



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

Estudo de Plantas Bioativas

Josiane de Souza Luna

Recife-PE Brasil

Março / 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo de Plantas Bioativas

Josiane de Souza Luna*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Co-Orientador: Prof. Dr. Lothar Wilhelm Bieber

***Bolsista CNPq**

Recife-PE Brasil

Março / 2006

Luna, Josiane de Souza

Estudo de plantas bioativas / Josiane de Souza Luna –
Recife : O autor, 2006.
xv 233 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. I. Título.

546

CDD (22.ed.)

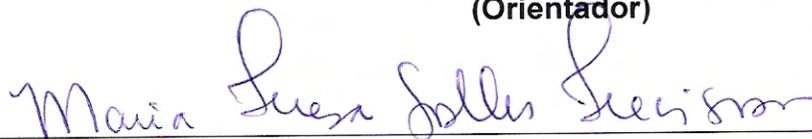
FQ2006-0011

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

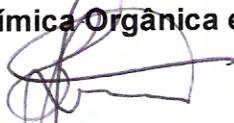
Aprovada:



Profº Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Departamento de Química da UFAL
(Orientador)



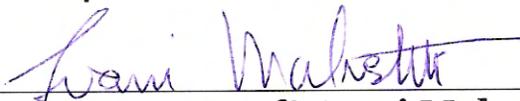
Profª Maria Teresa Salles Trevisan
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFCE



Profº Brás Heleno de Oliveira
Departamento de Química da UFPR



Profª Simone Maria da Cruz Gonçalves
Departamento de Química Fundamental da UFPE



Profª Ivani Malvestiti
Departamento de Química Fundamental da UFPE

“Estudo de Plantas Bioativas”.

por

Josiane de Souza Luna

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
31 de março de 2006

Dedico

Primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida me proporcionando muitas alegrias e sempre me dando força para superar as dificuldades;

Aos meus queridos pais **Joatan Correia de Luna** e **Generita de Souza Luna** pelo imenso amor, carinho, apoio, incentivo e dedicação. Muitíssimo obrigada;

Aos meus amados irmãos **Josinaldo** e **Josimeires** sempre tão carinhosos e dedicados;

Aos meus maravilhosos padrinhos **Nino** e **Dalva** pelo carinho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pelo conhecimento transmitido, apoio, estímulo, paciência, amizade e orientação. Minha eterna gratidão e admiração;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de Doutorado;

À minha sobrinha Larissa e ao meu cunhado Leonardo pelo carinho;

Aos grandes amigos da Universidade Federal de Pernambuco Aderivaldo e Patrícia pelo apoio que sempre me deram;

Aos companheiros da Universidade Federal de Pernambuco Mariene, Clécio, Fernando Tupolevck, e Joacir pelos bons momentos que passamos juntos;

Aos professores do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco pelos conhecimentos adquiridos;

Aos companheiros de laboratório da Universidade Federal de Alagoas Charles, Emília, Everton, Jhonnatan, Rosevaldo e Sâmia pelos bons momentos que passamos juntos;

Às amigas Cenira e Raquel pela ajuda na realização deste trabalho e por todo o carinho e amizade;

Às amigas Jussara, Valdiléa e Adriana pela força que sempre me deram;

Ao professor Brás Heleno de Oliveira por ter me acolhido em seu laboratório;

Ao professor Edilberto da Universidade Federal do Ceará pela obtenção dos espectros de RMN;

Ao secretário da pós-graduação Maurílio pela amizade;

Ao Fernando e à Karla pela ajuda nos bioensaios;

Ao amigo Aldy, à Sandra, Paulo César e Dona Margarida pelo carinho e amizade;

Ao Marcos Sá pelos espectros de infravermelho;

Aos alunos de iniciação científica Sheila, Tatiana, João e Midian pela ajuda na realização deste trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas e da Universidade Federal de Pernambuco que de alguma maneira colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviatura	iv
Lista de Figura	v
Lista de Tabela	ix
Lista de Fluxograma	xi
Resumo	xii
Abstract	Xiv
Capítulo I. Introdução	2
I.1 – Objetivos do trabalho	7
I.1.1 – Gerais	7
I.1.2 – Específicos	7
I.2 – Considerações sobre a família Annonaceae, a espécie <i>Annona muricata</i> e as acetogeninas	11
I.2.1 – A família Annonaceae	11
I.2.2 – A espécie <i>Annona muricata</i>	14
I.2.3 – Acetogeninas	15
I.2.3.1 – Acetogeninas encontradas no gênero <i>Annona</i>	17
I.2.3.2 – Biossíntese das Acetogeninas	23
I.3 – Considerações sobre a família Olacaceae e a espécie <i>Ximenia americana</i>	26
I.3.1 – A família Olacaceae	26
I.3.2 – A espécie <i>Ximenia americana</i>	24
I.4 – Considerações sobre a Família Icacinaceae e a espécie <i>Emmotum nitens</i>	29
I.4.1 – A Família Icacinaceae	29
I.4.2 – A Espécie <i>Emmotum nitens</i> (Benth.) Miers	30
I.5 – Considerações gerais sobre os testes de atividade efetuados	32
I.5.1 – Teste com a <i>Artemia salina</i> Leach	32
I.5.2 – A esquistossomose Mansônica e o Caramujo <i>B. glabrata</i>	32
I.5.3 – A Dengue e o mosquito <i>A. aegypti</i>	43
I.5.4 – A Traça-das-Crucíferas, <i>Plutella xylostella</i> (Linnaeus)	49
I.5.5 – A Atividade Antioxidante	50
Capítulo II. Parte experimental	53
II.1 - Solventes e reagentes	53
II.2 - Análise cromatográfica	53
II.2.1 – Cromatografia clássica em coluna e cromatografia em camada delgada	53
II.2.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	54
II.2.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)	54
II.3 – Reagentes Reveladores	54
II.3.1 – Composição química dos reveladores	55
II.4 – Análise espectrofotométrica	55
II.5 – Métodos instrumentais	55
II.6 – Coleta e identificação do material botânico	56
II.7 – Preparação dos extratos	56
II.8 – Bioensaios	57
II.8.1 – Bioensaio com as larvas de <i>A. salina</i>	57

II.8.2 – Bioensaios com o caramujo adulto e massa de ovos <i>B. glabrata</i>	58
II.8.3 - Bioensaios com as larvas do mosquito <i>A. aegypti</i>	60
II.8.3.1 – Dose-resposta	61
II.8.4 – Bioensaios com a traça-das-crucíferas <i>Plutella xylostella</i>	61
II.8.5 – Testes para a atividade antioxidante com o radical DPPH	62
II.8.5.1 – Ensaio qualitativo	62
II.8.5.2 – Ensaio quantitativo	63
II.9 – Cálculo dos valores das concentrações letais (CL90, CL50 e CL10) e doses letais (DL90, DL50 e DL10) dos extratos e compostos	64
II.10 - Prospecção fitoquímica dos extratos	64
II.10.1 - Teste para fenóis e taninos	64
II.10.2 - Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	64
II.10.3 - Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	65
II.10.4 - Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	65
II.10.5 - Teste para esteróides e triterpenóides	65
II.10.6 - Teste para saponinas	66
II.10.7 - Teste para alcalóides	66
II.10.7.1 – Composição química do reagente de Dragendorff	66
II.10.8 - Teste para antraquinonas, antronas e coumarinas	67
II.10.9 - Teste para acetogeninas	67
II.11 – Estudo fitoquímico das folhas da espécie <i>A. muricata</i>	67
II.11. 1 – Filtração 3. Nesta filtração foi trabalhada a Fração 4.1 oriunda da filtração2	68
II.11.2 – Coluna 1. Para esta coluna foi selecionada a Fração 4.1.2 proveniente da filtração 3	69
II.11.3 – Coluna 2 – Cromatografia da fração 4.4 proveniente da filtração 2	70
II.11.4 – Isolamento dos constituintes químicos da Fração 4.2 proveniente da filtração 2	72
II.11.5 – Elucidação estrutural das substâncias isoladas	72
II.12 – Estudo fitoquímico da espécie <i>X. americana</i> (casca do caule) monitorado pela atividade antioxidante	73
II.12.1 – Filtração 1. Nesta filtração foi trabalhada a fração F3-Acetato de etila oriunda da partição do extrato bruto	73
II.13 – Constituintes químicos do <i>Emmotum nitens</i>	76
Capítulo 3. Resultado e Discussão	78
III.1 – Avaliação das atividades larvicida, moluscicida e toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> das plantas selecionadas para estudos biológicos e escolha da planta para estudo químico	79
III.1.1 – Avaliação da atividade das folhas de <i>Annona muricata</i> no desenvolvimento de <i>Plutella xylostella</i>	84
III.1.2 – Construção da Curva Dose-Resposta para a Atividade das folhas da <i>A. muricata</i> frente às Larvas do <i>A. aegypti</i>	88
III.2 – Estudo do extrato etanólico das folhas da <i>Annona muricata</i>	92
III.2.1 – Estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de <i>Annona muricata</i>	92

III.2.2 – Compostos isolados a partir do extrato etanólico das folhas da <i>A. muricata</i>	94
III.2.2.1 – O composto AM1	94
III.2.2.2 – Os compostos AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6	98
III.3 – Reavaliação Estrutural das Emotinas A, B, F, I , Emotinol-1 e Emotinol-2	131
III.3.1 – Emotina A	131
III.3.2 _ Emotinas B e F	141
III.3.3 – Emotina I	155
III.3.4 – Emotinol-1	168
III.3.5 – Emotinol-2	181
III.4 – Avaliação Estrutural do Composto XA	192
III.5 – Avaliação da Atividade Antioxidante do extrato, frações e composto obtido da Casca do Caule da planta <i>X. americana</i> e das emotinas A, B, E e I	207
Capítulo IV – Conclusão	214
Referências Bibliográficas	217

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	Micromolar
CL ₁₀	Concentração letal para 10% de organismo alvo
CL ₁₀₀	Concentração letal para 100% de organismo alvo
CL ₅₀	Concentração letal para 50% de organismo alvo
CL ₉₀	Concentração letal para 90% de organismo alvo
DEPT	“Distortionless enhancement by polarisation transfer”
DOR	Dispersão óptica rotatória
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH	Etanol
F	Fração
HMBC	“Heteronuclear multiplebond coherence”
HMQC	“Heteronuclear multiplequantum coherence”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
L4	Quarto estágio larval
m/z	Relação carga/massa
MIP	Manejo Integrado de Pragas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Porcentagem de inibição

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado de algumas rotas biossintéticas de classes de metabólitos secundários	4
Figura 2 – Procedimento geral para a obtenção de princípios ativos de plantas	6
Figura 3 – Distribuição mundial da família Annonaceae	12
Figura 4 – Gravioleira	14
Figura 5 – Proposta da provável rota biossintética das acetogeninas	25
Figura 6 – Distribuição mundial da família Olacaceae	26
Figura 7 – A espécie <i>Ximenia americana</i>	27
Figura 8 – A espécie <i>Emmotum nitens</i>	31
Figura 9 – <i>Schistosoma mansoni</i>	33
Figura 10 – Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil em 1999	34
Figura 11 – Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	35
Figura 12 - O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 13 – Ocorrência e distribuição potencial do dengue no mundo	44
Figura 14 - Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i>	44
Figura 15 – <i>Plutella xylostella</i>	49
Figura 16 – <i>A. salina</i>	58
Figura 17 – (A) Caramujo da espécie <i>B. glabrata</i> , (B) Massa de ovos do caramujo <i>B. glabrata</i>	59
Figura 18 – Larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	60
Figura 19 – Mortalidade das larvas de <i>Plutella xylostella</i> tratadas com extrato etanólico de folhas mistas de <i>Annona muricata</i> entre os meses de abril de 2002 a março de 2003 e os níveis de precipitação pluviométrica no mesmo período	85
Figura 20 – Gráfico da concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) versus tempo (min) necessário para 100% de mortalidade das larvas do <i>A. aegypti</i>	89
Figura 21 – Curva dose reposta para o efeito do extrato das folhas de <i>A. muricata</i> sobre as larvas do mosquito <i>A. aegypti</i>	91
Figura 22 – Curva concentração versus porcentagem de mortalidade em 360 minutos	92
Figura 23 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 300 MHz da substância AM1, padrão interno TMS	96
Figura 24 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 75 MHz da substância AM1, padrão interno TMS	97
Figura 25 – Espectro na região do infravermelho da substância AM2 em KBr	104
Figura 26 – Espectro na região do infravermelho da substância AM3 em KBr	105
Figura 27 – Espectro na região do infravermelho da substância AM4 em KBr	105
Figura 28 – Espectro na região do infravermelho da substância AM5 em KBr	106
Figura 29 – Espectro na região do infravermelho da substância AM6 em KBr	106
Figura 30 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM2, padrão interno TMS	107
Figura 31 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM3, padrão interno TMS	108
Figura 32 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM4, padrão interno TMS	109
Figura 33 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM5, padrão interno TMS	110
Figura 34 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM6, padrão interno TMS	111

Figura 35 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM2, padrão interno TMS	112
Figura 36 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM3, padrão interno TMS	113
Figura 37 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM4, padrão interno TMS	114
Figura 38 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM5, padrão interno TMS	115
Figura 39 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM6, padrão interno TMS	116
Figura 40 – Espectro de DEPT 135° em CDCl_3 da substância AM2, padrão interno TMS	117
Figura 41 – Espectro de DEPT 135° em CDCl_3 da substância AM3, padrão interno TMS	118
Figura 42 – Espectro de DEPT 135° em CDCl_3 da substância AM4, padrão interno TMS	119
Figura 43 – Espectro de DEPT 135° em CDCl_3 da substância AM5, padrão interno TMS	120
Figura 44 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM2 em KBr	121
Figura 45 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM3 em KBr	121
Figura 46 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM4 em KBr	122
Figura 47 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz do derivado acetilado da substância AM2, padrão interno TMS	123
Figura 48 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz do derivado acetilado da substância AM3, padrão interno TMS	124
Figura 49 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância AM4, padrão interno TMS	125
Figura 50 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM2, padrão interno TMS	126
Figura 51 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM3, padrão interno TMS	127
Figura 52 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM4, padrão interno TMS	128
Figura 53 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotina A, padrão interno TMS	136
Figura 54 – Espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° em CDCl_3 a 125 MHz da substância Emotina A, padrão interno TMS	138
Figura 55 – Mapa de contornos HMQC da substância Emotina A	138
Figura 56 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina A	139
Figura 57 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina A	140
Figura 58 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotina B, padrão interno TMS	144
Figura 59 – Espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° em CDCl_3 a 125 MHz da substância Emotina B, padrão interno TMS	145
Figura 60 – Mapa de contornos HMQC da substância Emotina B	146
Figura 61 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina B	147

Figura 62 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina B	148
Figura 63 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotina F, padrão interno TMS	150
Figura 64 – Espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° em CDCl_3 a 125 MHz da substância Emotina F, padrão interno TMS	151
Figura 65 – Mapa de contornos HMQC da substância Emotina F	152
Figura 66 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina F	153
Figura 67 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina F	154
Figura 68 – Espectro na região do infravermelho da substância emotina I em KBr	157
Figura 69 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância emotina I, padrão interno TMS	159
Figura 70 – Mapa de contornos COSY da substância emotina I	160
Figura 71 – Experimento VT a diferentes temperaturas da substância emotina I	161
Figura 72 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância emotina I, padrão interno TMS	162
Figura 73 – Espectro de DEPT 135° da substância emotina I	163
Figura 74 – Espectro de DEPT 90° da substância emotina I	164
Figura 75 – Mapa de contornos HMQC da substância emotina I	165
Figura 76 – Mapa de contornos HMBC da substância emotina I	166
Figura 77 – Mapa de contornos NOESY da substância emotina I	167
Figura 78 – Espectro na região do infravermelho da substância emotinol-1 em KBr	171
Figura 79 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotinol-1, padrão interno TMS	173
Figura 80 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância emotinol-1, padrão interno TMS	174
Figura 81 – Espectro de DEPT 135° da substância emotinol-1	175
Figura 82 – Espectro de DEPT 90° da substância emotinol-1	176
Figura 83 – Mapa de contornos HMQC da substância emotinol-1	177
Figura 84 – Mapa de contornos COSY da substância emotinol-1	178
Figura 85 – Mapa de contornos HMBC da substância emotinol-1	179
Figura 86 – Mapa de contornos NOESY da substância emotinol-1	180
Figura 87 – Espectro na região do infravermelho da substância emotinol-2 em KBr	182
Figura 88 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotinol-2, padrão interno TMS	184
Figura 89 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância emotinol-2, padrão interno TMS	185
Figura 90 – Espectro de DEPT 135° da substância emotinol-2	186
Figura 91 – Espectro de DEPT 90° da substância emotinol-2	187
Figura 92 – Mapa de contornos COSY da substância emotinol-2	188
Figura 93 – Mapa de contornos HMQC da substância emotinol-2	189
Figura 94 – Mapa de contornos HMBC da substância emotinol-2	190
Figura 95 – Mapa de contornos NOESY da substância emotinol-2	191
Figura 96 – Espectro na região do infravermelho da substância XA em KBr	194
Figura 97 – Espectro de RMN de hidrogênio em CD_3OD a 500 MHz da substância XA, padrão interno TMS	196
Figura 98 – Espectro de RMN de carbono em CD_3OD a 125 MHz da substância XA, padrão interno TMS	197
Figura 99 – Espectro de DEPT 135° da substância XA	198
Figura 100 – Espectro de DEPT 90° da substância XA	199

Figura 101 – Mapa de contornos HMQC da substância XA	200
Figura 102 – Mapa de contornos COSY da substância XA	201
Figura 103 – Mapa de contornos HMBC da substância XA	202
Figura 104 – Mapa de contornos NOESY da substância XA	203
Figura 105 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância XA em KBr	204
Figura 106 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl ₃ a 500 MHz do derivado acetilado da substância XA, padrão interno TMS	205
Figura 107 – Espectro de RMN de carbono em CDCl ₃ a 125 MHz do derivado acetilado da substância XA, padrão interno TMS	206
Figura 108 - Ensaio antioxidante qualitativo do extrato etanólico de <i>X. americana</i> , suas frações e o composto XA	208
Figura 109 - Ensaio antioxidante qualitativo da substância emotina I	208
Figura 110 – Comportamento cinético da <i>X. americana</i> determinado espectrofotometricamente a 515nm, pela reação com uma solução de DPPH 90µM; 1,25mg/mL (a); 0,625mg/mL (b); 0,312mg/mL (c) e 0,156mg/mL (d)	211
Figura 111 – Comportamento cinético Emotina I determinado espectrofotometricamente a 515nm, pela reação com uma solução de DPPH 90µM	212
Figura 112 – Mecanismo de regeneração de um orto-difenol	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas selecionadas para estudo	9
Tabela 2 – Acetogeninas em espécies do gênero <i>Annona</i> até abril do ano de 2005	15
Tabela 3 – Exemplos de Acetogeninas de <i>Annona muricata</i>	19
Tabela 4 – Plantas e compostos ativos contra o molusco do gênero <i>Biomphalaria</i>	37
Tabela 5 – Plantas e compostos ativos contra as larvas do <i>Aedes aegypti</i>	46
Tabela 6 – Plantas coletadas para estudo	57
Tabela 7 – Extratos da <i>A. muricata</i> coletados entre abril de 2002 e março de 2003	57
Tabela 8 – CCD das frações provenientes da coluna 1	70
Tabela 9 – CCD das frações provenientes da coluna 2	71
Tabela 10 – Plantas utilizadas neste estudo e as atividades de seus extratos contra <i>A. aegypti</i> , <i>B. glabrata</i> e <i>A. salina</i>	80
Tabela 11 – Atividades moluscicida, larvicida e toxicidade frente a <i>A. salina</i> do extrato bruto das folhas da <i>A. muricata</i>	81
Tabela 12 – Valores de concentrações letais para a atividade moluscicida, larvicida e toxicidade frente a <i>A. salina</i> do extrato bruto das folhas da <i>A. muricata</i>	81
Tabela 13- Classes de compostos detectados nos extratos de plantas ativos utilizados neste estudo	84
Tabela 14 – Médias da mortalidade das larvas (\pm EP), duração e viabilidade das fases de larva e pupa de <i>Plutella xylostella</i> tratadas com o extrato etanólico das folhas de <i>Annona muricata</i> coletadas em outubro de 2002	86
Tabela 15 – Avaliação estatística da relação dose-resposta do extrato etanólico bruto das folhas da <i>A. muricata</i> sobre as larvas do <i>A. aegypti</i>	89
Tabela 16 – Coeficiente de correlação de Pearson da relação dose-resposta do extrato etanólico bruto das folhas da <i>A. muricata</i> sobre as larvas do <i>A. aegypti</i>	90
Tabela 17 – Triagem da ação moluscicida, larvicida e toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> das frações provenientes da filtração-1 em carvão ativo	93
Tabela 18 – Triagem da ação moluscicida, larvicida e toxicidade frente à <i>A. salina</i> das frações provenientes da filtração-2 em gel de sílica	93
Tabela 19 – Dados de RMN de hidrogênio e carbono de anéis metil- γ -lactona de acetogeninas	99
Tabela 20 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de anéis metil- γ -lactona das acetogeninas isoladas	100
Tabela 21 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos anéis THF das acetogeninas AM2, AM3, AM5 e AM6	101
Tabela 22 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos anéis THF da acetogenina AM4	101
Tabela 23 – Atividade moluscicida da mistura das acetogeninas obtidas de <i>A. muricata</i>	129
Tabela 24 – Valores de concentrações letais para a atividade moluscicida da mistura das acetogeninas obtidas de <i>A. muricata</i>	129
Tabela 25 – Atividade larvicida das acetogeninas AM2, AM3, AM4 e AM5 frente às larvas do <i>A. aegypti</i>	130
Tabela 26 – Valores de concentrações letais para a atividade larvicida das acetogeninas AM2, AM3 AM4 e AM5	130
Tabela 27 - Dados de RMN da Emotina A em CDCl_3	135
Tabela 28 - Dados de RMN da Emotina B em CDCl_3	143
Tabela 29 - Dados de RMN da Emotina F em CDCl_3	149
Tabela 30 - Dados de RMN da Emotina I em CDCl_3	158
Tabela 31 – Atividade da emotina I contra as larvas do mosquito <i>A. aegypti</i>	168

Tabela 32 – Valores de concentrações letais da emotina I contra as larvas do <i>A. aegypti</i>	168
Tabela 33 - Dados de RMN da Emotinol-1 em CDCl_3	172
Tabela 34 - Dados de RMN do Emotinol-2 em CDCl_3	172
Tabela 35 - Dados de RMN da Substância XA em CD_3OD	183
Tabela 36 – Atividade antioxidante de <i>X. americana</i> e suas frações e do composto XA determinada pela redução do radical livre DPPH*	195
Tabela 37 – Atividade antioxidante da substância Emotina I determinada pela redução do radical livre DPPH*	209
Tabela 38 – Atividade antioxidante dos controles positivos determinada pela redução do radical livre DPPH*	209

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 – Filtração em carvão ativo e em gel de sílica do extrato etanólico das folhas da <i>A. muricata</i> (390g)	68
Fluxograma 2 - Extração por solventes do extrato etanólico da casca do caule da <i>X. americana</i> (600g)	74
Fluxograma 3 – Filtração em sílica gel desativada da fração em acetato de etila	75
Fluxograma 4 – Filtração em sílica gel desativada da sub-fração em F3.1-Acetato de etila 1	76

RESUMO

O estudo dos componentes de plantas guiado por bioensaios tem sido adotado por ser um caminho rápido e seguro para a obtenção dos princípios ativos. A utilização de produtos naturais para o controle de pragas e para o tratamento e cura de doenças não é uma técnica recente, já que seu uso era comum antes do advento dos produtos sintéticos.

No presente trabalho relatamos os resultados dos testes biológicos para a verificação das atividades larvicida frente à larva do mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, moluscicida com o caramujo *Biomphalaria glabrata* Say e toxicidade frente à larva da *Artemia salina* Linnaeus dos extratos brutos das seguintes plantas: *Spondias mombin* L. (sementes), *Annona muricata* L. (folhas), *Marsdenia altissima* Jacq. Dugand (casca do caule), *Bauhinia cheilantha* Bong. Steud. (caule, folhas e raiz), *Bursera leptophloeos* Mart. (caule), *Caesalpinia echinata* Lam. (folhas e caule), *Caesalpinia ferrea* Mart. (folhas), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (folhas e caule), *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. (tubérculo), *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (casca do caule), *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (folhas), *Ocotea glomerata* (Nees.) Mez. (casca do caule, caule e folhas), *Eugenia uniflora* L. (folhas e caule), *Piper arboreum* Aublet. (folhas) e *Zizyphus joazeiro* Mart. (caule). O extrato das folhas da espécie *A. muricata* mostrou a melhor atividade frente ao caramujo *B. glabrata*: $CL_{10} = 6,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{50} = 17,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{90} = 73,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$, às larvas do mosquito *A. aegypti*: $CL_{10} = 11,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{50} = 28,52 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{90} = 50,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e à *A. salina*: $CL_{10} = 0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{50} = 0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $CL_{90} = 2,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e foi por isto selecionado para estudo fitoquímico.

O estudo fitoquímico do extrato das folhas da *A. muricata* conduziu ao isolamento do fitoesteróide β -sitosterol e das acetogeninas anossenegalina, xilomaticina, bulatanocina, anomontacina, anonacina, goniotalamicina e isoanonacina. As acetogeninas isoladas foram ativas no caramujo *B. glabrata* e nas larvas do mosquito *A. aegypti*. A ação moluscicida das acetogeninas é aqui descrita pela primeira vez.

Annona muricata foi testada ainda contra a traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus) e sua avaliação sazonal foi determinada. O extrato da planta coletado no mês de outubro foi o mais ativo com 100% de mortalidade na concentração de 5 mg/mL.

Numa segunda fase do trabalho foi realizada a reavaliação estrutural dos compostos denominados emotinas A, B, F, I, emotinol-1 e emotinol-2 obtidos da espécie *Emmotum nitens* (Benth.) Miers utilizando dados de espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Unidimensionais e bidimensionais. A emotina I foi ativa no frente às larvas do mosquito *A. aegypti* e apresentou ainda atividade antioxidante.

Na terceira parte do trabalho foi realizado o estudo fitoquímico com o extrato etanólico da casca do caule da espécie *Ximenia americana* L.. Guiado pelo bioensaio da atividade antioxidante com o radical DPPH. Esse extrato mostrou uma porcentagem de inibição de 89,02% na concentração de 0,312 mg/mL. A epicatequina foi isolada como sendo um dos responsáveis pela atividade.

Palavras-chave: bioensaios, estudo fitoquímico, atividade e avaliação estrutural.

ABSTRACT

The use of naturally-occurring plant compounds in the control of pests and for treating and curing diseases considerably pre-dates the use of their synthetic counterparts. Typically, however, plant products have been employed in the form of crude or semi-purified extracts containing a mixture of active components. The bioassay-guided fractionation of plant extracts presents a facile and rapid strategy by which to isolate targeted active principles.

The present work described the results of biological assays conducted on crude extracts of a variety of Brazilian plants. Three biological activities were screened, namely, larvicidal activity against the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* Say, and toxicity against *Artemia salina* Linnaeus. The plants (and organs) investigated were: *Spondias mombin* L. (seeds), *Annona muricata* L. (leaves), *Marsdenia altissima* Jacq. Dugand (stem bark), *Bauhinia cheilantha* Bong. Steud. (leaves, roots and stems), *Bursera leptophloeos* Mart. (stem), *Caesalpinia echinata* Lam. (leaves and stems), *Caesalpinia ferrea* Mart. (stems), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (leaves and stems), *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. (tubers), *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (stem bark), *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (leaves), *Ocotea glomerata* (Nees.) Mez. (leaves, stem and stem bark), *Eugenia uniflora* L. (leaves and stems), *Piper arboreum* Aublet. (leaves) and *Zizyphus joazeiro* Mart. (stems).

The most promising extract was that obtained from leaves of *Annona muricata*, which showed high activities against adults of *Biomphalaria glabrata* ($LC_{10} = 6.16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{50} = 17.57 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{90} = 73.04 \mu\text{g.mL}^{-1}$), larvae of *Aedes aegypti* ($LC_{10} = 11.13 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{50} = 28.52 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{90} = 50.13 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and the brine shrimp *Artemia salina* ($LC_{10} = 0.10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{50} = 0.48 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $LC_{90} = 2.27 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The crude leaf extract of *A. muricata* was thus subjected to detailed phytochemical studies leading to the isolation of the phytosteroid β -sitosterol, and of the acetogenins annosenegalin, xylomaticin, bullatanocin, anomontacin, annonacin, goniothalamycin and isoannonacin, each of which showed activity against *B. glabrata* and *A. aegypti*. The molluscicidal activities of these acetogenins is described for the first time in the present study.

Extracts of *Annona muricata*, collected during different seasons of the year, were assayed for their activities against the Diamondback (or Cabbage) moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), a major pest of Cruciferous plants. The crude extract obtained from leaves harvested in October exhibited the highest activity with 100% mortality of the moth at a concentration of 5 mg/mL.

Together with the phytochemical studies described above, a structural re-evaluation of emotins A, B, F, I, emotinol-1 and emotinol-2 obtained from *Emmotum nitens* (Benth.) Miers was carried out using 1- and 2-D nuclear magnetic resonance techniques. Biological screening of these compounds revealed that emotin I was active against larvae of *Aedes aegypti* and also exhibited antioxidant activity as determined by the 1,1-diphenylpicrylhydrazyl free radical (DPPH) assay. Finally, the antioxidant activity of the ethanol extract of the stem bark of *Ximena americana* L. was investigated. At a concentration of 0.312 mg/mL, the extract exhibited 89.02% inhibition in the DPPH assay, and epicatechin was isolated as one of the compounds responsible for this activity.

Keywords: biological assays, biological activities, phytochemical studies.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

Capítulo I. Introdução

Desde a antiguidade o homem utiliza a natureza para promover o seu bem estar e melhorar a sua qualidade de vida. Em decorrência desta atividade, as plantas integraram-se às culturas de várias civilizações, servindo-lhes dentre inúmeros fins, como fonte de alimentos, para o controle de pragas e para o tratamento e cura de doenças (SCHENKEL *et al.*, 1999; MARTINEZ, 2002).

O uso de plantas medicinais representou e ainda representa um recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As virtudes demonstradas por inúmeras dessas espécies de plantas foram adquiridas, muito provavelmente, na experimentação empírica e avaliação das fontes naturais, em um tipo de pesquisa baseada em tentativa e erro (DI STASI, 1996). Devido a alguns motivos, tais como insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejados dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos produtos naturais, as plantas medicinais, apesar do emprego empírico, continuam sendo usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN & CECHINEL-FILHO, 2003). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos da saúde (JUNIOR *et al.*, 2005). Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades terapêuticas dessas plantas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes clínicos e pré-clínicos. Essa prática ocasionou um crescimento na procura de provas científicas sobre a segurança e eficácia terapêutica dessas plantas medicinais, e como resultado disso muitos fármacos da medicina ocidental são baseados em compostos de ocorrência natural em plantas da medicina tradicional (VERPOORTE, 1999).

A utilização de produtos de origem vegetal para o controle de pragas e doenças na agricultura não é uma técnica recente, já que seu uso era comum, principalmente nos países tropicais, antes do advento dos produtos sintéticos. Com o surgimento destes compostos, então mais eficientes e de menor custo, os produtos de origem vegetal praticamente deixaram de ser usados. Entretanto, nos últimos anos, com o agravamento dos problemas provocados pelo uso dos produtos sintéticos, a pesquisa tem novamente se voltado para o estudo dos produtos vegetais, para atender a demanda proveniente, principalmente, do segmento representado pela agricultura orgânica (MARTINEZ, 2002).

A maioria das plantas do nosso planeta ainda é desconhecida sob o ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil espécies estimadas, somente cerca de 5% foram estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos até meados dos anos 90 (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998). Dessa forma, as plantas constituem ainda uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas. Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico na química de produtos naturais com vistas à obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas e também para o controle de pragas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área (ABELSON, 1990; BRESOLIN & CECHINEL-FILHO, 2001; MARTINEZ, 2002).

Os compostos obtidos a partir de fontes naturais são separados em dois grandes grupos: compostos do metabolismo primário (ex: aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas) e compostos do metabolismo secundário ou metabolismo especial (ex: flavonóides, alcalóides, terpenos, acetogeninas, etc.). Os metabólitos primários são amplamente distribuídos nos seres vivos e, certamente, são essenciais para a vida, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita e utilidade não evidente, embora essenciais para os organismos que os produzem (MANN *et al.*, 1994; MATOS, 1997).

O metabolismo secundário diferencia-se do primário basicamente por não apresentar produtos comuns à maioria das plantas, sendo característicos de grupos taxonômicos tais como família e gênero. Normalmente, os metabólitos secundários são produzidos em pequenas quantidades pelos vegetais. Vários são os grupos de substâncias formados pelo metabolismo primário e usados para a biossíntese dos metabólitos secundários, e os principais são acetato, mevalonato, chiquimato e alguns aminoácidos, **Figura 1 p. 4** (DI STASI *et al.*, 2002; MANN *et al.*, 1994; MARTINS *et al.*, 1995).

Os metabólitos secundários são conhecidos por suas ações repelentes ou atraentes nas interações intraespécies e interespcies e na proteção contra o estresse biótico e abiótico. Além disso, muitos são explorados como medicamentos, inseticidas, parasiticidas, flavorizantes, pigmentos e fragrâncias para perfumaria (BELL, 1981; WINK, 1990; BUCKINGHAM, 1993; BONGAERTS, 1998). Entre os diversos exemplos de substâncias de uso terapêutico oriundas do metabolismo especial de plantas, podemos citar o diterpeno **Taxol**, isolado do gênero *Taxus*, usado para o tratamento de câncer dos ovários e pulmões (WANI *et al.*, 1971) e que está entre os agentes quimioterapêuticos mais eficazes (FITZPATRICK & WHEELER, 2003), a **Morfina**, um alcalóide obtido do látex de *Papaver somniferum*, e que é um potente analgésico em uso clínico (SAMUELSSON, 1989) e o

sesquiterpeno **Artemisinina**, presente em *Artemisia annua*, uma substância que possui uma longa história como um agente antimalarial e que possui ainda atividade imunossupressiva (NOORI *et al.*, 2004) e atividade esquistossomícida (CHEN *et al.*, 1980).

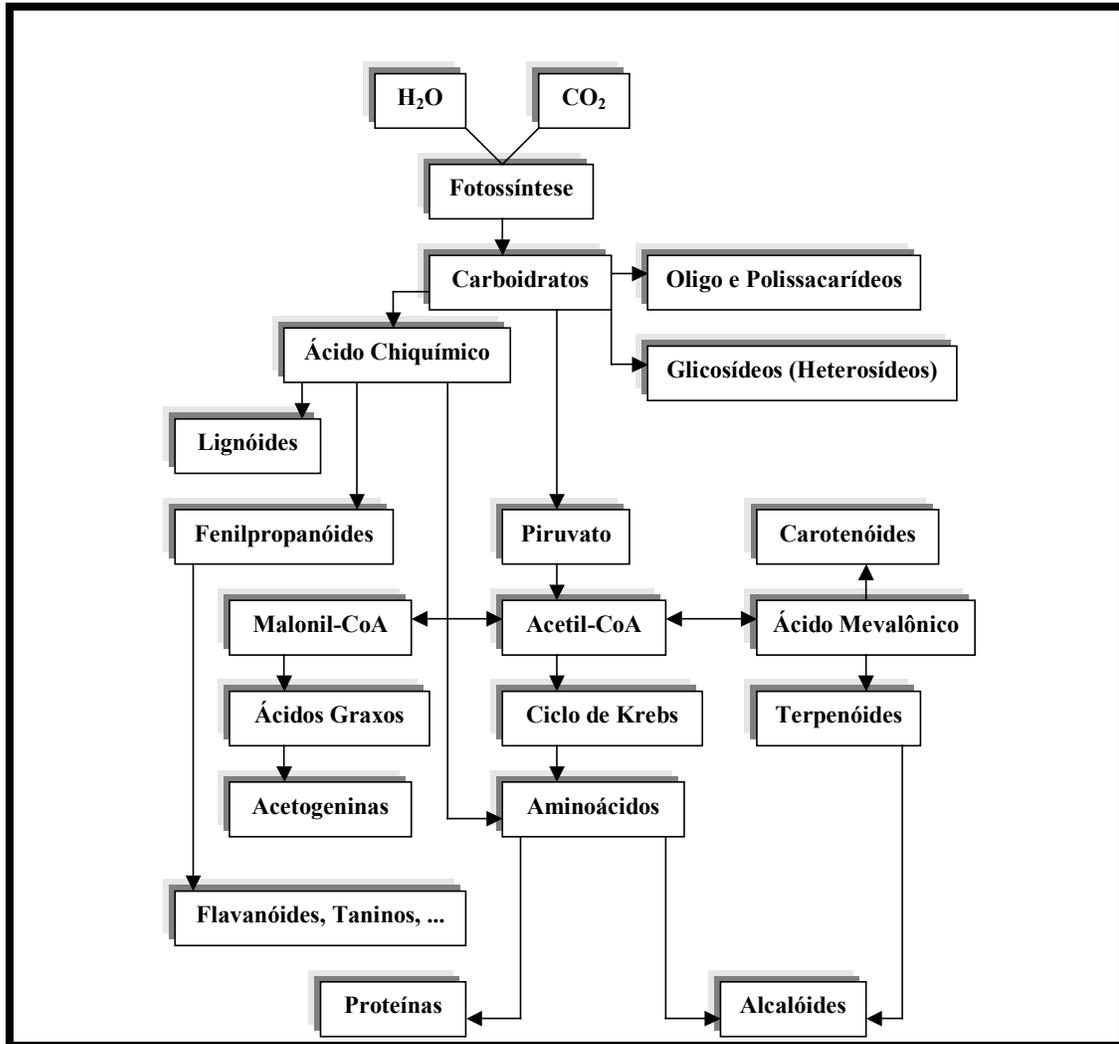
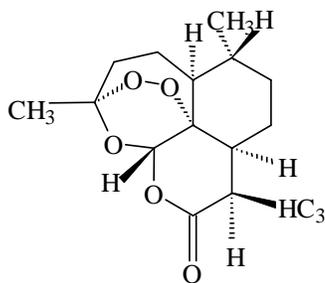
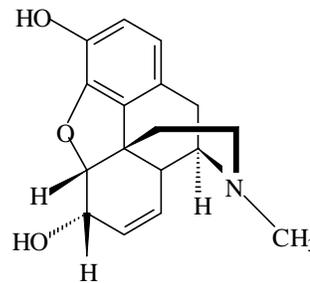


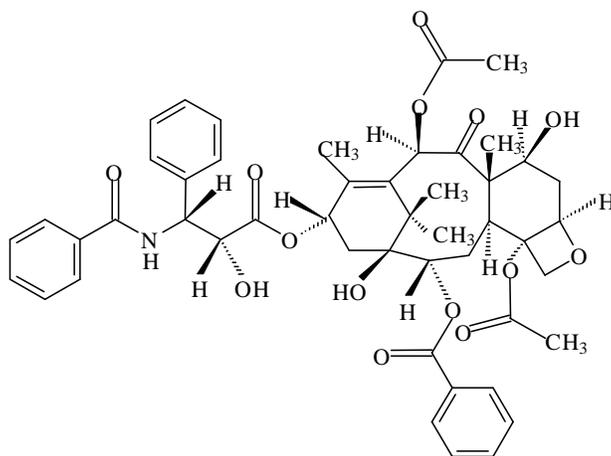
Figura 1 – Esquema simplificado de algumas rotas biossintéticas de classes de metabólitos secundários (Martins *et al.*, 1995)



Artemisinina



Morfina

**Taxol**

A fitoquímica interessa-se em estudar os produtos decorrentes do metabolismo secundário dos vegetais e compreende as etapas de isolamento, purificação e determinação estrutural desses metabólitos (BRAZ-FILHO, 1994). Quando associada a ensaios específicos de atividade biológica, a análise fitoquímica permite identificar, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas presentes em uma determinada espécie. Vale ressaltar que, nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente presentes em pequenas concentrações (SCHENKEL *et al.*, 1999) e os processos de isolamento e purificação precisam ser mais eficientes.

No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção dos bioensaios para a detecção de um efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, reprodutíveis, sensíveis e de baixo custo. Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), ensaios bioquímicos visando alvos moleculares (enzimas e receptores) e cultura de células animais ou humanas. Contudo, o teste adequado dependerá do objetivo do trabalho.

Durante a investigação fitoquímica que nos leva ao isolamento e a caracterização dos compostos biologicamente ativos, é de primordial importância o biomonitoramento das frações obtidas em cada etapa desta investigação, tornando assim, mais eficiente o processo de obtenção do composto ativo. Na **Figura 2 p. 6**, mostramos uma seqüência de experimentos que esperamos levar de forma eficiente e segura aos componentes ativos.

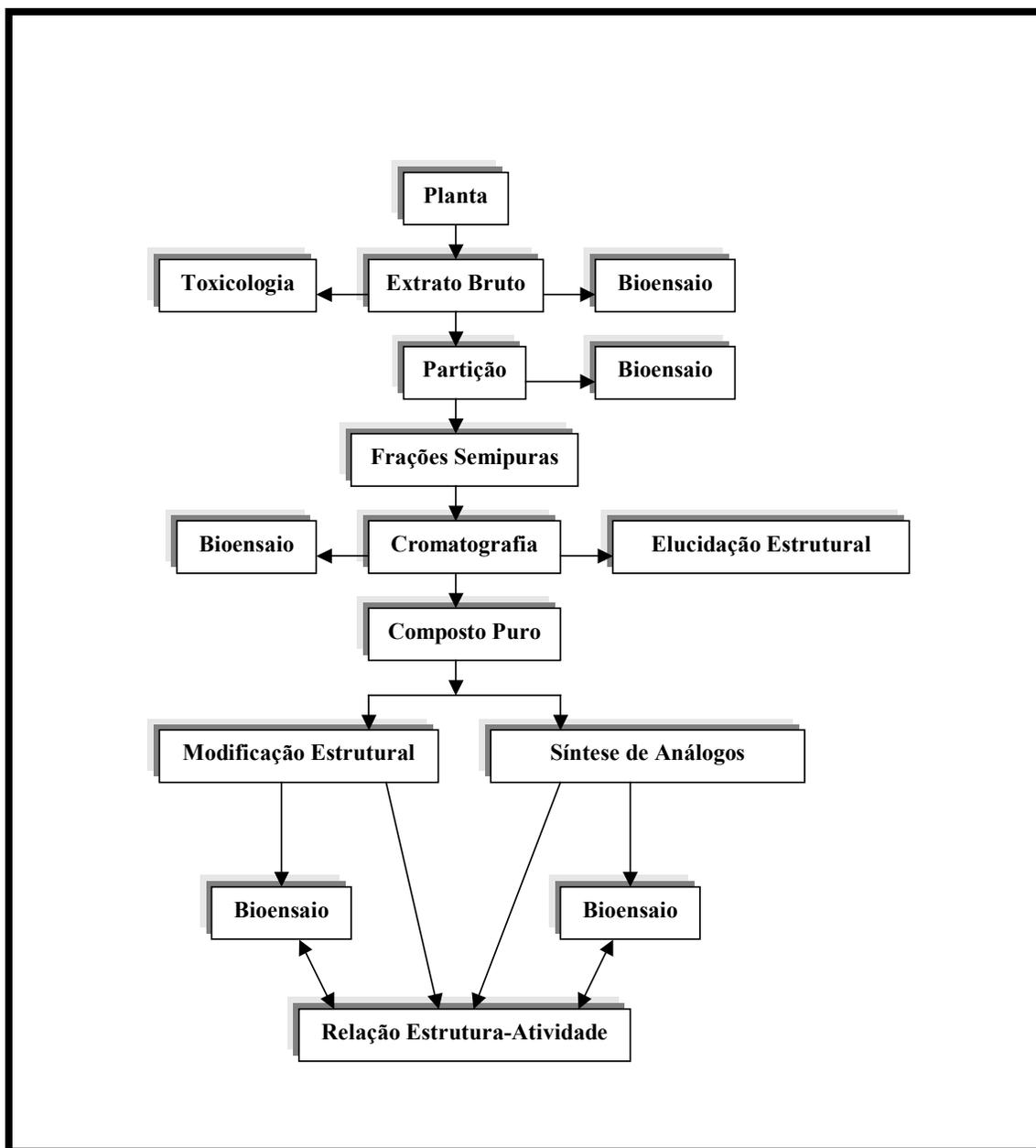


Figura 2 – Procedimento geral para a obtenção de princípios ativos de plantas (Adaptado de HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991)

I.1 – Objetivos do trabalho

I.1.1 – Gerais

Contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia para o controle de pragas, vetores e doenças tropicais com produtos naturais.

Dar uma visão geral de todas as etapas em pesquisas com plantas bioativas, estudando assuntos diferentes em fases distintas. O processo de seleção das plantas envolve aspectos etnofarmacológicos, etnobotânicos e quimiosistemáticos pois uma boa seleção das plantas é uma garantia de sucesso no estudo da atividade biológica.

Com o objetivo de resolver problemas latentes no nosso laboratório as emotinas obtidas da espécie *Emmotum nitens* foram tomadas para uma reavaliação da estrutura química.

I.1.2 – Específicos

Verificação das atividades larvicida frente à larva do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), moluscicida com o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say) e toxicidade frente à larva da *Artemia salina* (Linnaeus) dos extratos brutos das seguintes plantas: *Spondias mombin* L. (sementes), *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (casca do caule), *Annona muricata* L. (folhas), *Bauhinia cheilantha* Bong. Steud. (caule, folhas e raiz), *Bursera leptophloeos* Mart. (caule), *Caesalpinia echinata* Lam. (folhas e caule), *Caesalpinia ferrea* Mart. (folhas), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (folhas e caule), *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (folhas), *Eugenia uniflora* L. (folhas e caule), *Marsdenia altissima* Jacq. Dugand (casca do caule), *Ocotea glomerata* (Nees.) Mez. (casca do caule, caule e folhas), *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb. (tubérculo), *Piper arboreum* Aublet. (folhas) e *Zizyphus joazeiro* Mart. (caule) (**Tabela 1 p. 9**)

Estudo químico das folhas da espécie *Annona muricata* com o isolamento e purificação dos princípios ativos guiado pelos bioensaios larvicida frente às larvas do mosquito *A. aegypti* e moluscicida frente ao caramujo *B. glabrata*.

Avaliação da atividade do extrato etanólico das folhas da *A. muricata* contra as larvas de *Plutella xylostella* (Linnaeus) e sua avaliação sazonal.

Utilização de técnicas de RMN unidimensionais e bidimensionais na reavaliação das estruturas das emotinas obtidas da espécie *Emmotum nitens* (Benth.) Miers. A proposta de

reavaliação é devido ao fato de que os espectros utilizados na época da identificação foram obtidos a 60 e a 100MHz para hidrogênio. Avaliar a atividade biológica de algumas dessas emotinas sobre as larvas do mosquito *A. aegypti* e *A. salina* e atividade antioxidante.

Estudo químico monitorado pela atividade antioxidante do extrato etanólico da casca do caule de *Ximenia americana*.

Tabela 1 - Plantas selecionadas para estudo

Família	Espécie [Local: data da coleta] Número de voucher	Nome comum	Uso etnobotânico	Referência	Parte estudada
Anacardiaceae	<i>Spondias mombin</i> L. [Penedo-AL: 03/98] 17578	Cajá	Usada para tratar disenteria (C), diarreia (C), indigestão (C), feridas (C), como antisséptico (C), possui atividades espasmolítica (C), antibacterial (F, G), antiviral (F, G), abortiva (F) e moluscicida (F e G).	OFFIAH & ANVANWU, 1989; CORTHOUT <i>et al.</i> , 1992, 1994; ABO <i>et al.</i> , 1999; RODRIGUEZ-LOPÉZ <i>et al.</i> , 2003.	Sementes
Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L. [Maceió-AL: 08/00] MAC 8530	Graviola, Cruaçá, Jaca do Pará, Araticum do Grande	Usada no emagrecimento (F) e para tratar diabetes (CR), como sedativa e tranqüilizante (F); possui propriedades antidiarréica (F), antiviral (CC), antileishmania (P), inseticida (S), moluscicida (F) e parasiticida (S), relaxante muscular e cardiodepressivo (C e F).	MARTINS, 1989; BORIES <i>et al.</i> , 1991; HASRAT <i>et al.</i> , 1997; DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001; JARAMILLO <i>et al.</i> , 2000	Folhas
Asclepiadaceae	<i>Marsdenia altissima</i> (Jacq.) Dugand [Barra de São Miguel-AL: 09/00] JEP 3652 (UB)	Cipó-Seda	Algumas espécies desse gênero são usadas para tratar gonorréia e possuem propriedades antiasmática, antifertilidade e anticancerígena.	CHOWDHURY <i>et al.</i> , 1994; MA <i>et al.</i> , 1997; KUMAR <i>et al.</i> , 1999	Casca do caule
Burseraceae	<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud. [Maceió-AL: 04/99] 23567	Mororó	Plantas desse gênero são usadas para tratar infecções, processos dolorosos e diabetes.	DA SILVA & CECHINEL FILHO, 2002	Caule, Folhas e Raízes
	<i>Bursera leptophloeos</i> Mart. [Santa Luzia-AL: 12/99] 00789	Imburana- de-Cambão	Aplicação como peitoral, tônico e para tratar afecções da bexiga.	BALBACH, 1986	Caule
Caesalpinaceae	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. [Maceió-AL: 12/98] 20045	Pau-Brasil	Usada como tônico, adstringente, fortificante e para tratar dor de dente (L).	CORRÊA, 1978	Folhas e Caule
	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. [Maceió-AL: 02/99] 43256	Pau-Ferro	Usada para tratar diabetes e afecções bronco-pulmonares (C e R).	BALBACH, 1986	Folhas
	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. [Marechal Deodoro-AL: 11/97] 21754	Catingueira	Usada para tratar catarro, diarreia e disenteria (F, FL, e C).	BRAGA, 1960	Folhas e Caule

Continuação da tabela 1

Convolvulaceae				
<i>Operculina macrocarpa</i> (Linn) Urb. [Rio Largo-AL: 09/96] 16876	Batata-de-Purga	Usado como estimulante do útero e possui fraca ação moluscicida.	BARROS <i>et al.</i> , 1970; SOUSA & ROUQUAYROL, 1974	Tubérculo
Fabaceae				
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan [Betânia-PE: 11/01]	Angico preto	Possui atividade antiinflamatória (C).	DESMARCHELIER <i>et al.</i> , 1999	Casca do caule
<i>Dioclea virgata</i> (Rich.) Amshoff [Camaçari-BA: 09/00] JEP 3654 (UB)	Cipó-pixuma	Algumas espécies desse gênero são usadas para tratar febre e malária e outras possuem propriedades tóxicas.	BRAGA, 1960; MILLIKEN, 1997	Folhas
Lauraceae				
<i>Ocotea glomerata</i> (Nees.) Mez [Murici-AL: 09/00] JEP 3635 (UB)	Louro-pinho	Algumas espécies desse gênero são usadas para tratar dor, reumatismo, febre, dispepsia, dermatites e tumores.	VAN DEN BERG, 1982; VIEIRA, 1992	Casca do caule, Caule e Folhas
Mirtaceae				
<i>Eugenia uniflora</i> L. [Maceió-AL: 05/97] 29879	Pitanga	Usada para tratar bronquite, influenza e distúrbios intestinais (F), como febrífuga e antirreumática (F); possui propriedades antioxidante (PA), antifúngica (F), antimicrobiana (F), hipotensiva (F), tripanocida (F) e diurética (F).	SIMÕES, 1989; LIMA <i>et al.</i> , 1993; ALMEIDA <i>et al.</i> , 1995; CONSOLINI <i>et al.</i> , 1999; ADEWUNMI <i>et al.</i> , 2001; CONSOLINI & SARUBBIO, 2002; HOLETZ <i>et al.</i> , 2002; SOUZA <i>et al.</i> , 2002; VELAZQUEZ <i>et al.</i> , 2003	Folhas e Caule
Olacaceae				
<i>Ximena americana</i> L. [Juazeiro do Piauí-PI: 04/02] 14580	Ameixa, Ameixa de Espinho, Ameixa do Brasil	Usada como adstringente no tratamento das menstruações excessivas, na lavagem de feridas e cicatrização de úlceras (C), afecções da boca, reumatismo e diarreia (R).	BRAGA, 1960; KONE <i>et al.</i> , 2004	Casca do caule
Piperaceae				
<i>Piper arboreum</i> Aublet. [São Sebastião-AL: 09/00] JEP 3647 (UB)	Alecrim de Angola, Pau de Angola	Usada para tratar reumatismo, como carminativo e emoliente (H e F).	VAN DEN BERG, 1982	Folhas
Rhamnaceae				
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. [Propriá-SE: 09/00] JEP 3637 (UB)	Juá	Usada para tratar problemas estomacais (F) e febres intermitentes (C), como tônico capilar (E) e utilizada na higiene pessoal como sabão (E).	BRAGA, 1960; DELORME & MIOLLA, 1979	Caule

H-Haste, C-Casca, E-Entrecasca, FL-Flores, L-Lenho, R-Raiz, F-Folha

I.2 – Considerações sobre a família Annonaceae, a espécie *Annona muricata* e as acetogeninas

I.2.1 – A família Annonaceae

A família Annonaceae Juss. é bastante ampla compreendendo cerca de 130 gêneros e mais de 2300 espécies, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do mundo (ALALI *et al.*, 1999). Destes, 51 gêneros e 950 espécies são encontrados na Ásia e Austrália; 40 gêneros e 450 espécies na África e Madagascar e cerca de 38 gêneros e 740 espécies no continente Americano (**Figura 3 p. 12**). Esta família de plantas tropicais é considerada possuidora de espécies primitivas e de aspecto arcaico. Elas foram chamadas por Darwin como “fóssil vivo”, que até agora, em circunstâncias favoráveis, têm escapado da extinção e sobrevivido até os dias atuais. A família Annonaceae está incluída na ordem das Magnoliales e segundo Leboeuf *et al.*, 1982 forma uma das mais primitivas famílias de angiospermas.

No aspecto econômico, Annonaceae apresenta uma diversidade muito grande como uma fonte de frutos comestíveis, principalmente nos gêneros *Annona*, *Cananga* e *Rollinia* e, além disso, vários membros dessa família são usados na medicina popular para tratar os mais diversos males. Investigações dos constituintes químicos de extratos de diferentes partes de espécies desta família levaram ao isolamento de uma grande variedade de compostos (WATERMAN, 1986), a maioria dos trabalhos realizados nos anos 60 e 70, foram voltados para o isolamento de alcalóides. Alcalóides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos foram os mais comumente isolados do gênero *Annona*, sendo que a **reticulina** parece ser o de maior ocorrência. Leboeuf *et al.* em 1982, listou cerca de 170 alcalóides já isolados de diversos gêneros de Annonaceae, principalmente os do tipo isoquinolínicos. Alcalóides protoberberínicos, proaporfínicos, dentre outros, também foram obtidos (LEBOUEF *et al.*, 1982). Em 1984, a azaantraquinona **cleistofolina** foi isolada de *Cleistopholis patens* (WATERMAN, 1984), e a **dielsiquinona** foi obtida de *Guateria dielsiana* (GOULART *et al.*, 1986), foram reconhecidas como uma nova classe de alcalóides presentes nessa família. Conhecidos como alcalóides azaantraquinonas. Representantes azaantracênicos como a **geovanina** (OLIVEIRA *et al.*, 1987) e a **anofolina** (RASAMIZAFY *et al.*, 1987) também foram obtidos.

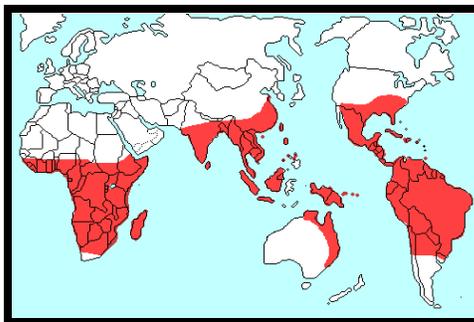
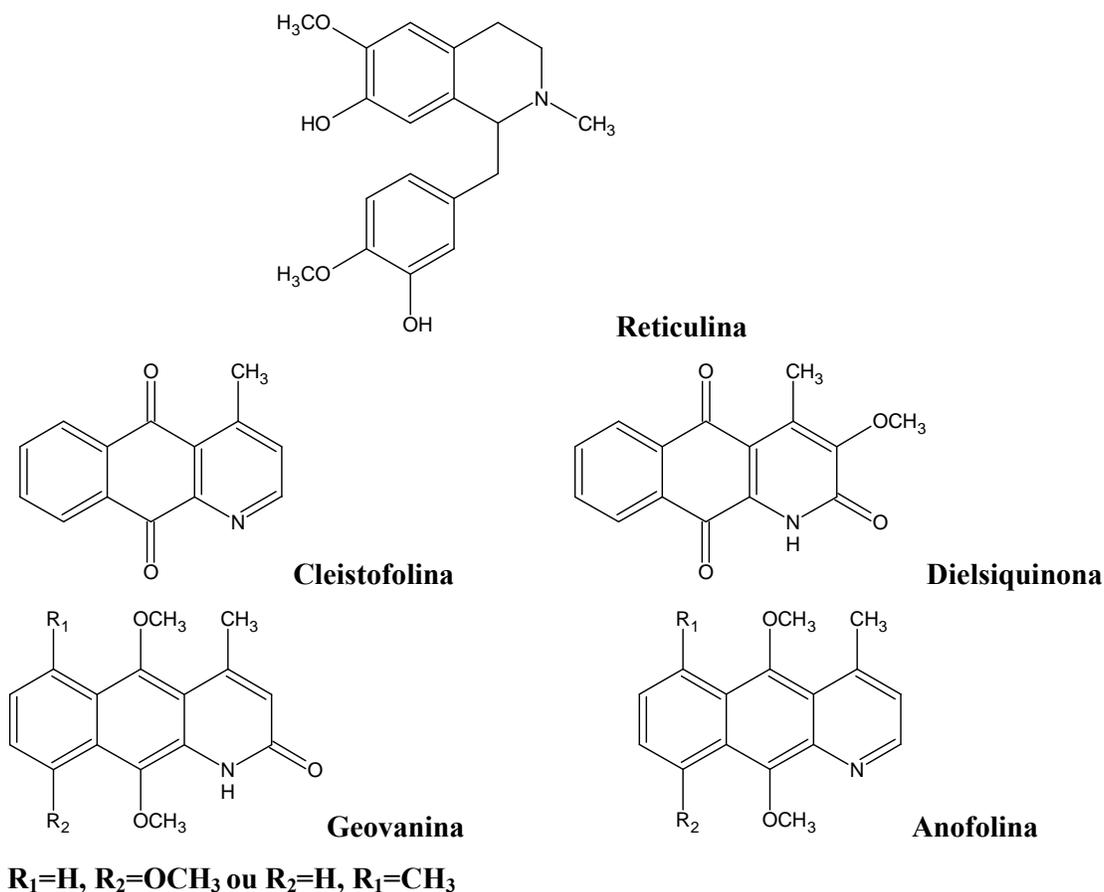


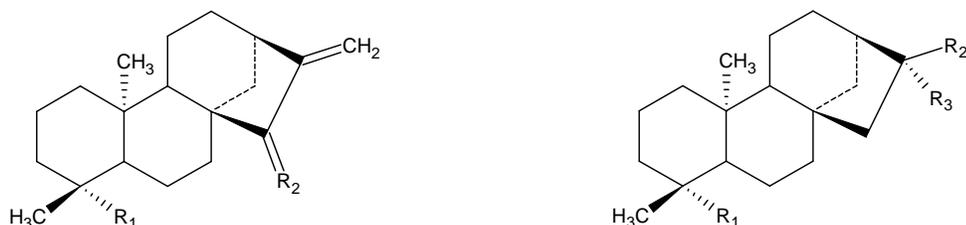
Figura 3 – Distribuição mundial da família Annonaceae (www.omnicyber.org 11/12/2005)



Apesar do direcionamento das pesquisas com anonáceas nos últimos anos não ter como enfoque principal os alcalóides, novos membros dessa classe de compostos são ainda isolados em trabalhos com espécies desta família. Do extrato metanólico dos galhos de *Annona cherimola* foi isolada a cherimolina, um alcalóide tipo quinolínicos possuindo um anel lactona de 6 membros (CHEN *et al.*, 1997). Dois alcalóides 7-desidroaporfínicos foram obtidos das folhas de *Annona purpurea* (CHANG *et al.*, 1998). Das folhas de *Annona cherimola* foi isolado um alcalóide benzilisoquinolínicos (CHEN & WU, 2001). Dos Santos *et*

al., 2003 isolou um alcalóide 7-desidroaporfina do extrato etanólico da madeira de *Annona dioica*. A literatura registra ainda dentre outros, novos alcalóides isolados das sementes de *Annona atemoya* (WU *et al.*, 2005), dos galhos de *Annona squamosa* (YANG *et al.*, 2004), dos frutos e galhos de *Annona glabra* (CHANG *et al.*, 2000) e das folhas de *Annona montana* (WU *et al.*, 1993).

Outra importante classe de compostos isolados da família Annonaceae até meados dos anos 80 é a dos terpenóides. Andrade *et al.*, 2003 revisou os terpenóides isolados nesta família entre 1954 e 2001 e verificou um total de 518 terpenóides isolados divididos em 11 tipos diferentes de esqueletos. A abundância de diterpenos do tipo caurano é notável (152 citações), exemplos destes compostos isolados de espécies de *Annona* (**1-11**) são mostrados abaixo.



	R₁	R₂		R₁	R₂	R₃
1	CH ₂ OH	H ₂	5	CHO	H	CH ₂ OH
2	CH ₂ OAc	H ₂	6	CHO	H	CH ₂ OAc
3	CHO	H ₂	7	OH	H	COOH
4	CO ₂ H	H ₂	8	OH	H	COOCH ₃
			9	CHO	H	COOH
			10	CHO	H	COOCH ₃
			11	CO ₂ H	H	COOH

A família Annonaceae é muito rica na biodiversidade de compostos químicos e embora menos freqüentes compostos de outras classes também foram isolados desta família, tais como carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas, ácidos fenólicos, catequinas, proantocianidinas, taninos, flavonóides, óleos essenciais, lactonas, compostos aromáticos, poliacetilenos, vitaminas, carotenos, esteróides, saponinas, monoterpênos, sesquiterpênos e triterpênos, neolignanais, amidas e ciclopeptídeos (WELE *et al.*, 2005a; WELE *et al.*, 2005b; YANG *et al.*, 2004; AKENDENGUE *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2003; SANTOS & SALATINO, 2000; LUE *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1997; DIAZ, 1997; HAO *et al.*, 1995; KUBTSCHABSKY *et al.*, 1985; LEBOEUF *et al.*, 1982). Nos últimos 20 anos, o direcionamento dos estudos fitoquímicos nas anonáceas mudou consideravelmente para uma importante classe de compostos encontrados nessa família conhecidos como acetogeninas (CHANG *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2001; GLEYE *et al.*, 2001; GLEYE *et al.*, 1999; ALALI *et al.*, 1999; YU *et al.*, 1998; GLEYE *et al.*, 1997a e 1997b; ROBLOT *et al.*, 1993).

I.2.2 – A espécie *Annona muricata*

O gênero *Annona* possui mais de 100 espécies de árvores e arbustos que se encontram distribuídos em países tropicais e subtropicais. A espécie *A. muricata* conhecida no Brasil como graviola, cruaçá, araticum do grande ou jaca do Pará, é bastante cultivada por possuir um fruto comestível de ampla aceitação comercial (BORIES *et al.*, 1991).

A gravioleira (**Figura 4**) possui caule reto, galhos pequenos fechados e finos, sua altura chega a 7,5-9,0 metros. Possui flores grandes de coloração amarelo-pálida e suas folhas são normalmente verdes, largas, alternadas, lisas, lustrosas e de forma oblonga. O fruto é o maior da família, de forma ovóide, ou em forma de coração, apresenta falsos espinhos recurvados, e são carnosos, curtos e moles. Sua polpa é branca, doce, mas ligeiramente ácida. Possui ainda muitas sementes pretas e longas. *A. muricata* é originária do sul da América Tropical, e hoje é bem distribuída no oeste da Índia e África (MORTON, 1987).



Figura 4 – Gravioleira (<http://www.cieer.org> 18/12/2005)

Diferentes propriedades e usos são atribuídos a diferentes partes dessa planta na medicina popular. O fruto verde é usado como anti-diarréico (BORIES *et al.*, 1991), contra aftas, para combater piolhos e outros parasitas da pele e para afugentar moscas e mosquitos (CORRÊA, 1978). As folhas são usadas como antiespasmódicas, antidisentéricas, hipoglicemiante, para tratar reumatismos e abscessos (CORRÊA, 1978), como sedativas e tranqüilizante. (MARTINS, 1989; HASRAT, 1997; BORIES *et al.*, 1991). As sementes são usadas como inseticida, parasiticida (BORIES *et al.*, 1991), adstringentes e eméticas (CORRÊA, 1978). Seu óleo essencial tem propriedades anti-reumáticas, antinevrálgicas e parasiticidas (MARTINS, 1989); as raízes são usadas como antídoto nos envenenamentos por entorpecentes (CORRÊA, 1978) e como antiparasíticas e pesticida (GLEYE, 1997b) e a casca da raiz é usada como sedativa, antiespasmódica e para tratar diabetes (VASQUEZ, 1990). *A. muricata* é ainda usada no tratamento da malária e no estado do Amazonas, seu fruto é usado

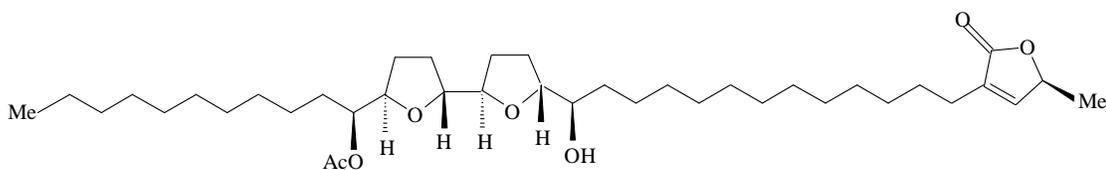
para tratar febre (MILLIKEN, 1997). Cápsulas de folhas e galhos de graviola podem ser encontradas a venda na internet como uma alternativa no combate ao câncer (www.boticaperu.com; www.intimaca.com; www.harvesthealth.com, 22/11/05).

Esta espécie é rica em compostos bioativos e vários trabalhos de pesquisas têm demonstrado para a *A. muricata* atividades, hipotensiva das folhas (CARBAJAL *et al.*, 1991), antidepressiva do fruto com o isolamento de alcalóides isoquinolínicos como os responsáveis pela atividade (HASRAT *et al.*, 1997), anti-herpes da casca do caule (PADMA *et al.*, 1998), citotóxica (cell line U 937) e antileishmanial contra *Leishmania braziliensis* e *L. panamensi* do pericarpo cujo fracionamento levou ao isolamento das acetogeninas anonacina, anonacina A e anomuracina A (JARAMILLO *et al.*, 2000). BORIES *et al.*, 1991, determinou a ação do extrato das sementes de *A. muricata* contra *Molinema dessetae* e isolou as acetogeninas anonacina, anonacinona, murisolina, corossolina e corossolona como responsáveis pela atividade. Foram observadas ainda atividades contra *Entamoeba histolytica*, antibacterial contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *Penicillium oxalicum* (casca) (HEINRICH, 1992) e moluscicida contra o caramujo adulto *Biomphalaria glabrata* (folha) (DOS SANTOS e SANT'ANA, 2001) e Feng *et al.*, 1962 descrevem a ação relaxante muscular e cardiodepressiva para os extratos da casca e folhas de *A. muricata*.

Estudos químicos com a *A. muricata* levaram ao isolamento de compostos das mais variadas classes: alcalóides, terpenóides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos (ANDRADE *et al.*, 2003; LEBOUF *et al.*, 1982), entretanto, nos últimos anos as pesquisas fitoquímicas com esta espécie foram realizadas com o interesse principal de se isolar compostos da classe das acetogeninas (ZENG, *et al.*, 1996; RIESER, *et al.*, 1996; GLEYE, *et al.*, 1997a e 1997b; CHANG & WU, 2001; LIAW *et al.*, 2002).

I.2.3 – Acetogeninas

As acetogeninas representam uma classe de compostos relativamente nova, mas que tem crescido rapidamente. A primeira acetogenina, uvaricina, foi isolada em 1982 a partir do extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata*. Uvaricina apresentou uma alta atividade antileucêmica e marcou o início do estudo dessa classe de compostos (RUPPRECHT *et al.*, 1990).



Uvaricina

Quimicamente, as acetogeninas são compostos C_{35} - C_{39} derivados dos ácidos graxos de cadeia longa e contém tipicamente duas cadeias longas de hidrocarbonetos, uma das quais conecta um grupo terminal γ -lactona-2,4-dissubstituído, podendo ser saturado ou α,β -insaturado, a um número variável de anéis tetraidrofurânicos (THF) e até o momento foram encontradas unicamente na família Annonaceae. As cadeias hidrocarbônicas apresentam-se geralmente oxigenadas na forma de grupos hidroxilas, acetoxilas e/ou cetonas. Acetogeninas sem anéis THF, contendo anéis simples com ligações duplas contendo ainda ou não grupos epóxidos também já foram descritas (FANG *et al.*, 1993; CHANG & WU, 2001).

As acetogeninas são potencialmente bioativas e apresentam intenso potencial como agente antitumoral, citotóxico, imunossupressivo, pesticida, antibacterial e antimicrobiana (HISHAM *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1998a e 1998b; ROBLOT *et al.*, 1993; GLEYE *et al.*, 2001) e devido a essas atividades, esses produtos naturais têm atraído considerável atenção dos pesquisadores. O modo primário de ação das acetogeninas é a inibição do complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase) no sistema de transporte eletrônico mitocondrial, inibindo a fosforilação oxidativa e resultando na diminuição dos níveis de ATP celular e na inibição do crescimento das células cancerígenas. Um segundo modo de ação relacionado é a inibição da enzima NADH oxidase nas membranas plasmáticas das células cancerígenas, resultando na diminuição brusca de ATP celular. As acetogeninas são descritas como um dos inibidores mais potentes no transporte de elétrons em mamíferos (FANG *et al.*, 1993; ZENG *et al.*, 1996; OBERLIES *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Yuan *et al.*, 2003 sugerem que a Annonacina, uma acetogenina que possui apenas um anel THF, isolada da *A. muricata* (LIAW *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1998; BORIES *et al.*, 1991), é um composto anticancerígeno promissor. OBERLIES *et al.*, 1995 demonstraram que acetogeninas de anonáceas constituem uma classe de compostos extremamente potente e que possuem atividade de inibição do crescimento celular seletiva para células cancerígenas e exibe toxicidade mínima em células não cancerígenas. As acetogeninas mostraram-se mais eficazes que o agente antineoplásico padrão, a adriamicina, e também foram ativas em células cancerígenas resistentes a adriamicina. A habilidade desses compostos em bloquear a formação de ATP foi destacada por Oberlies *et al.*, 1995 como

sendo o único modo de ação de agentes antineoplásicos e uma esperança para o tratamento de tumores resistentes que requerem ATP para energizar o mecanismo transportador.

As acetogeninas podem ser divididas em quatro classes estruturais de acordo com a quantidade e o arranjo dos anéis tetraidrofurânicos: acetogeninas contendo dois anéis THF adjacentes, acetogeninas contendo dois anéis THF não adjacentes, acetogeninas contendo um único anel THF e aquelas acetogeninas que não possuem anel THF (FANG *et al.*, 1993). Devido a essa grande variedade estrutural, novas acetogeninas podem ainda ser isoladas da família Annonaceae. De acordo com Fang *et al.* (1993) e Gu *et al.* (1995) estudos de relação estrutura atividade com acetogeninas revelaram que:

1-Em todos os casos, acetogeninas com 2 anéis THF adjacentes são mais potentes que aquelas com 2 anéis THF não adjacentes, que são mais potentes que as acetogeninas com apenas 1 anel THF e essas são ainda mais potentes que aquelas que não possuem anel THF.

2-O grupo γ -lactona terminal é essencial para a atividade; redução da dupla ligação em γ -lactonas α,β -insaturadas reduz a atividade; cetolactonas são menos potentes que γ -lactonas α,β -insaturadas; redução da cetona restaura alguma atividade.

3-O grupo hidroxila na posição 4 é muito importante para o aumento da atividade; o aumento do número de hidroxilação para 3 hidroxilas livres também aumenta a atividade, especialmente se uma hidroxila estiver presente no final da cadeia alifática; um nível médio de polaridade deve ser importante porque a presença de 4 ou 5 hidroxilas diminui a atividade biológica.

4-Compostos com grupo ceto ao longo da cadeia alifática são menos ativos que seus análogos hidroxilados; redução dos grupos carbonilas a álcoois aumenta a atividade.

5-A presença de duplas ligações e/ou dióis vicinais ao longo da cadeia hidrocarbônica aumenta a atividade.

6-Derivados acetonídeos de dióis vicinais, derivados acetilados e outras possíveis substituições sobre as hidroxilas produzem compostos menos ativos que aqueles de partida.

I.2.3.1 – Acetogeninas encontradas no gênero *Annona*

A **Tabela 2 p. 18** contém uma lista do número de acetogeninas encontradas em espécies do gênero *Annona* até abril do ano de 2005, em uma pesquisa usando a base de dados NAPRALERT e a **Tabela 3 p. 19** contém alguns exemplos de acetogeninas encontradas em *Annona muricata*. Vale ressaltar que a maior parte das acetogeninas isoladas de *A. muricata*

são do tipo mono-THF, embora acetogeninas com dois anéis THF e sem anel THF também tenham sido isoladas.

Tabela 2: Acetogeninas em espécies do gênero *Annona* até abril do ano de 2005

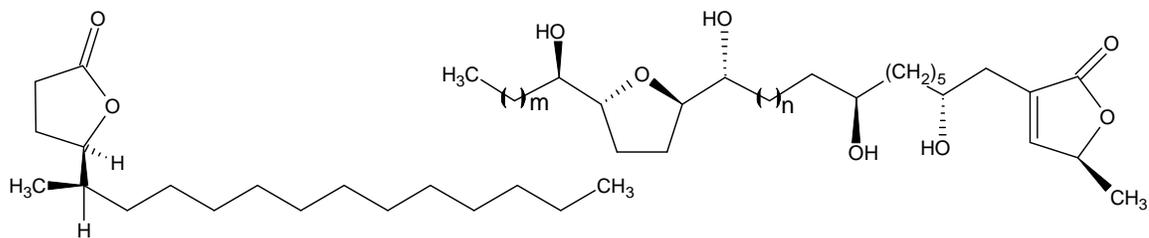
Espécie	Parte estudada	Número de Acetogeninas Isoladas
<i>Annona atemoya</i>	Raiz, Semente	4, 46
<i>Annona bullata</i>	Casca, Casca do Caule	34, 2
<i>Annona cherimolia</i>	Caule, Raiz, Semente	2, 6, 35
<i>Annona coriacea</i>	Raiz, Semente	08, 1
<i>Annona crassiflora</i>	Semente	1
<i>Annona densicoma</i>	Casca, Casca do Caule	4, 7
<i>Annona glabra</i>	Folhas, Semente	13, 22
<i>Annona glauca</i>	Raiz, Semente	2, 14
<i>Annona haematanthai</i>	Raiz	1
<i>Annona jahnii</i>	Galhos	3
<i>Annona montana</i>	Folhas, Sementes, Raiz	20, 17, 9
<i>Annona muricata</i>	Folhas, Casca do Caule, Pericarpo, Raiz, Semente	36, 4, 2, 24, 75
<i>Annona nutans</i>	Casca da Raiz	6
<i>Annona purpurea</i>	Folhas, Caule, Semente	7, 1, 9
<i>Annona reticulata</i>	Folhas, Casca, Casca do Caule, Semente	7, 2, 4, 22
<i>Annona senegalensis</i>	Semente	10
<i>Annona spinescens</i>	Semente	12
<i>Annona spraguei</i>	Semente	04
<i>Annona squamosa</i>	Casca, Casca do Caule, Semente	6, 20, 50

Tabela 3: Exemplos de Acetogeninas de *Annona muricata*

Acetogenina	Parte da Planta	Tipo	Atividade	Referência
Murisolina	Semente	Mono-THF	Citotóxica, antiparasítica (<i>Molinema dessetae</i>)	MYINT <i>et al.</i> , 1990; BORIES <i>et al.</i> , 1991; ROBLOT <i>et al.</i> , 1993; LIAW <i>et al.</i> , 2002
Muricatacina	Semente	Sem anel THF e com anel lactona saturado	Citotóxica	RIESER <i>et al.</i> , 1991
Anonacina	Semente, Folhas, Pericarpo	Mono-THF	Antiparasítica (<i>M. dessetae</i>); Citotóxica; promove morte neuronal dopaminérgica, induz neurodegeneração e astrogliose em ratos	RIESER <i>et al.</i> , 1991; BORIES <i>et al.</i> , 1991; GROMEK <i>et al.</i> , 1994; WU <i>et al.</i> , 1995a; YU <i>et al.</i> , 1998; JARAMILLO <i>et al.</i> , 2000; LIAW <i>et al.</i> , 2002; CHAMPY <i>et al.</i> , 2002; LANNUZEL <i>et al.</i> , 2003; CHAMPY <i>et al.</i> , 2004
Solamina	Semente, Casca do Caule, Raiz Folhas	Mono-THF	Citotóxica	MYINT <i>et al.</i> , 1991; ROBLOT <i>et al.</i> , 1993; HISHAM <i>et al.</i> , 1993; GLEYE <i>et al.</i> , 1998a; LIAW <i>et al.</i> , 2002
Corossolona	Semente, Folhas	Mono-THF	Citotóxica, antiparasítica (<i>M. dessetae</i>)	MYINT <i>et al.</i> , 1991; CORTES <i>et al.</i> , 1991; BORIES <i>et al.</i> , 1991; ROBLOT <i>et al.</i> , 1993; CHANG & WU, 2001; LIAW <i>et al.</i> , 2002
Goniotamicina	Folhas	Mono-THF	-	WU <i>et al.</i> , 1995a

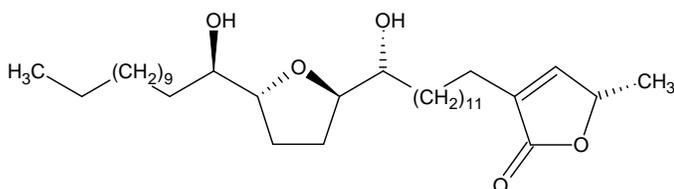
Continuação da tabela 3

<i>Cis</i> -Anonacina e <i>Cis</i> -Anonacina- 10-ona	Semente	Mono-THF	Citotóxica	RIESER <i>et al.</i> , 1996
Anopentocinas A, B e C	Folhas	Mono-THF	Citotóxica	ZENG <i>et al.</i> , 1996
Arianacina	Semente	Mono-THF	Citotóxica	RIESER <i>et al.</i> , 1996
Javoricina	Semente	Mono-THF	Citotóxica	RIESER <i>et al.</i> , 1996
Coibinas A e B	Raízes	Sem anel THF e com dupla ligação na cadeia alifática	-	GLEYE <i>et al.</i> , 1997b
Muridienina-1, -2, -3 e -4	Raízes	Sem anel THF, e com 2 ligações duplas na cadeia alifática	-	GLEYE <i>et al.</i> , 1998b

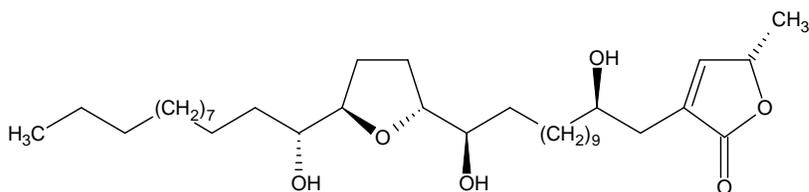


Murisolina

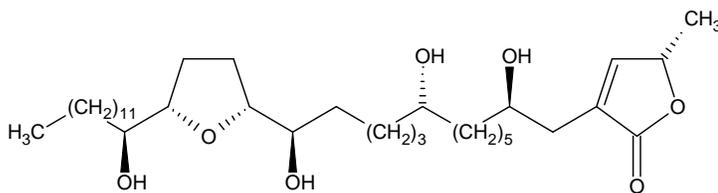
Anonacina m=11; n=3
Goniotalamicina m=13; n=5



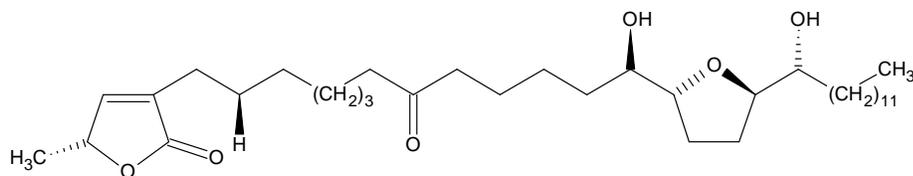
Muricatacina



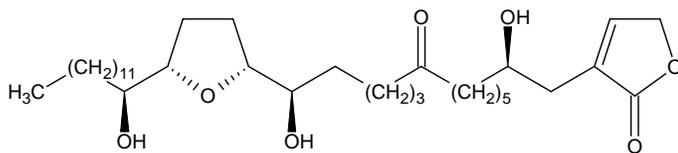
Solamina



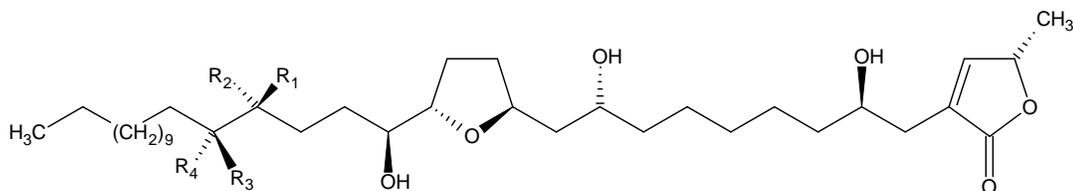
Corossolona



Cis-Anonacina



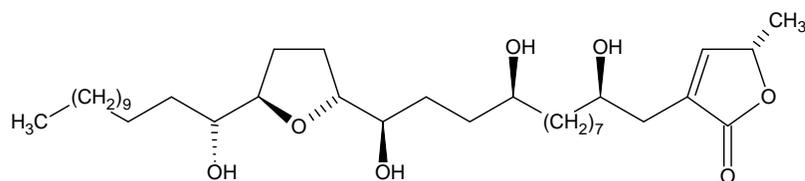
Cis-Anonacina-10-ona



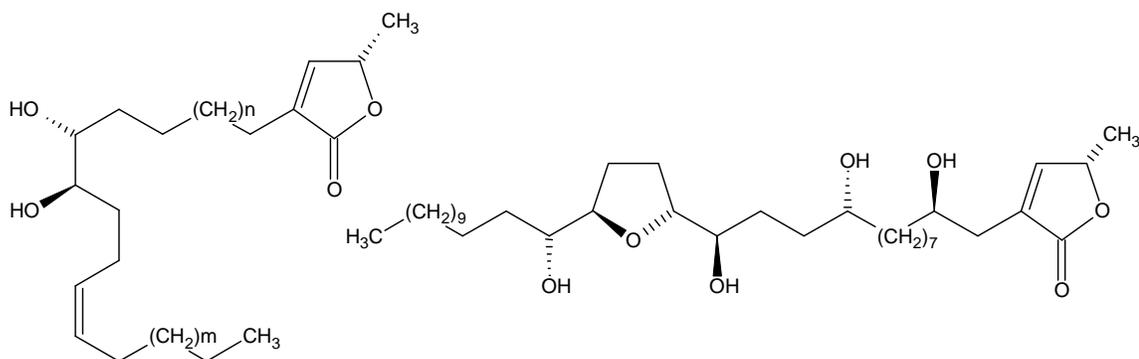
Anopentocina A $R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH$

Anopentocina B $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=H$

Anopentocina C $R_1=H(OH), R_2=OH(H), R_3=(OH)H, R_4=H(OH)$



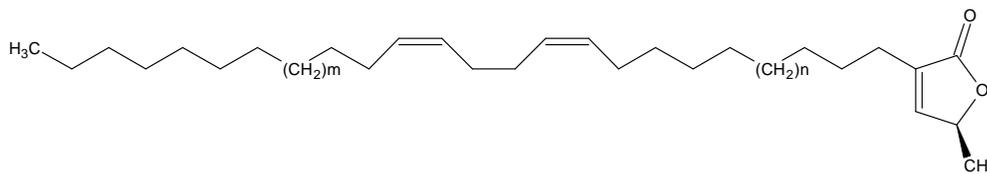
Arianacina



Coibina A $m=9, n=9$

Coibina B $m=11, n=7$

Javoricina



Muridienina-1 $n=3; m=5$

Muridienina-2 $n=5; m=5$

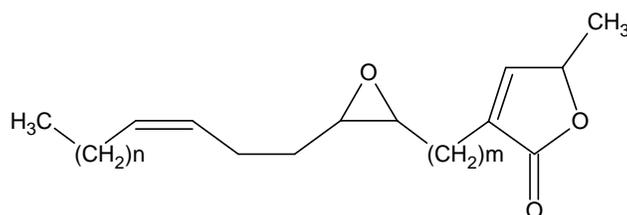
Muridienina-3 $n=3; m=7$

Muridienina-4 $n=7; m=3$

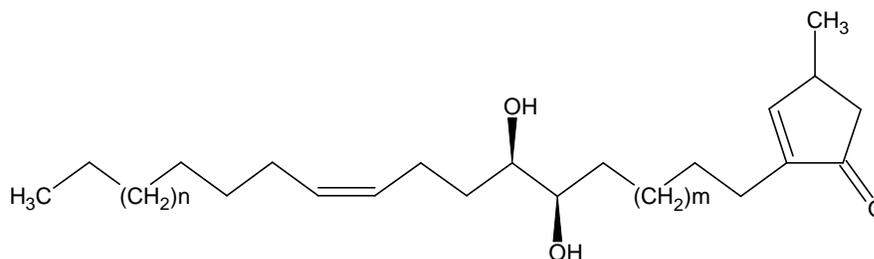
I.2.3.2 – Biossíntese das Acetogeninas

Segundo RUPRECHT *et al.*, 1990 e FANG *et al.*, 1993, a análise retrobiossintética das acetogeninas conhecidas revela que seus precursores podem ter sido reunidos por uma combinação linear de duas ou três unidades de carbonos (ácido acético ou ácido propiônico) via acetil-CoA, malonil-CoA e propionil-CoA, através de mecanismos análogos ao caminho metabólico para a biossíntese dos ácidos graxos. As acetogeninas com anéis tetraidrofurânicos podem ser divididas em três grupos e podem ser obtidas por epoxidação do trieno, dieno ou trienocetona seguido por abertura e fechamento de anel. A estereoquímica dos anéis tetraidrofurânicos e grupos hidroxilas adjacentes dependem da regioquímica das duplas ligações, da face de epoxidação e do modo de abrir e fechar os anéis epóxidos (cauda-cauda ou de dentro pra fora) como o caminho hipotético mostrado na **Figura 5 p. 25**.

