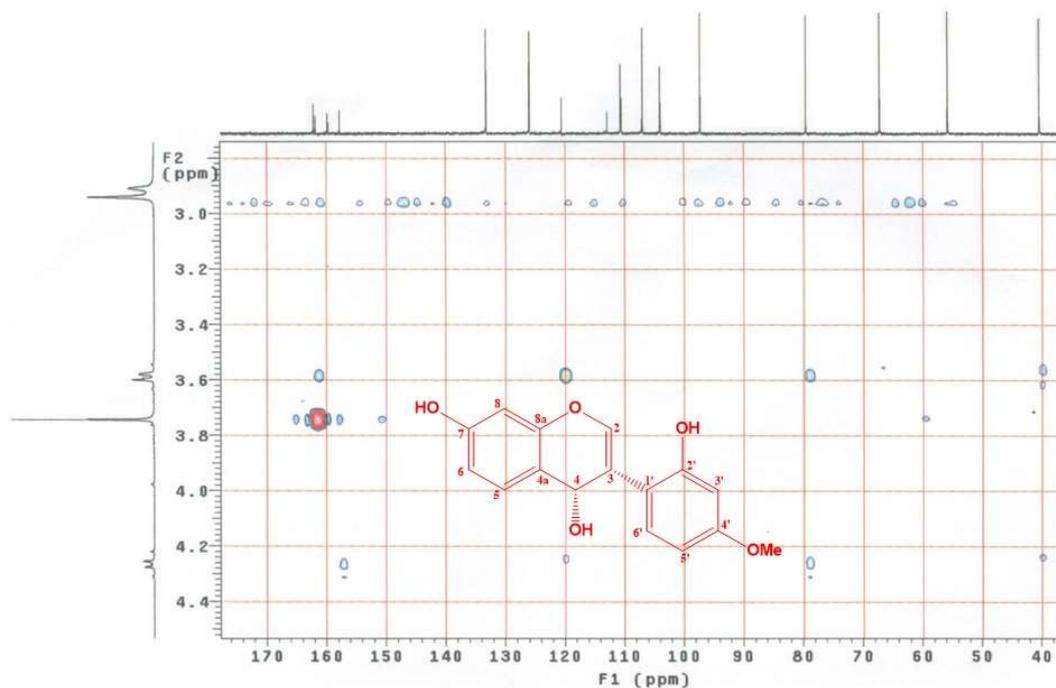


Figura 144 - Expansão 4 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (6,1-7,7 ppm) x (154,0-164,0 ppm).

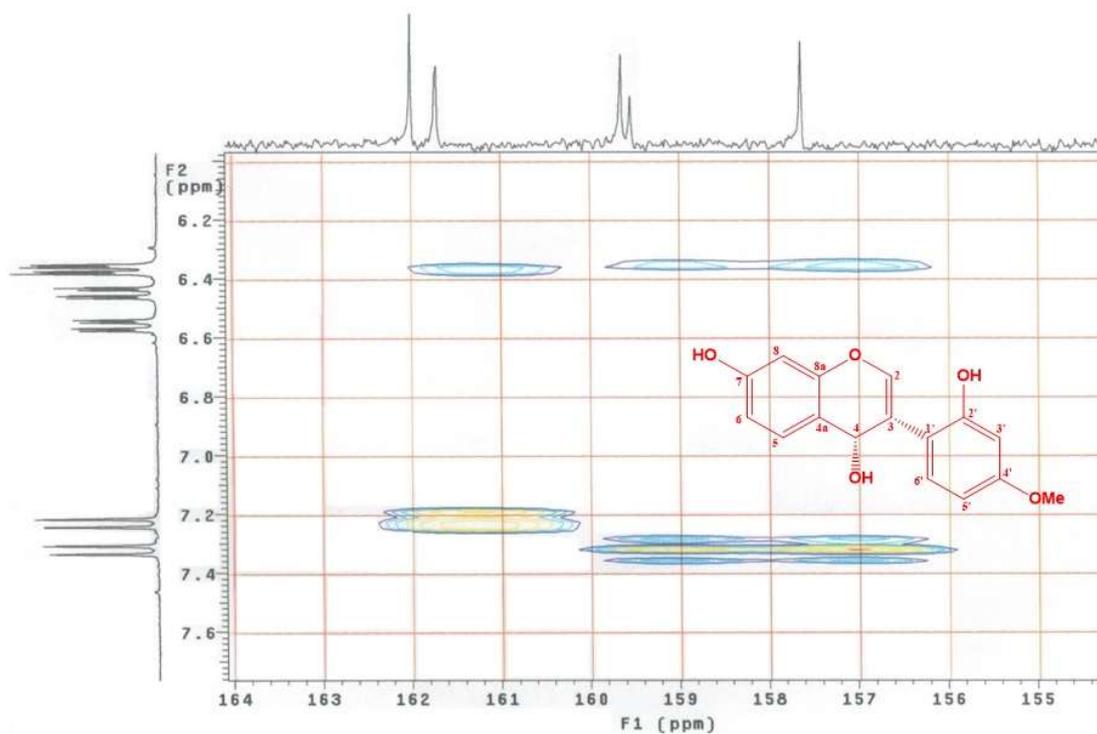


Figura 145 - Expansão 5 do mapa de correlação heteronuclear HMBC de **S18**, ^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz, acetona d_6 , na região de (5,4-9,4 ppm) x (90,0-164,0 ppm).

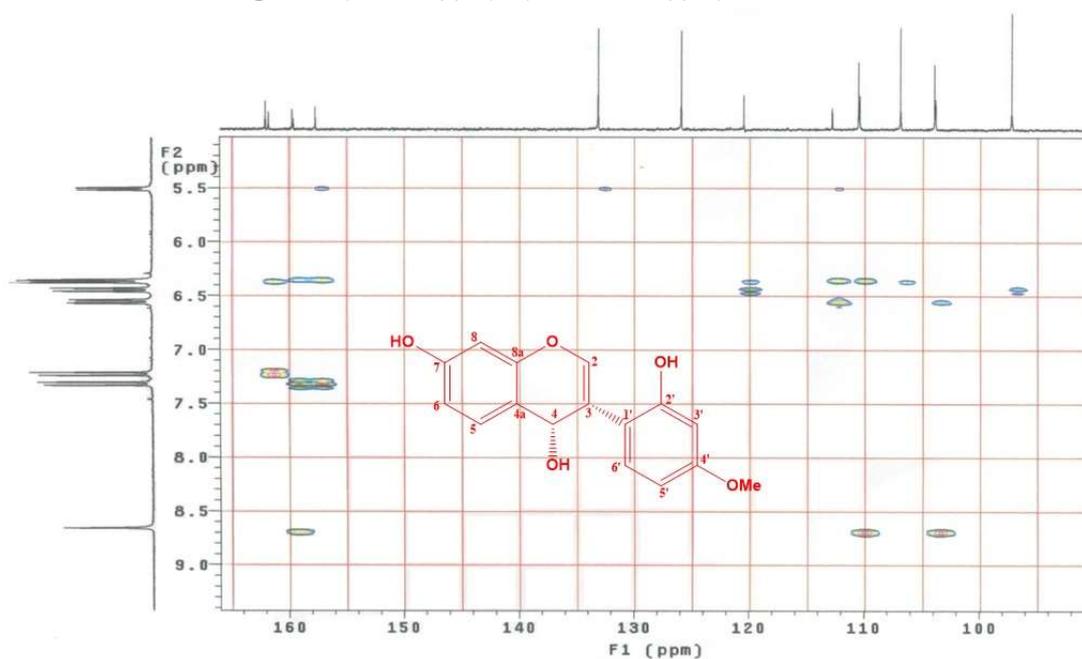


Figura 146 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar os hidrogênios do grupo metoxílico (δ_{H} 3,74) de **S18**, 300 MHz, CD_3OD .

