

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS ANTITUMORAIS E
TRIPANOSOMICIDAS: ESTUDO QUÍMICO DE
Lentinus strigosus (BASIDIOMYCOTA) E
Habenaria petalodes (ORQUIDACEAE)**

por

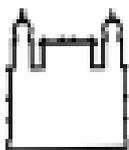
BETANIA BARROS COTA

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS ANTITUMORAIS E TRIPANOSOMICIDAS:
ESTUDO QUÍMICO DE *Lentinus strigosus* (BASIDIOMYCOTA) E
Habenaria petalodes (ORQUIDACEAE)**

por

BETANIA BARROS COTA

Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências da
Saúde na área de Biologia Celular e
Molecular e sub-área Química de
Produtos Naturais

Orientador: Dr. Carlos Leomar Zani

Belo Horizonte
Fevereiro de 2007

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C843b Cota, Betania Barros.
2007

Busca de substâncias antitumorais e tripanosomicidas: estudo químico de *Lentinus strigosus* (Basidiomycota) e *Habenaria petalodes* (Orquidaceae) / Betania Barros Cota. – Belo Horizonte, 2007.

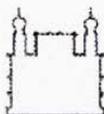
xxi, 263 f.: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 240 - 263

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Química - Métodos 2. Produtos Naturais 3. Basidiomicetos I. Título. II. Zani, Carlos Leomar (Orientação).

CDD – 22. ed. – 540



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

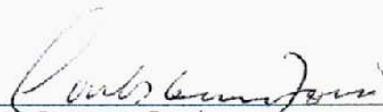
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

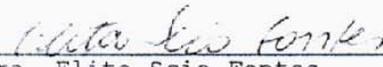
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da segunda defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Betânia Barros Cota, sob a orientação do Dr. Carlos Leomar Zani.

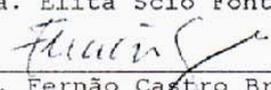
Aos vinte seis dias do mês de março do ano de dois mil e sete, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da segunda tese de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese da aluna Betânia Barros Cota intitula-se "Busca de substâncias antitumorais e tripanosomicidas: estudo químico de *Lentinus strigosus* (Schewin) Fr. (Basidiomycota) e *Habenaria petalodes* Lindl. (Orchydaceae)". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Carlos Leomar Zani - CPqRR/Fiocruz (orientador e presidente da banca), Dra. Elita Scio Fontes - UFJF (membro titular), Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi - UFMG (membro titular), Dra. Gracia Divina de Fátima Silva - UFMG (membro titular), Dr. Fernão Castro Braga - UFMG (membro titular) e Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - CPqRR/Fiocruz (suplente). Após argüir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Carlos Leomar Zani, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte seis de março de dois mil e sete.



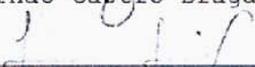
Dr. Carlos Leomar Zani



Dra. Elita Scio Fontes



Dr. Fernão Castro Braga



Dra. Gracia Divina de Fátima Silva



Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto Belo Horizonte MG Brasil Cep: 30190-002

Tel.: 55 0xx31 3295 3566 Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br/ensino>

Colaboradores

Dr. Alvicler Magalhães^I

Dr. Álvaro J. Romanha^{II}

Dr. Carlos Augusto Rosa^{III}

Dra Elaine Maria Souza-Fagundes^{IV}

Dr Luiz Henrique Rosa^V

Dr. Olindo A. Martins-Filho^{VI}

Dr. Rodrigo C. Oliveria^{VII}

Dra. Tânia M. A. Alves^{VIII}

I - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

II - Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular – Instituto de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ

III - Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

IV - Departamento de Fisiologia e Biofísica – UFMG

VI - Laboratório de Doenças de Chagas – Instituto de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ

VII - Laboratório de Imunologia Celular e Molecular de Parasitas – Instituto de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ

VIII - Laboratório de Química de Produtos Naturais – Instituto de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ

Suporte Financeiro

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FAPEMIG – Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais

*Ao meu querido esposo, Guilherme.
Aos meus pais, Marília e Lucrecio e ao meu irmão, Juliano.*

AGRADECIMENTOS

À Natureza que nos presenteia com sua multiplicidade de criações e estimula o homem a buscar as respostas de suas curiosidades.

Ao meu orientador, Carlos Leomar Zani, por ter me confiado este trabalho.

Ao meu ex-orientador, Fernão Castro Braga, que me iniciou neste caminho.

Às Professoras Antônia Ribeiro e Tânia M.A. Alves que me receberam com carinho e amizade.

Aos colegas de laboratório, Aline, Alysson, Belinha, Carolina, Cristiane, Daniela, Elaine, Eliandra, Ezequias, Fernanda, Helen, Ilza, Isabel, Márcia, Márcio, D. Maria, Patrícia, Paula, Rafaela, Rodrigo, Samantha, Susana, Vívian e Waldinei pela acolhida, paciência.

Ao Luiz e Renata, pelas idéias e apoio.

Aos amigos, Rodrigo Maia e Rosângela Barbosa pelo constante incentivo e amor.

Aos colegas da portaria do René; José Alves, Eric, Reginaldo e Joel, pelas conversas nas horas de espera....

À Maria Silva pela carinho em cuidar da minha casa....

SUMÁRIO

Dedicatórias	v
Agradecimentos	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiv
Resumo	xviii
Abstract	xix
Curriculum vitae	xx
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Os produtos naturais como fonte de fármacos.....	28
3.2 Doenças causadas por Trypanossomas e Leishmanias na América Latina.....	31
3.3 Tripanotona redutase como alvo terapêutico em Trypanossomas e Leishmanias.....	34
3.4 Metabólitos bioativos de basidiomicetos.....	37
3.5 O gênero <i>Lentinus</i>	51
3.5.1 Constituintes químicos do gênero <i>Lentinus</i>	52
3.6 A família Orquidaceae.....	54
3.6.1 Aspectos químicos e biológicos da família Orquidaceae.....	56
3.7 O gênero <i>Habenaria</i>	72
4. MATERIAIS E MÉTODOS	75
4.1 <i>Lentinus strigosus</i>	76
4.1.1 Isolamento do fungo.....	76
4.1.2 Cultivo do fungo.....	76
4.1.3 Extração.....	76

4.2	<i>Habenaria petalodes</i>	77
4.2.1	Coleta e identificação.....	77
4.2.2	Preparo dos extratos.....	77
4.3	Métodos cromatográficos.....	78
4.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	78
4.3.1.1	Placas para cromatografia em camada delgada.....	78
4.3.1.2	Reveladores para cromatografia em camada delgada.....	78
4.3.2	Cromatografia em coluna aberta (CC).....	78
4.3.3	Cromatografia líquida de alta pressão (CLAE).....	79
4.3.4	Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade.....	80
4.3.5	Filtração em gel de Sephadex LH-20.....	80
4.3.6	Extração em fase sólida (FS).....	80
4.4	Métodos físicos.....	81
4.4.1	Pontos de fusão (PF).....	81
4.4.2	Rotações óticas.....	81
4.4.3	Espectros no ultravioleta (UV).....	81
4.4.4	Espectros no infravermelho (IV).....	81
4.4.5	Espectros de massa (EM).....	81
4.4.6	Espectros de ressonância magnética nuclear.....	82
4.7	Ensaio biológicos.....	82
4.7.1	Ensaio bioquímico <i>in vitro</i> de inibição da enzima recombinante tripanotona redutase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
4.7.2	Ensaio <i>in vitro</i> com formas intracelulares amastigotas de <i>T. cruzi</i>	83
4.7.3	Ensaio <i>in vitro</i> com sangue de camundongos infectados com as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	84
4.7.4	Ensaio com linhagens de células tumorais humanas.....	84
4.7.5	Ensaio <i>in vitro</i> de proliferação de linfócitos de sangue periférico humano induzida por fitohemaglutinina (PHA).....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1	Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila obtido do cultivo do fungo <i>Lentinus strigosus</i>	87
5.1.1	Isolamento das substâncias.....	87
5.1.1.1	Escala analítica.....	87
5.1.1.2	Escala semi-preparativa.....	88

5.1.1.3	Escala preparativa.....	91
5.2	Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato em acetato de etila de <i>L. strigosus</i>	93
5.2.1	Substância I: neopanepoxidol.....	93
5.2.2	Substância II: panepoxidona.....	96
5.2.3	Substância III: 6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol.....	98
5.2.4	Substância IV: hipnofilina.....	102
5.3	Atividades biológicas das substâncias ativas isoladas do extrato em acetato etila de <i>L. strigosus</i>	105
5.4	Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico da espécie vegetal <i>Habenaria petalodes</i>	111
5.4.1	Isolamento das substâncias.....	112
5.4.1.1	Fracionamento preliminar do extrato etanólico de <i>H. petalodes</i> por partição e extração em fase sólida.....	112
5.4.1.2	Fracionamento da fração diclorometânica por cromatografia em coluna de sílica gel.....	112
5.4.1.3	Fracionamento das frações polares do extrato etanólico de <i>H. petalodes</i>	113
5.5	Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato etanólico de <i>H. petalodes</i>	115
5.5.1	Substância V: éster 2-isobutil-2-(2,3,4,6-tetracetil-O-glicopiranosil) bis 1,4-[4(β-D-glicopiranosiloxi)benzil] do ácido málico (dactilorina acetilada no anel 2).....	115
5.5.2	Substância VI: loroglossina.....	120
5.5.3	Substância VII: quercetina 3-O-β-glicopiranosídeo (isoquercitrina).....	123
5.5.4	Substância VIII: militarina.....	127
5.5.5	Substância IX: isoramnetina 3-O-β-glicopiranosídeo.....	130
5.5.6	Substância X: isoramnetina 3,7-di-O-β-glicopiranosídeo.....	133
5.6	Estudo fitoquímico das frações polares da espécie vegetal <i>Habenaria petalodes</i>	136
6.	EXPERIMENTAL	141
6.1	Dados físicos e espectrais das substâncias isoladas de <i>Lentinus strigosus</i>	142

6.2	Dados físicos e espectrais das substâncias isoladas de <i>Habenaria petalodes</i>	144
7.	CONCLUSÕES	149
7.1	Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila do fungo <i>Lentinus strigosus</i>	150
7.2	Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico da espécie vegetal <i>Habenaria petalodes</i>	151
8	PERSPECTIVAS	152
8.1	Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila do fungo <i>Lentinus strigosus</i>	153
8.2	Estudo fitoquímico das frações polares do extrato etanólico da espécie vegetal <i>Habenaria petalodes</i>	153
9	ANEXOS	154
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	240

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução da tripanotona pela enzima tripanotona redutase.....	36
Figura 2 - Principais estruturas de um fungo pertencente ao filo Basidiomycota.....	38
Figura 3 - Corpo de frutificação de <i>Lentinus strigosus</i>	52
Figura 4 - Exemplos de álcoois sesquiterpênicos identificados no destilado obtido do cultivo líquido de <i>Lentinus lepideus</i>	52
Figura 5 - Partes aéreas de <i>Habenaria petalodes</i>	74
Figura 6 - Gráfico da porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase em relação ao perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila de <i>L. strigosus</i>	88
Figura 7 - Fluxograma de fracionamento do extrato de <i>L. strigosus</i> em escala semi-preparativa.....	90
Figura 8 - Fluxograma de fracionamento do extrato de <i>L. strigosus</i> em escala preparativa.....	92
Figura 9 - Estruturas das substâncias isoladas do extrato em acetato de etila de <i>L. strigosus</i>	105
Figura 10 - Proposta de mecanismo de inibição reversível e tempo-dependente da TR pela lunarina.....	107
Figura 11 - Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico de <i>H. petalodes</i>	114
Figura 12 - Principais fragmentações no espectro de massas por “ <i>electrospray</i> ” da substância V	117
Figura 13 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, para a substância VII , com adição da substância de referência (isoquercitrina).....	126
Figura 14 - Perfil cromatográfico, obtido por CCD, para a substância VII	126
Figura 15 - Estruturas das substâncias isoladas das frações polares do extrato etanólico de <i>H. petalodes</i>	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de drogas de origem vegetal.....	28
Tabela 2 - Drogas antiparasitárias lançadas no mercado de 1975 a 1997.....	34
Tabela 3 - Substâncias isoladas de basidiomicetos com atividade antimicrobiana...	39
Tabela 4 - Substâncias isoladas de basidiomicetos com atividades biológicas relacionadas à toxicidade.....	45
Tabela 5 - Inibidores de enzimas provenientes de basidiomicetos.....	50
Tabela 6 - Uso popular de espécies do gênero <i>Habenaria</i>	72
Tabela 7 - Condições utilizadas para fracionamento e purificação em cromatografia em coluna aberta.....	79
Tabela 8 - Atividade do extrato em acetato de etila do fungo <i>L. strigosus</i> em diferentes ensaios biológicos.....	87
Tabela 9 - Fracionamento do extrato em acetato de etila de <i>L. strigosus</i> por cromatografia em coluna de sílica gel.....	91
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância I.....	95
Tabela 11 - Constantes de acoplamento escalar para substâncias relacionadas a epoxiquinonas.....	95
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância II.....	98
Tabela 13 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H para substância III e comparação com dados da literatura.....	100
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância III.....	101
Tabela 15 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H para substância IV e comparação com dados da literatura.....	103
Tabela 16 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância IV e comparação com dados da literatura.....	104
Tabela 17 - Resultados dos ensaios biológicos das substâncias isoladas do extrato orgânico de <i>L. strigosus</i>	106
Tabela 18 - Resultados dos ensaios biológicos das substâncias isoladas do extrato de <i>Lentinus strigosus</i> nos ensaios de inibição da tripanotona redutase e ensaios com formas amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	109
Tabela 19 - Valores de CI_{50} das substâncias isoladas do extrato de <i>Lentinus strigosus</i> em ensaios com células tumorais humanas e células mononucleares do sangue periférico.....	111

Tabela 20 - Fracionamento da fração diclorometânica obtida do extrato bruto de <i>H. petalodes</i> por cromatografia em coluna de sílica gel.....	113
Tabela 21 - Principais picos registrados nos espectros, obtidos por “ <i>electrospray</i> ” no modo positivo, para a substância V	116
Tabela 22 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C para substância V	119
Tabela 23 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H para substância VI	122
Tabela 24 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C para substância VII e comparação com dados da literatura.....	125
Tabela 25 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹ H para substância VIII	129
Tabela 26 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a substância IX	132
Tabela 27 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a substância X	135
Tabela 28 - Atividade citotóxica das frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometânica de <i>H. petalodes</i>	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{25}$	Rotação específica medida a 25°C
A549	Linhagem celular de carcinoma de pulmão
BHCB	Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG
c	Concentração em g/L
CCCAV	Cromatografia centrífuga em contra-corrente de alta velocidade
CCB	Coleção de Culturas de Basidiomicetos
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica gel
CCSe	Cromatografia em coluna de exclusão
CETEC	Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP	Cromatografia líquida de média pressão
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CPRG	Clorofenol- β -D-galactopiranosídeo
DEPT	Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
d.i.	Diâmetro interno
DTNB	Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
ϵ	Absortividade molar
EE-UFMG	Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFS	Extração em fase sólida
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GABA	Ácido gama- aminobutírico
δ	Deslocamento químico
$\delta OD/\delta t$	Relação entre densidade óptica e intervalo de tempo
°GL	Graus Gay-Lussac

GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
HeLa	Linhagem de câncer cervical humano
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -2- ácido etanesulfônico
HepG2	Linhagem de câncer de fígado humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL60	Linhagem celular de leucemia promielocítica
HMBC	Coerência heteronuclear de múltiplas ligações
HMQC	Coerência heteronuclear de transições múltiplo-quânticas
HPV	Papiloma vírus humano
HSV	Vírus da Herpes
Hz	Hertz
IE	Impacto eletrônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Int	Integração
IV	Infravermelho
K ⁺ -ATPase	Bomba de sódio-potássio - enzima
K-562	Linhagem celular de eritromieloblastoma humano
kDa	Kilo Dalton - unidade de massa atômica - 1000 Dalton
λ	Comprimento de onda
lit.	Abreviatura de literatura
L1210	Linhagem celular de leucemia murina
L929	Linhagem celular de fibroblasto murino
MCF-7	Linhagem celular de mama humana
MDCK	Linhagem celular de rim canino -Madin-Darby
MEA	Meio sólido de extrato de malte
MEC	Meio líquido de extrato de malte
MHz	Megahertz
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazoli-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
m/z	Relação carga/massa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAPRALERT	Banco de dados Alerta de Produtos Naturais (Natural Products Alert)

NCI	Instituto Nacional do Câncer dos EUA (National Cancer Institute)
NCI-H187	Linhagem celular de câncer de pulmão
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina-polietileno glicol (Natural Product-PEG)
nm	Nanômetro ($1,0 \times 10^{-9}$ metros)
PCT [WO]	“Patent Cooperation Treaty- Eletronic Gazette’
%p/v	Porcentagem peso-volume
μm	Micra
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
PF	Ponto de fusão
PHA	Fitohemaglutinina
ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoroetileno
P388	Linhagem celular de leucemia murina
Rf	Fator de retenção
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo “Instituto Memorial de Roswell Park”
RP	Fase reversa (Reverse Phase)
RSV	Vírus de Sarcoma de Rous
SK-OV-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário
SRB	Sulfarodamina B
THA	Tripanossomíase africana humana
TK-10	Linhagem celular renal humana
TMS	Tetrametilsilano
TNB	Tiolato de nitrobenzóico
TR	Enzima tripanotiona redutase
Tr(s)	Tempo(s) de retenção
T(S) ₂	Tripanotiona
UACC	Linhagem celular de melanoma humano
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
V	Diferença de potencial ou tensão (volts)

Vero
v/v

Linhagem celular de epitélio renal de macaco
Volume/volume

RESUMO

BUSCA DE SUBSTÂNCIAS ANTITUMORAIS E TRIPANOSOMICIDAS: ESTUDO QUÍMICO DE *Lentinus strigosus* (BASIDIOMYCOTA) E *Habenaria petalodes* (ORQUIDACEAE)

As espécies estudadas neste trabalho foram selecionadas a partir de um estudo de triagem intitulado “Bioprospecção da Biodiversidade Mineira e Desenvolvimento de Novas Drogas em Minas Gerais”, em que extratos de espécies vegetais e fungos basidiomicetos, coletados em ecossistemas locais, foram submetidos a diversos ensaios biológicos. O extrato acetato em etila do meio líquido do fungo *Lentinus strigosus* inibiu a enzima tripanotona redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* e seu fracionamento biomonitorado levou ao isolamento de quatro substâncias; neopanepoxidol, 6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol, hipnofilina e panepoxidona, sendo as duas últimas responsáveis pelas atividades biológicas do extrato. Esses dois metabólitos terpênicos apresentaram atividade citotóxica para três linhagens tumorais humanas (UACC-62 -melanoma; TK-10 - renal e MCF-7 - mama; CI_{50} de 3,2 μ M a 11,0 μ M), inibiram a proliferação de linfócitos induzidos por fitohemaglutinina (CI_{50} de 5,9 μ M e 10,0 μ M), a enzima TR (CI_{50} de 48,5 μ M a 1,0 μ M) e o crescimento de formas amastigotas de *T. cruzi* (CI_{50} de 6,0 μ M e 2,5 μ M). Panepoxidona e hipnofilina já foram descritas anteriormente, porém, é a primeira vez que se relata o isolamento desses metabólitos em *L. strigosus*. O extrato bruto etanólico de *Habenaria petalodes* (Orquidaceae) apresentou atividade citotóxica para três linhagens tumorais humanas a 20 μ g/ mL (UACC-62 - melanoma; TK-10 - renal e MCF-7 - mama). O extrato etanólico bruto de toda a planta foi extraído com diclorometano (fração apolar) e metanol/água (fração polar) por extração líquido-líquido. A fração diclorometânica apresentou actividade citotóxica para as três linhagens de células tumorais a 20 μ g/ mL e foi selecionada para posterior fracionamento biomonitorado devido a sua baixa massa e complexidade química. Devido à ausência de relatos sobre os constituintes químicos, as frações polares de *Habenaria petalodes* (Orquidaceae) foram priorizadas para estudo fitoquímico. A fração polar foi extraída em cartucho Sep-Pak C₁₈ e forneceu as subfrações, metanólica e aquosa que foram fracionadas por técnicas cromatográficas, obtendo-se três derivados do ácido succínico; loroglossina, militarina e dactilorina acetilada no anel 2 e, três flavonóides: isoquercitrina, isoramnetina 3-O- β -glicopiranosídeo e

isoramnetina 3,7-di-O- β -glicopiranosídeo, isolados pela primeira vez nesta espécie vegetal.

ABSTRACT

SEARCH FOR ANTITUMORAL AND TRYPANOCIDAL COMPOUNDS: PHYTOCHEMISTRY STUDY OF *Lentinus strigosus* (BASIDIOMYCOTA) AND *Habenaria petalodes* (ORCHIDACEAE)

In a previous screening work many vegetal species and basidiomycete fungi were collected on local ecosystems and tested in several bioassays. From this work we selected to study the *Lentinus strigosus* fungus and *Habenaria petalodes* orchid. The ethyl acetate extract from the culture of fungus inhibited the enzyme trypanothione reductase (*TRYR*) from *Trypanosoma cruzi*. The chromatographic fractionation guided by inhibition of trypanothione reductase assay of *L. strigosus* extract furnished four compounds, neopanepoxidol, 6,7-epoxi-4(15)-hirsutene-1,5-diol, hypnophilin and panepoxidone, reported from this fungus species for the first time. Panepoxidone and hypnophilin, the bioactive compounds of the extract, showed a cytotoxic activity on human tumour cell lines (IC₅₀ 3.2 to 11.0 μm), inhibited the lymphocyte proliferation (IC₅₀ 5.9 and 10.0 μm), the *TRYR* enzyme (IC₅₀ 48.5 to 1.0 μm) and the growth of amastigotes of *T. cruzi* (IC₅₀ de 6.0 and 2.5 μm). The ethanolic crude extract of *Habenaria petalodes* (Orchidaceae) showed cytotoxic activity in three human tumour cell lines, at 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (UACC-62 - melanome; TK-10 - kidney e MCF-7 - breast). The ethanolic crude extract of whole plant was extracted with dichlorometane (apolar fraction) and methanol/water (polar fraction) by liquid-liquid extraction. The apolar fraction showed cytotoxic activity in the three human tumour cell lines, at 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and was selected for further guided fractionation because low mass and complexity of this fraction. The chemical investigations of polar fractions of *H. petalodes* was performed because there is no previous studies of this plant. The polar fraction was subjected to Sep-Pak C₁₈ cartridge to give two polar subfractions, the methanolic and aqueous. These subfractions were purified by chromatographic techniques furnishing three succinic acid derivatives, loroglossine, militarine and dactilorine acylated in the ring 2, and three flavonoids: isoquercitrine, isoramnetin 3-O- β -glicopyranoside and isoramnetin 3,7-di-O- β -glicopyranoside, related in this species from the first time.

CURRICULUM VITAE

1 DADOS PESSOAIS

- 1.1 Nome: Betania Barros Cota
- 1.2 Endereço eletrônico: betania@cpqrr.fiocruz.br
- 1.3 Telefone: (31) – 33497791

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
Farmácia com Habilitação em Indústria

2.2 Pós-graduação – Mestrado

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
Ciências Farmacêuticas

3 PUBLICAÇÕES

Cota BB, Magalhães A, Alves TMA, Zani CL. Isolamento de substâncias fenólicas e atividade antitumoral do extrato etanólico de *Habenaria* sp. (Orquidaceae). In: XXIX Congresso Latinoamericano de Química, São Paulo, 2006.

Cota BB, Rosa LH, Alves TMA, Zani CL. Estudo da atividade inibitória de extratos do fungo endofítico *Alternaria* sp. sobre a enzima tripanotona redutase. In: XXIX Congresso Latinoamericano de Química, São Paulo, 2006.

Rosa LH, Cota BB, Machado KMG, Rosa CA, Zani CL. Antifungal compound produced by *Oudemansiella canarii* (basidiomycota). World Journal of Microbiology & Biotechnology; 2005: 21, p. 983-987.

Cota BB, Rosa LH, Souza-Fagundes EM, Zani CL. Metabólitos secundários produzidos pelo fungo basidiomiceto CCB178 com atividades citotóxica, imunossupressora e inibitória da enzima tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*. In: XXVI Congresso Latinoamericano de Química, Bahia, 2004.

4 PATENTE

Cota BB, Zani CL, Rosa LH, Souza-Fagundes EM, Rosa CA, Romanha AJ, Martins-Filho OA, Oliveria RC, inventores. Fundação Oswaldo Cruz, depositante. Extratos de *Lentinus strigosus*, substâncias isoladas dos mesmos e composições farmacológicas contendo os mesmos. BR depósito de pedido de patente PI0604223-6. 03 out. 2006.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca sistemática de fontes de substâncias bioativas é útil para o desenvolvimento de novas drogas usadas no tratamento e controle de enfermidades negligenciadas no Brasil como a doença de Chagas, leishmaniose e malária, além de doenças com elevadas taxas de incidências como o câncer.

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade no mundo. Não somente o número absoluto de espécies vegetais é elevado mas, também, seu grau de endemismo, o que coloca o Brasil em primeiro lugar no ranking mundial de biodiversidade (Mittmeier et al, 1997). É consenso mundial que a conservação contínua dos recursos genéticos, terrestres e marinhos são críticos para o desenvolvimento econômico sustentável de países em desenvolvimento, (Seidl, 1999), sendo as fontes naturais recursos para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

O presente trabalho teve origem nos resultados obtidos no projeto “Bioprospecção da Biodiversidade Mineira e Desenvolvimento de Novas Drogas em MG”. O objetivo deste projeto foi coletar espécies vegetais e fungos basidiomicetos de ecossistemas locais e submetê-los a diversos ensaios biológicos incluindo:

- a) enzima tripanotona redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi*;
- b) amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* que expressam a β -galactosidase
- c) amastigotas de *Leishmania* sp.
- d) três linhagens de células tumorais humanas preditivas de atividade anticâncer;
- e) células mononucleares de sangue periférico humano.

Como resultado deste esforço, dezenas de extratos bioativos foram identificados como promissores. Dos 2402 extratos testados no ensaio de inibição da tripanotona redutase, somente 4,2% apresentaram elevada atividade. O extrato orgânico obtido do meio líquido do cultivo do basidiomiceto *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr. foi selecionado para estudo biomonitorado pois demonstrou 100% de atividade inibidora da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi* a 10 μ g/mL.

O extrato etanólico de *Habenaria petalodes* Lindl. apresentou atividade citotóxica a 20 µg/mL em ensaios com as linhagens tumorais humanas: UACC-62 (141%), TK-10 (52%) e MCF-7 (68%). O estudo do extrato dessa espécie vegetal foi priorizado de acordo com o critério de seletividade, ou seja, ação pronunciada sobre apenas uma ou duas das três linhagens empregadas. Neste caso, o extrato etanólico foi citocida apenas para a linhagem de células de melanoma humano, pois além de inibir a proliferação celular foi capaz de matar a células.

De acordo com a literatura científica, não existem estudos químicos sobre *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr. e *Habenaria petalodes* Lindl. Por isso, o conhecimento do potencial químico e farmacológico dessas espécies contribui para o aproveitamento racional da biodiversidade brasileira, permitindo reverter a riqueza do solo, fauna e flora brasileira em recursos econômicos.

A identificação de espécies promissoras é a etapa inicial para o desenvolvimento de fármacos no Brasil, que tem enorme diferença de poder aquisitivo entre suas camadas sociais, dificuldade de atuar na área de fármacos sintéticos, mas está entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo (Ferreira, 1998). A identificação de princípios ativos permite, também, a exploração pelas empresas farmacêuticas de forma direta, como matéria-prima para semi-síntese ou como moléculas-modelo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar os constituintes bioativos de *Lentinus strigosus* e de *Habenaria petalodes*.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar e preparar extrato orgânico do basidiomiceto *L. strigosus*;
- Realizar o fracionamento monitorado do extrato orgânico de *L. strigosus* pelo ensaio de inibição da enzima tripanotona redutase;
- Coletar a espécie vegetal *H. petalodes* em maior quantidade e preparar extrato etanólico de toda a planta;
- Realizar o fracionamento monitorado do extrato etanólico de *H. petalodes* pelo ensaio com linhagem de melanoma humano;
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os produtos naturais como fonte de fármacos

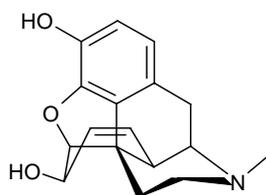
Relatos sobre o uso de plantas como agentes medicinais pelos Egípcios, Chineses e Gregos datam de 2900 a.c. (Newman et al, 2000). Contudo, os fármacos de origem vegetal utilizados ainda na clínica foram descobertos no século XIX e início do século XX (Tabela 1) (Mans et al, 2000).

Tabela 1 - Exemplos de drogas de origem vegetal

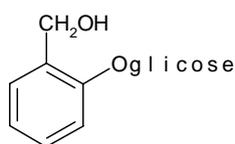
Substância	Indicação	Fonte
atropina	antiespasmódico, antiarrítmico	<i>Atropa belladona</i>
cafeína	estimulante	<i>Camellia sinensis</i>
codeína	analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
digoxina	cardiotônico	<i>Digitalis purpurea</i>
escopolamina	anticolinérgico	<i>Datura stramonium</i>
papaverina	antiespasmódico	<i>Papaver somniferum</i>
quinina	antimalárico	<i>Cinchona pubescens</i>
reserpina	antihipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i>
teofilina	diurético, broncodilatador	<i>Theobroma cacao</i>

Fonte: Mans et al, 2000.

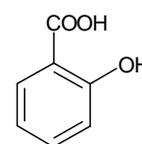
A morfina (1), usada como analgésico em doenças terminais, foi isolada de *Papaver somniferum* por Serturmer e foi o primeiro produto natural puro lançado pela Merck S/A. Posteriormente, Buchner isolou a salicina (2) (glicosídeo do álcool salicílico) que deu origem ao ácido salicílico (3) por síntese a partir do fenol. Somente em 1898, Felix Hofman sintetizou o ácido acetil salicílico, primeiro fármaco semi-sintético proveniente de um produto natural (Newman et al, 2000; Yunes, Cechinel Filho, 2001).



(1)



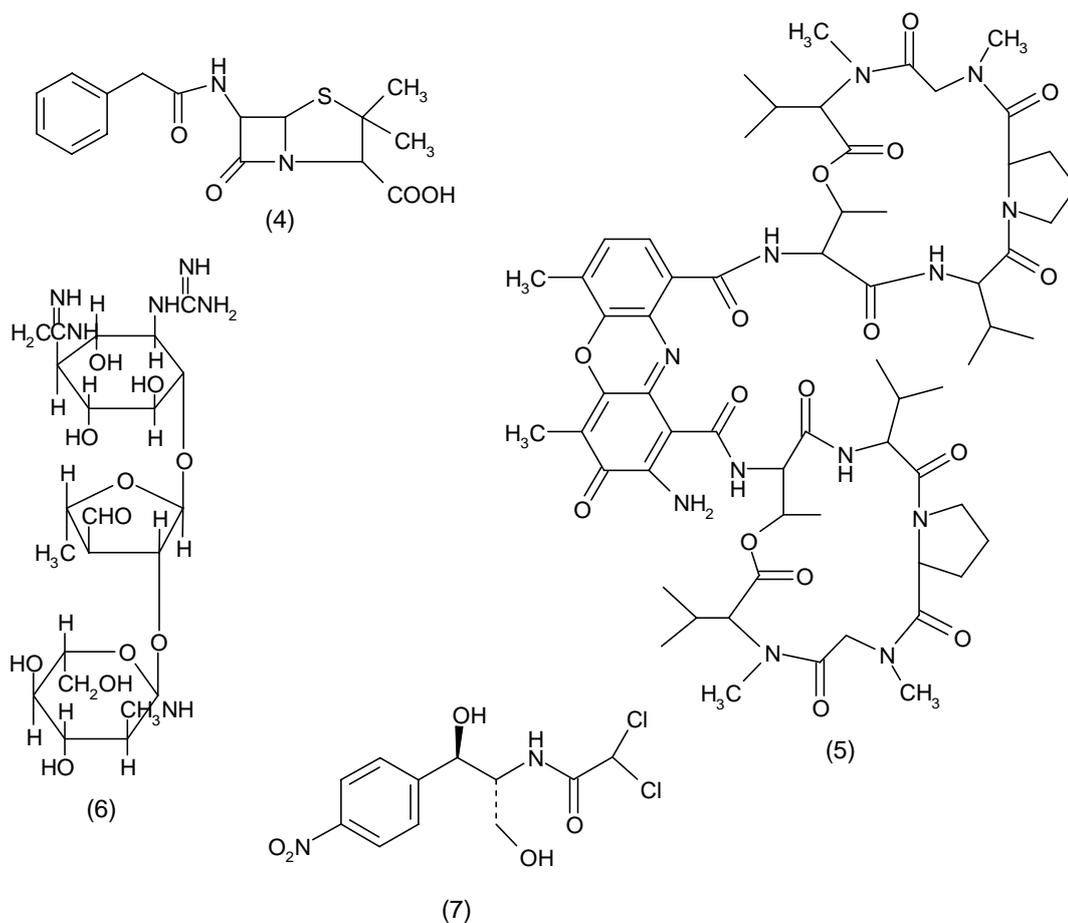
(2)



(3)

A descoberta da penicilina (4) em cultura de *Penicillium* revolucionou a pesquisa para a descoberta de novas drogas, o que levou ao isolamento de vários

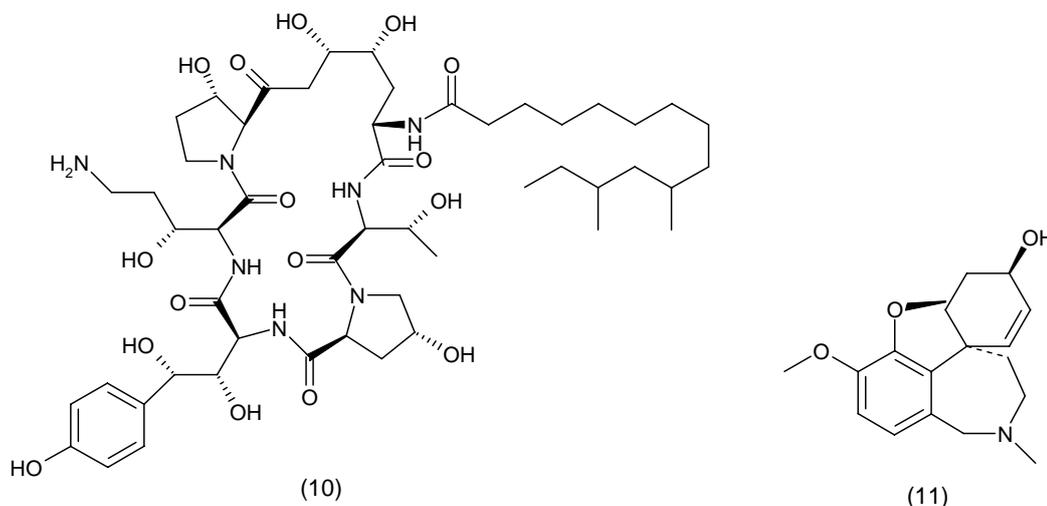
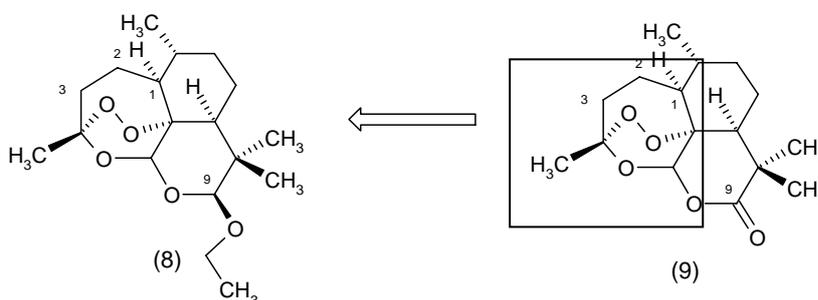
antibióticos de fungos como a actinomicina (5), a estreptomicina (6), o cloranfenicol (7), a neomicina, entre outros (Yunes, Cechinel Filho, 2001; Butler, 2004).

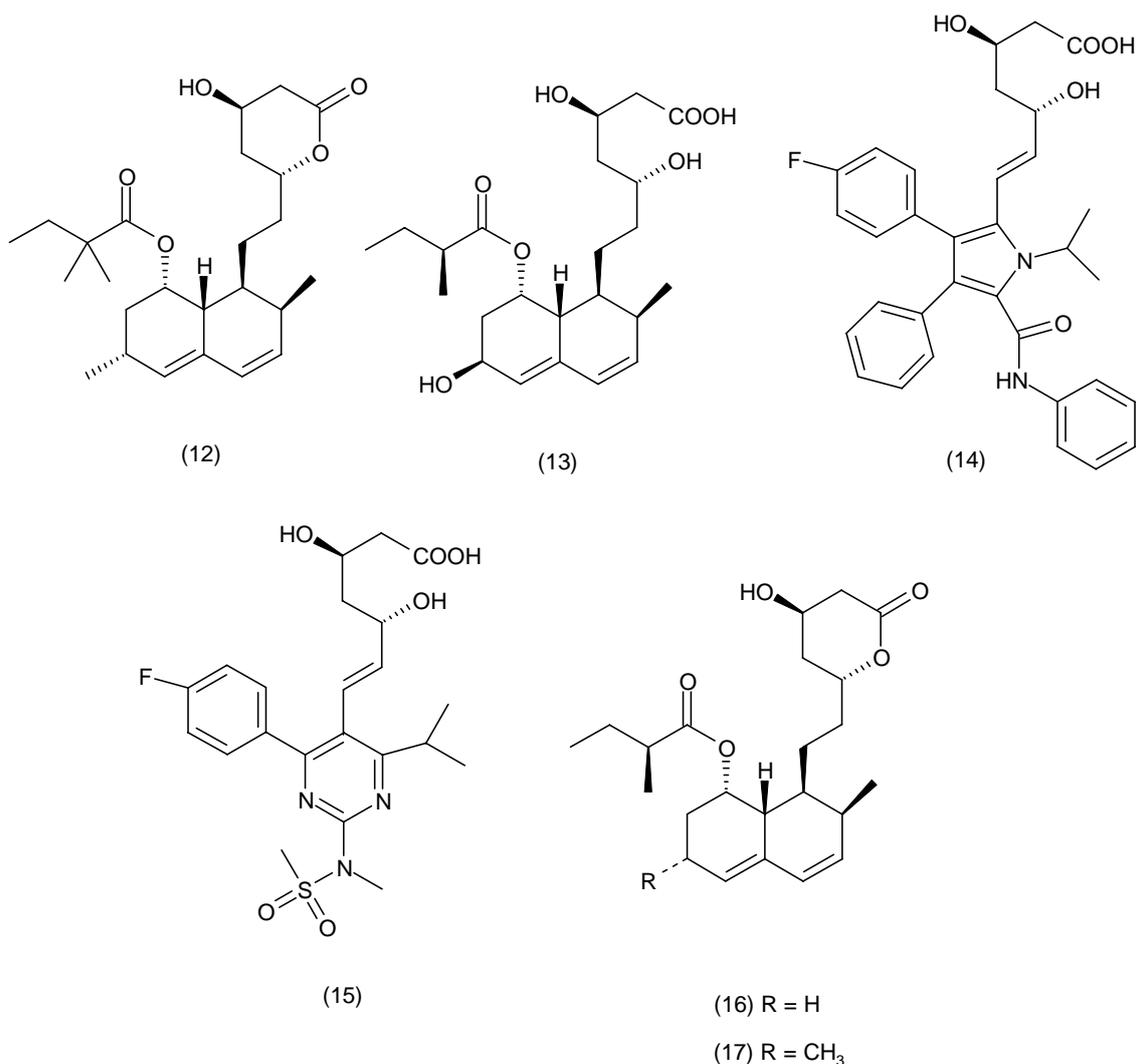


Substâncias obtidas de produtos naturais são ainda a principal fonte para a descoberta de novos agentes terapêuticos para doenças auto-imunes, câncer, desordens lipídicas e enfermidades infecciosas de origem bacteriana e fúngica. As substâncias de origem natural normalmente possuem diversos centros estereogênicos, arquitetura complexa e um grande número de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (Clardy, Walsh, 2004). A variedade de padrões estruturais encontrada nas diversas classes de produtos naturais como policetídeos, terpenos, alcalóides e lignanas é muito grande.

Um total de 15 produtos naturais ou fármacos derivados de produtos naturais foram lançados nos Estados Unidos, Comunidade Européia e Japão no período de 2000 a 2003 (um em 2000, quatro em 2001, cinco em 2002 e cinco em 2003), incluindo novos tipos de drogas como o arteeter (8) (Butler, 2004). Esta substância é um análogo da artemisinina (9), um agente antimalárico isolado de *Artemisia annua*, que contém uma subunidade farmacofórica no sistema trioxânico, essencial à atividade observada contra isolados do *Plasmodium* spp. Em 2001, foi lançado pela

Merck S/A o antifúngico caspofungina (10), que teve como protótipo a pneumocandina B, isolada originalmente do fungo *Glarea lozoyensis*. Já a galantamina (11), que teve como modelo um produto natural isolado das plantas *Galanthus* spp. e *Narcissus* spp, foi lançada pela Johnson & Johnson e é um inibidor sintético da acetilcolinesterase, usado para o tratamento da doença de Alzheimer. Por outro lado, as estatinas simvastatina (12), pravastatina (13), atorvastatina (14), rosuvastatina (15) são fármacos antilipidêmicos que tiveram como substâncias-protótipo a mevastatina (16), agente antifúngico obtido de *Penicillium brevicompactum* e a lovastatina (17) (Butler, 2004).





A busca por produtos naturais em ambientes inexplorados como oceanos, florestas tropicais e águas termais tem fornecido todos os tipos de organismos, como bactérias, fungos, protozoários, esponjas e invertebrados, e consiste em uma estratégia altamente competitiva para as empresas farmacêuticas (Kayser et al, 2003). O Brasil, um dos países mais ricos em diversidade do mundo, apresenta uma biota selvagem pouco conhecida e explorada, ainda passível de ser revertida em patrimônio econômico (Nodari, Guerra, 2002).

3.2 Doenças causadas por Trypanossomas e Leishmanias na América Latina

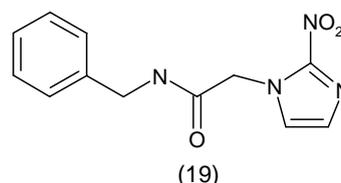
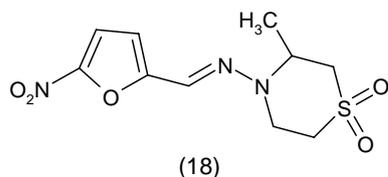
Kinetoplastida é uma ordem de protozoários que engloba parasitos tripanossomas e leishmanias que possuem uma organela oval especial, o cinetoplasto, situada na base do flagelo, uma região mitocondrial rica em DNA (Shapiro, England, 1995).

Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pertencem à subordem Trypanosomatina e à família Trypanosomatidae. A tripanosomíase americana é causada pelo *T. cruzi*, enquanto que as espécies *Leishmania tropica*, *L. brasiliensis* e *L. chagasi* estão associadas, respectivamente, à leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (Schidmidt, Krauth-Siegel, 2002).

Essas doenças são responsáveis por considerável mortalidade e morbidade principalmente em decorrência da falta de recursos econômicos para combatê-las eficientemente. As dificuldades de implementação de programas de prevenção contra a leishmaniose e a Doença de Chagas, os efeitos tóxicos e a resistência às drogas usadas na clínica são os principais motivos do fracasso de estratégias consideradas de sucesso. Essas doenças infecciosas impedem o desenvolvimento social e econômico de países e atingem, principalmente, a população pobre e marginalizada (Fries, Fairlamb, 2003).

A doença de Chagas afeta 16 a 18 milhões de pessoas no mundo, um quarto da população da América Latina e cerca de 6 milhões de pessoas no Brasil (Coura, Castro, 2002; WHO, 2004). O tratamento da doença de Chagas depende basicamente de duas drogas, o benzonidazol (18) e o nifurtimox (19), que apresentam eficácia somente na fase aguda da doença e provocam efeitos colaterais graves como neuropatias e distúrbios gastrointestinais (Coura, Castro, 2002).

Acredita-se que a ação do benzonidazol seja por reação covalente do grupo nitro com macromoléculas do parasita. A droga é efetiva na fase aguda da doença, embora existam relatos de fracassos por variações de sensibilidade de populações de parasitos na América Central e do Sul (D'Silva, Daunes, 2002). O mecanismo de ação do nifurtimox é ainda incerto, mas é semelhante ao do benzonidazol que parece envolver a formação de um íon radical por redução do grupo nitro que, então, reduz espécies moleculares de oxigênio e leva à formação de ânions superóxidos. A superprodução de ânions diminui a capacidade da célula em remover espécies de oxigênio altamente reativas (H_2O_2 , OH^\cdot), resultando em peroxidação lipídica e dano às membranas celulares, proteínas e DNA (Docampo, 2001).



O gênero *Leishmania* possui mais de 20 espécies patogênicas ao homem distribuídas por toda a região tropical e subtropical. A leishmaniose atinge 12 milhões de pessoas no mundo, e a cada ano surgem cerca de 2 milhões de novos casos (WHO, 2002). O agente de escolha para o tratamento de leishmaniose (visceral e mucocutânea) é o antimoniato de meglumina. Porém, anfotericina B é uma droga efetiva contra cepas de *Leishmania* resistentes ao antimônio. Miltefosida, paramomicina, anfotericina B lipossomal e desoxicolato de anfotericina B também são usadas no controle desta doença, mas a maior parte destes fármacos causa efeitos colaterais que limitam o seu uso e/ou são de custo elevado para os tratamentos prolongados (Fries, Fairlamb, 2003).

De acordo com a análise realizada por Pecoul et al (1999), das 1223 novas entidades químicas lançadas no mercado entre 1975 e 1997, somente 13 foram aprovadas para doenças tropicais (Tabela 2). As formulações de pentamidina e anfotericina B são versões atualizadas de produtos previamente lançados e hidrocloreto de halofantrina e mefloquina são resultados de pesquisa militar. Cinco dos treze fármacos (albendazol, benzonidazol, ivermectina, oxamniquina e praziquantel) são provenientes de pesquisa veterinária e somente quatro podem ser considerados resultados diretos das atividades de indústrias farmacêuticas. Newman et al (2003) também relatam um total de 13 novas entidades químicas lançadas no período de 1981 a 2002. Dentre estas, duas são produtos naturais, cinco são derivadas de produtos naturais, quatro são sintéticas e duas são obtidas totalmente por síntese, mas possuem o grupo farmacofórico proveniente de um produto natural.

Tabela 2 - Drogas antiparasitárias lançadas no mercado de 1975 a 1997

Droga	Ano de registro	Indicação
Artemeter	1997	Malária
Atavaquona/ proguanil	1992/1997	
Hidroclorato de halofantrina	1992	
Mefloquina	1987	
Hidroclorato de eflornitina	1990	Tripanosomíase Africana
Nifurtimox	1984	
Oxamniquina	1981	Schistosomose
Praziquantel	1980	
Albendazol	1987	Helmintoses
Benznidazol	1981	
Ivermectina	1989	Oncocercose
Isetionato de pentamidina	1950/1984	Tripanosomíase Africana
Complexo lipídico de anfotericina B	1962/1996	Leishmaniose

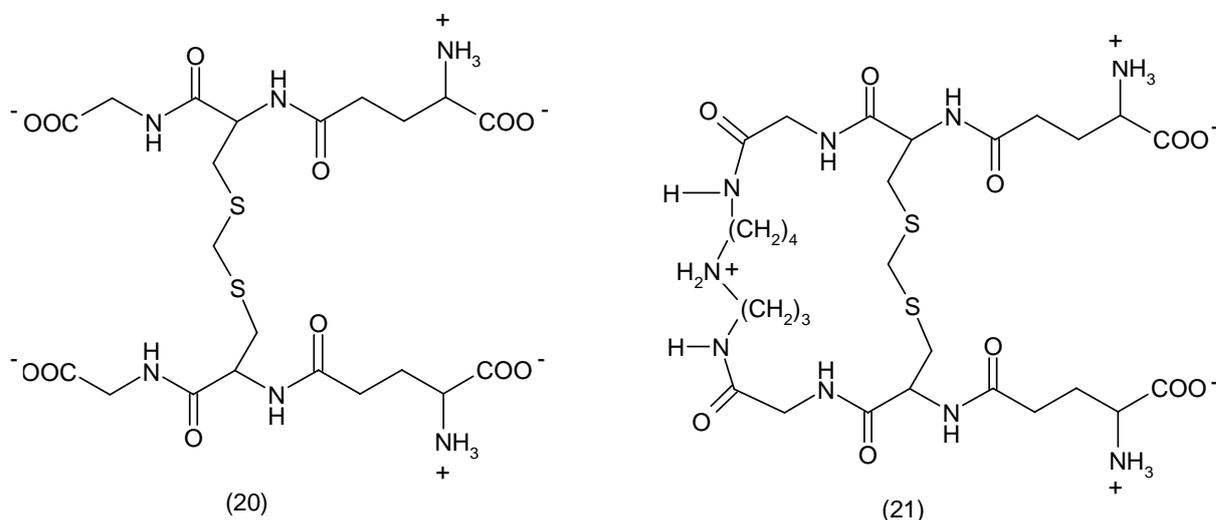
Fonte: Pecoul et al (1999).

A escassez de fármacos disponíveis no mercado, as dificuldades apresentadas pelos já existentes, e a falta de interesse das empresas farmacêuticas em desenvolver novas drogas são fatores que levam a busca contínua por inovações nesta área.

3.3 Tripanotiona redutase como alvo terapêutico em *Tripanossoma* spp. e *Leishmania* spp.

A maior diferença bioquímica entre os parasitos da ordem *Kinetoplastida* e a maioria dos eucariotos é a presença de um metabolismo tiólico no qual a enzima glutationa redutase (GR) é substituída pela tripanotiona redutase (TR). Conseqüentemente, o substrato dessas enzimas são diferentes. Esses protozoários sintetizam a espermidina e glutationa (GSH - 20) pelo mesmo processo que os mamíferos, porém utilizam a glutationa de modo diferente, conjugando-a à espermidina, o que resulta em uma substância única denominada tripanotiona (T(SH)₂ - 21) (Fairlamb et al, 1985; Fairlamb, Cerami, 1992).

A glutationa (20) e a tripanotiona (21) diferem em tamanho e carga, mas possuem a porção γ -glutamilcisteinil conservada. A glutationa é menor e têm carga formal -2 em pH fisiológico, enquanto que a tripanotiona possui carga formal positiva e uma porção hidrofóbica de sete grupos metilênicos (Bond et al, 1999; Fries, Fairlamb, 2003).



A vantagem biológica da substituição da glutationa pela tripanotiona nos kinetoplastídeos ainda não está clara. Apesar de a tripanotiona ser ligeiramente mais eletronegativa (-0,242 V para glutationa e -0,230 V para tripanotiona), as reações de troca dissulfeto-ditiol ocorrem nesses dois substratos de modo não enzimático. Em pH fisiológico, a tripanotiona existe mais na forma de tiolato, pois seus grupos tióis são mais ácidos do que aqueles da glutationa. Portanto, espera-se que a T(SH)₂ (pka 7,4) seja muito mais reativa do que a GSH (pka 8,7) já que as suas trocas exibem um valor ótimo quando o pka é igual ao pH fisiológico e que ela seja um agente redutor mais eficiente por ser um ditiol (Fries, Fairlamb, 2003).

Tripanotiona redutase e glutationa redutase são proteínas homodiméricas de cerca de 50 kDa por subunidade, contêm FAD como coenzima e agem como aceptores de elétron do NADPH. Essas enzimas possuem cisteína no sítio ativo essencial para atividade catalítica, mas são específicas em relação a seus respectivos substratos. O sítio ativo da glutationa redutase é carregado positivamente e contém uma região hidrofílica, o que confere ligação ao seu substrato carregado negativamente. Por outro lado, a tripanotiona redutase é carregada negativamente e contém uma região hidrofóbica, permitindo a ligação específica a tripanotiona (Bond et al, 1999; Fries, Fairlamb, 2003; Fairlamb, 2003).

A tripanotona redutase é uma flavoenzima dependente de NADPH que catalisa a redução da tripanotona dissulfeto (TS)₂ (22) a tripanotona (T(SH))₂ (23) (Figura 1). A tripanotona fornece hidrogênios a espécies altamente oxigenadas como superóxidos e peróxidos de hidrogênio e é essencial para a eliminação de substâncias citotóxicas e espécies que levam ao estress oxidativo e, portanto, à morte do parasita (Fries, Fairlamb, 2003).

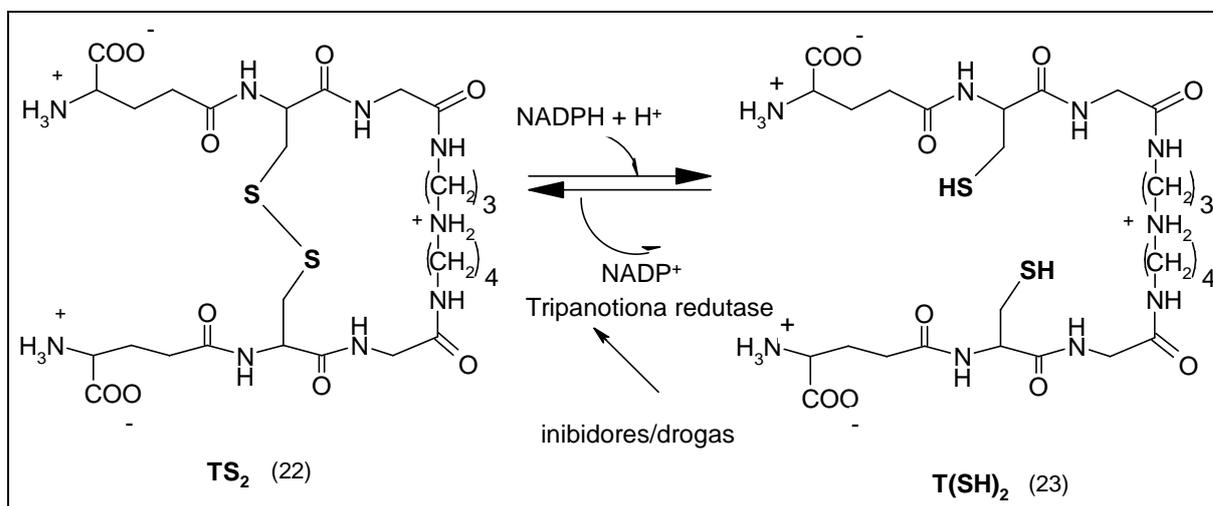


Figura 1 - Redução da tripanotona pela enzima tripanotona redutase.

Fonte: Schirmer, Muller, Krauth-Siegel, 1995.

A validação da TR como alvo terapêutico deriva de experimentos genéticos que mostram que ela é essencial para os tripanosomatídeos. Assim:

- A expressão de um mutante dominante negativo para a TR de *T. cruzi* em *Leishmania donovani* levou a uma diminuição em 85% da atividade enzimática em células recombinantes, que demonstraram menor capacidade de regeneração da tripanotona a partir da tripanotona dissulfeto em presença do agente oxidante diamida (Tovar et al, 1998),
- A criação de mutantes de *L. donovani* e de *L. major* possuindo somente um alelo do gene da TR demonstraram menor capacidade de sobrevivência em macrófagos em comparação às células selvagens carregando duas cópias para o gene da TR (Dumas et al, 1997).
- A infecção de camundongos com formas sanguíneas de tripanosomatídeos transfectados com plasmídios contendo um gene da TR, controlado por um promotor induzido por tetraciclina, mostrou que a sobrevivência dos parasitos depende do nível do indutor (tetraciclina) em relação à linhagem selvagem (Krieger et al, 2000).

A potencialidade desta enzima como alvo terapêutico levou a Glaxo Wellcome a realizar uma triagem de 25.000 substâncias empregando o ensaio colorimétrico desenvolvido pelo Prof. Alan Fairlamb (El-Waer et al, 1991; Hamilton et al, 2003). A triagem resultou na seleção de 100 moléculas-modelo para possível desenvolvimento. O uso deste ensaio consiste em uma abordagem promissora para a descoberta de novos protótipos de drogas contra cinetoplastídeos, como *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani* e *L. major* (Fairlamb, 2003).

3.4 Metabólitos bioativos de basidiomicetos

Fungos pertencem ao reino *Eucariota* e caracterizam-se, principalmente, pela ausência de plastídios, presença de mitocôndria com cristas achatadas, complexo de Golgi e parede celular formada por quitina e β -glucana. Obtêm nutrientes por absorção, apresentam reprodução sexuada ou assexuada, são unicelulares ou filamentosos, sapróbios, mutualistas ou parasitos (Kirk et al, 2001).

Até o momento, foram descritas 72.000 espécies de fungos, mas de acordo com Hawksworth (1991, 2004) o grupo pode chegar a 1,5 milhões de espécies, o que significa que 95% das espécies ainda não foram descobertas.

O reino Fungi possui 4 filas: Ascomycota, Basidiomycota, Crytridiomycota e Zigomycota. O grupo deuteromycota não é aceito como uma categoria formal, pois não é uma unidade monofilética e engloba fungos que perderam a fase sexuada ou são anamórficos de outros filas, principalmente dos filas Ascomycota e Basidiomycota (Kirk et al, 2001).

O filo Basidiomycota possui 4 classes, 33 ordens e cerca de 30.000 espécies descritas. A principal característica deste filo é a presença de uma estrutura reprodutiva em forma de clava, o basídio, que contém de 2-4 células haplóides (esporos) denominadas basidiosporos (Figura 2). Durante a reprodução sexuada, as hifas de dois fungos se fundem, gerando um micélio binuclear (dicariótico), que freqüentemente possui conexões em forma de ansas (asa). Ocorre então, a fusão nuclear e posteriormente, a meiose e a formação dos basidiosporos. O micélio pode ser encontrado no solo, na madeira, formar rizomas, micorrizas (associação entre

fungos e plantas) ou anéis de basidiomas sobre gramíneas e plantas (Kirk et al, 2001).

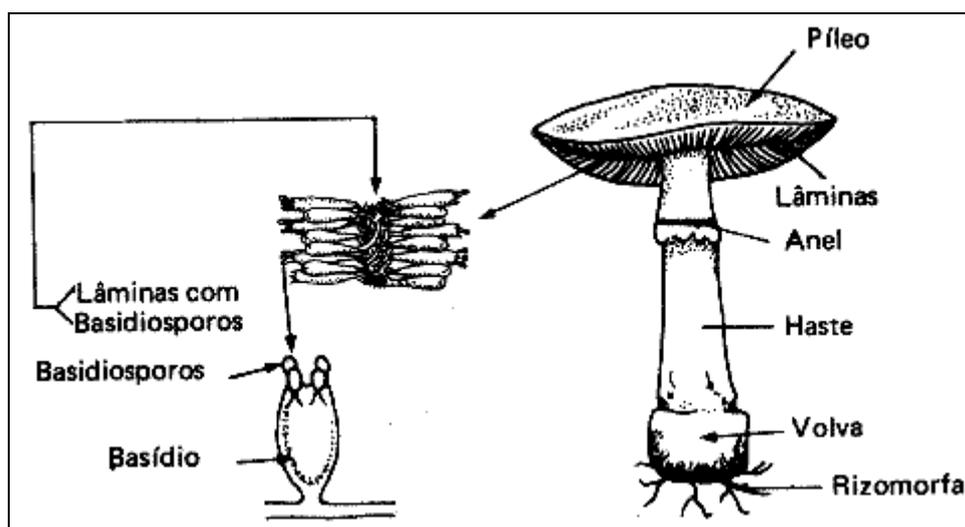


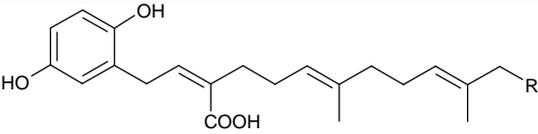
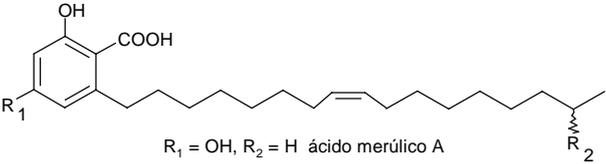
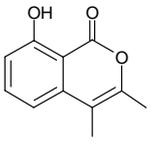
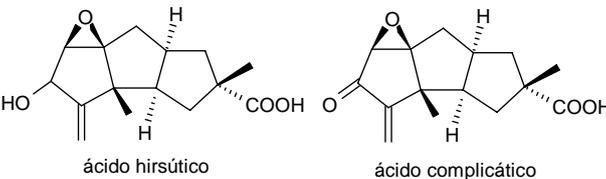
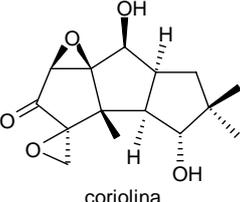
Figura 2 - Principais estruturas de um fungo pertencente ao filo Basidiomycota.

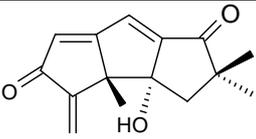
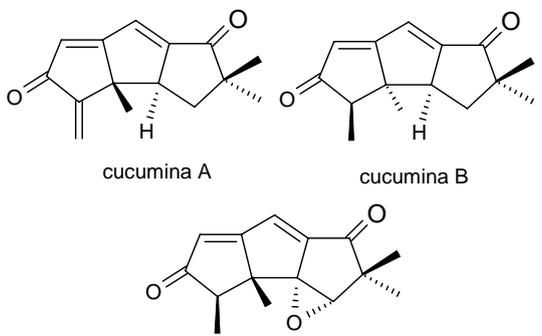
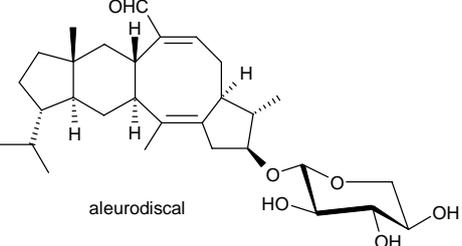
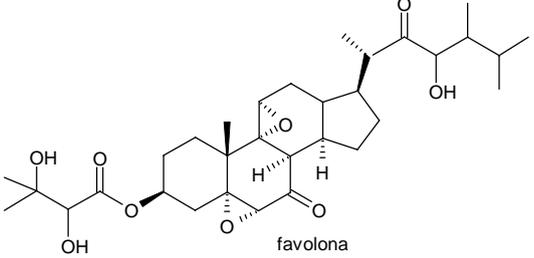
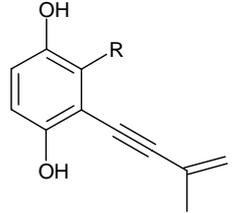
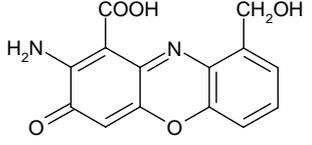
Fonte: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos.htm. Acesso em: 20/09/2006.

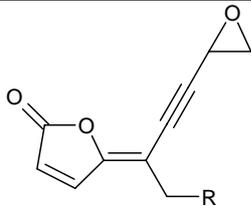
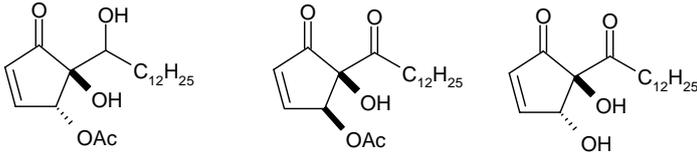
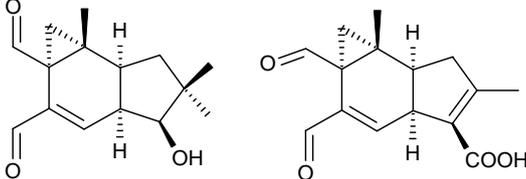
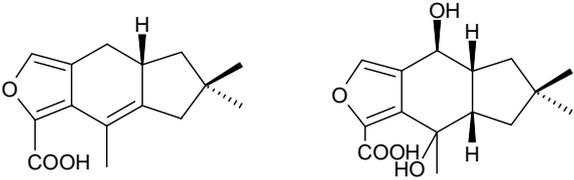
Muitos basidiomicetos são sapróbios e, portanto, importantes para a ciclagem dos nutrientes no meio ambiente (Capelari, 1989). Esses fungos são usados desde os tempos antigos como alimento (*Agaricus bisporus*), alucinógeno (*Amanita muscaria*), medicamento (*Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*) ou como fonte de corante (*Mycena leaiana*). *Fomes fomentarius* e *Piptoporus betulinus*, ambos da família Polyporaceae, foram encontrados no corpo do velho Otzi, homem do gelo descoberto nos Alpes com idade estimada de cerca 5.700 anos. Cientistas acreditam que esses cogumelos eram usados para tratar infecções devido às suas propriedades antimicrobianas e/ou para iniciar fogo (Stamets, 2002). Existem relatos referentes ao uso do fungo *Fomitopsis officinalis*, para o tratamento da tuberculose, pelo médico grego Dióscorides. Porém, o marco mais importante em relação aos basidiomicetos foi a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum* (Ascomycota), o que impulsionou a exploração da atividade antibiótica dos basidiomicetos pela indústria farmacêutica (Stamets, 2002).

Existem várias publicações descrevendo a atividade antimicrobiana de fungos da família Polyporaceae. Na tabela 3, encontram-se diversos compostos isolados de basidiomicetos com atividade antibacteriana e/ou antifúngica (Erkel , Anke, 1997; Brizuela et al, 1998; Levy et al, 2003; Lübken et al, 2004; Zjawiony, 2004).

Tabela 3 - Substâncias isoladas de basidiomicetos com atividade antimicrobiana

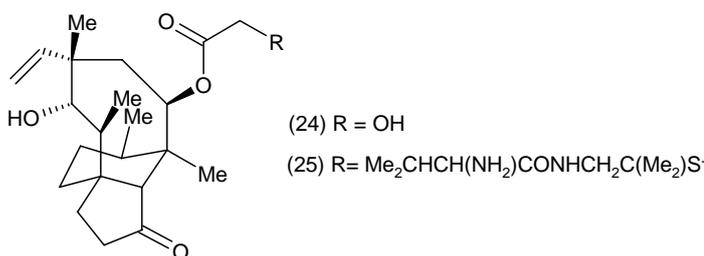
Substância	Espécie	Microorganismo alvo
 <p>R = OH ganomicina A R = H ganomicina B</p>	<i>Ganoderma pfeifferi</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina e <i>Micrococcus flavus</i>
 <p>R₁ = OH, R₂ = H ácido merúlico A R₁ = H, R₂ = OH ácido merúlico B R₁ = H, R₂ = H ácido merúlico C</p>	<i>Phelia radiata</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium insidiosum</i> , <i>Micrococcus roseus</i> e <i>Sarcina lutea</i> (CIM 0,4-10 µg/mL)
 <p>oospolactona</p>	<i>Gleophyllum sepiarium</i>	<i>Alternaria</i> sp. (ascomiceto)
 <p>ácido hirsútico ácido complicático</p>	<i>Stereum complicatum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
 <p>coriolina</p>	<i>Coriolus consors</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> (CIM 12,5 µg/mL)

 <p>incarnal</p>	<p><i>Gloeostereum incarnatum</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i></p>
 <p>cucumina A cucumina B</p> <p>cucumina C</p>	<p><i>Macrocistia cucumis</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. brevis</i>, <i>Nemastospora coryli</i>, <i>Penicillium notatum</i> e <i>Mucor mihei</i></p>
 <p>aleurodiscal</p>	<p><i>Aleurodiscus mirabilis</i></p>	<p><i>Mucor miehei</i> (zigomiceto)</p>
 <p>favolona</p>	<p><i>Favalaschia</i> sp.</p>	<p><i>Mucor miehei</i>, <i>Paecilomyces varioti</i> e <i>Penicillium iscandicum</i></p>
 <p>R = CHO, frustulosina R = CH₂OH, frustulosinol</p>	<p><i>Stereum frustulosum</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus mycooides</i>, <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Vibrio cholera</i></p>
 <p>cinabarina</p>	<p><i>Pycnoporus sanguineus</i></p>	<p><i>Bacillus cereus</i> e <i>Leuconostoc plantarum</i></p>

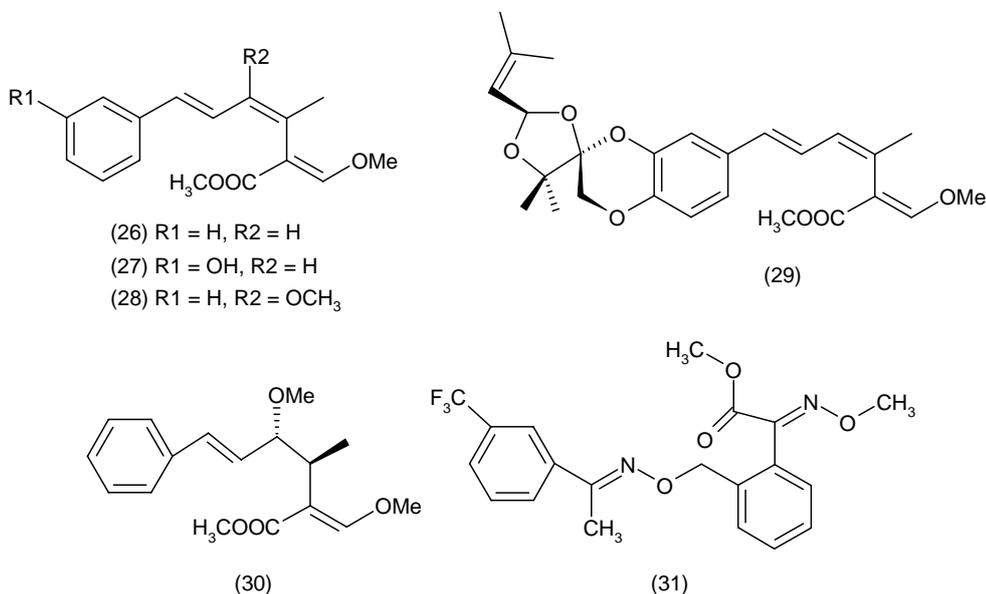
 <p>R = OH aporpinona B R = OCOCH₃ 1"-acetilaporpinona B</p>	<p><i>Aporpium caryae</i></p>	<p><i>Bacillus subtilis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i></p>
 <p>4-O-acetil higroforona A¹² 4-O-acetil higroforona C¹² 4-higroforona D¹²</p>	<p><i>Hygrophorus persoonii</i>, <i>Hygrophorus pustulatus</i> e <i>Hygrophorus persoonii</i></p>	<p><i>Cladosporium cucumerinum</i></p>
 <p>10-hidróxi-isoveleral ácido hidrogrâmico</p>	<p><i>Clitocybe hydrograma</i></p>	<p><i>Bacillus</i> spp.</p>
 <p>tsugicolina F tsugicolina P</p>	<p><i>Laurilia tsugicola</i></p>	<p><i>Bacillus</i> spp. e <i>Sarcinea lutea</i></p>

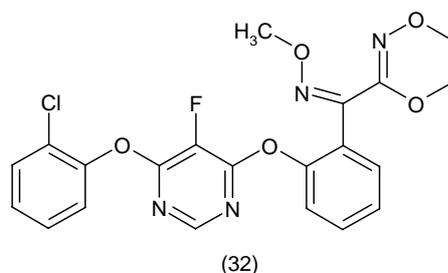
Fonte: Amone et al, 1997, 1998; Brizuela et al, 1998; Erkel, Anke, 1997; Hellwig et al, 1998; Levy et al, 2003; Lübken et al, 2004; Monthana et al, 2000; Takazawa, Kashino, 1991; Zjawiony, 2004.