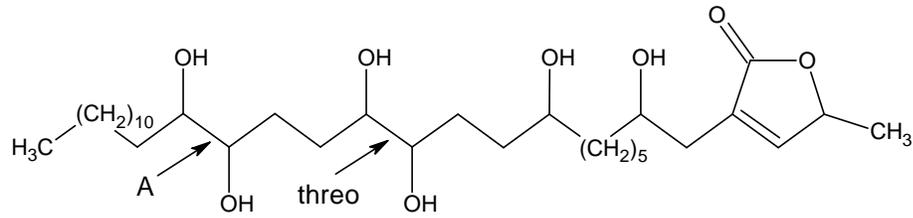
O isolamento das acetogeninas de *A. muricata* sem anel THF epomuriceninas A e B (ROBLOT *et al.*, 1993), coibinas A e B (GLEYE *et al.*, 1997b), muriexol e donexocina (YU *et al.*, 1998), chatenaitrieninas 1, 2, 3 e 4, muricadienina e muridienina 1, 2, 3 e 4 (GLEYE *et al.*, 1998b), sabadelina (GLEYE *et al.*, 1999), coibinas C e D (GLEYE *et al.*, 2000a) e coronina (GLEYE *et al.*, 2001) como uma série biogenética, é um importante argumento em favor da hipótese para a biossíntese de acetogeninas mono- e bis-THF.



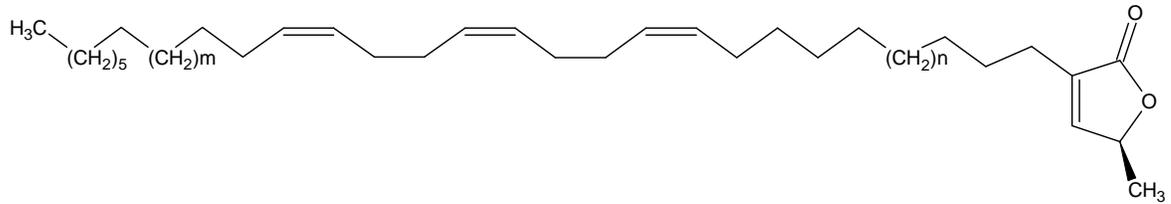
m=12, n=11 Epomuricenina A; m=10, n=13 Epomuricenina B



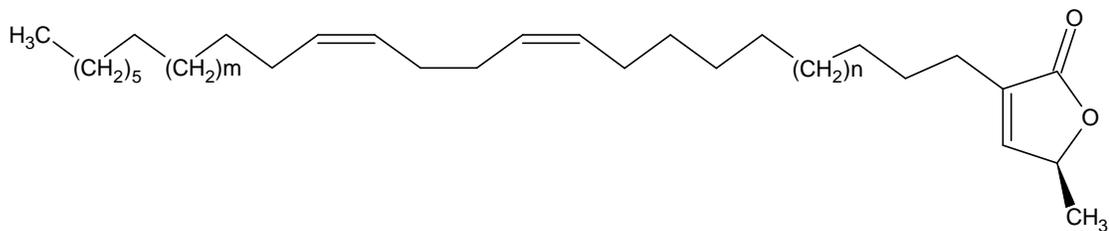
m=9, n=9 Coibina A; m=7, n=11 Coibina B



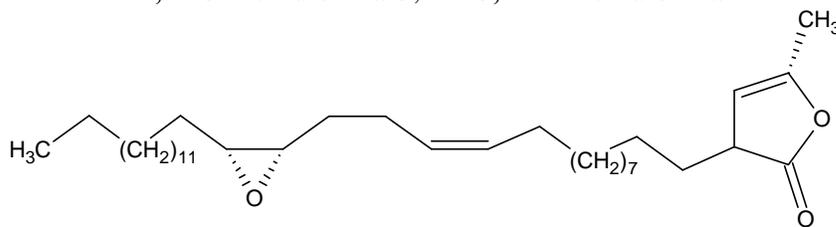
A=eritro Muriexol; A=treo Donexocina



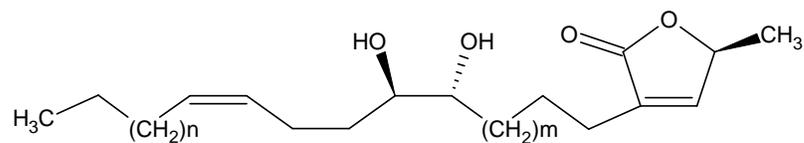
**m=1, n=3 Chatenaitrienina-1; m=3, n=1 Chatenaitrienina-2;
m=3, n=3 Chatenaitrienina-3; m=1, n=5 Chatenaitrienina-4**



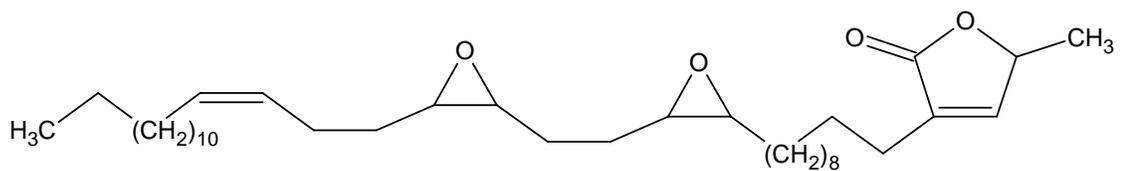
**m=3, n=5 Muricadienina; m=5, n=3 Muridienina-1; m=5, n=5 Muridienina-2;
m=7, n=3 Muridienina-3; m=3, n=7 Muridienina-4**



Sabadelina



m=12, n=10 Coibina C; m=10, n=12 Coibina D



Coronina

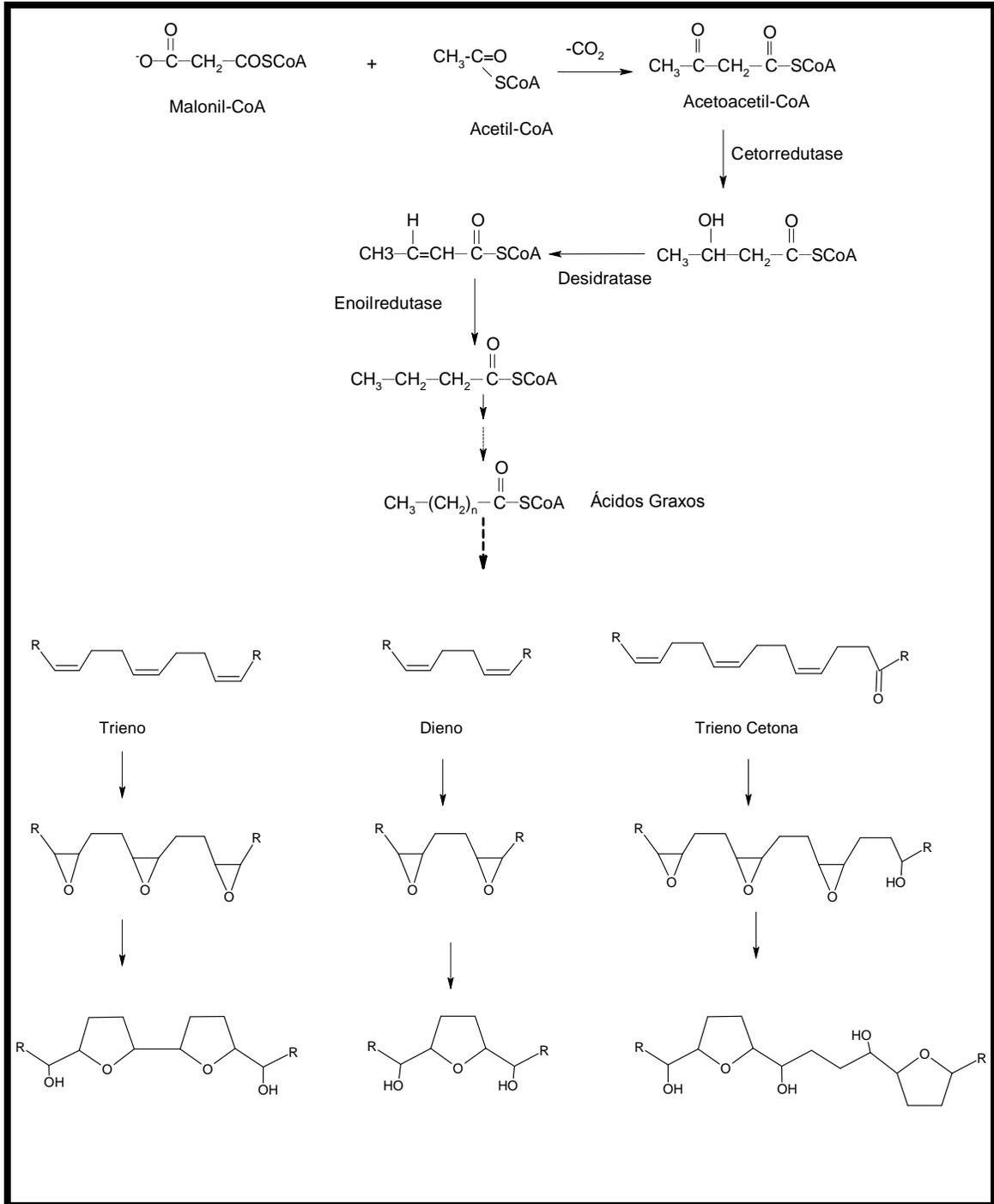


Figura 5 – Proposta da provável rota biossintética das acetogeninas (Rupprecht *et al.*, 1990)

I.3 – Considerações sobre a família Olacaceae e a espécie *Ximenia americana*

I.3.1 – A família Olacaceae

A família Olacaceae é predominantemente encontrada em países tropicais (**Figura 6**) e possui cerca de 45 gêneros e mais que 220 espécies (THUMFORT *et al.*, 1993; HOSAMANI & PATTANASHETTAR, 2004). Estudos químicos realizados com espécies desta família permitiram identificar as seguintes classes de compostos: flavonóides, sesquiterpenos, alcalóides, saponinas e ácidos graxos (WIART *et al.*, 2001; FORT *et al.*, 2000; BOHLIN, 1999; ROJAS & HEBLE, 1994; DIRSCH *et al.*, 1993; ABE & YAMAUCHI, 1993; FORGAES & PROVOST, 1981). Os óleos das sementes de olacáceas constituem uma fonte rica em ácidos graxos e lipídeos (SPITZER *et al.*, 1997). Alguns exemplos de ácidos graxos de olacáceas podem ser vistos no item 1.3.2.

A atividade biológica de espécies desta família é pouco estudada sendo que *Ptychopetalum olacoides* (raiz) apresentou atividade anticolinesterase (SIQUEIRA *et al.*, 2003), antioxidante (SIQUEIRA, 2002) e efeito neuroprotetor (SIQUEIRA *et al.*, 2004), entretanto, não foram realizados estudos químicos para identificar os compostos responsáveis pelas atividades. Para *Ochanostachys amentacea* (galhos) foi descrita atividade anti-HIV (RASHID *et al.*, 2001) com o isolamento do ácido poliacetilênico (-)-17-hidroxi-9,11,13,15-octadecatetraínico como um dos responsáveis pela atividade. A literatura registra ainda estudos biológicos com a espécie *Ximenia americana* que estão descritos no item 1.3.2.

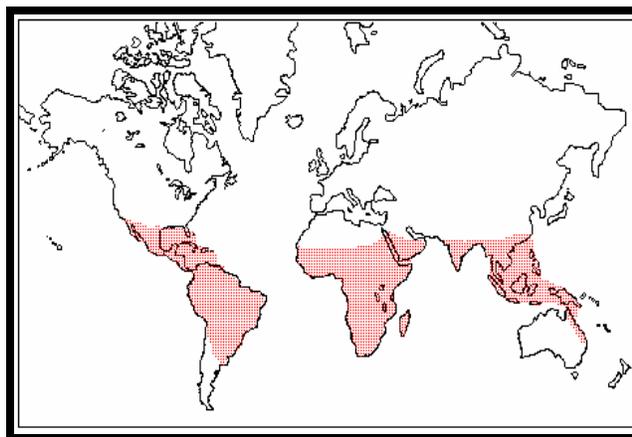


Figura 6 – Distribuição mundial da família Olacaceae (www.science.siu.edu/parasitic-plants/Olacaceae/ 04/12/2005)

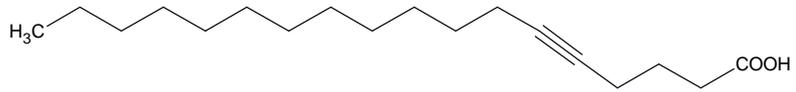
I.3.2 – A espécie *Ximenia americana*

A espécie *X. americana* (**Figura 7**) é uma árvore de 2-5 metros de altura e possui espinhos, que são mais salientes nas plantas a pleno sol e com menos folhagem (POTT & POTT, 1994).

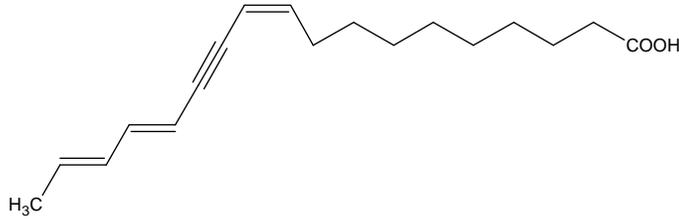


Figura 7 – A espécie *Ximenia americana* (www.science.siu.edu/parasitic-plants/Olacaceae/ 04/12/2005)

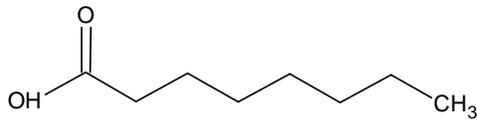
Ximenia americana é conhecida como: Ambuy (Minas Gerais), ameixa-da-baia, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho, ameixa-do-brasil (Ceará), ameixa-do-pará, espinheiro-de-ameixa, limão-bravo-do-brejo, sândalo-do-brasil, umbu-bravo e limão-bravo (BRAGA, 1960) e utilizada popularmente como: aromática, adstringente, hemorroidal, diurética, depurativa, purgativa, contra menstruação excessiva, perturbação gástrica (BRAGA, 1960) e em Cote d'Ivoire na África é usada para o tratamento da malária (BENOIT *et al.*, 1996). Estudos biológicos revelaram que a casca do caule desta planta possui atividade antiviral contra os vírus HIV-1 e HIV-2 (ASRES *et al.*, 2001). Frações obtidas do extrato clorofórmico das raízes de *X. americana* exibiram atividade pesticida com inibição do crescimento dos ovos de *Clavigralla tomentosicollis*, uma das mais importantes pragas do feijão caupi na região do semiárido do sub-Sahara na África. Estudos químicos determinaram que essas frações eram ricas em dois ácidos graxos C-18 acetilênicos: o ácido octadeca-5-inóico e o ácido (10Z),(14E),(16E)-octadeca-10,14,16-triene-12-inóico (FATOPE *et al.*, 2000a). Extração das raízes de *X. americana* conduziu ao isolamento do palmitato de 3-olean-12-enil que foi inativo no ensaio da larva de camarão (FATOPE *et al.*, 2000b). EROMOSELE & EROMOSELE (2002) descrevem o isolamento e a identificação dos ácidos graxos saturados: ácido caprílico, ácido palmítico e ácido esteárico e dos ácidos insaturados: ácido oléico, ácido eicosadienóico, ácido linolênico, ácido eicosatrienóico, ácido erúico, ácido araquidônico e ácido nervônico obtidos do extrato em éter de petróleo das sementes da *X. americana* e determinados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).



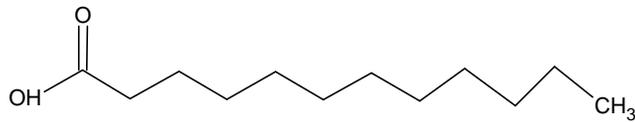
Ácido octadeca-5-inoico



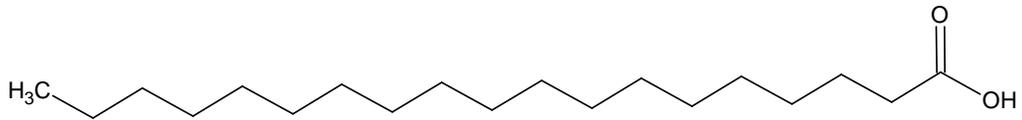
Ácido (10Z), (14E), (16E)-octadeca-10,14,16-trieno-12-inoico



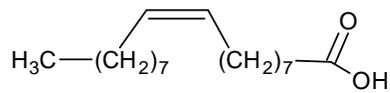
Ácido Caprílico



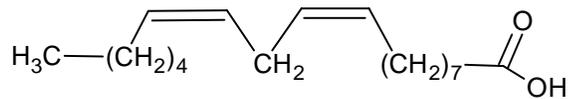
Ácido Palmítico



Ácido Esteárico



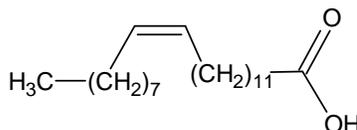
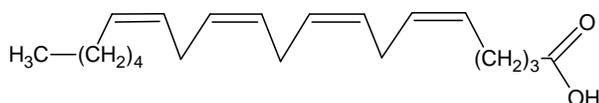
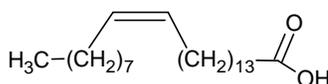
Ácido Oléico



Ácido Eicosadienóico



Ácido linolênico

**Ácido Eicosatrienóico****Ácido Erúico****Ácido Araquidônico****Ácido Nervônico**

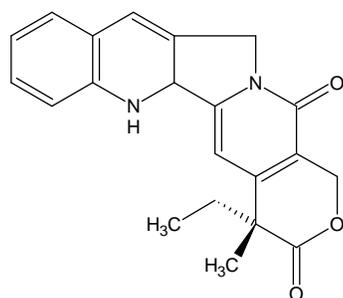
I.4 – Considerações sobre a Família Icacinaceae e a espécie *Emmotum nitens*

I.4.1 – A Família Icacinaceae

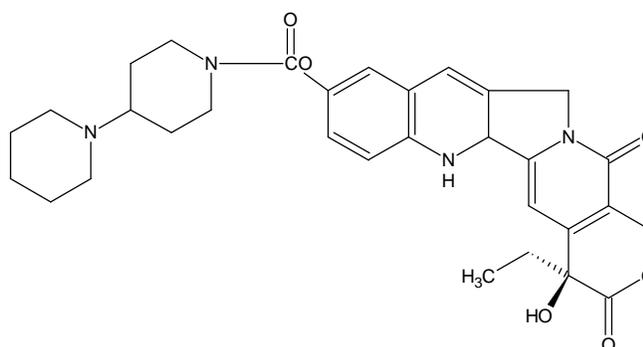
Icacinaceae é uma família pantropical constituída por 38 gêneros. Desses, apenas oito são encontrados no Brasil: *Citronella*, *Dendrobangia*, *Discophora*, *Emmotum*, *Humirianthera*, *Leretia*, *Pleurisanthes* e *Poraqueiba* (OLIVEIRA, 1994). É uma família pouco estudada e que teve o interesse por sua química despertado a partir do isolamento do alcalóide camptotecina, a partir de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae) (GOVINDACHARIA & VISWANATHAN, 1972).

A camptotecina foi primeiramente obtida da planta chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) e demonstrou possuir atividades antileucêmica e antitumoral potentes (WALL *et al.*, 1966). A camptotecina chegou a ser utilizada clinicamente, mas devido a sua pouca solubilidade em água e sua elevada toxicidade caiu em desuso. Este interesse reaparece hoje em dia, porque o Irinotecan um derivado da camptotecina encontra-se no mercado como um

agente anticancerígeno cujo nome comercial é Campto® (Laboratórios Prasfarma) (CÁRDENAS *et al.*, 2002).



Camptotecina



Irinotecan

As espécies da família Icacinaceae analisadas após a revisão de Hegnauer (HEGNAUER, 1966), mostraram uma ampla diversidade de metabólitos secundários, destacando-se os sesquiterpenos do tipo eudesmano rearranjado. Esses foram isolados das espécies *Poraqueiba paraensis* (TRAINOTTI, 1979), *P. guaianensis* (GOULART, 1983), *Emmotum nitens* (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; DE OLIVEIRA *et al.*, 1976; SANT'ANA, 1984), *E. fagifolium* (DA SILVA, 1979), *E. orbiculatum* e *E. glabrum* (MAIA, 1983) que devido as suas origens foram chamadas de emotinas.

I.4.2 – A Espécie *Emmotum nitens* (Benth.) Miers

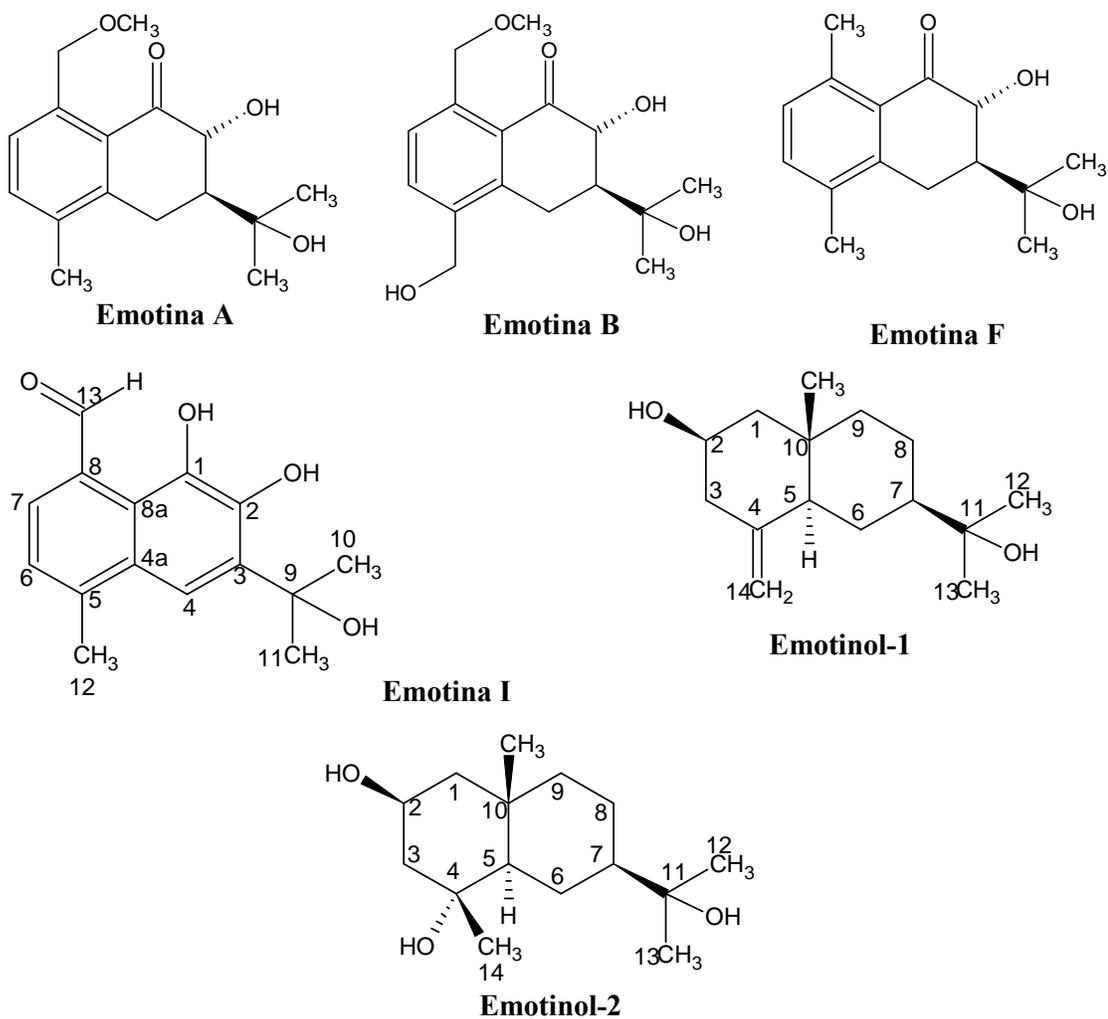
E. nitens (Figura 8 p. 31) possui uma vasta distribuição geográfica estendendo-se desde a Amazônia até aos estados do sul e centro-oeste. Várias emotinas foram isoladas desta espécie. Estes compostos são sesquiterpenóides do tipo tetralina, tetralona, naftaleno, e naftoquinona. As principais emotinas até agora descritas são as **emotinas A, B e F** (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; 1976). A determinação das estruturas das emotinas foi efetuada principalmente através de extensivos trabalhos de transformações químicas, em conjunto com os métodos espectroscópicos. Utilizou-se espectroscopia na região do IV e UV, ressonância magnética nuclear de hidrogênio a 60MHz e a 100MHz, análise elementar e espectrometria de massas e em alguns casos RMN¹³C a 25MHz (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; 1976).

Naquela oportunidade não foram utilizadas técnicas bidimensionais sendo a atribuição de deslocamento químico efetuada por comparação com dados da literatura de substâncias de estruturas relacionadas. Há necessidade de rever estes estudos para confirmar as propostas estruturais. Para melhor conhecer as relações nos espectros de RMN¹H e ¹³C estamos reavaliando os espectros das emotinas A, B e F a 500MHz e 125MHz respectivamente com a

finalidade de racionalizar estes dados e poder discuti-las para o grupo das emotinas tetralonas e tetralinas. Além disso, há três outras emotinas codificadas como **Emotina I**, **Emotinol-1** e **Emotinol-2** cujas estruturas precisam ser revistas e seus espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram também obtidos para esta revisão.



Figura 8 – A espécie *Emmotum nitens* (www.avidepa.org.br 04/12/2005)



I.5 – Considerações gerais sobre os testes de atividade efetuados

I.5.1 – Teste com a *Artemia salina* Leach

A *Artemia salina* Leach, comumente conhecida como “larva de camarão” é um crustáceo de água salgada encontrado em todo mundo, e é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de animais.

Como a *A. salina* é um organismo simples que pode sentir o efeito de qualquer substância biologicamente ativa e apresenta facilidade na obtenção de suas larvas e de estocagem de seus ovos mesmo em ambientes diversos, a mortalidade deste microcrustáceo é considerada o bioensaio ideal. Esse bioensaio é bastante utilizado para monitorar o fracionamento de extratos de plantas com atividades citotóxica, farmacológica ou pesticida, a razão entre o número de larvas mortas e o número de larvas vivas em comparação a um controle negativo é utilizada para estimar a toxicidade das soluções testes (PELKA *et al.*, 2000; MCLAUGHLIN *et al.*, 1991). Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de vegetais fazendo-se o isolamento guiado pelo bioensaio de toxicidade sobre a *A. salina*, que se caracteriza também por ser de baixo custo, fácil manuseio, não exigir técnicas anti-sépticas, resultado rápido e reprodutível. É importante ressaltar que com relação à reprodutibilidade, devem ser considerados parâmetros como temperatura, composição e salinidade do meio e a idade das larvas (HARTL & HUMPF, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 1998).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para monitoramento rápido e simples da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (BORIES *et al.*, 2000), é bastante útil como um teste de apoio para os demais testes de atividade específica.

I.5.2 – A esquistossomose Mansônica e o Caramujo *B. glabrata*

A esquistossomose, conhecida também como esquistossomíase, bilharziose e popularmente barriga d’água é uma endemia parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma* que interage com populações humanas há milhares de anos e ocorre em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta parasitose teve origem nas bacias de dois rios importantes: o Nilo localizado no Egito e o Yang-Tse localizado na China. Os ovos do gênero

Schistosoma, já foram encontrados nas vísceras de múmias egípcias. No Brasil, acredita-se que sua introdução se deu através do tráfico de escravos africanos que traziam consigo o parasito. A presença de hospedeiros intermediários suscetíveis (*Biomphalaria*) permitiu a instalação desta espécie no território brasileiro. De todas as espécies de interesse médico *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. hematobium*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, apenas o *S. mansoni* (**Figura 9**) foi encontrado no Brasil e está completamente adaptado ao meio (NOVAES *et al.*, 1999; NEVES, 2000).



Figura 9 – *Schistosoma mansoni* (www.micro.magnet.fsu.edu/optics/olympusmicd/galleries/brightfield/schistosomamansoni 04/12/05)

Os focos primitivos da doença se instalaram na região canavieira do nordeste e, com os movimentos migratórios que ocorreram em vários momentos da história econômica do país, a doença se expandiu para outras regiões.

No Brasil encontra-se um dos maiores focos de esquistossomose do mundo, distribuindo-se por quase todos os estados, principalmente com infestações endêmicas em partes da região nordeste, leste e centro-oeste (**Figura 10 p. 34**) (<http://www.saneamento10.hpg.ig.com.br/Esquisto.html> 04/12/05).

O ciclo evolutivo da doença é mantido pelo principal hospedeiro definitivo do *S. mansoni*, o homem, embora também acometa roedores silvestres, gado, etc., e por hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*. Em todos os estados brasileiros há pelo menos uma das três espécies hospedeiras do *S. mansoni*, a saber: *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata*, sendo esta última a mais difundida e de maior importância epidemiológica (BARBOSA, 1995).

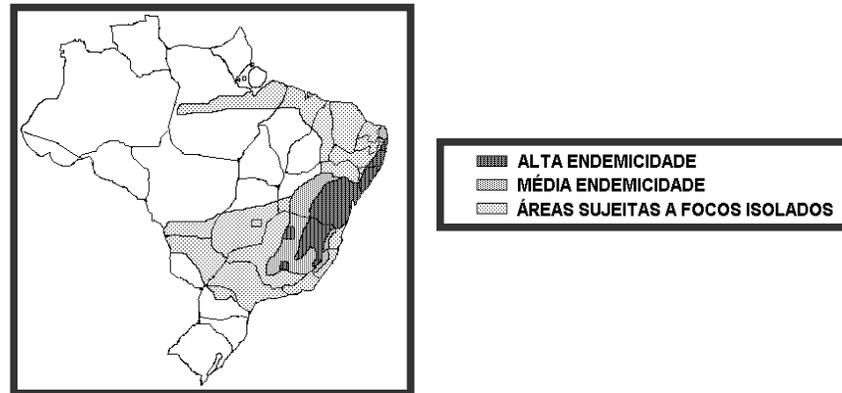


Figura 10 – Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil em 1999

(<http://www.saneamento10.hpg.ig.com.br/Esquisto.html> 04/12/05)

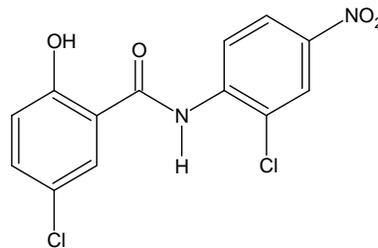
O *S. mansoni*, ao atingir a fase adulta de seu ciclo biológico (**Figura 11 p. 35**) no sistema porta-hepático do homem e de outros mamíferos, alcança a veia mesentérica inferior, onde o macho e fêmea se acasalam e onde ocorre a postura dos ovos. Uma fêmea de *S. mansoni* produz cerca de 300 ovos por dia, parte desses ovos é retida nos tecidos, ocasionando lesões características da esquistossomose, e parte – cerca de 22% - é eliminada nas fezes. Os ovos maduros, quando em contato com a água de lagos e rios, liberam o miracídio. Nesses ambientes o miracídio deve encontrar o molusco hospedeiro num tempo de 24 horas, caso contrário eles morrem, por não serem capazes de se nutrirem. No caramujo, em um período de quatro a sete semanas, eles dão origem às cercárias, que são também formas aquáticas de vida livre. Cada miracídio chega a produzir cerca de 300.000 cercárias que sobrevivem por algumas horas. A movimentação destas na água facilita o encontro com o hospedeiro definitivo, no qual penetram através da pele. Após entrar no hospedeiro definitivo, elas se transformam em poucos minutos nos esquistossômulos. A partir do segundo dia, iniciam migração para os pulmões, pela corrente sanguínea ou linfática. Quando os vermes se tornam adultos, migram para o sistema porta (os vasos sanguíneos do fígado), acasalam-se e começa a postura dos ovos, fechando-se então o ciclo do parasito (OLIVEIRA & GAZZINELLI, 1998).

No conhecido ciclo de transmissão da esquistossomose (**Figura 11 p. 35**) (verme-ovo-miracídio-cercária-verme) pode-se pensar em atacar e romper o ciclo em vários pontos. Um desses pontos é o caramujo *Biomphalaria glabrata*, o hospedeiro intermediário, no qual se processa a transformação do miracídio para cercária.



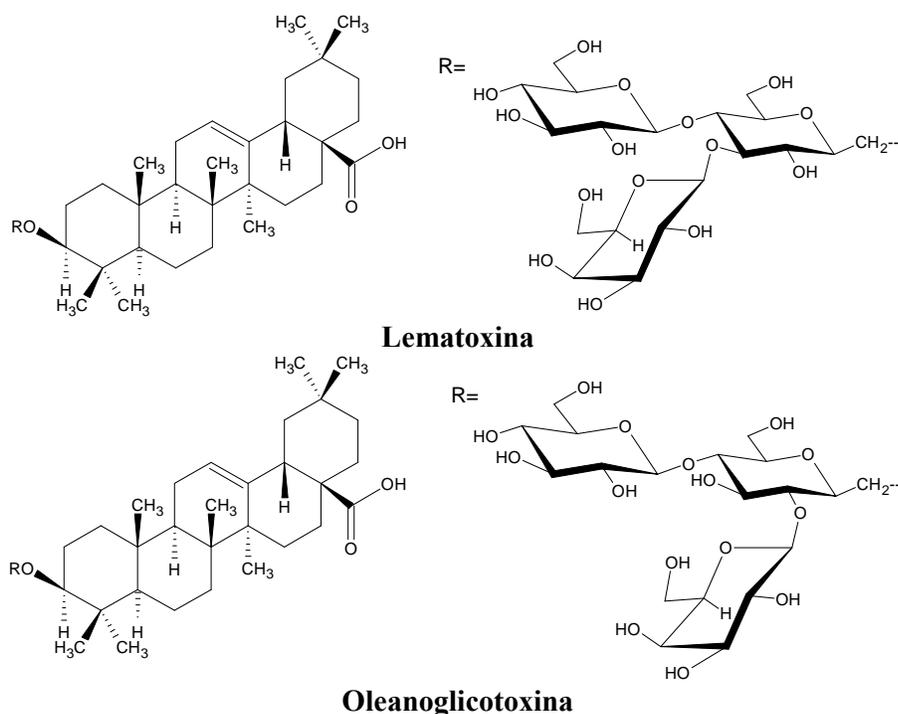
Figura 11 – Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Na atualidade, existem poucos moluscidas sintéticos de uso liberado para o controle dos caramujos, sendo a niclosamida (**Bayluscide^R**), produzida pela Bayer e recomendada pela OMS, o moluscida mais conhecido e utilizado mundialmente para o tratamento de focos dos moluscos transmissores da doença. O alto custo desses produtos, a biodegradação lenta, a toxicidade ao meio ambiente e o surgimento da resistência dos caramujos, têm estimulado fortemente a busca por moluscidas de origem vegetal. O uso de plantas como moluscidas pode representar uma alternativa barata, além de apresentar um menor impacto ambiental (KLOSS & MCCULLOUGH, 1981; DOS SANTOS & SANT'ANA, 1999).



Niclosamida

Desde a década de 30 várias plantas foram testadas com o intuito de encontrar compostos naturais com atividade moluscida e desde então o número de plantas testadas para esse propósito tem aumentado sensivelmente. Em 1933, Archibald propôs o controle do molusco usando-se frutos de *Balanites aegyptiaca*. Lemma (1965) constatou que uma planta originária da Etiópia, a *Phytolacca dodecandra* conhecida popularmente como endod, continha um grupo de saponinas altamente potentes como moluscidas e que estavam presentes nos extratos aquosos dos frutos. Esta planta ainda é uma das mais promissoras no combate ao molusco. As substâncias responsáveis pela ação moluscida do endod são a lematoxina ($CL_{90} = 1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a oleanoglicotoxina ($CL_{100} = 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985).



Marston e Hostettman (1985) destacaram a importância da relação atividade/estrutura dos produtos naturais de plantas responsáveis pela atividade moluscicida até aquele ano e chamam atenção para o isolamento e a identificação dos princípios ativos que são essenciais para o estudo do nível de sua toxicidade e estabilidade sobre condições de campo, para determinação da dosagem e para investigação do seu modo de ação. Estes compostos incluem saponinas, consideradas as principais substâncias moluscicidas de origem vegetal por serem solúveis em água, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides, esteróides glicoalcalóides, diterpenóides, monoterpênóides, iridóides, naftoquinonas, naftofenóis, fenóis, flavonóides, furanocumarinas, isobutilamidas e taninos. No entanto, grande parte da literatura registra a atividade moluscicida dos extratos sem descrever o princípio ativo (**Tabela 4 p. 37**).

A **Tabela 4 p. 37** mostra algumas plantas com propriedades moluscicidas das quais foram extraídas substâncias ativas. Algumas dessas substâncias possuem um valor muito baixo de concentração letal (CL) o que indica serem excelentes moluscicidas, destacando-se as **miliaminas D** ($CL_{100} = 2,5 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), **L** ($CL_{100} = 1,0 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e **M** ($CL_{100} = 1,0 \times 10^{-5} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) isoladas do látex de *Euphorbia milli* que são os mais potentes moluscicidas de origem vegetal.

Tabela 4 – Plantas e compostos ativos contra o molusco do gênero *Biomphalaria*

Família / Espécie	Tecido	Extrato		Composto		Referência
		Solvente de Extração	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Nome	CL ₁₀₀₍₅₀₎₍₉₀₎ (µg.mL ⁻¹)	
Anacardiaceae						
<i>Anacardium occidentale</i>	Casca da Castanha	Hexano	1,30	Ácido anacárdico C _{15:3}	(0,3)	SOUZA <i>et al.</i> , 1992; KUBO <i>et al.</i> , 1986
				Ácido anacárdico C _{15:2}	(0,6)	
				Ácido anacárdico C _{15:1}	(1,0)	
Annonaceae						
<i>Annona crassiflora</i>	Polpa e Semente	Etanol	1,67	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Caule	Etanol	0,97	---	---	
	Casca da Raiz	Etanol	0,97	---	---	
	Madeira da Raiz	Etanol	16,80	---	---	
<i>Annona glabra</i>	Folha	Etanol	0,97	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Semente	Etanol	3,23	---	---	
<i>Annona muricata</i>	Folha	Etanol	1,59	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Casca do Caule	Etanol	0,97	---	---	
<i>Annona pisonis</i>	Folha	Etanol	62,68	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Casca do Caule	Etanol	1,85	---	---	
<i>Annona salzmanii</i>	Folha	Etanol	0,95	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001

Continuação da tabela 4

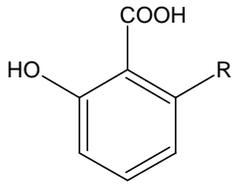
<i>Annona squamosa</i>	Semente	Etanol	7,74	---	---	
	Raiz	Etanol	3,78	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Casca do Caule	Etanol	14,00	---	---	
	Folha	Etanol	44,55	---	---	
Agavaceae						
<i>Agave decipiens</i>	Folha	n-Butanol	---	Saponina monodesmosídica A	13,0	ABDEL-GAWAD <i>et al.</i> , 1999
				Saponina monodesmosídica B	6,0	
Euphorbiaceae						
<i>Jatropha elliptica</i>	Raiz	Etanol	24,80	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2001
	Rizoma	Etanol	13,07	Jatrofona	1,16	
<i>Jatropha glauca</i>	Folha	Metanol	21,70	---	---	
		Acetona	6,70	---	---	
	Caule	Metanol	20,00	---	---	AL-ZANBAGI <i>et al.</i> , 2000
		Acetona	24,90	---	---	
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Folha	Metanol	44,30	---	---	
	Caule	Clorofórmio	55,90	---	---	AL-ZANBAGI <i>et al.</i> , 2000
		Acetona	50,00	---	---	
		Hexano	23,00	---	---	

Continuação da tabela 4

<i>Euphorbia milli</i>	Látex	Acetona	---	Miliamina L	((0,01))	ZANI <i>et al.</i> , 1993
<i>Euphorbia schimperiana</i>	Folha	Metanol	18,60	---	---	AL-ZANBAGI <i>et al.</i> , 2000
		Clorofórmio	2,20	---	---	
		Hexano	11,20	---	---	
	Caule	Metanol	53,80	---	---	
		Clorofórmio	10,50	---	---	
		Acetona	19,50	---	---	
		Hexano	15,00	---	---	
Leguminosae						
<i>Parkia clappertoniana</i>	Folha	Etanol	---	2'-Hidroxi-3,7,8,4',5'- pentametoxiflavona	25,0	LEMMICH <i>et al.</i> , 1996
<i>Abarenia cocliocampos</i>	Casca do Caule	Etanol	44,25	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2000
<i>Derris</i> sp.	Raiz	Etanol	3,65	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2000
<i>Swartzia madagascariensis</i>	Vagem	Água	---	Saponina 5	3,0	MARSTON <i>et al.</i> , 1993
Lytraceae						
<i>Lafoensia pacari</i>	Raiz	Etanol	40,27	---	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2000
Mimoioidae						
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Folha	Etanol	50,00	---	---	BEZERRA <i>et al.</i> , 2002
	Casca	Etanol	50,00	---	---	

Continuação da tabela 4

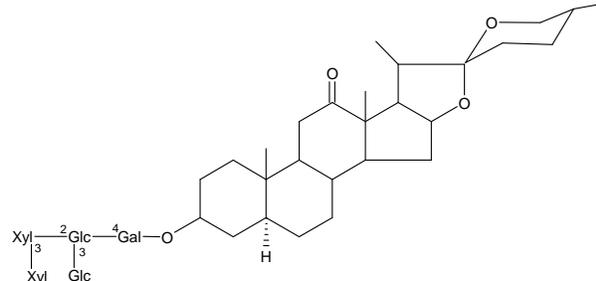
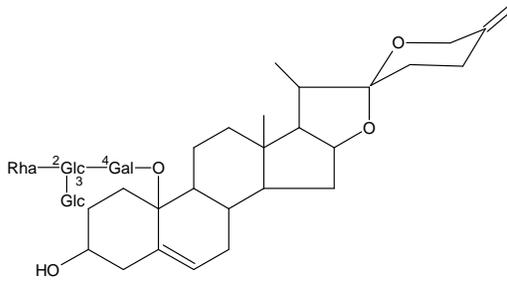
<i>Stryphnodendron polyphyllum</i>	Folha	Etanol	50,00	---	---	BEZERRA <i>et al.</i> , 2002
	Casca	Etanol	50,00	---	---	
Piperaceae						
<i>Piper anducum</i>	Folha	Éter de Petróleo	---	Cromeno 1	30,0	ORJALA <i>et al.</i> , 1993
				Cromeno 2	30,0	
Phytolacaceae						
<i>Phytolacca dodecandra</i>	Fruto	---	---	Lematoxina	(1,5)	MARSTON & HOSTETTMANN, 1985
				Oleanoglicotoxina	6,0	
<i>Phytolacca icosandra</i>	Grãos	Água	---	Saponina 1	3,1	TREYVAUD <i>et al.</i> , 2000
				Saponina 2	3,1	
				Saponina 3	10,0	
				Saponina 4	12,4	
Podocarpaceae						
<i>Podocarpus andira</i>	Folha	Metanol	---	Podoandina	10,0	KUBO <i>et al.</i> , 1992
Solanaceae						
<i>Solanum aculeastrum</i>	Casca da Raiz	Metanol	25,0	β -Solamarina	10,0	WANYONYI <i>et al.</i> , 2002
				Solamargina	10,0	
Zingiberaceae						
<i>Renealmia exaltata</i>	Folha	Etanol	28,03	--	---	DOS SANTOS & SANT'ANA, 2000



R = C_{15:3} - Ácido 6-[8(Z),11(Z), 14-pentadecatrienil] salicílico

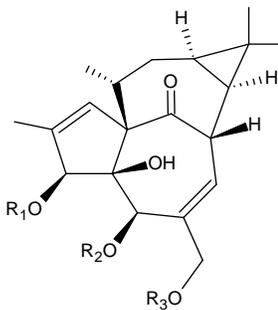
R = C_{15:2} - Ácido 6-[8(Z),11(Z)-pentadecadienil] salicílico

R = C_{15:1} - Ácido 6-[8(Z)-pentadecenil] salicílico

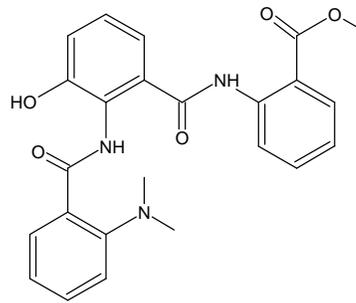


Saponina monodesmosídica A

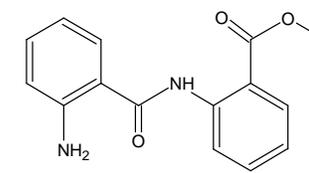
Saponina monodesmosídica A



A =

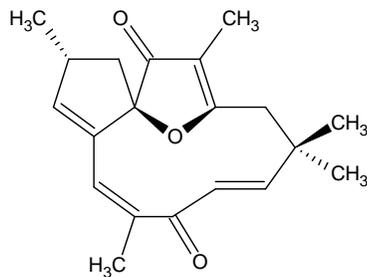


B =

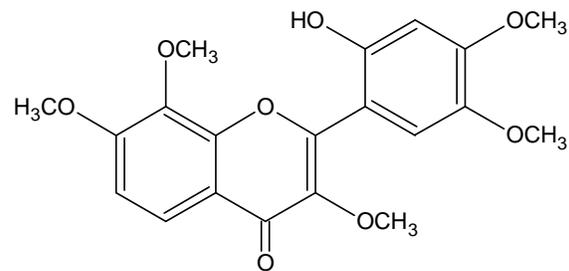


C = Ac

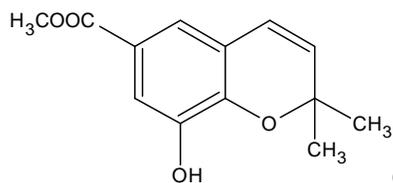
	R₁	R₂	R₃
Miliamina D	H	A	C
Miliamina L	B	H	C
Miliamina M	H	B	C



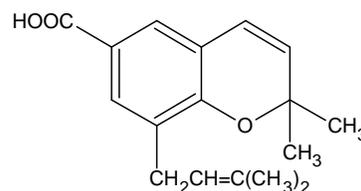
Jatrofona



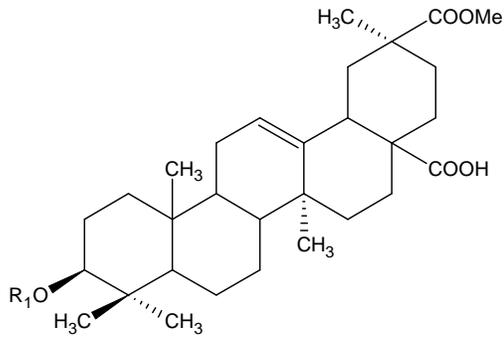
2'-hidroxi-3,7,8,4',5'-pentametoxiflavona



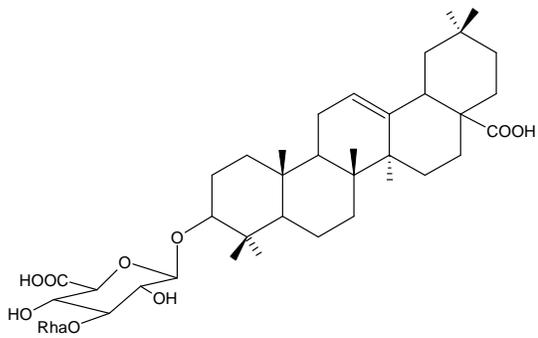
Cromeno 1



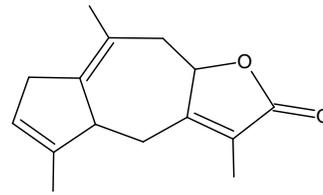
Cromeno 2



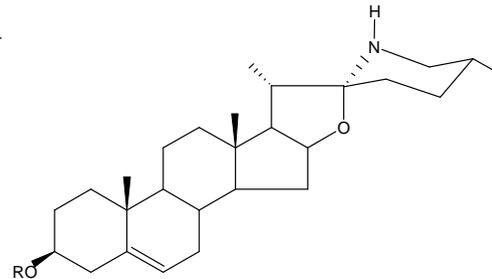
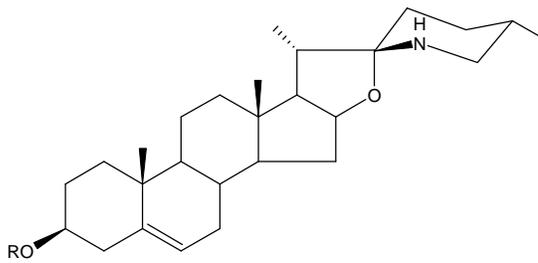
- Saponina 1** $R_1 = -Glc$
- Saponina 2** $R_1 = -Glc^3-Gal$
- Saponina 3** $R_1 = -Glc^2-Glc$
- Saponina 4** $R_1 = -Glc^3-Glc^3-Glc$



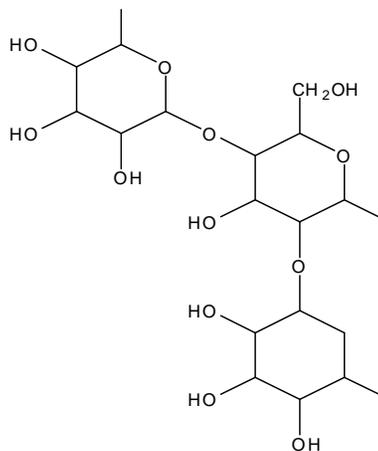
Saponina 5



Podoandina

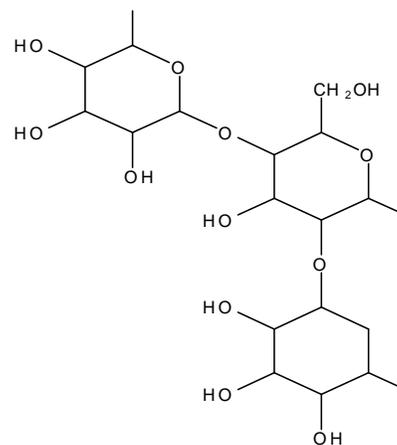


R =



β -Solamarina

R =



Solamargina

I.5.3 – A Dengue e o mosquito *A. aegypti*

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80 milhões de pessoas se infectam anualmente, em 100 países de todos os continentes, exceto a Europa, cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 24 mil morrem em consequência da doença (FUNASA, 2002; GUBLER, 2002; GUZMAN & KOURI, 2003). A dengue e a febre amarela são causadas por vírus, mas seus transmissores, tecnicamente chamados de vetores, são mosquitos do gênero *Aedes*. No Brasil, o mosquito *Aedes aegypti* (**Figura 12**) é o único vetor conhecido da febre amarela urbana e da dengue (MARCONDES, 2001).

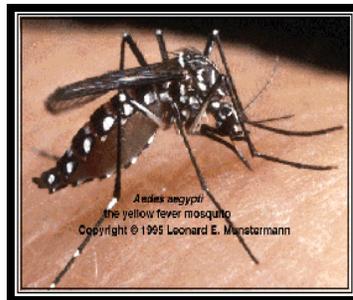
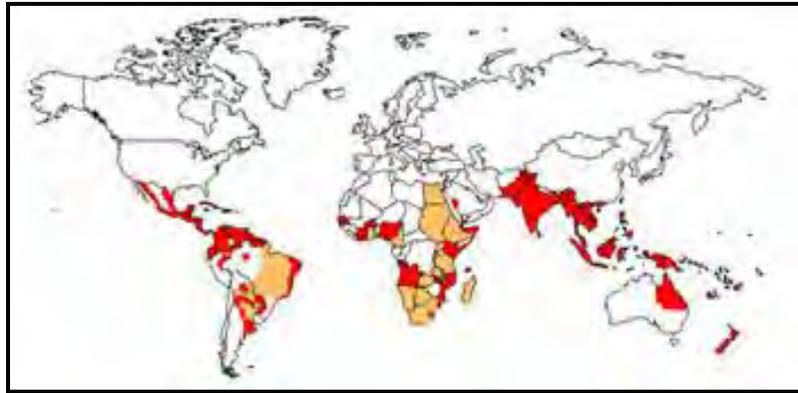


Figura 12 - O mosquito *Aedes aegypti* (www.ceasacampinas.com.br 04/12/05)

O mosquito *A. aegypti* é facilmente reconhecido por sua cor geralmente marrom médio, apresentando uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do tórax e outra mais fina, reta, longitudinal, central, as quais formam a figura de uma lira. Foi trazido da África para a América durante a colonização e a escravidão. As fêmeas, em princípio realizam a oviposição na parede de qualquer recipiente, próximo do nível da água. A hematofagia, cópula e a oviposição são diurnas. As fêmeas do *A. aegypti* preferem sugar o homem, mas se alimentam também de cães, roedores e aves. Ao exercer a hematofagia inoculam com a saliva as partículas virais (NEVES, 2000).

O mosquito transmissor da dengue encontrou no mundo moderno, condições muito favoráveis para sua rápida expansão, a urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; a intensa utilização de materiais não-biodegradáveis como recipientes de plástico e vidro e as mudanças climáticas. Com essas condições, o *A. aegypti* espalhou-se por uma área onde vivem milhões de pessoas em todo o mundo. As áreas de distribuição de maior risco da dengue são: América Central, América do Sul (exceto Chile, Paraguai e Argentina), América do Norte (México), África, Austrália,

Caribe (exceto Cuba e Ilhas Cayman), China, Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan (**Figura 13**). O ciclo de vida do *A. aegypti* pode está mostrado na **Figura 14**.



- Áreas infestadas com *Aedes aegypti*
- Áreas infestadas com *Aedes aegypti* e atividade epidêmica da dengue

Figura 13 – Ocorrência e distribuição potencial do dengue no mundo no ano de 2005 (www.cdc.gov/.../map-distribution-2005_500.jpg 08/01/06)

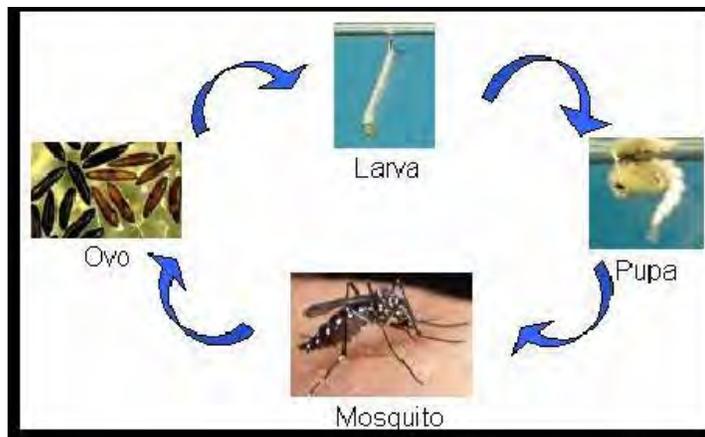


Figura 14 - Ciclo de vida do *A. aegypti* (Adaptado de www.ceasacampinas.com.br 04/12/05)

A transmissão da doença ocorre a partir da picada da fêmea do mosquito. De 8 a 12 dias após ter sugado sangue de pessoa contaminada, o mosquito está apto a transmitir a doença. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções para uma pessoa sadia, nem através da água ou alimento. Em 45 dias de vida, um único mosquito pode contaminar até 300 pessoas. O período de incubação, ou seja, o período em que a pessoa

demora a apresentar os sintomas da doença, varia de 3 a 15 dias após a picada pelo mosquito, sendo em média, de 5 a 6 dias (NEVES 2000).

Clinicamente, a dengue pode evoluir para duas formas distintas; a dengue clássica, considerada benigna e a dengue hemorrágica, de gravidade variável e que pode ser fatal (MARCONDES, 2001). A dengue é caracterizada por febre alta, calafrios, fortes dores na cabeça, nos olhos, nas articulações, nos músculos e nos ossos, falta de apetite, enjôo, vômitos, diarreia, fadiga e debilidade (TEIXEIRA *et al.*, 1999). O vírus da dengue é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae representado por quatro sorotipos D1, D2, D3 e D4, sendo que o D4 não é conhecido no Brasil (CONSOLI & DE OLIVEIRA, 1998).

Não existem vacinas contra os sorotipos da dengue e por enquanto, a única maneira de prevenir a ocorrência desta arbovirose é pelo controle da proliferação do *A. aegypti* (MARCONDES, 2001). Esse controle pode ser feito de duas maneiras: o controle mecânico que consiste de medidas dirigidas aos recipientes, constituindo-se na sua remoção ou alteração de suas condições de maneira a não permitir o acúmulo de água e a proliferação das formas imaturas do mosquito e o controle químico que consiste na aplicação de produtos químicos, de baixa a alta concentração nos locais de criação do vetor e em suas proximidades ou locais de abrigo e repouso, em doses previamente determinadas, para as diferentes técnicas e equipamentos utilizados. Pode-se dividir o controle químico em duas modalidades: larvicida e adulticida (NEVES, 2000; www.sucen.sp.gov.br 07/10/05).

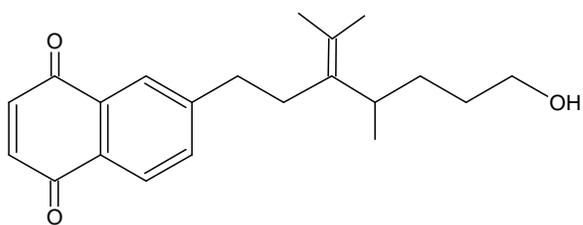
O controle dos mosquitos é um problema, pois os mesmos possuem grande plasticidade genética, isto é, ao se aplicar sucessivas vezes o mesmo inseticida em dosagem mortal, alguns que já eram geneticamente resistentes em pouco tempo repovoam o ambiente. Para o inseticida continuar eficiente faz-se necessário uma dosagem cada vez mais elevada que chega a ser tóxica para o homem e animais domésticos; portanto novas drogas e novos métodos devem ser desenvolvidos para o controle dos mosquitos (NEVES, 2000). Devido à necessidade de métodos mais seguros que possam ser usados no controle do *A. aegypti*, a busca de novos compostos de origem vegetal ativos contra esse vetor tem sido uma preocupação constante dos grupos de pesquisa. Na **Tabela 5 p. 46** são mostradas alguns extratos de plantas ativos contra as larvas do *A. aegypti* embora quase sempre sem a identificação dos princípios ativos.

Tabela 5 – Plantas e compostos ativos contra as larvas do *Aedes aegypti*

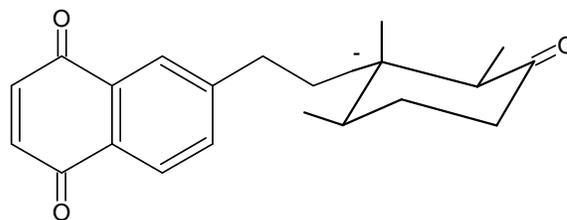
Família / Espécie	Tecido	Extrato		Composto		Referência
		Nome	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Nome	CL ₁₀₀ (90) (µg.mL ⁻¹)	
Asteraceae						
<i>Tagetes minuta</i>	Caule	Óleo	10,0	---	---	GREEN <i>et al.</i> , 1991
Boraginaceae						
<i>Cordia curassivaca</i>	Raiz	Diclorometano	---	Cordiaquinona A	12,50	IOSET <i>et al.</i> , 2000
				Cordiaquinona B	25,00	
				Cordiaquinona K	12,50	
				Cordiaquinona J	25,00	
<i>Cordia linnaei</i>	Raiz	Clorofórmio	---	Cordiaquinona E	12,50	IOSET <i>et al.</i> , 2000
				Cordiaquinona B	25,00	
				Cordiaquinona G	50,00	
				Cordiaquinona H	25,00	
Cupressaceae						
<i>Calocedrus formosona</i>	Folha	Óleo	56,30	---	---	CHENG <i>et al.</i> , 2003
	Casca	Óleo	51,80	---	---	
Fabaceae						
<i>Myroxylon balsamun</i>	Casca	Hexano	13,00	E-nerolidol	17,00	SIMAS <i>et al.</i> , 2004

Continuação da tabela 5

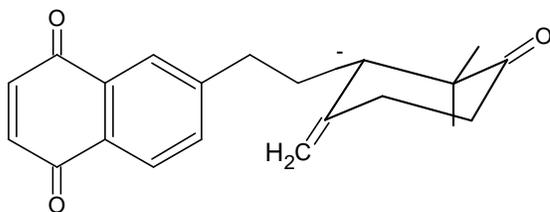
Labiatae						
<i>Mythostachys setosa</i>	Partes Aéreas	Diclorometano	9,20	---	---	CICCIA <i>et al.</i> , 2000
Lamiaceae						
<i>Ocimum sanctum</i>	Folha	Hexano	---	Eugenol	200,00	
	Caule	Hexano	---	(E)-6-hidroxi-4,6-dimetil-3-hepteno-2-ona	6,20	KELM & NAIR, 1998
Legumiaceae						
<i>Derris urucu</i>	Casca da Raiz	Metanol	17,60	---	---	GUSMÃO <i>et al.</i> , 2002
<i>Derris medula</i>	Raiz	Metanol	33,32	---	---	
Menispermaceae						
<i>Abuta gradifolia</i>	Galho	Diclorometano	2,60	---	---	CICCIA <i>et al.</i> , 2000
Papaveraceae						
<i>Argemone mexicana</i>	Semente	Acetona	17,43	---	---	SAKTHIVADIVEL & THILAGAVATH, 2003
Rutaceae						
<i>Feronia limonia</i>	Folha	Acetona	57,23	---	---	RAHUMAN <i>et al.</i> , 2000
<i>Melicope subunfoliolata</i>	Folha	Metanol	---	Meliternatina	0,47	HO <i>et al.</i> , 2003
Taxodiaceae						
<i>Cryptomeria japonica</i>	Folha	Oleo	37,60	---	---	CHENG <i>et al.</i> , 2003
	Cascas	Oleo	48,10	---	---	



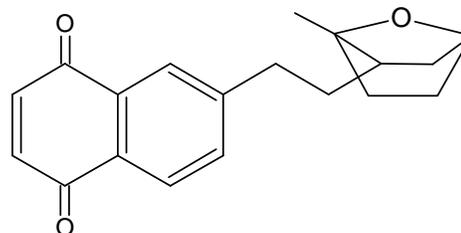
Cordioquinona A



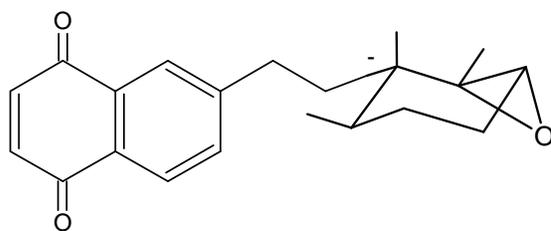
Cordioquinona B



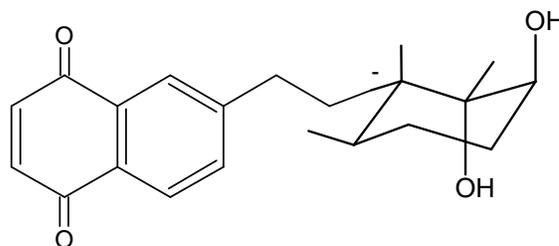
Cordioquinona K



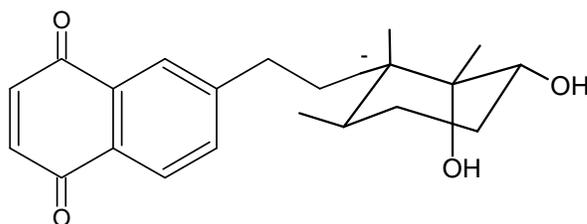
Cordioquinona J



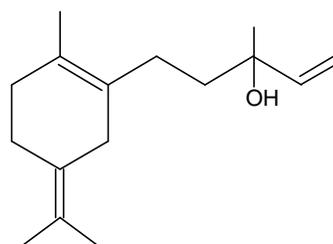
Cordioquinona E



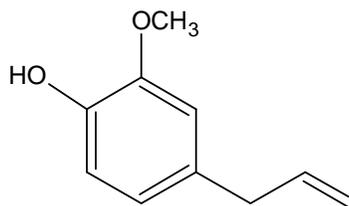
Cordioquinona G



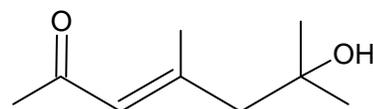
Cordioquinona H



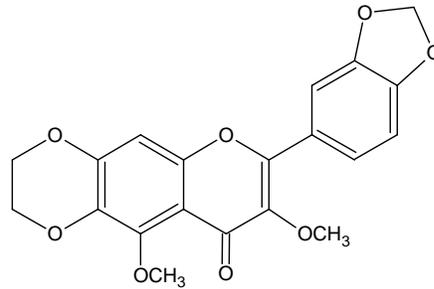
E-nerolidol



Eugenol



(E)-6-hidroxi-4,6-dimetil-3-hepteno-2-ona



Meliternatina

I.5.4 – A Traça-das-Crucíferas, *Plutella xylostella* (Linnaeus)

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (**Figura 15**) é considerada uma das principais pragas das plantas da família Brassicaceae no Brasil e no mundo. Os danos por ela causados são decorrentes do ataque da lagarta que se alimenta da epiderme das folhas e acarretam a depreciação do produto, o atraso no crescimento da planta e até mesmo a sua morte (CASTELLO BRANCO & GUIMARÃES, 1990; VILLAS BOAS *et al.*, 1990; NAKANO *et al.*, 1992). Este inseto é provavelmente oriundo da região Mediterrânea e está presente nos cinco continentes. O custo para o seu controle pode representar até 50% do custo total da sua produção (MONNERAT *et al.*, 2004).



Figura 15 – *Plutella xylostella* (www.mpg.de/.../2002/pri0282.htm 04/12/05)

Dentre as diferentes técnicas utilizadas para a supressão populacional desta praga, o controle químico tradicional com o uso de inseticidas é o mais utilizado pelos agricultores, sendo aplicados com frequência de uma a três vezes por semana, dependendo da época de produção. Entretanto, mesmo que os danos causados pela traça-das-crucíferas justifiquem a adoção dessa medida de controle, sua implementação traz riscos de intoxicação de agricultores, animais domésticos e selvagens e podem deixar resíduos nos alimentos que são consumidos *in natura* ou com pouco preparo. Também existe a possibilidade de contaminação

do ambiente. O uso contínuo e desordenado destes agentes pode ainda resultar na seleção de populações resistentes (CASTELO BRANCO, 1990).

Com o agravamento dos problemas provocados pelo uso dos produtos sintéticos, a pesquisa tem se voltado para o estudo dos produtos vegetais, para atender a demanda proveniente, principalmente, do segmento representado pela agricultura orgânica (MARTINEZ, 2002). No entanto, apesar da utilização de plantas com ação inseticida para o Manejo Integrado de Pragas – MIP ser uma área bastante promissora, existe uma carência de estudos com plantas com potencialidade inseticida para o controle da traça-das-crucíferas. Dentre as plantas citadas na literatura como eficazes contra a *P. xylostella* temos *Azadirachta indica* (sementes) (DREYER & HELLPAP, 1991), *Cordyceps militaris* (fruto) de onde foi obtido o 3'-desoxiadenosina como o componente ativo (KIM *et al.*, 2002), *Annona squamosa* (sementes) (LEATEMIA & ISMAN, 2004) e *Pongamia pinnata* (sementes) (SURESHGOUD *et al.*, 2005)

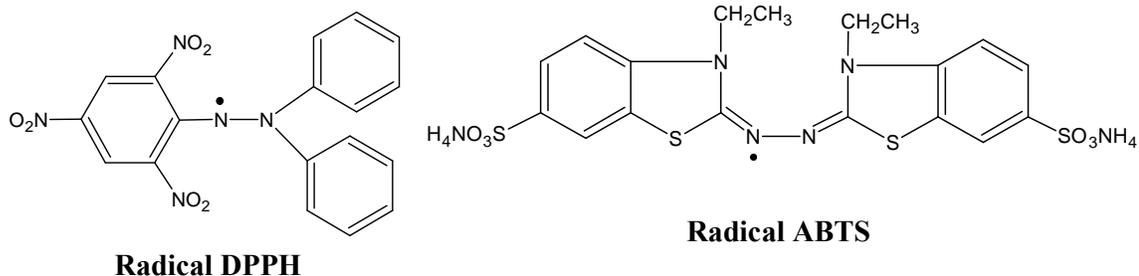
1.5.5 – A Atividade Antioxidante

Danos oxidativos irreversíveis de biomoléculas são alguns dos fatores que causam a ocorrência e desenvolvimento de numerosas doenças degenerativas tais como: arteriosclerose, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, etc. (LODYATO *et al.*, 2004). As plantas constituem uma fonte importante de produtos naturais ativos que diferem amplamente entre si em termos de estrutura e propriedades biológicas e que têm desempenhado um papel importante na medicina tradicional. Frutos e vegetais são boas fontes de antioxidantes naturais para a dieta humana, contendo muitos componentes antioxidantes que protegem contra os radicais livres e têm sido associados com a redução do risco dessas doenças crônicas (ZHANG & HAMAUZU, 2004; ARGOLLO *et al.*, 2004).

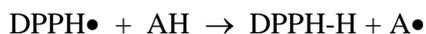
Os efeitos protetores dos produtos naturais de origem vegetal são devidos à presença de vários componentes que possuem diferentes mecanismos de ação. Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante são enzimas e proteínas e substâncias de baixo peso molecular tais como: vitaminas, carotenóides, flavonóides, antocianinas e outros compostos fenólicos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias puras e extratos de plantas. Esses métodos são tipicamente baseados na inibição do acúmulo de produtos oxidados, uma vez que a geração de radicais livres é inibida pela adição de antioxidantes e requerem equipamentos caros e específicos (espectrofotômetro,

HPLC, etc.). Um dos métodos mais confiáveis envolve a medida do desaparecimento de radicais livres tais como o radical ácido 2,2'-azino-bis(etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS⁺), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), ou outros radicais coloridos, em um espectrofotômetro (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).



O uso do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), um radical livre estável à temperatura ambiente, com coloração violeta característica em solução metanólica à temperatura ambiente, está descrito como um reagente para o ensaio da atividade antioxidante de pequenas moléculas (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). A capacidade sequestrante de radicais de compostos puros ou extratos de plantas pode ser estabelecida pela redução desse radical em solução metanólica. Nesse tipo de ensaio, o “sequestro” do radical DPPH• é seguido pelo monitoramento da diminuição da absorvância a 515nm, que ocorre devido à redução pelo antioxidante (AH) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).



Os testes com o radical DPPH podem ser qualitativos e quantitativos. Para os ensaios qualitativos o material a ser testado é aplicado em placas de cromatografia em camada delgada que são em seguida mergulhadas em uma solução de DPPH. Uma coloração amarela indica a presença de antioxidantes. Nos testes quantitativos o desaparecimento do radical DPPH é monitorado pela diminuição da absorvância a 515 nm medida em um espectrofotômetro (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).

Os resultados da análise espectrofotométrica podem ser utilizados para medir a concentração de inibição (CI₅₀) que é quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH (90µM) em 50% e a porcentagem de inibição (PI) que é a porcentagem total do radical DPPH que reage com a amostra antioxidante no estado estacionário (estado a partir do qual a absorvância torna-se constante). Concentração de inibição e porcentagem de inibição são os dois parâmetros utilizados para determinar a capacidade de capturar radicais livres de amostras puras e extratos brutos (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000; ARGOLO *et al.*, 2004).

CAPÍTULO II
PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo II. Parte experimental

II.1 - Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram destilados no laboratório de destilação do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, a partir de solventes de grau comercial da marca Herzog (Brasil) e os solventes de grau HPLC, espectroscópico e deuterados foram adquiridos da Merck (Alemanha), Aldrich (Estados Unidos), Carlo-Erba (Itália), Grupo Química (Brasil) e VETEC (Brasil). O reagente utilizado para a atividade antioxidante, DPPH, e os padrões (-)-catequina e (-)-epicatequinagalato foram adquiridos da Sigma (Estados Unidos).

II.2 - Análise cromatográfica

II.2.1 – Cromatografia clássica em coluna e cromatografia em camada delgada

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como suportes, Carvão Ativo (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro), Sílica Gel G60 (230-400 mesh, Merck, Alemanha) e Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia). A quantidade utilizada do adsorvente foi de 20 a 30 vezes a quantidade em massa da amostra; a coluna de Sephadex possuía 3cm de diâmetro e 38cm de altura.

As análises comparativas foram realizadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de vidro (6 x 9,5cm) contendo uma camada de 0,50mm de gel de sílica GF₂₅₄ da Merck (Alemanha), eluídas com clorofórmio e misturas de clorofórmio e metanol.

A suspensão da sílica (10g) em água destilada (22mL) foi distribuída nas placas usando-se um espalhador mecânico com 0,50 mm de abertura, seguindo-se ativação em estufa a 100°C por 1 hora.

O critério de pureza adotado foi a observação de uma única mancha em placa de camada delgada de sílica, variando-se a fase móvel e os reveladores.

II.2.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises qualitativas foram realizadas em aparelho VARIAN (Palo Alto, CA, USA), com uma bomba modelo 9012Q e um detector UV modelo 9065. Utilizou-se uma coluna de C18 Dynamax (4,6 x 250mm, 8µm).

Para as separações preparativas utilizou-se um aparelho da marca Rainin, com uma bomba modelo SD-200, um detector UV modelo UV-1 e uma coluna de C18 Dynamax (21,4 x 250mm, 8 µm). Os dados cromatográficos foram processados usando um software Varian Star (versão 5.3) e a água usada para cromatografia foi duplamente destilada e processada em um sistema de purificação Simplicity UV (Millipore, São Paulo).

As análises foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

II.2.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

A análise de CLAE-EM foi obtida utilizando-se um equipamento Hewlett Packard (Palo Alto, CA USA), cromatógrafo modelo HP 1100 equipado com um Waters Microbondapak (Milford, MA, USA) coluna C18 (10 x 8 mm; 10 µm) e acoplado a um espectrômetro de massa Esquire LC Bruker (Bruker, Ettlingen, Germany).

As análises foram realizadas no Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne – Switzerland.

II.3 – Reagentes Reveladores

As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação com luz na região do UV, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, por imersão em cuba de Iodo, seguindo-se por borrifação com solução ácida de Sulfato Cérico ou ainda solução de Kedde preparadas conforme descrição a seguir (Reativos MERCK, 1972). As placas reveladas com Sulfato Cérico e solução de Kedde foram aquecidas em estufa a 100°C por 5 minutos.

II.3.1 – Composição química dos reveladores

Solução ácida de Sulfato Cérico – 0,7g de Sulfato Cérico foram dissolvidos em 27mL de solução aquosa de Ácido Sulfúrico a 26%, e o volume foi completado com água destilada para 100mL de solução. Essa solução é utilizada para revelar compostos orgânicos em geral.

Reagente de Kedde – Dissolveu-se 5,6g de Hidróxido de Potássio em água destilada suficiente para 50mL de solução. A esta solução foram adicionados 50 mL de metanol e 1 g de Ácido 3,5-dinitrobenzóico. Esse reagente é específico para revelação de subunidades γ -lactona- α,β -insaturadas presentes em alguns tipos de acetogeninas.

II.4 – Análise espectrofotométrica

Os ensaios quantitativos com o DPPH para a determinação da atividade antioxidante da espécie *X. americana* foram realizados em espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda-2 UV-Vis (PALO ALTO- USA) no Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas.

II.5 – Métodos instrumentais

Os espectros na região do infravermelho (IV), foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR-1600 (PALO ALTO- USA) no Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizadas pastilhas de KBr a 1% da amostra. A frequência de absorção foi medida em unidade de número de onda (cm^{-1}).

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico (EM-IE), em um aparelho Hewlett-Packard Mod. 5987A, operando a 70eV no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Os espectros de ressonância magnética nuclear unidimensionais e bidimensionais, foram obtidos em um aparelho Bruker Avance DRX 500 operando a 500MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono treze no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará. Em todos os casos, o referencial interno foi o trimetilsilano (TMS) e como solventes foram utilizados CDCl_3 ou CD_3OD como indicado em cada espectro.

Os dados de análise elementar foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

II.6 – Coleta e identificação do material botânico

As folhas da *A. muricata* foram coletadas no pomar comercial, no Sítio Aldeia Verde situado na cidade de Maceió estado de Alagoas em agosto de 2001. A coleta foi realizada pela aluna Josiane de Souza Luna e a identificação foi efetuada pelo botânico Cícero Barros (Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas - IMA, Maceió-AL, Brasil). Uma exsicata desta planta encontra-se depositada no herbário do IMA com o número 8530.

A casca do caule da *Ximenia americana* L. foi coletada em Abril/2002 no Município de Juazeiro do Piauí – Piauí e uma exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal do Piauí (UFPI) com o número 14.580.

As demais plantas utilizadas neste estudo foram coletadas nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, e o material foi classificado pelos professores José Elias de Paula (Universidade de Brasília - UnB, Brasília-DF), Rosário Rocha (Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Maceió-AL) e Suzene Izídio da Silva (Universidade Federal Rural de Pernambuco -UFRPE, Recife-PE). As exsicatas encontram-se depositadas nos herbários das respectivas instituições (**Tabela 6 p. 57**).

II.7 – Preparação dos extratos

As partes selecionadas de cada planta foram separadas, secas ao ar livre e trituradas a pó (mesh 2.5mm) em um moinho de laboratório da marca Nogueira (Itapira-SP). O material depois de pulverizado (3,5Kg de folhas da *A. muricata*, 3,3Kg da madeira do caule da *X. americana* e 500g das demais espécies) foi submetido à extração com etanol a 90% (2L de álcool/500g de material vegetal) em macerador à temperatura ambiente (25-27°C) por 3 dias e filtrado. O resíduo foi extraído mais duas vezes da mesma maneira. Após a evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório, e remoção da água residual em liofilizador quando necessário, obteve-se os respectivos extratos brutos. Esses extratos foram mantidos em freezer a -20°C até a realização dos bioensaios frente às larvas de *A. salina*, do mosquito *A. aegypti* e com o caramujo *B. glabrata* (adulto e ovos). Além desses testes, a espécie *X. americana* foi ainda submetida a ensaios antibacterianos. Além do extrato bruto obtido para o estudo químico, extratos das folhas da espécie *A. muricata* foram obtidos mensalmente entre abril de 2002 e março de 2003. As folhas foram coletadas sempre no dia 17 de cada mês (**Tabela 7 p. 57**).

Tabela 6: Plantas coletadas para estudo

Espécie	Parte Estudada
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Casca do caule
<i>Annona muricata</i>	Folhas
<i>Bauhinia cheilantha</i>	Caule, Folhas e Raízes
<i>Bursera leptopholeos</i>	Caule
<i>Caesalpineia echinata</i>	Folhas e Caule
<i>Caesalpineia ferrea</i>	Folhas
<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	Folhas e caule
<i>Dioclea virgata</i>	Folhas
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas e Caule
<i>Marsdenia altissima</i>	Casca do caule
<i>Ocotea glomerata</i>	Casca do caule, Caule e Folhas
<i>Operculina macrocarpa</i>	Tubérculo
<i>Piper arboreum</i>	Folhas
<i>Spondias mombin</i>	Sementes
<i>Ximenia americana</i>	Casca do caule
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Caule

Tabela 7: Extratos das folhas de *A. muricata* coletados entre abril/2002 e março/2003

Mês/Ano de Coleta	Peso Fresco (g)	Peso do Extrato (g)	Rendimento (%)
Abril/2002	290,00	38,69	13,34
Maio/2002	300,00	17,31	5,77
Junho/2002	260,00	17,47	6,72
Julho/2002	320,00	26,62	8,32
Agosto/2002	300,00	34,53	11,51
Setembro/2002	280,00	31,36	11,12
Outubro/2002	300,00	32,96	10,99
Novembro/2002	330,00	40,52	12,28
Dezembro/2002	360,00	60,95	16,93
Janeiro/2003	230,00	33,70	14,65
Fevereiro/2003	280,00	40,36	14,41
Março/2003	310,00	40,18	12,96

II.8 – Bioensaios

II.8.1 – Bioensaio com as larvas de *A. salina*

Os bioensaios com as larvas da *A. salina* (**Figura 16, p. 58**) foram realizados no laboratório de bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas.

Para esses testes foram utilizadas larvas com 48 horas de eclosão, obtidas pela imersão de uma pequena porção de ovos em água do mar, por 24 horas sob iluminação parcial com luz artificial (60W). Após esse período, as larvas eclodidas foram removidas com auxílio de pipeta de Pasteur e colocadas em placas de meio de cultura (10cm de diâmetro) por um período de 48 horas, de acordo com a descrição de McLAUGHLIN *et al.*, 1991.

Nos testes preliminares a solução estoque do material a ser testado foi preparada a $3000\mu\text{g mL}^{-1}$, adicionando-se 15mg do material a 5mL de água do mar a 1% de DMSO. Alíquotas da solução estoque foram adicionadas a água do mar para obtenção de uma solução com concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ na qual foram colocadas entre 10 a 12 larvas. Os testes foram feitos em duplicata com um volume final de 150 μL de solução. Os extratos que promoveram mortalidade das larvas, superior a 40% foram então submetidos a testes mais elaborados. Cada concentração, nestes ensaios, foi testada em um volume final de 5mL e em quadruplicata, utilizando-se entre 10 e 12 larvas em cada cuba-teste. Para estes testes foi preparada uma solução estoque a $3.000\mu\text{g mL}^{-1}$ em água do mar a 1% de DMSO, e a partir desta foram feitas diluições para as concentrações desejadas.



Figura 16 – *A. salina* (livingthings.narod.ru/Clit/Ani/Art/Cru/Bra/brap01.htm 06/12/05)

Em ambos os testes, as larvas foram deixadas em contato com as soluções por um período de 24 horas, e ao final deste tempo foi determinado o número de mortos e sobreviventes. Paralelamente foi realizado um controle branco com água do mar e outro com água do mar a 1% de DMSO e um controle positivo com uma solução aquosa de timol a $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

II.8.2 – Bioensaios com o caramujo adulto e massa de ovos *B. glabrata*

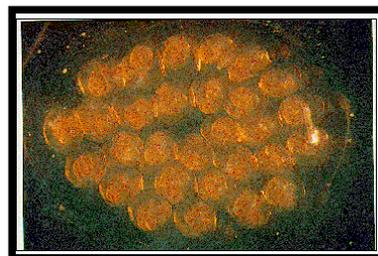
Estes experimentos foram realizados no laboratório de bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, que possui uma criação de caramujos da

espécie *B. glabrata* (**Figura 17A**), oriundos da região do Barreiro de Cima na cidade de Belo Horizonte-MG e gentilmente cedidos pelo Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ de Belo Horizonte.

Nos testes iniciais, a solução do material a ser testado foi preparada a $100\mu\text{g mL}^{-1}$ adicionando-se 12,5mg do material a 125mL de água desclorada a 0,1% de DMSO, na qual foram colocados cinco caramujos com diâmetro variando de 12 a 23 mm ou massas de ovos (**Figura 17B**) de 0-1 dia contendo 30 embriões, sendo o teste realizado em duplicata. No bioensaio final, foram utilizados 10 caramujos por copo, com diâmetro variando de 14-23mm, e 250mL da solução-teste mantendo-se sempre a relação de 25mL de solução por caramujo por experimento. Cada concentração foi testada em triplicata, segundo as normas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965). Dois conjuntos de controles foram usados, um positivo com Niclosamida a $3\mu\text{g mL}^{-1}$ ou carbonato cúprico a $50\mu\text{g mL}^{-1}$ para o caramujo adulto e pentaclorofenol $0,49\mu\text{g mL}^{-1}$ para a massa de ovos e outro negativo com água desclorada a 0,1% de DMSO para ambos os testes.



(A)



(B)

Figura 17 – (A) Caramujo da espécie *B. glabrata* (<http://www.ioc.fiocruz.br>). 06/12/05). (B) Massa de ovos do caramujo *B. glabrata*

O tempo de exposição destes organismos foi de 24 horas. Decorrido este período, contou-se o número de organismos mortos, com o auxílio de um microscópio no caso das desovas, e transferiu-se os organismos vivos para copos contendo água desclorada, permanecendo sob observação por mais 72 horas, com o registro e retirada dos exemplares mortos a cada 24 horas. Os caramujos adultos foram alimentados com alface diariamente.

A morte dos adultos foi indicada pela descoloração, ausência de contrações musculares, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo, enquanto que os ovos foram considerados mortos quando suas células tornaram-se opacas ou desagregaram-se. A temperatura da água foi mantida entre 25 a 27°C. O pH permaneceu entre 6 e 7.

II.8.3 - Bioensaios com as larvas do mosquito *A. aegypti*

O experimento foi realizado no laboratório de bioensaios larvicida do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas. Para a realização desse teste os ovos do *A. aegypti* foram submersos em uma bacia com água desclorada a uma temperatura que variou entre 25 e 27°C para a eclosão dos ovos. As larvas eclodidas foram alimentadas com ração para gato até atingirem o quarto estágio larval (L4) – **Figura 18**.



Figura 18 – Larva do mosquito *Aedes aegypti* (http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_larvae2.jpg 06/12/05)

Os testes iniciais foram realizados em duplicata, em copos plásticos contendo 25mL da solução teste, com dez larvas no estágio L4. A solução teste foi inicialmente preparada a 500ppm, adicionando-se água destilada a 1% de DMSO. Os extratos considerados ativos foram aqueles que promoveram a morte de no mínimo 40% das larvas. Os testes apurados foram realizados em quadruplicata, em copos plásticos contendo 25mL da solução teste, com 25 larvas L4. A solução teste foi preparada dissolvendo-se a quantidade de material a ser testada em água destilada a 1% de DMSO. Após 24 horas foram efetuados o registro e retirada das larvas mortas.