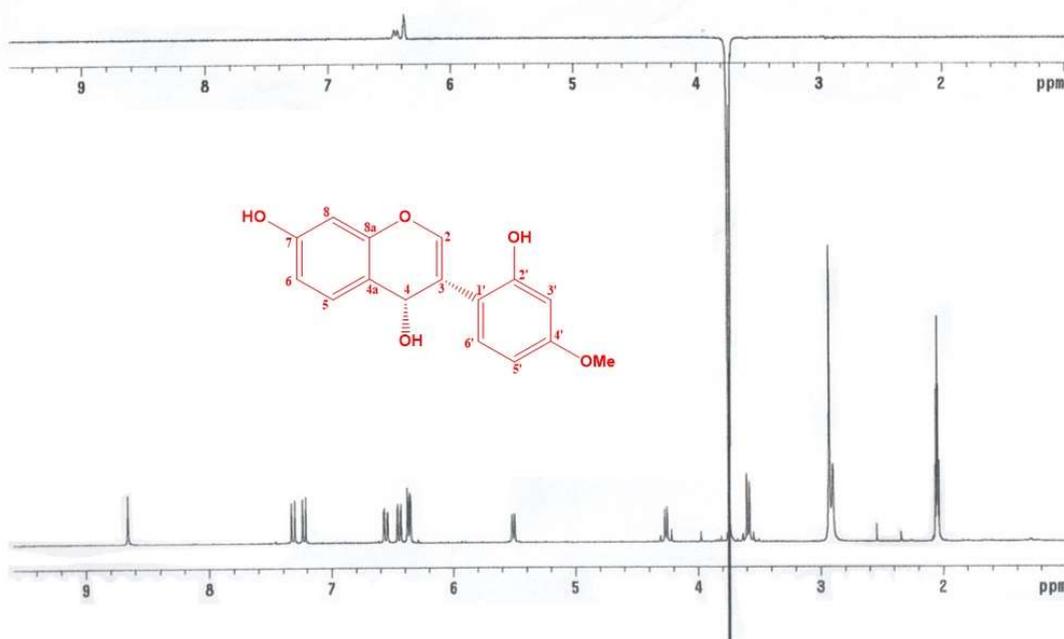


Figura 147 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar o sinal em δ_H 4,26 (H-2 α_{axial}) de **S18**, 300 MHz, CD₃OD.

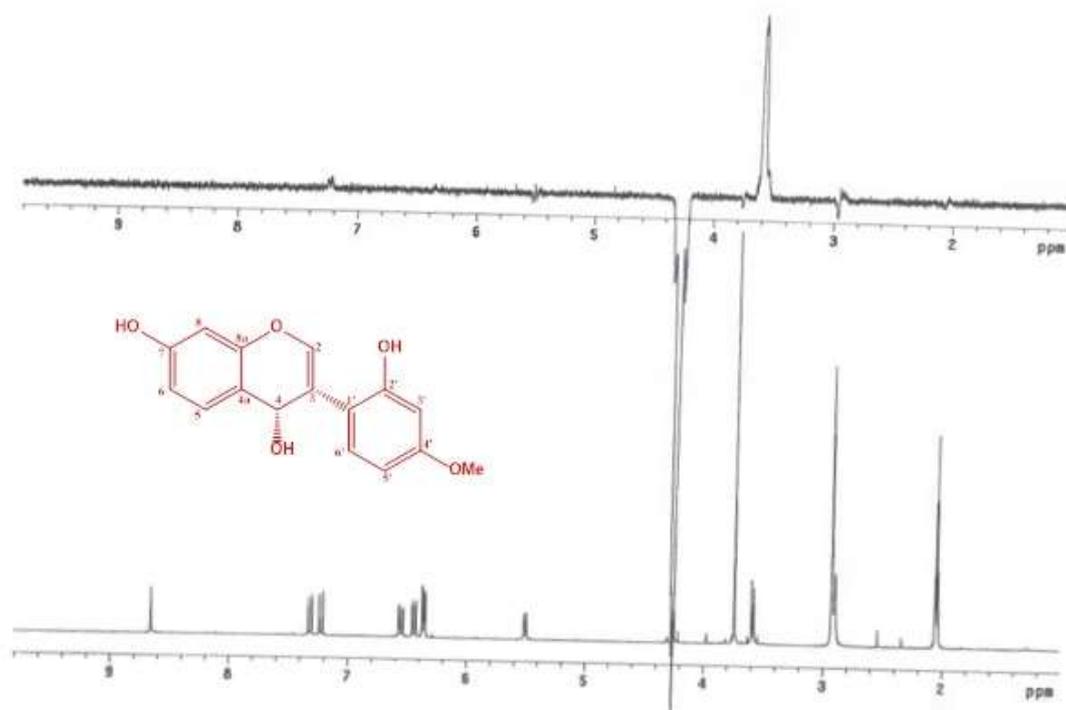
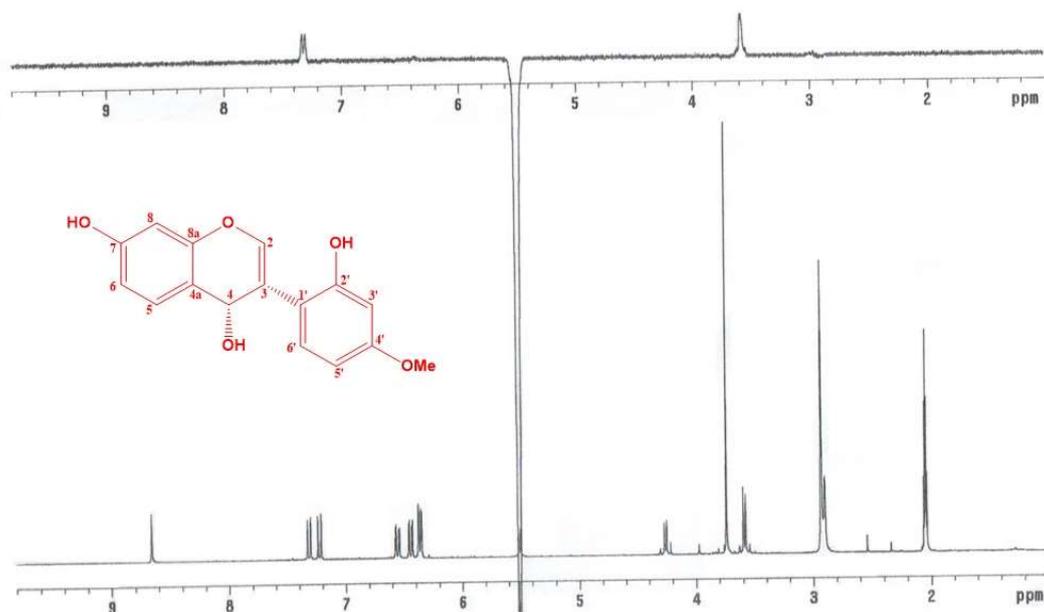


Figura 148 - Espectro de NOE diferencial ao irradiar o sinal em δ_H 5,50 (H-4 $_{equatorial}$) de **S18**, 300 MHz, CD₃OD.



5.4 Resultados das atividades biológicas de *V. guianensis*

5.4.1 Teste de difusão em disco e método adaptado de contagem de unidade formadora de colônia (UFC).

O estudo de plantas medicinais é um recurso promissor para o desenvolvimento e descoberta de novas drogas antifúngicas para tratamento de infecções fúngicas (MENEZES et al., 2011). Neste sentido submetem-se os extratos etanólicos, frações e substâncias isoladas de *V. guianensis* frente à fungos patógenos humanos.

O método de difusão em disco foi utilizado para indicar quais extratos, frações e/ou substâncias isoladas apresentavam potencial antimicrobiano. Foram considerados ativas as amostras que apresentaram o halo de inibição igual ou acima de 8 mm de diâmetro, de acordo com Packer e Luz (2007). Discos com nitrato de miconazol (antifúngico convencional) foram utilizados como controle positivo, com formação de um halo de inibição de 25 mm frente à cepa de *Trichophyton mentagrophytes* e 30 mm frente às cepas de *Microsporum gypseum*, *Candida guilliermondii* e *Trichoderma aureoviride*.

Os resultados obtidos para os microrganismos (*T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *C. guilliermondii* e *T. aureoviride*) estão apresentados na Tabela 20.

