



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA - MBT

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS E
FRAÇÕES DE *Minquartia guianensis* (OLACACEAE)

LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO

MANAUS

2011

LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS E
FRAÇÕES DE *Minquartia guianensis* (OLACACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica

C977e

Cursino, Lorena Mayara de Carvalho

Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae) / Lorena Mayara de Carvalho Cursino. - Manaus: UEA, 2011.

121 fls.: il; 27cm.

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dra. Cecília Veronica Nunez

1. Olacaceae 2. *Minquartia guianensis* 3. Triterpenos I. Título

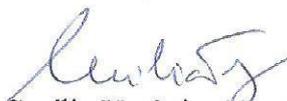
CDU 016:581.192



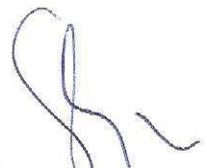
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA-MBT

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA
LORENA MAYARA DE CARVALHO
CURSINO DO CURSO DE MESTRADO EM
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS.

Aos cinco dias do mês de agosto do ano de dois mil e onze, às quatorze horas e trinta minutos, realizou-se no auditório do Curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, localizado no 4º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde, na Avenida Carvalho Leal, número 1777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado de **LORENA MAYARA DE CARVALHO CURSINO**, sob o título “**Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae)**”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, tendo como orientadora a Dra. Cecília Verônica Nunez, segundo encaminhamentos da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Dra. Cecília Verônica Nunez (Presidente), Dra. Maria de Meneses Pereira (membro), e Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (membro). Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os membros examinadores emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo a aluna sido APROVADA conforme o parecer da referida banca examinadora.


Dra. Cecília Verônica Nunez
CPF: 219.674.728-90


Dra. Maria de Meneses Pereira
CPF: 027.379.062-53.


Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
CPF: 005.152.642-53

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Silvia e Afonso, pelo amor, pela educação e pelos ensinamentos que me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois Ele sempre esteve comigo em todos os momentos me abençoando com muita sabedoria.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Cecilia Nunez, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e principalmente confiança desde a iniciação científica. Agradeço também a oportunidade de participar de vários congressos, nos quais pude grandiosamente aprender muito e principalmente conhecer pesquisadores de alto nível.

À minha família em especial à minha avó Rute Albuquerque pelas orações e palavras de carinho e à minha tia querida Loretta Ennes pela amizade, carinho e pela atenção dada cada vez que precisei. E a todos os meus tios, primos e avós paternos que mesmo longe estão sempre na torcida por mim.

À minha amiga e irmã de coração Carmen Jardina pela longa amizade e pelo apoio mesmo distante.

Aos meus amigos Adriana e Denny Mesquita pela grande amizade, palavras de incentivo e principalmente pela atenção dada para seguir este caminho difícil, mas muito valioso.

Ao Rodrigo Marinho por ter me ajudado muito quando foi necessário.

Ao meu amigo Manoel Jeffreys pela amizade, compreensão e principalmente por ser uma pessoa boa, simples e alegre.

Às minhas amigas Nívea Falcão e Daiane Martins pelas longas conversas, carinho, alegria e pela amizade.

Aos meus amigos do laboratório em especial ao Nerilson, Scarlat e Jaciara, pelo companheirismo, ajuda e pelas risadas constantes nos momentos de descontração. Agradeço também: Orleyson, Francislane, David, Joyce, Claudia, Giselle, Taciane, Karen, Maria Izabel, Kissinara, Orlando, Gabriela, Virgínia, Júlio Nino, Júlio Souza que contribuíram para um ótimo ambiente de trabalho.

Ao Prof. Dr. Pierre Alexandre pela atenção no laboratório e por estar disposto a ensinar quando fosse necessário.

Ao Prof. Dr. Takeshi Matsuura da UFAM pela colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos, em destaque à Jaqueline Andrade e Vanessa Neves pela ajuda com os ensaios biológicos.

À Profa. Dra. Marilene Vainstein da UFRGS pela colaboração na realização dos ensaios antifúngicos e em especial a Luciana Azevedo e Melissa Landell pela atenção e auxílio no decorrer da análise por bioautografia.

Ao Prof. Dr. Afonso Souza e à Profa. Dra. Maria Lúcia Belém da UFAM, pela colaboração na obtenção do espectro de massas e em especial ao Felipe Melo que realizou a análise.

Aos professores do MBT-UEA pelos ensinamentos.

Ao CNPq/CT-Agro, PPBio/INPA/CNPq/MCT, FAPEAM, CENBAM/CNPq/MCT pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

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

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Minquartia guianensis* (OLACACEAE).

lorena.cursino@gmail.com

Este estudo teve como objetivo isolar os constituintes químicos de *Minquartia guianensis* (Olacaceae) e avaliar os extratos das folhas e galhos quanto às atividades antifúngica e antibacteriana. Foram realizadas duas coletas desta espécie, uma em abril (1ª coleta) e outra em julho (2ª coleta), na Reserva Ducke, Manaus, AM. Após secagem e moagem, os materiais vegetais foram extraídos com diclorometano (DCM), Metanol (MeOH) e Água (H₂O). Os extratos DCM e MeOH foram submetidos à prospecção fitoquímica por meio de cromatografia em camada delgada e reveladas com alguns reveladores para determinar indícios de classes químicas presentes. O estudo fitoquímico do extrato DCM das folhas forneceu três triterpenos, lupen-3-ona (**1**), taraxerona (**2**), ácido oleanólico (**3**) e um poliacetileno, ácido minquartinoico (**4**). O extrato DCM dos galhos forneceu outro triterpeno, 3-β-metóxi-lup-20-(29)-eno (**5**). Quanto à atividade antibacteriana, os extratos foram avaliados frente a diversas cepas e os melhores resultados foram: os extratos MeOH das folhas e dos galhos da primeira coleta contra *Edwardsiella tarda* (CIM de 62,5 µg/mL) e o ácido minquartinoico isolado das folhas ativo contra *Aeromonas hydrophila* (CIM de 45,5 µg/mL e CMB > 91 µg/mL). Quanto à atividade antifúngica frente à *Cryptococcus gattii*, as frações dos extratos foram testadas por bioautografia e diversas apresentaram atividade. Uma destas frações foi fracionada, obtendo o ácido minquartinoico, o que sugere que este possa ser o responsável pela atividade antifúngica. Este é o primeiro relato das substâncias taraxerona, ácido oleanólico e 3-β-metóxi-lup-20-(29)-eno em Olacaceae e da presença de atividade frente à bactéria *A. hydrophila* e ao fungo *C. gattii* dos extratos de *M. guianensis*.

Palavras chaves: Olacaceae, *Minquartia guianensis*, triterpenos

Área de concentração: química de produtos naturais

Linha de Pesquisa: bioprospecção de plantas e seus micro-organismos visando novos antimicrobianos.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOACTIVITY OF THE EXTRACTS AND FRACTIONS FROM *Minquartia guianensis* (OLACACEAE).

lorena.cursino@gmail.com

The aim of this study was to isolate the chemical compounds of *Minquartia guianensis* (Olacaceae) and evaluate the leaf and branch extracts as antifungal and antibacterial agents. There were performed two collections of this species, the first in April and the second in July at Reserva Ducke, Manaus, AM. After drying and milling, the plant materials were extracted with dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and water (H₂O). The DCM and MeOH extracts were submitted to thin layer chromatography analysis in order to identify chemical classes. The phytochemical study of DCM extract from leaves provided three triterpenes lupen-3-one (**1**), taraxerone (**2**), oleanolic acid (**3**) and polyacetylene minquartinoic acid (**4**). The DCM extract from branches yielded one triterpene, 3- β -methoxy-lup-20-(29)-ene (**5**). The extracts were evaluated against some bacteria and the best results were found to MeOH extract from leaves and branches from first collection against *Edwardsiella tarda* (MIC of 62.5 μ g/mL) and the minquartinoic acid isolated from leaves against *Aeromonas hydrophila* (MIC of 45.5 μ g/mL and MBC > 91 μ g/mL). Some fractions were assayed against *Cryptococcus gattii* by the bioautography assay and several showed activity. One of the active fractions was fractionated and the polyacetylene, minquartinoic acid was isolated, which suggests that it can be the responsible for the activity. This is the first report of the substances taraxerone, oleanolic acid and 3- β -methoxy-lup-20-(29)-ene in Olacaceae and *A. hydrophila* and *C. gattii* activity of *M. guianensis* extracts.

Keywords: Olacaceae, *Minquartia guianensis*, triterpenes.

Concentration area: chemistry of natural products

Research line: bioprospection of plants and their microorganisms in order to find new antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Ocorrência mundial da família Olacaceae.	5
Figura 2. Foto da espécie <i>M. guianensis</i> , com destaque para o tronco (Nunez, 2008)	26
Figura 3. Folhas de <i>M. guianensis</i> (Foto: MOBOT, 2008).	27
Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos.	30
Figura 5. Fotos das placas referentes às frações 4.1 (substâncias 1 e 2) e 4.2.	33
Figura 6. Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta.	35
Figura 7. Fracionamento do extrato metanólico da segunda coleta.	38
Figura 8. Fotos das placas referente à fração 8-14.1 (substância 5).	40
Figura 9. Fracionamento do extrato diclorometânico dos galhos da primeira coleta.	40
Figura 10. Frações em destaque testadas do extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta contra <i>Cryptococcus gattii</i> .	41
Figura 11. Frações em destaque testadas do extrato metanólico das folhas da primeira coleta (CURSINO et al., 2006).	42
Figura 12. Frações em destaque testadas do extrato metanólico das folhas da segunda coleta.	42
Figura 13. Frações em destaque do extrato diclorometano dos galhos da primeira coleta.	43
Figura 14. Fotos das placas dos extratos DCM das folhas da 1ª e 2ª coleta.	46
Figura 15. Fotos das placas dos extratos DCM dos galhos da 1ª e 2ª coleta.	47
Figura 16. Fotos das placas dos extratos MeOH das folhas da 1ª e 2ª coleta.	48
Figura 17. Fotos das placas dos extratos MeOH dos galhos da 1ª e 2ª coleta.	48
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H de lupen-3-ona e taraxerona.	53
Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ¹ H de lupen-3-ona e taraxerona.	54
Figura 20. Espectro de RMN de ¹³ C de lupen-3-ona e taraxerona.	55
Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de lupen-3-ona e taraxerona.	56
Figura 22. Espectro de RMN de ¹ H do ácido oleanólico.	59
Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ¹ H do ácido oleanólico.	60
Figura 24. Espectro de RMN de ¹³ C do ácido oleanólico.	61
Figura 25. DEPT do ácido oleanólico.	62

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do poliacetileno.	65
Figura 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H do poliacetileno.	66
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do poliacetileno.	67
Figura 29. Espectro de COSY do poliacetileno.	68
Figura 30. Mapa de contorno de HSQC do poliacetileno.	69
Figura 31. Mapa de contorno de HMBC do poliacetileno.	70
Figura 32. Espectro de massas do poliacetileno	71
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	75
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	76
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	77
Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C do 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	78
Figura 37. Mapa de contorno HSQC de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	79
Figura 38. Expansão do mapa de contorno HMBC de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	80
Figura 39. Fotos da bioautografia da fração 63-66.	82
Figura 40. Fotos da bioautografia da fração 9-12.	82
Figura 41. Fotos da bioautografia da fração 28-30.	83
Figura 42. Fotos da bioautografia da fração 15.1C.	83
Figura 43. Fotos da bioautografia da fração 15.3B.	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Alcaloides	6
Tabela 2. Cromona	8
Tabela 3. Diterpenos	9
Tabela 4. Esteroides	11
Tabela 5. Flavonoides	12
Tabela 6. Derivados Fenólicos	13
Tabela 7. Derivados de Glicerol	14
Tabela 8. Isoprenos	14
Tabela 9. Poliacetilenos	15
Tabela 10. Poliisopreno	17
Tabela 11. Proantocianidinas	17
Tabela 12. Sesquiterpeno	18
Tabela 13. Triterpenos	18
Tabela 14. Triterpenos glicosilados, saponinas	20
Tabela 15. Poliacetileno de <i>M. guianensis</i>	22
Tabela 16. Xantona de <i>M. guianensis</i>	23
Tabela 17. Triterpenos de <i>M. guianensis</i>	23
Tabela 18. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 10-13	32
Tabela 19. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 23-29	33
Tabela 20. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 63-66	34
Tabela 21. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento da fase DCM	36
Tabela 22. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento da fase AcOEt	37
Tabela 23. Eluentes utilizados para cada grupo de frações de 3-5	39
Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C da lupen-3-ona comparados com a literatura (NUNEZ et al., 2000)	51
Tabela 25. Dados de RMN de ^{13}C da taraxerona comparados com a literatura (SAIRAIWA et al., 2006)	52

Tabela 26. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do ácido oleanólico em comparação com a literatura	58
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (500 MHz, em CDCl_3) do poliacetileno	64
Tabela 28. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) e HMBC do poliacetileno	64
Tabela 29. Dados de RMN de ^{13}C para 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno	73
Tabela 30. Efeitos α , β e γ calculados a partir do lupeol	74
Tabela 31. Halos de inibição dos extratos frente às duas cepas de <i>A. hydrophila</i>	85
Tabela 32. Halos de inibição dos extratos da 1ª coleta frente às bactérias testadas	86
Tabela 33. Halos de inibição dos extratos da 2ª coleta frente às bactérias testadas	87
Tabela 34. CIM dos extratos da 1ª coleta	87
Tabela 35. CIM dos extratos da 2ª coleta	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AcOEt - Acetato de etila

CC - Coluna Cromatográfica

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CMB - Concentração Mínima Bactericida

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DCM - Diclorometano

Hex - Hexano

MeOH - Metanol

Rf - Fator de retenção

Rt - Tempo de retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

u.m.a. - Unidade de Massa Atômica

UV - Ultra-violeta

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas medicinais	1
1.2 Atividade antifúngica	2
1.3 Atividade antibacteriana	3
1.4 Olacaceae	5
1.4.1 Atividades biológicas de espécies da Olacaceae	21
1.4.2 Quimiosistemática	21
1.5 <i>Minquartia guianensis</i>	22
2. OBJETIVOS	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Obtenção dos extratos	29
3.2 Cromatografia em camada delgada dos extratos	31
3.3 Fracionamento cromatográfico	32
3.3.1 Extrato diclorometânico das folhas	32
3.3.2 Extrato metanólico das folhas	36
3.3.3 Extrato diclorometânico dos galhos	38
3.4 Atividade antifúngica sobre <i>Cryptococcus gattii</i> (R265)	41
3.5 Atividade antibacteriana	44
3.5.1 Cepas testadas	44
3.5.2 Método difusão em ágar	44
3.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	44
3.5.4 Concentração Mínima Bactericida (CMB)	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos	46
4.2 Substâncias identificadas de <i>Minquartia guianensis</i>	49
4.2.1 Identificação das substâncias 1 e 2	50
4.2.2 Identificação da substância 3	57
4.2.3 Identificação da substância 4	63
4.2.4 Identificação da substância 5	72
4.3 Resultado do fracionamento do extrato metanólico	81
4.4 Atividade antifúngica	81
4.4.1 Bioautografia frente à <i>Cryptococcus gattii</i> (R265)	81
4.4.1.1 Extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta	81
4.4.1.2 Extrato metanólico das folhas da primeira coleta	82
4.4.1.3 Extrato metanólico das folhas da segunda coleta	83
4.4.1.4 Extrato diclorometânico dos galhos	84
4.5 Atividade antibacteriana	84
4.5.1 Método de difusão em ágar	85
4.5.1.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	85
4.5.1.2 <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	86
4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	87
4.5.3 Concentração Mínima Bactericida (CMB)	89
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas na medicina popular ocorre há muitos anos e esse costume é passado de geração em geração até os dias atuais. No entanto, a ação dessas plantas no organismo pode variar em cada pessoa, podendo causar até o efeito contrário do esperado. Desta forma, faz-se necessário o estudo aprofundado com as plantas medicinais a fim de se comprovar a atividade biológica para a qual ela é empregada. A busca por princípios ativos com propriedades terapêuticas tem aumentado visando novos medicamentos oriundos de vegetais (RATES, 2000).

Em vista de comprovar as propriedades terapêuticas de princípios ativos é necessária a realização de etapas, como isolamento, purificação das substâncias isoladas, análises biológicas dos extratos além do estudo da estrutura/atividade para determinar a ação do princípio ativo (MACIEL et al., 2002).

Com isso, destaca-se a importância da integração das áreas de química e farmacologia, já que a química busca o isolamento e determinação estrutural e a farmacologia contribui para as análises que comprovam a atividade de um extrato ou de uma determinada substância pura (FILHO & YUNES, 1997). A partir das análises farmacológicas iniciais dá-se continuidade a estudos mais complexos visando chegar ao medicamento que é o fator fundamental para o conhecimento do potencial terapêutico das plantas usadas pelas populações tradicionais para combater doenças (VIEGAS et al., 2006).

Entre as doenças que afetam os seres humanos estão as provocadas por micro-organismos. A necessidade de se encontrar novos compostos que possam combater efetivamente os micro-organismos patogênicos tem forçado os cientistas à busca de novas drogas, principalmente porque os micro-organismos costumam adquirir resistência aos antibióticos usados comercialmente.

A busca de novas drogas antimicrobianas são obtidas a partir de vegetais devido apresentarem muitas substâncias de interesse comparando com produtos obtidos por síntese. Com isso, as plantas têm se tornado o foco de estudos científicos com ênfase nas diversas propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003; VERPOORTE, 1998).

Dentre a diversidade de classes de metabólitos secundários existentes, algumas se destacam pela atividade biológica. Os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos apresentam

atividade inseticida (VIEGAS Jr. et al., 2003). Os triterpenos apresentam atividades cardioprotetora (SUDHAHAR et al., 2007), gastroprotetora (PERTINO et al., 2007), antiinflamatória (MEDEIROS et al., 2007), antitumoral (BRAGA et al., 2007), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ et al., 2008) e anti-hiperglicêmica (SATO et al., 2007). Os flavonóides foram relatados por apresentar atividades antioxidante e antiinflamatória (VOLP et al., 2008) e os alcalóides pelas atividades antioxidante, antiinflamatória e inseticida (OLIVEIRA et al., 2009).

Visando contribuir para a obtenção de novas substâncias antimicrobianas, o presente projeto teve como alvo o estudo fitoquímico e avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae).

1.2 Atividade antifúngica

A importância de estudos em busca de substâncias antifúngicas isoladas de plantas utilizadas há muito tempo pela medicina popular deve-se ao aumento de problemas de saúde pública, destacando-se as micoses e surgimentos de patógenos resistentes a antibióticos. Com isso, substâncias produzidas pelas plantas são fontes importantes de novos antimicrobianos (MAGRO et al., 2006).

Há muitos relatos sobre a resistência adquirida por micro-organismos a determinados antibióticos, o que impulsiona a busca por novos antimicrobianos. Com isso, metabólitos secundários com atividade contra certos fungos tornam-se o alvo para novas pesquisas. Há diversos exemplos de metabólitos antifúngicos, tais como: fenilpropanóides de *Nectandra megapotamica* (GARCEZ et al., 2009), saponinas de *Swartzia langsdorffii* (MARQUI et al., 2008), alcaloides de *Pterogyne nitens* (REGASINI et al., 2010), estilbeno, flavonona, pterocarpano, triterpeno e mistura de esteroides de *Swartzia apetala* (ARAÚJO et al., 2008).

Com isso, no presente projeto foi escolhido o fungo *Cryptococcus gatti*, um patógeno que causa doença tanto em indivíduos saudáveis quanto em pessoas imunodeprimidas e pessoas infectadas pelo vírus HIV (LITVINTSEVA et al., 2005; MORGAN et al., 2006). Em 1999, este patógeno provocou um surto que afetou muitas pessoas na Ilha de Vancouver, Canadá (KIDD et al., 2004).

Uma das infecções causada pelo gênero *Cryptococcus* é a criptococose. Em consequência desta doença apresentar manifestações clínicas inespecíficas, ocorre atraso no

diagnóstico contribuindo para a demora do início do tratamento causando mortes freqüentes. A manifestação mais comum é por doença pulmonar que ocorre em regiões tropicais e subtropicais (SEVERO et al., 2009).

Na busca por antifúngicos, alguns extratos foram avaliados, como por exemplo, o extrato diclorometânico das raízes de *Calophyllum brasiliense* e o extrato acetato de etila de *Spiranthera odoratissima*, os quais mostraram-se ativos frente ao *C. gattii* (ALBERNAZ et al., 2010). Outro estudo realizado com a espécie *Eugenia dysenterica* mostra que os seus constituintes voláteis foram ativos contra cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (COSTA et al., 2000).

1.3 Atividade antibacteriana

Infecções intestinais estão entre as doenças que mais acometem viajantes e pessoas em países em desenvolvimento. Estudo realizado com crianças de um hospital em João Pessoa, PB, Brasil, mostrou um número significativo de crianças com infecção intestinal (TÔRRES et al., 2005). Este problema ocorre em regiões tropicais e muitas destas crianças acabam morrendo por falta de tratamento. O principal sintoma de infecção intestinal é a diarreia (VISWANATHAN et al., 2008).

Devido à resistência de bactérias a determinados antibióticos, buscam-se alternativas que possam beneficiar os seres vivos tanto humanos quanto animais. Vários estudos relatando a atividade antibacteriana de extratos e frações são encontrados na literatura como, por exemplo: extratos de *Plinia glomerata* cujas frações acetato de etila e fração aquosa ativas contra *Staphylococcus aureus*, e esta mesma fração aquosa foram ativas contra *Escherichia coli* (SERAFIN et al., 2007). O extrato diclorometânico de *Kielmeyera cuspidata* mostra atividade frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* (SOBRAL et al., 2009); o extrato etanólico de *Ocotea duckei* foi ativo contra *E. coli* (ANTUNES et al., 2006); o extrato metanólico de *Caesalpinia bonducella* e os triterpenos, α -amirina, β -amirina, lupeol e acetato de lupeol foram ativos contra *S. aureus*, *E. coli*, *Shigella flexneri* (SAEED et al., 2001); o ácido aleuritólico isolado de *Spirostachys africana* foi ativo contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentery*, *S. flexnerii* e *S. boydii* (MATHABE et al., 2008).

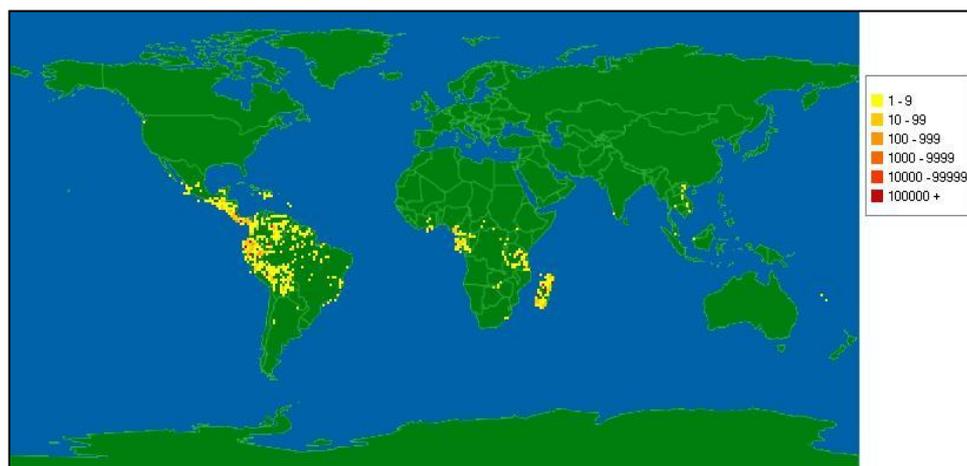
Aeromonas é um dos gêneros de bactérias reconhecidos como patógenos intestinais de humanos. Estudo com crianças que apresentaram diarreia mostrou que este sintoma também é causado por bactérias deste gênero (MORENA et al., 1993).

A espécie *Aeromonas hydrophila* destaca-se por causar mortes de peixes de água doce. As doenças que envolvem os peixes são principalmente hemorragias cutâneas nas nadadeiras e na superfície do corpo (HOSHINA et al., 1962; COSTA et al., 2003).

Aeromonas hydrophila está relacionada também com infecções nos seres humanos. Um estudo realizado por Ketover e colaboradores (1973) descreveu que esta espécie causa infecção em hospedeiros imunodeprimidos, pessoas com uma resposta imunológica deficiente e que as características clínicas são semelhantes às que acometem infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Olacaceae

A família Olacaceae possui distribuição pantropical, tem registros de 24 gêneros e 150 espécies. No Brasil ocorrem apenas 12 gêneros com 60 espécies (Figura 1), com maior dispersão na Amazônia (LORENZI & SOUZA, 2008).



[http:// www.tropicos.org/Name/42000210?tab=maps](http://www.tropicos.org/Name/42000210?tab=maps)

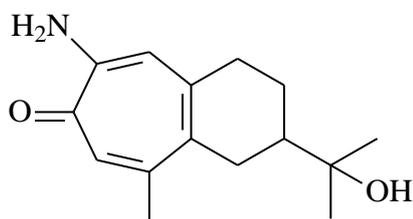
Figura 1. Ocorrência mundial da família Olacaceae.

Na Olacaceae foram relatados diversos ácidos graxos. Em *Curupira tefeensis* foram identificados os ácidos palmítico, láurico, mirístico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, araquidônico, gondôico, behênico, erúico, lignocérico, nervônico, cerótico (SPITZER et al., 1990). E também desta espécie foram identificados os ácidos ximênico, 9(Z),11(Z)-octadecadienóico, 9,11-octadecadienóico, e ácido exocárpico (SPITZER et al., 1991). Da espécie *Heisteria silvanii* foi identificado o ácido 9,10-epoxiesteárico (SPITZER et al., 1997). Os ácidos palmítico, oléico, esteárico, linoléico e ácido linolênico foram identificados em *Mappia foetida* (HOSAMINI & PATTANASHETTAR, 2005). Em *Onguekoa gore* foram identificados os ácidos isânico e *cis*-octadecenedienóico (GUSTONE et al., 1963). Em *Ptychopetalum olacoides* os ácidos encontrados foram esteárico e palmítico (MONTRUCCHIO et al., 2005). Outros ácidos se encontram em uma revisão do estudo realizado com algumas espécies da família Olacaceae (BADAMI & PATIL, K. B., 1981).

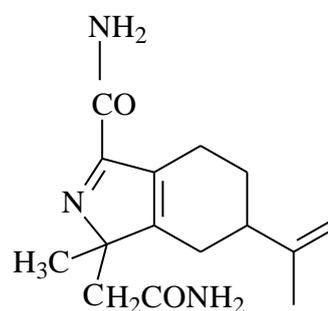
Diversas substâncias foram isoladas de espécies desta família e estão relatadas nas tabelas de 1 a 14.