As larvas foram consideradas mortas quando não responderam a estímulo induzido ou quando não conseguiram chegar à superfície da solução de acordo com as normas da OMS (WHO, 1965). Após 48 horas fez-se uma leitura final com registro do número total de larvas mortas. A variação da temperatura foi de 25 a 27°C e a umidade relativa do ar foi de 85-92%.

Foram feitos dois controles um positivo contendo temefos a 3 µg mL⁻¹ e outro negativo com água destilada a 1% de DMSO.

II.8.3.1 – Dose-resposta

Para avaliação da relação dose-resposta sobre as larvas do *A. aegypti* o extrato bruto das folhas da *A. muricata* selecionado para estudo químico foi submetido aos bioensaios em quadruplicata nas seguintes concentrações: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A cada hora foi realizada uma leitura para a contagem do número de organismos mortos e vivos e o final do experimento ocorreu com a morte de todas as larvas. Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o teste de Tuckey ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) e a correlação de Pearson (VIEIRA, 1997; BEIGUELMAN, 2002).

II.8.4 – Bioensaios com a traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. Sementes de couve, *Brassica oleracea*, var. *acephala* (Brassicaceae), foram semeadas em casa-de-vegetação, em bandeja de isopor contendo substrato comercial indicado para sementeira [Terra : Fibra : Bagaço de Cana (2:1:1)]. Após 35 dias, as mudas foram transplantadas para local definitivo em canteiros construídos próximo ao Departamento de Química da UFAL, adotando-se tratos culturais padrões prescritos para a cultura dessa espécie (FILGUEIRA, 2003), mas sem a utilização de inseticidas. As folhas de couve foram utilizadas para os experimentos quando atingiram idade variando de 40 a 55 dias após o transplântio.

Para os testes de atividade foi utilizado o extrato da espécie *A. muricata* coletado no mês de novembro. O extrato foi solubilizado em água destilada utilizando-se 1% de DMSO (v/v), para obtenção da concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como esse extrato mostrou-se bastante ativo e havia no laboratório extratos das folhas de *A. muricata* referentes a uma coleta sazonal, decidiu-se realizar a análise sazonal da atividade das folhas desta planta contra a *P. xylostella*. Todos os extratos foram testados a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com o mês que apresentou o melhor resultado na mortalidade larval, as concentrações foram diminuídas para 4000, 3000, 2000 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para avaliação do efeito no desenvolvimento do inseto.

Discos de folhas de couve manteiga foram imersos em cada extrato e na testemunha (água), durante 30 segundos e, após secos ao ar livre foram inoculados com 12 lagartas recém eclodidas oriundas da criação estoque do laboratório, e mantidos em placas de Petri. A avaliação da mortalidade larval foi realizada no início, no terceiro dia, e depois diariamente,

sendo os discos de folhas substituídos por outros submetidos ao mesmo tratamento citado anteriormente. Para a avaliação do efeito no desenvolvimento do inseto, foram avaliadas a duração e a viabilidade das fases de larva e de pupa.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos e cinco repetições, onde cada repetição era constituída por 12 lagartas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa computacional SANEST (Versão 3.0) ((MACHADO & ZONTA, 1991).

II.8.5 – Testes para a atividade antioxidante com o radical DPPH

Para esses testes foram utilizados o extrato bruto da casca do caule da espécie *X. americana*, as frações em hexano, em clorofórmio, em acetato de etila e hidrometanólica oriundas da partição líquido-líquido do extrato etanólico e o composto XA isolado a partir da fração em acetato de etila.

II.8.5.1 – Ensaio qualitativo

Inicialmente foram preparadas soluções estoque contendo 5 mg.mL^{-1} de material em metanol. Para o composto puro a concentração foi de 2 mg.mL^{-1} .

Para evitar uma coloração de fundo que mascarasse a reação com o DPPH, as soluções estoque foram diluídas na proporção de 1:1 com metanol de modo que foram obtidas as concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e $0,156 \text{ mg.mL}^{-1}$

A capacidade de capturar radicais dessas amostras em relação ao DPPH foi testada usando placas cromatográficas de sílica, nas quais foram aplicadas uma gota ($2 \mu\text{L}$) de cada solução-teste e após a evaporação do solvente, a placa cromatográfica foi imersa em uma solução de DPPH a $90 \mu\text{M}$ em metanol por 10s.

O aparecimento de uma coloração amarela foi tomado como indicativo de um resultado positivo para a atividade antioxidante. A intensidade da coloração depende da quantidade e natureza da capacidade de capturar radicais das substâncias presentes na amostra testada.

Utilizou-se metanol puro como controle negativo e os flavonóides (-)-catequina, (-)-galato de epicatequina e (-)-galato de epigallocatequina como controles positivos.

II.8.5.2 – Ensaio quantitativo

A porcentagem total do radical DPPH (90 μ M) que reage com o antioxidante no estado estacionário (20min) é chamada de porcentagem de inibição (PI). Para a determinação dos valores da porcentagem de inibição das amostras foram efetuadas análises espectrofotométricas. Uma alíquota de 30 μ L de cada solução-teste foi misturada com solução metanólica do radical DPPH para um volume final de 1,5 mL em uma cubeta. Um volume igual de metanol puro foi adicionado a cubeta controle. O desaparecimento do radical DPPH foi monitorado pela diminuição da absorvância a 515nm, que foi registrada a cada 0, 1, 2, 3, 4 e 5min., e subseqüentemente a cada 5min até 30min. A concentração do radical DPPH na mistura reacional foi calculada usando-se duas curvas de calibração com as seguintes equações de regressão linear: (r=0,99789): $A_{515 \text{ nm}} = 0,01 [\text{DPPH}] - 0,00659$ e (r=0,99904) (EMI), $A_{515 \text{ nm}} = 0,01035[\text{DPPH}] - 0,01127$ (etanol, hexano e clorofórmio) e $A_{515 \text{ nm}} = 0,01008 [\text{DPPH}] - 0,01736$ (acetato de etila, hidrometanólico e composto puro), onde o valor [DPPH] é expresso em mg.mL⁻¹

A porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) foi calculada de acordo com Brand-Williams e col. (1995), da seguinte forma: $\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_t / [\text{DPPH}]_{t_0} \times 100$, onde t é o tempo quando absorvância foi determinada e t₀ é o tempo zero.

A porcentagem de inibição (IP) foi calculada de acordo com a seguinte expressão: $\text{IP} = [(A_{t_0} - A_{t_s}) / A_{t_0}] \times 100$, onde A_{t₀} é a absorvância no tempo zero e A_{t_s} é a absorvância no tempo estacionário (20min).

As equações de regressão linear foram estabelecidas usando-se o OriginTM versão 6.0 (Microcal, Northampton, MA, USA).

O composto EMI foi testado nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,312 mg/mL. O extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* e as frações em hexano, em clorofórmio e hidrometanólica foram testados nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg.mL⁻¹ enquanto que as frações em acetato de etila e o composto puro foram testados nas concentrações de 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078 mg.mL⁻¹.

II.9 – Cálculo dos valores das concentrações letais (CL₉₀, CL₅₀ e CL₁₀) e doses letais (DL₉₀, DL₅₀ e DL₁₀) dos extratos e compostos

Os valores de CL e DL foram obtidos a partir de uma análise investigatória em um programa Finney (FINNEY, 1971) com um intervalo de confiança de 95%, onde foram plotados os dados de porcentagem de morte versus logaritmo da concentração.

II.10 - Prospecção fitoquímica dos extratos

Os extratos das plantas utilizadas neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de MATOS, 1997. Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos, e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro. Para os testes de 2.9.1 a 2.9.4 sete porções de 3-4mL de cada extrato dissolvidos em etanol, foram colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

II.10.1 - Teste para fenóis e taninos

No tubo de ensaio de número 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl₃ 1molL⁻¹. Agitou-se bem e observou-se alguma variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl₃. A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de cloreto férrico (FeCl₃) foi preparada adicionando-se 9g deste reagente em 50mL de água destilada contendo 2mL de ácido clorídrico 3molL⁻¹. Em seguida completou-se o volume para 100mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3molL⁻¹ foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100mL de solução, em um balão volumétrico.

II.10.2 - Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Ensaio com os tubos 2, 3 e 4. O tubo de número 2 foi acidulado a pH 3 com HCl 3molL⁻¹ e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11 com NaOH 1molL⁻¹. A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como

mostrado a seguir. Para se obter a solução de NaOH 1mol.L⁻¹ dissolveu-se 4g deste reagente em água destilada para 100mL de solução em balão volumétrico.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

II.10.3 - Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Acidulou-se o tubo 5 por adição de HCl 3molL⁻¹ até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1molL⁻¹ até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir:

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
leucoantocianidinas	Vermelha	-
catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
flavononas	-	Vermelho Laranja

II.10.4 - Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7.

O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

II.10.5 - Teste para esteróides e triterpenóides

Adicionou-se 10mL de uma solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco de cada becker três vezes com porções de 1-

2mL de CHCl_3 . Separou-se os extratos em tubos diferentes e colocou-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores.

A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

II.10.6 - Teste para saponinas

Tomou-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma. Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

II.10.7 - Teste para alcalóides

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

II.10.7.1 – Composição química do reagente de Dragendorff

5,0 g de subnitrito de bismuto foram dissolvidos em 50,0 mL de água destilada, seguido da adição de 12,0 mL de ácido clorídrico concentrado sob agitação. Em seguida, adicionou-se lentamente 25,0 g de iodeto de potássio. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100,0 mL de solução. A 25,0 mL desta solução foram adicionados 18,0 mL de ácido acético glacial, completando-se o volume final da solução com água destilada para 100,0 mL.

Esse reagente é empregado para a detecção de alcalóides e peptídeos, cicloexilaminas, polietilenoglicóis e derivados, compostos de óxido polietileno, lactamas, lipídeos e esteróides α,β -insaturados.

II.10.8 - Teste para antraquinonas, antronas e coumarinas

Foram marcados os pontos com os extratos-teste em placas cromatográficas que foram eluídas com clorofórmio. As placas foram borrifadas com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observou-se a presença das cores indicativas em luz UV 365nm. A cor vermelha indica antraquinona, a amarela indica antrona e a azul indica coumarina.

II.10.9 - Teste para acetogeninas

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Kedde.

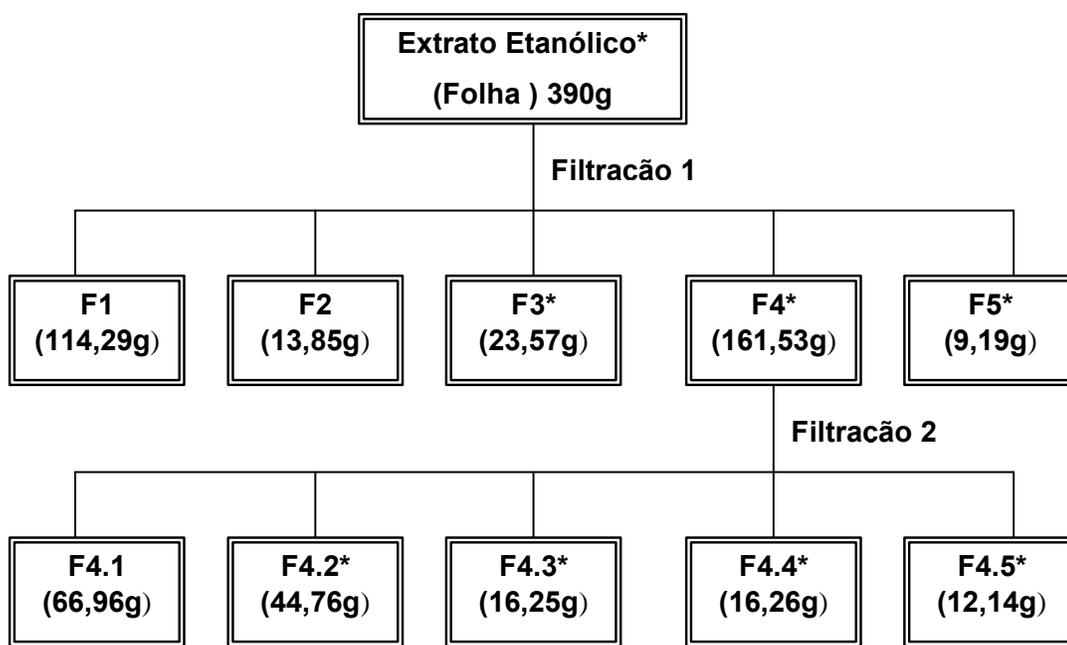
II.11 – Estudo fitoquímico das folhas da espécie *A. muricata*

O extrato etanólico bruto seco das folhas (390g) foi dissolvido em 300mL de acetona e incorporado em carvão ativo (250g, Reagen Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro). A mistura resultante foi seca a temperatura ambiente, pulverizada e submetida a uma filtração em funil de Buchner (20cm de diâmetro) sobre uma camada (2,5cm) de gel de sílica 60 (230-400 mesh, Merck, Damrstadt) (Filtração-1). A eluição foi realizada utilizando-se 2,5L dos seguintes solventes: H₂O, H₂O:EtOH (30%), H₂O:EtOH (1:1), EtOH, EtOH:AcOEt (1:1), AcOEt e CHCl₃ e coletados separadamente. Após a concentração destas frações, em aparelho rotatório a baixa pressão, os resíduos obtidos foram liofilizados até secura completa. Após comparação através de cromatografia em camada delgada de sílica, usando-se como eluentes CHCl₃ e CHCl₃:MeOH (10%), essas frações foram reunidas perfazendo-se 5 grupos: **F1**-H₂O (114,29g), **F2**-H₂O:EtOH (30%) (13,85g), **F3**-H₂O:EtOH (1:1) (23,57g), **F4**-[EtOH + EtOH:AcOEt (1:1) + AcOEt] (161,53g) e **F5**-CHCl₃ (9,19g) (**Fluxograma 1**) que foram posteriormente submetidas aos bioensaios. A fração **F4** foi selecionada para estudo. Uma parte dessa fração foi reservada para os bioensaios (5g) e a outra parte (156,53g) foi dissolvida em 200mL de CHCl₃, incorporada em gel de sílica (200g) e após remoção do clorofórmio por ventilação forçada, o material foi pulverizado e submetido a um processo de filtração em coluna a pressão reduzida (Filtração-2). Foram coletadas amostras de 1L, utilizando-se respectivamente os seguintes solventes: hexano, hexano:CHCl₃ (20%),

hexano:CHCl₃ (1:1), CHCl₃, AcOEt e MeOH. As amostras obtidas foram concentradas em aparelho rotatório a pressão reduzida e o resíduo de solvente eliminado a vácuo.

Após análise comparativa através de CCD, usando-se como eluente CHCl₃:MeOH (3%), estas frações foram reunidas em 5 grupos: **F4.1**-Hexano (66,96g), **F4.2**-Hexano:CHCl₃ (20%) (44,76g), **F4.3**-[Hexano:CHCl₃ (1:1) + CHCl₃] (16,25g), **F4.4**-AcOEt (16,26g) e **F4.5**-MeOH (12,14g) (**Fluxograma 1**) e submetidas aos bioensaios.

Fluxograma 1 – Filtração em carvão ativo e em gel de sílica do extrato etanólico das folhas da *A. muricata* (390g)



*Material Ativo nos Ensaios Moluscicida, Larvicida e/ou frente a *A. salina*.

II.11. 1 – Filtração 3. Nesta filtração foi trabalhada a **Fração 4.1** oriunda da filtração 2

A fração 4.1 (66,96g) foi então solubilizada em 180mL de CHCl₃, incorporada em gel de sílica (120g), evaporada a temperatura ambiente, pulverizada e submetida a uma filtração em coluna à pressão reduzida. Foram coletadas 7 amostras com o volume médio de 1L cada uma, empregando-se na eluição das mesmas hexano, clorofórmio, metanol e misturas destes. Após evaporação do solvente em aparelho rotatório foram obtidas 7 frações, codificadas como F4.1.1, F4.1.2, F4.1.3, F4.1.4, F4.1.5, F4.1.6 e F4.1.7, conforme visto abaixo. Essas frações tiveram os resíduos de seus solventes eliminados a vácuo. Foi realizada a análise comparativa

destas frações em cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica, utilizando CHCl_3 como eluente, o que permitiu verificar que as mesmas eram diferentes entre si. Através da análise por CCD a fração 4.1.2 foi selecionada para fracionamento.

Frações	Eluentes
F4.1.1 (43,28g)	Hexano
F4.1.2 (5,14g)	Hexano: CHCl_3 (5%)
F4.1.3 (3,34g)	Hexano: CHCl_3 (10%)
F4.1.4 (11,77g)	Hexano: CHCl_3 (1:1)
F4.1.5 (0,78g)	CHCl_3
F4.1.6(1,71g)	CHCl_3 :MeOH (15%)
F4.1.7 (0,07g)	MeOH

II.11.2 – Coluna 1. Para esta coluna foi selecionada a **Fração 4.1.2** proveniente da filtração 3

Essa fração (5,14g) foi dissolvida em 25mL de CHCl_3 , incorporada em 4g de gel de sílica, pulverizada e submetida a uma cromatografia em coluna de gel de sílica (56,78g), e forneceu 130 frações com o volume médio de 8mL cada uma. As frações foram eluídas com hexano, clorofórmio, metanol e mistura destes nas seguintes proporções:

Frações	Eluentes
1-99	Hexano
100-110	Hexano: CHCl_3 (10%)
111-115	Hexano: CHCl_3 (1:1)
116-120	CHCl_3
121-130	MeOH

A análise comparativa destas frações por cromatografia em camada delgada de sílica, usando-se como eluentes hexano: CHCl_3 (1:1) e CHCl_3 , permitiu reuni-las em sete grupos, conforme a **Tabela 8 p. 70**.

A fração 45-83 devido ao seu aspecto na cromatografia de sílica em camada fina, foi submetida a uma lavagem exaustiva com etanol e após filtração forneceu um sólido branco em estado de pureza satisfatório e que foi denominado (AM1) (0,4534g). O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da cromatografia em camada delgada de sílica, variando-se a fase móvel.

Tabela 8 – CCD das frações provenientes da coluna 1

Frações Reunidas	Eluentes
1-34 (0,0038g)	Hexano:CHCl ₃ (1:1)
35 (0,0044g)	Hexano:CHCl ₃ (1:1)
36-44 (3,3584g)	Hexano:CHCl ₃ (1:1)
45-83 (1,6683g)	CHCl ₃
84-104 (0,0998g)	CHCl ₃
105-130 (0,0053g)	CHCl ₃

II.11.3 – Coluna 2 – Cromatografia da fração 4.4 proveniente da filtração 2

A fração 4.4 (13,75g) foi dissolvida em 40mL de CHCl₃, incorporada em gel de sílica (14g), evaporada a temperatura ambiente, pulverizada e submetida à cromatografia em coluna de sílica, usando-se 120g deste adsorvente na fase estacionária. Foram coletadas 49 frações, com um volume médio de 8mL cada, empregando-se na sua eluição clorofórmio, metanol e misturas destes, nas seguintes proporções:

Frações	Eluentes
1-7	CHCl ₃
8-21	CHCl ₃ :MeOH (1%)
22-31	CHCl ₃ :MeOH (2%)
32-38	CHCl ₃ :MeOH (5%)
39-42	CHCl ₃ :MeOH (10%)
43-46	CHCl ₃ :MeOH (20%)
47-49	MeOH

Após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada de sílica, as frações puderam ser reunidas em 10 grupos. Foram utilizados como eluentes CHCl₃, CHCl₃:MeOH (2,5%) e CHCl₃:MeOH (5,0%) (**Tabela 9 p. 71**).

Tabela 9 – CCD das frações provenientes da coluna 2

Frações Reunidas	Eluentes
1 (0,0149g)	CHCl ₃
2-4 (0,0020g)	CHCl ₃
5-7 (0,0083g)	CHCl ₃
8-12 (0,0109g)	CHCl ₃
13-25 (0,4666g)	CHCl ₃ :MeOH (2,5%)
26-39 (10,8400g)	CHCl ₃ :MeOH (2,5%)
40-41 (2,1062g)	CHCl ₃ :MeOH (5%)
42-43 (0,0477g)	CHCl ₃ :MeOH (5%)
44-45 (0,1739g)	CHCl ₃ :MeOH (5%)
46-49 (0,0667g)	CHCl ₃ :MeOH (5%)

A fração 26-39 (10,84g), material oleoso, foi selecionada através de cromatografia em camada delgada de sílica para purificação. Após sete colunas cromatográficas com sílica gel, uma de sílica impregnada com KOH, uma de carvão ativo e três de Sephadex, obtendo-se ao final 4 frações com aparência de cera denominadas AMF2 (25mg), AMF3 (32mg), AMF4 (33mg), AMF5 (19mg) e AMF6 (90mg). Essas frações foram comparadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica mostrando-se iguais sendo em seguida reunidas e submetidas à cromatografia de alta eficiência preparativa. A separação por CLAE preparativa, forneceu 6 frações, codificadas como AM1, AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6 que foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas cujas condições estão descritas no **item II.2.3 p. 54**. Todas essas frações foram submetidas aos ensaios larvicidas.

Para as colunas de sílica, o material foi primeiro impregnado em quantidade suficiente deste adsorvente, o mínimo para torná-lo pulverizado e a quantidade de sílica utilizada na fase estacionária foi de 20 a 30 vezes o peso do material a ser cromatografado. Na fase móvel foram utilizados como eluentes: clorofórmio, metanol e misturas destes. A sílica impregnada com KOH foi utilizada com o objetivo de se obter uma melhor separação dos compostos hidroxilados (PINTO *et al.*, 1997) e foi preparada adicionando-se a cada 90g de sílica, 10mL de uma solução aquosa de KOH a 10%. A mistura foi homogeneizada em aparelho rotatório, sem pressão, e ativada em estufa a 100⁰C por 3 horas. As colunas de Sephadex foram eluídas com metanol.

Para as análises de CLAE analítica foram injetadas alíquotas de 30 μ L na concentração de 20 mg.mL⁻¹ a uma vazão de 1,8 mLmin⁻¹ e para CLAE preparativa foram injetadas alíquotas de 1mL na concentração de 20 mg.mL⁻¹ a uma vazão de 25,0 mLmin⁻¹. A coluna foi mantida a 25°C e a eluição foi realizada utilizando-se CH₃OH:H₂O (90:10). O eluído foi monitorado a 210nm.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas das amostras AM2, AM3, AM4 e AM5 foi realizada com uma interface APCI modo positivo. AM6 foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas usando a técnica de ionização por "electrospray" modo negativo e foi caracterizada como uma mistura de três substâncias.

II.11.4 – Isolamento dos constituintes químicos da Fração 4.2 proveniente da filtração 2

A fração 4.2 oriunda da filtração 2 em sílica (44,00g) e ativa nos testes de atividade moluscicida, larvicida e frente a *A. salina*, após ser submetida a cinco filtrações em sílica, uma filtração em carvão ativo, seis cromatografias em coluna de sílica e sete em coluna de Sephadex forneceu ao todo três frações com aspecto de cera, codificadas como AMF6 (113,3mg), AMF7 (71,5mg), AMF8 (67,5mg) e AMF9 (25,9mg). Essas frações após comparação por CLAE foram somadas as frações AMF3, AMF4, AMF5 e AMF6 e submetidas à separação por CLAE preparativa para a obtenção de maior quantidade das substâncias AM1, AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6. Uma alíquota das frações reunidas foi submetida aos ensaios moluscida e larvicida.

As colunas de sílica e Sephadex e as análises por CLAE foram realizadas de acordo com procedimento descrito no item anterior. Nas filtrações em sílica foi utilizado na fase móvel CHCl₃, metanol e misturas destes. Na filtração em carvão ativo, o material depois de incorporado, seco e pulverizado foi extraído sucessivamente com os solventes H₂O, EtOH, AcOEt, CHCl₃ e misturas destes em ordem decrescente de polaridade.

II.11.5 – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As frações AM1, AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6 foram então submetidas às técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional e espectrometria de massas e análise elementar.

Para melhor caracterização, as substâncias AM2, AM3 e AM4 foram submetidas a uma reação de acetilação.

Reação de acetilação: Adicionou-se a 20mg de substância 4 gotas de piridina e em seguida 5mL de anidrido acético recém destilado. A mistura permaneceu em repouso por 72 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi recebida em gelo picado em um béquer, adicionou-se 50mL de ácido clorídrico 1mol.L^{-1} e deixou-se em contato por uma hora, para completa hidrólise do anidrido acético. A solução resultante foi submetida à extração com clorofórmio (3x50mL). A solução clorofórmica foi lavada com solução de ácido clorídrico 1mol.L^{-1} (3x50mL) para eliminar o excesso de piridina e depois lavada novamente com água destilada (1x50mL). O excesso de ácido foi removido pela lavagem com bicarbonato de sódio a 5% (3x50mL) seguindo-se lavagem com água (1x50mL). Seguiu-se secagem com Na_2SO_4 e remoção do solvente a pressão reduzida. Para as três substâncias o material acetilado foi isolado como um óleo amarelado.

II.12 – Estudo fitoquímico da espécie *X. americana* (casca do caule) monitorado pela atividade antioxidante

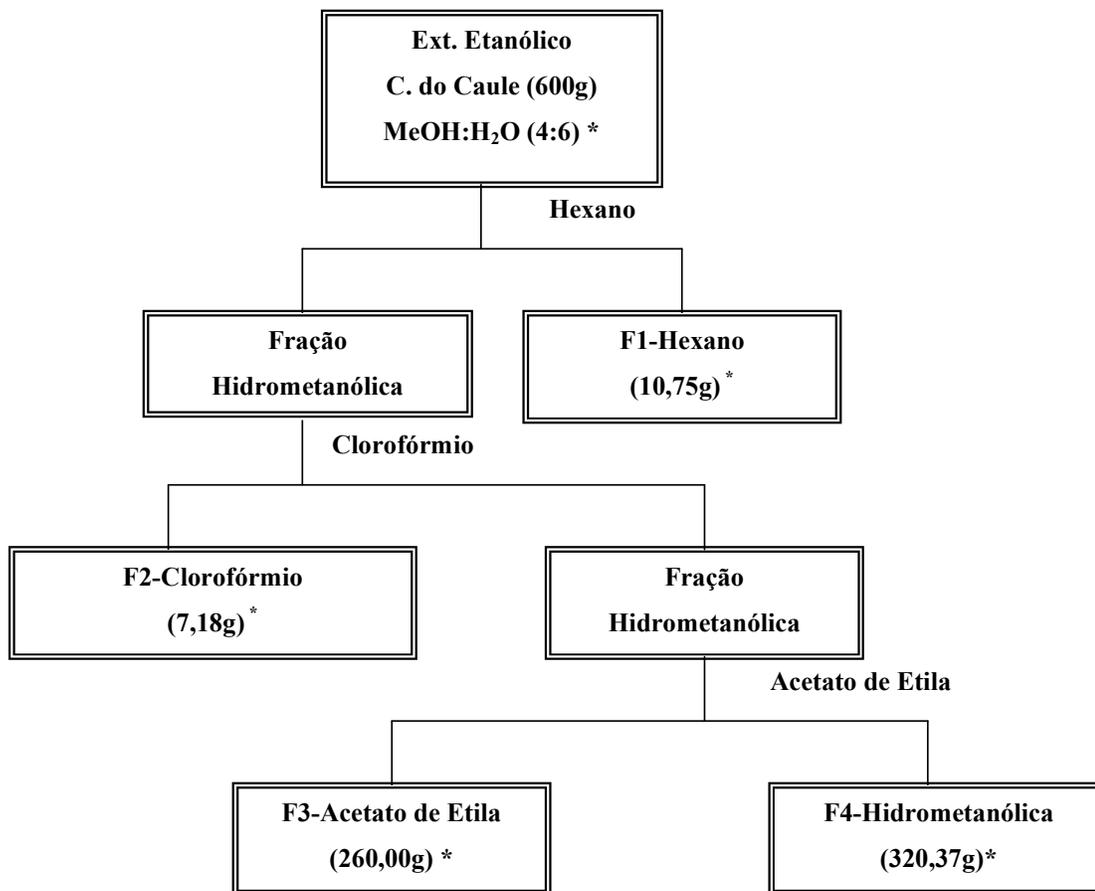
O extrato etanólico da casca do caule (600g) da espécie *X. americana* coletada no estado do Piauí após ser submetido aos bioensaios, foi suspenso em 600mL de uma mistura $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (60%) e submetido a um processo de extração por solvente, utilizando-se 1,5L dos respectivos solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após evaporação do solvente em aparelho rotatório das frações e liofilização do extrato hidrometanólico, foram obtidas 4 frações: **F1**-Hexano (10,75g), **F2**-Clorofórmio (7,18g), **F3**-Acetato de etila (260,00g) e **F4**-Hidrometanólica (320,37g) que foram submetidas aos bioensaios (**Fluxograma 2 p. 74**).

II.12.1 – Filtração 1. Nesta filtração foi trabalhada a fração **F3**-Acetato de etila oriunda da partição do extrato bruto

A fração **F3**-Acetato de etila (260,00g) de cor marrom-avermelhado, foi dissolvida em 300mL de metanol e incorporada em sílica desativada com água a 10% (180g). A mistura foi seca à temperatura ambiente, pulverizada e submetida a uma filtração em sílica em funil de separação sob uma camada de sílica desativada. Foram obtidas três subfrações: **F3.1**-Acetato

de etila (1) (46,54g), **F3.2**-Acetato de etila (2) (29,11g) e **F3.3**-Metanol (76,66g) (**Fluxograma 3 p.75**). Cada fração foi obtida pela passagem de 500mL de solvente.

Fluxograma 2 - Extração por solventes do extrato etanólico da casca do caule da *X. americana* (600g)



* Ativo no teste antioxidante

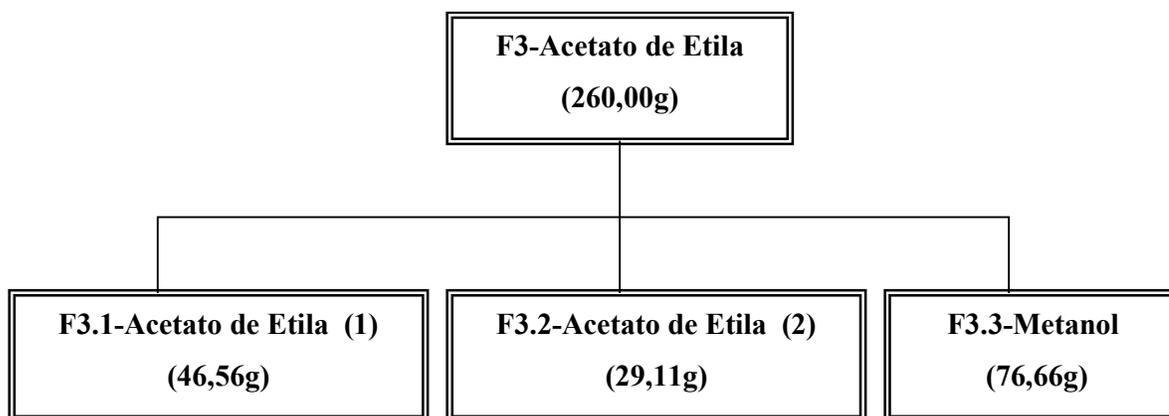
Filtração 2-Nesta filtração foi trabalhada a fração **F3.1**-Acetato de etila (1) oriunda da filtração 1

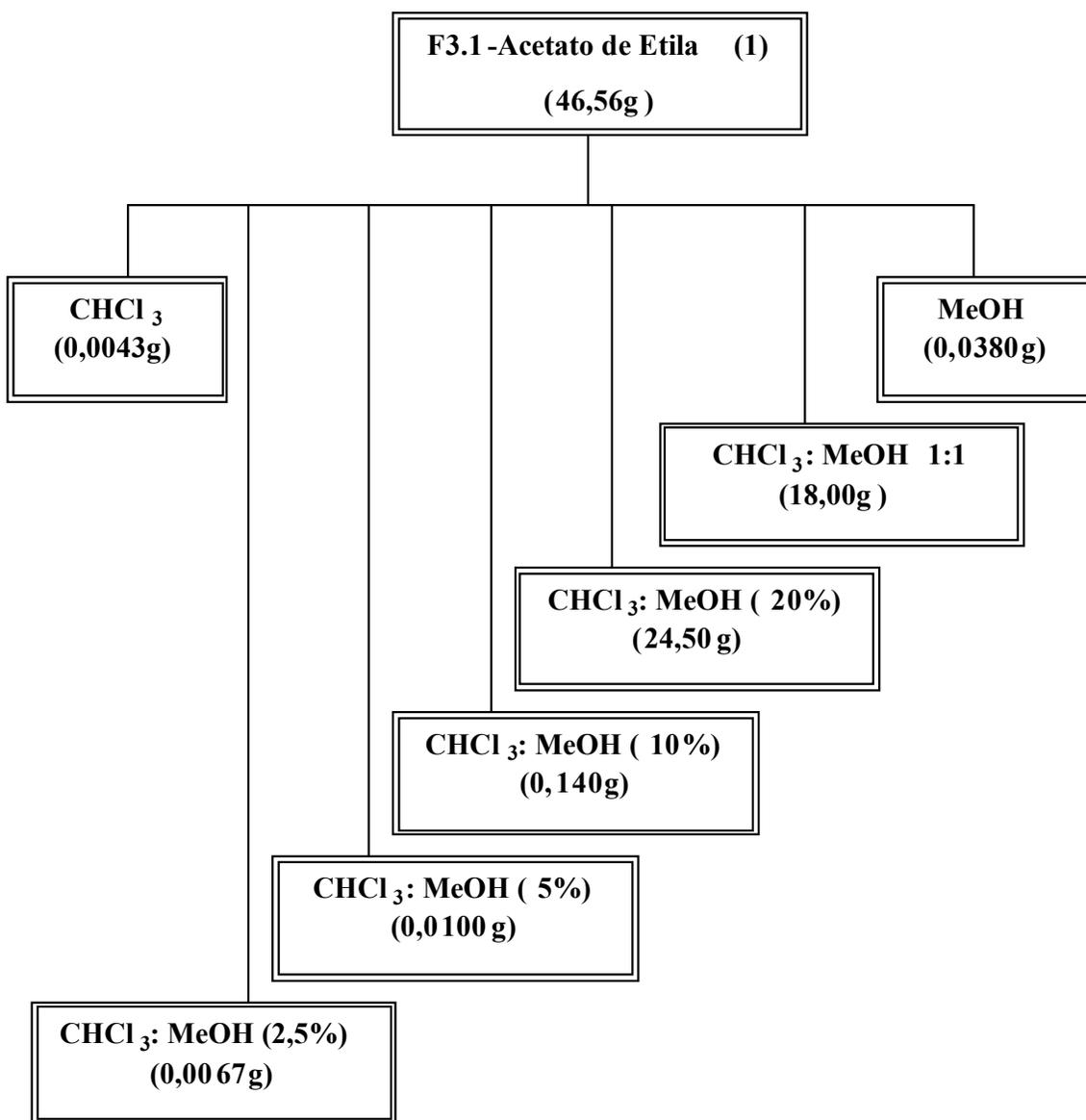
A fração acetato de etila 1 (42,72g) de cor marrom-avermelhado, foi dissolvida em 80mL de MeOH, incorporada em 60g de gel de sílica, evaporada sob ventilação forçada, pulverizada e submetida a uma filtração, usando como suporte gel de sílica (100g). Foram

coletadas 7 frações com o volume médio de 500mL cada uma, empregando-se como eluentes clorofórmio, metanol e misturas destes (**Fluxograma 4 p. 76**).

A fração $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (20%), sólido amorfo de cor vinho, foi submetida a um processo de cristalização. A fração foi completamente dissolvida em 10mL de acetato de etila em seguida adicionou-se 10mL de éter etílico. A mistura foi mantida em geladeira por 24 horas e submetida à filtração em funil de Buchner. O processo foi repetido por mais duas vezes e ao final obteve-se um precipitado de cor bege codificado como XA1, considerado puro após apresentar uma única mancha em cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando-se acetato de etila, acetato de etila:MeOH (20%) e acetato de etila:MeOH (40%) como eluentes. A substância obtida foi caracterizada por métodos espectroscópicos, análise elementar e reação de acetilação de acordo com descrição na **p.73**. XA foi submetida ao ensaio da atividade antioxidante conforme descrição nas **p. 62 e 63**.

Fluxograma 3 – Filtração em sílica gel desativada da fração em acetato de etila



Fluxograma 4 – Filtração em sílica gel desativada da subfração F3.1-Acetato de etila 1**II.13 – Constituintes químicos do *Emmotum nitens***

Três substâncias codificadas como emotinas A, B e F obtidas da madeira do caule da espécie *Emmotum nitens* coletado em Diamantina-MG, foram reavaliadas estruturalmente. A elucidação estrutural destes compostos foi realizada com o uso de espectrômetros operando a 60 e a 100MHz para hidrogênio e apenas espectros de hidrogênio e carbono foram obtidos. Neste trabalho as substâncias foram reavaliadas com o uso de espectros de RMN

unidimensionais de ^1H , ^{13}C , DEPT 90° e 135° e bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC. Há ainda três outras emotinas - Emotina I, Emotinol-1 e Emotinol-2 - que ainda não foram descritas e estão sendo avaliadas. Os espectros foram obtidos em um aparelho operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para o carbono-13, obtidos a temperatura ambiente no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará. Utilizou-se como solvente o deuteroclorofórmio (CDCl_3). As amostras com maior quantidade, emotinas A, B, F e I, foram submetidas aos bioensaios com as larvas de *A. salina* e do mosquito *A. aegypti* e a emotina I foi ainda submetida aos ensaios de atividade antioxidante conforme descrição anterior.

CAPÍTULO III
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 3. Resultado e Discussão

III.1 – Avaliação das atividades larvicida, moluscicida e toxicidade frente a *Artemia salina* das plantas selecionadas para estudos biológicos e escolha da planta para estudo químico

A seleção de uma determinada espécie para estudo é um dos pontos críticos da pesquisa de produtos naturais. Uma seleção inadequada da planta pode levar ao desperdício de tempo e de recursos. Acredita-se que plantas que apresentam um tipo de atividade biológica podem apresentar outras atividades e por isso a importância de se realizar estudos etnobotânicos e quimiosistemáticos como um critério para a seleção das plantas a serem estudadas. Tendo em vista a valorização de nossas plantas medicinais o grupo de química de produtos naturais liderado pelo professor Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana vem estudando a ação moluscicida, larvicida e toxicológica de extratos de plantas medicinais do nosso país especialmente do nordeste, com o objetivo de desenvolver uma metodologia de controle de vetores de doenças tropicais e de insetos e pragas.

As espécies de plantas selecionadas para estudos iniciais tiveram como critério de seleção informações etnobotânicas e/ou quimiosistemáticas. Foram selecionados para os testes iniciais de atividade biológica 22 extratos etanólicos de diferentes órgãos de 15 plantas (**Tabela 10 p. 80**). As concentrações dos extratos foram selecionadas de acordo com o interesse do grupo: 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ensaio com a *A. salina*, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os testes com o caramujo adulto e massa de ovos e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ensaio com as larvas do *A. aegypti*. Os resultados da triagem inicial com os extratos das plantas selecionadas estão apresentados na Tabela 10 p. 80 e os resultados dos testes mais apurados com a espécie *Annona muricata* podem ser vistos nas **Tabelas 11 e 12 p. 81**.

Tabela 10 - Atividades dos extratos das plantas selecionadas contra *A. aegypti*, *B. glabrata* e *A. salina*

Espécie	Parte estudada	Atividade (expressa como % mortalidade) contra:			
		<i>A. aegypti</i> 500 µg,mL ⁻¹	<i>B. glabrata</i> 100 µg,mL ⁻¹	<i>A. salina</i> 1000 µg,mL ⁻¹	
				Adultos	Ovos
<i>Annona muricata</i>	Folhas	100	100	0	100
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Casca do caule	0	-	-	80
<i>Bauhinia cheilantha</i>	Caule	100	-	0	50
	Folhas	0	-	0	61
	Raízes	0	-	24	100
<i>Bursera leptophloeos</i>	Caule	10	-	9	57
<i>Caesalpinia echinata</i>	Folhas	80	-	7	78
	Caule	50	-	100	57
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Folhas	10	-	0	68
<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	Folhas	10	-	3	0
	Caule	20	-	14	100
<i>Dioclea virgata</i>	Folhas	5	0	-	88
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas	65	-	0	45
	Caule	10	-	5	0
<i>Ocotea glomerata</i>	Casca do caule	15	0	-	29
	Caule	0	0	-	0
	Folhas	35	0	-	0
<i>Operculina macrocarpa</i>	Tubérculo	100	-	7	100
<i>Marsdenia altissima</i>	Casca do caule	40	80	-	62
<i>Spondias mombin</i>	Sementes	85	-	0	96
<i>Ximenia americana</i>	Casca do caule	0	-	-	0
<i>Piper arboreum</i>	Folhas	15	0	-	83
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Caule	15	0	-	66
Controles					
Teste para atividade moluscicida:					
	Carbonato Cúprico (50 µg.mL ⁻¹)	-	100	-	-
	Niclosamida (3 µg.mL ⁻¹)	-	100	-	-
	Água desclorada contendo 1% DMSO	-	0	0	-
Teste para atividade larvicida:					
	Temefos (3 µg.mL ⁻¹)	100	-	-	-
	Água destilada contendo 1% DMSO	0	-	-	-
Teste para atividade citotóxica:					
	Timol (10 µg.mL ⁻¹)	-	-	-	100
	Água do mar contendo 1% DMSO	-	-	-	0
Teste para atividade contra a massa de ovos do molusco:					
	Pentaclorofenol (DL ₉₀ = 0,49 µg.mL ⁻¹)	-	-	90	-

Tabela 11 – Atividades moluscicida, larvicida e toxicidade frente a *A. salina* do extrato bruto das folhas da *A. muricata*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i>				<i>A. aegypti</i>				<i>A. salina</i>			
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	50	30	20	10	80	50	25	10	5	1	0,5	0,1
% de mortalidade	90	75	55	25	92	82	35	10	95	77	50	7,5

Tabela 12 – Valores de concentrações letais para a atividade moluscicida, larvicida e toxicidade frente a *A. salina* do extrato bruto das folhas da *A. muricata*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>A. aegypti</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>A. salina</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
CL ₁₀	6,16	11,13	0,10
CL ₅₀	17,57	28,52	0,48
CL ₉₀	50,13	73,04	2,27

Oito dos extratos testados mostraram ser ativos a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (mortalidade $\geq 40\%$) contra as larvas do *A. aegypti*. Os mais ativos com 100% de mortalidade foram os extratos das folhas de *A. muricata*, do caule de *B. cheilantha* e do tubérculo de *O. macrocarpa*. Os extratos das sementes de *S. mombin*, folhas de *C. echinata* e *E. uniflora*, caule de *C. echinata* e casca do caule de *M. altissima* exibiram, nesta ordem, um decréscimo de mortalidade contra as larvas do mosquito.

Apenas dois dos extratos testados neste estudo, aqueles das folhas da *A. muricata* e da casca do caule de *M. altissima*, mostraram atividade a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra o caramujo adulto, enquanto que o extrato do caule de *C. echinata* foi o único com uma boa atividade, 100% de mortalidade, contra a massa de ovos do *B. glabrata*.

Dezesseis dos extratos testados apresentaram atividade citotóxica (mortalidade $\geq 40\%$) contra as larvas de *A. salina* na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As mais altas atividades (100% mortalidade) foram observadas com as sementes de *S. mombin*, folhas de *A. muricata*, raízes de *B. cheilantha*, caule de *C. pyramidalis* e tubérculo de *O. macrocarpa*.

O único extrato que mostrou 100% de mortalidade a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a massa de ovos do caramujo, *C. echinata* (caule), foi também parcialmente ativo contra as larvas do mosquito *A. aegypti* e da *A. salina* (50% e 57% de mortalidade). Por outro lado, dos dois extratos mais ativos contra o caramujo adulto a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, um (das folhas da *A. muricata*) foi também bastante ativo contra as larvas do mosquito e no teste de toxicidade com a *A. salina*, enquanto o outro (da casca do caule de *M. altissima*) foi apenas parcialmente ativo nos

bioensaios das larvas de mosquito e de *A. salina*. A baixa atividade no ensaio da larva de *A. salina* é muito interessante, pois indica uma baixa toxicidade do extrato. Os dados mostrados na **Tabela 10 p. 80** indicam que nas concentrações testadas, alguns dos extratos das plantas selecionadas mostram boas atividades contra organismos que atuam como vetores de doenças humanas.

Os extratos ativos foram submetidos aos testes de prospecção fitoquímica seguindo-se a descrição de MATOS (1997) conforme descrito nos itens 2.9.1 a 2.9.8 e observou-se a presença de várias classes de compostos nesses extratos (**Tabela 13 p. 84**). Essa variedade nas classes de compostos indica que as atividades não parecem estar limitadas a qualquer parte morfológica da planta ou a qualquer classe de metabólito secundário.

As atividades dos extratos descritos na **Tabela 10 p. 80** contra as larvas do *A. aegypti* são comparáveis àquelas previamente citadas na literatura (CICCIA *et al.*, 2000) para os extratos de *Xanthium spinosum*, *Eupatorium hecatanthum*, *Baccharis coridifolia* e *Aristolochia triangularis*, uma vez que todos esses extratos exibiram 50% de mortalidade para os mosquitos em concentrações na região de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Embora sejam menos ativas que *Tagetes minuta* (50% de mortalidade a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, GREEN *et al.*, 1991), *Minthostachys setosa* (50% de mortalidade a 9,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, CICCIA *et al.*, 2000), *Abuta gradifolia* (50% de mortalidade a 2,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, CICCIA *et al.*, 2000) e *Myroxylon balsamun* (50% de mortalidade a 13,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, SIMAS *et al.*, 2004). O extrato das folhas de *A. muricata* foi o que apresentou a melhor atividade (90% de mortalidade a 73,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Tanto o extrato das folhas de *A. muricata* quanto os extratos das espécies *S. mombin* (sementes), *M. altissima* (casca do caule), *B. cheilantha* (caule), *C. echinata* (caule, folhas), *O. macrocarpa* (tubérculo) e *E. uniflora* (folhas) poderão ser de grande valor na busca de novos compostos com atividade larvicida.

Com relação à atividade moluscicida, extratos das raízes das espécies *Jatropha gossypifolia* (CL₉₀ 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ADEWUNMI e ADESOGEN, 1986) e *Annona squamosa* (CL₉₀ 8,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; DOS SANTOS e SANT'ANA, 2001), do fruto de *Phytolacca dodecandra* (CL₅₀ 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; SOUZA *et al.*, 1987), da folha de *Euphorbia cotinifolia* (CL₉₀ 1,2-3,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; PEREIRA *et al.*, 1978) e do látex de *Euphorbia milii* (CL₅₀ 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 2000) possuem melhores atividades que aquela do extrato mais ativo descrito nesse estudo, ou seja o das folhas da *A. muricata* (90% de mortalidade a 50,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50% de mortalidade a 17,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A organização Mundial de Saúde (WHO, 1993) preconiza que um extrato com valor de CL₅₀ menor que 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

pode ser empregado diretamente no combate ao molusco, enquanto que extratos menos ativos podem produzir novos compostos com atividades moluscicida.

Entretanto, qualquer consideração de exploração comercial das plantas que mostraram significantes atividades neste estudo deve levar em conta o impacto ambiental, a facilidade de cultivo e a disponibilidade da planta para a população local. Algumas das espécies de interesse, *A. muricata*, *S. mombin* e *E. uniflora*, são bastante cultivadas no nordeste do Brasil como fontes de frutos comestíveis, possuindo assim uma boa possibilidade para a exploração comercial de outras partes destas plantas tais como, caules, sementes, folhas, etc. É interessante ressaltar que no nordeste do Brasil, os fazendeiros costumam utilizar uma pasta preparada de material vegetal das espécies *A. muricata* e *A. squamosa* para controlar nematódeo, bactérias e fungos no solo, e eles também acreditam que tal tratamento protege a planta de ataque por insetos.

As atividades detectadas nas plantas testadas não parecem estar limitadas a qualquer parte morfológica da planta ou a qualquer classe de composto de metabólito secundário. *A. muricata* foi a espécie que mostrou a melhor atividade nesse estudo e foi então selecionada para estudos químicos. Vale salientar que a triagem inicial é apenas um indicativo de atividade, e que deve ser confirmado através de um ensaio apurado quando se utiliza um maior número de organismos alvos com um maior número de repetições. Por esse motivo, foram realizados posteriormente os ensaios com a espécie *A. muricata* (folha) antes do início dos estudos químicos. Os dados obtidos, concentração versus mortalidade dos organismos alvos, foram computadorizados e os valores das concentrações letais CL_{10} , CL_{50} e CL_{90} , em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para as atividades larvicida, moluscicida e de toxicidade frente a *A. salina* foram determinados através da realização de uma análise investigatória, efetuada em um programa Finney com um intervalo de confiança de 95% (FINNEY, 1971) (**Tabela 12 p. 81**).

Tabela 13: Classes de compostos detectados nos extratos de plantas ativos utilizados neste estudo

Espécie	Fenóis	Flavanonas	Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis, Xantonas	Flavonas, Flavonóis e Xantonas	Esteróides Livres	Triterpenos Pentacíclicos	Leucoan- tocianidinas	Antraquinonas	Antronas	Alcalóides	Acetogeninas
<i>A. macrocarpa</i> (CC)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>A. muricata</i> (F)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>B. cheilantha</i> (C)	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>B. cheilantha</i> (F)	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>B. cheilantha</i> (R)	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>C. echinata</i> (F)	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>C. echinata</i> (C)	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>E. uniflora</i> (F)	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>E. uniflora</i> (C)	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>M. altissima</i> (CC)	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>O. macrocarpa</i> (T)	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. mombin</i> (S)	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-

+ = detectado; - = não detectado, S=Semente; F=Folha; CC=Casca do Caule; C=Caule; R=Raiz; T=Tubérculo

III.1.1 – Avaliação da atividade das folhas de *Annona muricata* no desenvolvimento de *Plutella xylostella*

O extrato etanólico bruto das folhas da *A. muricata* foi submetido a ensaios biológicos com a traça-das-crucíferas, *P. xylostella*, mostrando-se ativo. O extrato testado foi aquele cujas folhas foram coletadas no mês de novembro e apresentou uma porcentagem de mortalidade de 86,6% sobre as lagartas testadas. Devido a esta boa atividade e a grande disponibilidade dessa planta na nossa região realizou-se em seguida uma análise sazonal da atividade das folhas da *A. muricata* sobre a *P. xylostella*. Para a avaliação sazonal as folhas foram coletadas mensalmente por um período de 12 meses no dia dezessete de cada mês.

As porcentagens de mortalidade das larvas da traça-das-crucíferas após tratamento com os extratos etanólicos das folhas de *A. muricata* coletadas mensalmente pelo período de um ano encontram-se na **Figura 19 p. 85**. A figura indica ainda os níveis de precipitação

durante esse mesmo período. A partir dos dados obtidos pode-se observar que os extratos que exibiram as melhores taxas de letalidade foram àqueles obtidos durante o segundo semestre do período avaliado, isto é, a época do ano em que a precipitação pluviométrica foi baixa ou ausente. Dessa forma, o extrato obtido no mês de outubro promoveu uma taxa de mortalidade de 100% das lagartas quando aplicado na concentração de 5mg/mL, um percentual que não diferiu dos tratamentos dos meses subseqüentes até o mês de fevereiro, com médias de 86,6; 73,0; 69,0 e 61,0%, respectivamente. Em contraste, as porcentagens de mortalidade promovidas pelos extratos obtidos durante os outros meses do ano foram variáveis e menores, com valores variando entre 49,6% em maio a 14,6% em agosto.

Quando o extrato das folhas coletadas no mês de outubro foi aplicado nas larvas em concentrações abaixo de 5mg.mL⁻¹ foram registradas porcentagens de mortalidade significativamente menores (Tabela 14 p. 86). Exposição ao extrato na concentração mais alta evitou que as larvas atingissem a fase de pupa, o que não permitiu avaliar os efeitos do extrato no desenvolvimento do inseto. Quando aplicadas nas concentrações de 3 e 4mg/mL, entretanto, os extratos causaram um aumento na duração da fase de larva por 2,6 dias comparados com o controle (água destilada : DMSO 1%). Em contraste, exposição aos extratos nas concentrações de 1 e 2mg/mL não produziram alteração significativa na duração desta fase (Tabela 14 p. 86).

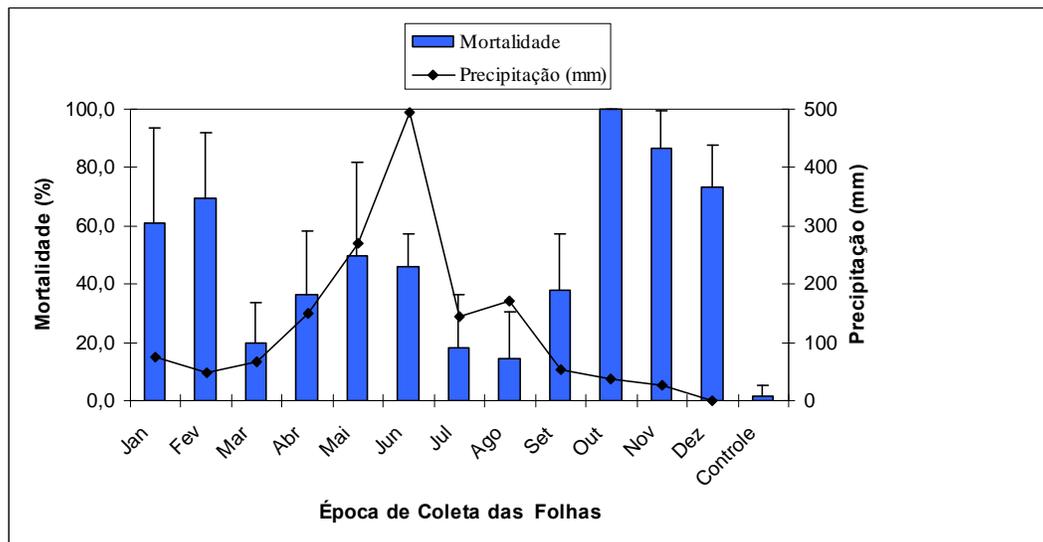


Figura 19 – Mortalidade das larvas de *Plutella xylostella* tratadas com extrato etanólico de folhas mistas de *Annona muricata* entre os meses de abril de 2002 a março de 2003 e os níveis de precipitação pluviométrica no mesmo período

Foi possível verificar que o extrato na concentração mais elevada (5 mg.mL⁻¹) causou um efeito inseticida com mortalidade total das lagartas, porém a medida que a concentração foi diminuindo, o efeito do extrato observado foi uma diminuição na taxa de crescimento do inseto. Isso poderia ser atribuído à presença de compostos tóxicos não-específicos, ou de substâncias com propriedades fagoinibidora e inibidoras do crescimento existentes nas folhas de *A. muricata*. Esse fato corrobora com resultados de RATNAYAKE *et al.*, 1992, os quais mostraram que as acetogeninas de anonáceas apresentam propriedades fagoinibidora em doses baixas e podem ser fatais em doses elevadas. Uma maior duração da fase larval, em campo, fará com que o inseto permaneça por mais tempo exposto ao ataque de parasitóides, predadores e entomopatógenos. Esse prolongamento está correlacionado com o crescimento mais lento, podendo estar associado a pouca ingestão de alimento, por existir uma ou várias substâncias tóxicas ou por desequilíbrio nutricional. Assim, um consumo reduzido de alimento pela larva deverá levar a um menor dano causado pelo inseto à planta hospedeira (RODRIGUÉZ, 1995).

Tabela 14 – Médias da mortalidade das larvas (\pm EP), duração e viabilidade das fases de larva e pupa de *Plutella xylostella* tratadas com o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* coletadas em outubro de 2002

Concentração do Extrato (5mg.mL ⁻¹)	Mortalidade Larval (%)	Duração da Fase Larval (Dias)	Duração da Fase Pupal (Dias)	Viabilidade Larval (%)	Viabilidade Pupal (%)
5	100,0 \pm 0,00 ^a	-	-	-	-
4	58,0 \pm 2,04 ^b	10,6 \pm 0,45 ^a	5,2 \pm 0,18 ^a	37,8 \pm 1,67 ^d	92,0 \pm 4,90 ^a
3	53,0 \pm 7,26 ^{bc}	10,6 \pm 0,22 ^a	5,6 \pm 0,26 ^a	46,2 \pm 5,53 ^{cd}	96,0 \pm 4,00 ^a
2	34,8 \pm 8,08 ^{cd}	8,8 \pm 0,46 ^b	5,4 \pm 0,18 ^a	64,8 \pm 8,08 ^{bc}	100,00 \pm 0,00 ^a
1	23,0 \pm 5,53 ^{de}	8,2 \pm 0,09 ^b	5,2 \pm 0,16 ^a	76,4 \pm 7,26 ^{ab}	100,00 \pm 0,00 ^a
Controle	1,6 \pm 1,67 ^e	8,0 \pm 0,04 ^b	4,0 \pm 0,05 ^b	98,2 \pm 2,04 ^a	96,4 \pm 2,04 ^a

Médias \pm EP seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

A concentração mais elevada (5 mg.mL⁻¹) do extrato das folhas causou 100% de mortalidade larval enquanto que exposição às concentrações de 2, 3 e 4 mg.mL⁻¹ levaram a decréscimos gradativos na viabilidade larval com valores de 64,8; 46,2 e 37,8%, respectivamente. A viabilidade larval registrada para a concentração de 1 mg.mL⁻¹ (76,4%) não foi estatisticamente diferente do valor registrado para o controle (98,2%). Naqueles

tratamentos em que a duração da fase larval foi prolongada, uma correlação inversa ($r=-0,81$; $P=0,010$) entre a duração do estágio larval e a viabilidade da larva pôde ser demonstrada, as quais não diferiram estatisticamente entre si. Mediante estas observações, podemos afirmar que o extrato das folhas de *A. muricata* apresenta características insetistáticas, pois pode não ter causado ação aguda contra os insetos, mas conseguiu reduzir a população de adultos para níveis inferiores.

As lagartas mortas pela ação dos extratos apresentaram escurecimento acentuado, tamanho reduzido. Muitas delas morreram durante a ecdise, por não conseguirem liberar totalmente a exúvia, que tipicamente permanece presa à parte posterior do abdome, produzindo a coloração escura observada. Essas alterações morfológicas podem ter sido resultantes do efeito de componentes químicos no sistema hormonal do inseto. Mordue & Blackwell (1993), também observaram sintomas semelhantes em lagartas submetidas a diferentes doses de azadiractina, e atribuíram essas alterações à redução na concentração do ecdisônio ou atraso da sua liberação na hemolinfa.

Pode ser visto na **Tabela 14 p. 86** que a fase pupal foi bem menos afetada pela exposição aos extratos que a fase larval. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada nas viabilidades da pupa entre qualquer um dos tratamentos e o controle (água:DMSO 1%). Além disso, embora a exposição aos extratos aparentemente tenha aumentado a duração da fase pupal por um dia em comparação com o controle, nenhuma correlação entre a extensão desse aumento e a concentração do extrato foi observada. É claro que as larvas ficam mais expostas aos constituintes químicos presentes nos extratos em virtude dos seus hábitos alimentares.

O uso potencial de espécies de *Annona* para o controle de pragas foi demonstrado por Prates *et al.* (1999) que avaliaram a atividade inseticida das sementes de araticum (*A. crassiflora*) contra *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (lagarta-do-cartucho do milho, Lepidoptera: Noctuidade), uma praga do milho. Extratos de araticum produziram 100% de mortalidade das lagartas 12 dias após a eclosão, indicando que a planta pode ser uma fonte potencial de inseticidas naturais no controle dessa praga. Extratos de sementes de *A. squamosa* também demonstraram possuir propriedades inseticidas (GRITSANAPAN, 1997; CATARINO & EZEQUIEL, 1999). Através do fracionamento monitorado pela atividade biológica do extrato das sementes, Londershausen *et al.* (1991) estabeleceu que dois dos princípios ativos eram as acetogeninas anonina I e anonacina A.

O estudo da variação sazonal qualitativa e quantitativa de compostos naturais produzidos por uma planta é de grande importância no entendimento da maneira pela qual o

metabolismo secundário é influenciado pelos estágios de desenvolvimento fisiológico do organismo e fatores ambientais a que ele é submetido (VANCE *et al.*, 1994). Dessa forma, a variação sazonal na atividade inseticida das folhas de *A. muricata* descritas neste trabalho reflete uma variação significativa no acúmulo de metabólitos secundários durante as diferentes estações do ano. Estudos precisam ser ainda conduzidos, entretanto, para determinar o papel da mudança climática no acúmulo desses metabólitos. Em termos práticos, as elevadas atividades larvicidas uniformes exibidas pelas folhas durante o período seco sugerem que a melhor época para a coleta da planta com o interesse em suas propriedades inseticidas seja entre os meses de outubro e fevereiro (período seco).

A influência da época de coleta do material vegetal no perfil e quantidade de metabólitos secundários presentes tem sido o objetivo de vários estudos. Veselá *et al.* (1999) verificaram que os extratos das cascas de *Taxus baccata* L. (Taxaceae) coletadas várias vezes durante 1993 e 1994 exibiram variações significativas nas concentrações de cinco taxanos. Esses autores concluíram que os diterpenos eram acumulados nas mais altas concentrações em outubro (período seco) e nas mais baixas concentrações em janeiro. Outros trabalhos também comprovaram que a variabilidade sazonal tem efeito na atividade de compostos orgânicos ativos (ELSOHLY *et al.*, 1997; PARK *et al.*; 1998; DORN, 2003).

Da mesma forma que a *A. muricata*, outras espécies de anonáceas contêm componentes tóxicos, principalmente acetogeninas, que dão a planta propriedades inseticidas. Neste trabalho, foi possível mostrar que os extratos das folhas de *A. muricata* exibem um efeito inseticida significativo. Com o objetivo de melhor avaliar o potencial da *A. muricata* como uma candidata para inclusão em um programa de manejo de doenças e pragas, estudos mais detalhados dos metabólitos desta planta devem ser feitos com ênfase particular na variação com condições ambientais e ontogênicas.

III.1.2 – Construção da Curva Dose-Resposta para a Atividade das folhas da *A. muricata* frente às Larvas do *A. aegypti*

O extrato etanólico bruto das folhas da *A. muricata* apresentou atividade larvicida frente às larvas do mosquito *A. aegypti* ($CL_{90} = 73,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Assim, para obtenção de uma avaliação mais rigorosa, foram conduzidos novos testes de atividade desse extrato frente às larvas do mosquito, para que se pudesse traçar um perfil da variação de concentração *versus* tempo necessário para 100% de mortalidade das larvas. Dessa forma, foi realizado o bioensaio apurado, em quadruplicata, com dez concentrações: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800,

900 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As concentrações foram selecionadas de modo que tivéssemos 100% de mortalidade das larvas em um espaço curto de tempo. A cada 60 minutos foi realizada a leitura do número de indivíduos afetados para cada concentração testada; sendo considerado como etapa final o tempo, em minutos, onde toda população estudada estivesse morta (**Figura 20**). As médias foram submetidas a tratamento estatístico, através da análise de variância pela diferença média dos indivíduos mortos ao nível de significância de 0 a 5% ($p < 0,05$), e comparadas através do teste de Tukey (**Tabela 15**). O coeficiente de correlação de Pearson também foi calculado para cada concentração e os resultados podem ser vistos na **Tabela 16 p. 90** (VIEIRA, 1997; BEIGUELMAN, 2002).

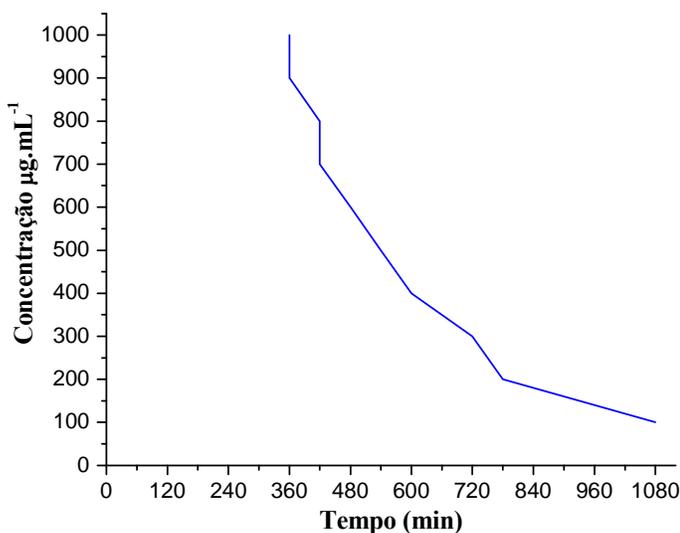


Figura 20 – Gráfico da concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus tempo (min) necessário para 100% de mortalidade das larvas do *A. aegypti*

Tabela 15 – Avaliação estatística da relação dose-resposta do extrato etanólico bruto das folhas da *A. muricata* sobre as larvas do *A. aegypti*

Causa	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Valor de F
Tratamento	9	1223190	135910	0,094
Resíduo	30	43150050	1438335	

Tabela 16 – Coeficiente de correlação de Pearson da relação dose-resposta do extrato etanólico bruto das folhas da *A. muricata* sobre as larvas do *A. aegypti*

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Correlação de Pearson	Regressão linear
100	1,12	$r^2 = 0,1334$, a= -4,64488, b= 4,0687
200	0,97	$r^2 = 0,203$, a= -29,37, b= 8,8420
300	0,97	$r^2 = 0,29336$, a= -65,92, b= 16,90
400	0,88	$r^2 = 0,39178$, a= -120,1499, b= 28,78
500	1,00	$r^2 = 0,477$, a= -172,78, b= 41,21
600	0,97	$r^2 = 0,5673$, a= -240,136, b= 57,1068
700	0,96	$r^2 = 0,64389$, a= -304,11, b= 72,688
800	0,95	$r^2 = 0,6916$, a= -348,17, b= 83,70
900	0,93	$r^2 = 0,756$, a= -409,78, b= 99,386
1000	0,46	$r^2 = 0,7872$, a= -447,78, b= 108,28

A regressão linear dos dados obtidos mostra uma conformidade dos pontos analisados, indicando assim que as condições foram bem controladas e que todas as concentrações testadas foram significativas e os resultados reprodutíveis. O coeficiente de variância foi de 11,51% para todas concentrações testadas, sendo este menor que o definido para 9 e 30 graus de liberdade.

Os dados obtidos mostram uma similaridade de toxicidade para a maioria das concentrações testadas. Com o experimento conduzido até o tempo necessário para mortalidade total em cada concentração, foi possível estabelecer a variação da toxicidade a cada período de tempo e definir qual a dosagem estatisticamente mais efetiva num tempo mínimo de exposição.

A análise de variância ao nível de significância de $p \leq 0,05$ revelou que entre as concentrações de 100 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as médias de mortalidade por período não apresentaram uniformidade, havendo uma grande diferença entre os tempos máximos para ocasionar a mortalidade total. A partir da concentração de 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ estatisticamente não houve diferença percentual de mortalidade após 5 horas de exposição, onde a dispersão dos dados em relação à média apresentou um coeficiente de variância de 11,51%. Embora, tenham ocorrido diferenças grandes entre os períodos do teste para as concentrações analisadas, o coeficiente de correlação de Pearson ($-1 \leq r \leq +1$) revelou que todas as concentrações haviam apresentado uma tendência de correlação positiva, e apenas as concentrações de 100 e 1000

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ não confirmaram estatisticamente este crescimento de toxicidade. Ao realizar a regressão linear, apenas as concentrações de 700 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ puderam ter seus dados comprovados em mais de 60%. Indicando assim que os dados obtidos não obedecem à equação da reta.

A **Figura 21** mostra a curva dose-resposta do extrato das folhas de *A. muricata* sobre as larvas do *A. aegypti*. A partir da concentração de 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estatisticamente não existem diferenças no percentual de mortalidade após 330 minutos, e dessa forma, a concentração de 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que apresentou o melhor resultado, maior mortalidade em um menor espaço de tempo, indicando que concentrações acima desta não são necessárias uma vez que o perfil de mortalidade não se modifica. A porcentagem de mortalidade para cada concentração no tempo de 360 minutos (**Figura 22 p. 92**) também demonstra que a partir de 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não há diferença significativa na porcentagem de mortalidade das larvas nesse período de tempo.

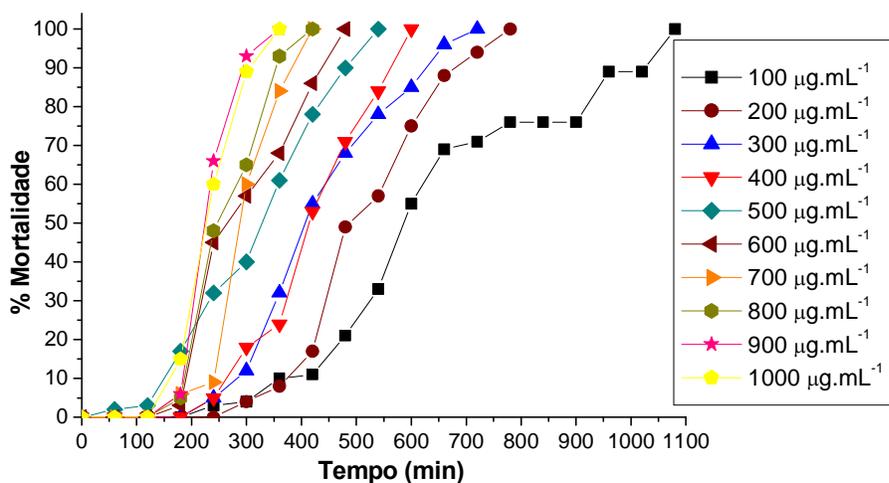


Figura 21 – Curva dose resposta para o efeito do extrato das folhas de *A. muricata* sobre as larvas do mosquito *A. aegypti*

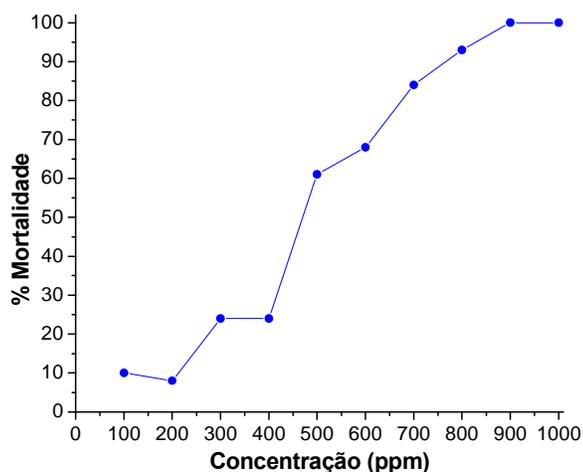


Figura 22 – Curva concentração versus percentagem de mortalidade em 360 minutos

III.2 – Estudo do extrato etanólico das folhas da *Annona muricata*

III.2.1 – Estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Annona muricata*

O fracionamento do extrato etanólico das folhas da *A. muricata* foi problemático devido à presença da clorofila. A interferência da clorofila pode ser evitada através do uso de misturas de metanol e éter de petróleo como solventes de extração, permanecendo a clorofila na fase etérea (GOODWIN, 1976). Como uma alternativa, carvão ativado pode ser usado para eliminar a clorofila de um extrato (BIANCO *et al.*, 1982; 1983), embora esse procedimento aumente o risco de produção de artefatos causados por isomerização, hidrólise ou oxidação de componentes lábeis (MERZLYAK *et al.*, 1996).

Com o objetivo de se remover a clorofila e, ao mesmo tempo, reduzir a complexidade do extrato etanólico das folhas da *A. muricata*, o extrato bruto foi inicialmente submetido a uma filtração em carvão ativo usando um procedimento descrito para o isolamento de iridóides (BIANCO *et al.*, 1982 e 1983). Nesta filtração foram usados como eluentes sucessivamente água, etanol, acetato de etila, clorofórmio e misturas destes conforme a **Tabela 17 p. 93**. Observou-se que houve remoção da clorofila quando se utilizou o clorofórmio, no entanto, uma parte do material ficou retida no adsorvente, parte da clorofila e substâncias oleosas, uma vez que dos 390g de extrato bruto que entraram na filtração, apenas 322,43g foram recuperados. Quanto às atividades, observou-se que as frações F1-H₂O e F2-H₂O:EtOH (30%) não apresentaram atividade nos bioensaios moluscicida, larvicida e de

toxicidade frente às larvas da *A. salina*, já as frações F3-H₂O:EtOH (1:1) e F4-[EtOH+EtOH:AcOEt (1:1)+AcOEt] foram ativas em todos os bioensaios realizados e a fração F5-CHCl₃ foi inativa no bioensaio larvicida com larvas do *A. aegypti* e ativa nos testes moluscicida e de toxicidade frente à *A. salina*, mas apesar desta atividade seletiva o que a torna bastante interessante essa fração apresentou um baixo peso (9,19g) em comparação com as demais frações além de concentrar a clorofila o que torna muito difícil o seu fracionamento e por isso não foi trabalhada (**Tabela 17**).

Tabela 17 – Triagem da ação moluscicida, larvicida e toxicidade frente a *Artemia salina* das frações provenientes da filtração-1 em carvão ativo

Fração	% Mortalidade		
	<i>B. glabrata</i> (50 µg .mL ⁻¹)	<i>A. aegypti</i> (50 µg.mL ⁻¹)	<i>A. salina</i> (1 µg.mL ⁻¹)
F1 (H ₂ O)	0	25	0
F2 (H ₂ O:EtOH (30%))	0	15	0
F3 (H ₂ O:EtOH (1:1))	100	90	74
F4 (EtOH+EtOH:AcOEt (1:1)+AcOEt)	100	100	100
F5 (CHCl ₃)	80	0	100

A fração 4 por ter sido bastante ativa (**Tabela 18**) e pela quantidade de material obtido (161,53g) foi selecionada para trabalho. Essa fração foi submetida a uma filtração em sílica e forneceu 5 grupos de frações que foram submetidos aos bioensaios: F4.1-Hexano (66,96g), F4.2-Hexano:CHCl₃ (20%) (44,76g), F4.3-[Hexano:CHCl₃ (1:1) + CHCl₃] (16,25g), F4.4-AcOEt (16,26g) e F4.5-MeOH (12,14g) (**Tabela 18**).

Tabela 18 – Triagem da ação moluscicida, larvicida e toxicidade frente à *A. salina* das frações provenientes da filtração-2 em gel de sílica

Fração	% Mortalidade		
	<i>B. glabrata</i> (50µg.mL ⁻¹)	<i>A. aegypti</i> (50µg.mL ⁻¹)	<i>A. salina</i> (1µg.mL ⁻¹)
F4.1	40	50	12
F4.2	100	95	100
F4.3	100	100	100
F4.4	100	100	86
F4.5	100	95	0

Apesar de ter sido considerada pouco ativa nos bioensaios larvicida (50% de mortalidade a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e moluscicida (40% de mortalidade a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a fração 4.1 apresentou-se inativa no ensaio de toxicidade frente a *A. salina* (Tabela 18) sendo assim mais seletiva o que constitui uma vantagem. Além disso, a fração 4.1 apresentava uma quantidade considerável de material (66,96g) e foi então selecionada para trabalho com o objetivo de se aprender a melhor forma de desenvolver o fracionamento dos constituintes químicos desta planta e com a finalidade de obtenção do princípio ativo. Após ser submetida a uma filtração a fração 4.1 forneceu ao final 7 frações codificadas como F4.1.1, F4.1.2, F4.1.3, F4.1.4, F4.1.5, F4.1.6 e F4.1.7. A fração 4.1.2 (5,14g), inativa, foi selecionada para estudo. A seleção dessa fração foi feita baseada no seu aspecto em cromatografia de camada delgada de sílica, que mostrava aparentemente uma facilidade de se obter um composto puro mais rapidamente que as outras frações oriundas da filtração 3. As demais frações trabalhadas foram selecionadas com base na atividade biológica visando isolar os seus constituintes ativos. As frações 4.2 e 4.4 foram ativas nos três bioensaios realizados (**Tabela 18 p. 93**).

III.2.2 – Compostos isolados a partir do extrato etanólico das folhas da *A. muricata*

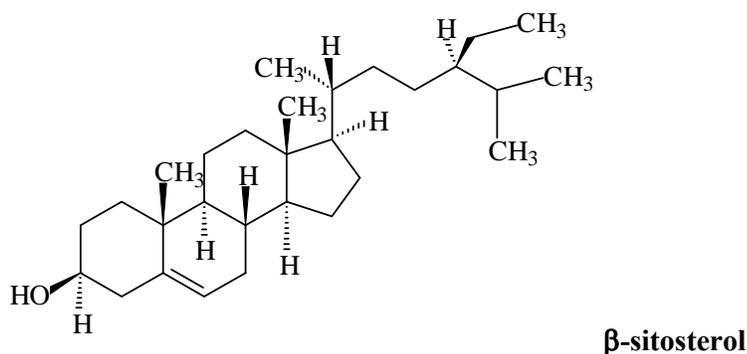
III.2.2.1 – O composto AM1

AM1 foi isolado como um sólido branco em forma de agulhas (PF $136-138^{\circ}\text{C}$). No seu espectro de hidrogênio (**Figura 23 p. 96**) em CDCl_3 a 300 MHz podemos destacar os sinais em δ 5,35 (d; 5,1 Hz) e δ 3,52 (m) atribuídos a hidrogênios olefínico e carbinólico respectivamente e sinais entre δ 0,67 e 1,00 correspondentes a hidrogênios de grupos metilas. O espectro de RMN de carbono (**Figura 24, p. 97**) evidenciou para AM1 um total de 29 sinais relativos a 29 átomos de carbono da molécula, sendo 3 quaternários, 9 metínicos, 11 metilênicos e 6 metílicos, destacando-se dentre esses os sinais em δ 140,71 e δ 121,71 caracterizando o grupo $-\text{C}=\text{CH}-$, o sinal do carbono carbinólico em δ 71,77 e os sinais em δ 19,81; 19,38; 18,98; 18,74; 11,95 e 11,83 correspondentes aos seis grupos metílicos existentes na molécula.

Análise comparativa através de cromatografia em camada delgada, utilizando Hexano: CHCl_3 (20%) e Hexano: CHCl_3 (50%) como eluentes, com uma amostra padrão do esteróide β -sitosterol (PF 139°C , DEVON & SCOTT, 1972) utilizando ponto misto não mostrou diferença de RF entre essa substância e o composto AM1 e a comparação dos dados

de RMN¹H e ¹³C do composto AM1 e do β-sitosterol (THOMPSON *et al.*, 1972; WRIGHT *et al.*, 1978) também indicou semelhança entre os mesmos.

Dessa forma, o composto AM1 foi identificado como sendo o esteróide β-sitosterol. AM1 foi submetido aos bioensaios larvicida, moluscicida e de toxicidade frente à *A. salina* e mostrou-se completamente inativo com 0% de mortalidade.



A literatura registra para o β-sitosterol uma importante atividade gastroprotetora em ratos com 85,7% de gastroproteção contra 46,2% do controle positivo (NAVARRETE *et al.*, 2002), atividade antiinflamatória em ratos, embora essa atividade seja relativamente fraca quando comparada com aquela da hidrocortisona usada como controle positivo (PARK *et al.*, 2001), uma forte ação antioxidante superior ao do controle positivo α-tocoferol (WENG & WANG, 2000) e hipocolestorêmica (WANG & NG, 1999).

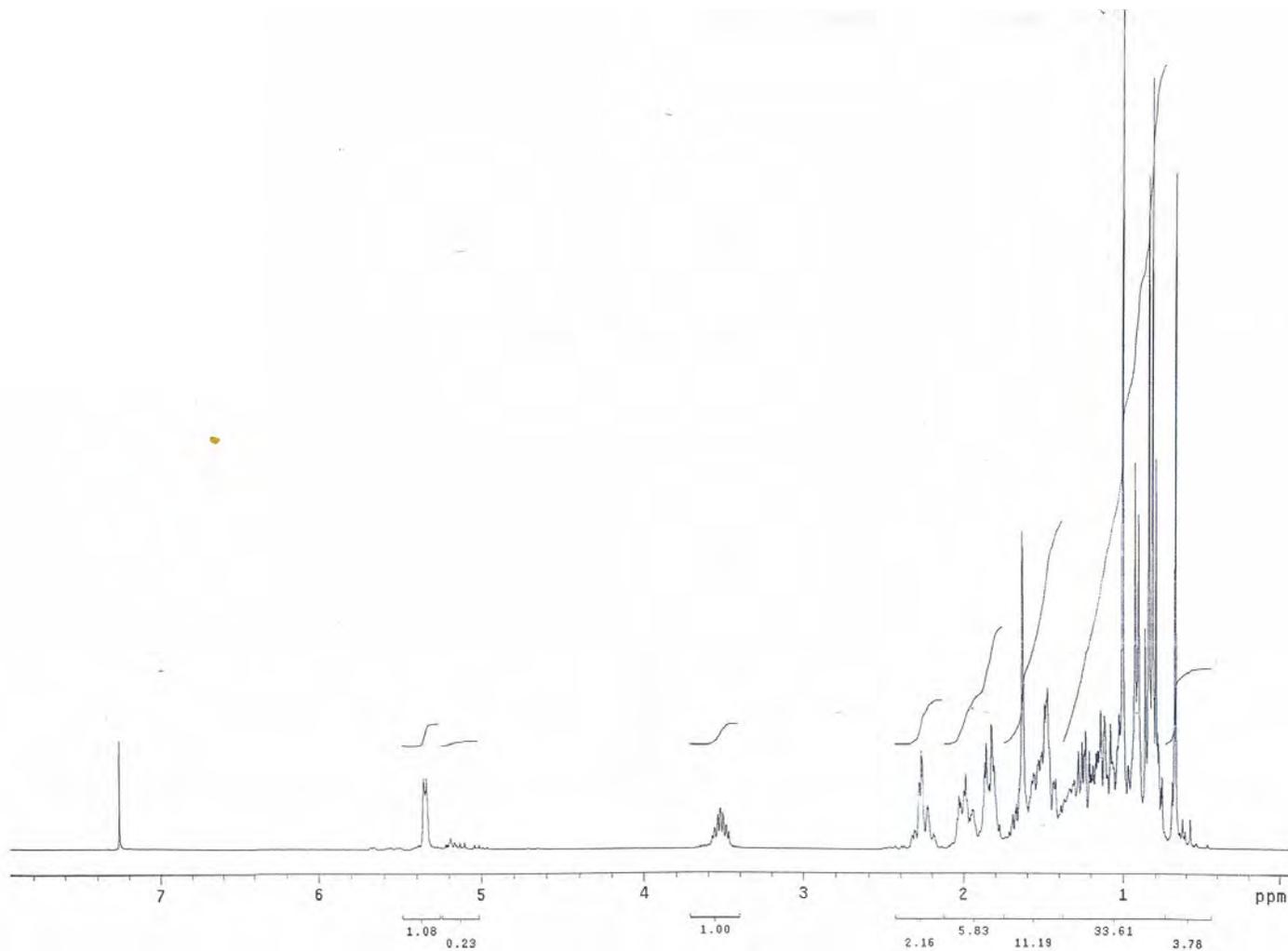


Figura 23 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 300 MHz da substância AM1, padrão interno TMS

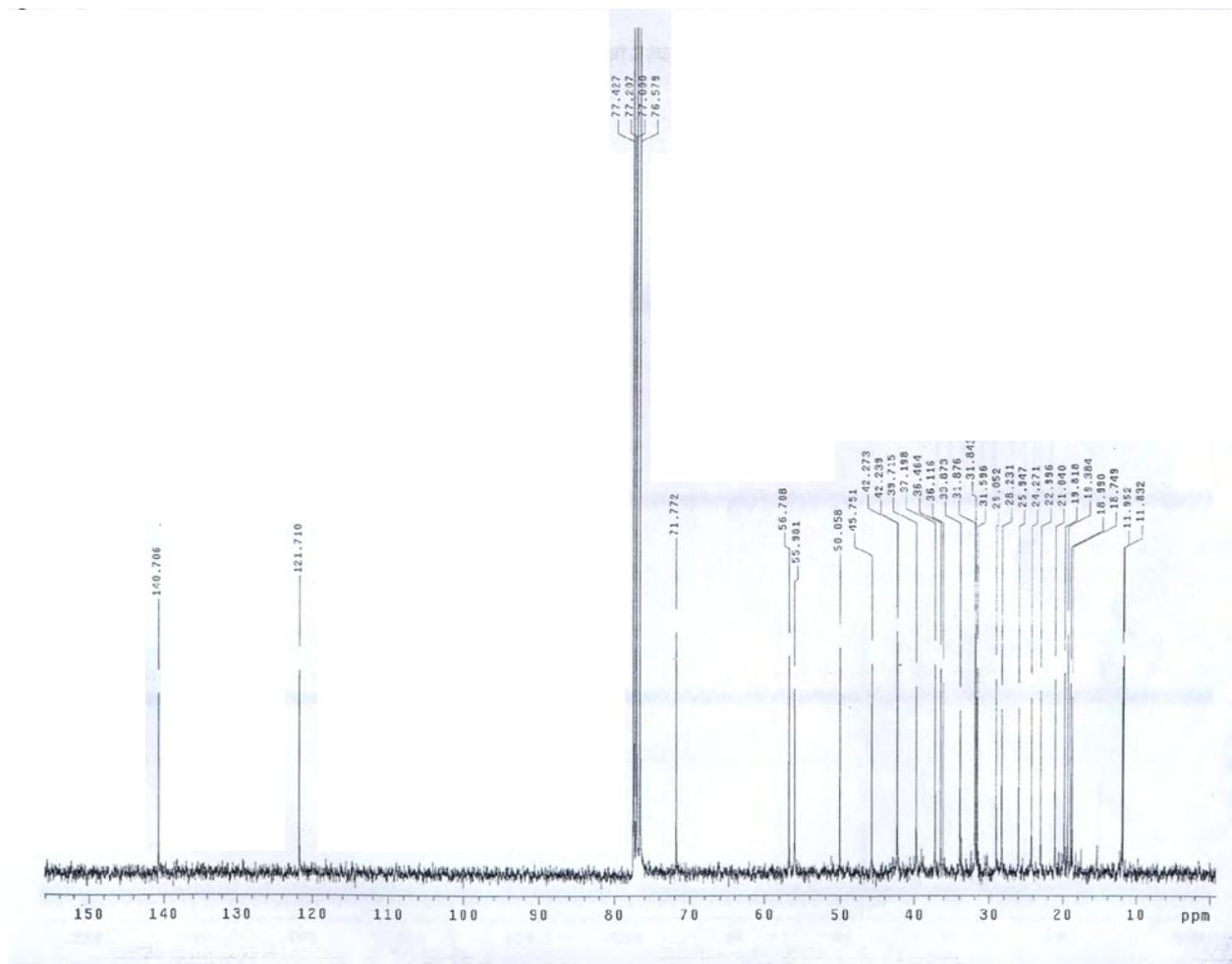


Figura 24 – Espectro de RMN de carbono em $CDCl_3$ a 75 MHz da substância AM1, padrão interno TMS

III.2.2.2 – Os compostos AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6

Os compostos AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6 foram todos isolados sob a forma de um material com aspecto de cera. O isolamento desses compostos foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa, uma vez que a cromatografia em coluna aberta não foi eficiente na separação desses compostos. A revelação positiva com o reagente de Kedde indicou a natureza dessas substâncias como acetogeninas, uma vez que esse reagente é específico para acetogeninas contendo o anel γ -lactona α,β -insaturado.