O diterpeno pleuromutilina (24), isolado de *Pleurotus mutilus* e *P. passeckerianus*, é usado como precursor de derivados usados para o tratamento de enfermidades produzidas por micoplasmas em bovinos (Erkel , Anke, 1997; Ripley et al, 2004). O seu derivado valnemulina (Econor®) (25) foi desenvolvido em meados de 1990 pela indústria Novartis e é utilizado para o controle da pneumonia enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Também é usado para a prevenção e tratamento de disenteria causada por *Brachyspira hyodysenteriae* em suínos. Em janeiro de 2004, esta substância foi aprovada para o controle da enteropatia proliferativa (ileíte) causada por *Lawsonia intracellularis* e para a prevenção de colite (*B. pilosicoli*) em porcos (Bacqué et al, 2002; Ripley et al, 2004).



Os gêneros *Agaricus* (26 e 27), *Favolaschia* (26-30), *Myena* (26 e 30) e *Oudemansina* (26 e 30) produzem estrobilurinas (26-29) e/ou oudemansina A (30). Essas substâncias aromáticas têm atividade contra vários fungos filamentosos (CIM 0,1-1 µg/mL), mas não possuem atividade antibacteriana. Agem bloqueando a respiração de fungos por inibição da oxidação do ubiquinol, componente do complexo mitocondrial bc1 (Erkel , Anke, 1997; Zjawiony, 2004). Estrobilurinas são moléculas que serviram de modelo para o desenvolvimento de análogos sintéticos, tais como trifluoroestrobina (31) e fluoxaestrobina (32), fungicidas usados atualmente na agricultura (Heinemann et al, 2004).

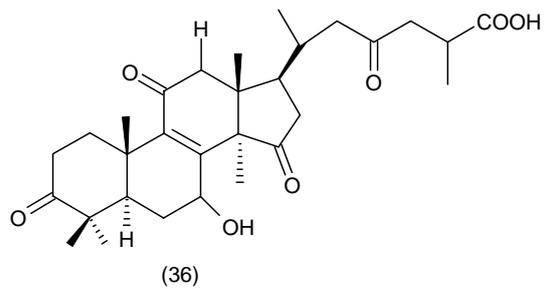
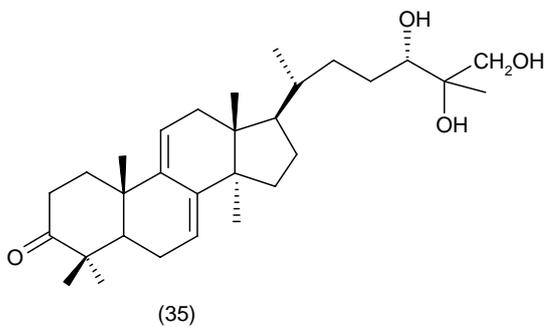
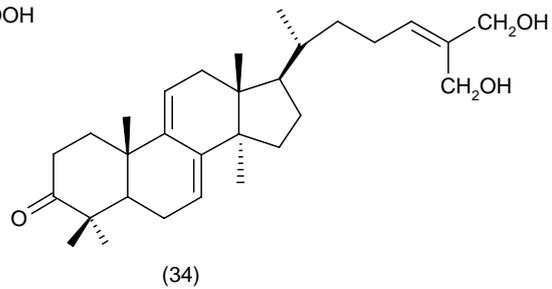
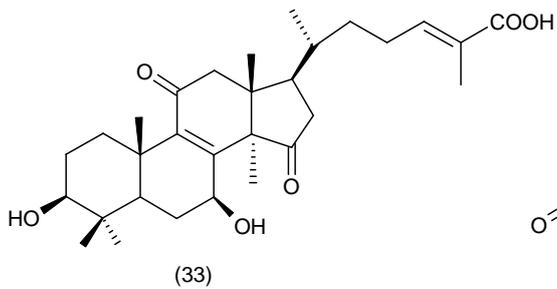




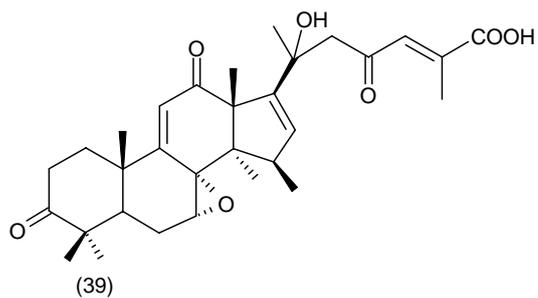
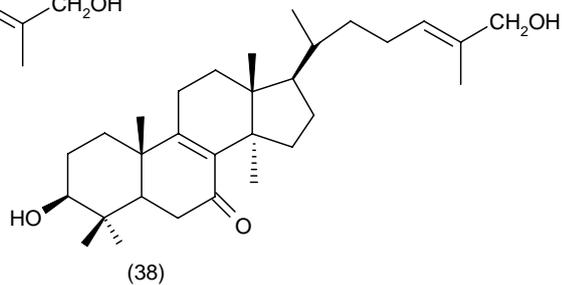
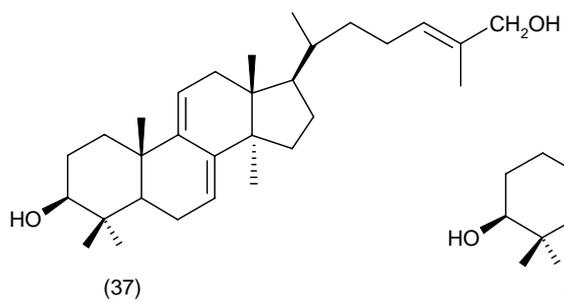
Mucidina (26), um antibiótico antifúngico isolado do cultivo micelial de *Oudemansiella mucida*, apresenta alta atividade citotóxica frente a uma grande variedade de leveduras. Por isso, tem sido utilizada para o tratamento tópico de dermatomycoses pelo nome comercial de Mucidermin Spofa®. Foi o primeiro antibiótico produzido a partir de basidiomicetos e aplicado clinicamente na República Checa (Brizuela et al, 1998).

Uma triagem mais recente foi realizada por Rosa e colaboradores (2003) e teve como objetivos explorar a biodiversidade brasileira e descobrir novas substâncias ativas. O grupo avaliou a atividade antifúngica e antibacteriana de 103 extratos orgânicos provenientes de 103 isolados de basidiomicetos em um painel de microrganismos patogênicos. 14% dos extratos apresentaram atividade contra um ou mais microrganismos, sendo este um trabalho pioneiro já que a maioria dos estudos realizados no Brasil investiga somente as atividades farmacológicas e fitoquímicas de basidiomicetos comestíveis (Ishikawa et al, 2001; Paccola et al, 2001, Oliveira et al, 2002).

Muitos basidiomicetos demonstram atividade antiviral estão descritos na literatura. O fungo *Ganoderma lucidum* é vendido associado a oito espécies vegetais como suplemento alimentar para tratamentos alternativos que visam a promoção da saúde, da longevidade e da “saúde da próstata” em países asiáticos (Ades et al, 2001). Os corpos de frutificação dessa espécie são fontes de diversos triterpenos (33-36) com atividade inibitória da protease do vírus HIV (Min et al, 1998; El-Mekkawy et al, 1998).

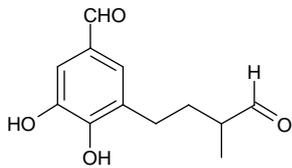
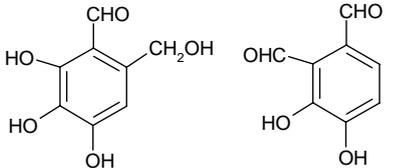
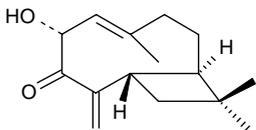


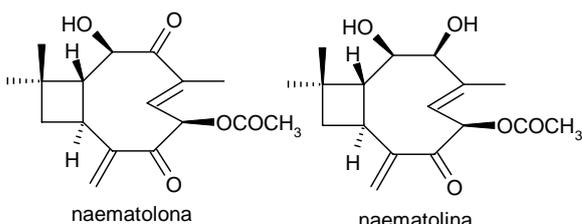
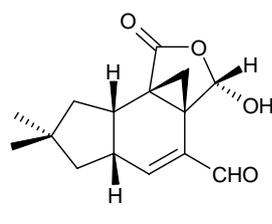
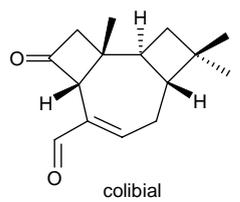
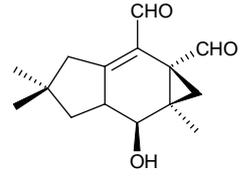
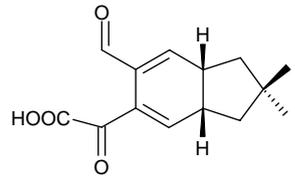
Recentemente foram isolados outros três triterpenos (37-39) de *Ganoderma pfeifferi* com atividade contra os vírus influenza do tipo A e HSV do tipo 1 (Mothana et al, 2003).

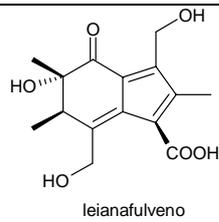


Os cogumelos medicinais são usados contra o câncer na China, Rússia, Japão, Coreia, EUA e Canadá. Existem cerca de 200 espécies de basidiomicetos com capacidade de inibir tumores (Wasser , Weis, 1999). Muitas espécies são comestíveis (*Grifola frondosa*, *Polyporus confluens*, *Hericium erinaceum*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor*) e por isso o uso com propósito nutricional está associado ao valor medicinal (Wasser, Weis, 1999). Em 1991, o valor do mercado de fungos medicinais e seus suplementos alimentares era estimado de 1,2 bilhões de dólares e, em 1999, de 6 bilhões de dólares (Lindequist, Niedermeyer, Jülich, 2005). A maioria das substâncias citotóxicas e antitumorais de espécies de basidiomicetos é de natureza terpenoídica e apresenta outras atividades biológicas (Tabela 4) (Harttig et al, 1990, Erkel et al, 1992, Simon et al, 1995, Erkel, Anke, 1997, Clericuzio et al, 1999; Zjawiony, 2004).

Tabela 4 - Substâncias isoladas de basidiomicetos com atividades biológicas relacionadas à toxicidade

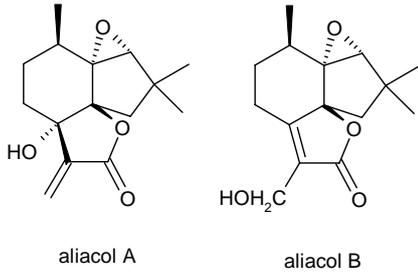
Substância	Espécie	Atividade biológica
 <p>montadial A</p>	<i>Bondarzewia montana</i>	Citotoxicidade frente à linhagem linfocítica leucêmica L1210 (CI ₅₀ = 10 µg/mL) e linhagem promielocítica leucêmica humana HL60 (CI ₅₀ = 5 µg/mL)
 <p>fornecina A fornecina B</p>	<i>Pyroformes demidoffii</i>	Citotoxicidade frente à linhagens HeLA (CI ₅₀ = 20 µg/mL), MDCK(CI ₅₀ = 14 µg/mL) e FL (CI ₅₀ = 17 µg/mL)
 <p>cariofilenol</p>	<i>Lactarius subumbonatus</i>	Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>

 <p>naematolona naematolina</p>	<p><i>Panus</i> spp.</p>	<p>Inibem a incorporação de timidina no DNA em células ascíticas de carcinoma de Erlich</p>
 <p>ácido marásmico</p>	<p><i>Marusmius conigenus</i>, <i>Lachnella</i> sp. e <i>Peniophora laeta</i></p>	<p>Prolonga o tempo de vida de camundongos com leucemia linfocítica P388</p>
 <p>colibial</p>	<p><i>Collybia confluens</i></p>	<p>Atividade citotóxica em linhagem de células HL-60</p>
 <p>merulidial</p>	<p><i>Merulius tremellosus</i></p>	<p>Inibe a síntese de DNA em células ascíticas de carcinoma de Ehrlich à 1 µg/mL</p>
 <p>ácido clavicornônico</p>	<p><i>Clavicornona pyxidata</i></p>	<p>Inibidor de DNA polimerases direcionada ao RNA</p>



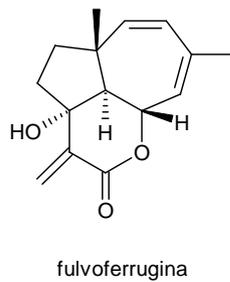
Mycena leaiana

Citotóxico e mutagênico em teste de Ames



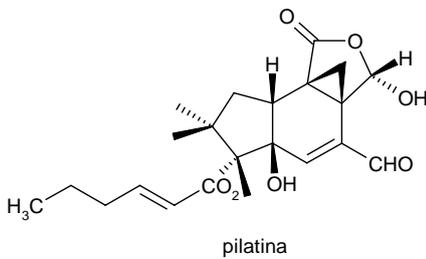
Marasmius alliaceus

Inibem a síntese de ácidos nucleicos em células ascíticas do tumor de Ehrlich na concentração de 2-10 µg/mL



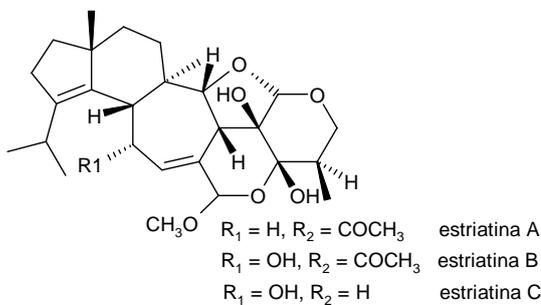
Marasmius fulvoferrugineus

Inibe a incorporação de leucina, uridina e timidina na síntese de RNA, proteínas e DNA



Flagelloscypha pilatii

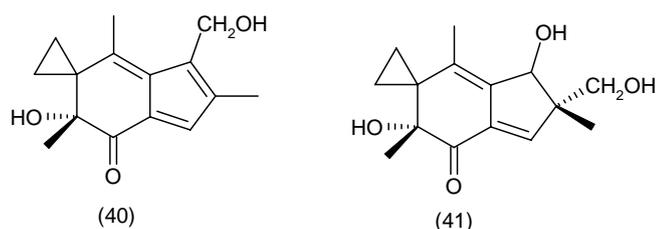
Interfere com a síntese de DNA, RNA em células ascíticas de tumor de Ehrlich



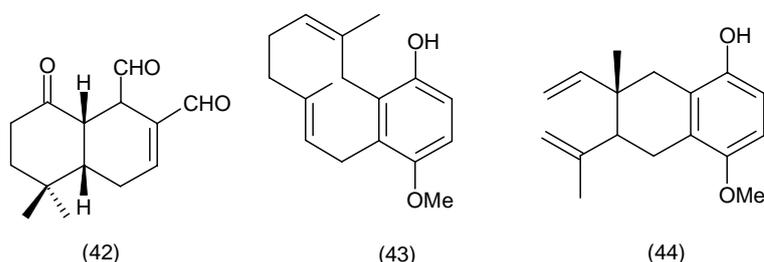
Cyathus striatus,
Cyathus poeppigii,
Cyathus limbatus e
Cyathus montagnei

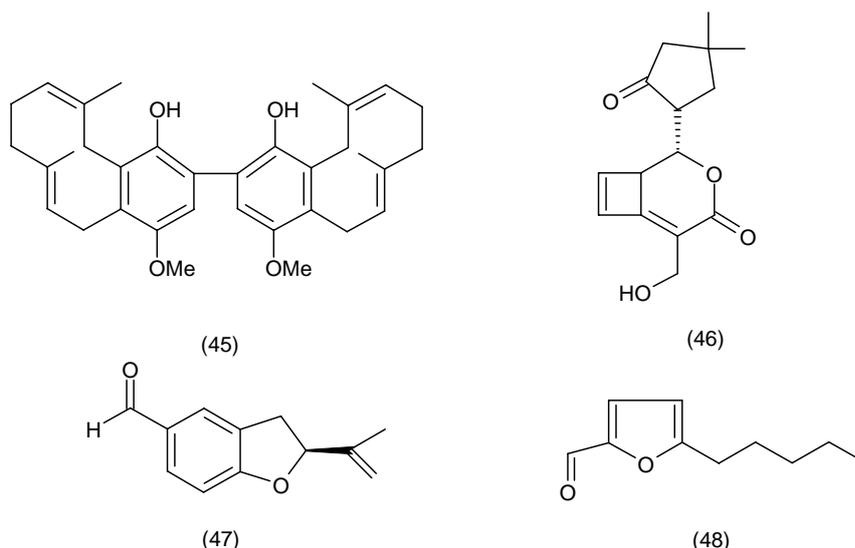
Interferem com a síntese de DNA, RNA em células ascíticas de tumor de Ehrlich e prolongam o tempo de vida de camundongos com leucemia linfocítica P388

a fase S do ciclo celular e leva à morte por indução da apoptose (El Kamar et al, 2003, Poindessous et al, 2003). O irofulveno chegou até a fase III em ensaios clínicos de pacientes portadores de câncer pancreático refratários a gencitabina. Entretanto, em abril de 2001, a empresa MGI Pharma anunciou a suspensão do estudo pois a droga controle demonstrou benefício superior em relação a sobrevivência dos pacientes quando comparada ao irofulveno. Por outro lado, estudos que envolvem a associação do irofulveno com outros quimioterápicos para o tratamento de tumores sólidos ainda estão sendo realizados (El Kamar et al, 2003, Van Larr et al, 2004).



Cogumelos comestíveis apresentam diferentes propriedades medicinais tais como antiinflamatórias, antidiabéticas, hipocolesterolêmicas e antioxidantes. A literatura confirma as características medicinais desses fungos pela presença de substâncias isoladas de basidiomicetos que apresentam as mais variadas atividades biológicas (Stamets, 2002, Wasser, 2002). Por exemplo, panudial (42), isolado das espécies de *Panus*, é um inibidor da agregação plaquetária, enquanto que os flavidulóis A (43), B (44) e C (45), obtidos de *Lactarius flavidulus*, são imunossupressores. Fomanisina (46) e fomanoxina (47), provenientes de *Fomes annosus*, são fitotóxicas e o 5-pentil-2-furaldeído (48), isolado de *Irpex lacteus*, é nematocida (Erkel, Anke, 1997).





Os basidiomicetos também têm fornecido inúmeros inibidores de enzimas que são importantes para o controle de diversas doenças (Tabela 5). Além disso, muitas espécies são usadas na indústria para a produção de aromatizantes por processos biotecnológicos (Erkel, Anke, 1997, Brizuela et al, 1998; Lomascolo et al, 1999).

Tabela 5 - Inibidores de enzimas provenientes de basidiomicetos

Inibidor	Basidiomiceto	Alvo enzimático
ácido clavitorônico	<i>Clavicornia pyxidata</i>	transcriptase reversa
mevinolina	<i>Monascus ruber</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
tiromicina A	<i>Tyromyces lacteus</i>	leucina e cisteína aminopeptidase
caloporosídeo	<i>Caloporus dichrous</i>	fosfolipase C
coriolina B	<i>Coriolus consors</i>	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
panepofenantrina	<i>Panus rudis</i>	enzima ativadora da ubiquitina

Fonte: Brizuela et al, 1998; Erkel, Anke, 1997; Lomascolo et al, 1999; Sekizawa et al, 2002.

O Brasil não possui uma micota suficientemente estudada, sendo que muitas espécies ainda não foram identificadas (Rosa, 2003). A descoberta da espécie *Agaricus blazei*, conhecido popularmente como “Cogumelo do Sol”, é um bom exemplo do pouco conhecimento e exploração das espécies de fungos encontradas no ecossistema brasileiro. Este cogumelo, natural da Mata Atlântica, foi coletado inicialmente por um agricultor na cidade de Piedade, Estado de São Paulo. A espécie foi, então, enviada para o Japão para o estudo das suas propriedades medicinais (Shibata, Demiate, 2003). De *A. blazei* foram obtidas frações com propriedades imunoestimuladoras, anticâncer e antitumoral. Além disso, a Associação do Câncer do Japão provou a eficácia deste fungo em câncer de cólon, ovário, mama, pulmão bem como em tumores sólidos (Wasser, 2002).

A exploração de fungos provenientes da biodiversidade brasileira está apenas no início. A possibilidade de aplicação dos basidiomicetos como suplementos alimentares ou como fontes de substâncias biologicamente ativas demonstra o potencial desse filo.

3.5 O gênero *Lentinus*

Lentinus são fungos sapróbios, lamelares e decompositores de madeira. Os fungos desse gênero pertencem à família Polyporaceae (filo Basidiomycota) e são representados por 40 espécies conhecidas (Kirk et al, 2001).

O gênero tem distribuição essencialmente tropical (Ásia, Indonésia, Austrália, Papua Nova-Guiné) e algumas espécies são raramente encontradas em regiões polares (Pegler, 1983; Rólen, 2001).

Os gêneros *Lentinus* e seu correlato *Panus* são caracterizados por possuírem lamela decorrente e um sistema de hifas dimítico (hifas com grampos de conexão e hifas esqueléticas sem grampos), que dá aos basidiomas uma textura coriácea. Existe muita controvérsia sobre a nomenclatura e a taxonomia de *Lentinus* e *Panus*. O himenóforo lamelar, parte inferior do corpo de frutificação que contém os esporos sexuais, e, as microestruturas similares têm causado conflitos nas classificações. A determinação das espécies é difícil devido à ocorrência de um alto grau de polimorfismo, da presença de um complexo em microestrutura e do desenvolvimento secundário de estruturas protetoras (Pegler, 1983). O uso de técnicas de seqüenciamento de DNA sugere que, apesar de Pegler (1983) definir o gênero como polifilético, pode existir três grupos monofiléticos: *Lentinus*, *Panus* e *Neolentinus*. Recentemente Rólen (2001) confirmou a distinção entre *Lentinus* e *Panus* a partir do seqüenciamento da região espaçadora (“Internal Transcribed Spacer” – ITS) do rDNA e de dados morfológicos.

Lentinus strigosus (Figura 3) é uma das espécies mais distribuídas do gênero. Foi descrita originalmente na Carolina do Norte, EUA, e é encontrada em regiões subtropicais e subtemperadas (Pegler, 2001).



Figura 3 - Corpo de frutificação de *Lentinus strigosus*.

Fonte: Luiz Henrique Rosa

3.5.1 Constituintes químicos do gênero *Lentinus*

Poucas espécies do gênero *Lentinus* foram investigadas quimicamente até o momento. Do cultivo micelial de *Lentinus lepideus* Fr., contendo isoleucina como única fonte de nitrogênio, foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) vários sesquiterpenos de esqueleto cadinano hidrocarbonados e alcoólicos (Figura 4) (Hanssen, 1982; 1985).

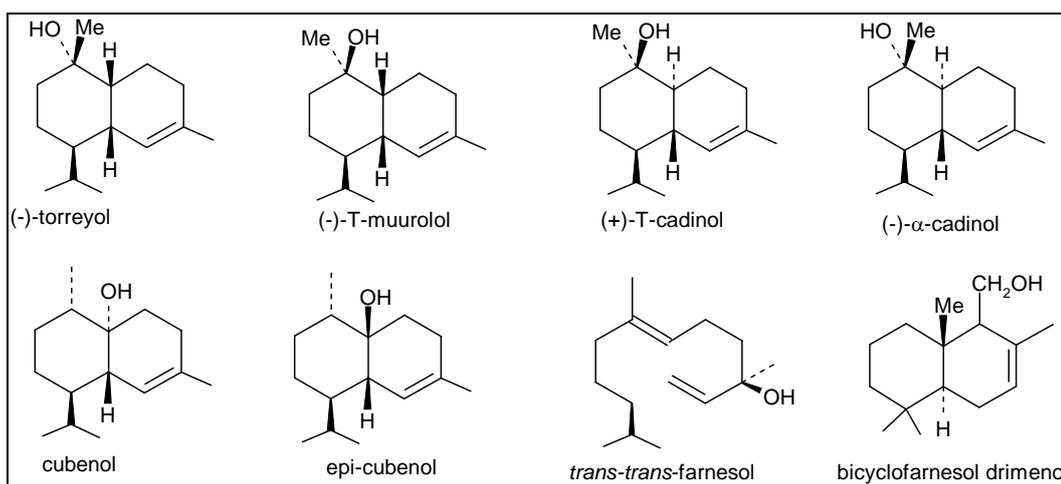
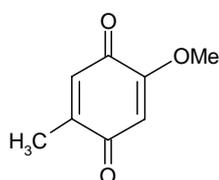


Figura 4 - Exemplos de álcoois sesquiterpênicos identificados no destilado obtido do cultivo líquido de *Lentinus lepideus*.

Fonte: Hanssen, 1982; 1985.

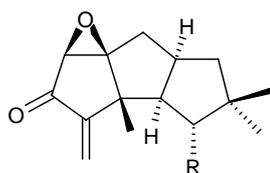
Posteriormente, Jin et al (1996) extraíram da cultura micelial de *Lentinus lepideus* uma proteoglicana denominada “lepidano” que induziu a proliferação de esplenócitos de camundongos por ativação do fator de transcrição NF-κB.

Anchel (1948) relatou o isolamento de uma benzoquinona com propriedades antibacterianas e antifúngicas, a partir do cultivo em meio líquido de *L. degener*. Esse mesmo metabólito (2-metoxi-5-metil-1,4-benzoquinona) (49) foi obtido do cultivo micelial de *L. adherens*, espécie selecionada a partir de um estudo de triagem para substâncias antitrombóticas utilizando ensaios de agregação plaquetária com plasma bovino. O ensaio com plaquetas humanas demonstrou que esta substância é capaz de inibir a agregação plaquetária, com uma CI_{50} de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e age como um antagonista do receptor de tromboxano A2 (Lauer, Anke, Hansske, 1991).



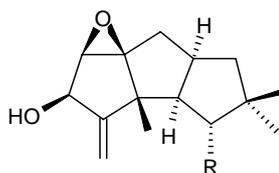
(49)

Quatro sesquiterpenos (50-53) foram isolados do extrato obtido do cultivo em meio líquido de *L. crinitus*, um cogumelo encontrado na África que cresce sobre a madeira em decomposição. 1-desoxi-hipnofilina (50) e hipnofilina (51) foram os metabólitos isolados mais ativos pois apresentaram atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos em concentrações que variam de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Abate, Abraham, 1994).



(50) R=H

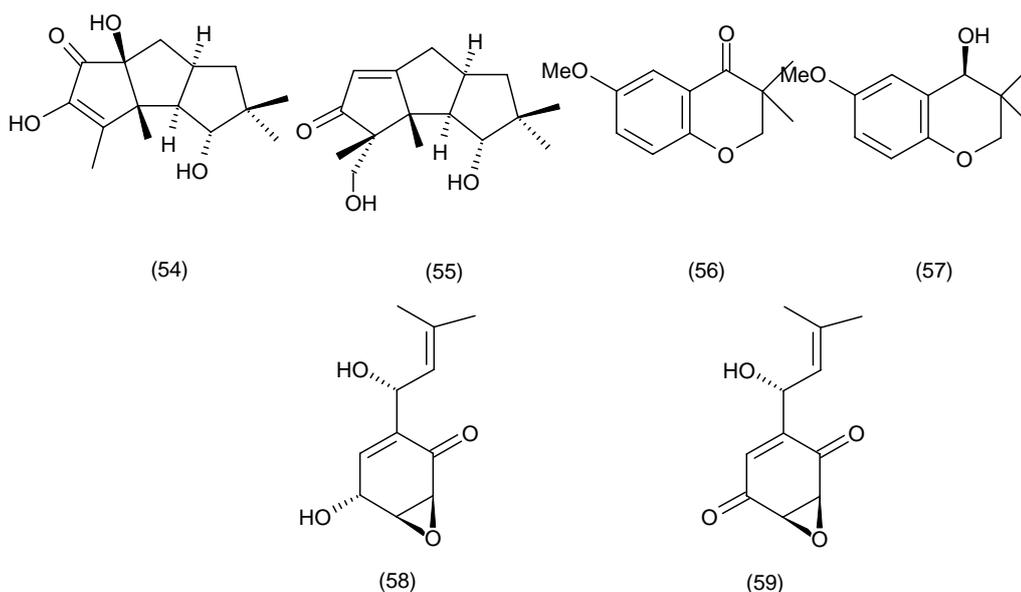
(51) R=OH



(52) R=H

(53) R=OH

Recentemente, foram isolados oito metabólitos do extrato em acetato de etila do cultivo de *Lentinus connatus*: hipnofilina (51), dihidrohipnofilina (53), conatusinas A (49) e B (50), as cromonas (56) e (57), panepoxidona (58) e panepoxidiona (59). As substâncias (58) e (59) apresentaram atividade citotóxica contra todas as linhagens tumorais testadas (KB, BC, NCI-H187 e Vero), enquanto que a dihidrohipnofilina (53) foi ativa somente contra as linhagens NCI-H187 e Vero. Por outro lado, todas três foram ativas contra *Plasmodium falciparum* (CI_{50} de 2,1 a 3,4 $\mu\text{g/mL}$) (Rukachaisirikul et al, 2005).



3.6 A família Orquidaceae

A família Orquidaceae possui 775 gêneros e cerca de 19.500 espécies (Judd et al, 2002). Embora a família esteja distribuída em quase todas as regiões do planeta, a grande maioria das espécies concentra-se em florestas tropicais e subtropicais úmidas e cresce predominantemente na condição de epífita (Toscano, Moraes, 2002; Waechter, Baptista, 2004).

As orquídeas habitam diversos ecossistemas e são encontradas em florestas, campos, cerrados, dunas, restingas e tundras. São denominadas de epífitas as espécies que vivem sobre outras plantas e utilizam os seus galhos apenas como suporte pois são capazes de absorver os nutrientes provenientes da água da chuva que se depositam em suas raízes. Uma significativa parcela das espécies vive sobre ou entre as rochas e outras são terrestres. Existem, também, casos raros de

orquídeas subterrâneas (saprófitas) e aclorofiladas que se alimentam de matéria orgânica em decomposição (Toscano, Moraes, 2002).

As orquídeas são geralmente cultivadas pela beleza, exotismo e fragrância de suas flores. A importância econômica dessa família está relacionada à presença de espécies ornamentais, que inclui, principalmente, os gêneros *Cattleya*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Vanda*, *Brassia*, *Cymbidium*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Encyclia* e *Coelogyne* (Judd et al, 2002).

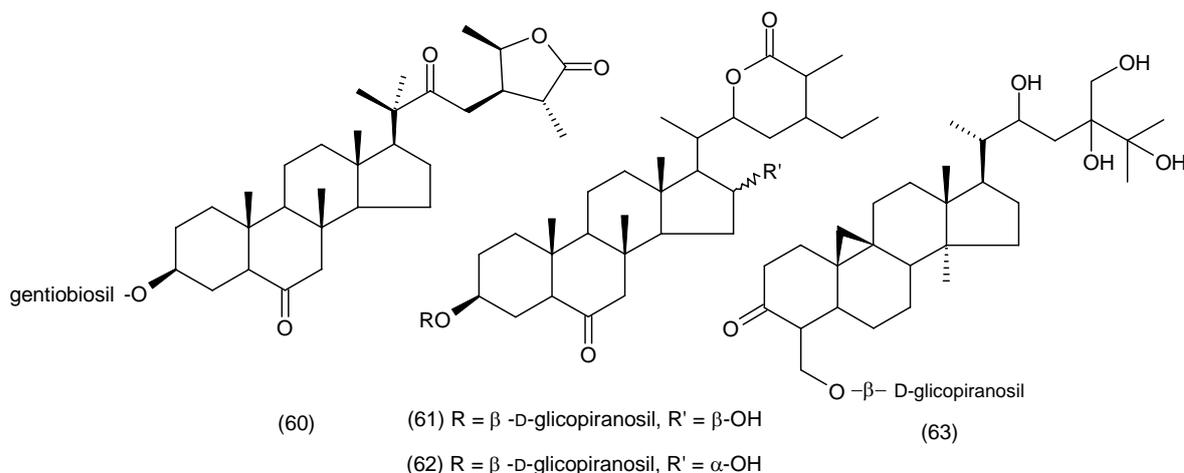
A espécie mais conhecida devido ao seu valor econômico é a *Vanilla planifolia*, nativa da América Central e Sul e, única espécie comestível da família Orquidaceae (Bythrow, 2005). Das vagens dessa espécie se extrai a essência de baunilha, produto importante para a obtenção da vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído), uma substância usada largamente como agente aromatizante em alimentos e como fragrância (Lomascolo et al, 1999). A vanilina possui atividade antimicrobiana contra leveduras associadas à deterioração de alimentos e contra *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua* (Fitzgerald, Stratford, Narbad, 2003; Fitzgerald et al, 2004). Vanilina possui propriedades anticarcinogênicas pois reduz os danos causados ao DNA por luz ultravioleta e raio-X (Keshava et al, 1998) e inibe a proteína quinase DNA-dependente (Duran, Karran, 2003). Uma pró-droga da vanilina, MX-1520, foi sintetizada e demonstrou ser capaz de reduzir o número de células falciformes em camundongos submetidos à condições de hipóxia (Zhang et al, 2004).

O Brasil é um dos países com a maior variedade de orquídeas do mundo, comparável em diversidade apenas com a Colômbia e ao Equador (Toscano, Moraes, 2002). Possui cerca de 12% das espécies do mundo e 1800 espécies endêmicas (Giulietti et al, 2005). Estudos registram cerca de 2.300 espécies para o território brasileiro, distribuídas na Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Campos Rupestres e Cerrado do Brasil Central (Barros et al, 2004).

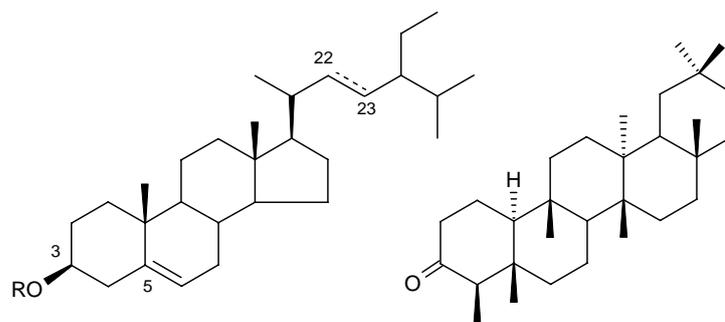
3.6.1 Aspectos químicos e biológicos da família Orquidaceae

Muitas espécies da família Orquidaceae são usadas tradicionalmente em países orientais como a China, Japão, Coréia; em países da África, pelos índios da América do Norte e aborígenes da Austrália para o tratamento de desordens de diferentes origens como úlcera, malária, tuberculose, inflamação e impotência (Kong et al, 2003; Bulpitt, 2005). Vários produtos contendo *Gymnadenia conopsea* e/ou *G. crassinervis* foram patenteados pelos chineses e são usados para o tratamento da diabetes (CN 1745810), doenças da próstata (CN 1745814), síndrome do climatério (CN 1742976) e reumatismo (CN 1762472).

Os primeiros estudos químicos sobre espécies da família Orquidaceae relatam a ocorrência de três glicosídeos esteroidais (60-62) em *Dendrobium ochreatum* (Behr, Leander, 1976) e de um triterpeno glicosilado (63) em *Cymbidium giganteum* (Dähmen, Leander, 1978).



O esteróide β -sitosterol (64) foi amplamente encontrado em espécies de orquídeas (Sachdev, Kushreshtha, 1986; Majumder, Kar, 1989; Majumder, Lahiri, 1990a; Majumder, Roychowdhury, Chakraborty, 1997; Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999; Chang, Lin, Chen, 2001; Fan et al, 2001; Sheng-Yang et al, 2004), enquanto que o estigmasterol (65), friedelina (66) e daucosterol (67) foram encontrados, respectivamente, em *Bulbophyllum protactum* e *Dendrobium clavatum*, *B. vaginatum* e *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* (Majumder, Roychowdhury, Chakraborty, 1997; Leong, Harrison, Powell, 1997; Chang, Lin, Chen, 2001; Sheng-Yang et al, 2004).



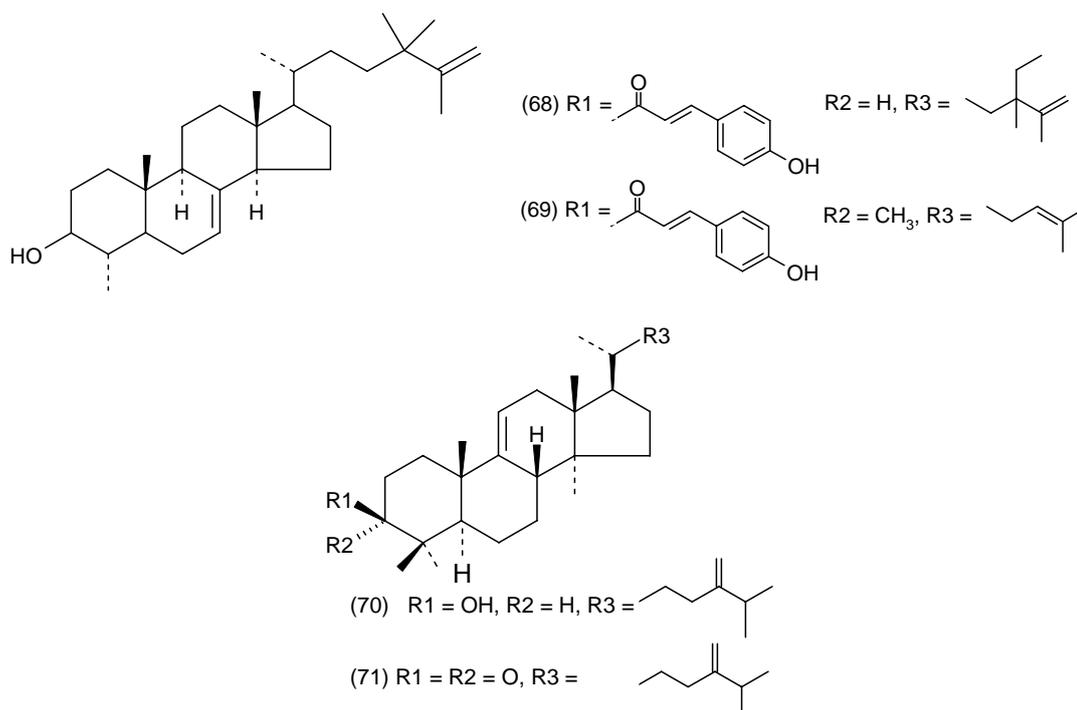
(64) R = H; 22,23-diidro

(66)

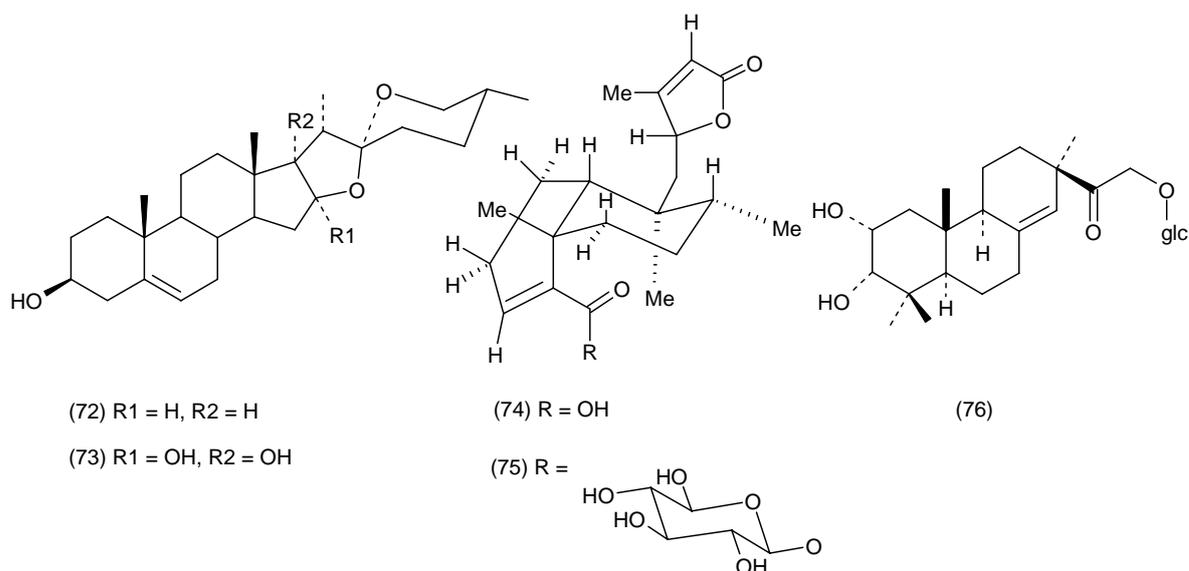
(65) R = H; Δ^{22}

(67) R = glicose; 22,23-diidro

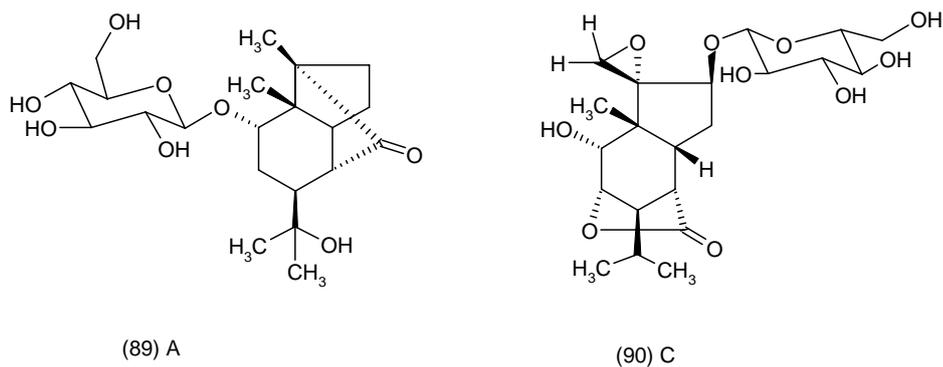
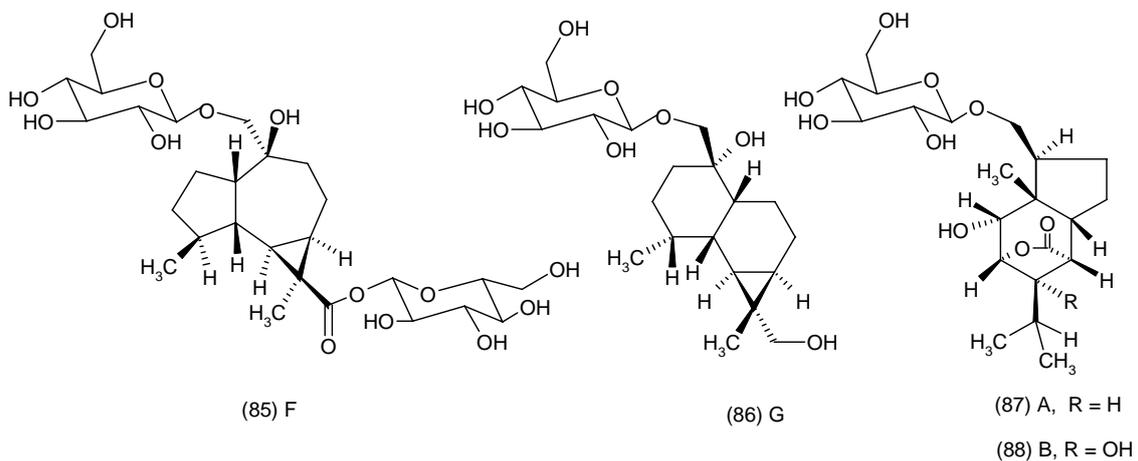
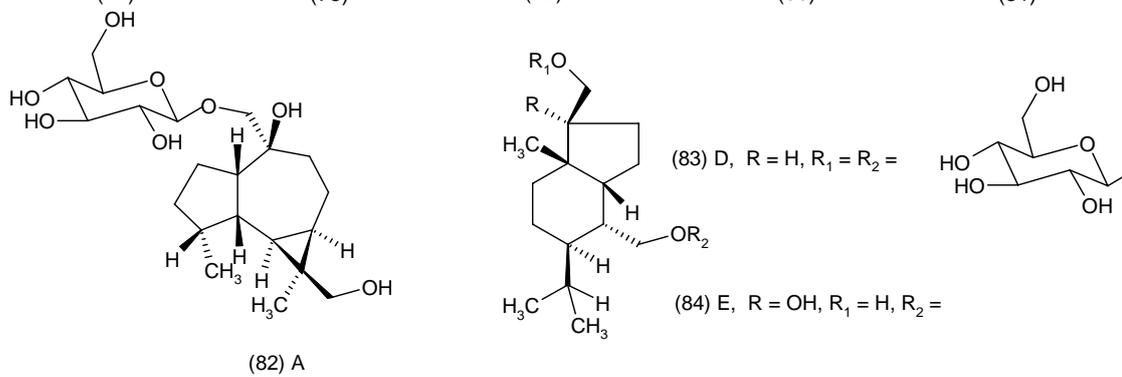
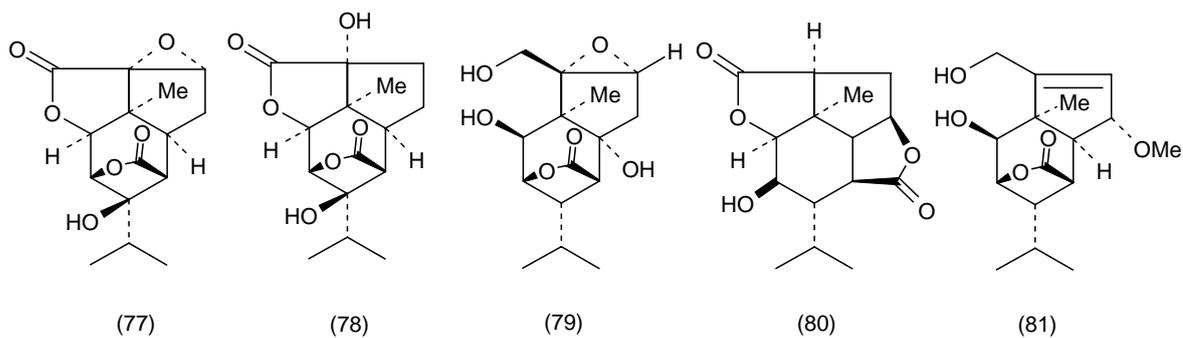
Uniflorina (68), isolada de *Coelogyne uniflora* e, arundinol (69), isolado de *Arundina bambusifolia*, se destacam nesse grupo de triterpenos por possuírem grupo cinamoil na posição 3 (Majumder, Pal, 1990; Majumder, Ghosal, 1994). Mais recentemente foram isolados do extrato metanólico de *Agrostophyllum brevipes* dois triterpenos; agrostofilinol (70) e agrostofilinona (71), que são considerados precursores de triterpenos tetracíclicos com cadeia lateral modificada (Majumder, Majumder, Sen, 2003).



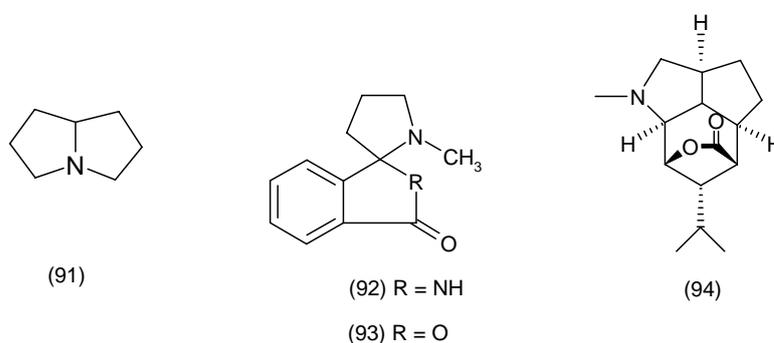
As saponinas diosgenina (72) e denfigenina (73) foram isoladas de *Dendrobium fimbriatum* (Talapra, Bhaumik, Talapra, 1992) ao passo que diterpenos glicosilados como o ácido efemérico (74), efemerosídeo (75) e efemerantosídeo (76) foram obtidos somente de extratos das espécies do gênero *Ephemerantha* (Niwa et al, 1987; Tezuka et al, 1991).



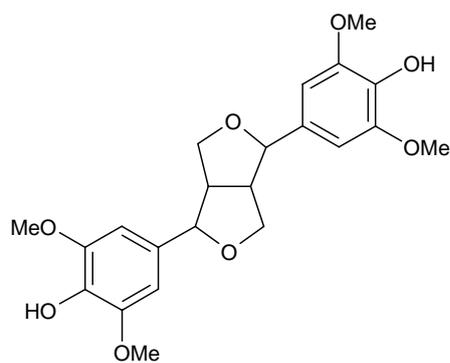
Sesquiterpenos do grupo picrotoxano foram encontrados em *Dendrobium aduncum* (aducina - 77) (Gawell, Leandeer, 1976), em *D. amoenum* (amotina - 78 e amoenina - 79) (Majumder, Guha, Sen, 1999) e em *Dendrobium* "Snowflake" (*D. cassiope* x *D. nobile*) (flankinina A - 80 e B - 81) (Morita et al, 2000). Relatos de atividade imunomoduladora de extratos de *D. nobile*, espécie usada na medicina chinesa por suas propriedades tônicas, levou ao isolamento de vários sesquiterpenos glicosilados denominados dendrosídeos A-G (82-86) e dendronobilosídeos A (87) e B (88), com propriedades estimulantes da proliferação de linfócitos em camundongos (Zhao et al, 2001; Ye, Qin, Zhao, 2002). O extrato butanólico dos caules de *D. moniliforme*, espécie usada popularmente na China para reduzir a febre e como sialagogo, também forneceu sete sesquiterpenos glicosilados, dos quais dendromonilisídeo A (89) e C (90) estimularam a proliferação de células B e inibiram a proliferação de células T, *in vitro*, na concentração de 10^{-5} M (Zhao et al, 2003).



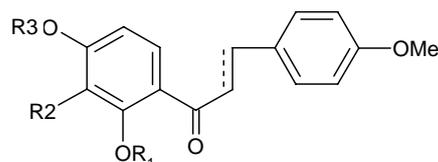
Os estudos de triagem fitoquímica para a detecção de alcalóides em espécies da família Orquidaceae começaram a ser realizados na década de 60 e tinham o objetivo estabelecer uma relação taxonômica entre as espécies (Lüning, 1967; Lawler, Slaytor, 1969). Posteriormente, vários alcalóides pirrolizidínicos (91) (cornucervina, laburnina, falaenopina T, grandifolina, lindelofidina) foram isolados de *Hammarbya paludosa*, *Liparis keitaoensis*, *Malaxis grandifolia*, *Phalaenopsis* spp., *Vanda* spp. e *Vandopsis* spp. (Lindström, Lüning, Siirala-Hansén, 1971; Brandänge et al, 1971; 1972; Lindström, Lüning, 1972; Brandänge, Granelli, 1973). Posteriormente, Borba et al (2001) utilizaram como um dos critérios para a identificação taxonômica de espécies do gênero *Pleurothallis*, encontradas nos campos rupestres do Brasil, a avaliação do teor de alcalóides pirrolizínicos. Dentre os alcalóides pirrolizínicos destacam-se também, shiunidina (92) e shisunina (93), ambos com atividade inibitória da enzima Na⁺, K⁺-ATPase e isolados de *Dendrobium loddigesii* (Kong et al, 2003). O alcalóide sesquiterpenolídico, dendrobina (94), estruturalmente relacionado a picrotoxina, um antagonista do receptor GABA, foi encontrado em *D. nobile* e demonstrou ser um antagonista da taurina e da β-alanina, inibidores pré-sinápticos da espinha dorsal de sapos (Kubo et al, 1983).



O levantamento bibliográfico realizado revelou que lignanas e chalconas, substâncias de esqueleto fenilpropânico, são raramente encontradas em orquídeas. O fracionamento do extrato diclorometânico de *Bulbophyllum vaginatum* levou ao isolamento da lignana conhecida como siringaresinol (95) (Leong, Harrison, Powell, 1999). Essa mesma substância foi isolada do extrato metanólico de *Lusia volucris*, que também forneceu as chalconas conhecidas como; 3-(4''-metoxi)-1-(2',4'-dihidroxi-3-metoxi)-prop-2-en-1-ona (96) e 3-(4''-metoxi)-1-(2'-hidroxi-4'-metoxi)-prop-2-en-1-ona (97) e, a dihidrochalcona lusianina (98) (Majumder, Lahiri, Mukhoti, 1995). Além disso, duas lignanas acetiladas, denominadas sanjidinas A (99) e B (100), que são isômeros entre si, foram isoladas dos tubérculos de *Pleione bulbocodioides* (Bai, Yamaki, Takagi, 1997).



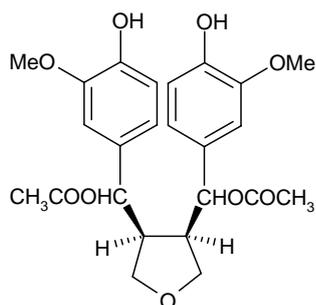
(95)



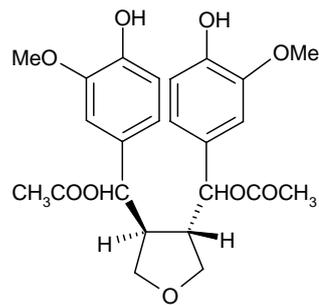
(96) R1 = R3 = H, R2 = OMe, 2,3-deidro

(97) R1 = R2 = H, R3 = Me, 2,3-deidro

(98) R1 = R3 = H, R2 = OMe, 2,3-diidro

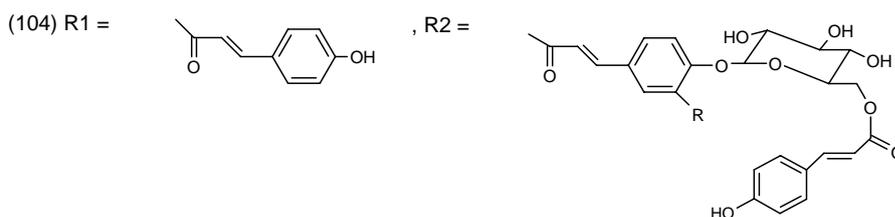
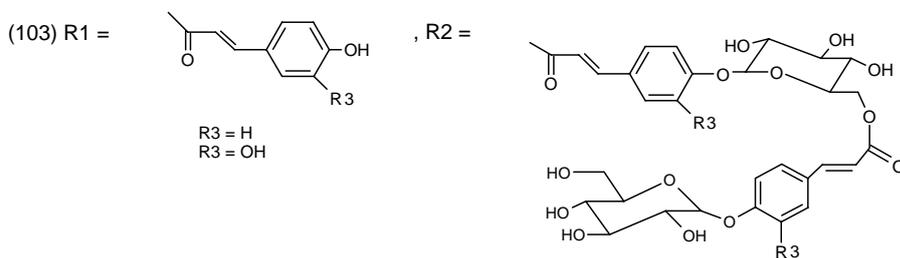
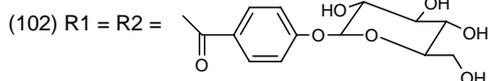
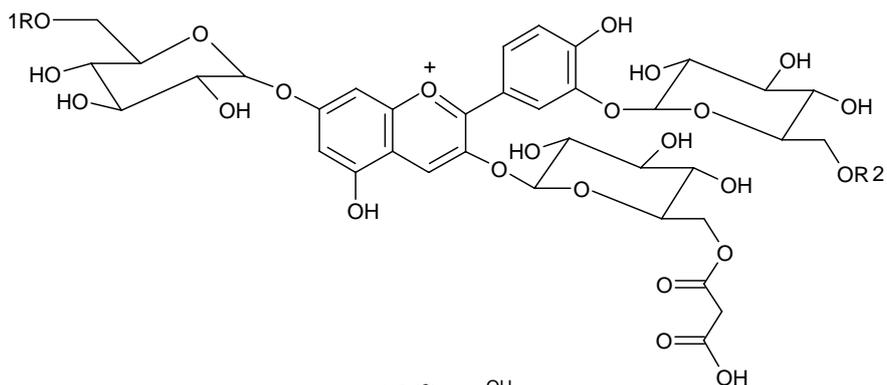
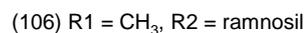
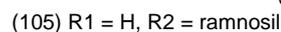
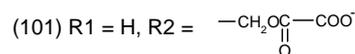
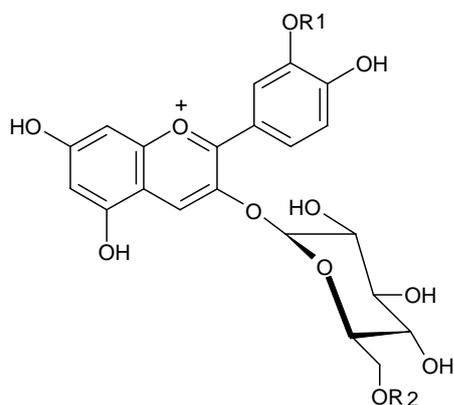


(99)



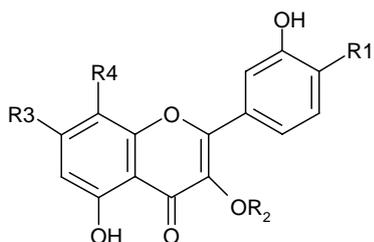
(100)

Antocianidinas de padrões estruturais complexos foram identificadas em flores de orquídeas. O estudo sobre a presença de fenilpropanóides em flores de espécies europeias revelou que a cianidina 3-O- β -(6''-O-oxalil)-glicosídeo (101) é a principal antocianidina encontrada em *Orchis* spp., *Nigritella* spp. e *Ophrys insectifera* (Strack et al, 1986). Outro trabalho demonstrou que sete antocianidinas (crisantemina, cianina, seranina, ofrisanina, orquicianina I e II, serapianina) são amplamente encontradas em flores de 79 espécies (Strack, Bush, Klein, 1989). Antocianidinas aciladas e glicosiladas, com substituições nas posições 3-,7-3', foram isoladas de flores de *Dendrobium* sp. (102), *Bletilla striata* (103), *Laelia pumila* x *Cattaleya walkeriana* (104), *Phalaenopsis* spp e *Vanda* spp. (Saito et al, 1994; 1995; Tatsuzawa et al, 1994; 1997; 2004). A maioria das antocianidinas identificadas em orquídeas possui cianidina como núcleo fundamental, glicose como açúcar e os derivados dos ácidos hidroxinâmicos: ácido sináptico, ferúlico, caféico, p-cumárico, p-hidroxibenzóico e malônico como substituintes acilas. Também foram encontradas rutinosídeos antocianogênicos (105-106) em *Dracula chimaera* e *D. cordobae* (78 e 28% do teor total de antocianidina, respectivamente) (Fossen, Øvstedal, 2003).



Apesar de os flavonóides serem amplamente distribuídos no reino vegetal, não existem muitos relatos sobre a presença desse grupo de compostos fenólicos na família Orquidaceae. A triagem fitoquímica de folhas de 142 espécies pertencentes a 75 gêneros revelou que não existe uma distribuição uniforme de flavonóides (Williams, 1979). Isoquercitrina (107) e astragalina (108) foram isoladas do extrato butanólico de *Orchis militaris* (Appolonia et al, 1986) e os flavonóis, sanciol A (109) e B (110), caracterizados por um substituinte feniletíl na posição 5, foram obtidos dos turbérculos de *Pleione bulbocodioides*. De *Goodyera*

schlechtendaliana foi isolado um flavonol glicosilado com substituinte fenilmetil na posição 8 denominado goodierina (111), além de rutina, canferol 3-O-rutinosídeo e isoramnetina 3-O-rutinosídeo (Du et al, 2000). Nove flavonóis glicosilados, derivados da quercetina e canferol e, um éster ferúlico da quercetina 3-rutinosídeo-7-glicosídeo (112) foram obtidos das flores de *Dendrobium* cv. 'Pompador' (Williams et al, 2002). Sheng-Yang et al (2004) também descreveram a presença de quercetina-3,7-diglicosídeo (113) em *Coeloglossum viride* var. *bracteatum*.



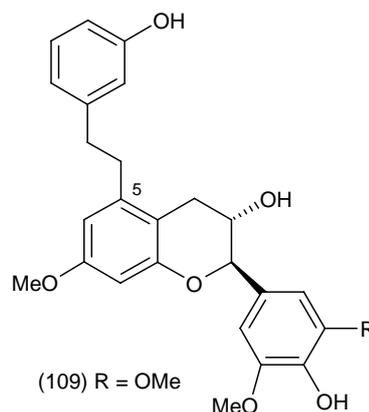
(107) R1 = R3 = OH; R2 = Gli; R4 = H

(108) R1 = H; R2 = Gli; R3 = OH; R4 = H

(111) R1 = OH; R2 = Gli-Ram; R3 = OH; R4 =

(112) R1 = OH; R2 = Gli-Ram-ferulil; R3 = Gli; R4 = H

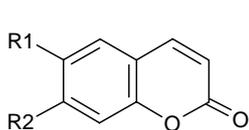
(113) R1 = OH; R2 = Gli; R3 = Gli; R4 = H



(109) R = OMe

(110) R = H

A cumarina de estrutura mais simples (1,2-benzopirona) (114) foi isolada de *Orchis militaris* e *Dendrobium clavatum* var. *aurantiacum* (Appolonia et al, 1986; Chang, Lin, Chen, 2001) e a bicromona, pleionina A (115), foi obtida dos tubérculos de *Pleione bulbocodioides* (Bai, Yamaki, Takagi, 1996). Outras três cumarinas (116-118) e duas flavanonas (119-120) foram isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Dendrobium densiflorum*. Escoparona (116), escopoletina (117) e homoeriodictiol (118) inibiram em 64%, 21% e 50%, respectivamente, a agregação plaquetária em ensaio utilizando sangue de ratos na concentração de 100 μ M (Fan et al, 2001).

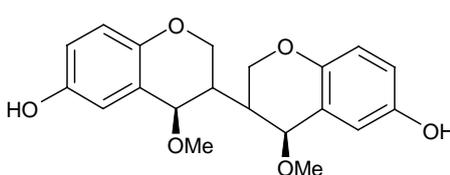


(114) R1 = R2 = H

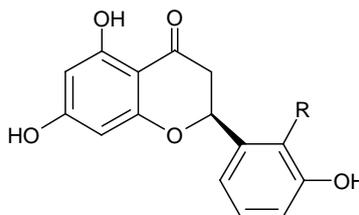
(116) R1 = R2 = OMe

(117) R1 = OMe, R2 = OH

(118) R1 + R2 = OCH₂O



(115)

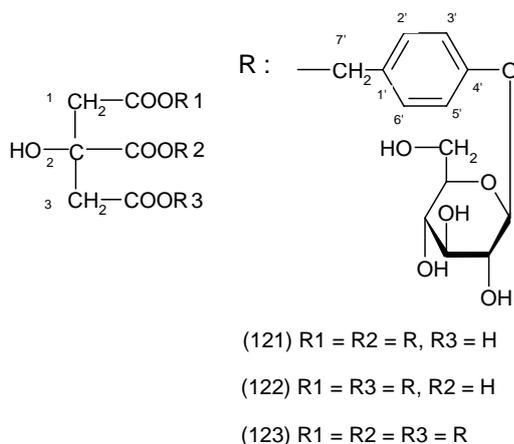


(119) R = H

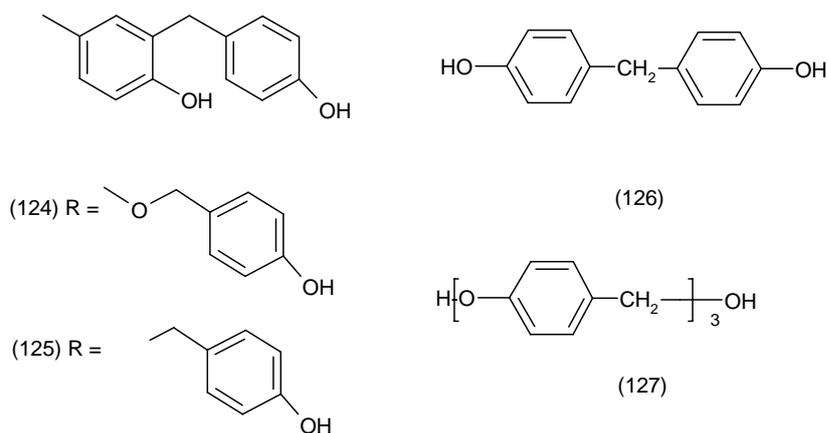
(120) R = OMe

Vários fenilpropanóides voláteis foram identificados por CG/EM como componentes minoritários e majoritários do extrato floral de *Bulbophyllum cheiri*. Alguns desses metabólitos, como metileugenol, são biotransformados por machos da mosca *Bactrocera papayae* em feromônios que atraem as fêmeas (Nishida et al, 2004). Compostos fenólicos simples tais como 4-hidroxibenzaldeído e álcool 4-hidroxibenzílico foram obtidos das espécies *Gastrodia elata*, *G. septentrionalis*, *G. faberi*, *Dactylorhiza hatagirea* e *Coelogyne viride* (Tagushi et al, 1981; Inoue et al, 1984; Li, Zhou, Hong, 1993; Yi-Ming, Zhuo-Lun, Yong-Fu, 1993; Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999; Sheng-Yang et al, 2004). Além disso, ácidos orgânicos foram isolados de extratos de *B. vaginatum* e *Dendrobium clavatum* var. *aurantiacum* (Leong, Harrison, Powell, 1999; Chang, Lin, Chen, 2001).

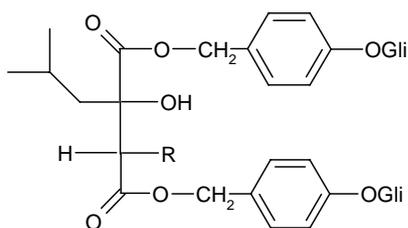
Estudos fitoquímicos de *G. elata* levaram ao isolamento de substâncias fenólicas tais como 2,4-bis(4-hidroxibenzil)fenol e os ésteres do ácido cítrico denominados parishinas (121-123) (Taguchi et al, 1981; Noda et al, 1995; Lin et al, 1996).



A fração em acetato de etila do extrato metanólico de *Gastrodia elata* apresentou efeito relaxante em preparações de músculo liso. O seu fracionamento forneceu 11 substâncias fenólicas, das quais quatro (124-127) apresentaram atividade espasmolítica a 0,02 mg/mL, o que confirmou o uso popular de seus rizomas para tratamento de doenças nervosas e neurálgicas (Hayashi et al, 2002).

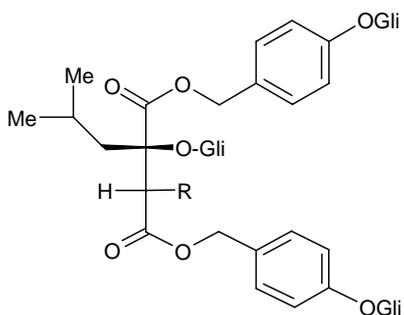


Derivados do ácido málico, loroglossina (128) e militarina (129), foram isolados da fração butanólica dos extratos de *Orchis militaris*, *Galeola faberi* e de *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* (Aasen et al, 1975; Yi-Ming, Zhuo-Lun, Yong-Fu, 1993). A separação cromatográfica da fração butanólica proveniente das raízes de *Dactylorhiza hatagirea* forneceu, além da loroglossina e militarina, outros cinco derivados do ácido málico e tartárico conhecidos como dactilorinas A - E (130 - 134) (Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999).