Tabela 1. Alcaloides

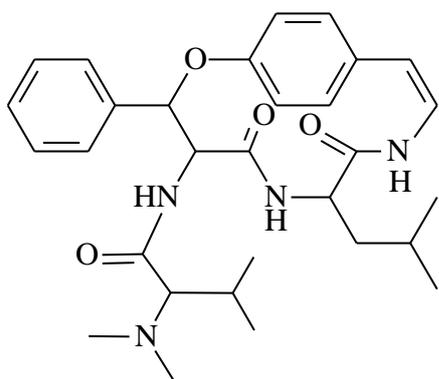
<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Dulacia guianensis</i>	Manicolina A (1)	POLONSKY et al., 1981
	Manicolina B (2)	
<i>Heisteria nitida</i>	Integerrenina (3)	EL-SEEDI et al., 1999
	Óxido de anorldianina 27-N (4)	
	Anorldianina (5)	EL-SEEDI et al., 2005
	Escopolamina (6)	VALERA et al., 1977
<i>Mappia foetida</i>	Camptotecina (7)	GOVINDACHARI, T. R. & N. VISWANATHAN, 1972
	<i>O</i> -Acetilcamptotecin (8)	
	9-metoxicamptotecina (9)	
	<i>O</i> -cetilmetoxicamptotecina (10)	
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	Escorodocarpinas A-C (11)	WIART et al., 2001
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Teobromina (12)	COLOMBO et al., 2010
		MONTRUCCHIO et al., 2005
	Cafeína (13)	



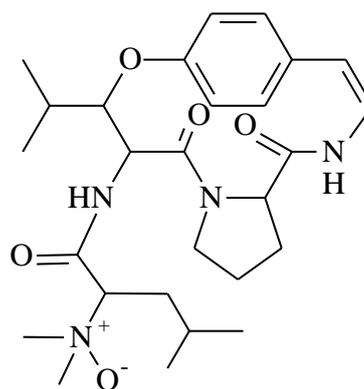
1



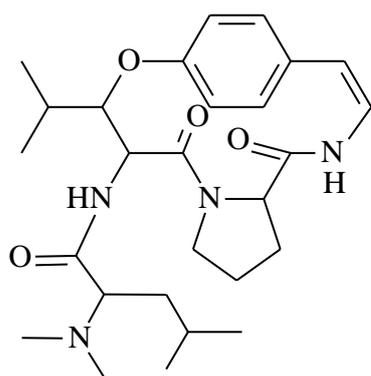
2



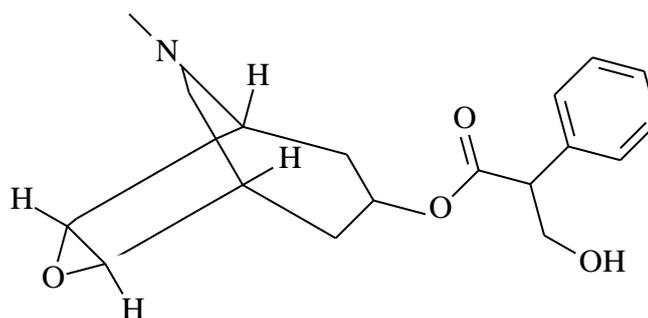
3



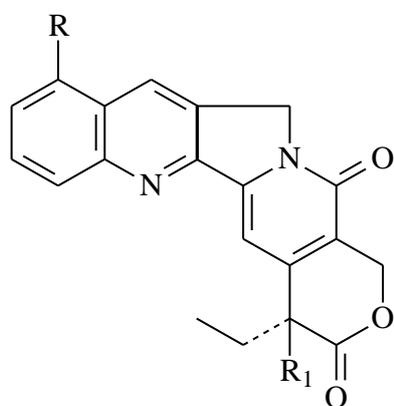
4



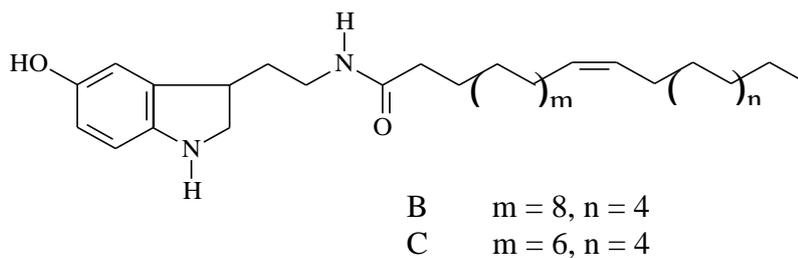
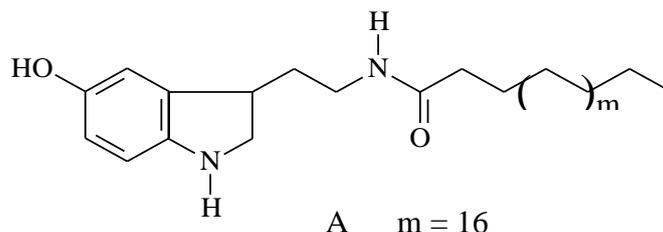
5



6



- 7: R=H, R₁=OH
 8: R=H, R₁=OAc
 9: R=OMe, R₁=OH
 10: R=OMe, R₁=OAc



11

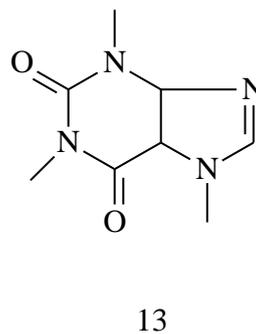
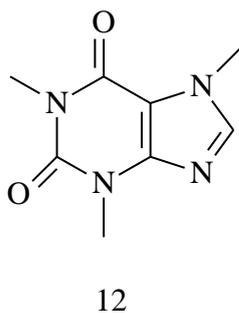
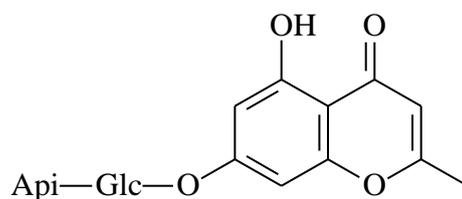


Tabela 2. Cromona

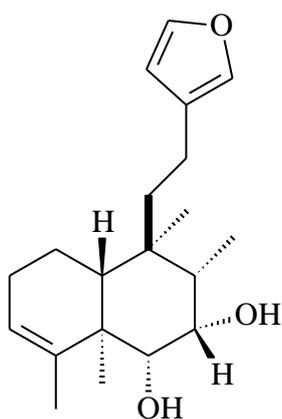
<i>Espécie</i>	<i>Substância</i>	<i>Referência</i>
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	5,7-hidroxi-2-metil cromona (14)	ABE et al., 1993



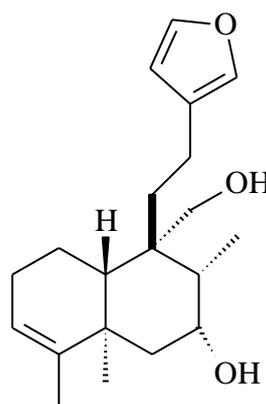
14

Tabela 3. Diterpenos

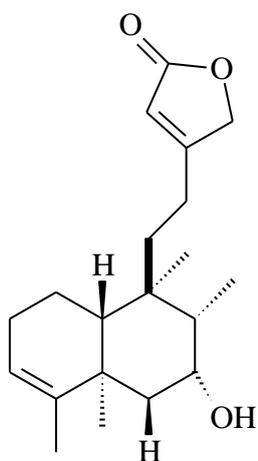
<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>	
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	6 α ,7 α -dihidroxianonena (15)	TANG et al., 2009	
	7- α ,20-dihidroxianonena (16)		
	7- α ,hidroxisolidagalactona I (17)		
		Ptycho-6 α ,7 α -diol (18)	TANG et al., 2008
		Ptychonolida (19)	
		20- <i>O</i> -metilptychonal acetal (20)	
		Ptychonal hemiacetal (21)	
	Ptychonal (22)		



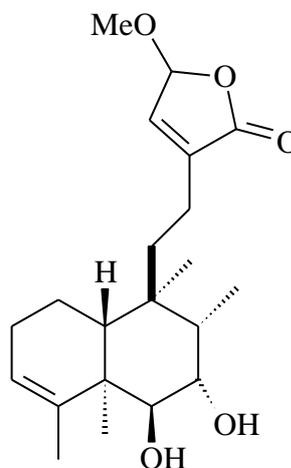
15



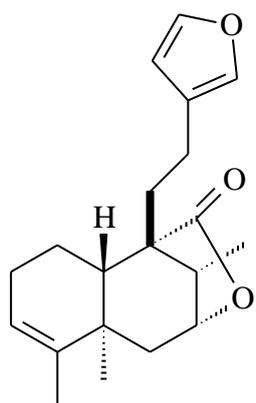
16



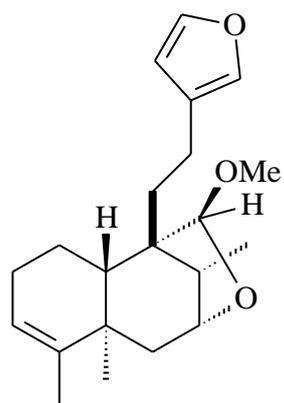
17



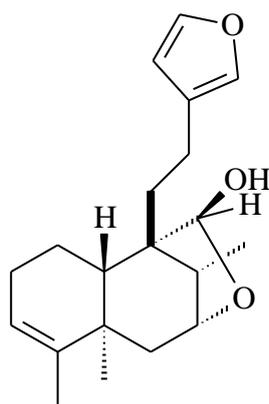
18



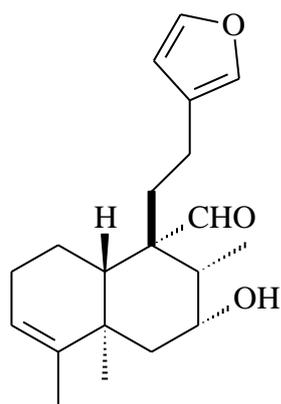
19



20



21



22

Tabela 4. Esteroides

<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Estigmasterol (23)	MONTRUCCHIO et al., 2005
	β -sitosterol glicosilado (24)	
	β -sitosterol (25)	

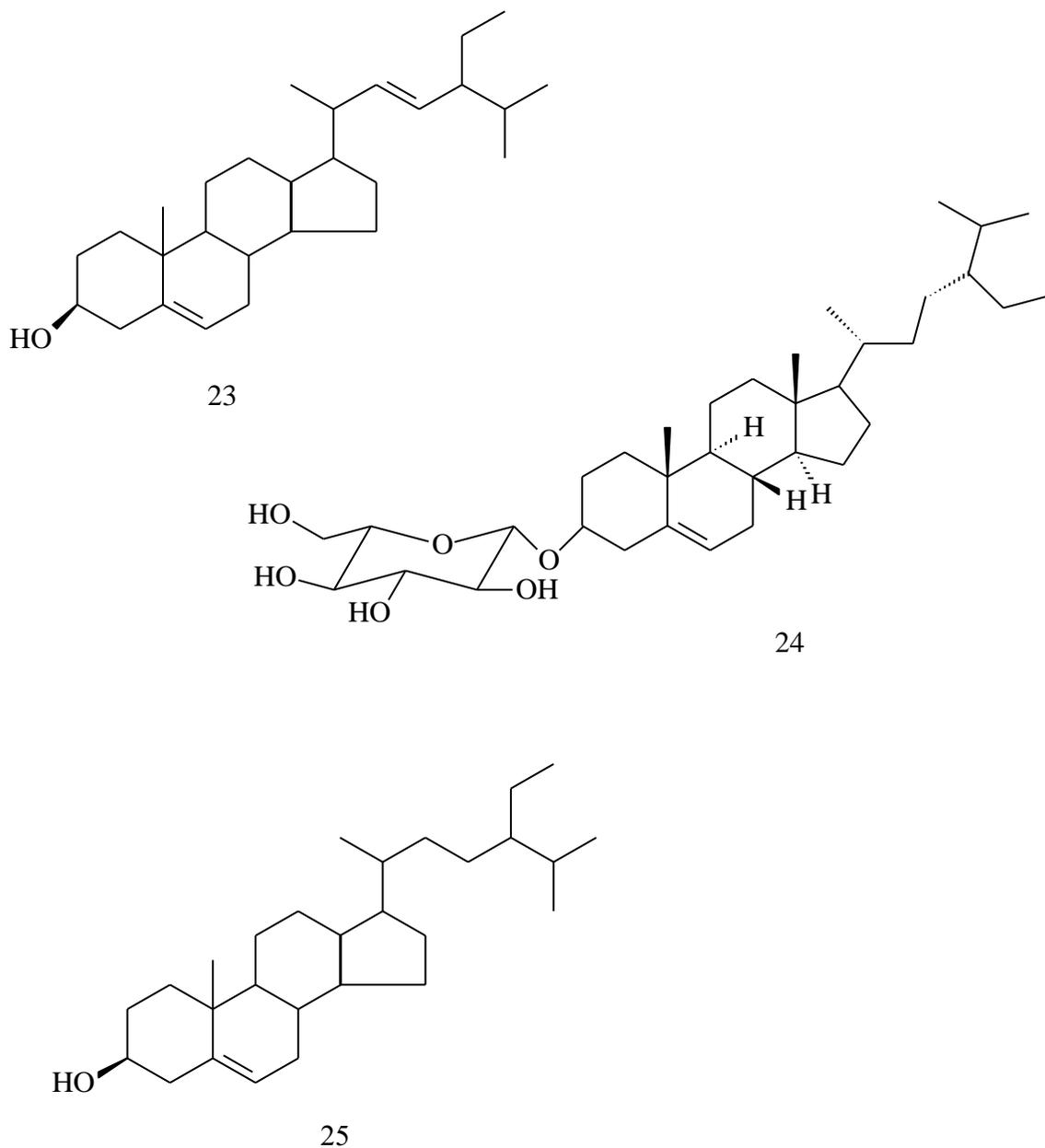
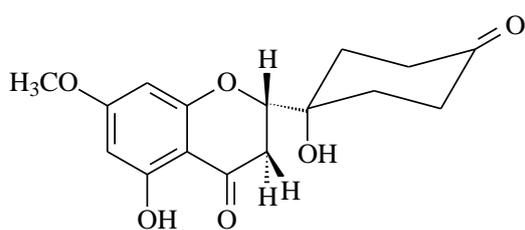
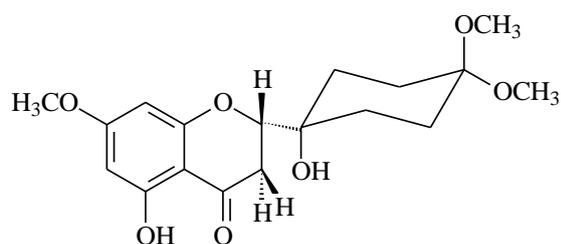


Tabela 5. Flavonoides

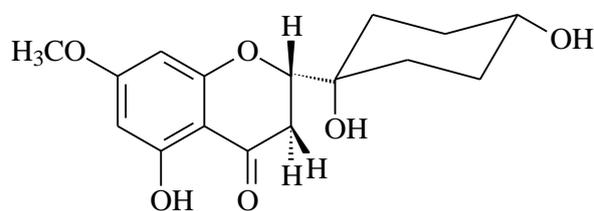
<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Ongokea gore</i>	(2 <i>S</i>)-Ongokein-4'-ona (26)	JERZ et al., 2005
	(2 <i>S</i>)-4',4'-Dimetoxi-ongokein (27)	
	(2 <i>S</i>)- <i>cis</i> -4'-hidroxi-ongokein (28)	
	(2 <i>S</i>)- <i>trans</i> -4'-hidroxi-ongokein (29)	
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	Lucenina-2 (30)	ABE, F. & YAMAUCHI, T., 1993
	Vicenina-2 (31)	
	Isoschaftoside (32)	
	Tricin 7- <i>O</i> -glicosídeo (33)	
	3- <i>O</i> -β-D-glicosídeo (34)	



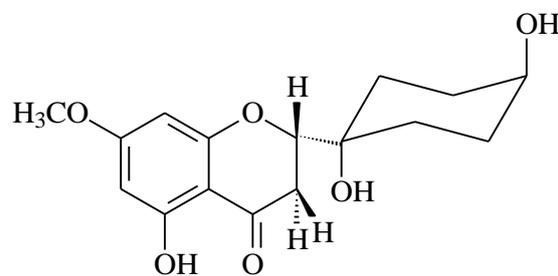
26



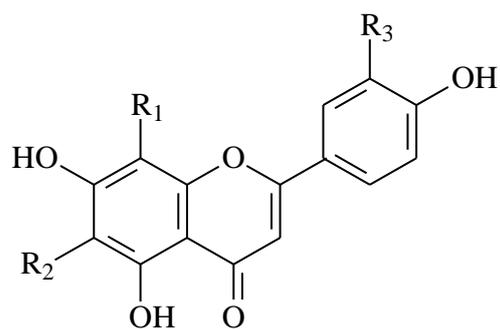
27



28



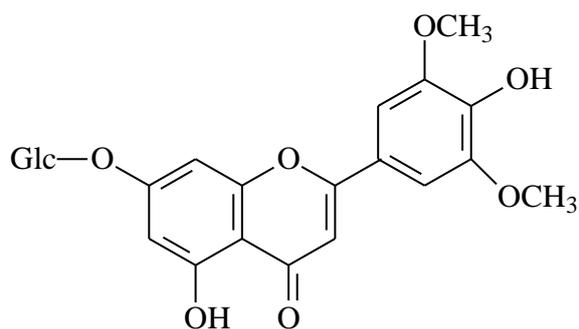
29



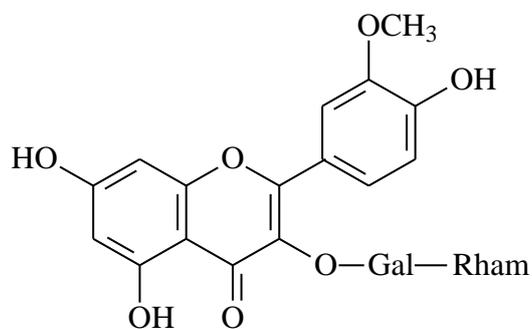
31: R₁=R₂=Glc / R₃ = OH

32: R₁=R₂=Glc / R₃=H

33: R₁=Glc / R₂=Aro / R₃=H



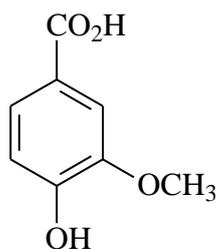
33



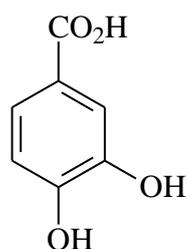
34

Tabela 6. Derivados fenólicos

<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Ácido vinílico (35)	COLOMBO et al., 2010
	Ácido protocatecuíco (36)	



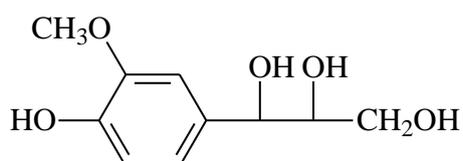
35



36

Tabela 7. Derivados do glicerol

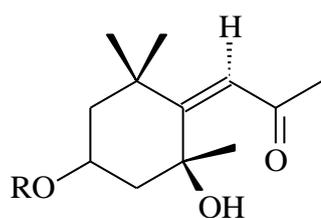
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referência</i>
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	Treo-guaiacilglicerol (37)	ABE, F. & YAMAUCHI T., 1993
	Eritro-guaiacilglicerol (38)	



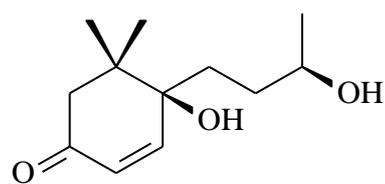
37: Treo
38: Eritro

Tabela 8. Isoprenos

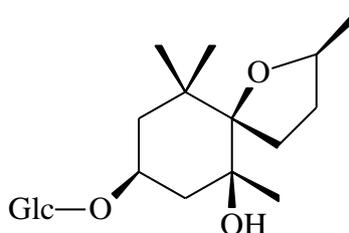
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referência</i>
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	Grasshoppercetona (39)	ABE, F. & YAMAUCHI T., 1993
	3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo (40)	
	Blumenol B (41)	
	C ₁₉ H ₃₄ O ₈ (42)	



39: R = H
40: R=Glc



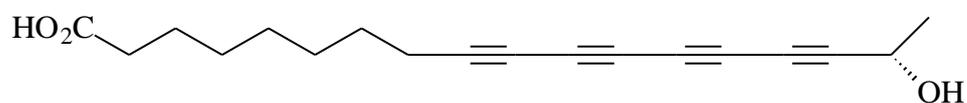
41



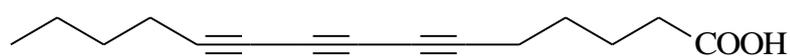
42

Tabela 9. Poliacetilenos

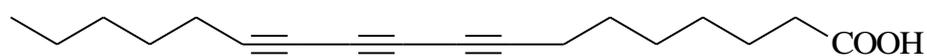
<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Coula edulis</i>	Ácido minquartinóico (43)	FORT et al., 2000
<i>Ochanostachys amentaceae</i>		RASHID et al., 2001
<i>Heisteria acuminata</i>	Ácido pentadeca-6,8,10-trienóico (44)	KRAUS et al., 1998
	Ácido octadeca-8,10,12-trienóico (45)	
	Ácido <i>trans</i> -pentadec-10-en-6,8-dienóico (46)	
	Ácido <i>cis</i> -hexadec-11-en-7,9-dienóico (47)	
	Ácido <i>cis</i> -octadec-12-en-7,9-dienóico (48)	
<i>Heisteria silvanii</i>	Ácido pirúlico (49)	SPITZER et al., 1997
	Ácido 13-octadecen-9,11-diinóico (50)	
	Ácido heistérico (51)	
	Ácido 9-11-octadecadinóico (52)	
	Ácido ximênico (53)	



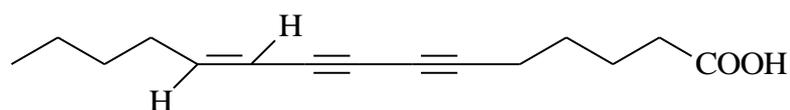
43



44



45



46

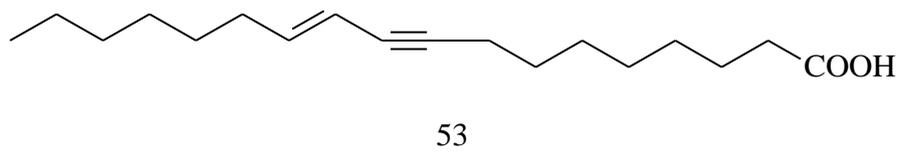
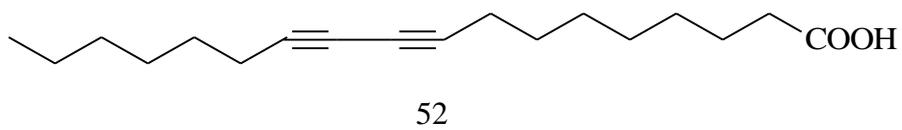
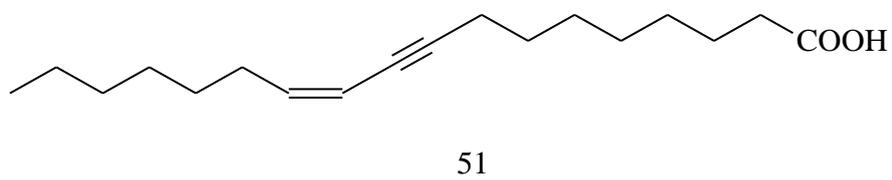
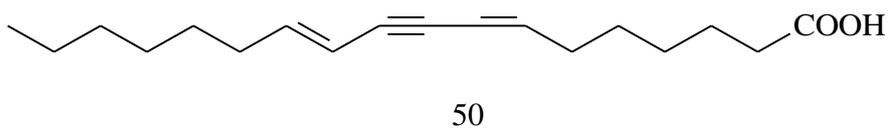
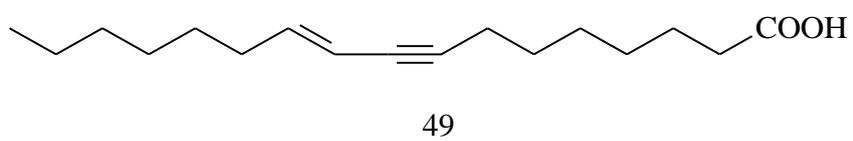
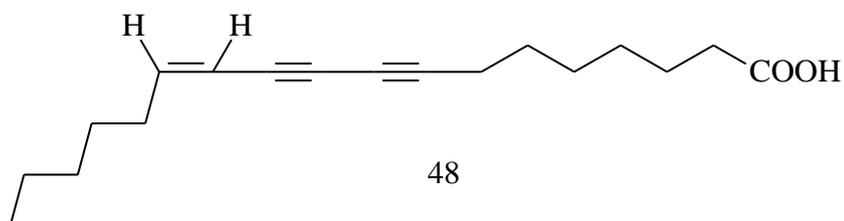
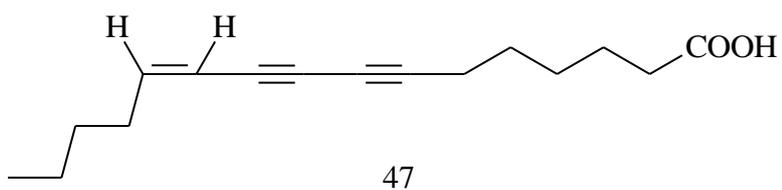
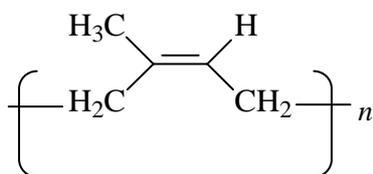


Tabela 10. Poliisopreno

<i>Espécie</i>	<i>Substância</i>	<i>Referência</i>
<i>Curupira tefeensis</i>	<i>cis</i> -1,4-isopreno (54)	SPITZER et al., 1995



54

Tabela 11. Proantocianidinas

<i>Espécie</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Heisteria pallida</i>	Ouratecatequina (55)	DIRSCH et al., 1992
	Ouratea-proantocianidina A (56)	
	Epiafzelechin-(4 β ->8)-epiafzelechin-(4 β ->8)-4'- <i>O</i> -metil-(-)-epigallocatequina (57)	DIRSCH et al., 1993

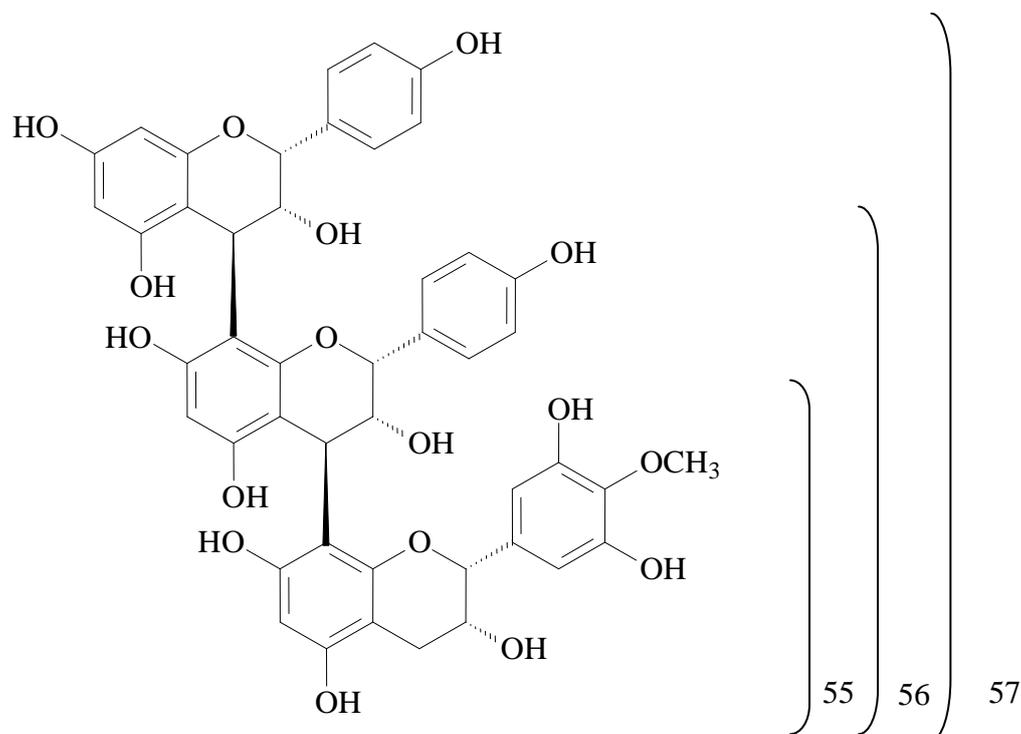
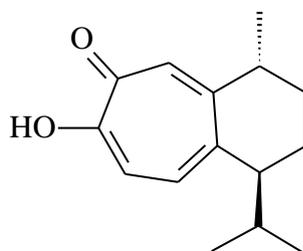


Tabela 12: Sesquiterpeno

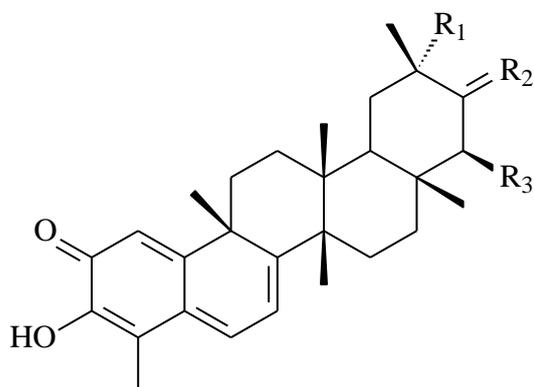
<i>Espécie</i>	<i>Substância</i>	<i>Referência</i>
<i>Scorodocarpus borneensis</i>	Escodopina (58)	WIART et al., 2001



58

Tabela 13: Triterpenos

<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Heisteria pallida</i>	Pristimerina (59)	DIRSCH et al., 1992
	Tingenona (60)	
	22-hidroxi-tingenona (61)	
	Netzahualcoiona (62)	
<i>Ptychopetalum olacoides</i>	Lupeol (63)	MONTRUCCHIO et al., 2005
	α -amirina (64)	

59: $R_1 = \text{COOCH}_3 / R_2 = \text{H} / R_3 = \text{H}$ 60: $R_1 = \text{H} / R_2 = \text{O} / R_3 = \text{H}$ 61: $R_1 = \text{H} / R_2 = \text{O} / R_3 = \text{OH}$

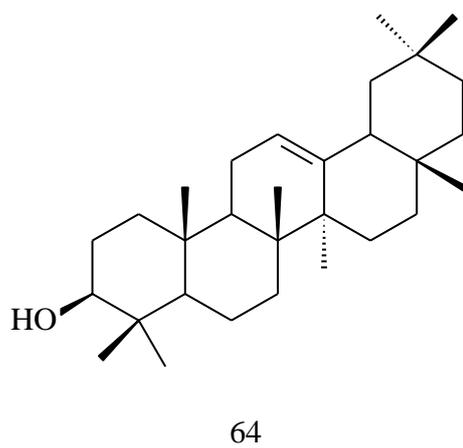
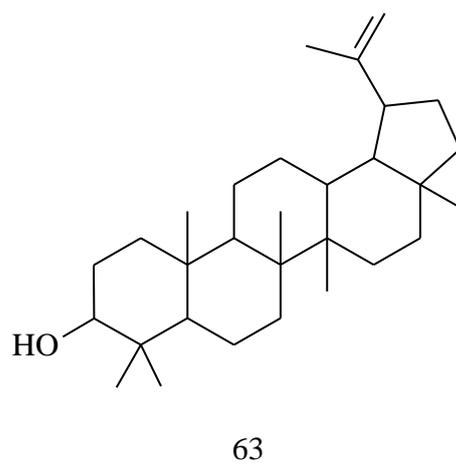
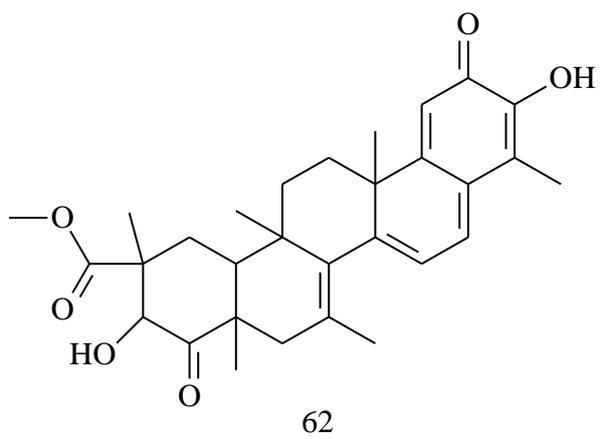
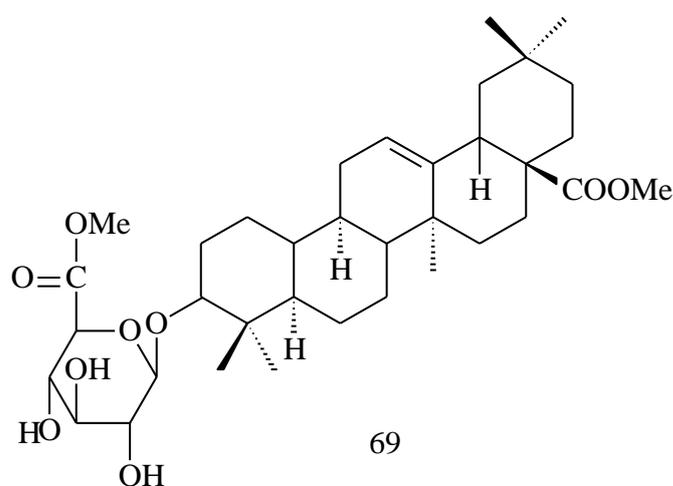
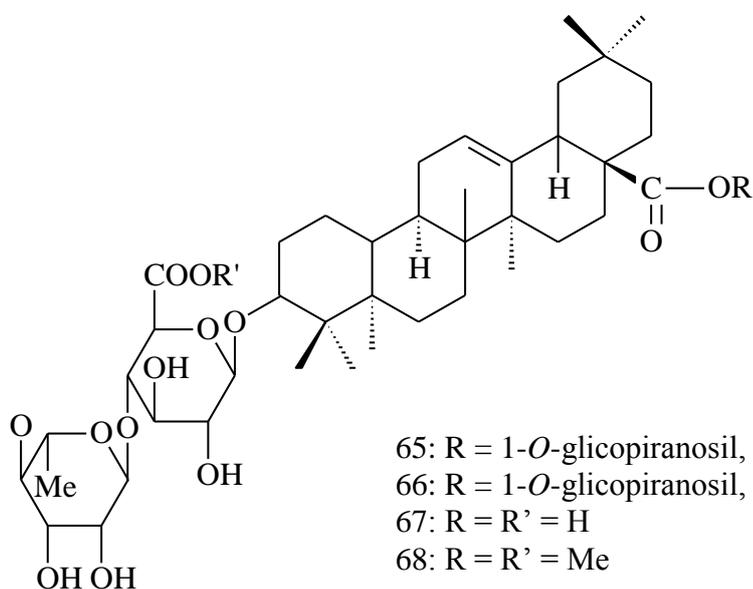


Tabela 14. Triterpenos glicosilados, saponinas

<i>Espécies</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
<i>Olax andronensis</i> <i>O. glabriflora</i> <i>O. ittacorun</i>	Olaxoside (65)	FORGACS, P. & PROVOST, J.,1981
	Éster metílico C ₄₉ H ₇₈ O ₁₈ (66)	
	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₃ (67)	
	Éster dimetílico (68)	
	Ácido 3- <i>O</i> -glicoronídeo oleanólico (69)	



1.4.1. Atividades biológicas de espécies de Olacaceae

Extratos e substâncias obtidas de espécies de Olacaceae possuem registros de atividades biológicas, como o ácido minquartinóico isolado de *Ochanostachys amentaceae* apresentou atividade anti-HIV (RASHID et al., 2001) e também isolado de *M. guianensis* (MARLES et al., 1989) mostrou atividade frente ao *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* (RASMUSSEN et al., 2000).