O extrato EtOH das folhas foi capaz de inibir o crescimento de *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* com a formação de halo de inibição de 18 e 15 mm, respectivamente. Já o extrato EtOH do alburno apresentou-se inativo frente às espécies de fungos avaliadas.

As frações hexânicas e acetato de etila, obtidas da partição do extrato EtOH das folhas, também apresentaram uma forte atividade antifúngica (Tabela 20). Por outro lado, não foi observado qualquer halo que demonstrasse efeito inibitório da fração hidrometanólica, frente às cepas padrão testadas.

Os resultados exibidos na Tabela 20 mostram que a atividade antifúngica apresentada pelo extrato EtOH das folhas foi mantida nas fases acetato de etila e hexânica, sobre *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*. Para a fração acetato de etila houve a formação de halo de inibição de 15 e 20 mm frente às cepas de fungos patogênicos humanos *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*, respectivamente.

Tabela 20 - Resultados do teste de difusão em disco dos extratos EtOH brutos, frações e substâncias isoladas de *V. guianensis* frente à fungos patógenos humanos.

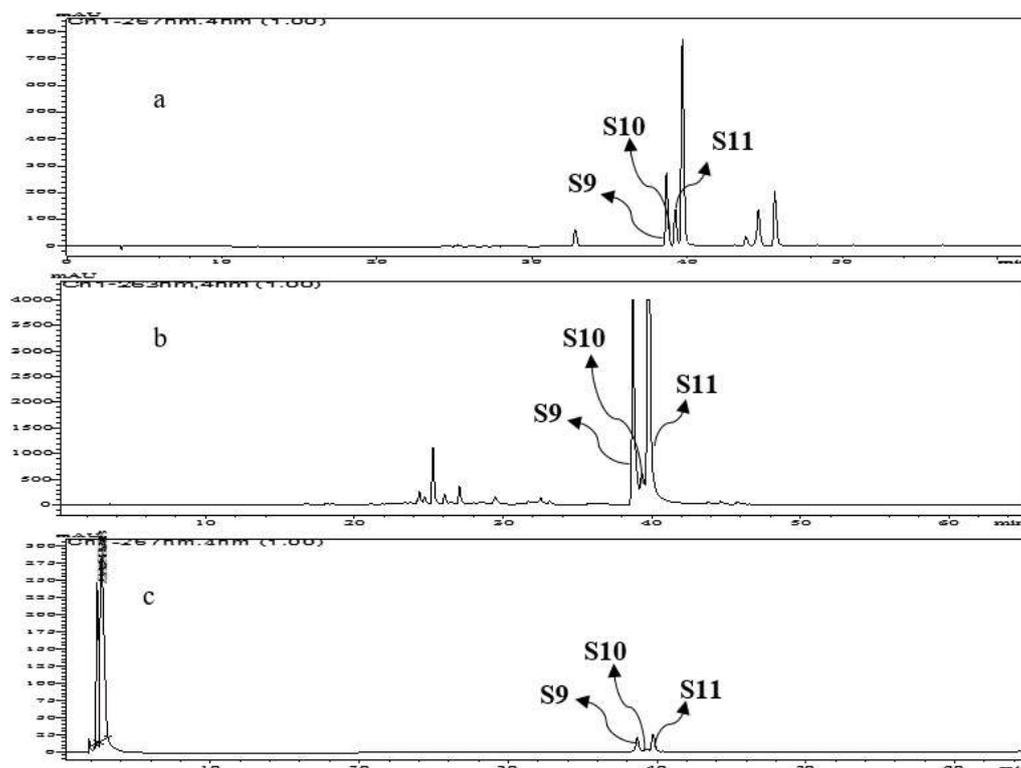
Amostras	Halo de Inibição (mm)			
	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>T. aureoviride</i>
^a Ext. EtOH das Folhas	18,0	15,0	-	-
^a Fração Hex. das folhas	11,5	15,0	-	-
^a Fração AcOEt das folhas	15,0	20,0	-	-
^a Fração MeOH/H ₂ O das folhas	-	-	-	-
^a Ext. EtOH do Alburno	-	-	-	-
S9^b	-	-	-	-
S10^b	15,0	20,0	-	-
S11^b	13,0	15,0	-	-
S13^b	-	-	-	-
S14^b	-	-	-	-
Nitrato de Miconazol*	25	30	30	30
Nitrato de Miconazol**	25	30	30	30

Legenda: (-) ausência de inibição do desenvolvimento microbiano; ^oconcentração utilizada 20 mg.mL⁻¹; ^cconcentração utilizada 10 mg.mL⁻¹; *nitrato de miconazol foi utilizado na concentração de 20 mg.mL⁻¹ e ** 10 mg.mL⁻¹, para comparação, equivalente aos extratos e substâncias isoladas, respectivamente.

As substâncias purificadas **S9**, **S10** e **S11** também foram avaliadas quanto as suas propriedades antifúngicas. Observa-se nos cromatogramas da Figura 149, que estas substâncias estão presentes nas três frações obtidas do extrato EtOH das folhas. Porém, nas frações hexânica e AcOEt os picos relativos a estas substâncias são mais intensos, o que pode representar uma maior concentração destas substâncias nessas frações, visto que se partiu de mesma concentração das frações. Os resultados obtidos para as substâncias isoladas mostram que a atividade encontrada para frações pode ser atribuída à presença das substâncias **S10** e **S11**, pois a substância **S9**, apresentou-se inativa para todo os microrganismos avaliados.

Verifica-se ainda na Tabela 20, que as substâncias **S13** (crisofanol) e **S14** (fisciona), isoladas da fração hexânica do alburno, não apresentaram atividade para nenhum dos fungos testados, corroborando com o resultado obtido com o extrato EtOH do alburno.

Figura 149 - Cromatogramas obtido via HPLC-UV, no modo analítico, das frações do extrato etanólicos das folhas de *V. guianensis*, no modo gradiente de ampla extensão, $\lambda = 267$ (a e c) e 263 (b) nm.



Legenda: a – Fração hexânica , b – Fração AcOEt, c - Fração hidrometanólica

Estas análises para avaliação da atividade antifúngica, utilizando o método de difusão em disco, foram aprofundadas pelo uso do método de avaliação quantitativa de inibição de unidade formadora de colônia (HERRERA, 2001). Para tanto, foram selecionados para a determinação da inibição de UFCs, o extrato EtOH das folhas, frações bioativas e as substâncias **S10** e **S11**. Os resultados estão apresentados na Tabela 21, os quais confirmam a atividade antifúngica apresentada pelo método de difusão em disco, visto que o extrato EtOH das folhas mostrou uma inibição moderada de unidades formadoras de colônia (UFCs) para *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*, da ordem de 29,7% e 45,6%, respectivamente. A fração hexânica mostrou-se menos ativa em comparação ao extrato bruto, por outro lado, a fração AcOEt foi mais ativa do que o extrato etanólico bruto, para os dois fungos testados.

A inibição das UFCs dos dermatófitos, apresentado pelas substâncias **S10** e **S11**, foram mais significativas do que o extrato e as frações. Ressalta-se que a substância **S11** foi mais ativa para os dois microrganismos, com inibição de 82,81% das colônias de *T. mentagrophytes*, enquanto **S10** inibiu 45,91% do mesmo microrganismo.

Tabela 21 - Resultados de inibição de UFC para extrato, frações e substâncias ativas das folhas de *V. guianensis*.