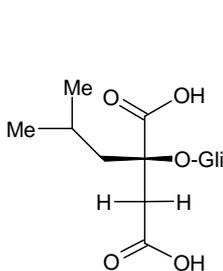
(128) R = OH

(129) R = H

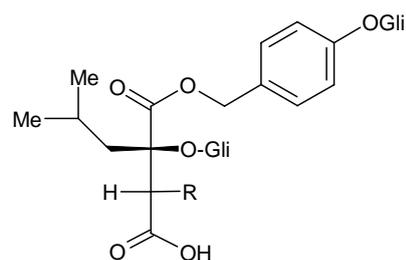


(130) A, R = H

(131) B, R = OH



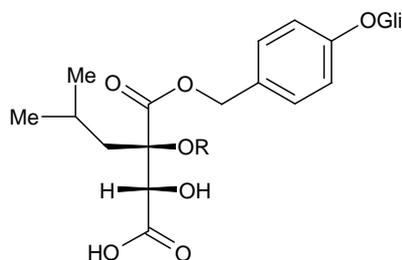
(132) C



(133) D, R = OH

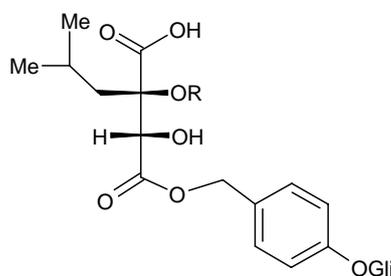
(134) E, R = H

A investigação química do extrato etanólico dos rizomas de *Coeloglossum viride* var. *bracteatum*, orquídea usada pela medicina popular Chinesa devido à suas propriedades tônicas, forneceu as dactilorinas A e B e sete derivados tartáricos glicosilados denominados coelovirinas A - G (135 - 141) (Sheng-Yang et al, 2002 2003; 2004).



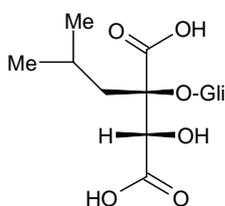
(135) A, R = H

(137) C, R = gli

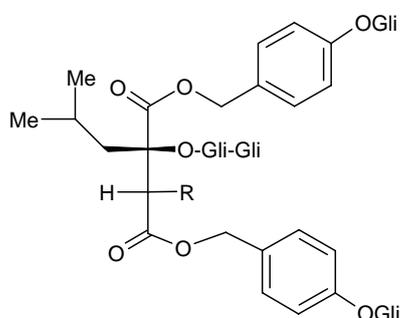


(136) B, R = H

(138) D, R = gli



(139) E

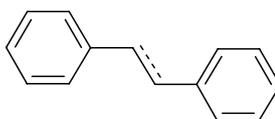


(140) F, R = OH

(141) G, R = H

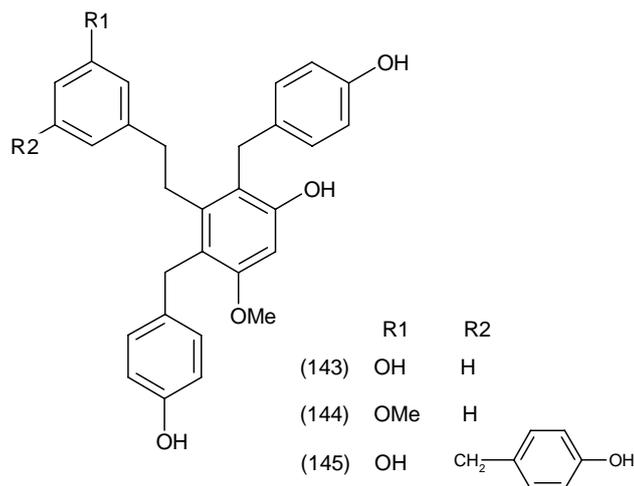
Dos pseudobulbos de *Laelia autumnalis* foi isolada uma lectina que se liga à carboidratos de maneira específica e reversível, aglutinando as células. A lectina obtida é uma glicoproteína dimérica com atividade hemaglutinante direcionada principalmente a eritrócitos humanos desialilados A1 e difere das lectinas isoladas de outras orquídeas (*Cymbidium hybridum*, *Epipactis helleborine*, *Listera ovata*) que se ligam especificamente a estruturas contendo α -manose (Zenteno et al, 1995).

Compostos bibenzílicos são encontrados em espécies de orquídeas pertencentes à vários gêneros. A maior parte destas substâncias possui esqueleto básico como representado abaixo (142) e são considerados derivados de estilbenos.

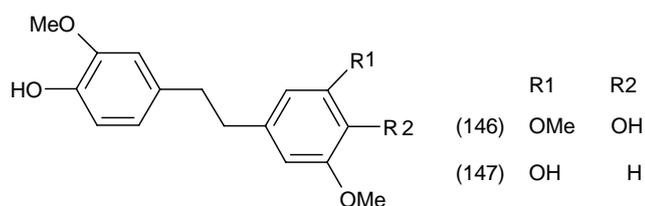


(142)

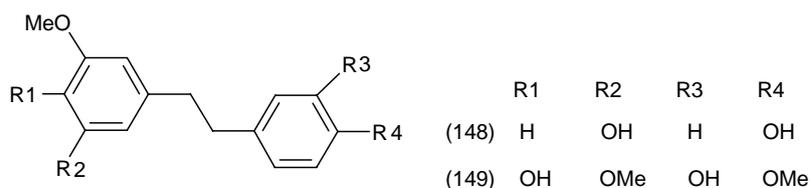
Estilbenos de estruturas mais complexas (143-145) foram isolados do extrato metanólico de tubérculos de *Bletilla striata*, que apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*. Essa espécie é usada pela medicina tradicional da China para tratar tuberculose e hemorragia pulmonar. Os três bibenzílicos isolados apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides*, *Nocardia gardneri* e *S. aureus*. Porém, foram inativos em ensaios de atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (Takagi, Yamaki, Inoue, 1983).



O fracionamento do extrato metanólico dos caules de *Dendrobium loddigesii*, biomonitorado por ensaios com plaquetas de coelhos induzidas com ácido araquidônico e colágeno, levou ao isolamento de moscatilina (146) (Chen, Wu, Teng, 1994). Este metabólito foi também isolado dos extratos de diversas espécies de *Dendrobium* (Majumder, Sen, 1987; Li et al, 1991; Majumder, Lahiri, Mukhoti, 1996; Majumder, Guha, Sen, 1999; Miyazawa et al, 1999; Fan et al, 2001) e de *Agrostophyllum khasiyanum* (Majumder, Lahiri, Mukhoti, 1996). Miyazawa et al (1997, 1999) demonstraram que moscatilina e o estilbeno giganteol (147), isolado de *D. nobile*, são antimutagênicos pois induzem a resposta de genes responsáveis em reparar danos no DNA em ensaio com *Salmonella typhimurium*.

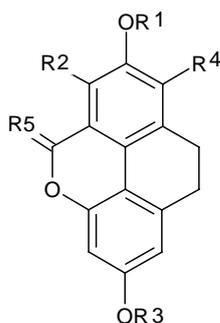


Um estudo englobando 26 espécies pertencentes a nove gêneros da família Orquidaceae demonstrou que batatasina III (148) foi o constituinte mais encontrado nas subtribos *Coelogyntinae*, *Dendrobiinae*, *Bulbophyllinae* e *Bletiinae* (Veeraju et al, 1989). Esse estilbeno foi isolado das espécies *Coelogyne ovalis*, *Cymbidium aloifolium*, *Cirrhopetalum andersonii*, *D. rotundatum*, *Arundina bambusifolia*, *Bulbophyllum vaginatum*, *B. protractum*, *Thunia alba* e *B. reptans*, confirmando sua ampla distribuição (Sachdev, Kuhshreshtha, 1986; Juneja, Sharma, Tandon, 1987; Majumder, Basak, 1991; Majumder, Pal, 1992; Majumder, Ghosal, 1994; Leong et al, 1997; Majumder, Roychowdhury, Chakraborty, 1997, 1998; Majumder, Pal, Majumder, 1999). Batatasina III também foi isolada de *Scaphyglottis livida*, uma orquídea epífita do México e demonstrou atividade espasmolítica, junto com 3,4'-dihidroxi-5,5'-dimetoxibenzílico, em ensaios de inibição de contrações em íleo de ratos induzidas com acetilcolina (Estrada et al, 1999). O mesmo efeito espasmolítico foi relatado por Hernandez-Romero e et al (2004) para o aloifol II (149) ($CI_{50} = 0,26 \pm 0,1 \mu M$), um bibenzílico isolado do extrato $CH_2Cl_2/MeOH$ de *Nidema boothii*.



Entretanto, os constituintes da família Orquidaceae mais relatados pela literatura científica são os fenantrenos (Majumder, Sarkar, Chakraborti, 1982; Majumder, Badyopadhyay, Joardar, 1982; Bhandari et al, 1985; Majumder, Kar, Shoolery, 1985; Majumder, Kar, 1987; Majumder, Banerjee, 1988; Majumder, Maiti, 1988; Barua et al, 1990; Majumder, Banerjee, 1990; Majumder, Basak, 1990; Majumder, Lahiri, 1990b; Majumder, Pal, Joardar, 1990; Majumder, Pal, 1992; Majumder, Sen, 1991; Majumder, Ghosal, 1993; 1994; Yamaki et al, 1993; Bai et al, 1996; Majumder, Banerjee, Sen, 1996; Anuradha, Rao, 1998; Estrada, Toscano, Mata, 1999; Majumder, Pal, Majumder, 1999; Majumder, Sen, Banerjee, 1999; Honda, Yamaki, 2000; Majumder, Sen, Majumder, 2001; Manako et al, 2001; Hernández-Romero et al, 2004; Leong, Harrison, 2004).

O estudo químico de 26 espécies pertencentes aos gêneros *Dendrobium*, *Bulbophyllum*, *Coelogyne*, *Pholidota*, *Anthogonium*, *Arundina*, *Epidendrum*, *Calanthe* e *Aerides* levou ao isolamento de quatro derivados fenantrênicos (coelogina - 150, coeloginina - 151, imbricatina - 152 e flacidina - 153), dentre os quais, os mais freqüentemente isolados foram imbricatina e flacidina. Entretanto, esses dois compostos foram encontrados somente nas espécies das subtribos *Coelogyntinae*, *Dendrobiinae* e *Bulbophyllinae* (Veeraju et al, 1989).



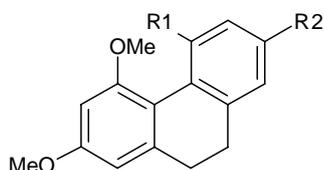
(150) R1 = Me, R2 = OH, R3 = H, R4 = OMe, R5 = H₂

(151) R1 = Me, R2 = OH, R3 = H, R4 = OMe, R5 = O

(152) R1 = R3 = R4 = H, R2 = OMe, R5 = H₂

(153) R1 = Me, R2 = OH, R3 = R4 = H, R5 = H₂

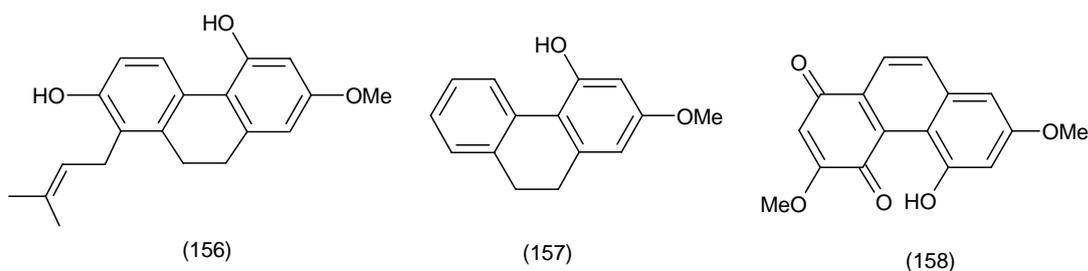
Fisch et al (1973) demonstraram que o orquinol (154), isolado de *Orchis militaris* e, loroglossol (155), isolado de *Loroglossum hircinum*, possuem atividade antifúngica contra *Candida lipolytica* a 100 ppm.



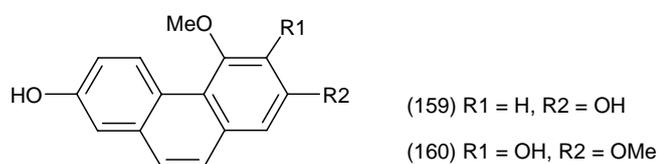
(154) R1 = H; R2 = OH

(155) R1 = OH; R2 = H

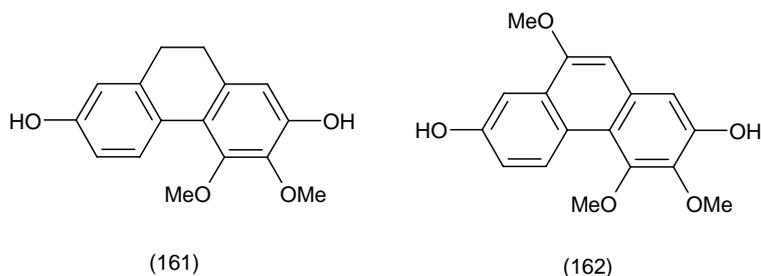
Spiranthes sinensis var. *amoena* é uma orquídea usada popularmente na Tailândia e na China para o tratamento de hemoptises. O extrato das raízes dessa espécie apresentou atividade citotóxica em células HeLa-S3 e seu fracionamento levou ao isolamento de oito dihidrofenantrenos, dos quais somente o espirantol A (156) demonstrou ser ativo (CI₅₀ 10,8 µg/mL) (Tezuka, Ueda, Kikuchi, 1989). Lee et al (1995) isolaram dois fenantrenos, 4,7-dihidroxi-2-metoxi-9,10-dihidrofenantreno (157) e denbinobina (158), das partes aéreas de *Dendrobium nobile*. Estas duas substâncias demonstraram atividade citotóxica em três linhagens celulares humanas: carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de ovário (SK-OV-3) e leucemia promielocítica (HL-60). Porém, somente a primeira aumentou o tempo de vida de camundongos portadores de sarcoma da linhagem P180 quando administrada na dose de 20 mg/kg.



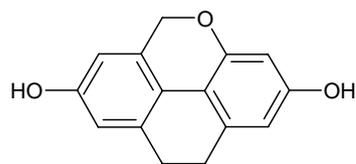
Coelonina (159) e o 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (160) foram isolados do extrato MeOH/CHCl₃ das partes aéreas de *Scaphyglottis lívida* em estudo biomonitorado por ensaios de inibição da contração em íleo de ratos. Esses dois derivados fenantrênicos apresentaram atividade espasmolítica, o que confirmou o uso medicinal dessa espécie pelos índios do México para se evitar o aborto (Estrada et al, 1999).



Maxillaria densa, uma orquídea epífita amplamente distribuída no México e na Guatemala, é utilizada popularmente para o tratamento de dor de estômago (Hernández-Romero et al, 2004). O fracionamento biomonitorado do extrato CHCl₃/MeOH para atividade fitotóxica contra *Amaranthus hypochondriacus* (caruru) levou ao isolamento de eriantridina (161) e gimnopusina (162) que, apresentaram também, atividade citotóxica frente à células de mamíferos em ensaios *in vitro* (Valencia-Islas et al, 2002).

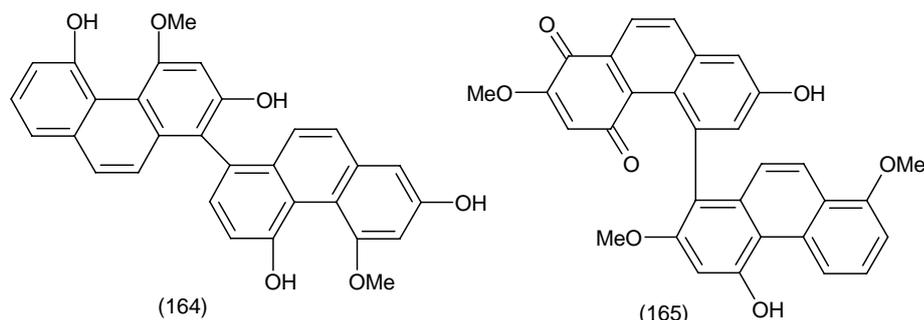


Já flavidina (163), isolada de *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulata* e *Otochilus fusca* (Majumder et al, 1982), apresentou atividade antioxidante em vários ensaios *in vitro*. Sua ação antioxidante foi relacionada com sua habilidade de doar hidrogênio, ou seja, de sua de capacidade produzir espécies mais estáveis que não iniciam ou propagam a oxidação lipídica (Jayaprakasha et al, 2004).



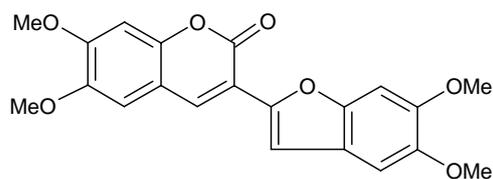
(163)

Estruturas bi-bicíclicas e bi-tricíclicas também são encontradas em espécies dessa família. O fracionamento de *Dendrobium thyrsiflorum* forneceu dentirsina (164), dentirsinol (165) e dentirsinona (166) que demonstraram atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (Hela, K-562, MCF-7) em concentrações que variam de 0,45 μM a 18,1 μM (Zhang et al, 2005).



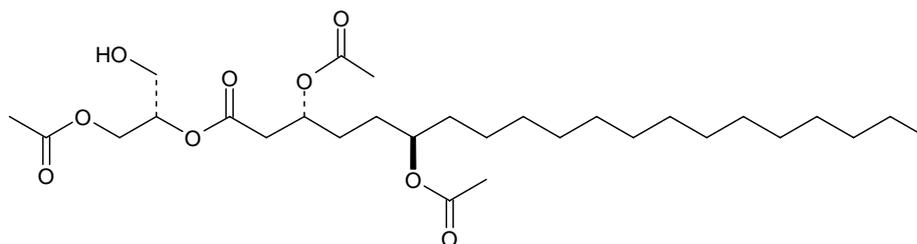
(164)

(165)



(166)

No Brasil não existe uma tradição no estudo fitoquímico de orquídeas. Reis et al (2000) publicaram um estudo sobre a composição química de resinas e óleos de *Oncidium pubes*. Constataram que o mecanismo de polinização está baseado na atração e recompensa dos visitantes florais e que os componentes dos óleos das flores são di e triacilgliceróis, nos quais o glicerol está esterificado com um ou dois resíduos de ácido acético e um ácido graxo. Posteriormente, este mesmo grupo publicou o isolamento de um novo diacilglicerol, denominado oncidinol (167) (Reis et al, 2003).



(167)

3.7 O gênero *Habenaria*

O gênero apresenta cerca de 600 espécies que se distribuem por quase todos os países tropicais do globo (Pio Corrêa, 1984). De acordo com Pabst, Dungs (1975) o Brasil possui cerca de 165 espécies das quais a maior parte habita, preferencialmente, terras úmidas e alagadiças e, portanto, são raramente encontradas nos campos secos (Pio Corrêa, 1984).

O cerrado quando comparado diretamente com a Mata Atlântica é efetivamente pobre em orquídeas (Pabst, 1971). No entanto, os campos rupestres apresentam grande quantidade de orquídeas, rivalizando com áreas de Mata Atlântica quando confrontado com as matas ciliares. O principal centro de diversidade de *Habenaria* no Brasil é o cerrado, destacando-se a Serra do Cipó, região do planalto central cuja vegetação é dominada pelos campos rupestres, entremeados por áreas de cerrado, mata ciliares e brejos (Batista, Bianchetti, 2003; Barros et al, 2004).

Poucas espécies do gênero *Habenaria* apresentam valor ornamental pois suas flores são, em geral, sem realce, pequenas e de cor verde-amarelada ou amarelas. Além disso, seu cultivo é difícil e como consequência, os trabalhos sobre o gênero baseiam-se em estudos botânicos (Pio Corrêa, 1984).

Um levantamento bibliográfico realizado no banco de dados “Natural Products Alert” (NAPRALERT, 2005) descreve o uso popular de diversas espécies de *Habenaria* (Tabela 6).

Tabela 6 - Uso popular de espécies do gênero *Habenaria*

Espécie	Uso popular como/ contra	Parte usada
<i>Habenaria bracteata</i>	afrodisíaco	toda a planta ou raízes
<i>Habenaria buchneroides</i>	disenteria	toda a planta
<i>Habenaria commelinifolia</i>	anti-hemorrágico, dor reumática	toda a planta/ raízes
<i>Habenaria conopsea</i>	antiepilético	sementes
<i>Habenaria constricta</i>	contraceptivo	toda a planta
<i>Habenaria densa</i>	alimento	tubérculos

Fonte: NAPRALERT, 2005.

Entretanto, a literatura científica é escassa quando se refere às triagens para atividades biológicas desse gênero. Benoit et al (1976) demonstraram que o extrato etanólico de *Habenaria psychodes* foi inativo para atividade antiinflamatória a 100 mg/kg, em ensaio de edema de pata induzido com carragenina. Outro estudo de triagem revelou que o extrato etanólico das partes aéreas de *Habenaria dilata* também foi inativo em ensaio de atividade tumoral contra leucemia murina linfocítica (P388) em camundongos (400 mg/kg), em ensaio para atividade citotóxica usando linhagem de carcinoma de nasofaringe humano (KB) e em estudos de alimentação de insetos (Steermitz et al, 1981). Por outro lado, Desta (1994) descreveu as atividades contraceptivas (dose de 0,12 mg/kg) e de estimulação da contração uterina (dose de 20 mg/mL) do extrato etanólico das raízes de *Habenaria* sp. em ensaios com ratos.

Habenaria petalodes Lindl. (Figura 5) é uma monocotiledônea que se encontra distribuída no Brasil e Paraguai. No Brasil, é encontrada nos estados do norte, nordeste, centro e sudeste (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe). É uma espécie terrestre que ocupa uma grande variedade de habitats, que vão desde campos abertos até florestas de galerias. Pode-se adaptar em locais com elevada perturbação humana e é freqüentemente encontrada nas margens de rodovias. As flores são completamente verdes e têm um forte cheiro à noite. O florescimento em Minas Gerais ocorre no final da estação chuvosa e começo da estação seca (principalmente em março e abril), mas espécimes florescentes são também encontradas de janeiro a junho (Batista et al, 2004).

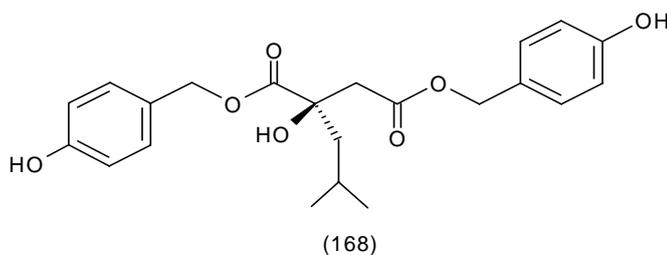
Habenaria pelatodes possui vários sinônimos tais como *Habenaria autumnalis* Poeppig & Endlicher, *Habenaria odontopetala* Reichenbach, *Habenaria garberi* Porter, *Platanthera garberi* (Porter) Chapman, *Platanthera herzogii* Schlechter, *Habenaria tetradon* Kraenzlin, *Habenaria strictissima* Reichenbach, *Habenaria dentifera* C. Schweinfurth e é mais conhecida como *Habenaria floribunda* Lindley (Club Peruano de Orquideas, 2005). Porém, não foram encontrados relatos sobre o seu nome popular e usos etnobotânicos no Brasil.



Figura 5 - Partes aéreas de *Habenaria petalodes*.

Fonte: Betania Barros Cota

O levantamento bibliográfico realizado demonstrou que, até o momento, existe somente o relato sobre o isolamento de um éster fenólico, habenariol (170), do extrato diclorometânico de *H. repens*, responsável pela proteção da planta contra o ataque predatório de herbívoros (Wilson et al, 1999).



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr.

4.1.1 Isolamento do fungo

O isolado *Lentinus strigosus* (Schwein) Fr. (CCB178) foi obtido da “Coleção de Culturas de Basidiomicetos (CCB)” do Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil e mantido no Setor de Biotecnologia e Tecnologia Química do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), Brasil.

4.1.2 Cultivo do fungo

Os pré-inóculos das culturas dos fungos foram preparados assepticamente transferindo-se três discos de 5 mm de diâmetro da cultura obtida em meio extrato de malte em ágar para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio extrato de malte líquido (extrato de malte a 1,5%, peptona a 0,1% e glicose a 1,5%). Os frascos foram agitados a 150 rpm, a 28°C por cinco dias. Os conteúdos dos frascos dos pré-inóculos foram transferidos para 4 frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio extrato de malte líquido e incubados a 28°C por nove dias. Os frascos foram congelados (-20°C) até a extração.

Uma produção em larga escala da cultura foi realizada em 4 litros de meio extrato de malte líquido (extrato de malte a 1,5%, peptona a 0,1% e glicose a 1,5%) em fermentador automático (Microferm New Brunswick Scientific) a 150 rpm, 28°C, taxa de aeração de 3 litros/minuto, durante 9 dias, no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1.3 Extração

As culturas obtidas foram descongeladas à temperatura ambiente e a biomassa micelial foi separada do meio líquido por filtração a vácuo. O meio líquido foi extraído com 5 x 30 ml de acetato de etila para cada 100 mL de meio líquido. A fração orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o extrato concentrado em

evaporador-rotatório (Büchi modelo R-114), sob pressão reduzida, em temperaturas inferiores a 45° C. O solvente residual foi removido em centrífuga à vácuo (Thermo Savant SC 250), obtendo-se 0,135 g e 2,29 g de extratos brutos provenientes, respectivamente, do cultivo em Erlenmeyer (400 mL de meio) e fermentador automático (3800 mL de meio).

Para a realização dos ensaios biológicos, soluções estoques dos extratos brutos de 10 mg/mL foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocadas a -40°C.

4.2 *Habenaria petalodes* Lindl.

4.2.1 Coleta e identificação

A espécie vegetal, coletada em 13/04/2004 na Estação Ecológica do Campus da UFMG, foi identificada e herborizada pelos professores Júlio A. Lombardi e João Renato Stehmann, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Uma exsicata (BHCB 88339) encontra-se depositada no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.2.2 Preparo dos extratos

A primeira coleta da planta foi realizada na Estação Ecológica do Campus da UFMG. A planta inteira foi lavada em água corrente, seca em temperatura ambiente e reduzida a pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura. A extração foi realizada por maceração com etanol até esgotamento do material vegetal. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, em temperatura inferior a 40°C e o solvente residual eliminado em centrífuga à vácuo.

A segunda coleta de *H. petalodes* foi realizada na Reserva Particular do Santuário do Caraça. Espécimes da planta inteira foram secas em estufa ventilada à temperatura de aproximadamente 40°C e submetidas à moagem em moinho de facas antes de se realizar a maceração com etanol.

4.3 Métodos cromatográficos

4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

4.3.1.1 Placas para cromatografia em camada delgada

Para cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ sobre folha de alumínio (Merck) e sílica gel 60 lavada com ácido sobre poliéster (Sigma).

4.3.1.2 Reveladores para cromatografia em camada delgada

As revelações cromatográficas foram feitas por irradiação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) em cabine de UV, lâmpada Camag e/ou com as seguintes soluções:

Vanilina-H₂SO₄ (Wagner, Bladt, Zgainski, 1984)

Este reagente foi preparado misturando 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial, seguido da adição de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As placas foram então aquecidas a 100°C por 5-10 min e avaliadas no visível.

Difenilboriloxietilamina-polietileno glicol - NP/PEG (Wagner, Bladt, Zgainski, 1984)

As placas foram borrifadas, sequencialmente, com solução de difenilboriloxietilamina a 1% em metanol e solução de polietileno glicol-4000 a 5% em etanol. As placas foram avaliadas no ultravioleta em 365 nm.

4.3.2 Cromatografia em coluna aberta (CC)

Como fase estacionária utilizou-se sílica gel 60 (Merck). Diferentes sistemas de eluentes contendo solventes das marcas Aldrich, Grupo Química, Merck e Quimex foram utilizados como fases móveis (Tabela 7).

Tabela 7 - Condições utilizadas para fracionamento e purificação em cromatografia em coluna aberta

Origem/ material	Malha	Diâmetro x Comprimento	Solventes ou misturas
<i>L. strigosus</i> - Extrato bruto	200-400	500 x 30 mm	DCM/MeOH
<i>L. strigosus</i> - Subgrupo 2a	70-230	5 x 30 mm	DCM, DCM/MeOH, MeOH
<i>H. petalodes</i> - Fr DCM	200-400	47 x 350 mm	HEX/Et ₂ O, HEX/Et ₂ O e MeOH

4.3.3 Cromatografia líquida de alta pressão (CLAE)

As análises e separações em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando solventes da Merck, Em Science e Mallinckrodt. As análises em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo líquidos de alta eficiência Shimadzu, constituído de injetor manual, detector com arranjo de diodos modelo SPD-M10A e bomba modelo LC-10A. Todas as análises foram realizadas utilizando um fluxo de 1 mL/min. Para fase reversa foi utilizada coluna octadecilsilano (Shimpack - C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm, d.i. e para fase normal em coluna de sílica gel (Shimpack - Si, 5 µm, 4,6 x 250 mm, d.i.). As separações em escala semi-preparativa foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, constituído de injetor manual, detector UV monocromático modelo SPD-10^a, bomba modelo LC-8A e fluxos de 8,0 a 10,0 mL/min. As purificações em fase normal foram realizadas em coluna de sílica gel (Shimpack - Si, 5 µm, 20 x 250 mm, d.i) com misturas de diclorometano em metanol e em fase reversa em coluna de octadecilsilano (Shimpack C₁₈, 5 µm, 20 x 250 mm, d.i) ou de octilsilano (Asahipack, C₈, 5 µm, 10 x 250 mm, d.i) com misturas de metanol ou acetonitrila em água.

As análises em escala analítica para comparação da substância **VII** com a substância de referência foram realizadas em coluna de fase reversa (Shimpack 5 µm, 4,6 x 250 mm, d.i.) em cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodos. A substância **VII** e a substância de referência (isoquercitrina) foram

preparadas na concentração de 1 mg/mL em mistura de MeOH/ H₂O (1:1) e diluídas 20 vezes em H₂O, obtendo-se soluções a 50 µg/mL. Alíquotas de 50 µL da substância **VII** e da substância de referência foram injetadas, separadamente e após a mistura do mesmo volume das mesmas. A eluição foi realizada em gradiente linear de 30% a 70% de metanol em água durante 20 min.

4.3.4 Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade

Para cromatografia centrífuga em contra-corrente com alta velocidade utilizou-se o aparelho Pharma-Tech modelo 1000, composto de três bobinas de politetrafluoroetileno (PTFE com diâmetro interno de 1,6 mm) com capacidade para 350 mL, uma bomba Shimadzu modelo LC-8A e coletor automático Advantec modelo SF-2120. A coluna foi recheada com a fase aquosa superior do sistema de solventes clorofórmio/metanol/água (2:1:1 v/v) e a fase orgânica inferior foi bombeada no sentido cabeça-cauda da coluna, com fluxo de 2 mL/min e velocidade de revolução de 1000 rpm. Após o equilíbrio hidrodinâmico, a amostra (subgrupo 7 - *L. strigosus*) foi injetada em um "loop" de 3 mL.

4.3.5 Filtração em gel de Sephadex LH-20

A fração aquosa proveniente do extrato etanólico de *H. petalodes* foi fracionada em coluna aberta de vidro (30 x 470 mm, d.i.) preenchida com gel de Sephadex LH-20 (Pharmacia) em mistura de MeOH/H₂O (1:1). A coluna foi eluída com MeOH/H₂O (1:1) e frações de 10-20 mL coletadas.

4.3.6 Extração em fase sólida (FS)

As extrações em fase sólida foram realizadas em cartucho Sep-Pak C₁₈ (Waters, modelo Classic), previamente ativados com metanol e posteriormente pré-condicionados com H₂O.

4.4 Métodos físicos

4.4.1 Pontos de fusão (PF)

Os pontos de fusão foram medidos em aparelho Electrothermal e não foram corrigidos.

4.4.2 Rotações óticas

As rotações óticas foram medidas em polarímetro Perkin-Elmer 341 (25°C, lâmpada de Na , 589 nm), no Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.4.3 Espectros no ultravioleta (UV)

Os espectros no ultravioleta-visível foram registrados em espectrofotômetro Beckman DU[®] Série 600 do Laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisa René Rachou e em detector com arranjo de diodos acoplado à cromatógrafo líquido de alta eficiência. As amostras analisadas foram dissolvidas em metanol (grau HPLC, Em Science), obtendo-se soluções nas concentrações de 1-2%. Os aditivos utilizados (AlCl₃, HCl, NaOAc, H₃BO₃) foram preparados de acordo com Mabry, Markham, Thomas (1970).

4.4.4 Espectros no infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram registrados no espectrofotômetro Shimadzu modelo FITIR-8400, em pastilhas de KBr.

4.4.5 Espectros de massa (EM)

Os espectros de massas por impacto eletrônico (IE) e “*electrospray*” (IES) foram obtidos, respectivamente, em espectrofotômetro Shimadzu QP5050A e em espectrofotômetro Thermo Finnigan LCQ-Advantage.

4.4.6 Espectros de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram registrados em aparelho Bruker DRX-400, do Departamento de Química da UFMG. Os solventes deuterados das marcas Sigma Aldrich e Merck foram utilizados para obtenção dos espectros de RMN. Como referência interna, utilizou-se tetrametilsilano em todos os experimentos. Os espectros foram medidos nos seguintes solventes:

Terpenóides	CDCl ₃
	CD ₃ OD
Flavonóides	CD ₃ OD
	Piridina-d ₅
Derivados do ácido succínico e málico	CD ₃ OD

4.7 Ensaios biológicos

4.7.1 Ensaio bioquímico *in vitro* de inibição da enzima recombinante tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Químicas de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou, como parte do trabalho de doutorado e coordenação do Dr. Carlos L. Zani. Foi utilizado um ensaio colorimétrico em microplacas de 96 poços que se baseia na inibição da tripanotiona redutase (TR), uma flavoenzima que catalisa a redução dependente de NADPH, da tripanotiona (TS)₂ (Bachem®). (Fairlamb et al, 1985; Hamilton et al, 2003). A enzima tripanotiona redutase recombinante foi purificada de *Escherichia coli* (Borges et al, 1995) e gentilmente cedida pelo prof. Fairlamb, da Divisão de Química Biológica & Microbiologia Molecular da Universidade de Dundee, Escócia. Após a adição da amostra (10 µg/mL), uma mistura de 200 µL contendo tampão (HEPES 40 Mm, EDTA 1Mm, pH 7,5), tripanotiona (0,80 µM), NADPH (0,12 mM) e TR (20,5 mU/mL) foi transferida para cada poço. A placa foi incubada por 30 min a 30°C em leitor de microplacas (VERSAMAX®) e depois da adição de 25 µL de reagente de Ellman a 500 µM (DTNB - ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), a leitura foi realizada no modo cinético em 412 nm, medindo-se a inclinação da curva ($\delta OD/\delta t$). Em paralelo, foram realizados controles positivos, adicionando-se clomipramina (6,5 µM) como inibidor da TR e controles sem a droga (negativos). Os

resultados foram expressos em porcentagem de inibição da enzima em relação aos controles negativos (Fairlamb et al, 1985; 2003; Hamilton et al, 2003). Foram considerados positivos os extratos e amostras capazes de inibir em pelo menos 50% a atividade da enzima. Cada amostra foi avaliada em triplicata, em três ensaios independentes e os cálculos da CI_{50s} realizados por software SoftMax versão 4.0. O software calcula os resultados de porcentagem de inibição da enzima conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição: } 100 \times (1 - \text{MédiaAbs da amostra} / \text{MédiaAbs controle com enzima})$$

4.7.2 Ensaio *in vitro* com formas intracelulares amastigotas de *T. cruzi*

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou, sob a coordenação do Dr. Álvaro J. Romanha. Quatro mil células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 12 h em meio e condições apropriadas. Foram adicionados 10 parasitas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen), transfectados de modo a expressar o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*, por célula (Buckner et al, 1996). Após um período de infecção de 2 horas, o meio de cultivo foi, então, substituído por 200 μ L de meio sem parasitas. O controle positivo (benzonidazol; CI_{50} a 1 μ g/mL) e as substâncias **II** e **IV**, isoladas de *Lentinus strigosus*, foram adicionadas, em triplicata, 48 horas após a infecção. A quantificação da atividade enzimática foi realizada em um leitor de ELISA regulado para 570 nm, 16 a 20 horas após adição de 50 μ L do vermelho de clorofenol- β -D-galactopiranosídeo (CPRG). Também foram usados controles com as células e controles com células infectadas com parasitas (sem a droga).

4.7.3 Ensaio *in vitro* com sangue de camundongos infectados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou, sob a coordenação do Dr. Álvaro J. Romanha. Sangue de camundongo albino suíço foi obtido por punção cardíaca durante o pico da parasitemia, isto é, no sétimo dia após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. O sangue infectado foi diluído com sangue de camundongos normais à concentração de 2×10^6 tripomastigotas/mL. Soluções estoques das substâncias II e IV, isoladas de *Lentinus strigosus* (4 mg/mL de DMSO) foram diluídas em sangue infectado a uma concentração final de 100 µg/mL. Duas alíquotas de 200 µL foram transferidas, em triplicata, para microplacas de 96 poços e as mesmas foram incubadas a 4°C durante 24 h. Foram usados controles sem a droga e com DMSO (2,5% v/v). Como controle positivo foi usada violeta de genciana em sua CL₅₀ (7,5 µg/mL). O número de parasitas foi determinado em microscópio ótico, em 50 campos com aumento de 400 vezes em lâminas preenchidas com 5 µL de sangue proveniente de cada poço. A atividade tripanosomicida foi expressa como a porcentagem de redução do número de parasitas (lise) comparado ao controle com o DMSO (Brenner et al, 1962), na qual cada amostra foi avaliada em triplicata.

4.7.4 Ensaio com linhagens de células tumorais humanas

Estes ensaios foram realizados pelos técnicos do Laboratório de Químicas de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou, sob coordenação do Dr. Carlos L. Zani. Os testes para atividade citotóxica foram realizados usando o protocolo descrito por Monks et al (1991), utilizando as linhagens tumorais humanas UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e TK-10 (renal). As suspensões celulares foram diluídas de acordo com a linhagem de modo que 100 µL, adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços possuísse 5000 células MCF-7, 10.000 células UACC-62 e 15.000 células TK-10. Os inóculos foram incubados por 24 h, a 37°C, para estabilização das células e então, foram adicionadas, em triplicata, as amostras a 20 µg/mL. Após a incubação das células por 72 h em atmosfera de CO₂ e 100% de umidade, as células foram fixadas com adição de 50 µL de ácido tricloroacético a 50% p/v (concentração final de 10%) e incubação das placas por 60 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e as placas foram

lavadas 5 vezes com água. As placas foram secas a temperatura ambiente e em seguida adicionado 50 µL de sulforodamina B a 0,4% p/v por poço. Após 10 min, a sulforodamina não-ligada foi removida pela lavagem das placas (5 vezes), com ácido acético a 1% v/v. Depois de secas, o corante foi solubilizado com tampão Tris e as densidades ópticas lidas em espectrofotômetro em 515 nm. As amostras capazes de inibir a multiplicação celular em pelo menos 80% são consideradas citostáticas e as capazes de inibir em pelo menos 100% são consideradas citocidas. Como controles positivos foram empregados etoposídeo (16 µg/mL) e a colchicina (8 µg/mL). Cada amostra foi avaliada em triplicata, em três ensaios independentes e os cálculos da CI_{50s} realizados por software SoftMax versão 4.0.

4.7.5 Ensaio *in vitro* de proliferação de linfócitos de sangue periférico humano induzida por fitohemaglutinina (PHA)

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou pela Dra. Elaine M. Fagundes-Souza. Os ensaios de proliferação celular *in vitro* (blastogênese) basearam-se no método descrito por Gazzinelli et al (1983). As células foram mantidas em meio de cultivo completo (CMBLAST) contendo RPMI suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh+, previamente inativado, 1,6% de L-glutamina e 3% da mistura de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina e fungisona). A cultura foi mantida em condições estéreis, em placas de 96 poços de fundo chato. Em cada poço foram adicionados 100 µL da suspensão celular contendo $1,5 \times 10^6$ células mononucleares por mililitro de CMBlast, 2,5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e as amostras em diferentes concentrações. As placas foram mantidas em estufas de atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, a 37°C por 72 horas. A proliferação celular foi avaliada após adição de 20 µL de MTT (5 mg/mL) e incubação das placas por 4 h, a 37°C. Os sobrenadantes foram removidos e 200 µL de HCl a 0,04 N em isopropanol foram adicionados. As absorbâncias foram medidas em 590 nm em espectrofotômetro (Jiang, Xu, 2003). Os resultados foram expressos em termos de percentual de inibição ou estimulação relativo a proliferação celular estimulada com PHA. A dexametasona (10 µg/mL), substância supressora da proliferação de linfócitos, foi utilizada como controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS

5.1 Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila obtido do cultivo do fungo *Lentinus strigosus*

O extrato em acetato de etila de *L. strigosus* foi avaliado em diversos ensaios biológicos (Tabela 8) e foi selecionado por inibir em 100% a enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi* a 10 µg/mL.

Tabela 8 - Atividade do extrato em acetato de etila do fungo *L. strigosus* em diferentes ensaios biológicos

Amostra	% de inibição da proliferação de células tumorais (10 µg/mL)			% de inibição da proliferação de CMSP ^b (10 µg/mL)	% de inibição da TR ^c (10 µg/mL)
	UACC-62a	TK-10a	MCF-7a		
Extrato bruto	93,5	93,9	60,3	80,5	100,0

^a UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mamária) e TK-10 (renal). ^b Células mononucleares humanas do sangue periférico estimuladas com PHA. ^c Tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*. Ensaios realizados em triplicata.

5.1.1 Isolamento das substâncias

5.1.1.1 Escala analítica

100 µg do extrato em acetato de etila, obtido do meio líquido cultivo do fungo *L. strigosus*, foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica, usando gradiente de 10 a 100% de metanol em água em 25 min, 100% a 10% de metanol em 5 min, e detecção no UV a 210 nm. Foram coletadas 82 frações de 220 µL em microplaca de 96 poços e o solvente foi evaporado em estufa a 30°C. O ensaio *in vitro* com TR foi realizado sobre a microplaca e permitiu identificar as frações do cromatograma (frações 5 e 11) responsáveis pela atividade (Figura 6) e otimizar o fracionamento do extrato em CLAE em escala semi-preparativa.

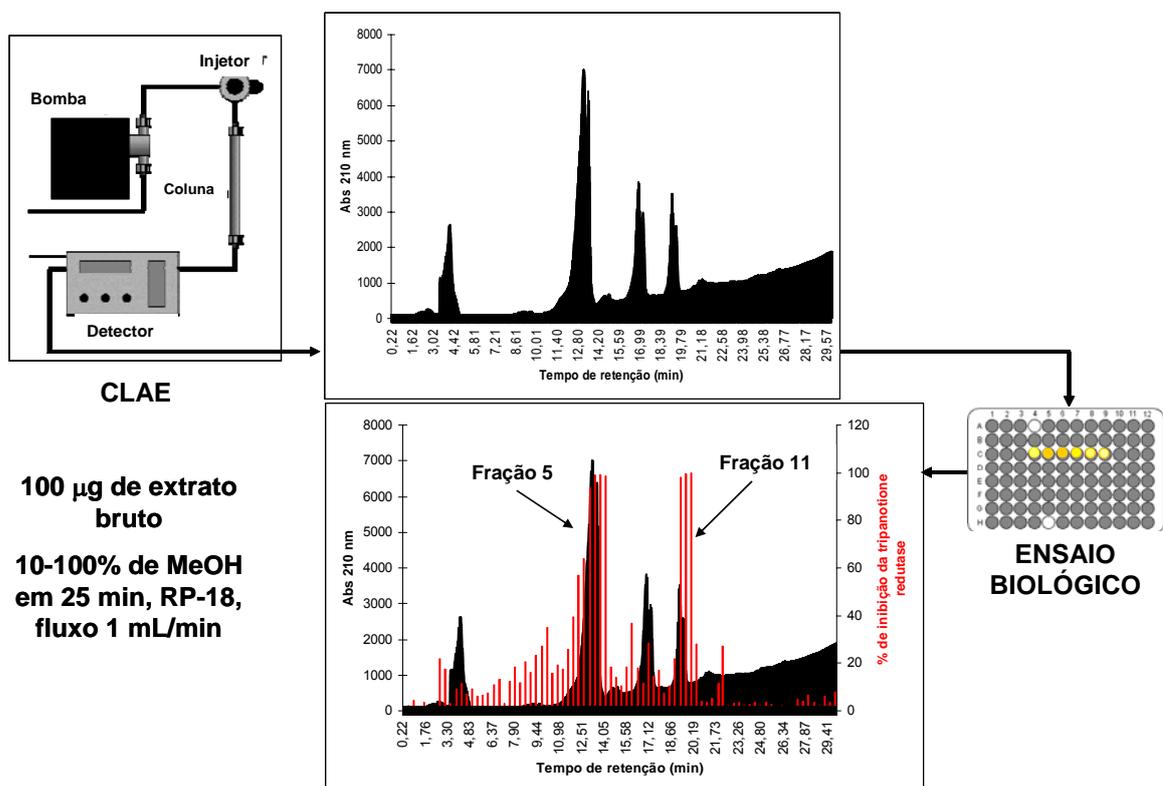


Figura 6 - **A**: Perfil cromatográfico do fracionamento de 100µg do extrato em acetato de etila de *Lentinus strigosus* (eluição em gradiente de metanol em água de 10% a 100% em 25 min, 100% a 10% em 5 min, coluna RP-18 (250 x 4,6 mm, d.i.); fluxo 1 mL/min; detecção no UV a 210 nm. **B**: Gráfico da porcentagem de inibição da enzima tripanotona redutase em relação ao perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila de *L. strigosus*

5.1.1.2 Escala semi-preparativa

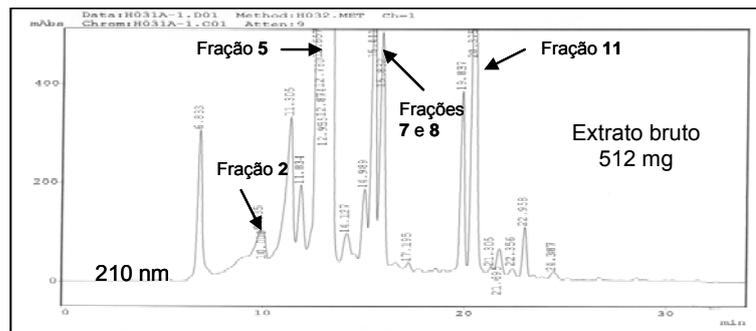
A partir do fracionamento em escala analítica do extrato em acetato etila de *L. strigosus* foi possível padronizar um fracionamento visando o isolamento das substâncias para a obtenção dos dados espectrométricos para a elucidação estrutural.

O perfil cromatográfico do extrato bruto em gradiente de acetonitrila em água (15% a 100% de acetonitrila em 17 min, 100% a 15% de acetonitrila em 5 min), utilizando condições semelhantes ao do fracionamento em escala analítica (Figura 7), apresentou semelhança com o perfil em metanol/ água e foi o método de escolha para a separação dos componentes ativos.

O fracionamento de 0,512 g do extrato bruto foi realizado em escala semi-preparativa por fase reversa (Figura 7). Aliquotas de 100 mg do extrato bruto foram fracionadas em cromatógrafo Shimadzu, usando gradiente linear de 15% a 100% de acetonitrila em água em 34 min e 100% a 15% de acetonitrila em 12 min. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min e a detecção foi realizada com espectrofotômetro UV regulado para 210 nm e 254 nm. Foram obtidas 14 subgrupos pela separação do extrato orgânico de *L. strigosus* por CLAE em escala semi-preparativa (Figura 7).

Os subgrupos 2, 5 e 11 foram purificados por CLAE em escala semi-preparativa utilizando coluna de fase normal (coluna Shimpack prep-Si, 5 µm, 20 x 250 mm, d.i.), fluxo de 10 mL/min e detecção no UV a 260 nm. Os subgrupos 2 (12 mg) e 5 (202 mg) foram purificadas com mistura de diclorometano/metanol (95:5) e o subgrupo 11 (22 mg) com mistura de diclorometano/metanol (97:3), no modo isocrático. Os subgrupos 5 e 11 forneceram as substâncias **II** e **IV**, respectivamente. Porém, o subgrupo 2a (5,1 mg) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com misturas de polaridades crescentes de diclorometano/ metanol e forneceu um sólido amarelo pálido (substância **I**).

Os subgrupos 7 e 8, por terem se apresentado como sólidos de coloração branca e mesmo R_f em cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), foram reunidas e recristalizadas em uma mistura de diclorometano/ hexano, fornecendo a substância **III**.



CLAE, Shim-pack prep RP-18, ACN-H₂O 15 : 85 - 100 : 0 em 34'; 100 : 0 - 15 : 85 em 12', 10 mL/min, 210 e 254 nm.

14 subgrupos

2
12 mg

5
202 mg

7 e 8
62 mg

11
22 mg

2a
5,1 mg
CLAE, Shim-pack prep Si, DCM: MeOH (95: 5), 10 mL/min, 260 nm

CLAE, Shim-pack prep Si, DCM: MeOH (95: 5), 10 mL/min, 260 nm

Recristalização
HEX: DCM

CLAE, Shim-pack prep Si, DCM: MeOH (97: 3), 10 mL/min, 260 nm

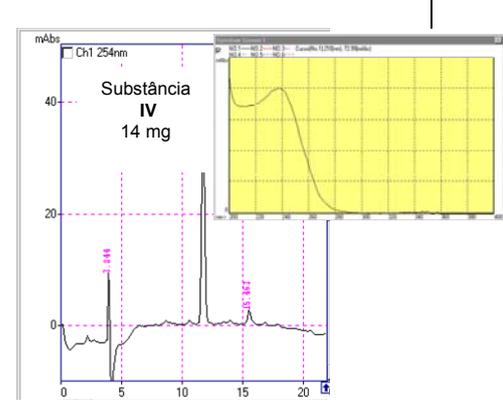
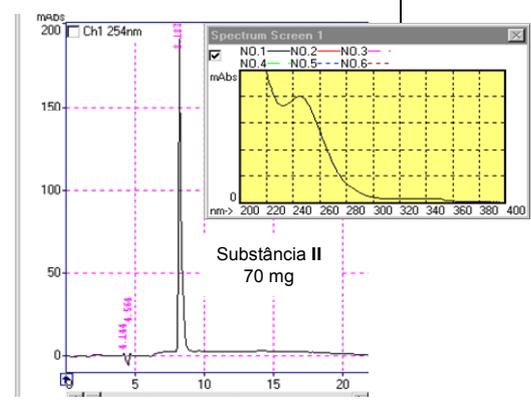
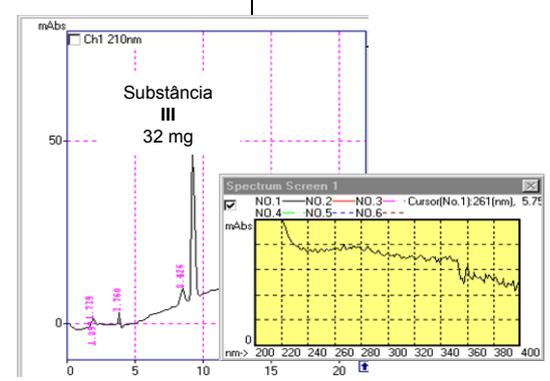
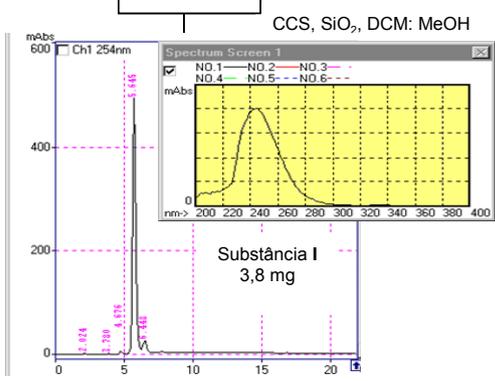


Figura 7 - Fluxograma de fracionamento do extrato em acetato de etila de *L. strigosus* em escala semi-preparativa.

5.1.1.3 Escala preparativa

Utilizou-se um outro método para isolar as substâncias ativas (II e IV) do extrato bruto em quantidades suficiente para a realização dos ensaios biológicos. Assim, foram utilizadas a cromatografia em coluna de sílica gel (CCS) e cromatografia centrífuga em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV).

Uma alíquota de 1,5 g do extrato obtido do cultivo em fermentador foi incorporada em 3,0 g de sílica e fracionados em coluna de vidro empacotada com 57 g de sílica gel, procedendo-se à eluição com misturas de polaridades crescentes de diclorometano e metanol (Tabela 9, Figura 8).

Recolheram-se 238 frações de cerca de 10 mL, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada de sílica gel. As cromatoplas foram eluídas com misturas de diferentes proporções de diclorometano/ metanol e as manchas foram visualizadas sob luz UV a 254 nm, ou após revelação com vanilina/ácido sulfúrico. As frações com perfis semelhantes foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório a 40°C, obtendo-se 13 subgrupos (Tabela 9).

Tabela 9 - Fracionamento do extrato em acetato de etila de *L. strigosus* por cromatografia em coluna de sílica gel

Frações	Eluente	Volume (mL)	Subgrupos (frações referentes)
1-21	DCM (100)	300	1 (1-30)
22-37	DCM/MeOH(99,5:0,5)	200	2 (31-39)
38-58	DCM/MeOH(99,0:1,0)	300	3 (40-44)
59-76	DCM/MeOH(98,5:1,5)	200	4 (45-62)
77-91	DCM/MeOH(98,0:2,0)	200	5 (63-65)
92-121	DCM/MeOH(97,5:2,5)	350	6 (66-69)
122-136	DCM/MeOH(97,0:3,0)	200	7 (70-100)
137-150	DCM/MeOH(96,5:3,5)	200	8 (101-128)
151-188	DCM/MeOH(96,0:4,0)	500	9 (129-183)
189-198	DCM/MeOH(80:20)	100	10 (184-188)
199-208	DCM/MeOH(60:40)	100	11 (189-198)
209-218	DCM/MeOH(40:60)	100	12 (199-218)
219-238	MeOH(100)	200	13 (219-238)

Nota: Volume total de eluentes: 2950 mL. Legenda: DCM, diclorometano; MeOH, metanol.

O subgrupo 3 forneceu a substância **IV** (35 mg). Já, o subgrupo 7 (0,75 g) (Figura 8) foi purificado por cromatografia centrífuga em contra-corrente com alta velocidade (CCCAV). Setenta e quatro frações de 10 mL foram coletadas (Figura 8) e analisadas por CCD com diferentes proporções de diclorometano/metanol. As manchas foram visualizadas pela mesma técnica descrita anteriormente. As frações 24 a 30 foram agrupadas devido à similaridade observada em CCD e forneceram a substância **II**.

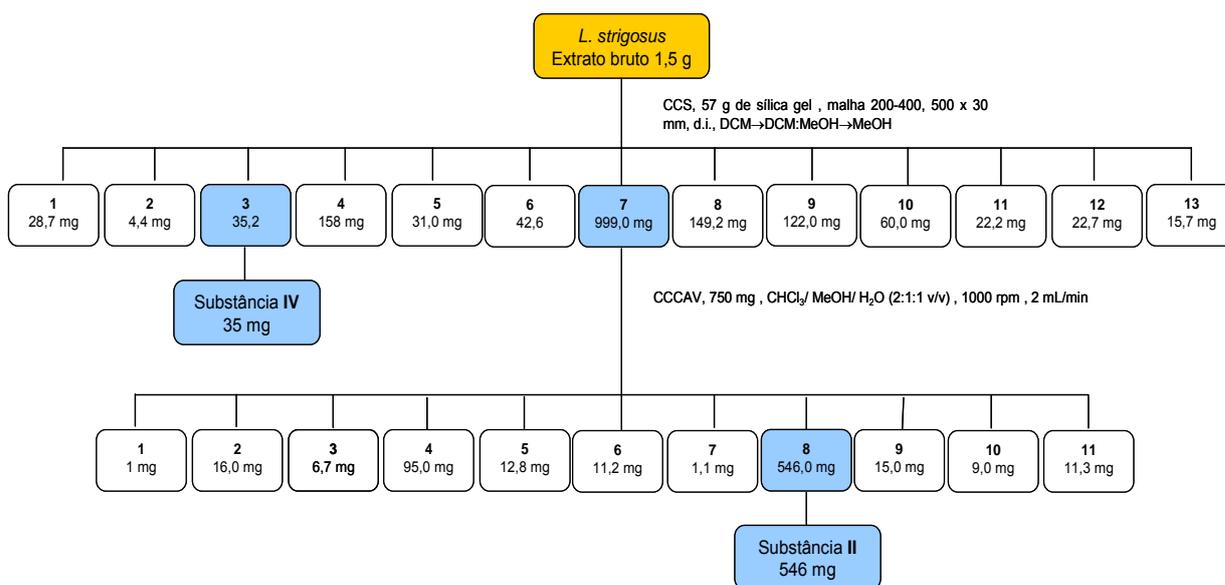
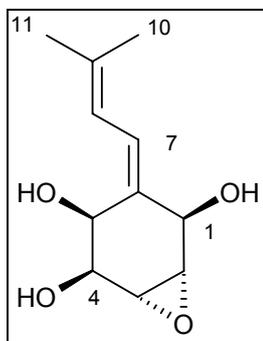


Figura 8 - Fluxograma de fracionamento do extrato bruto, obtido em fermentador, de *L. strigosus* em escala preparativa.

5.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato em acetato etila de *L. strigosus*

5.2.1 Substância I: neopanepoxidol



A substância **I** foi isolada como um sólido amarelo pálido, que apresentou ponto de fusão de 158-159 °C (lit. 163-166 °C; Kis et al, 1970) e máximo de absorção no ultravioleta, obtido em detector de fotodiodo por CLAE em eluição com gradiente de acetonitrila em água (página 156), em 247 nm (lit. 247 nm em CH₃OH/CH₂Cl₂; Kis et al, 1970). Não foi obtida a sua atividade ótica.

O espectro no IV (KBr, ν_{\max}) de **I** (página 157) revelou a presença de uma banda em 3308 cm⁻¹, referente ao estiramento de O–H em ligação de hidrogênio intermolecular. As absorções em 2900 cm⁻¹ e 2862 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramento de C–H de carbono alifático e as bandas em 1600 cm⁻¹ e em 1038 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramento de C=C de dieno conjugado e estiramento de C–O, respectivamente (lit. 3550, 3450, 1460, 930, 845 cm⁻¹, Kis et al, 1970; Silverstein, 1994).

O espectro de massas (página 158), obtido por impacto de elétrons (IE 70 eV) de **I**, forneceu o pico do íon molecular com m/z 212, consistente com a fórmula C₁₁H₁₆O₄.

O espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) de **I** (página 159) apresentou multipletos em δ 6,62 e em δ 6,53 que foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos vicinais H-7 e H-8, respectivamente. A partir dos valores das constantes de

acoplamento escalar foi possível estabelecer a correlação entre o duplete em δ 4,21 (1H, $J = 5,5$ Hz) e o duplete duplo em δ 3,96 (1H, $J = 5,5; 1,1$ Hz). Os simpletos em δ 1,79 e δ 1,81, com integral de 6H, foram atribuídos a hidrogênios de grupos metila referentes aos carbonos C-10 e C-11 (Tabela 10) (Silverstein, 1994). Pela análise do experimento COSY (${}^{2,3} J_{H,H}$) de **I** (página 160), foi possível confirmar as atribuições anteriores e atribuir os sinais em δ 3,38 (1H, $J = 3,5; 2,5; 0,6$ Hz) e δ 3,28 (1H, $J = 4,0; 2,0; 0,6$ Hz) aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente (Tabela 10).

O espectro de RMN de ${}^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD_3OD) de **I** (página 161) apresentou sinais correspondentes a 11 átomos de carbono. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (página 162) foi possível determinar a natureza dos carbonos, o que confirmou a presença de dois carbonos metílicos, sete carbonos metínicos e de dois carbonos quaternários. Alguns carbonos apresentaram deslocamentos químicos característicos de ligações duplas (δ 138,08 e δ 132,92), de carbonos hidroxilados (δ 73,20, δ 71,00 e δ 70,90) e de epóxidos (δ 57,81 e δ 56,66) (Tabela 10) (Silverstein, 1994).

A análise do mapa de contornos HMQC (${}^1J_{C,H}$) permitiu a atribuição inequívoca da maioria dos carbonos protonados (página 163). Outros sinais (C-6, C-9, C-10 e C-11) foram atribuídos por comparação com o espectro simulado no programa ACD40-CNMR (IBM, Versão 3.50) (Silverstein, 1994) porque o experimento HMBC não foi realizado.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância I

Posição	Substância I ^a			
	Tipo C ^b	$\delta^{13}\text{C}$ ^c	$\delta^1\text{H}/M^d$ /J Hz ^e	COSY (H→H)
1	CH	71,00 ou 70,90	4,56 sl (w/2 5,5)	3,28; 3,38
2	CH	57,81	3,38 ddd 0,6; 2,5; 3,5	3,28; 4,56
3	CH	56,66	3,28 ddd 0,6; 2,0; 4,0	3,38; 3,96
4	CH	71,00 ou 70,90	3,96 dd 1,1; 5,5	3,28; 3,38; 4,21
5	CH	73,20	4,21 d 5,5	3,96
6	C	132,92	-	-
7	CH	128,34	6,62 m	6,53
8	CH	121,86	6,53 m	1,79 ou 1,81; 6,62
9	C	138,08	-	-
10	CH ₃	18,04	1,81 s	4,56; 6,53
11	CH ₃	26,74	1,79 s	4,56; 6,53

^a Dados obtidos no presente trabalho (CD₃OD, 400 MHz).

^b Atribuída pelo experimento DEPT-135.

^c Dados atribuídos pelo mapa de contornos da técnica HMQC.

^d M = multiplicidade; d = duplete; ddd = duplo duplete duplo; m = multiplete, s= simpleto, sl= simpleto largo.

^e J = constante de acoplamento escalar.

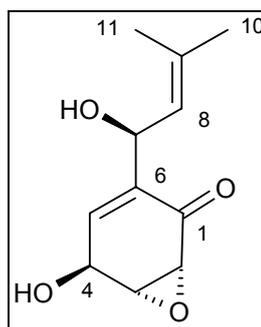
A estereoquímica dos hidrogênios nas posições 1, 4 e 5 do neopanepoxidol foi relacionada às epoxiquinonas, de acordo com o proposto por Sekiguchi, Gaucher (1979), para o isômeros *trans* devido aos valores de acoplamento escalar de pequena distância (Tabela 11). Propõe-se aqui uma configuração em barco para o anel de 6 membros do neopanepoxidol com as hidroxilas das posições 1, 4 e 5 em equatorial, equatorial e axial, respectivamente.

Tabela 11 - Constantes de acoplamento escalar para substâncias relacionadas a epoxiquinonas

Acoplamento escalar	Isômero <i>cis</i> ^a	Isômero <i>trans</i> ^b
$J_{3,4}$	2,5-3,0	1,0-1,4
$J_{4,5}$	2,5	5,0

^aIsômero *cis*: OH em 4 e epóxido no mesmo plano. ^b OH em 4 e epóxido em planos opostos

5.2.2 Substância II: panepoxidona



A substância **II** foi isolada como um óleo amarelo, que apresentou máximo de absorção no ultravioleta, obtido em detector de fotodiodo por CLAE em eluição em gradiente de acetonitrila em água, em 242 nm (página 164) (lit. 242 nm em CH₂Cl₂) e atividade ótica de $[\alpha]_D^{25} - 61,0$ (CH₂Cl₂, c = 0,4) (lit. $[\alpha]_D^{20} - 61,0$, c = 0,4, CH₂Cl₂) (Kis et al, 1970).

O espectro no IV (KBr, ν_{\max}) de **II** (página 165) apresentou uma banda em 3381 cm⁻¹ referente ao estiramento de O–H. As absorções em 2974 cm⁻¹ e 2880 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramento de C–H de carbono alifático e a banda forte em 1682 cm⁻¹ foi atribuída a estiramento C=O de grupo carbonila α,β -insaturada cíclica. As absorções em 1383 cm⁻¹ e em 1043 cm⁻¹ foram atribuídas, respectivamente, a deformação angular de C–H e a estiramento de C–O de álcool (lit. 3600_v O–H, 3400_v O–H, 1680_v C=O, Kis et al, 1970; Silverstein, 1994).

O espectro de massas de **II** (página 166), obtido no modo negativo por “*electrospray*”, forneceu o íon *quasi*-molecular com m/z 209 [M-H]⁻, compatível com a fórmula molecular C₁₁H₁₄O₄.

O espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **II** (página 167) apresentou um duplo duplo duplo em δ 6,70 (1H, $J = 3,6$ Hz; 2,5 Hz; 1,3 Hz) cujo deslocamento químico é característico de hidrogênio olefínico e foi atribuído ao H-5. A partir dos valores das constantes de acoplamento escalar foi possível estabelecer a correlação entre o quarteto duplo em δ 5,02 (1H, $J = 8,8$ Hz; 1,3 Hz) e o duplo em δ 5,29 (1H, $J = 8,8$ Hz) que foram atribuídos aos H-8 e H-7 e entre o duplo

duplo em δ 3,46 (1H, $J = 3,6$ Hz; 1,0 Hz) e o duplo duplete duplo em δ 3,80 (1H, $J = 3,6$ Hz; 2,5 Hz; 1,3 Hz) que foram atribuídos, respectivamente, aos H-2 e H-3. Por fim, o simpleto em δ 1,72, com integral de 6H, foi atribuído a hidrogênios de grupos metila referentes aos carbonos C-10 e C-11 (Tabela 12) (Silverstein, 1994).

A atribuição inequívoca destes hidrogênios foi realizada com base na análise dos mapas de contornos COSY ($^{2,3}J_{H,H}$) (página 168) que permitiu correlacionar os sinais em δ 5,29 (H-7) com δ 5,02 (H-8) e δ 6,70 (H-5) e em δ 3,80 (H-3) com δ 3,46 (H-2), δ 4,68 (H-4) e δ 6,70 (H-5) (Tabela 12).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de **II** (página 169) apresentou sinais de carbono característicos de carbonila (δ 194,47) e de carbonos metílicos (δ 25,90 e δ 18,42). A presença de carbonos hidroxilados foi identificada pelos sinais em δ 65,35 e em δ 63,16 e de carbonos de epóxido pelos sinais em δ 53,88 e em δ 57,71. A análise do subespectro DEPT-135 (página 170) confirmou a presença de dois grupos metila, seis grupos metínicos, dois carbonos quaternários e de uma carbonila (Tabela 12).

A confirmação da atribuição dos sinais de RMN de 1H e de ^{13}C foi feita a partir da análise do mapa de contornos HMQC ($^1J_{C,H}$) (página 171). O mais importante foi correlacionar os sinais dos carbonos hidroxilados em δ 63,16 com δ 4,68 (C/H-4) e em δ 65,35 com δ 5,29 (C/H-7) e os sinais dos carbonos da ligação dupla em δ 137,78 com δ 6,70 (C/H-5) e em δ 123,68 com δ 5,02 (C/H-8) aos seus respectivos hidrogênios. Já, os sinais dos carbonos quaternários em δ 138,98 (C-6/H-2 e H-7) e em δ 138,26 (C-9/H-7) foram atribuídos pelos valores de J_3 - J_4 adquiridos pelo mapa de contornos HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) (página 172; Tabela 12). A estereoquímica da panepoxidona foi baseada na proposta de Shotewll et al. (2000) que a sintetizaram e obtiveram a configuração relativa por análise de raio-X.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância II

Posição	Substância II ^a				
	Tipo C ^b	$\delta^{13}\text{C}$ ^c	$\delta^1\text{H}/\text{M}^d / J(\text{Hz})^e$	HMBC (C→H)	COSY (H→H)
1	C=O	194,47	-	3,46; 5,29; 6,70	-
2	CH	53,88	3,46 dd 1,0; 3,6	3,80	3,80; 4,68
3	CH	57,71	3,80 ddd 1,3; 2,5; 3,6	6,70	3,46; 4,68; 6,70
4	CH	63,16	4,68 sl	3,80	3,46; 3,80; 6,70
5	CH	137,78	6,70 ddd 1,3; 2,5; 3,6	3,80; 5,29	3,80; 4,68; 5,29
6	C	138,98	-	3,46; 5,29	5,02; 6,70
7	CH	65,35	5,29 d 8,8	5,02; 6,70	-
8	CH	123,68	5,02 qd 1,3, 8,8	1,72; 5,29	1,72; 5,29
9	C	138,26	-	5,29	-
10/11	CH ₃	25,90/18,42	1,72 s	1,72; 5,02	5,02

^a Dados obtidos no presente trabalho (CDCl₃, 400 MHz).

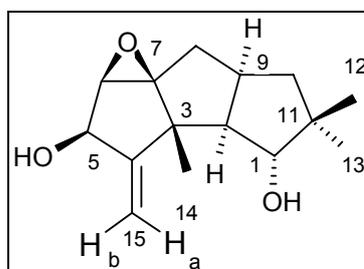
^b Atribuída pelo experimento DEPT-135.

^c Dados atribuídos pelo mapa de contornos da técnica HMQC.

^d M = multiplicidade; d = duplete; dd = duplete duplo, ddd = duplo duplete duplo, qd = quarteto duplo; sl = simpleto largo.