O grupo metil- γ -lactona é característico para a categoria das acetogeninas. Fang *et al.* (1993), Rupprecht *et al.*, 1990 e Downum *et al.*, 1993 afirmam que este grupo pode ser encontrado em cinco formas diferentes (**Estruturas A1, A2, A3, A4 e A5**) e pode ser evidenciado pelos espectros na região do infravermelho e de RMN. A existência de um grupo metil- γ -lactona α,β -insaturado é indicado na região do infravermelho por uma banda forte em $1740-1750\text{ cm}^{-1}$ e para um grupo metil- γ -lactona saturado o sinal é observado a 1770 cm^{-1} . A espectroscopia de ressonância magnética nuclear também é essencial para a caracterização deste grupo (**Tabela 19 p. 99**).

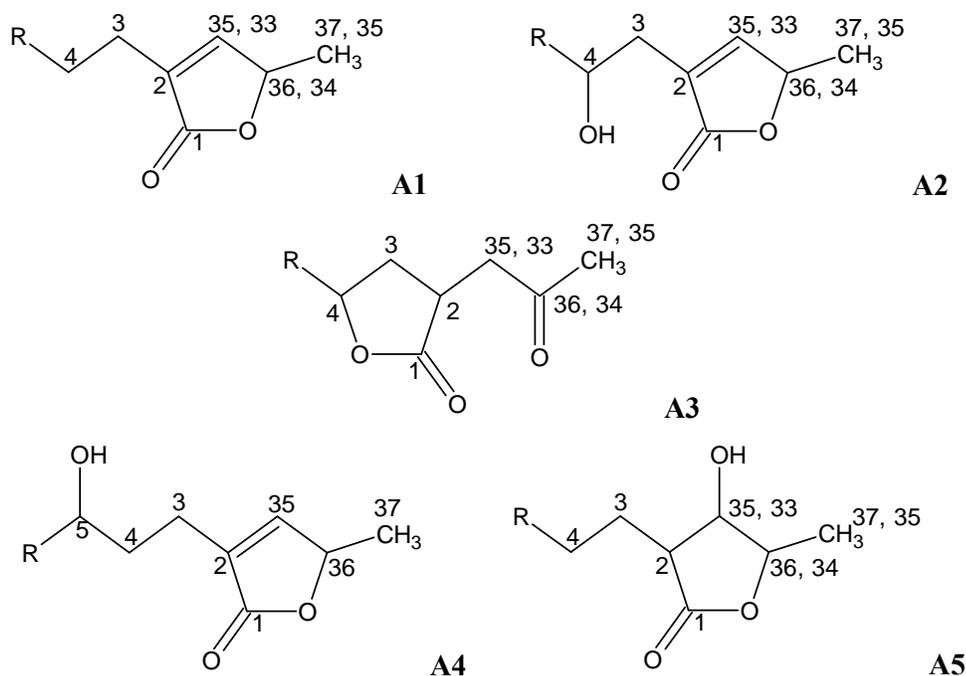


Tabela 19 – Dados de RMN de hidrogênio e carbono de anéis metil- γ -lactona de acetogeninas

Átomo	A1		A2		A3				A4		A5	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	Cis ^{13}C	Trans ^1H	Trans ^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	173,8	-	174,6	-	178,2	-	178,7	-	173,7	-	177,4
2	-	134,2	-	131,1	3,02	43,6	3,03	44,1	-	133,9	2,56	43,8
3	2,26	25,1	2,51	33,3	1,48	33-36	2,23	33-36	2,40	21,4	a	23,3
			2,38		2,61		1,99					
4 ou 5	1,52	27,4	3,83	69,8	4,39	79,3	4,54	78,9	3,59	70,7	a	27,5
35 ou 33	6,99	148,9	7,17	151,8	2,61	33-36	2,67	33-36	7,05	149,3	4,17	73,8
					3,11		3,05					
36 ou 34	5,00	76,4	5,04	77,9	-	205,52	-	205,42	5,01	77,4	4,59	82,5
37 ou 35	1,38	19,2	1,42	19,0	2,20	36,7	2,20	36,7	1,40	19,0	1,38	18,1

a - não identificado

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram obtidos espectros na região do infravermelho (**Figuras 25 p. 104, 26 e 27 p. 105 e 28 e 29 p. 106**), RMN de hidrogênio (**Figuras 30 p. 107, 31 p. 108, 32 p. 109, 33 p. 110 e 34 p. 111**), RMN de carbono (**Figuras 35 p. 112, 36 p. 113, 37 p. 114, 38 p. 115 e 39 p. 116**) e DEPT 135° (**Figuras 40 p. 117, 41 p. 118, 42 p. 119 e 43 p. 120**) Também foi realizada a análise por espectrometria de massas desses compostos.

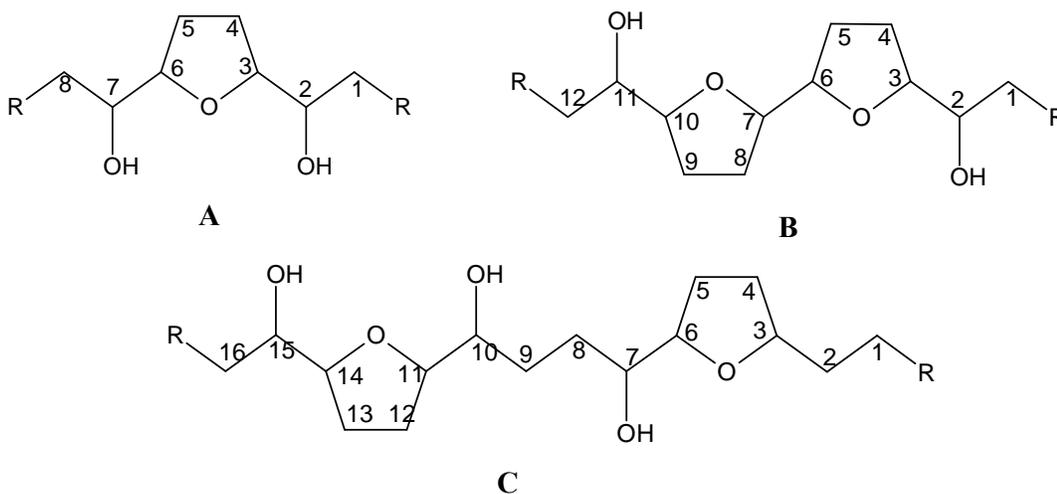
A observação dos espectros na região do infravermelho, obtido em solução de KBr, das substâncias revelou a presença de bandas características de grupo OH (AM2: 3396 cm^{-1} , AM3: 3452 cm^{-1} , AM4: 3365 cm^{-1} , AM5: 3454 cm^{-1} e AM6: 3451 cm^{-1}) e carbonila (AM2: 1745 cm^{-1} , AM3: 1737 cm^{-1} , AM4: 1746 cm^{-1} , AM5: 1737 cm^{-1} e AM6: 1735) essas observações junto com os dados extraídos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Tabela 20 p. 100**) indicou que em todos os casos havia a presença de um grupo metil- γ -lactona- α,β -insaturado contendo uma hidroxila no carbono-4 como em A2.

As acetogeninas podem conter um, dois ou nenhum anel tetra-hidrofurano (THF). A presença deste anel em uma dada substância é evidenciada pela existência de sinais entre δ 79 e 83 ppm no espectro de carbono-13. Com relação aos anéis THF podemos encontrar normalmente três tipos de acetogeninas. Aquelas do tipo A que possuem um anel THF flanqueado por duas hidroxilas e apresentam dois sinais de carbono entre δ 81 e 83 ppm; as do tipo B com dois anéis THF em seqüência flanqueados por duas hidroxilas e que apresentam quatro sinais de carbono entre δ 81 e 83 e aquelas acetogeninas do tipo C que possuem dois

anéis THF separados por quatro átomos de carbonos sendo um flanqueado por duas hidroxilas e o outro por apenas uma hidroxila que apresentam três sinais entre δ 81 e 83 ppm e um sinal em δ 79 ppm.

Tabela 20 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de anéis metil- γ -lactona das acetogeninas isoladas

Átomo	AM2		AM3		AM4		AM5		AM6	
	^1H	^{13}C								
1	-	175,2	-	174,9	-	175,06	-	175,10	-	174,7
2	-	131,56	-	131,52	-	131,54	-	131,53	-	130,99
3	2,52	33,51	2,52	33,67	2,54	33,78	2,53	33,67	2,37	33,11
			2,43		2,42		2,42		2,49	
4 ou 5	3,84	70,30	3,83	70,25	3,86	70,31	3,80	70,26	3,80	69,71
35 ou 33	7,21	152,32	7,20	152,32	7,09	152,31	7,21	152,33	7,17	151,95
36 ou 34	5,08	78,44	5,07	78,43	5,07	78,42	5,07	78,44	5,04	77,88
37 ou 35	1,45	19,51	1,44	19,49	1,45	19,51	1,44	19,50	1,43	19,02



A avaliação dos espectros de carbono-13 revelou que os compostos AM2, AM3, AM5 e AM6 são do tipo mono-THF, tipo A, e que o composto codificado como AM4 possui dois anéis THF não adjacentes, tipo C (Tabelas 21 e 22 p. 101).

Tabela 21 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos anéis THF das acetogeninas AM2, AM3, AM5 e AM6

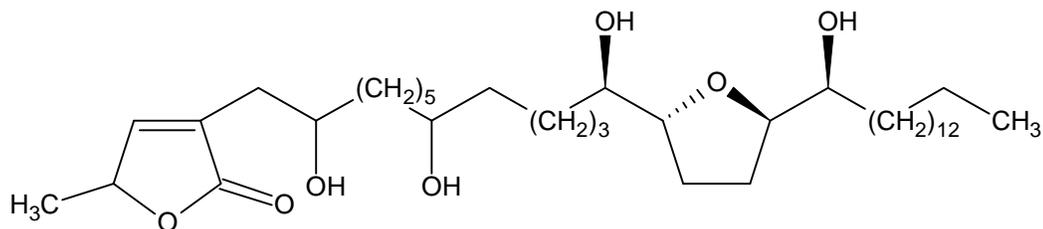
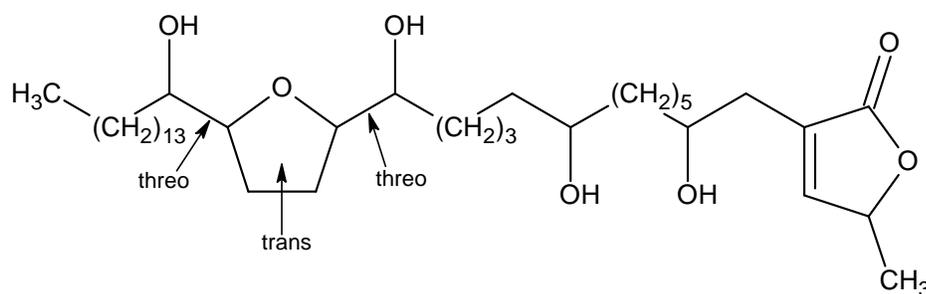
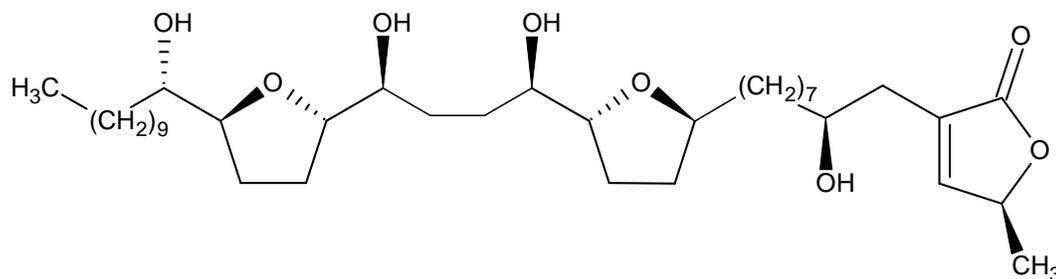
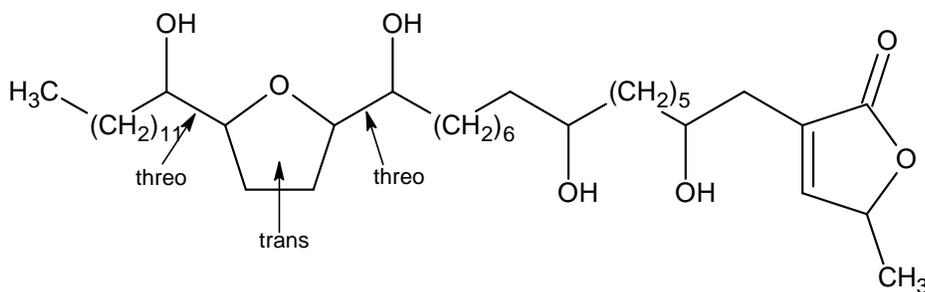
Átomo	AM2		AM3		AM5		AM6	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	3,43	74,70	3,42	74,53	3,45	74,43	3,38	74,09
3	3,85	83,63	3,80	83,12	3,81	83,02	3,76	82,70
6	3,85	82,60	3,80	83,04	3,81	83,12	3,76	82,60
7	3,43	72,2	3,42	74,43	3,45	74,53	3,78	71,50

Tabela 22 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos anéis THF da acetogenina AM4

Átomo	AM4	
	^1H	^{13}C
3	3,90	79,73
6	3,81	82,17
7	3,44	74,98
12	3,44	74,79
13	3,81	82,22
16	3,81	82,22
17	3,41	74,67

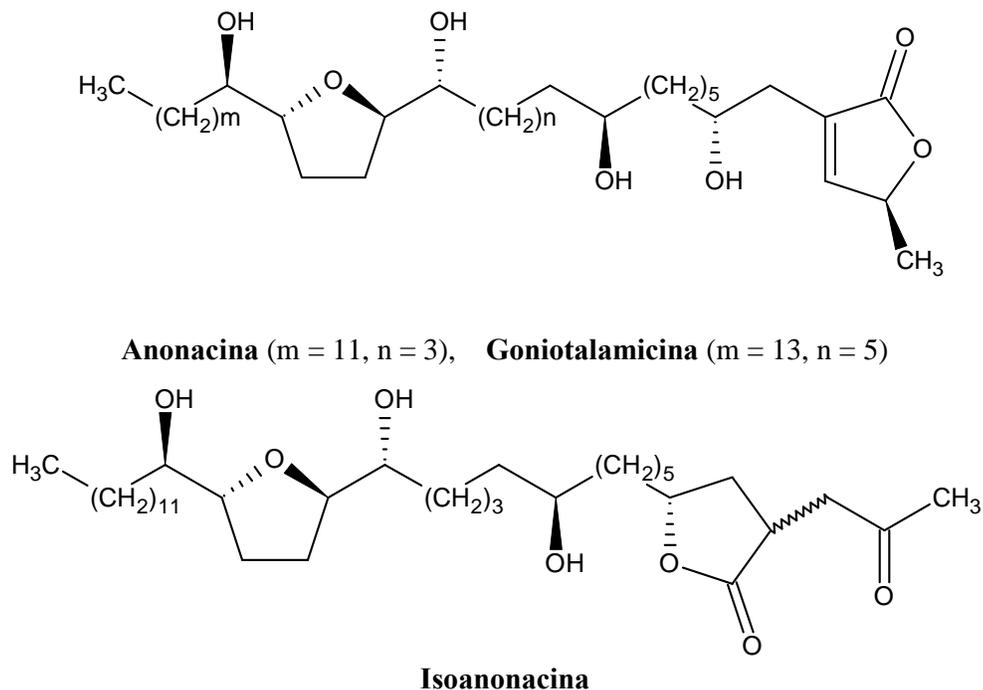
A análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas foi essencial pra a caracterização dessas substâncias. A substância AM6 foi caracterizada uma mistura de três componentes. O espectro de massas do composto AM2 revelou os picos m/z 597 (26,07%), 578 (31,44%), 559 (6,33%), 541 (63,34%), 523 (21,17%), 427 (3,00%), 355 (8,06%), 314 (5,21%), 309 (6,47%), 280 (5,53%), 238 (0,47%) e 161 (0,47%). O composto AM3 revelou os picos m/z 594 (100%), 577 (26,4%), 561 (51,28%), 543 (37,12%) 525 (27,04%), 373 (4,96%), 328 (1,76%), 221 (1,92%) e 197 (4,48%). O composto AM4 revelou os picos m/z 594 (100%), 577 (26,4%), 561 (51,28%), 543 (37,12%) 525 (27,04%), 373 (4,96%), 328 (1,76%), 221 (1,92%) e 197 (4,48%). O composto AM5 revelou os picos 597 (100%), 579 (64,67%), 561 (69,86%), 543 (53,06%), 525 (28,66%), 513 (9,95%), 302 (3,77%), 263 (3,13%) e 241 (3,61%). AM2, AM3 e AM4 foram submetidas a reações de acetilação com anidrido acético e o espectro na região do infravermelho dos compostos acetilados mostrou estarem peracetilados (**Figuras 44 e 45 p. 121 e 46 p. 122**). A análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 mostrou sinais que indicam a existência de quatro grupos OH nesses compostos. A observação dos dados de espectrometria de massa e espectroscopia de RMN de hidrogênio (**Figuras 47 p.**

123, 48 p. 124 e 49 p. 125) e de carbono (Figuras 50 p. 126, 51 p. 127 e 52 p. 128) e a comparação desses dados com aqueles da permitiu postular para as acetogeninas AM2, AM3, AM4 e AM5 respectivamente, as estruturas da anossenegalina, xilomaticina, bulatanocina e anomontacina.

**Anossenegalina****Xilomaticina****Bulatanocina****Anomontacina**

Análise de AMF6 através de CLAE-EM eletrospray revelou tratar-se de uma mistura de três compostos: anonacina (90%), isoanonacina (6%) e gionitalamicina (4%). O espectro de massas mostrou a presença dos picos m/z 577, (100%), 551 (73,52%), 515 (6,47%), 483

(11,18%), 383 (5,88), 239 (30,59%), 227 (44,11%) e 197 (32,94%) para a anonacina, m/z 577 (100%), 551 (43,11%), 483 (5,39%), 383 (5,99%), 239 (11,97), 255 (85,63%) e 225 (69,46%) para a goniotalamicina e m/z 577 (100%), 551 (53,85%), 343 (1,8%), 265 (35,50%), 225 (27,22%) e 197 (9,47%) para a isoanonacina.



Todas essas acetogeninas são conhecidas e encontram-se descritas na literatura. Anossenegalina foi obtida das sementes de *A. senegalensis* e *A. cherimolia* (SAHPAZ *et al.*, 1996), entretanto, não há descrição dessa acetogenina na espécie *A. muricata*. Xilomaticina foi encontrada primeiramente nas cascas da espécie *Xylopia aromática* (COLMANSAIZARBITORIA *et al.*, 1994), mas também já foi isolada das folhas e galhos de *Asimina longifolia* (YE *et al.*, 1995), da casca de *Goniothalamus giganteus* (ALALI *et al.*, 1997), das sementes de *Asimina triloba* (WOO *et al.*, 1999) e das sementes de *A. muricata* (LIAW *et al.*, 2002). Bulatanocina foi isolada pela primeira vez da casca de *A. bullata* (GU *et al.*, 1993), mas também já foi encontrada nas sementes de *A. spinescens* (QUEIROZ *et al.*, 1997) e nas folhas de *A. glabra* (LIU *et al.*, 1998). Anomontacina é uma acetogenina que foi descrita pela primeira vez por Jossang *et al.*, 1991, que isolou este composto das sementes de *A. montana*. A literatura ainda registra o isolamento dessa acetogenina na casca de *Goniothalamus giganteus* (FANG *et al.*, 1992), na casca de *Xylopia aromática* (COLMANSAIZARBITORIA *et al.*, 1994), nas sementes de *Asimina triloba* (WOO *et al.*,

1999), nas sementes de *A. cherimolia* (KIM *et al.*, 2001), nos frutos de *A. glabra* (HSIEH *et al.*, 2004) e nas sementes de *Annona muricata* (LI *et al.*, 2001). Anonacina é a principal acetogenina de *A. muricata* (CHAMPY *et al.*, 2002) e também já foi isolada de várias outras espécies de Annonaceae. Isoanonacina já foi obtida de *Annona densicoma* (ZAFRA-POLO *et al.*, 1996), das folhas de *Annona muricata* (WU *et al.*, 1995a, 1995b, 1995c, 1995d), das folhas e galhos de *Asimina longifolia* (YE *et al.*, 1995), da casca de *Goniothalamus giganteus* (ALALI *et al.*, 1997), das raízes de *Goniothalamus gardneri* (CHEN *et al.*, 1997), das raízes de *Goniothalamus donnaiensis* (JIANG & YU, 1997) e das sementes de *A. muricata* (LI *et al.*, 2001) e Goniotalamicina foi isolada da casca do caule de *A. densicoma* (YU *et al.*, 1992), de *Goniothalamus giganteus* (ALKOFAHI *et al.*, 1988), de *Asimina parviflora* (RATNAYAKE *et al.*, 1994), das folhas de *Annona muricata* (WU *et al.*, 1995a), das folhas e galhos de *Asimina longifolia* (YE *et al.*, 1995), das raízes de *Goniothalamus donnaiensis* (JIANG & YU, 1997) das sementes de *A. glauca* (WAECHTER *et al.*, 1997), das raízes de *Goniothalamus gardneri* (CHEN *et al.*, 1997) e da casca de *Goniothalamus giganteus* (ALALI *et al.*, 1998).

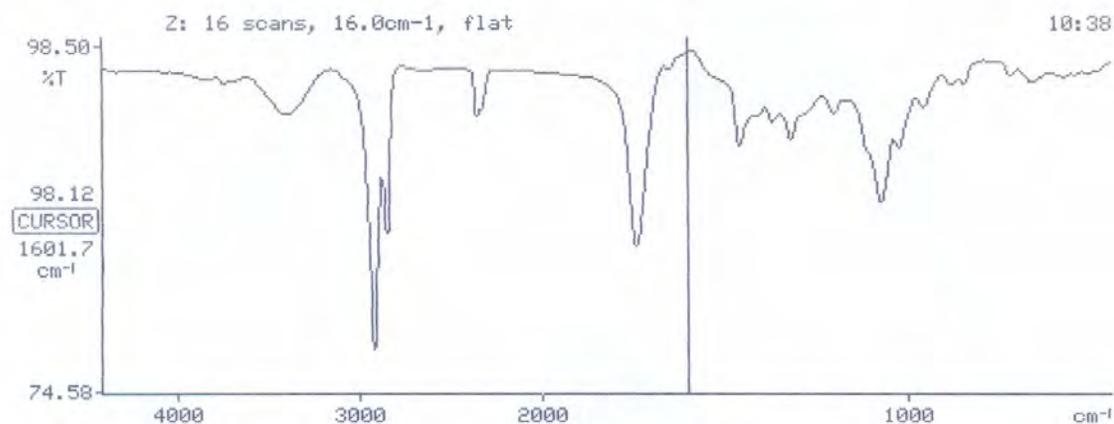


Figura 25 – Espectro na região do infravermelho da substância AM2 em KBr

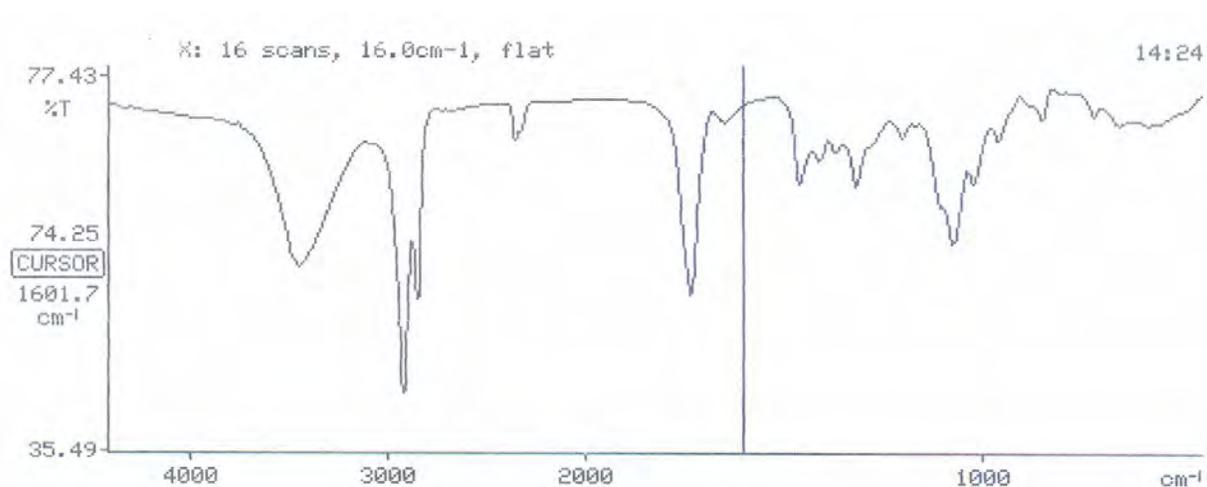


Figura 26 – Espectro na região do infravermelho da substância AM3 em KBr



Figura 27 – Espectro na região do infravermelho da substância AM4 em KBr

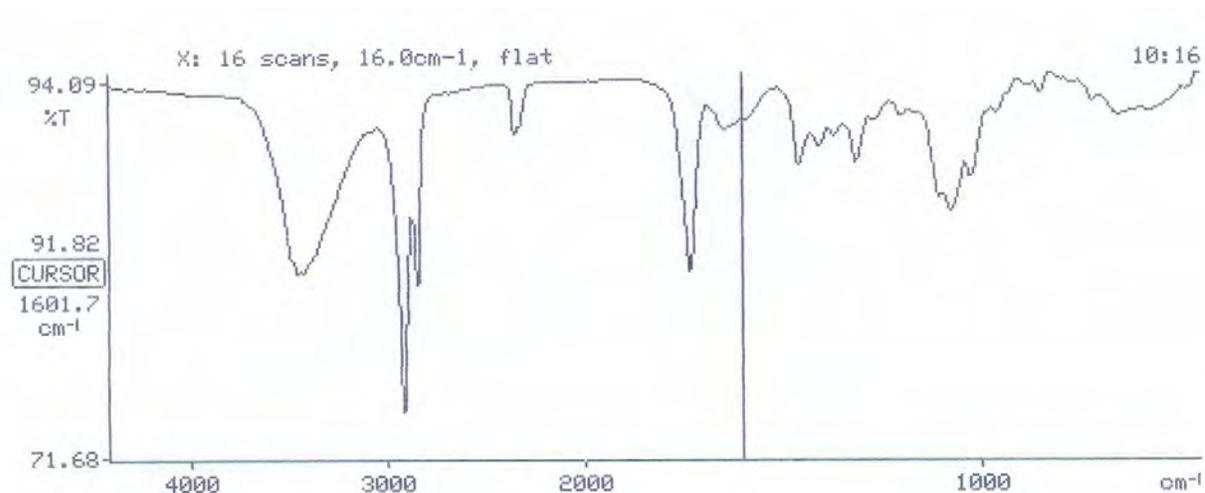


Figura 28 – Espectro na região do infravermelho da substância AM5 em KBr

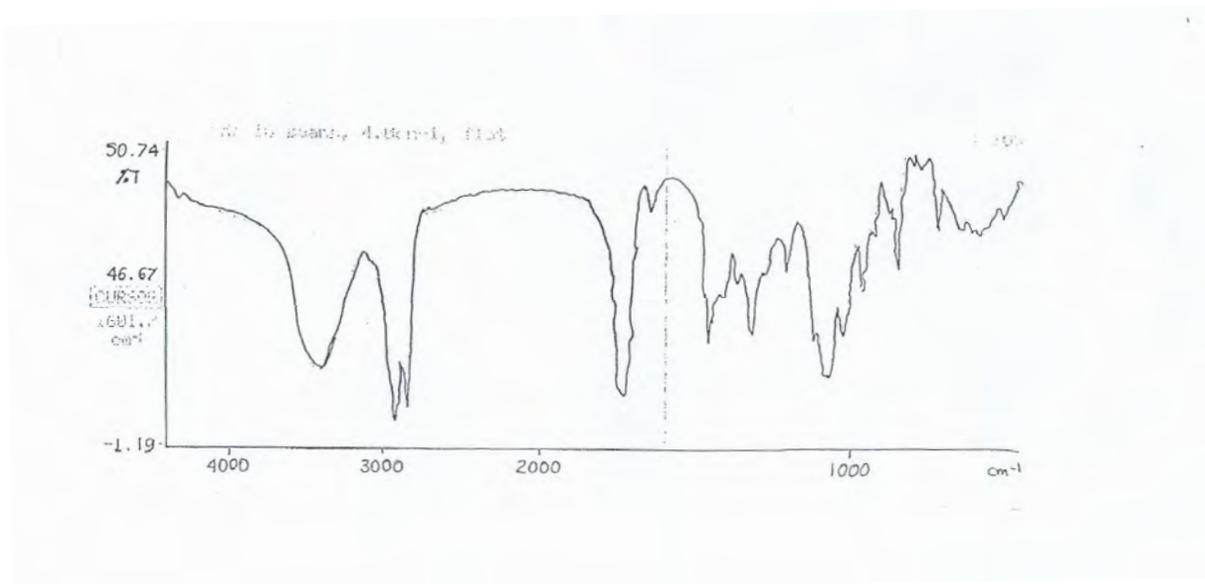


Figura 29 – Espectro na região do infravermelho da substância AM6 em KBr

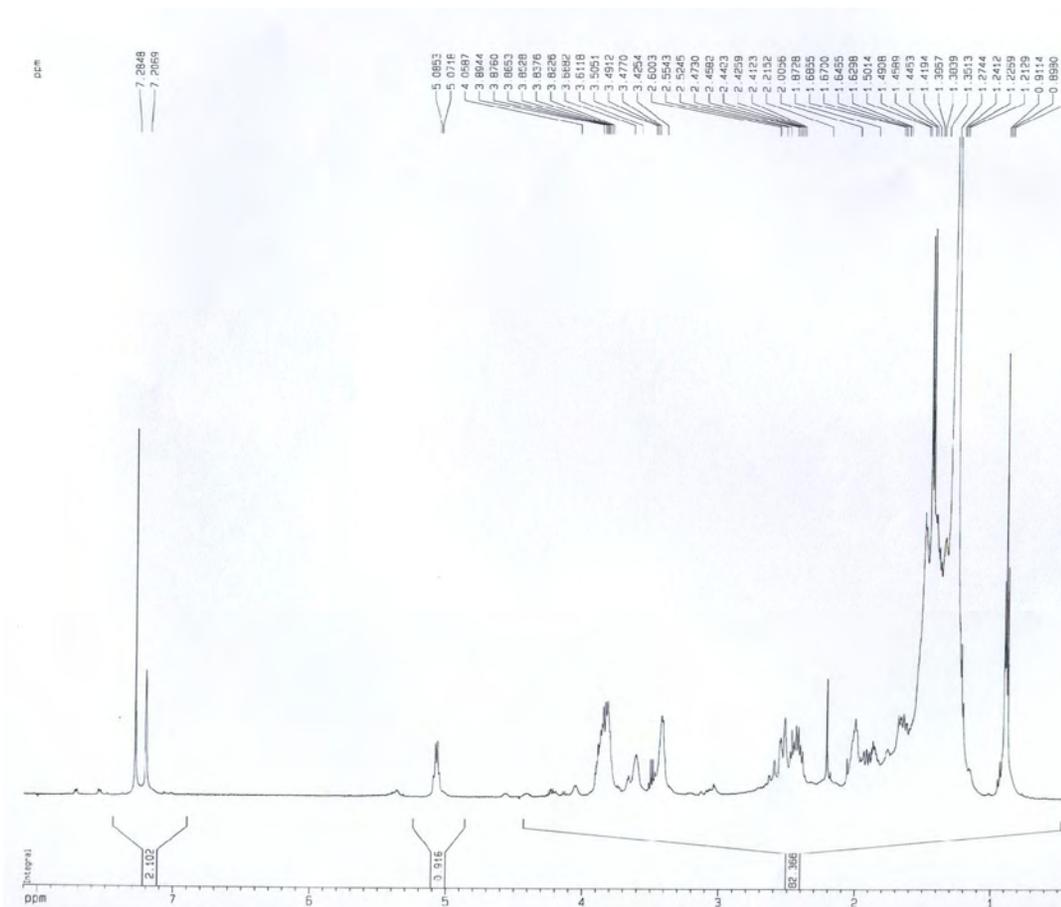


Figura 30 – Espectro de RMN de hidrogênio em $CDCl_3$ a 500 MHz da substância AM2, padrão interno TMS

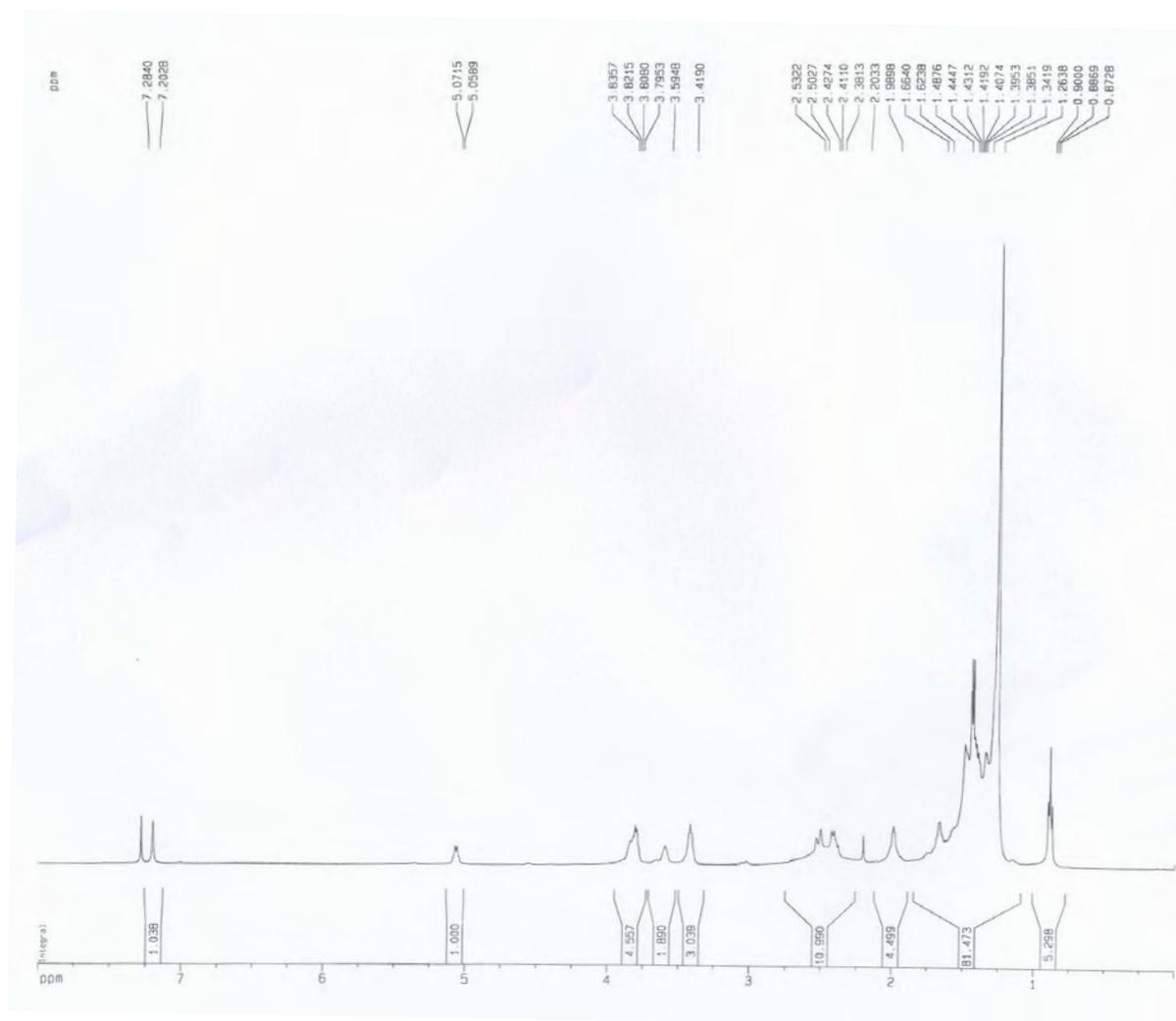


Figura 31 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância AM3, padrão interno TMS

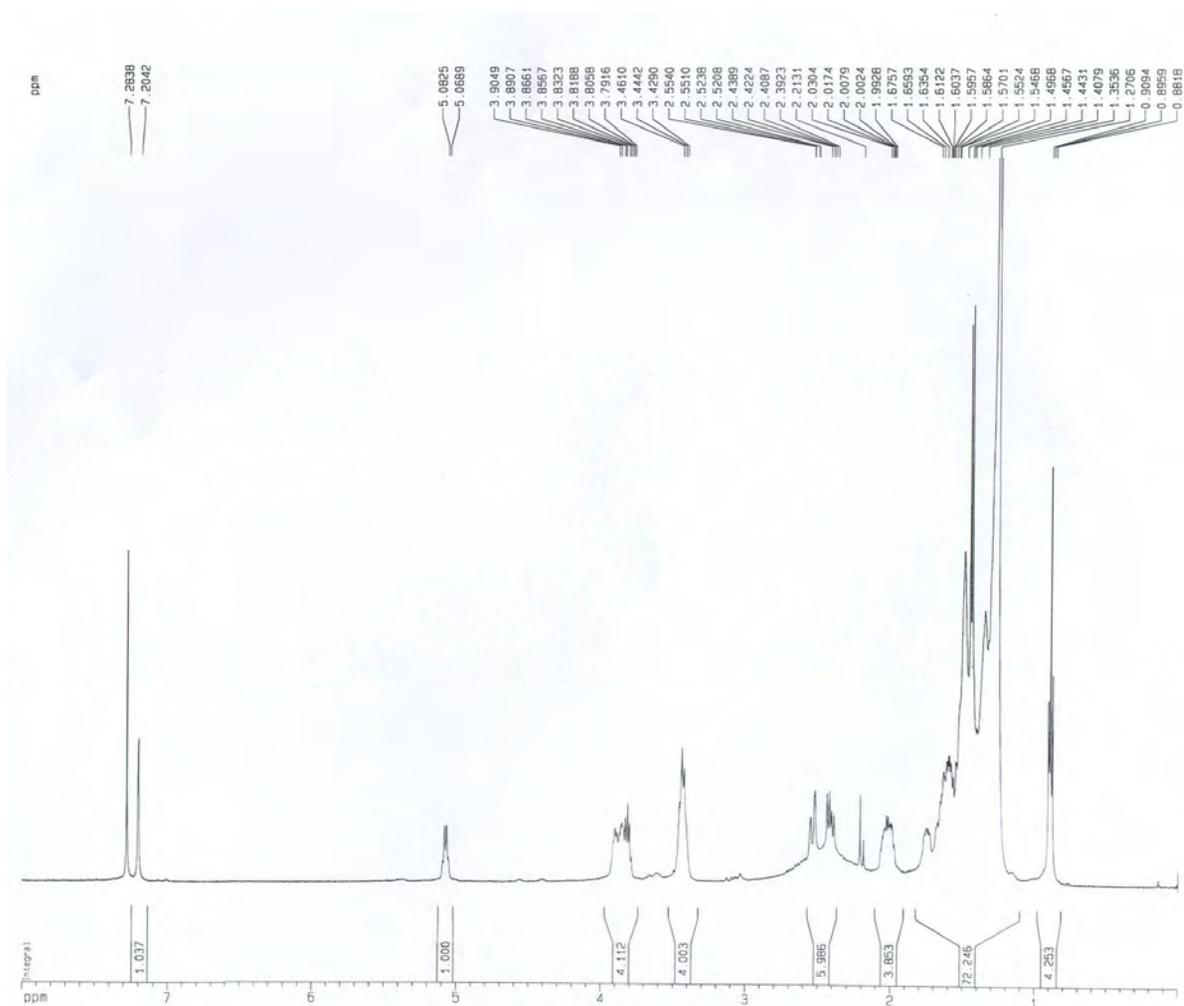


Figura 32 – Espectro de RMN de hidrogênio em $CDCl_3$ a 500 MHz da substância AM4, padrão interno TMS

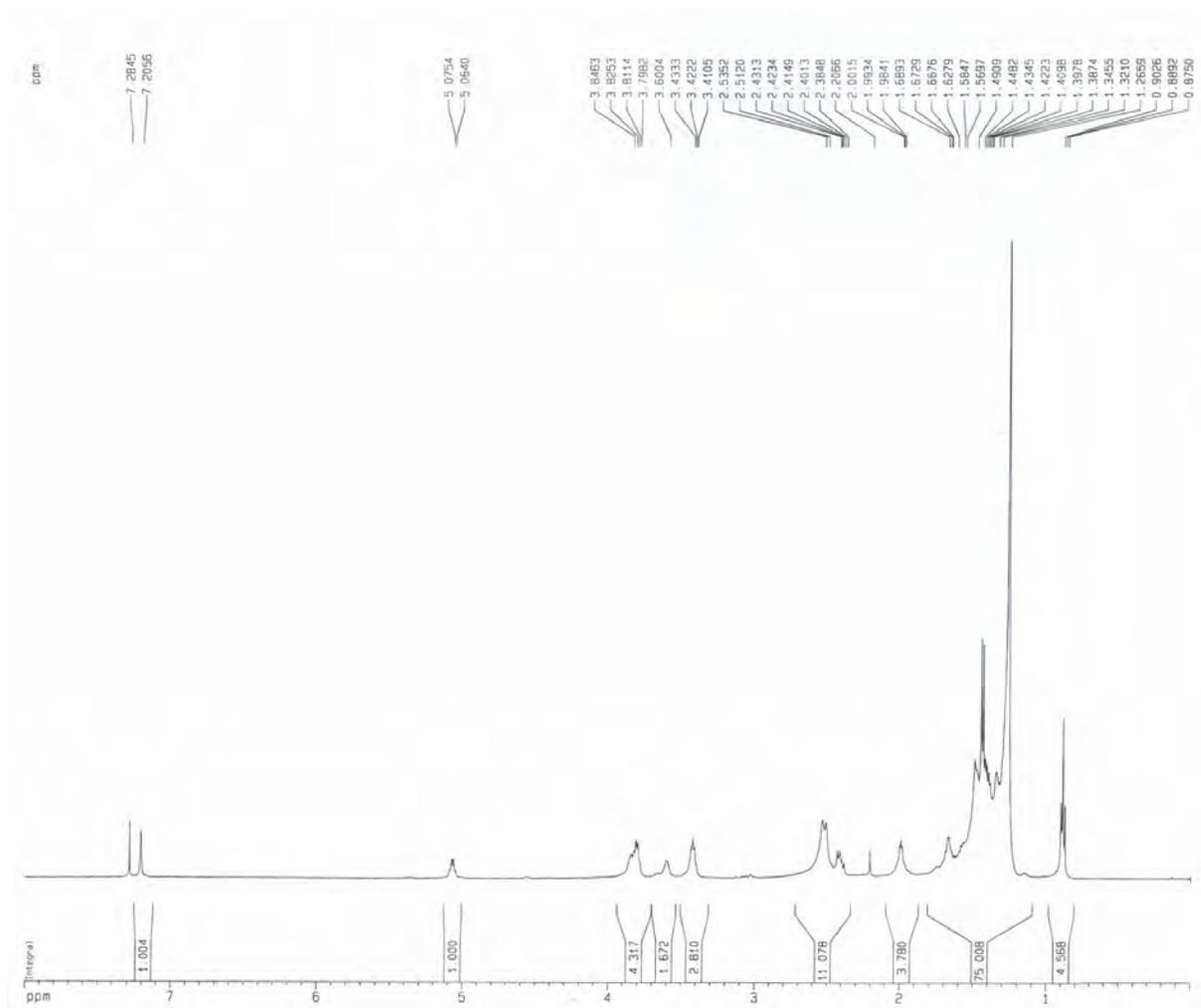


Figura 33 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância AM5, padrão interno TMS

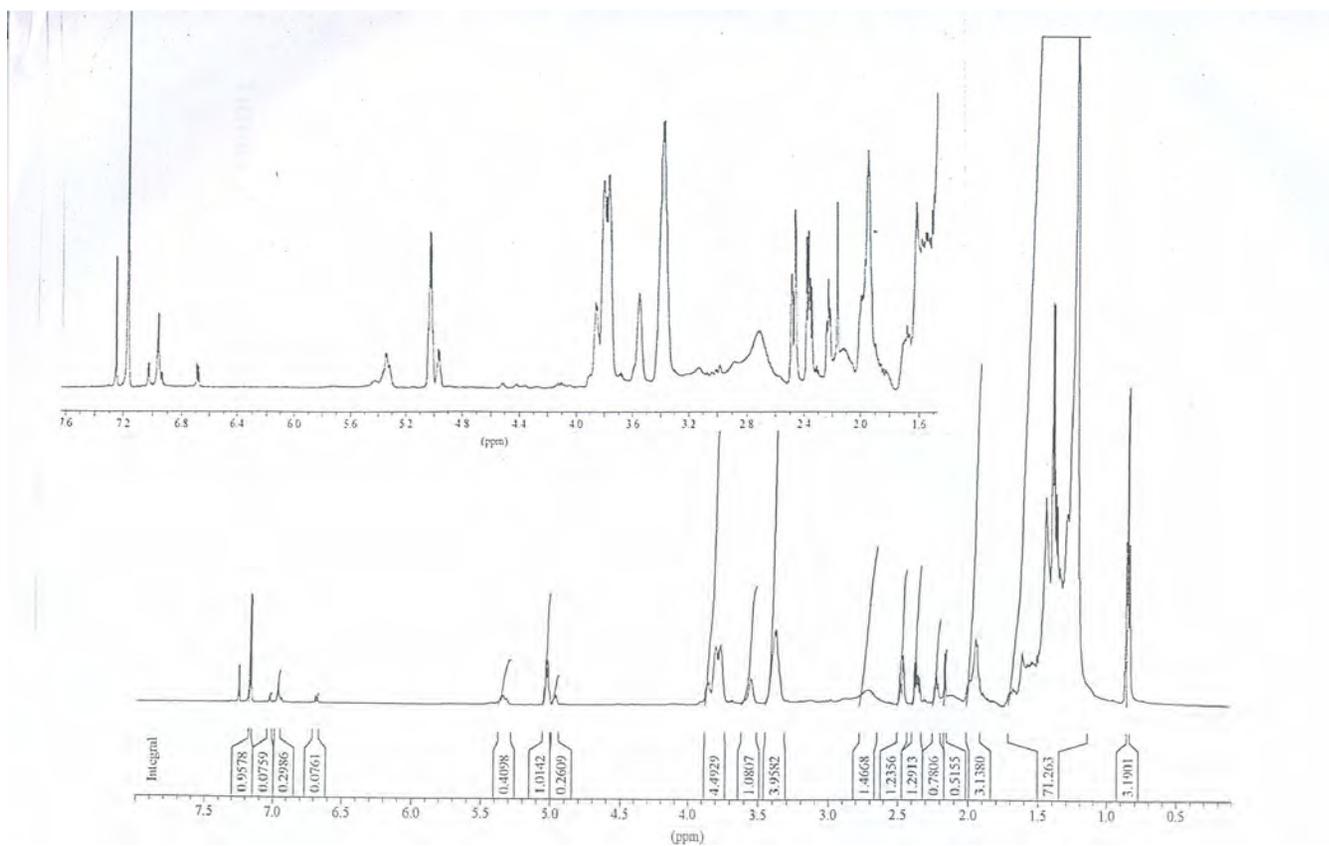


Figura 34 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância AM6, padrão interno TMS

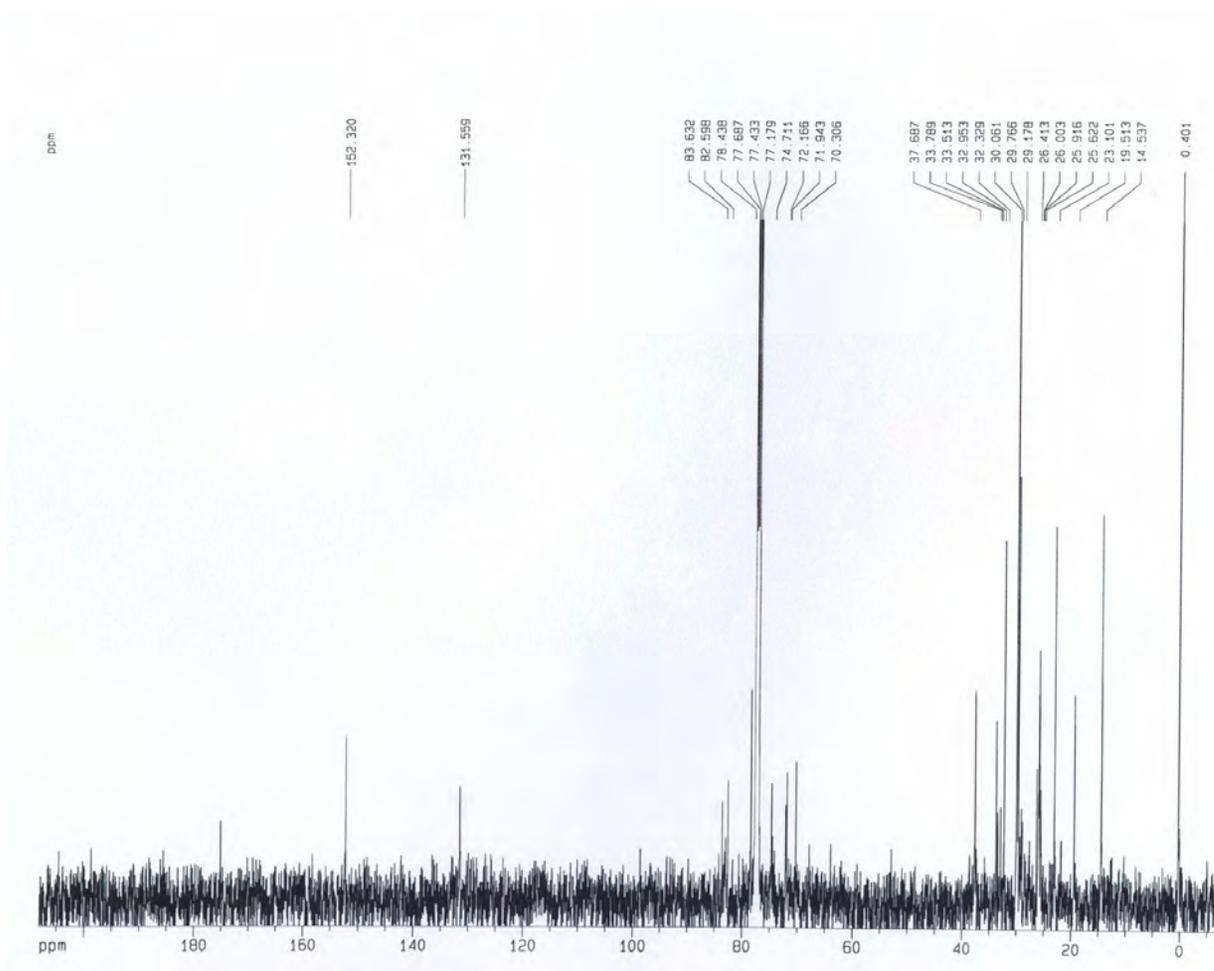


Figura 35 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM2, padrão interno TMS

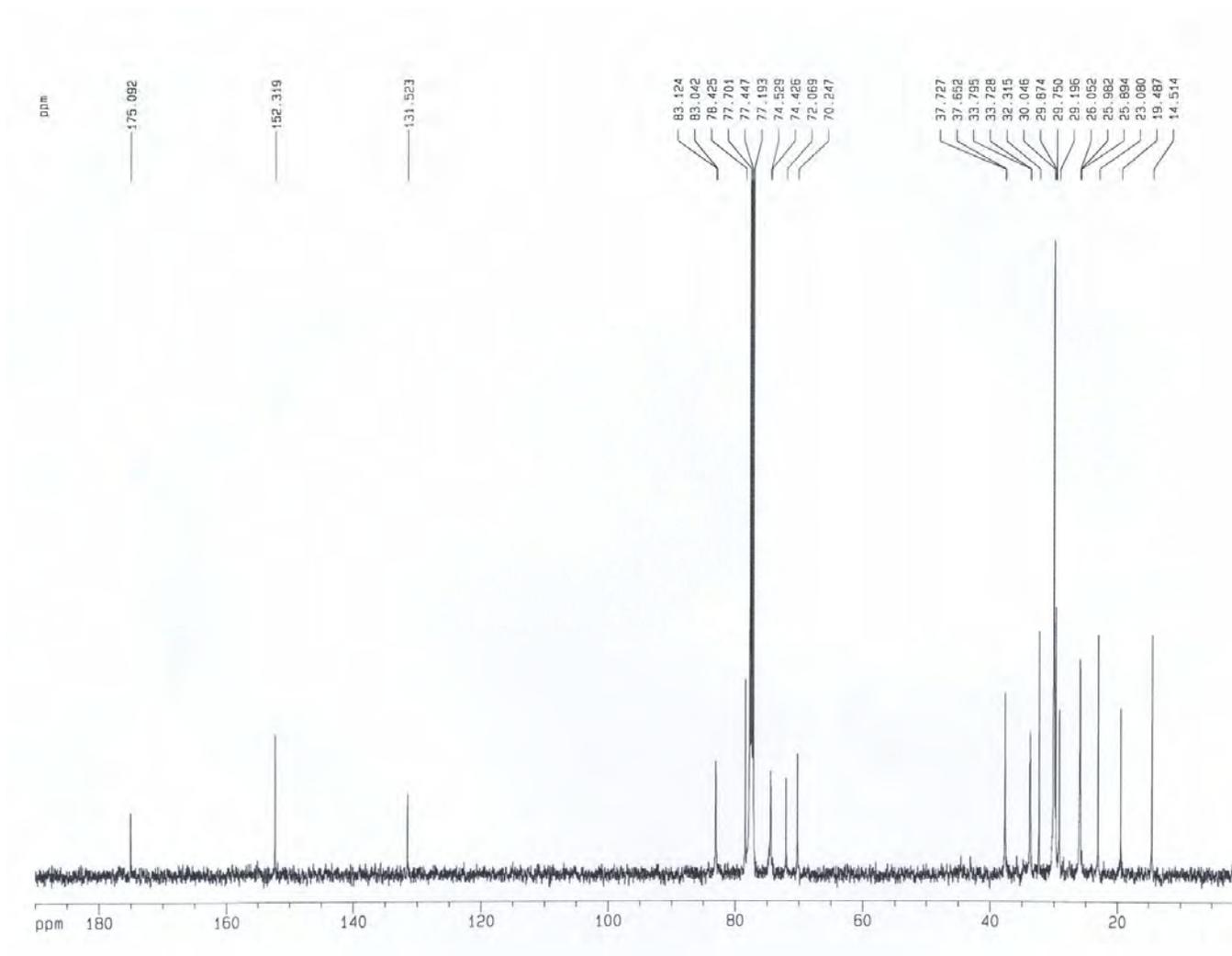


Figura 36 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM3, padrão interno TMS

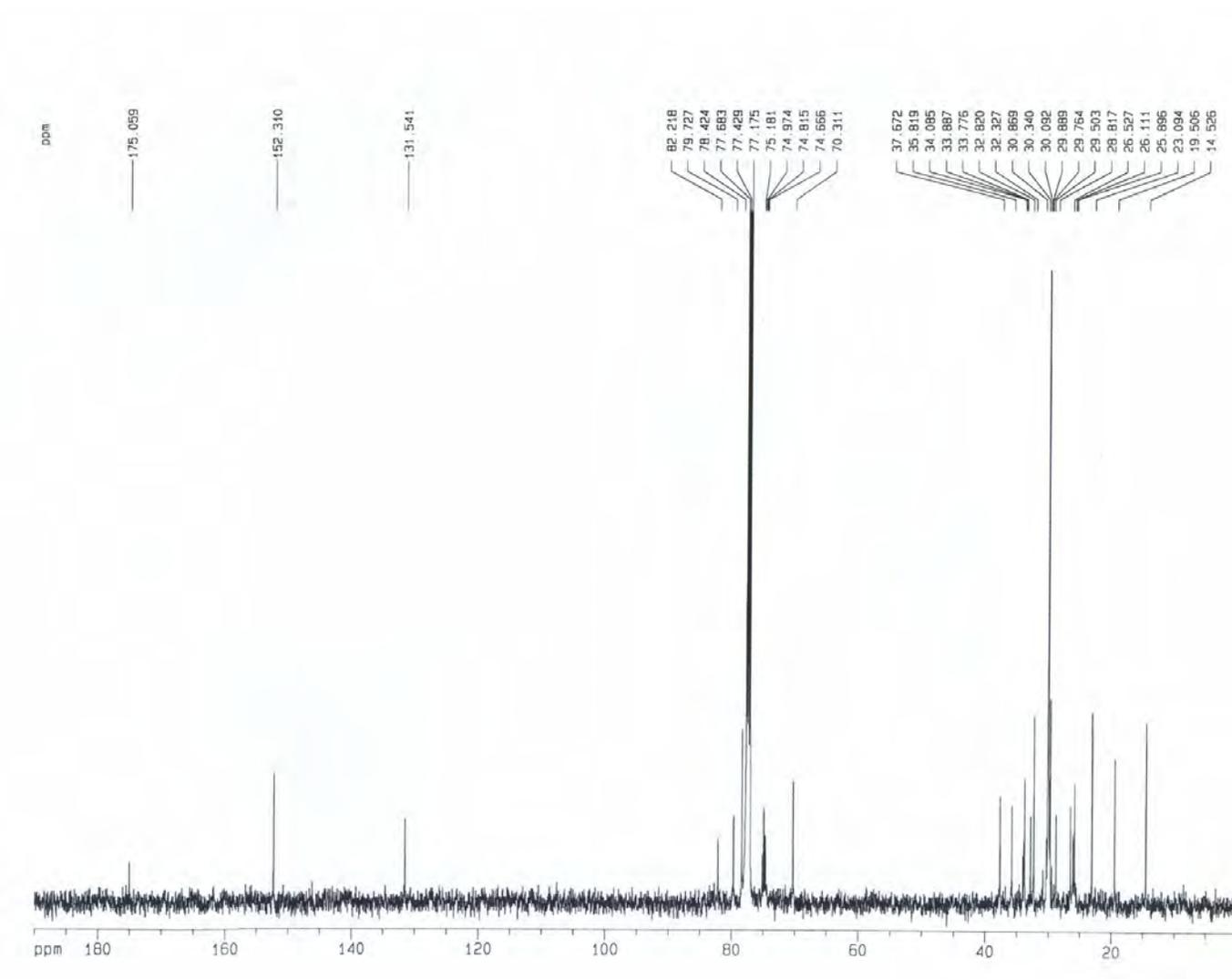


Figura 37 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância AM4, padrão interno TMS

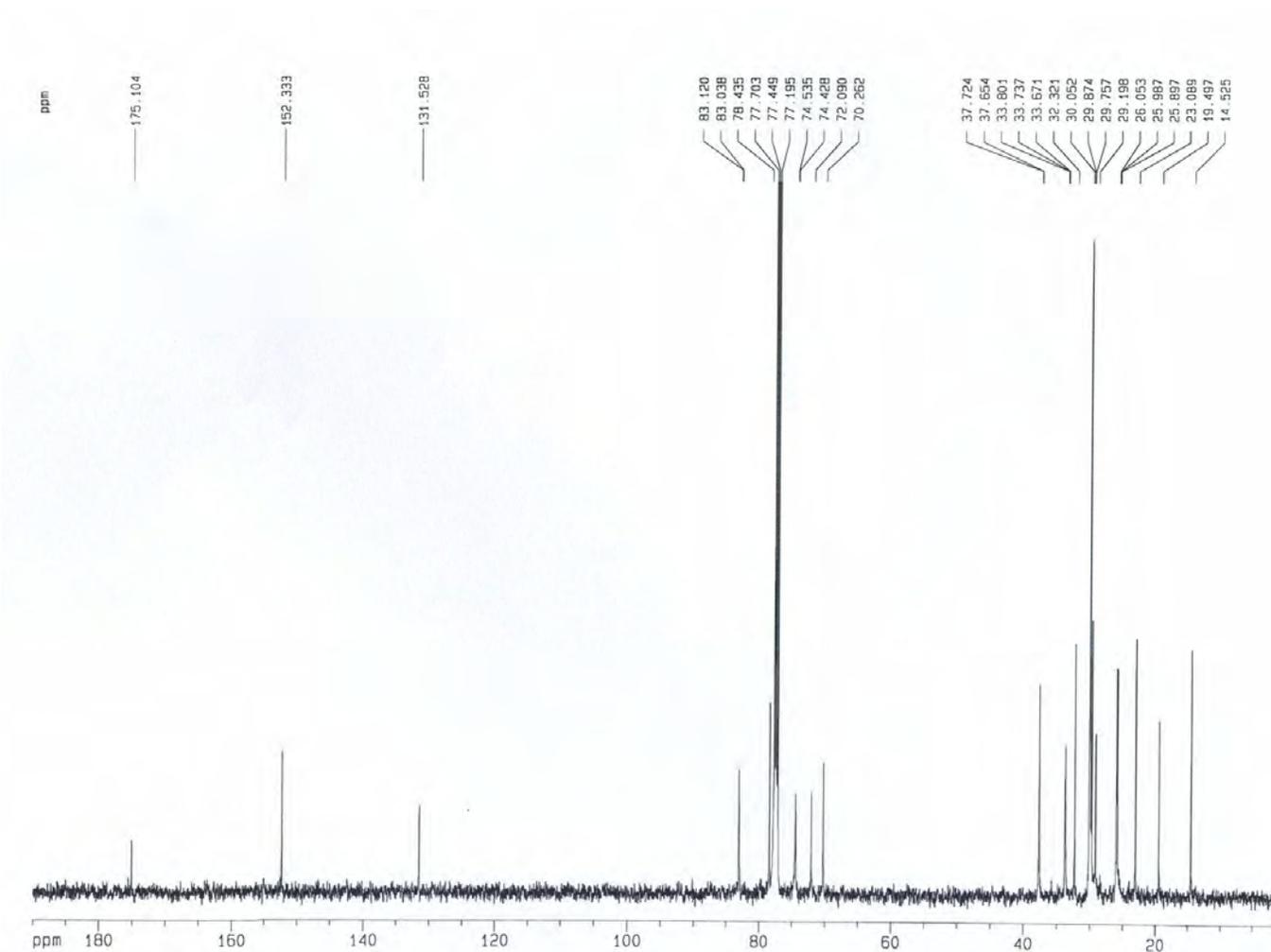


Figura 38 – Espectro de RMN de carbono em CDCl₃ a 125 MHz da substância AM5, padrão interno TMS

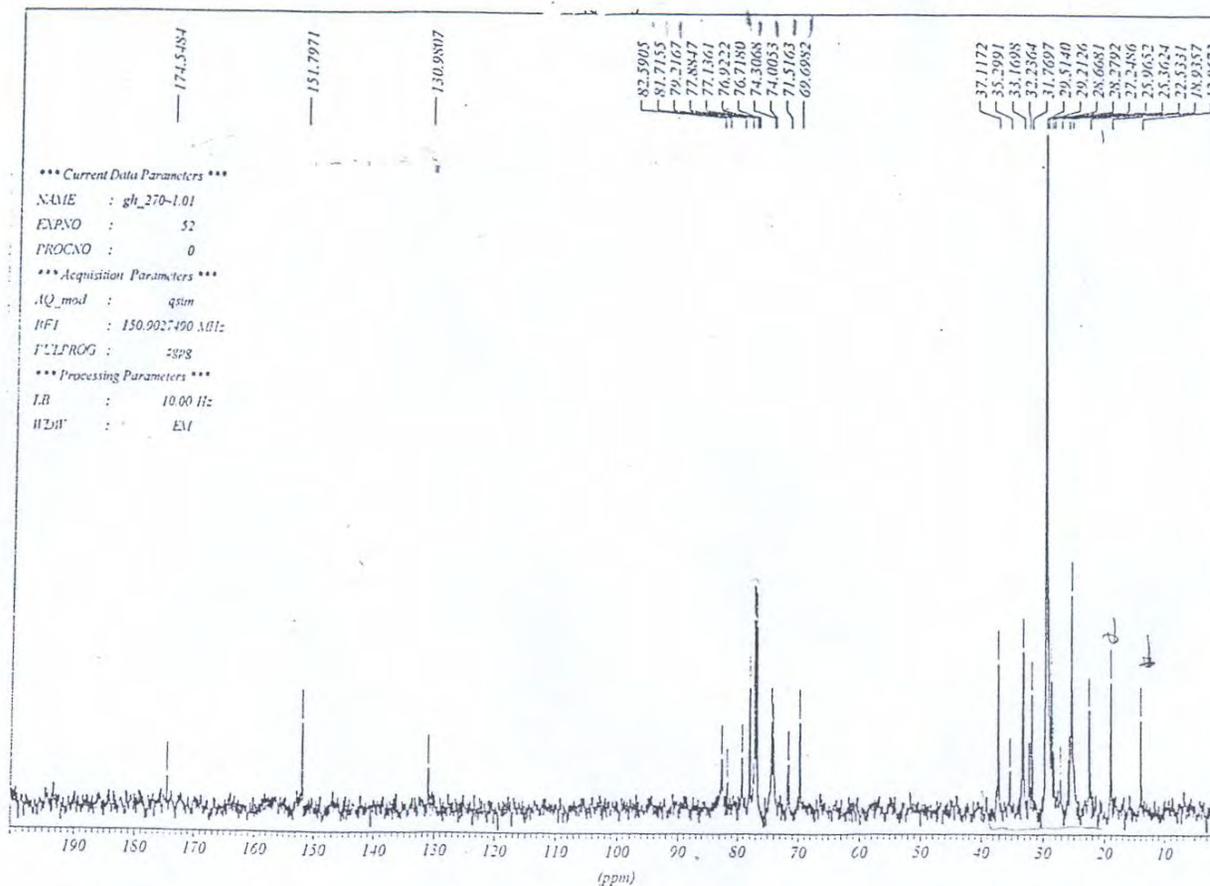


Figura 39 – Espectro de RMN de carbono em CDCl₃ a 125 MHz da substância AM6, padrão interno TMS

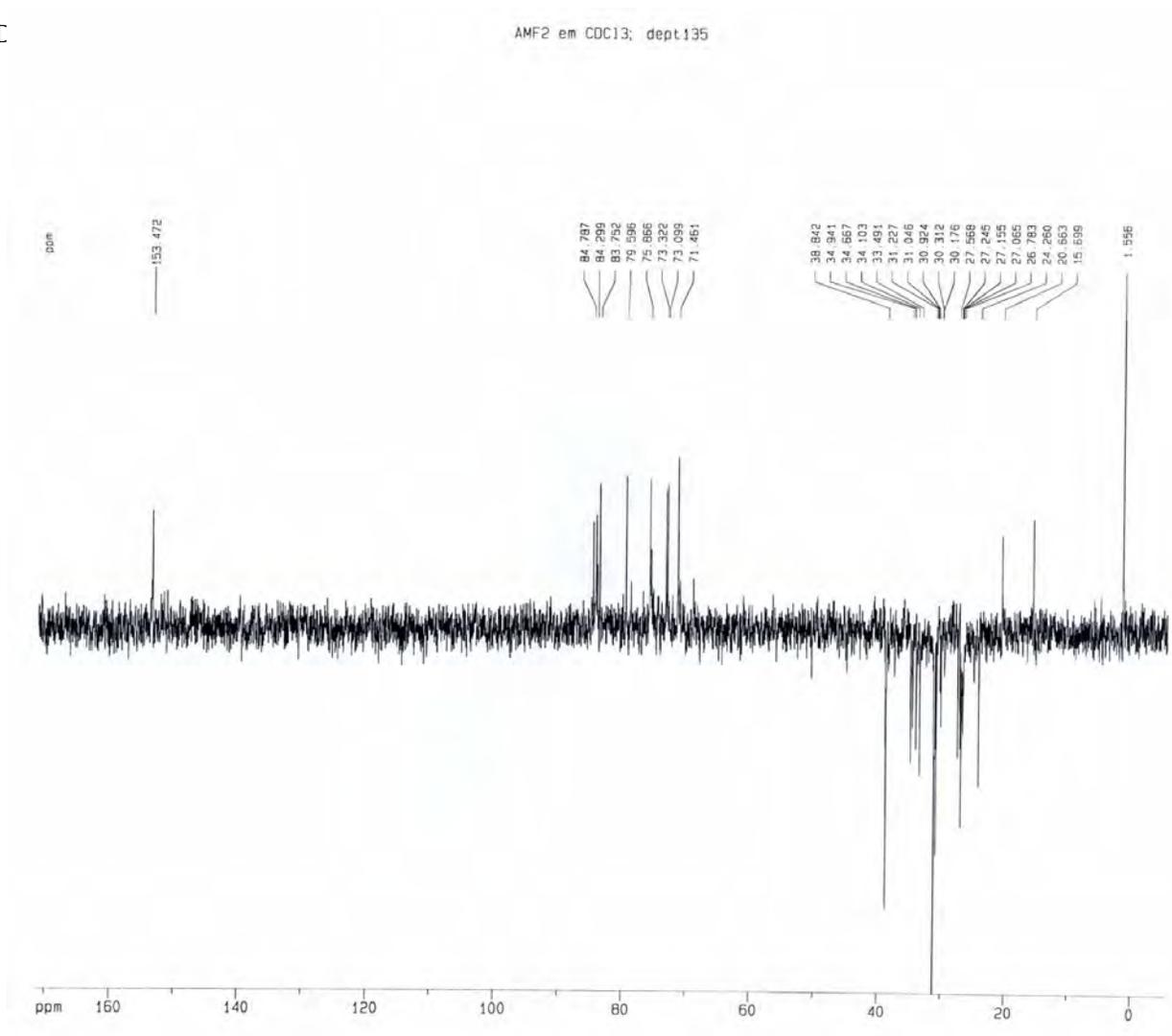


Figura 40 – Espectro de DEPT 135° em CDCl₃ da substância AM2, padrão interno TMS

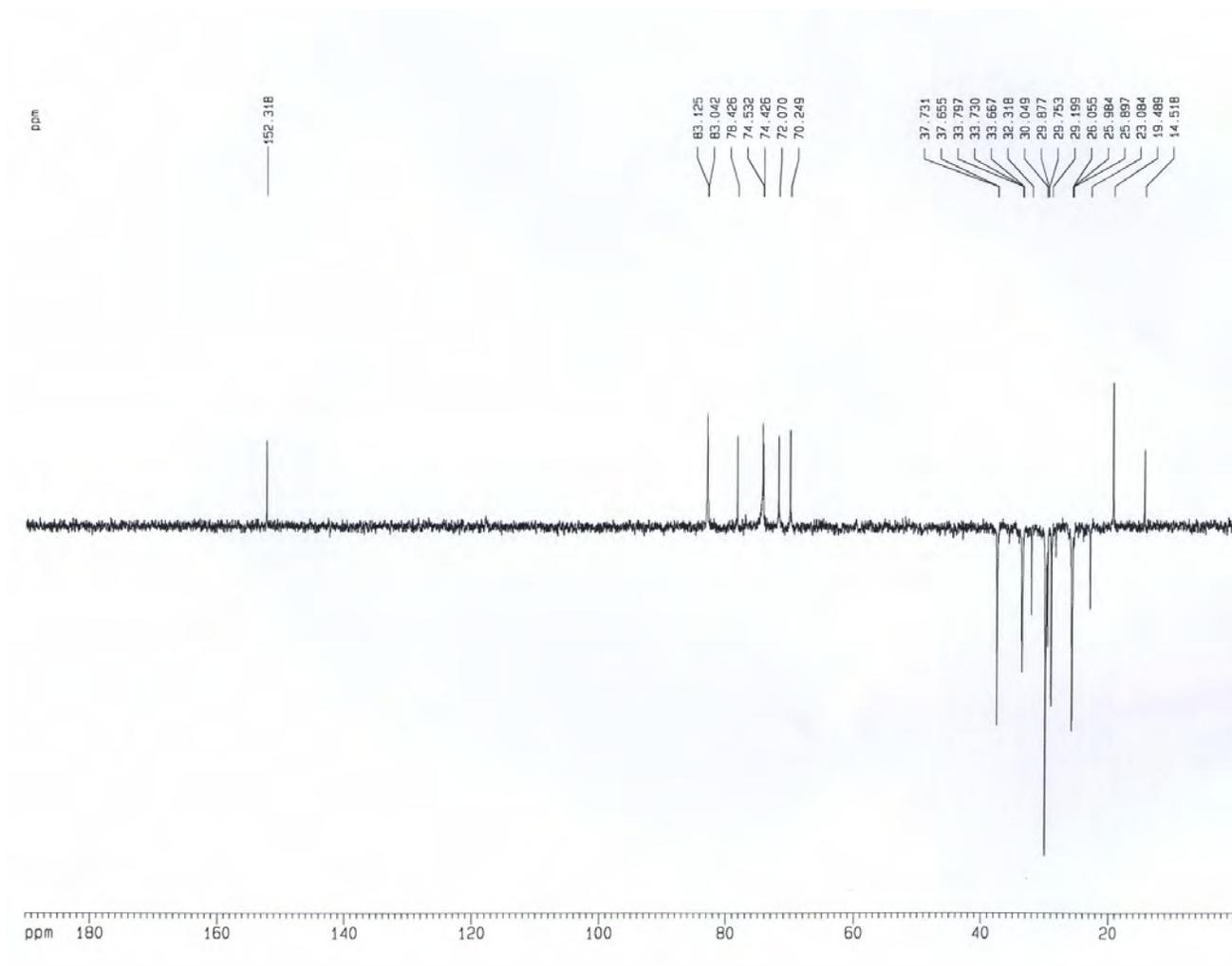


Figura 41 – Espectro de DEPT 135° em CDCl₃ da substância AM3, padrão interno TMS

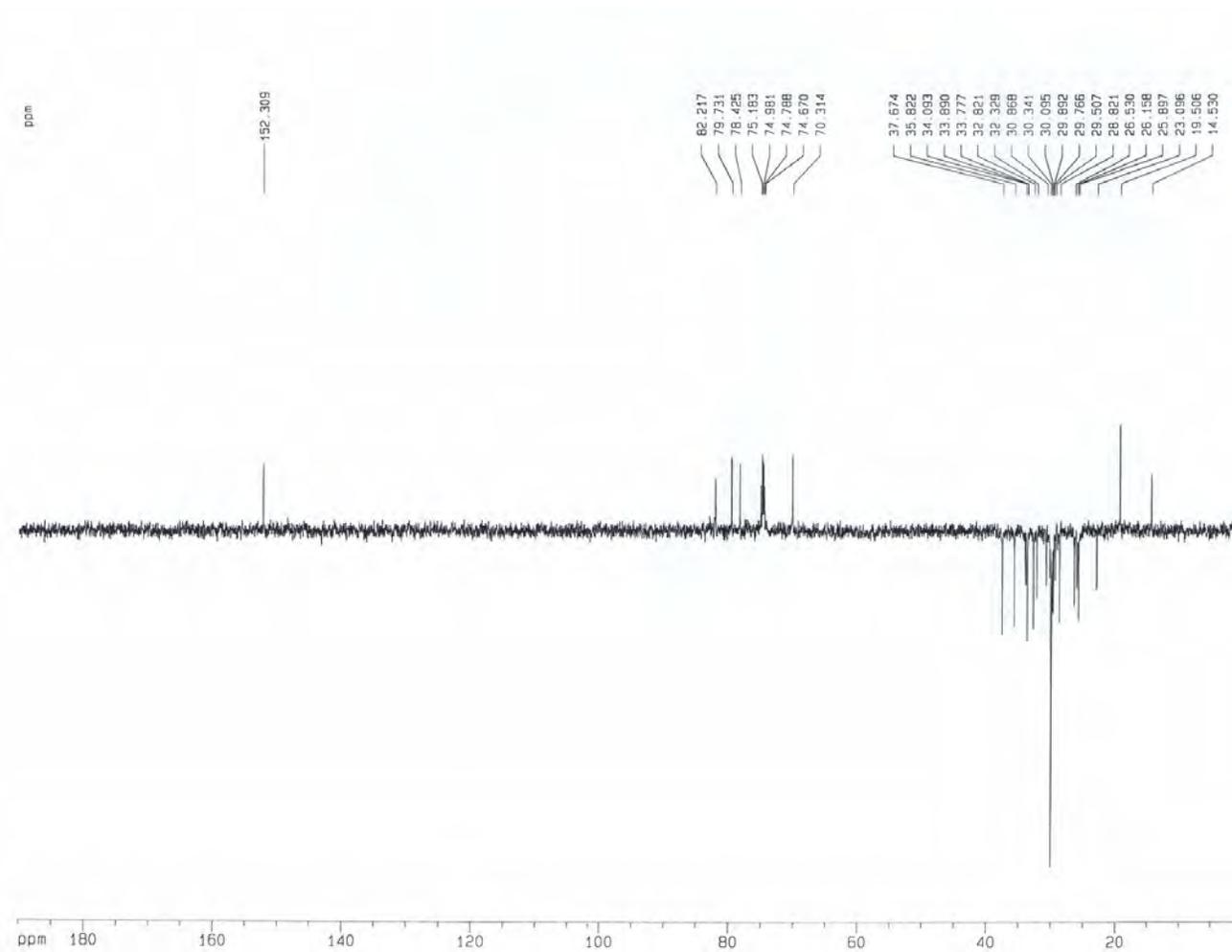


Figura 42 – Espectro de DEPT 135° em CDCl₃ da substância AM4, padrão interno TMS

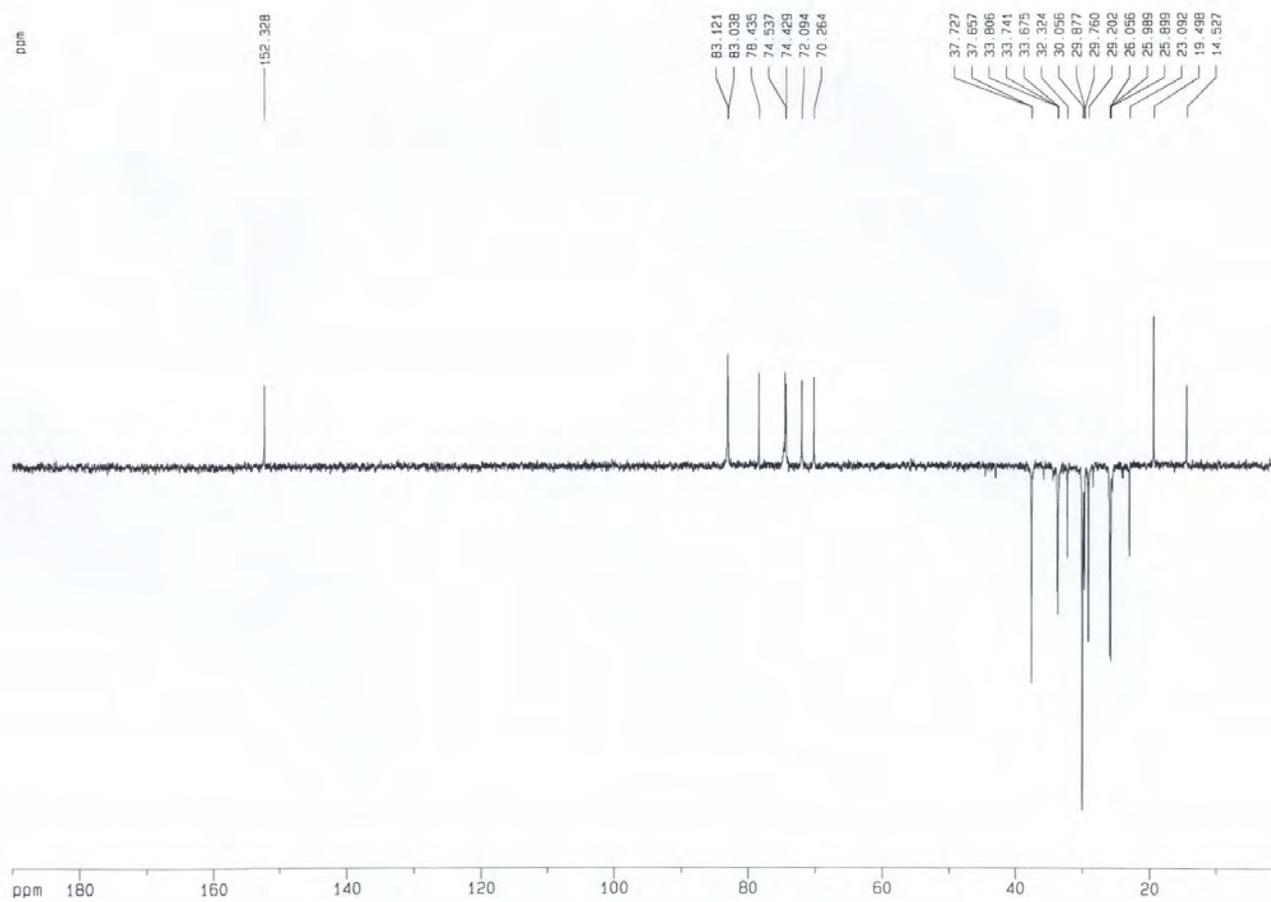


Figura 43 – Espectro de DEPT 135° em CDCl₃ da substância AM5, padrão interno TMS

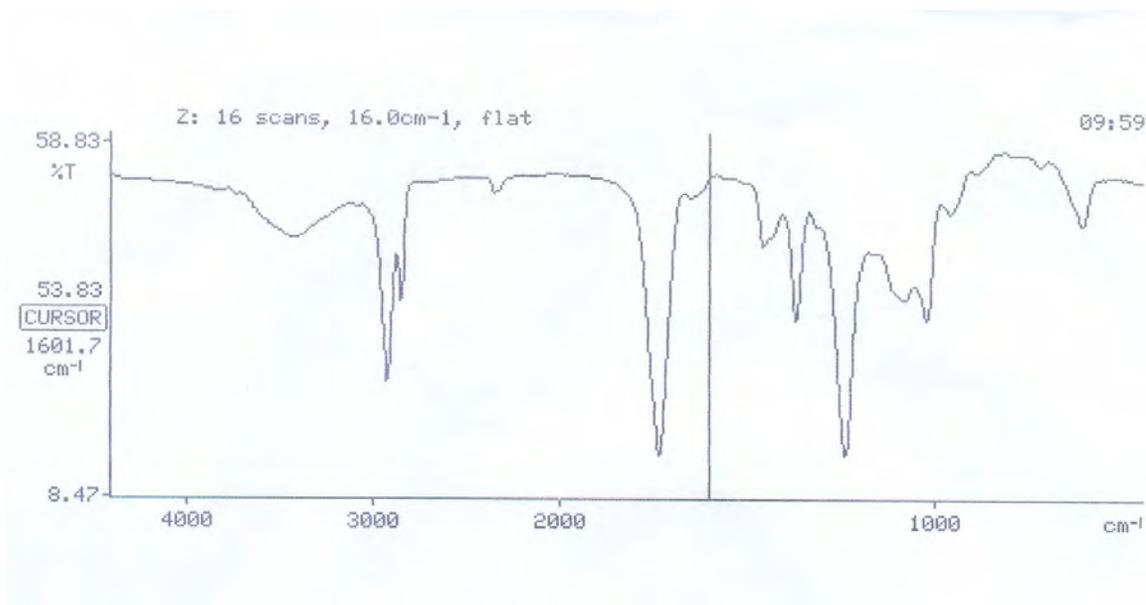


Figura 44 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM2 em KBr

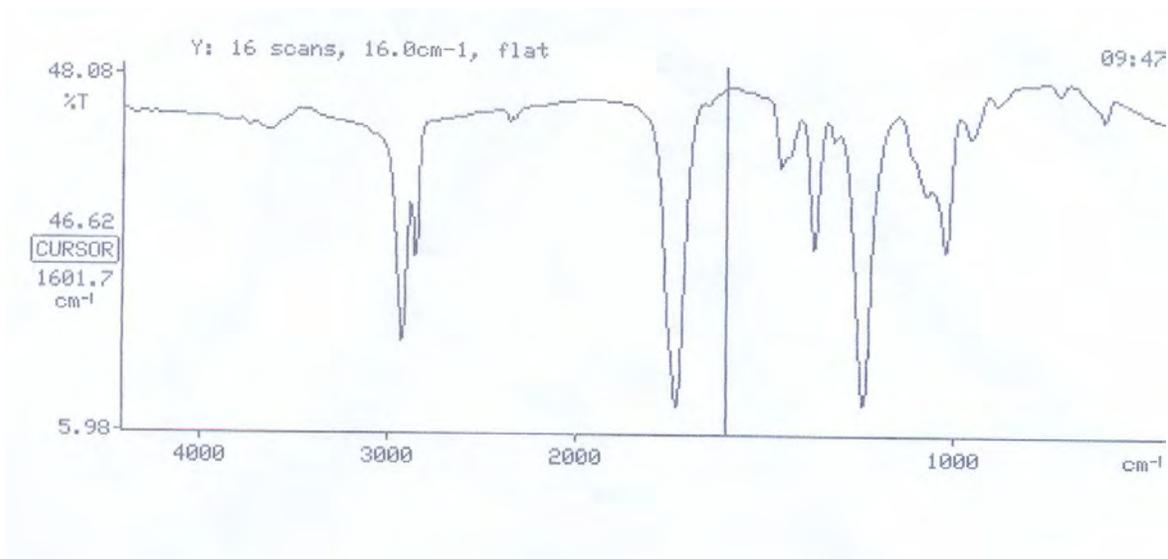


Figura 45 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM3 em KBr

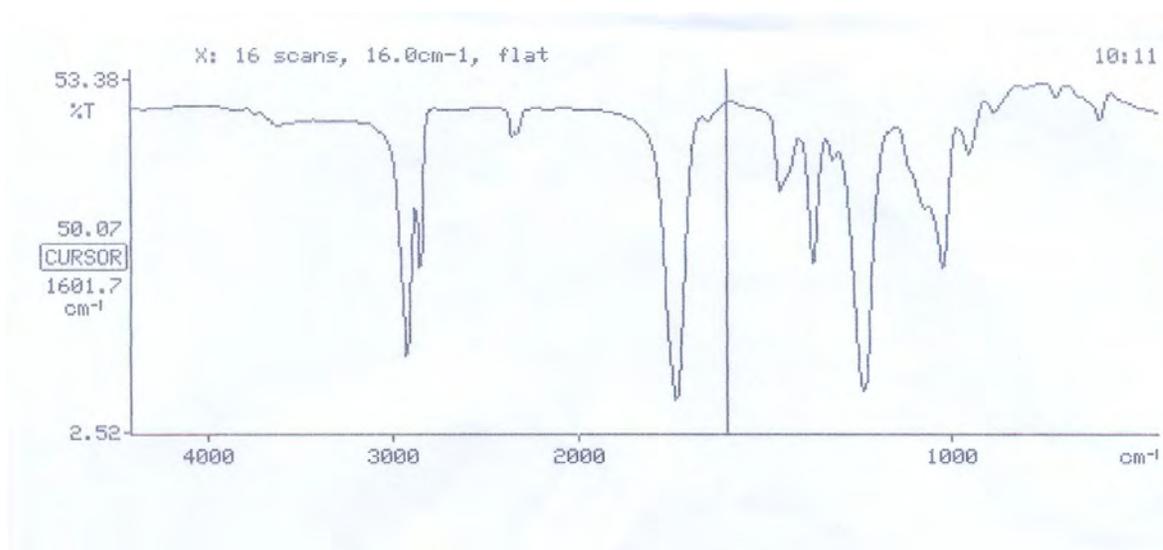


Figura 46 – Espectro na região do infravermelho do derivado acetilado da substância AM4 em KBr