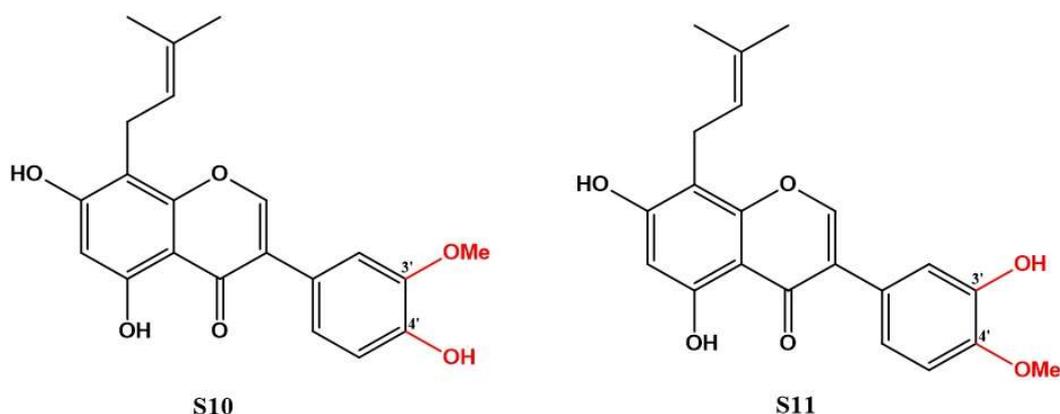
Microrganismos	Atividade antifúngica em % inibição de UFC				
	Ext. EtOH ^a	Fase Hex ^a	Fase AcOEt ^a	S10 ^b	S11 ^b
<i>T. mentagrophytes</i>	29,70 ±0,71	25,00±1,41	40,63±0,00	45,31±0,71	82,81±0,71
<i>M. gypseum</i>	45,60±2,12	14,00±0,00	61,30±2,83	57,00±1,41	68,82±2,12

Legenda: ^aconcentração utilizada 20 mg.mL⁻¹ (correspondente 2 mg/placa);

^bconcentração utilizada 10 mg.mL⁻¹ (correspondente 1 mg/placa).

As substâncias **S10** e **S11** são isômeras de posição, sendo que **S10** apresenta um grupo hidroxila na posição 4' e um grupo metoxila na posição 3', enquanto que a substância **S11**, apresenta um grupo hidroxila na posição 3' e uma metoxila na posição 4'.

Figura 150 – Estruturas das substâncias **S10** e **S11**.



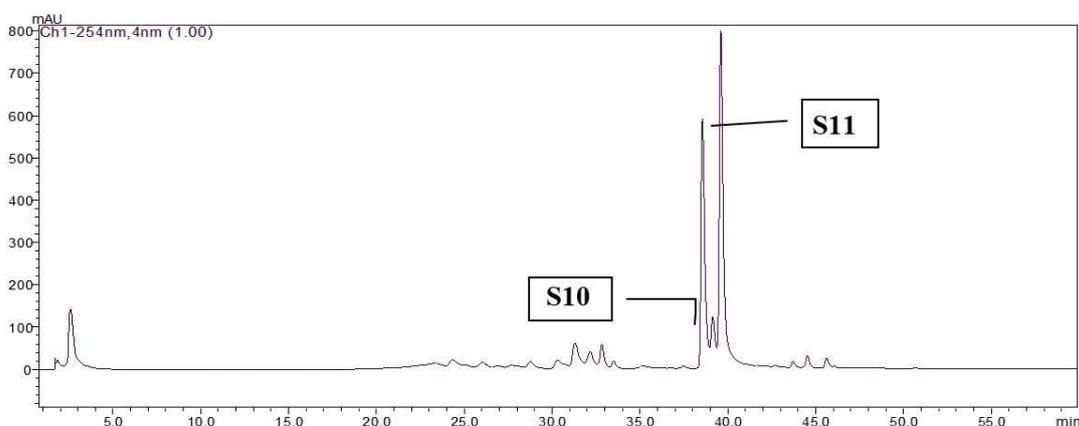
Apesar dessa pequena diferença estrutural, verifica-se uma diferença significativa no grau de atividade frente aos microorganismos *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*, sendo **S11** mais ativa do que **S10** (Tabela 21).

As estruturas das substâncias **S10** e **S11** foram otimizadas por cálculos químico-quânticos utilizando o programa *HyperChem* com o objetivo de gerar cálculos dos seguintes descritores moleculares: eletrônicos (polarizabilidade e refratividade molar) e de lipofilia e solubilidade (Log P). O Log P é um descritor de lipofilia e solubilidade, pois mede a diferença de solubilidade do composto em duas fases imiscíveis e em equilíbrio. Desta forma, foram obtidos os seguintes parâmetros, para **S10**: Polarizabilidade molecular = 108,54 °A, Refratividade = 108,54 °A, Coeficiente de partição (Log P) = -1,11 e para **S11**: Polarizabilidade molecular = 38,72 °A, Refratividade = 105,52 °A, Coeficiente de partição (Log P) = 0,55. Como Log P de **S10** é menor do que o de **S11** evidencia que esta molécula é mais hidrofílica do que **S11**, e uma vez no organismo, **S11** teria maior tendência em distribuir entre estruturas apolares (ex. membranas moleculares). Em relação aos parâmetros eletrônicos, os resultados mostram que **S10** (Polarizabilidade molecular

= 108,54 °Å) é mais polarizável que **S11** (Polarizabilidade molecular = 38,72 °Å), isso significa que **S10** possui uma estabilização intramolecular em solução maior do que **S11** (JURS; DIXON; EGOLF, 1995).

Estes dados de descritores moleculares podem justificar a maior atividade antifúngica de **S11** sobre os microrganismos *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* comparado a **S10**, pois compostos lipofílicos podem romper a estrutura da membrana microbiana com maior facilidade, portanto, as moléculas mais lipofílicas ou hidrofóbicas são mais ativas que as mais hidrofílicas e isto se deve à constituição lipoprotéica e lipídica das membranas celulares. As substâncias químicas com caráter lipofílico possuem uma maior capacidade de atravessarem as barreiras da membrana celular pelo processo de difusão passiva (ZHANEL et al., 2004; SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996, COWAN et al., 1999), sendo este transporte diretamente proporcional ao gradiente e ao coeficiente de partição lipídio/água da substância (RANG; DALE; RITTER, 1997). Considerando que **S11** apresenta mais características lipofílicas do que **S10**, como demonstrado através dos cálculos de descritores moleculares e também de acordo com a análise do cromatograma obtido em fase reversa no HPLC, exibido na Figura 151, pode-se propor uma justificativa com base no caráter lipossolúvel para o fato de **S11** apresentar uma atividade antifúngica mais elevada do que **S10**.

Figura 151 - Cromatograma obtido via HPLC-UV, no modo gradiente de ampla extensão, $\lambda = 254\text{nm}$.



5.4.2 Concentração Inibitória Mínima

Neste trabalho para verificar a ação antifúngica da espécie *V. guianensis* também utilizou-se o método da microdiluição, o qual permite determinar a menor concentração de extrato, fração ou substância pura que iniba o crescimento fúngico, após incubação (SVETAZ et al., 2010). Este método apresenta a vantagem de ser quantitativo, possuir maior sensibilidade comparado a outros métodos, e é recomendado, tanto para amostras hidrossolúveis, como lipossolúveis (RIOS;

RECIO; VILLAR, 1988, TRABULSI et al., 1999, OSTROSKY, et al., 2008). Este método também permite determinar se um composto ou extrato tem ação fungicida ou fungistática com uma concentração específica (SCORZONI et al., 2007). Além de ser recomendado como padrão geral de metodologia para o teste com produtos naturais (HADACEK; GREGER, 2000).

O critério utilizado para a classificação da atividade de *V. guianensis* foi para considerar-se como ativos aqueles extratos com CIMs $\leq 800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e os compostos puros com CIMs $\leq 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valores esses baseados no trabalho de Stein et al. (2006).

Os resultados das CIMs obtidas neste trabalho estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Determinação da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de fungos por extratos EtOH, frações e substâncias de *V. guianensis*.

Amostras	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	Cp	Ca	Ck.	Cd	Fp ^a	Fp ^b
Extrato EtOH Folhas	>64	>64	>64	32	>64	64
Fração hexânica das Folhas	64	>64	>64	64	64	64
Fração AcOEt das Folhas	8	16	8	8	32	16
Fração MeOH/H ₂ O das Folhas	>64	>64	>64	>64	>64	>64
S9	>64	>64	>64	32	>64	>64
S11	32	>64	>64	8	>64	64
Extrato EtOH Alburno	64	>64	>64	16	>64	>64
Fluconazol	64	>64	64	2	>64	>64

Legenda: Cp (*Candida parapsilosis* ATCC 22019), Ca (*Candida albicans* INGOS 40175), Ck (*Candida krusei* ATCC 6258), Cd (*Candida dubliniensis* CBS 7987), Fp^a (*Fonsecaea pedrosoi*, paciente 21507), Fp^b (*Fonsecaea pedrosoi*, paciente 35641).