^e J = constante de acoplamento escalar.

5.2.3 Substância III: 6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol



A substância III apresentou-se como um sólido branco cristalino, com atividade ótica $[\alpha]_D^{25} +135^\circ$ (CHCl₃, c = 0,5). O espectro no UV-VIS (200-500 nm), obtido em MeOH (2%p/v), sugeriu que a substância não possui grupos cromóforos e que seu máximo de absorção se encontra na região do ultravioleta de vácuo (página 173).

O espectro no IV (KBr, ν_{max}) de III (página 174) apresentou uma banda em 3390 cm⁻¹ que foi atribuída a estiramento de O–H. A natureza alifática da substância foi evidenciada pela presença das absorções em 2939 cm⁻¹ e 2858 cm⁻¹, atribuídas a

estiramento de C–H de carbono alifático e confirmada pelas bandas em 1458 cm^{-1} e em 957 cm^{-1} e 883 cm^{-1} , que foram atribuídas a deformação angular no plano e fora do plano de C–H, respectivamente. A banda em 1666 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de C=C de alqueno e a absorção em 1392 cm^{-1} a deformação angular de C–H, enquanto que as bandas em 1222 cm^{-1} e em 1045 cm^{-1} foram atribuídas a estiramento de C–O (lit. 3398, 1716, 1668, 1463 cm^{-1} , Abate, Abraham, 1994; Silverstein, 1994).

O espectro de massas de **III** (página 175), obtido por impacto de elétrons (EI 70 eV), mostrou o pico do íon molecular com m/z 250, consistente com a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **III** (página 176), juntamente com os dados da literatura para o 6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol, permitiu atribuir os sinais em δ 5,32 (d, 1H, $J = 2,2\text{ Hz}$) e em δ 5,15 (dd, 1H, $J = 2,2\text{ Hz}; 0,8\text{ Hz}$) aos hidrogênios olefínicos H-15_a e H-15_b. (Tabela 13). Esses hidrogênios apresentaram correlações com o quarteto em δ 4,62 (1H, $J = 2,2\text{ Hz}$), que foi relacionado ao duplete em δ 3,47 (1H, $J = 2,2\text{ Hz}$), permitindo atribuir esses dois sinais como sendo os hidrogênios dos carbonos C-5 e C-6, respectivamente. A partir dos valores das constantes de acoplamento escalar foi possível estabelecer a correlação entre o duplete em δ 3,80 (1H, $J = 8,4\text{ Hz}$) e o duplete duplo em δ 2,03 (1H, $J = 12,0\text{ Hz}; 8,4\text{ Hz}$) que foram atribuídos aos hidrogênios dos carbonos C-1 e C-2. O valor de $J = 12,0\text{ Hz}$ do sinal em δ 2,03 permitiu relacioná-lo com o multiplete em δ 1,13 (1H, $J = 12,0\text{ Hz}$), que foi atribuído ao H-10 β . Pela análise do mapa de contornos COSY ($^{2,3} J_{\text{H,H}}$) (página 177), observaram-se correlações entre o multiplete referente ao H-10 β e os multipletos em H-10 α e H-9 e entre o multiplete H-9 e o duplete referente ao H-8, confirmando as atribuições realizadas através do espectro de RMN de ^1H .

Tabela 13 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H para substância III e comparação com dados da literatura

Hidrogênio	6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol ^a			Substância III ^b				
	δ ^1H	M	J (Hz)	δ ^1H	M ^c	ln	J (Hz) ^d	COSY (H→H)
H-1	3,81	d	8,5	3,80	d	1H	8,4	2,03
H-2	2,03	dd	11,0	2,03	dd	1H	8,4; 12,0	2,60; 3,80
H-5	4,63	m	2,0	4,62	q	1H	2,2	3,47; 5,15; 5,32
H-6	3,48	d	2,0	3,47	d	1H	2,2	4,62; 5,15
H-8	1,83	d	9,0	1,82	d	2H	9,0	-
H-9	2,62	m	8,0, 11,0	2,60	m	1H	-	1,13; 1,82; 1,85; 2,03
H-10 α	1,84	dd	12,0	1,85	m	1H	-	1,13; 2,60
H-10 β	1,14	dd	12,0	1,13	m	1H	12,0	1,85, 2,60
H-12	0,89	s	-	1,05	s	3H	-	-
H-13	1,05	s	-	0,89	s	3H	-	-
H-14	1,18	s	-	1,17	s	3H	-	-
H-15 _a	5,33	d	2,0	5,32	d	1H	2,2	4,62
H-15 _b	5,16	d	2,0	5,15	dd	1H	2,2	3,47; 4,62

^a Dados obtidos por Abate, Abraham (1994), em CDCl_3 (400 MHz).

^b Dados obtidos no presente trabalho, em CDCl_3 (400 MHz).

^c M = multiplicidade; d= duplete; dd = duplete duplo; m = multiplete, q= quarteto; s= simpleto.

^d J = constante de acoplamento escalar.

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância III (página 178) apresentou 15 sinais de átomos de carbono. Por comparação com o subespectro DEPT-135 (página 179, Tabela 14) confirmou-se presença de quatro carbonos quaternários, cinco carbonos metínicos, três carbonos metilênicos e três carbonos metílicos. Alguns sinais apresentaram deslocamentos químicos característicos de carbonos de ligação dupla em δ 159,64 e em δ 112,53 e de carbonos hidroxilados em δ 80,96 e em δ 74,19.

A análise do experimento HMQC ($^1J_{\text{C,H}}$) (página 180) confirmou a atribuição de alguns sinais e permitiu correlacionar os sinais de carbonos hidroxilados em δ 80,96 com o sinal em δ 3,80 (C/H-1) e em δ 74,19 com o sinal em δ 4,62 (C/H-5) e do sinal de carbono ligado a epóxido δ 63,73 com δ 3,47 (C/H-6) aos seus respectivos hidrogênios. As posições dos grupos metila foram confirmadas com o auxílio do

mapa de contornos HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) (página 181) que demonstrou manchas de correlações entre C-12/H-10 β e H-1), entre C-13/H-10 β , H-10 α e H-1 e entre C-14/H-2. Abate, Abraham (1994), atribuíram aos H-12 e H-13, os sinais em δ 0,89 e em δ 1,07 no espectro de RMN de 1H . Estes sinais foram correlacionados aos sinais de carbono em δ 17,5 e δ 19,8, respectivamente. Portanto, a atribuição desses grupos por Abate, Abraham (1994) não está em acordo com a análise dos experimentos bidimensionais (HMQC, HMBC) adquiridos para a substância III.

Tabela 14 - Dados de RMN de 1H e de ^{13}C para a substância III

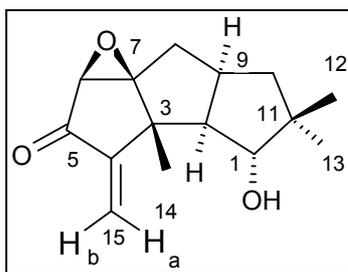
Carbono	Substância III			6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol
	δ^1H	$\delta^{13}C^a$	Multiplicidade ^b	$\delta^{13}C^c$
C-1	3,80	80,96	CH	81,0
C-2	2,03	55,25	CH	55,2
C-3	-	47,55	C	47,6
C-4	-	159,64	C	159,5
C-5	4,62	74,19	CH	74,2
C-6	3,47	63,73	CH	63,8
C-7	-	75,03	C	75,1
C-8	1,82	30,74	CH ₂	30,7
C-9	2,60	34,81	CH	34,8
C-10	1,85/1,13	46,36	CH ₂	46,4
C-11	-	44,22	C	44,2
C-12	0,89	26,48	CH ₃	17,5
C-13	1,05	19,78	CH ₃	19,8
C-14	1,17	17,51	CH ₃	26,5
C-15	5,32/5,15	112,53	CH ₂	112,5

^a Dados obtidos no presente trabalho (CDCl₃, 100 MHz).

^b Atribuída pelo experimento DEPT-135.

^c Dados obtidos por Abate, Abraham (1994), em CDCl₃ (75 MHz).

5.2.4 Substância IV: hipnofilina



A substância **IV** foi isolada como um óleo amarelo, que apresentou valor de atividade ótica de $[\alpha]_D^{25} - 74,0$ (CHCl_3 , $c = 0,9$) (lit. $[\alpha]_D^{25} - 82,9$, CHCl_3 , $c = 0,9$; Giannetti et al, 1986) e máximo de absorção no ultravioleta, obtido em detector de fotodiodo por CLAE em eluição em gradiente de acetonitrila em água (página 182) em 238 nm (lit. 234 nm em MeOH, Giannetti et al, 1986).

O espectro no IV (KBr, ν_{max}) de **IV** (página 183) apresentou uma banda em 3443 cm^{-1} que foi atribuída a estiramento de O–H. A natureza alifática foi evidenciada pela presença de absorções em 2937 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} , referentes a estiramento de C–H de carbono alifático. A banda em 1728 cm^{-1} foi atribuída a estiramento C=O de grupo carbonila α,β -insaturada em anel de 5 membros e a absorção em 1636 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=C de alquenos. As bandas em 1375 cm^{-1} e em 1115 cm^{-1} foram atribuídas às deformações angulares de C–H e estiramento de C–O, respectivamente (Silverstein, 1994).

O espectro de massas de **IV** (página 184), obtido por impacto de elétrons (EI 70 eV), apresentou pico do íon molecular com m/z 248, consistente com a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **IV** (página 185) e os dados da literatura para a hipnofilina permitiram atribuir os sinais em δ 6,13 (s, 1H) e em δ 5,45 (s, 1H) aos hidrogênios olefínicos H-15_a e H-15_b. O simpleto em δ 3,43, com integral de um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio do carbono C-6 e os demais sinais foram atribuídos por comparação com dados da literatura (Tabela 15).

Tabela 15 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H para substância **IV** e comparação com dados da literatura

Hidrogênio	Hipnofilina ^a			Substância IV ^b			
	δ ^1H	M	<i>J</i> (Hz)	δ ^1H	Int	M ^c	<i>J</i> (Hz) ^d
H-1	3,87	d	9,0	3,87	1H	d	9,0
H-2	2,14	dd	9,0; 12,0	2,14	1H	dd	9,0; 12,0
H-6	3,44	s	-	3,43	1H	s	-
H-8	1,93 1,84	ABX	9,0; 10,0; 14,0	1,95	3H	m	-
H-9	2,65	m	8,0; 10,5	2,64	1H	m	-
H-10 α	1,87	dd	0,2; 0,7; 13,0	1,90	3H	m	-
H-10 β	1,30	dd	10,5; 13,0	1,23	1H	m	-
H-12	1,07	s	-	1,07	3H	s	-
H-13	0,89	s	-	0,89	3H	s	-
H-14	1,31	s	-	1,30	3H	s	-
H-15 _b	5,46	s	-	5,45	1H	s	-
H-15 _a	6,14	s	-	6,13	1H	s	-

^a Dados obtidos por Giannetti et al (1986) em CDCl_3 (400 MHz).

^b Dados obtidos no presente trabalho, em CDCl_3 (400 MHz).

^c M = multiplicidade; d = duplete; dd = duplete duplo, m = multiplete, s = simpleto.

^d *J* = constante de acoplamento escalar.

O espectro de RMN de ^{13}C (página 186) obtido para a substância **IV** (100 MHz, CDCl_3) apresentou sinais de carbonos característicos de carbonila em δ 197,60 e de carbonos de grupos metila em δ 17,71, em δ 19,70 e em δ 26,42. A multiplicidade desses sinais foi atribuída por comparação com o experimento DEPT-135 (página 187), confirmando a presença de três carbonos metílicos, três carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos, quatro carbonos quaternários e uma carbonila (Tabela 16).

A análise do experimento HMQC ($^1J_{C,H}$) (página 188) permitiu obter a maioria das correlações heteronucleares 1H - ^{13}C e confirmou a atribuição de alguns sinais. O mais importante foi correlacionar o sinal do carbono ligado à hidroxila em δ 81,2 com o sinal em δ 3,87 (C/H-1) e o sinal do carbono ligado ao epóxido em δ 61,10 com δ 3,43 (C/H-6) aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 16).

As posições dos carbonos metilênicos C-8 e C-10 e dos grupos metila foram confirmadas pela análise do mapa de contornos HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) (página 189) que demonstrou manchas de correlações entre δ 30,75 com δ 2,64, δ 2,14 e δ 1,23 (C-8/H-9, H-2, H-10 β), entre δ 34,52 com δ 2,14, δ 1,95, δ 1,90 e δ 1,23 (C-9/H-2, H-8, H-10 α , H-10 β) e entre δ 46,12 com δ 1,07 e δ 0,89 (C-10/H-12, H-13). Desse modo, atribuição dos grupos metila para a substância **IV** foi diferente da relatada por Abate, Abraham (1994) (Tabela 16).

Tabela 16 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de 1H e de ^{13}C para substância **IV** e comparação com dados da literatura

Carbono	Substância IV			Hipnofilina ^c
	δ^1H	$\delta^{13}C^a$	Multiplicidade ^b	$\delta^{13}C$
C-1	3,87	81,23	CH	81,2
C-2	2,14	56,13	CH	56,4
C-3	-	45,54	C	45,4
C-4	-	153,73	C	153,8
C-5	-	197,60	C=O	197,7*
C-6	3,43	61,14	CH	61,1
C-7	-	76,04	C	76,1*
C-8	1,95	30,75	CH ₂	30,8
C-9	2,64	34,52	CH	34,5
C-10	1,90/1,23	46,12	CH ₂	46,1
C-11	-	44,14	C	44,1
C-12	1,07	26,43	CH ₃	17,7
C-13	0,89	19,66	CH ₃	19,7
C-14	1,30	17,75	CH ₃	26,4
C-15	6,13/5,45	121,61	CH ₂	121,6

^a Dados obtidos no presente trabalho (CDCl₃, 100 MHz).

^b Atribuída pelo experimento DEPT-135.

^c Dados obtidos por Abate, Abraham (1994) (CDCl₃, 75,5 MHz).

* Dados obtidos por Giannetti et al, 1986 (CDCl₃, 100 MHz).

A configuração absoluta da hipnofilina foi descrita por Giannetti e et al (1986) e foi obtida pela similaridade de seu espectro de dicroísmo circular com o do ácido complicático, composto estruturalmente semelhante em que a configuração absoluta é conhecida.

5.3 Atividades biológicas das substâncias ativas isoladas do extrato em acetato etila de *Lentinus strigosus*

Foram isoladas quatro substâncias do extrato em acetato de etila de *L. strigosus* (Figura 9). Duas, neopanepoxidol (I) e panepoxidona (II), são terpenóides de onze carbonos derivados da epoxidona, enquanto que hipnofilina (IV) e seu diol (III) são sesquiterpenóides da família hirsutano (Kis et al, 1970; Abate, Abraham, 1994).

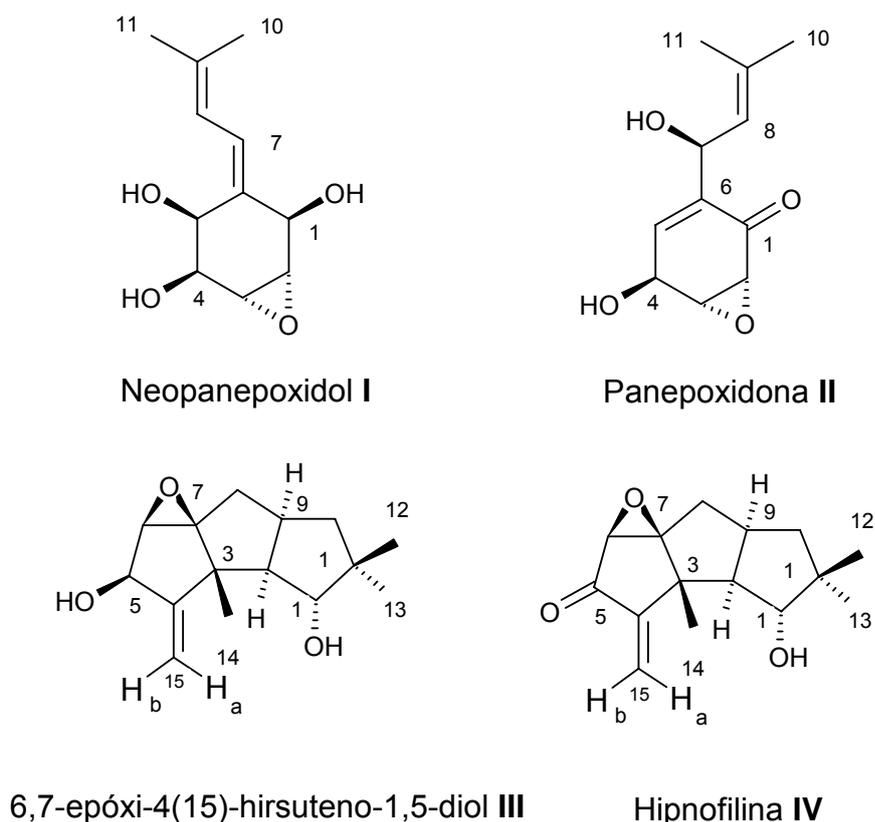


Figura 9 - Estruturas das substâncias isoladas do extrato em acetato de etila de *L. strigosus*.

Hipnofilina foi previamente isolada de *Lentinus connatus* (Rukachaisirikul et al., 2005), *L. crinitus* (Abate & Abraham, 1994) e *Pleurotellus hypnophilus* (Giannetti et al., 1986) e sintetizada a partir do esquarato de diisopropila (Geng, Liu, Paquette, 2002). Por outro lado, seu derivado alcoólico (III) foi isolado somente do extrato obtido do cultivo de *L. connatus* (Rukachaisirikul et al., 2005) e *L. crinitus* (Abate & Abraham, 1994). Panepoxidona e neopanepoxidol foram isolados de *Panus rudis* e *P. conchatus* (Kis et al., 1970), enquanto que panepoxidona também foi obtida de *L. connatus* (Rukachaisirikul et al., 2005) e *L. crinitus* (Erkel and Anke, 1996).

As substâncias isoladas foram avaliadas, preliminarmente, em três ensaios biológicos a 20 µg/mL. Os resultados dos ensaios biológicos (Tabela 17) demonstraram que somente panepoxidona (II) e hipnofilina (IV) são ativas.

Tabela 17 - Resultados dos ensaios biológicos das substâncias isoladas do extrato orgânico de *L. strigosus*

Substâncias (20 µg/mL)	% de inibição da proliferação de células tumorais			% de inibição da proliferação de CMSP ^b	% de inibição da TR ^c
	UACC-62 ^a	TK-10 ^a	MCF-7 ^a		
Neopanepoxidol (I)	13,5	2,5	3,7	8,8	0,0
Panepoxidona (II)	100,0	100,0	100,0	87,5	82,0
6,7-epóxido-4(15)-hirsuteno-1,5-diol (III)	17,3	2,9	-	11,5	0,0
Hipnofilina (IV)	100,0	100,0	100,0	66,5	100,0

^a UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mamária) e TK-10 (renal). ^b Células mononucleares humanas do sangue periférico estimuladas com PHA. ^c Tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*. Os dados foram obtidos em triplicata.

A partir dos resultados preliminares (Tabela 17), somente panepoxidona e hipnofilina foram avaliadas em ensaios utilizando amastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* e tiveram seus valores de CI₅₀ obtidos para os ensaios de inibição da tripanotona redutase, de inibição do crescimento de formas amastigotas de *T. cruzi*, ensaio com células tumorais humanas e células mononucleares do sangue periférico (Tabelas 18 e 19).

As substâncias **II** e **IV** apresentaram valores de CI_{50s} de $48 \mu M$ e $1 \mu M$, respectivamente, no ensaio de inibição da TR (Tabela 18). Panepoxidona e hipnofilina apresentaram CI_{50} na mesma faixa de poliaminoguanidinas e poliaminobiguanidinas sintéticas (CI_{50s} de $0,95 \mu M$ e $69,47 \mu M$) (Bi et al., 2006). Comparando com o controle positivo, clomipramina (CI_{50} de $6,5 \mu M$) (Fairlamb, Fries, 2003), panepoxidona é cerca de oito vezes menos ativa e hipnofilina é cerca de sete vezes mais ativa.

Bond et al (1999) identificaram o alcalóide lunarina como um inibidor competitivo e tempo-dependente da TR. A proposta para inativação da TR pela lunarina envolve a formação de uma ligação covalente entre o seu grupo amida α,β -insaturado e o sítio ativo tiólico (cisteína53) da enzima (Bond et al,1999; Hamilton et al,2003) (Figura 10). De acordo com Kupchan et al (1970), o grupo exometileno da hipnofilina sofre facilmente uma reação de adição do tipo “Michael” com grupos tiólicos da cisteína. Portanto, as duas substâncias ativas poderiam sofrer o mesmo tipo de reação que a lunarina já que possuem cetona α,β -insaturada.

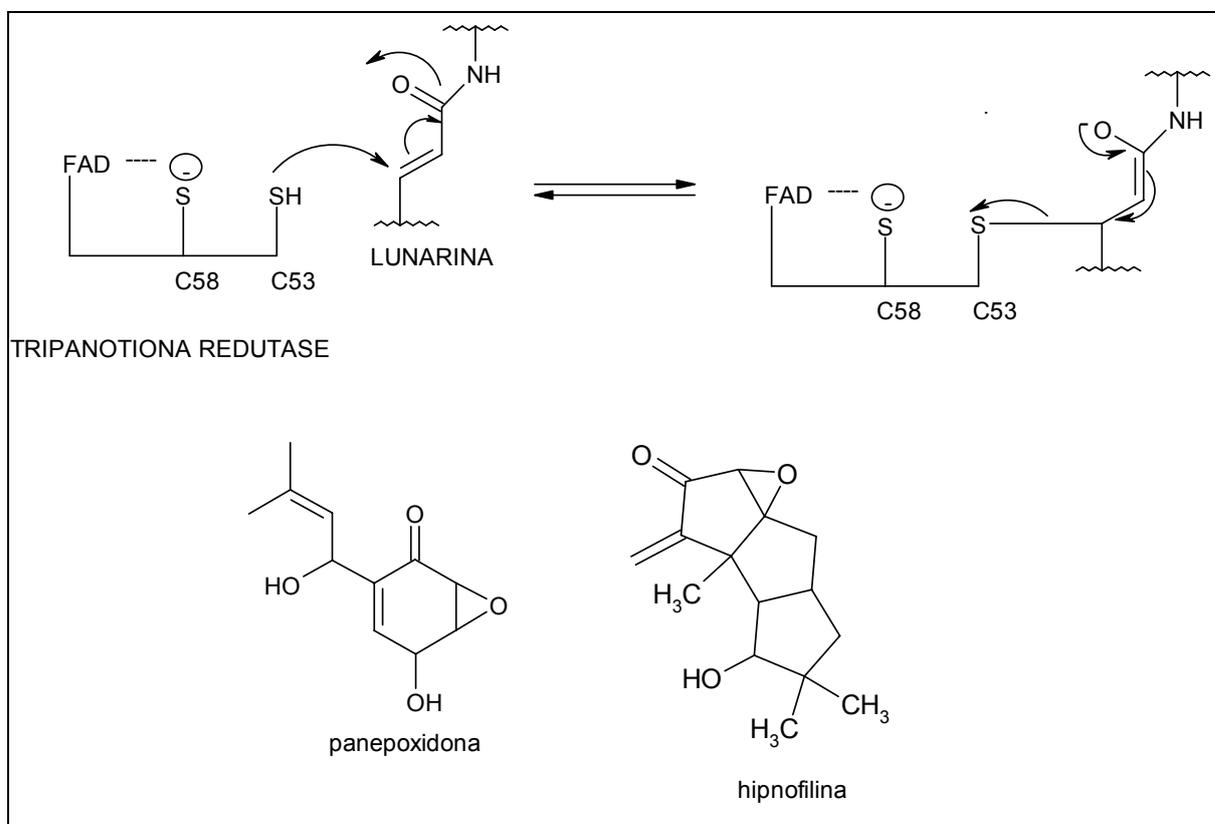


Figura 10 - Proposta de mecanismo de inibição reversível e tempo-dependente da TR pela lunarina.

Fonte: Hamilton et al, 2003.

Devido aos resultados obtidos nos ensaios bioquímicos de inibição da TR, panepoxidona e hipnofilina foram avaliadas contra as formas amastigotas intracelulares *T. cruzi* da cepa Tulahen expressando a β -galactosidase. No ensaio contra amastigotas, essas duas substâncias apresentaram valores de CI_{50s} de 6,0 μ M e 2,5 μ M, respectivamente, salientando os resultados positivos encontrados nos ensaios de inibição da TR (Tabela 18). Os valores de CI_{50} para panepoxidona e hipnofilina foram próximos ao do benzonidazol, fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas. Drogas com capacidade de inibir a multiplicação das formas amastigotas é clinicamente relevante pois são as formas do parasita que mantêm a infecção ativa na doença de Chagas e promoverem o rompimento das células hospedeiras, causando danos aos tecidos e órgãos.

Quando avaliadas a 100 μ g/mL, no ensaio *in vitro* em sangue de camundongos contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi*, as substâncias **II** e **IV** foram consideradas inativas (Tabela 18) em relação à violeta genciana (CI_{50} a 7,5 μ g/mL; 18,3 μ M). A falta de atividade dessas duas substâncias pode ser devido à incapacidade de atravessarem as membranas biológicas, serem rapidamente metabolizadas pelo hospedeiro ou sofrerem degradação pelos componentes presentes no sangue. Resultados semelhantes foram encontrados para os análogos da espermina que inibiram a TR, mas não foram tóxicos para as culturas de tripanossomas (Fries, Fairlamb, 2003). Os resultados do estudo realizado por Inchausti e et al (1997) também demonstraram que extratos do filtrado e do micélio do cultivo de 17 fungos basidiomicetos foram, em geral, inativos a 250 μ g/mL em ensaios contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além disso, dos sete metabólitos secundários (aleurodiscal, estriatinas A e B, miniopetal E, oosporeína, naematolina e ácido podoscífico) isolados de basidiomicetos e avaliados no ensaio contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, somente naematolina foi capaz de lisar 79% das formas sanguíneas de *T. cruzi* a 250 μ g/mL.

Apesar dos resultados encontrados nos ensaios com tripomastigotas neste trabalho, o modelo com a enzima possui características adequadas para estudos biomonitorados, já que detecta substâncias bioativas. Além disso, as atividades de inibição da TR e de inibição das formas intracelulares de *T. cruzi* transgênico são pela primeira vez relatadas neste trabalho.

Tabela 18 - Resultados dos ensaios biológicos das substâncias isoladas do extrato de *Lentinus strigosus* nos ensaios de inibição da tripanotona redutase e ensaios com formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*

Substâncias	Cl ₅₀ TR ^a	Cl ₅₀ Amastigota de <i>T. cruzi</i> ^b	Lise de Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ^c
Neopanepoxidol I	nt	nt	nt
Panepoxidona II	48,5 µM	6,0 µM	9,5% a 476,0 µM
6,7-Epóxi-4(15)-hirsuteno- 1,5-diol III	nt	nt	nt
Hipnofilina IV	1,0 µM	2,5 µM	36% a 403,0 µM
Clomipramina	6,5 µM	---	---
Benzonidazol	---	3,5 µM	---
Violeta genciana	---	---	50% a 18,3 µM

^a Tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*. ^b *Trypanosoma cruzi* recombinante expressando β-galactosidase. ^c Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Nt: não testada. Os dados foram obtidos em triplicata.

Estudos prévios têm demonstrado que a panepoxidona apresenta atividade citotóxica contra células de mastocitoma murino (linhagem P815) (Kis et al., 1970) e inibe o fator de transcrição NF-κB que regula a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune, na inflamação e na síntese de moléculas de adesão (Erkel, Anke, Sterner, 1996). Hipnofilina apresenta fitotóxica em ensaio usando coleoptiles de aveia (*Avena* sp.) (Kupka et al., 1981) e atividade antitumoral em células ascíticas de carcinoma de Erlich a 5 µg/mL (Kupka et al., 1981). Recentemente, hipnofilina (**IV**), panepoxidona (**II**) e diidrohipnofilina (**III**) foram isoladas do extrato orgânico de *Lentinus connatus* e apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens tumorais (KB – linhagem celular de câncer epidérmico, BC – linhagem celular de câncer de mama, NCI-H187 – linhagem celular de câncer de células pequenas de pulmão e Vero – fibroblastos de rim de macaco) (Rukachaisirikul et al, 2005). Os resultados preliminares com três linhagens celulares demonstram a potencialidade da panepoxidona e hipnofilina com drogas citotóxicas promissoras no desenvolvimento de fármacos utilizados no tratamento do câncer

pois exibiram valores de CI_{50} de 3,2 a 11 μM (Tabela 19), sendo a linhagem de mama humana (MCF-7) a mais sensível.

Muitas das drogas citotóxicas utilizadas no tratamento do câncer são imunossupressoras. Além disso, poucos relatos descrevem atividade imunomoduladora de produtos naturais proveniente de basidiomicetos. Considerando este fato, as substâncias **II** e **IV** foram avaliadas em ensaio com células mononucleares do sangue periférico. Essas substâncias apresentaram valores de CI_{50} de 5,9 μM e 10,0 μM , respectivamente, inferiores ao da dexametasona, droga imunossupressora utilizada no tratamento de diversas enfermidades relacionadas a processos inflamatórios (Tabela 19) (Bradley, Lichtenstein, 1996). O ensaio com células mononucleares do sangue periférico é considerado um ensaio preliminar de toxicidade para células de defesa humanas. As células utilizadas são estimuladas com fitohemaglutinina, um mitógeno que tem a propriedade de se ligar às *N*-acetilgalactosamina de glicoproteínas expressas nas superfícies das células e, levar à proliferação de linfócitos (Tsai et al, 2002). Panepoxidona e hipnofilina apresentaram um perfil citotóxico *in vitro*, suprimindo a resposta imune. Esta resposta supressora pode ser benéfica na doença de Chagas na qual a liberação de antígenos de *T.cruzi* pode desencadear uma resposta inflamatória. A atividade imunomoduladora desses dois metabólitos é descrita pela primeira vez nesse trabalho, demonstrando o potencial como drogas imunossupressoras, úteis na clínica no tratamento de doenças auto-imunes, no transplante de órgãos e distúrbios imunológicos específicos.

Tabela 19 - Valores de CI_{50} das substâncias isoladas do extrato de *Lentinus strigosus* em ensaios com células tumorais humanas e células mononucleares do sangue periférico

Substâncias	CI_{50} proliferação de células tumorais			CI_{50} proliferação de CMSP ^b
	UACC-62 ^a	MCF-7 ^a	TK-10 ^a	
Neopanepoxidol I	---	---	---	---
Panepoxidona II	6,2 μ M	3,2 μ M	5,7 μ M	5,9 μ M
6,7-Epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol III	---	---	---	---
Hipnofilina IV	11,0 μ M	4,2 μ M	8,6 μ M	10,0 μ M
Etoposídeo	3,1 μ M	3,4 μ M	2,0 μ M	---
Dexametasona	---	---	---	25,4 μ M

^a UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mamária) e TK-10 (renal). ^b Células mononucleares humanas do sangue periférico estimuladas com PHA. Os dados foram obtidos em triplicata.

5.4 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico da espécie vegetal *Habenaria petalodes*

A extração de 86,0 g de material vegetal fresco das espécimes de *H. petalodes*, coletadas Estação Ecológica do Campus da UFMG, forneceu 2,67g de massa de extrato, enquanto que a extração de 99,0 g de material vegetal, coletado na Reserva Particular Santuário do Caraça e previamente seco em estufa ventilada, forneceu 5,36 g de extrato etanólico. Os extratos brutos de *H. petalodes*, apesar de terem sido obtidos de espécimes coletadas em localidades diferentes, apresentaram perfis semelhantes por CCD ($CHCl_3/MeOH/H_2O$ 64:50:10) após revelação com vanilina-ácido sulfúrico e por CLAE em gradiente de 10-100% de MeOH em 30 min em coluna de fase reversa e detecção no UV em 210 e 254 nm. Também apresentaram atividade citotóxica de 141% e 99%, respectivamente, em ensaios com linhagem de células de melanoma humano (UACC-62) e por isso, os extratos brutos de *H. petalodes* foram reunidos para o isolamento das substâncias.

5.4.1 Isolamento das substâncias

5.4.1.1 Fracionamento preliminar do extrato etanólico de *H. petalodes* por partição e extração em fase sólida

Uma porção de 6,2 g do extrato etanólico foi suspensa em uma mistura de MeOH/H₂O (1:1) com o auxílio de banho de ultra-som e a suspensão obtida foi transferida para um funil de separação, procedendo-se à partição com DCM. A fração MeOH/H₂O foi seca em centrífuga à vácuo, ressuspensa em água destilada e semipurificada em cartucho Sep-Pak C₁₈. A amostra foi aplicada no cartucho com auxílio de uma seringa, obtendo-se duas frações; aquosa (3,9 g), que consiste na amostra não adsorvida em sílica quimicamente modificada com grupos octadecila (RP-18) e, metanólica (756 mg), adsorvida em cartucho e eluída com MeOH (Figura 11).

5.4.1.2 Fracionamento da fração diclorometânica por cromatografia em coluna de sílica gel

A fração diclorometânica (429 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel sob pressão, procedendo-se à eluição com HEX/Et₂O (100:0 → 0:100), Et₂O/EtOAc (90:1) e metanol (Tabela 20). Foram coletadas frações de diferentes volumes que foram monitoradas por CCD de sílica gel sob luz UV a 254 nm ou após revelação com vanilina-ácido sulfúrico. As frações com perfis semelhantes foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório à 40°C, obtendo-se 10 subgrupos. As frações 6-9 foram reunidas e, posteriormente, extraídas em cartucho Sep-Pak C₁₈, com misturas crescentes de metanol em água (10% de MeOH; 30% de MeOH, 50% de MeOH, 70% de MeOH, 100% de MeOH). As frações eluídas com 70% e 100% de metanol apresentaram atividade citotóxica em ensaios com UACC-62 e foram submetidas ao fracionamento por CLAE (C₈, 75-95% de MeOH em 10 min, 95% de MeOH em 10 min, fluxo de 2 mL/min, UV em 230 e 254 nm) (Figura 11). A baixa recuperação da massa injetada não permitiu isolar a substância responsável pela atividade.

Tabela 20 - Fracionamento da fração diclorometânica obtida do extrato bruto de *H. petalodes* por cromatografia em coluna de sílica gel

Frações	Eluente	Volume (mL)	Subgrupos (frações referentes)
1	HEX (100)	700	1 (1)
2-3	HEX/Ét ₂ O (90:10)	1600	2 (2-3)
4	HEX/Ét ₂ O (80:20)	800	3 (4)
5	HEX/Ét ₂ O (70:30)	700	4 (4)
6	HEX/Ét ₂ O (60:40)	700	5 (5)
7	HEX/Ét ₂ O (50:50)	200	6 (6-7)
8	HEX/Ét ₂ O (40:60)	600	7 (7-8)
9	HEX/Ét ₂ O (30:70)	400	8 (8)
10	HEX/Ét ₂ O (20:80)	400	9 (9-10)
11	Ét ₂ O (100)	400	10 (11-13)
12	HEX/ActOC (90:10)	200	
13	MeOH(100)	200	

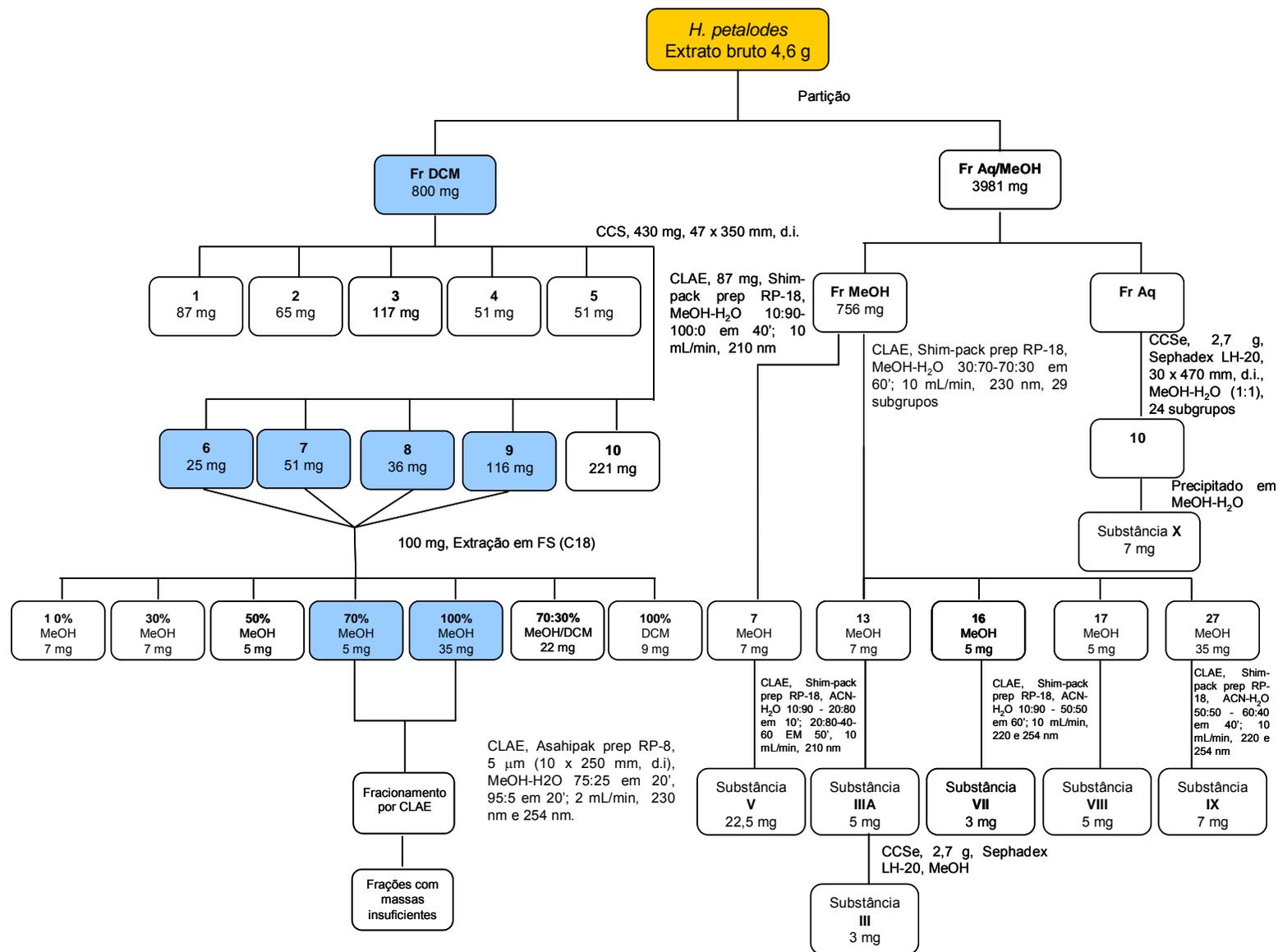
Nota: Volume total de eluentes: 6900 mL. Legenda: HEX, hexano; Et₂O, isopropanol; ActOc, acetato de etila; MeOH, metanol.

5.4.1.3 Fracionamento das frações polares do extrato etanólico de *H. petalodes*

A fração metanólica foi fracionada em um cromatógrafo semi-preparativo, empregando coluna de fase reversa. Como fase móvel utilizou-se gradiente linear de metanol em água (MeOH, 10-100% ou MeOH, 30-70%), fluxos de 10 mL/min e detecção com espectrofotômetro UV regulado para 210 nm e 254 nm. Da eluição com 10 a 100% de metanol em água foi obtido o derivado do ácido málico glicosilado **V** (22,5 mg), enquanto que o flavonóide **VIII** (7 mg) foi isolado a partir da eluição com 30 a 70% de metanol em água. Algumas subfrações foram purificadas por CLAE com diferentes misturas de acetonitrila e água e forneceram as substâncias **VI** (4 mg), **VII** (5 mg) e **IX** (8 mg) (Figura 11).

A fração aquosa (2,7 g) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna por exclusão de tamanho (CCSe) (Figura 11). Para empacotamento da coluna de vidro (30 x 470 mm, d.i.) foi utilizada uma suspensão de Sephadex LH-20 em mistura de MeOH/H₂O (1:1). Uma alíquota de 2 g foi dividida em duas porções de 1 g cada. As porções foram ressuspensas em MeOH/H₂O (1:1), aplicadas na

coluna de Sephadex LH-20 com o auxílio de uma pipeta e eluídas com a mesma mistura de solventes. As frações coletadas (10-20 mL) foram reunidas por análise do perfil por CCD de sílica gel sob luz UV a 254 nm ou após revelação com vanilina-ácido sulfúrico e/ou revelação com vapor de iodo. Das 24 subfrações obtidas, algumas foram submetidas as técnicas de purificação tais como CCS e CCSe, porém sem sucesso em relação à obtenção de compostos puros. A fração 10 forneceu um sólido amarelo por precipitação em uma mistura de MeOH/H₂O (substância **X**).

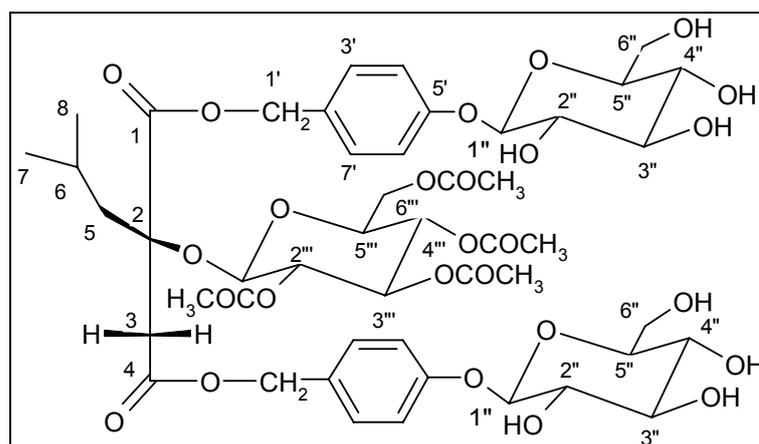


■ Atividade citotóxica (>80%) em ensaio com linhagem celular de melanoma humano (UACC-62)

Figura 11 - Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico de *H. petalodes*.

5.5 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do extrato etanólico de *H. petalodes*

5.5.1 Substância V: éster 2-isobutil-2-(2,3,4,6-tetracetil-O-glicopiranosil) bis 1,4-[4(β-D-glicopiranosiloxi)benzil] do ácido málico (dactilorina acetilada no anel 2)



A substância **V** foi obtida como uma resina amarela pálida e isolada da fração metanólica de *H. petalodes*. Apresentou atividade ótica de $[\alpha]_D^{25} - 30,0$ (MeOH, $c = 0,16$) e máximos de absorção no ultravioleta, obtido em detector de fotodiodo por CLAE (página 190), em 224 nm, 269 nm e 276 nm.

O espectro no IV (KBr, ν_{\max}) de **V** (página 191) revelou a presença de uma banda em 3433 cm^{-1} que foi atribuída a estiramento de O–H. As naturezas alifática e aromática da substância I foram evidenciadas, respectivamente, pelas absorções em 2959 cm^{-1} e 2874 cm^{-1} , referentes a estiramento de C–H de carbono alifático e pelas bandas em 1612 cm^{-1} e 1512 cm^{-1} , referentes a estiramento C=C de aromáticos. A banda em 1755 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de C=O de carbonila de éster e as absorções em 1234 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos de C–O de éster e álcool (Silverstein, 1994).

Os espectros de massas (página 192), obtidos por “*electrospray*” (EM-ES) no modo positivo para **V**, registraram picos dos íons *quasi*-moleculares referentes aos adutos de sódio com $m/z\ 1079\ [M+Na]^+$ e de potássio com $m/z\ 1095\ [M+K]^+$, compatíveis com a fórmula molecular $C_{48}H_{64}O_{26}$. Outros picos referentes aos

fragmentos de **V** foram obtidos pelos espectros de massa e as perdas que explicam a formação dos mesmos encontram-se esquematizadas na tabela abaixo.

Considerando os fragmentos (Figura 12), as perdas representadas esquematicamente na tabela 21, dados da literatura (Yi-Ming , Zhuo-Lun , Yong-Fu, 1993) e análise parcial dos espectros de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, propôs-se a estrutura da substância **V** como sendo o éster 2-isobutil-2-(2,3,4,6-tetracetil-O-glicopiranosil) bis 1,4-[4(β -D-glicopiranosiloxi)benzil] do ácido málico. Os principais fragmentos estão representados no esquema abaixo.

Tabela 21 - Principais picos registrados nos espectros, obtidos por “*electrospray*” no modo positivo, para a substância **V**

Representação das perdas	Picos (<i>m/z</i>)
[M+Na]	1079
[M+Na - 106]	973
[M+Na - 106 - 162]	811
[M+Na - 106 - 162 - 106]	705
[M+Na - 106 - 162 - 106 - 162]	543
[M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 172]	371
[M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 190]	353
[M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 172 - 60]	311

A partir das perdas e picos do espectros de massas, dados da literatura e análise dos espectros de ressonância magnética foi possível propor explicam a formação dos mesmos encontram-se esquematizadas na tabela abaixo

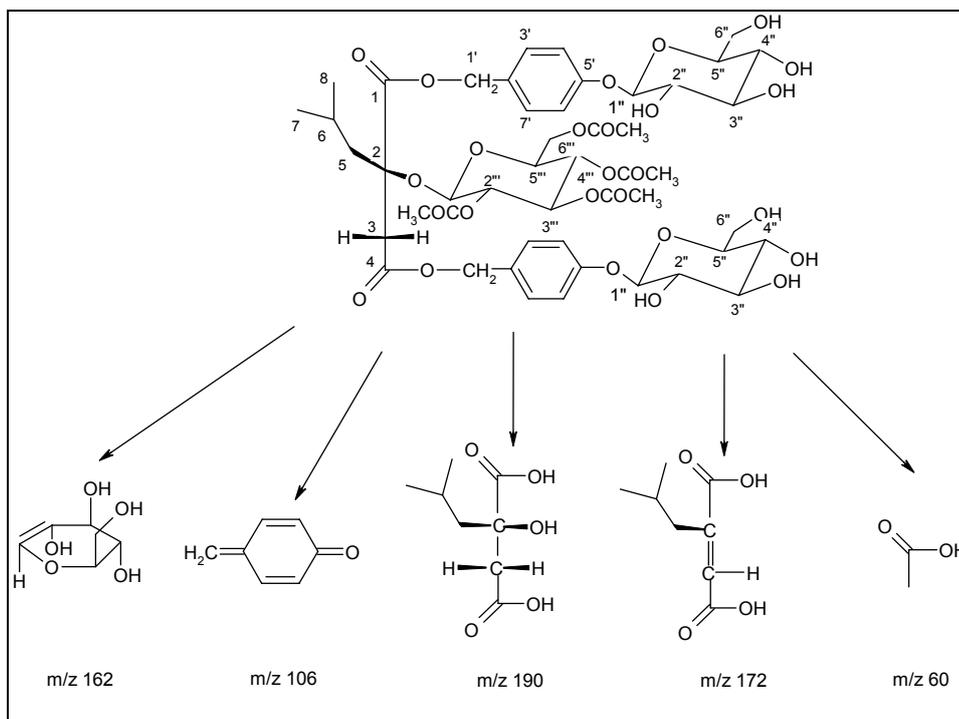


Figura 12 - Principais fragmentações no espectro de massas por “electrospray” da substância **V**.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **V** (página 193) apresentou dois sistemas de spins do tipo A_2B_2 em δ 7,30 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), δ 7,11 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz) e em δ 7,29 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), δ 7,09 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz). Os sinais em δ 0,84 e δ 0,77 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz), em δ 1,61 (dd, 2H, $J = 14,1$ Hz; 7,2 Hz) e em δ 1,73 (m, 2H) indicaram a presença de um grupo isobutílica. Hidrogênios benzílicos foram identificados pela presença de dupletos em δ 5,10 ($J = 12,0$ Hz) e δ 5,03 ($J = 12,0$ Hz) e em δ 5,06 ($J = 12,0$ Hz) e δ 4,91 ($J = 12,0$ Hz) com constantes de acoplamento característicos de hidrogênios geminais. Os sinais na região de δ 4,0 - δ 3,0 apresentaram-se sobrepostos, porém evidenciaram a presença de hidrogênios dos açúcares. A presença das unidades glicosídicas foi confirmada pelos dupletos em δ 5,21, δ 4,93 e em δ 4,89, que foram atribuídos a hidrogênios anoméricos. As constantes de acoplamento relativamente grandes ($J_{\text{H}_1\text{-H}_2}$ 8,0 Hz, 7,8 Hz e 7,7 Hz, respectivamente) dos hidrogênios anoméricos indicaram configuração β para as ligações glicosídicas (Tabela 22) (Silverstein, 1994).

Pela análise do experimento COSY (${}^{2,3} J_{H,H}$) (páginas 194) foi possível correlacionar os sinais da unidade glicosídica da porção 2-O-(β -D-glicopiranosil pelas manchas entre os sinais em δ 5,21 (H-1'') com δ 4,85 (H-2''), em δ 5,14 (H-3'') com δ 4,85 (H-2''), em δ 4,95 (H-4'') com δ 3,23 (H-5'') e em δ 4,00 (H-6''_B) com δ 3,23 (H-5'') e δ 3,78 (H-6''_A).

A análise do espectro de RMN de ${}^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD_3OD) (página 195) e subespectro DEPT-135 (página 196) de **V** revelou sinais correspondentes a presença de carbonos aromáticos (δ 159,47 - δ 117,97), seis carbonilas (δ 171,53 - δ 173,25), seis carbonos de grupos metila, sendo quatro característicos de grupos acetila, sete carbonos metilênicos e quatro tipos de carbonos quaternários. Dentre estes, o sinal em δ 81,69 foi atribuído a um carbono alifático oxigenado. Também foi possível identificar três sinais de carbonos anoméricos em 102,52, δ 102,31 e em δ 98,56, o que confirmou a presença de três açúcares (Tabela 22).

A análise dos mapas de contornos HMQC (${}^1 J_{C,H}$) (páginas 197 e 198) permitiu correlacionar os sinais dos carbonos do grupo isobutila em δ 50,23 com δ 1,61 (C/H-5), em δ 24,86 com δ 1,73 (C/H-6), em δ 23,64 com δ 0,77 (C/H-7) e em δ 24,97 com δ 0,84 (C/H-8) aos seus respectivos hidrogênios. Também foi possível atribuir os sinais dos carbonos metilênicos vizinhos ao anel aromático (δ 68,11 com δ 5,10 e δ 5,03 e δ 67,61 com δ 5,06 e δ 4,91) (Tabela 22).

Os sinais das carbonilas (δ 172,53- δ 171,55) dos grupos acetila ligados aos oxigênios das hidroxilas do açúcar em 2 foram atribuídos pelas correlações entre os sinais em δ 171,61 com δ 4,85 (C=O/H-2''), em δ 171,79 com δ 5,14 (C=O/H-3'') e em δ 171,55 com δ 4,95 (C=O/H-4'') adquiridos pela análise do mapa de contornos HMBC (${}^{2,3} J_{C,H}$) (páginas 199 e 200).

Tabela 22 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância **V**

Posição	Substância V ^a			
	Tipo C^b	$\delta^{13}\text{C}^c$	Hidrogênio	$\delta \text{H} / \text{M}^d / J (\text{Hz})^e$
C-1	C=O	173,25	-	-
C-2	C	81,69	-	-
C-3	CH_2	44,782	H-3 _A H-3 _B	3,04 d 17,9 2,98 d 17,9
C-4	C=O	172,06	-	-
C-5	CH_2	50,23	H-5	1,61 dd 7,2/ 14,1
C-6	CH	24,86	H-6	1,73 m
C-7	CH_3	23,64	H-7	0,77 d 6,4
C-8	CH_3	24,97	H-8	0,84 d 6,4
porção 1-O-(4- β -D-glicopiranosiloxi)benzil			porção 1-O-(4-D-glicopiranosiloxi) benzil	
C-1'	CH_2	68,11	H-1' _A H-1' _B	5,10 d 12,0 5,03 d 12,0
C-2'	C	130,83	-	-
C-3',7'	CH	131,66	H-3',7'	7,30 d 8,7
C-4',6'	CH	118,07	H-4',6'	7,11 d 8,6
C-5'	C	159,51	-	-
Gli-1"	CH	102,31	Gli-1"	4,93 d 7,8
Gli-2"	CH	78,26	Gli-2"	3,43 m
Gli-3"	CH	75,05	Gli-3"	3,45 m
Gli-4"	CH	78,09	Gli-4"	3,46 m
Gli-5"	CH	71,53	Gli-5"	3,40 m
Gli-6"	CH_2	62,66	Gli-6" _A Gli-6" _B	3,88 dd 2,6/ 12,0 3,70 dd 4,6/ 12,0
porção 4-O-(4- β -D-glicopiranosiloxi)benzil			porção 4-O-(4-D-glicopiranosiloxi) benzil	
C-1'	CH_2	67,61	H-1' _A H-1' _B	5,06 d 12,0 4,91 d 12,0
C-2'	C	131,06	-	-
C-3',7'	CH	131,79	H-3',7'	7,29 d 8,7
C-4',6'	CH	118,02	H-4',6'	7,09 d 8,6
C-5'	C	159,51	-	-
Gli-1"	CH	102,52	Gli-1"	4,89 d 7,7
Gli-2"	CH	78,26	Gli-2"	3,43 m
Gli-3"	CH	75,05	Gli-3"	3,45 m
Gli-4"	CH	78,09	Gli-4"	3,46 m

Gli-5''	CH	71,49	Gli-5''	3,40 m
Gli-6''	CH ₂	62,69	Gli-6'' _A	3,89 dd 2,2/ 12,0
			Gli-6'' _B	3,69 dd 5,4/ 12,0
porção 2-O-(β-D-glicopiranosil)			porção 2-O-(β-D-glicosil)	
Gli-1'''	CH	98,56	Gli-1'''	5,21 d 8,0
Gli-2'''	CH	72,79	Gli-2'''	4,85 dd 7,9/ 9,7
Gli-3'''	CH	74,20	Gli-3'''	5,14 dd 1,0/ 9,8
Gli-4'''	CH	69,66	Gli-4'''	4,95 dd 1,0/ 9,8
Gli-5'''	CH	72,40	Gli-5'''	3,23 dt 3,0/ 9,9
Gli-6'''	CH ₂	62,81	Gli-6''' _A	4,00 dd 3,6/ 12,4
			Gli-6''' _B	3,78 dd 2,4/ 12,4
Gli-2'''-C=O	C=O	171,61/20,93	Gli-2'''-C=OCH ₃	1,95 s
Gli-3'''-C=O	C=O	171,79/20,69	Gli-3'''-C=O-CH ₃	1,97 s
Gli-4'''-C=O	C=O	171,55/20,87	Gli-4'''-C=O-CH ₃	2,01 s
Gli-6'''-C=O	C=O	172,53/20,79	Gli-6'''-C=O-CH ₃	2,00 s

^a Dados obtidos no presente trabalho, em CD₃OD (400 MHz).

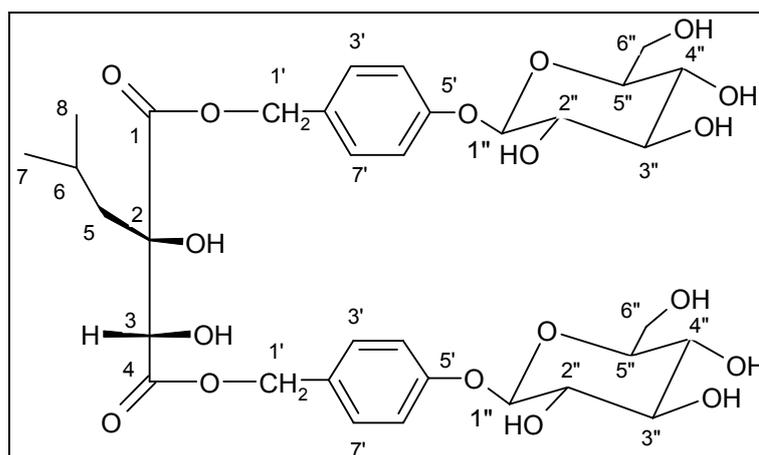
^b Atribuída pelo experimento DEPT-135.

^c Dados obtidos atribuídos pelo mapa de contornos HMQC.

^d M = multiplicidade: d = duplete; dd = duplete duplo; dt = duplo tripleto; m = multiplete; s = simpleto.

^e J = constante de acoplamento escalar

5.5.2 Substância VI: Ioroglossina



A substância **VI** foi isolada da fração metanólica e apresentou-se como um sólido amarelo. O espectro no UV-VIS (200-500 nm), obtido em MeOH (2p%/v) (página 201), apresentou máximos de absorção em 221 nm e em 268 nm. Os valores das bandas são semelhantes ao da substância **VI** e consistentes com os máximos de benzenos substituídos (Silverstein, 1994).

O espectro de massas (página 202), obtido por “*electrospray*” no modo positivo de **VI**, registrou um íon *quasi*-molecular referente ao aduto de sódio com m/z 765 $[M+Na]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{34}H_{46}O_{18}$ e coerente com a estrutura da loroglossina.

O espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) de **VI** (página 203) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos (δ 7,30 - δ 7,07) e sinais característicos de grupo isobutila em δ 0,80 e δ 0,94 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz cada), em δ 1,68 (m) e em δ 1,91 (m). Os dupletos em δ 5,08 e em δ 4,97, com acoplamento escalar de 11,8 Hz, foram atribuídos a hidrogênio benzílicos dos carbonos C-1 e o simpleto em δ 4,36 foi atribuído a um hidrogênio isolado de um grupo oximetínico da porção tartárica. Os sinais na região entre δ 4,0 - δ 3,0, apesar de apresentaram-se sobrepostos, foram atribuídos a hidrogênios das unidades glicosídicas (Tabela 23). Pela análise do espectro de correlação homonuclear COSY (página 195) pôde-se confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de 1H monodimensional (Tabela 23).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) (página 196) da substância **VI** revelou sinais característicos de carbonos aromáticos (δ 159,53 - δ 117,88) e de carbonilas de ésteres (δ 174,87 e δ 172,87). Os sinais em δ 81,69 e 77,53 foram atribuídos a carbonos alifáticos oxigenados. Também foi possível identificar sinais de carbonos anoméricos em δ 102,52, apesar dos sinais de seus hidrogênios estarem sobrepostos ao sinal do metanol no espectro de RMN de 1H .

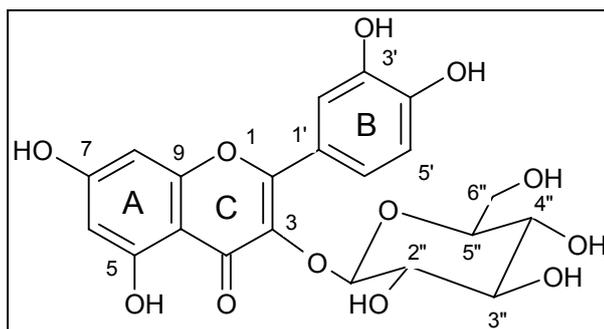
A atribuição de todos os sinais de RMN de ^{13}C (Tabela 23) foi baseada na análise dos mapas de contornos HMQC ($^1J_{C,H}$) (páginas 206) e HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) (páginas 207 e 208) e por comparação com os dados da literatura foi possível identificar a substância **VI** como sendo loroglossina (Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999).

Tabela 23 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹H para substância VI

Posição	Substância VI ^a		
	δ ¹³ C ^c	Hidrogênio	δ H/ M ^d /J (Hz) ^e
C-1	174,87	-	-
C-2	81,14	-	-
C-3	77,53	H-3	4,36 s
C-4	172,87	-	1,91 m
C-5	45,34	H-5	1,68 m
C-6	25,33	H-6	-
C-7	24,72	H-7	0,80 d (6,5)
C-8	24,15	H-8	0,94 d (6,5)
porção 1-O-(4-D-glicopiranosiloxi)benzil		porção 1-O-(4-D-glicopiranosiloxi) benzil	
C-1'	68,16	H-1' _A	5,08 d (11,8)
		H-1' _B	4,97 d (11,8)
C-2'	129,54/130,74/131,74	-	-
C-3',7'	129,54/130,74/131,74	H-3',7'	7,30 d (8,6)
C-4',6'	117,82/117,88/117,95	H-4',6'	7,12 d (8,6)
C-5'	159,38/159,53	-	-
Gli-1''	102,52	Gli-1''	3,45 m
Gli-2''	75,05	Gli-2''	3,45 m
Gli-3''	78,09/78,29	Gli-3''	3,40 m
Gli-4''	71,54	Gli-4''	3,45 m
Gli-5''	78,09/78,29	Gli-5''	3,89 m
Gli-6''	62,88	Gli-6''	3,71 m
porção 4-O-(4-D-glicopiranosiloxi)benzil		porção 4-O-(4-D-glicopiranosiloxi) benzil	
C-1'	68,16	H-1' _A	5,09 d
		H-1' _B	4,98 d
C-2'	129,54/130,74/131,74	-	-
C-3',7'	129,54/130,74/131,74	H-3',7'	7,18 d (8,8)
C-4',6'	117,82/117,88/117,95	H-4',6'	7,07 d (8,8)
C-5'	159,38/159,53	-	-
Gli-1''	102,52	Gli-1''	3,45 m
Gli-2''	75,05	Gli-2''	3,45 m
Gli-3''	78,09/78,29	Gli-3''	3,40 m
Gli-4''	71,54	Gli-4''	3,45 m
Gli-5''	78,09/78,29	Gli-5''	3,89 m
Gli-6''	62,88	Gli-6''	3,71 m

Nota: ^{a,b,c,d,e} Idem tabela 19.

5.5.3 Substância VII: quercetina 3-O-β-glicopiranosídeo (isoquercitrina)



A substância **VII** foi isolada da fração metanólica e apresentou-se como um sólido amarelo amorfo. Sua análise por CCD de sílica gel sugeriu ser um flavonóide em função do aparecimento de uma mancha de coloração alaranjada após revelação com NP/PEG (Wagner, Bladt, Zgainski, 1984).

O espectro de **VII** no UV-VIS (200-500 nm) (página 209), obtido em metanol (1%p/v), indicou a presença um núcleo flavônico devido às absorções em 204 nm, 257 nm e 356 nm, típicas de flavonas e flavonóis. A absorção em 257 nm corresponde à banda II (240-280 nm) que caracteriza o anel A e a absorção em 356 nm corresponde à banda I (300-380 nm) que caracteriza o anel B. A banda II pode ser atribuída ao cromóforo benzoíla e a banda I ao cromóforo cinamoíla. O valor do máximo de absorção da banda I possibilita a distinção entre flavonas (304-350 nm) e flavonóis (328-357 nm), sugerindo tratar-se deste último (Marbry, Markham, Thomas, 1970). A adição de NaOH promoveu deslocamento batocrômico das bandas I e II, indicando presença de hidroxila fenólica. O deslocamento batocrômico da banda I sem decréscimo da sua intensidade, indicou a presença de grupo OH em C-4'. A adição de AlCl₃ provocou deslocamento batocrômico da banda I em relação à curva em MeOH, sugerindo a presença do sistema *orto*-diidroxí. A presença de hidroxila quelatogênica em C-5 foi indicada pelo deslocamento batocrômico da banda II e confirmada pela não regeneração da curva com adição de AlCl₃/HCl. A adição de NaOAc provocou deslocamento batocrômico de ambas bandas, o que indicou a presença de hidroxilas livres de caráter ácido acentuado em C-4' e em C-7. A adição de NaOAc/H₃BO₃ promoveu o deslocamento batocrômico das bandas I e confirmou a presença do sistema *orto*-diidroxí (Marbry, Markham, Thomas, 1970).

O espectro de massas de **VII** (página 210), obtido por “*electrospray*”, apresentou íon *quasi*-molecular com m/z 487 $[M + Na]^+$, no modo positivo e, um íon *quasi*-molecular com m/z 463 $[M-H]^-$, no modo negativo, relativos à fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$. Foi também possível identificar o fragmento com m/z 325 correspondente a aglicona com sódio $[(M + Na) - 162]^+$.

O espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) da substância **VII** (página 211) apresentou sinais de impurezas na região de δ 2,70 - δ 0,87. A substância foi purificada por CCSe e obteve-se outro espectro sem grandes modificações nesta região. Entretanto, a análise dos sinais de RMN de 1H permitiu identificar um sistema ABX de deslocamentos de hidrogênios aromáticos em δ 7,73 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ 7,60 (1H, dd, $J = 2,0/ 8,7$ Hz, H-6') e δ 6,89 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5') devido à uma dissustituição 3',4' do anel B e um sistema de spins AB indicando um acoplamento *meta* para o anel A (δ 6,41, 1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8 e δ 6,24, 1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6). Um duplete em δ 5,27 foi atribuído a hidrogênio anomérico e o valor da sua constante de acoplamento escalar ($J = 7,6$ Hz) indicou uma posição axial do hidrogênio do açúcar, ou seja, orientação β da ligação glicosídica (Silverstein, 1994). A presença da unidade glicosídica foi confirmada pelos sinais na região de δ 4,06 a δ 3,30, que apresentaram-se sobrepostos, impossibilitando a atribuição dos mesmos (Tabela 24).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , $CDCl_3$, $DMSO-d_6$) (página 212) da substância **VII** também apresentou sinais de impurezas. As atribuições dos átomos de carbono desse espectro foram feitas com base nos dados publicados na literatura para a isoquercitrina (Güvenalp, Demirezer, 2005).

Tabela 24 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C para substância **VII** e comparação com dados da literatura

Posição	Substância VII		Isoquercitrina ^c	
	$\delta^1\text{H}^a$	$\delta^{13}\text{C}^b$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	-	157,57	-	158,0
3	-	135,18	-	135,1
4	-	178,59	-	178,9
5	-	161,95	-	163,2
6	6,24 d 1H (2,0)	99,56	6,10 d 1H (2,0)	101,4
7	-	165,09	-	167,3
8	6,41 d 1H (2,0)	94,41	6,26 d 1H (2,0)	95,4
9	-	158,53	-	158,6
10	-	104,98	-	105,2
1'	-	122,28	-	123,0
2'	7,73 d 1H (2,0)	115,47	7,70 d 1H (2,0)	116,2
3'	-	144,87	-	145,9
4'	-	149,00	-	149,5
5'	6,89 d 1H (8,7)	117,29	6,85 d 1H (8,0)	117,4
6'	7,60 d 1H (2,0; 8,7)	122,03	7,57 d 1H (2,0; 7,5)	122,7
3-O-Gli				
1''	5,27 d (7,6)	104,76	5,10 d 1H (7,7)	101,4
2''	4,06-3,30	74,63	3,80-3,30	74,3
3''	4,06-3,30	77,11	3,80-3,30	76,8
4''	4,06-3,30	70,07	3,80-3,30	70,3
5''	4,06-3,30	77,22	3,80-3,30	77,5
6''	4,06-3,30	61,80	3,80-3,30	61,3

^a Dados obtidos no presente trabalho, em CD_3OD (400 MHz).

^b Dados obtidos no presente trabalho, em mistura de CD_3OD e CDCl_3 e DMSO (100 MHz).

^c Dados obtidos por Güvenalp, Demirezer (2005), em metanol (300 MHz e 75 MHz).

A co-injeção de isoquercitrina com a substância **VII** por CLAE resultou em um único pico, porém com área menor devido às impurezas da amostra (Figura 13), corroborando com a proposta realizada a partir das análises dos espectros de RMN e de UV.

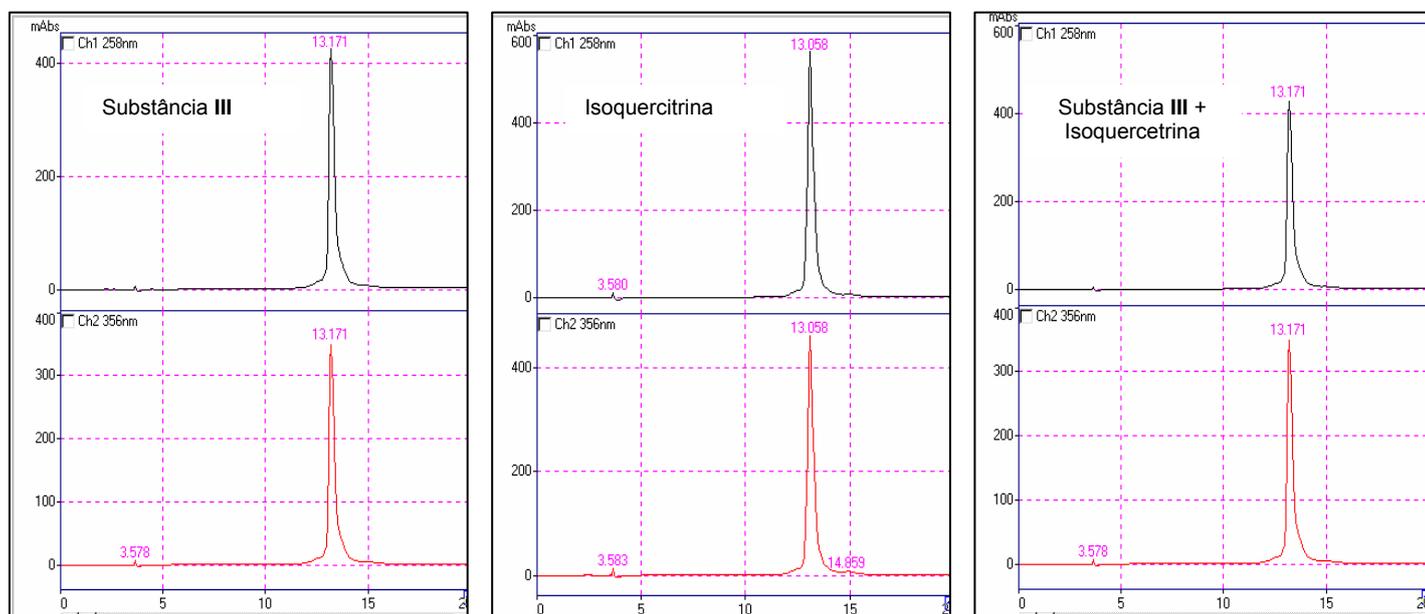
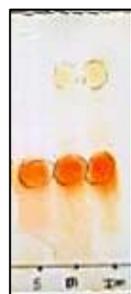


Figura 13 - Cromatogramas, obtidos por CLAE, para a substância **VII**, com adição da substância de referência (isoquercitrina). Condições cromatográficas: eluição em gradiente de água (A) e metanol (B), 0 min 70% A/30% B, 20 min, 30% A/70% B, coluna RP-18 (250 x 4,6 mm, d.i.); fluxo 1 mL/min, detecção no UV com arranjo de diodos.