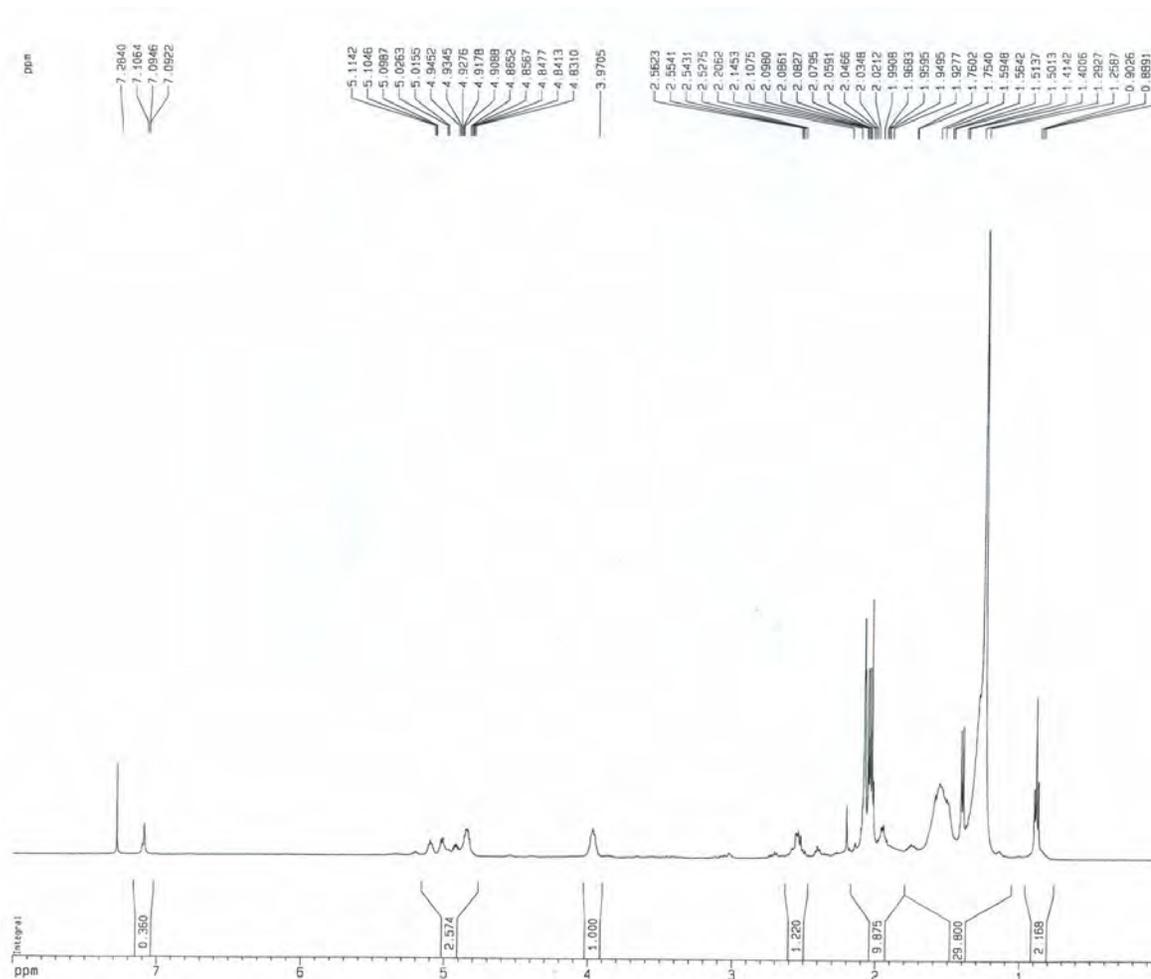


Figura 47 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz do derivado acetilado da substância AM2, padrão interno TMS

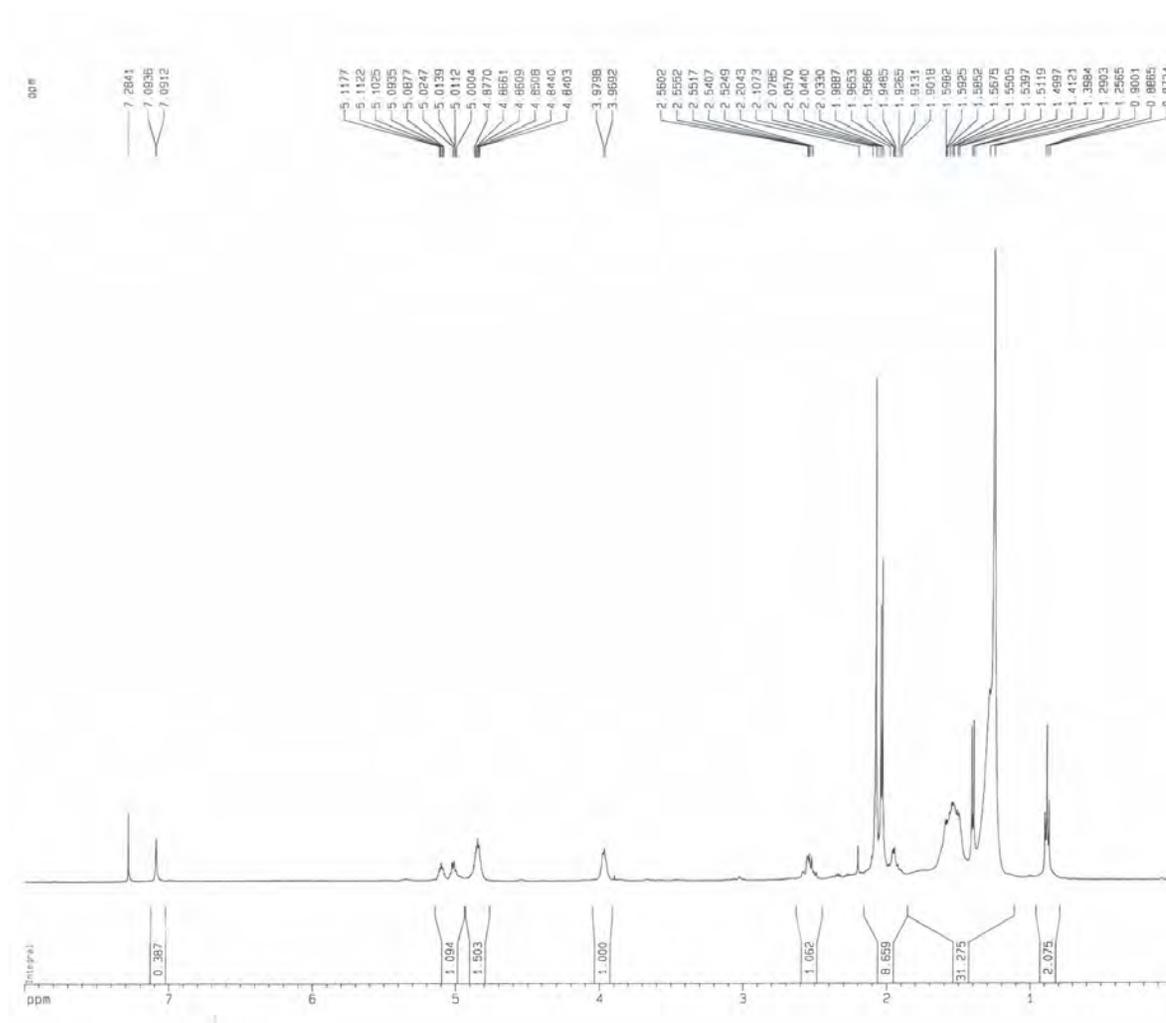


Figura 48 – Espectro de RMN de hidrogênio em $CDCl_3$ a 500 MHz do derivado acetilado da substância AM3, padrão interno TMS

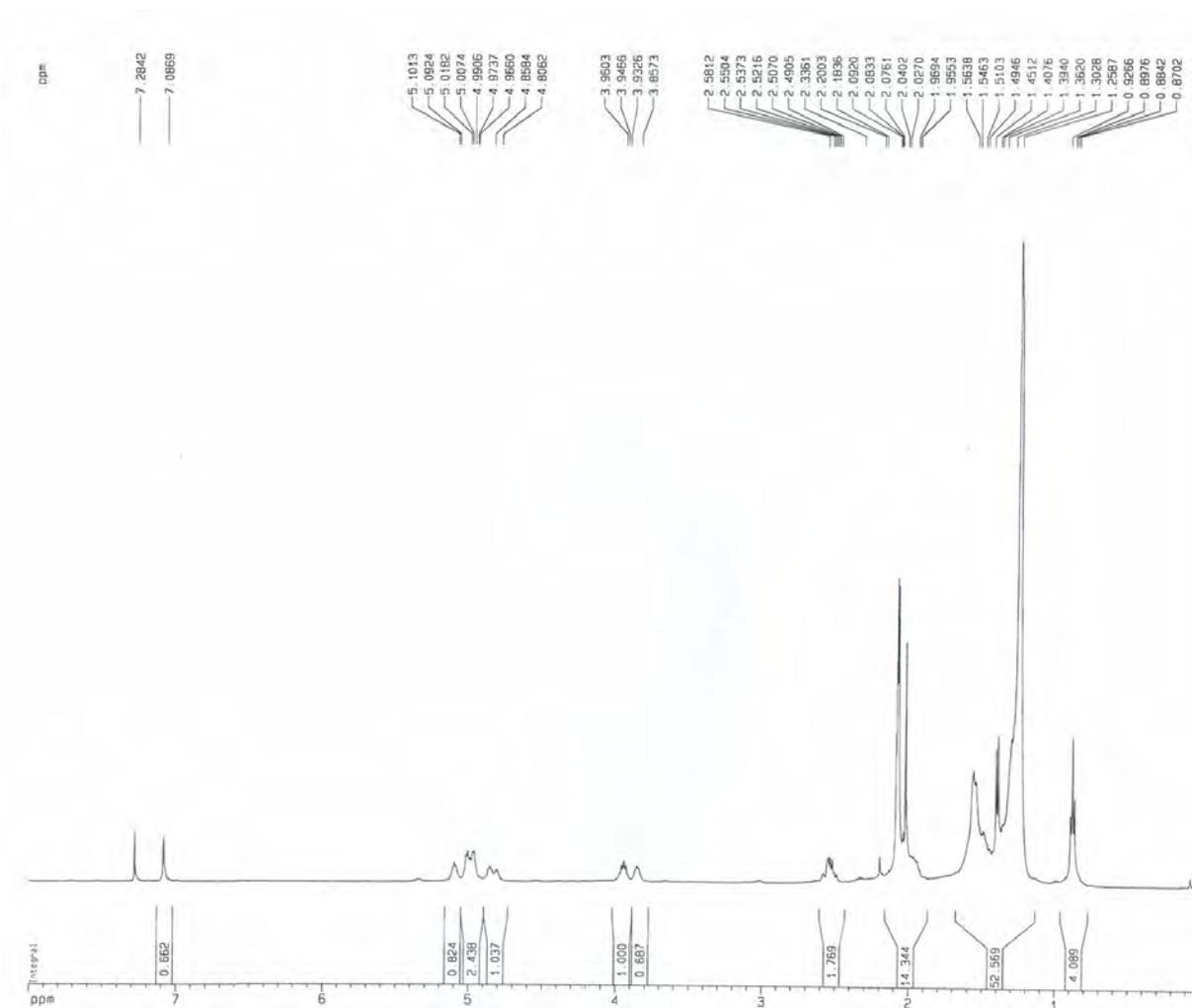


Figura 49 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância AM4, padrão interno TMS

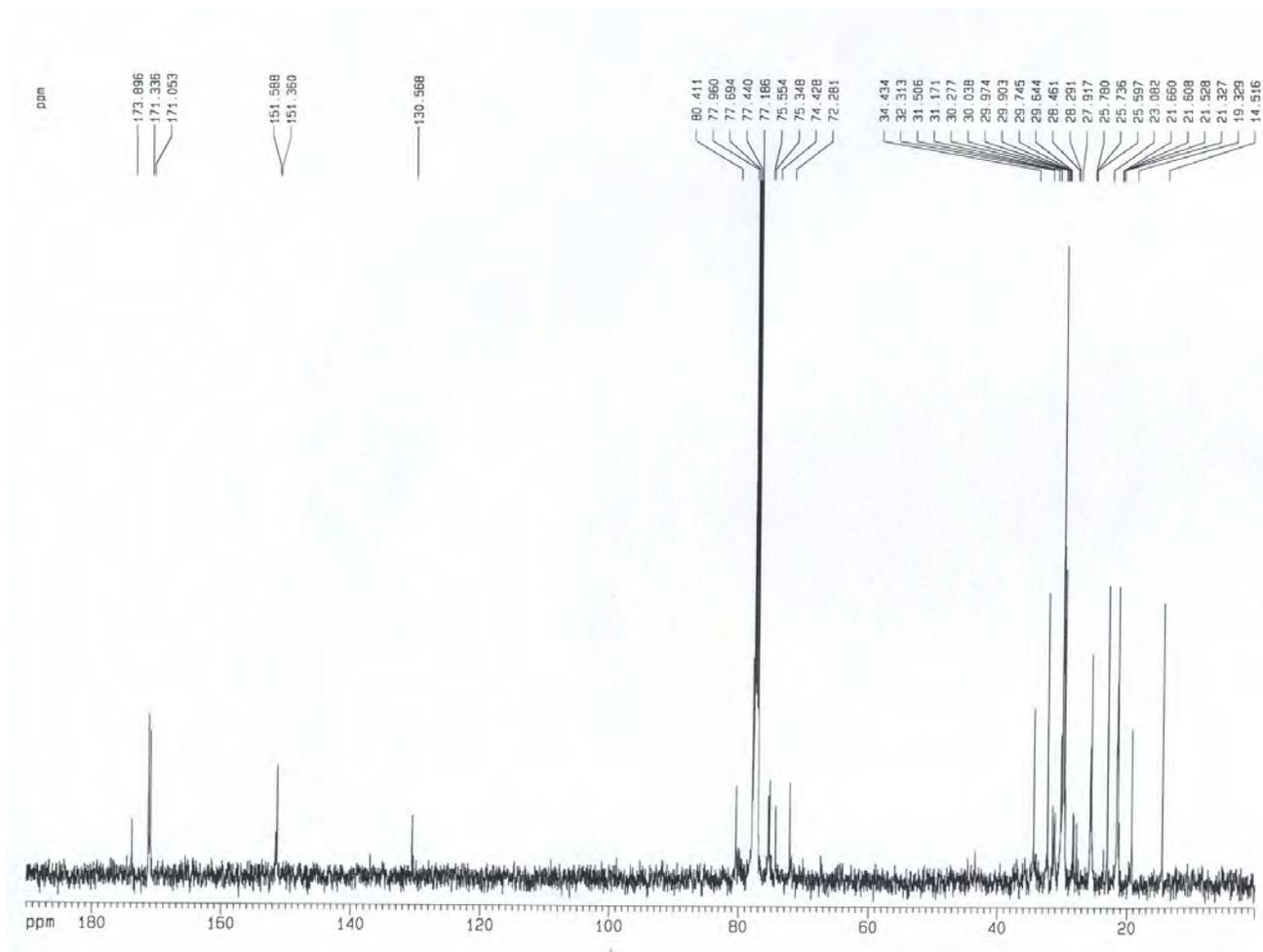


Figura 50 – Espectro de RMN de carbono em $CDCl_3$ a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM2, padrão interno TMS

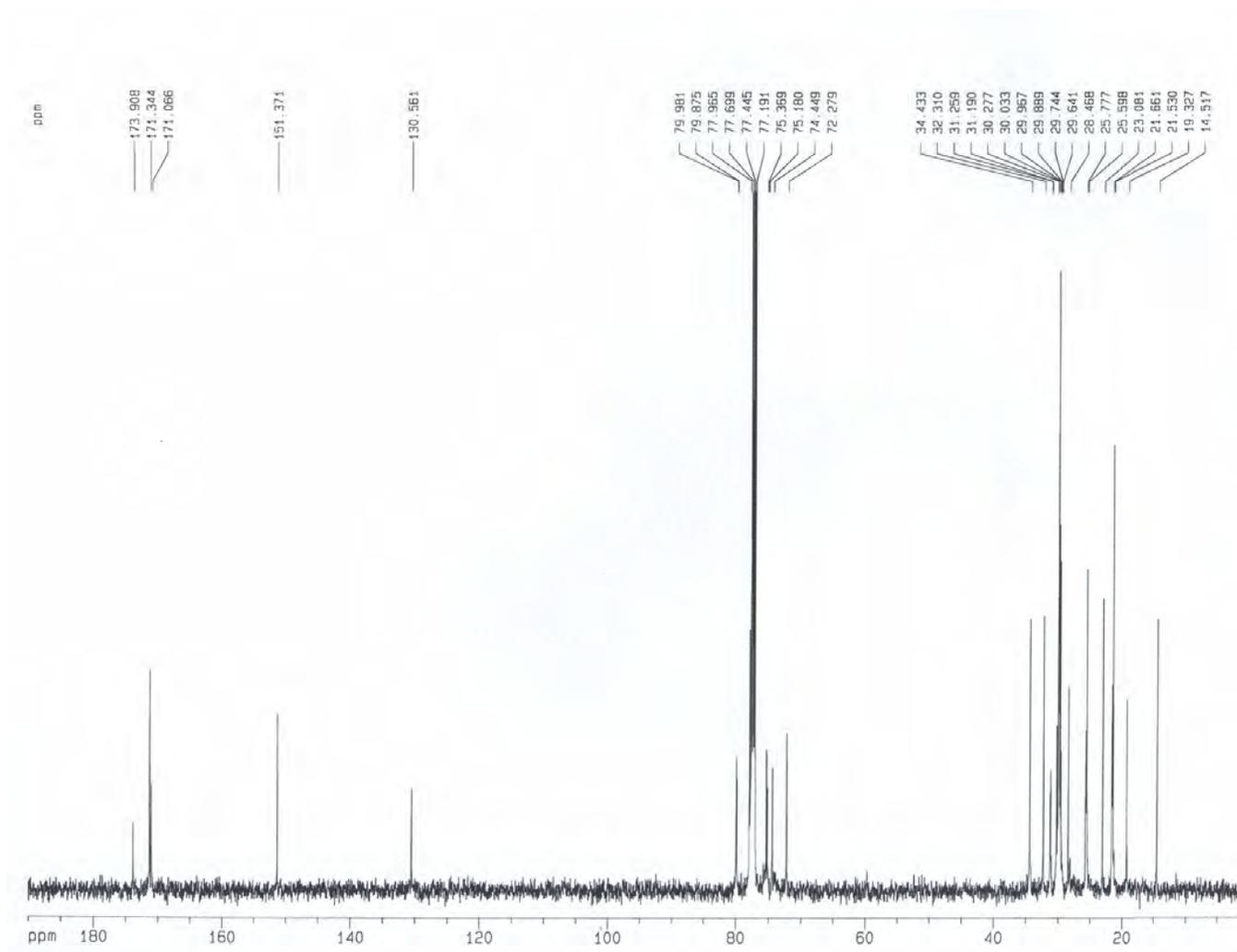


Figura 51 – Espectro de RMN de carbono em $CDCl_3$ a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM3, padrão interno TMS

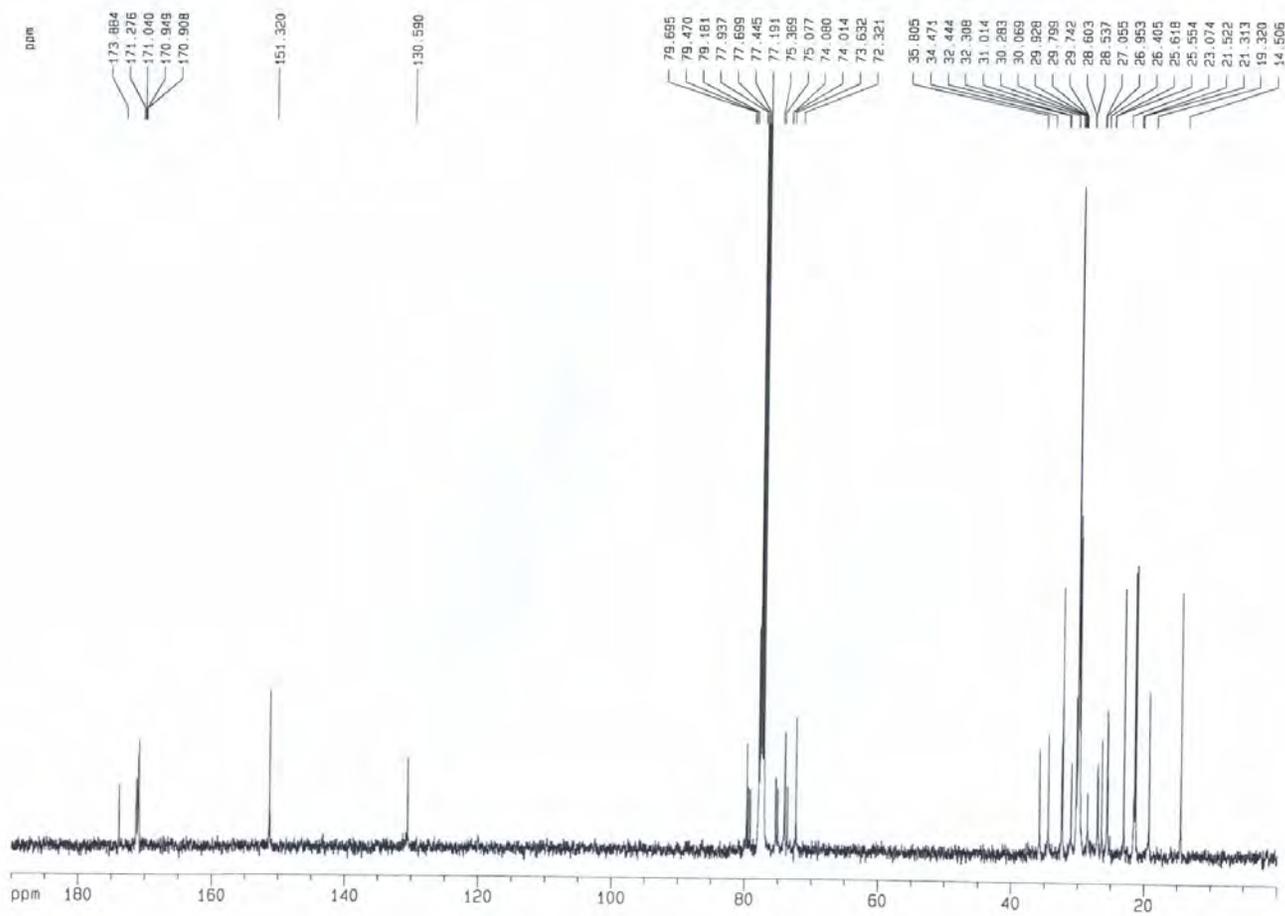


Figura 52 – Espectro de RMN de carbono em CDCl₃ a 125 MHz do derivado acetilado da substância AM4, padrão interno TMS

Uma amostra da mistura das acetogeninas AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6 foi testada no caramujo *B. glabrata* e os resultados de porcentagem de mortalidade *versus* concentração podem ser vistos na **Tabela 23** e os valores de CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀ estão descritos na **Tabela 24**.

Tabela 23 – Atividade moluscicida da mistura das acetogeninas obtidas de *A. muricata*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i>				
	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3,0	2,5	2,0	1,5
% de Mortalidade	90	70	53	40	23

Tabela 24 – Valores de concentrações letais para a atividade moluscicida da mistura das acetogeninas obtidas de *A. muricata*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
CL ₁₀	0,78
CL ₅₀	1,70
CL ₉₀	3,71

O valor do CL₉₀ = 3,71 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indica que essas acetogeninas possuem uma ótima ação moluscicida com uma melhor atividade que compostos como as saponinas monodesmosídica A (CL₁₀₀ = 13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e B (CL₁₀₀ = 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Agave decipiens* (ABDEL-GAWAD *et al.*, 1999), a 2'-hidroxi-3,7,8,4',5'-pentametoxiflavona (CL₁₀₀ = 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Paerkia clappertoniana* (LEMMICH *et al.*, 1996), os cromenos 1 e 2 (CL₁₀₀ = 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Piper anducum* (ORJALA *et al.*, 1993), a oleanoglicotoxina (CL₁₀₀ = 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Phytolacca dodecandra* (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985) e as saponinas 3 e 4 de *Phytolacca icosandra* (TREYVAUD *et al.*, 2000), entretanto, menos ativa que a jatrofona (CL₁₀₀ = 1,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Jatropha elliptica* (DOS SANTOS & SANT'ANA, 1999), a lematoxina (CL₉₀ = 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Phytolacca dodecandra* (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985), as saponinas 1 e 2 (CL₁₀₀ = 3,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Phytolacca icosandra* (TREYVAUD *et al.*, 2000) e a miliamina L (CL₉₀ = 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Euphorbia milli* (ZANI *et al.*, 1993). Nós estamos descrevendo pela primeira vez a atividade moluscicida das acetogeninas.

AM2, AM3, AM4 e AM5 foram submetidas aos testes de atividade contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* e mostraram-se bastante ativas e com atividades bastante semelhantes entre si como pode ser visto nas **tabelas 25 e 26**.

Tabela 25 – Atividade larvicida das acetogeninas AM2, AM3, AM4 e AM5 frente às larvas do *A. aegypti*

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5
% Mortalidade AM2	95	60	49	29	9
% Mortalidade AM3	91	62	48	30	7
% Mortalidade AM4	97	66	48	28	8
% Mortalidade AM5	91	68	44	27	8

Tabela 26 – Valores de concentrações letais para a atividade larvicida das acetogeninas AM2, AM3 AM4 e AM5

Concentração Letal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	AM2	AM3	AM4	AM5
CL ₁₀	0,61	0,62	0,66	0,64
CL ₅₀	1,39	1,42	1,37	1,42
CL ₉₀	3,19	3,22	2,87	3,17

Os dados de CL₅₀ indicam que essas acetogeninas possuem uma considerável atividade frente às larvas do *A. aegypti* e mostram-se mais eficientes que vários compostos encontrados na literatura tais como as cordiaquinonas A (CL₅₀ = 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), B (CL₅₀ = 25,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), J (CL₅₀ = 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e K (CL₅₀ = 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Cordia curassavica* (IOSET *et al.*, 2000), as cordiaquinonas E (CL₅₀ = 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), G (CL₅₀ = 25,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), E (CL₅₀ = 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e H (CL₅₀ = 25,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Cordia linnaei* (IOSET *et al.*, 2000), o E-nerolidol (CL₅₀ = 17,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Myroxylon balsamun* (SIMAS *et al.*, 2004) e menos ativas que a meliternatina (CL₅₀ = 0,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Melicope subunfoliolata* (HO *et al.*, 2003).

As acetogeninas têm sido descritas frequentemente na literatura como sendo tóxica a larvas de mosquito (ALALI *et al.*, 1998). Da espécie *Annona squamosa* foi obtida uma acetogenina denominada anonina que teve um processo para o seu isolamento e seu uso como inseticida patentado (MOESCHLER *et al.*, 1987). A atividade desses compostos contra as larvas do *A. aegypti* também está citada na literatura. Granados *et al.*, 2001, descreveu a ação de uma mistura rica em acetogeninas obtida das sementes de *Annona aff. spraguei* frente às larvas deste mosquito entretanto, não identificou quais as acetogeninas eram responsáveis pela atividade.

III.3 – Reavaliação Estrutural das Emotinas A, B, F, I, Emotinol-1 e Emotinol-2

III.3.1 – Emotina A

A substância emotina A foi isolada como cristais em forma de agulhas de cor branca (p.f. 77-78°C, éter etílico + n-hexano) e teve sua composição química determinada por espectrometria de massas e análise elementar como $C_{16}H_{22}O_4$ (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974).

O espectro de RMN de hidrogênio (**Figura 53, p. 136**) a 500 MHz da emotina A, em $CDCl_3$, é um espectro de primeira ordem. A região mais desprotegida mostra a presença de dois dupletos relativos a dois hidrogênios aromáticos em δ 7,54 (1H, d, $J = 7,88$ Hz) e δ 7,42 (1H, d, $J = 7,88$ Hz). O valor da constante de acoplamento J indica um acoplamento do tipo *orto* entre esses hidrogênios. A maioria dos átomos de hidrogênio dessa molécula tem deslocamento químico na região entre δ 2,0 e 5,0 ppm. Nesta região são encontrados dois dupletos, δ 4,92 ($J = 15,13$ Hz) e δ 4,79 ($J = 15,13$ Hz) atribuídos a dois hidrogênios oximetilênicos, cuja constante de acoplamento $J = 15,13$ Hz indica um acoplamento geminal entre esses núcleos. Seguem-se dois sinais simples e largos em δ 4,58 e δ 4,49 cada um integrado para um átomo de hidrogênio. O espectro de hidrogênio mostra ainda um duplete largo em δ 4,43 (1H), com uma constante de acoplamento $J = 12,61$ Hz característica de acoplamento axial-axial, que foi atribuído a um hidrogênio carbinólico; dois simpletos, sendo um característico de um grupo metoxila em δ 3,50 (3H) e o outro em δ 2,31 (3H) pertencente a um grupo metila; dois duplos dupletos, um em δ 3,03 (1H, $J = 4,73$ Hz e 17,02 Hz) e o segundo em δ 2,55 (1H, $J = 12,61$ Hz e 17,02 Hz). A constante de acoplamento $J = 17,02$ Hz indica um acoplamento geminal entre eles. Na região de maior proteção observamos um triplo duplete em δ 2,20 (1H, $J = 4,73$ Hz e 12,61 Hz). A constante de acoplamento no valor de 12,61 Hz é geralmente observada para um acoplamento axial-axial. A região de maior proteção revela a existência de dois sinais simples em δ 1,44 (3H) e em δ 1,31 (3H) referentes aos dois outros grupos metilas na molécula (**Tabela 27, p. 135**).

A análise dos espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° (**Figura 54, p. 137**), obtidos em $CDCl_3$, permitiu verificar um total de 16 sinais correspondentes aos 16 átomos de carbono para a emotina A. Destes, seis são quaternários, quatro são metínicos, dois são metilênicos e quatro são metílicos (**Tabela 27 p. 135**). Os valores de deslocamento químico confirmam entre os seis carbonos quaternários a presença de um carbono carbonílico (δ 200,24) quatro carbonos aromáticos (δ 141,28; δ 139,82; δ 135,48 e δ 126,49) e um

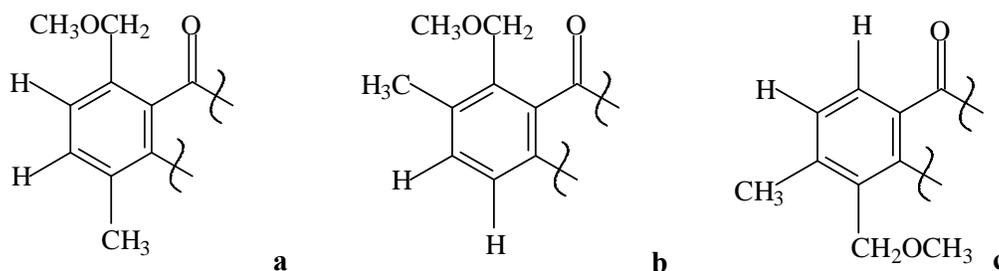
carbono saturado oxigenado (δ 72,73). Os sinais observados em δ 135,59 e em δ 125,27 foram atribuídos aos átomos de carbonos aromáticos metínicos (DEPT 90⁰). Os sinais em δ 76,15 e em δ 50,37 foram atribuídos aos dois carbonos metínicos saturados existentes na molécula. O carbono em δ 76,15 está ligado a um átomo de oxigênio. Os sinais observados em δ 29,10 e em δ 72,66 são referentes a dois grupos metilênicos saturados sendo um oxigenado (δ 72,66). Os grupos metilas apresentam um sinal em δ 58,84 que é atribuído ao grupo metoxila, um em δ 19,51 conectado ao núcleo aromático e os dois restantes em δ 23,96 e δ 27,81 conectados a um carbono saturado que possui um átomo de oxigênio.

O mapa de contornos HMQC (**Figura 55 p. 138**) mostra todos os acoplamentos direto carbono-hidrogênio como indicado na **Tabela 27 p. 135**. Esse mapa confirma o acoplamento geminal entre os hidrogênios em δ 4,92 e em δ 4,79 uma vez que ambos encontram-se ligados ao carbono em δ 72,66. Os hidrogênios cujos sinais se apresentaram simples e largos em δ 4,58 (1H) e em δ 4,49 (1H) não apresentam acoplamento no mapa de contornos HMQC com quaisquer dos carbonos da molécula e foram atribuídos a hidrogênios dos grupos hidroxílicos. O duplete largo em δ 4,43 atribuído a um hidrogênio carbinólico mostra um acoplamento com o carbono metínico cujo sinal se encontra em δ 76,15. Os hidrogênios metílicos com sinais em δ 2,31, em δ 1,31 e em δ 1,44, encontram-se acoplados respectivamente aos carbonos com sinais em δ 19,51, 27,85 e 23,96 e o hidrogênio metoxílico cujo sinal se encontra em δ 3,50 possui um acoplamento com o carbono com sinal em δ 58,84. O hidrogênio com sinal sob a forma de um triplo duplete em δ 2,20 está acoplado ao carbono metínico com sinal em δ 50,37. Os hidrogênios aromáticos com sinais em δ 7,54 e δ 7,42 estão acoplados aos carbonos cujos sinais se encontram em δ 125, 27 e em δ 135,59, respectivamente. Os hidrogênios com sinais sob a forma de duplo duplete em δ 3,03 e em δ 2,55 encontram-se acoplados ao carbono com sinal em δ 29,10.

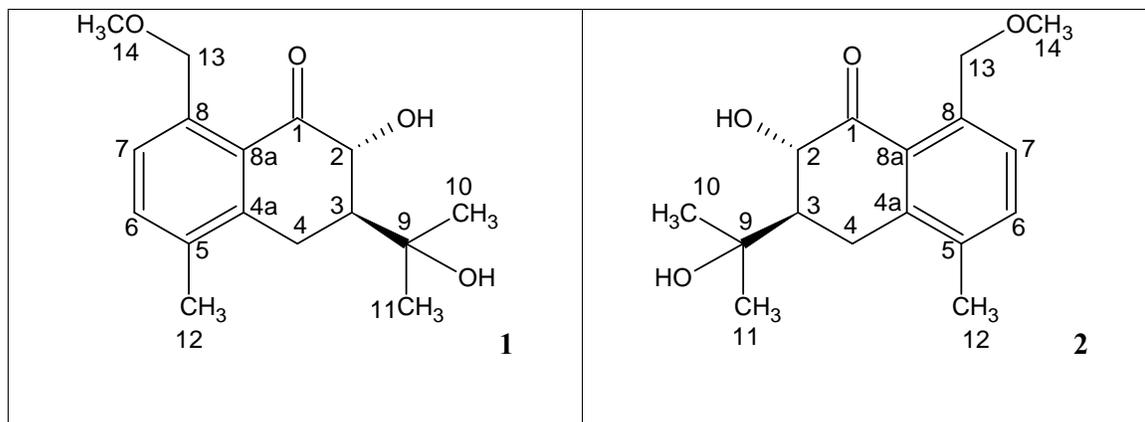
O mapa de contornos COSY da emotina A (**Figura 56 p. 139; Tabela 27 p. 135**) mostra que o hidrogênio carbinólico H-2 cujo sinal é o duplete em δ 4,43 ($J = 12,61$ Hz) possui um acoplamento fraco com o hidrogênio hidroxílico (δ 4,58 sl), e um acoplamento com o H-3 (δ 2,20 td, $J = 12,61$ Hz e 4,73 Hz). O H-3 em δ 2,20 acopla ainda com os hidrogênios em δ 3,03 (dd, 17,02 Hz, 4,73 Hz, H-4_{quase-axial}) e em δ 2,53 (dd, 17,02 Hz, 12,61 Hz, H-4_{quase-quatorial}). Portanto H-3 possui um J H-3-H-4 de 12,61 Hz e outro de 4,73Hz e J H-3-H-2 de 12,61Hz o que evidencia que H-3 e H-2 estão em posição quase-axial. Os

hidrogênios com sinais em δ 3,03 e δ 2,53 possuem uma constante de acoplamento geminal de 17,02 Hz. Esta seqüência indica que há na molécula um grupo $-\text{CHOH}-\text{CH}-\text{CH}_2-$.

Os acoplamentos no mapa de contornos HMBC (**Figura 57 p. 140; Tabela 27 p. 135**) do grupo carbonila com os hidrogênios H-2 e H-3 indicam a carbonila numa posição α ao grupo CHOH (C-2). A seqüência $\text{CHOH}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ foi determinada pelo mapa de contornos COSY e assim passamos a ter a seqüência $-\text{CO}-\text{CHOH}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ com a carbonila na posição 1. O mapa de contornos HMBC mostra também um acoplamento entre o carbono quaternário oxigenado a δ 72,73 com os hidrogênios em δ 4,43 (H-2), δ 2,20 (H-3), δ 3,03 (H-4_{quase-axial}), δ 2,53 (H-4_{quase-equatorial}) e os hidrogênios metílicos em δ 1,31 e δ 1,44 indicando no carbono-3 a presença de um grupo hidroxiisopropila ($-\text{COH}(\text{CH}_3)_2$). Observa-se ainda no mapa de contornos HMBC o acoplamento entre o carbono metilênico em δ 72,66 e os hidrogênios em δ 7,54 (d, aromático) e em δ 3,50 (metoxílico) e um acoplamento entre o carbono metílico em δ 19,51 e o hidrogênio aromático em δ 7,42 (d), dessa forma, os dois hidrogênios aromáticos estão em posição orto (como indicado pelo espectro de hidrogênio com $J = 7,88$ Hz e pelo COSY), com o hidrogênio em δ 7,54 possuindo uma relação orto ao grupo metilenometoxi e o hidrogênio em δ 7,42 orto ao grupo metila com um arranjo do tipo mostrado em **a**, eliminando outras duas possibilidades que poderiam ser postuladas (**b e c**).



O valor da constante de acoplamento extraído a partir da análise dos dados de RMN de hidrogênio, para os hidrogênios H-2 e H-3 ($J = 12,61$) indica uma relação *trans*-diaxial, e, portanto os substituintes em C-2 e C-3 guardam uma relação *trans*-diequatorial entre si. Esta situação deve corresponder a uma conformação mais favorecida em que os substituintes em C-2 e C-3 ocupam posições quase equatoriais em qualquer uma das duas configurações enantioméricas possíveis. A análise detalhada dos espectros de RMN uni- e bidimensionais permitiu indicar para a emotina A a estrutura **1** ou sua antípoda óptica **2**.



De acordo com a literatura a emotina A tem a configuração C-3 S e C-2 R (DE OLIVEIRA *et al.*, 1976) e dessa forma, a estrutura da emotina A deve ser a estrutura **1** confirmando a proposta descrita na literatura (DE OLIVEIRA *et al.*, 1976).

Tabela 27 - Dados de RMN da Emotina A em CDCl_3

Posição	^1H	J em Hz	COSY	^{13}C	HMBC
1	-	-	-	200,24	2,20; 4,43
2	4,43 d 1H	12,61	2,20; 4,58	76,15	2,20; 2,53; 3,03
3	2,20 td 1H	12,61; 4,73	2,53; 3,03; 4,43	50,37	1,31; 1,44; 2,53; 3,03; 4,43
4	eq-3,03 dd 1H; ax-2,55 dd 1H	17,02; 4,73 17,02; 12,61	2,20; 2,53 2,20; 3,03	29,10	2,20; 4,43
4a	-	-	-	141,38	2,31; 2,53; 3,03; 7,42
5	-	-	-	126,49	2,31; 2,53; 3,03; 7,42; 7,54
6	7,42 d 1H	7,88	2,31; 7,54	135,59	2,31; 7,54
7	7,54 d 1H	7,88	7,42	125,27	4,79; 4,92
8	-	-	-	139,82	4,79; 4,92; 7,42
8a	-	-	-	135,48	2,53; 3,03; 4,79; 4,92
9	-	-	-	72,73	1,31; 1,44; 2,20; 2,53; 4,43
10 (11)	1,31 s 3H	-	-	27,85	1,44
11 (10)	1,44 s 3H	-	-	23,96	1,31; 2,20
12	2,31 s 3H	-	7,42	19,51	7,42
13	4,92 d 1H;	15,13	4,79	72,66	3,50; 7,54
13'	4,79 d 1H	15,13	4,92		
14	3,50 s 3H	-	-	58,84	4,79; 4,92
OH-2*	4,58 sl 1H	-	12,61	-	-
OH-9*	4,49 s 1H	-	-	-	-

*O espectro de HMQC mostrou que os sinais desses hidrogênios não se acoplam a sinais de carbono; q=quase-equatorial; ax=quase-axial

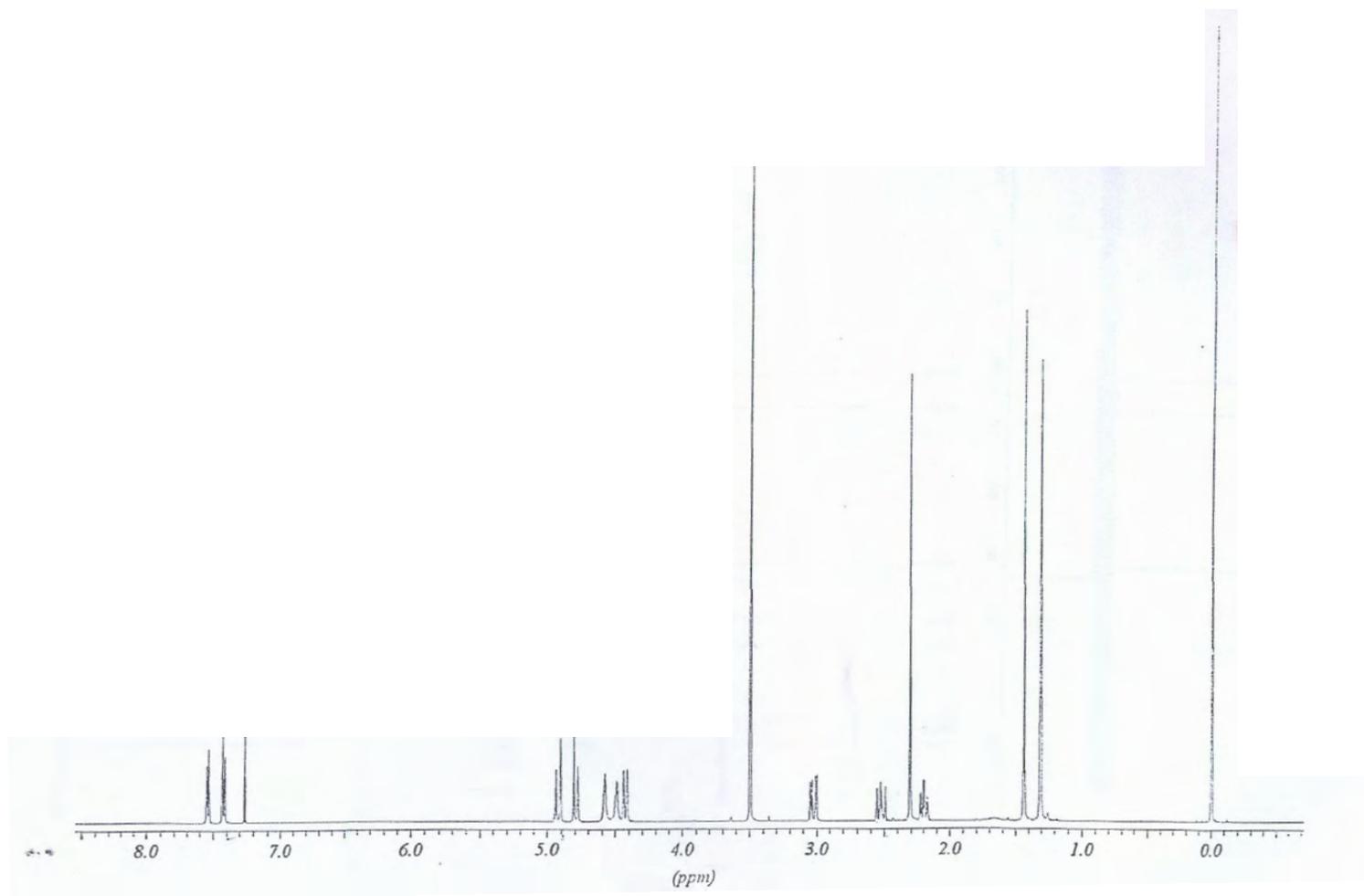
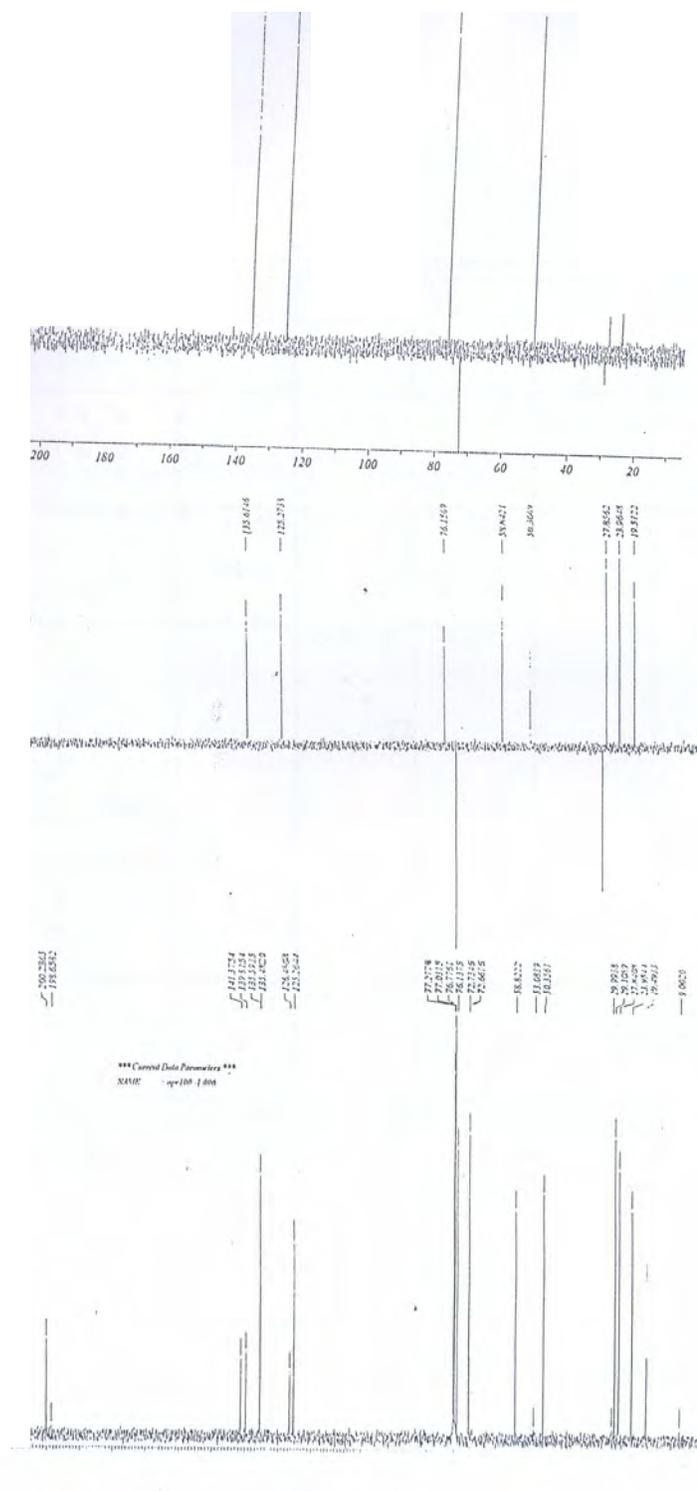


Figura 53 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância Emotina A, padrão interno TMS



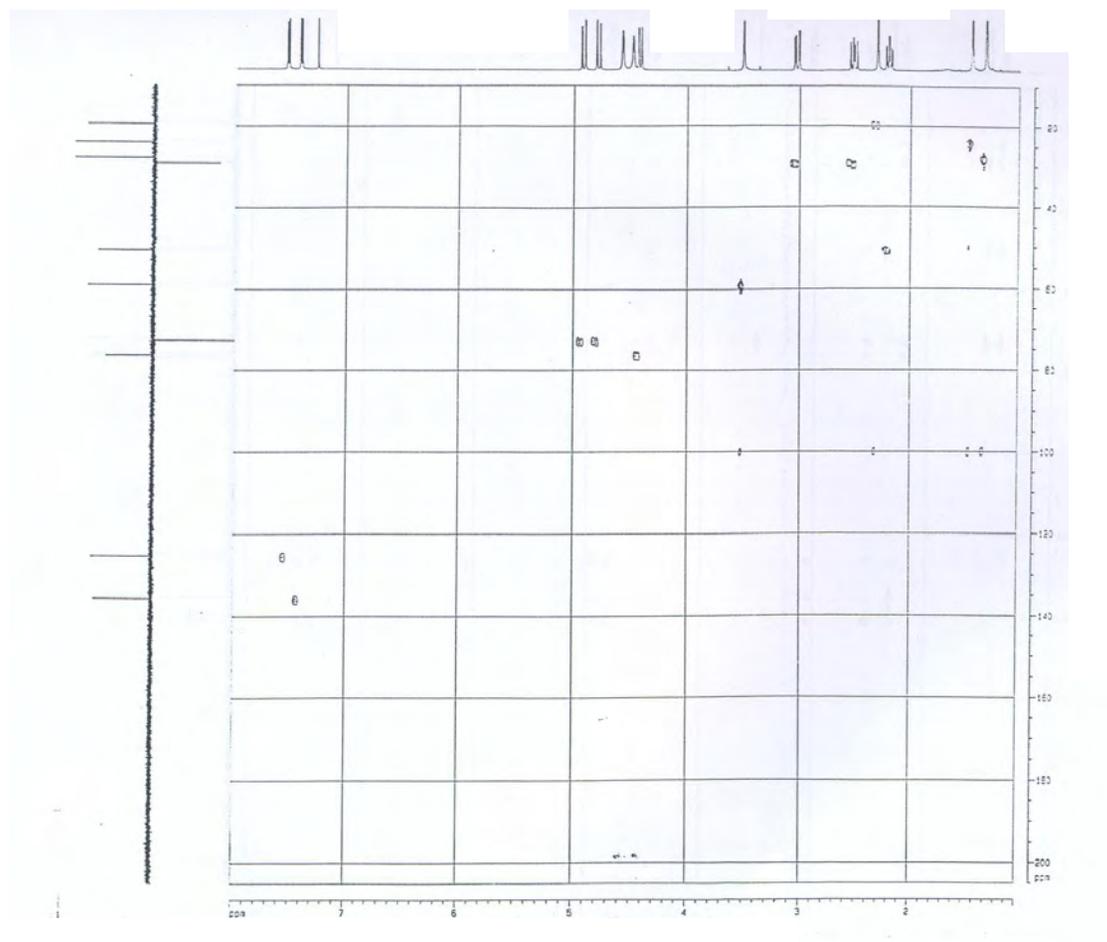


Figura 55 – Mapa de contornos HMQC da substância Emotina A

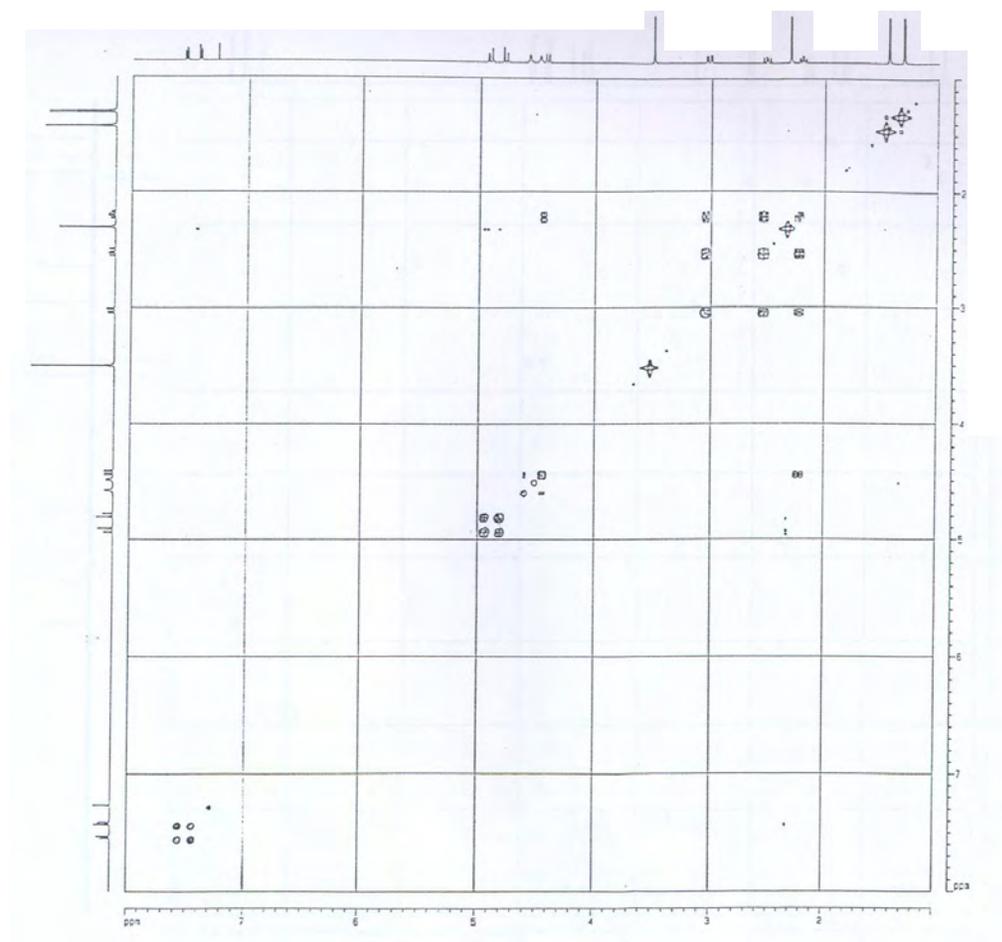


Figura 56 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina A

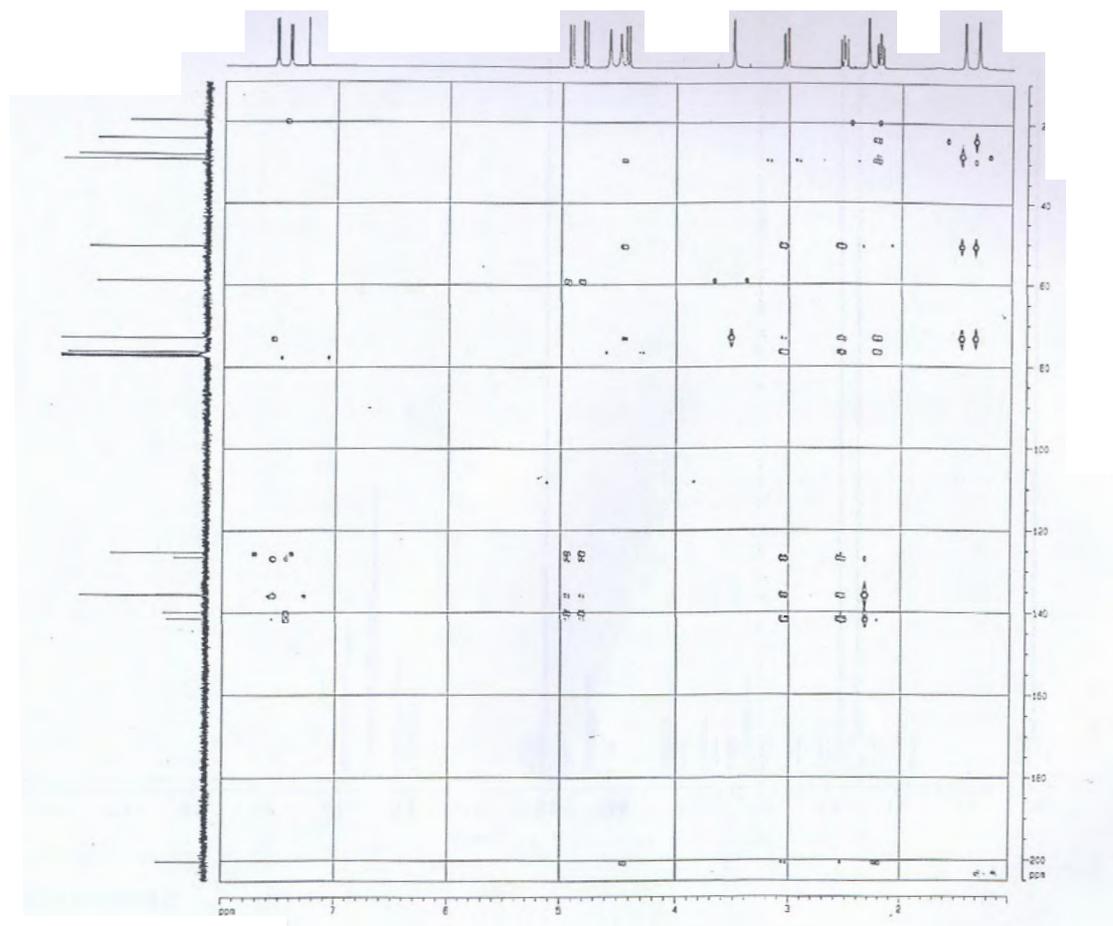


Figura 57 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina A

III.3.2 - Emotinas B e F

A emotina B foi isolada como cristais em forma de agulhas de cor branca (p.f. 138-140°C, etanol) e a emotina F foi isolada sob a forma de um sólido de cor branca (p.f. 99-101°C, éter etílico + n-hexano).

As emotinas B e F guardam entre si uma estreita relação estrutural, que se traduz pela semelhança entre os seus espectros de RMN de hidrogênio (**Figuras 58 p. 144 e 63 p. 150; Tabelas 28 p. 143 e 29 p. 149**) e RMN de carbono, DEPT 135° e 90° (**Figuras 59 p. 145 e 64; p. 151; Tabelas 28 p. 143 e 29 p. 149**). Esses espectros, por sua vez, relacionam-se àqueles da emotina A, confirmando a semelhança entre as estruturas dessas substâncias.

A semelhança entre os espectros de RMN de hidrogênio, obtidos a 500 MHz, dessas duas substâncias é muito grande. Dentre as feições espectrais comuns citam-se a presença de sinais relativos a seis hidrogênios do grupo 2-hidroxiisopropila, a dois hidrogênios aromáticos vicinais e a quatro hidrogênios alicíclicos (dois hidrogênios metilênicos diastereotópicos e dois hidrogênios metínicos, sendo um deles carbinólico), de modo análogo a emotina A. A emotina B apresenta ainda sinais devidos a quatro hidrogênios de dois grupos oximetilênicos e um sinal relativo a um grupo metoxila, já a emotina F apresenta sinais relativos a dois grupos metilas aromáticos e não apresenta sinais relativos a hidrogênios oximetilênicos.

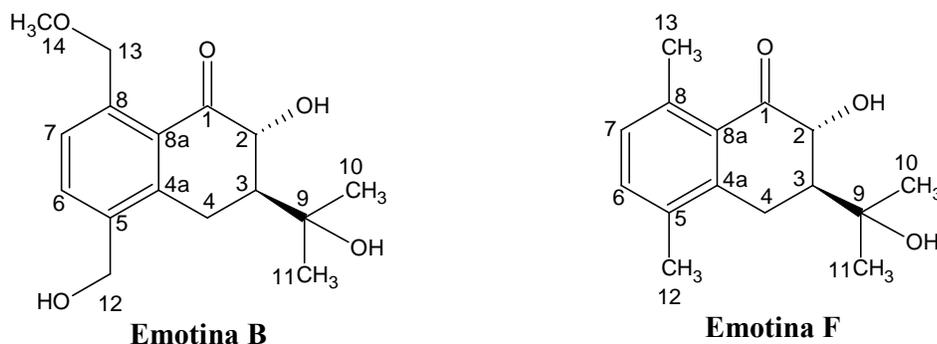
Os espectros de RMN de carbono confirmam a existência de um anel aromático conjugado a uma carbonila como na emotina A. Para a emotina B, os mapas de contorno HMQC, COSY e HMBC também foram analisados (**Figuras 60 p. 146, 61 p. 147 e 62, p. 148; Tabela 28, p. 143**) e os acoplamentos a longa distância vistos no mapa de contornos HMBC do hidrogênio em δ 4,91 (conectado ao carbono metilênico em δ 72,66) com os carbonos em δ 58,89 (metoxila), em δ 125,27, em δ 141,77 e em δ 200,09 (carbonila) e entre o carbono metilênico em δ 72,66 com os hidrogênios do grupo metoxílico em δ 3,51 e com o hidrogênio aromático em δ 7,63 indicam o CH₂ a δ 72,66 ligado ao grupo OCH₃ e ao carbono na posição 8 (δ 141,77) e os acoplamentos entre o hidrogênio com sinal em δ 4,73 com os carbonos cujos sinais encontram-se em δ 133,43 e em δ 137,66 indicam que o grupo CH₂OH está conectado ao carbono 5.

Os dados de HMQC, COSY e HMBC para a emotina F podem ser vistos nas **Figuras 65 p.152, 66 p.153 e 67 p.154 e Tabela 29, p. 149**. A carbonila em δ 200,27 mostra uma correlação vista no mapa de contornos HMBC com os hidrogênios metílicos em δ 2,60 cujo carbono foi observado em δ 22,20. Este grupo metila possui acoplamento a longa distância

com o hidrogênio em δ 7,05 (H-7) o que indica a presença desse grupo metila na posição 8. O acoplamento entre o hidrogênio em δ 2,27, que corresponde ao segundo grupo metila no anel aromático, com os carbonos em δ 134,36 (C-5); δ 141,25 (4a) e em δ 135,09 (6) indicam o grupo CH_3 ligado ao carbono 5.

De Oliveira *et al.* (1976) converteu a emotina A na emotina F através de hidrogenólise e as curvas de dispersão óptica rotatória (DOR) foram superponíveis mostrando que as emotinas A e F possuem a mesma configuração relativa (DE OLIVEIRA *et al.*, 1976).

A análise dos espectros de RMN de hidrogênio, RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90°, juntamente com os dados bidimensionais dos mapas de contornos HMQC, COSY, HMBC e NOESY permitiram confirmar para as emotinas B e F as estruturas abaixo. Os dados extraídos dos espectros bidimensionais das emotinas B e F podem ser vistos nas **Tabelas 28 p. 143 e 29, p. 149.**



A análise por RMN unidimensional e bidimensional confirmou para as emotinas A, B e F as estruturas já propostas na literatura. Apenas algumas modificações nos valores dos deslocamentos químicos foram observadas. Os valores de δ em ppm para os hidrogênios 6 e 7 da emotina A foram invertidos e os valores de deslocamentos químicos para os carbonos 4, 4a, 5 e 8a também não coincidiram com os valores atribuídos nas referências citadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; DE OLIVEIRA *et al.*, 1976).

Tabela 28 - Dados de RMN da Emotina B em CDCl_3

Posição	^1H	J em Hz	COSY	^{13}C	HMBC
1	-	-	-	200,09	2,09; 2,63; 3,19; 4,41; 4,54; 4,91; 7,63
2	4,41 dd 1H	12,61;2,2	2,09; 4,54	76,30	2,09; 2,63; 3,19; 4,54
3	2,09 td 1H	12,61; 4,73	2,63; 3,19; 4,41	50,59	1,29; 1,42; 2,63; 3,19; 4,41; 4,54
4	eq-3,19 dd 1H	17,02; 4,73	2,09; 2,63	27,75	2,09; 4,41; 7,63
	ax-2,63 dd 1H	17,02; 12,61	2,09; 3,19		
4a	-	-	-	141,50	2,09; 2,63; 3,19
5	-	-	-	137,66	2,63; 3,19; 4,73; 7,63
6	7,63 s 1H	7,88	-	133,43	2,63; 4,73; 7,63
7	7,63 s 1H	7,88	-	125,27	4,73; 4,91; 7,63
8	-	-	-	141,77	4,73; 4,91; 7,63
8a	-	-	-	126,69	2,63; 3,19; 4,73; 4,91; 7,63
9	-	-	-	72,87	1,29; 1,42; 2,09; 2,63; 3,19; 4,41
10 (11)	1,29 s 3H	-	-	27,70	2,09; 1,42
11 (10)	1,42 s 3H	-	-	23,97	2,09; 1,29
12	4,73 d 1H	14,0	4,69	62,72	7,63
12'	4,69 d 1H	14,0	4,73		
13	4,91 d 1H	15,13	4,73	72,66	3,51; 7,63
13'	4,73 d 1H	15,13	4,91		
14	3,51 s 3H	-	-	58,89	4,73; 4,91
OH-2*	4,54 d 1H	2,2	4,41	-	-
OH-9*	4,47 s 1H		-	-	-

*O espectro de HMQC mostrou que os sinais desses hidrogênios não se acoplam a sinais de carbono; eq=quase-equatorial; ax=quase-axial

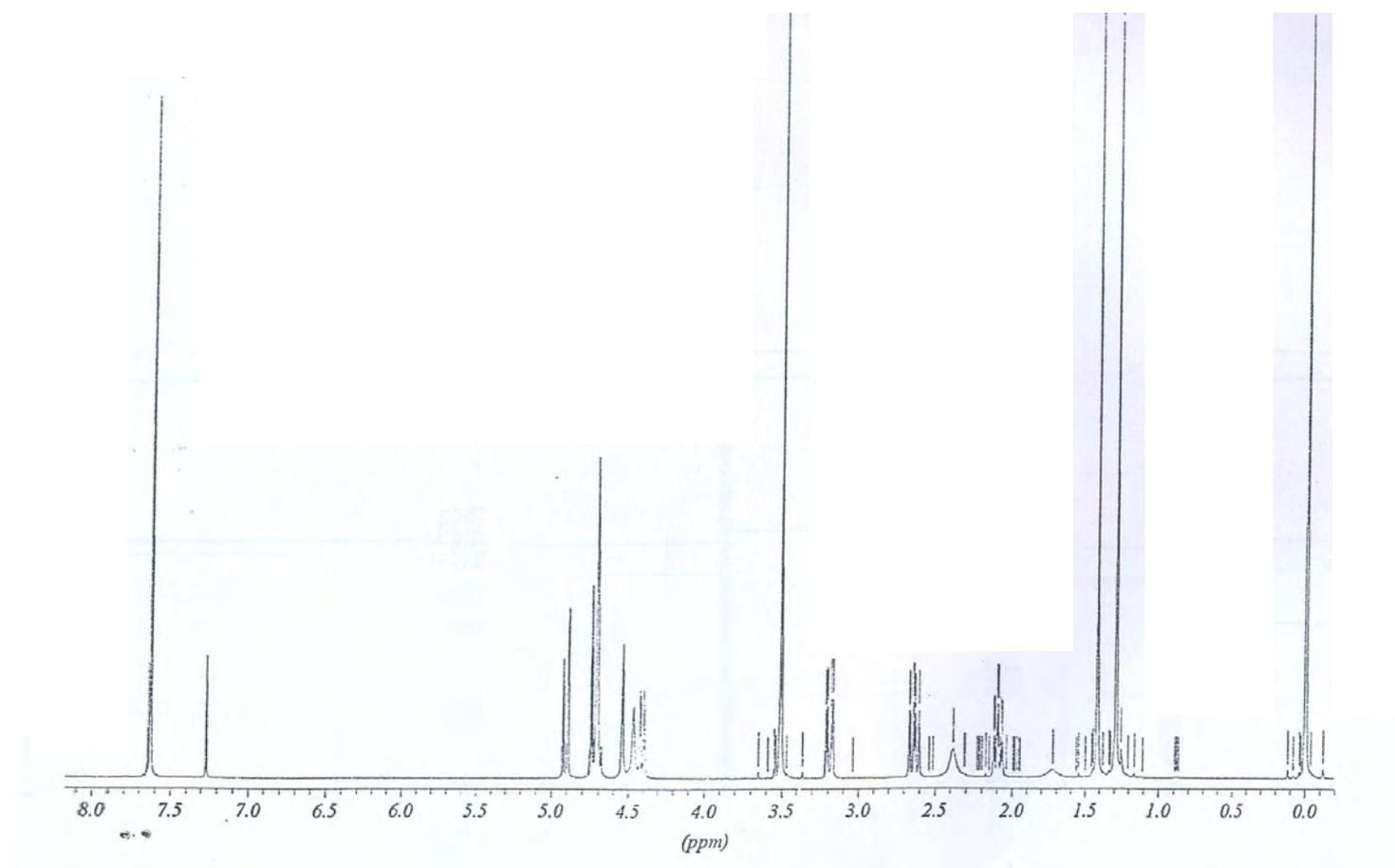


Figura 58 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância Emotina B, padrão interno TMS

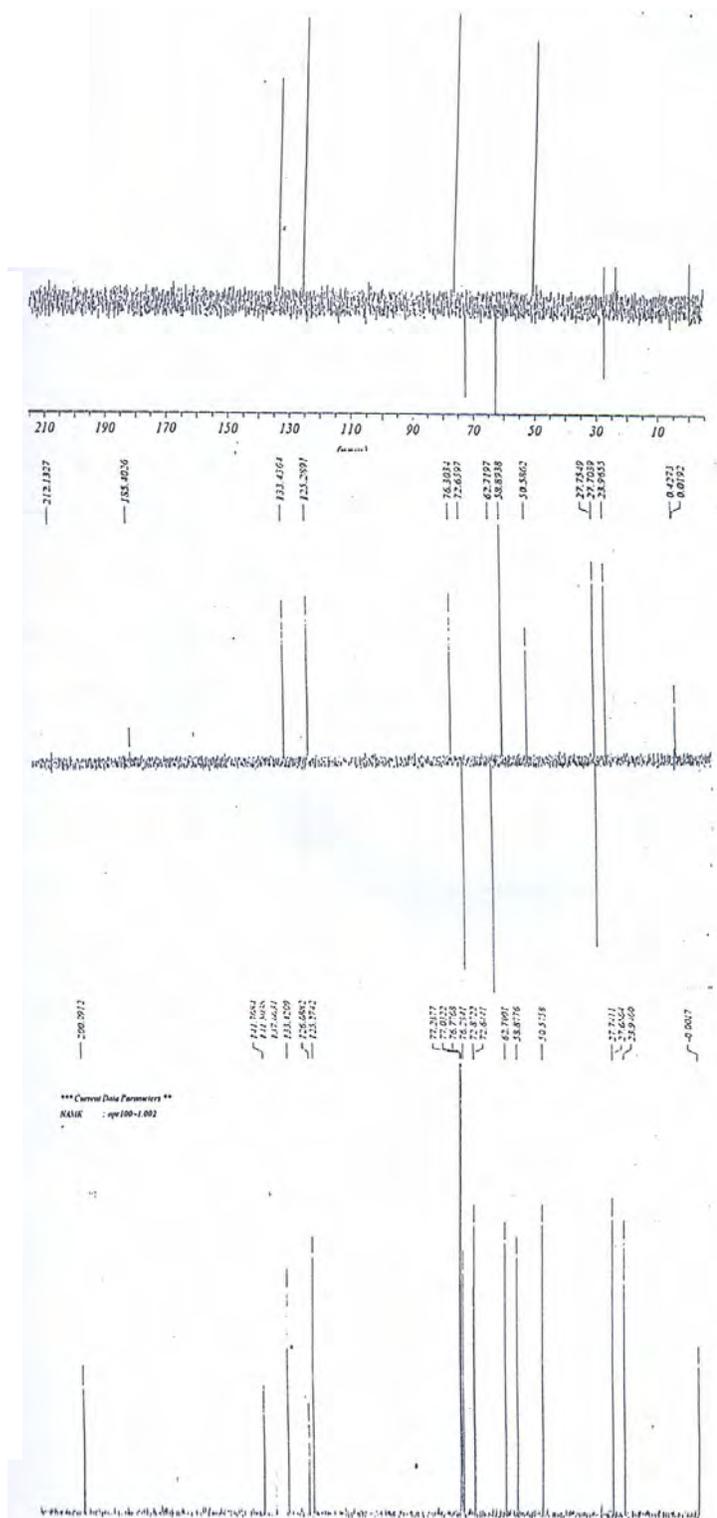


Figura 59 – Espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° em CDCl₃ a 125 MHz da substância Emotina B, padrão interno TMS

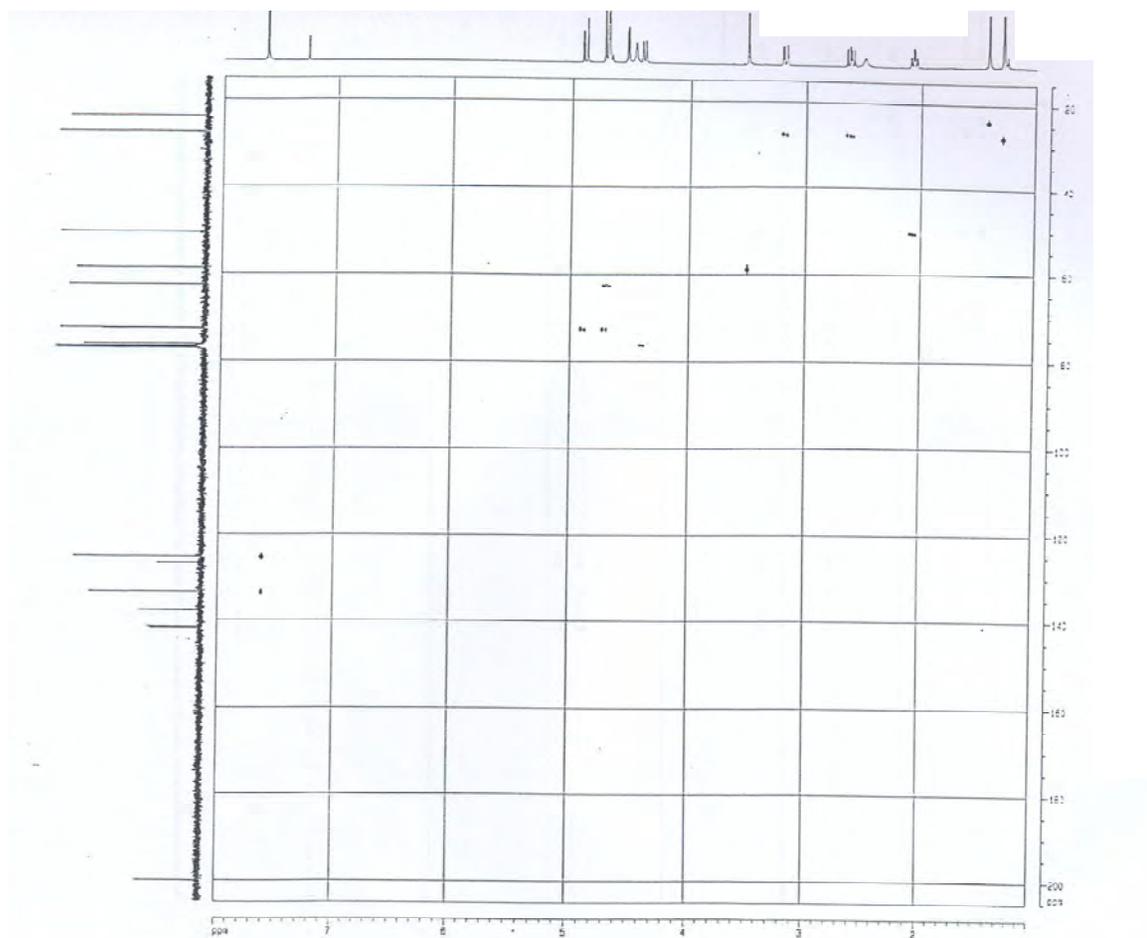


Figura 60 – Mapa de contornos da substância Emotina B

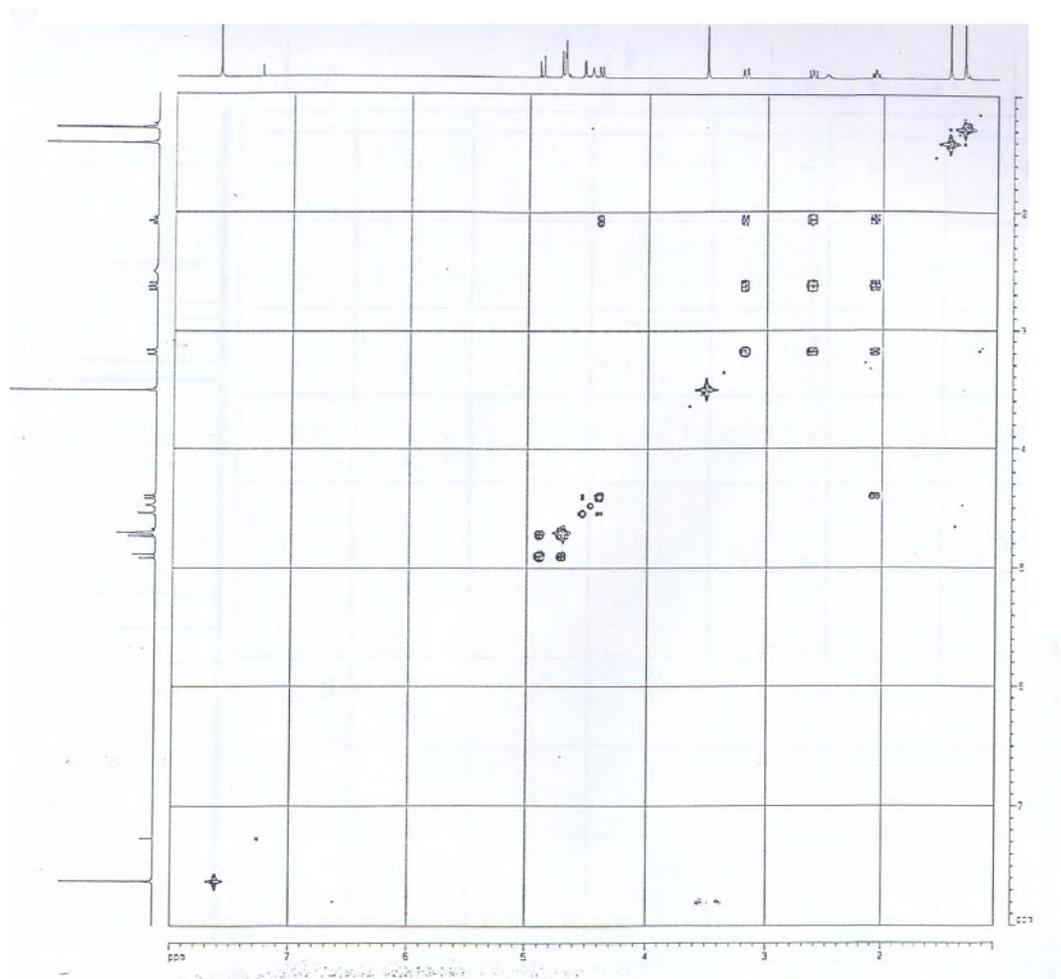


Figura 61 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina B

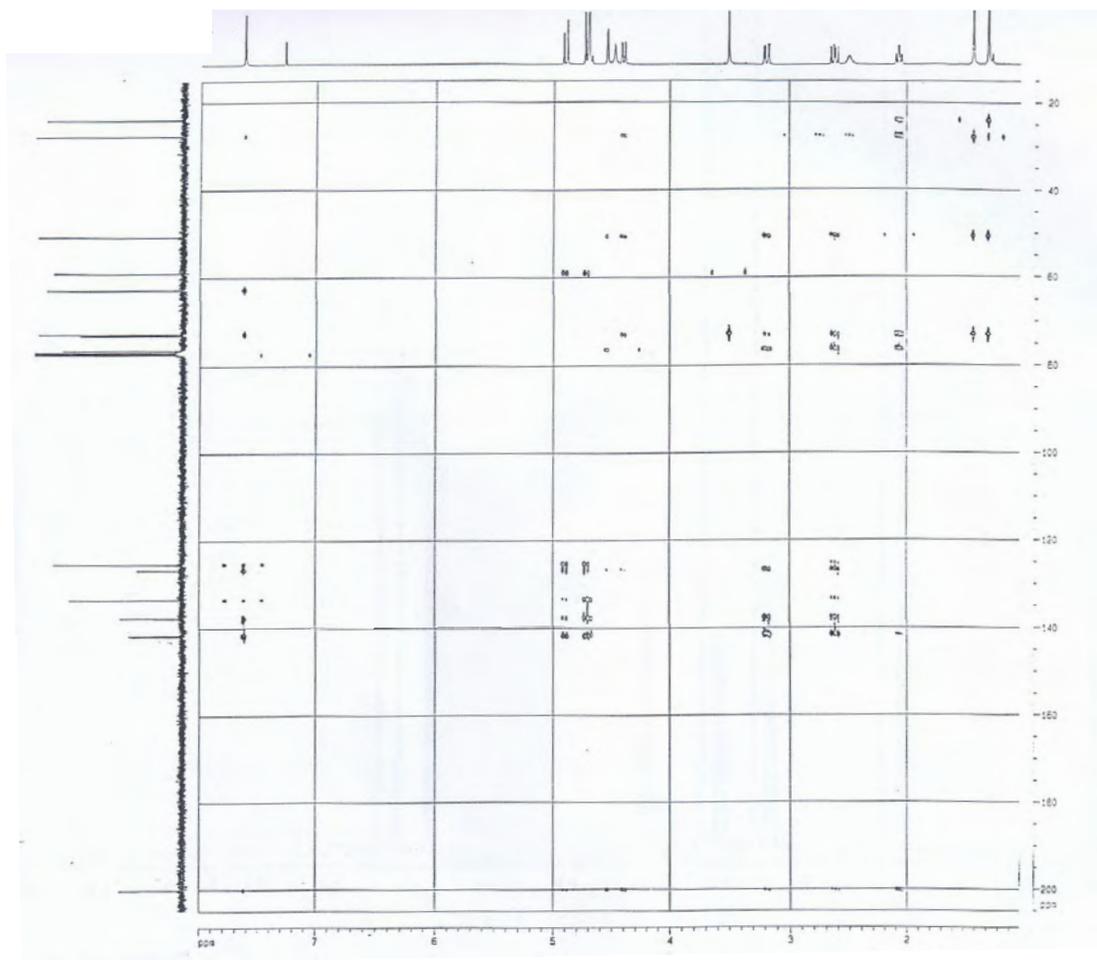


Figura 62 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina B

Tabela 29 - Dados de RMN da Emotina F em CDCl₃

Posição	¹ H	J em Hz	COSY	¹³ C	HMBC
1	-	-	-	200,37	2,16; 2,49; 2,60; 2,99; 4,38; 4,69; 7,05
2	4,38 dd 1H	12,61; 3,15	2,16; 4,69	76,09	2,16; 2,49; 2,99; 4,69
3	2,16 td 1H	12,61; 5,14	1,43 (f); 2,99; 4,38	50,22	1,30; 1,43; 2,49; 2,99; 4,38; 4,69
4	eq-2,99 dd 1H	17,34; 5,04	2,16; 2,49	29,03	1,30; 2,16; 4,38; 7,27
	ax-2,49 dd 1H	17,34; 12,61	2,16; 2,99		
4a	-	-	-	141,25	2,16; 2,27; 2,49; 2,99; 7,27
5	-	-	-	134,36	2,27; 2,49; 2,99; 7,05
6	7,27 d 1H	7,5	2,27 (f); 7,05	135,09	2,27; 7,05
7	7,05 d 1H	7,5	2,60 (f); 7,27	130,09	2,60; 7,27
8	-	-	-	138,96	2,60; 7,27
8a	-	-	-	127,97	2,49; 2,60; 2,99; 4,38; 7,05; 7,27
9	-	-	-	72,74	1,30; 1,43; 2,16; 2,49; 2,99; 4,38; 4,57
10 (11)	1,30 s 3H	-	4,57 (f)	27,81	1,43; 2,16; 4,57
11 (10)	1,43 s 3H	-	2,16 (f)	23,94	1,30; 2,16
12	2,27 s 3H	-	7,27 (f)	19,41	7,27
13	2,60 s 3H	-	7,05 (f)	22,20	7,05
OH-2*	4,69 d 1 H	3,15	4,38	-	-
OH-9*	4,57 s 1H	-	1,30 (f)	-	-