O extrato de *Liriosma ovata* mostrou um potencial antiinflamatório enquanto as substâncias isoladas mostraram fraca atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* no ensaio de microdiluição (PICERNO et al, 2008).

Um estudo realizado contra larvas de *Artemia salina* mostra que o extrato etanólico de *Strombosia scheffleri* teve baixa citotoxicidade com CL₅₀ maiores que 1000 µg/mL (MOSHI et al, 2009). Outro estudo com extrato etanólico desta espécie sugere possuir substâncias com propriedade de neuroproteção (SIQUEIRA et al, 2004).

Óleos das sementes de *Scorodocarpus borneensis* mostraram atividade antifúngica frente à *Microsporium* e *Acremonium* e também frente a *Candida albicans* (RABMAN et al., 2002). O extrato metanólico de *S. borneensis* mostrou foto-citotoxicidade *in vitro* frente a células obtidas de humanos com leucemia (HL 60) (ONG et al., 2009).

Estudos com extratos comerciais da espécie *Ptychopetalum olacoides* mostraram a validação de método de análise qualitativa e quantitativa por CLAE utilizando o ácido vinílico (26) como marcador químico e como padrão externo (COLOMBO et al., 2010). O extrato etanólico desta espécie comprovou a atividade antidepressiva (PIATO et al., 2009), antioxidante *in vivo* (SIQUEIRA et al., 2007) e também verificou-se atividade contra amnésia (SILVA et al., 2009).

1.4.2 Quimiosistemática

Em estudo com espécies de Olacaceae e Icacinaceae, verificou-se a ausência de miricetina e a presença de quercetina em ambos, o que infere um vínculo destas duas famílias. A ausência de proantocianidinas em Icacinaceae pode afirmar que a família Olacaceae é mais primitiva que a família Icacinaceae (HARON & PING, 1997). Alcaloides ciclopeptídeos isolados de *Heisteria nitida* sugerem que o valor da quimiosistemática tem uma relação entre

Santalales e Asterides (EL-SEEDI et al., 2005).

1.5 *Minquartia guianensis*

A espécie *M. guianensis* (Olacaceae) (Figura 2 e 3) é encontrada na região Amazônica e em países como Nicarágua, Panamá e Costa Rica (MOBOT, 2010). Seus nomes populares são: acariquara, acariquara-roxa, huacapu, acari, acapú, acaximba, arariúba, entre outros (CAMARGO & FERRAZ, 2005). As sinônimas desta espécie são: *Eganthus poeppigii*, *Endusa punctata*, *Minquartia punctata*, *M. macrophylla*, *M. parvifolia*, e *Secretania loranthacea* (MOBOT, 2010).

Há um fitoterápico produzido através de decocção das cascas desta espécie conhecido como Huacapu. Tem como principais usos contra vírus, câncer, bactérias, inflamações e vermes (TAYLOR, 2006).

Estudos com o extrato metanólico das cascas desta espécie relatam a toxicidade contra *Artemia franciscana* (QUIGNARD et al., 2003). Outro estudo relata a atividade do extrato hidroalcoólico contra *Plasmodium falciparum* (RUIZ et al., 2011).

Ácidos graxos e ésteres foram identificados nesta espécie como o ácido 17-hidróxiesteárico, o ácido *R-O*-metilmandélico, o éster (-)-(*R*)-*O*-metilmandélico (RASMUSSEN et al., 2000), quatro ácidos acetilênicos e o ácido *trans*-14-octadecenóico (MORRIS et al., 1963).

Nas tabelas 15, 16 e 17 estão mostradas as substâncias isoladas da espécie *M. guianensis* encontradas na literatura.

Tabela 15. Poliacetileno de *M. guianensis*

<i>Substância</i>	<i>Referências</i>
Ácido minquartinóico (70)	MARLES et al., 1989
	EL-SEEDI et al., 1994

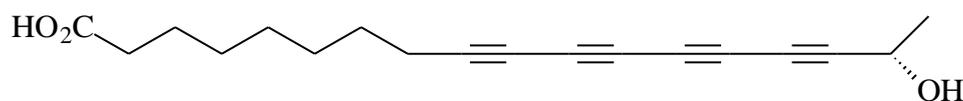
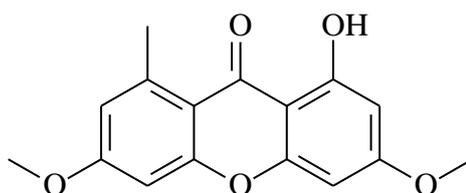


Tabela 16. Xantona de *M. guianensis*

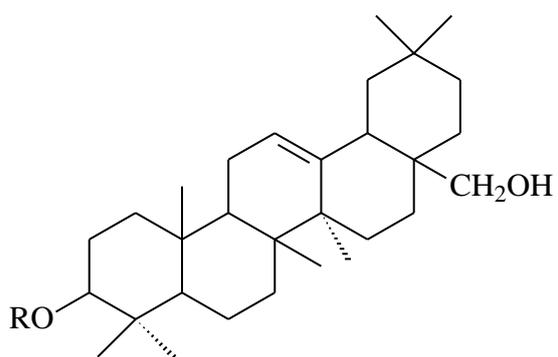
<i>Substância</i>	<i>Referência</i>
Lichexantona (71)	EL-SEEDI et al., 1994



71

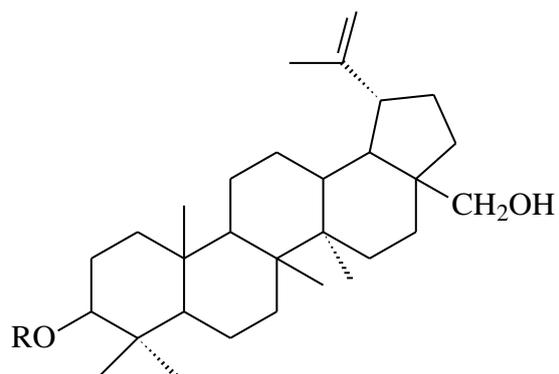
Tabela 17. Triterpenos de *M. guianensis*

<i>Substâncias</i>	<i>Referências</i>
Eritrodiol (72)	EL-SEEDI et al., 1994
Eritrodiol esterificado com ácido graxo (73)	
Betulina (74)	
Betulina esterificada com ácido graxo (75)	
Éter derivado do eritrodiol (76)	
13,28-epoxi-3-acetoxi-11-oleaneno,3 β ,13 β (77)	
Lupeol (78)	CURSINO et al., 2009
Esqualeno (79)	
Lupen-3-ona (80)	
Taraxerol (81)	



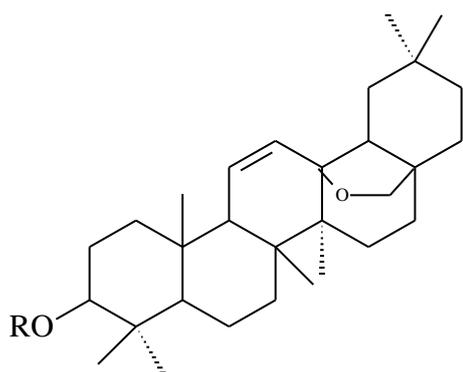
72: R = H

73: R = Ácidos graxos

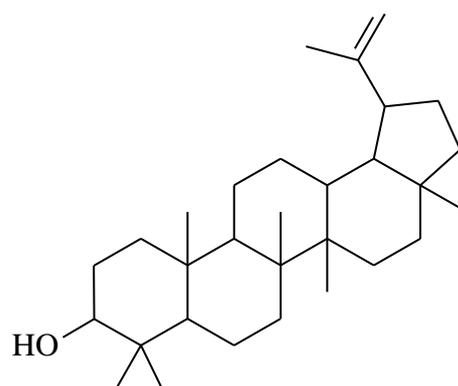


74: R = H

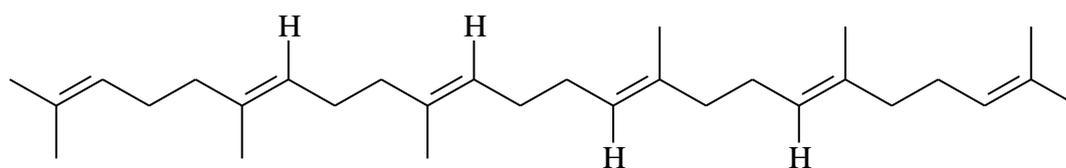
75: R = Ácidos graxos



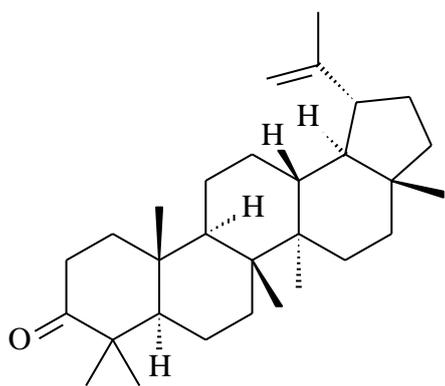
76: R = H

77: R = COCH₃

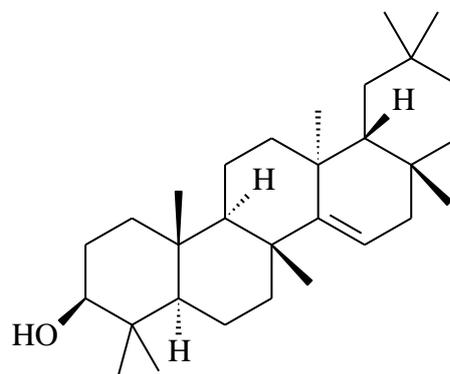
78



79



80



81



Figura 2. Foto da espécie *M. guianensis*, com destaque para o tronco (Nunez, 2008)



Figura 3. Folhas de *M. guianensis* (Foto: MOBOT, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos de *Minquartia guianensis* e avaliar o potencial antifúngico e antibacteriano.

2.2 Específicos

- Isolar substâncias, identificar ou elucidar a estrutura química através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais, IV e UV).
- Avaliar a atividade antifúngica das frações obtidas dos extratos DCM e MeOH das folhas, DCM dos galhos da primeira coleta e MeOH das folhas da segunda coleta frente à *Cryptococcus gattii* por bioautografia.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos DCM, MeOH e aquoso (H_2O) das folhas e galhos obtidos da primeira coleta e DCM e MeOH das folhas e galhos obtidos da segunda coleta, frente à *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *P. aeruginosa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos

As folhas e galhos da espécie *M. guianensis* foram coletados na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. Foram realizadas duas coletas, sendo uma em abril de 2005 e a outra em julho de 2008. Os extratos brutos foram comparados por CCD e por serem distintos não foram reunidos.

O material vegetal secou-se à temperatura ambiente, moído e submetido à extração com diclorometano, metanol e água, em ultra-som, por um período de 20 minutos para cada solvente. Cada extração foi realizada em triplicata. Após, foi realizada a evaporação dos solventes, utilizando rota-evaporador e liofilizador, para obtenção dos extratos brutos (Figura 4).

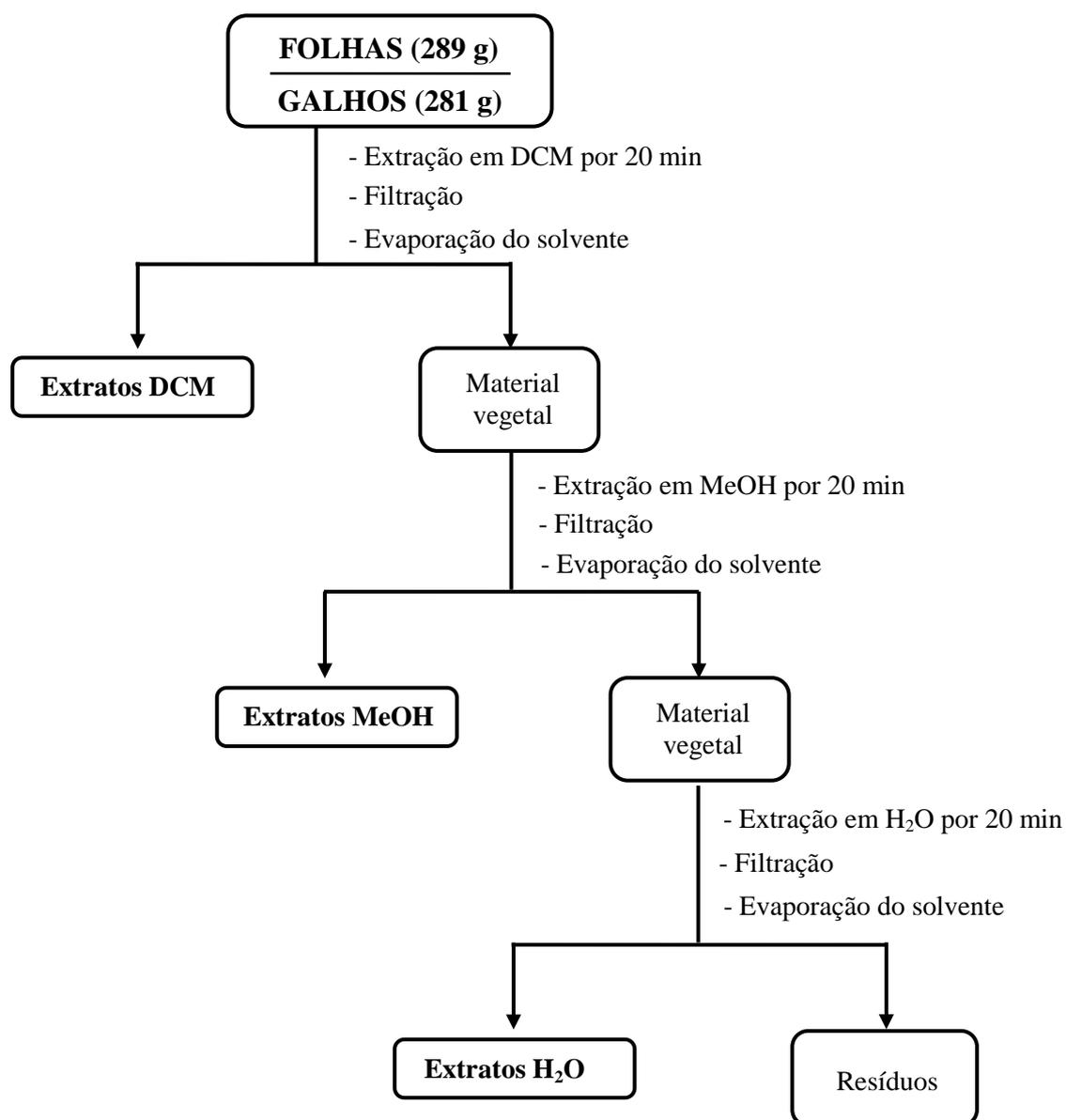


Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos.

3.2 Cromatografia em camada delgada dos extratos

Os extratos foram analisados por CCD para obter indícios de classes químicas presentes e também para ter uma comparação entre os extratos das duas coletas realizadas em meses distintos. Para cada extrato foi preparada uma solução (5 mg/mL) e em cada placa foram adicionados 10 µL desta solução.

As placas foram observadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda (λ) 254 e 365 nm (método físico). Reveladores químicos também foram utilizados como: iodo, soluções de sulfato cérico, anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico, cloreto de alumínio e Dragendorff. Os procedimentos para preparação de cada um dos reagentes estão mostrados a seguir:

Iodo: as placas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo iodo ressublimado. O aparecimento de manchas amarelas indica a presença de ligações duplas.

Solução de sulfato cérico: foram dissolvidos 4,2 g de sulfato de cério IV em 50 mL de água destilada. Acrescentou-se 2,8 mL de H₂SO₄ concentrado e foi aquecido. Após resfriado, foi completado com 100 mL de água destilada. Este é um revelador universal, mas cores entre lilás, laranja, vermelho e rosa indicam a presença de terpenos.

Solução de anisaldeído sulfúrico: foram misturados 0,5 mL de anisaldeído + 10 mL de ácido acético glacial + 85 mL de MeOH + 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Este é um revelador universal, mas cores como lilás e rosa indicam a presença de terpenos.

Solução de cloreto férrico: foram dissolvidos 3 g de cloreto férrico em 100 mL de álcool etílico. Esta solução revela indícios da presença de compostos fenólicos.

Solução de cloreto de alumínio: foi dissolvido 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de álcool etílico. Quando a placa foi borrifada, observou-se no UV 365 nm a intensificação da fluorescência, o que indica a possível presença de flavonoides.

Solução de Dragendorff: preparam-se duas soluções (I e II). A solução I consistiu em dissolver, sob aquecimento, 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial. Após, esta solução foi adicionada a 40 mL de água destilada. A solução II consistiu em dissolver 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. Estas duas soluções (I e II) foram reunidas e denominadas de solução estoque. A solução para borrifamento direto nas placas foi preparada adicionando 10 mL de água destilada + 1 mL da solução estoque + 2 mL de ácido acético glacial. A solução de Dragendorff quando borrifada na placa revela a presença de alcalóides com manchas de cor laranja.

3.3 Fracionamento cromatográfico

Os extratos fracionados foram o diclorometânico das folhas e dos galhos da primeira coleta, e o metanólico das folhas da segunda coleta. Durante o fracionamento, as frações foram analisadas por CCD reveladas por métodos físicos e químicos (Item 3.2).

3.3.1 Extrato diclorometânico das folhas

Foi realizado o fracionamento do extrato diclorometânico das folhas que resultou em 109 frações (CURSINO et al., 2006). Após análise por CCD, as frações quimicamente semelhantes foram reunidas. A fração denominada 10-13 foi escolhida para seguir o fracionamento, por mostrar-se interessante quimicamente quando revelada com $Ce(SO_4)_2$, sugerindo a presença de terpenos, o que é compatível com a literatura consultada.

Esta amostra 10-13 (390 mg) foi fracionada em coluna aberta (65 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro) de Florisil (40 g, partículas de 100-200 mesh – ASTM, MERCK), usando gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 18).

Tabela 18. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 10-13

Frações coletadas	Eluentes
0-5	Hex/AcOEt 98:2
6-11	Hex/AcOEt 97:3
12-15	Hex/AcOEt 96:4
16-18	Hex/AcOEt 95:5
19-21	Hex/AcOEt 9:1
22-24	Hex/AcOEt 8:2
25-27	Hex/AcOEt 7:3
28-30	Hex/AcOEt 6:4
31-33	Hex/AcOEt 1:1
34-35	AcOEt 100 %
36-37	AcOEt/MeOH 9:1
38	AcOEt/MeOH 85:15
39-41	AcOEt/MeOH 8:2
42	AcOEt/MeOH 75:15
43-44	AcOEt/MeOH 7:3
45	AcOEt/MeOH 1:1
46-48	MeOH 100 %

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 160 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas variou de 50 a 80 mL. Foram obtidas 48 frações, as quais foram reunidas, após analisadas por CCD. A fração 4, após ser purificada com hexano, resultou em duas subfrações: a subfração 1 denominada de substância 1 e 2 (cristais brancos) e a subfração 2 denominada de fração 4.2 (sobrenadante amarelo). Esses cristais foram registrados na luz visível, UV 254 nm, UV 365 nm e por fim foram revelados com vapores de iodo e anisaldeído sulfúrico (Figura 5). Os cristais foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C .

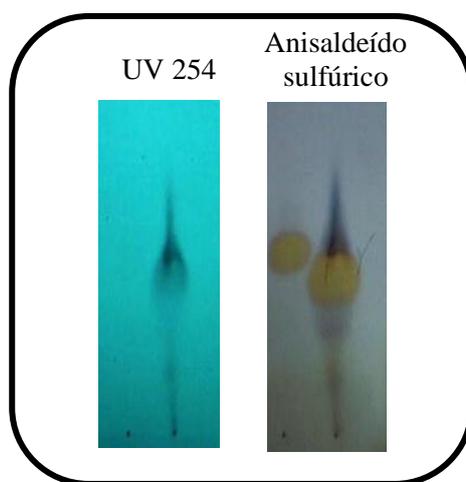


Figura 5. Fotos das placas referentes às frações 4.1 (substâncias 1 e 2) e 4.2

A fração 23-29 (480 mg) resultou da reunião das frações 23 a 29 por apresentarem perfil semelhante em CCD, foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta (25 x 2 cm), recheada com 40 g de sílica gel 60 (230-400 mesh) com gradiente de acetona em diclorometano, conforme descrito na Tabela 19.

Tabela 19. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 23-29

Frações coletadas	Eluentes
0-10	DCM/Acetona 99:1
11-12	DCM/Acetona 98:2
13	DCM/Acetona 9:1
14-15	DCM/Acetona 7:3
16	DCM/Acetona 1:1
17-18	Acetona 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 150 mL e para as frações recolhidas utilizaram-se volumes de 50 a 100 mL. A partir das frações analisadas foi possível reunir as frações de 9 a 11 por apresentarem características químicas semelhantes, quando analisadas por CCD. Essa fração 9-11 foi purificada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A amostra foi dissolvida em AcOEt e gotas de acetonitrila (ACN). A análise dessa fração foi realizada em coluna analítica de cianopropil (Phenomenex[®]) e a purificação foi realizada em coluna semi-preparativa cianopropil (Phenomenex[®]), 250 x 10 mm, 5 µm, volume de injeção 25 µL, fluxo 1 mL/min. Foram observados 4 picos com $t_R = 4, 10, 20$ e 40 min. Estabelecida a melhor condição de separação, esta amostra foi fracionada em coluna semipreparativa cianopropilsilano (Phenomenex[®]), 250 x 10 mm, 5 µm, volume de injeção 35 µL, fluxo 5 mL/min. As frações obtidas, correspondentes a cada pico foram analisadas por RMN de ¹H e ¹³C, destacando a fração 4b (denominada de substância 3) que mostrou elevado grau de pureza.

Outra fração escolhida para fracionamento foi a 63-66, por apresentar atividade frente à análise por bioautografia contra *Cryptococcus gattii*. Foi fracionada em coluna aberta (28 cm de altura e 1,2 cm de diâmetro) de sílica gel (18 g e partículas de 230-400 mesh – ASTM, MERCK), com gradiente de acetona em hexano, MeOH em acetona até MeOH 100% (Tabela 20).

Tabela 20. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento de 63-66

Frações coletadas	Eluentes
0-2	Hex/Acetona 9:1
3-6	Hex/Acetona 8:2
7-10	Hex/Acetona 7:3
11-13	Hex/Acetona 6:4
14-15	Hex/Acetona 1:1
16-19	Acetona 100%
20-22	Acetona/MeOH 9:1
23-25	Acetona/MeOH 8:2
26-27	Acetona/MeOH 7:3
28-29	Acetona/MeOH 6:4
30-31	Acetona/MeOH 1:1
32-35	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 80 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas variou de 20 a 30 mL, foram obtidas 35

frações, as quais foram analisadas por CCD e reunidas. A fração 9A (substância 4) se mostrou pura quando analisada por CCD, observada sob luz visível, UV 254 e 365 nm e reveladas com iodo e anisaldeído sulfúrico (Figura 6). Por esta razão foi analisada por RMN de ^1H e ^{13}C e também foram obtidos os espectros de massas registrados em espectrômetro do tipo *Ion-trap* modelo *LCQ Fleet* (Thermo scientific) operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). Os seguintes parâmetros de operação foram utilizados: *Vaporizer temp* ($^{\circ}\text{C}$) - 300; *Sheath gas* (arb) - 30; *Aux gas* (arb) - 10; *sweep gas* (arb) - 0; *Discharge voltage* (Kv) - 3; *Capillary temp* ($^{\circ}\text{C}$) - 275; *Capillary voltage* (v) - 10; *Tube lens* (v) - 75. Fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.

O fluxograma com todo o fracionamento do extrato diclorometânico das folhas encontra-se na Figura 6.

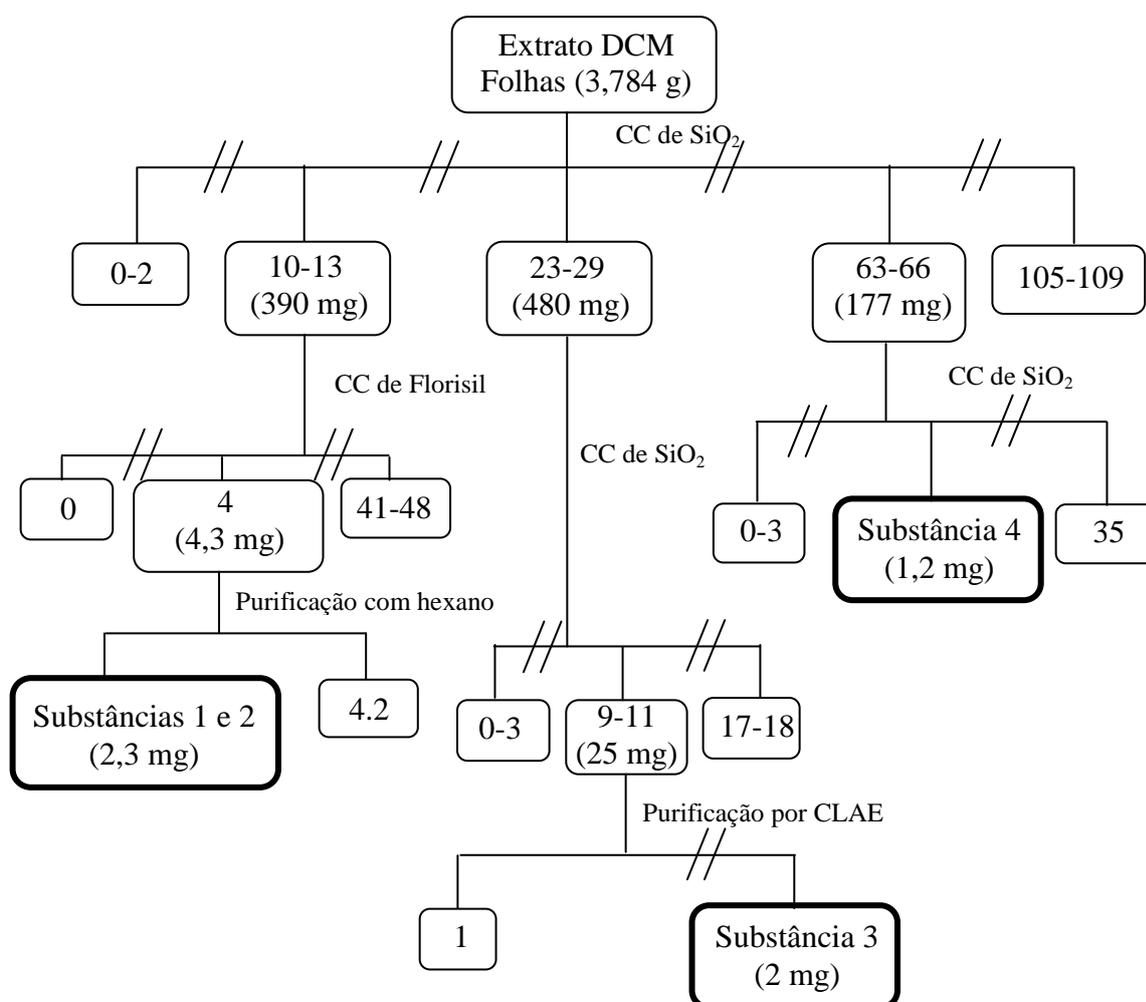


Figura 6. Fracionamento do extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta.

3.3.2 Extrato metanólico das folhas

Realizou-se o fracionamento do extrato metanólico das folhas da segunda coleta, que foi ativo para análise antifúngica frente à *Cryptococcus gatti* e análise antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila*. Foi realizada uma partição líquido-líquido deste, a massa inicial foi de 10 g solubilizados numa mistura de MeOH/H₂O 1:9. A solução foi extraída com 500 mL de DCM em funil de separação (repetindo 3 vezes) e com AcOEt (repetindo 3 vezes). Por fim, a fase hidrometanólica foi liofilizada.

A fase DCM foi fracionada em coluna aberta (30 cm de altura e 3 cm de diâmetro) de Florisil (100-200 mesh ASTM, MERCK), com gradiente acetona em hexano, MeOH em acetona e MeOH 100% (Tabela 21), obtendo um total de 56 frações. As frações foram reunidas, após serem analisadas por CCD.