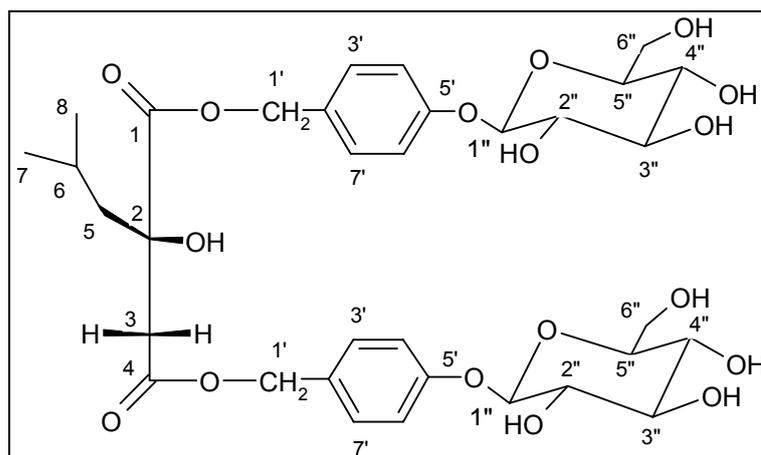
A substância **VII** também foi comparada, por CCD, com a substância de referência e apresentou mancha com o mesmo Rf da isoquercitrina (Figura 14).



(a) (b) (c)

Figura 14 - Perfil cromatográfico, obtido por CCD, para a substância **VII**. (a) Substância **VII**, (b) substância **VII** + isoquercitrina, (c) isoquercitrina. Eluente: Acetato de etila/ Ácido fórmico/ Ácido acético/ Água (100: 11: 11: 27), revelador, NP/PEG.

5.5.4 Substância VIII: militarina



A substância **VIII** também foi isolada da fração metanólica e apresentou-se como um sólido resinoso com atividade ótica de $[\alpha]_D^{25} - 28,0$ (MeOH, $c = 0,23$) [Lit. $[\alpha]_D^{25} - 47,0$ (MeOH, $c = 0,78$, Aasen, Behr, Leander, 1975)]. O espectro no UV-VIS (200-500 nm), obtido em MeOH (1 p%/v) (página 213), apresentou máximos de absorção em 203 nm, 219 nm e 269 nm.

O espectro no IV (KBr, ν_{\max}) de **VIII** (página 214) apresentou uma banda em 3410 cm^{-1} que foi atribuída a estiramento de O–H. As naturezas alifática e aromática da substância **VIII** foram evidenciadas, respectivamente, pelas absorções em 2924 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , referentes a estiramento de ligações C–H de carbono alifático e pelas bandas em 1612 cm^{-1} , 1512 cm^{-1} e 1458 cm^{-1} referentes a estiramento C=C de aromáticos. A absorção em 1736 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de C=O de carbonila de éster e as absorções em 1076 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} foram atribuídas à estiramentos de C–O [Lit. (KBr) 3700-3000, 1735, 1615, 1515 cm^{-1}] (Silverstein, 1994; Aasen, Behr, Leander, 1975).

O espectro de massas da **VIII** (página 215), obtido por “*electrospray*”, apresentou íon *quasi*-molecular com m/z 749 $[M + Na]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{34}H_{46}O_{17}$ (página 208) e coerente com a estrutura da militarina.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **VIII** (página 216) apresentou dois multipletos, com integral de quatro hidrogênios cada em δ 7,30 - δ 7,25 e em δ 7,11 - δ 7,07, que foram atribuídos a hidrogênios aromáticos. Os sinais em δ 0,82 e δ 0,93 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz), em δ 1,61 (m, 2H) e em δ 1,72 (m) indicaram a presença de um grupo isobutila. Os dupletos em δ 2,65 e em δ 2,95, com J característico de acoplamento geminal ($J = 15,6$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do carbono C-3 e o simpleto em δ 5,01 foi atribuído aos hidrogênios benzílicos (H-1') (Tabela 25). O acoplamento entre esse dois hidrogênios geminais (H-1') não foi observado, possivelmente por estarem em ambientes químicos não tão diferentes como os hidrogênios benzílicos da substância **VI** (Tabela 25). Os multipletos presentes em δ 4,91 e na região de δ 3,92 a δ 3,36 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios anoméricos e aos demais hidrogênios (H-2"a H-6") das unidades glicosídicas (Tabela 25).

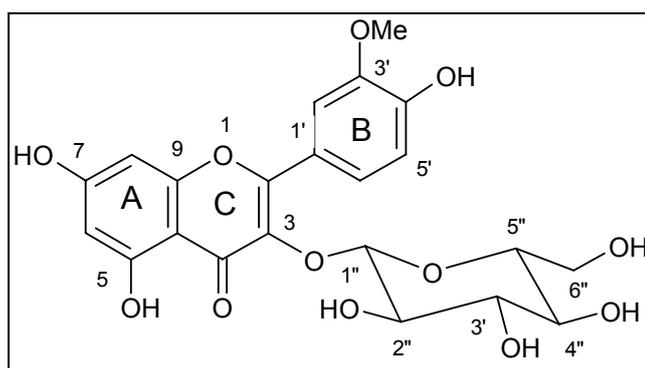
O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) (página 217) e subespectro DEPT-135 (página 218) revelaram deslocamentos químicos semelhantes aos das substâncias **V** e **VI**. Os sinais também foram comparados com dados da literatura e confirmados pelas correlações demonstradas pelos espectros HMQC ($^1J_{\text{C,H}}$) (página 219) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$) (página 220, Tabela 25).

Tabela 25 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹H para substância VIII

Posição	Substância VIII ^a			
	Tipo C ^b	δ ¹³ C ^c	Hidrogênio	δ H/ M ^d /J (Hz) ^e
C-1	C=O	174,63	-	-
C-2	C	75,25	-	-
C-3	CH ₂	44,78	H-3	2,65 d (15,6) 2,95 d (15,6)
C-4	C=O	170,24	-	-
C-5	CH ₂	47,66	H-5	1,61m
C-6	CH	23,65	H-6	1,72 m
C-7	CH ₃	22,53	H-7	0,82 d (6,5)
C-8	CH ₃	23,30	H-8	0,93 d (6,5)
porção 1-O-(4-D-glicopiranosiloxi)benzil			porção 1-O-(4-D-glicopiranosil)oxi benzil	
C-1'	CH ₂	66,56	H-1'	5,01 s
C-2'	C	129,42	-	-
C-3',7'	CH	129,42/129,64/129,79	H-3',7'	7,30-7,25 m
C-4',6'	CH	116,39	H-4',6'	7,11-7,07 m
C-5'	C	157,75/157,83	-	-
Gli-1''	CH	100,92	Gli-1''	4,91 m
Gli-2''	CH	73,50	Gli-2''	3,45 m
Gli-3''	CH	76,55/76,73	Gli-3''	3,45 m
Gli-4''	CH	69,98	Gli-4''	3,39 m
Gli-5''	CH	76,55/76,73	Gli-5''	3,45 m
Gli-6''	CH ₂	61,12	Gli-6'' _A Gli-6'' _B	3,70 m 3,87 m
porção 4-O-(4-D-glicopiranosiloxi)benzil			porção 4-O-(4-D-glicopiranosil)oxi benzil	
C-1'	CH ₂	65,80	H-1'	5,01 s
C-2'	C	129,42	-	-
C-3',7'	CH	129,42/129,64/129,79	H-3',7'	7,30-7,25 m
C-4',6'	CH	116,39	H-4',6'	7,11-7,07 m
C-5'	C	157,75/157,83	-	-
Gli-1''	CH	100,92	Gli-1''	4,91 m
Gli-2''	CH	73,50	Gli-2''	3,45 m
Gli-3''	CH	76,55/76,73	Gli-3''	3,45 m
Gli-4''	CH	69,98	Gli-4''	3,39 m
Gli-5''	CH	76,55/76,73	Gli-5''	3,45 m
Gli-6''	CH ₂	61,12	Gli-6'' _A Gli-6'' _B	3,70 m 3,87 m

Nota: ^{a,b,c,d,e} Idem tabela 19.

5.5.5 Substância IX: isoramnetina 3-O-β-glicopiranosídeo



A substância **IX** também foi isolada da fração metanólica e apresentou-se como um sólido amorfo amarelo. Sua análise por CCD de sílica gel após revelação com NP/PEG, sugeriu ser um flavonóide devido ao aparecimento de uma mancha de coloração amarelada (Wagner, Bladt, Zgainski, 1984).

O espectro de **IX** no UV-VIS (200-500 nm) (página 221), obtido em metanol (1%p/v), mostrou bandas com máximos de absorção em 254 nm, 265 nm e 356 nm, compatíveis com a estrutura de um flavonol (328-357 nm) (Marbry, Markham, Thomas, 1970). O deslocamento batocrômico das bandas I e II, após a adição de NaOH, indicou presença de hidroxila fenólica. A adição de AlCl₃ provocou deslocamento batocrômico da banda II e sugeriu a presença da hidroxila quelatogênica em C-5. A adição de AlCl₃/HCl confirmou a presença de hidroxila quelatogênica pela inalteração da banda II e levou ao aparecimento da banda Ia, provavelmente pela protonação de um oxigênio em C-4'. O deslocamento batocrômico observado das bandas I e II, após a adição de NaOAc, confirmou a presença de hidroxilas em C-7 e em C-4', porém, a não modificação do espectro após adição de NaOAc/H₃BO₃ confirmou a ausência de sistema *orto*-diidroxil (Marbry, Markham, Thomas, 1970).

O espectro de massas (página 222) de **IX**, obtido por “*electrospray*” no modo positivo, apresentou íon *quasi*-molecular referente ao aduto de sódio com m/z 501 [M + Na]⁺, relativo à fórmula molecular C₂₂H₂₂O₁₂. Foi também possível identificar o fragmento com m/z 339, correspondente a aglicona com sódio [(M + Na) - 162]⁺ e o pico com m/z 452, relativo à perda de um grupo metoxila e água [(M + Na) - 31 - 18]⁺. A presença do grupo metoxila foi confirmada pelo pico com m/z 317 [(M + H) - 162]⁺,

que ao perder um grupo metila formou o fragmento com m/z 302 $[(M + H) - 162 - 15]^+$.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **IX** (página 223) foi possível identificar um sistema ABX para os hidrogênios aromáticos em δ 7,92 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ 7,59 (1H, dd, $J = 2,0/ 8,4$ Hz, H-6') e δ 6,91 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') devido à uma dissubstituição 3',4' do anel B e um sistema de spins AB indicando um acoplamento *meta* para o anel A (δ 6,39, 1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-8 e δ 6,19, 1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-6). Um sinal de hidrogênio anomérico apareceu em δ 5,39 (d, 1H) e o valor da sua constante de acoplamento escalar ($J = 7,4$ Hz) indicou uma posição axial do hidrogênio do açúcar, ou seja, orientação β da ligação glicosídica. O singlete com integral de 3H em δ 3,95 foi atribuído a um grupo metoxila e os sinais na região de 4,0-3,0 foram atribuídos aos hidrogênios da unidade glicosídica (H-2'' à H-6'') (Tabela 26) (Silverstein, 1994). A confirmação da atribuição dos dados de RMN de ^1H para a substância **IX** foi realizada a partir dos dados da literatura (Yeskaliyeva et al., 2006).

Pelo experimento COSY ($^{2,3}J_{\text{H,H}}$) (página 224) pôde-se estabelecer as correlações entre os sinais em δ 5,39 (H-1'') com 3,46/ 3,45 (H-2'' ou H-3'') e em δ 3,24 (H-5'') com δ 3,31 (H-4'') e δ 3,56 (H-6''_A) (Tabela 23).

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de **IX** (página 225) apresentou sinais correspondentes à 22 átomos de carbonos. A partir da análise do subespectro DEPT-135 (página 226) foi possível determinar a presença de uma carbonila, nove carbonos quaternários, um carbono metilênico, um carbono metílico e dez carbonos metínicos. O mapa de contornos HMQC ($^1J_{\text{C,H}}$) (página 227) possibilitou a atribuição alguns sinais de hidrogênios e carbonos de maneira inequívoca (Tabela 26).

O mapa de contornos HMBC ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$) (páginas 228 e 229) permitiu, então, distinguir as posições dos sinais de carbonos C-2'' e C-3'' do açúcar devido às correlações entre os sinais em δ 78,24 com δ 3,31 e δ 3,46 (C/H-4'' e H-2'') e em δ 76,06 com δ 3,45 (C/H-3'') e em δ 71,66 com δ 3,45 (C/H-3''). As posições do grupo metoxila e da unidade glicosídica foram determinadas pela correlação entre δ 148,57 com δ 3,95 (C-3'/OMe) e entre δ 135,48 com δ 5,39 (C-3/H-1'').

Tabela 26 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância IX

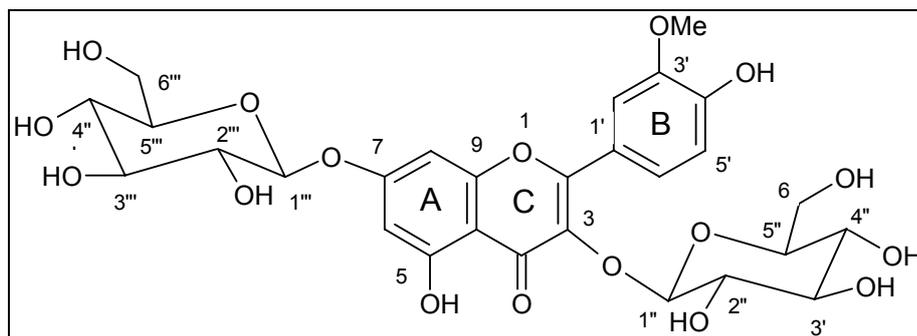
Posição	Substância IX				
	Tipo C ^a	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}/M^b / J$ (Hz) ^c	HMBC (C→H)	COSY (H→H)
2	C	158,70	-	6,39; 7,59; 7,92	-
3	C	135,48	-	5,39	-
4	C=O	179,49	-	-	-
5	C	163,33	-	6,19	-
6	CH	100,25	6,19 d (1,6)	6,39	6,39
7	C	166,68	-	6,19; 6,39	-
8	CH	94,95	6,39 d (1,6)	6,19	6,19
9	C	158,70	-	6,39; 7,59; 7,92	-
10	C	105,84	-	6,19; 6,39	-
1'	C	123,27	-	6,91; 7,92	-
2'	CH	114,54	7,92 d (2,0)	7,59	7,59
3'	C	148,57	-	3,95; 6,91; 7,92	-
4'	C	151,02	-	6,91; 7,59; 7,92	-
5'	CH	116,16	6,91 d (8,4)	-	7,59
6'	CH	123,97	7,59 dd (2,0; 8,4)	7,92	6,91; 7,92
3'-OCH ₃	CH ₃	56,94	3,95 s	-	-
Gli-1''	CH	103,85	5,39 d (7,4)	3,45/3,46	3,45/3,46
Gli-2''	CH	76,06	3,46 m	5,39	3,45
Gli-3''	CH	78,24	3,45 m	3,31	3,31; 3,46
Gli-4''	CH	71,66	3,31 m	3,45/3,46	3,45
Gli-5''	CH	78,69	3,24 ddd (2,2; 5,4)	3,31; 3,56	3,56
Gli-6'' _A	CH ₂	62,72	3,56 dd (11,9; 5,4)	3,24; 3,73	-
Gli-6'' _B			3,73 dd (2,2; 2,1; 11,9)	3,56	-

^a As atribuições foram baseadas pelos experimentos DEPT-135 e HMQC.

^b M = multiplicidade: d = duplete; dd = duplete duplo; ddd = duplo duplete duplo, m= multiplete; s= simpleto.

^c J = constante de acoplamento escalar.

5.5.6 Substância X: isoramnetina 3,7-di-O-β-glicopiranosídeo



A substância **X** foi isolada da fração aquosa e apresentou-se como um sólido amorfo amarelo. Sua análise por CCD de sílica gel após revelação com NP/PEG, levou ao aparecimento de uma mancha de coloração amarela, sugerindo ser um flavonóide (Wagner, Blatt, Zgainski, 1984).

O espectro de **X** no UV-VIS (200-500 nm) (página 230), obtido em metanol (1%p/v), revelou um perfil característico de flavonol, com bandas em 254 nm, 265 nm e 352 nm (Marbry, Markham, Thomas, 1970). Em relação à substância **IX**, a diferença fundamental foi observada no espectro de **X** em presença de NaOAc. Neste espectro não ocorreu deslocamento batocrômico da banda II, indicando a ausência de hidroxila de caráter ácido acentuado em C-7. Além disso, houve o aparecimento da banda Ia, indicando a presença de hidroxila em C-4'.

O espectro de massas de **X** (páginas 231), obtido por “*electrospray*” no modo positivo, apresentou íon *quasi*-molecular referente ao aduto de sódio com m/z 663 $[M + Na]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{17}$. Foi também possível identificar o fragmento com m/z 501, correspondente a aglicona com sódio $[(M + Na) - 162]^+$ e o pico com m/z 452, relativo à perda do açúcar, do grupo metoxila e água $[(M + Na) - 162 - 31 - 18]^+$.

O espectro de RMN 1H (400 MHz, piridina- d_5) da substância **X** (páginas 232) mostrou dois simpletos em δ 6,79 (s) e em δ 7,04 (s) que foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 do anel A e sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,25, δ 7,78 (d) e em δ 8,47 (s) que foram atribuídos aos H-5', H-6'e H-2' no anel B. A atribuição

desses sinais foi realizada a partir da análise do mapa de contornos COSY ($^{2,3}J_{H,H}$) (página 225), que demonstrou correlações entre os sinais em δ 6,79 com δ 7,04 (H-6/H-8), entre δ 8,47 com δ 7,78 (H-2'/H-6') e entre δ 7,25 com δ 7,78 (H-5'/H-6'). O singlete com integral de 3H em δ 3,95 foi atribuído aos hidrogênios de um grupo metoxila, que pelas correlações demonstradas pelos mapas de contorno HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) (páginas 238 e 239) foi localizado sobre o carbono 3' (δ 148,03). Dois hidrogênios anoméricos apareceram em δ 5,82 (d, 7,8 Hz) e δ 6,55 (d; 7,4 Hz) e seus valores de acoplamento escalar indicaram uma orientação β da ligação glicosídica (Tabela 27).

A análise do espectro de HMQC ($^1J_{C,H}$) (páginas 236 e 236) possibilitou a atribuição dos sinais de hidrogênios e carbonos anoméricos de maneira inequívoca devido a manchas de correlação entre δ 101,67 com 5,82 (C/H-1'') e entre δ 103,11 com 6,55 (C/H-1''). As posições dos açúcares foi realizada a partir da análise do mapa de contornos HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$) devido às correlações entre os sinais em δ 134,87 com δ 6,55 (C-3/H-1'') e em δ 163,96 com δ 5,82 (C-7/H-1''). A atribuição de todos os sinais de RMN de ^{13}C (Tabela 27) foi baseada na análise dos mapas de contornos HMBC ($^{2,3}J_{C,H}$).

Tabela 27 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância X

Posição	Substância X		
	Tipo C ^a	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}/M^b / J$ (Hz) ^c
2	C	157,69	-
3	C	134,87	-
4	C=O	178,78	-
5	C	162,25	-
6	CH	100,44	6,79 s
7	C	163,96	-
8	CH	95,03	7,04 s
9	C	156,91	-
10	C	106,90	-
1'	C	121,89	-
2'	CH	114,32	8,47 s
3'	C	148,03	-
4'	C	151,02	-
5'	CH	116,27	7,25
6'	CH	123,85	7,78 d (8,8)
3'- OCH ₃	CH ₃	56,19	3,95 s
3-O-Gli			
Gli-1"	CH	103,11	6,55 d (7,4)
Gli-2"	CH	78,44	4,42 m
Gli-3"	CH	74,80/76,27	4,37 m/4,36 m
Gli-4"	CH	71,17/71,40	4,34 m/4,34 m
Gli-5"	CH	79,19	4,05 m e 4,19 m
Gli-6"	CH ₂	62,19/62,39	4,40 m/4,59 m
7-O-Gli			
Gli-1"	CH	101,67	5,82 d (7,8)
Gli-2"	CH	78,44	4,42 m
Gli-3"	CH	74,80/76,27	4,37 m/4,36 m
Gli-4"	CH	71,17/71,40	4,34 m/4,34 m
Gli-5"	CH	79,19	4,05 m e 4,19 m
Gli-6"	CH ₂	62,19/62,39	4,40 m/4,59 m

^a As atribuições foram baseadas pelos experimentos DEPT-135, COSY, HMQC e HMBC.

^b M = multiplicidade: d = duplete, m= multiplete; s= simpleto.

^c J = constante de acoplamento escalar.

5.6 Estudo fitoquímico das frações polares da espécie vegetal *Habenaria petalodes*

Embora o Brasil seja um dos países mais ricos em espécies de orquídeas do mundo (Giulietti et al, 2005), a maior parte ainda não foi avaliada quanto ao seu potencial farmacológico e fitoquímico como ocorre com *Habenaria petalodes*.

Citotoxicidade é o termo usado para o efeito tóxico de uma substância a nível celular e sua avaliação é útil para a descoberta de agentes antitumorais (Freshney, 2000). O extrato etanólico de *H. petalodes* apresentou atividade citotóxica em ensaios com as linhagens tumorais humanas, UACC-62 (141%), TK-10 (52%) e MCF-7 (68%) a 20 µg/mL. Esse extrato foi citocida somente em ensaios com a linhagem UACC-62, isto é, foi capaz de inibir a proliferação das células além de matar as células do inóculo inicial. Por ser a linhagem mais sensível, UACC-62 foi escolhida para o fracionamento biomonitorado.

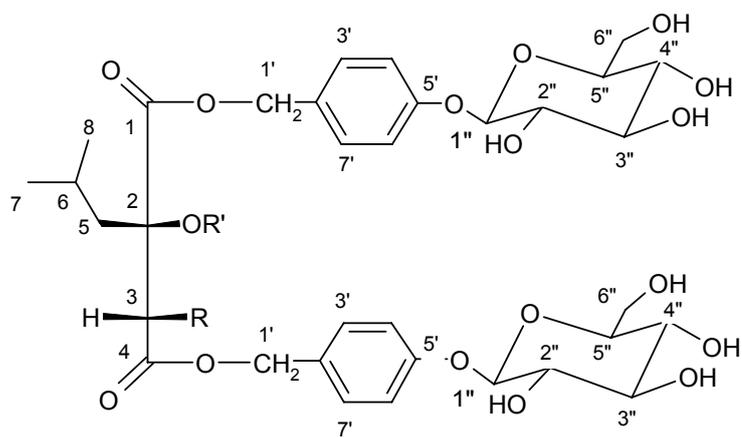
O pré-fracionamento do extrato deu origem a três frações; diclorometânica, metanólica e aquosa e, resultou na concentração da atividade citotóxica na mais apolar (Fr DCM) (Tabela 28). A fração ativa (Fr DCM) foi cromatografada em coluna aberta de sílica gel, obtendo-se 10 subgrupos. As frações foram testadas em linhagem de melanoma humano (UACC-62) e os subgrupos 6-9, que apresentaram atividade citotóxica de 99 a 113% (Tabela 28), foram reunidos. Após o agrupamento, uma alíquota de 100 mg foi fracionada em cartucho Sep-Pak C₁₈, com misturas crescentes de metanol em água e, posteriormente, as frações ativas obtidas foram submetidas ao fracionamento por CLAE em escala semipreparativa. O baixo rendimento da fração apolar e a baixa recuperação de massa obtidas dos fracionamentos foram fatores limitantes para a purificação da(s) substância(s) ativa(s).

Tabela 28 - Atividade citotóxica das frações resultantes do fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel de sua fração diclorometânica

Amostra	% de Atividade Citotóxica	
	UACC ^a	CV ^c
HP	99	10
Fr DCM	127	18
Fr MeOH	-	-
Fr H ₂ O	-	-
Fr-1	13	4
Fr-2	17	7
Fr-3	21	1
Fr-4	27	4
Fr-5	29	7
Fr-6	110	3
Fr-7	100	7
Fr-8	113	15
Fr-9	99	14
Fr-10	8	3
Colchicina	81	5
Etoposídeo	95	6

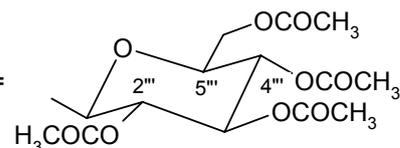
^aO extrato e as frações foram testados a 20 µg/mL, enquanto que os controles positivos; colchicina e etoposídeo, foram testados a 0,8 µg/mL e 1,6 µg/mL, respectivamente. ^bUACC-62 (melanoma). ^cCoefficiente de variação.

O isolamento de constituintes químicos das frações metanólica e aquosa foi então realizado devido à ausência de estudos sobre o gênero e a espécie em questão. As frações polares, frações metanólica e aquosa, do extrato etanólico de *H. petalodes* foram priorizadas para estudo fitoquímico. Todas as substâncias (**V-X**) (Figura 15) foram isoladas por CLAE em escala semi-preparativa a partir de frações obtidas por extração líquida-líquida ou por extração em fase sólida do extrato etanólico.



Dactilorina acetilada no anel 2 **V**

R = H, R' =

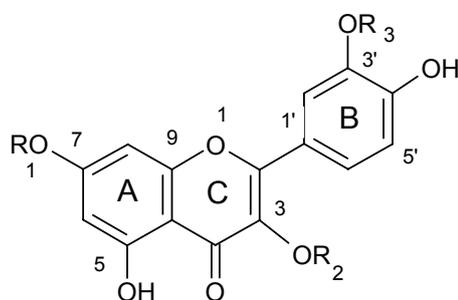


Loroglossina **VI**

R = OH, R' = H

Militarina **VIII**

R = H, R' = H



	R ₁	R ₂	R ₃
Isoquercitrina VII	H	gli	H
Isoramnetina 3-O-glicopiranosídeo IX	H	gli	CH ₃
Isoramnetina 3,7-di-O-glicopiranosídeo X	gli	gli	CH ₃

Figura 15 - Estruturas das substâncias isoladas das frações polares do extrato etanólico de *H. petalodes*.

O levantamento bibliográfico realizado indicou que a substância **V** é inédita. Um derivado do ácido succínico, dactilorina A, foi isolada de *Dactylorhiza hatagirea* (Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999) e de *Coelogyne viride* (Sheng-Yang et al, 2004). Dactilorina A é estruturalmente semelhante a substância **V**, mas distingue-se da mesma pela ausência dos cinco grupos acetila. Portanto, é primeira vez que se relata no gênero *Habenaria* a ocorrência natural de um éster do ácido succínico em que um dos seus açúcares se encontra totalmente acetilado.

A fração metanólica também forneceu dois derivados do ácido succínico estruturalmente relacionados à substância **V**; loroglossina (**VI**) e militarina (substância **VIII**). A presença desses dois metabólitos em *Orchis militaris* (Aasen, Behr, Leander, 1975; Appolonia, Marston, Hostettmann, 1986), *Dactylorhiza hatagirea* (Kizu, Kaneko, Tomimori, 1999) e *Coeloglossum viride* (Sheng-Yang et al, 2004) foi descrita anteriormente. Portanto, a existência dessa classe de compostos em espécies de orquídeas pertencentes a gêneros diferentes consiste em uma importante informação quimiotaxonômica.

Recentemente, Zhang e et al (2006) relataram que uma fração enriquecida em derivados do ésteres do succinato (denominada CE) obtida do extrato dos rizomas de *Coeloglossum viride* (L.) *Hartm.* var. *bracteatum* (Wild.), uma espécie da família Orquidaceae encontrada na China, Tibete, Mongólia, Províncias de Shanxi, Gansu e Qinghai, melhorou a memória de camundongos após as mesmas terem sido debilitadas por agentes químicos tais como escopolamina, cicloheximida e álcool. Além disso, a fração CE protegeu os neurônios desses camundongos contra injúrias provocadas pela proteína β -amilóide e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A técnica de extração da fração enriquecida CE que contém dactilorina B (26,1%), loroglossina (20,7%), dactilorina A (38,9%) e militarina (4,2%), como principais componentes, e o uso dessa fração contra a demência estão protegidas pelas patentes número 200410049696.6 (China) e PCT [WO 2004/058244], respectivamente.

Outros três flavonóides foram isolados das frações metanólica e aquosa. Isoquercitrina (**VII**) foi previamente isolada de *Orchis sambucina* (Tira, 1975), *O. morio* (Pagani, 1976) e *O. militaris* (Appolonia, Marston, Hostettmann, 1986) e isoramnetina 3-O- β -glicopiranosídeo (**IX**) foi isolada de *Neobenthamia gracilis*

(Williamns, 1979). Mas, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, isoramnetina 3,7-di-O-β-glicopiranosídeo (**X**) ainda não foi encontrada em espécies da família Orquidaceae. Todas as substâncias (**V-X**) isoladas das frações inativas de *H. petalodes* (metanólica e aquosa) foram consideradas inativas pois apresentaram atividade citotóxica inferior a 50% a 10 µg/mL (dados não mostrados).

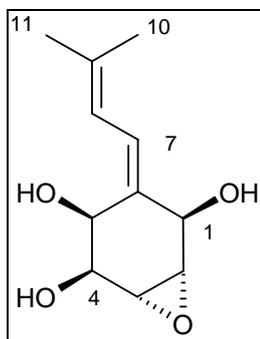
Entretanto, algumas das substâncias isoladas foram ativas em outros modelos. O levantamento bibliográfico realizado para as atividades biológicas revelou que a isoquercitrina inibe as enzimas monoaminoxidase B (Lee et al, 2001) e hialuronidase (Kim et al, 2005) a uma concentração de 11,64 µM e 20,9 µM, respectivamente. Também inibe a elastase secretada por neutrófilos (CI₅₀ 0,7 µg/mL) (Melzig, Pertz, Krenn, 2001), a superóxido dismutase de eritrócitos humanos (CI₅₀ 8 µM) (Kuppusamy, Muniandy, 2004) e a glicosilação (CI₅₀ 3,20 x 10⁻⁷ M) (Kim et al, 2004). Possui atividade sedativa (Kang et al, 2000), efeito protetor contra a injúria oxidativa (Rute et al, 2004) e efeito inibitório sobre a angiogênese em ensaio *ex vivo* (Matsubara et al, 2004).

A isoramnetina 3-O-β-glicopiranosídeo diminui a adesão de plaquetas de ratos (Sempinska et al, 1977), apresenta atividade contra espasmo brônquico em ensaio com traquéias de cobaias (Circosta, Limardi, Occhuito, 1992), inibe a produção de antígenos em células infectadas com vírus Epstein-Bar, e reduz a formação de papilomas em pele de camundongos (Ito et al, 1999). Este flavonóide também estimula a migração de neutrófilos em ensaio quimiotático e aumenta a atividade de morte por fagocitose dos neutrófilos *in vitro* a 4 µg/mL (Akbay et al, 2003).

EXPERIMENTAL

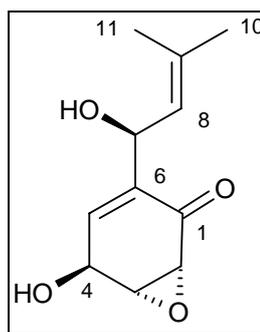
6. EXPERIMENTAL

6.1 Dados físicos e espectrais das substâncias isoladas de *Lentinus strigosus*



Substância I: neopanepoxidol

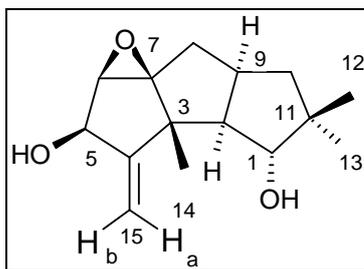
Sólido amarelo pálido; UV λ_{\max} nm: 247 nm; PF: 158-159°C; IV (KBr) ν_{\max} 3308 (OH), 2962 (alif.), 2862 (alif.), 1600 (C=C), 1038 (C=C) cm^{-1} , EM/IE (70 eV), m/z 212 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,62 (1H, m, H-7), 6,53 (1H, m, H-8), 4,56 (1H, sl, H-1), 4,21 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-5), 3,96 (1H, dd, $J = 1,1; 5,5$ Hz, H-4), 3,38 (1H, ddd, $J = 0,6; 2,5; 3,5$ Hz, H-2), 3,28 (1H, ddd, $J = 0,6; 2,0; 4,0$ Hz, H-3), 1,81 (3H, s, H-10/-11), 1,79 (3H, s, H-10/-11); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 138,08 (C-9), 132,92 (C-6), 128,34 (C-7), 121,86 (C-8), 73,20 (C-5), 71,00 (C-1/-4), 70,90 (C-1/-4), 57,81 (C-2), 56,66 (C-3), 26,74 (C-10/-11), 18,04 (C-10/-11).



Substância II: panepoxidona

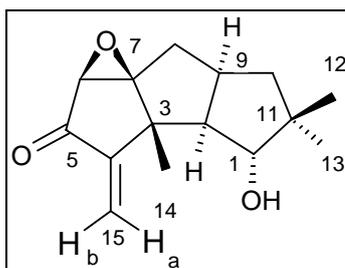
Óleo amarelo; $[\alpha]_D^{25} - 61^\circ$ (c 0,4, CH_2Cl_2); UV λ_{\max} nm: 242 nm; IV (KBr) ν_{\max} 3381 (OH), 2974 (alif.), 2880 (alif.), 1682 (C=O), 1383 (def. angular C-H), 1043 (C-O) cm^{-1} ; IES-EM modo negativo, m/z 209 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,70 (1H, ddd, $J = 1,3; 2,5; 3,6$ Hz, H-5), 5,29 (1H, qd, $J = 1,3; 8,8$ Hz, H-7), 5,02 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-8), 4,68 (1H, sl, H-4), 3,80 (1H, dq, $J = 1,3; 2,5; 3,6$ Hz, H-3), 3,46 (1H, dd, $J = 1,0; 3,6$ Hz, H-2), 1,72 (6H, s, H-10/-11); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz):

δ 194,47 (C-1), 138,98 (C-6), 138,26 (C-9), 137,78 (C-5), 123,68 (C-8), 65,35 (C-7), 63,16 (C-4), 57,71 (C-3), 53,88 (C-2), 25,90 (C-10/-11), 18,42 (C-10/-11).



Substância III: 6,7-epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol

Sólido branco cristalino; $[a]_D^{25} +135^\circ$ (c 0,5, CHCl_3); IV (KBr) ν_{max} 3391 (OH), 2939 (alif.), 2858 (alif.), 1666 (C=C), 1458 (alif.), 1392 (def. angular C-H), 1222 (C-O), 1045 (C-O), 957 (def. angular C-H), 883 (def. angular C-H) cm^{-1} ; EM/IE (70 eV), m/z 250 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,32 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-15a), 5,15 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-15b), 4,62 (1H, q, $J = 2,2$ Hz, H-5), 3,80 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1), 3,47 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-6), 2,60 (1H, m, H-9), 2,03 (1H, dd, $J = 8,4; 12,0$ Hz, H-2), 1,85 (1H, m, H-10 α), 1,82 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-8), 1,17 (3H, s, H-14), 1,13 (1H, m, $J = 12,0$ Hz, H-10 β), 1,05 (3H, s, H-12), 0,89 (3H, s, H-13); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 159,64 (C-4), 112,53 (C-15), 80,96 (C-1), 75,03 (C-7), 74,19 (C-5), 63,73 (C-6), 55,25 (C-2), 47,55 (C-3), 46,36 (C-10), 44,22 (C-11), 34,81 (C-9), 30,74 (C-8), 26,48 (C-12), 19,78 (C-13), 17,51 (C-14).

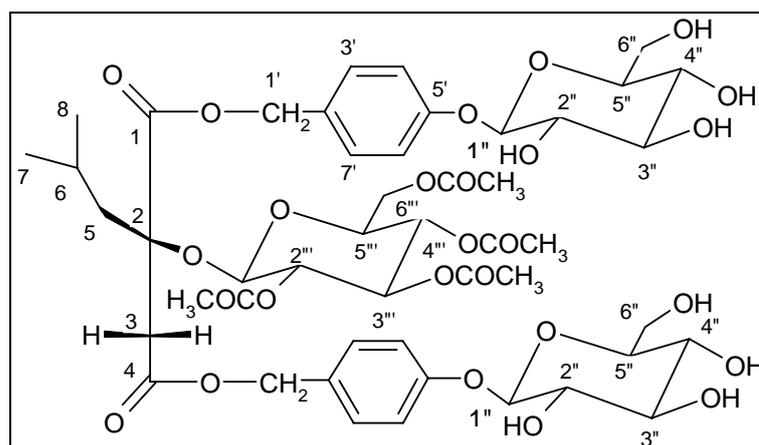


Substância IV: hipnofilina

Óleo amarelo; $[a]_D^{25} - 74^\circ$ (c 0,9, CHCl_3); UV λ_{max} nm: 238 nm; IV (KBr) ν_{max} 3443 (OH), 2937 (alif.), 2870 (alif.), 1728 (C=O), 1636 (C=C), 1464 (def. angular C-H), 1375 (def. angular C-H), 1115 (C-O) cm^{-1} ; EM/IE (70 eV), m/z 248 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6,13 (1H, s, H-15a), 5,45 (1H, s, H-15b), 3,87 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-1), 3,43 (1H, s, H-6), 2,64 (1H, m, H-9), 2,14 (1H, dd, $J = 9,0; 12,0$ Hz, H-2), 1,95 (2H, m, H-8), 1,90 (1H, m, H-10 α), 1,30 (3H, s, H-14), 1,23 (1H, m, H-10 β), 1,07 (3H, s, H-12), 0,89 (3H, s, H-13); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 197,60

(C-5), 153,73 (C-4), 121,61 (C-15), 81,23 (C-1), 76,04 (C-7), 61,14 (C-6), 56,13 (C-2), 46,12 (C-10), 45,54 (C-3), 44,14 (C-11), 34,52 (C-9); 30,75 (C-8), 26,43 (C-12), 19,66 (C-13), 17,75 (C-14).

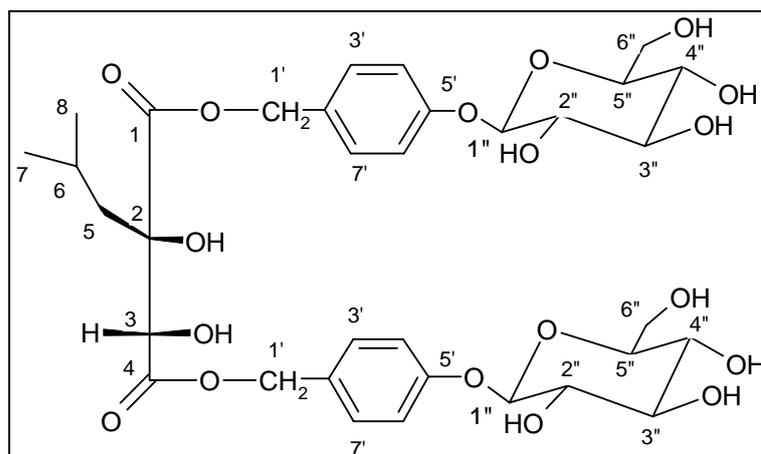
6.2 Dados físicos e espectrais das substâncias isoladas de *Habenaria petalodes*



Substância V: éster 2-isobutil-2-(2,3,4,6-tetracetil-O-glicopiranosil) bis 1,4-[4(β-D-glicopiranosiloxi)benzil] do ácido málico – dactilorina acetilada no anel 2

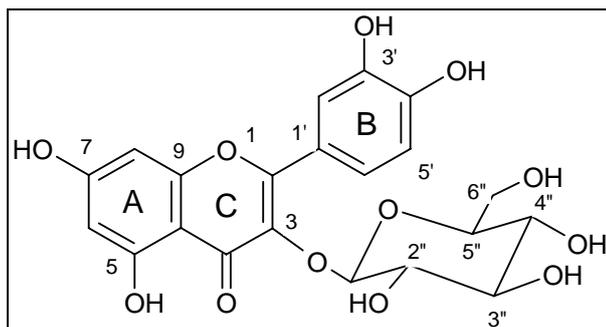
Sólido resinoso; $[a]_D^{25}$ - 30,0° (c 0,16, MeOH); UV λ_{\max}^{MeOH} nm (log ϵ): 224 (3,76), 269 (3,28), 276 (3,24); IV ν^{KBr} cm⁻¹: 3433 (OH), 2959 (alif.), 2874 (alif.), 1612 (arom.), 1512 (arom.), 1755 (C=O), 1234 (C-O), 1072 (C-O), 1042 (C-O); positive ion IES-EM m/z 1079 [M + Na]⁺, 973 [M+Na - 106]⁺, 811 [M+Na - 106 - 162]⁺, 705 [M+Na - 106 - 162 - 106]⁺, 543 [M+Na - 106 - 162 - 106 - 162]⁺, 371 [M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 172]⁺, 353 [M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 190]⁺, 311 [M+Na - 106 - 162 - 106 - 162 - 172 - 60]⁺, 1095 [M + K]⁺; RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,30 e 7,29 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3',7'), 7,11 e 7,09 (d, $J = 8,6$ Hz, H-4',6'), 5,21 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'''), 5,10, 5,03 (d, $J_A = J_B = 12,0$ Hz, H-1'_A e H-1'_B), 5,05 e 4,90 (d, $J_A = J_B = 12,0$ Hz, H-1'_A e H-1'_B), 5,14 (dd, $J = 1,0; 9,8$ Hz, H-3'''), 4,95 (dd, $J = 1,0; 9,8$ Hz, H-4'''), 4,93 (d, $J = 7,8$ Hz, H-1''), 4,89 (d, $J = 7,7$ Hz, H-1''), 4,85 (dd, $J = 7,9; 9,7$ Hz, H-2'''), 4,00 (dd, $J = 3,6; 12,4$ Hz H-6''_A), 3,89 (dd, $J = 2,2; 12,0$ Hz, H-6''_A), 3,87 (dd, $J = 2,2; 12,0$ Hz, H-6''_B), 3,76 (dd, $J = 2,4; 12,4$ Hz, H-6''_B), 3,71 (ddd, $J = 1,9; 6,0; 12,4$ Hz, H-6''_A), 3,68 (ddd, $J = 1,9; 6,0; 12,4$ Hz, H-6''_B), 3,46 (m, H-3'', H-4''), 3,43 (m, H-2''), 3,40 (m, H-5''), 3,21 (td, $J = 3,0; 9,9$ Hz, H-5'''), 3,05 (d, $J = 18,0$ Hz, H-3_A), 2,98 (d, $J = 18,0$ Hz, H-3_B), 2,01 (3H, s), 2,00 (3H, s), 1,97 (3H, s), 1,95 (3H, s), 1,73 (m, H-6), 1,61 (dd, $J = 7,2; 14,1$ Hz, H-5), 0,84 (3H, d, $J = 8,0$ Hz, H-8), 0,77 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-7); RMN de

^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): 173,17 (C-1), 172,44 (Gli-6'''-C=O), 171,98 (C-4), 171,69 (Gli-3'''-C=O), 171,51 (Gli-2'''-C=O), 171,46 (Gli-4'''-C=O), 159,47/159,38 (C-5'), 131,71/ 131,59 (C-3',7'), 130,96/ 130,72 (C-2'), 117,97/ 117,93 (C-4',6'), 102,41/ 102,21 (C-1'''), 98,48 (C-1'''), 81,58 (C-2), 78,16 (C-2''), 77,98 (C-4''), 74,95 (C-3''), 74,10 (C-3'''), 72,70 (C-2'''), 72,30 (C-5'''), 71,49/ 71,39 (C-5''), 69,55 (C-4''), 68,02 (C-1'), 67,53 (C-1'), 62,70 (C-6'''), 62,59/ 62,56 (C-6''), 50,16 (C-5), 44,75 (C-3), 24,90 (C-8), 24,76 (C-6), 23,54 (C-7), 20,82 (Gli-2'''-C=O-CH₃), 20,78 (Gli-4'''-C=O-CH₃), 20,71 (Gli-6'''-C=O-CH₃), 20,60 (Gli-3'''-C=O-CH₃).



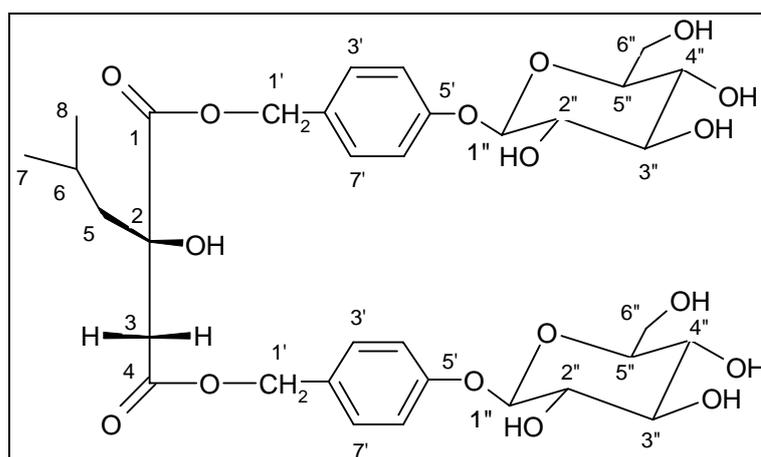
Substância VI: Ioroglossina

Sólido amarelo; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 201 (4,22), 221 (4,18), 268 (3,42); IES-EM modo positivo, 765 [M + Na]⁺; RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 7,30 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3',7'), 7,18 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3',7'), 7,12 (d, $J = 8,6$ Hz, H-4',6'), 7,07 (d, $J = 8,8$ Hz, H-4',6'), 5,09 e 4,98 (d, $J_A = J_B = 12,0$ Hz, H-1'), 5,08 e 4,97 (d, $J_A = J_B = 11,8$ Hz, H-1'), 4,36 (s, H-3), 3,89 (m, H-6''), 3,71 (m, H-6''), 3,45 (m, H-2'', H-3'', H-5''), 3,40 (m, H-4''), 1,91 (m, H-5), 1,68 (m, H-6), 0,94 (d, $J = 6,5$ Hz, H-8), 0,80 (d, $J = 6,5$ Hz, H-7); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ 174,87 (C-1), 172,87 (C-4), 159,38/159,53 (C-5'), 129,54/130,74/131,74 (C-2' ou C-3',7'), 117,82/117,88/117,95 (C-4',6'), 102,52 (C-1''), 81,14 (C-2), 78,09/78,29 (C-3''/C-5''), 77,53 (C-3), 75,05 (C-2''), 71,54 (C-4''), 68,16 (C-1'), 62,88 (C-1''), 45,34 (C-5), 25,33 (C-6), 24,72 (C-7), 24,15 (C-8).



Substância VII: quercetina 3-O-β-glicopiranosídeo (isoquercitrina)

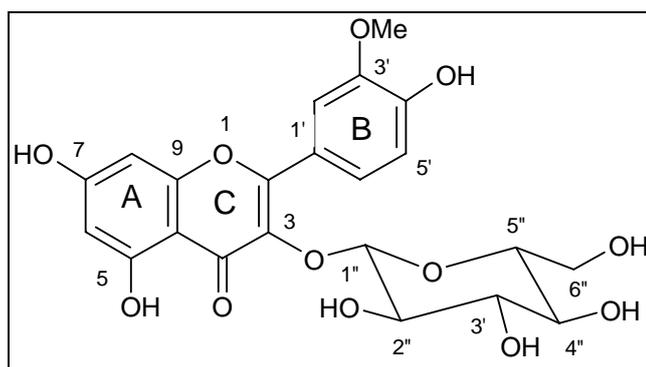
Sólido amarelo amorfo; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 204 (4,07), 256 (3,69), 356 (3,55); + NaOH 274, 409; + AlCl₃ 270, 296, 359; +AlCl₃/HCl 270, 292, 356; + NaOAc 272, 338 om, 399, + H₃BO₃ 261, 326 om, 376; ESI-MS modo positivo m/z 487 [M + Na]⁺; ESI-MS modo negativo m/z 463 [M + H]⁻; RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,73 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,60 (1H, d, $J = 2,0; 8,7$ Hz, H-6'), 6,89 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5'), 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,24 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 5,27 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1''), 4,06-3,30 (m, H-2''-H-6''); RMN de ¹³C (CD₃OD, 100 MHz): δ 178,59 (C-4), 165,09 (C-7), 161,95 (C-5), 158,53 (C-9), 157,57 (C-2), 149,00 (C-4'), 144,87 (C-3'), 135,18 (C-3), 122,28 (C-1'), 122,03 (C-6'), 117,29 (C-5'), 115,47 (C-2'), 104,98 (C-10), 104,76 (C-1''), 99,56 (C-6), 94,41 (C-8), 77,22 (C-5''), 77,11 (C-3''), 74,63 (C-2''), 70,07 (C-4''), 61,80 (C-6'').



Substância VIII: militarina

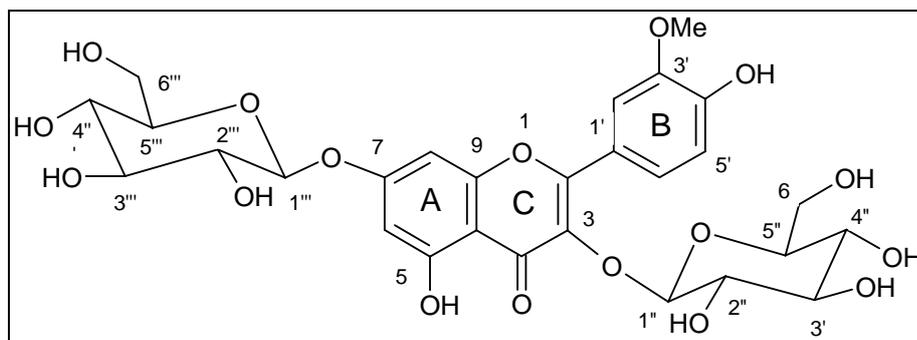
Sólido resinoso; $[a]_D^{25} - 28,0^\circ$ (c 0,23, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 203 (4,19), 219 (4,10), 269 (3,47); IR ν^{KBr} cm⁻¹: 3410 (OH), 2924 (alif.), 2855 (alif.), 1612 (arom.), 1512 (arom.), 1736 (C=O), 1458 (arom.), 1234 (C-O), 1076 (C-O), 1045 (C-O); IES-EM modo positivo m/z 749 [M + Na]⁺; RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ 7,30-7,25

(4H, m, H-3',7'), 7,11-7,07 (4H, m, H-4',6'), 5,01 (4H, s), 4,91 (m, H-1''), 3,87 (1H, m, H-6''_B), 3,70 (1H, m, H-6''_A), 3,45 (m, H-2'', H-3'', H-5''), 3,39 (m, H-4''), 2,95 (1H, d, H-3_B), 2,65 (1H, d, H-3_A), 1,72 (1H, m, H-6), 1,61 (2H, m, H-5), 0,93 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-8), 0,82 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-7); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ 174,63 (C-1), 170,24 (C-4), 157,83/157,75 (C-5'), 129,79/129,64 (C-3',7'), 129,42 (C-2'), 116,39 (C-4',6'), 100,92 (C-1''), 76,73/76,55 (C-3''/C-5''), 75,25 (C-2), 73,50 (C-2''), 69,98 (C-4''), 66,56 (C-1'), 65,80 (C-1'), 61,12 (C-1''), 47,66 (C-5), 44,78 (C-3), 23,65 (C-6), 23,30 (C-8), 22,53 (C-7).



Substância IX: isoramnetina 3-O- β -glicopiranosídeo

Sólido amarelo amorfo; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 204 (4,71), 254 (4,27), 265 (4,24); 356 (4,19) + NaOH 271, 330, 412; + AlCl_3 267, 298, 356; + AlCl_3/HCl 269, 298, 356, 400, + NaOAc 274, 338 om, 389, + H_3BO_3 254, 265, 356; IES-EM modo positivo m/z 501 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 339 $[\text{M} + \text{Na} - 162]^+$; RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 7,92 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,59 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,4 Hz, H-6'), 6,91 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,39 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-8), 6,19 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-6), 5,39 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, H-1''), 3,95 (3H, s, 3'-OCH₃), 3,73 (dd, $J = 2,2$; 11,9 Hz, H-6''_B), 3,56 (dd, $J = 5,4$; 11,9 Hz, H-6''_A), 3,46 (m, H-2''), 3,45 (m, H-3''), 3,31 (m, H-4''), 3,24 (ddd, $J = 2,2$; 2,2; 5,4 Hz, H-5''); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ 179,49 (C-4), 166,68 (C-7), 163,33 (C-5), 158,70 (C-9), 158,70 (C-2), 151,02 (C-4'), 148,57 (C-3'), 135,48 (C-3), 123,97 (C-6'), 123,27 (C-1'), 116,16 (C-5'), 114,54 (C-2'), 105,84 (C-10), 103,85 (C-1''), 100,25 (C-6), 94,95 (C-8), 78,69 (C-5''), 78,24 (C-3''), 76,06 (C-2''), 71,66 (C-4''), 62,72 (C-6''), 56,96 (3'-OCH₃).



Substância X: isoramnetina 3,7-di-O-β-glicopiranosídeo

Sólido amarelo amorfo; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 201 (4,67), 254 (4,31), 265 (4,24), 352 (4,18); + NaOH 247, 266, 396; + AlCl₃ 269, 295, 358; +AlCl₃/HCl 272, 358, 400; + NaOAc 255, 265, 359, 415; + H₃BO₃ 255, 265, 358; IES-EM m/z 663 [M + Na]⁺, m/z 501 [M + Na - 162]⁺; RMN de ¹H (C₅D₅N, 400 MHz): δ 6,79 (1H, s, H-6), 7,04 (1H, s, H-8), 8,47 (1H, s, H-2'), 7,25 (1H, H-5'), 7,78 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-6'), 3,95 (3H, s, 3'-OCH₃), 6,55 (1H, d, J = 7,4 Hz, H-1''), 5,82 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1'''), 4,36/ 4,37 (m, H-2''/H-2'''), 4,42 (m, H-3''/ H-3'''), 4,34 (m, H-4''/ H-4'''), 4,05 e 4,19 (m, H-5''/ H-5'''), 4,40 e 4,59 (m, H-6''/ H-6'''); RMN de ¹³C (C₅D₅N, 100 MHz): δ 178,78 (C-4), 163,96 (C-7), 162,25 (C-5), 157,69 (C-2), 156,91 (C-9), 151,02 (C-4'), 148,03 (C-3'), 134,87 (C-3), 123,85 (C-6'), 121,89 (C-1'), 116,27 (C-5'), 114,32 (C-2'), 106,90 (C-10), 103,11 (C-1''), 101,67 (C-1'''), 100,44 (C-6), 95,03 (C-8), 79,19 (C-5''/ C-5'''), 78,44 (C-3''/ C-3'''), 76,27/74,80 (C-2''/C-2'''), 71,40/71,17 (C-4''/ C-4'''), 62,39/62,19 (C-6''/C-6'''), 56,19 (3'-OCH₃).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7.1 Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila do fungo *Lentinus strigosus*

- O fracionamento do extrato bruto de *L. strigosus* forneceu quatro substâncias de natureza terpenóidica; sendo duas delas, panepoxidona e hipnofilina, responsáveis pelas atividades biológicas do extrato.
- É a primeira vez que se relata as atividades imunomoduladoras, de inibição da TR e de inibição do crescimento de amastigotas de *T. cruzi* por essas duas substâncias. Também é inédito o isolamento de hipnofilina e panepoxidona do extrato em acetato de etila de *L. strigosus*.
- A hipnofilina apresentou valor de CI_{50} cerca de seis vezes menor do que o da clomipramina, um agente antidepressivo inibidor da TR, podendo servir como modelo para o desenvolvimento de inibidores mais potentes para esta enzima.
- Panepoxidona e hipnofilina reduziram a multiplicação das formas intracelulares de *T. cruzi* com valores de CI_{50} de 6,0 e 2,5 μM , próximos ao apresentado pelo benzonidazol no mesmo ensaio.
- Panepoxidona e hipnofilina apresentaram atividade citotóxica para três linhagens tumorais humanas (UACC-62, TK-10, MCF-7) em concordância com dados relatados na literatura.
- Os resultados do ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico da panepoxidona e hipnofilina (CI_{50} de 5,9 e 10,0 μM , respectivamente) foram próximos ao da dexametasona (CI_{50} de 25,4 μM), um fármaco utilizado na clínica.

7.2 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico da espécie vegetal *Habenaria petalodes*

- A fração apolar (Fr DCM) de *Habenaria petalodes* inibiu a proliferação de células tumorais de melanoma humano em 127% a 20 µg/mL, mas a quantidade e complexidade da mesma não permitiram a obtenção da(s) substância(s) ativa(s).
- O estudo das frações polares de *H. petalodes* forneceu três flavonóides; isoquercitrina, isoramnetina 3-O-β-glicopiranosídeo e isoramnetina 3,7-di-O-β-glicopiranosídeo, além de três derivados do ácido succínico: loroglossina, militarina e dactilorina acetilada no anel 2, sendo esta última inédita na literatura.
- Todas as substâncias isoladas das frações polares de *H. petalodes* foram inativas em ensaios com linhagens tumorais humanas UACC-62 (melanoma), TK-10 (renal) e MCF-7 (mama) a 10 µg/ mL. Além disso, a dactilorina acetilada no anel 2 (substância **V**) foi inativa nos ensaios de proliferação de células humanas do sangue periférico e de inibição da enzima TR.

PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

8.1 Fracionamento biomonitorado do extrato em acetato de etila do fungo *Lentinus strigosus*

- Elucidar o mecanismo pelo qual a hipnofilina e panepoxidona inibem a enzima tripanotiona redutase.
- Elucidar o mecanismo pelo qual a hipnofilina e panepoxidona exercem atividade citotóxica.
- Obter derivados da hipnofilina e da panepoxidona mais ativos e seletivos para atividade tripanossomicida

8.2 Estudo fitoquímico das frações polares do extrato etanólico da espécie vegetal *Habenaria petalodes*

- As substâncias isoladas de *H. petalodes* são relatadas pela primeira vez para esta espécie e para o gênero, o que pode ser uma importante informação quimiotaxonômica. Obter maiores quantidades da fração apolar de *H. petalodes* para viabilizar o fracionamento biomonitorado dos seus componentes citotóxicos.
- De acordo com os estudos realizados por Shang et al (2006), a fração enriquecida com derivados do ácido succínico (dactilorina B, dactilorina A, loroglossina e militarina) são úteis para o tratamento da doença de Alzheimer e demência. Portanto, sugere-se a avaliação do potencial farmacológico de *H. petalodes* para o tratamento da doença de Alzheimer e demência já que é fonte de loroglossina e militarina.

ANEXOS

ANEXOS

Espectros de UV, IV e RMN utilizados na identificação das substâncias isoladas:

Neopanepoxidol (substância **I**)

Panepoxidona (substância **II**)

6,7-Epóxi-4(15)-hirsuteno-1,5-diol (substância **III**)

Hipnofilina (substância **IV**)

Éster 2-isobutil-2-(2,3,4,6-tetracetil-O-glicopiranosil) bis 1,4-[4(β -D-glicopiranosiloxi)benzil] (substância **V**)

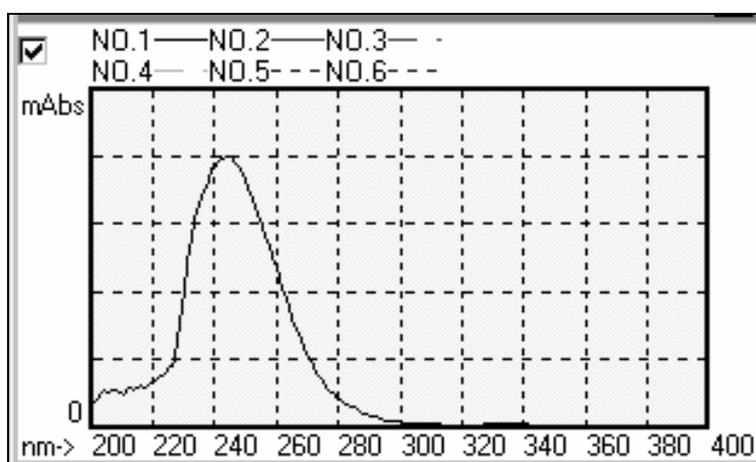
Loroglossina (substância **VI**)

Isoquercitrina (substância **VII**)

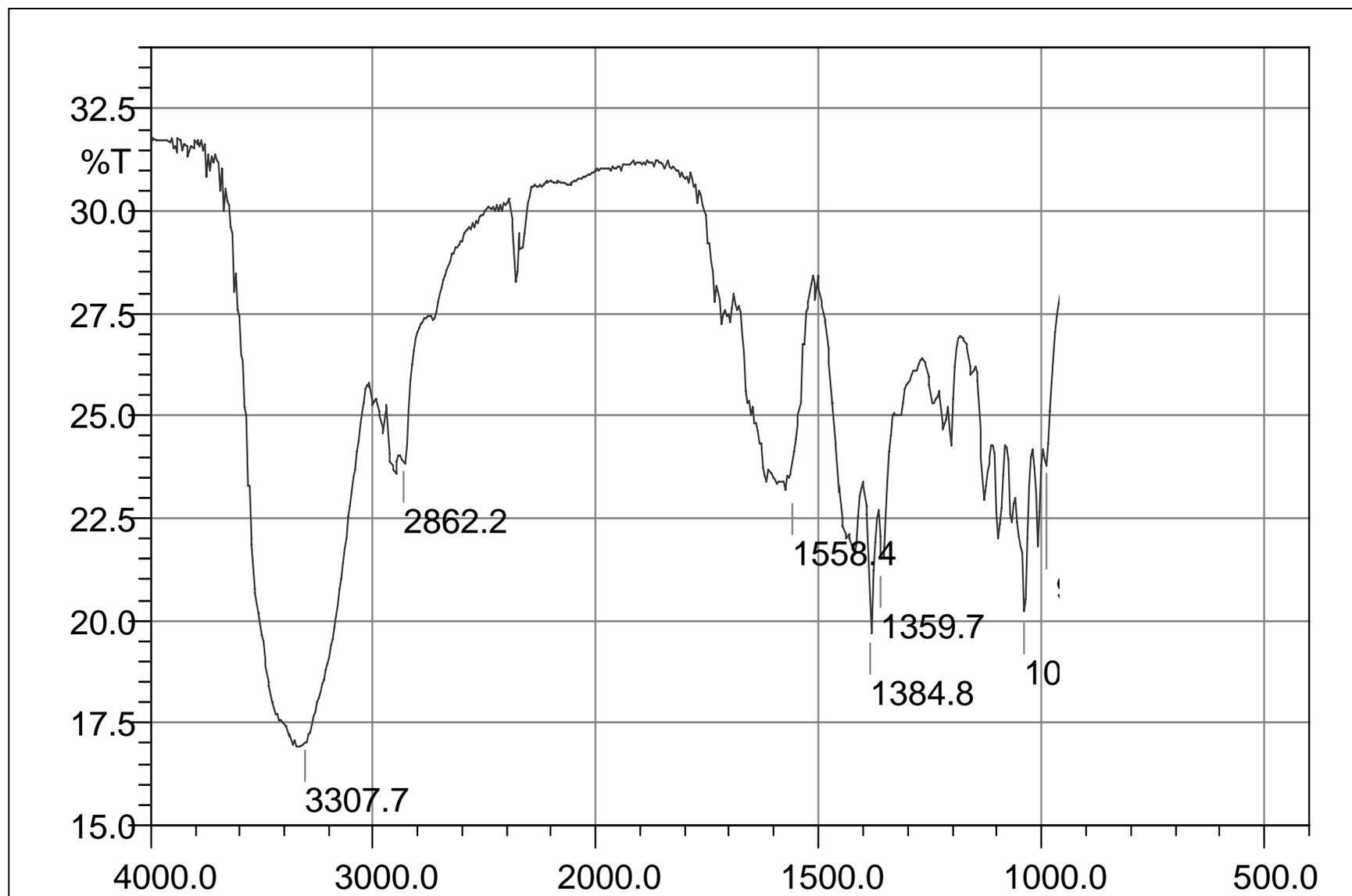
Militarina (substância **VIII**)

Isoramnetina 3-O- β -glicopiranosídeo (substância **IX**)

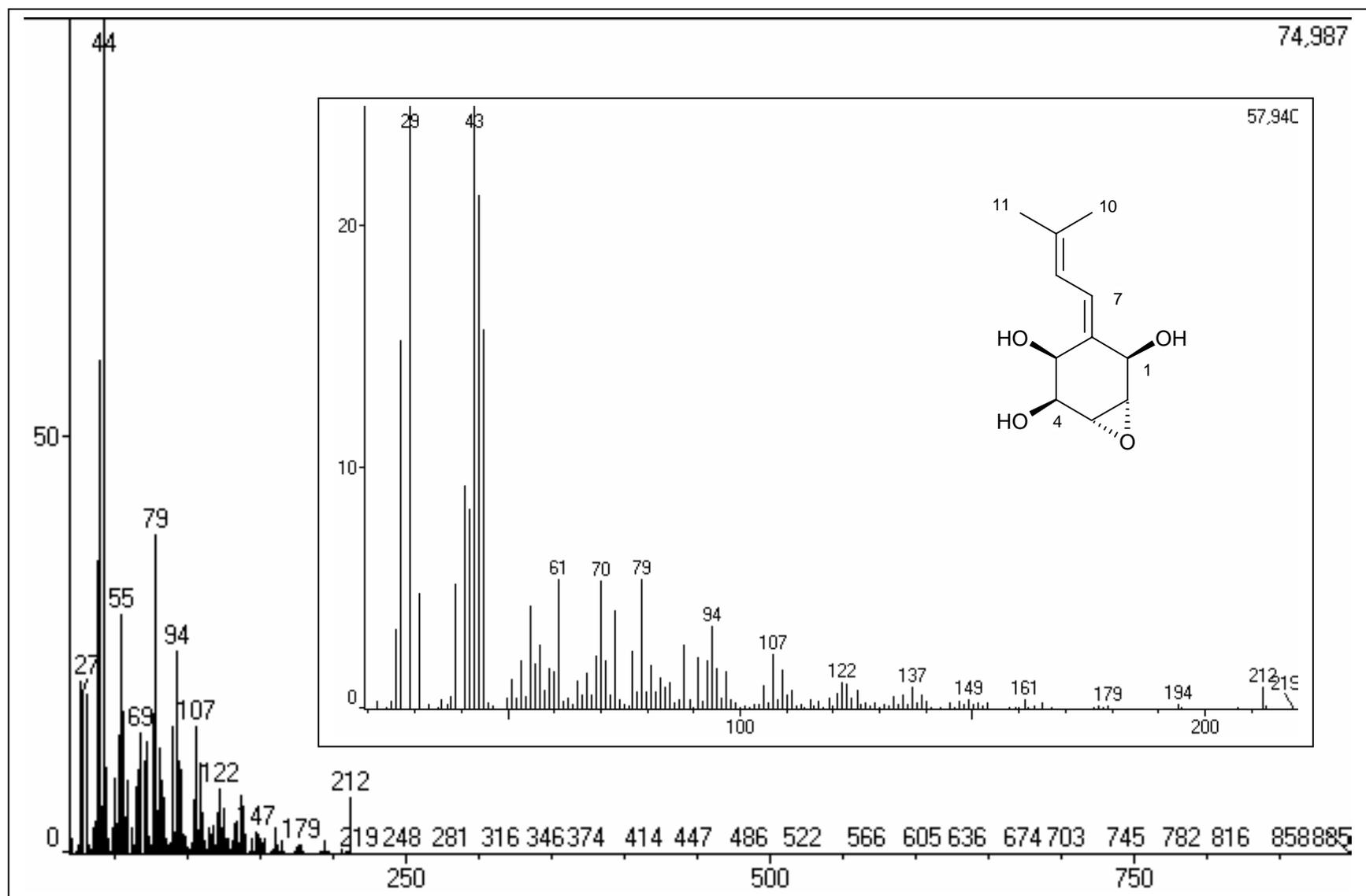
Isoramnetina 3,7-di-O- β -glicopiranosídeo (substância **X**)



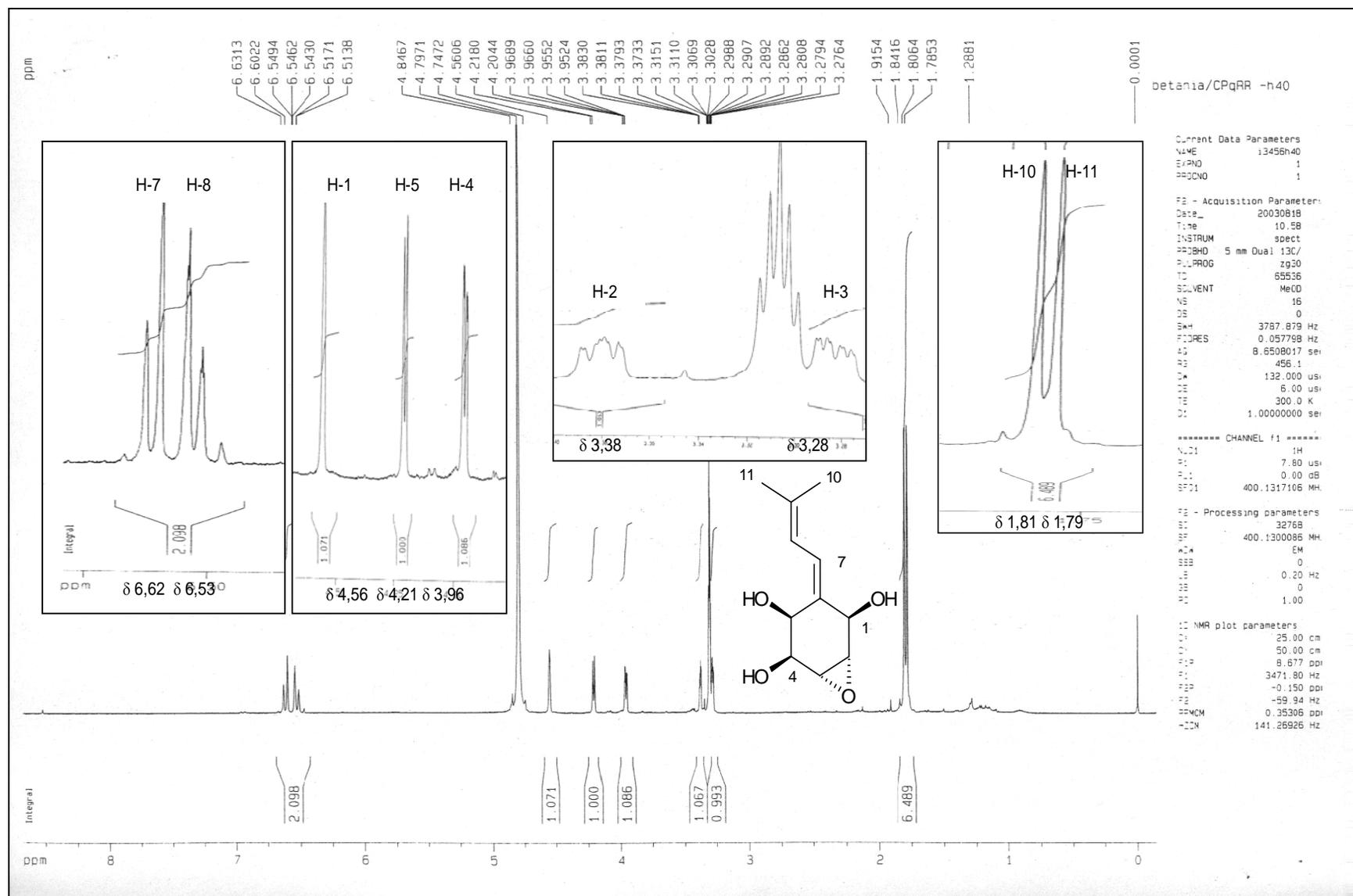
Espectro no UV da substância I (200-400 nm).