*O espectro de HMQC mostrou que os sinais desses hidrogênios não se acoplam a sinais de carbono; eq=quase-equatorial; ax=quase-axial; f (fraco)

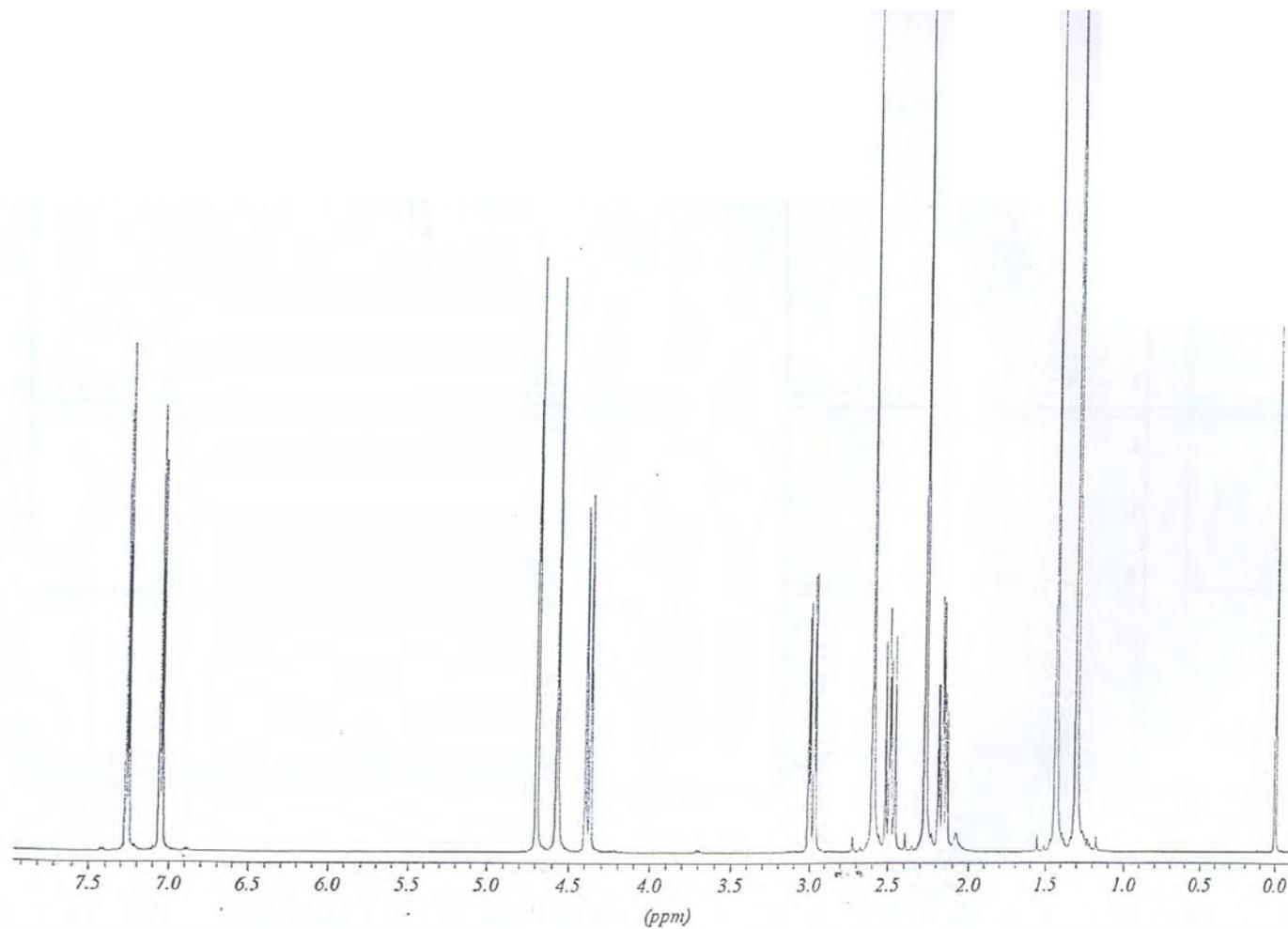


Figura 63 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz da substância Emotina F, padrão interno TMS

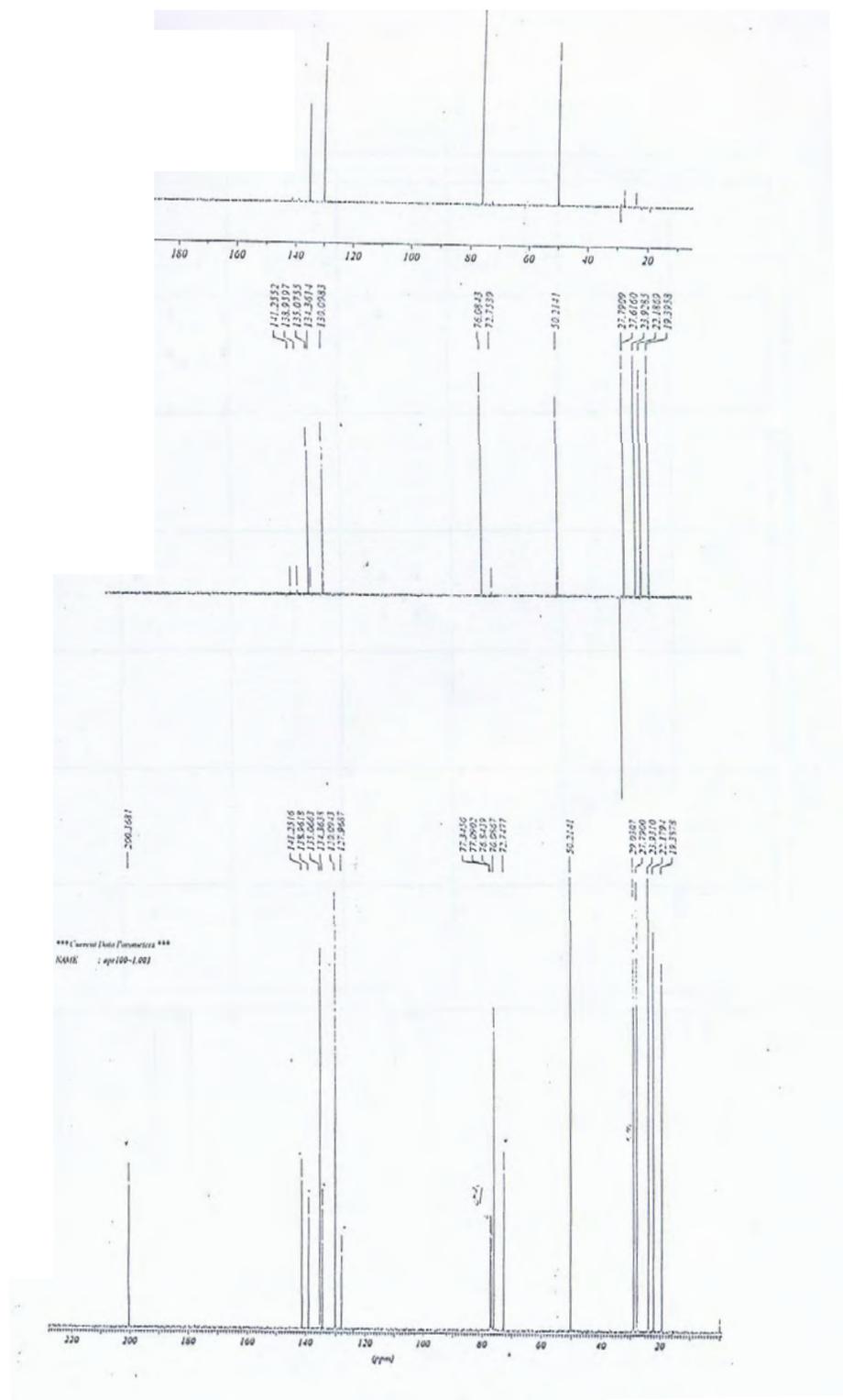


Figura 64 – Espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° em CDCl₃ a 125 MHz da substância Emotina F, padrão interno TMS

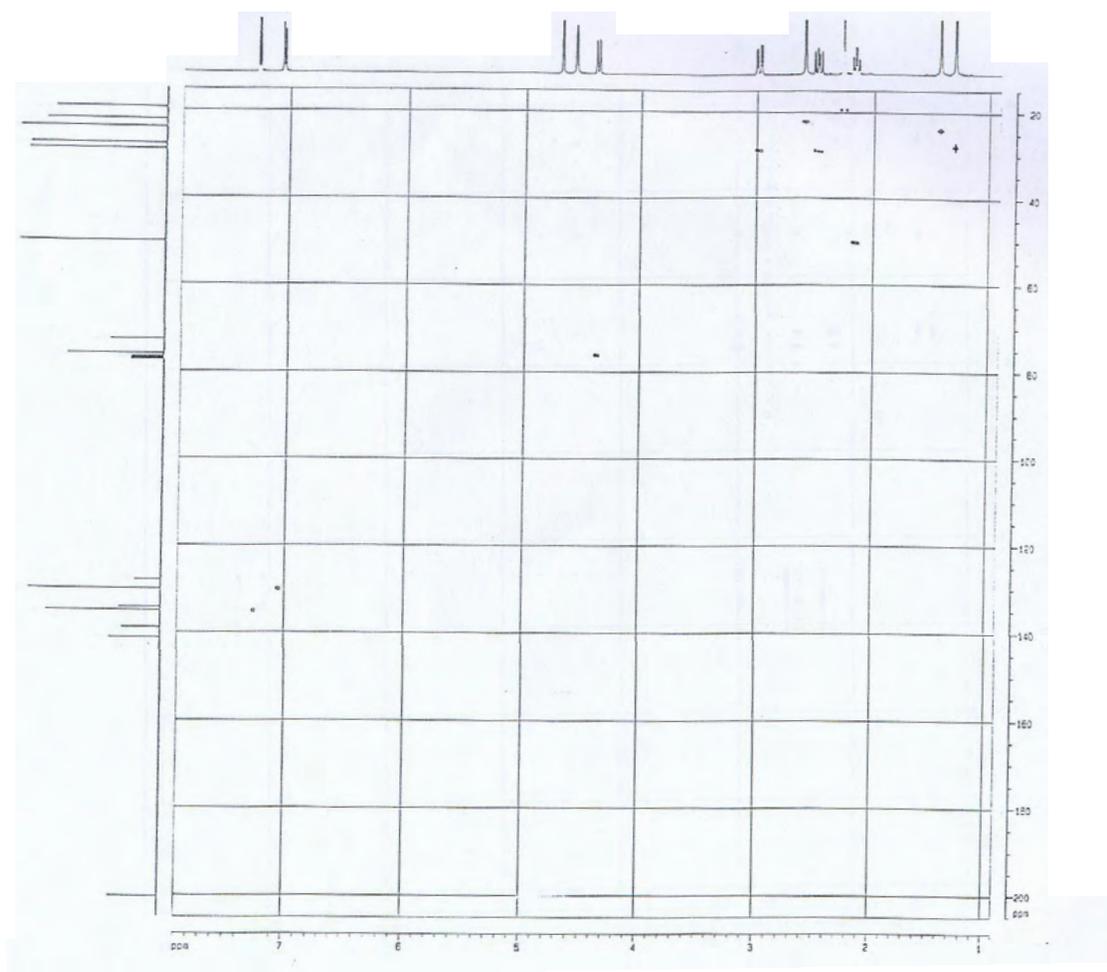


Figura 65 – Mapa de contornos HMQC da substância Emotina F

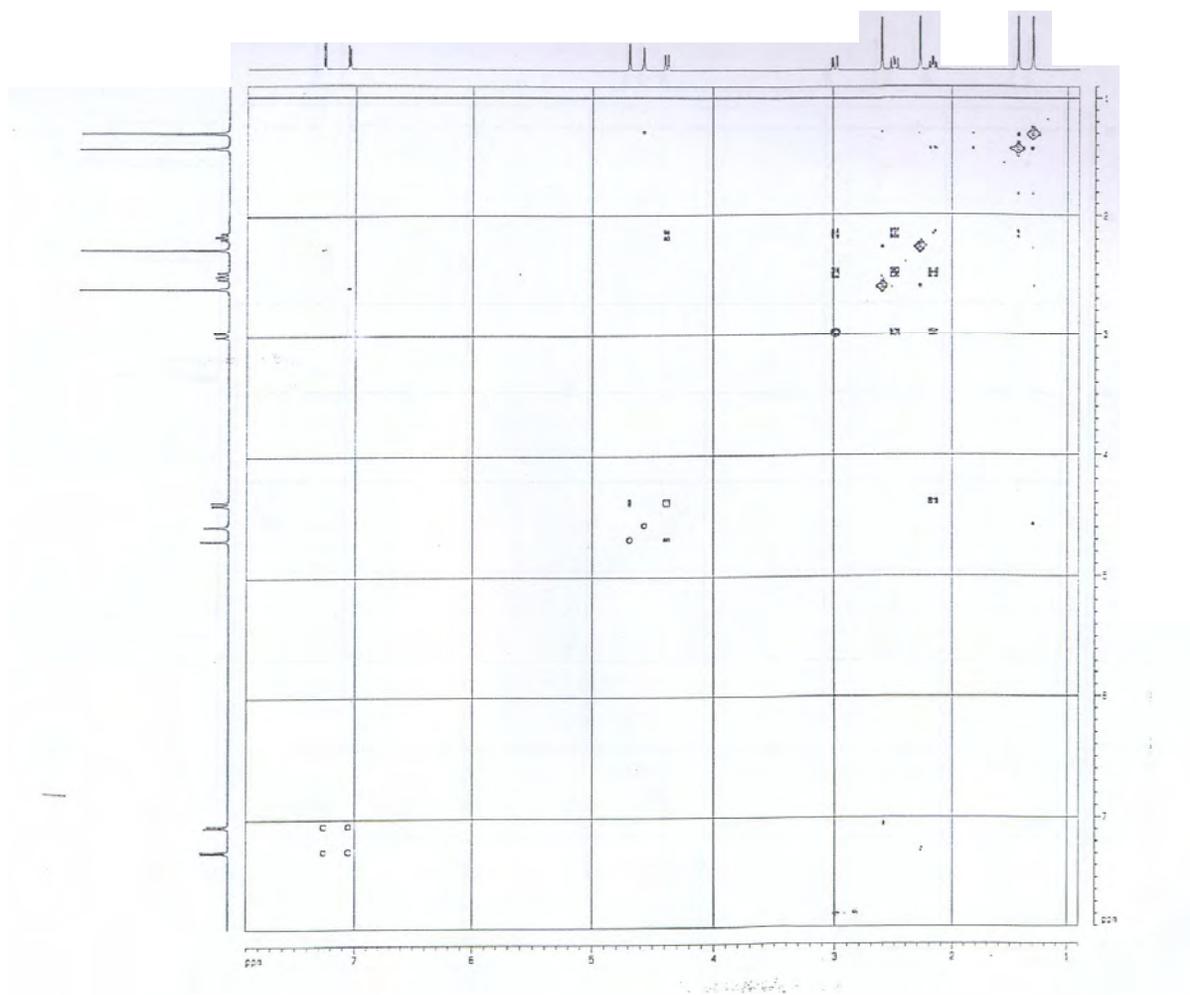


Figura 66 – Mapa de contornos COSY da substância Emotina F

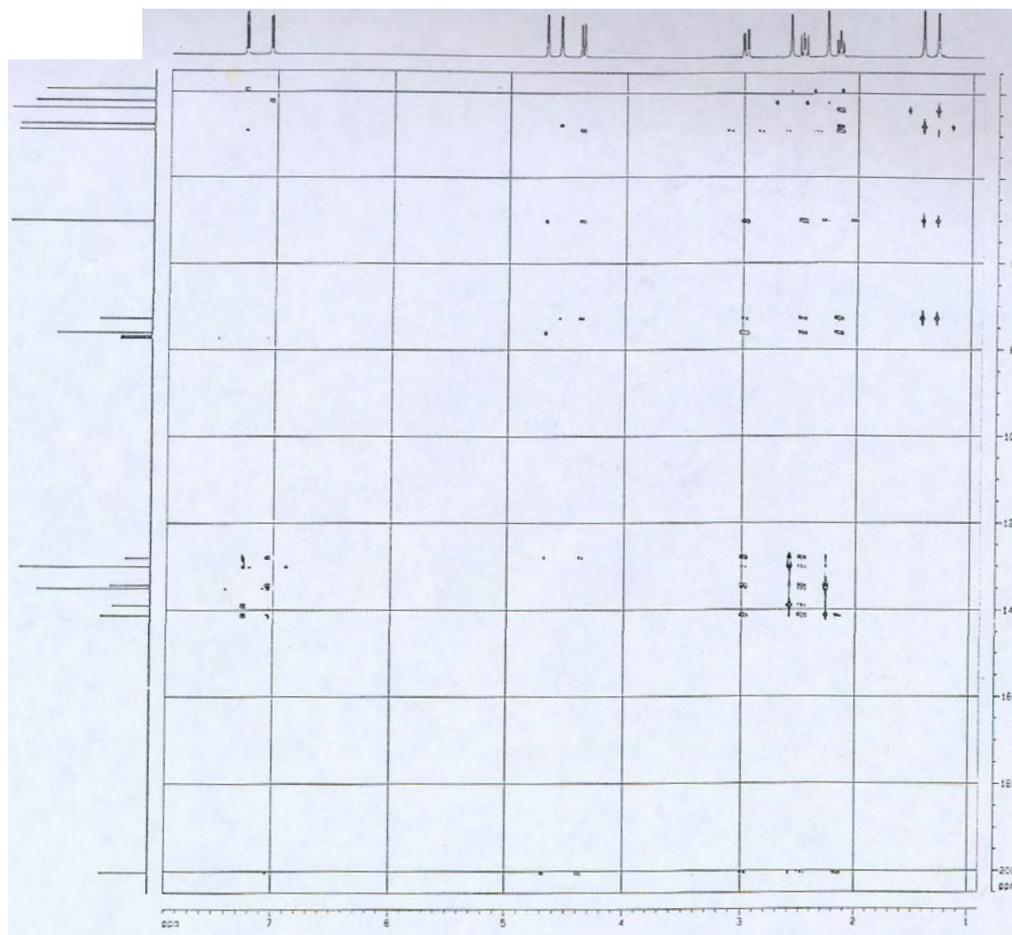


Figura 67 – Mapa de contornos HMBC da substância Emotina

III.3.3 – Emotina I

A substância emotina I foi isolada como cristais em forma de agulhas de cor vermelha (p.f. 192-194°C), seu espectro na região do infravermelho, obtido em solução de KBr, (**Figura 68, p. 157**) revelou a presença de uma banda característica de grupo OH (3450-3430 cm^{-1}), de grupo carbonílico (1635 cm^{-1}) e bandas de sistema aromático (1620, 1560, 1475 e 1440 cm^{-1}).

O espectro de RMN de hidrogênio (**Figura 69, p. 159**) a 500 MHz da emotina I, em CDCl_3 , é um espectro de primeira ordem. A região de campo baixo mostra a presença de quatro sinais simples em δ 12,46 (1H), δ 9,81 (1H), δ 7,18 (1H) e δ 3,77 (1H) e três sinais de hidrogênios aromáticos, sendo dois dupletos em δ 7,98 (1H) e δ 7,38 (1H), com uma constante de acoplamento $J = 8,0\text{Hz}$ sugerindo um acoplamento do tipo *orto* entre eles, e um sinal simples em δ 7,71 (1H). A região de campo mais protegido apresenta dois sinais simples, um em δ 2,83 (3H) e outro em δ 1,85 (6H), ambos característicos de grupos metílicos (**Tabela 30, p. 158**).

O mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da emotina I (**Figura 70 p. 160; Tabela 30 p. 158**) mostra que o hidrogênio cujo sinal é um duplete em δ 7,98 ($J = 8,0\text{ Hz}$) possui um acoplamento com o hidrogênio em δ 7,38 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$) e um acoplamento com o hidrogênio metílico aromático (δ 2,83). O hidrogênio em δ 7,38 acopla ainda com o hidrogênio carbonílico (δ 9,81) que também acopla com o hidrogênio hidroxílico em δ 12,46. Foi também observado um acoplamento escalar entre os hidrogênios aldeídico e hidroxílico em δ 12,46, através do oxigênio carbonílico, sugerindo a presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular. Evidência adicional da ligação de hidrogênio foi obtida através de um experimento VT (**Figura 71, p. 161**) á baixa temperatura, baseado na análise das mudanças de deslocamento químico dos hidrogênios aldeídico e hidroxílico a baixa temperatura.

A análise dos espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90°, obtidos em CDCl_3 , permitiu verificar para a emotina I um total de 14 sinais correspondentes a 15 átomos de carbono (**Figuras 72 p. 162, 73 p. 163 e 74 p. 164; Tabela 30 p. 158**). Destes, oito são quaternários, quatro são metínicos e três são metílicos. Os valores de deslocamento químico sugerem a presença de uma carbonila característica de aldeído (δ 197,36), dez carbonos aromáticos sendo sete quaternários (δ 147,86; δ 142,67; δ 140,49; δ 136,28; δ 129,32; δ 128,90 e δ 120,00) e três metínicos (δ 143,38; δ 124,02 e δ 113,32), um carbono saturado oxigenado (δ 73,07), um grupo metila aromático (δ 21,70) e dois grupos metílicos alifáticos

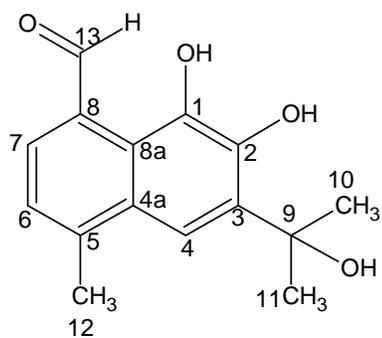
em δ 29,62 provavelmente ligados ao carbono oxigenado (δ 73,07), indicando a existência de um grupo hidroxiisopropila comum nas emotinas.

O mapa de contornos HMQC (**Figura 75, p. 165**) mostra os acoplamentos direto carbono-hidrogênio como indicado na **Tabela 30, p. 158**. O hidrogênio em δ 9,81 está conectado ao carbono carbonílico e não há acoplamento entre os hidrogênios em δ 12,46 (1H), δ 7,18 (1H) e δ 3,77 (1H) e qualquer dos átomos de carbonos da molécula, o que sugere que eles sejam de grupos hidroxílicos.

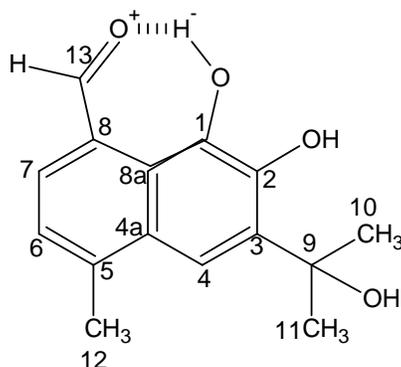
O mapa de contornos HMBC (**Figura 76 p. 166; Tabela 30, p. 158**) mostra uma correlação entre o carbono em δ 124,02 (conectado ao hidrogênio em δ 7,38) e os hidrogênios metílicos em δ 2,83; entre o carbono em δ 143,38 (conectado ao hidrogênio em δ 7,98) e o hidrogênio aldeídico em δ 9,81; entre o carbono carbonílico em δ 197,36 e o hidrogênio aromático em δ 7,98 e entre o carbono metílico em δ 21,70 com o hidrogênio aromático em δ 7,38, o que indica que os sinais em δ 124,02 e δ 143,38 correspondem aos carbonos 6 e 7 e ainda que a carbonila em δ 197,36 está conectada ao carbono na posição 8 e o grupo metila em δ 21,70 está ligado ao carbono na posição 5. A existência da ligação de hidrogênio sugere a presença do grupo hidroxila (δ 12,46) peri a carbonila e portanto conectado ao carbono na posição 1. A correlação do carbono quaternário oxigenado (δ 73,07) com as metilas alifáticas, confirma a presença de um grupo hidroxiisopropila e, a hipótese de biossíntese para as emotinas sugere que este grupo esteja conectado ao carbono na posição 3 (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; 1976). Correlação entre o carbono em δ 136,28 e os hidrogênios metílicos alifáticos em δ 1,85 indica que esse é o carbono 3. O mapa de contornos HMBC mostra ainda uma correlação entre o carbono em δ 140,49 e o hidrogênio hidroxílico em δ 7,18, e entre o carbono em δ 142,67 e os hidrogênios em δ 7,71 (aromático) e em δ 12,46 e δ 7,18 (hidroxílicos), isso sugere que os carbonos em δ 140,49; 142,67 e 113,32 são respectivamente, os carbonos 1, 2 e 4 e que o hidrogênio hidroxílico em δ 7,18 é o OH-2.

O mapa de contornos NOESY (**Figura 77 p. 167; Tabela 30 p. 158**) mostra um acoplamento entre o hidrogênio aromático em δ 7,71 (H-4) com o sinal dos hidrogênios da metila aromática ligada ao carbono-5 (H-12) e com as metilas alifáticas confirmando que esse é o hidrogênio 4 e o grupo hidroxiisopropila está conectado ao carbono 3.

A reunião de todas essas informações permitiu indicar para a emotina I a estrutura da página seguinte. Os valores de deslocamentos químicos dos demais carbonos foram determinados com base nas correlações obtidas no mapa de contornos HMBC.



Emotina I



Emotina I com Ligação de Hidrogênio

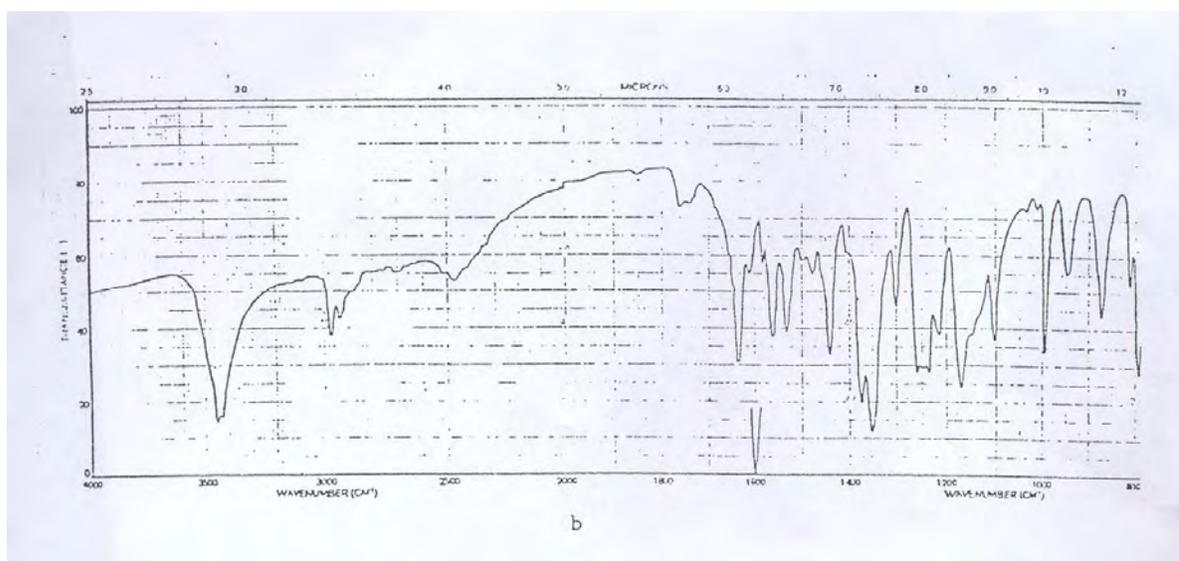


Figura 68 – Espectro na região do infravermelho da substância emotina I em KBr

Tabela 30 - Dados de RMN da Emotina I em CDCl₃

Posição	¹ H	J em Hz	COSY	¹³ C	HMBC	NOESY
1	-	-	-	140,49	7,18	-
2	-	-	-	142,67	7,18; 7,71; 12,46	-
3	-	-	-	136,28	7,18; 1,85	-
4	7,71 s 1H	-	-	113,32	-	1,85; 2,83
4a	-	-	-	129,32	9,81	-
5	-	-	-	128,90	2,83; 7,38	-
6	7,38 d 1H	8,00	7,98	124,02	2,83	2,83; 7,98
7	7,98 d 1H	8,00	7,38; 9,81(f)	143,38	9,81	7,38; 9,81
8	-	-	-	120,00	7,71; 7,98; 9,81	-
8a	-	-	-	147,86	2,83; 7,71; 7,98	-
9	-	-	-	73,07	1,85; 7,71	-
10, 11	1,85 s 6H	-	-	29,62	1,85	7,71
12	2,83 s 3H	-	-	21,70	7,38	7,38; 7,71
13	9,81 s 1H	-	-	197,36	7,98	7,98; 12,46
OH-1*	12,46 s 1H	-	-	-	-	9,81
OH-2*	7,18 s 1H	-	-	-	-	3,77
OH-9*	3,77 s 1H	-	-	-	-	7,18

*O espectro de HMQC mostrou que os sinais desses hidrogênios não se acoplam a sinais de carbono. f=fraco

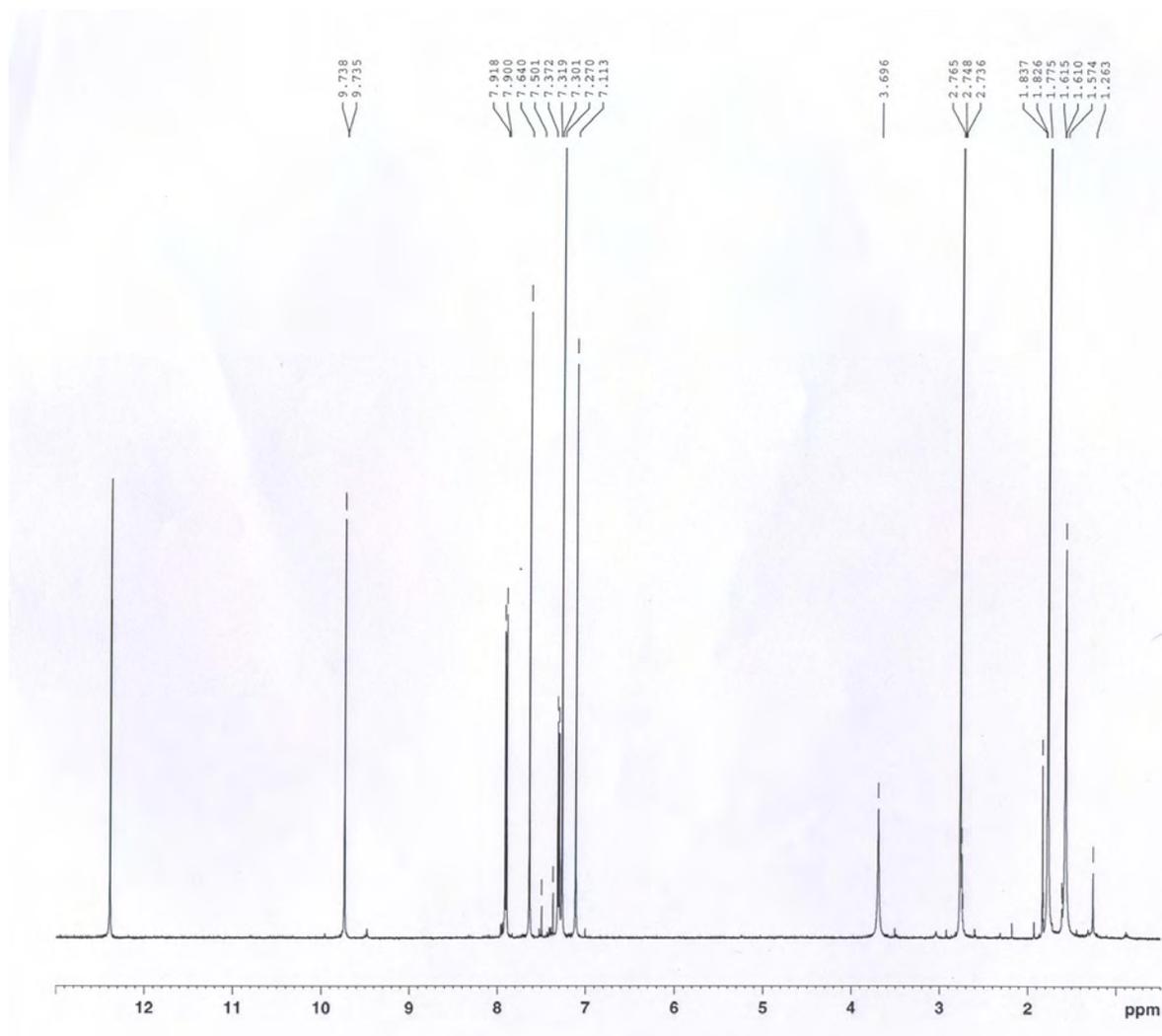


Figura 69 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl_3 a 500 MHz da substância emotina I, padrão interno TMS

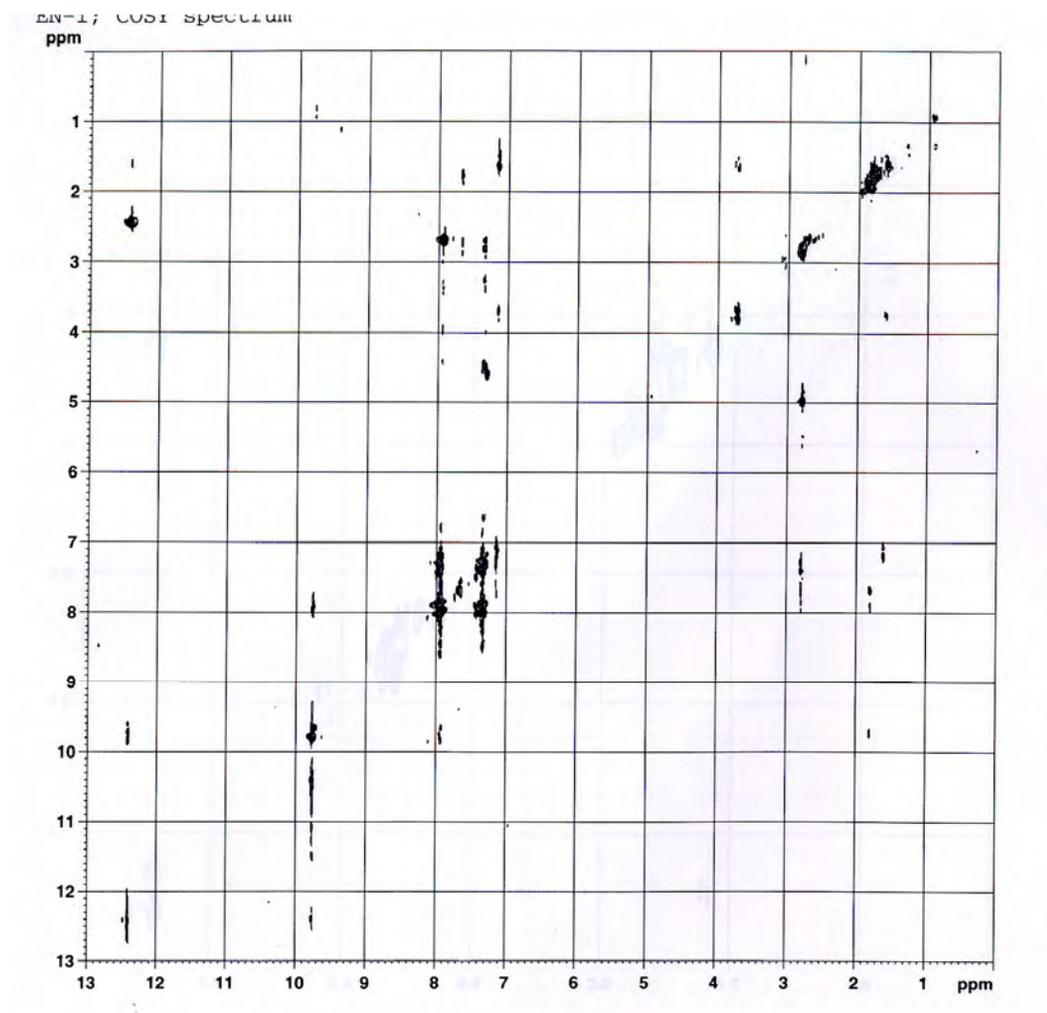


Figura 70 – Mapa de contornos COSY da substância emotina I

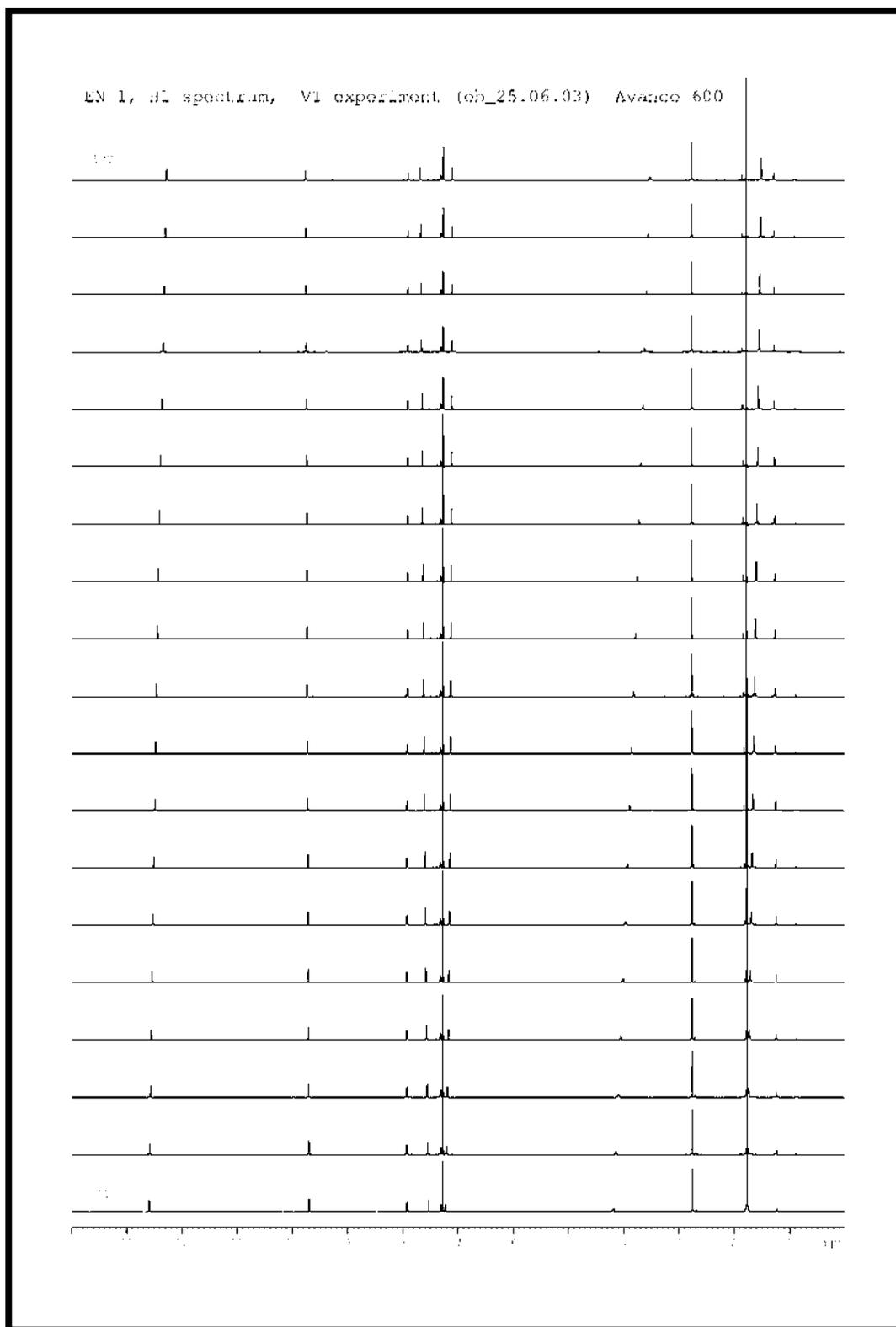


Figura 71 - Experimento VT a diferentes temperaturas da substância emotina

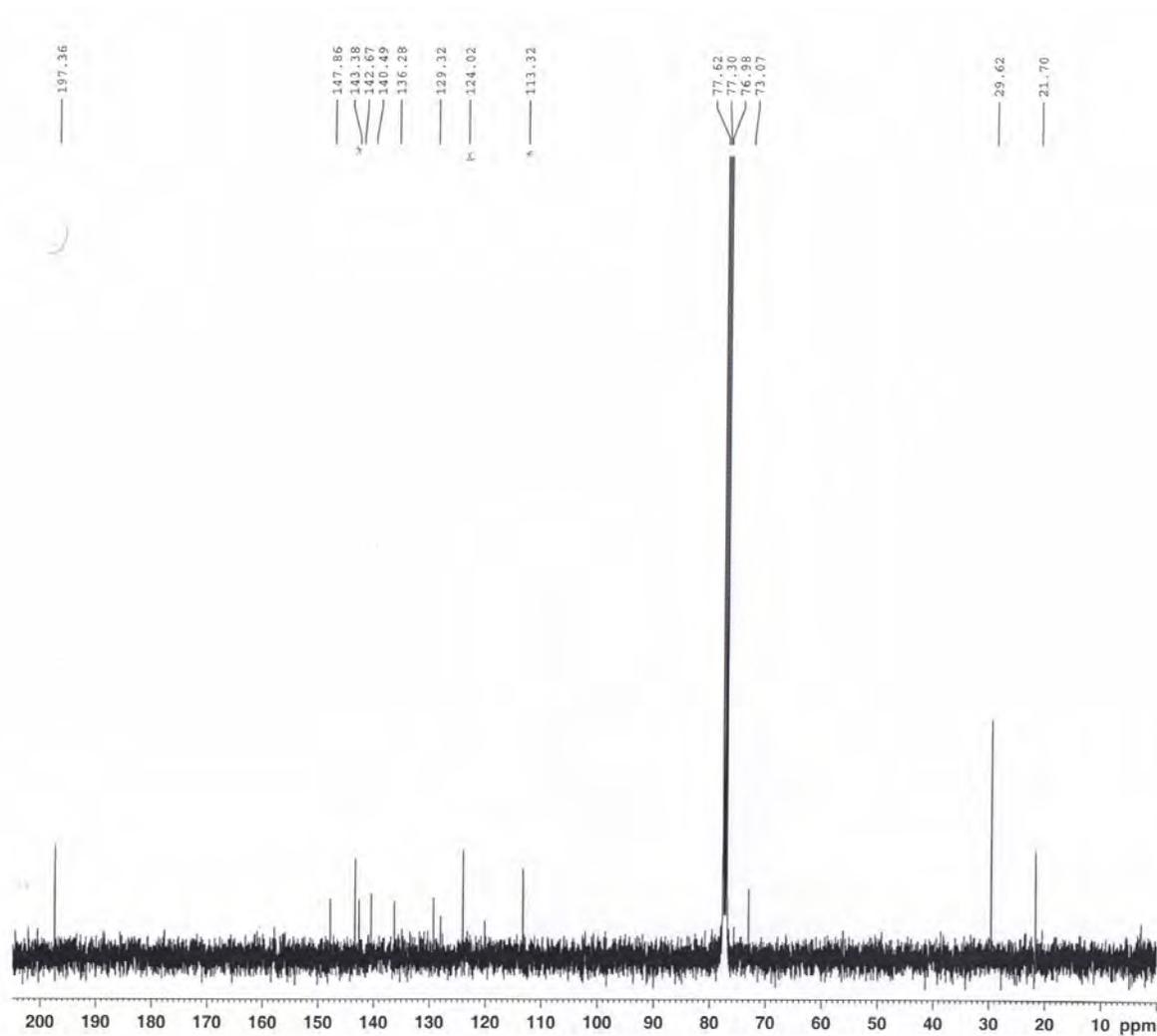


Figura 72 – Espectro de RMN de carbono em CDCl_3 a 125 MHz da substância emotina I, padrão interno TMS

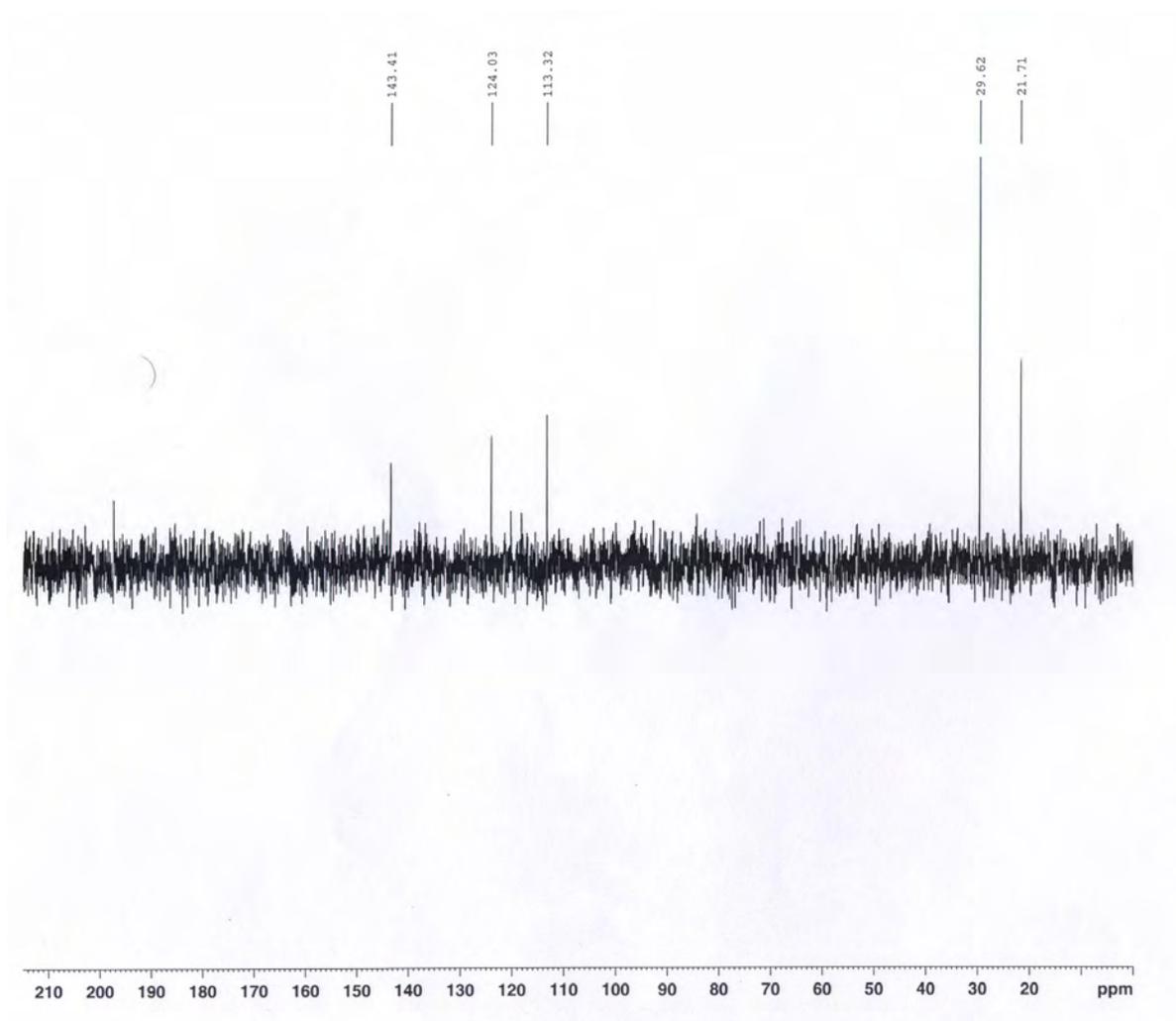


Figura 73 – Espectro de DEPT 135° da substância emotina I

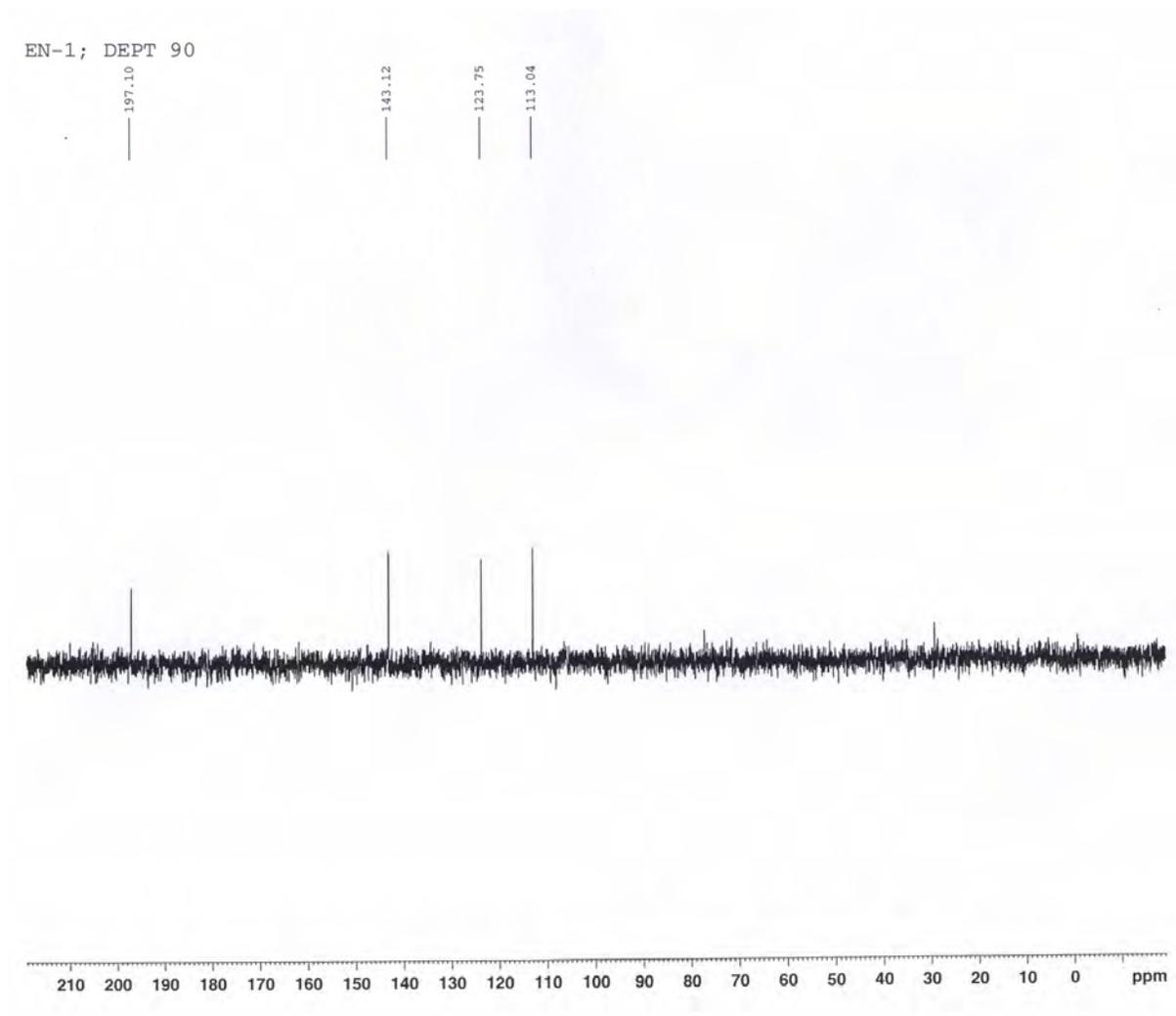


Figura 74 – Espectro de DEPT 90° da substância emotina I

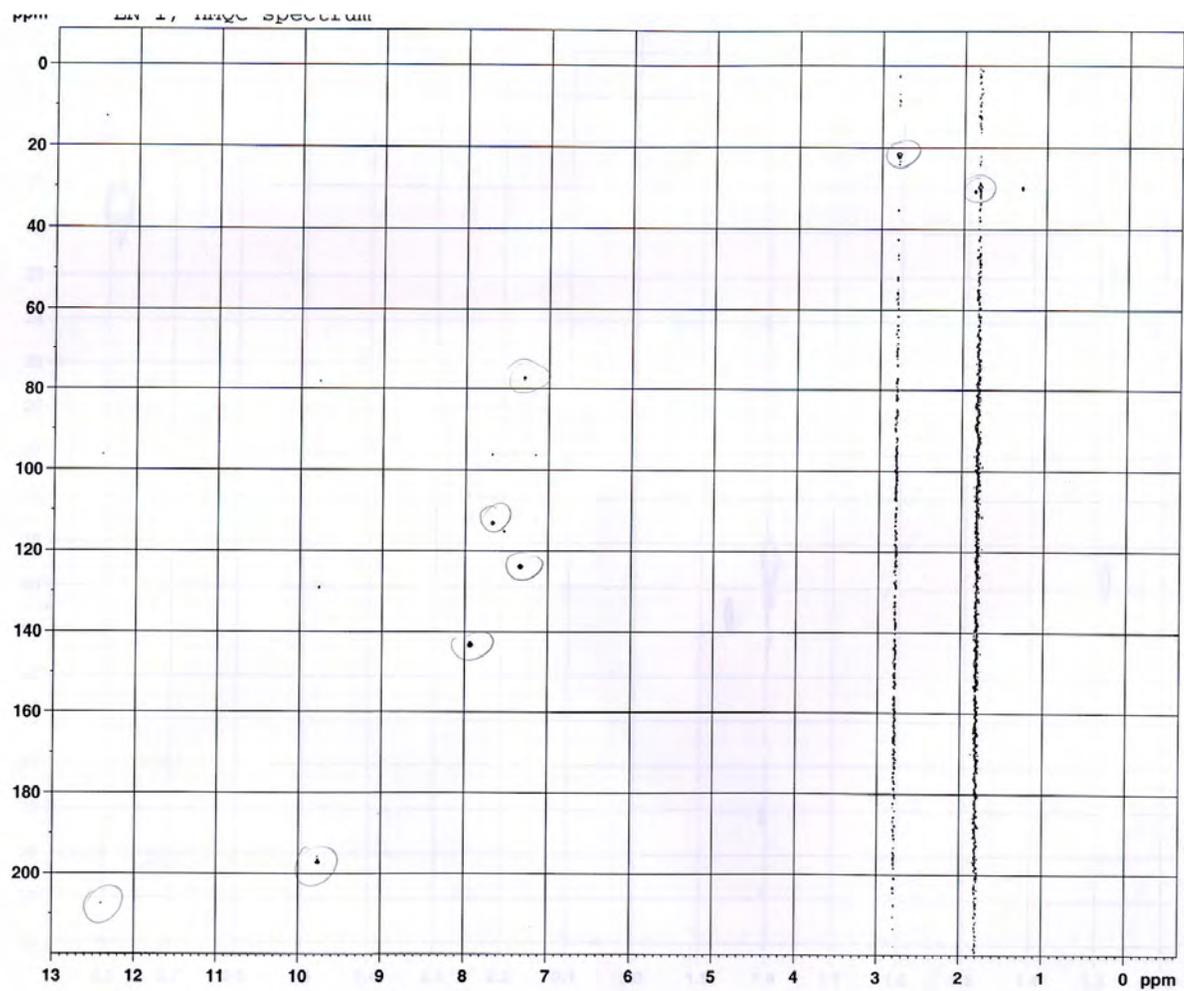


Figura 75 – Mapa de contornos HMQC da substância emotina I

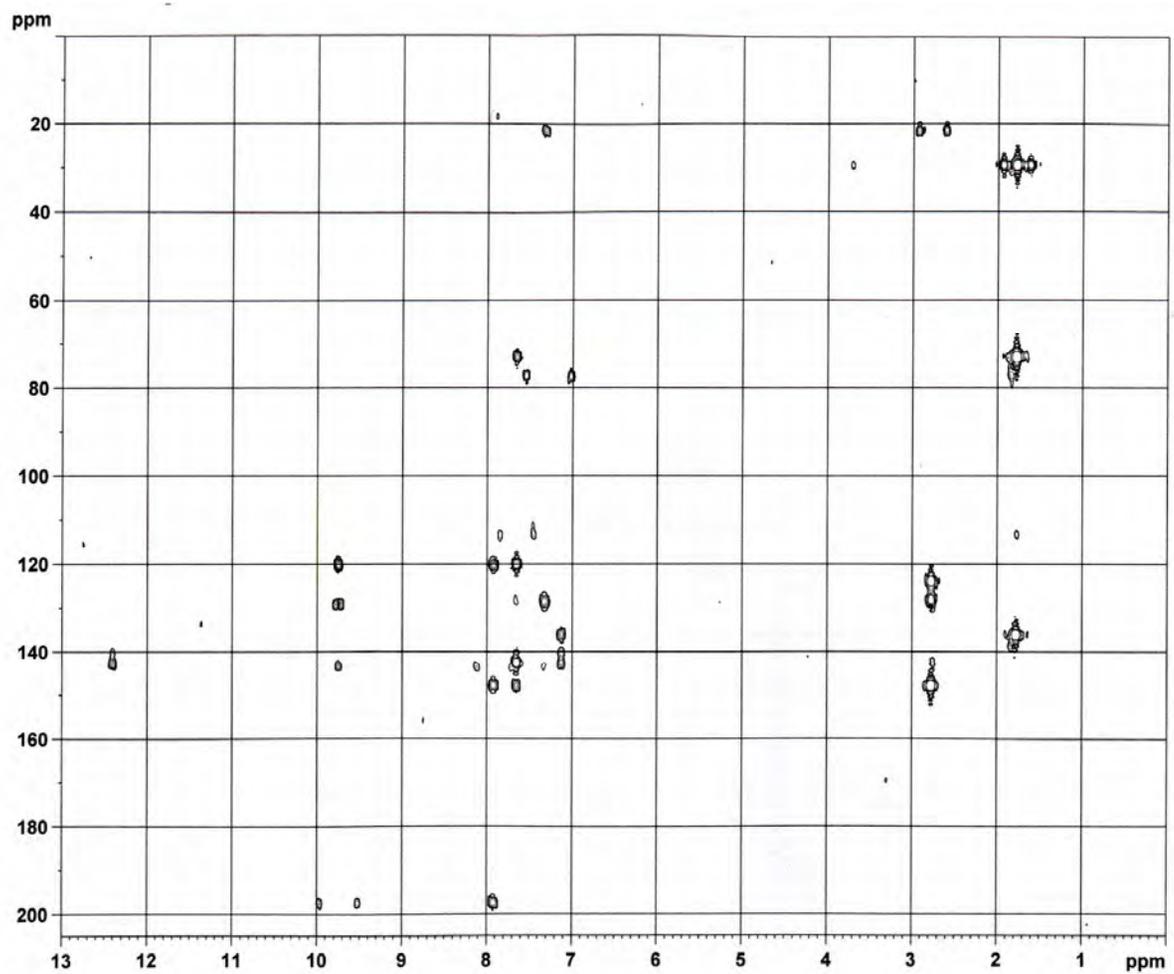


Figura 76 – Mapa de contornos HMBC da substância emotina I

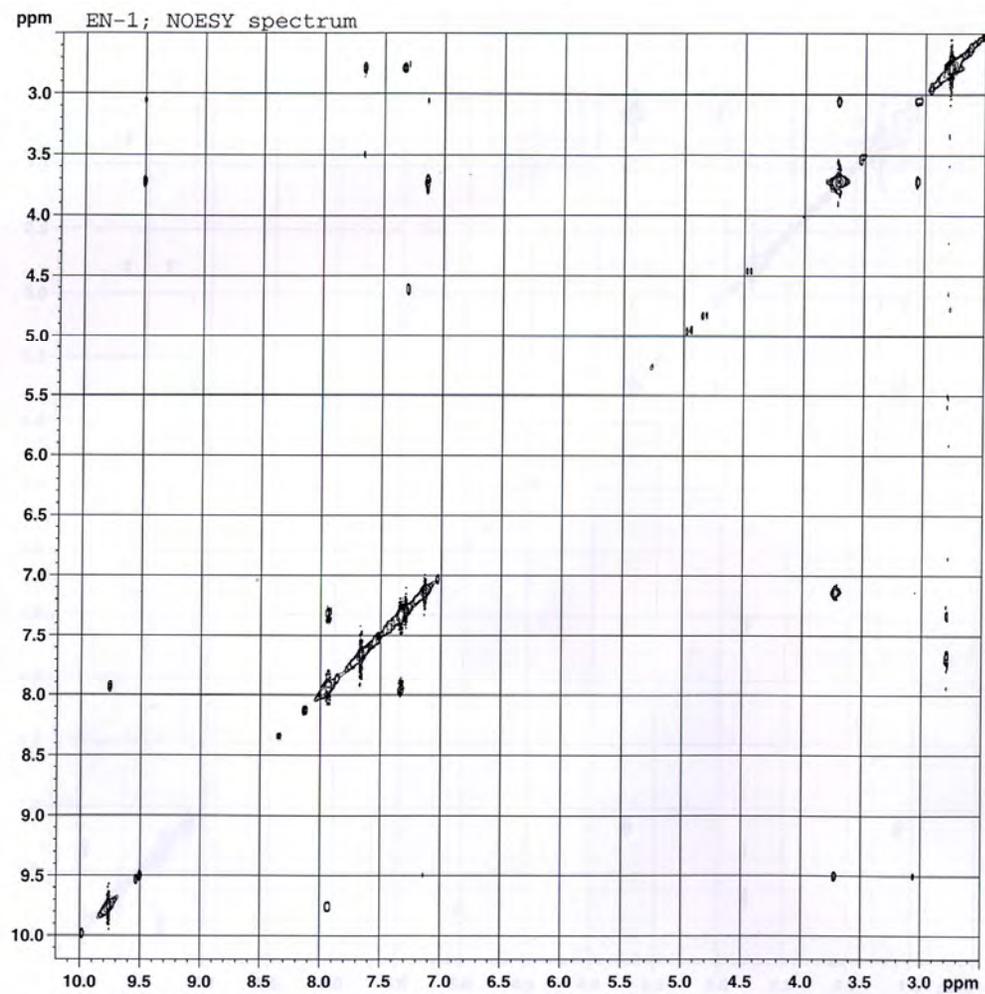


Figura 77 – Mapa de contornos NOESY da substância emotina I

A substância emotina I foi ativa no ensaio contra as larvas do mosquito *A. aegypti* com um valor de $CL_{50} = 11,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados dos testes de atividade estão descritos **Tabelas 31 e 32**.

Tabela 31 – Atividade da emotina I contra as larvas do mosquito *A. aegypti*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i>				
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	20,0	15,0	12,5	10,0	5,0
% de Mortalidade	90	70	53	40	23

Tabela 32 – Valores de concentrações letais da emotina I contra as larvas do *A. aegypti*

Organismo Teste	<i>B. glabrata</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
CL ₁₀	6,47
CL ₅₀	11,70
CL ₉₀	21,15

III.3.4 – Emotinol-1

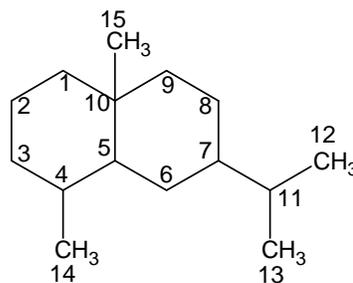
A substância emotinol-1 foi isolada como cristais em forma de agulhas de cor branca (p.f. 121-123°C, éter sulfúrico + n-hexano) e seu espectro na região do infravermelho, obtido em solução de KBr (**Figura 78 p. 171**), revelou a presença de uma banda característica de grupo OH ($3430\text{-}3330 \text{ cm}^{-1}$) e $\text{C} = \text{CH}_2$ (3050 cm^{-1}). O espectro de massas do emotinol-1 revelou os picos m/z 220 (5%), 202 (2%), 161 (5%), 59 (100%) e 41 (40%).

O espectro de RMN de hidrogênio (**Figura 79 p. 173**) a 500 MHz dessa substância mostra a presença de dois simpletos largos relativos a hidrogênios de um grupo metileno olefínico em δ 4,91 e δ 4,70, um quinteto referente a um hidrogênio carbinólico em δ 4,21 com uma constante de acoplamento igual a 3,0 Hz, o que evidencia esse hidrogênio em posição equatorial rodeado de dois grupos CH_2 - e portanto o grupo hidroxila em axial, dois sinais simples de grupos metílicos sendo um em δ 0,96 (3H) (grupo metila conectado a carbono de junção de anel) e outro em δ 1,24 (6H, grupo hidroxiisopropila) e sinais na região mais protegida entre δ 1,20-2,42 (δ 2,42 (2H); 1,84; 1,77; 1,69; 1,61; 1,60; 1,47; 1,40; 1,35; 1,26 e 1,20) (**Tabela 33, p. 172**).

A co-ocorrência desse composto com as emotinas descritas anteriormente fez supor que o mesmo apresenta um esqueleto carbônico dos eudesmanos já que aquelas têm esses como precursores biogênicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 1974; 1976).

A análise dos espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° (**Figuras 80, p. 174, 81 p. 175 e 82 p. 176; Tabela 33, p. 172**), obtidos em CDCl₃, revelou um total de 15 sinais relativos aos 15 átomos de carbono existentes nessa substância, dos quais três são quaternários, três são metínicos, seis são metilênicos e três são metílicos. Os valores dos deslocamentos químicos indicam entre os carbonos quaternários a presença de um carbono carbinólico (δ 73,28) e de um carbono com hibridização sp² (δ 147,16) que forma uma dupla terminal com o carbono metilênico em δ 109,28 e, entre os carbonos metínicos a presença de um carbono carbinólico em δ 69,71. Os carbonos metílicos apresentam um sinal em δ 19,00, referente a uma metila ligada a um carbono de junção de anel e os outros dois em δ 27,70 e em δ 27,52 ligados a carbono saturado que possui oxigênio, indicando a existência de um grupo hidroxiisopropila na molécula, o que é confirmado por espectrometria de massas através do pico m/z 59 [(CH₃)₂C =⁺OH]. Esses dados permitiram calcular um índice de deficiência de hidrogênio igual a três para o emotinol-1, sendo uma ligação dupla carbono-carbono e dois anéis alifáticos, e indicar para essa substância a fórmula molecular C₁₅H₂₆O₂ com pico m/z 220 referente ao fragmento formado através da perda de uma molécula de água do íon molecular.

O mapa de contornos HMQC (**Figura 83, p. 177**) mostra os acoplamentos direto carbono-hidrogênio como indicado na **Tabela 33 p 172**.



Esqueleto Eudesmano

O mapa de contornos COSY ¹H-¹H (**Figura 84 p. 178**) para o emotinol-1 mostra que o hidrogênio com sinal em δ 1,47 acopla com o hidrogênio cujo sinal é visto em δ 1,77 (acoplamento geminal) e com o hidrogênio carbinólico com sinal em δ 4,21 (acoplamento vicinal), esse último por sua vez, acopla também com o hidrogênio cujo sinal encontra-se em δ 2,42 (2H). O hidrogênio em δ 2,42 possui ainda uma correlação fraca com hidrogênio olefínico cujo sinal é encontrado em δ 4,91. Este núcleo em δ 4,91 apresenta também uma correlação com o hidrogênio olefínico com sinal em δ 4,70 (acoplamento geminal) indicando

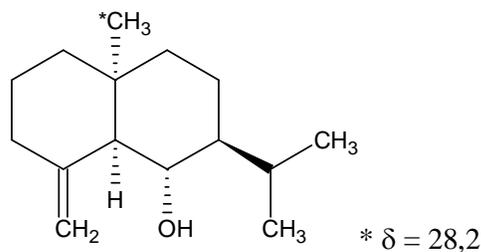
a presença de um grupo $R-CH_2-CH(OH)-CH_2-(R_1)C=CH_2$ e confirmando o carbono carbinólico entre dois grupos CH_2- como sugerido pelo espectro de hidrogênio. O mapa de contornos COSY evidencia ainda uma correlação entre o hidrogênio em δ 1,26 com os hidrogênios em δ 1,69 (acoplamento geminal), em δ 1,84 (metínico) e em δ 1,40 (metínico). O hidrogênio em δ 1,40 acopla também com os hidrogênios em δ 1,60 e em δ 1,20 que acoplam entre si. Há ainda uma correlação entre o hidrogênio em δ 1,20 e o hidrogênio em δ 1,61 e deste último com o hidrogênio em δ 1,35 (acoplamento geminal) (**Tabela 33 p. 172**) indicando a existência de um grupo $R-CH(R_1)-CH_2-CH(R_2)-CH_2-CH_2-R_3$. Como citado acima, o hidrogênio metínico em δ 1,84 possui apenas um acoplamento com o hidrogênio em δ 1,26 e por isso foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono da junção de anel (δ 50,64), já o hidrogênio metínico em δ 1,40 está vizinho a dois grupos $-CH_2$ e foi assim atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono que está conectado ao grupo hidroxipropila (δ 49,71).

O mapa de contornos HMBC (**Figura 85 p. 179**) evidencia um acoplamento entre o carbono em δ 50,64 (ligado ao hidrogênio em δ 1,84) com os hidrogênios em δ 1,47; 2,42; 4,91; 4,70 e 0,96 indicando que esse carbono é o carbono metínico da junção de anel, entre o carbono metílico em δ 19,00 (ligado ao hidrogênio em δ 0,96) e os hidrogênios em δ 1,77; 1,61 e 1,35 e também entre o carbono quaternário em δ 36,21 com os hidrogênios em δ 1,77 e 0,96 (grupo metílico) indicando que este é o carbono quaternário da junção de anel conectado a um grupo metila e a dois grupos metilênicos. Esse mapa mostra ainda uma correlação dos hidrogênios metílicos em δ 1,24 com os carbonos em δ 49,71 (metínico), δ 73,28 (carbinólico) e δ 27,70 e δ 27,52 (carbonos metílicos) o que confirma a existência de um grupo hidroxipropila conectado ao carbono metínico em δ 49,71 ligado ao hidrogênio em δ 1,40, entre outros acoplamentos (**Tabela 33 p. 172**). A presença do grupo hidroxipropila foi observada também no espectro de massas pela presença do pico m/z 59.

Os dados extraídos dos espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional para o emotinol-1 estão de acordo com o arranjo de um esqueleto do tipo eudesmano contendo dois grupos hidroxilas, sendo um localizado no carbono 2 e o outro no carbono 11, e uma ligação dupla entre os carbonos 4 e 14.

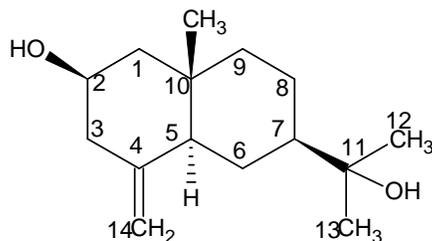
A estereoquímica no carbono-2 foi deduzida a partir da observação do sinal do hidrogênio carbinólico, este se apresenta como um quinteto com uma constante de acoplamento de 3,0 Hz o que caracteriza um hidrogênio em equatorial e, portanto, o grupo hidroxila em axial. O deslocamento do grupo metila em C-10 (δ 19,00) caracteriza uma junção *trans*, com o grupo metila em C-10 e o hidrogênio em C-5 em axial (OLIVEIRA *et al.*,

2000). No 10-epijunonol, um raro exemplo de eudesmano *cis* o valor do deslocamento químico para o carbono correspondente a este é de δ 28,2 (THOMAS *et al.*, 1976).



10-Epijunonol

O hidrogênio H-7 possui uma correlação espacial vista no mapa de contornos NOESY (Figura 86 p. 180; Tabela 33 p. 172) com o hidrogênio H-5 da junção de anel, o que indica que esses hidrogênios encontram-se próximos no espaço. Dessa forma, o hidrogênio-7 encontra-se em posição axial com o grupo hidroxiisopropila em equatorial que é a configuração mais comumente observada em sesquiterpenos do tipo eudesmano e é a mesma das emotinas A, B e F. Assim, o emotinol-1 possui a estrutura de um sesquiterpeno do tipo eudesmano.



Emotinol-1

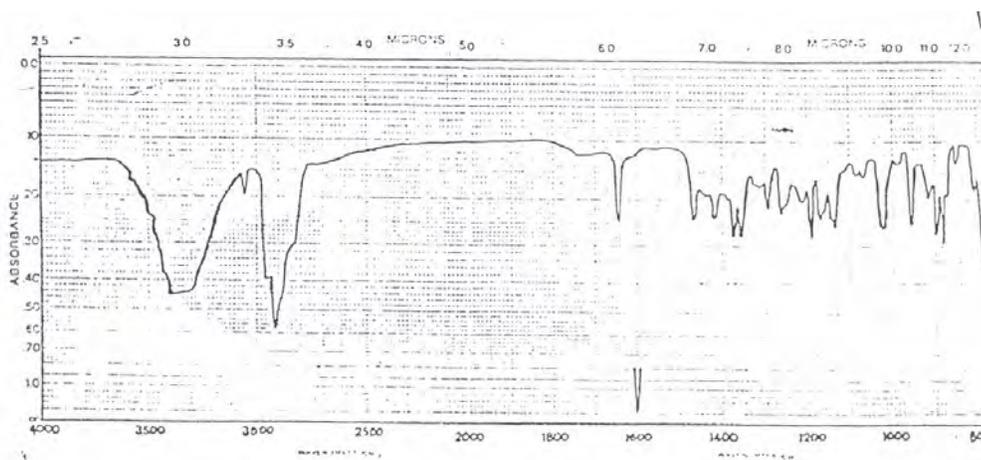


Figura 78 – Espectro na região do infravermelho da substância emotinol-1 em KBr

Tabela 33 - Dados de RMN da Emotinol-1 em CDCl₃

Posição	¹ H	J em Hz	COSY	¹³ C	HMBC	NOESY
1	eq-1,77	3,0	1,47	48,16	0,96	0,96; 4,21
	ax-1,47		1,77; 4,21			4,21
2	4,21(qt)	3,0	1,47; 2,42	69,71	1,77; 2,42	1,47 (f); 1,77; 2,42
3	2,42 (2H)		4,70; 4,91(f)			44,91
4	-		-	147,16	2,42	-
5	1,84		1,26	50,64	1,47; 2,42; 4,70; 4,91; 0,96	1,40; 2,42
6	eq-1,69		1,26	25,07	-	1,24; 4,70
	ax-1,26	1,40; 1,69; 1,84	4,70			
7	1,40		1,20; 1,26; 1,60	49,71	1,24	1,84
8	eq-1,60		1,20; 1,40	41,45	1,77; 0,96	1,20
	ax-1,20	1,40; 1,60	1,60			
9	eq-1,61		1,35	22,00	-	1,35; 0,96
	ax-1,35	1,20; 1,61	1,61; 0,96			
10	-		-	36,21	1,77; 0,96	-
11	-		-	73,28	1,24	-
12 *	1,24		-	27,70	1,24	1,69
13*	1,24		-	27,52	1,24	1,69
14	eq-4,91		2,42 (f); 4,70	109,28	2,42	2,42; 4,70
	ax-4,70	2,42; 4,91	1,26; 1,69; 4,91			
15	0,96		-	19,00	-	1,35; 1,61; 1,77

f=fraco, *Esses sinais podem estar interconvertidos, ax=axial, eq=equatorial, qt=quinteto

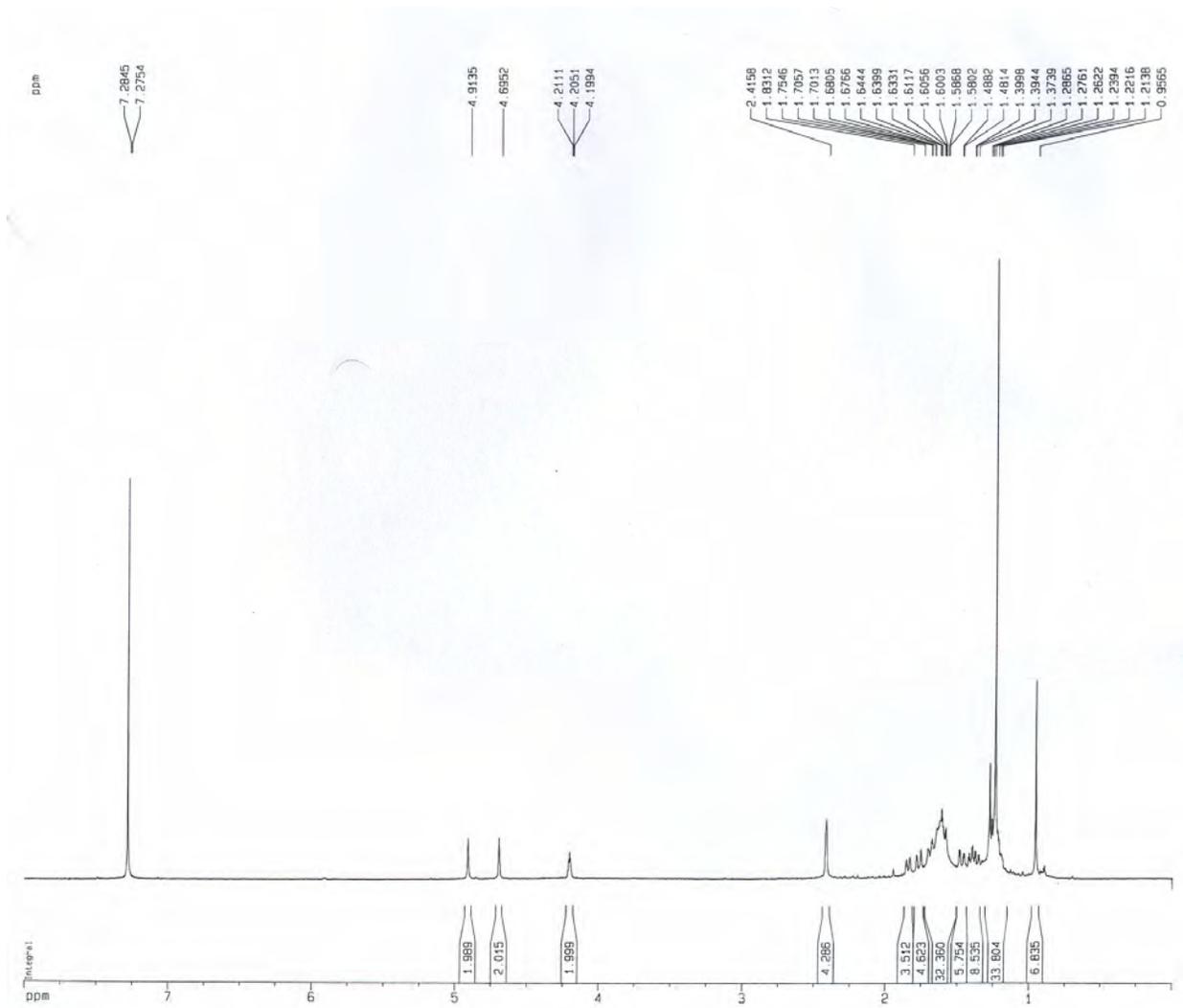


Figura 79 – Espectro de RMN de hidrogênio em $CDCl_3$ a 500 MHz da substância Emotinol-1, padrão interno TMS

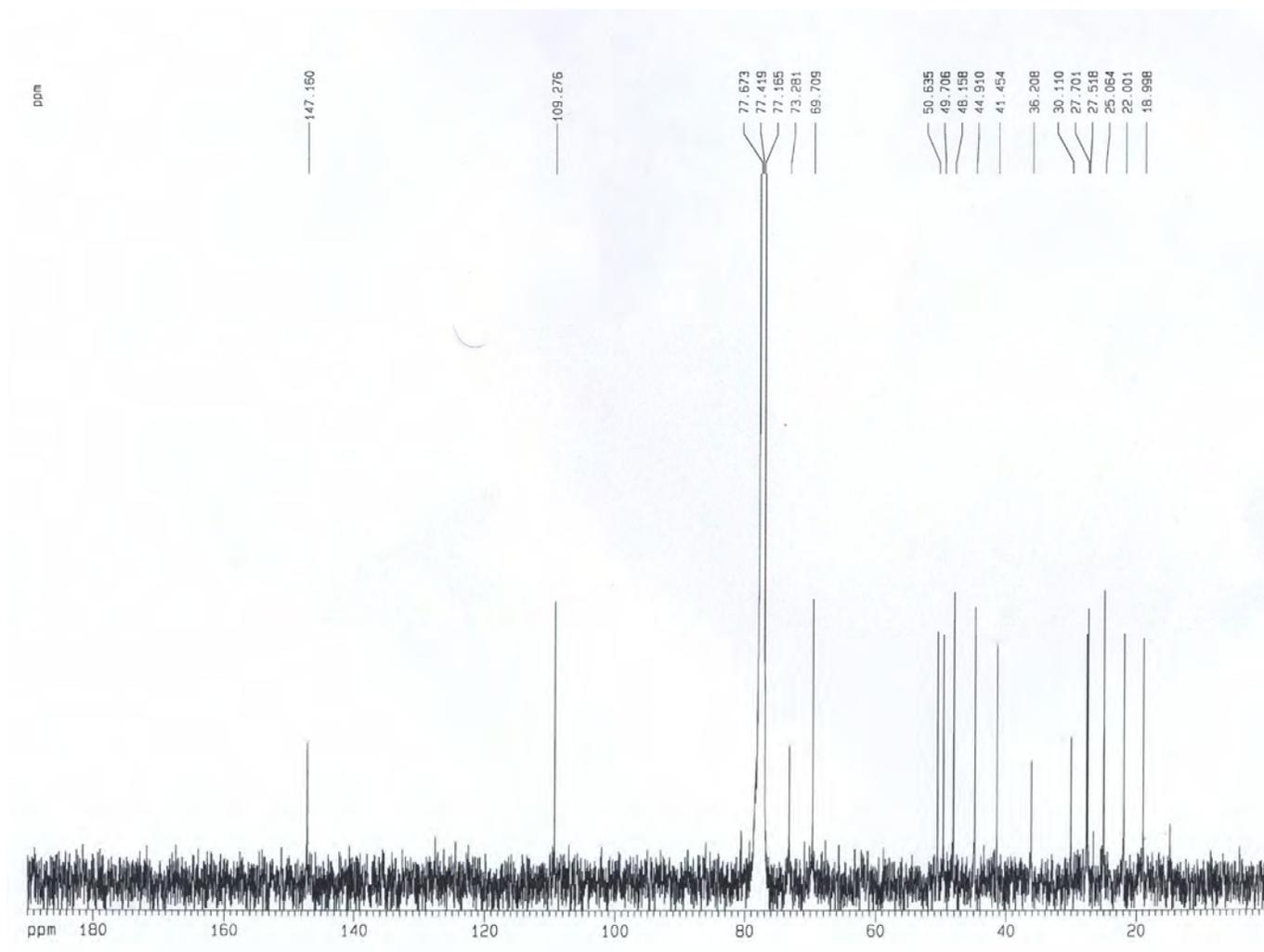


Figura 80 – Espectro de RMN de carbono em $CDCl_3$ a 125 MHz da substância emodinol-1 , padrão interno TMS