Tabela 21. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento da fase DCM

Frações coletadas	Eluentes
0-4	Hex/Acetona 95:5
5-7	Hex/Acetona 9:1
8-10	Hex/Acetona 8:2
11-14	Hex/Acetona 7:3
15-18	Hex/Acetona 6:4
19-21	Hex/Acetona 1:1
22-25	Hex/Acetona 3:7
26-29	Hex/Acetona 1:9
30-32	Acetona 100%
33-35	Acetona/MeOH 9:1
36-38	Acetona/MeOH 8:2
39-41	Acetona/MeOH 7:3
42-44	Acetona/MeOH 6:4
45-48	Acetona/MeOH 1:1
49-56	MeOH 100%

A partir das frações obtidas da coluna realizada da fase DCM, verificou-se que as frações 5, 6 e 7 mostraram forte intensidade quando analisadas por luz UV 365 nm, com fluorescência azul. Estas frações foram reunidas, denominadas de fração 5-7, quando analisadas por CCD observou-se duas manchas, portanto, foi submetida à cromatografia em

camada delgada preparativa (CCDP). A amostra foi diluída em hexano e eluída em hexano/acetona 8:2.

A fase AcOEt (130,5 mg) foi fracionada para possível isolamento de substâncias com atividade biológica. Foi realizada uma coluna aberta (26,5 cm de altura e 1 cm de diâmetro) de sílica gel (sílica gel 60 – tamanho de partícula de 0,04 - 0,06 mm), usando gradiente de AcOEt em hexano, MeOH em AcOEt até MeOH 100% (Tabela 22).

Tabela 22. Eluentes utilizados para cada grupo de frações do fracionamento da fase AcOEt

Frações coletadas	Eluentes
0-4	Hex/AcOEt 9:1
5-8	Hex/ AcOEt 8:2
9-10	Hex/ AcOEt 7:3
11-12	Hex/ AcOEt 1:1
13-14	AcOEt 100%
15-17	AcOEt/MeOH 9:1
18-20	AcOEt/MeOH 7:3
21-22	AcOEt/MeOH 6:4
23-25	AcOEt/MeOH 1:1
26-30	MeOH 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 40 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas variou de 5 a 10 mL. Foram obtidas 30 frações que foram analisadas por CCD e reunidas.

O fracionamento do extrato metanólico está mostrado na Figura 7.

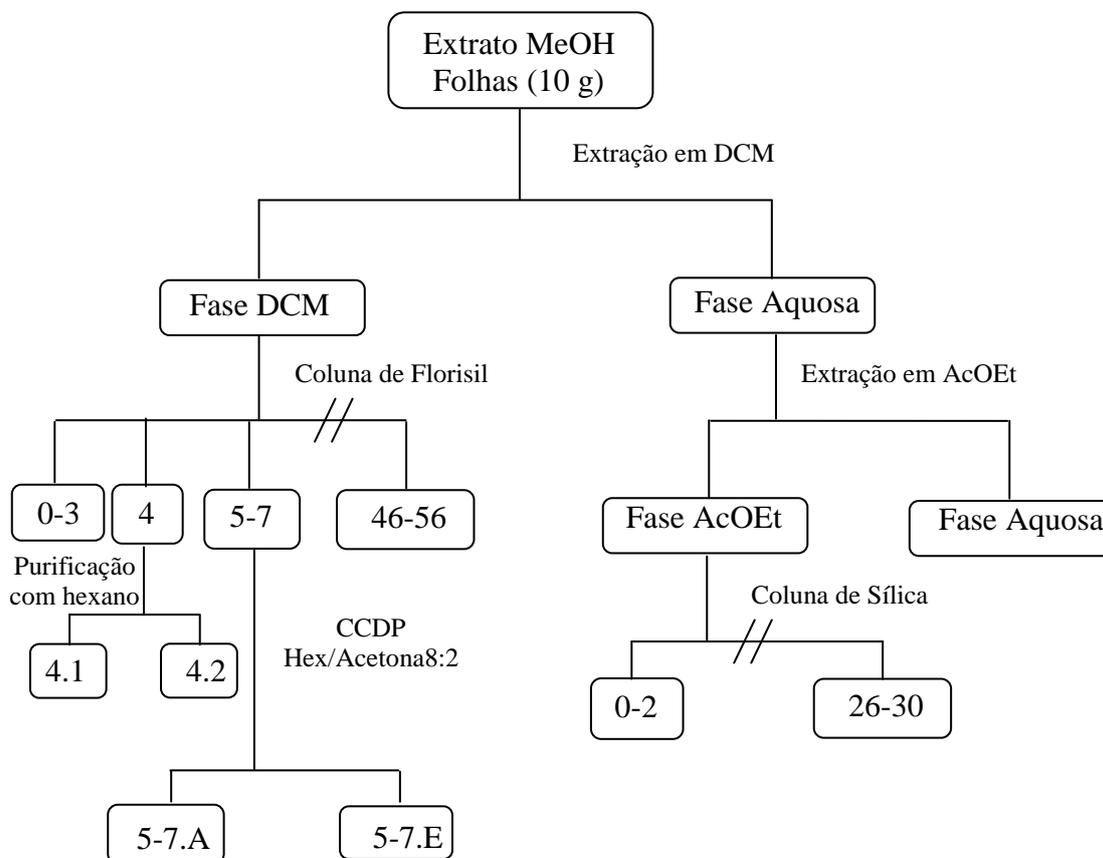


Figura 7. Fracionamento do extrato metanólico da segunda coleta.

3.3.3 Extrato diclorometânico dos galhos

O extrato diclorometânico dos galhos foi fracionado totalizando 103 frações que após serem analisadas por CCD foram reunidas (CURSINO et al., 2008). Dentre estas, a fração reunida da 3 a 5 (74,8 mg) foi escolhida para continuar o fracionamento. Realizou-se uma coluna aberta (33 cm de altura e 1 cm de diâmetro) de sílica gel (7 g de sílica gel 60 – tamanho de partícula de 0,04 - 0,06 mm), usando gradiente de DCM em hexano, AcOEt em DCM até AcOEt 100% (Tabela 23).

Tabela 23. Eluentes utilizados para cada grupo de frações de 3-5

Frações coletadas	Eluentes
0-8	Hex/DCM 95:5
9-16	Hex/DCM 9:1
17-20	Hex/DCM 85:15
21-27	Hex/DCM 8:2
28-32	Hex/DCM 75:25
33-37	Hex/DCM 7:3
38-43	Hex/DCM 65:35
44-48	Hex/DCM 6:4
49-53	Hex/DCM 55:45
54-58	Hex/DCM 1:1
59-63	DCM 100%
64-68	DCM/AcOEt 95:5
69-74	DCM/AcOEt 9:1
75-77	DCM/AcOEt 8:2
78-80	DCM/AcOEt 7:3
81-83	DCM/AcOEt 6:4
84-86	DCM/AcOEt 1:1
87-89	AcOEt 100%

O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna cromatográfica foi de 50 mL, enquanto que o volume das frações recolhidas variou de 15 a 25 mL. Foram obtidas 89 frações, as quais foram reunidas por semelhança química. A fração 8-14 foi purificada em acetona resultando em duas frações, uma denominada de 8-14.1 correspondente à substância 5 e a outra de 8-14.2 (Figura 8). A substância 5 apresentou alto grau de pureza e foi enviada para análise de RMN de ^1H e de ^{13}C .

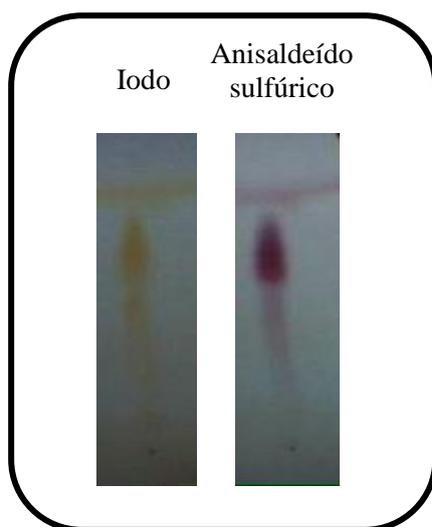


Figura 8. Fotos das placas referente à fração 8-14.1 (substância 5).

O fluxograma do extrato diclorometânico dos galhos está apresentado na Figura 9.

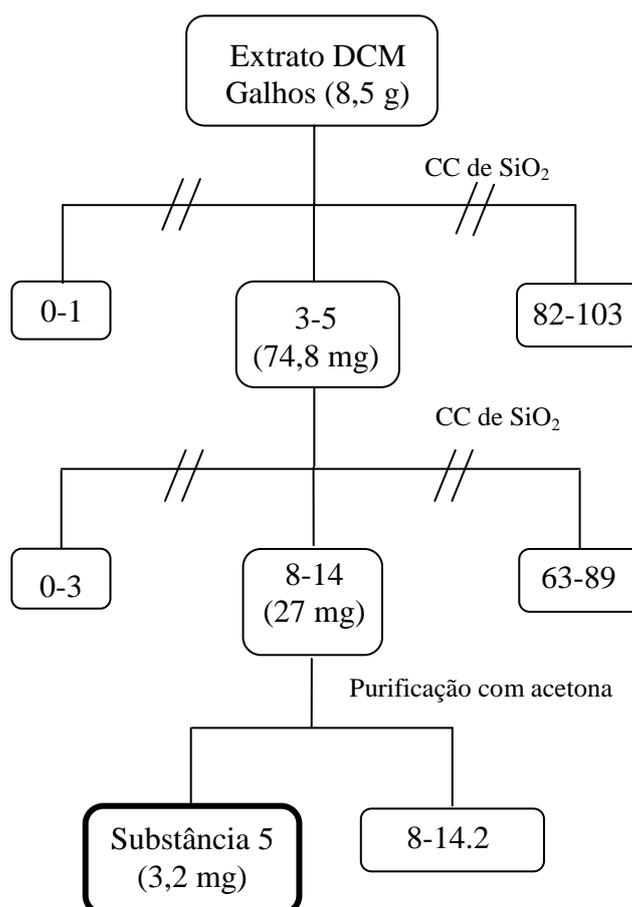


Figura 9. Fracionamento do extrato diclorometânico dos galhos da primeira coleta.

3.4 Atividade antifúngica sobre *Cryptococcus gattii* (R265)

A análise foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein, pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os ensaios foram realizados frente à linhagem de *C. gattii*, isolado de ambiente clínico. Os extratos foram testados frente a esta linhagem e verificou-se atividade antifúngica (AZEVEDO et al, 2010).

Portanto, as frações obtidas dos extratos diclorometânico, metanólico das folhas e diclorometânico dos galhos da primeira coleta e frações do extrato metanólico das folhas da segunda coleta, totalizando 53 frações, foram testadas por bioautografia visando o monitoramento. As frações escolhidas para serem analisadas estão destacadas nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Como já haviam sido fracionados alguns extratos no Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) (CURSINO et al, 2008), algumas das frações de cada fracionamento também foram analisadas.

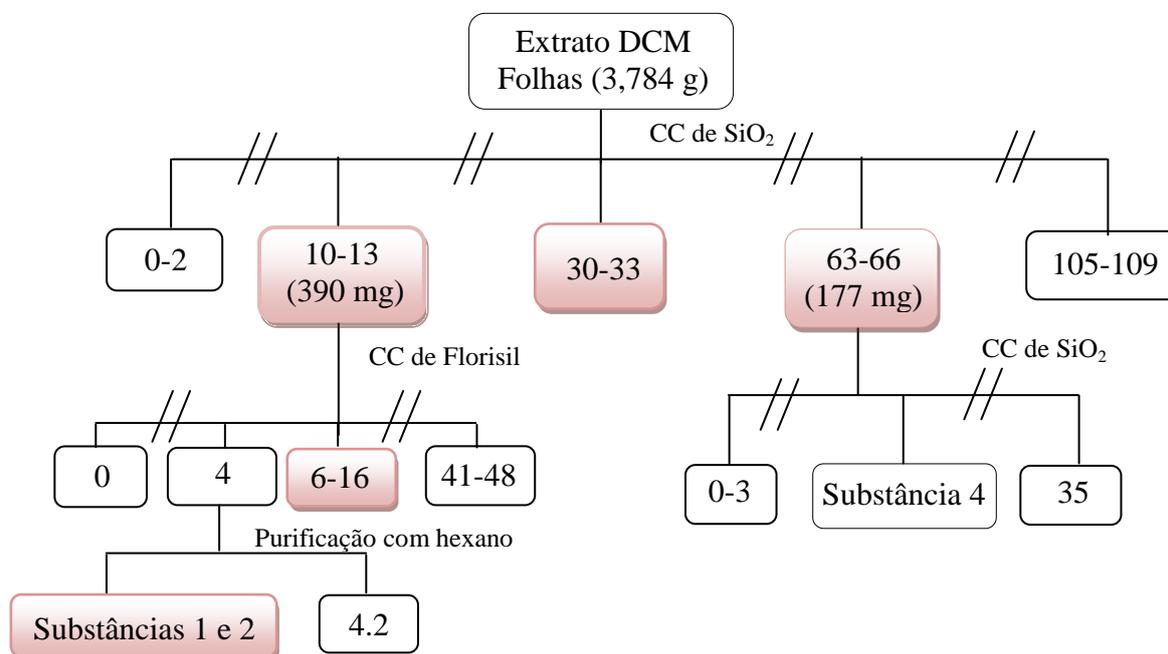


Figura 10. Frações em destaque testadas do extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta contra *Cryptococcus gattii*.

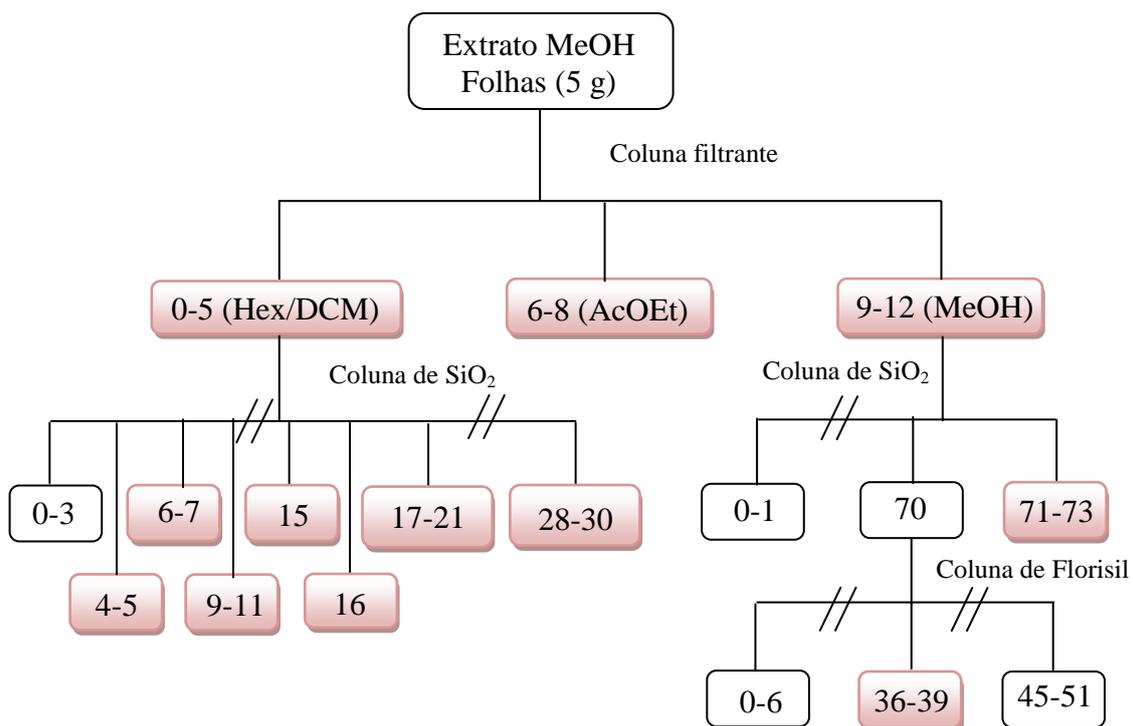


Figura 11. Frações em destaque testadas do extrato metanólico das folhas da primeira coleta (CURSINO et al., 2006).

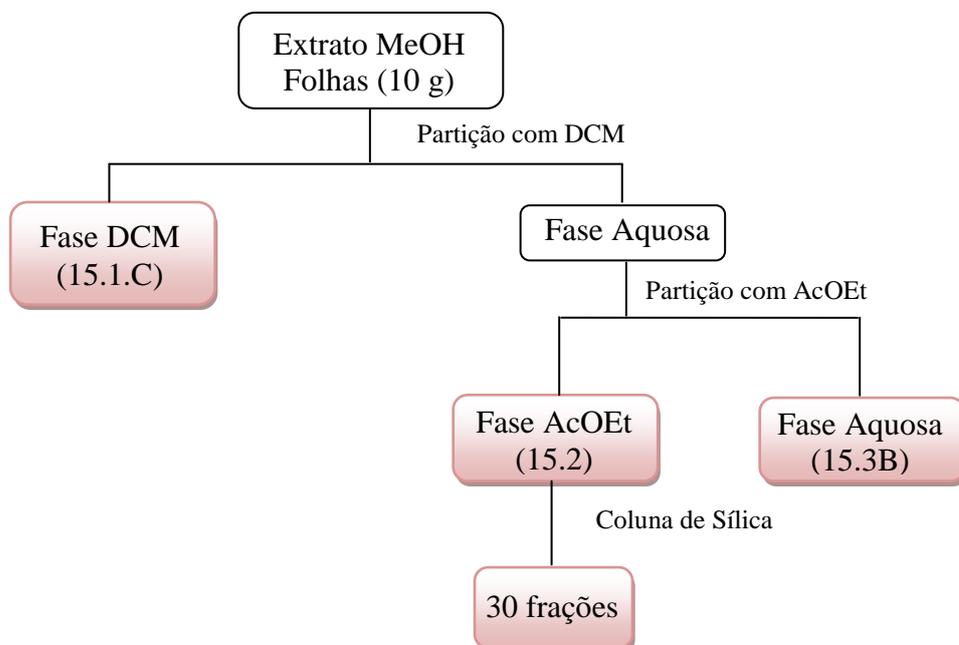


Figura 12. Frações em destaque testadas do extrato metanólico das folhas da segunda coleta.

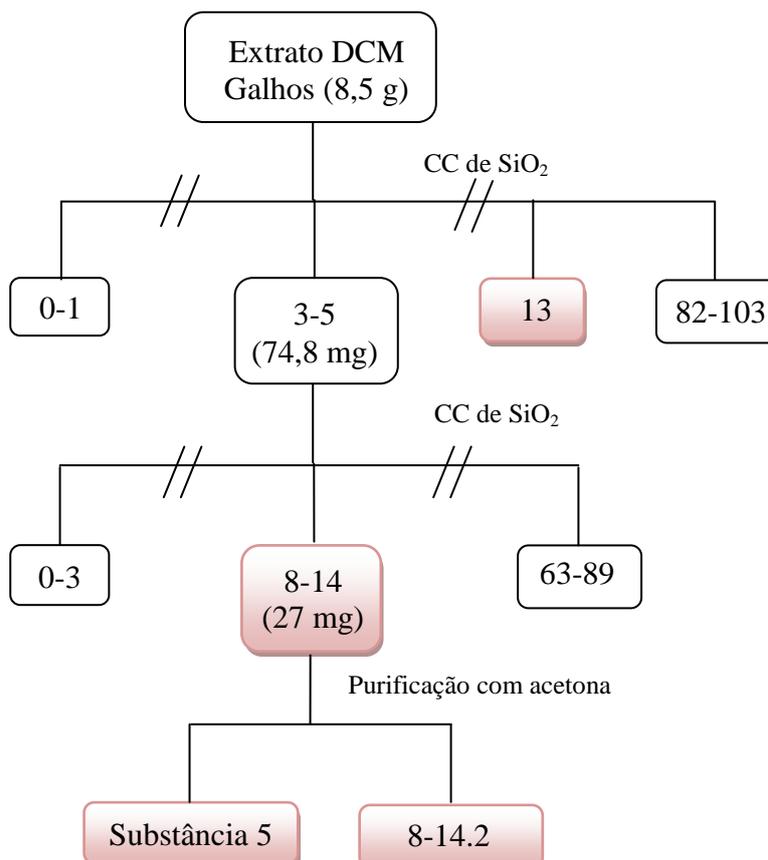


Figura 13. Frações em destaque do extrato diclorometano dos galhos da primeira coleta.

As frações foram preparadas na concentração de 5 mg/mL e uma alíquota de 25 μ L desta solução foi adicionada em cada ponto de aplicação da cromatofolha, enquanto o controle positivo resultou da adição de uma alíquota de 5 μ L do antibiótico anfotericina B (0,5 μ g/mL).

Primeiramente, o fungo foi repicado e após 48 h foi realizado o preparo do inóculo que se iniciou com a adição de uma colônia em uma solução salina (0,85 %), após foi comparado com a escala de Mc Farland. Este inóculo também foi levado ao espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) = 530 nm e absorvância entre 0,12 – 0,15. Após solidificação do meio de cultura YEPG – peptona (1 %), extrato de levedura (0,5 %), glicose (2 %) e ágar (2 %), o inóculo foi aplicado nas placas cromatográficas. Em seguida, estas foram incubadas na estufa por 35 °C e a leitura foi realizada após 72 h. Para melhor visualização da atividade, foi borrifado o revelador MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Marca NITROGEN) (2,5 mg/mL) que apresenta cor púrpura e onde tem atividade revela uma

cor branca amarelada. Ao borrifar o revelador nas placas, estas foram incubadas na estufa 35 °C e após 2 h foi realizada a leitura.

3.5 Atividade antibacteriana

3.5.1 Cepas testadas

As análises foram realizadas frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966 e B32), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *P. aeruginosa* (ATCC 10145).

3.5.2 Método difusão em ágar

O ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Takeshi Matsuura, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

O método utilizado foi o de difusão em Ágar que consiste na metodologia em que o micro-organismo-teste é inoculado em placa de Petri contendo o meio de cultura Ágar Müller-Hinton, onde foram feitas incisões circulares, com diâmetro de 6,0 mm, de modo a obter-se uma cavidade. Foi utilizado como controle negativo o dimetilssulfóxido (DMSO) e a oxitetraciclina como controle positivo. Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C (*A. hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*) e 37 °C (*Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*) por um período de 18 a 24 horas. Ao final do período de incubação, verificou-se a formação dos halos de inibição de crescimento e mediu-se o diâmetro. A análise foi realizada em triplicata.

3.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para esta análise, o método utilizado foi o de microdiluição modificado (ELOFF, 1998). Os extratos foram primeiramente solubilizados em DMSO a 5%, e em seguida foram realizadas diluições sucessivas até a obtenção das concentrações de 1000 µg/mL a 15,6 µg/mL. Em seguida, cada concentração foi adicionada em poços (microplaca de 96 poços). Foram adicionados 95 µL de cada concentração do extrato e 5 µL do inóculo (Mc Farland 0,5

contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$) diluída 10 vezes. Para o controle negativo foi utilizado 95µL de caldo mais DMSO e o inóculo. O controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina nas concentrações de 125 µg/mL – 0,97 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida a placa foi agitada e incubada a temperatura e tempo adequado para cada microrganismo. A CIM foi detectada com o auxílio do revelador cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (2 mg/mL), foi adicionado 40µL deste revelador em cada poço. Micro-organismos metabolicamente ativos coram-se de vermelho. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que não houve mudança de coloração.

3.5.4 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Foi realizada também a análise para a determinação da CMB, que determina onde não houve crescimento bacteriano a partir da CIM. Primeiramente, foram retirados 10 µL de cada concentração que não demonstrou crescimento microbiano na CIM e após foi semeada em Ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a temperatura de 30 °C (*Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*) e 37 °C (*Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) por um período de 18 a 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos

Os extratos DCM das folhas foram analisados por CCD e revelados para determinar possíveis classes químicas presentes. De acordo com a Figura 14 observou-se a presença de substâncias características de terpenos, por revelar com sulfato cérico (coloração roxa). O eluente utilizado foi Hex/AcOEt 6:4. Quando estes extratos foram revelados com cloreto férrico e Dragendorff verificou-se que não há presença de compostos aromáticos e alcaloides.

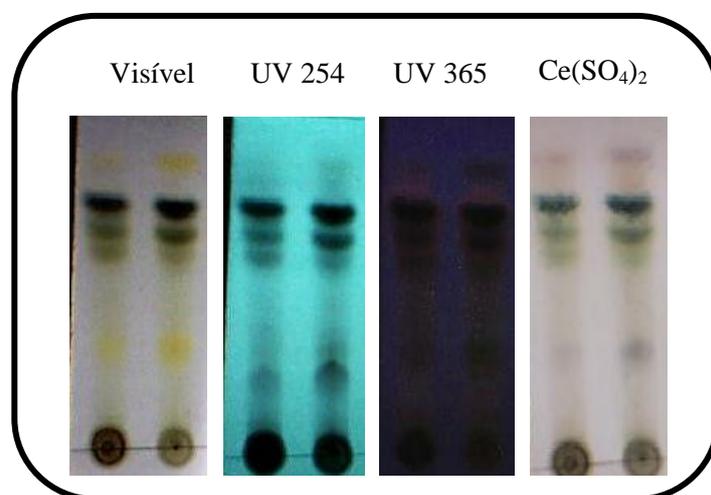


Figura 14. Fotos das placas dos extratos DCM das folhas da 1ª e 2ª coleta.

Ao analisar os dois extratos DCM dos galhos (1^a e 2^a coletas) verificou-se fluorescência quando irradiados por luz UV 365 nm, caracterizando possivelmente compostos aromáticos. Observaram-se também manchas de cores laranja e roxa quando reveladas com sulfato cérico, confirmando a presença de terpenos.

As placas reveladas com cloreto férrico e Dragendorff confirmaram a ausência de compostos aromáticos e alcalóides. O eluente utilizado foi Hex/AcOEt 6:4 (Figura 15).

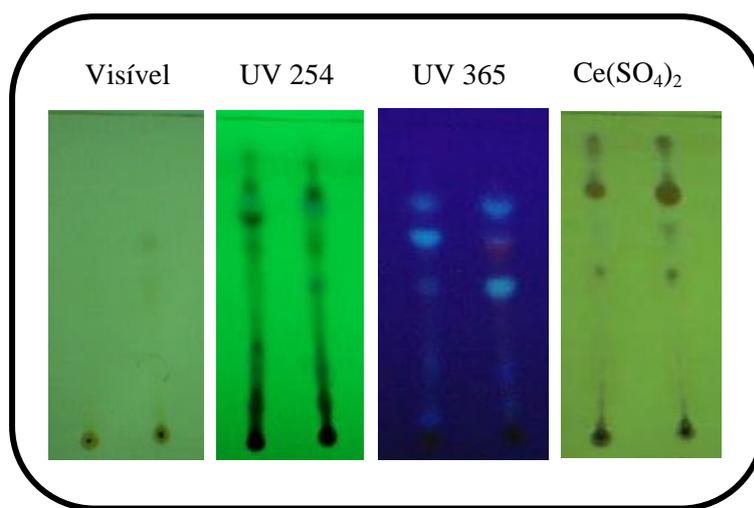


Figura 15. Fotos das placas dos extratos DCM dos galhos da 1^a e 2^a coleta.

Os extratos MeOH das folhas da 1^a e 2^a coleta mostraram a presença de compostos aromáticos, quando revelados com cloreto férrico, sendo possivelmente taninos hidrolisáveis pela cor azulada (SIMÕES et al., 2004). Quando reveladas com Dragendorff observou-se a ausência de alcalóides e quando reveladas com cloreto de alumínio, foi sugestiva a possível presença de flavonóides, pois ao analisar no UV 365 nm, observou-se intensificação da fluorescência. Os extratos revelados com sulfato cérico e anisaldeído apresentaram coloração lilás possivelmente triterpenos (WAGNER & BLADT, 2001). O eluente utilizado foi o AcOEt/MeOH 7:3 (Figura 16).

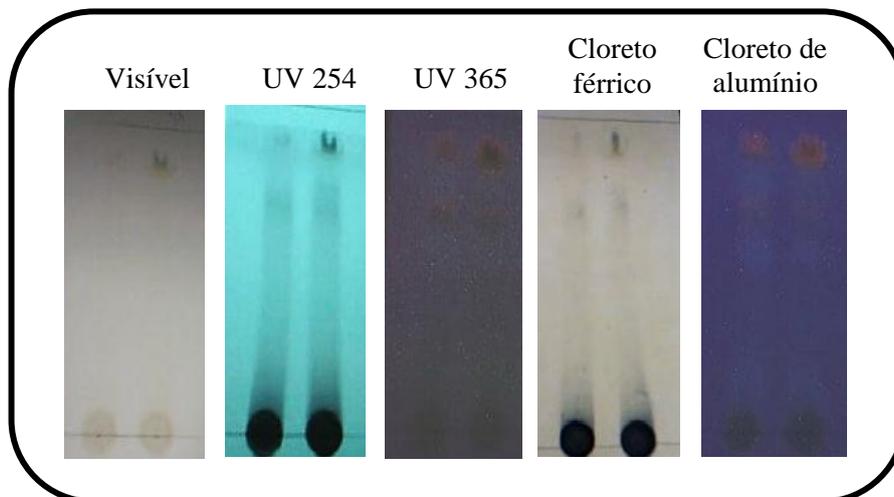


Figura 16. Fotos das placas dos extratos MeOH das folhas da 1ª e 2ª coleta.

Ao revelar os extratos MeOH dos galhos com anisaldeído (cor marrom avermelhada) e sulfato cérico (lilás) verificou-se a presença de terpenos. Quando as placas foram reveladas com cloreto férrico observou-se uma coloração verde azulada, caracterizando compostos aromáticos; quando reveladas com cloreto de alumínio e observadas sob luz UV 365 nm, verificou-se a intensificação da fluorescência, sugerindo a presença de flavonoides. Essa coloração azul é característica de taninos hidrolisáveis (SIMÕES et al., 2004). Verificou-se a ausência de alcalóides para estes extratos, quando revelados com Dragendorff. O eluente utilizado foi o AcOEt/MeOH 7:3 (Figura 17).