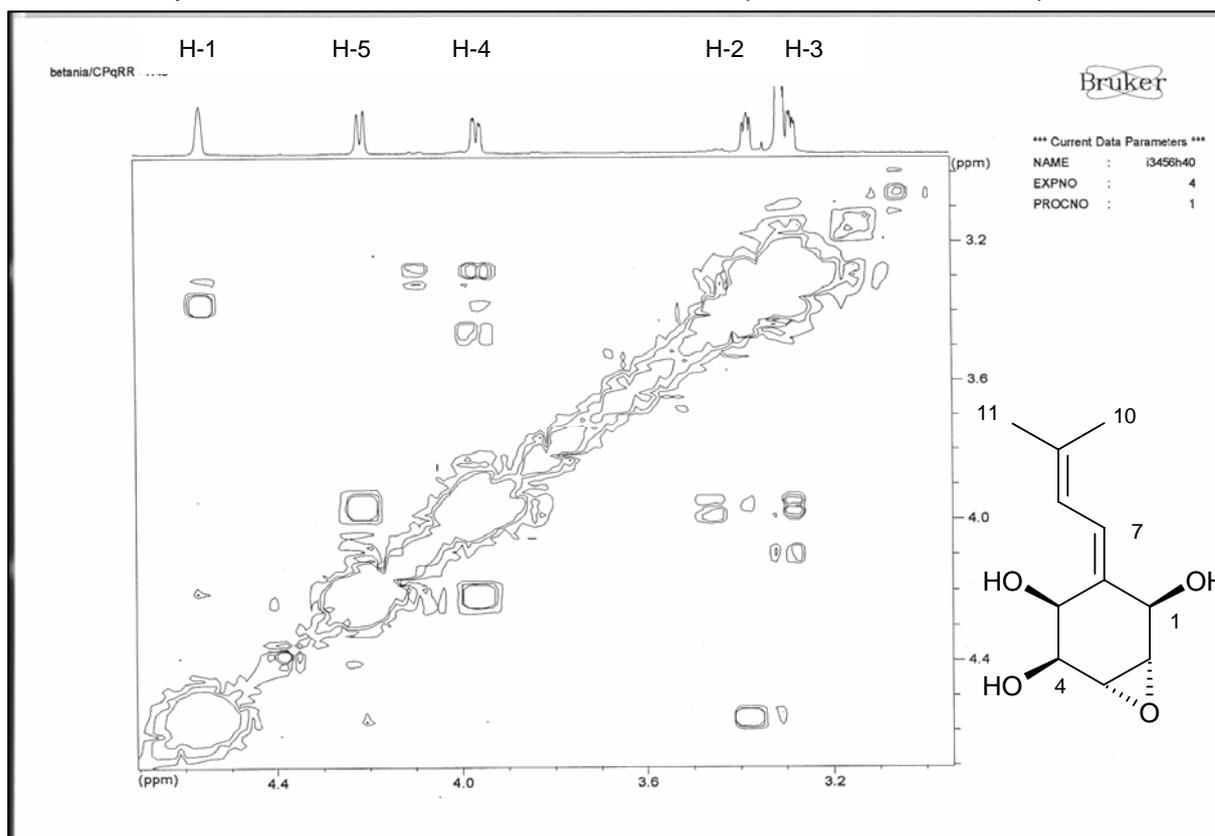
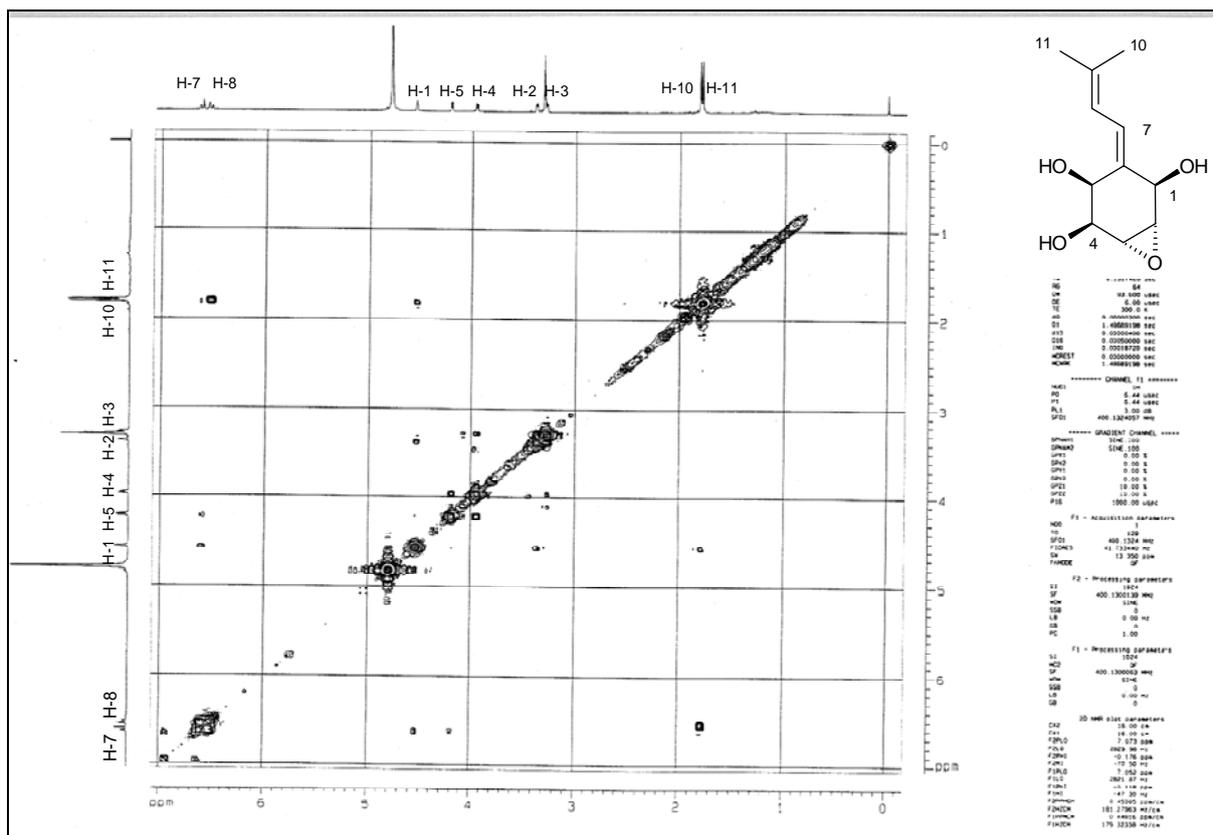
Espectro no IV da substância I (KBr, cm⁻¹).

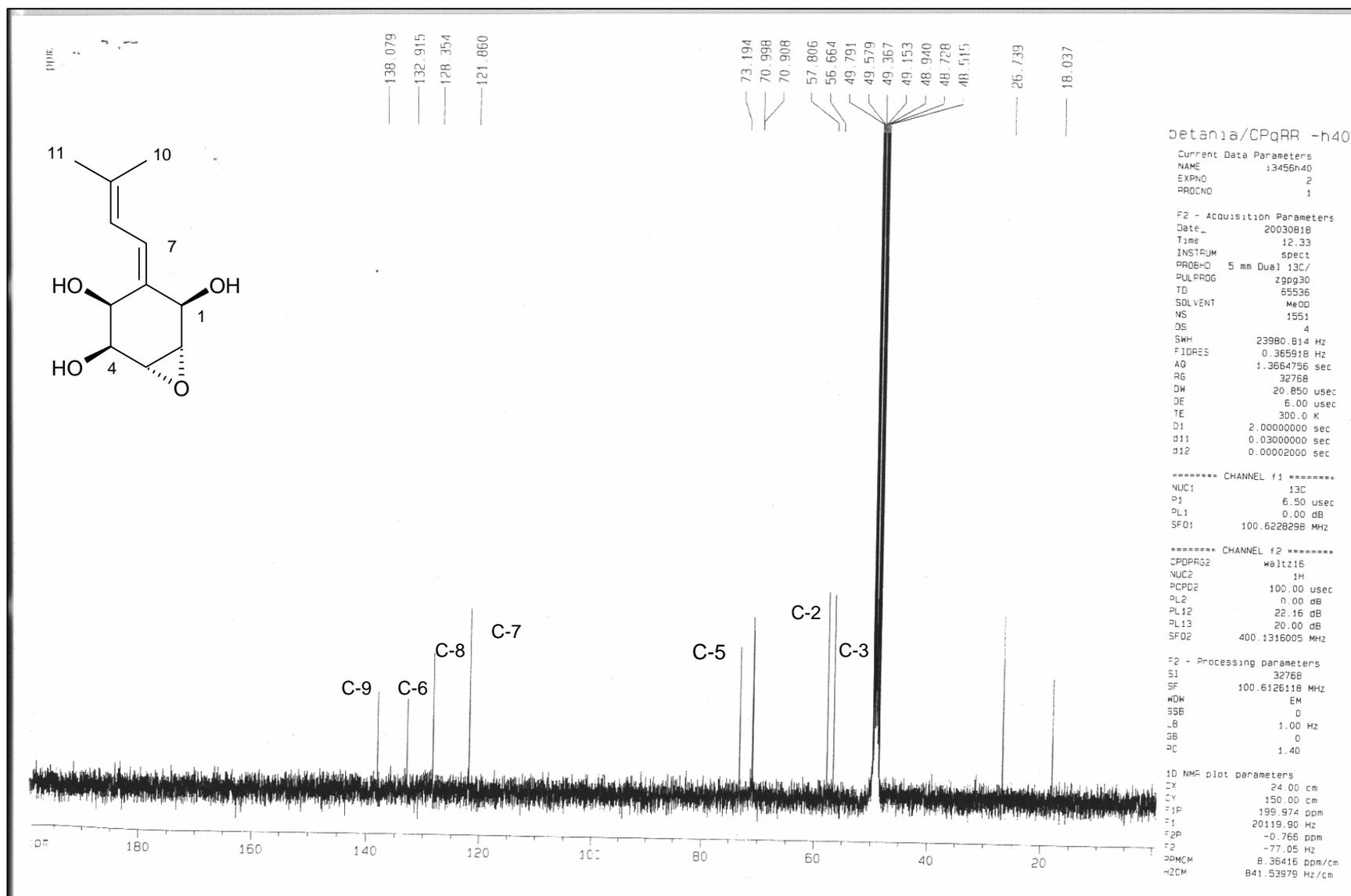


Espectro de massas, obtido por impacto de elétrons (EI 70 eV), da substância I.

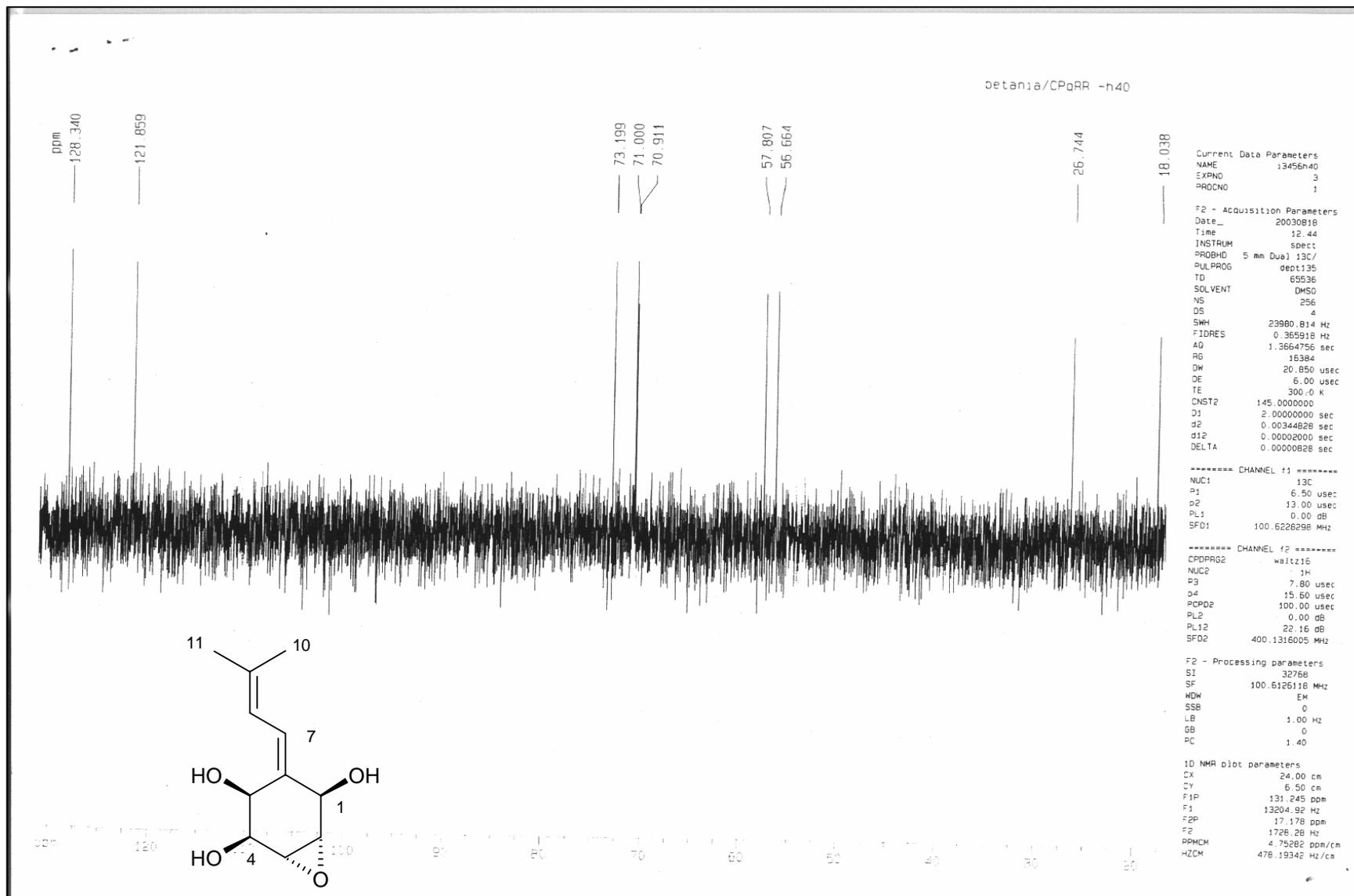


Espectro de RMN ¹H da substância I (400 MHz, CD₃OD, δ).

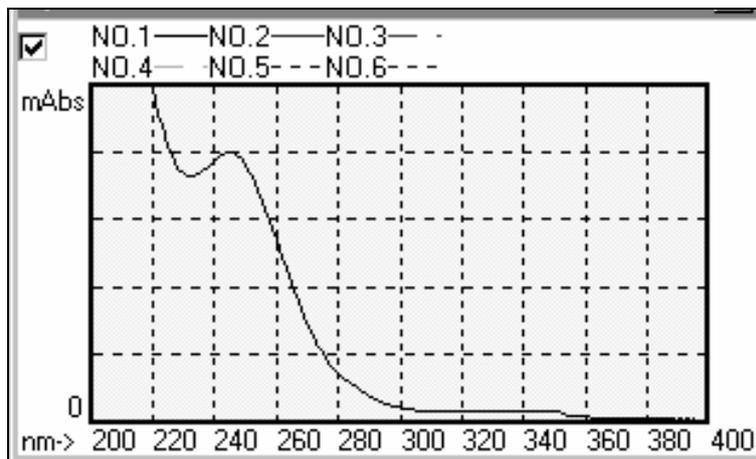




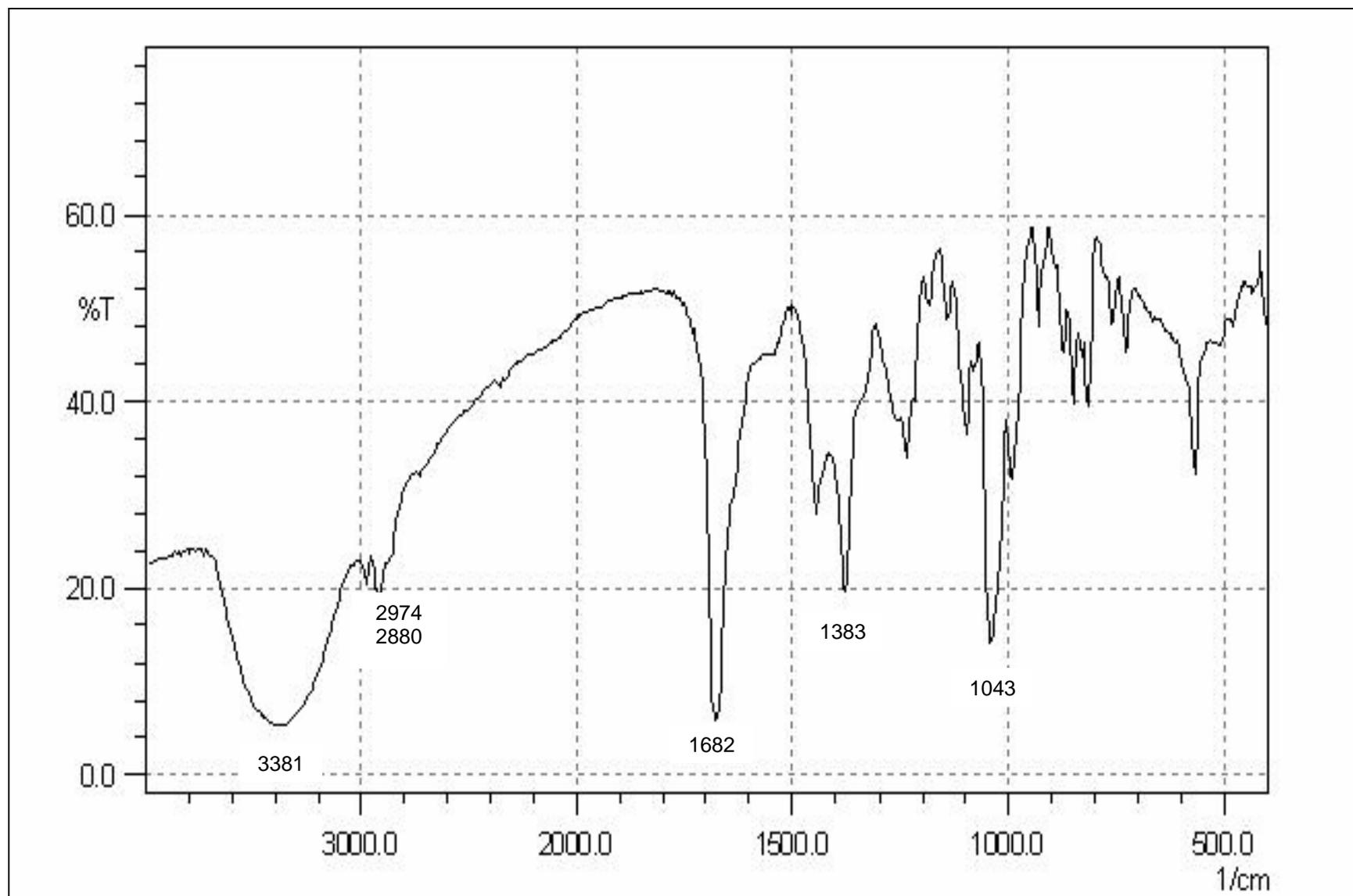
Espectro de RMN ¹³C da substância I (100 MHz, CD₃OD, δ).



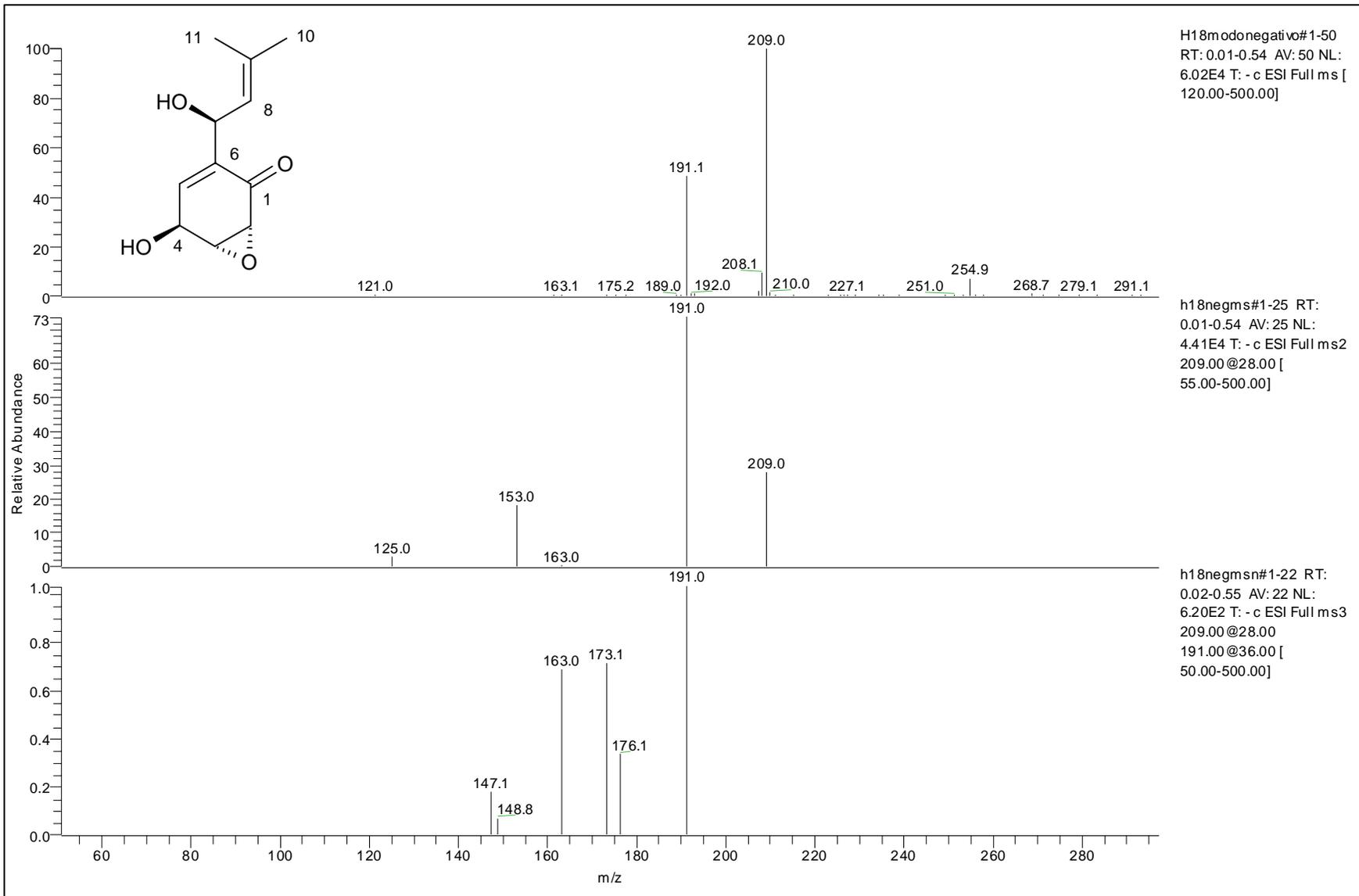
Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, CD₃OD, δ) da substância I.



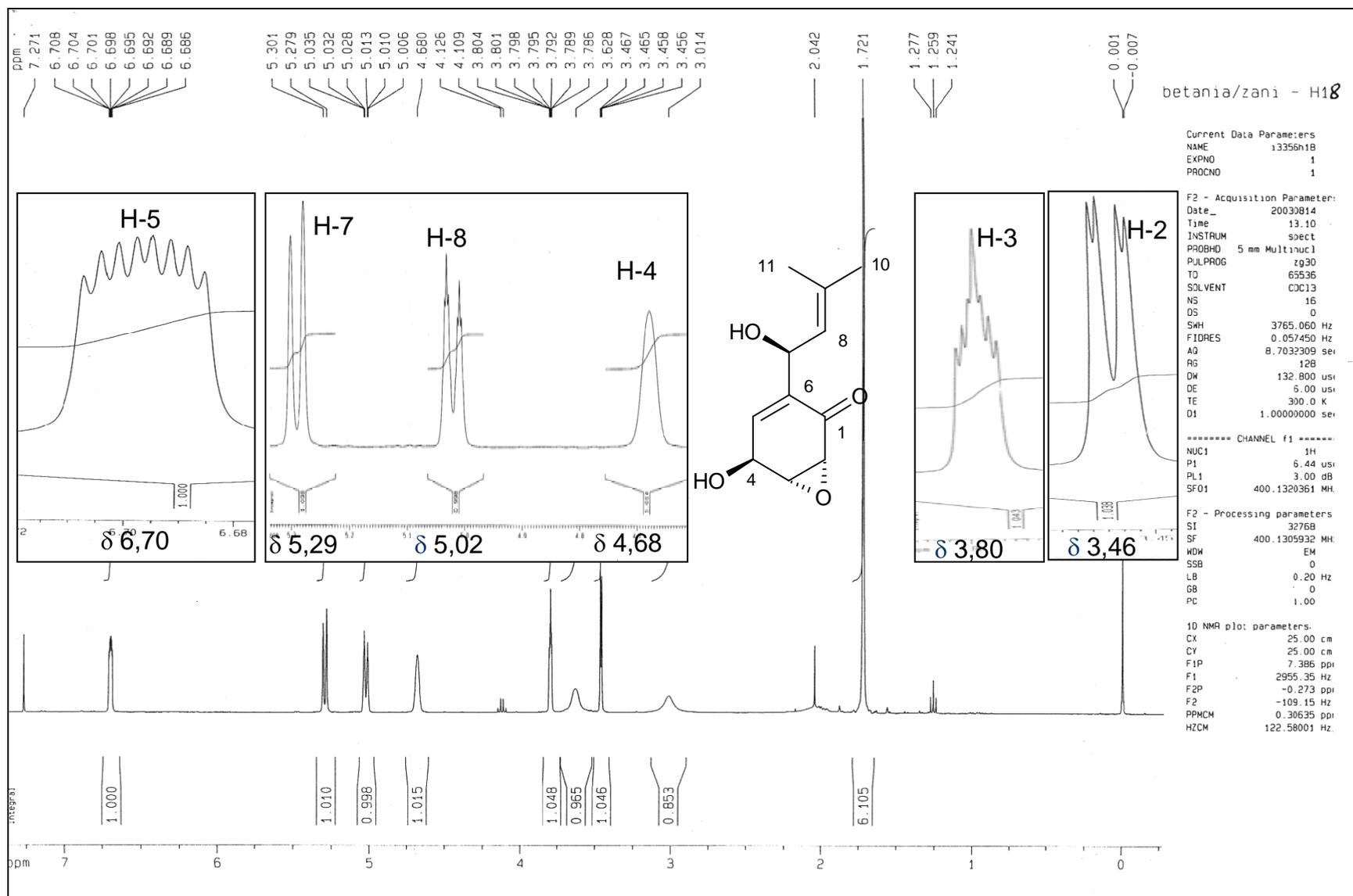
Espectro no UV da substância II (200-400 nm).

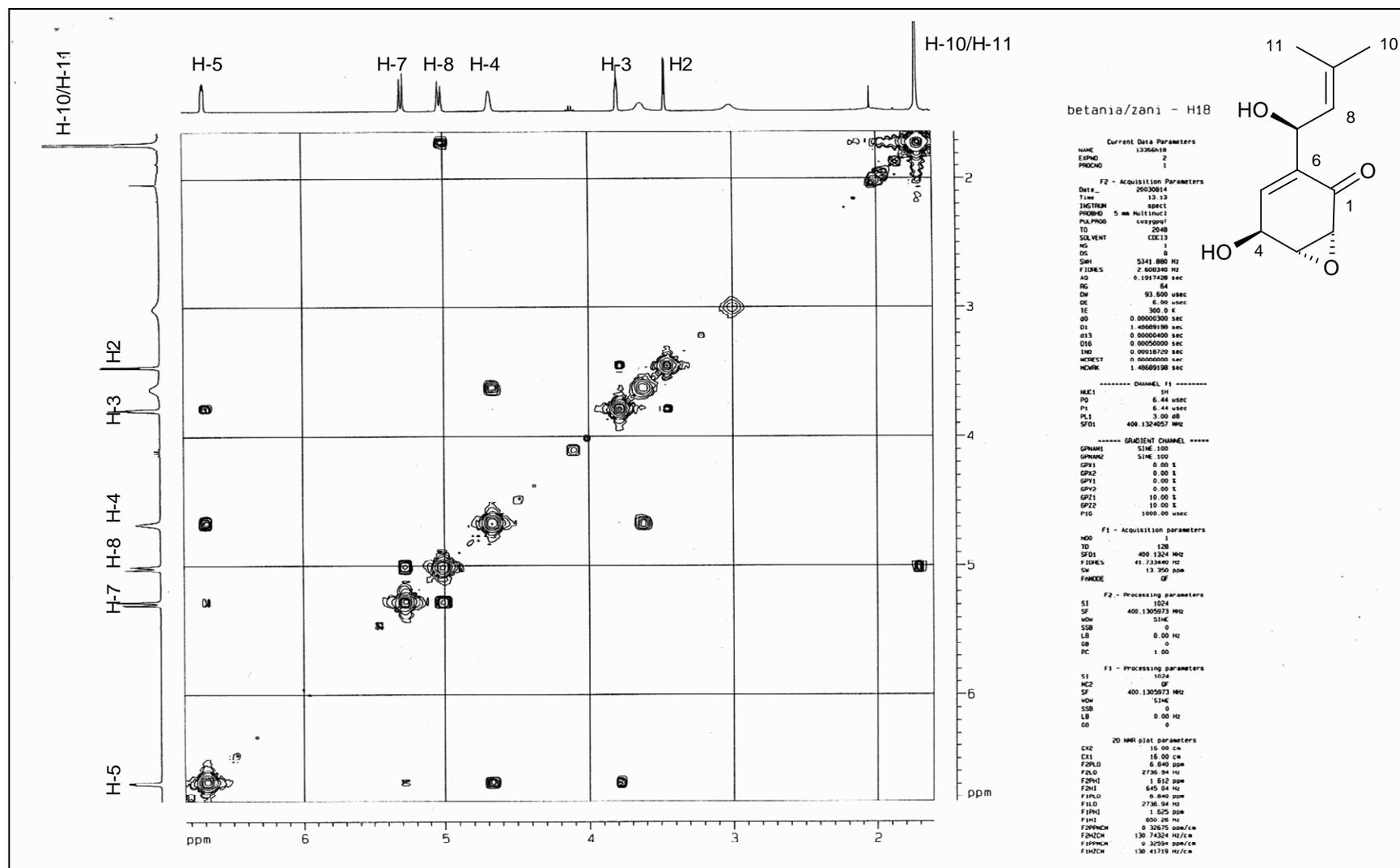


Espectro no IV da substância II (KBr, cm^{-1}).

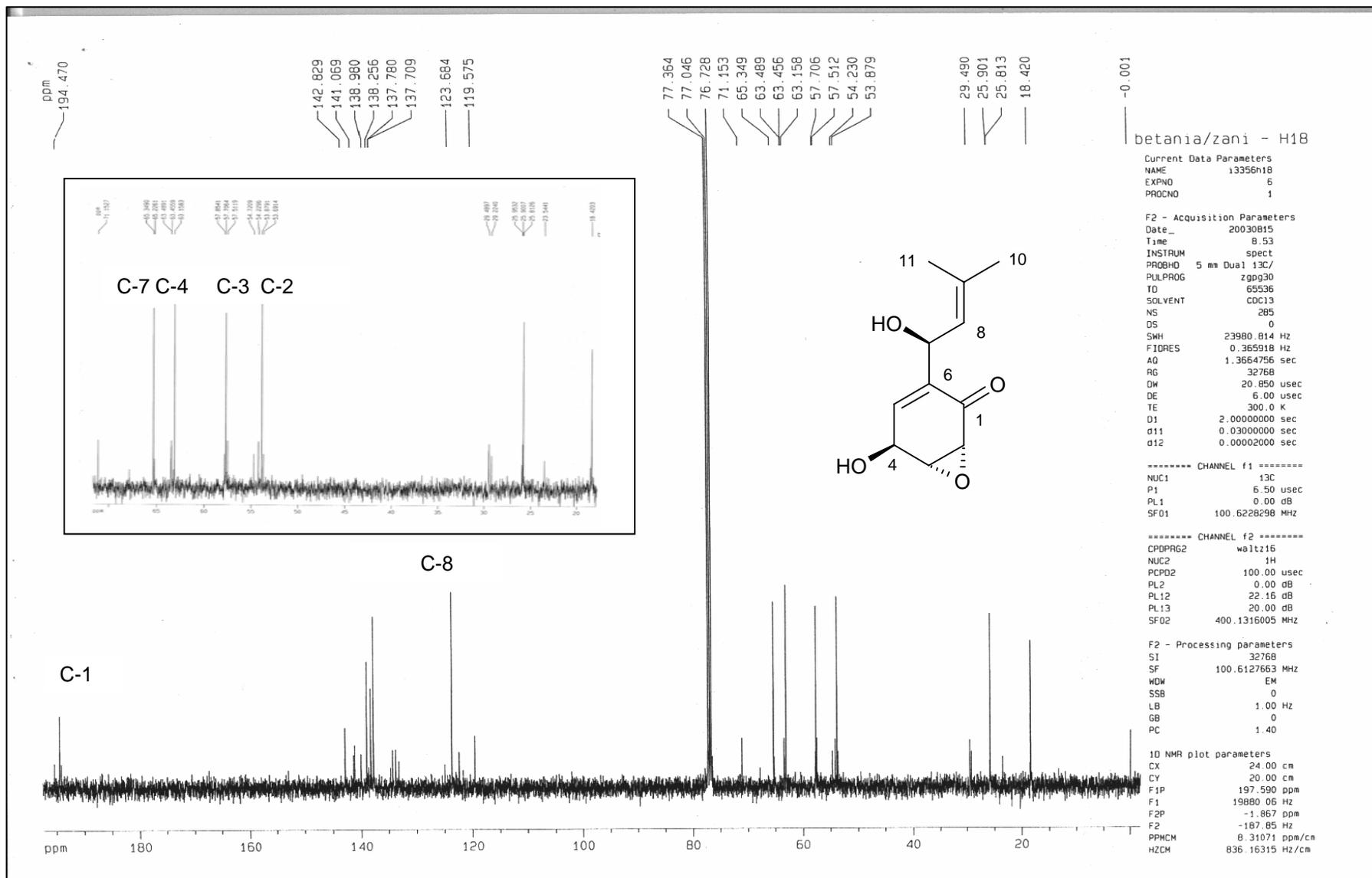


Espectro de massas, com ionização por "electrospray" no modo negativo, da substância II.

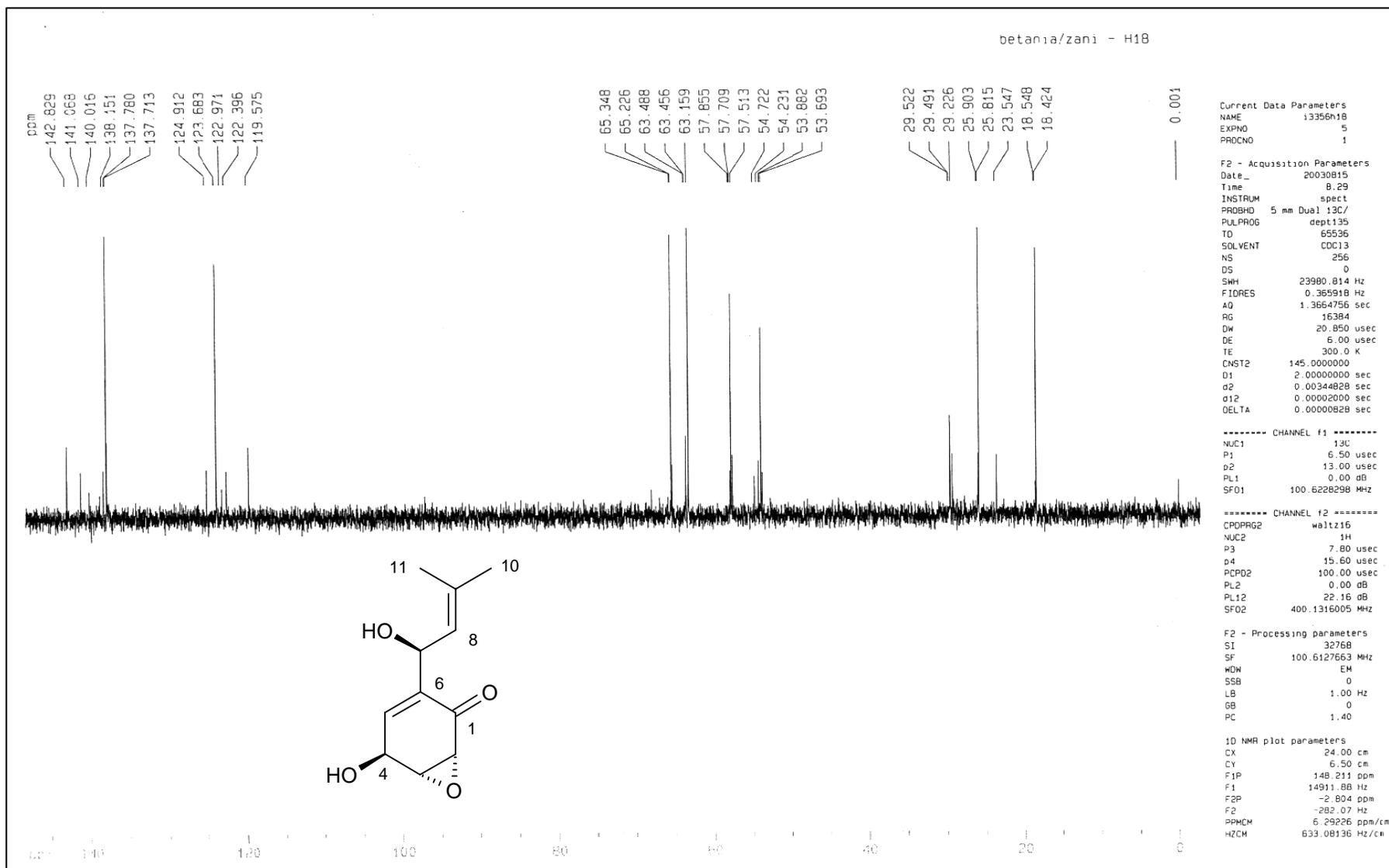


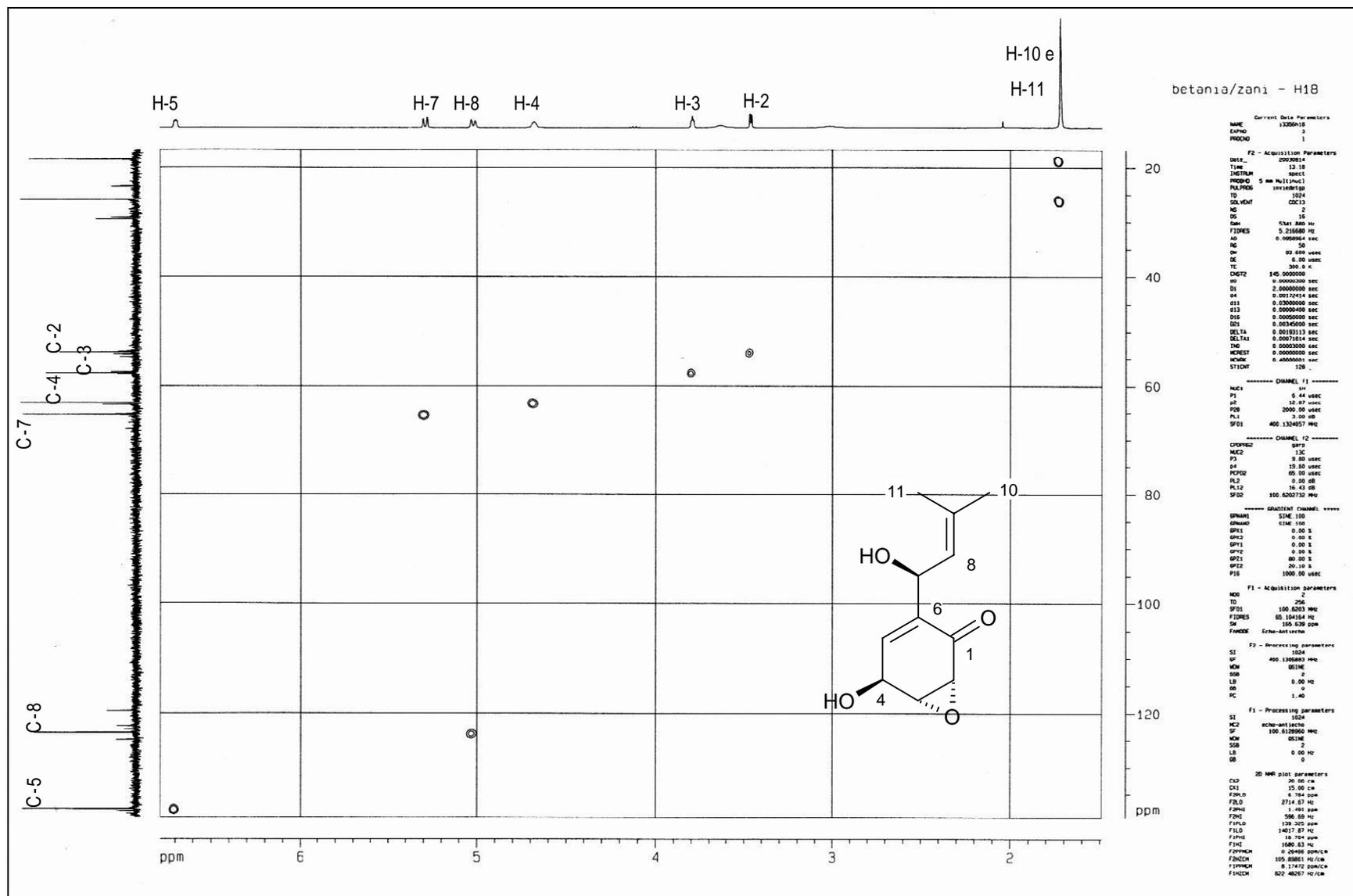


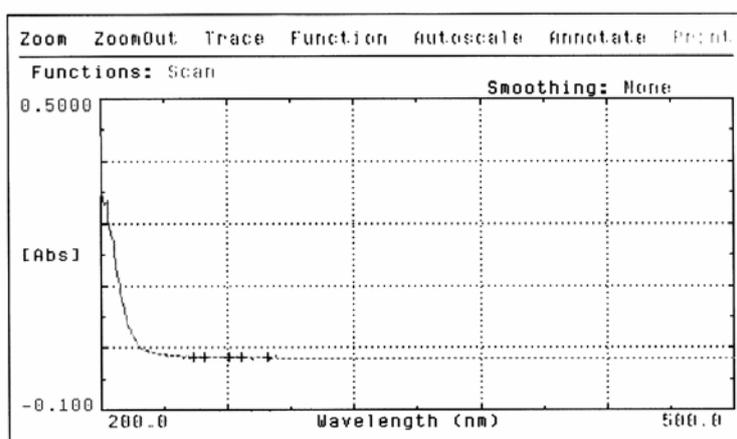
Mapa de contornos COSY da substância II (400 MHz, CDCl₃, δ).



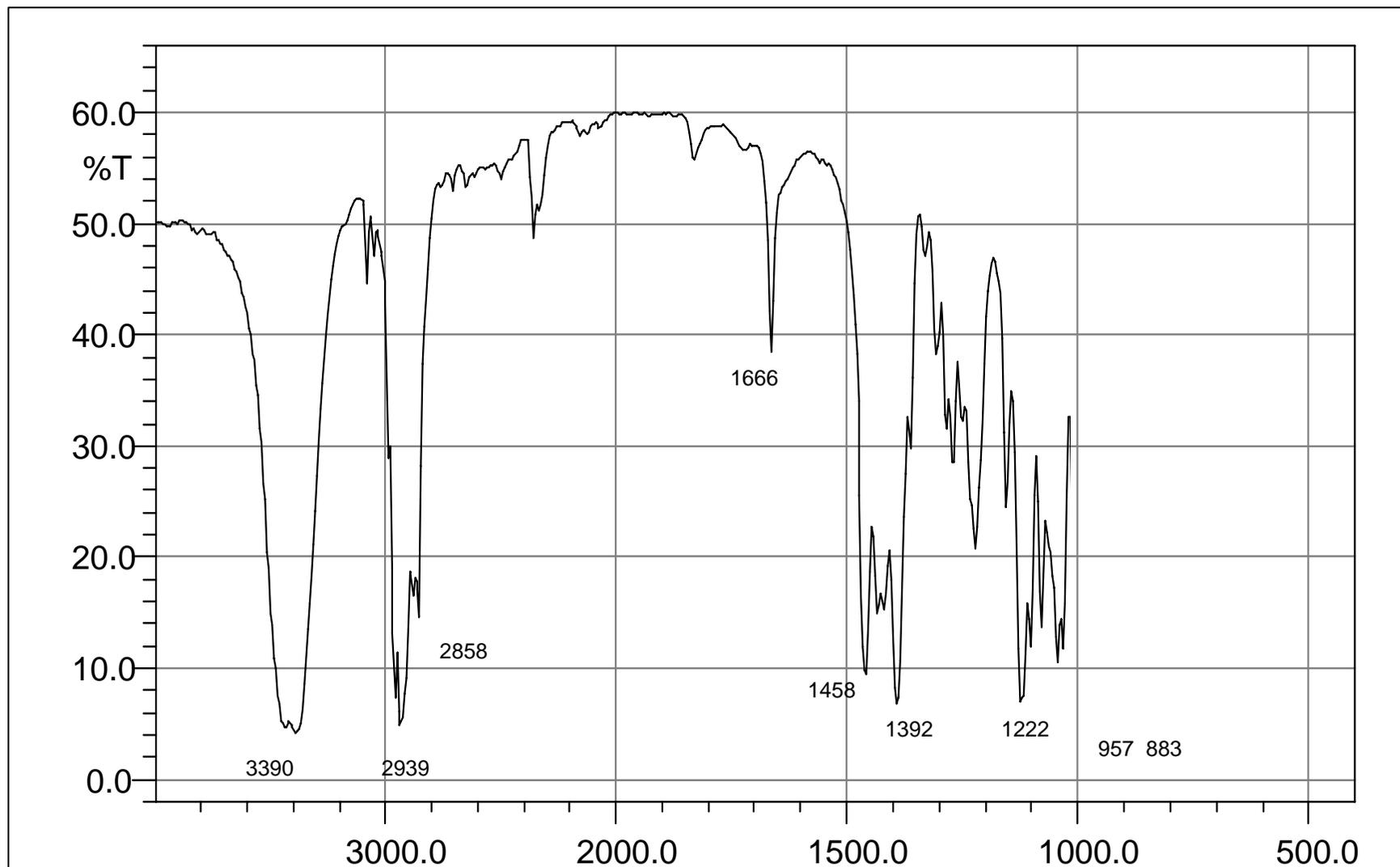
Espectro de RMN ^{13}C da substância II (100 MHz, CDCl_3 , δ).



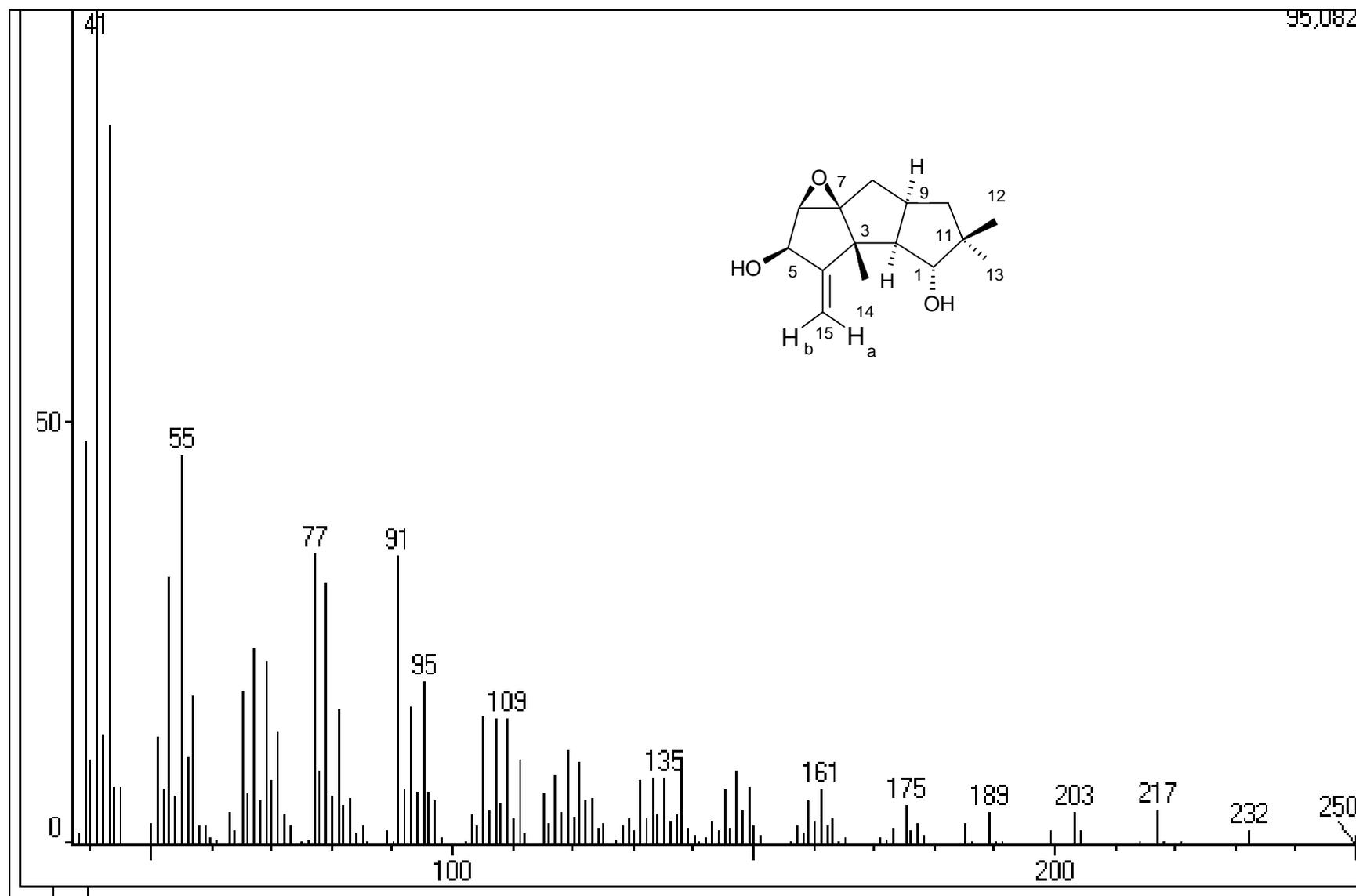




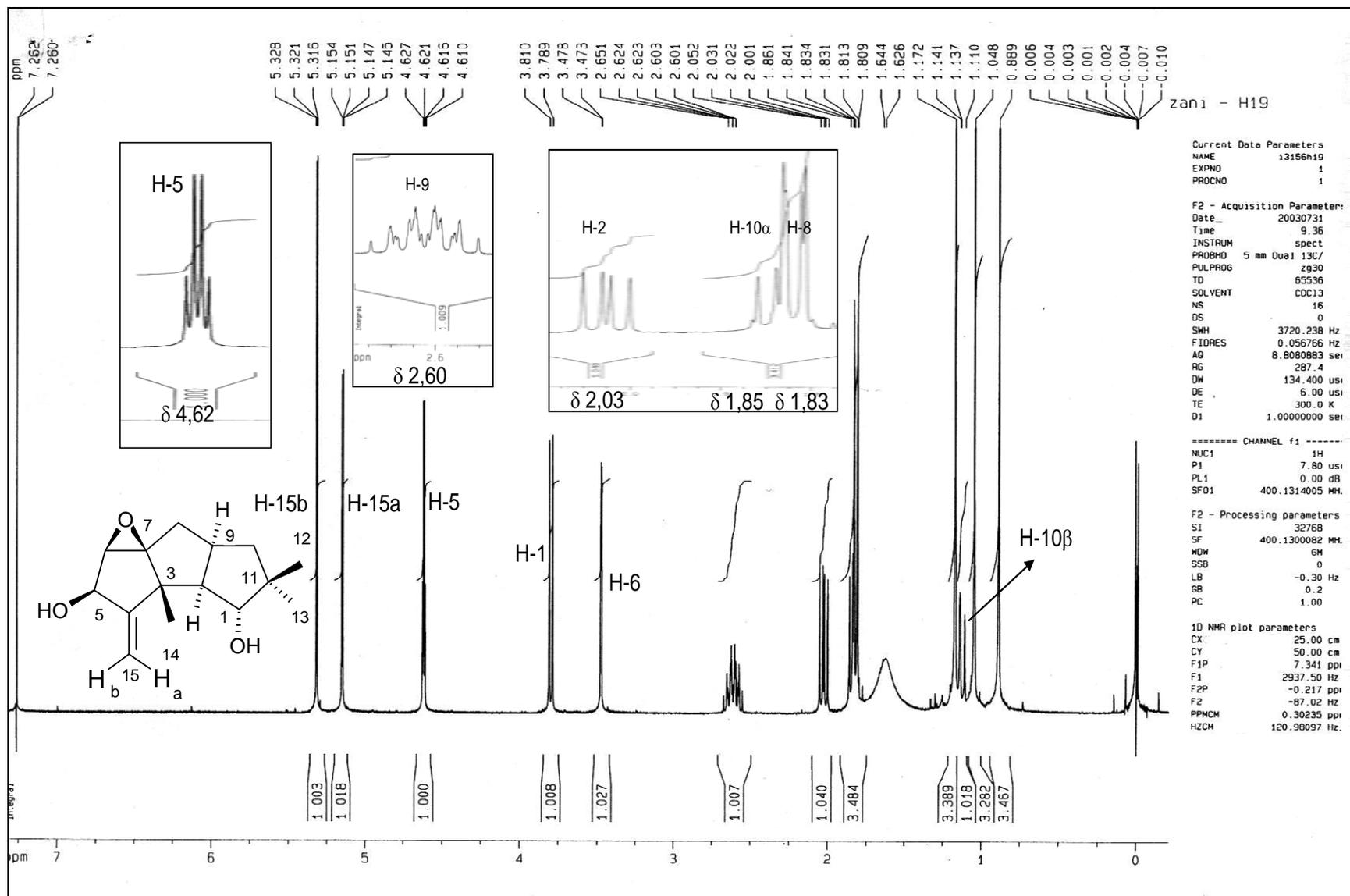
Espectro da substância III no UV (2%p/v em MeOH, 200-500 nm).



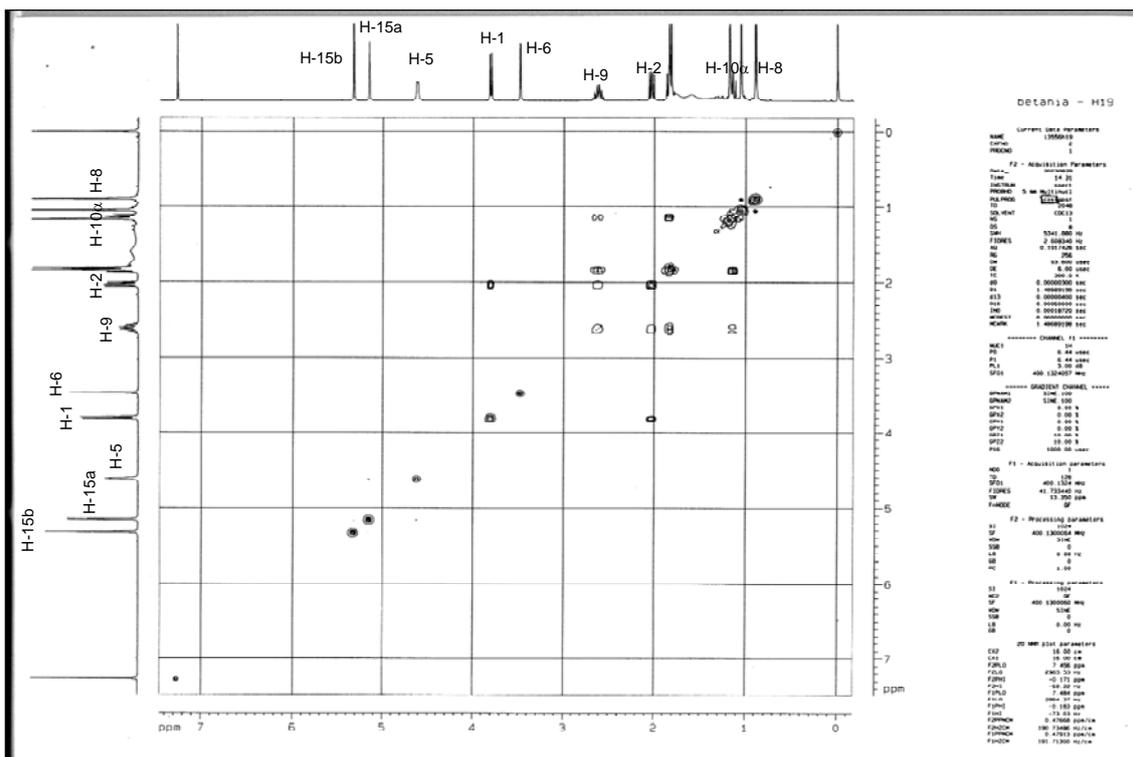
Espectro no IV da substância III (KBr, cm⁻¹).



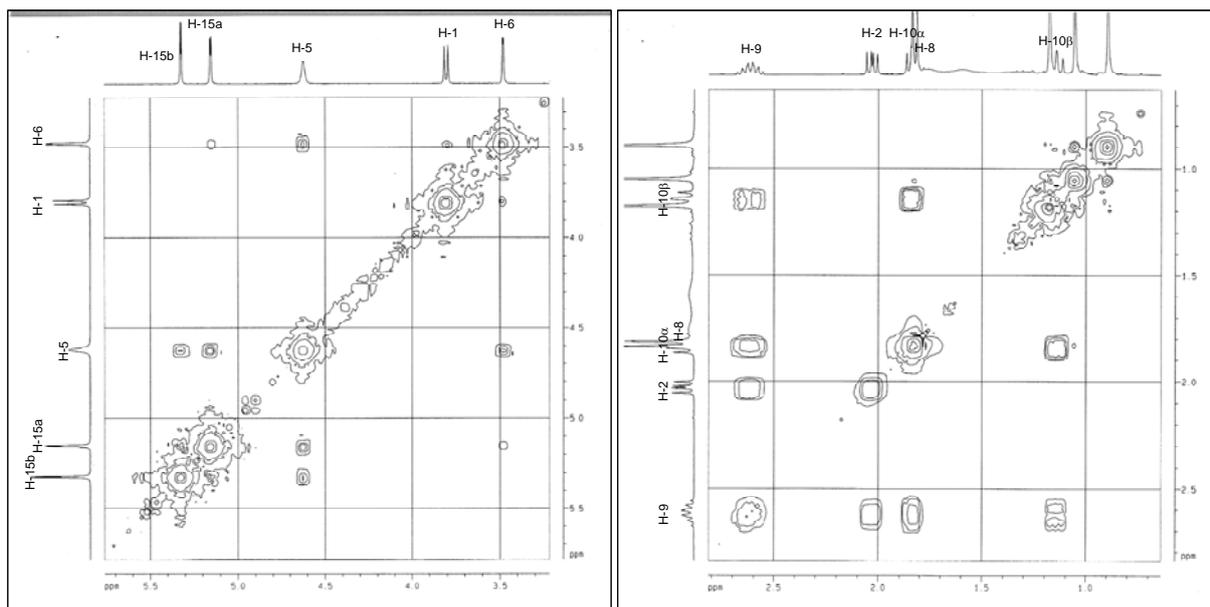
Espectro de massas, obtido por impacto de elétrons (EI 70 eV), da substância III.



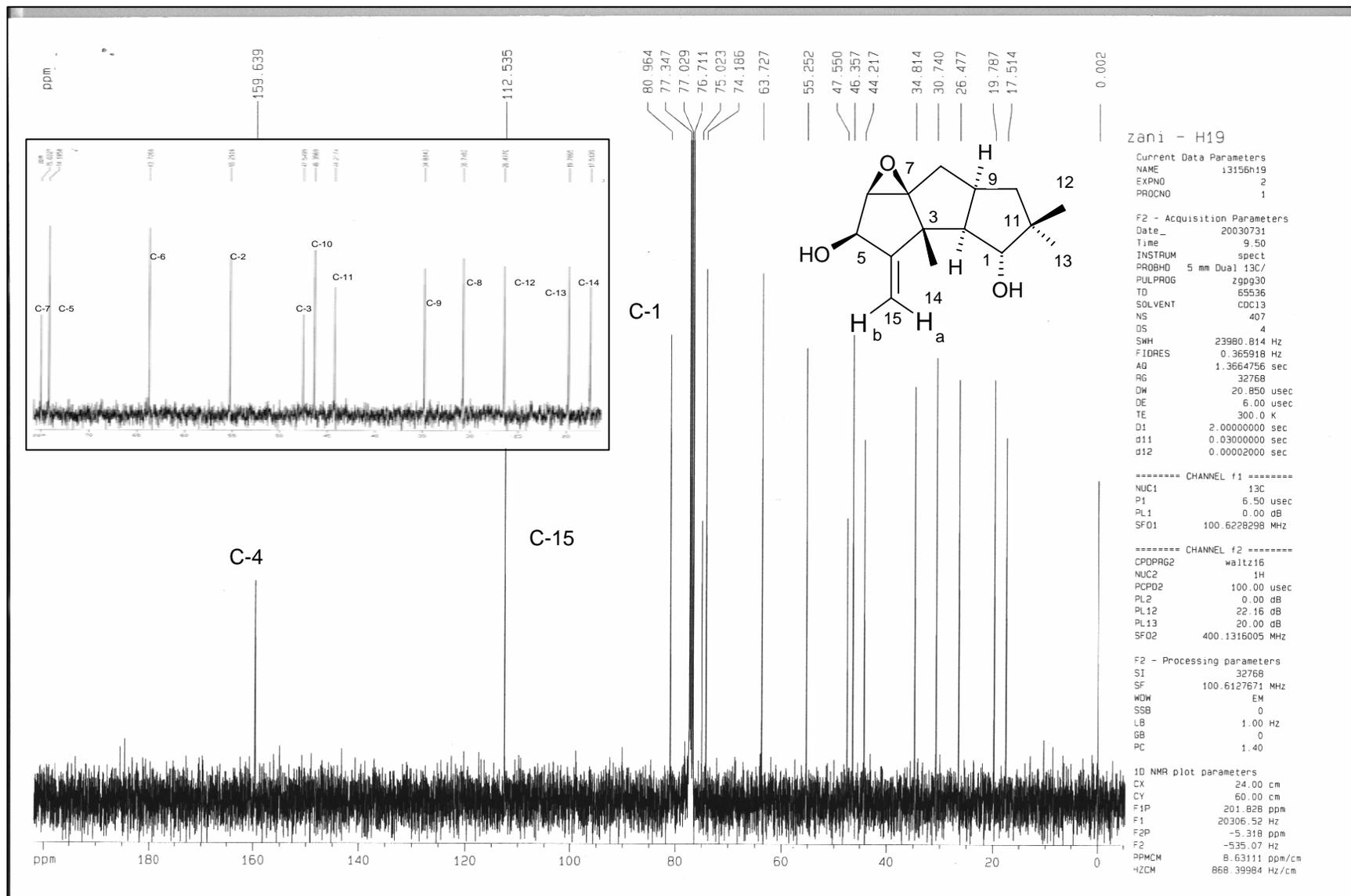
Espectro de RMN ^1H da substância III (400 MHz, CDCl_3 , δ).



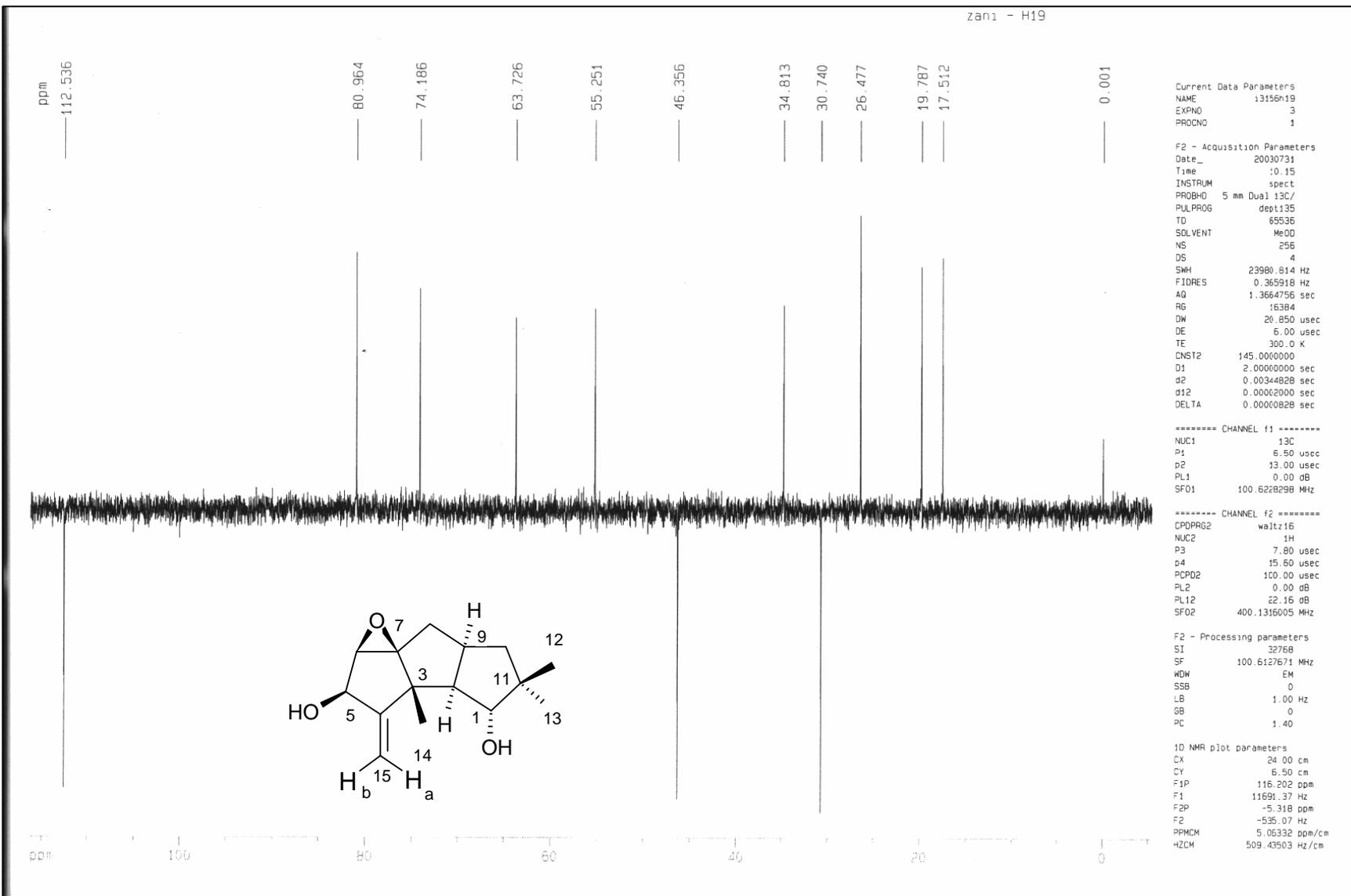
Mapa de contornos COSY da substância III (400 MHz, CDCl₃, δ).