A concentração mínima inibitória para o extrato EtOH das folhas foi de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. dubliniensis* e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *F. pedrosoi* (paciente 35641), enquanto o extrato EtOH do alburno apresentou CIM 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. Parapsilosis* e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. dubliniensis*. Em um estudo realizado por Panda; Brahma; Dutta (2010), foi relatado que o extrato EtOH das folhas de *Cassia fistula* frente a *C. Parapsilosis* apresentou um CIM de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, isso mostra que o extrato EtOH do alburno foi aproximadamente 12 vezes mais ativo frente a *C. Parapsilosis* que o extrato EtOH das folhas de *Cassia fistula*.

O extrato EtOH das folhas e alburno apresentaram 390 e 781 vezes mais ativo frente *C. dubliniensis* do que do extrato aquoso de *Arctium minus* (bardana) que apresentou um CIM de 12500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. dubliniensis* (LUBIAN et al.; 2010), porém é menos ativo quando comparado ao controle positivo Fluconazol (Tabela 22).

Para as demais cepas de fungos (*C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. krusei*) avaliadas na concentração máxima de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tanto o extrato EtOH das folhas, como do alburno não apresentaram inibição significativa do crescimento microbiano.

O extrato EtOH das folhas, fração hexânica e a substância 5,7,3'-triidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-4'-metoxi-isoflavona (**S11**) apresentaram um CIM de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente ao fungo *F. pedrosoi*, já a fração AcOEt apresentou uma atividade maior com CIM de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o isolado clínico *F. pedrosoi* (35641) e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o isolado clínico *F. pedrosoi* (21507). Estes resultados mostram uma atividade mais significativa do que a apresentada pelo antifúngico padrão (Fluconazol), o qual apresentou CIM maior que 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em um estudo realizado por Cruz et al. (2007), foi mostrado que os extratos de *Ziziphus joazeiro* e *Caesalpinia pyramidalis* apresentaram CIM de 400 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o fungo *F. pedrosoi*, respectivamente, isso mostra que o extrato EtOH das folhas e as fração hexânica de *V. guianensis* são 6 vezes mais ativo que o extrato de *Ziziphus joazeiro*. Daboit et al. (2011) relataram variação de CIM de 625 a 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para amostras de própolis frente ao microrganismo *F. pedrosoi*.

Estes resultados relatados neste trabalho para *V. guianensis* frente ao agente etiológico da cromoblastomicose são bastantes promissores, uma vez que esta é uma doença de difícil tratamento e os derivados azólicos (voriconazol, posaconazol) possui indicação formal de uso. Apesar da eficácia da droga em destruir o fungo, o tratamento normalmente é muito longo, variando de 6 meses a mais de 3 anos e não existem estudos controlados que tenham acompanhado os pacientes por todo este período para verificar a real taxa de cura do itraconazol (SALGADO, 2007).

A substância lupiwighteona (**S9**) apresentou CIM de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *C. dubliniensis*, enquanto a substância 5,7,3'-triidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-4'-metoxi-isoflavona (**S11**) apresentou uma atividade maior (CIM de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados corroboram com a atividade apresentada tanto para o extrato bruto como para as frações frente a *C. dubliniensis*.

Com relação à atividade fungicida, a fração AcOEt das folhas apresentou Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. dubliniensis*. E CFM maior que 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as cepas de *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. krusei*. Para todas as demais espécies de fungos, os extratos, frações e substâncias de *V. guianensis* não apresentaram atividade fungicida. O extrato de alburno apresentou CFM maior que 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. dubliniensis*, e o extrato das folhas apresentou-se menos ativo com CFM maior que 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para mesma espécie. Os resultados de atividade fungicida apresentadas para *V. guianensis* são melhores do que apresentados para o extrato EtOH de *Cassia fistula*, a qual apresentou CFM de 6000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (PANDA; BRAHMA; DUTTA, 2010).

Os resultados discutidos até aqui permitem concluir que os extratos, frações e as substâncias **S10** e **S11** de *V. guianensis* apresentam significativa atividade antifúngica, resultados estes que apoiam o uso popular desta planta no tratamento de infecções da pele, corroborando a importância dos levantamentos etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de bioatividade, auxiliando assim na busca de novas drogas bioativas, oriundos de fontes vegetais, para combater enfermidades que acometem os seres humanos.

5.4.3 Resultados da atividade antioxidante

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante, em termos de % de inibição do radical livre DPPH, os extratos EtOH das folhas e do alburno de *V. guianensis* mostraram alta capacidade destes de sequestrar os radicais livres DPPH. As concentrações ensaiadas para os extratos das folhas foram de 2,5 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtendo-se percentagens de inibição de DPPH que variaram de 22,0% a 77,2%, indicando propriedade antioxidante significativa. Já as concentrações usadas para o alburno variaram de 2,0 a 8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tendo-se obtido percentuais de inibição de DPPH variando de 28,8% a 87,8%, apontando, assim, para o extrato etanólico do alburno uma propriedade antioxidante mais elevada do que a observada para os extratos das folhas. Pode-se observar que ocorre um aumento linear da porcentagem de atividade antioxidante com o aumento da concentração. Estes resultados da avaliação da atividade sequestradora de radical DPPH dos extratos etanólicos das folhas e do alburno de *V. guianensis* e do controle positivo Trolox, estão apresentados na Tabela 23.

A partir da curva de inibição obtida por regressão linear dos valores de concentração do radical DPPH e de suas absorbâncias a 517 nm, foi possível determinar a concentração efetiva CE_{50} (concentração efetiva capaz de reduzir o radical DPPH em 50%). Os resultados confirmam que o extrato etanólico do alburno apresenta maior poder antioxidante ($CE_{50} = 3,7 \pm 0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparado ao controle positivo Trolox ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e também ao extrato etanólico das folhas ($CE_{50} = 6,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Este resultado qualifica-o como um extrato de alta capacidade de sequestrar radicais livres, pois apresenta valor de CE_{50} menor que apresentado por diversas plantas, reconhecidamente fortes antioxidantes, como a erva-mate, $CE_{50} = 252,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (BERTÉ et al., 2011) e o Chá verde, $CE_{50} = 140,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MORAIS et al., 2009).

Tabela 23 - Porcentagem de inibição do radical DPPH provocada pelos extratos etanólicos das folhas e do alburno de *V. guianensis*, pelas substâncias **S10** e **S11** e pelo controle positivo (Trolox). Também apresentados os dados de CE₅₀ (µg.mL⁻¹).

Amostras	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Inibição do DPPH (%)	CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Extrato das folhas	10,0	77,2	6,2 ± 0,4
	7,5	57,5	
	5,0	44,6	
	2,5	22,0	
Extrato do alburno	8,0	87,8	3,7 ± 0,3
	6,0	76,7	
	4,0	56,6	
	2,0	28,8	
S10	75,0	76,0	26,62 ± 0,1
	50,0	64,5	
	25,0	55,9	
	12,5	36,0	
S11	150,0	66,8	81,27 ± 0,1
	100,0	58,0	
	50,0	50,9	
	25,0	37,6	
TROLOX	12,5	15,18	4,5 ± 0,1
	8,0	89,3	
	6,0	63,4	
	4,0	44,5	
	2,0	24,6	

A atividade antioxidante dos extratos de plantas é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos (JAYAPRAKASHA et al., 2007), como flavonoides e antraquinonas, os quais foram isolados do alburno dessa planta e submetidos ao ensaio com DPPH para avaliar se esses constituintes químicos contribuíam para a alta atividade sequestradora de radical apresentada pelos extratos.