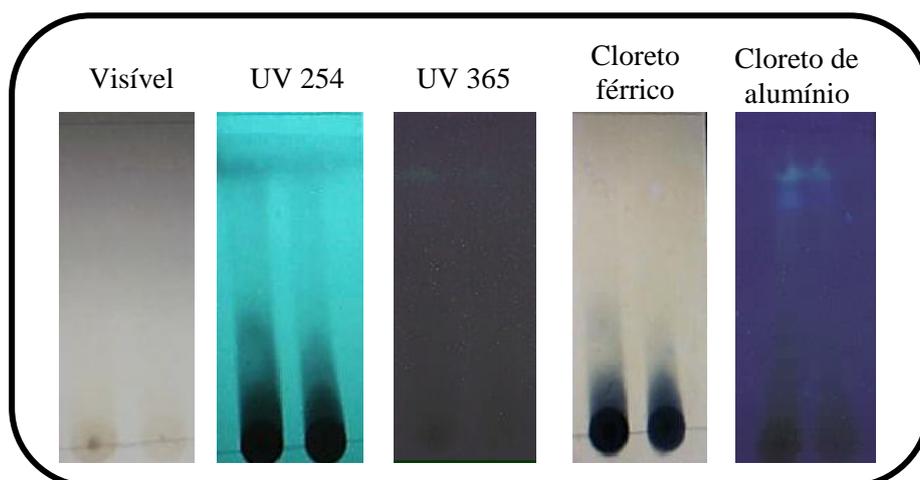
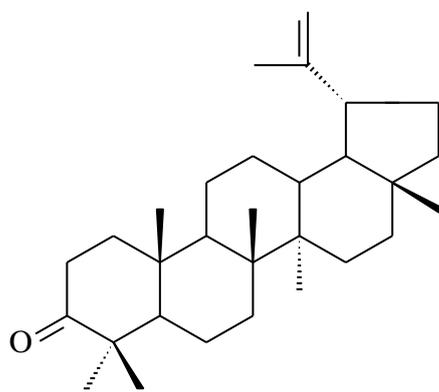
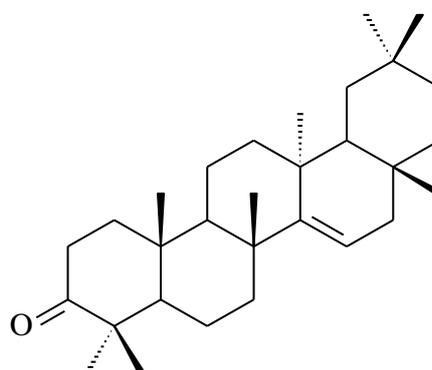


Figura 17. Fotos das placas dos extratos MeOH dos galhos da 1ª e 2ª coleta.

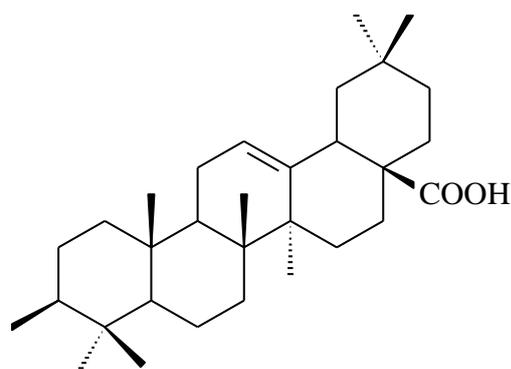
4.2 Substâncias identificadas de *Minquartia guianensis*



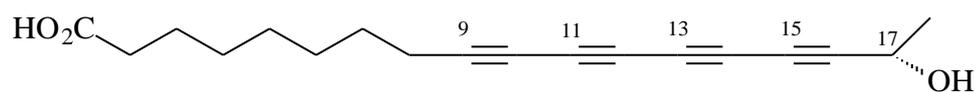
1
Lupen-3-ona



2
Taraxerona

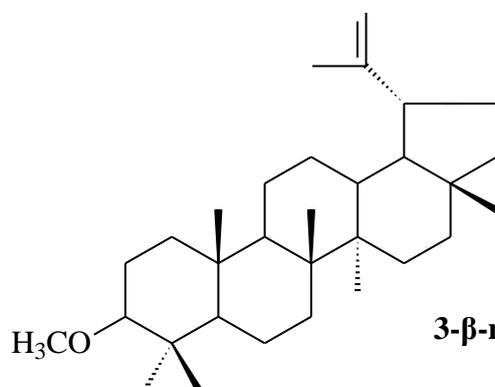


3
Ácido oleanólico



4

Ácido minquartinóico



5
3-β-metóxi-lup-20-(29)-eno

4.2.1 Identificação das substâncias 1 e 2

A fração 4.1, obtida do extrato diclorometânico, apresentou sólido branco amorfo e quando revelada com anisaldeído sulfúrico verificou-se coloração amarela.

O espectro de RMN de ^1H desta fração mostra a presença de sinais mais intensos na região de ligações duplas terminais em δ_{H} 4,5 (1H, *dd*, $J = 2,5$ e $1,0$ Hz) e δ_{H} 4,6 (1H, *d*, $J = 2,5$ Hz) indicando a presença de triterpeno com esqueleto lupano. Os sinais menos intensos foram observados em δ_{H} 5,5 (1H, *dd*, $J = 8,0$ e $3,0$ Hz) (Figuras 18 e 19) indicando a presença de outro triterpeno com esqueleto taraxerano.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 20 e 21), verificam-se os sinais mais intensos em δ_{C} 151,0 (C) e em δ_{C} 109,6 (CH_2), referentes aos carbonos olefínicos, característicos de triterpeno com o esqueleto lupano. Outros sinais foram observados em δ_{C} 157,7 (C) e 117,4 (CH) referentes aos carbonos olefínicos de outro triterpeno do tipo taraxerano. Foi observado em δ_{C} 218,3 a presença de carbonila.

Os dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C estão mostrados nas Tabelas 24 e 25.

A comparação dos dados de RMN com os da literatura possibilitou propor as mesmas como sendo a mistura de dois triterpenos: o com sinais mais intensos como sendo a lupen-3-ona e o outro com sinais menos intensos, a taraxerona. Esta identificação foi baseada na metodologia que indica que sinais de intensidades semelhantes são da mesma substância (OLEA & ROQUE, 1990; BROCHINI et al., 1998).

Os dados obtidos de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) para taraxerona foram comparados com dados da literatura de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) (SARAIVA et al., 2006). Os dados obtidos de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) para lupen-3-ona foram comparados com dados da literatura de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) (NUNEZ, et al., 2000).

A lupen-3-ona foi previamente identificada das folhas de *Minquartia guianensis* (CURSINO et al., 2009). A taraxerona está sendo descrita pela primeira vez na família Olacaceae.

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C da lupen-3-ona comparados com a literatura (NUNEZ et al., 2000)

Posição	δ_{C} Observado	δ_{C} Literatura	Carbonos
1	40,21	39,56	CH ₂
2	34,36	34,07	CH ₂
3	218,28	217,90	C=O
4	47,54	47,24	C
5	55,15	54,88	CH
6	19,55	19,63	CH ₂
7	33,80	33,53	CH ₂
8	41,01	40,73	C
9	50,02	49,75	CH
10	37,11	36,83	C
11	21,71	21,43	CH ₂
12	25,39	25,12	CH ₂
13	38,40	38,14	C
14	43,12	42,84	C
15	27,66	27,39	CH ₂
16	35,75	35,48	CH ₂
17	43,21	42,93	C
18	48,47	48,21	CH
19	48,17	47,89	CH
20	151,01	150,70	C
21	30,07	29,79	CH ₂
22	39,84	39,93	CH ₂
23	26,89	26,61	CH ₃
24	21,26	20,98	CH ₃
25	16,19	15,90	CH ₃
26	16,02	15,74	CH ₃
27	14,71	14,43	CH ₃
28	18,25	17,97	CH ₃
29	109,63	109,36	CH ₂
30	19,92	19,27	CH ₃

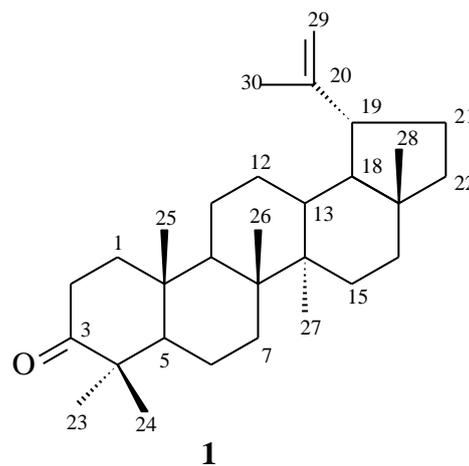
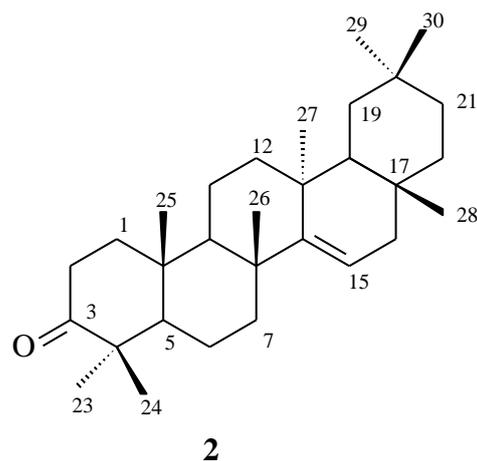
**1**
Lupen-3-ona

Tabela 25. Dados de RMN de ^{13}C da taraxerona comparados com a literatura (SARAIVA et al., 2006)

Posição	δ_{C} Observados	δ_{C} Literatura	Carbonos
1	38,6	38,5	CH ₂
2	34,3	34,2	CH ₂
3	218,3	217,7	C=O
4	47,8	48,8	C
5	56,0	55,9	CH
6	20,2	20,1	CH ₂
7	35,3	35,2	CH ₂
8	39,1	37,9	C
9	49,0 ^a	48,9	CH
10	36,0	35,8	C
11	17,7	17,5	CH ₂
12	36,9	36,8	CH ₂
13	37,9	37,7	C
14	157,7	157,3	C
15	117,4	117,3	CH
16	38,0	37,8	CH ₂
17	37,5	37,7	C
18	48,9 ^a	48,9	CH
19	40,9	40,8	CH ₂
20	29,0	28,9	C
21	30,0	33,7	CH ₂
22	33,3	33,2	CH ₂
23	26,3 ^b	26,2	CH ₃
24	21,6	21,6	CH ₃
25	15,0	14,9	CH ₃
26	30,9	30,0	CH ₃
27	25,8 ^b	25,7	CH ₃
28	30,2	30,1	CH ₃
29	33,6	33,5	CH ₃
30	21,6	21,5	CH ₃

**2**
Taraxerona

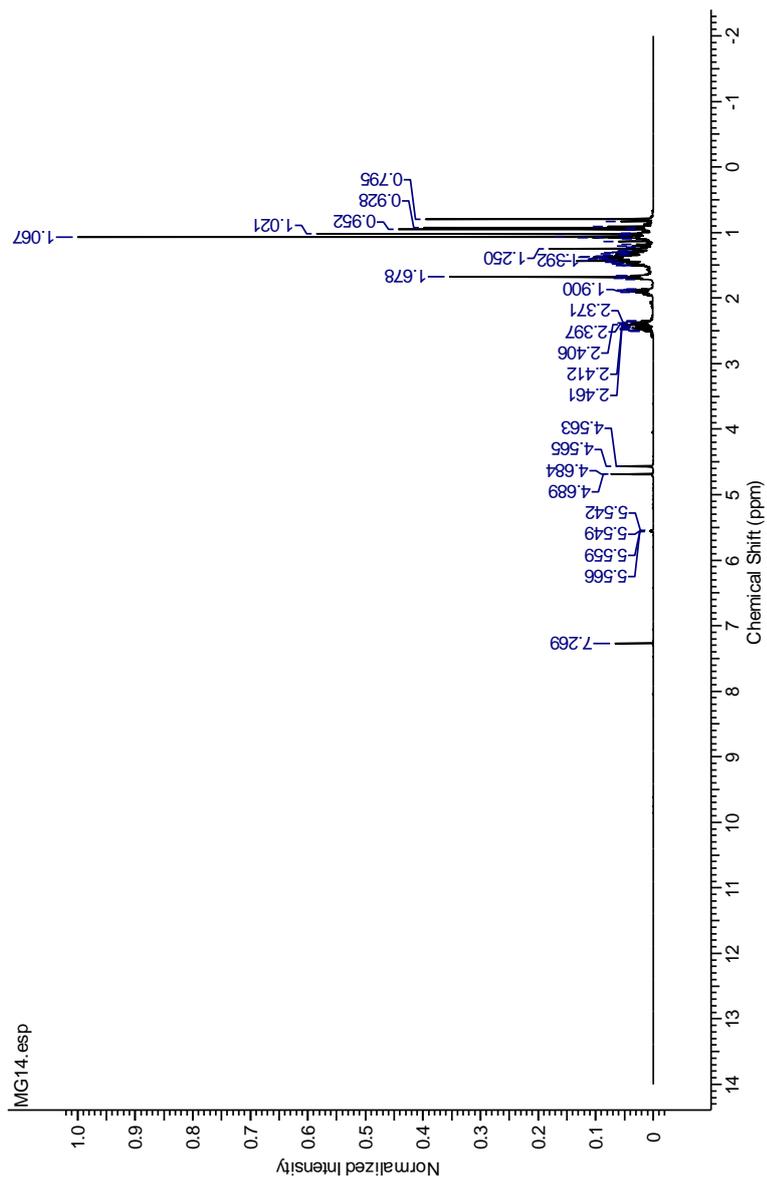


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de lupen-3-ona e taraxerona.

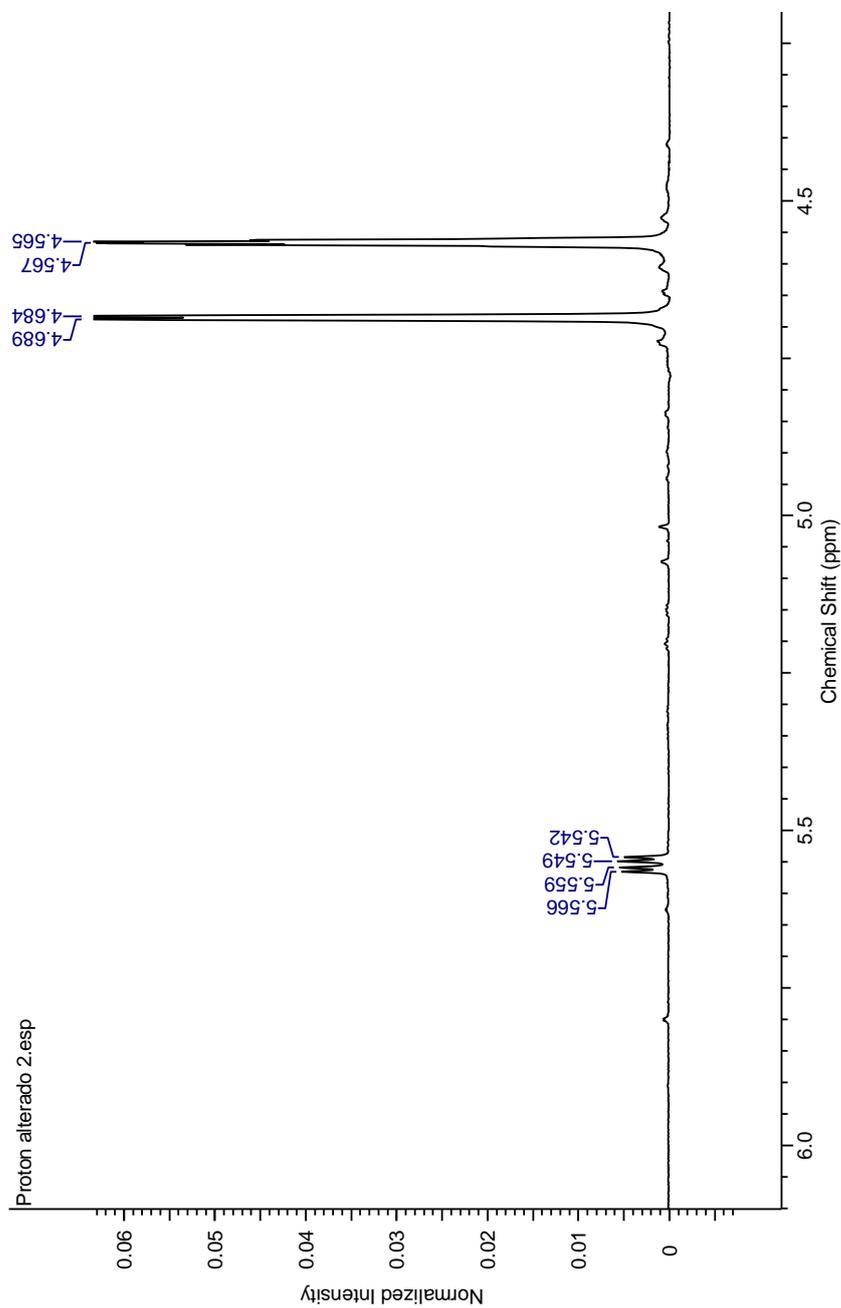


Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^1H de lupen-3-ona e taraxerona.

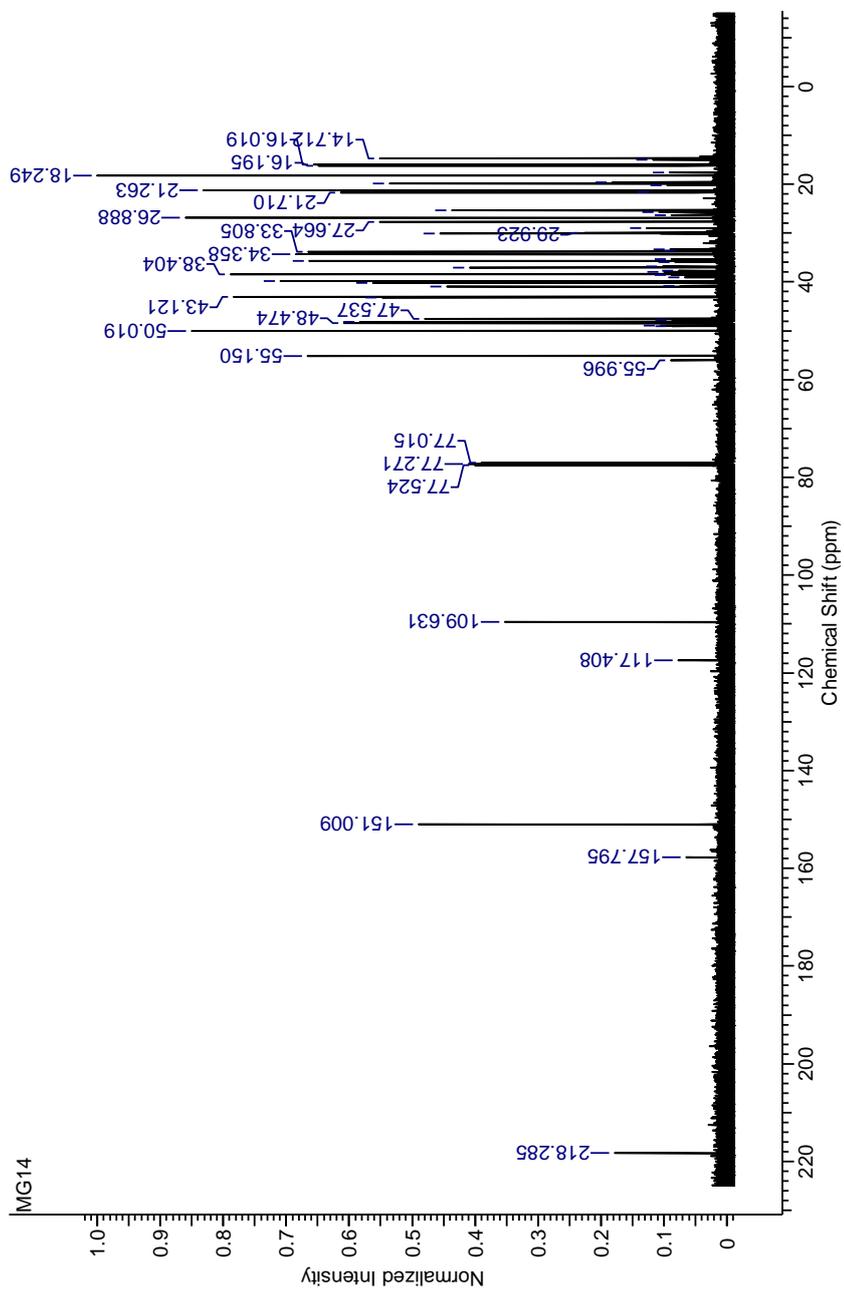


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de lupen-3-ona e taraxerona

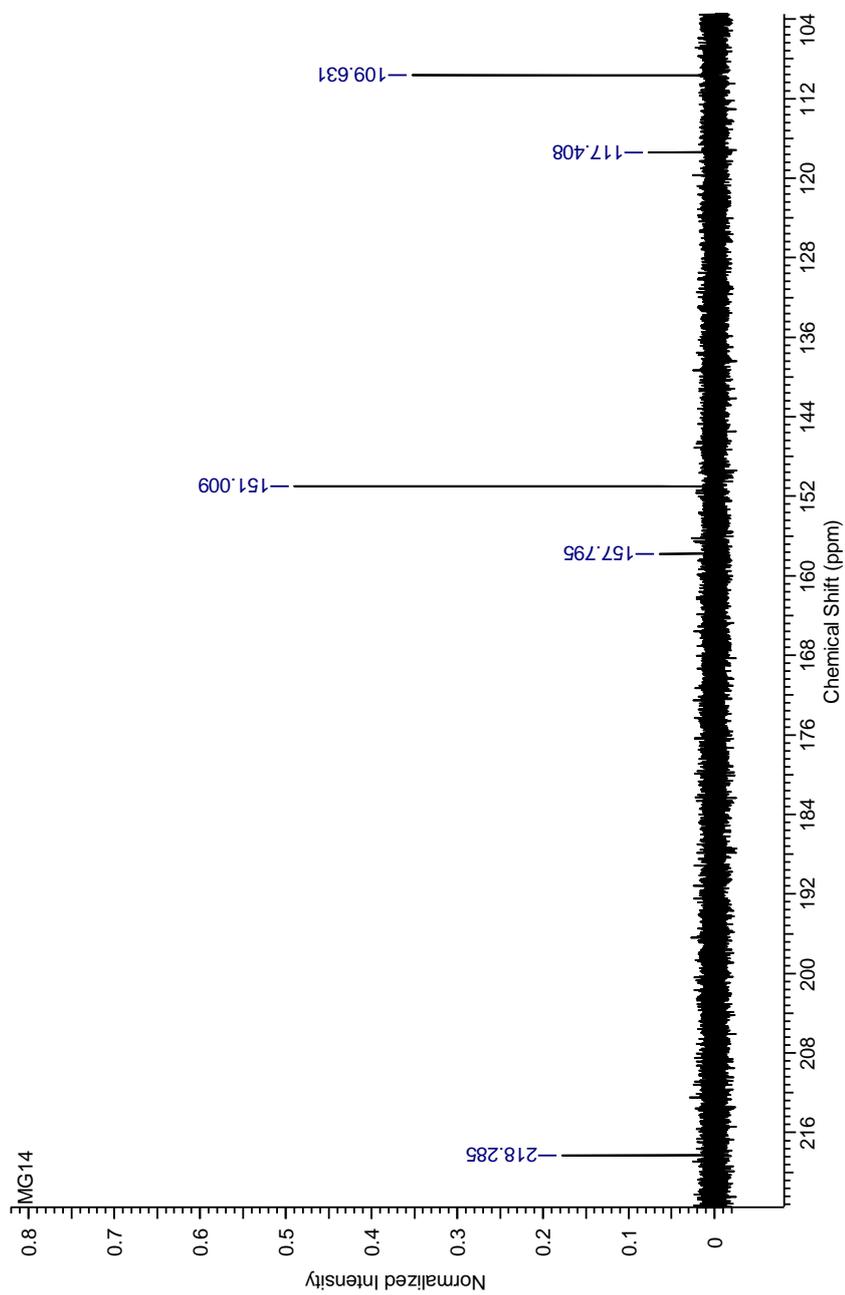


Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de lupen-3-ona e taraxerona.

4.2.2 Identificação da substância 3

A fração 4b mostrou-se um sólido amorfo com elevado grau de pureza quando purificada por HPLC.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 22 e 23) apresentou sinais de metilas na região entre 0,7 e 1,4 ppm, o que indica sinais característicos de triterpenos. Na região de hidrogênios de carbonos olefínicos, observaram os sinais em δ_{H} 5,30 (1H, *t*, $J = 4,0$ Hz) e δ_{H} 2,82 (1H, *dd*, $J = 14,0$ and $4,0$ Hz) característicos de triterpeno do esqueleto oleanano.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) mostrou sinais de carbonos olefínicos em δ_{C} 122,8 e δ_{C} 143,7 característicos de C-12 e C-13, respectivamente, do triterpeno com esqueleto oleanano. Após, observou-se a um sinal em δ_{C} 173,9 inferindo a presença de carboxila (C-28) e outro sinal em δ_{C} 80,4, característico de carbono carbinólico (Tabela 26).

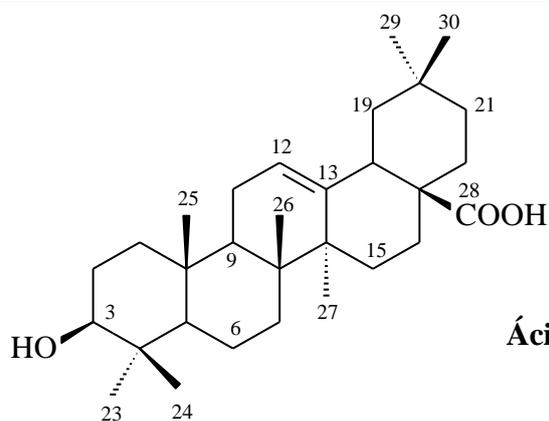
No espectro de DEPT (Figura 25) observaram-se sinais intensos de CH_3 e CH e principalmente sinais de CH_2 em δ_{C} 46,0; 38,4; 34,6; 34,5; 32,1; 27,9 27,7; 23,6; 23,7; 18,1. Quando estes sinais foram comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU 1994; GOHARI et al., 2009) permitiu a identificação do ácido oleanólico (3).

Os dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram comparados com dados da literatura de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) (GOHARI et al., 2009).

Este triterpeno está sendo descrito pela primeira vez em Olacaceae.

Tabela 26: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do ácido oleanólico em comparação com a literatura

Posição	δ_{C} (GOHARI et al., 2009)	δ_{C} (MAHATO & KUNDU, 1994)	δ_{C} Observado	Carbono
1	39,0	38,5	38,4	CH ₂
2	28,2	27,4	27,7	CH ₂
3	78,1	78,7	80,4	CH
4	39,4	38,7	38,2	C
5	55,8	55,2	55,6	CH
6	18,8	18,3	18,1	CH ₂
7	33,3	32,6	32,1	CH ₂
8	39,8	39,3	39,5	C
9	48,2	47,6	47,7	CH
10	37,4	37,0	37,9	C
11	23,7	23,1	23,7	CH ₂
12	122,6	122,1	122,8	CH
13	144,8	143,4	143,8	C
14	42,2	41,6	41,9	C
15	28,4	27,7	27,9	CH ₂
16	23,8	23,4	23,6	CH ₂
17	46,7	46,6	46,7	C
18	42,0	41,3	41,3	CH
19	46,5	45,8	46,0	CH ₂
20	31,0	30,6	30,9	C
21	34,3	33,8	34,6	CH ₂
22	33,2	32,3	34,5	CH ₂
23	28,8	28,1	28,2	CH ₃
24	16,6	15,6	16,9	CH ₃
25	15,6	15,3	15,6	CH ₃
26	17,5	16,8	17,0	CH ₃
27	26,2	26,0	26,1	CH ₃
28	180,2	173,9	173,9	C
29	33,3	33,1	33,2	CH ₃
30	23,8	23,6	23,8	CH ₃



3
Ácido oleanólico

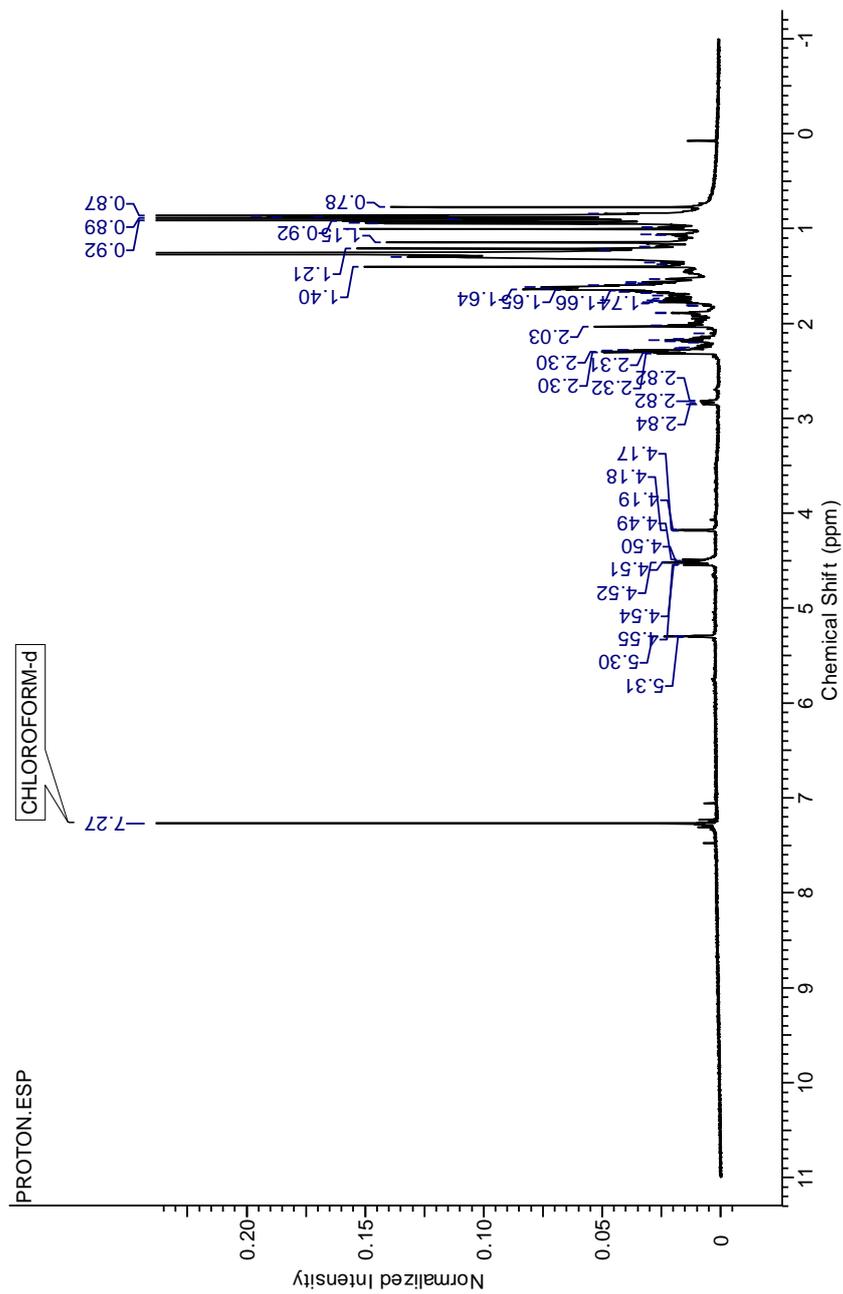


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do ácido oleonóico

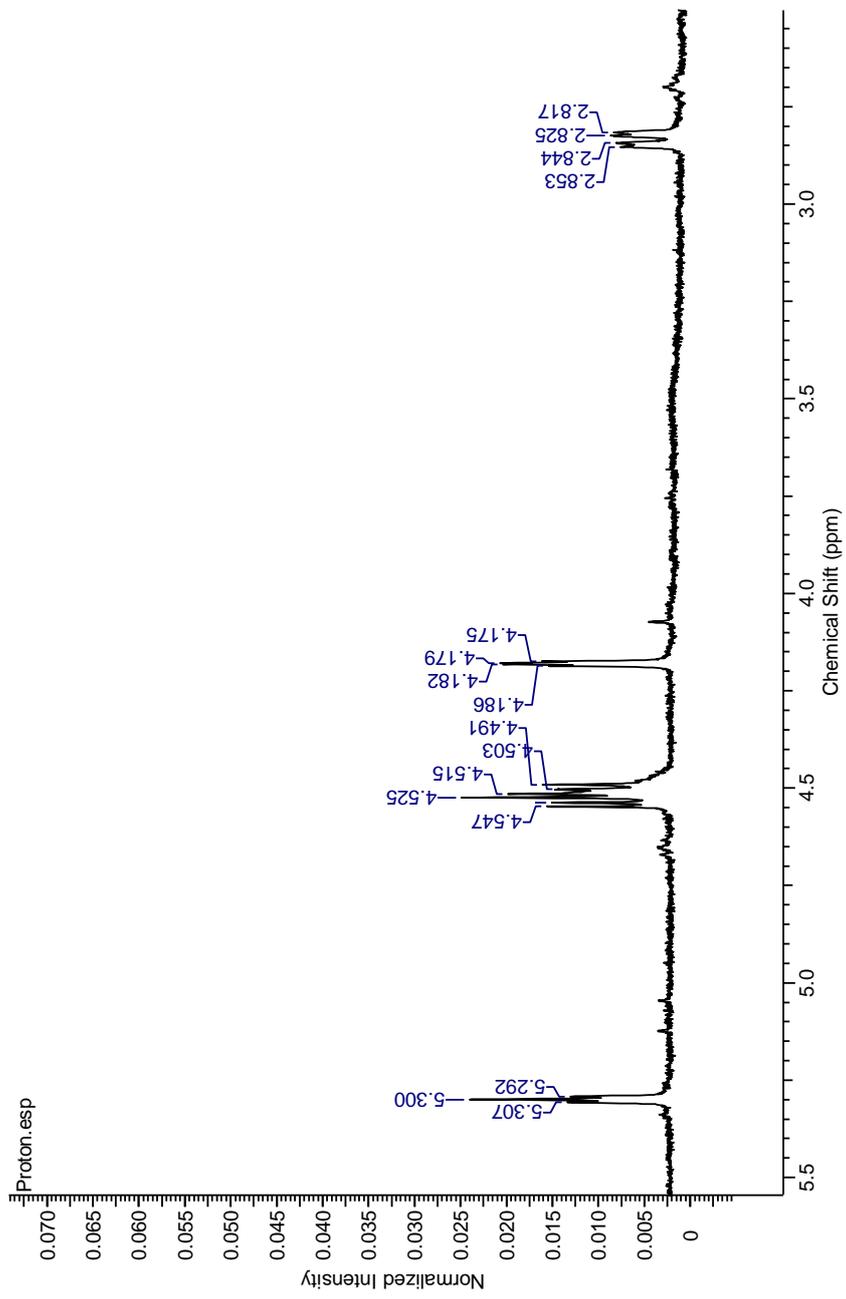


Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ¹H do ácido oleonólico.