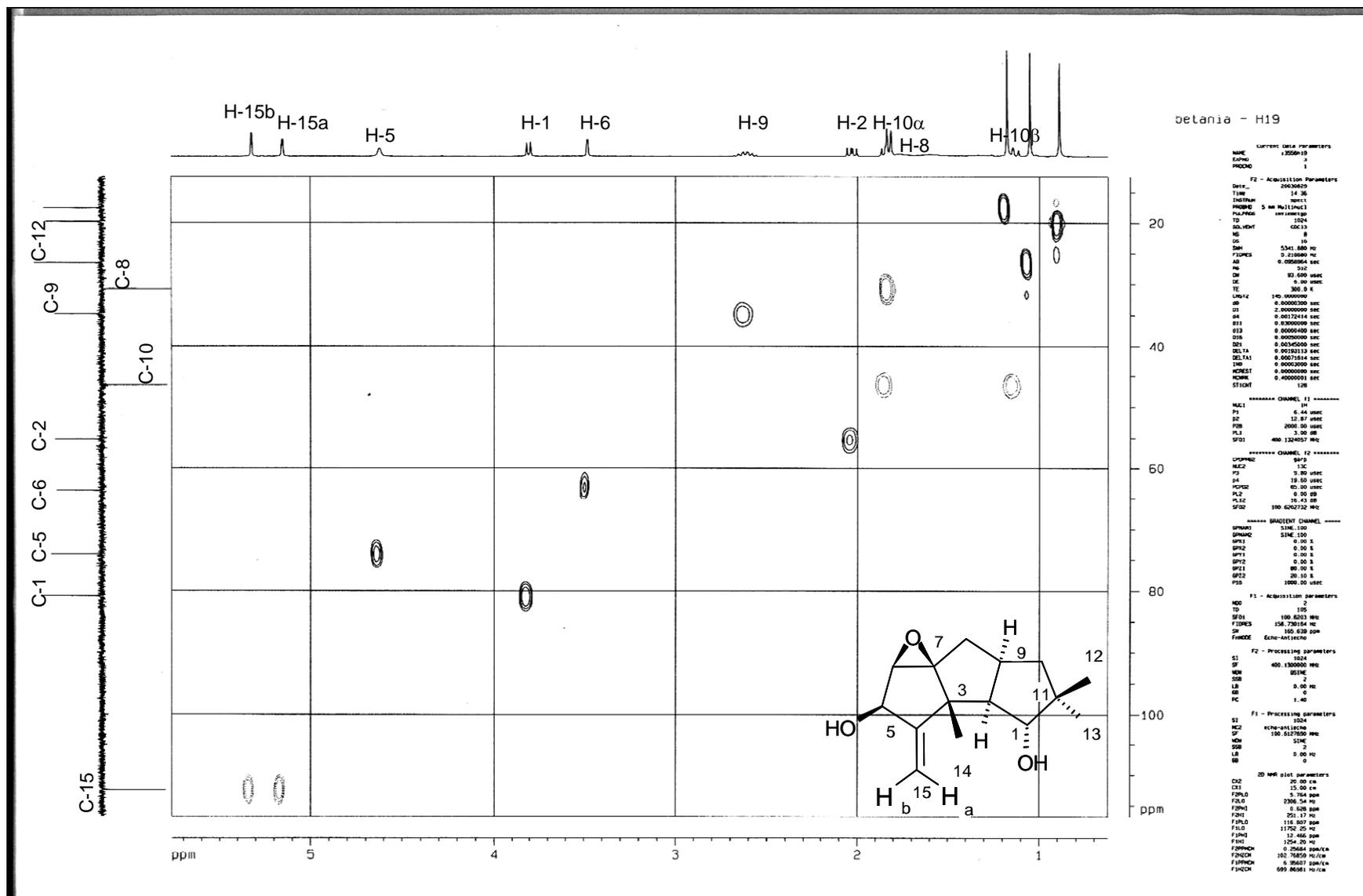
Expansão do mapa de contornos COSY da substância III (400 MHz, CDCl₃, δ).



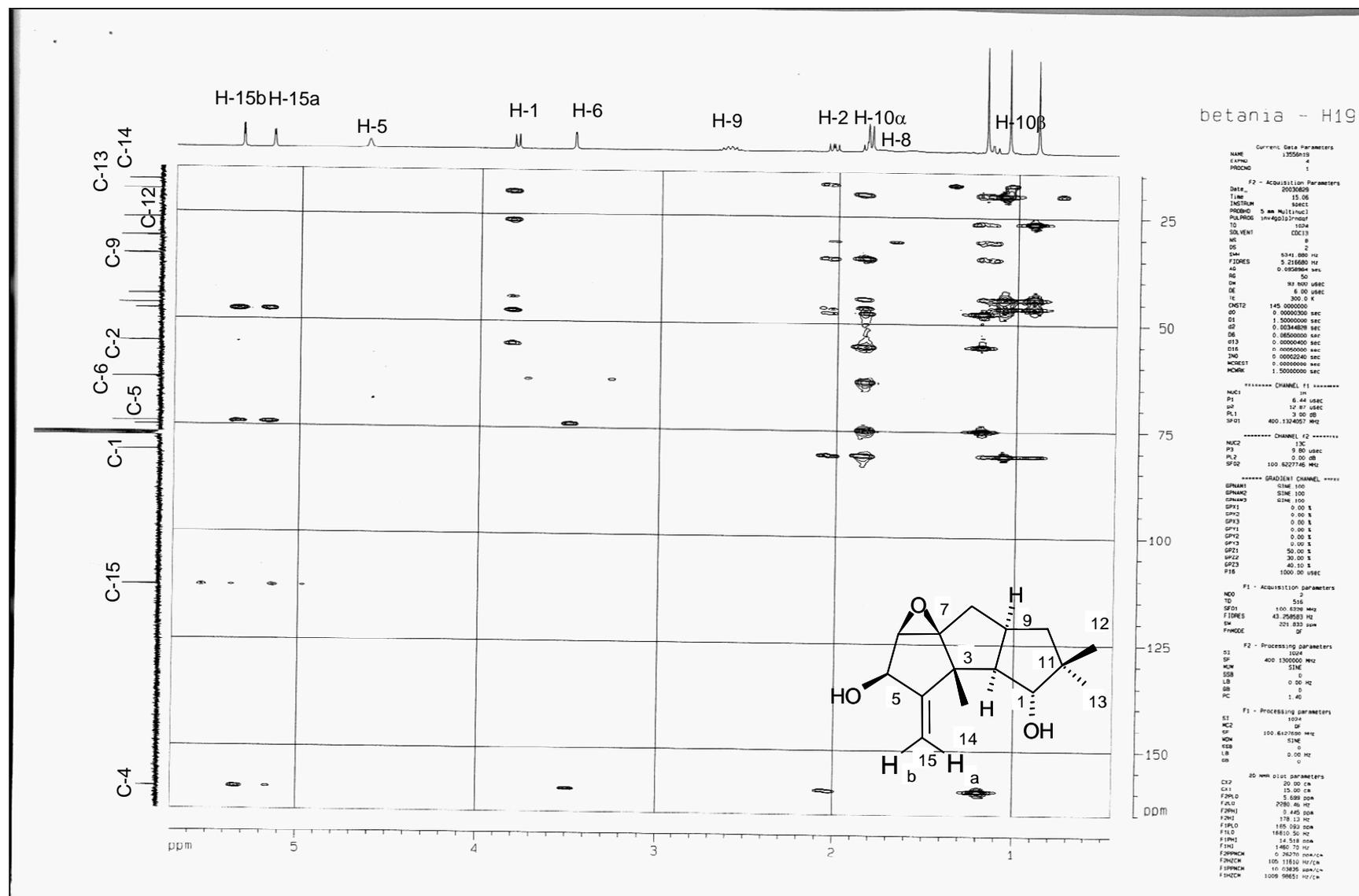
Espectro de RMN ¹³C da substância III (100 MHz, CDCl₃, δ).



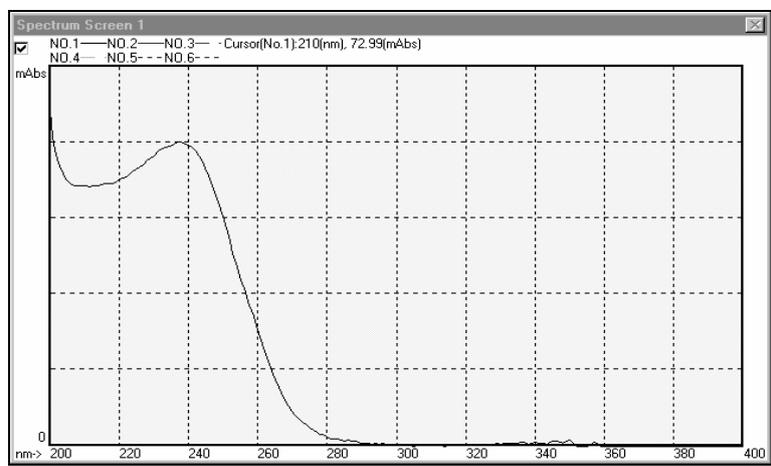
Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, CDCl₃, δ) da substância III.



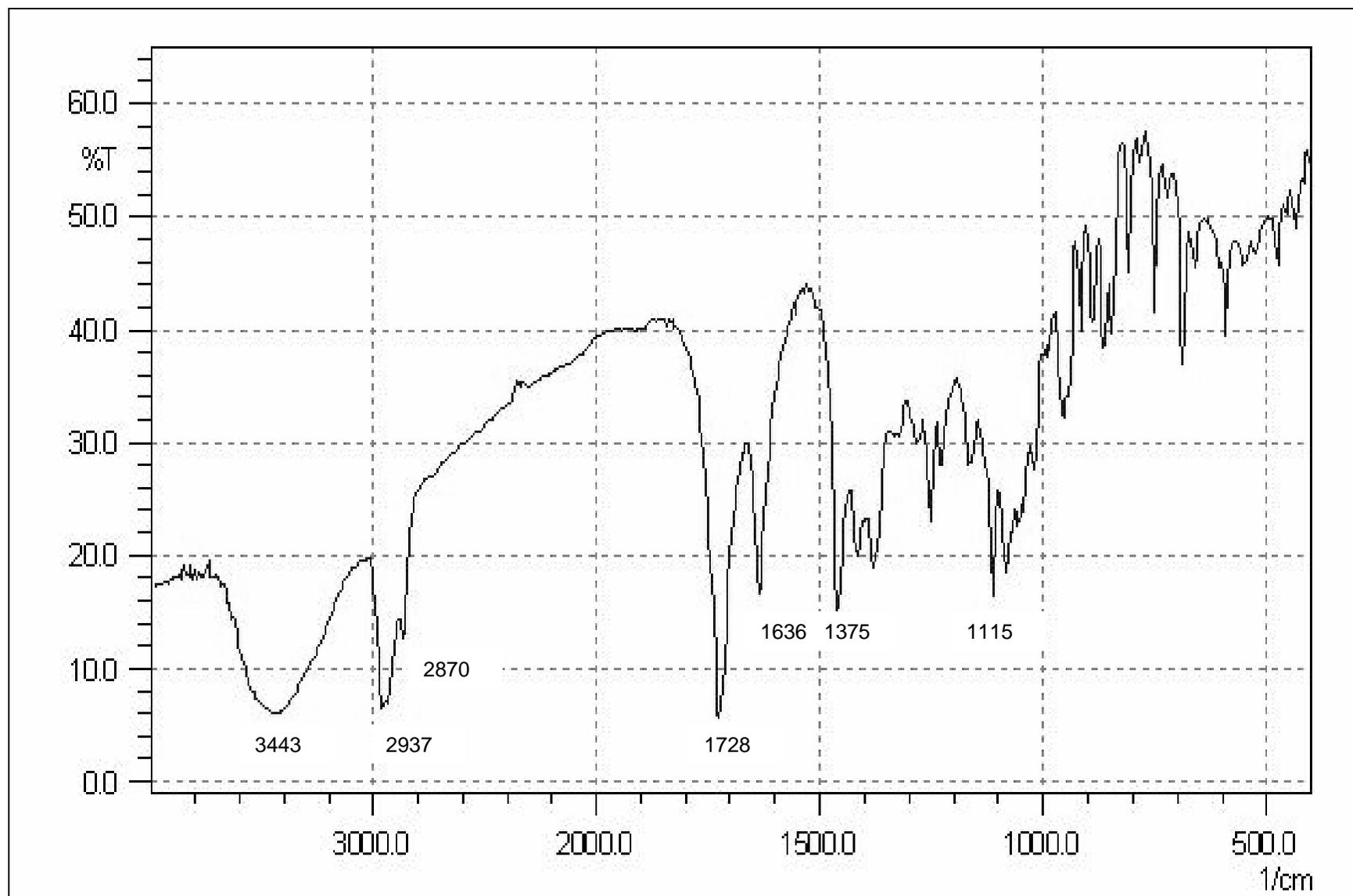
Mapa de contornos HMBC da substância III.



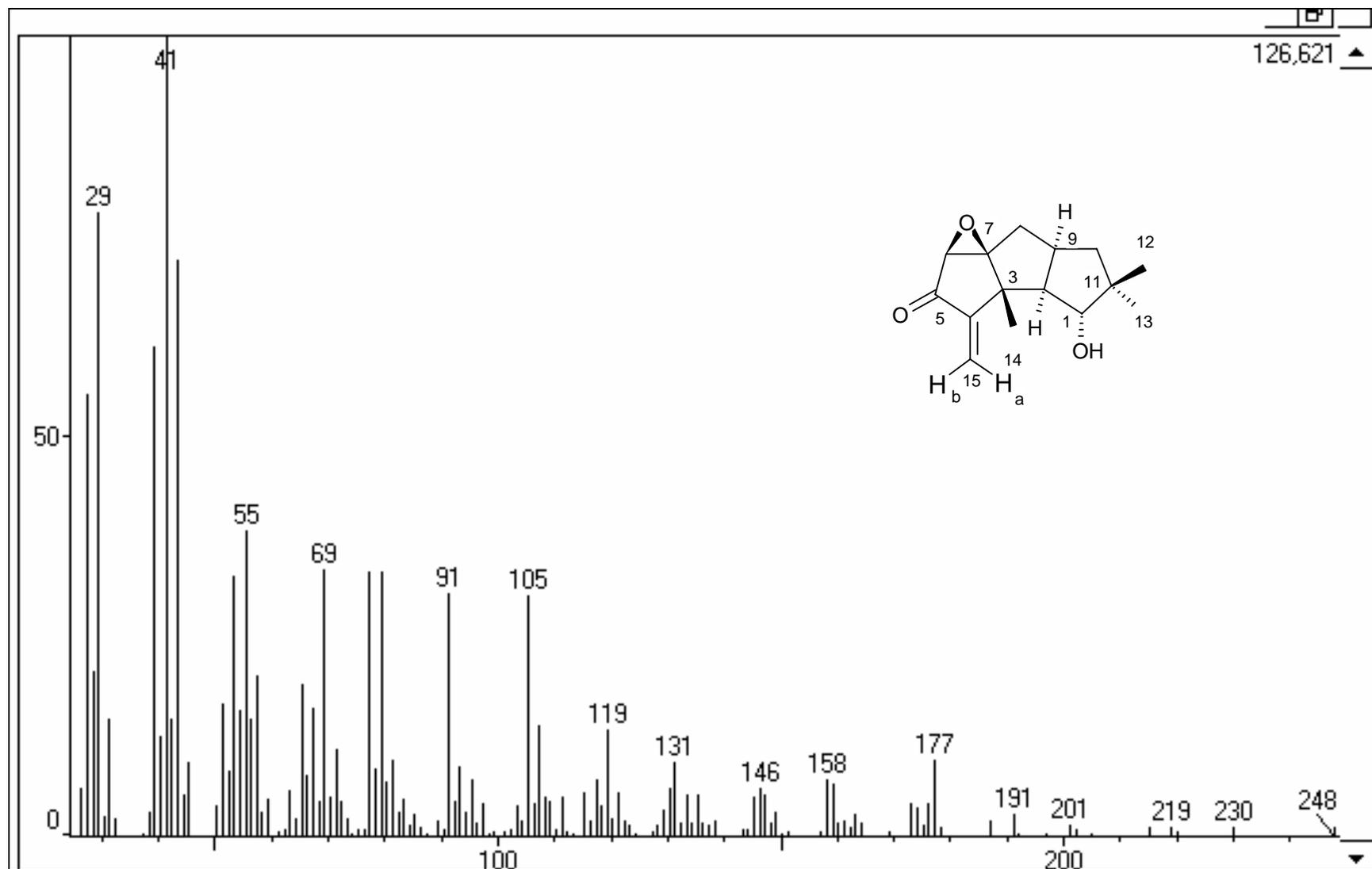
Mapa de contornos HMBC da substância III.



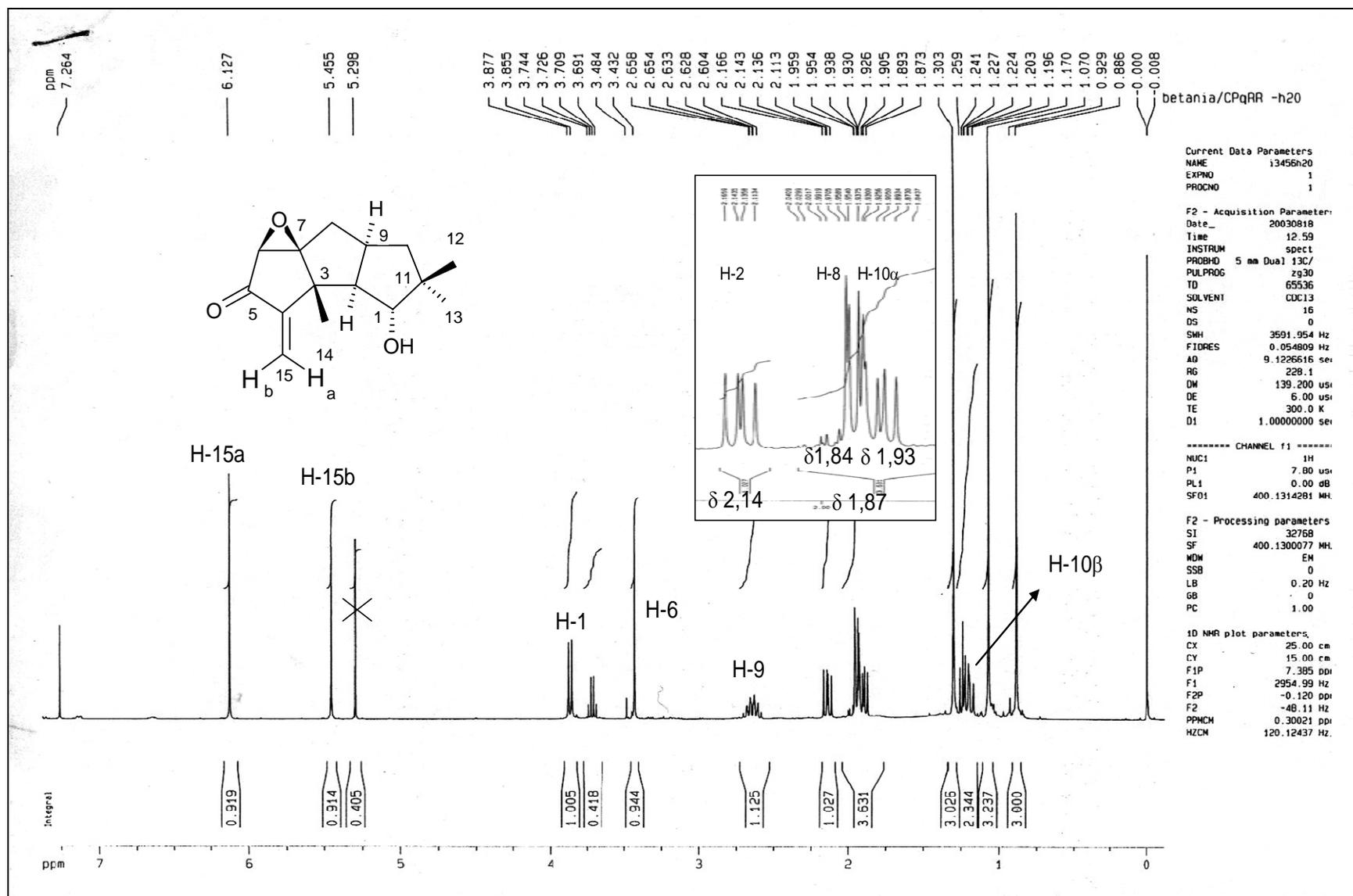
Espectro no UV da substância IV (200-400 nm).



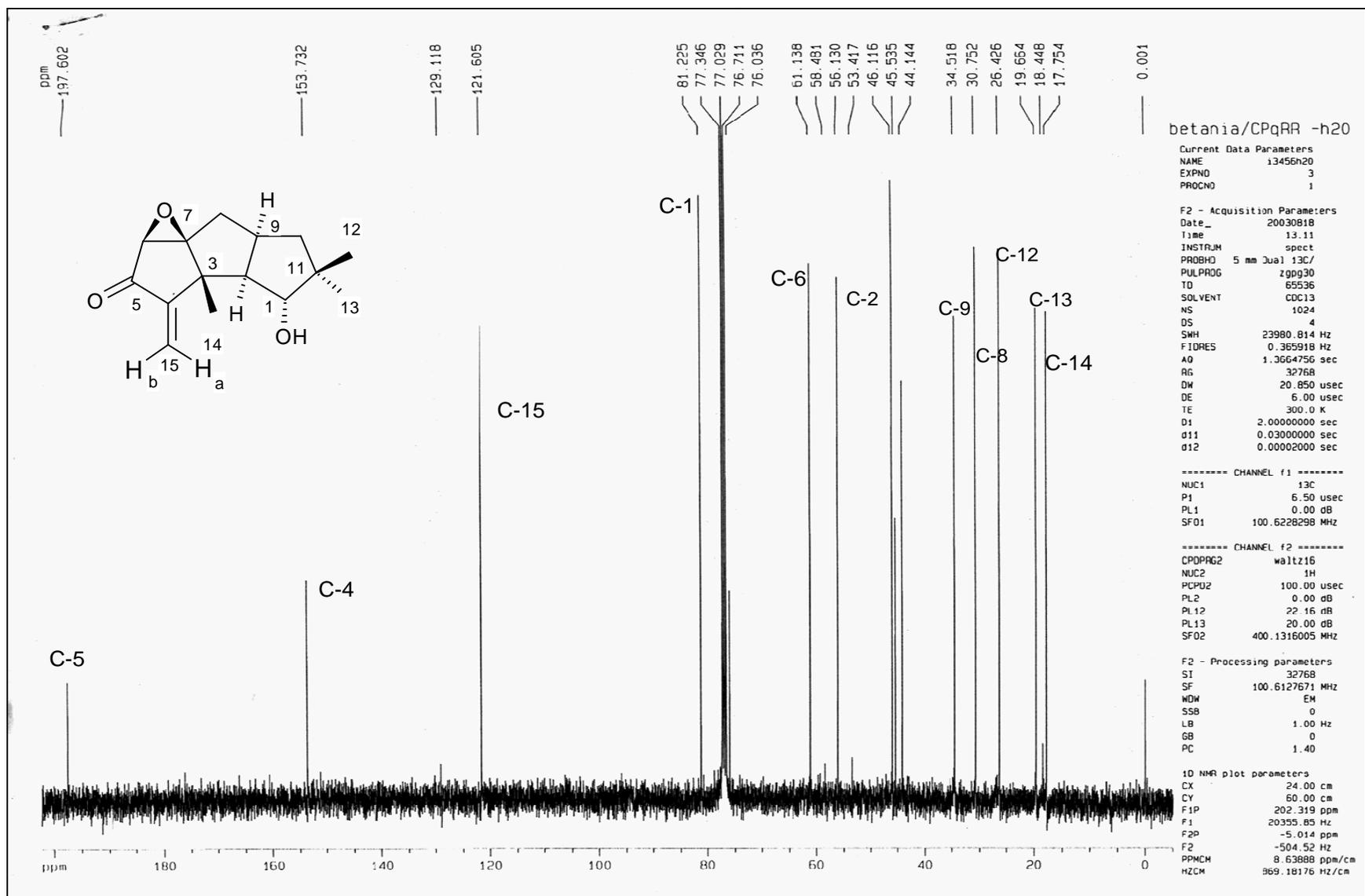
Espectro no IV da substância IV (KBr, cm^{-1}).



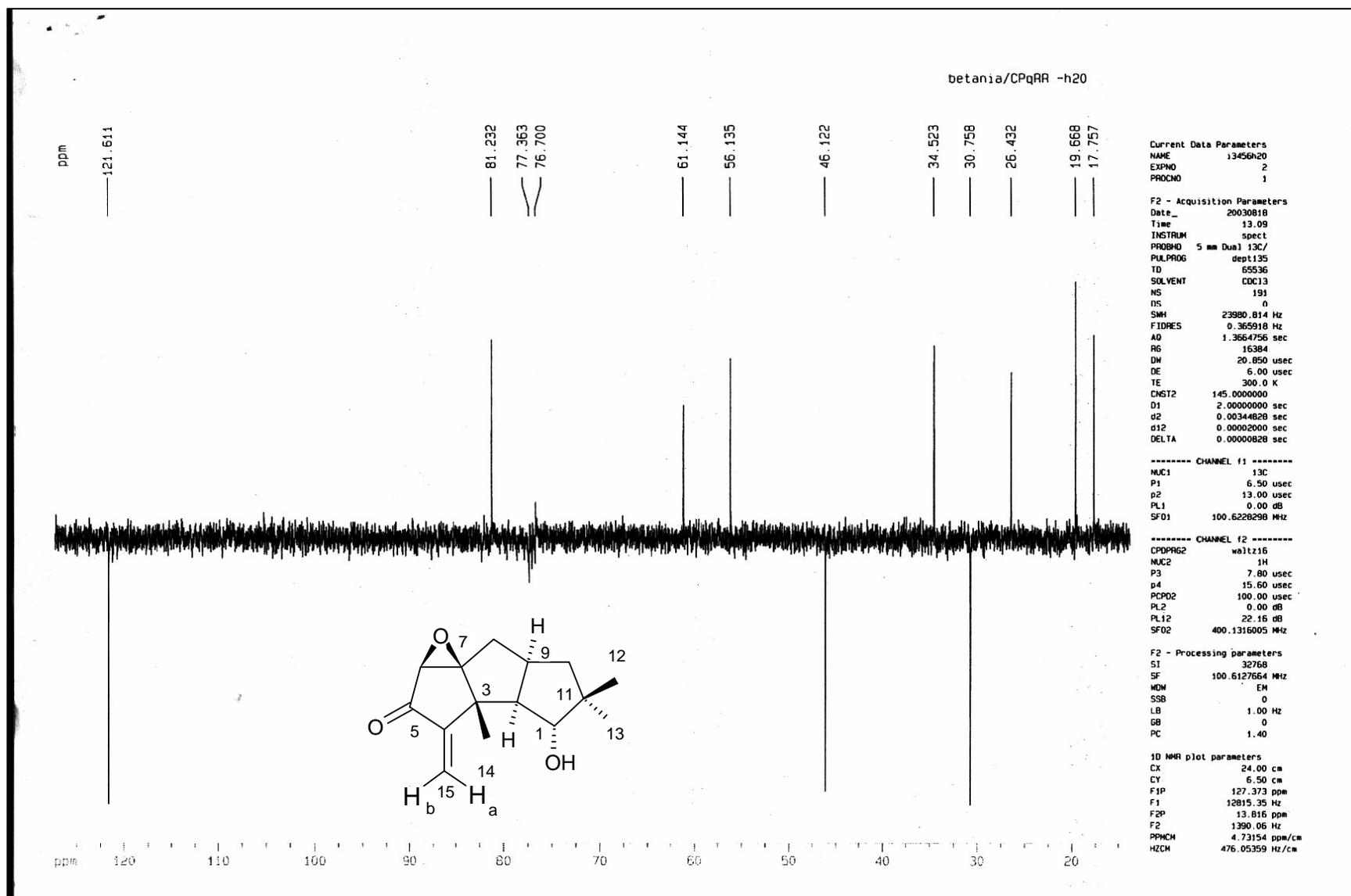
Espectro de massas, obtido por impacto de elétrons (EI 70 eV), da substância **IV**.

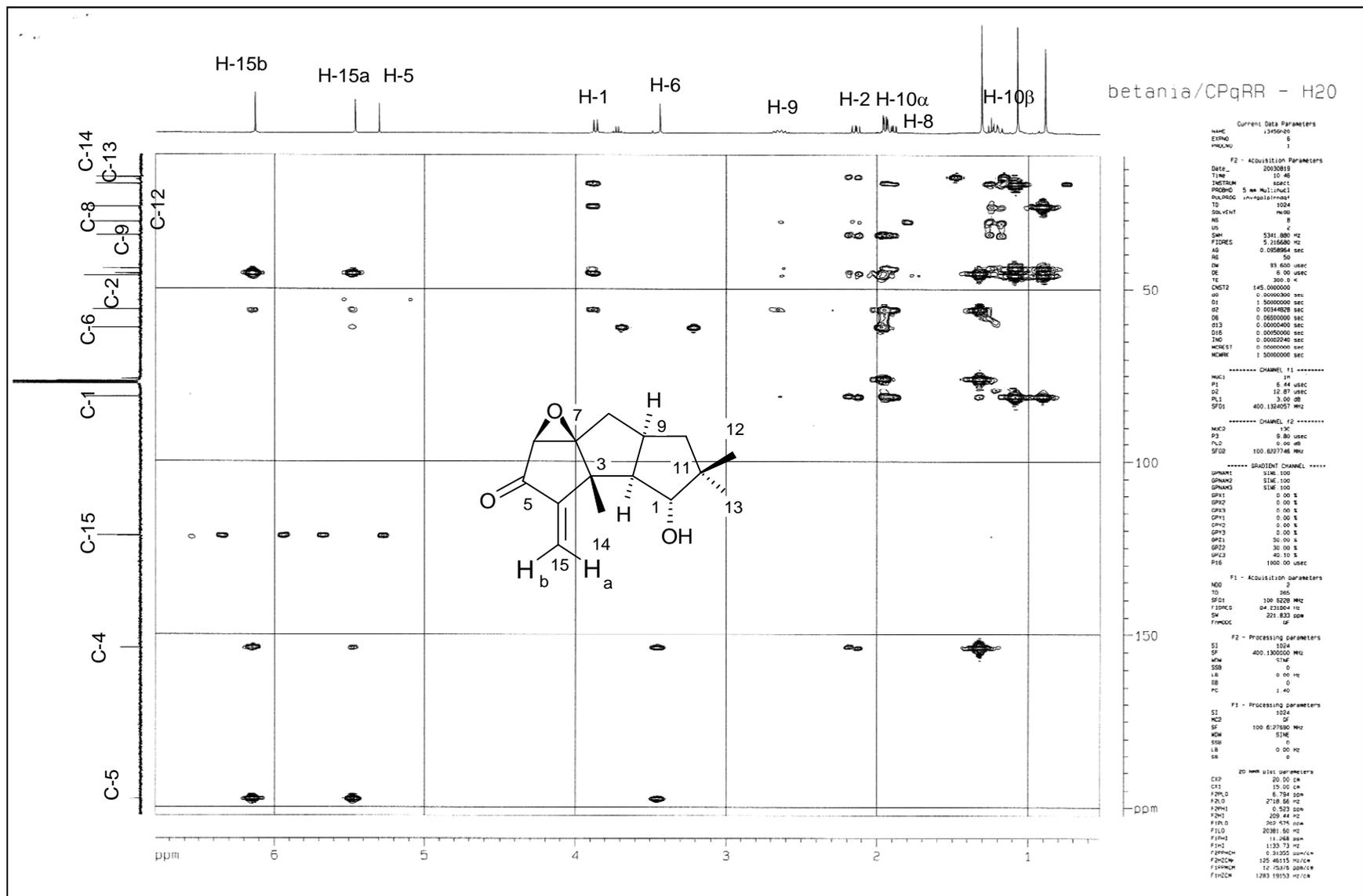


Espectro de RMN ^1H da substância IV (400 MHz, CDCl_3 , δ).

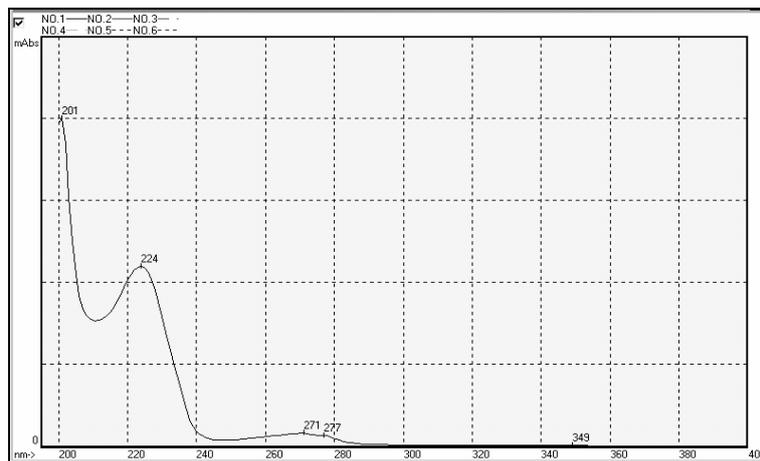


Espectro de RMN ¹³C da substância IV (100 MHz, CDCl₃, δ).

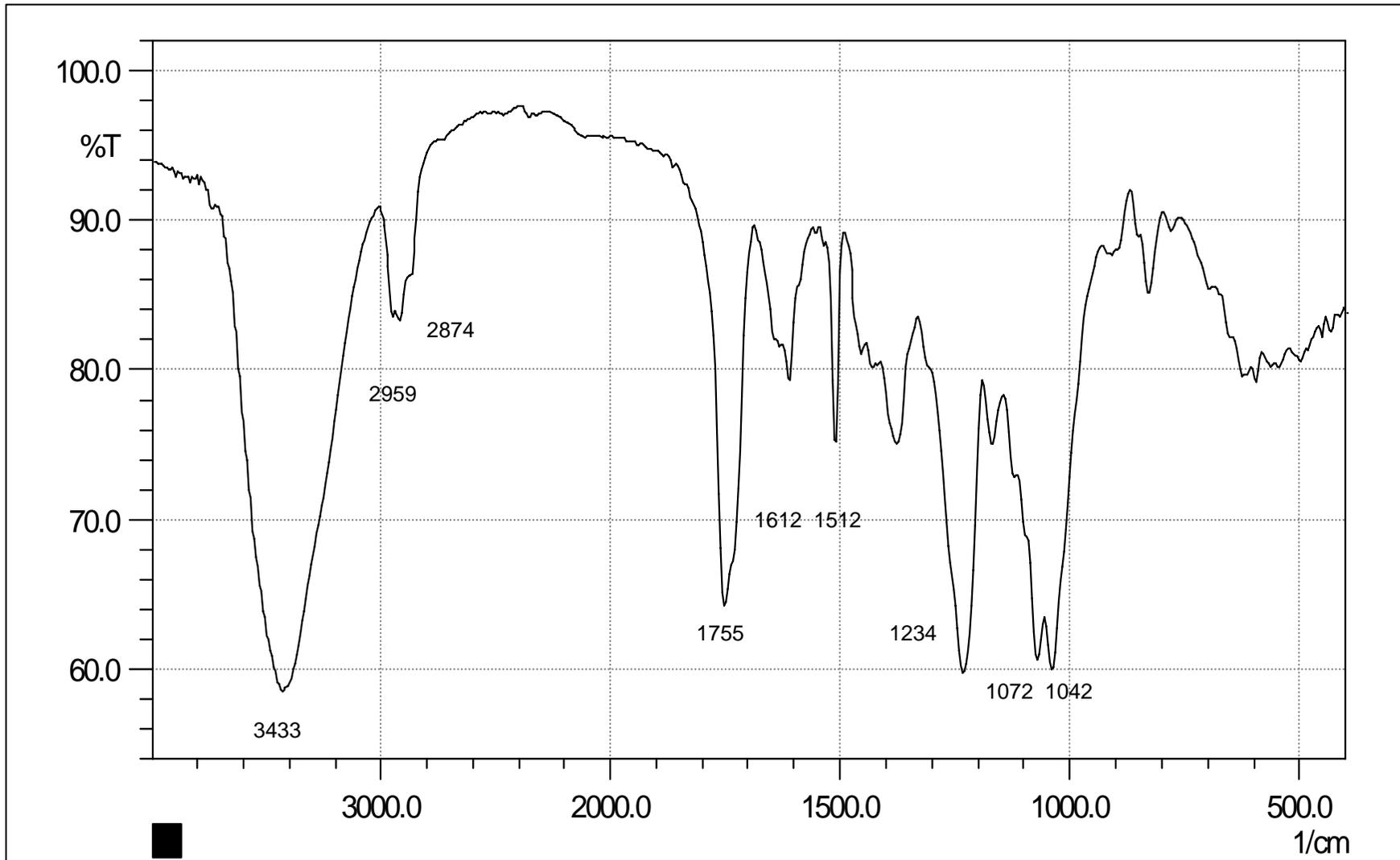




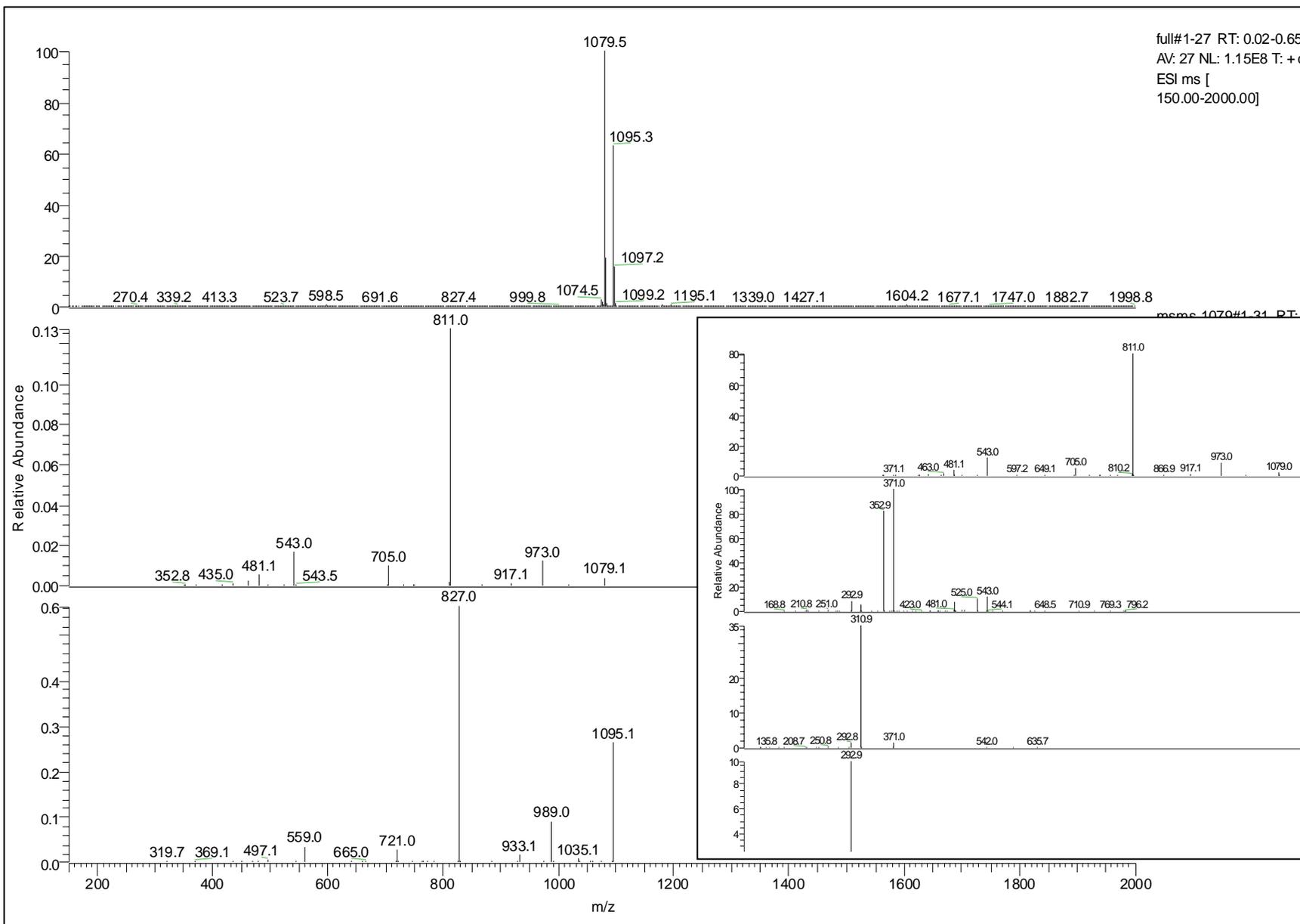
Mapa de contornos HMBC da substância IV.



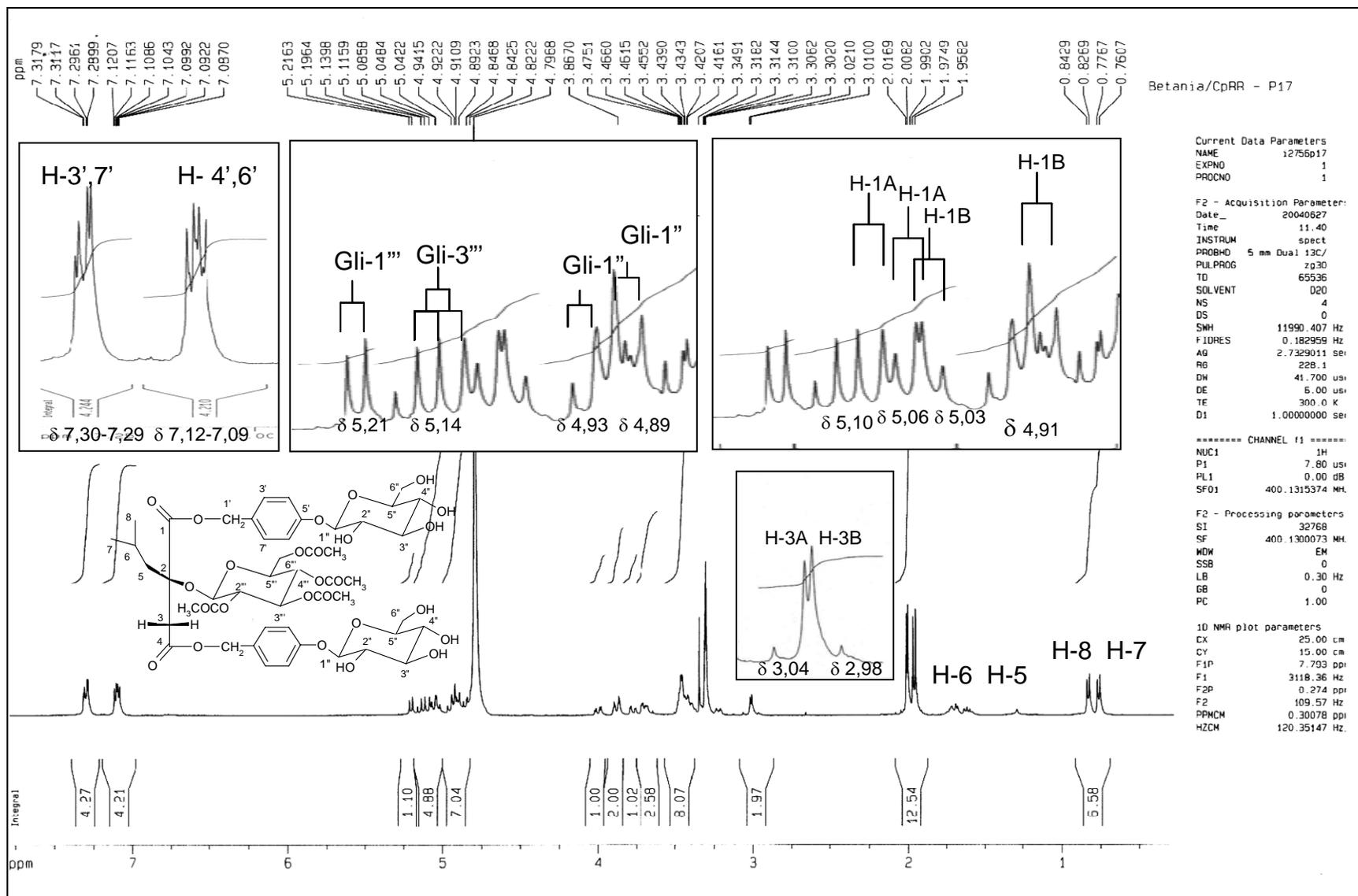
Espectro da substância **V** no UV (200-400 nm).

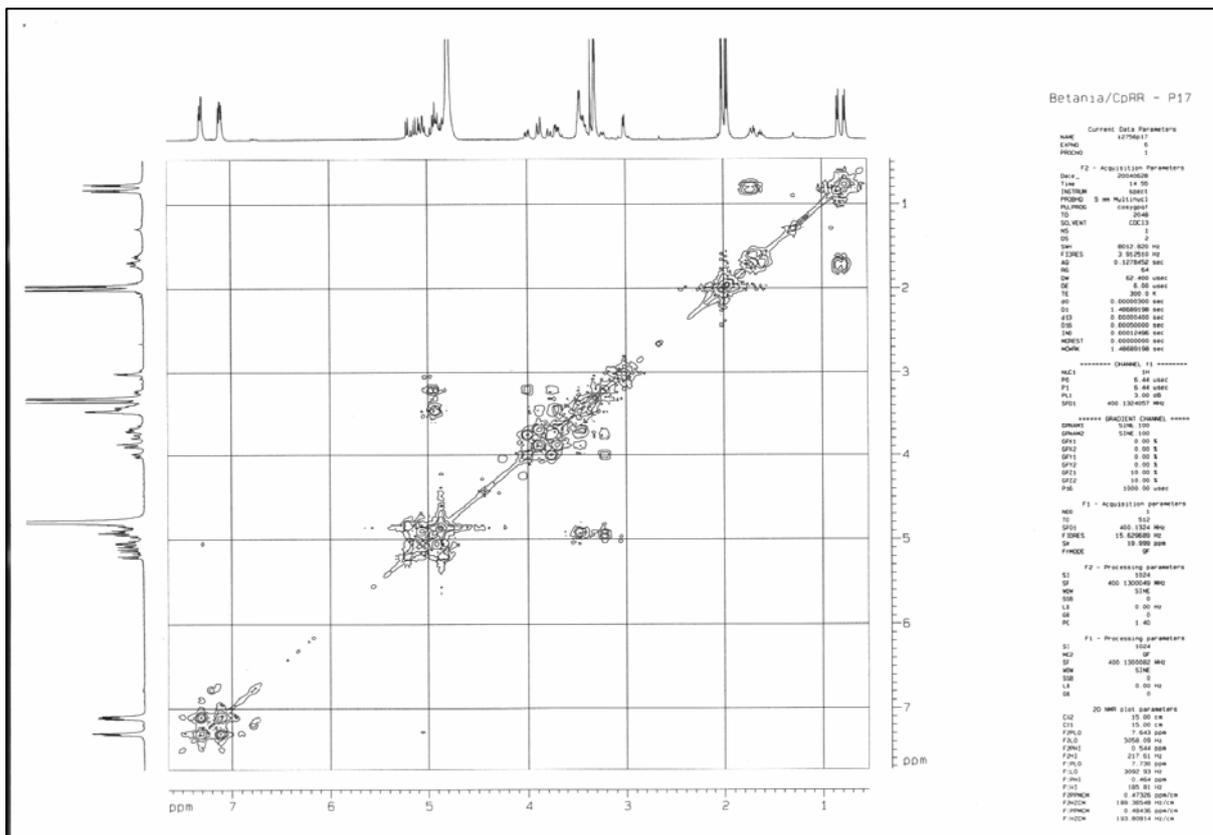


Espectro no IV da substância V (KBr, cm^{-1}).

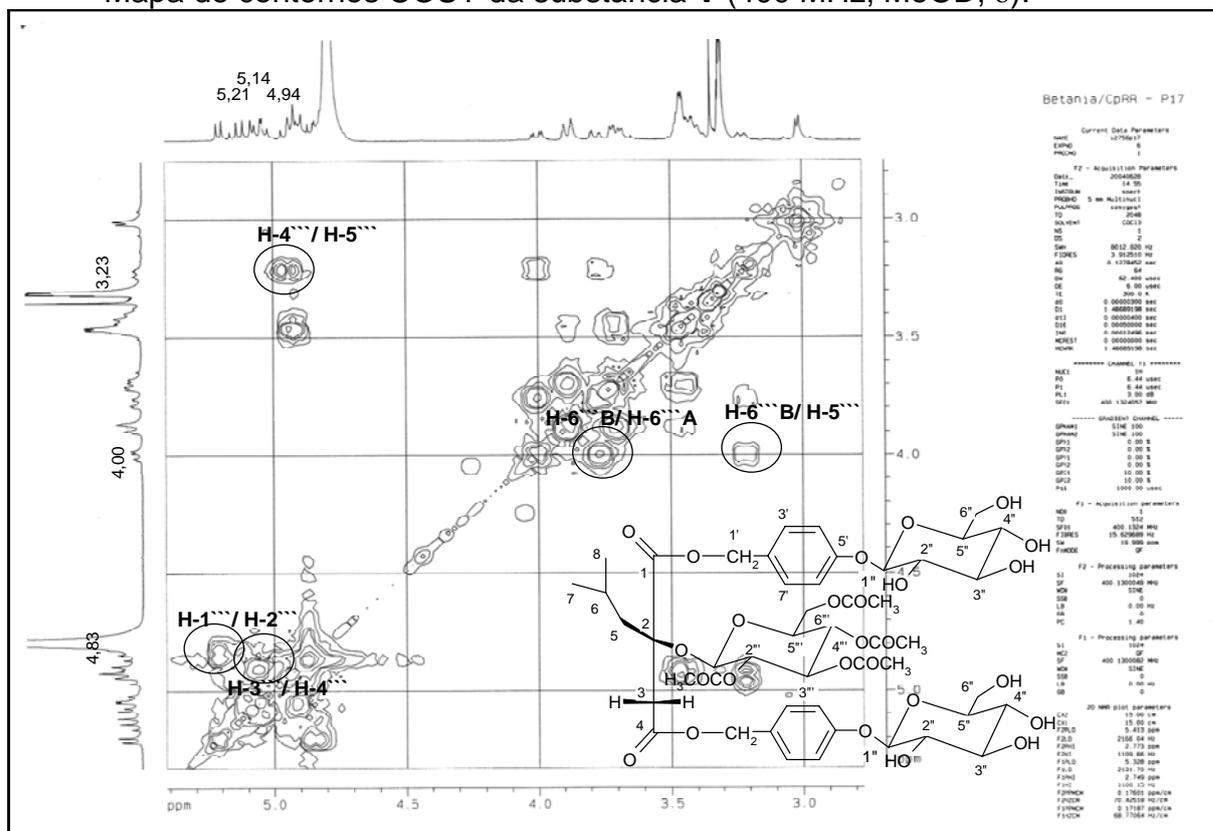


Espectro de massas por "electrospray" da substância V.

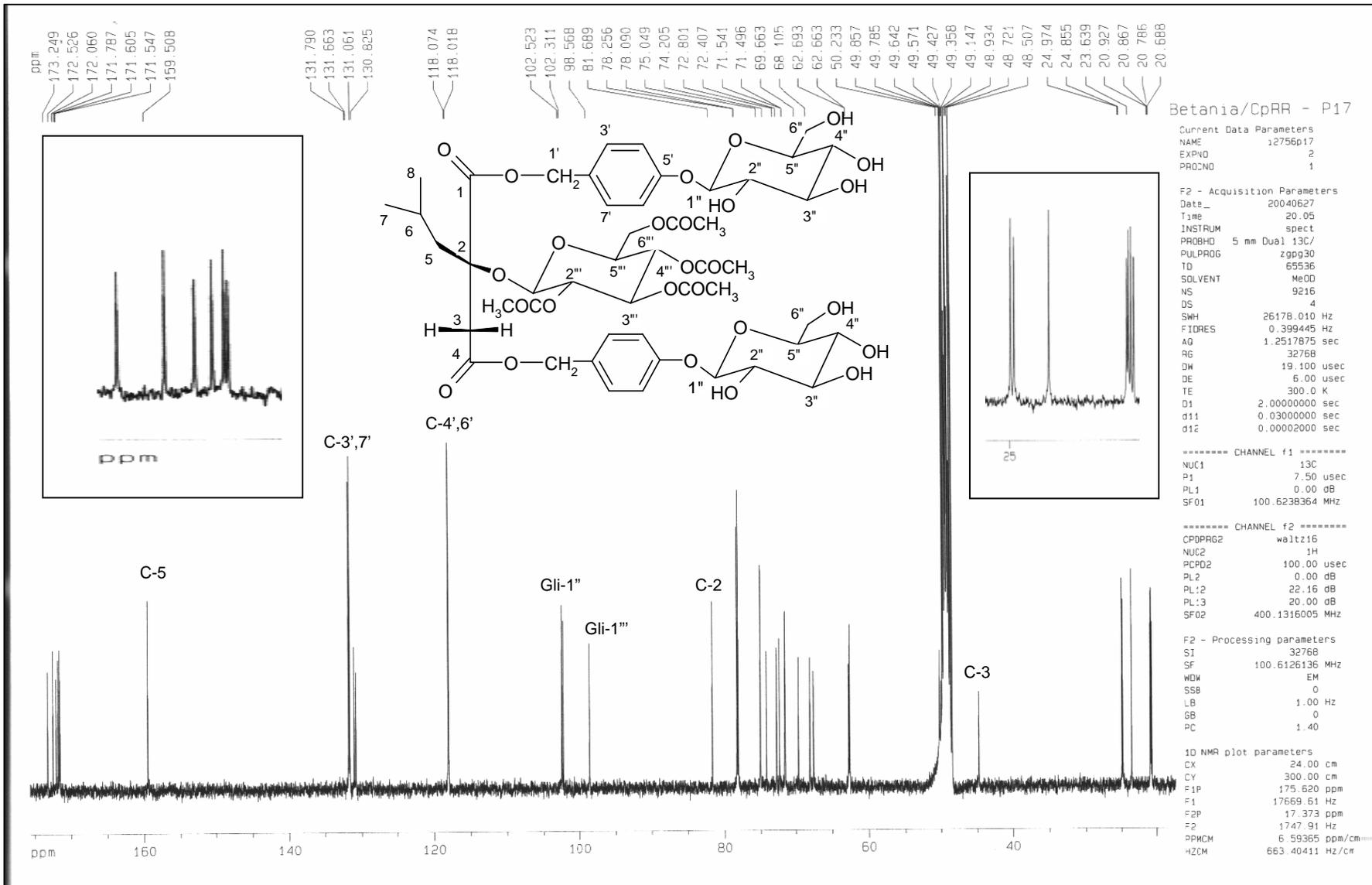




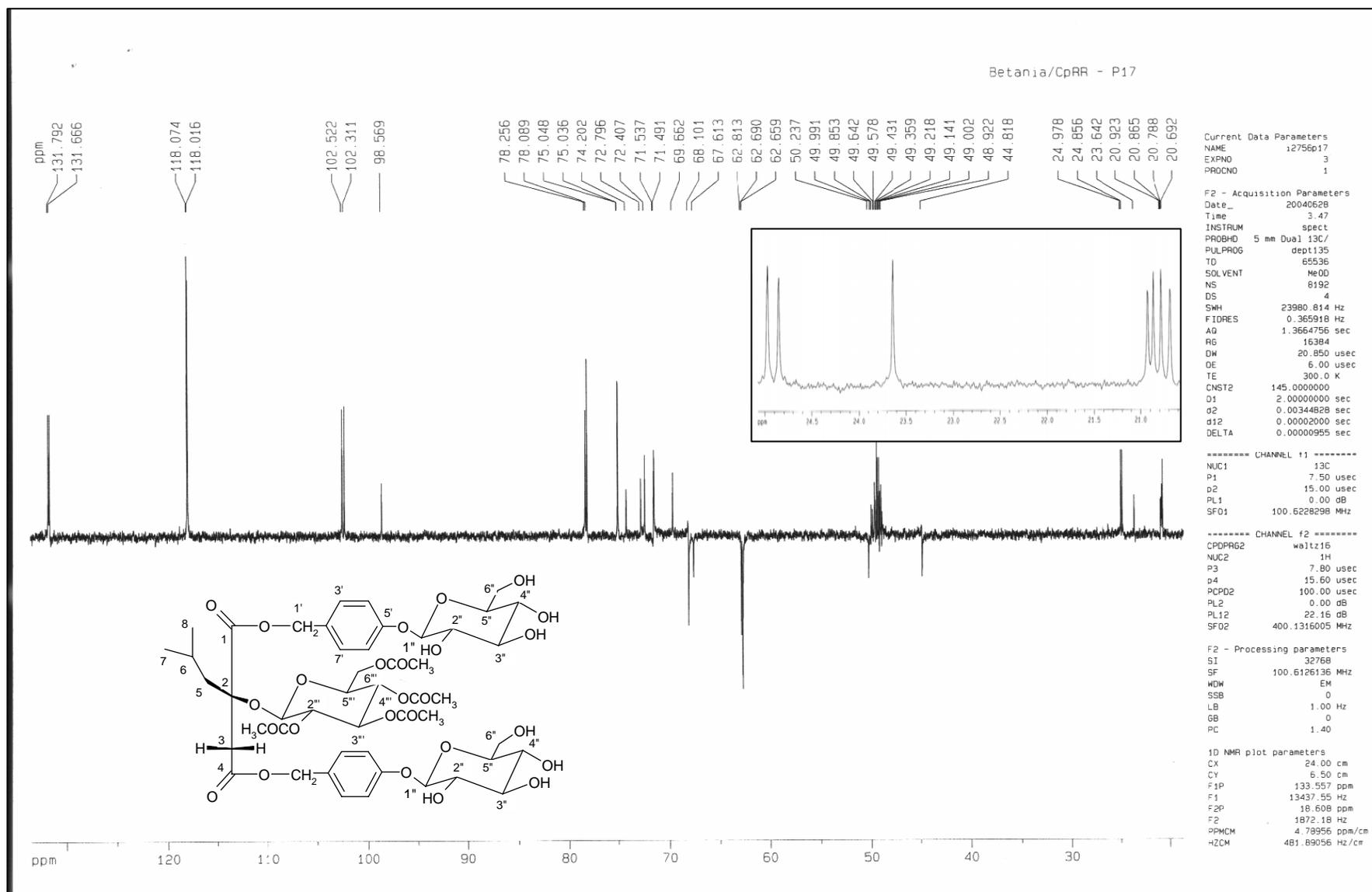
Mapa de contornos COSY da substância V (400 MHz, MeOD, δ).



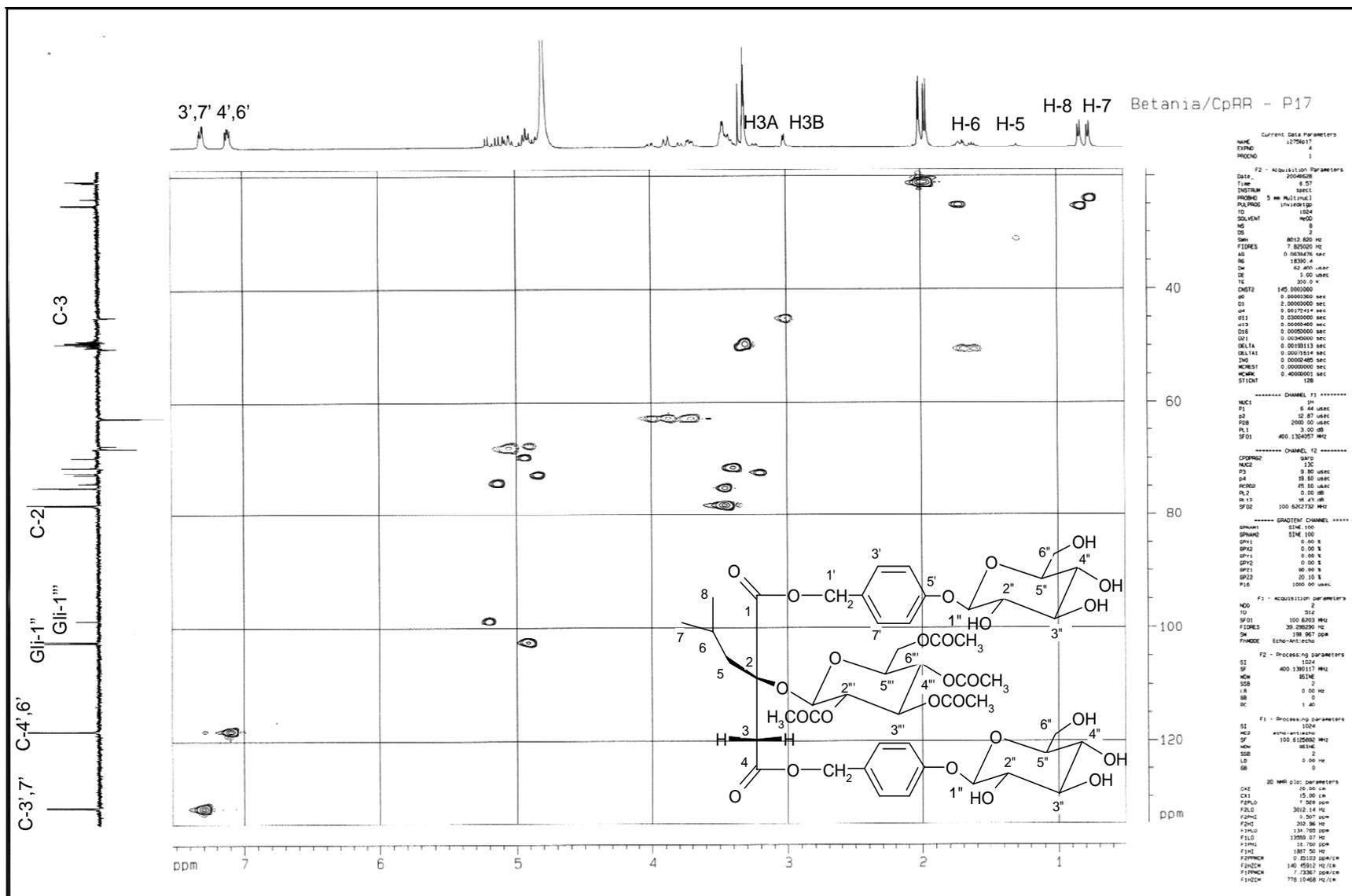
Mapa de contornos COSY da substância V (400 MHz, MeOD, δ).



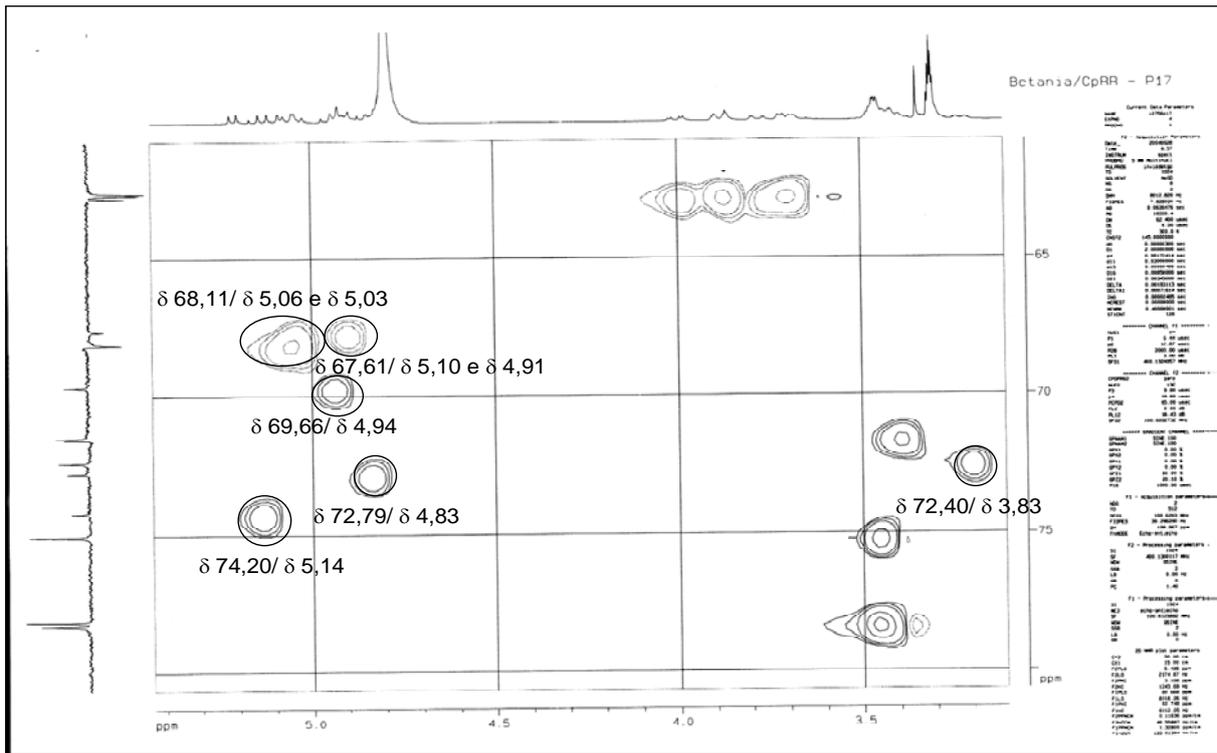
Espectro de RMN ¹³C da substância V (100 MHz, MeOD, δ).



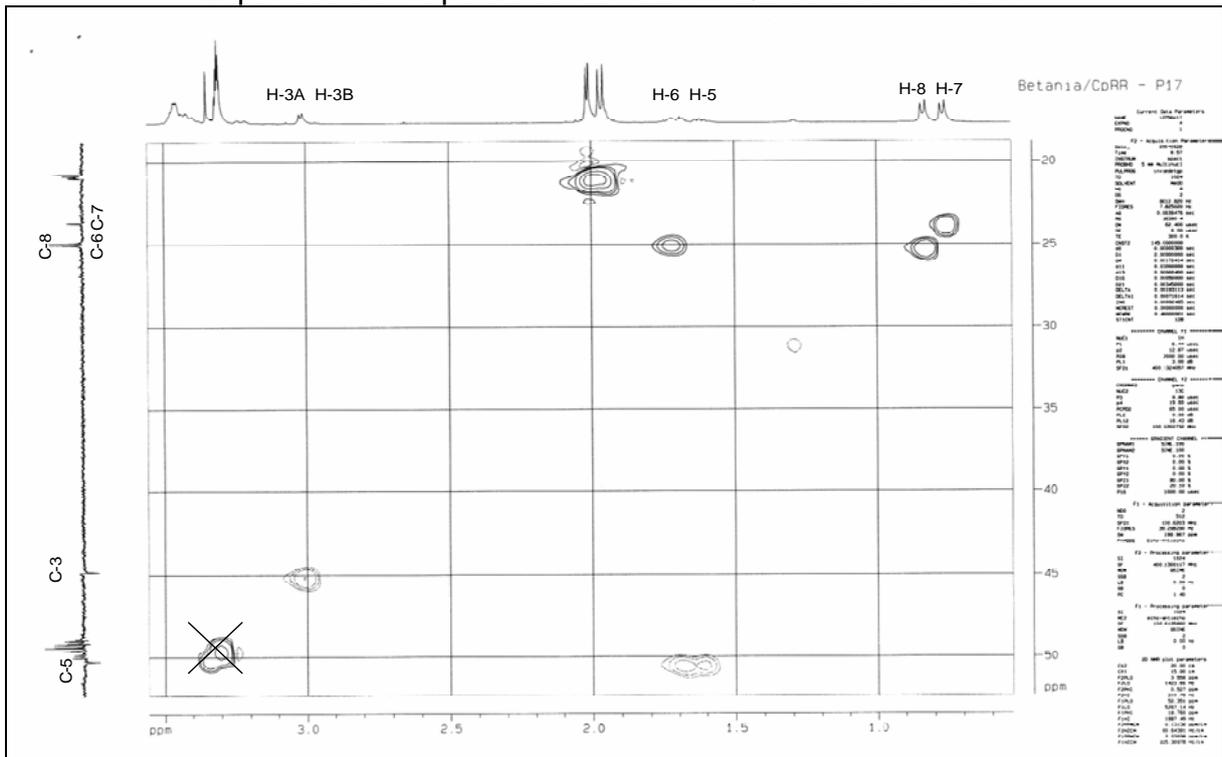
Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, MeOD, δ) da substância V.