Os resultados obtidos a partir das isoflavonas isoladas (**S6-S12**), evidenciaram que todas as amostras testadas foram capazes de reduzir os radicais livres DPPH[•]. No entanto, as substâncias **S6**, **S7**, **S8**, **S9** e **S12** apresentaram atividade muito baixa, com uma porcentagem de inibição abaixo de 50,0%, a 100 µg.mL⁻¹. Os compostos **S10** e **S11** apresentaram maior capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH), com porcentagem de inibição superior a 50,0%, durante 60 minutos de reação (Tabela 23). As substâncias **S10** (CE₅₀ = 26,62 ± 0,1 µg.mL⁻¹) e **S11** (CE₅₀ = 81,27 ± 0,1 µg.mL⁻¹) foram cerca de 6 e 18 vezes menos ativas do que Trolox (CE₅₀ = 4,5 ± 0,1 µg.mL⁻¹).

A isoflavona **S10** foi três vezes mais eficaz na redução dos radicais livres de DPPH[•] do que a substância **S11**. Estudos mostram que a estabilidade do radical livre flavanoil formado depende da habilidade do flavonoide em deslocar o elétron desemparelhado, e a presença de hidroxilas em *orto* com o grupo metoxila, doador

de elétrons, é um fator que auxilia nessa deslocalização, proporcionando uma maior estabilidade ao radical fenoxila, assim que ele se forma, após a doação de um hidrogênio do radical para DPPH*, com isso aumenta a eficiência antioxidante do composto (CUVELIER, RICHARD; BERSET, 1992, BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, RIBEIRO et al., 2005), em conjunto com a sua conjugação estendida através do sistema carbonila α,β -insaturado, no anel C, sendo estas, algumas das principais características estruturais associadas com a atividade antioxidante dos flavonoides (VAN ACKER et al. 1996).

A substância **S12** mostrou-se menos ativa do que a **S11**. Estudos mostram que a presença de um substituinte (resíduos de açúcar) na posição C-7 do anel A, em flavonoides, reduz a atividade sequestradora de radicais, uma vez que a estrutura dos flavonoides perde a sua coplanaridade, devido à presença de grupos volumosos (ALVES et al., 2005, KHLEBNIKOV et al., 2007).

As antraquinonas crisofanol (**S13**) e fisciona (**S14**) foram inativas, e este resultado corrobora com dados apresentados por Krenn et al. (2003). Da mesma forma, a isoflavona (**S17**) e o isoflavan-4-ol (**S18**), na concentração máxima testada de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, exibiram valores de atividade sequestradora de radical DPPH inferiores a 50%, inviabilizando a determinação da CE_{50} . Diante destes resultados, sugere-se que a alta atividade antioxidante apresentada pelos extratos etanólicos das folhas e alburno de *V. guianensis* pode ser atribuída ao efeito de sinergismo das substâncias presentes nestes extratos ou à existência de substâncias responsáveis por tal atividade ainda não isoladas da fração hexânica, acetato de etila e/ou hidrometanólica desses órgãos vegetais.

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das folhas e alburno de *V. guianensis* resultou no isolamento e identificação estrutural de dezoito substâncias pertencentes à diferentes classes químicas, tais como: antraquinonas, isoflavonas, triterpenos e esteroides. Destaca-se que a classe das isoflavonas está sendo citada pela primeira vez para a espécie. A presença destas classes é de grande importância quimiotaxônomica para caracterizar o gênero *Vatairea*.

Dentre as substâncias isoladas destacam-se a 5,3'-diidroxido-4'-metoxido-2'',2''-dimetilpirano-(5'',6'':8,7)-isoflavona (**S7**), 5,7-diidroxido-3',4'-metilendioxi-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona (**S8**), 5,7,3'-triidroxido-4'-metoxido-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona (**S11**), 5,3'-diidroxido-4'-metoxido-7-O-β-glicopiranosídeo-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona (**S12**) e *cis*-7,2'-diidroxido-4'-metoxido-isoflavan-4-ol (**S18**), as quais são novos produtos naturais. No entanto, com exceção das antraquinonas fisiona (**S13**), crisofanol (**S14**) e dos esteroides sitosterol (**S15**) e estigmasterol (**S16**), todos os metabólitos secundários isolados e identificados, neste trabalho, são relatados pela primeira vez para o gênero *Vatairea*.

Os resultados dos testes de atividade antifúngica, foram bastante relevantes e podem dar fundamentação científica ao uso desta planta por comunidades tradicionais da região amazônica para o tratamento de infecções da pele, causadas pelos fungos dermatofíticos. Os resultados obtidos para as substâncias isoladas das folhas, mostrou que a atividade encontrada no extrato e frações deve-se à presença de pelo menos duas substâncias 5,7,4'-triidroxido-8-(3,3-dimetilalil)-3'-metoxido-isoflavona (**S10**) e 5,7,3'-triidroxido-4'-metoxido-8-(3,3-dimetilalil)-isoflavona (**S11**). Ressalta-se ainda que a substância **S9** apresentou atividade apenas frente a *Candida dubliniensis* (CIM = 32 µg.mL⁻¹), no entanto, este resultado é 16 vezes menor que a atividade apresentada pelo antifúngico comercial fluconazol (CIM = 2 µg.mL⁻¹).

Os extratos etanólicos do alburno e das folhas de *V. guianensis* mostraram alta capacidade destes de sequestrar os radicais livres de DPPH, enquanto as isoflavonas e antraquinonas testadas apresentaram baixa capacidade anti-radicalar, o que sugere que a maior ação antioxidante apresentada pelos extratos pode estar associada com o sinergismo entre os seus constituintes fenólicos.

Torna-se oportuno salientar que os resultados encontrados neste estudo são relevantes e promissores, pois mostram que esta planta apresenta várias atividades biológicas, as quais estão sendo relatadas pela primeira vez para a espécie *Vatairea guianensis*.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. K.; SINGH, S. S.; VERMA, S.; KUMAR, S.; Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 43-46, 2000.
- AHMED, I.; ADEGHATE, E.; SHARMA, A. K.; PALLOT, D. J.; SINGH, J.; Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 40, n. 3, p. 145-151, 1998.
- AHMED, M.; KHALEDUZZAMAN, M.; ISLAM, S. M.; Isoflavan-4-ol, dihydrochalcone and chalcone derivatives from *Polygonum lapathifolium*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 2009-2011, 1990.
- AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A.; Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4038-4039, 1992.
- AHN, E.; NAKAMURA, N.; AKAO, T.; KOMATSU, K.; QUI, M.; HATTORI, M.; Prenylated flavonoids from *Moghania philippinensis*. **Phytochemistry**, v. 64, n.8, p. 1389-1394, 2003.
- AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P.; Synthesis of lupiwighteone via a *para*-Claisen-Cope rearrangement. **Tetrahedron**, v. 59, n. 23, p. 4177-4181, 2003.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e Ciência: Revista da Rede de Ensino FTC**, v. 5, n. 12, p. 1-8, 2007
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA, Jr. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMIÉ, D.; DAVIDOVIÉ-AMIÉ, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIÉ, N.; Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica chemical acta**, v. 76, n. 18, p. 55-61, 2003.

- BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG M. C.; FURLAN M. A.; Chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899–902, 1999.
- BANDEIRA, P. N.; DE FARIAS, S. S.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; COSTA, S. M. O.; New Isoflavone Derivative and Other Flavonoids from the Resin of *Amburana cearensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 372-375, 2011.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BASTOS, G. N. T.; OLIVEIRA KRM; HAMOY, M; MACCHI, B. M; NASCIMENTO, J. L. M. Óleo essencial de *Mansoa standley*: utilizações etnofarmacológicas. In: SOUZA FILHO, SILVA, Antonio Pedro da; NASCIMENTO, José Luiz Martins do. (Org.). **Aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas**. 1.ed. Belém - PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2012, v. 10, p. 133-143.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk metodo. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1996.
- BENAVIDES, A.; BASSARELLO, C.; MONTORO, P.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; Flavonoids and isoflavonoids from *Gynerium sagittatum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1277–1284, 2007.
- BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523–5527, 2011.
- BOHM, B. A.; CHOY, J. B.; LEE, A. Y. M.; Flavonoids of *Balsamorhiza and Wyethia*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 501-503, 1989.
- BOJASE, B.; WANJALA, C. C. W.; MAJINDA, R. R. T.; Two new isoflavanoids from *Bolusanthus speciosus*. **Bulletin of the Chemical Society Ethiopia**, v.15, n. 2, p. 131–136, 2001.
- BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLIS, V.; SAUL, A.; Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 247–254, 2004.