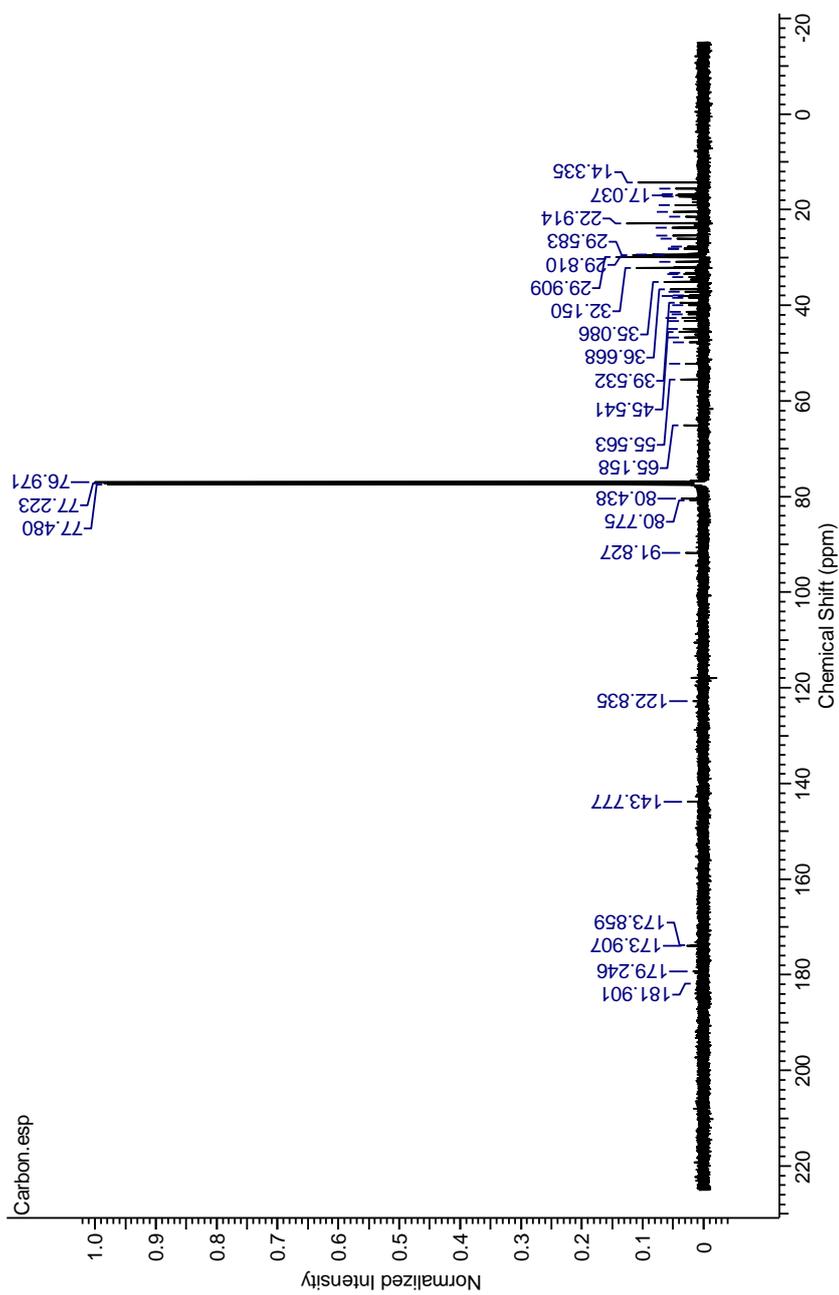


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido oleonólico.

4.2.3 Identificação da substância 4

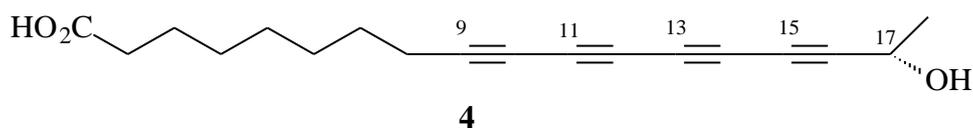
Após alguns fracionamentos, a fração 9A, obtida do extrato diclorometânico das folhas, mostrou-se purificada quando analisada por RMN de ^1H e de ^{13}C . Esta apresentou cor lilás quando revelada com anisaldeído sulfúrico.

Primeiramente observou-se, no espectro de RMN de ^1H (Figuras 26 e 27), um quarteto em $\delta_{\text{H}} 4,59$ ($J = 6,5$ Hz), referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbonílico. Em $\delta_{\text{H}} 2,36$ um tripleto ($J = 7,5$ Hz) referente ao hidrogênio ligado ao carbono vizinho ao grupo carboxila e em $\delta_{\text{H}} 2,31$ observou-se outro tripleto ($J = 7,0$ Hz) (Tabela 27).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28) verificaram-se sinais em $\delta_{\text{C}} 178,8$ e $\delta_{\text{C}} 79,2$ correspondentes a carbonos quaternários e em $\delta_{\text{C}} 59,1$ a carbono CH e em $\delta_{\text{C}} 33,1$ a carbono CH_2 ligado ao grupo carboxila (Tabela 28).

O espectro de COSY (Figura 29) mostrou acoplamento de $\delta_{\text{H}} 4,59$ com $\delta_{\text{H}} 1,48$; $\delta_{\text{H}} 2,36$ com $1,64$; $\delta_{\text{H}} 2,31$ com $1,54$ e acoplamento de $\delta_{\text{H}} 1,64$ com $1,35$. Os mapas de contorno de HSQC e HMBC também foram analisados. No mapa de contorno de HSQC (Figura 30) foram observados acoplamentos entre $\delta_{\text{C}} 19,5$ e $\delta_{\text{H}} 2,31$; $\delta_{\text{C}} 24,0$ e $\delta_{\text{H}} 1,48$; $\delta_{\text{C}} 29,2$ e $\delta_{\text{H}} 1,34$ e entre $\delta_{\text{C}} 33,1$ e $\delta_{\text{H}} 2,36$. Para o mapa de contorno HMBC (Figura 31) são observadas as correlações entre $\delta_{\text{C}} 178,8$ e $\delta_{\text{H}} 2,36$ (2J); $\delta_{\text{C}} 80,5$ e $\delta_{\text{H}} 2,31$ (2J); $\delta_{\text{C}} 79,2$ e $\delta_{\text{H}} 1,48$ (3J); $\delta_{\text{C}} 66,3$ e $\delta_{\text{H}} 2,31$ (3J); $\delta_{\text{C}} 59,1$ e $\delta_{\text{H}} 1,48$ (2J); $\delta_{\text{C}} 28,2$ e $\delta_{\text{H}} 2,31$ (2J) e o acoplamento entre $\delta_{\text{C}} 24,8$ e $\delta_{\text{H}} 2,36$ (2J).

No espectro de íons totais (Figura 32) é possível observar o íon em m/z 267 u.m.a. como o mais abundante. Este íon é referente ao produto de desidratação $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ da molécula protonada cuja m/z em 285 u.m.a. é discretamente observada no espectro de massas. A fragmentação deste íon gera ainda perdas de CO e H_2O quando submetido à sucessivas fragmentações. A perda de água (18 u.m.a.) na fonte está de acordo com o comportamento esperado para moléculas hidroxiladas, sensíveis à aplicação de temperatura, quando analisadas em fonte APCI, como uma consequência do processo de dessolvatação. Com base nestes dados, propõe-se a massa molecular de 284 u.m.a. para a substância em questão. A coerência dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C com os obtidos dos espectros de massas permitiu confirmar a estrutura do ácido minquartinoico (ácido 17-hidroxi-octadec-9,11,13,15-inoico), e confirmados pela comparação com dados da literatura (MARLES et al., 1989). Vale ressaltar que este poliacetileno foi obtido de uma fração ativa contra o fungo *Cryptococcus gattii*, podendo ser o responsável pela atividade antifúngica do extrato.



Ácido minquartinóico

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (500 MHz, em CDCl_3) do poliacetileno

H	δ_{H}	Multiplicidade	^1H - ^1H -COSY
2	2,36	<i>t</i> , $J = 7,5$	1,64 H-3
3	1,64	<i>qt</i> , $J = 7,5$	2,36 H-2
4	1,34	<i>M</i>	1,64 H-3
6	1,40	<i>M</i>	1,54 H-7 e 2,34
7	1,54	<i>qt</i> , $J = 7,5$	1,40 H-6 e 2,31 H-8
8	2,31	<i>t</i> , $J = 7,0$	1,54 H-7
17	4,59	<i>q</i> , $J = 6,5$	1,48 H-18
18	1,48	<i>d</i> , $J = 6,5$	4,59 H17

Constantes de acoplamento (J em Hz)

Tabela 28. Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz, em CDCl_3) e HMBC do poliacetileno

Posição	δ_{c}	HSQC	C	HMBC
1	178,8	-	C	2,36 (2J)
2	33,5	2,36	CH_2	-
3	24,8	1,64	CH_2	2,36 (3J)
4	28,8	1,34	CH_2	1,34 e 2,36 (3J)
5	-	1,40	CH_2	-
6	29,4	1,26	CH_2	-
7	28,0	1,54	CH_2	2,31 H-8 (2J)
8	19,5	2,31	CH_2	-
9	80,5	-	C	2,31 H-8 (2J)
10	66,3	-	C	2,31 H-8 (3J)
11	63,4	-	C	2,31
12	-	-	C	-
13	-	-	C	-
14	-	-	C	-
15	-	-	C	-
16	79,2	-	C	1,48 H-18 (3J)
17	59,1	-	CH	1,48 H-18 (2J)
18	24,0	1,48	CH_3	-

O poliacetileno, ácido minquartinóico, foi descrito em *Minquartia guianensis* (MARLES et al., 1989) e também em mais duas espécies da família Olacaceae, *Coula edulis*

(FORT et al., 2000) e *Ochanostachys amentaceae* (RASHID et al., 2001). Este foi ativo contra malária, leishmaniose (RASMUSSEN et al., 2000) e o vírus HIV (RASHID et al., 2001).

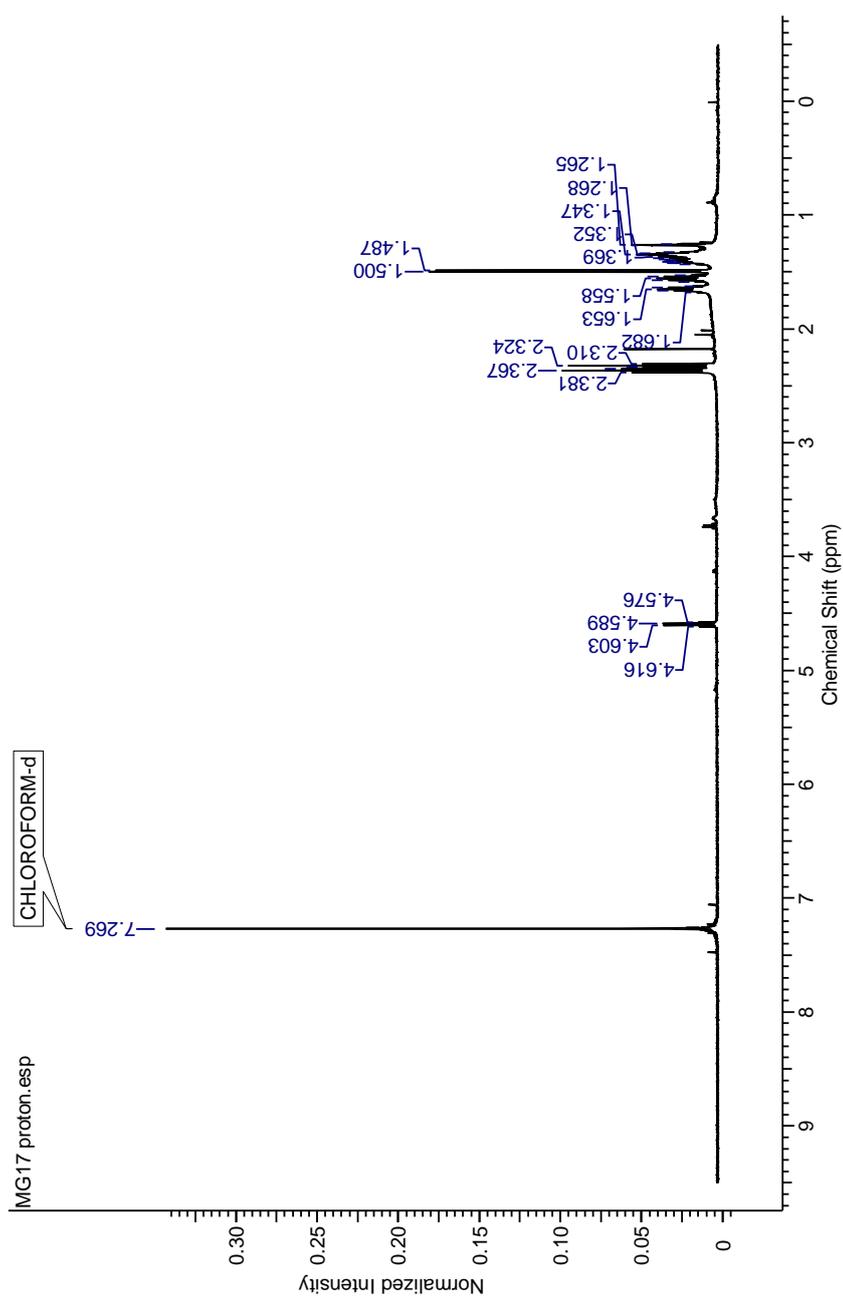


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do poliacetileno.

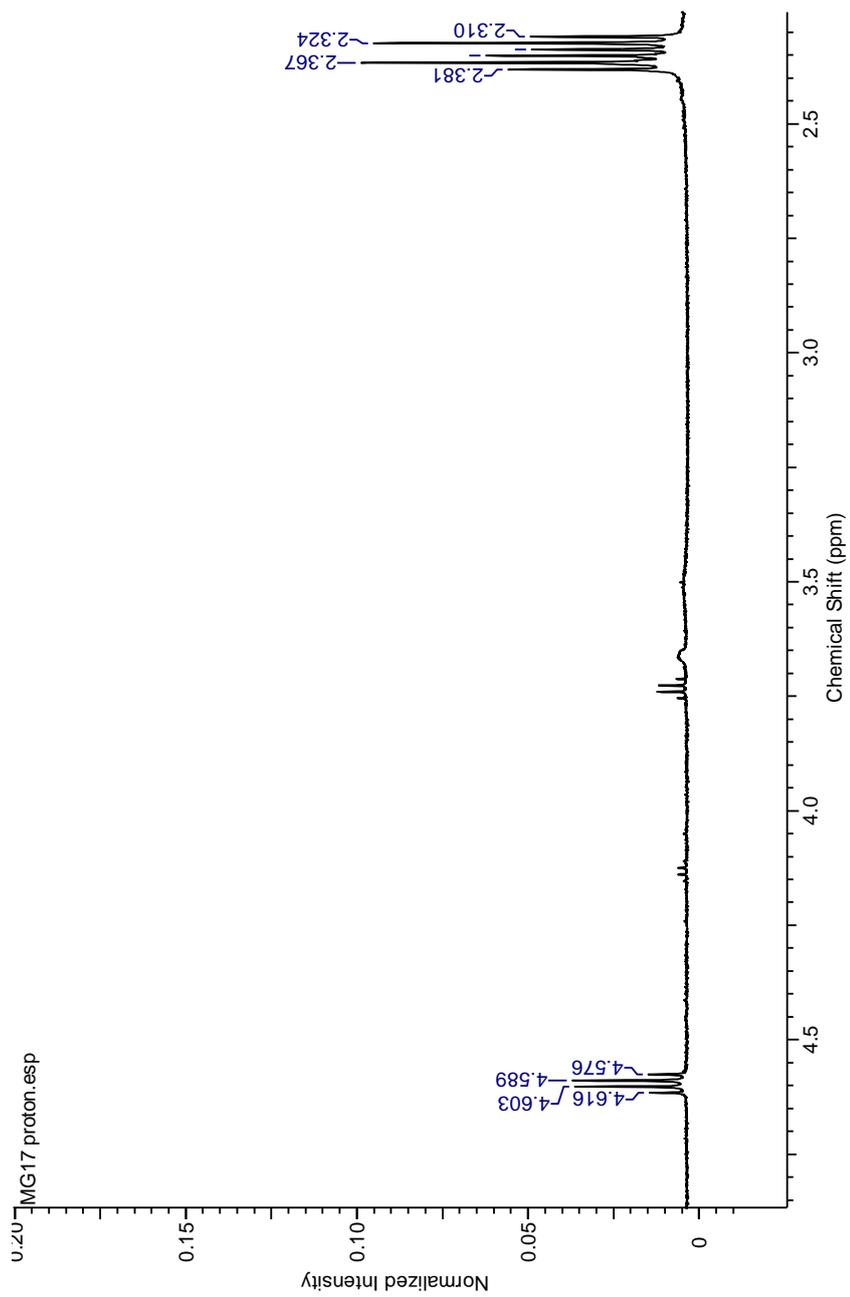


Figura 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H do poliacetileno.

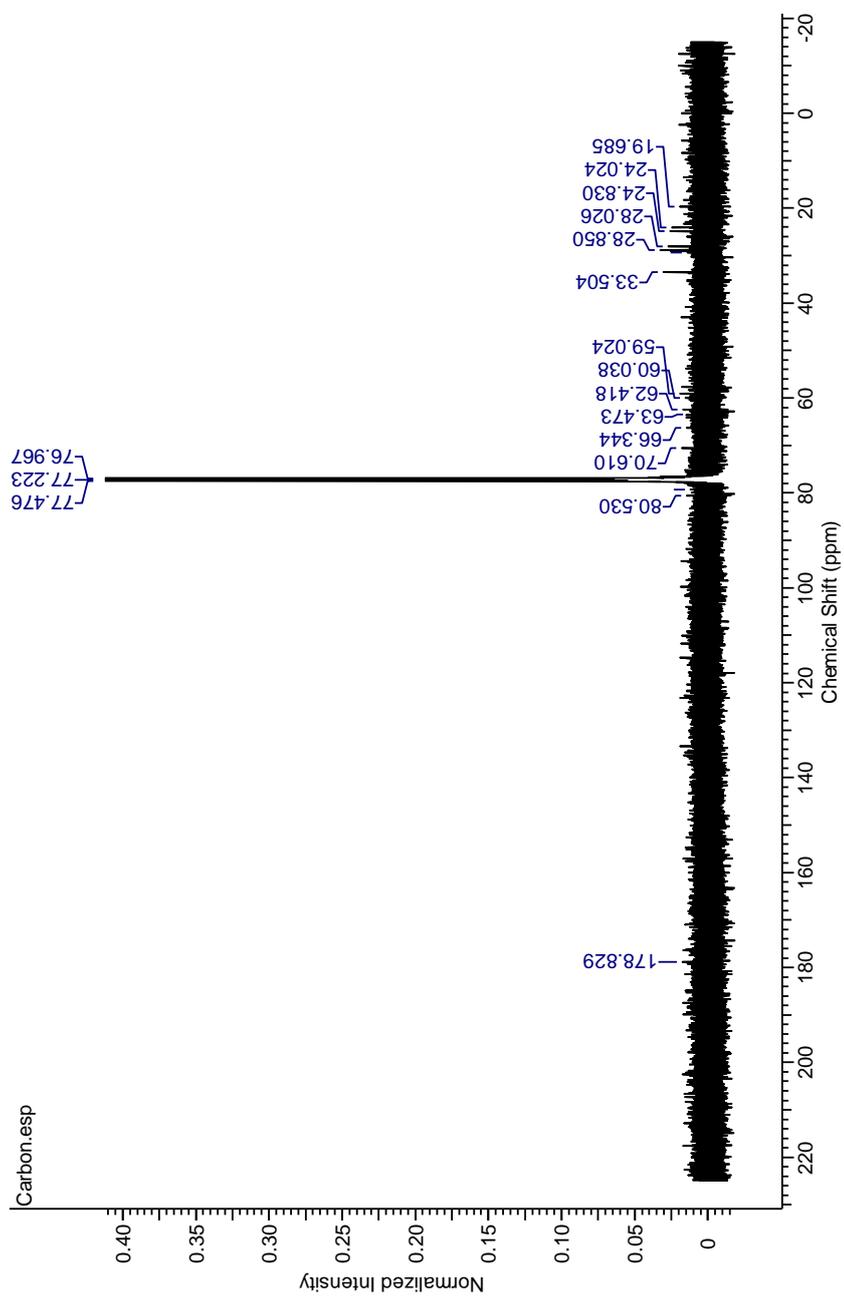


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do poliacetileno.

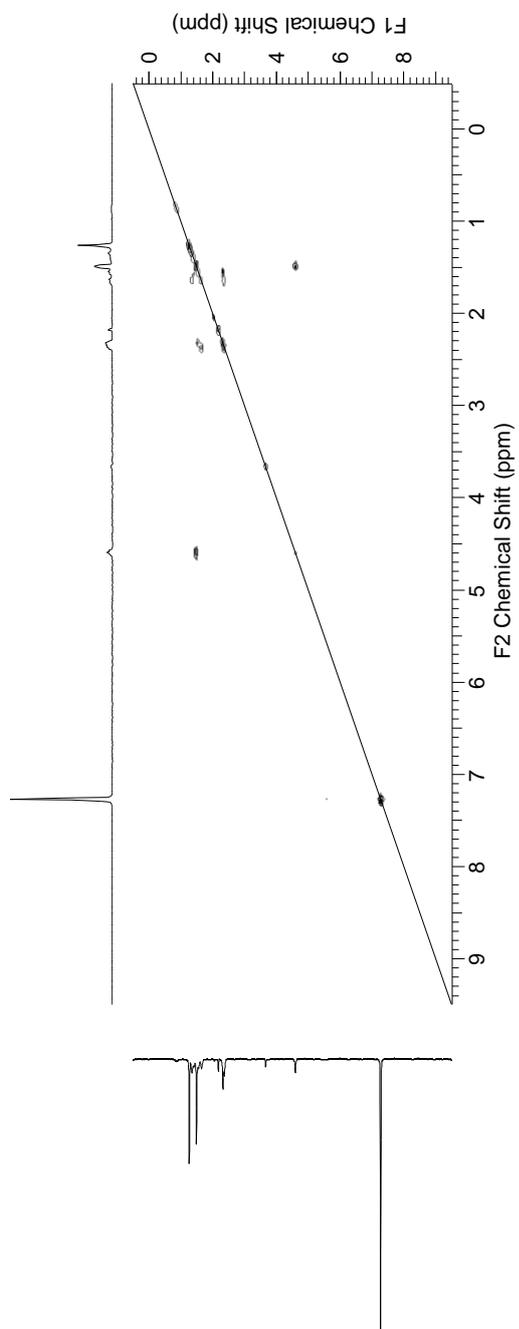


Figura 29. Espectro de COSY do poliacetileno.

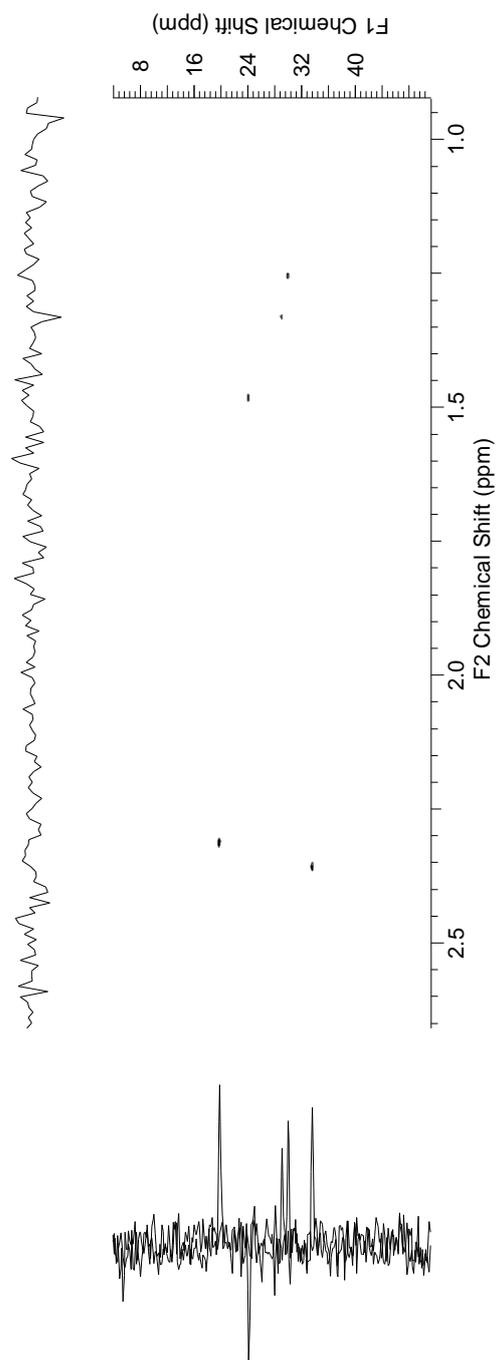


Figura 30. Mapa de contorno de HSQC do poliacetileno.

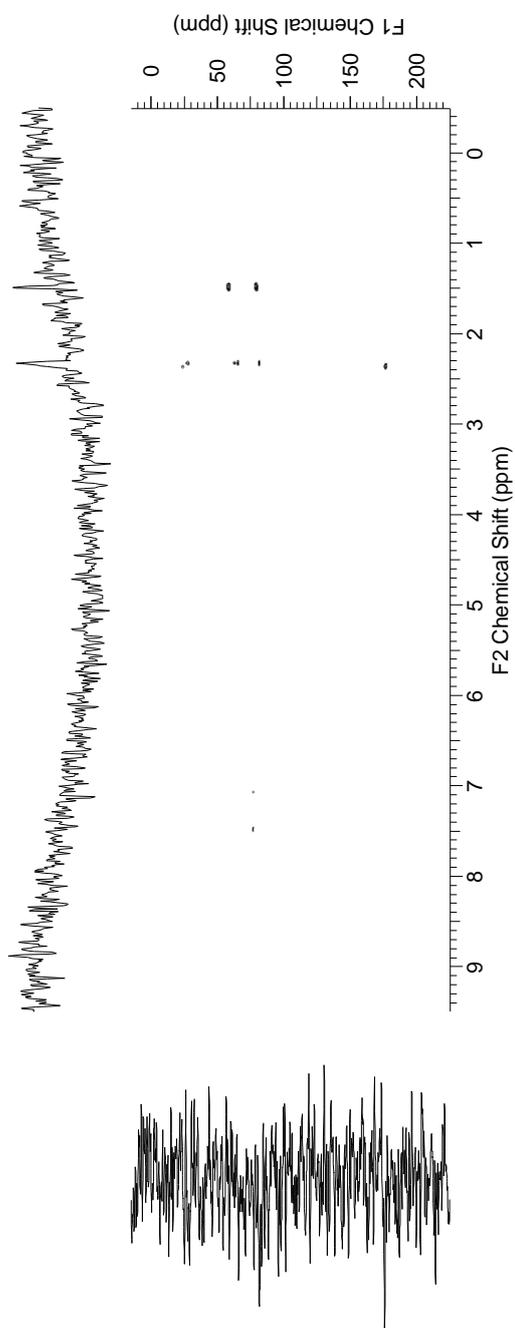


Figura 31. Mapa de contorno de HMBC do poliacetileno.