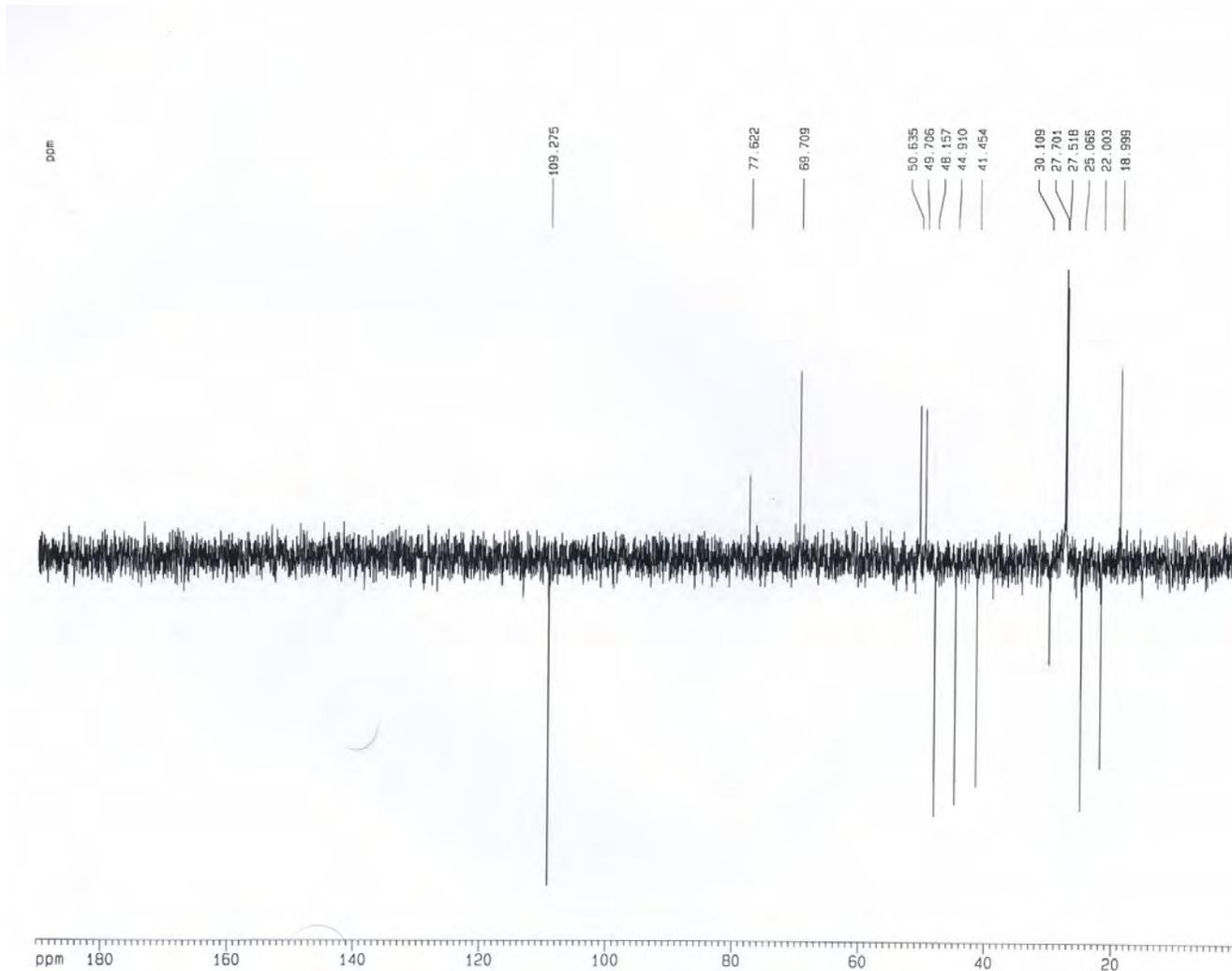


Figura 81 – Espectro de DEPT 135° da substância emotinol-1

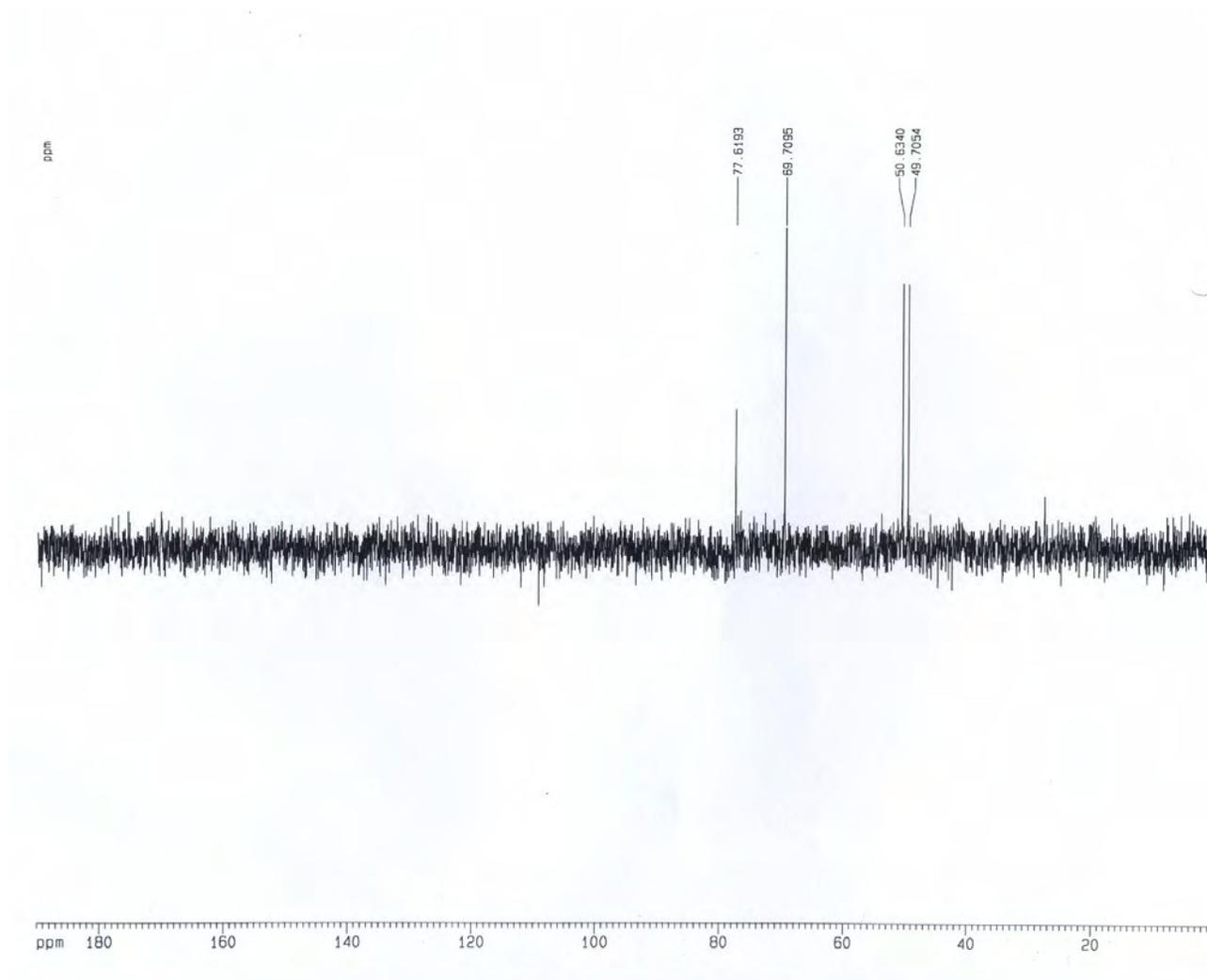


Figura 82 – Espectro de DEPT 90° da substância emotinol-1

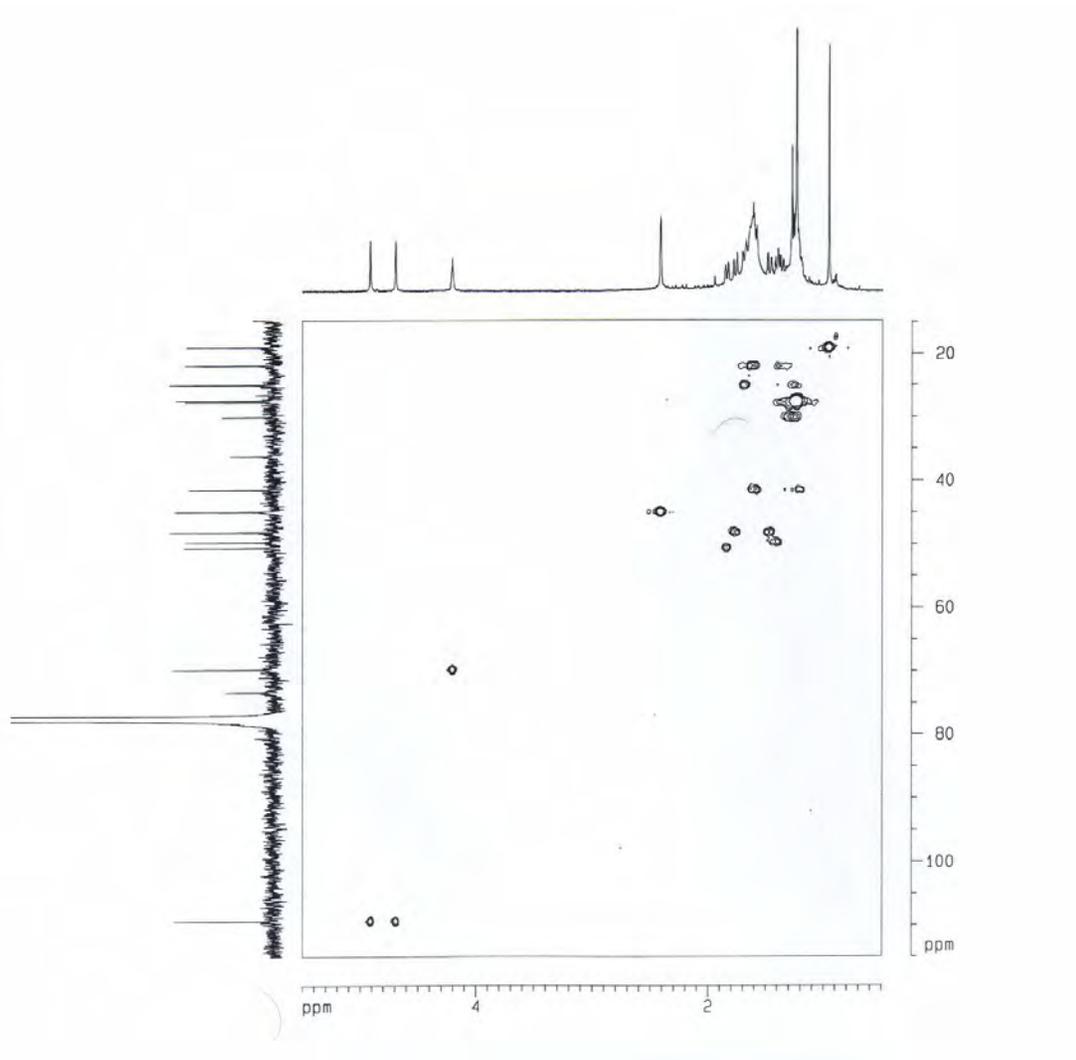


Figura 83 – Mapa de contornos HMBC da substância emotinol-1

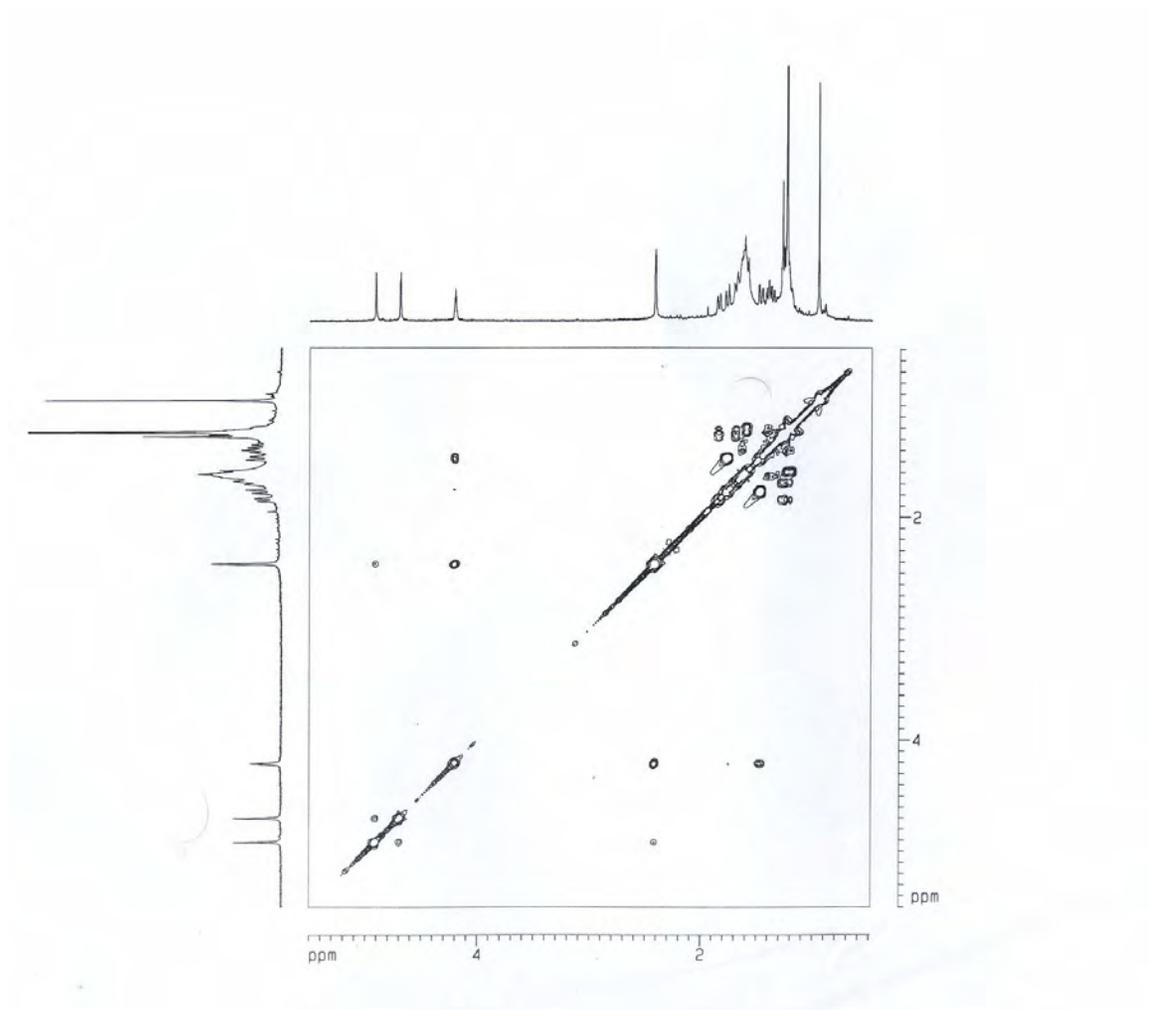


Figura 84 – Mapa de contornos COSY da substância emotinol-1

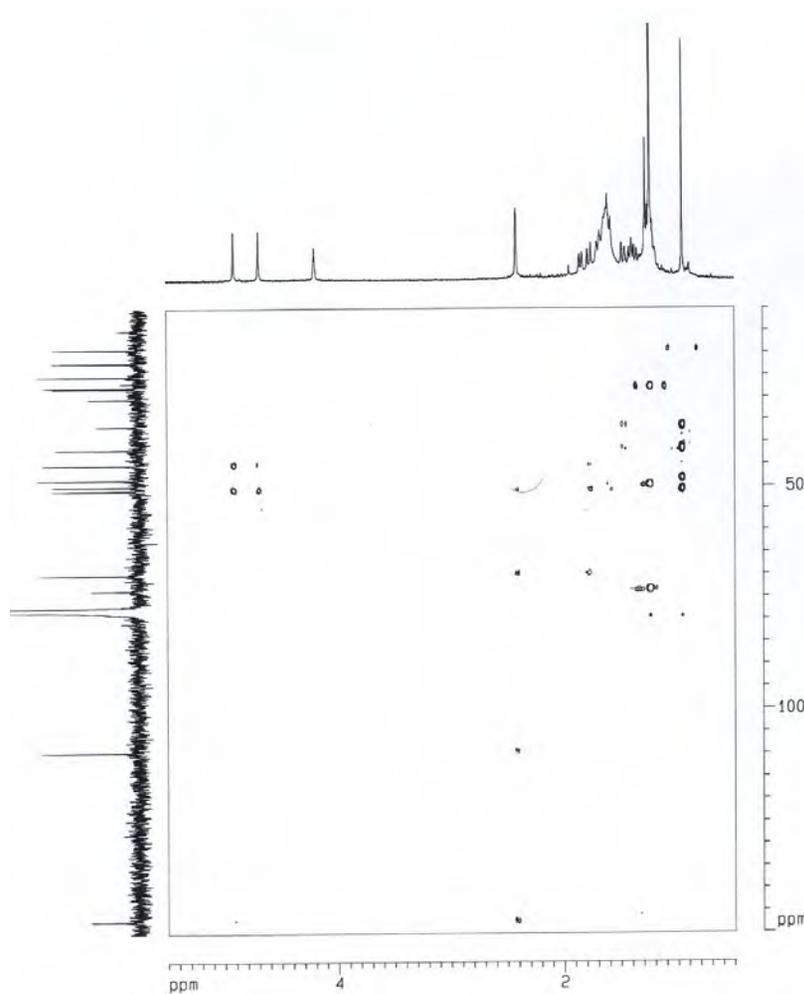


Figura 85 – Mapa de contornos HMBC da substância emotinol-1

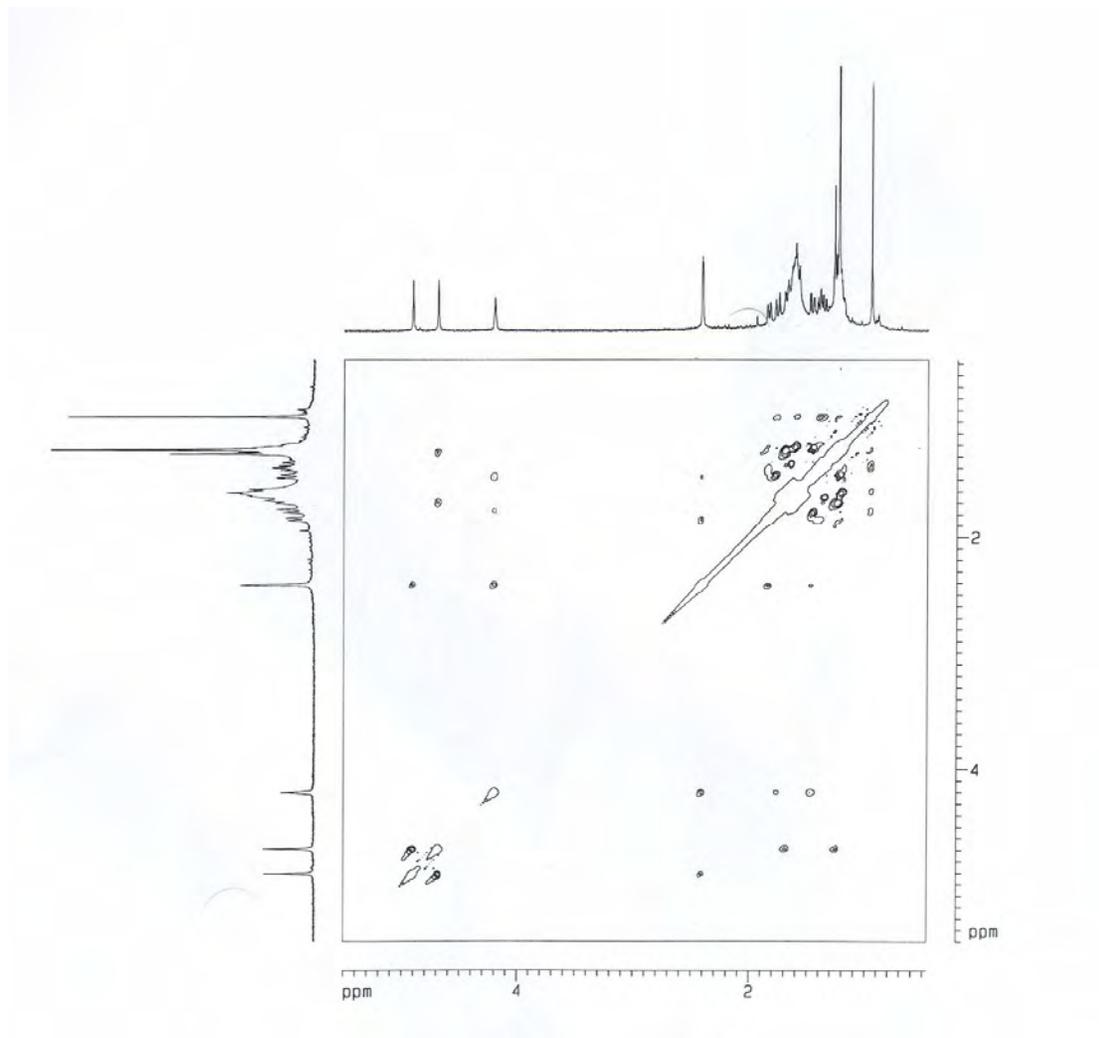


Figura 86 – Mapa de contornos NOESY da substância emotinol-1

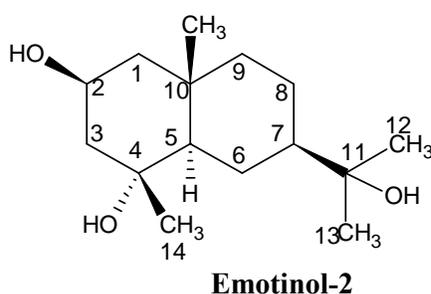
III.3.5 – Emotinol-2

O emotinol-2 foi isolado como um óleo de cor amarelada. O espectro dessa substância na região do infravermelho, obtido em solução de KBr (**Figura 87 p. 182**), revelou a presença de uma banda característica de grupo OH (3400 cm^{-1}). O espectro de massas do emotinol-2 revelou os picos m/z 256 (1%, íon molecular), 220 (5%), 161 (5%), 59 (100%) e 41 (40%). Os espectros de RMN de hidrogênio a 500 MHz (**Figura 88, p. 184; Tabela 34, p. 183**) e RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° a 125 MHz (**Figuras 89 p. 185, 90 p. 186 e 91, p. 187; Tabela 34, p. 183**) do emotinol-2 relacionam-se àqueles do emotinol-1 indicando uma semelhança estrutural entre essas substâncias. Dentre as feições espectrais comuns no espectro de hidrogênio citam-se a presença de um sinal de hidrogênio carbinólico em δ 4,29 com uma constante de acoplamento igual a 3,4 Hz, evidenciando esse hidrogênio em posição equatorial e conseqüentemente o grupo hidroxila em axial, um sinal de grupo metila em δ 20,62 (ligado ao hidrogênio em δ 1,14) conectado ao carbono de junção de anel em δ 34,36 indicando um acoplamento do tipo *trans* na junção de anel e outros dois em δ 28,06 e em δ 26,84 de grupo hidroxiiisopropila, confirmado por espectrometria de massas através do pico m/z 59 [$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{OH}^+$]. No entanto, o emotinol-2 não apresenta sinais característicos de hidrogênios olefínicos, mas apresenta um sinal correspondente a um grupo metílico em δ 25,31 e outro de um carbono carbinólico em δ 72,26 não existentes no emotinol-1. O valor do deslocamento químico para o carbono metílico em δ 25,31 (ligado aos hidrogênios em δ 1,34) nessa substância indica que esse grupo deve estar ligado ao carbono quaternário carbinólico.

O mapa de contornos COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (**Figura 92, p. 188; Tabela 34, p. 183**) para o emotinol-2 mostra que o hidrogênio em δ 1,68 (2H) acopla com o hidrogênio em δ 1,35 (acoplamento geminal) conectados ao carbono em δ 47,06 (C-1) e com o hidrogênio carbinólico em δ 4,29 (H-2) (acoplamento vicinal), esse último por sua vez, acopla também com os hidrogênios em δ 2,03 e em δ 1,68 que possuem um acoplamento geminal entre si e estão conectados ao carbono em δ 48,83 (C-3). O mapa de contornos HMQC mostra todos os acoplamentos direto carbono-hidrogênio (**Figura 93, p. 189; Tabela 34, p. 183**). O mapa de contornos HMBC (**Tabela 34, p. 183; Figura 94, p. 190**) mostra uma correlação entre o carbono carbinólico quaternário em δ 72,26 e os hidrogênios em δ 1,32; 1,34; 1,56; 1,68; 2,03; 4,29 indicando que esse é o carbono-4 e confirmando sua ligação com a metila em δ 25,31. O HMBC mostra ainda uma correlação entre o carbono em δ 34,36 e os hidrogênios metílicos em δ 1,14 (conectados ao carbono em δ 20,62) evidenciando que esse é o carbono

da junção de anel e que o mesmo está ligado a metila em δ 20,62 como indicado no início dessa discussão.

O mapa de contornos NOESY (**Figura 95, p. 191**) mostra um acoplamento entre os hidrogênios metílicos em δ 1,14 e àqueles em δ 1,34 indicando que a metila no carbono-4 encontra-se em posição axial. A estereoquímica no carbono 4, grupo metila em axial, está coerente com as observações de que nessa situação o deslocamento químico do carbono-14 ocorre em campo mais desprotegido do que quando o mesmo se encontra em equatorial, como evidenciado na literatura (ZHENG *et al.*, 2003; BOHLMANN *et al.*, 1980). A reunião de todas essas informações permitiu sugerir para o emotinol-2 a estrutura abaixo.



Os dados de ressonância magnética nuclear unidimensionais e bidimensionais das substâncias emotina I, emotinol-1 e emotinol-2 estão sendo descritos pela primeira vez.

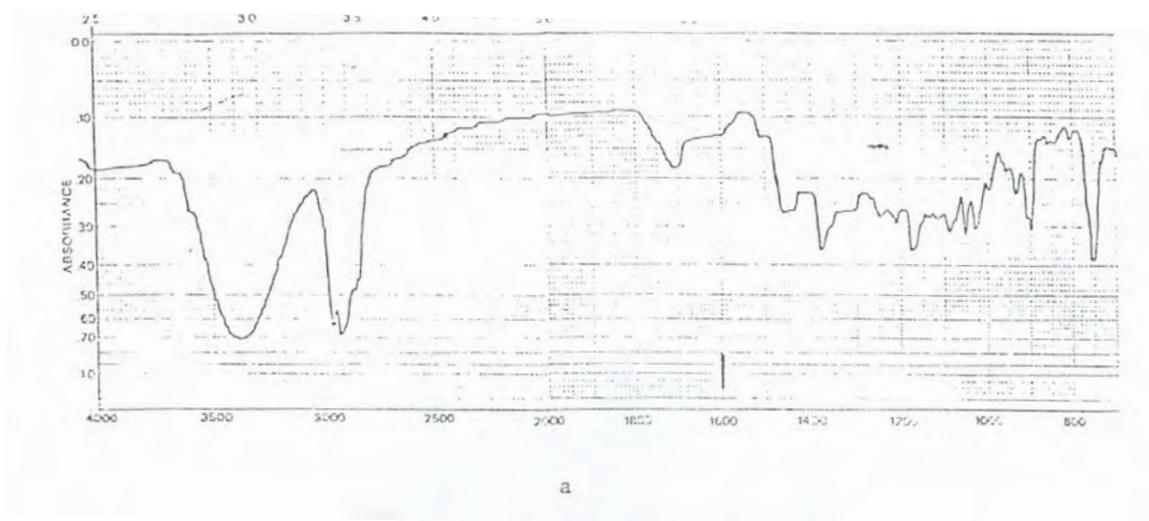


Figura 87 – Espectro na região do infravermelho da substância emotinol-2 em KBr

Tabela 34 - Dados de RMN do Emotinol-2 em CDCl₃

Posição	¹ H	J em Hz	COSY	¹³ C	HMBC
1	eq-1,68		1,35; 2,03; 4,29	47,06	1,14; 2,03
	ax-1,35		1,68 (f); 4,29		
2	4,29	3,4	1,35; 1,68; 2,03	68,55	1,68; 2,03
3	eq-2,03		1,68; 4,29	48,83	1,35; 1,68
	ax-1,68		1,35 (f); 2,03; 4,29		
4	-		-	72,26	1,32; 1,34; 1,56; 1,68; 2,03; 4,29
5	1,30		-	54,46	1,35; 1,68; 2,03; 1,14
6	eq-1,56		-	22,55	-
	ax-1,32		-		
7	1,37		-	50,30	1,22
8	1,96 (2H)		1,12	21,56	-
9	eq-1,47		1,12	45,29	1,14
	ax-1,12		1,47; 1,96		
10	-		-	34,36	1,14
11	-		-	73,56	1,22
12*	1,22		-	28,06	-
13*	1,22		-	26,84	-
14	1,34		-	25,31	-
15	1,14		-	20,62	-

*Esses sinais podem estar interconvertidos, ax=axial, eq=equatorial

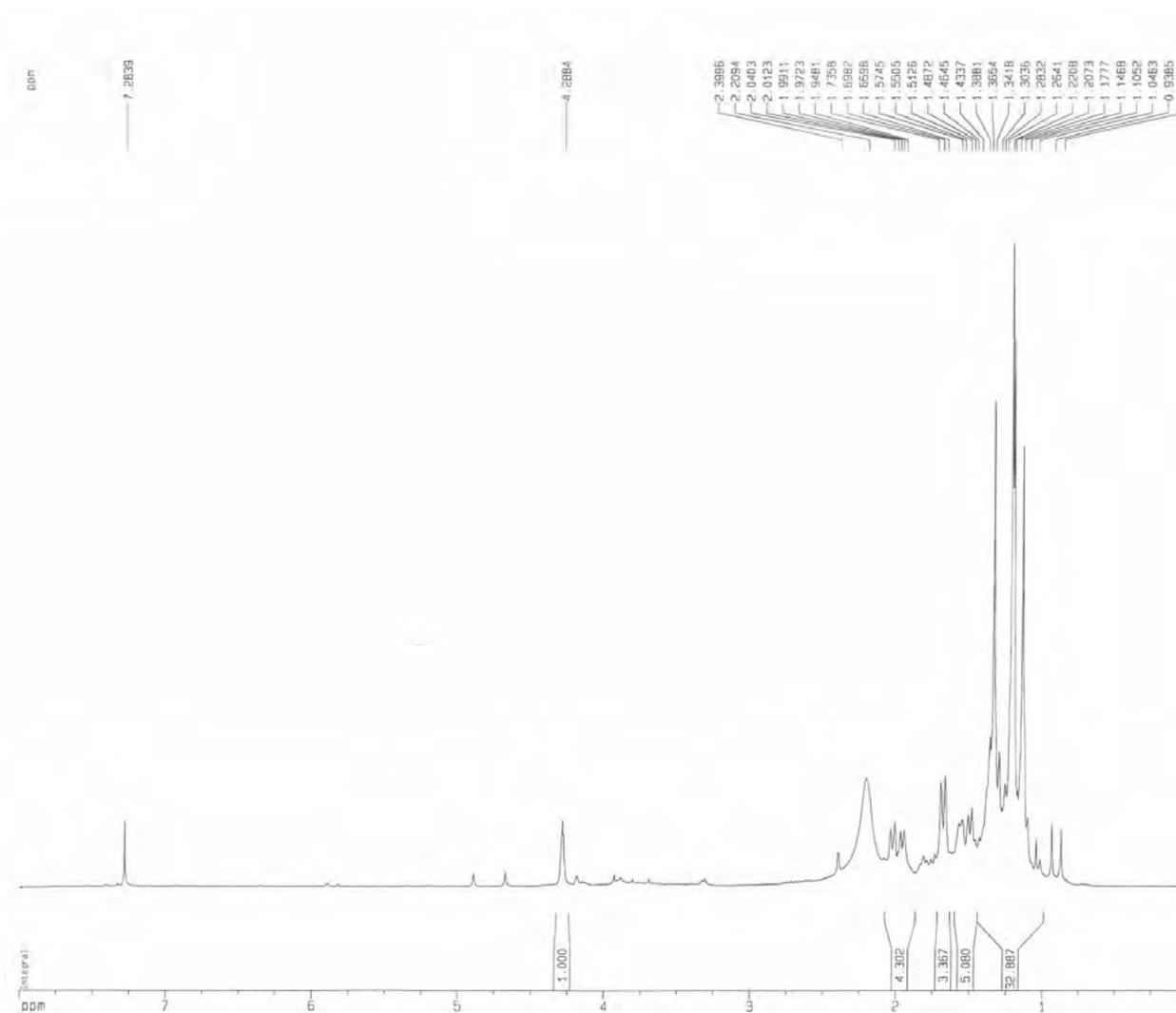


Figura 88 – Espectro de RMN de hidrogênio em $CDCl_3$ a 500 MHz da substância Emotinol-2, padrão interno TMS

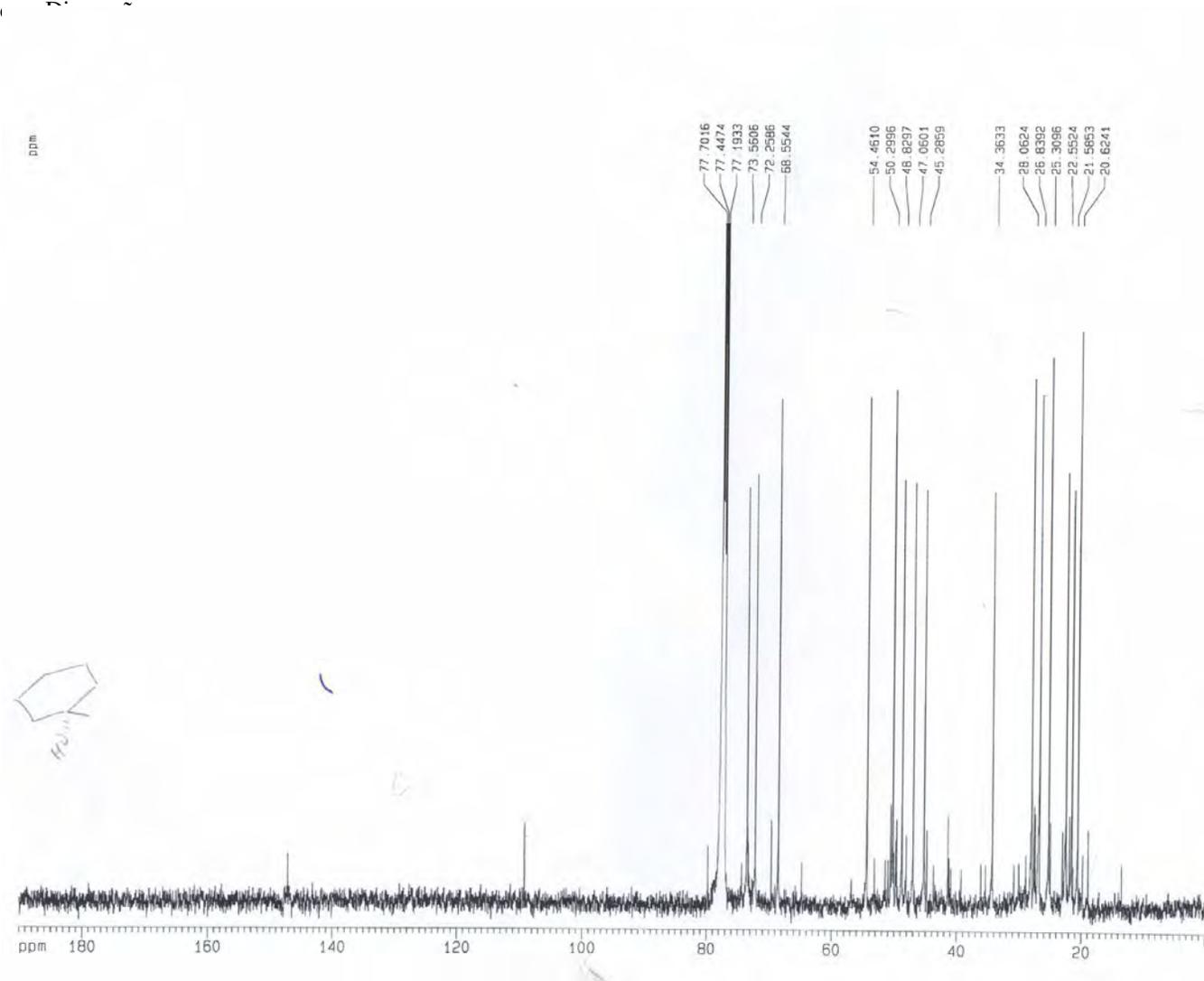


Figura 89 – Espectro de RMN de carbono em CDCl₃ a 125 MHz da substância emotinol-2, padrão interno TMS

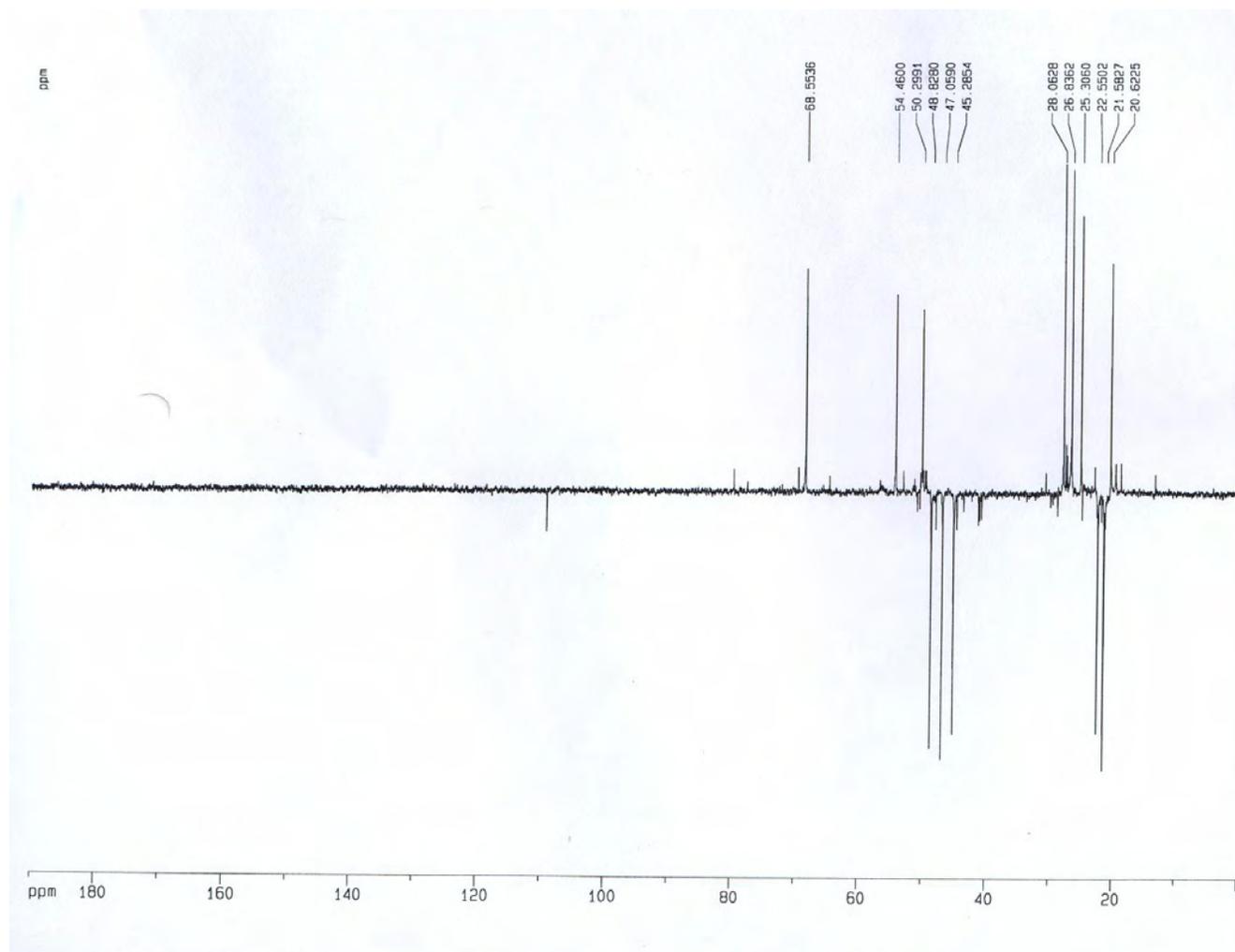


Figura 90 – Espectro de DEPT 135° da substância emotinol-2

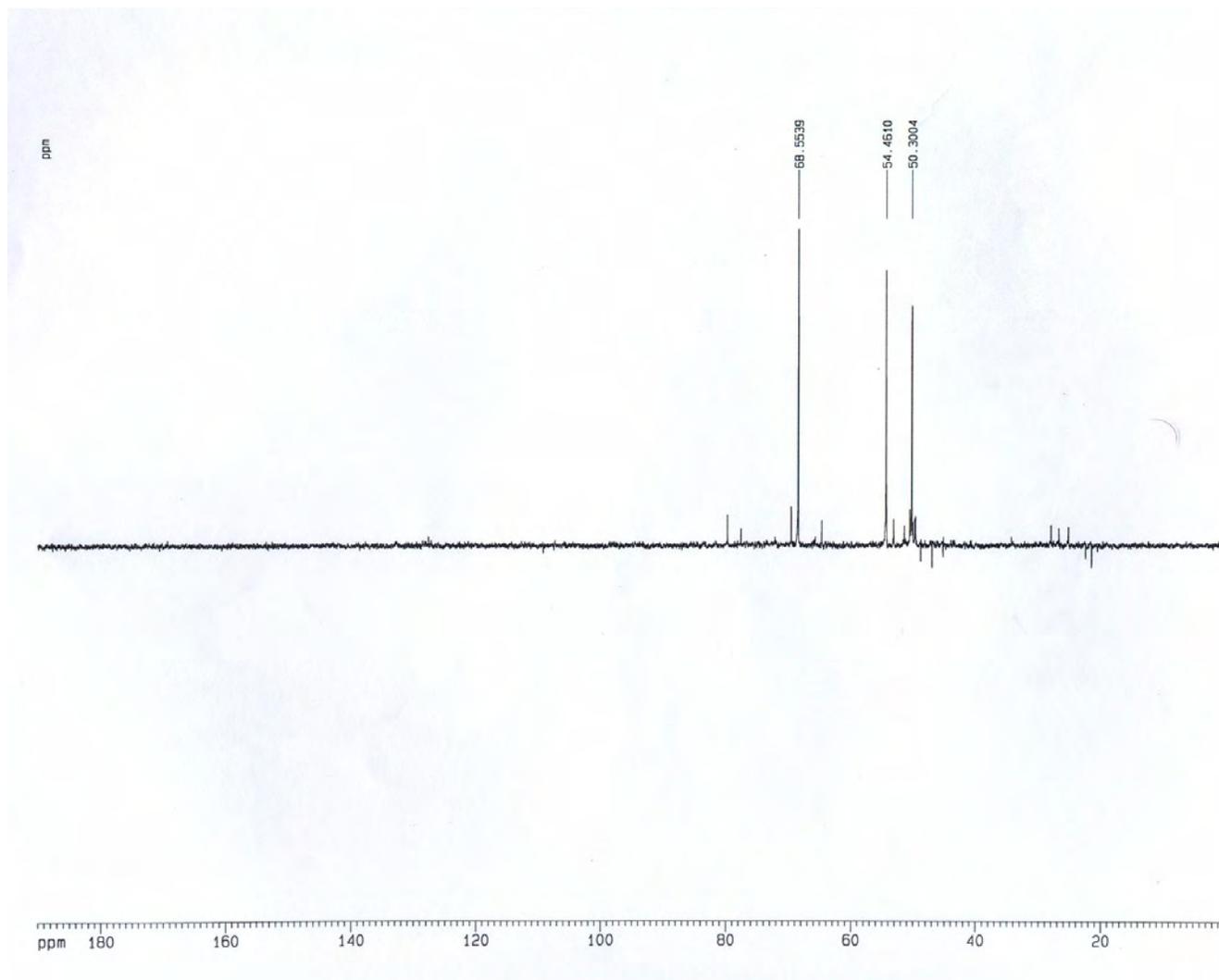


Figura 91 – Espectro de DEPT 90° da substância emotinol-2

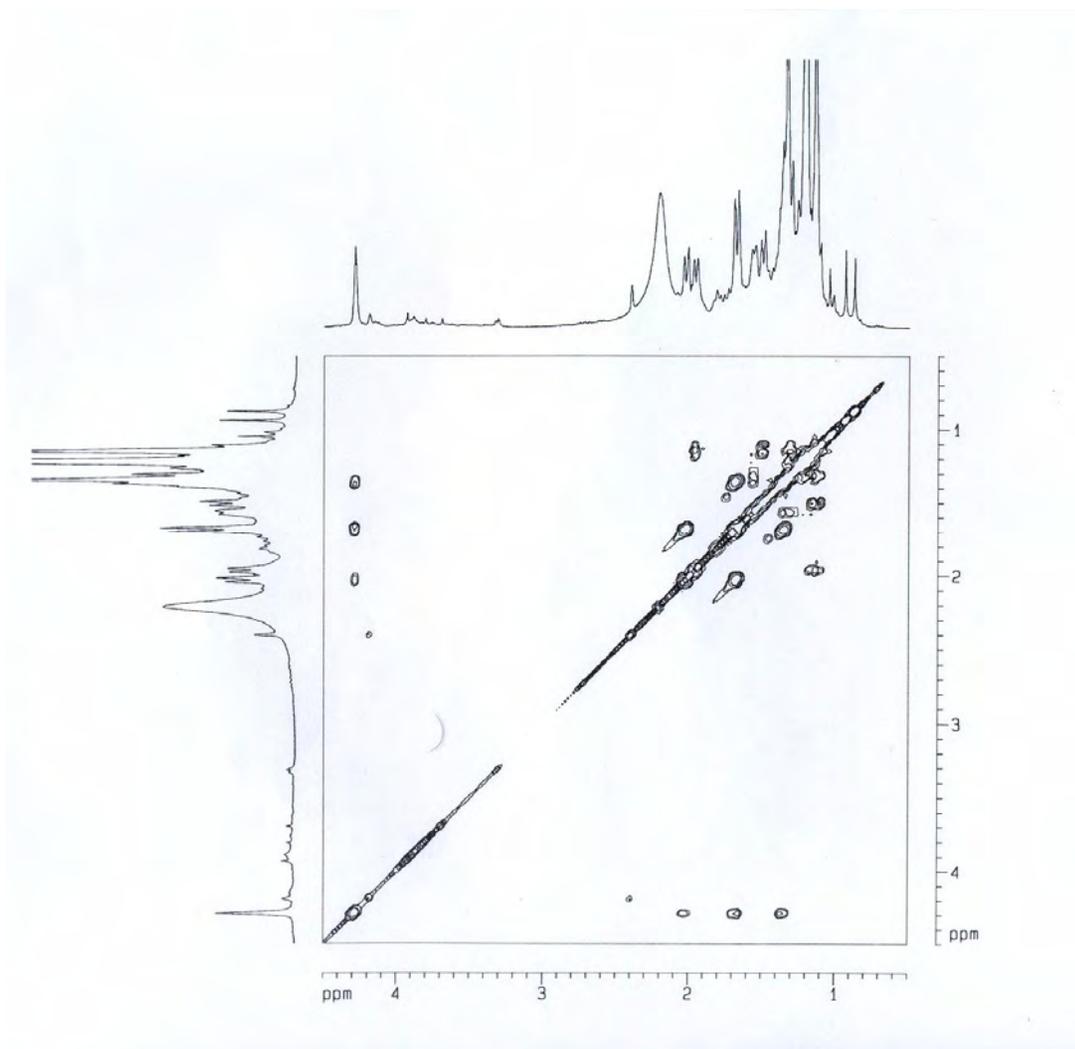


Figura 92 – Mapa de contornos COSY da substância emotinol-2

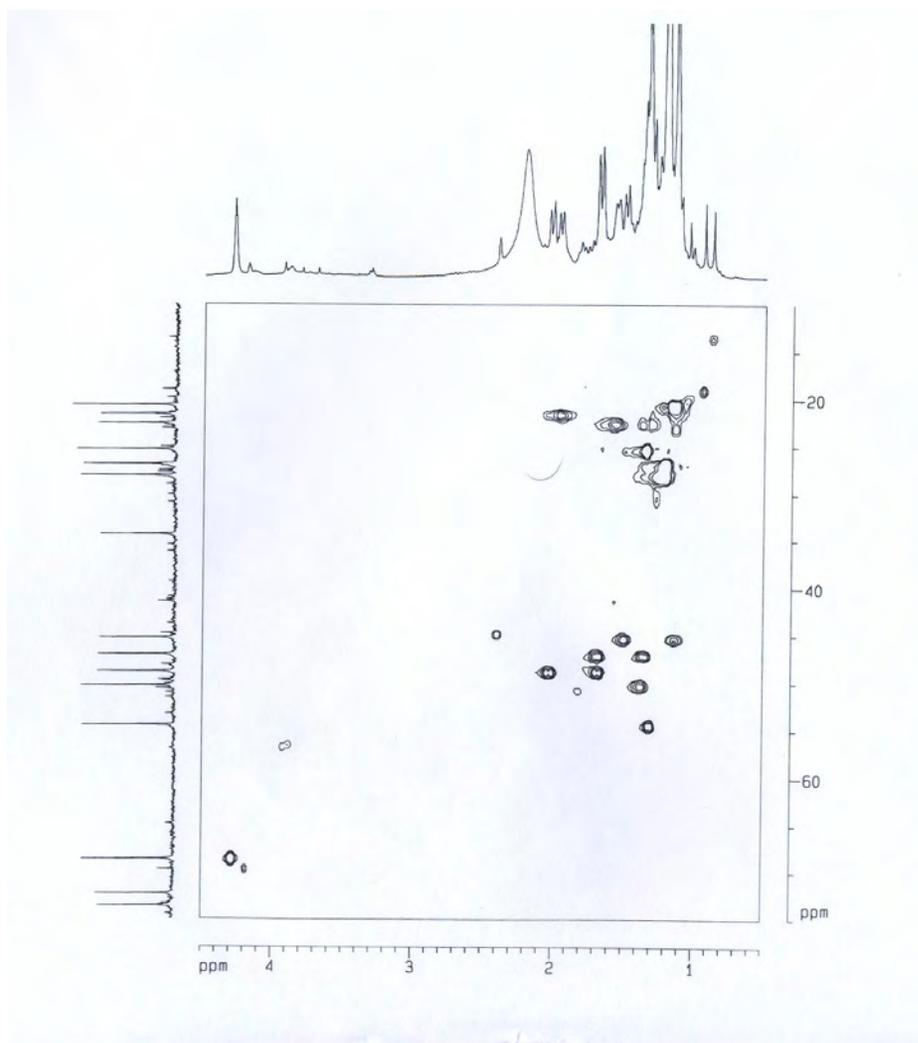


Figura 93 – Mapa de contornos HMQC da substância emotinol-2

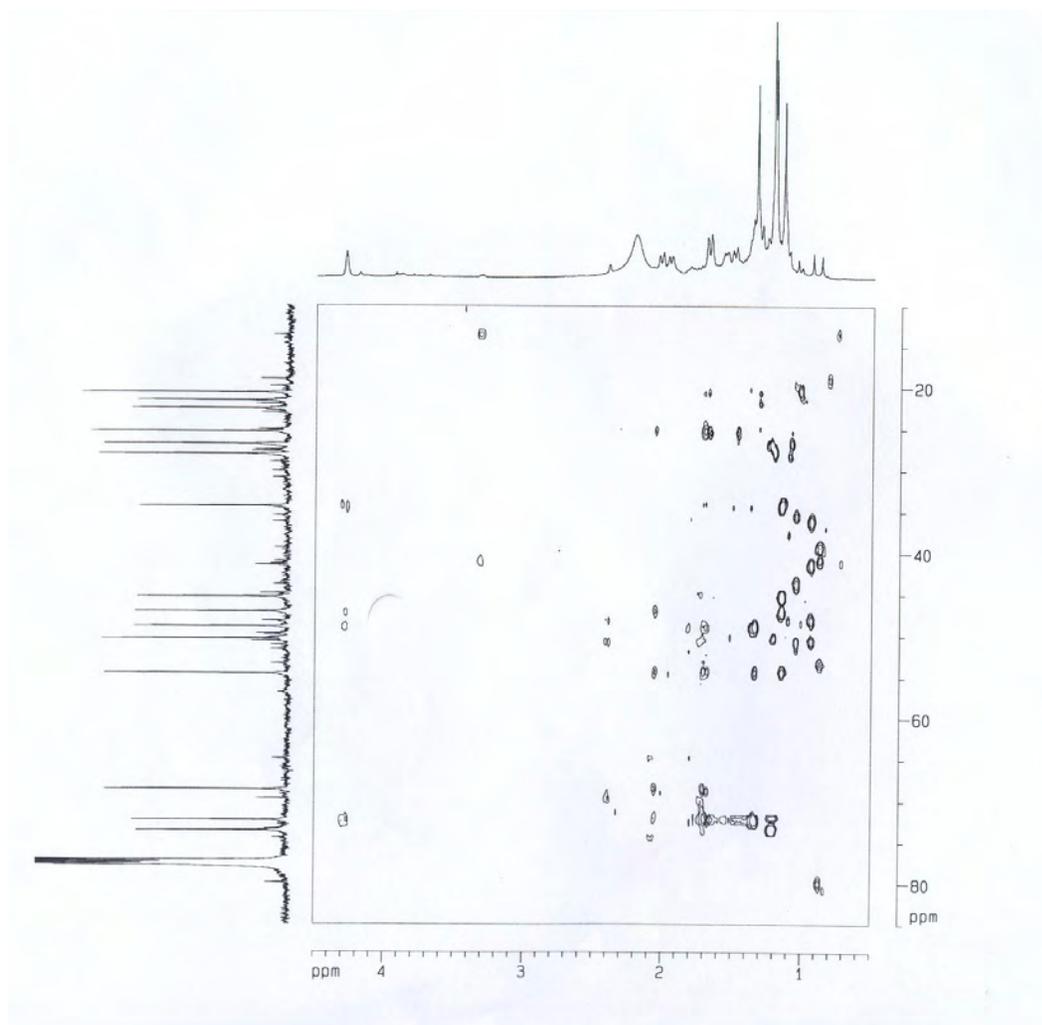


Figura 94 – Mapa de contornos HMBC da substância emotinol-2

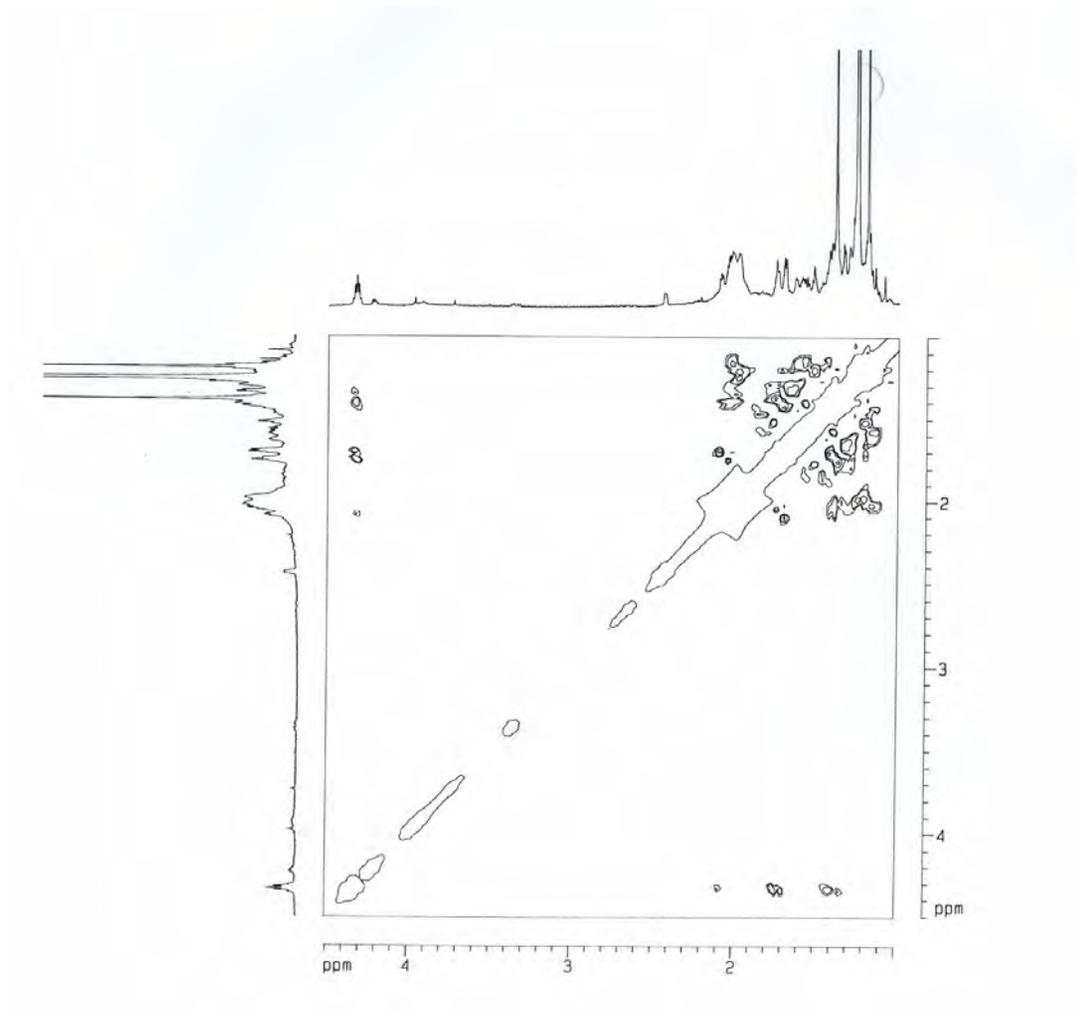


Figura 95 – Mapa de contornos NOESY da substância emotinol-2

III.4 – Avaliação Estrutural do Composto XA

XA foi isolada como um sólido de cor bege (p.f. 239°C, éter etílico) seu espectro na região do infravermelho, obtido em solução de KBr, (**Figura 96, p.194**) revelou a presença de bandas características de grupo OH (3502, 3456 e 3412 cm^{-1}) e bandas características de sistema aromático (1622, 1522, 1468, 1441 e 1387 cm^{-1}). A análise elementar revelou para essa substância a seguinte composição 62,67% de carbono, 4,21% de hidrogênio e 33,12% de oxigênio indicando a fórmula mínima $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$.

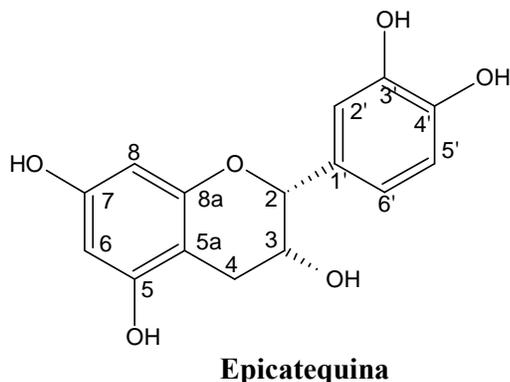
O espectro de RMN de hidrogênio (**Figura 97, p. 196; Tabela, 35 p. 195**) de XA obtido a 500 MHz mostrou a presença de quatro dupletos com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos em δ 6,78 ($J = 8,2\text{Hz}$), δ 7,00 ($J = 1,7\text{Hz}$); δ 5,97 ($J = 2,25\text{Hz}$) e δ 5,94 ($J = 2,25\text{Hz}$) e um duplete em δ 4,83, três duplos dupletos: um característico de hidrogênio aromático em δ 6,82 (1,7Hz e 8,2Hz) e dois pertencentes a carbono metílico em δ 2,88 (4,5Hz e 16,7Hz) e δ 2,76 (2,65Hz e 16,7Hz), um simpleto em δ 4,83 e um simpleto largo em δ 4,19 com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. A multiplicidade dos sinais e os valores das constantes de acoplamento indicam que há um acoplamento meta entre os hidrogênios em δ 5,97 e δ 5,94, um acoplamento orto entre os hidrogênios em δ 6,82 e δ 6,78, um acoplamento entre os hidrogênios em δ 6,82 e em δ 7,00 e ainda um acoplamento geminal entre os hidrogênios em δ 2,88 e δ 2,76.

A análise comparativa entre os espectros de RMN de carbono, DEPT 135° e DEPT 90° (**Figuras 98, p. 197; 99 p. 198 e 100 p. 199; Tabela 35, p. 195**) obtidos em metanol, evidenciou a existência de 15 sinais relativos a 15 átomos de carbono: sendo sete carbonos quaternários, sete metínicos e um metílico, o que permite indicar para esse composto a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$, com um índice de deficiência de hidrogênio igual a 10. Dentre esses sinais, apenas três são de carbonos com hibridização sp^3 : δ 67,60 e δ 79,8 ambos oxigenados e δ 29,83 relativo a um carbono metilênico. Todos os outros deslocamentos químicos vistos no espectro são característicos de carbono sp^2 . O mapa de contornos HMQC indica os acoplamentos direto carbono-hidrogênio (**Figura 101 p. 200; Tabela 35, p. 195**). Os valores de deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios juntamente com a quantidade de carbonos quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos na molécula de XA caracterizam a existência de dois anéis aromáticos e um anel não aromático possuindo dois

carbonos oxigenados (δ 67,60 δ 79,98) o que indica que essa é uma substância pertencente à classe dos flavonóides.

Os dados bidimensionais do mapa de contornos COSY (**Figura 102 p. 201; Tabela 35 p. 195**) indicam um acoplamento entre os sinais dos hidrogênios metilênicos e entre esses e o sinal do hidrogênio em δ 4,19 (ligado ao carbono oxigenado em δ 67,60). Esse último correlaciona ainda com o hidrogênio em δ 4,83 (ligado ao carbono oxigenado em δ 79,98). Há ainda uma correlação fraca entre o hidrogênio em δ 7,00 e o hidrogênio em δ 6,82.

A interpretação dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono e mapa de contornos COSY e comparação com dados da literatura (SANG *et al.*, 2002; GIL *et al.*, 2003) permitiu propor para XA a estrutura da epicatequina.



As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 103 p. 202; Tabela 35 p. 195**) entre o carbono em δ 79,98 (C-2) e os hidrogênios em δ 7,00 (H-2') e δ 6,82 (H-6'), entre o carbono aromático em δ 100,21 (C-5a) e os hidrogênios em δ 5,97 (H-6); 4,19 (H-3); 2,88 (H-4) e 2,76 (H-4) e ainda entre o entre o carbono aromático em δ 157,49 (C-8a) e os hidrogênios em δ 5,94 (H-8); 2,88 (H-4) e 2,76 (H-4) estão de acordo com a estrutura proposta.

O mapa de contornos NOESY (**Figura 104 p. 203; Tabela 35 p. 195**) mostra um acoplamento espacial entre os hidrogênios em δ 4,83 (H-2) e δ 4,19 (H-3) confirmando que eles se encontram do mesmo lado da molécula.

XA foi tratada com anidrido acético e piridina à temperatura ambiente por 24 horas. O produto da reação codificado como XA-OAc foi submetido à análise espectroscópica na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13. O espectro no infravermelho em solução de KBr do produto acetilado (**Figura 105 p. 204**)

indicou bandas características de grupo carbonílico (1768 cm^{-1}), sistema aromático (1623 , 1505 , 1505 e 1424 cm^{-1}) e ligação C-O (1210 e 1123 cm^{-1}).

O espectro de RMN de hidrogênio de XA-OAc (**Figura 106, p. 205**) revelou a existência de cinco grupos metilas [δ 1,93(3H); 2,29(6H) e 2,31(6H)], esse dado serviu para confirmar a existência de cinco grupos hidroxilas na molécula do produto natural. Neste mesmo espectro, nota-se que os sinais de todos os hidrogênios foram deslocados e aparecem mais desprotegidos. O espectro de RMN de carbono de XA-OAc (**Figura 107, p. 206**) mostra em região mais desprotegida, sinais referentes a cinco carbonilas (δ 170,90; 169,47; 168,91; 168,57 e 168,52) e em região mais protegida sinais referentes a carbonos metílicos (δ 21,19 e 21,05 com sinais praticamente do mesmo tamanho e δ 21,49 com um sinal menor) confirmando a existência de cinco grupos hidroxílicos na molécula de XA.

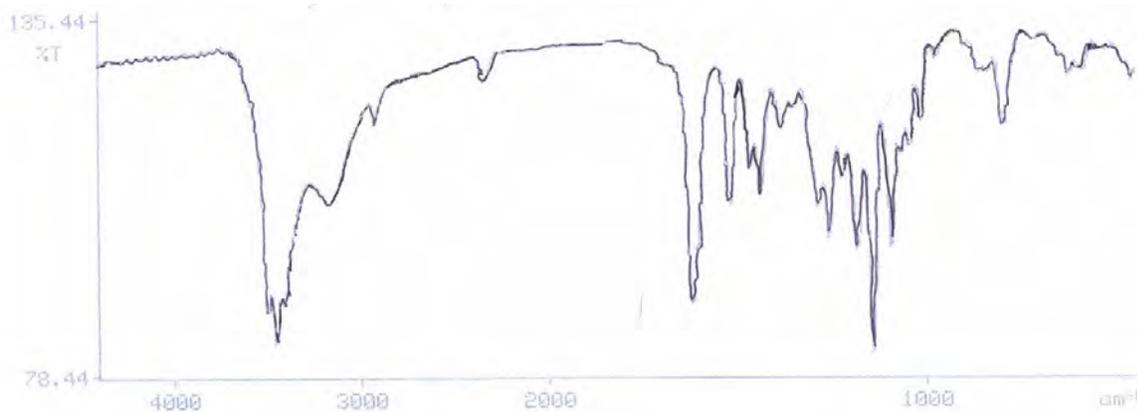


Figura 96 – Espectro na região do infravermelho da substância XA em KBr

Tabela 35 - Dados de RMN da Substância XA em CD₃OD

Posição	¹ H	J em Hz	COSY	¹³ C	HMBC	NOESY
2	4,83 s	-	4,19	79,98	6,82; 7,00	2,88; 4,19; 6,82; 7,00
3	4,19 sl	-	2,76; 2,88; 4,83	67,60	2,76; 2,88	2,88; 4,83; 6,82; 7,00
4	2,88 dd	4,5; 16,7	2,76; 4,19	29,83	4,83	2,76; 4,19; 4,83
	2,76 dd	2,7; 16,7	2,88; 4,19			2,88
5a	-	-	-	100,21	2,76; 2,88; 4,19; 5,97	-
5	-	-	-	158,11 ^b	2,76; 2,88; 5,97	-
6	5,97 ^a d	2,3	-	96,52	5,94	-
7	-	-	-	157,77 ^b	5,94; 5,97	-
8	5,94 ^a d	2,3	-	96,02	5,97	=
8a	-	-	-	157,49 ^b	2,76; 2,88; 5,94	-
1'	-	-	-	132,41	6,78; 7,00	-
2'	7,00 d	1,7	6,82	115,44	4,83; 6,82	4,19; 4,83
3'	-	-	-	145,88 ^c	6,78; 7,00	-
4'	-	-	-	146,04 ^c	6,78; 7,00	-
5'	6,78 d	8,2	-	116,02	6,82	-
6'	6,82 dd	1,7; 8,2	7,00	119,54	4,83; 7,00	4,19; 4,83

^{a,b,c}Esses sinais podem estar interconvertidos

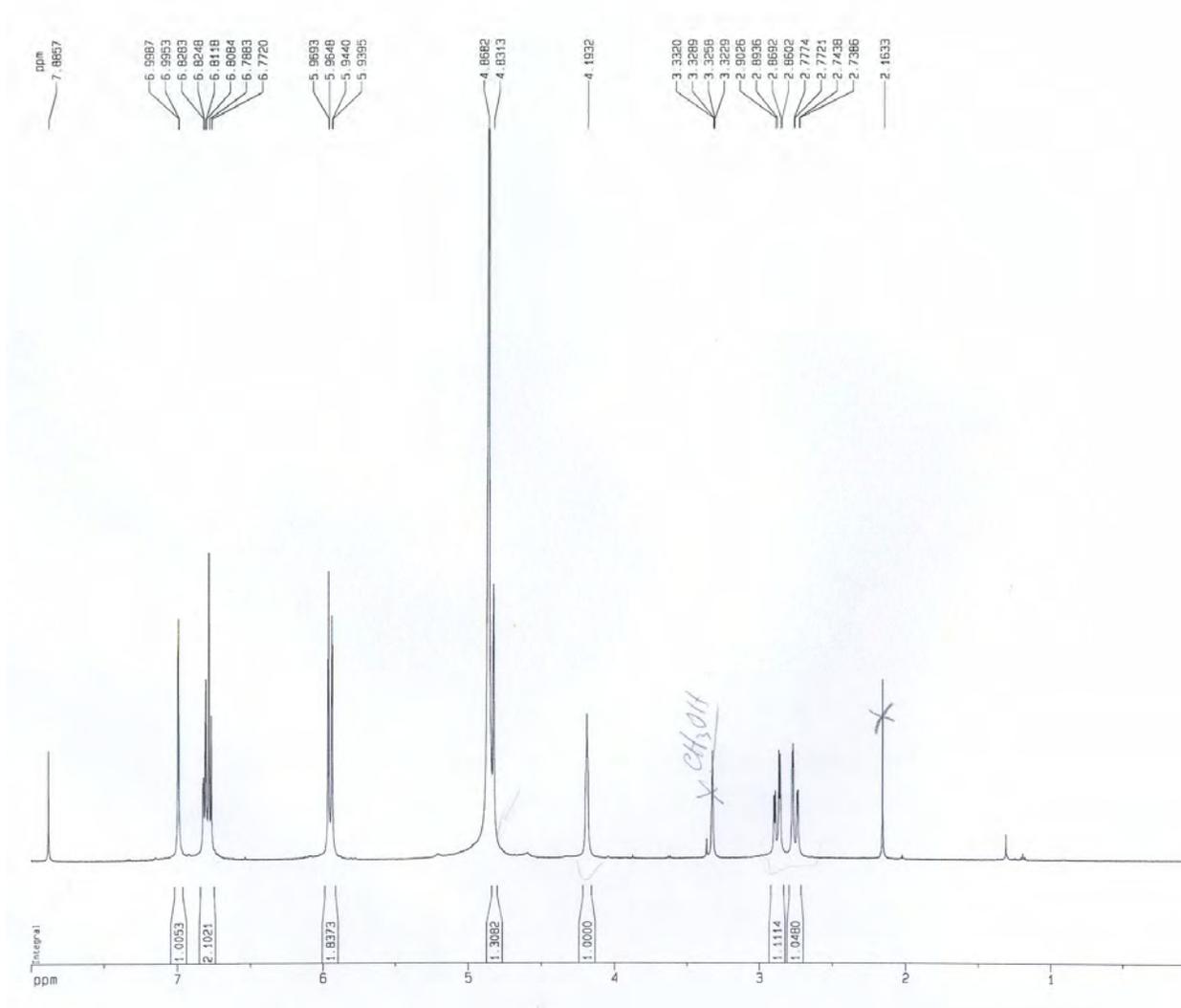


Figura 97 – Espectro de RMN de hidrogênio em CD₃OD a 500 MHz da substância XA, padrão interno TMS

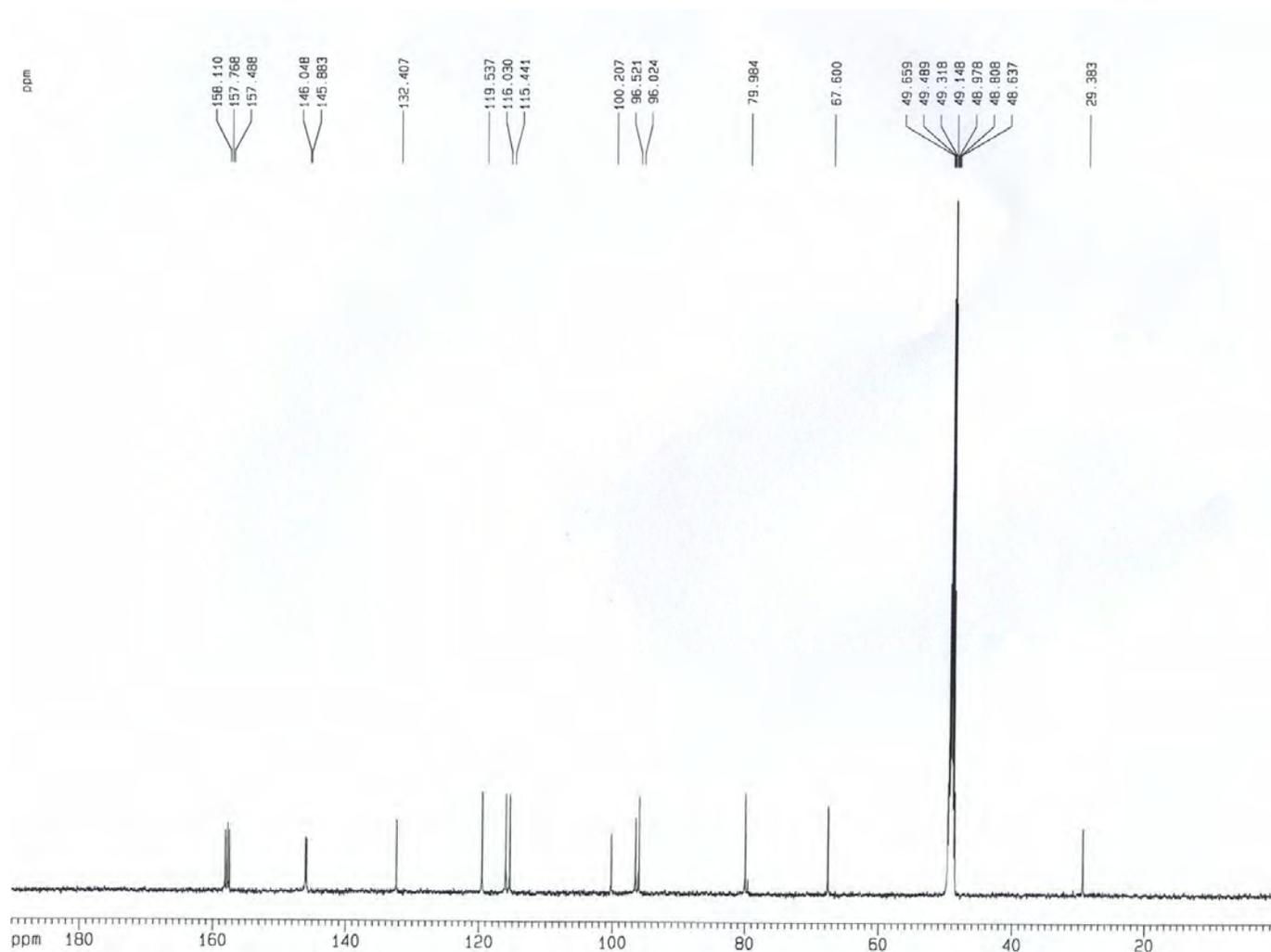


Figura 98 – Espectro de RMN de carbono em CD₃OD a 125 MHz da substância XA, padrão interno TMS

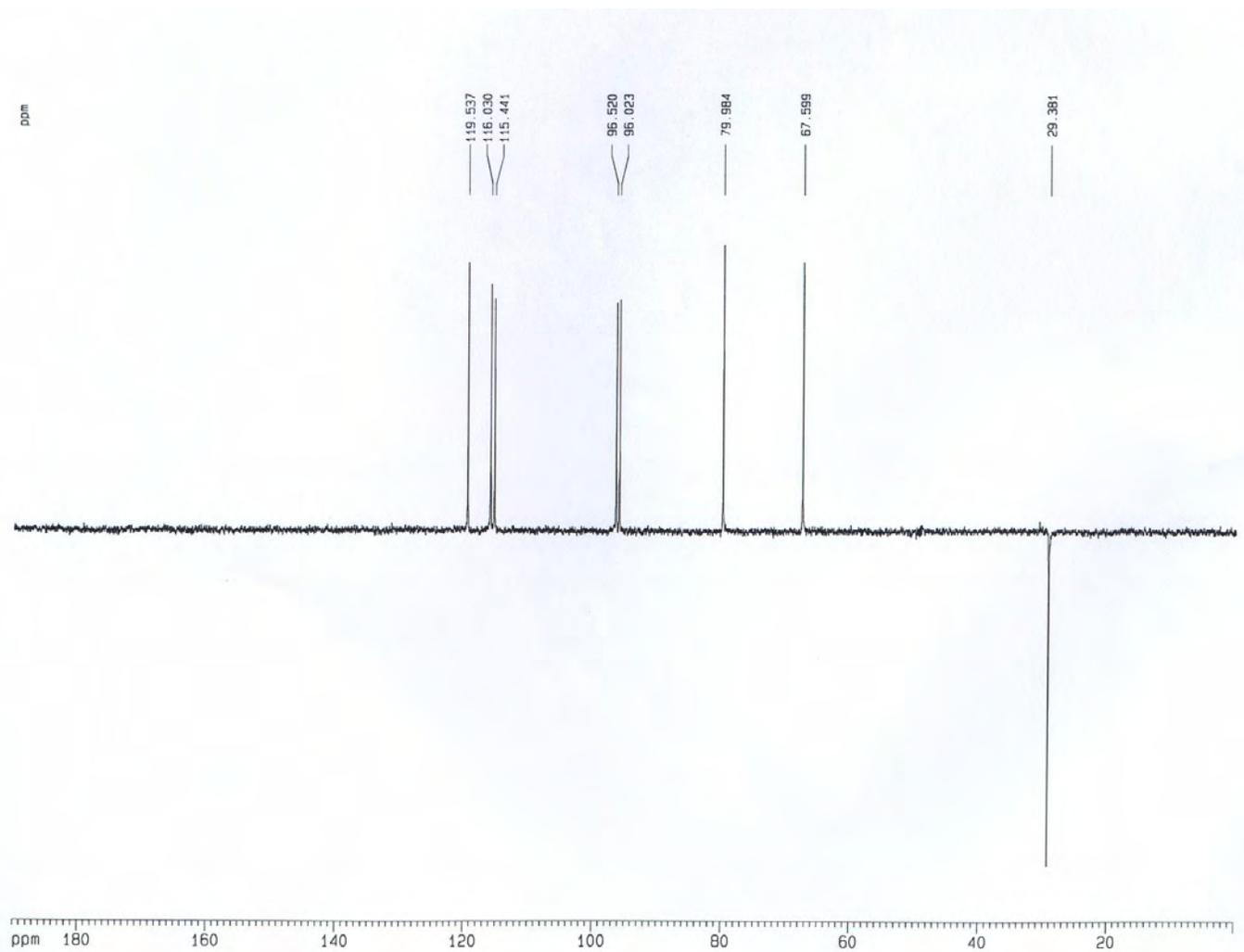


Figura 99 – Espectro de DEPT 135° da substância XA

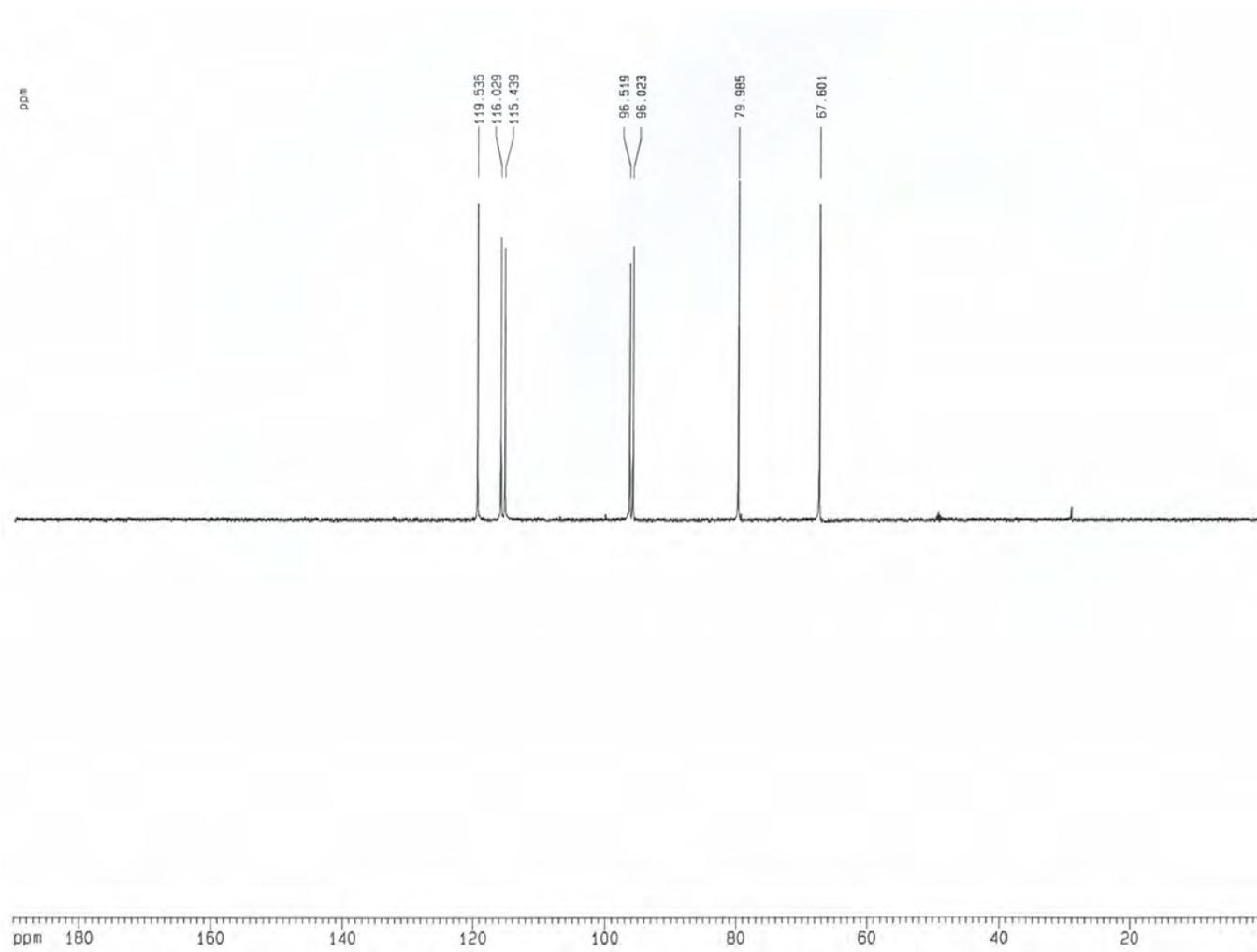


Figura 100 – Espectro de DEPT 90° da substância XA

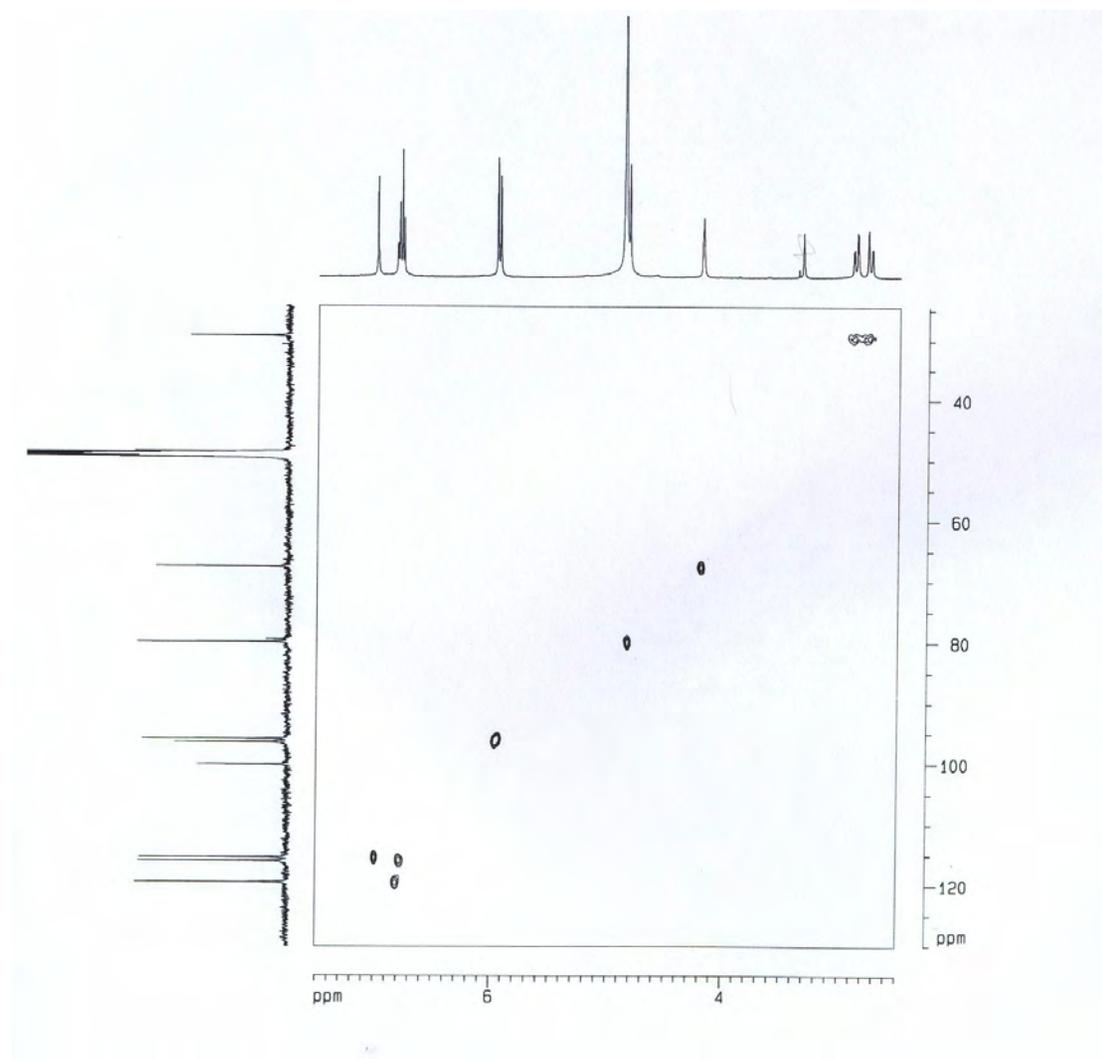


Figura 101 – Mapa de contornos HMQC da substância XA

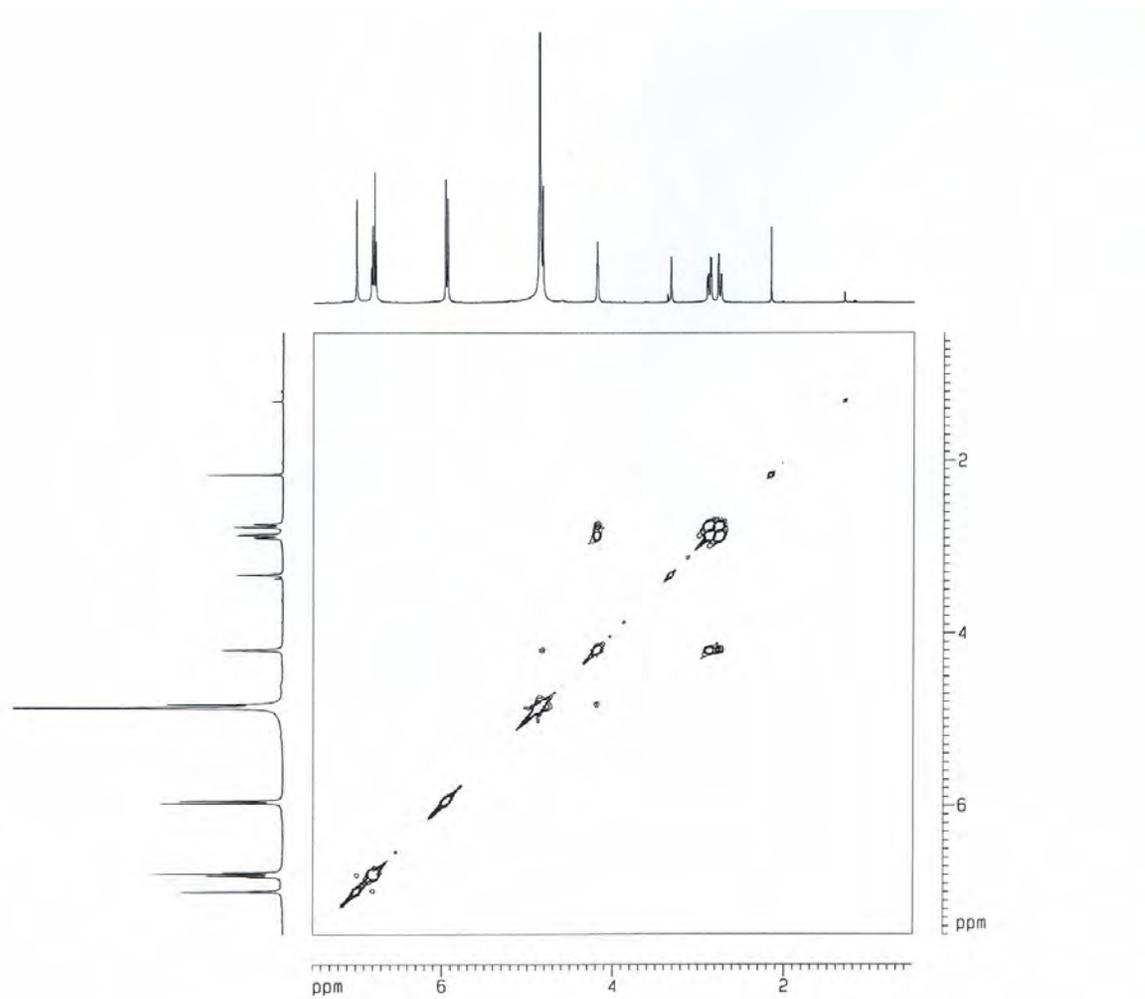


Figura 102 – Mapa de contornos COSY da substância XA

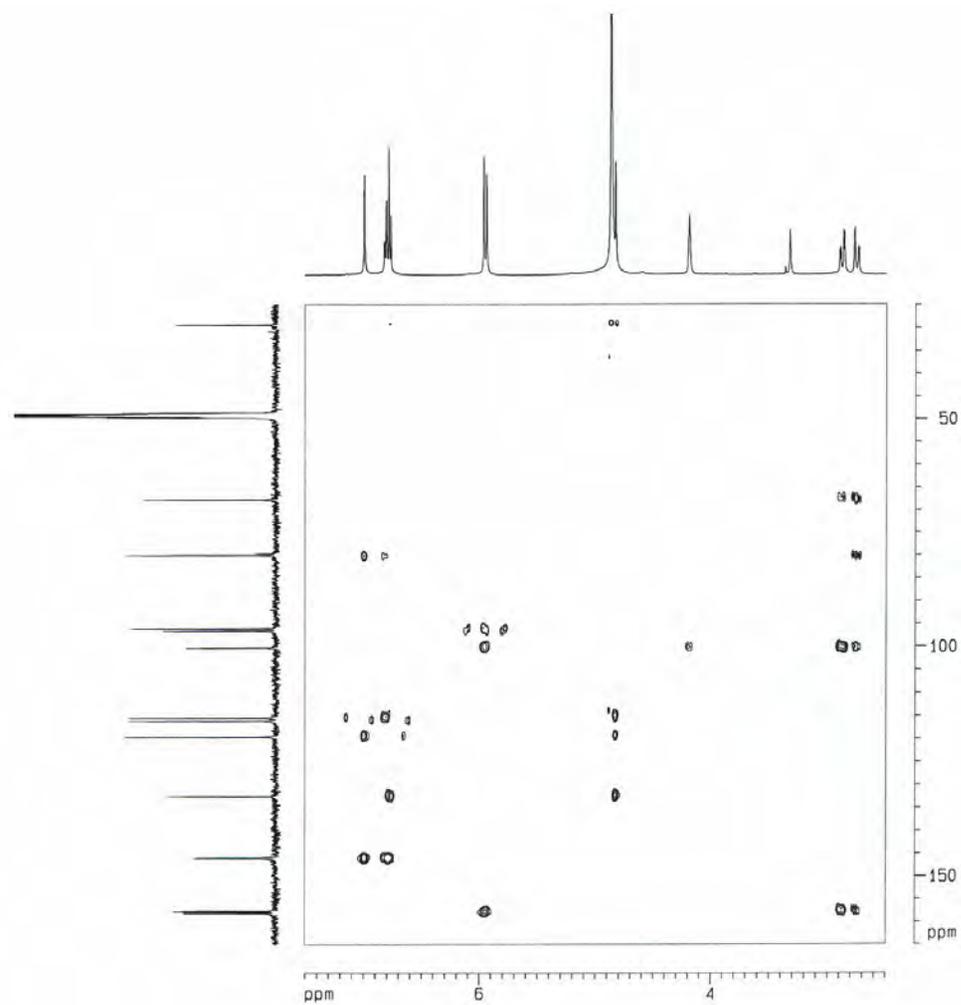


Figura 103 – Mapa de contornos HMBC da substância XA

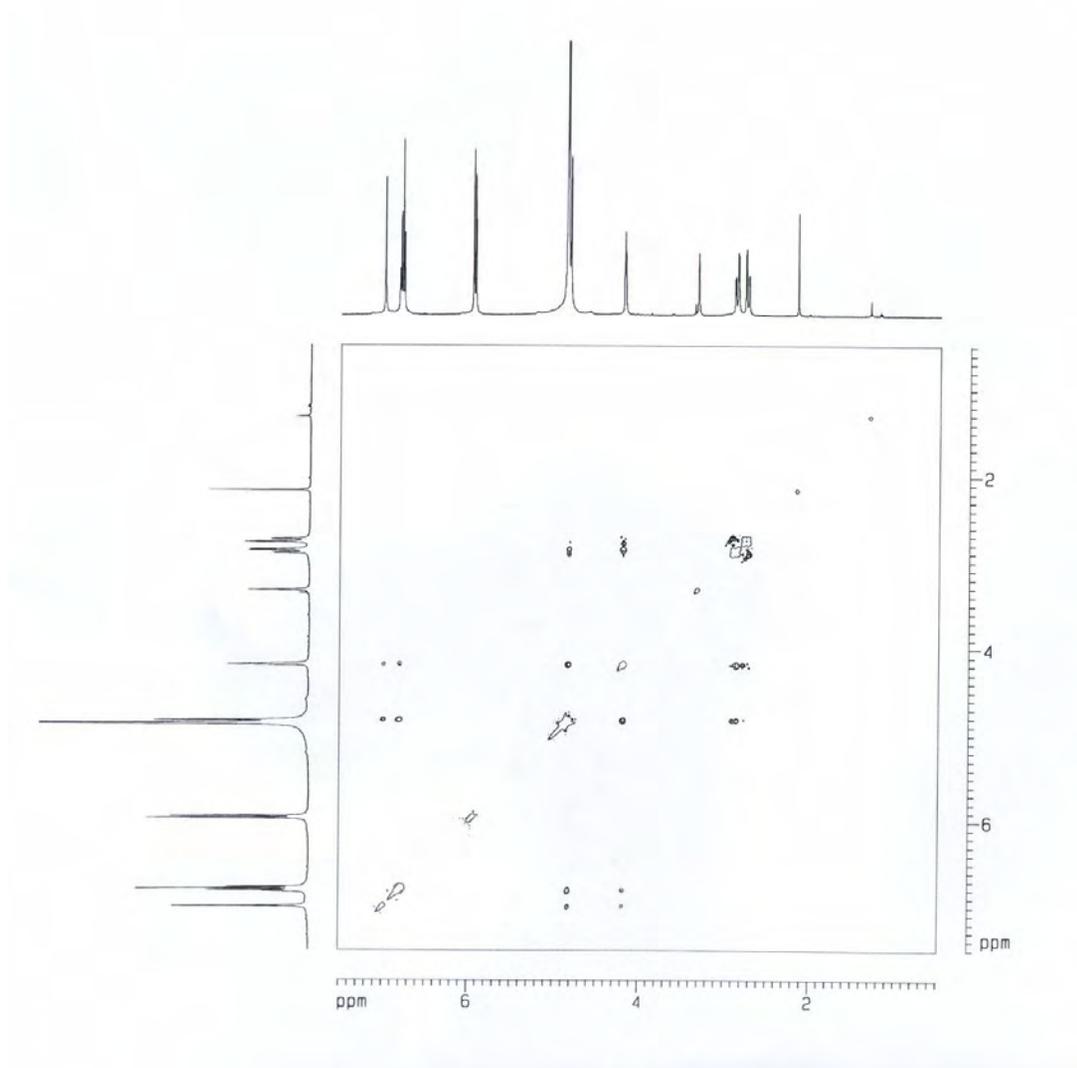


Figura 104 – Mapa de contornos NOESY da substância XA

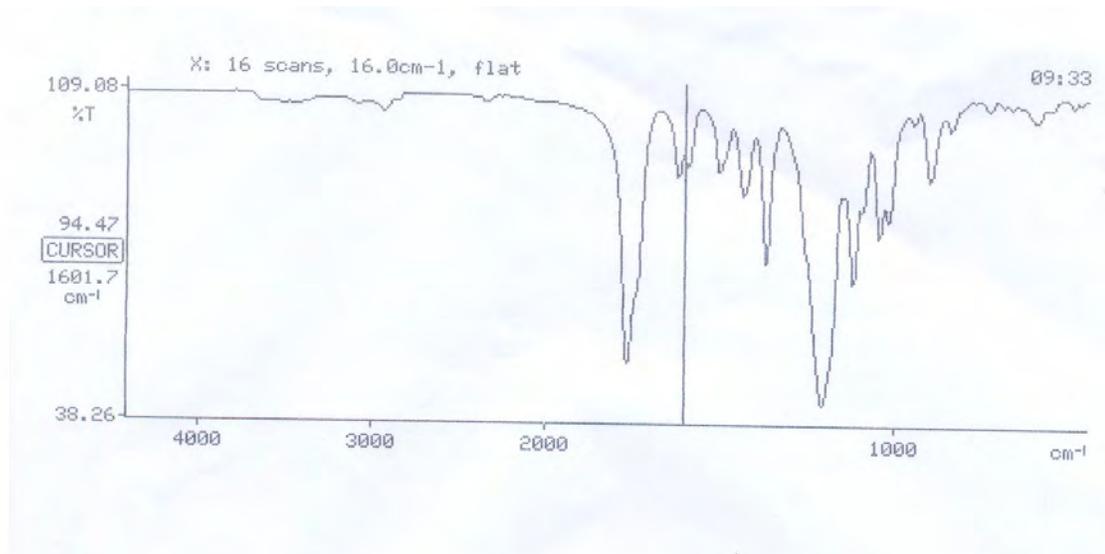


Figura 105 – Espectro na região do infravermelho do de rivaado acetilado da substância XA em KBr