- BRANDAO, H. N.; David, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M.; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASILEIRO, B. G.; PIZZILO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M.; Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no Programa de Saúde da Família, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L.; Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-60, 1997.
- CARDOSO, D. B. O. S. 2013. **Vatairea** in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23208>>. Acesso em: 24 jul 2013.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard**—Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1982. p. 111
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 2009.
- CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR, A. M.; MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C.; Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409–412, 2007.
- CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C.; Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structureactivity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324-235, 1992.
- DABOIT, T. C.; SANTOS, C. J.; SALLES, L. A.; HEIDRICH, D.; STOPIGLIA, C.D.O.; POSER, G.V.; SCROFERNEKER, M.L.; Antifungal Activity of Propolis Against *Fonsecaea pedrosoi*, a Chromoblastomycosis Agent. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 1, p. 68-72, 2011.

DE LA CRUZ, Mari Gemma. **Plantas medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros**, 1.ed. Cuiabá-MT: Carlini e Caniato Editorial, 2008, 224 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products (A Biosynthetic Approach)**. 3. ed. John Wiley e Sons: Baffins Lane; Chichester; West Sussex; England, 1997, 195 p.

DHANASEKARAN, D.; VINOITHINI, K.; LATHA, S; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A.; Human dental biofilm: Screening, characterization, in vitro biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* spp. **The Saudi Journal for Dental Research**, v. 5, n. 1, p. 55–70, 2014.

DROGE, W.; Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA. C.; Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ERASTO, P.; BOJASE-MOLETA, G.; MAJINDA, R. R.T.; Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 875–880, 2004.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K.; Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FORMIGA, M. D.; GOTTLIEB, O. R.; MENDES, P. H.; KOKETSU, M.; ALMEIDA, M. E. L.; PEREIRA, M. O. S.; MAGALHÃES, M. T.; Constituents of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 14, p. 828, 1975.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P.; Angiospermas. In.: FORZZA, R. C. et al (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v. 2. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1098.

GARCIA-ROSA, K.; VILLARREAL-ALVAREZ, N.; BBEN, P., PENˆA-RODRIGUEZ, L. M.; Chrysophanol, na antimicrobial anthraquinone from the root extract of *Colubrina greggii*. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 50, n. 2, p. 76–78, 2006.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B.; RIVERA, I. N. G.; Características Gerais das micoses. In: TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio (ORG) **Microbiologia**. 5 ed. editora São paulo: Atheneu, 2008. p.493-503.

GOULART, M. O. F. et al. Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofilonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p.95-100, 1993.

HABILA, J. D.; NDUKWE, G. I.; AMUPITAN, J. O.; NOK, A. J.; MIKHAIL, S. A.; LADAN, Z.; 3 β -hydroxyllup-20(29)-em-28-oic acid: Structural elucidation, *Candidosis* and mold inhibition evaluation. **Journal of Medicinal Research**, v. 4, n. 18, p. 933-1947, 2010.

HADACEK, F.; GREGER, H.; Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay of choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HALLIWELL, B.; Antioxidant Characterization, Methodology and Mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HAMZA, S. H., P. J. MERCADO, H. G. SKELTON, AND K. J. SMITH. An unusual dematiaceous fungal infection of the skin caused by *Fonsecaea pedrosoi*: a case report and review of the literature. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 5, p. 340–343, 2003.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 481-504, 2000.

HASTINGS, J. M.; HADDENN, M. K.; BLAGG, B. S.; Synthesis and evaluation of derrubone and select analogues. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 369-373, 2008.

HERRERA, A. G. Psychrotrophic Microorganisms: Agar Plate Methods, Homogenization, and Dilutions. In: Spencer, J. F. T and Ragout de Spencer Humana, A. L. (Edited). **Food Microbiology Protocols**. Series: Methods in Biotechnology, v. 14, 2001, p. 3-10.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENA, B. S.; RAO, L. J. M.; Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n.1, p. 330-336, 2007.

JURS, P. C.; DIXON, S. L.; EGOLF, L. M. **Em Chemometric Methods in Molecular Design**; van de Waterbeemb, H.; ed.; VCH: Weinheim, 1995.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S.; The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KHLEBNIKOV, A. I.; SCHEPETKIN, I. A.; DOMINA, N. G.; KIRPOTINA, L. N.; QUINN, M. T.; Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1749-1770, 2007.

KRENN, L.; PRESSER, A.; PRADHAN, R.; BAHR, B.; PAPER, D. H.; MAYER, K. K.; KOPP, B. Sulfemodin 8-O-beta-D-glucoside, a new sulfated anthraquinone glycoside, and antioxidant phenolic compounds from *Rheum emodi*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 8, p.1107-1109, 2003.

LIMA, H. C. Revisão taxonômica do gênero *Vatairea* (Leguminosae-Faboideae). **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 26, p. 173- 213. 1982.

LIU, J.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, C.; LU, S.; LIU, J.; The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays*L.) and related flavone glycosides. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 261–269, 2011.

LUBIAN, C. T; TEIXEIRA, J. M; LUND, R. G; NASCENTE, P. S; DEL PINO, F. A. B.; Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n. 2, p.157-162, 2010.

LUO, Y.; LI, X.; HE, J.; SU, J.; PENG, L.; WU, X.; DU, R.; ZHAO, Q.; Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels. **Food Chemistry**, v. 164, n. 1, p. 30-35, 2014.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.; ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

- MARIN, P. D.; GRAYER, R. J.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; KITE, G. C.; VEITCH, N. C.; Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1247-1253, 2004.
- MÁXIMO, P.; LOURENÇO, A.; FEIO, S. S.; ROSEIRO, J.C.; A new prenylisoflavone from *Ulex jussiaei*. **Z Naturforsch C**, v. 57, n. c, p. 609-613, 2002.
- MEIS, J. F.; VERWEIJ, P. E. **Current management of fungal infections**. *Drugs.*; 61 Suppl 1: p. 13-25, 2001.
- MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B.A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V.; Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1 ed. Brasília, DF: [S.n], 2009.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **The Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.
- MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L.; (2014). **MICOLOGIA**. Disponível em <http://www.epsiv.fiocruz.br/upload/d/cap4.pdf>, acesso em 28/08/2014.
- MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E.; Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 392-396, 2006.
- MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C.P; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P.; TEMPONI, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

NARA, K.; NIHEI, K.; OGASAWARA, Y.; KOGA, H.; KATO, Y.; Novel isoflavone diglycoside in groundnut (*Apios americana* medik). **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 703-710, 2011.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; PURNIMA, B.; QAZI, G. N. New isoflavones from *Iris kashmiriana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 12, p. 1137-1141, 2008.

NES, W. D.; NORTON, R. A.; BENSON, M.; Carbon-13 NRM studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C] mevalonates. **Phytochemistry**, v. 31, p. 805-811, 1992.

OLIVEIRA, A. A.; SEGOVIA, J. F. O.; SOUSA, V. Y. K.; MATA, E. C. G.; GONÇALVES, M. C. A.; BEZERRA, R. M.; JUNIOR, P. O. M.; KANZAKI, L. I. B.; Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. **SpringerPlus**, v. 2, p. 371-376, 2013.

OSTROSKY; E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-302, 2008.

OTTOBELLI, I.; FACUNDO, V. A.; STABILE, R. G.; ZULIANE, J.; FROTA, D. B.; BADRA, L. C.; OTTOBELLI, R. M.; BRASIL, H. O. B.; TOMÉ, J. C. L.; MACEDO, S. R. A.; LUZ, C. C.; SILVA-JARDIM, I.; Estudo Fitoquímico e atividade leishmanicida de *Vatairea guianensis* Aubl. (FABACEAE). **Revista Patologia Tropical**, v. 38, supl.2, p. 1319, 2009.