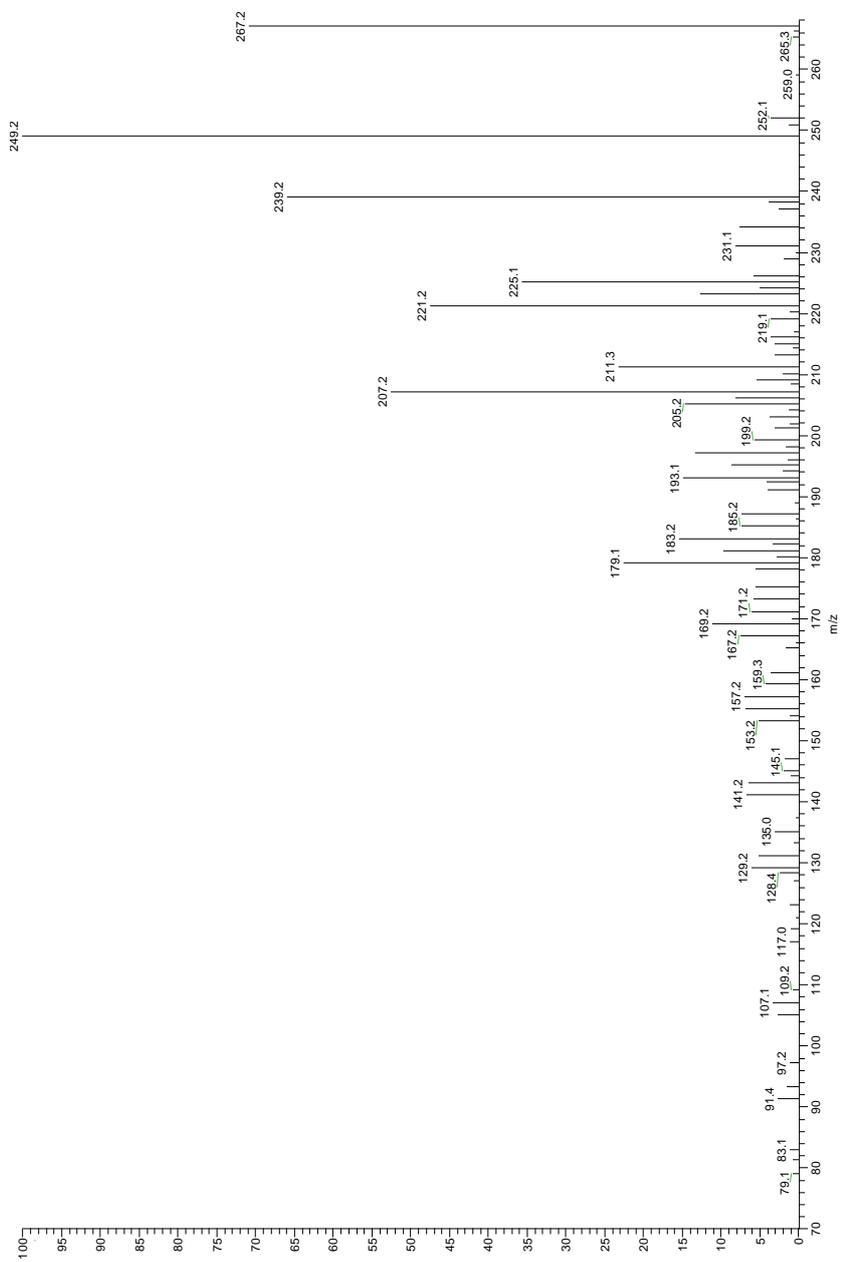


Figura 32. Espectro de massas do poliacetileno.

4.2.4 Identificação da substância 5

A substância 5 foi obtida do extrato diclorometânico dos galhos e mostrou coloração lilás quando revelada com anisaldeído sulfúrico por CCD.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 33 e 34) mostrou a presença de um *d* em δ_{H} 4,69 ($J = 2,0$ Hz) e um *dd* em δ_{H} 4,57 ($J = 2,0$ e 1,0 Hz) referentes aos hidrogênios olefínicos, apresentado características de triterpeno com esqueleto lupano. Foram observados sinais em δ_{H} 3,35 (3H, *s*) referente ao hidrogênio do grupo metoxila ligado ao C-3 e em δ_{H} 2,63 (1H, *dd*, $J = 12,0$ e 4,0 Hz) a presença do hidrogênio pertencente ao C-3.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35 e 36) verificaram-se sinais em δ_{C} 150,9 e em δ_{C} 109,2 característicos de carbonos com ligação dupla terminal, pertencentes aos carbonos olefínicos C-20 e C-29 de triterpenos do tipo lupano (MAHATO & KUNDU, 1994). Outros sinais foram observados em δ_{C} 88,9 referentes ao carbono carbinólico e em δ_{C} 57,5 referente ao carbono do grupo metoxila. Os demais deslocamentos químicos dos outros carbonos estão apresentados na Tabela 29.

No mapa de contorno de HSQC (Figura 37) observam-se os seguintes acoplamentos: δ_{C} 109,2 (C-29) e δ_{H} 4,57 (H-29); δ_{C} 109,2 (C-29) e δ_{H} 4,69 (H-29); δ_{C} 88,7 (C-3) e δ_{H} 2,64 (H-3) e também se verificou o acoplamento de δ_{C} 57,5 (C-31) e δ_{H} 3,35 (H-31). Para o mapa de contorno HMBC (Figura 38) são observados acoplamentos entre δ_{C} 88,7 e δ_{H} 3,35 (3J); δ_{C} 48,3 e δ_{H} 4,69(4J); δ_{C} 19,3 e δ_{H} 4,69(3J) e o acoplamento entre δ_{C} 48,3 e δ_{H} 4,57(3J).

Todos estes deslocamentos de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) foram comparados com dados da literatura de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) (MAHATO & KUNDU et al., 1994; CURSINO et al., 2009).

Tabela 29: Dados de RMN de ^{13}C para 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno

Posição	δ_{C} do lupeol (MAHATO & KUNDU, 1994)	δ_{C} do lupeol (CURSINO et al., 2009)	δ_{C} Observado	Carbono
1	38,7	38,7	40,0	CH ₂
2	27,4	27,5	25,2	CH ₂
3	78,9	79,0	88,7	CH
4	38,8	38,9	38,0	C
5	55,3	55,3	55,9	CH
6	18,3	18,3	20,9	CH ₂
7	34,2	34,3	34,3	CH ₂
8	40,8	40,9	38,6	C
9	50,4	50,5	50,5	CH
10	37,1	37,2	37,2	C
11	20,9	20,9	22,3	CH ₂
12	25,1	25,2	29,4	CH ₂
13	38,0	38,1	38,8	CH
14	42,8	42,8	42,8	C
15	27,4	27,4	27,4	CH ₂
16	35,5	35,6	35,6	CH ₂
17	43,0	43,0	43,0	C
18	48,0	48,3	48,0	CH
19	47,9	47,9	48,3	CH
20	150,9	150,9	150,9	C
21	29,8	29,9	31,9	CH ₂
22	40,0	40,0	40,9	CH ₂
23	28,0	28,0	28,0	CH ₃
24	15,4	15,3	16,0	CH ₃
25	16,1	16,1	16,1	CH ₃
26	15,9	15,9	16,1	CH ₃
27	14,5	14,5	14,5	CH ₃
28	18,0	18,0	18,0	CH ₃
29	109,3	109,3	109,3	CH ₂
30	19,3	19,3	19,3	CH ₃
31	-	-	57,5	OCH ₃

Como o triterpeno mais comum com este esqueleto é o lupeol, foi realizado um cálculo para confirmar os deslocamentos químicos afetados pelo grupo metoxila presente no carbono 3. De acordo com efeitos α , β e γ , primeiramente subtraiu-se os valores tirando a OH, depois foram somados os valores para calcular a MeO- (Tabela 30). Estes resultados foram comparados com a literatura (SILVERSTEIN et al., 2005) e permitiu a identificação do

triterpeno 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno (4). Este é o primeiro relato deste triterpeno em Olacaceae.

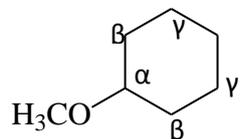
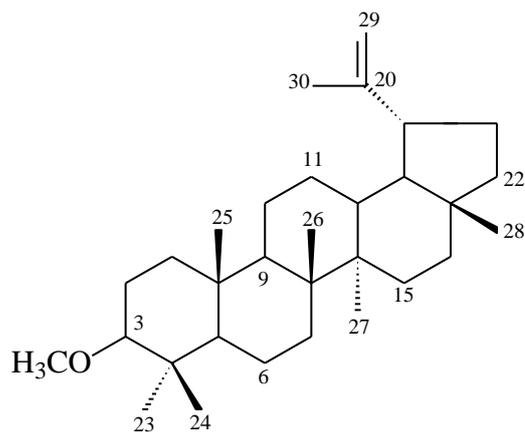


Tabela 30. Efeitos α , β e γ calculados a partir do lupeol

	Lupeol (Lit. 1)	Efeito - OH	Calculado (lupano)	Efeito + OMe	Calculado(3-β- metóxi-lup-20(29)- eno)
1	38,7	+5	43,7	-4	39,7
2	27,4	-8	19,4	+5	24,4
3	79,9	-41	38,9	+51	89,9
4	38,8	-8	30,8	+5	35,8
5	55,3	+5	60,3	-4	56,3



5

3- β -metóxi-lup-20(29)-eno

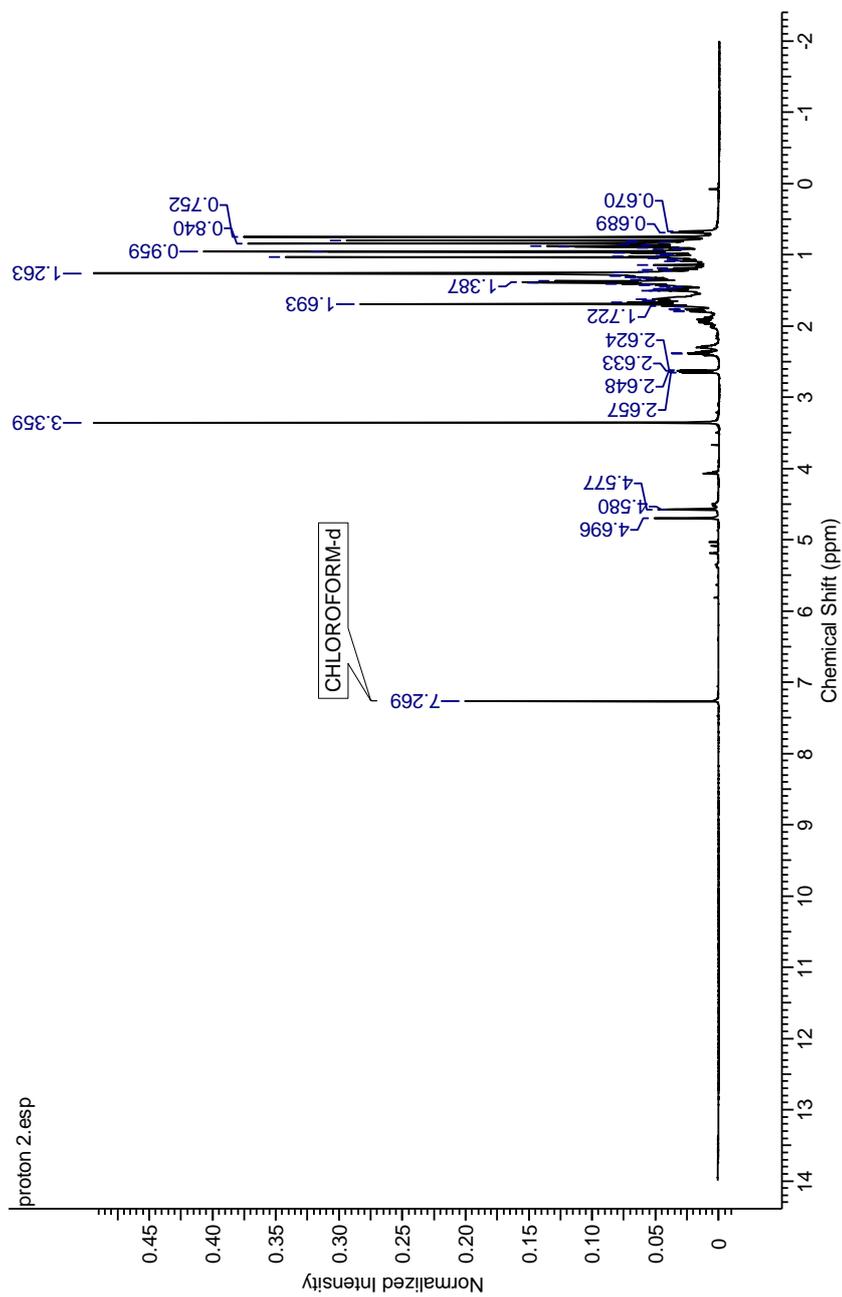


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno.

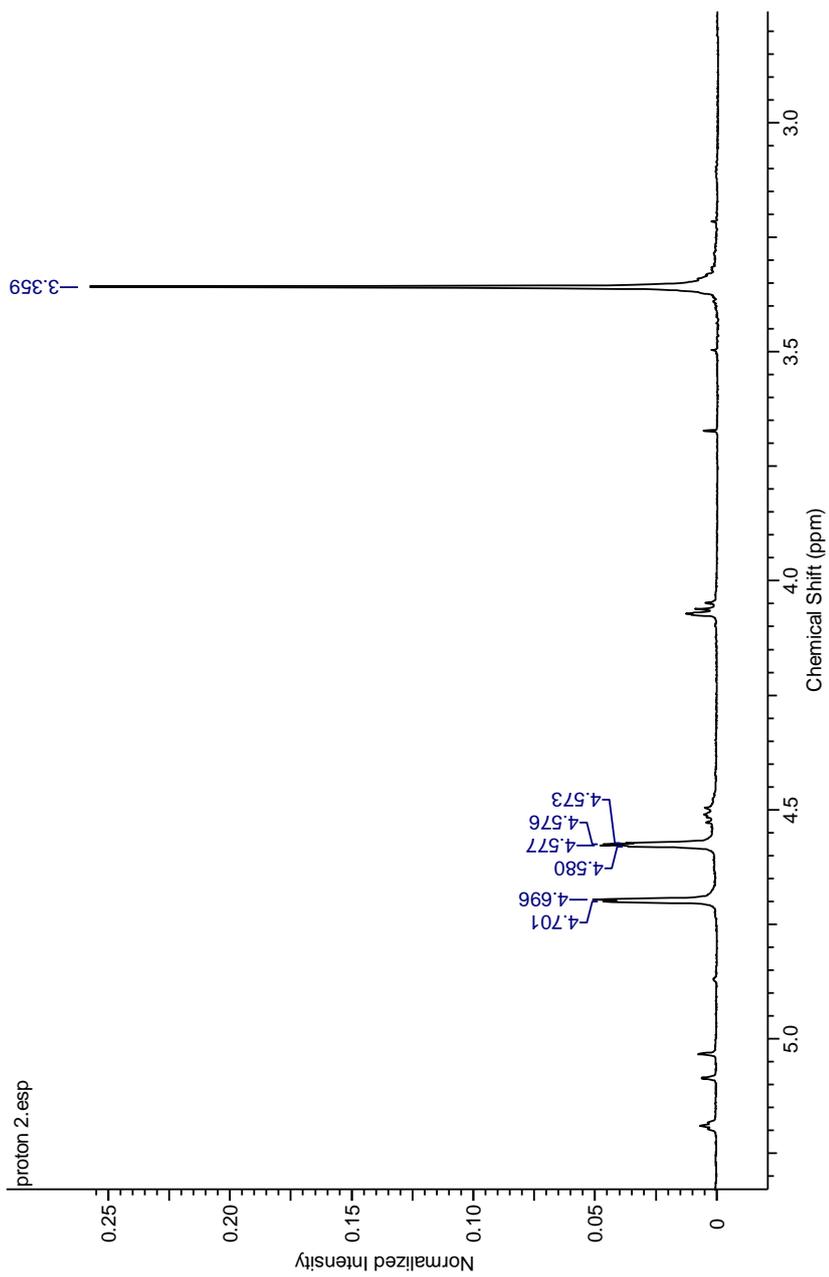


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H do 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno.

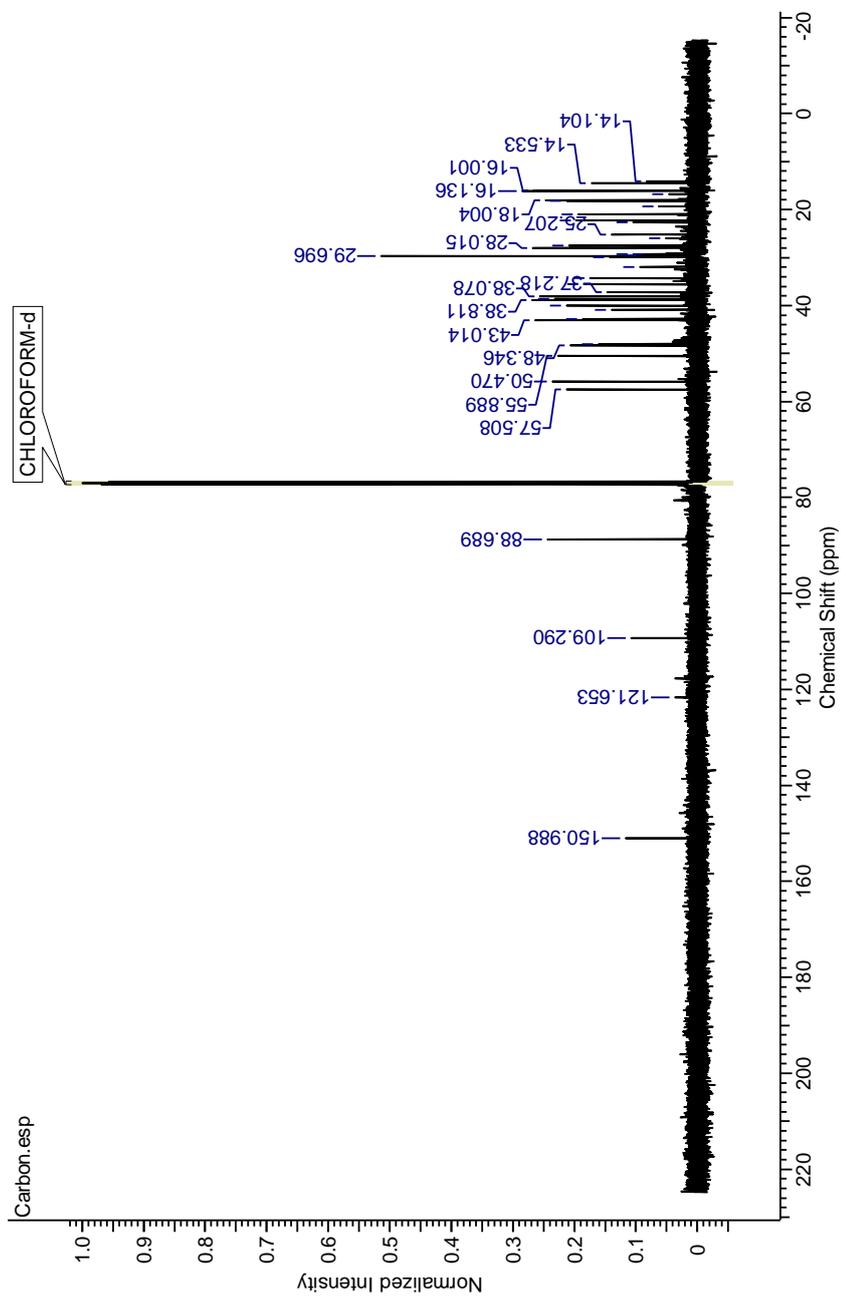


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno.

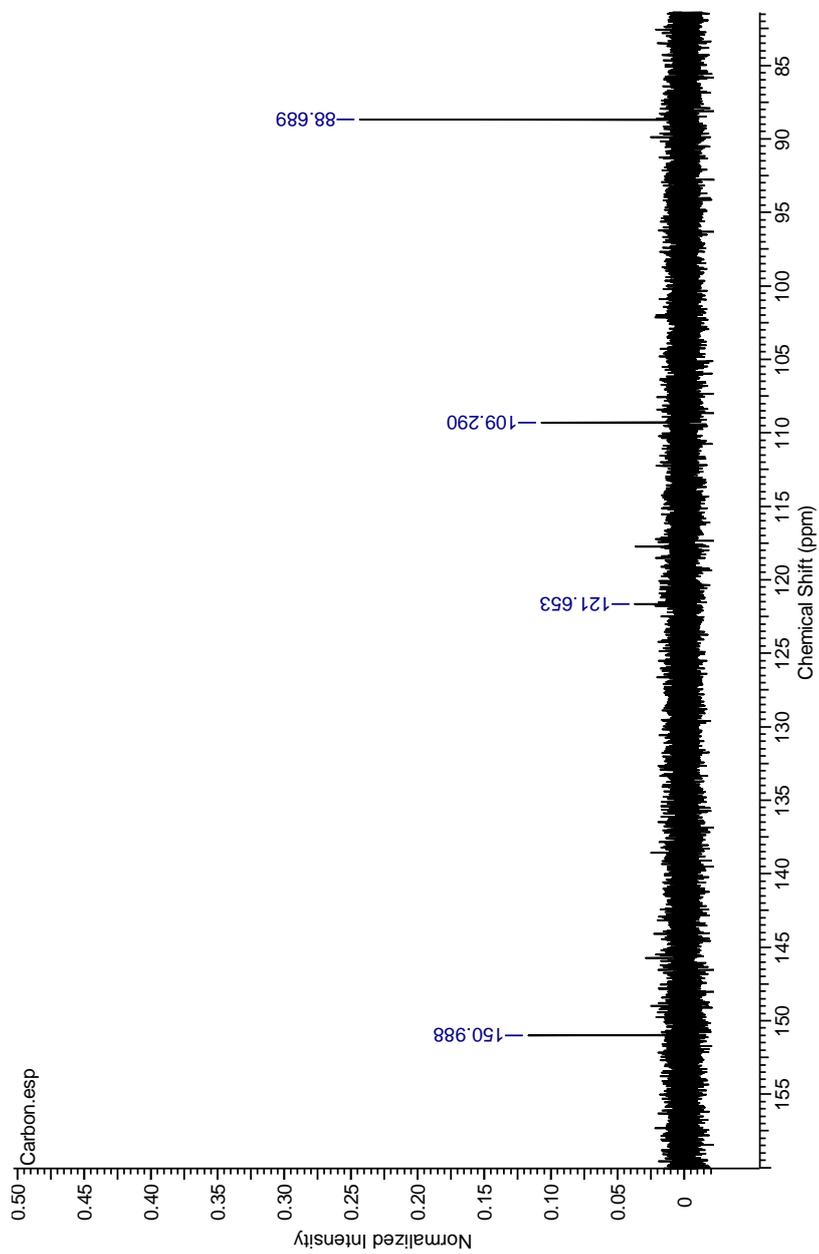


Figura 36. Expansão do espectro de ^{13}C de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno.

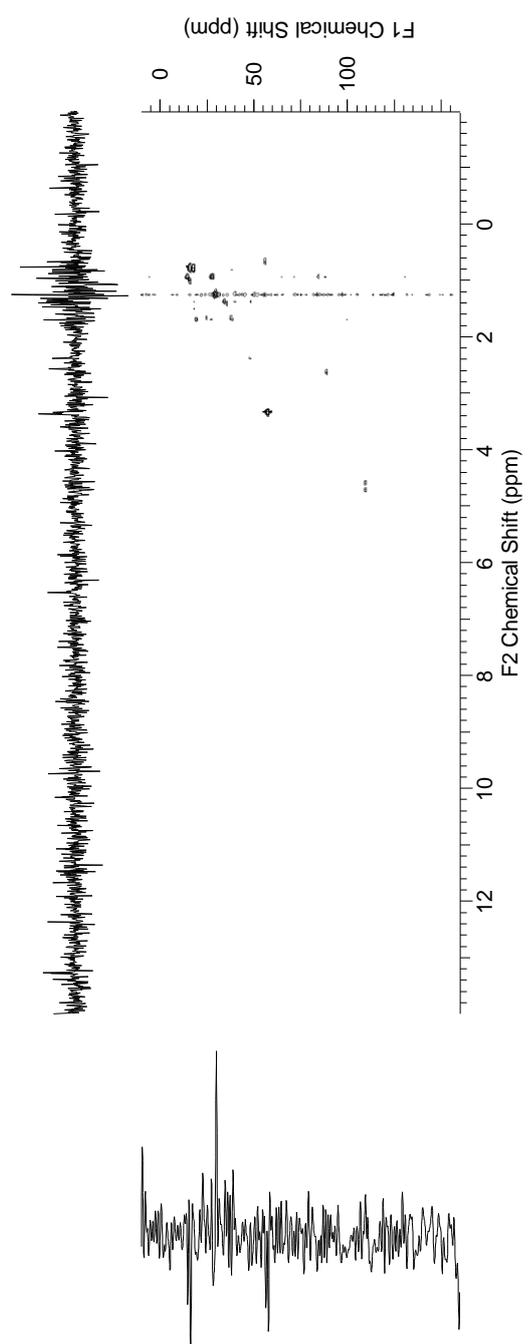


Figura 37. Mapa de contorno HSQC de 3-β-metóxi-lup-20(29)-eno

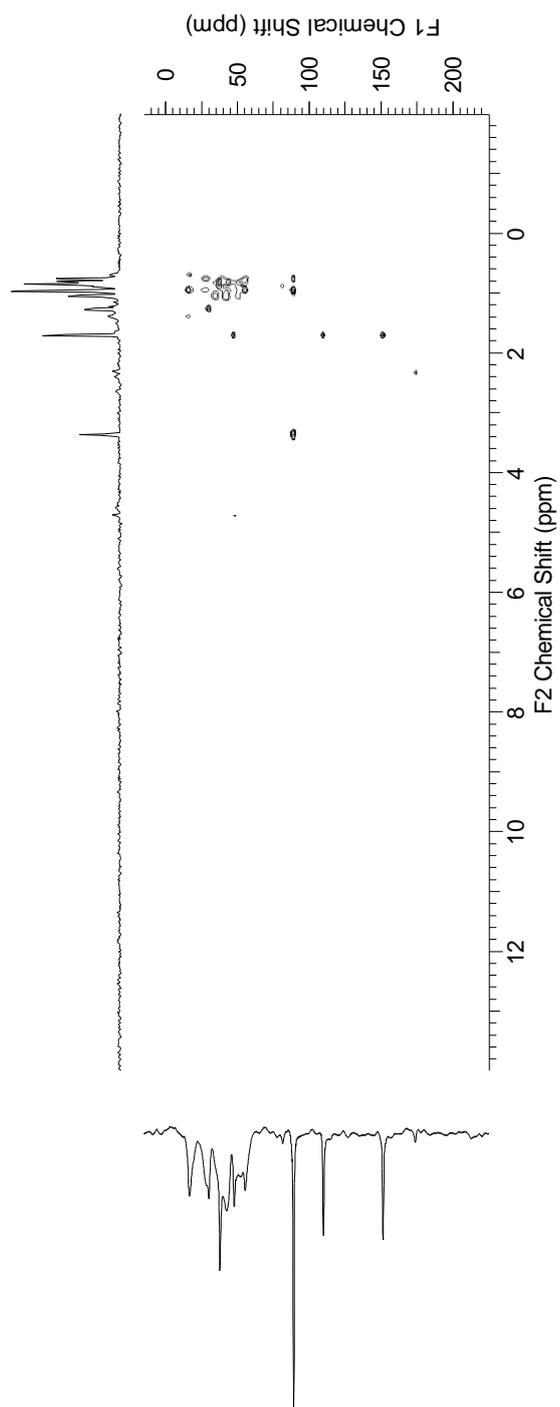


Figura 38. Expansão do mapa de contorno HMBC de 3- β -metóxi-lup-20(29)-eno.

4.3 Resultado do fracionamento do extrato metanólico

Após os fracionamentos realizados não foi possível chegar à identificação de substâncias puras do extrato metanólico das folhas.

4.4 Atividade antifúngica

4.4.1 Bioautografia frente à *Cryptococcus gattii* (R265)

Dentre as frações (Item 4.4) analisadas dos extratos diclorometânico e metanólico das folhas e diclorometânico dos galhos da primeira coleta e extrato metanólico das folhas da segunda coleta, cinco frações foram ativas, sendo uma obtida do extrato diclorometânico das folhas, duas do extrato metanólico das folhas da primeira coleta e duas do extrato metanólico das folhas da segunda coleta. O extrato diclorometânico dos galhos foi o único que não apresentou frações ativas.

4.4.1.1 Extrato diclorometânico das folhas da primeira coleta

Para este extrato foram selecionadas cinco frações. A fração ativa foi obtida da primeira coluna, denominada de 63-66, cuja fração foi submetida ao fracionamento e foi possível isolar o poliacetileno ácido minquartinóico. Foi realizada análise por CCD desta substância com eluente AcOEt/MeOH 7:3, apresentando Rf de 0,74. A bioautografia da fração antes de ser purificada foi analisada com o eluente: AcOEt/MeOH 7:3 e o Rf do composto ativo foi 0,72 (Figura 39). Esta substância com este Rf indica que pode se tratar da mesma substância, por terem Rfs similares, inferindo que a substância ativa pode se tratar do poliacetileno.