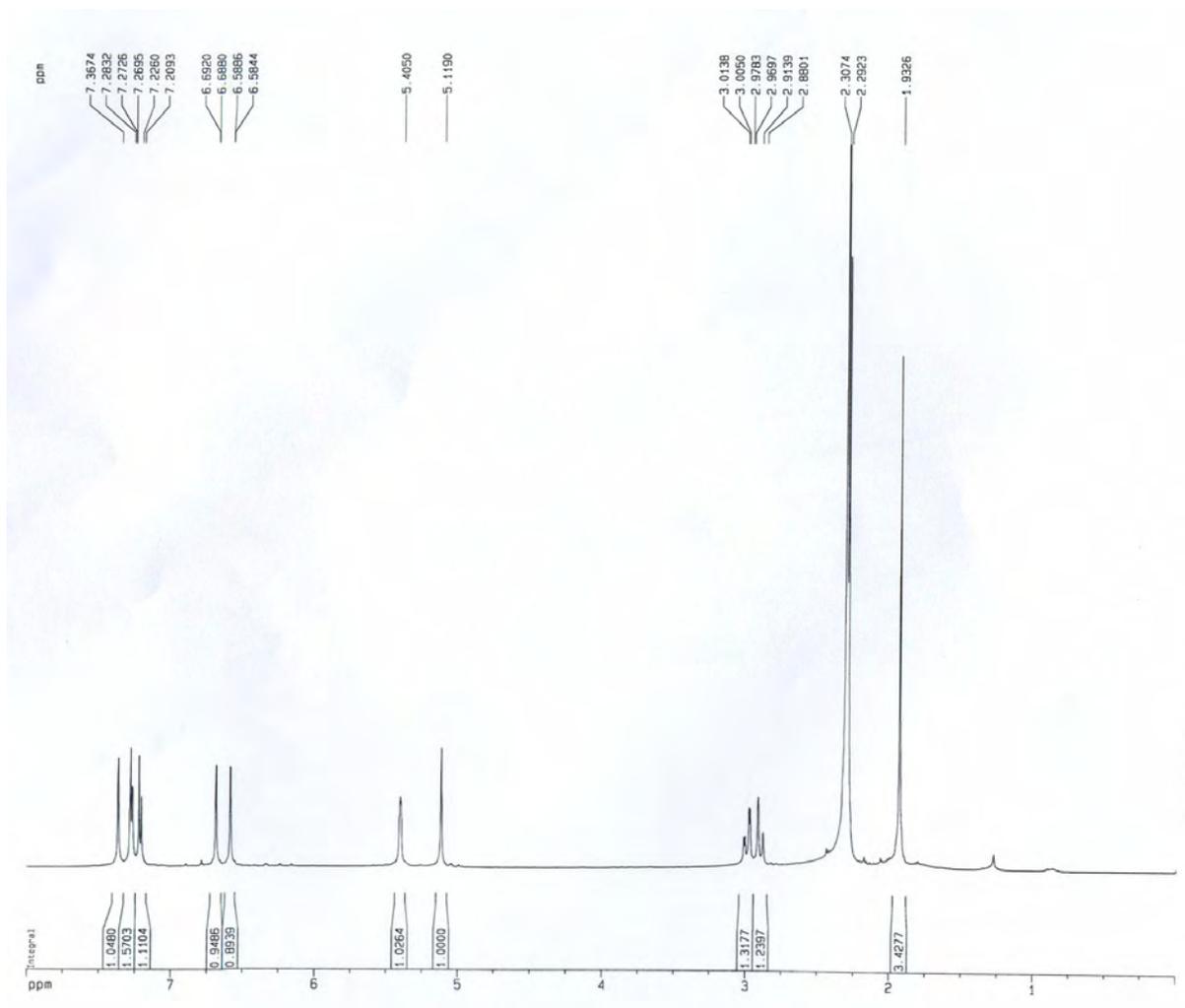


Figura 106 – Espectro de RMN de hidrogênio em CDCl₃ a 500 MHz do derivado acetilado da substância XA, padrão interno TMS

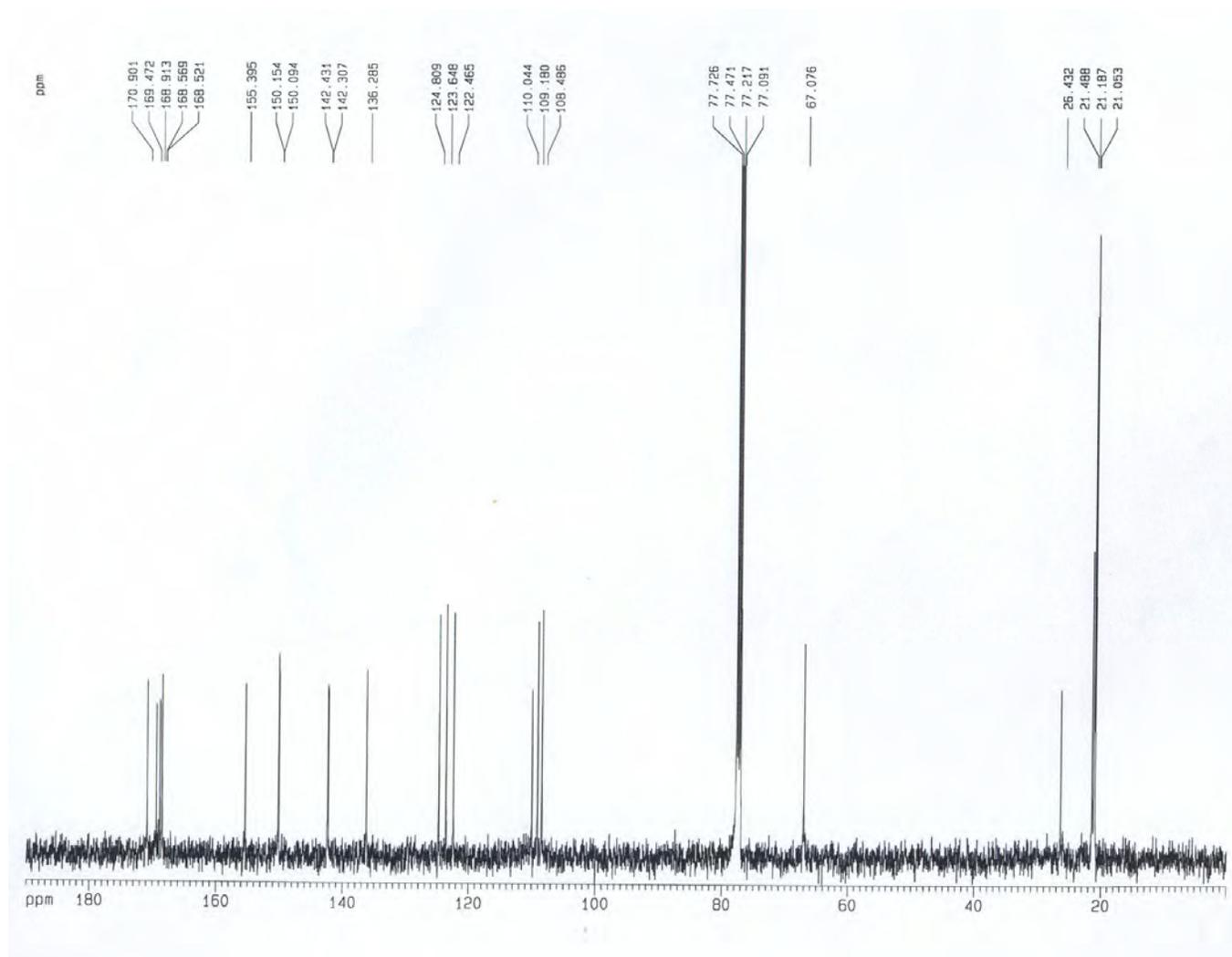


Figura 107 – Espectro de RMN de carbono em CDCl₃ a 125 MHz do derivado acetilado da substância XA, padrão interno TMS

III.5 – Avaliação da Atividade Antioxidante do extrato, frações e composto obtido da Casca do Caule da planta *X. americana* e das emotinas A, B, F e I

Os radicais desempenham um papel importante na origem da vida e evolução biológica, produzindo efeitos benéficos nos organismos. Por exemplo, radicais oxigenados exercem ações essenciais, tais como transdução de sinais e transcrição de genes. O NO, é um dos sinalizadores mais difundidos do corpo. Entretanto, os radicais livres causam a oxidação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, lipídeos e DNA, levando a sérios danos celulares e até a morte (TEPE *et al.*, 2005).

Para avaliar a atividade antioxidante de extratos e moléculas, o ensaio com o radical DPPH é um método bastante utilizado, por ser de fácil execução e ocorrer em um espaço de tempo curto quando comparado a outros métodos. A reação pode ser observada visualmente usando-se cromatografia em camada delgada (ensaio qualitativo) e sua intensidade pode ser avaliada por ensaios cromométricos ou espectrofotométricos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). O radical DPPH é seqüestrado pelos antioxidantes através da doação de hidrogênio para formar a molécula estável do DPPH na forma reduzida (ARGOLO *et al.*, 2004).

O ensaio qualitativo antioxidante foi realizado em placas cromatográficas de sílica usando-se como revelador uma solução de DPPH a 90µM e revelou que o extrato etanólico da casca do caule de *X. americana*, suas frações clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica, provenientes do processo de partição do extrato etanólico, e o composto codificado como XA, isolado a partir da fração em acetato de etila, reagiram rápida e fortemente com o radical DPPH, de forma semelhante aos controles positivos. A fração hexânica, no entanto, promoveu uma fraca reação que progrediu lentamente quando comparada à forte atividade dos flavonóides utilizados como controles (**Figura 108, p. 208**).

As substâncias isoladas da casca do caule de *E. nitens* e codificadas como emotinas A, B, F e I também foram testadas neste ensaio, mas só a emotina I reagiu com o radical DPPH. A reação observada no ensaio qualitativo dessa substância também foi semelhante aos controles utilizados (**Figura 109, p. 208**).

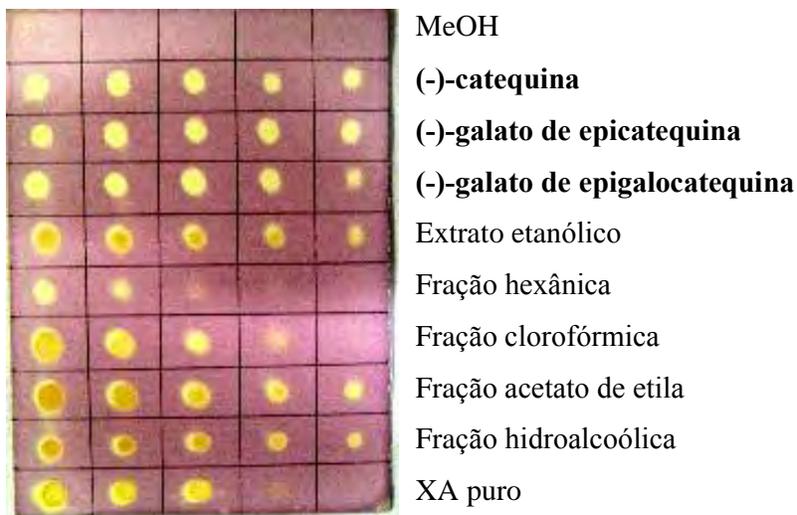


Figura 108 - Ensaio antioxidante qualitativo do extrato etanólico de *X. americana*, suas frações e o composto XA

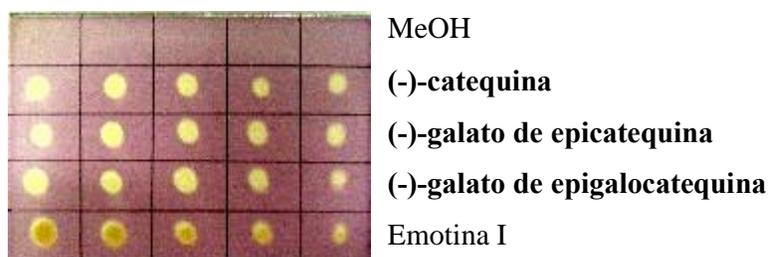


Figura 109 - Ensaio antioxidante qualitativo da substância emotina I

Os valores da concentração de inibição CI_{50} (concentração necessária para diminuir em 50% a concentração do radical DPPH) e da porcentagem de inibição PI caracterizam a capacidade antioxidante de compostos puros, mas esses parâmetros podem ser usados também para indicar quais extratos e frações são mais adequados como fontes de antioxidantes e podem ser usados para guiar processos de isolamento e purificação. Em nosso estudo, foi utilizada a medida da porcentagem de inibição para determinar a intensidade da atividade antioxidante das amostras testadas.

A intensidade da capacidade de seqüestrar radicais livres das amostras ensaiadas foi avaliada usando-se o valor da porcentagem de inibição e os resultados podem ser vistos nas **Tabelas 36 e 37 p. 209**. Em todas as amostras, o estado estacionário foi alcançado em até 20 minutos. A **Tabela 38 p. 209** mostra os resultados da porcentagem de inibição dos controles.

Tabela 36 – Atividade antioxidante de *X. americana* e suas frações e do composto XA determinada pela redução do radical livre DPPH*

Amostra	PI%	PI%	PI%	PI%	PI%	PI%
	2,5mg/mL	1,25mg/mL	0,625mg/mL	0,312mg/mL	0,0156mg/mL	0,078mg/mL
E. Etanólico	90,56	90,34	90,45	89,02	59,17	-
F.Hexânica	54,99	21,19	17,45	11,09	9,11	-
F.Clorofórmica	91,11	90,67	86,83	51,48	25,91	-
F. Acetato de Etila	-	91,28	91,16	88,81	73,83	39,37
F. Hidrometanólica	92,84	89,60	90,38	90,38	67,45	-
Composto XA	-	89,49	89,49	89,04	79,31	48,88

*Os valores de IP foram calculados no tempo estacionário (20min) (definido como o estado em que a absorvância da amostra torna-se estacionária)

Tabela 37 – Atividade antioxidante da substância Emotina I determinada pela redução do radical livre DPPH*

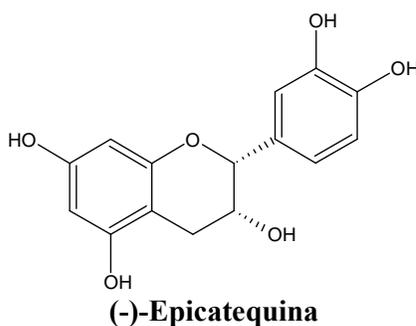
Amostra	PI%	PI%	PI%	PI%	PI%
	5mg/mL	2,5mg/mL	1,25mg/mL	0,625mg/mL	0,312mg/mL
Emotina I	96,56	94,67	88,33	79,22	48,44

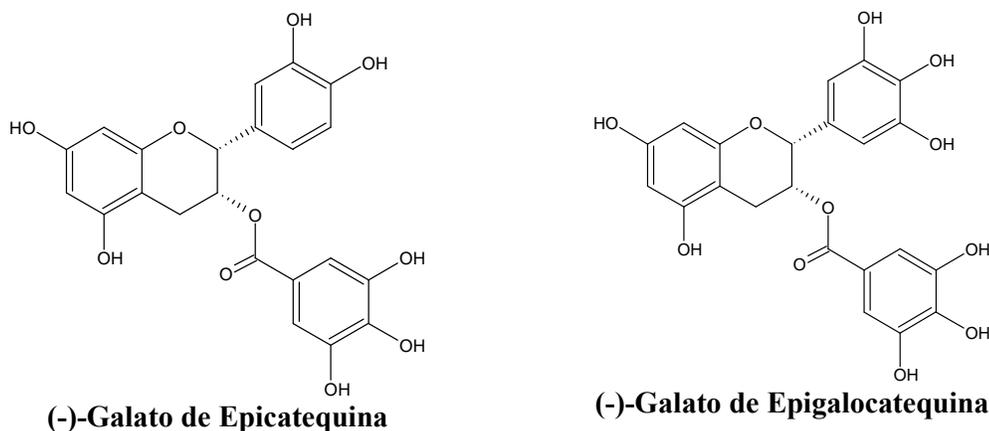
*Os valores de IP foram calculados no tempo estacionário (20min)

Tabela 38 – Atividade antioxidante dos controles positivos determinada pela redução do radical livre DPPH*

Amostra	PI %	PI %	PI %	PI %	PI %
	1,25mg/mL	0,625mg/mL	0,312mg/mL	0,0156mg/mL	0,0078mg/mL
Epicatequina	91,49	91,60	91,83	74,12	55,39
Galato de Epicatequina	92,51	92,28	92,85	85,70	16,00
Galato de Epigalocatequina	92,40	92,17	92,40	88,42	55,28

*Os valores de IP foram calculados no tempo estacionário (20min)





De acordo com os valores exibidos na tabela 36, para a *X. americana*, a porcentagem de inibição do radical DPPH é baixa para a fração hexânica, comparada aos valores obtidos para o extrato etanólico, para as frações clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica e para o composto XA. Esse comportamento está correlacionado com a natureza e a concentração de antioxidantes nas amostras como previsto por Sánchez-Moreno *et al.* (1998) e Choi *et al.* (2002), o que indica que a fração hexânica deve ser uma fonte pobre em compostos antioxidantes. Para as concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625 mg/mL as porcentagens de inibição do extrato etanólico, das frações clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica e do composto XA são semelhantes entre si e comparáveis aos controles, entretanto, a partir da concentração de 0,312 mg/mL a atividade da fração clorofórmica é significativamente menor que a atividade das demais amostras. Os resultados indicam ainda que dentre as frações obtidas da partição do extrato etanólica de *X. americana*, a fração acetato de etila parece ser a mais ativa e, portanto a mais rica em compostos antioxidantes. O resultado quantitativo da capacidade para seqüestrar o radical DPPH para o extrato etanólico de *X. americana*, para as frações obtidas a partir da partição líquido-líquido desse extrato (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica) e para o composto XA isolado a partir da fração acetato de etila é mostrado na **Figura 110, p 211**.

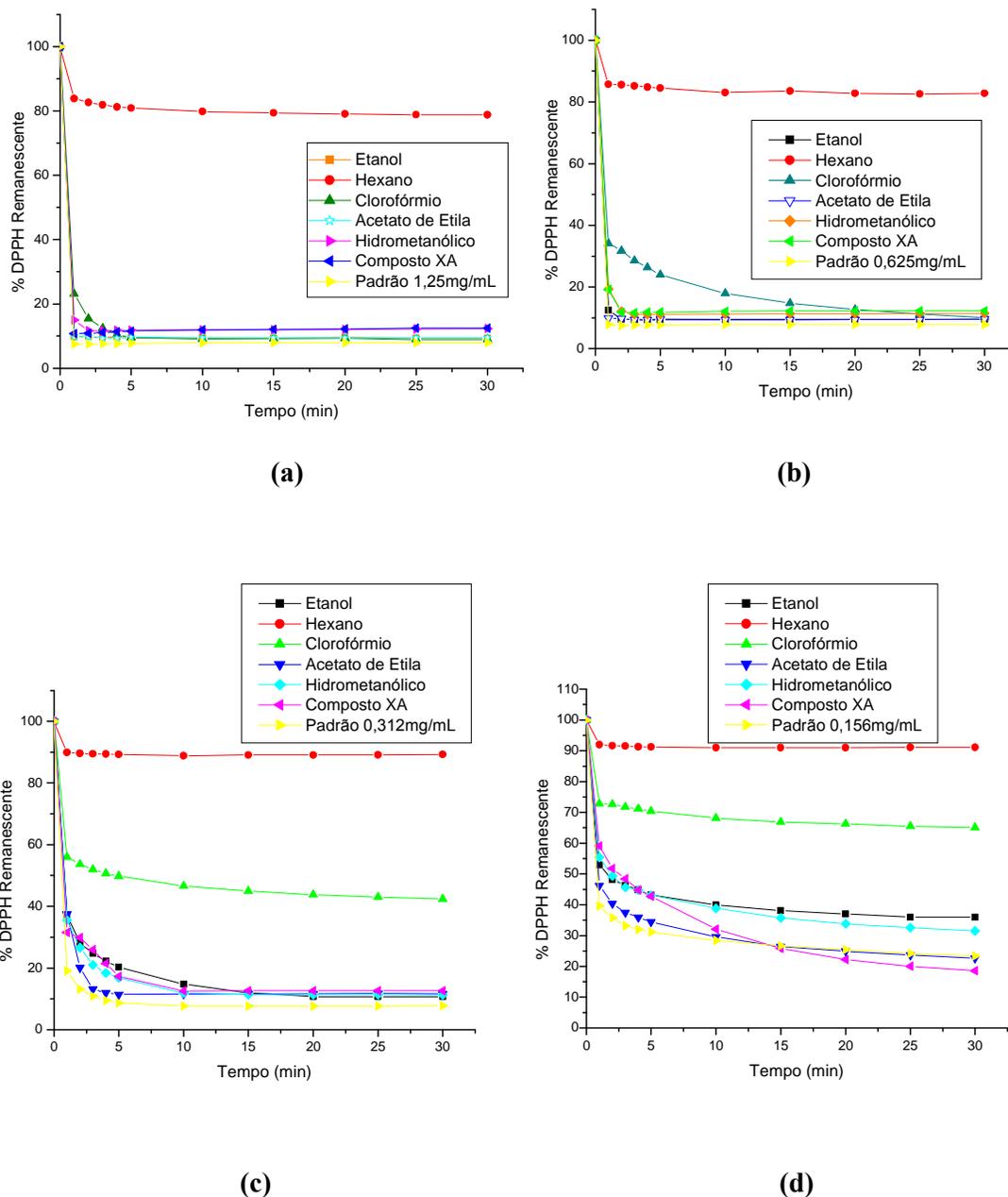


Figura 110 – Comportamento cinético da *X. americana* determinado espectrofotometricamente a 515nm, pela reação com uma solução de DPPH 90 μ M; 1,25mg/mL (a); 0,625mg/mL (b); 0,312mg/mL (c) e 0,156mg/mL (d)

Como as atividades dos controles são muito próximas apenas a (-)-epicatequina-galato foi utilizada para a comparação gráfica.

Os gráficos na **figura 110** indicam que outros compostos antioxidantes de diferentes polaridades podem ainda ser obtidos de *X. americana*. A prospecção fitoquímica mostrou um

resultado positivo para a presença dos compostos fenólicos em geral e compostos da classe dos flavonóides.

O composto XA, que foi caracterizado como a epicatequina, mostrou um comportamento próximo aos padrões utilizados, como era esperado.

A substância emotina I mostrou uma porcentagem de inibição de 88,33% a $1,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, um bom resultado quando comparado à porcentagem de inibição da (-)-epicatequina a $1,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ que é de 91,49%. O comportamento cinético da emotina I nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,312 mg/mL podem ser vistos na **figura 111**.

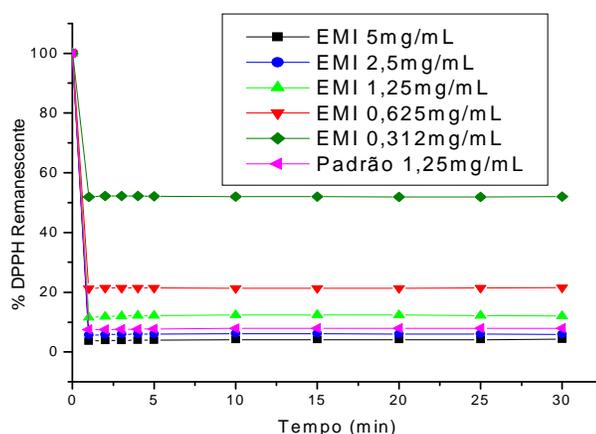


Figura 111 – Comportamento cinético Emotina I determinado espectrofotometricamente a 515nm, pela reação com uma solução de DPPH $90\mu\text{M}$

Por ser um composto fenólico, não é novidade a emotina I possuir atividade antioxidante. Em geral, a atividade sequestrante de compostos fenólicos depende da estrutura molecular e do padrão de substituição dos grupos hidroxilas, isto é, da disponibilidade de hidrogênios fenólicos e da possibilidade de estabilização dos radicais fenoxilas via ligação de hidrogênio ou deslocalização de elétrons. Grupos orto-dihidoxi possuindo propriedades elétron-doadores como observado na emotina I é um requerimento essencial na atividade antioxidante de flavonóides (AMIÉ *et al.*, 2003; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A eficiência de difenóis em *orto* e em *para* é devida em parte à estabilização do radical ariloxila por ligação de hidrogênio ou pela regeneração de um outro difenol indicado na **figura 112**, p.213 (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

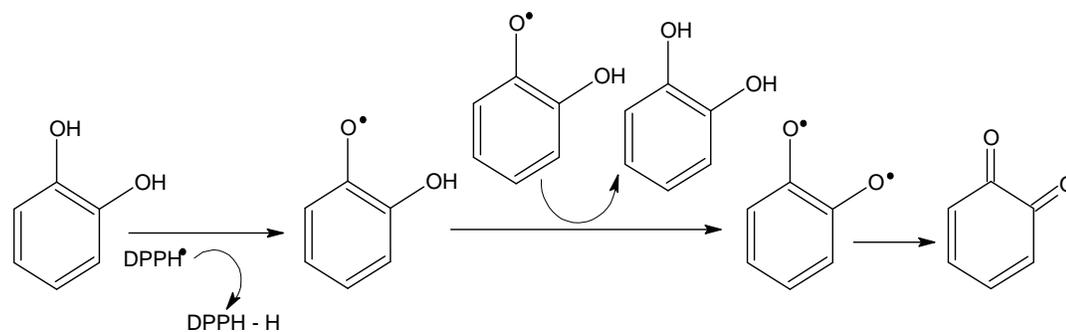


Figura 112 – Mecanismo de regeneração de um orto-difenol

Uma outra característica que deve contribuir para a ação antioxidante da Emotina I é a presença de uma carbonila peri a uma hidroxila.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO

Conclusão

Oito dos extratos testados mostraram ser ativos a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (mortalidade $\geq 40\%$) contra as larvas do *A. aegypti*. Os mais ativos com 100% de mortalidade foram os extratos das folhas de *A. muricata*, do caule de *B. cheilantha* e do tubérculo de *O. macrocarpa*. Os extratos das sementes de *S. mombin*, folhas de *C. echinata* e *E. uniflora*, caule de *C. echinata* e casca do caule de *M. altissima* exibiram, nesta ordem, um decréscimo de mortalidade contra as larvas do mosquito.

Apenas dois dos extratos testados neste estudo, aqueles das folhas da *A. muricata* e da casca do caule de *M. altissima*, mostraram atividade a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra o caramujo adulto, enquanto que o extrato do caule de *C. echinata* foi o único com uma boa atividade, 100% de mortalidade, contra a massa de ovos do caramujo *B. glabrata*.

Dezesseis dos extratos testados apresentaram atividade citotóxica (mortalidade $\geq 40\%$) contra as larvas de *A. salina* na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As mais altas atividades (100% mortalidade) foram observadas com as sementes de *S. mombin*, folhas de *A. muricata*, raízes de *B. cheilantha*, caule de *C. pyramidalis* e tubérculo de *O. macrocarpa*.

O extrato das folhas da espécie *A. muricata* apresentou os seguintes valores de concentração letal: *B. glabrata* $\text{CL}_{10} = 6,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $\text{CL}_{50} = 17,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\text{CL}_{90} = 73,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *A. aegypti* $\text{CL}_{10} = 11,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $\text{CL}_{50} = 28,52 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\text{CL}_{90} = 50,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$; *A. salina* $\text{CL}_{10} = 0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $\text{CL}_{50} = 0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\text{CL}_{90} = 2,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A curva dose-resposta do extrato das folhas de *A. muricata* sobre as larvas do *A. aegypti* mostrou que a partir da concentração de $700 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estatisticamente não existem diferenças no percentual de mortalidade após 330 minutos. Dessa forma, a concentração de $700 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que apresentou o melhor resultado, maior mortalidade em um menor espaço de tempo.

Annona muricata foi ativa no bioensaio com a traça-das-crucíferas *P. xylostella*. Sua avaliação sazonal demonstrou que o extrato obtido no mês de outubro promoveu uma taxa de mortalidade de 100% das lagartas quando aplicado na concentração de 5mg/mL , um percentual que não diferiu dos meses subsequentes até o mês de fevereiro, com médias de 86,6; 73,0; 69,0 e 61,0%, respectivamente. Em contraste, as porcentagens de mortalidade promovidas pelos extratos obtidos durante os outros meses do ano foram variáveis e menores, com valores variando entre 49,6% em maio a 14,6% em agosto.

O estudo fitoquímico do extrato das folhas da *A. muricata* conduziu ao isolamento do fitoesteróide β -sitosterol e das acetogeninas anossenegalina, xilomaticina, bulatanocina, anomontacina, anonacina, goniotalamicina e isoanonacina.

A substância β -sitosterol foi submetido aos bioensaios frente ao molusco *B. glabrata*, às larvas do mosquito *A. aegypti* e às larvas da *A. salina* e mostrou-se inativo em todos eles.

As acetogeninas isoladas foram ativas no caramujo *B. glabrata* e nas larvas do mosquito *A. aegypti*. A ação moluscicida das acetogeninas é descrita aqui pela primeira vez.

A casca do caule da espécie *X. americana* mostrou uma boa atividade antioxidante com o radical DPPH com uma porcentagem de inibição igual 89,02% na concentração de 0,312mg/mL. O seu estudo fitoquímico conduziu ao isolamento da substância epicatequina como um dos responsáveis pela atividade (PI = 91,49% na concentração de 1 mg.mL⁻¹).

As substâncias emotinas A, B, F, I, emotinol-1 e emotinol-2 foram reavaliadas confirmando as estruturas descritas na literatura. Os dados de ressonância magnética nuclear da emotina I, emotinol-1 e emotinol-2 estão sendo descritos pela primeira vez.

A substância emotina I apresentou atividade antioxidante com o radical DPPH (PI = 79,22% na concentração de 0,625 mg.mL⁻¹) e atividade larvicida frente às larvas do mosquito *A. aegypti* (CL₅₀ = 11,70 μ g.mL⁻¹).

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GAWAD, M. M.; EL-SAYEDU, M. M.; ABDEL-HAMEED, E. S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia**. v. 70, p. 371-381, 1999.
- ABE, F. & YAMAUCHI, T. Megastigmanes and flavonoids from the leaves of *Scorodocarpus borneensis*. **Phytochemistry**. v. 33, p.1297-1301, 1998.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; HONDA, K. & HAYASHI, N. Cyclitols and their glycosides from leaves of *Marsdenia tomentosa*. **Phytochemistry**. v. 47, p.1499-1501, 1993.
- ABELSON, P. H. Medicine from plants. **Science**. v. 247, p.513-515, 1990.
- ABO, K.A.; OGUNLEYE, V.O. & ASHIDI, J.S. Anti-microbial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**. v. 13, p.494-497, 1999.
- ADEWUNMI, C.O. & SOFOWORA, E. A. Preliminary screening of some plant extracts of molluscicidal activity. **Planta Medica**. v. 39, p.57-65, 1980.
- ADEWUNMI, C.O. & ADESAGEN, E. K. Toxicology of some Nigerian plants used in schistosoma control. I. The effect of molluscicides on molluscan hearts. **Fitoterapia**. v. 57, p.353-358, 1986.
- ADEWUNMI, C.O., AGBEDAHUNSI, J.M., ADEBAJO, A.C., ALADESANMI, A.J., MURPHY, N., WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 77, p.19-24, 2001.
- AKENDENGUE, B.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. **Phytochemistry**. v. 59, p. 885-888, 2002.
- ALADESANMI, A. J. & ADEWUNMI, C.O. Molluscicidal activity of ferrubietolide. **Fitoterapia**. v. 66, p.84-85, 1995.
- ALALI, F.; ZENG, L.; ZHANG, Y.; YE, Q.; HOPP, D. C.; SCHWEDLER, J. T. & MCLAUGHLIN, J. L. 4-deoxyannomontacin and (2,4-cis and trans)-annomontacinone, new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 5, p. 549-555, 1997.
- ALALI, F. Q.; ZHANG, Y.; ROGERS, L. & MCLAUGHLIN, J. L. Monotetrahydrofuran acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 761-768. 1998
- ALALI, F. Q.; LIU, XIAO-Xi & MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**. v. 62, p.504-540, 1999.
- ALKOFAHI, A.; RUPPRECHT, J. K.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J. & MCLAUGHLIN, J. L. Goniothalamycin and annonacin bioactive acetogenins from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). **Experientia**. v. 44, p. 83-85, 1998.
- ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO R. & BALDISSEROTTO, B. Análise do efeito antidiarreico das plantas usadas na medicina popular, Revista de Saúde Pública. v. 29, p.428-433, 1995.
- AL-ZANBAGI, N.A.; BANAJA, Abdul-Elah A.; BARRETT, J. Molluscicidal activity of some Saudi Arabian Euphorbiales against the snail *Biomphalaria pfeifferi*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 70, p.119–125, 2000.
- AMIÉ, D.; DAVIDOVIÉ-AMIÉ, D.; BESLO, D. & TRINAJSTIÉ, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**. v. 76, p.55-61, 2003.
- ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L. & SILVA, M. S. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution na compilation of ¹³C NMR data. **Recent Res. Dev. Phytochem.**, v. 7, p.1-85, 2003.

- ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M. & COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**. v. 95, p.229-233, 2004
- ASRES, K.; BUCAR, F.; KARTNIG, T.; WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C. & DE CLERCQ, E. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 and type 2 of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. **Phytotherapy Research**. v. 15, p.62-69, 2001.
- BALBACH, A. **As Plantas Curam**. São Paulo, Ed. Missionária, 1986.
- BALMÉ, F. **Plantas Medicinais**. São Paulo, Hemus, 1982.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro, Fio-Cruz, 1995.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Constituents of the stem-bark of *Zyziphus joazeiro*. **Journal of Natural Products**. v. 48, p.152; 1985.
- BARROS, G. S. G.; MATOS, F. J. A. & VIEIRA, J. E. V. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 22, p.116-122, 1970.
- BATISTA, J. S.; ALMEIDA, R. N. & BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 45, p.207-210, 1995.
- BELL, E. A. **The Physiological role(s) of secondary (natural) products**. In: **the biochemistry of plants, a comprehensive treatise**. New York, Academic Press, 1981.
- BEIGUELMAN, B. **Curso prático de Bioestatística**. São Paulo, Fundação de pesquisas Científicas de Ribeirão preto. 2002.
- BENOIT, F.; VALENTIN, A.; PELISSIER, Y.; DIAFOUKA, F.; MARION, C.; KONEBAMBA, D.; KONE, M.; MALLIE, M.; YAPO, A. & BASTIDE, J. M. Antibacterial activity of plant extracts - a comparison of agar dilution and microtitre In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**. v. 54, p.67-71, 1996.
- BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRIC, P.H.; SANTOS, S.C., Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants **Fitoterapia**. v. 73, p.428-430, 2002.
- BIANCO, A.; PASSACANTILLI, P.; NICOLETTI, M. & LIMA, R. A. Iridoids in equatorial and tropical flora. A new glucosidic iridoid from *Tecoma chrysantha* Jacq. **Gazzetta Chimica Italiana**. v. 112, p.227-229, 1982.
- BIANCO, A.; PASSACANTILLI, P.; NICOLETTI, M. & LIMA, R. A. Iridoids in equatorial and tropical flora. Two new natural esters of 6-epinomonelittoside. **Gazzetta Chimica Italiana**. v. 113, p.465-467, 1983.
- BOHLIN, L. Cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida*. **Phytochemistry**. v. 52, p.1739-1744, 1999.
- BOHLMANN, F.; GRENZ, M.; GUPTA, R. K.; DHAR, A. K.; AHMED, M.; KING, R. M. & ROBINSON, H. Eudesmane Derivatives from *Verbesina* species. **Phytochemistry**. v. 19, p. 2391-2397, 1980.
- BONGAERTS, R. J. M. **The chorismate branching point in *Catharanthus roseus*. Aspects of anthranilate synthase regulation in relation to alkaloid biosynthesis**. Tese de Doutorado - Universidade de Leiden – Holanda, 1998.
- BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A. & LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**. v. 57, p.434-436, 1991.
- BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVALCANTE, M. F.; DE OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R. & ECHEVARIA, A. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v. 23, p.20-22, 2000.

- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. Natal, Ed. Universitária, 1960.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. & BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 28, p.25-30, 1995.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova-SBQ**. v. 17, p.405; 1994.
- BRESOLIN, T. M. R. & CECHINEL-FILHO, V. **Ciências químico-farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí-SC. Editora Univali, 2003.
- BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products**. Ed. Chapman & Hall, London, 1993.
- CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R. & FUENTES, V. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 33, p.21-24, 1991.
- CÁRDENAS, E.; GIL, I. & HONORATO, J. Irinotecan. **Rev. Med. Univ. Navarra**. v. 46, p.49-55, 2002.
- CASTELO BRANCO, M. **Inseticidas para o controle da traça-das crucíferas: avaliação da eficiência, resistência e impacto sobre inimigos naturais**. Brasília, Embrapa-CNPq (boletim de pesquisa, 1), 1998.
- CASTELO BRANCO, M. & GUIMARÃES, A. L. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura brasileira**. v. 82, p.4-25, 1990.
- CATARINO, P.S.; EZEQUIEL, M.D. Control de moscas de la fruta com extractos de anona *Annona squamosa* L. (ANNONACEAE). In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, II, Chiapas. Proceedings**. Chiapas: Universidade de Chiapas, p.85-86, 1999.
- CECHINEL-FILHO, V. & YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, p.99-105, 1998.
- CHAMPY, P.; HOGLINGER, G.; FEGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R. & HIRSCH, E. C. Annonacin, the major acetogenin of *Annona muricata* (Annonaceae) induces neurodegeneration and astrogliosis in rat. **Movement Disorders**. v. 17, p.153, 2002.
- CHAMPY, P.; HOGLINGER, G.; FEGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R. LAURENS, A.; GUERINEAU, V.; LAPREVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; MICHEL, P. P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E. C & RUBERG, M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**. v. 88, p. 63-69, 2004.
- CHANG, F. R.; WEI, J. L.; TENG, C. M. & WU, Y. C. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**. v. 49, p.2015-2018, 1998.
- CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; HSIEH, T. J.; CHO, C. P. & WU, Y. C. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**. v. 47, p. 913-920, 2000.
- CHANG, F. R. & WU, Y. C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 925-931, 2001.
- CHANG, F. R.; LIAW, C. C.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F. & WU, Y. C. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**. v. 69, p.241-246, 2003.

- CHEN, C. Y.; CHANG, F. R. & WU, Y. C. Cherimolina, a novel alkaloid from the stems of *Annona cherimola*. **Tetrahedron Letters**. v. 38, p. 6247-6248, 1997.
- CHEN, D. J.; FU, L. F.; SHAO, P. P.; WU, F. Z.; FAN, C. Z.; SHU, H.; REN, C. X. & SHENG, X. L. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi*. v. 60, p. 422-425, 1980 Apud BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; SHU-HUA, X.; WEISS, N. A. & TANNER, M. Triggering of high level resistance against *Schistosoma mansoni* reinfection by artemether in mouse model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 71, p. 774-777, 2004.
- CHEN, Y.; CHEN, R. Y. & YU, D. Q. A new annonaceous acetogenin from *Goniothalamus gardneri*. **Chinese Chemical Letters**. v. 8, p. 971-974, 1997.
- CHEN, C. Y. & WU, Y. C. Annocherine C, a new C-alpha hydroxyl benzylisoquinoline and other constituents from the leaves of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**. v. 48, p. 1203-1206, 2001.
- CHENG, S.-S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Bioresource Technology**. v. 89, p.99–102, 2003.
- CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H. & KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. v. 163, p.1161-1168, 2002.
- CHOWDHURY, A. K. A.; HASHIM, M. F.; SEN, B. C.; KHAN, F. & AHMED, M. Antifertility principles from *Marsdenia-Tinctoria*. **Pharmacological And Photochemical Studies Pure And Applied Chemistry**. v. 66, p.2343-2346, 1994.
- CICCIA, G.; COUSSIO, J. & MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 72, p.185-189, 2000.
- COLMANSÁZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R.; GU, Z. M.; NG, J. H.; SMITH, D. L. & MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. **Journal of Natural Products**. v. 57, p.486-493, 1994.
- CONSOLINI, A. E.; BALDINI O. A. N. & AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as an anti-hypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 66, p.33-39, 1999.
- CONSOLINI, A. E. & SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p.57-63, 2002.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. 1978.
- CORTES, D.; MYINT, S. H.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LÉBOUF, M. and CAVÉ, A. Corosolone and corosoline, 2 new cytotoxic monotetrahydrofuran gamma lactones. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie**. v. 69, p.8-11, 1991.
- CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M., VANDENBERGHE, D. A. & VLIETINCK, A. J. Plant anti-viral agents. 9. Anti-viral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**. v. 31, p.1979-1981, 1992
- CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M., VANDENBERGHE, D. A. & VLIETINCK, A. J. Anti-bacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**. v. 60, p.460-463, 1994.
- DAN, S. www.albion.edu/plants/annonepg.htm 1984.
- DA SILVA, K. L. & CECHINEL FILHO, V. Plants of the genus *Bauhinia*: Chemical composition and pharmacological potential. **Química Nova**. v. 25, p.449-454, 2002.

- DA SILVA, N. H. “Estudo químico das espécies *Emmotum nitens* (Benth) Miers e *Emmotum fagifolium* Desv.” Tese de Doutorado- Depto de Química - ICEX - UFMG - Belo Horizonte, 1979.
- DE OLIVEIRA, A. B.; FERNANDES, M. L. M. & GOTTLIEB, O. R. Aromatic sesquiterpenoids from *Emmotum nitens*. **Phytochemistry**. v. 13, p.1199-1204, 1974.
- DE OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; LIBERALLI, C. T. M.; GOTTLIEB, O. R. & MAGALHÃES, M. T. Structure and absolute configuration of the sesquiterpenoid emmotins. **Phytochemistry**. v. 15, p.1267-1270, 1976.
- DELORME, R. J. & MIOLLA, H. **Pronto socorro do sertão**, a cura pelas plantas. Porto Alegre, Coleção Natura, 1979.
- DESMARCHELIER, C.; ROMA, R. L.; COUSSIO, J. & CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 67, p.69–77, 1999.
- DEVON, T. K. & SCOTT, A. I. **Handbook of Naturally Occurring Compounds. Volume II. Terpenes**. New York and London, Academic Press, 1972.
- DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo, Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
- DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H. & REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. v. 73, p.69-91, 2002
- DIAZ, A. M. P. Neolignans from *Anaxagorea clavata*. **Phytochemistry**. v. 44, p. 345-346, 1997.
- DIRSCH, V.; NESZMÉLYI, A. & WAGNER, H. A trimeric propylarginidin from stem bark of *Heisteria pallida*. **Phytochemistry**. v. 34, p.291-293, 1993.
- DOMINGUES, O. **Introdução à zootecnia**. São Paulo, Série didática, 1968.
- DORN, A. H. S. Monitoring seasonal variation in apple fruit volatile emissions *in situ* using solid-phase micro-extraction. **Phytochemical Analysis**. v. 14, p.232-240, 2003.
- DOS SANTOS, A. F. & SANT'ANA, A. E. G. Moluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatrofolones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **Phytotherapy Research**. v. 13, p.660-664, 1999.
- DOS SANTOS, A. F. & SANT'ANA, A.E.G. The moluscicidal activity of plants used in Brazilian folk medicine. **Phytomedicine**. v. 6, p.431-438, 2000.
- DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**. V .8, p.115-120, 2001.
- DOS SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A. & BRAZ, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 43, p. 396-400, 2003.
- DOWNUM, K. R.; ROMEU, J. T. & STAFFORD, H. A. Recent advances in the acetogenins of Annonaceae. **Phytochemical Potential of Tropical Plants**. v. 27, p. 167-202, 1993.
- DREYER, M. & HELLPAP, C. Nemm – a promising natural insecticide for small-scale vegetable production in tropical and subtropical countries. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 98, p.428-437, 1991.
- ELSOHLY, H.N.; CROMM JR., E.M.; KOPYCKI, W.J.; JOSHI, A.S.; MCCHESENEY, J.D. Diurnal and seasonal effects on the taxane content of the clippings of certain *Taxus* cultivars. **Phytochemical Analysis**. v. 8, p.124-129, 1997.
- EREMOSELE, C. O. & EREMOSELE, I. C. Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia Americana*. **Bioresource Technology**. v. 82, p.303-304, 2002.
- FANG, X. P.; ANDERSON, J. E.; SMITH, D. L. & McLAUGHLIN, J. L. Gigantetronenin and gigantrionenin – novel cytotoxic acetogenins from *Goniothalamus-giganteus*. **Journal of Natural Products**. v. 55, p. 1655-1663, 1992.

- FANG, X.; RIESER, M. J.; GU, Z.; ZHAO, G. & MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: An Updated Review. **Phytochemical Analysis**. v. 4, p.27-48, 1993.
- FARRIES, J. **A study of the effect of neem oil on the life cycle of the cattle tick (*Boophilus microplus*)**. Disponível em: http://maxpages.com/neemarticles/NEEM_OIL_on_CATTLE_TICK. Acesso em 11/06/2003.
- FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A. & TAKEDA, Y. C-18 acetylenic fatty acids of *Ximenia americana* with potential pesticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p.1872-1874, 2000a.
- FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A. & TAKEDA, Y. Oleanene palmitate from *Ximenia americana* **Pharmaceutical Biology**. v. 38, p. 391-393, 2000b.
- FENG, P. C.; HAYNES, L. J.; MAGNUS, K E; PLIMMER, J. R. & SHERRAT, H. S. A. Pharmacological screening of some west indian medicinal plants. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 14, p.556-561, 1962.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**, Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1971.
- FITZPRATICK, F. A. & WHEELER, R. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol ®), docetaxel (Taxotere ®), and related agents. **International Immunopharmacology**. v. 3, p.1699-1714, 2003.
- FORGAES, P. & PROVOST, J. Olaxoside, a saponin from *Olox andronensis*, *Olox glabriflora* and *Olox psittacorum*. **Phytochemistry**. v. 0, p.1689-1691, 1981.
- FORT, D. M.; KING, S. R.; CARLSON, T. J. & NELSON, S. T. Minquartynoic acid from *Coula edulis*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 28, p.489-490, 2000.
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Guia de vigilância epidemiológica. Brasília. Ministério da Saúde. 2002. Disponível em <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/dengue0.htm>>. Acesso: em 13 fev. 2005.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M. & SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**. v. 488, p.35-51, 2003.
- GLASS, V. Búfalo, cenário adequado. **Revista Globo Rural**. v. 15, p.46-52, 2000.
- GLEYE, C; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; LAPRÉVOTE, O. & SERANI, L. Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry. **Journal of Organic Chemistry**. v. 62, p.510-513, 1997a.
- GLEYE, C; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L. & CAVÉ, A. Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 44, p.1541-1545, 1997b.
- GLEYE, C; DURET, P.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. & CAVÉ, A. Cis-monotetrahydrofuran acetogenins from the roots of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 61, p.576-579, 1998a.
- GLEYE, C; RAYNAUD, S.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; FOURNEAU, C.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O.; ROBLOT, F.; LÉBOUEF, M.; FOURNET, A.; DE ARIAS, A. R.; FIGADERÉ, B. & CAVÉ, A. Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins. **Phytochemistry**. v. 47, p. 749-754, 1998b.
- GLEYE, C; LAURENS, A.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L. & HOCQUEMILLER, R. Isolation and structure isolation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 52, p.403-1408, 1999.
- GLEYE, C.; AKENDENGUE, B.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis. **Planta Medica**. v. 67, p.570-572, 2001.

- GOODWIN, T. W. Distribution of carotenoids. In Goodwin T. W. (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press, London. v. 1, p. 225-261, 1976.
- GOULART, M. O. F. **Estudo químico de quatro espécies vegetais da Amazônia e eletroquímica de emotinas**". Tese de Doutorado - Depto de Química - ICEX- UFMG - Belo Horizonte, 1983.
- GOULART, M. D.; SANT'ANA, A. E. G.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G. & MAIA, J. G. S. **Phytochemistry**. v. 25, p.1691, 1986.
- GOVINDACHARI, T. R. & VISWANATHAN, N. Alkaloids of *Mappia foetida*. **Phytochemistry**. v. 11, p.3529-3531, 1972.
- GREEN, M. M.; SINGER, J. M.; SUTHERLAND, D. J. & HIBBEN, C. R. Larvicidal activity of *Targetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** v. 7, p.282-286, 1991.
- GRITSANAPAN, W. Insecticidal activity of *Annona squamosa* Linn. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS I, Chapingo, **Proceedings**. Chapingo: Universidad Autonoma de Chapingo, 187-192, 1997.
- GROMEK, D.; HOCQUEMILLER, R. & CAVÉ, A. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 5, p.133-140, 1994.
- GU, Z. M.; FANG, X. P.; RIESER, M. J.; HUI, Y. H.; MIESBAUER, L. R.; SMITH, D. L.; WOOD, K. V. & MCLAUGHLIN, J. L. New cytotoxic annonaceous acetogenins: bullatanocin and cis- and trans- bullatanocinone, from *Annona bullata* (Annonaceae). **Tetrahedron**. v. 49, p. 747-754, 1993.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**. v. 10, n.2, p.100-103, 2002
- GUSMÃO, D. S.; PÁSCOA, V.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ, R. & Lemos, F. J. A. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p.371-375, 2002.
- GUZMAN, M. G. & KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the americas: Lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**. v. 27: p.1-13, 2003.
- HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, p.3864-3874, 1991.
- HAO, X.; YANG, X. S.; ZHANG, Z.; & SHANG, L. J. Clerodane diterpene from *Polyalthia cheliensis*. **Phytochemistry**. v. 39, p. 447-448, 1995.
- HARTL, M. & HUMPF, H. U. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Food Chem. Toxicol.** v. 38, p. 1097-1102, 2000.
- HASRAT, J. A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J. P.; VAUQUELIN, G. & VLIETINCK, A. J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and and Pharmacology**. v. 49, p.1145-1149, 1997.
- HEGNAUER, R. "**Chemotaxonomie der pflanzen**" IV p.275, Birkhauser Verlag, 1966.
- HEINRICH, M.; KHUNT, M.; WRIGHT, C. W.; RIMPLER, H., PHILLIPSON, J. D.; SCHANDELMAIER, A. & WARHURST, D. C. Parasitological and microbiological evaluation of Mixe Indian medicinal plants (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 36, p.81-85, 1992.
- HISHAM, A.; SREEKALA, U.; PIETERS, L.; BRUYNE, T.; van den HEUVEL, H. & CLAEYS, M. Epoxymurins A and B, two biogenetic precursors of annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Tetrahedron**. v. 49, p.6913-6920, 1993.

- HO, S. H.; WANG, J.; SIM, K. Y.; EE, G. C. L.; IMIYIABER, Z.; YAP, K. F.; SHAARI, K. & GOH, S. H. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. **Phytochemistry**. v. 62, p.1121-1124, 2003.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V. & DIAS, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p.1027-1031, 2002.
- HOSAMANI, K. M. & PATTANASHETTAR, R., S. Mappia foetida seed oil: A rich source of oil and moderate source of novel 3-keto-octadec-cis-15-enoic acid and its possible industrial utilization. **Industrial Crops and Products**. v. 22, p. 135-139, 2004.
- HSIEH, T. J.; WU, Y. C.; CHEN, S. C.; HUANG, C. S. & CHEN, C. Y. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**. v. 51, p. 869-876, 2004.
- IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P. & HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**. v. 53, p.613-617, 2000.
- JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZALEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M. & VELEZ, I. D. Cytotoxic and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**. v. 71, p.183-186, 2000.
- JIANG, Z. & YU, D. Q. New type of mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from *Goniothalamus donnaiensis*. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 929-933, 1997.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. & MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**. v. 28, 519-528, 2005.
- KELM, M. A. & NAIR, M. G. Mosquitocidal compounds and a triglyceride, 1,3-dilinolenoyl-2-palmitin, from *Ocimum sanctum*. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p.3092-3094, 1998.
- KIM, D. H.; SON, J. K. & WOO, M. H. Annomocherin, annonacin and annomontacin: A novel and two known bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Archives of Pharmacal Research**. v. 24, p. 300-306, 2001.
- KIM, J. R.; YEON, S. H.; KIM, H. S. & AHN, Y. J. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. **Pest Management Science**. v. 58, p.713-717, 2002.
- KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. Plant molluscicides: a review. **WHO schisto**. v. 51, p.59, 1981.
- KONE, W. M.; ATINDEHOU, K. K.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K.; TRAORE, D. & DOSSO, M. Traditional medicine in North Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93, p.43-49, 2004.
- KUBO, I.; KOMATSU, AS. & OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 34, p.970-973, 1986.
- KUBO, I.; YING, B.; CASTILLO, M.; BRINEN, L. S. & CLARDY, J. Ponoandin, a molluscicidal sesquiterpene lactone from *Podocarpus andina*. **Phytochemistry**. v. 31, p.1545-1548, 1992.
- KUMAR, A., KHARE, A., KHARE, N.K. Trisaccharides from *M. roylei*. **Phytochemistry**. v. 52, p.675-679, 1999.
- KUTSCHABSKY, L.; SANDOVAL, D. & RIPPERGER, H. Bullatantriol, a sesquiterpene from *Annona bullata*. **Phytochemistry**. v. 24, p. 2724-2725, 1985.
- LANNUZEL, A.; MICHEL, P. P.; HOGLINGER, G. U.; CHAMPY, P.; JOUSSET, A.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; DARIOS, F.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; HIRSCH, E. C. & RUBERG, M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is

- toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience**. v. 121, p.287-296, 2003.
- LEATEMIA, J. A. & ISMAN, M. B. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. **International Journal of Pest Management**. v. 50, p.129-133, 2004.
- LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. **Phytochemistry**. v. 21, p.2783-2813, 1982.
- LEMMA, A. A preliminary report on the molluscicidal property of Endod (*Phytolacca dodecandra*). **Ethiop. Med. J.** v. 3, p.187-190, 1965.
- LEMMICH, E.; ADEWUNMI, C.O.; FURU, P.; KRISTENSEN, A.; LARSEN, L.; OLSEN, C.E. 5-Deoxyflavones from *Parkia clappertoniana*. **Phytochemistry**. v. 42, n.4, p.1011-1013, 1996.
- LI, C. M.; TAN, N. H.; MU, Q.; ZENG, H. L.; HAO, X. J.; WU, Y. & ZHOU, J. From the seeds of *Annona squamosa* a new **cyclopeptide**, annosquamosin A (cyclo-(prolyl-S-oxomethyl-thryl-alanyl-isoleucyl-valyl-glycyl-tyryl), has been isolated. The structure was elucidated by chemical and spectral methods. **Phytochemistry**. v. 45, p. 521-523, 1997.
- LI, D. Y.; YU, J. G.; ZHU, J. X.; YU, D. L.; LUO, X. Z.; SUN, L. & YANG, S. L. Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 3, p.267-276, 2001.
- LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J. & WU, Y. C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 65, p.470-475, 2002.
- LIMA, M. S.; ALBUQUERQUE, D. A.; IBANEZ, O. M. & SANTANNA, O. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 88, p.599-603, 1993.
- LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; HOPP, D. C.; ROGERS, L. L.; PILARINOU, E. & MCLAUGHLIN, J. L. Glabracins A and B, two new acetogenins from *Annona glabra*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 959-965, 1998.
- LODYATO, V. I.; YURKOVA, I. L.; SOROKIN, V. L.; SHADYRO, O. I.; DOLGOPALET & KISEL, A. M. Novel (3,5-di-tert-butyl-2-hydroxy-phenylcarbamoyl)-alkanoic acids as potent antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p.4253-4256, 2004.
- LONDERSHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H. Molecular mode of action of annonins. **Pesticide Science**. v. 33, p.427-438, 1991.
- LUE, Y. P.; MU, Q.; ZHENG, H. L. & LI, C. M. 24-methylene tetracyclic triterpenes from *Polyalthia lancilimba*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 2053-2056, 1998.
- LUO, X. D.; BASILE, M. J. & KENNELLY, E. J. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p.1379-1382, 2002.
- MA, B.X., FANG, T.Z., MA, K., NI, J.H., WU, H.M., DING, W.P., JIANG, C.S. Novel saponins hainaneosides A and B isolated from *M. hainanensis*. **Journal of Natural Products**. v. 60, p.134-138, 1997.
- MACHADO, A. A. & ZONTA, E. P. **Manual do Sanest: Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas, UFPel, 1991.
- MAIA, J. G. S. “Estudo químico de *Emmotum orbiculatum* (Benth.) Miers e *Emmotum glabrum* Benth. Ex. Miers”. Tese de Doutorado - Depto de Química - ICEX- UFMG - Belo Horizonte, 1983.
- MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. & HARBORNE, J. B. **Natural Products: their Chemistry and Biological Significance**. New York – USA, Longman Scientific & Technical, 1994.

- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Belo Horizonte-MG, Atheneu, 2001.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**. v. 24, p.639-652, 1985.
- MARSTON, A.; MAILARD, M. & HOSTETTMANN, K. Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal from African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 38, p.215-223, 1993.
- MARTINEZ, S.S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR., 2002.
- MARTINS, J. E. C. **Plantas Medicinais de Uso na Amazônia**. 2ª Edição Cultural CEJUP, 1989.
- MARTINS, E. R.; DE CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. & DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa-MG, Imprensa Universitária, 1995.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. Fortaleza, Edições UFC. 1994.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza. Edições UFC, 1997.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. & SMITH, D. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update studies. In **Natural Products Chemistry**, 9, London, Att Ur-Rahman(Ed), Pergamon Press, 1991.
- MERZLYAK, M. N.; KHOZIN, I. & COHEN, Z. Spectrophotometric analysis of carotenoids in plant extracts based on elimination of chlorophyll absorption. **Phytochemical Analysis**. v. 7, p.294-299, 1996.
- MILLIKEN, W. **Plants for Malaria Plants for Fever**. Royal Botanic Gardens, Kew. 1997.
- MOESCHLER, H. F.; PFLUGER, W. & WENDISCH, D. **Pure annonin and a process for the preparation thereof, United States**, Bayer 4689232, 1987, <http://freepatentsonline.com/4689232> acessado em 15/01/06.
- MONNERATI, R. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BUTT, T. M. & BORDAT, D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-da-crucíferas por susceptibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD-PCR. **Horticultura Brasileira**. v. 22, p.607-609, 2004.
- MORTON, Julia F. **Soursop: fruits of warm climates**. Miami-FI, 75-80 www.hort.purdue.edu/newcrop/mortons/soursop.html, 1987.
- MYINT, S. H.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; DAVOUST, D. & CORTES, D. Murisolin: a new cytotoxic mono-tetrahydrofuran- γ -lactone from *Annona muricata*. **Heterocycles**. v. 31, p.861-867, 1990.
- MYINT, S. H.; CORTES, D.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; COTTE, J. & QUÉRO, A. Solamin: a cytotoxic mono-tetrahydrofuran- γ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. **Phytochemistry**. v. 30, p.3335-3338, 1991.
- NAKANO, O.; PARRA, J. R. P. & MARCHINI, L. C. **Pragas das hortaliças e ornamentais**. In: **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. Piracicaba: FEALQ, 1992.
- NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p.383–388, 2002.
- NEVES, D. P. (2000). **Parasitologia Humana**. São Paulo, Atheneu, 2000.
- NOORI, S. H.; NADERI, G. H. A.; ZUHAIR, M. H.; HABIBI, Z.; BATHAIE, S. Z. & HASHEMI, M. M. Immunosuppressive activity of a molecule isolated from *Artemisia annua* on DTH responses compared with cyclosporin A. **International Immunopharmacology**. v. 4, p.1301-1306, 2004.
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P. & ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmintos praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova**. v. 22, p.5-10, 1999.

- OBERLIES, N. H.; JONES, J. L.; CORBETT, T. H.; FOTOPOULOS, S. S. & MCLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous. **Cancer Letters**. v. 96, p.55-62, 1995.
- OFFIAH, V. N. & ANYANWU, I. I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 26, p.317-320, 1989.
- OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; CARAZZA, F. & MAIA, J. G. S. **Phytochemistry**. v. 26, p.2650-2651, 1987.
- OLIVEIRA, A. B. Terpenoids from Amazonian Icacinaceae In: The chemistry of the Amazon.1. Ed.Washington: **American Chemical Society**. v. 588, p.99-115, 1994.
- OLIVEIRA, R. C. & GAZZINELLI, G. Vacina contra a esquistossomose. **Ciência Hoje**. v. 8, 27-32, 1998.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 46, p.342-350, 2000.
- OLIVEIRA, F. C.; FERREIRA, M. J. P.; RODRIGUEZ, G. V. & EMERENCIANO, V. P. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. v. 37, p.1-45, 2000.
- ORJALA, J.; ELDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T. & STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**. v. 34, p.813-818, 1993.
- PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P. & COSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 61, p.81-83, 1998.
- PARK, M.K.; PARK, J.H.; KIM, N.Y.; SHIN, Y.G.; CHOI, Y.S.; LEE, J.G.; KIM, K.H.; LEE, S.K. Analysis of 13 phenolic compounds in *Aloe* species by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 9, p.186-191, 1998.
- PARK, E.; KAHNGA, J.; LEEB, S. H. & SHINB, K. An anti-inflammatory principle from cactus. **Fitoterapia**. v. 72, p.288-290, 2001.
- PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W. & PETSCHL, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **J. Dent**. v. 28, p. 341-345, 2000.
- PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P. & MENDES, N. M. Propriedades moluscidas de *Euphorbia cotinifolia* L. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol**. v. 11, p.345-351, 1978.
- POTT, A. & POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisas Agropecuárias do Pantanal- Corumbá – MT, 1994.
- QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L. & CAVE, A. Spinencin, a new bis-tetrahydrofuran acetogenin from the seeds of *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 760-765, 1997.
- RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN, G.; GHOUSE, B. S.; ARUMUGAN, S. & HIMALAYANA, B. Effect of *Feronia limonia* on mosquito larvae. **Fitoterapia**. v. 71, p.553-555, 2000.
- RASAMIZAFY, S. J.; HOCQUEMILLER, R.; CASSELS, B. K. & CAVE, A. Alcaloïdes de *Annona hayesii*. **Journal of Natural Products**. v. 50, p.759-761, 1987
- RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H. & BOYD, M. R. HIV-inhibitory natural products part 61 - Absolute stereochemistry and anti-HIV activity of minquartynoic acid, a polyacetylene from *Ochanostachys amentacea*. **Natural Product Letters**. v. 15, p.21-26, 2001.
- RATNAYAKE, S.; RUPRECHT, J. K.; POTTER, W. M.; MCLAUGHLIN, J.L Evaluation of various parts of the paw tree, *Assimia triloba* (Annonaceae), as a commercial source of the pesticidal Annonaceous acetogenins. **Journal of Economic Entomology**. v. 85, p.2353-2356, 1992.

- RATNAYAKE, S.; MIESBAUER, L. R.; SMITH, D. L.; WOOD, K. V.; EVERT, D. R. & MCLAUGHLIN, J. L. **CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY REVUE CANADIENNE DE CHIMIE**. v. 72, p.287-293, 1994.
- REATIVOS MERCK. **Reativos de coloración para cromatografía en capa fina y em papel**. Darmstadt Alemanha, E. Merck, 1972.
- RIESER, M. J.; KOZLOWSKI, J. F.; WOOD & MCLAUGHLIN Muricatacin: a simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron letters**. v. 32, p.1137-1140, 1991.
- RIESER, M. J.; FANG, X. P.; ANDERSON, J. E.; MIESBAUER, L. R.; SMITH, D. L. & MCLAUGHLIN, J. L. Muricatetrocins A and B and Gigantetrocin-B – 3 new cytotoxic monotetrahydrofuran-ring acetogenins from *Annona-muricata*. **Helvetica Chimica Acta**. v. 76, p.2433-2444, 1993.
- RIESER, M. J.; GU, Z.; FANG, X.; ZENG, L.; WOOD, K. V. & McLaughlin, J. L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p.100-108, 1996.
- ROBLLOT, F.; LAUGEL, T.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. & LAPREVOTE, O. Acetogenins of annonaceae. 21. 2 acetogenins from *Annona-muricata* seeds. **Phytochemistry**. v. 34, p.281-285, 1993.
- RODRIGUÉZ, H.C. **Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Piracicaba. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 1995.
- RODRIGUÉZ-LOPÉZ, V.; SALAZAR, L. & ESTRADA, S. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. **Fitoterapia**. v. 74, p.725-728, 2003.
- ROJA, G. & HEBLE, M. R. The quinoline alkaloids camptothecin and 9-methoxycamptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nothapodytes foetida*. **Phytochemistry**. v. 36, p.65-66, 1994.
- RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. & MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**. v. 53, 237-278, 1990.
- SAHPAZ, S.; GONZÁLEZ, M. C.; HOCQUEMILLER, R.; ZAFRA-POLO, M. C. & CORTES, D. Annosenegalin and annogalene two cytotoxic mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**. v. 42, p. 103-107, 1996.
- SAKTHIVADIVEL, M. & THILAGAVATHY, D. Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. **Bioresource Technology**. v. 89, p.213–216, 2003.
- SAMUELSSON, G. Nature as a source of new drugs. **Acta Pharm. Nord**. v. 1, p.111-116, 1989.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A. & SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Sci. Food Agric**. v. 76, p.270-276, 1998.
- SANG, S.; CHENG, X.; STARK, R. E.; ROSEN, R. T.; YANG, C. Y.; HO, C. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. **Biorganic & Medicinal Chemistry**. v. 10, p.2233-2237, 2002.
- SANT'ANA, A. E. G. “**Re-Exame do *Emmotum nitens* (Benth.) Miers**”. Tese de Doutorado - Depto de Química - ICEx- UFMG - Belo Horizonte, 1983.
- SANTOS, D. Y. A. C. & SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of annonaceae from Brazil taxonomy significance. **Phytochemistry**. v. 55, p. 567-573, 2000.
- SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G. & PETROVICK, P. R. **Produtos De Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos. In: Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**. Ed. UFSC e UFRGS, 1999.

- SIMAS, N. K.; LIMA, E. D.; CONCEIÇÃO, S. D.; KUSTER, R. M.; DE OLIVEIRA, A. M.; LAGE, C. L. S. Natural products for dengue transmission control - Larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids. *Química Nova*. v. 27, p.46-49, 2004.
- SIMÕES, C. M. O. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 1989.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S. & BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. v.2 1, p.557-559, 1998.
- SIQUEIRA, I. R.; CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D. S. & NETTO, C. A. Antioxidant action of na ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides*. *Pharmaceutical Biology*. v. 40, p.374-379, 2002.
- SIQUEIRA, I. R.; FOCHESSATTO, C.; DA SILVA, A. L.; NUNES, D. S.; BATASTINI, A. M.; NETTO, C. A. & ELISABETSKY, E. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. v. 75, p.645-650, 2003.
- SIQUEIRA, I. R.; CIMAROSTI H.; FOCHESSATTO, C.; NUNES, D. S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E. & NETTO, C. A. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sciences*. v. 75, p.1897-1906, 2004.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C. & WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*. v.11, p.1-9, 2000.
- SOUSA, M. P. & ROUQUAYROL, M. Z. Molluscicidal activity of plants from northeast Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica*. v. 7, p.389-394, 1974.
- SOUZA, C.P.; MENDES, N.M.; ARAÚJO, N. & KATZ, N. Atividade moluscicida do extrato butílico de *Phytolaca dodecandra* (Endod) sobre *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 82, p.345-349, 1987.
- SOUZA, C. P.; MENDES, N. M.; JANNOTTI-PASSOS, L. K. & PEREIRA, J. P. O uso da castanha do caju *Anacardium occidentale* como moluscicida alternativo. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 34, p.459-466, 1992.
- SOUZA, L. K. H. E.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; DE OLIVEIRA, J. G.; MIRANDA, A. T. B., LIAO, L. M. & SILVA, M. D. R. Anti-fungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p.247-249, 2002.
- SPITZER, V.; TOMBERG, W.; HARTMANN, R. & AICHHOLZ, R. Analysis of the seed oil of *Heisteria silvanii* (Olacaceae) - a rich source of a novel C18 acetylenic fatty acid. **Lipids**. v. 32, p., 1189-1200, 1997.
- SULLIVAN, J. T.; RICHARDS, C. S.; LLOYD, H. A. & KRISHNA, G. Anacardic acid: molluscicide in casheunut shell liquid. **Planta Medica**. v. 44, p.175, 1982.
- SURESHGOUD; SINGH, R.; & KALIDHAR, S. B. Effescts of karanj (*Pongamia pinnata* vent) methanolic seed extracts and fractions on growth and development of *Plutella xylostella* L. (Lep., Yponomeutidae). **Biological Agriculture and Horticulture**. v. 23, p.1-14, 2005.
- TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. & GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**. v. 8, p.5-33, 1999.
- TEPE, B.; SOKMEN, M.; AKPULAT, H. A. & SOKMEN, A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. **Food Chemistry**. v. 90, p.685-689, 2005.
- THOMAS, A. F.; OZAINNE, M.; DECORZANT, R. & LUKACS, F. N. G. 10-epijunenol, a new cis-eudesmane sesquiterpenoid. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2261-2264, 1976.

- THOMPSON, M. J.; DUTKY, S. R.; PATTERSON, G. W. & GOODEN, E. L. NMR spectra of C-24 isomeric sterols. **Phytochemistry**. v. 11, p.1781-1790, 1972.
- THUMFORT, P. P.; PATE, J. S.; RASINS, E. & GHISALBERTI, E.L. S-ethenyl cysteine, an aminoacid from *Olox plillanthi*. **Phytochemistry**. v. 34, p.675-679, 1993.
- TRAINOTTI, A. “**Estudo químico de quatro espécies vegetais da região amazônica**”. Tese de Doutorado - Depto de Química - ICEX- UFMG - Belo Horizonte. 1979.
- TREYVAUD, V.; MARSTON, A.; DYATMIKO, W. & HOSTETTMANN, K. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. **Phytochemistry**. v. 55, p.603-609, 2000.
- VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais da Amazônia – Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. Editora Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1982.
- VANCE, N.C.; KELSEY, R.G.; SABIN, T.E. Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. **Phytochemistry**. v. 36, p.1241-1244, 1994.
- VASQUEZ, M. R. Useful Plants of Amazonian Peru. Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library, USA, 1990.
- VELAZQUEZ, E., TOURNIER, H. A., DE BUSCHIAZZO, P. M., SAAVEDRA, G. & SCHINELLA, G.R. Anti-oxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**. v. 74, p.91-97, 2003.
- VERPOORTE, R. Chemodiversity and the biological role of secondary metabolites, some thoughts for select plant material for drug development in: **Bioassay Methods In Natural Products Research and Drug Development**. Ed. BOHLIN, L. & BRUHN, J. G. London. Kluwer. p.11-23, 1999.
- VESELÁ, D.; SAMAN, D.; VALTEROVÁ, I. & VANEK, T. Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. **Phytochemical Analysis**, v. 10, p.319-321, 1999.
- VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia. Manual das plantas medicinais**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1992.
- VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. São Paulo, Campus, 1997.
- VILLAS BOAS, G. L.; CASTELO BRANCO, M. & GUIMARÃES, A. L.. Controle químico da traça das crucíferas no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**. v. 8, 1p.10-11, 1990.
- WAECHTER, A. I.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, L. & CAVE, A. Glaucafilin, an acetogenin from *Annona glauca*. **Phytochemistry**. v. 44, p. 1537-1540, 1997.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T. & SIM, G. A. Plant antitumor agents I. the isolation and structure of Camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**. v. 88, p.3888-3890, 1966.
- WANG, H. X. & NG, T. B. Natural Products with Hypoglycemic, Hypotensive, Hypocholesterolemic, Antiatherosclerotic and Antithrombotic Activities. **Life Sciences**. v. 65, p.2663-2677, 1999.
- WANI, M.C.; TAYLOR, H.I.; WALL, M. E.; COGGON, P. & MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents .6. isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus-brevifolia*. **Journal of The American Chemical Society**. v. 93, p.2325-&, 1971.
- WANYONYI, A.W.; CHHABRA, S.C.; MKOJI, G.; EILERT, O.; NJUE, W.M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**. v. 52, p.79-84, 2002.
- WATERMAN, P. G. **Rev. Latinoam. De Quim**. v. 15, p. 90, 1984.
- WATERMAN, P. G.. **Phytochemistry**. v. 25, p.3-17, 1986.
- WELE, A.; ZHANG, Y. J.; BROUARD, J. P.; POUSET, J. L. & BODO, B. Two cyclopeptides from the seeds of *Annona cherimola*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2376-2380, 2005a.

- WELE, A.; NDOYE, Y.; ZHANG, Y. J.; BROUARD, J. P.; POUSET, J. L. & BODO, B. Glucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 1154-1157, 2005b.
- WENG, X. C. & WANG, W.. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**. v. 71, p. 489-493, 2000.
- WHO. World Health Organization. Molluscicide screening and evaluation, **Bull. World Health Organization**, **33**: 567-581., 1965.
- WHO. World Health Organization. **Tropical Disease Research**. World Health Organization, Geneva, 1993.
- WIART, C.; MARTIN, M. T.; AWANG, K.; HUE, A.; SERANI, L.; LAPRÈVOT, O.; PAIS, M. & RHAMANI, M. Sesquiterpenes and alkaloids from *Csorodocarpus borneensis*. **Phytochemistry**. v. 58, p.653-656, 2001.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: **Secondary Products from plant tissue culture**, ed. CHARLWOOD, B. V. & RHODES, M. J. C. p. 23. Oxford, Larendron Press, 1990.
- WOO, M. H.; KIM, D. H. & MCLAUGHLIN, J. L. Asitrilobins A and B: cytotoxic mono-THF Annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. **Phytochemistry**. v. 50, p. 1033-1040, 1999.
- WRIGHT, J.L.C., MCLNNES, A.G., SHIMIZU, S., SMITH, D.G., WALTER, J.A. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Can. J. Chem.** v. 56, p.1898–1903, 1978. Apud DE-EKNAMKUL, W. & POTDUANG, B. Biosynthesis of b-sitosterol and stigmaterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**. v.62, p.389–398, 2003.
- WU, F. E.; GU, Z. M.; ZENG, L.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; MCLAUGHLIN, J. L. & SASTRODIHARDJO, S. 2 new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricin-A and anomuricin-B, from the leaves of *Annona-muricata*. **Journal of Natural Products-Lloydia**. v. 58, p.830-836, 1995a.
- WU, F. E.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T. & MCLAUGHLIN, J. L. Muricatocin-A and muricatocin-B, 2 new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona-muricata*. **Journal of Natural Products-Lloydia**. v. 58, p.902-908, 1995b
- WU, F. E.; ZENG, L.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T. & MCLAUGHLIN, J. L. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, anomuricin-C and muricatocin-C, from the leaves of *Annona-muricata*. **Journal of Natural Products-Lloydia**. v. 58, p.909-915, 1995c.
- WU, F. E.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L. & SASTRODIHARDJO, S. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2,4-trans)-10r-annonacin-a-ones and (2,4-cis)-10r-annonacin-a-ones, from the leaves of *Annona-muricata*. **Journal of Natural Products-Lloydia**. v. 58, p.1430-1437, 1995d.
- YANG, Y. IC.; CHANG, F. R. & WU, Y. C. Annosqualine, a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**. v. 87, p.1392–1399, 2004.
- YE, Q.; ZENG, L; ZHANG, Y. ; ZHAO, G. X. ; MCLAUGHLIN, J. L. ; WOO, M. H. & EVERT, D. R. Longicin and goniotalamicinone novel bioactive monotetrahydrofuran acetogenins from *Asimina longifolia*. **Journal of Natural Products Lloydia**. v. 58, p. 1398-1406, 1995.
- YU, J. G.; HO, D. K.; CASSADY, J. M.; XU, L. Z. & CHANG, C. J. Cytotoxic polyketides from *Annona densicoma* (Annonaceae) – 10, 13- trans-13,14-erythro-densicomacin, 10-13-trans-13,14-threo-densicomacin, and 8-hydroxyannonacin. **Journal of Organic Chemistry**. v. 57, p. 6198-6202, 1992.

- YU, J. G.; GUI, H. Q. & LUO, X. Z. & SUN, L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 49, p.1689-1692, 1998.
- YUAN, S. F.; CHANG, H.; CHEN, H.; YEH, Y.; KAO, Y.; LIN, K.; WU, Y. & SU, J. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**. v. 72, p.2853, 2003.
- ZAFRA-POLO, M. C.; GONZALEZ, M. C.; ESTORNEL, E.; SAHPAZ, S. & CORTES, D. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**. v. 42, p.253-271, 1996.
- ZANI, C. L.; MARSTON, A.; HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *Hislopii*. **Phytochemistry**. V. 34, p.89-95, 1993.
- ZENG, L.; WU, F. E.; OBERLIES, N. H.; MCLAUGHLIN, J. L. & SASTRODIHADJO, S. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p.1035-1042, 1996.
- ZHANG, D. & HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**. v. 88, p.503-509, 2004.
- ZHENG, Q.; XU, Z.; SUN, X.; YAO, W.; SUN, H.; CHENG, C. H. K. & ZHAO, Y. Eudesmane and megastigmane glucosides from *Laggera alata*. **Phytochemistry**. v. 63, p.835-839, 2003.