OTTOBELLI, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J.; LUZ, C. C.; BRASIL, H. O. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; BRAZ-FILHO, R.; Estudo químico de duas plantas medicinais da Amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (Fabaceae). **Acta amazônica**, v. 41, n. 3, p. 393 - 400, 2011.

OZDEN, S.; DURUST, N.; TOKI, K.; SAITO, N.; HONDA, T.; Acylated kaempferol glycosides from the flowers of *Delphinium formosum*, **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 241-245, 1998.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S.; Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p.102-107, 2007.

PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. Orlando: Academic Press, 1999. 511p.

PANDA, S. K., BRAHMA, S. DUTTA, S. K. Selective antifungal action of crude extracts of *Cassia fistula* L.: A preliminary study on *Candida* and *Aspergillus* species. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 62-68, 2010.

PAOLETTI, T.; FALLARINI, S.; GUGLIESI, F.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; LOMBARDI, G.; Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, n- 1-3, p. 120–130, 2009.

PFALLER M. A.; DIEKEMA, D. J.; Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n.1, p.1-53, 2010.

PFALLER, M. A.; Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3–S13, 2012. Suppl. 1.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; Ethnopharmacology and Western Medicine. **Jounal Ethnopharmacoly**, v. 25, n. 1, p. 61-72, 1989.

PIECADE, L. R. WOLTER FILHO, W. Antraquinonas de *Valtairea guianensis* Aubl. (Fabaceae). **Acta Amazonica**, v. 18, p. 185- 187, 1988.

PIETTA, P. G.; Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

PONTÓN; J.; QUINDÓS, G.; Mecanismos de resistência a la terapéutica antifúngica, **Medicina Clínica**, v. 126 p. 56-60, 2006. Supl 1.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**. 3 ed. Guanabara Koognan, Rio de Janeiro, 1997. 692 p.

RASHED, K.; CIRIC, A.; GLAMOCLIJA, J.; SOKOVI, M.; Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 210–215, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, A. B.; BOLAZANI, V. S., YOSHIDA, M.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; SILVA, D.H.S.; A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3b, p. 526-530, 2005.

RIBEIRO, E. L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G. ; NAVES, P. L. F.; DIAS, S. M. S.; Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 189-192, 2006.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A.; Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **Traditional Medicines: Global Situation Issues and Challenges The World Medicines Situation Report 2011**. World Health Organization April 2011. Disponível em: <Downloaded from www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/en/ > Acesso em: 23 mar 2011.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPONDMA, Y.; JANSAKUL, C.; TAYLOR, W. C.; Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. **Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 827-34, 2002.

SALGADO, C. S.; Micoses profundas. **Anais da reunião anual da SBPC**, 59, 2007, Belém, PA.

SANTOS, Alberdan S ; BANNA, D. A. D. S. ; DEUS, R. J. A. ; NUNES, F. M. ; ARRUDA, M. S. P. ; GUILHON, Giselle Maria S Pinheiro ; XAVIER, Luciana Pereira. Investigação da Atividade Antimicrobiana em Folhas do cipó-de-alho. In: SOUZA FILHO, Antonio Pedro da Silva; NASCIMENTO, José Luiz Martins do. (Org.). **Aspectos botânicos, químicos e moléculas bioativas**. 1.ed. v. 10. Belém - PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2012a, p. 144-155.

SANTOS, J. F. L.; PAGANI, E.; RAMOS, J.; RODRIGUES, E.; Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 503–515, 2012b.

SARTI, Silvio José. Fitoterápicos e Fitoterapia. In: FERRO, Degmar (Org). **Fitoterapia- Conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 359-369, 1996.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N.; Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C. A. Sm. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 238-244, 2008.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R.; Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n.6, p. 487-495, 2007.

SILVA, C. T. L.; MEDEIROS; B. J. S.; SANTOS, K. C.; PEREIRA FILHO, R.; ALBUQUERQUE JR, R. L. C.; SOUSA, P. J. C.; CARVALHO, J. C. T.; Topical healing activity of the hydroethanolic extract from the seeds of *Vatairea guianensis* (aubl.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2011a.

_____. MENDONÇA, L. C.; MONTEIRO, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Antimicrobial activity of extracts obtained from the seeds of *Vatairea guianensis* (Aubl.). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 10, n.5, p. 462, 2011b.

SILVA, J. K.R.; ANDRADE, E. H.A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G.S.; Essential Oil Composition, Antioxidant Capacity and Antifungal Activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 3, p. 477 - 480, 2010.

SIMATUPANG, M. H.; DIETRICH, H. H.; GOTTWAL, H.; Uber die hautreizenden stoffe in *Vatairea guianensis*. **Aubt. Holsforschung**, v. 21, p. 87, 1967.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 1, p. 3 - 14, 1996.

SNYDER, L. R.; KIKERLAND, J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. John Wiley e Sons, p. 282 - 287, 1997.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M.L. B.; ANDRADE, C.H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. S.; Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n.4, p. 439-442, 2001.

STEIN, A. C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; POSER, G. V.; Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 95–98, 2006.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CÁCERES, A.; CECHINEL FILHO, V.; GIMÉNEZ, A.; PINZÓN, R.; ZACCHINO, S. A.; GUPTA, M.; Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 137–158, 2010.

TANG, H.; ZHENG, C.; LV, J.; WU, J.; LI, Y.; YANG, H.; FU, B.; LI, C.; ZHOU, Y.; ZHU, J.; Synthesis and antifungal activities in vitro of novel pyrazino [2,1-a] isoquinolin derivatives. **Journal Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 979-82, 2010.

TORRES-GUERRERO, E.; ISA-ISA, R.; ISA, M.; ARENAS, R.; Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 403–408, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 5 ed. São paulo: Atheneu, 2008, p.493-503.

_____. GOMPertz, O. F. CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

TSUKAYAMA, M.; KAWAMURA, Y.; TAHARA, H.; Synthesis of 4',5- and 3', 4', 5'-oxygenated pyranisflavones: alpinun-isoflavone and related compounds, and a revised structure of derrone. **Heterocycles**, v. 3, p. 505-516, 1992.

VAN ACKER, S. A.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A.; Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342,1996.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. p. 47-69. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (eds), **Methods in Plant Biochemistry**, Ed. Academic Press, London, 1991.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO L.; OOMAH B. D.; Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain mproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113–4117, 1998.

WÄTJEN, W.; WEBER, N.; LOU, Y. J.; WANG, Z. Q.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKÖTTER, A.; KAHL, R.; PROKSCH, P.; Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 119–124, 2007.

WON, D.; SHIN, B.; KANG, S.; HUR, H.; KIM, M.; HAN, J.; Absolute configurations of isoflavan-4-ol stereoisomers. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 15, p. 1952–1957, 2008.

WOODFOLK, J. A. Allergy and dermatofhytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 30-43, 2005.

XI, W.; FANG, B.; ZHAO, Q.; JIAO, B.; ZHOU. Z.; Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (*Citrus grandis* Osbeck.) varieties. **Food Chemistry**, v.161, p. 230–238, 2014.

XIAOLI, L.; NAILI,W.; SAU, W. M.; CHEN, A. S. C.; XINSHENG, Y.; Four New Isoflavonoids from the Stem Bark of *Erythrina variegata*. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 570-573, 2006.

YAHARA, S.; OGATA, T.; SAIJO, R.; KONISHI, R.; YAMAHARA, J.; MIYAHARA, K. NOHARA, T.; Isoflavan and related compouns from *Dalbergin odorífera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 979-987, 1989.

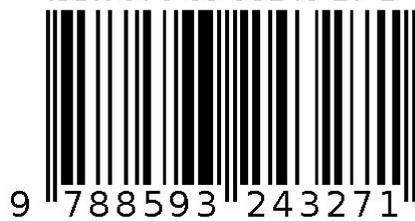
YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F.; Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, n. 6, p.747-751, 2001.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V.; Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 3, p. 176–186, 2001.

ZHANEL, G. G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J. A.; HOBAN, D. J.; The glycyliclins: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**, v. 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-93243-27-1



9 788593 243271