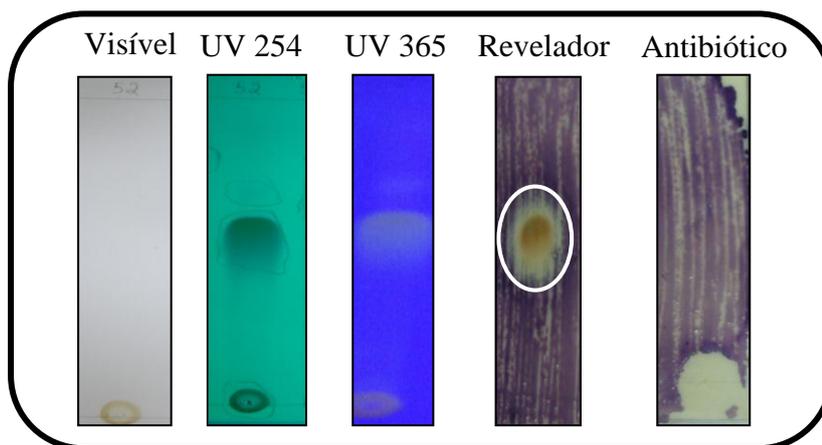


Figura 39. Fotos da bioautografia da fraça 63-66

4.4.1.2 Extrato metanólico das folhas da primeira coleta

Foram testadas 12 frações, dentre estas duas frações foram ativas: uma proveniente da primeira coluna realizada denominada de 9-12 e a outra obtida de outra coluna denominada de 28-30. A bioautografia da fração 9-12 foi realizada com eluente MeOH/H₂O 1:1 e o R_f do composto ativo foi igual a 0 (Figura 40), a fração 28-30 foi analisada com eluente AcOEt/MeOH 6:4 e o R_f do composto ativo foi igual a 0,73 (Figura 41).

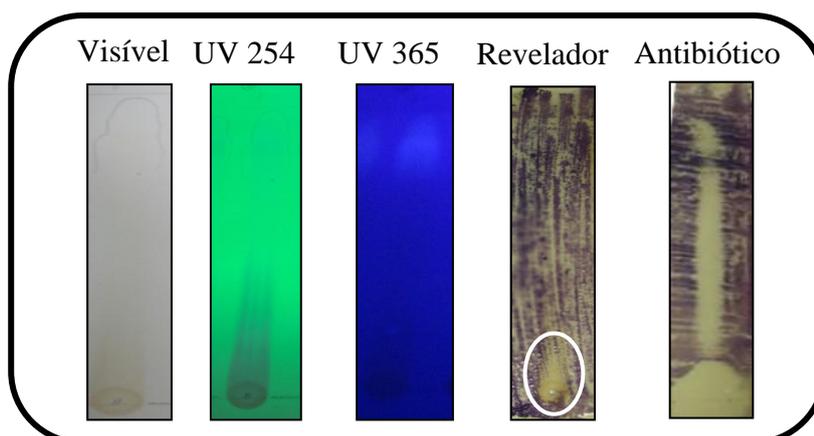


Figura 40. Fotos da bioautografia da fração 9-12

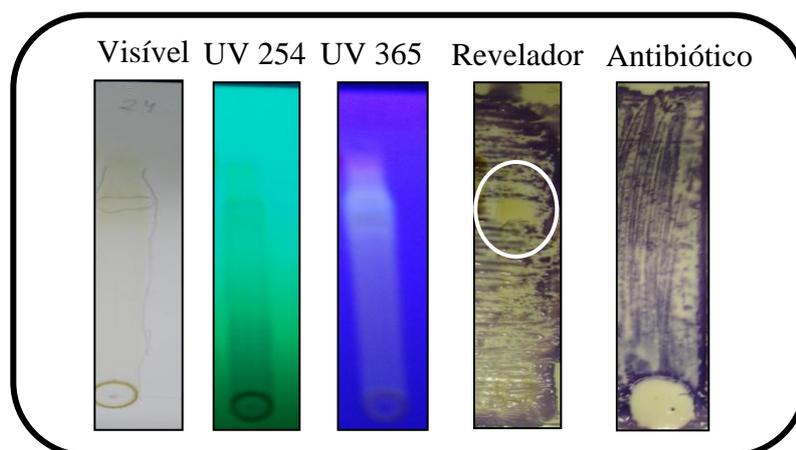


Figura 41. Fotos da bioautografia da fração 28-30

4.4.1.3 Extrato metanólico das folhas da segunda coleta

As frações ativas deste extrato foram: 15.1.C (Fase DCM) e 15.3.B (Fase MeOH/H₂O), obtidas da partição líquido-líquido realizada. A placa da fração 15.1C obtida foi realizada com o eluente AcOEt/MeOH 8:2 e obteve-se um R_f do composto ativo igual a 0,69 (Figura 42). A outra placa da fração 15.3.B foi realizada com o eluente MeOH/H₂O 1:1 (Figura 43).

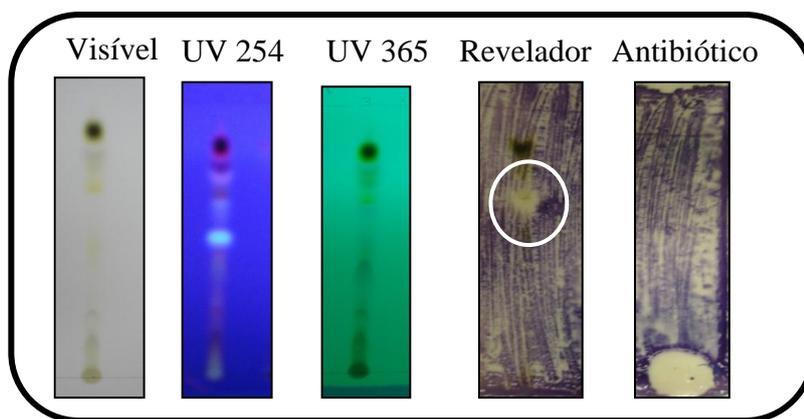


Figura 42. Fotos da bioautografia da fração 15.1C

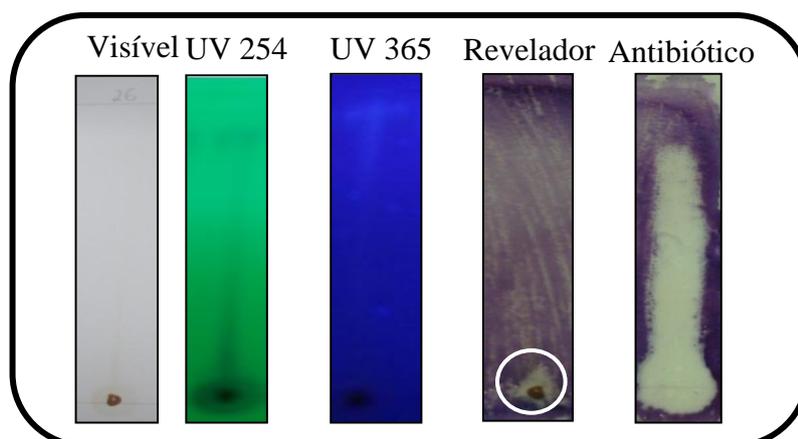


Figura 43. Fotos da bioautografia da fração 15.3B

Dentre as substâncias identificadas neste trabalho, as que foram testadas foram as substâncias lupen-3-ona (1), taraxerona (2) e 3- β -metóxi-lup-20-(29)-eno (4), todas foram inativas.

4.4.1.4 Extrato diclorometânico dos galhos

Dentre as quatro frações testadas do extrato diclorometânico dos galhos, nenhuma foi ativa contra *Cryptococcus gatti*.

4.5 Atividade antibacteriana

O extrato é considerado ativo quando apresenta um halo de inibição maior que 13 mm (VIEIRA et al., 2010). Entre 6 e 12 mm é considerado com atividade mediana; entre 2 e 5 mm é considerado com baixa atividade, e quando apresentar halo menor que 1 mm é considerado sem atividade.

A análise da atividade antibacteriana foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu em comparar as duas cepas de *Aeromonas hydrophila*. A segunda etapa consistiu em realizar os ensaios frente às bactérias: *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens*.

4.5.1 Método de difusão em ágar

4.5.1.1 *Aeromonas hydrophila*

Os resultados dos extratos da primeira e da segunda coleta da análise frente às duas cepas de *Aeromonas hydrophila* (cepa B32 e cepa Tipo – ATCC 7966) estão exibidos na Tabela 31.

Tabela 31. Halos de inibição dos extratos frente às duas cepas de *A. hydrophila*

		Extratos	
1 ^a coleta		<i>Aeromonas hydrophila</i> (B32)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Tipo)
Folhas	DCM	NA	NA
	MeOH	11 mm	5 mm
	H ₂ O	11 mm	4 mm
Galhos	DCM	8 mm	NA
	MeOH	14 mm	5 mm
	H ₂ O	11 mm	5 mm
2 ^a coleta			
Folhas	DCM	10 mm	NA
	MeOH	13 mm	6 mm
Galhos	DCM	NA	NA
	MeOH	NA	7 mm

NA = Não ativo

A maioria dos extratos da primeira coleta apresentou atividade frente às duas cepas testadas, porém sendo maior atividade frente à cepa B32. Observa-se que o extrato DCM das folhas foi inativo sobre as duas cepas e que o extrato DCM dos galhos tinha sido ativo apenas para a cepa B32, mas apresentou-se inativo para a linhagem Tipo.

Avaliando os extratos da segunda coleta frente às duas cepas de *A. hydrophila* observa-se que o extrato DCM dos galhos foi inativo para as duas cepas, enquanto o extrato DCM das folhas foi ativo apenas para a cepa B32 e o extrato MeOH dos galhos foi ativo apenas para a linhagem Tipo.

As diferenças dos resultados obtidos para as duas cepas justificam a necessidade de se conhecer a origem da bactéria e ter sua identificação correta.

4.5.1.2 *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *P. aeruginosa*

De acordo com a análise antibacteriana, os extratos da primeira coleta que mostraram alta atividade foram os extratos MeOH das folhas, MeOH e H₂O dos galhos frente a *Edwardsiella tarda*. Os extratos DCM das folhas e galhos não apresentaram atividade para nenhuma das bactérias testadas e os extratos H₂O dos galhos mostraram média atividade frente à *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 32).

Tabela 32. Halos de inibição dos extratos da 1ª coleta frente às bactérias testadas

	Folhas			Galhos			
	DCM	MeOH	H ₂ O	DCM	MeOH	H ₂ O	CP
<i>Edwardsiella tarda</i>	NA	14	2	NA	17	15	24
		14	2		17	15	24
		14	2		17	15	24
<i>Escherichia coli</i>	NA	3	NA	NA	2	6	19
		3			2	6	19
		3			2	6	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	5	NA	NA	6	6	9
		5			6	6	9
		5			6	6	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NA	NA	1	NA	2	3	20
			1		2	3	17
			1		2	3	19

CP: Controle positivo; NA: Não ativo

Os extratos da segunda coleta mostraram-se menos ativos que os da primeira coleta, pois apenas os extratos MeOH das folhas foram ativos frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e o extrato MeOH dos galhos frente a *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (Tabela 33).

Tabela 33. Halos de inibição dos extratos da 2ª coleta frente às bactérias testadas

	Folhas		Galhos		
	DCM	MeOH	DCM	MeOH	CP
<i>Edwardsiella tarda</i>	NA	NA	NA	NA	24 24 24
<i>Escherichia coli</i>	NA	3 3 3	NA	3 3 3	19 19 19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	5 5 5	NA	7 7 7	9 9 9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NA	NA	NA	5 5 5	20 17 19

CP: Controle positivo; NA: Não ativo

4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos da primeira coleta mostraram-se promissores. Os extratos MeOH e H₂O tanto das folhas quanto dos galhos apresentaram, respectivamente, CIM de 62,5 e 250 µg/mL contra *Edwardsiella tarda* e também o extrato MeOH dos galhos mostrou CIM de 250 µg/mL contra *Aeromonas hydrophila*. Os outros apresentaram CIM de 500 µg/mL ou maiores que 1 mg/mL contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 34).

Tabela 34. CIM dos extratos da 1ª coleta

	Folhas			Galhos			
	DCM	MeOH	H ₂ O	DCM	MeOH	H ₂ O	CP
<i>Edwardsiella tarda</i>	500 µg/mL	62,5 µg/mL	250 µg/mL	> 1 mg/mL	62,5 µg/mL	250 µg/mL	< 0,97 µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	500 µg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	500 µg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	1,95 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500 µg/mL	500 µg/mL	> 1 mg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	> 1 mg/mL	31,25 µg/mL
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	> 1 mg/mL	250 µg/mL	1 mg/mL	< 0,97 µg/mL

Os extratos da segunda coleta também se mostraram promissores. O extrato DCM das folhas apresentou CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ e os extratos MeOH das folhas e galhos apresentaram CIM de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra *Edwardsiella tarda*. Outro extrato que mostrou CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi o extrato MeOH dos galhos contra *Aeromonas hydrophila*. Os outros extratos apresentaram CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$ ou maiores que 1 mg/mL contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* (Tabela 35).

Tabela 35: CIM dos extratos da 2ª coleta

	Folhas		Galhos		
	DCM	MeOH	DCM	MeOH	CP
<i>Edwardsiella tarda</i>	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	> 1 mg/mL	125 $\mu\text{g/mL}$	< 0,97 $\mu\text{g/mL}$
<i>Escherichia coli</i>	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	500 $\mu\text{g/mL}$	1,95 $\mu\text{g/mL}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	500 $\mu\text{g/mL}$	31,25 $\mu\text{g/mL}$
<i>Aeromonas hydrophila</i>	> 1 mg/mL	1 mg/mL	> 1 mg/mL	250 $\mu\text{g/mL}$	< 0,97 $\mu\text{g/mL}$

Além dos extratos também foi testado o poliacetileno (substância 4) obtido do extrato diclorometânico das folhas. Este apresentou CIM de 45,5 $\mu\text{g/mL}$ e concentração bactericida mínima (CMB) > 91 $\mu\text{g/mL}$ contra *Aeromonas hydrophila*. Este resultado mostra que a substância isolada é mais ativa que o extrato, pois este apresentou CIM de 1 mg/mL .

4.5.3 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A CMB foi considerada a menor concentração de extrato que não houve crescimento sobre a superfície do meio de cultura. Com isso, foi observado que os extratos que apresentaram CMB foram os MeOH das folhas e dos galhos da segunda coleta com CMB de 250 µg/mL e o extrato H₂O dos galhos da primeira coleta com CMB de 250 µg/mL contra *Edwardsiella tarda*. Os extratos MeOH e H₂O das folhas da primeira coleta apresentaram CMB de 1 mg/mL contra *Aeromonas hydrophila*. Estes extratos que apresentaram CMB indicam que os mesmos possuem atividade bactericida, ou seja, possuem capacidade de matar a bactéria.

5. CONCLUSÕES

- ✓ O estudo fitoquímico de *Minquartia guianensis* resultou no isolamento de um poliacetileno e quatro triterpenos.
- ✓ O extrato MeOH das folhas e galhos da primeira coleta apresentaram atividade antibacteriana com a menor concentração inibitória mínima (CIM) contra *Edwardsiella tarda* (CIM de 62,5 µg/mL).
- ✓ O poliacetileno obtido do extrato diclorometânico das folhas testado contra *Aeromonas hydrophila* obteve um CIM de 45,5 µg/mL e CMB > 91 µg/mL.
- ✓ Quanto à atividade antifúngica, pode-se afirmar que as frações dos extratos testados foram ativas, com exceção das frações do extrato DCM dos galhos.
- ✓ A fração, da qual foi isolado o poliacetileno, foi ativa contra *Cryptococcus gattii* o que significa que este pode ser o responsável pela atividade do extrato.
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento da atividade biológica e principalmente para o conhecimento da composição química de *Minquartia guianensis*. Vale ressaltar que os triterpenos taraxerona, ácido oleanólico e 3-β-metóxi-lup-20-(29)-eno estão sendo descritos pela primeira vez em Olacaceae e o poliacetileno isolado ainda não tinha sido testado contra *Aeromonas hydrophila*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.;T. YAMAUCHI. Megastigmanes and flavonoids from the leaves of *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochemistry*, 33: 1499-1501. 1993.

ALBERNAZ, L.C.; PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; SPINDOLA, L.S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 116-121. 2010.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 517-524. 2006.

ARAÚJO, M.R.S.; ASSUNCAO, J.C.C.; DANTAS, I.N.F.; COSTA-LOTUFO, L V.; MONTE, F. J.Q. Chemical constituents of *Ximenia americana*. *Natural Product Communications*, 3: 857-860. 2008.

AZEVEDO, L.G.; CURSINO, L.M.C.; LANDELL, M.F.; NUNEZ, C.V.; VAINSTEIN, M.H.; FERREIRA, H.B. Evaluación de las actividades anti-fúngica y anti-helmíntica de los extractos de las hojas e ramas de *Minuartia guianensis*. XIX SILAE Congress “Fernando Cabieses Molina”, p. 258, ISBN: 88-8160-218-0, 2010.

BADAMI, R.C. & PATIL, K.B. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Progress in Lipid Research*, 19: 119-153. 1981.

BESSA, T.; TERRONES, M.G.H.; SANTOS, D Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. *Horizonte Científico*, 1: 1-17, 2007.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C.R.; CAPELLA, M.A.M. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer letters*, 248: 147-152, 2007.

BROCHINI, C.B.; NUNEZ, C.V.; MOREIRA, I.C.; ROQUE, N.F.; CHAVES, M.H.; MARTINS, D. *Química Nova*, 22: 37-49. 1998.

CAMARGO, J.L.C.; FERRAZ, I.D.K. Acariquara-roxa, *Minuartia guianensis* Aubl. *Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia*, 10. 2005.

COLOMBO, R.; BATISTA, A. N. D; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REIMBERG, M. C. H. Validated high-performance liquid chromatographic method for the standardisation of *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, commercial extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20,: 781-788. 2010.

COSTA, A. B. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Março de 2003. 68. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R.

Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 111-117. 2000.

CURSINO, L. M. C.; NUNEZ, C. V.; GONÇALVES, J. B. Estudo químico das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), visando substâncias antioxidantes. Anais da XV Jornada de Iniciação científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA, 409-410, 2006.

CURSINO, L. M. C.; BRENNER, M. M.; PEREIRA, E. C. L.; SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, J. A. A.; PEREIRA Jr., O. L.; NUNEZ, C. V. Estudo químico dos extratos diclorometânico e metanólico das folhas e dos galhos de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), visando substâncias antioxidantes, citotóxicas e/ou antifúngicas. Anais da XVII Jornada de Iniciação científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA, 407-408, 2008.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA Jr, O. L. P.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amazonica*, 39: 181-186. 2009.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, P.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYNS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16: 1425-1430. 2008.

DIRSCH, V.; W. WIEMANN; WAGNER, H. Antiinflammatory activity of triterpene quinone-methides and proanthocyanidins from the stem bark of *Heisteria pallida* Engl. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 2: 184-186. 1992.

DIRSCH, V., A. NESZMELYI, A.; WAGNER, H. A trimeric Propelargonidin from stem bark of *Heisteria pallida*. *Phytochemistry*, 34: 291-293. 1993.

EL-SEEDI, H. R.; HAZELL, A. C.; TORSSEL, K. B. G. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minuartia guianensis*, *Phytochemistry*, 35: 1297-1299. 1994.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711-713. 1998.

EL-SEEDI, H. R.; GOHIL, S.; PERERA, P.; TORSSELL, K. B. G.; BOHLIN, L. Cyclopeptide alkaloids from *Heisteria nitida*. *Phytochemistry*. 52: 1739-1744. 1999.

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

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*, 48: 1872-1874. 2000a.

FILHO, V. C. & YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. *Química Nova*, 21: 99-105. 1997.

FATOPE, M. O., ADOUM, O. A.; TAKEDA, Y. Oleanene palmitate from *Ximenia Americana*. *Pharmaceutical Biology*, 38: 391-393. 2000b.

FORGACS, P. & PROVOST, J. Olaxoside, a saponin from *Olax andronensis*, *Olax glabriflora* and *Olax psittacorum*. *Phytochemistry*, 20: 1689-1691. 1981.

FORT, D. M.; KING S. R.; CARLSON, T. J.; NELSON, S. T. Miquartynoic acid from *Coula edulis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 489-490. 2000.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megatamica*. *Química Nova*, 32: 407-411. 2009.

GOHARI, A. R.; SAEIDNIA, S.; HADJIAKHOONDI, A.; ABDOULLANI, M.; NEZAFATI, M. Isolation and quantitative analysis of oleanolic acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey. *Journal of Medicinal Plants*, 8: 65-69. 2009.

GOVINDACHARI, T. R. & N. VISWANATHAN. Alkaloids of *Mappia foetida*. *Phytochemistry*, 11: 3529-3531. 1972.

GUNSTONE, F. D. & SEALY, A. J. The acetylenic acids of isano (Boleko) Oil. *Fatty acids, Part XII. Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 5772-5778. 1963.

HARON, N. W.; PING, S. T. Distribution and taxonomic significance of flavonoids in the Olacaceae and Icacinaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25: 263-265. 1997.

HATT, N. H.; TRIFFETT, A. C. K.; WAILES, P. C. Acetylenic acids from fats of the Olacaceae and Santalaceae IV: The occurrence of octadeca-trans-11,trans-13-dien-9-ynoic acid in plant lipids. *Australian Journal of Chemistry*, 13: 488. 1960.

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*, 22: 135-139. 2005.

JERZ, G.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Cyclohexanoid protoflavanones from the stem-bark and roots of *Ongokea gore*. *Phytochemistry*, 66: 1698-1706. 2005.

KETOVER, B. P.; YOUNG, L. S.; ARMSTRONG, D. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: Clinical and immunologic aspects. *The journal of Infectious Diseases*, 127: 284-290. 1973.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARLETT, K. H.; FYEE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A. Rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 17258-17263. 2004.

KRAUS, C. M.; NESZME'LYI, A.; HOLLY, S.; WIEDEMANN, B.; NENNINGER, A.; TORSSELL, K. B. G.; BOHLIN, L.; WAGNER, H.. New Acetylenes Isolated from the Bark of *Heisteria acuminata*. *Journal of Natural Products*, 61: 422-427. 1998.

LIGTHELM, S. P.; SCHWARTZ, H. M.; HOLDT, M. M. The chemistry of ximenynic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1088-1093. 1952.

LITVINTSEVA, A. P.; THAKUR, R.; RELLER, L. B.; MITCHELL, T. G. Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *Journal Infectious Diseases*, 192: 888-892. 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C.; Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II, second ed., Instituto Pantarum, Nova Odessa, 2008.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25: 429-438. 2002.

MAGRO, A.; CAROLINO, M.; BASTOS, M.; MEXIA, A. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 23: 176-178. 2006.

MAHATO, S. B. e KUNDU, A. P. ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*, 37: 1517-1575. 1994.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R.; NEILL, D. A.; Isolation of a novel cytotoxic polyacetylene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minqartia guianensis*. *Journal of Natural Products*, 52: 261-266. 1989.

MARQUI, S. R.; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova*, 31: 828-831. 2008.

MATHABE, M. C.; HUSSEIN, A. A.; NIKOLOVA, R. V.; BASSON, A. E.; MEYER, J. J. M.; LALL, N. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys Africana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 194-197. 2008.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse

skin inflammation induced by phorbol Ester 120-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, 559: 227-235. 2007.

MOBOT: <http://www.tropicos.org/Image/100116126>, acessado em fevereiro 2012.

MOBOT: <http://www.tropicos.org/NameDistributions.aspx?nameid=22900119>, acessado em fevereiro 2012.

MOBOT:<http://www.tropicos.org/Name/40020129?tab=subordinatetaxa>, acessado em fevereiro de 2012.

MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MONACHE, F. D.; CARVALHO, J. L. S. Chemical compounds and antimicrobial activity of *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Visao Academica*. 6: 48-52. 2005.

MORENA, M. L.; VAN, R.; SINGH, K.; BRIAN, M.; MURRAY, B. E. Diarrhea associated with *Aeromonas* species in children in Day Care Center. *Journal of Infectious Diseases*, 168: 215-8. 1993.

MORGAN, J.; MCCARTHY, K. M.; GOULD, S.; FAN, K.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N.; STAMEY, K.; HAJJEH, R. A.; BRANDT, M. E. *Cryptococcus gattii* Infection: Characteristics and Epidemiology of Cases Identified in a South African Province with High HIV Seroprevalence, 2002–2004. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 1077-1080. 2006.

MORRIS, L. J. The oxygenated acids of isano (Boleko) oil. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 5779-5781. 1963.

MOSHI, M. J.; INNOCENT, E.; MASIMBA, P. J.; OTIENO, D. F.; WEISHEIT, A.; MBABAZI, P.; LYNES, M.; MEACHEM, K.; HAMILTON, A.; URASSA, I. Antimicrobial and brine shrimp toxicity of some plants used in traditional medicine in Bukoba District, north-western Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*. 11: 23-28. 2009.

NOVAIS, T. S. G.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 5-8. 2003.

NUNEZ, C. V. Terpenos de *Wunderlichia crulsiana* e *Mikania* sp. nov. 2000. 164 f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Química Nova*, 13: 278-281. 1990.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11: 92-99. 2009.

ONG, C. Y.; LING, S. K.; ALI, R. M.; CHEE, C. F.; SAMAH, Z. A.; HOCK HO, A. S.; TEO, S. H.; LEE, H. B. Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96: 216-222. 2009.

PEREZ, C.; PAULI, M.; BAZERQUE, P. An antibiotic assay by the Agar-well diffusion method. *Acta Biol. Med. Exper.*, 15: 113-115. 1990.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 21-24. 2003.

PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 553-559. 2007.

PIATO, A. L.; RIZON, L. P.; MARTINS, B. S.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) in Mice. *Phytotherapy Research*, 23: 519-524. 2009.

PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; RASTRELLI, L.; PICCINELLI, A.; AQUINO, R. Isoprenoid glycosides from *Liriosma ovate*. *Journal of Natural Products*, 71: 265-8. 2008.

POLONSKY, J.; VARENNE J.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C. Isolation and Structure (X-Ray-Analysis) of Manicoline A, a new α -aminotropone from *Dulacia-Guianensis* (Olacaceae). *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 15: 731-732. 1981.

POLONSKY, J.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C. JACQUEMIN, H.; FOURNET, A. Structure (x-ray analysis) of Manicoline B, a mixture of two diastereoisomers of a new alkaloid from *Dulacia guianensis* (Olacaceae). *Tetrahedron Letters*, 25: 2359-2362. 1984.

RABMAN, W. C. M.; MANAF, A. A.; SUKARI, A. *Scorodocarpus borneensis* essential oils, a possible natural antifungal therapy. *Science International (Lahore)*, 14: 41-43. 2002.

RASMUSSEN, H. B.; CHRISTESEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A; HUANSI, A. G. Absolute Configuration and Antiprotozoal Activity of Minquartynoic Acid. *Journal of Natural Products*, 63: 1295-1296. 2000.

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*, 15: 21-26. 2001.

RATTES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613. 2000.

REGASINI, L. O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 706-711. 2010.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84. 2005.

RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 917-921. 2011.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia*, 72: 807-809. 2001.

SARAIVA, R. C. G.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M.; Triterpenos e alcalóide tipo cantinona dos galhos e folhas de *Simaba polyphylla* (Cavalcante) W.W.

Thomas (Simaroubaceae). *Química Nova*, 29: 264-268. 2006.

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 793-798. 2007.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE-BELLE, F.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 578-582. 2007.

SEVERO, B. C.; XAVIER, M. O.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children. *Paediatr. Respir. Rev.*, 10: 166-171. 2009.

SILVA, A. L.; MARTINS, B. S.; LINCK, V. M.; HERRMANN, A. P.; MAI, N.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. MK801-and scopolamine-induce amnésias are reversed by na Amazonian herbal locally used as a “brain tonic”. *Psychopharmacology*, 202: 165-172. 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SIQUEIRA, I. R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, 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 Science*, 75: 1897-906. 2004.

SIQUEIRA, I. R.; FOCHESTATTO, C.; TORRES, I. L. S.; SILVA, A. L.; NUNES, D. S.;

ELISABETSKY, E.; NETTO, C. A. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* (“muirapuama”) in mice brain. *Phytomedicine*, 14: 763-769. 2007.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.; MELO, C. S.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. *Acta Amazonica*, 33: 93-104. 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*; Wiley, J and Sons, INC, Ed.; United States, 2005.

SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L. C.; COSTA, G. A. N.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmetera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19: 686-689. 2009.

SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PFEILSTICKER, K. *Curupira tefeensis* (Olacaceae) – A rich source of a very long chain fatty acids. *Fett Wissenschaft Technologie*, 92: 165-168. 1990.

SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; PFEILSTICKER, K. *Curupira tefeensis* II: Occurrence of acetylenic fatty acids. *Fett Wissenschaft Technologie*, 93: 169174. 1991.

SPITZER, V.; MARX, F.; MAIA, J. G. S.; *Curupira tefeensis* III: Occurrence of all-cis-1,4-polyisoprene. *Fett Wissenschaft Technologie*, 97: 37-38. 1995.

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*, 32: 1189-1200. 1997.

SUDHAHAR, V.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. *Vascular Pharmacology*, 46: 412-418. 2007.

TAYLOR, L. Huacapu (*Minquartia guianensis*). *Technical data report*, 2006.

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

TANG, W.; HIOKI, H.; HARADA, K.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y. Cloredane diterpenoids with NFG-potentiating activity from *Ptychopetalum olacoides*. *Journal of Natural Products*, 71: 1760-1763. 2008.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 373-380. 2005.

VALERA, G. C.; BUDOWISK, J.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. A new psychoactive drug: *Heisteria olivae* (Olacaceae). *Rendiconti*. 62: 363-364. 1977.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov Today*, 3: 232-238. 1998.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29: 326-337. 2006.

VIEGAS Jr, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26: 390-400. 2003.

VIEIRA, G. F. H.; MOURÃO, J. A.; ÂNGELO, A. M.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52: 129-132. 2010.

VISWANATHAN, V. K.; HODGES, K. HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. *Nature Reviews Microbiology*, 7:1-10. 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRIGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 23: 141-149. 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Second edition, 2001.

WIART, C.; MARTIN, M.T.; AWANG, K.; HUE, N.; SERANI, L.; LAPRÉVOTE, O.; PAIS, M.; RHAMANI, M. Sesquiterpenes and alkaloids from *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochemistry*, 58: 653-656. 2001.

WINSLOW, L. C.; KROLL, D. J. Herbs as medicines. *Arch. Intern. Med.*, 158: 2192-2199. 1998.