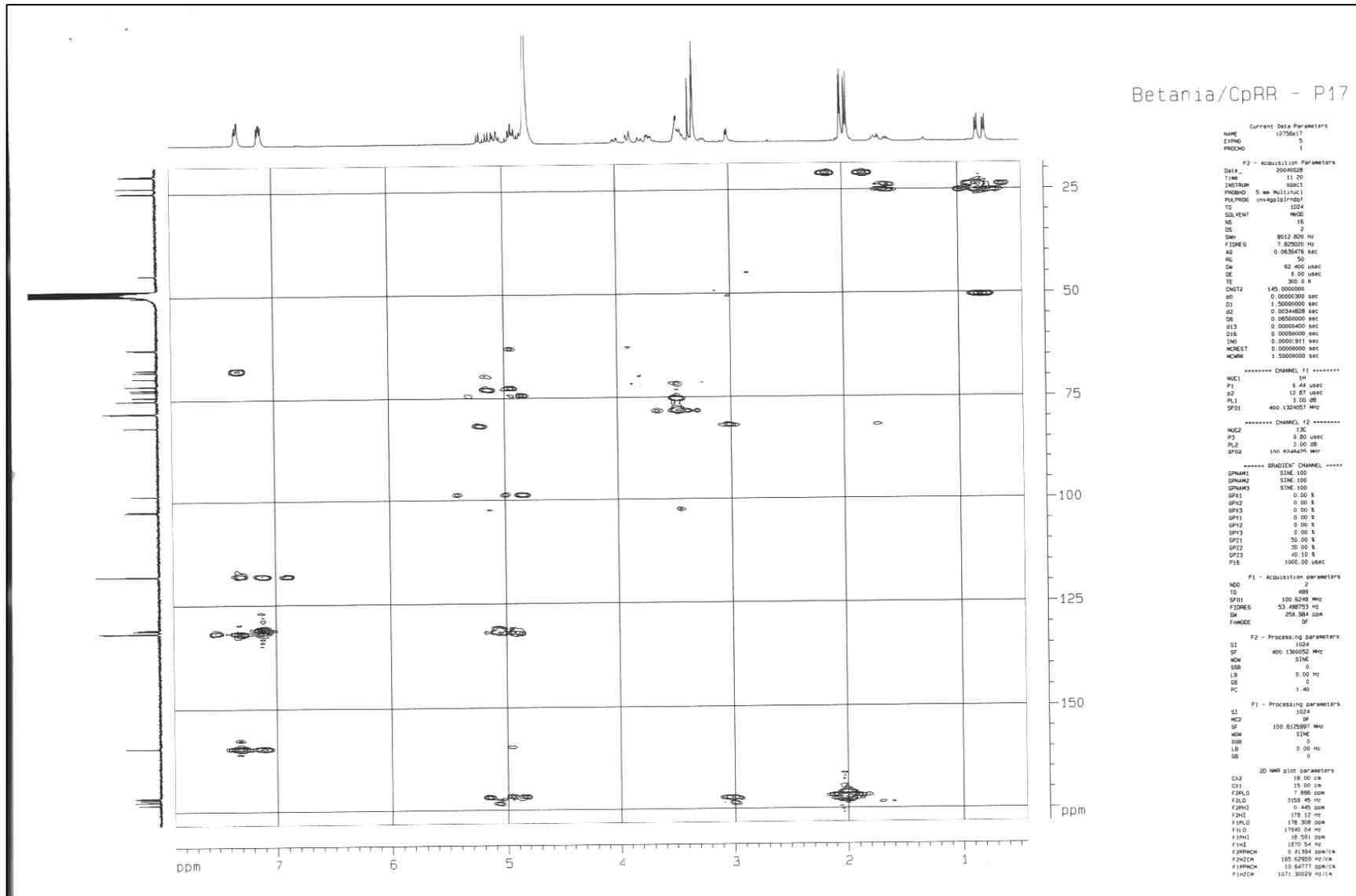
Mapa de contornos HMQC da substância V.



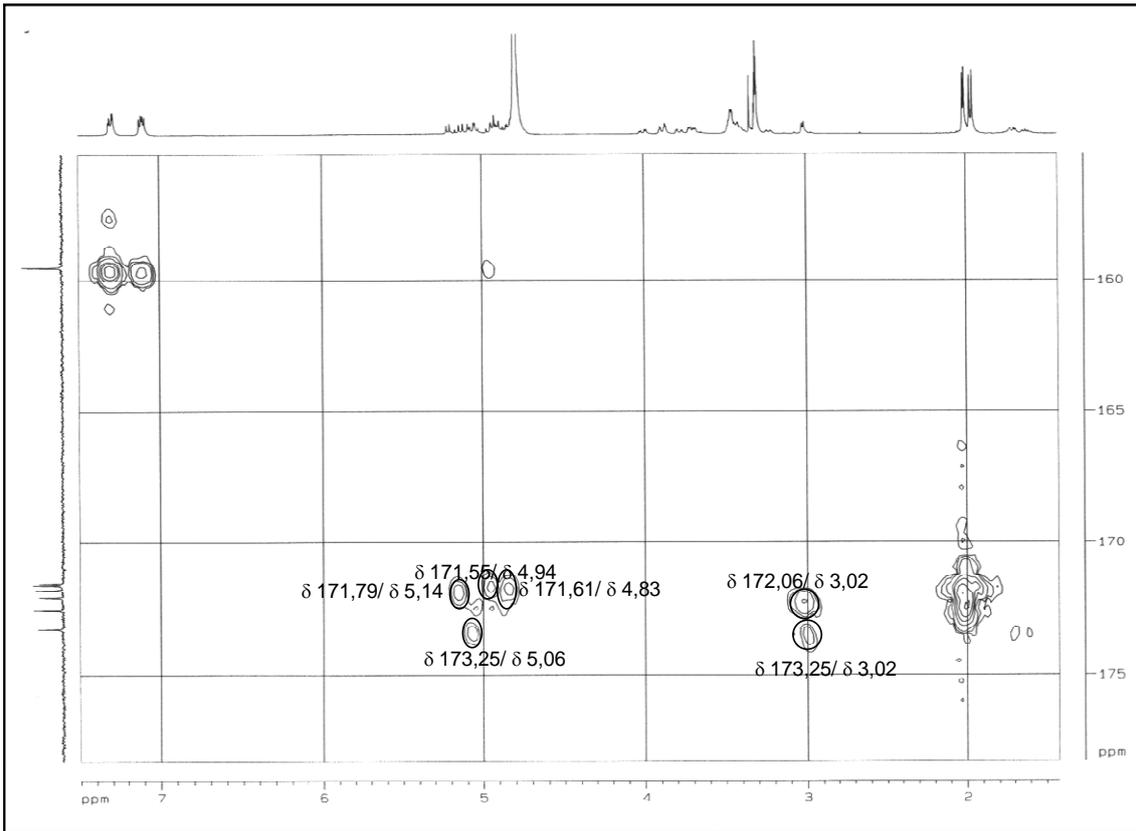
Expansão do mapa de contornos HMQC da substância V.



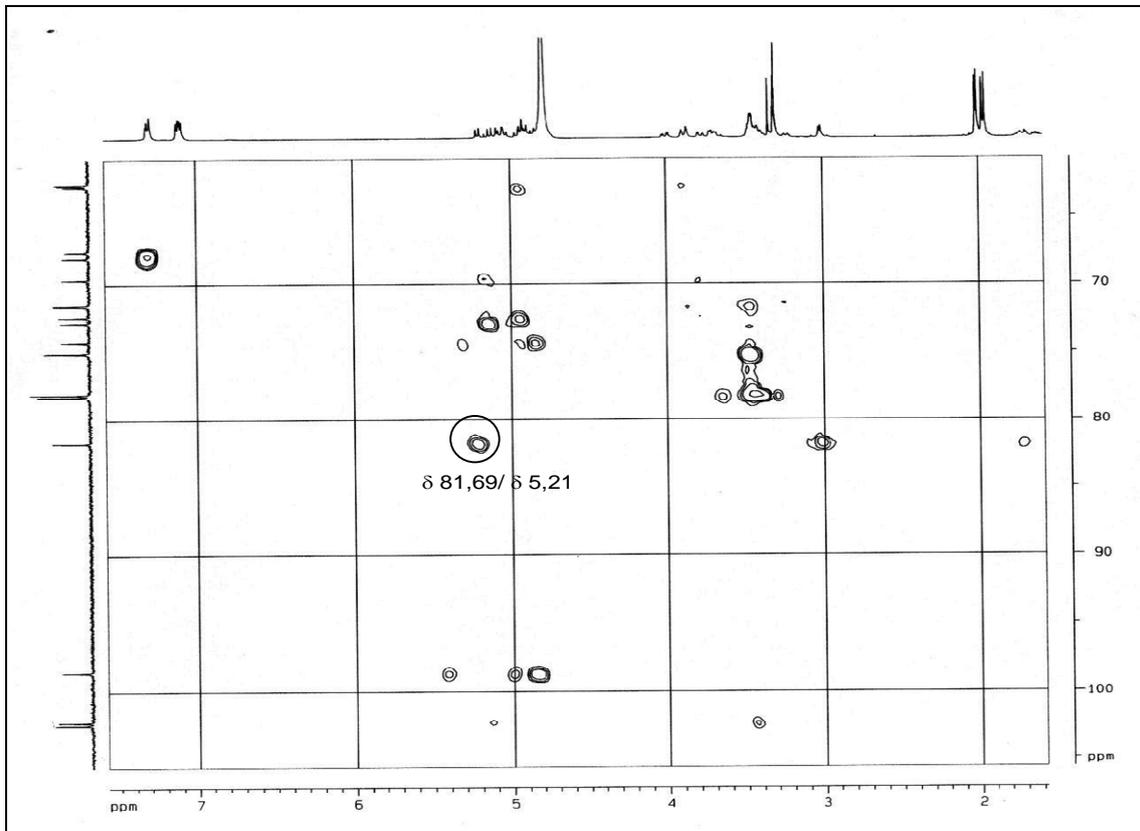
Expansão do mapa de contornos HMQC da substância V.



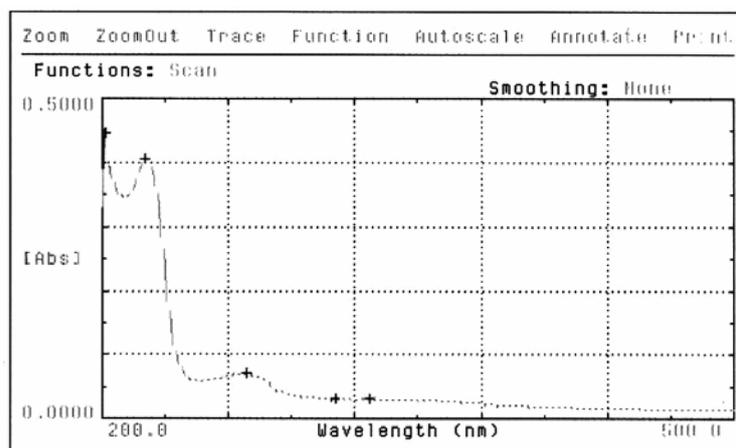
Mapa de contornos HMBC da substância V.



Expansão do mapa de contornos HMBC da substância V.

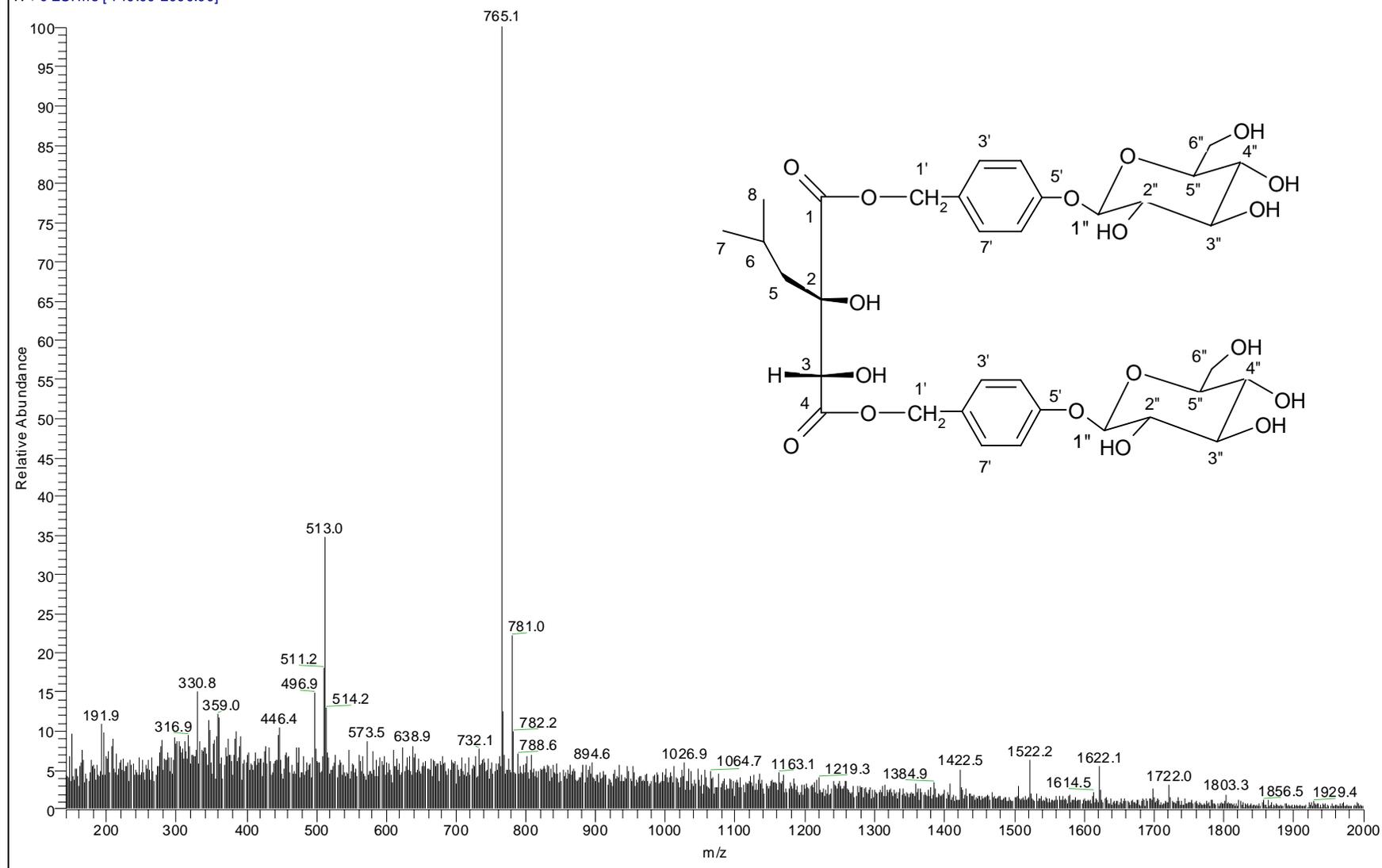


Expansão do mapa de contornos HMBC da substância V.

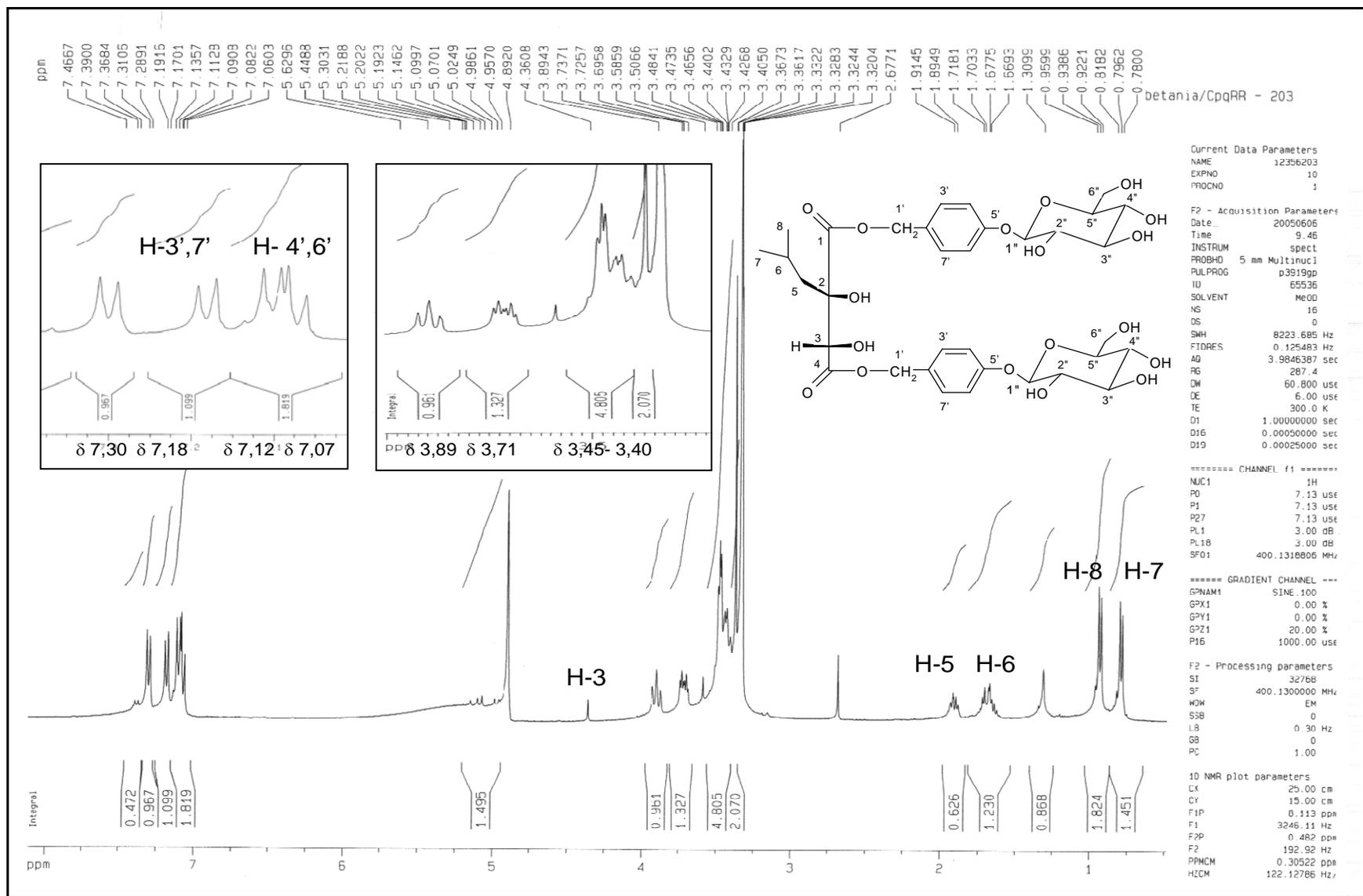


Espectro da substância **VI** no UV (2%p/v em MeOH, 200-500 nm).

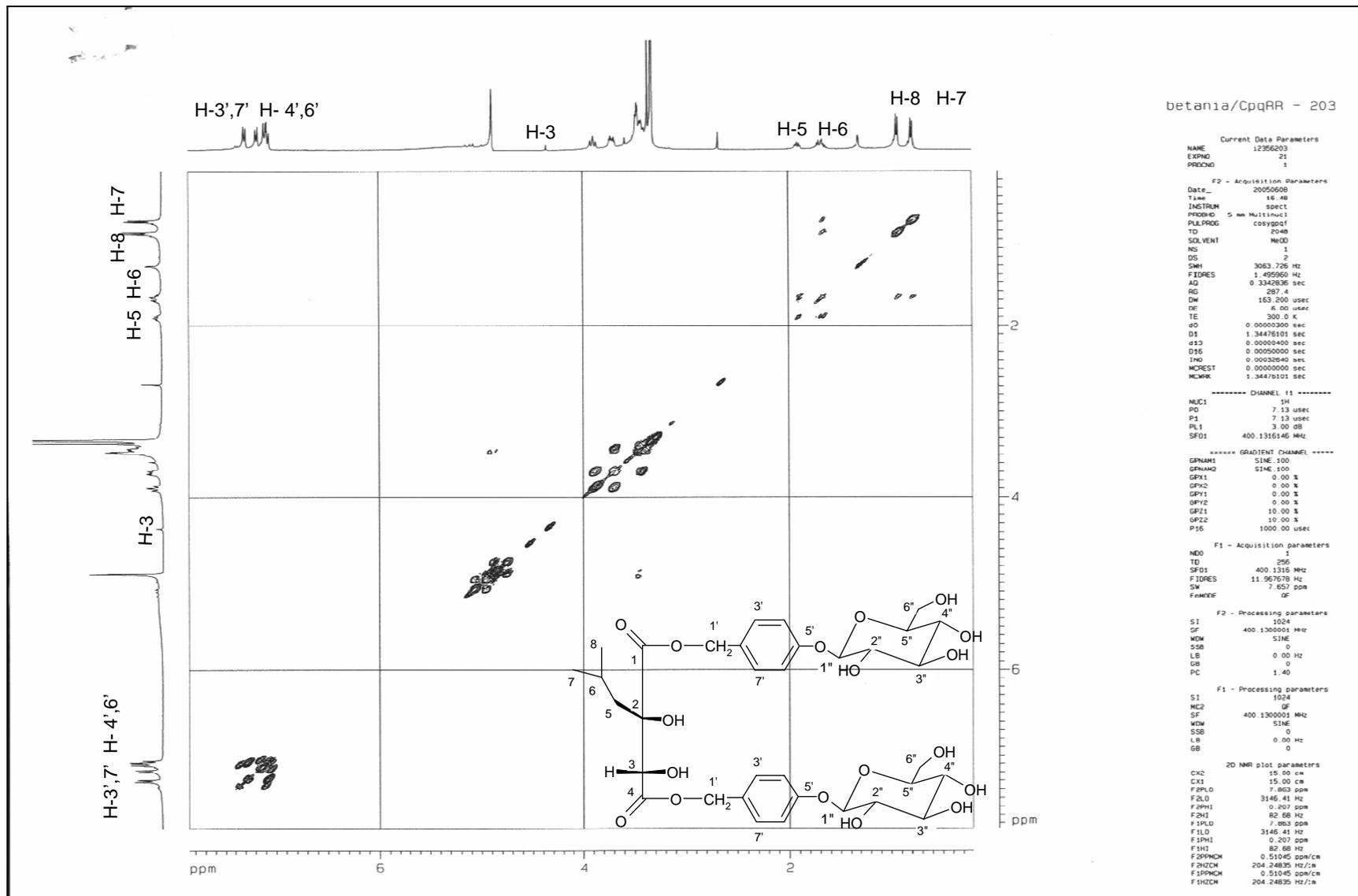
P104(2) conc_050704144747 #1-50 RT: 0.00-1.34 AV: 50 NL: 2.11E5
T: + c ESI ms [140.00-2000.00]

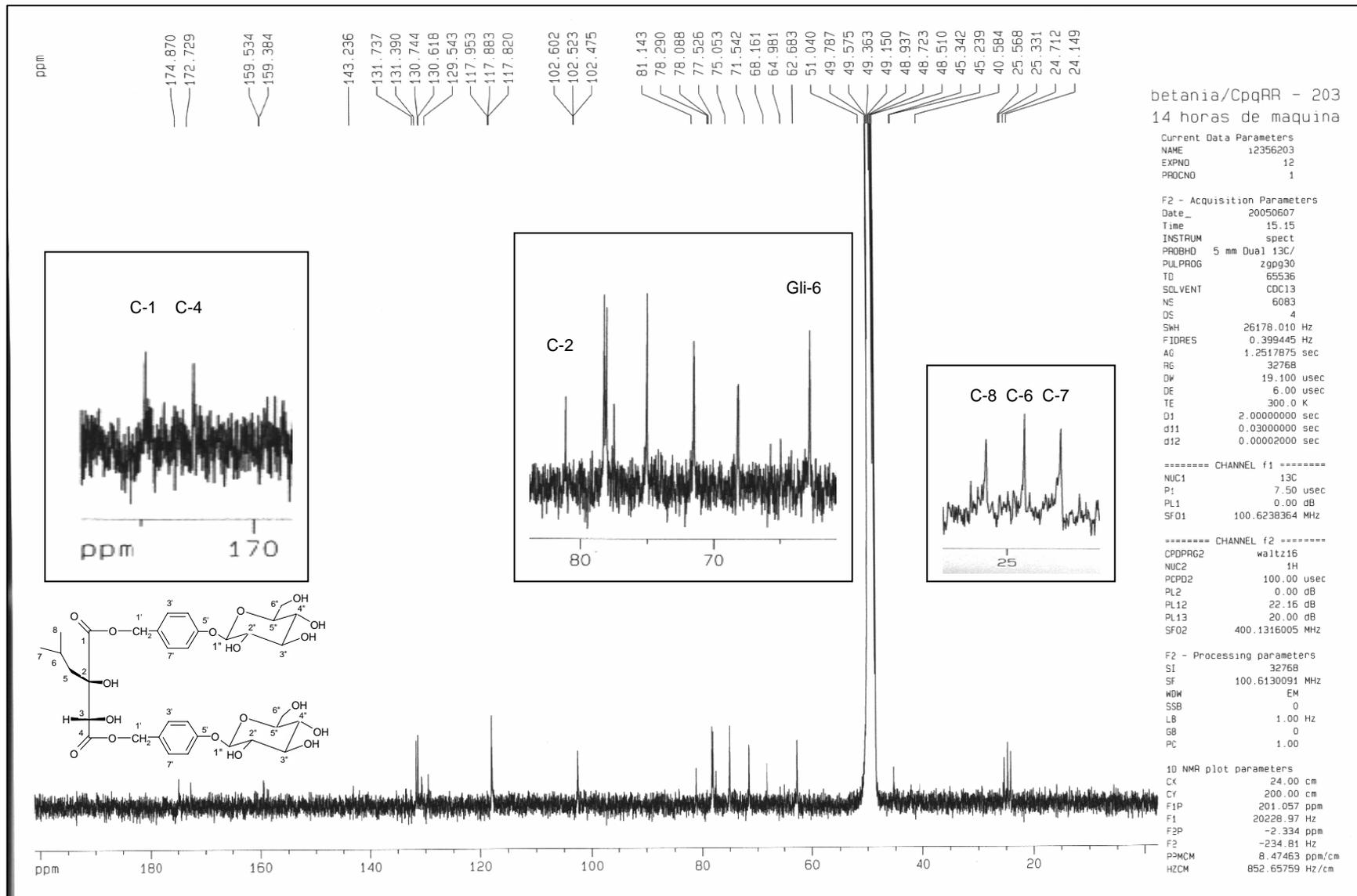


Espectro de massas, com ionização por "electrospray" no modo positivo, da substância VI.

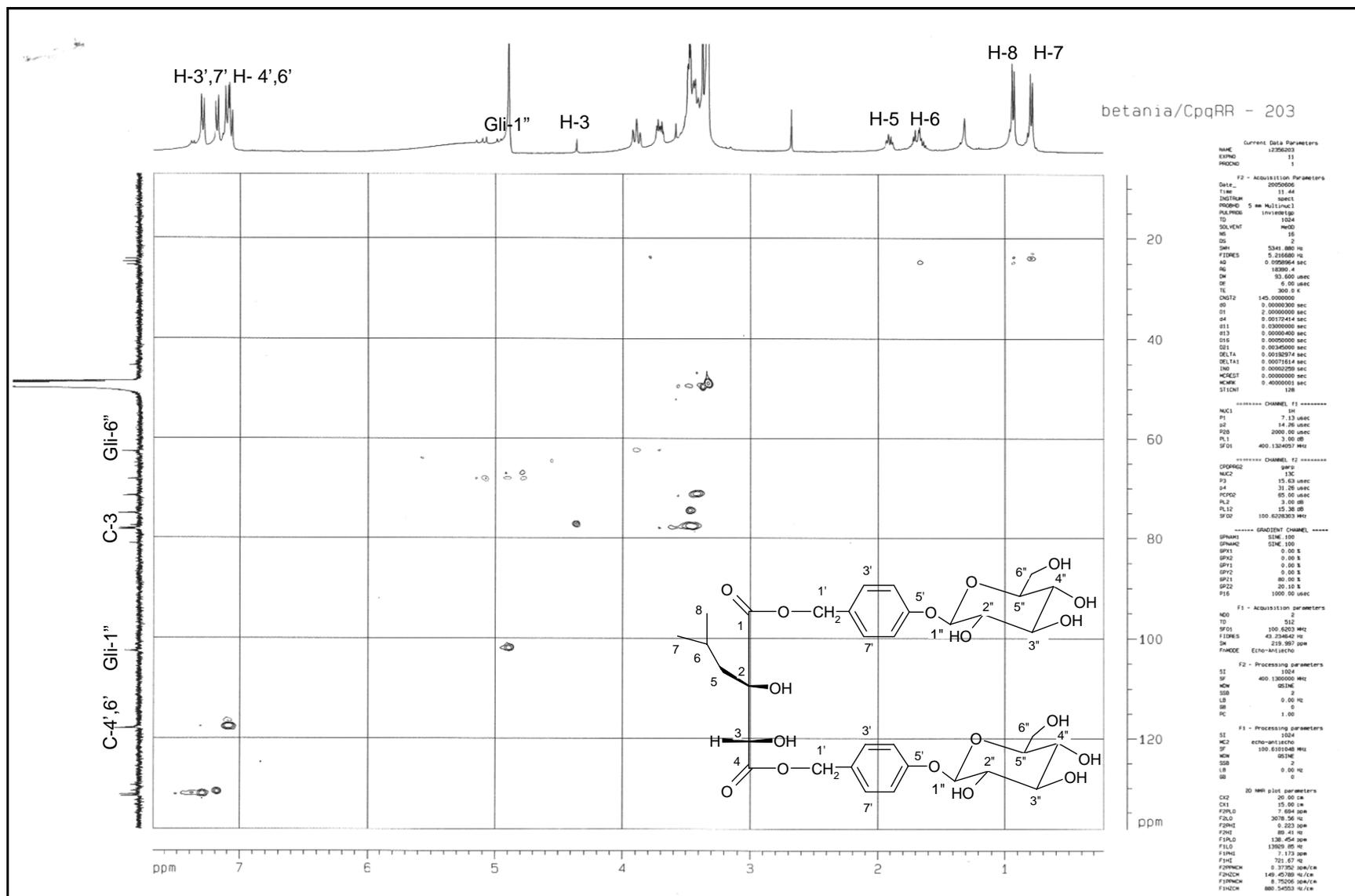


Espectro de RMN ¹H da substância VI (400 MHz, MeOD, δ).

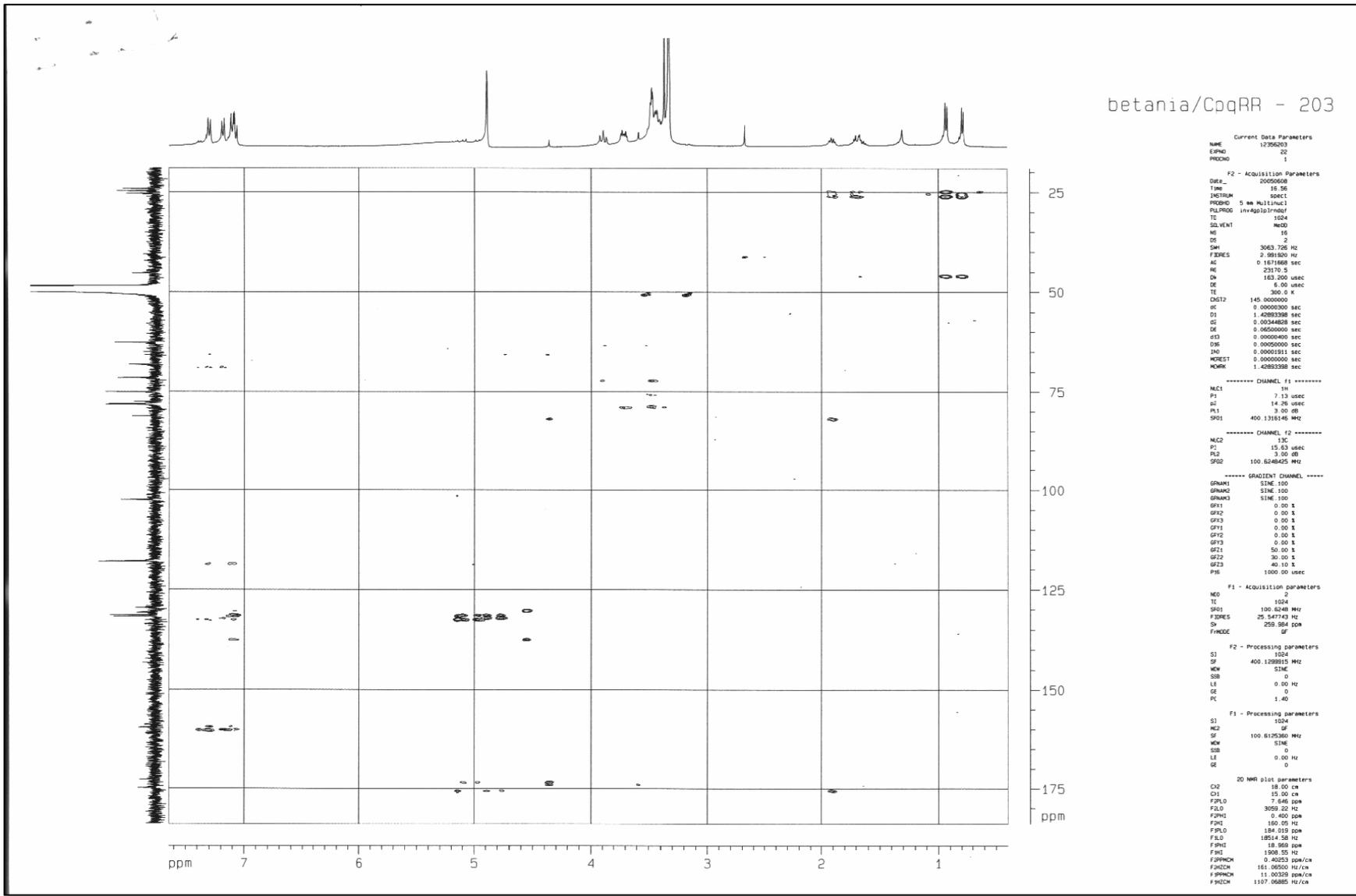




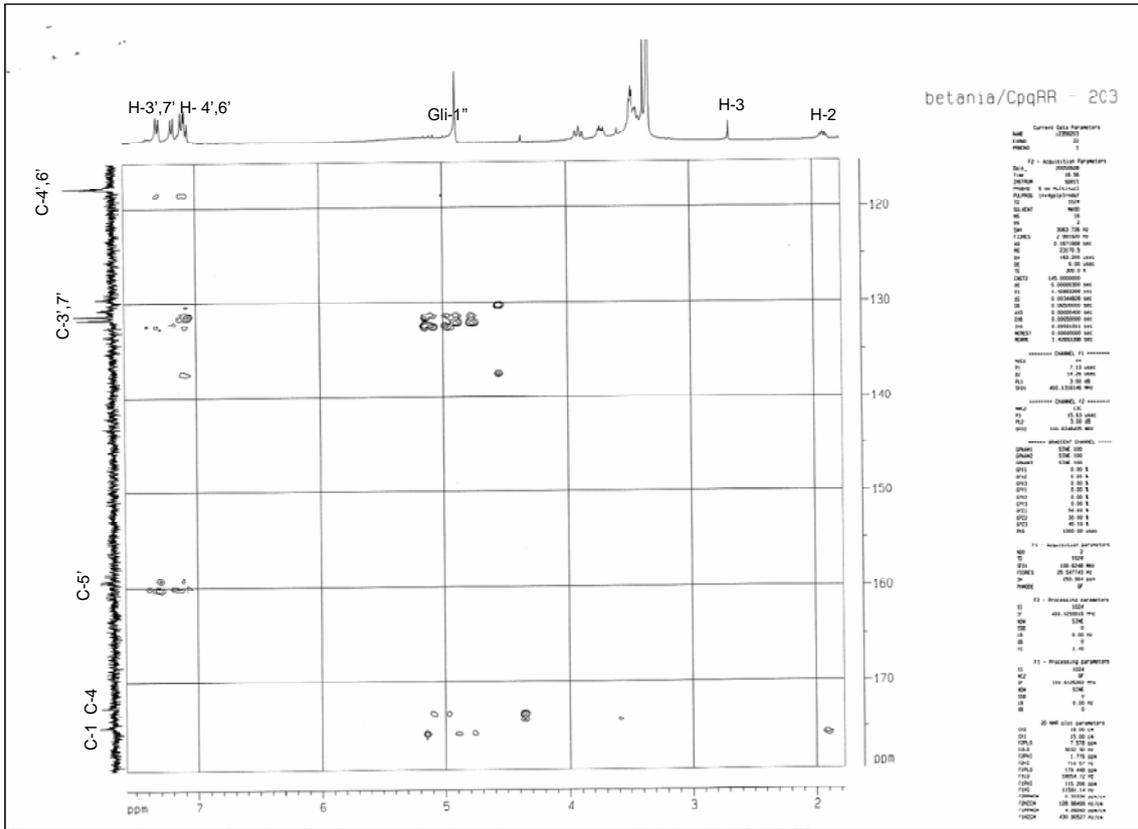
Espectro de RMN ^{13}C da substância VI (100 MHz, MeOD, δ).



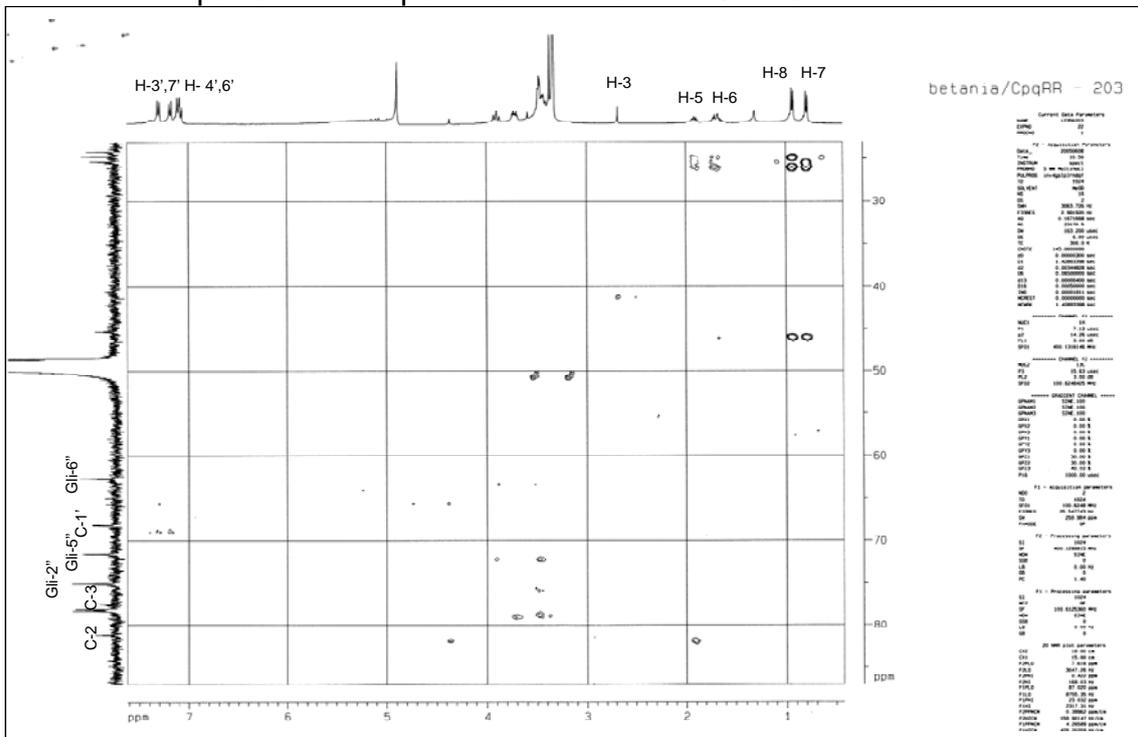
Mapa de contornos HMQC da substância VI.



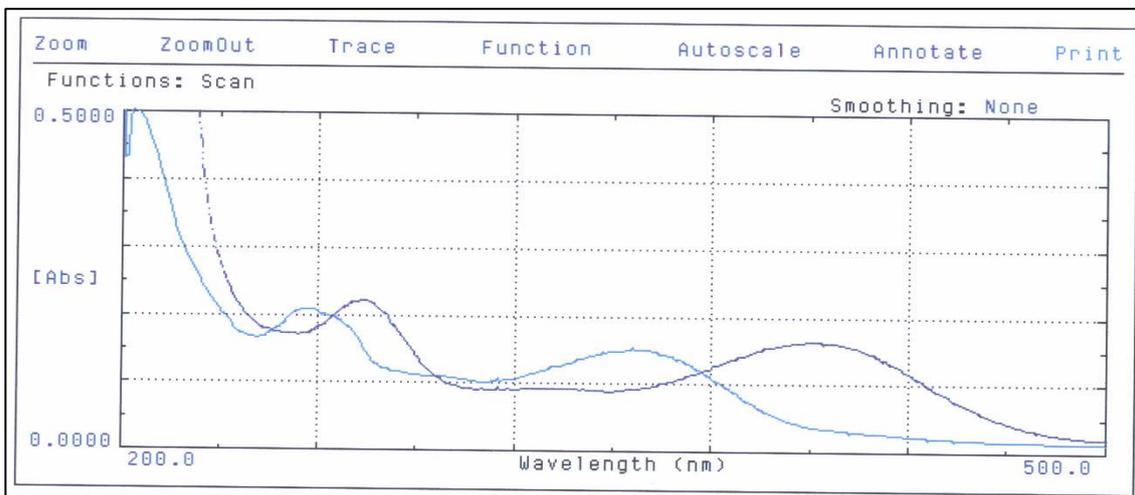
Mapa de contornos HMBC da substância VI.



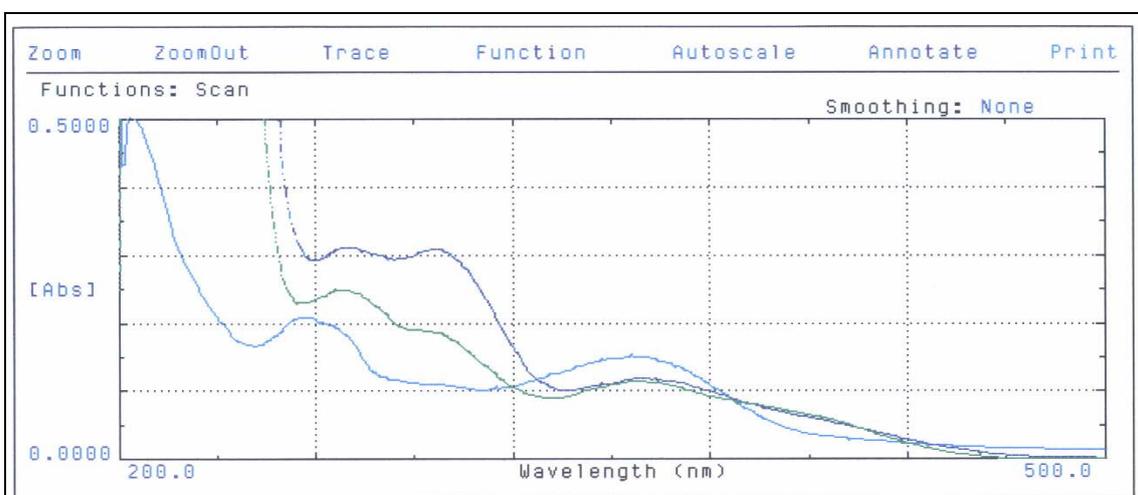
Expansão do mapa de contornos HMBC da substância VI.



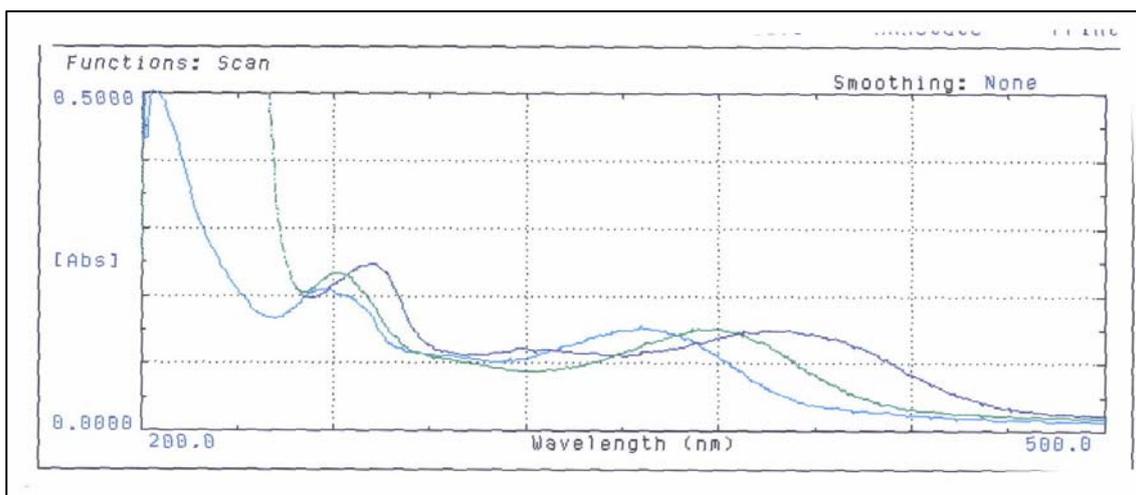
Expansão do mapa de contornos HMBC da substância VI.



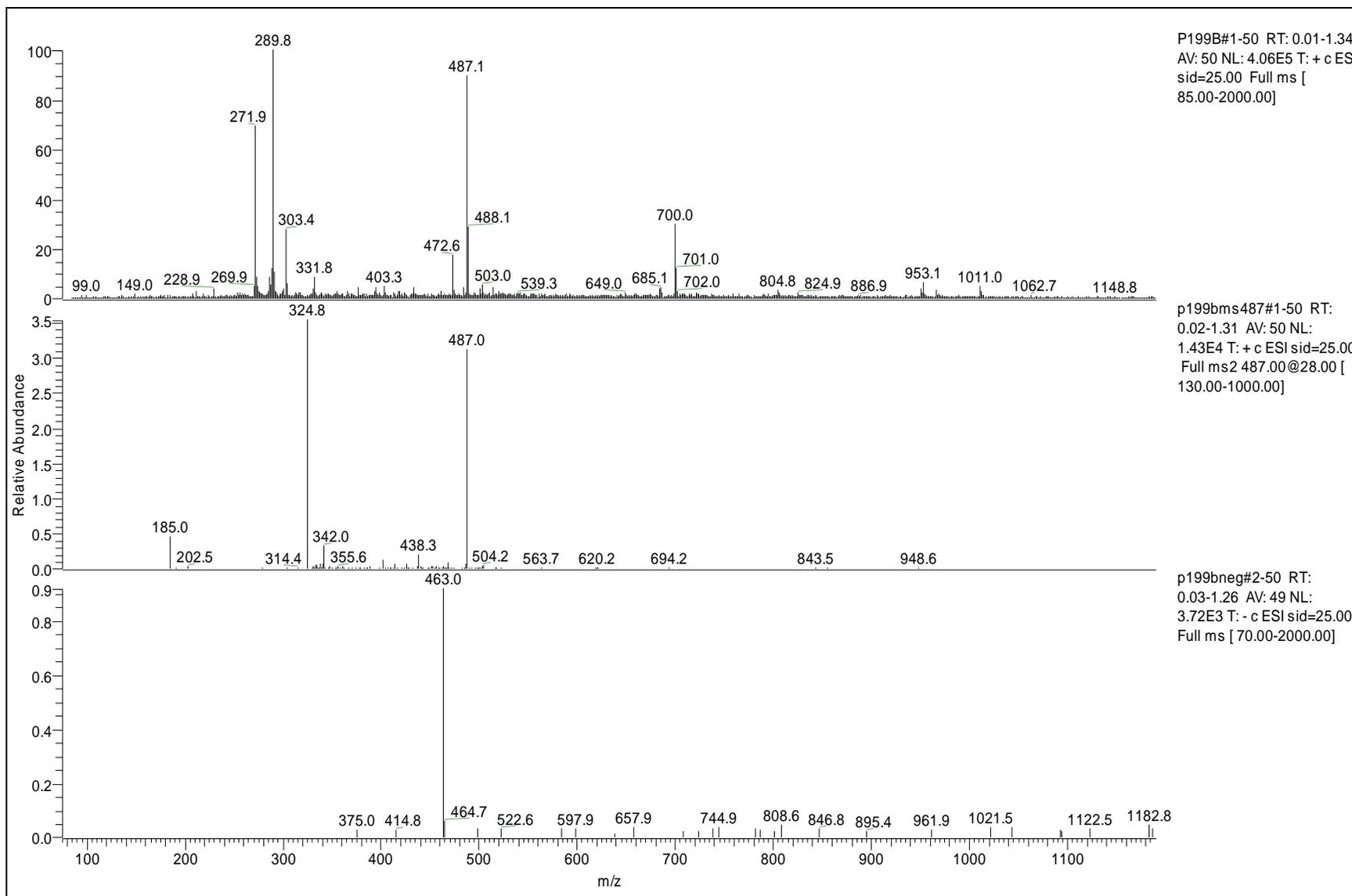
Espectro da substância **VII** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: NaOH (2,5% p/v).



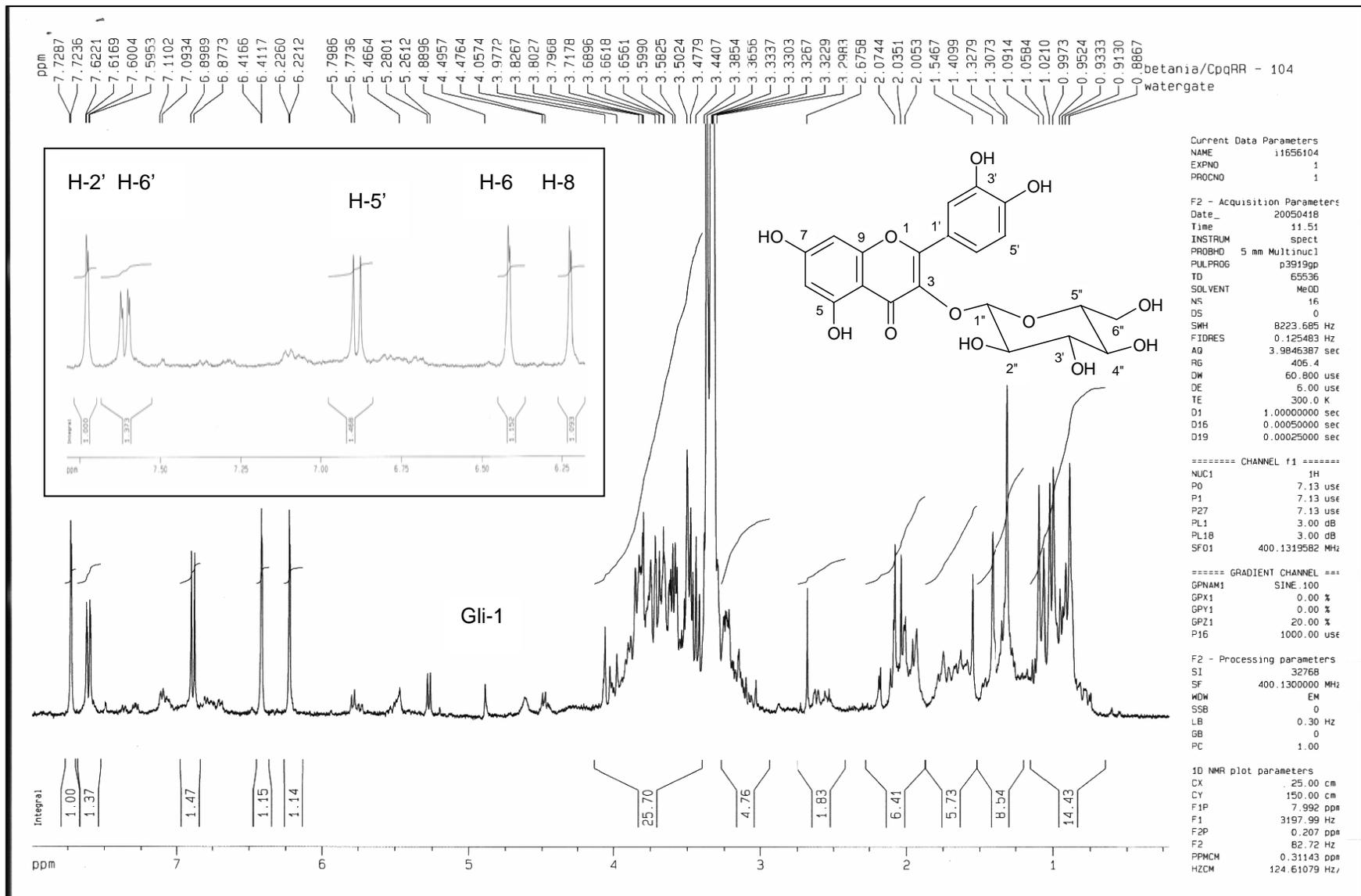
Espectro da substância **VII** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: AlCl₃ (5% p/v). Curva verde: AlCl₃ + HCl (50% p/v).



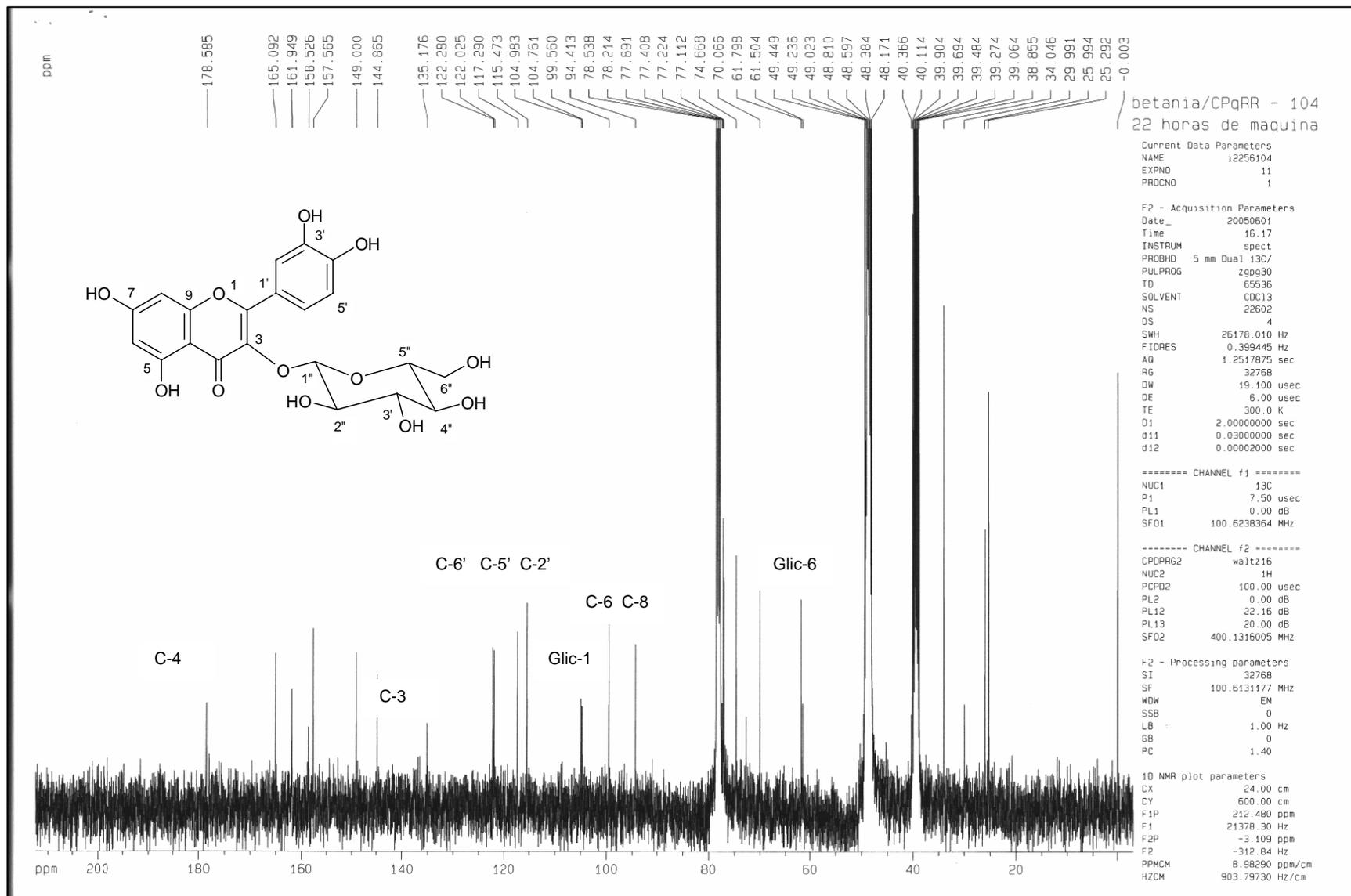
Espectro da substância **VII** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: NaOAc (pó). Curva verde: NaOAc + H₃BO₃ (sat.)



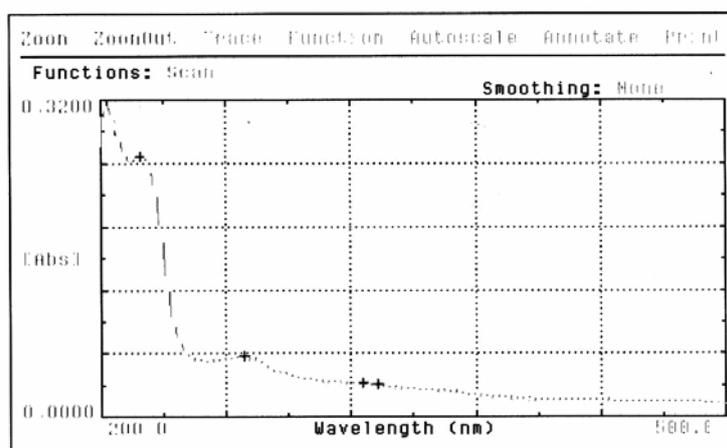
Espectro de massas obtido, com ionização por “electrospray”, no modo positivo e negativo da substância VII.



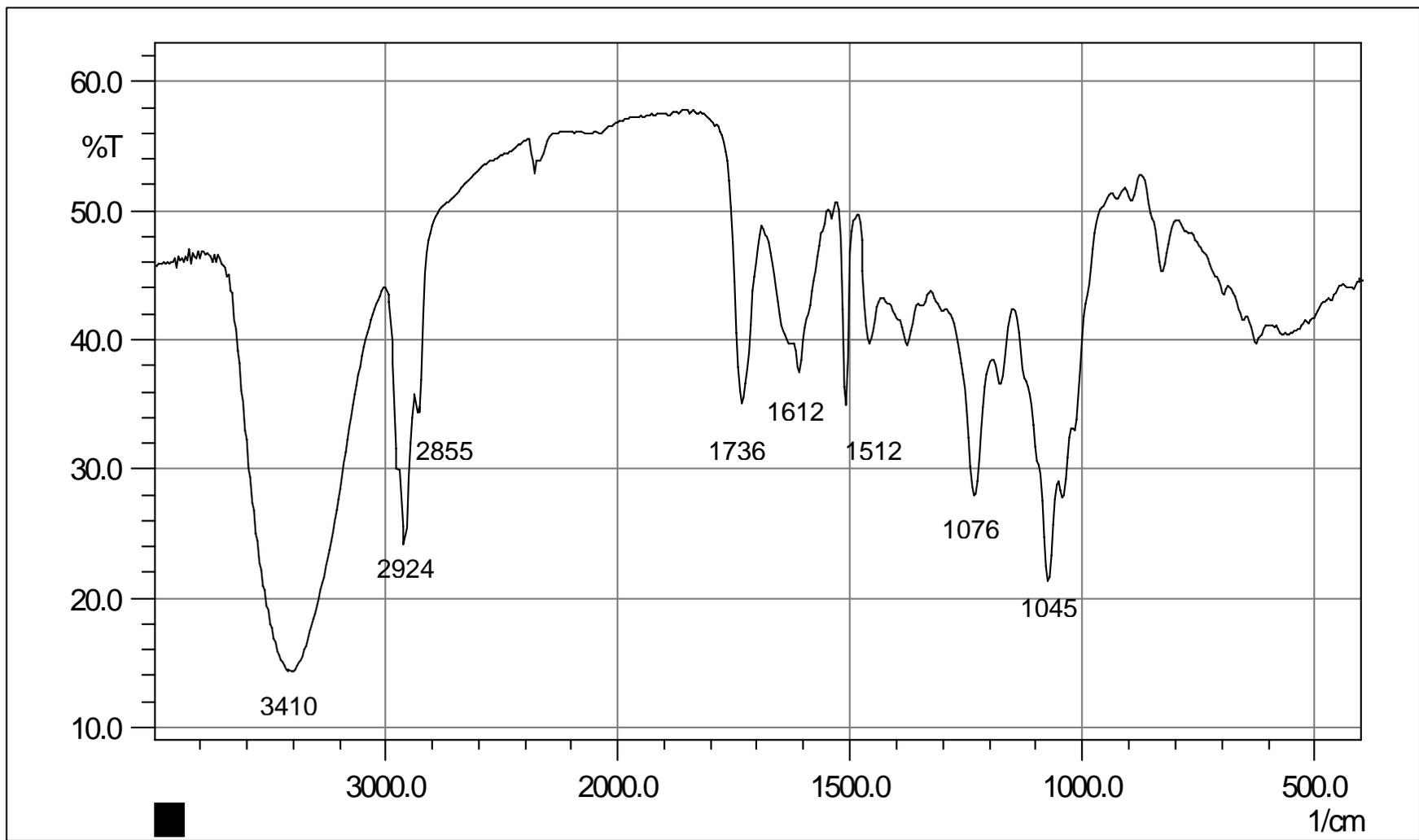
Espectro de RMN ¹H da substância VII (400 MHz, MeOD, δ).



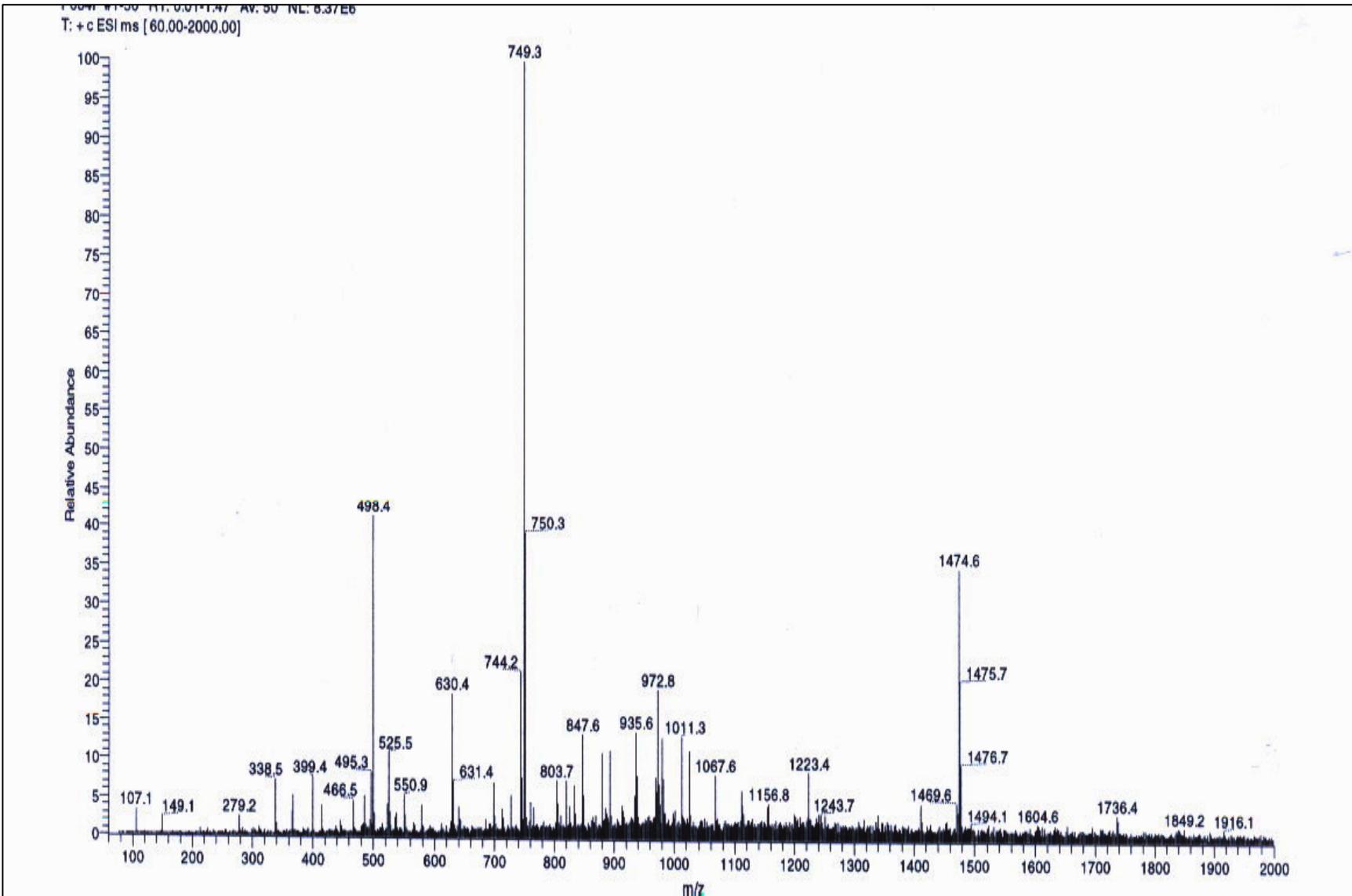
Espectro de RMN ^{13}C da substância VII (100 MHz, MeOD, CDCl_3 , DMSO, δ).



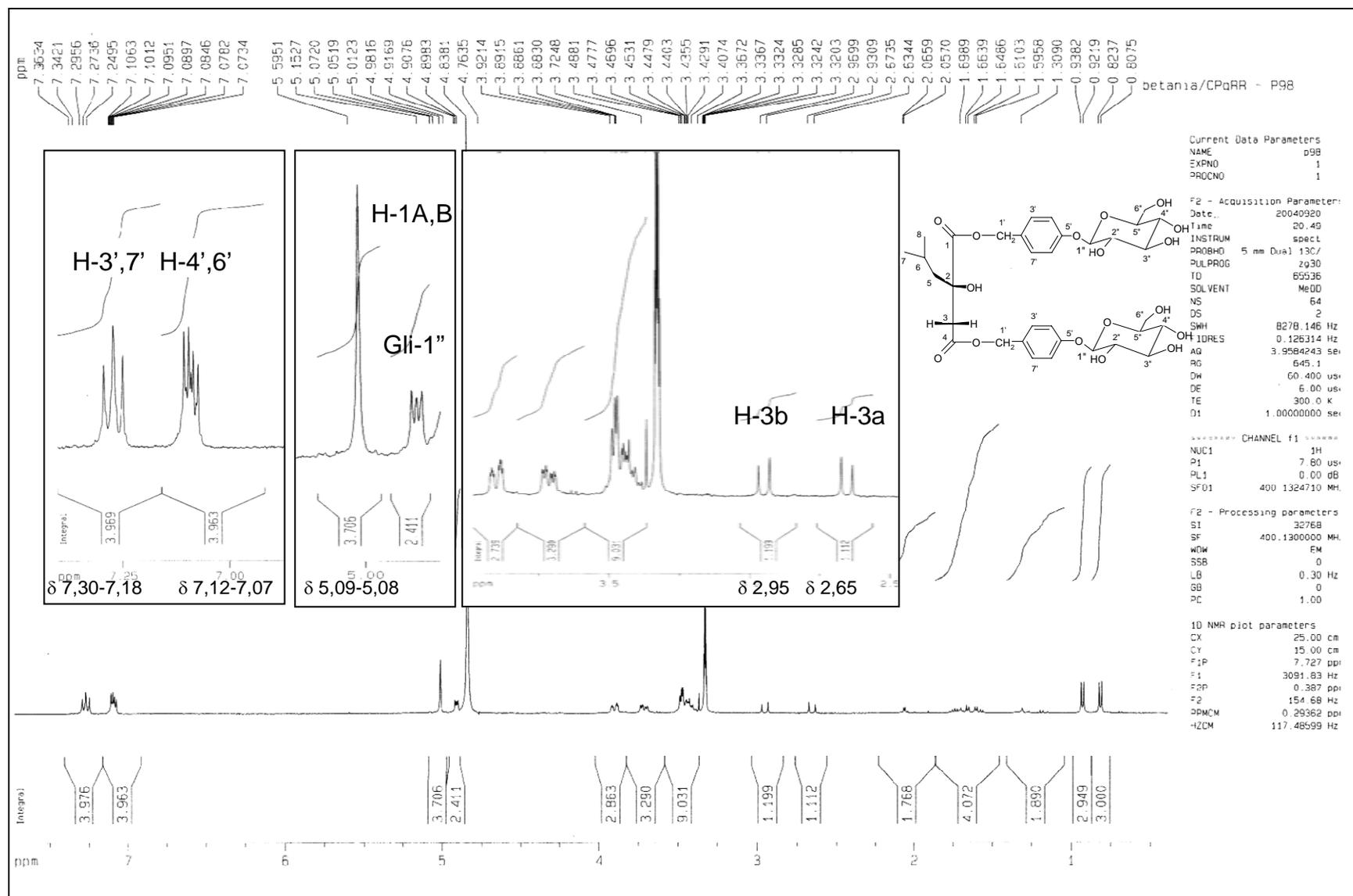
Espectro da substância **VIII** no UV (1%p/v em MeOH, 200-500 nm).



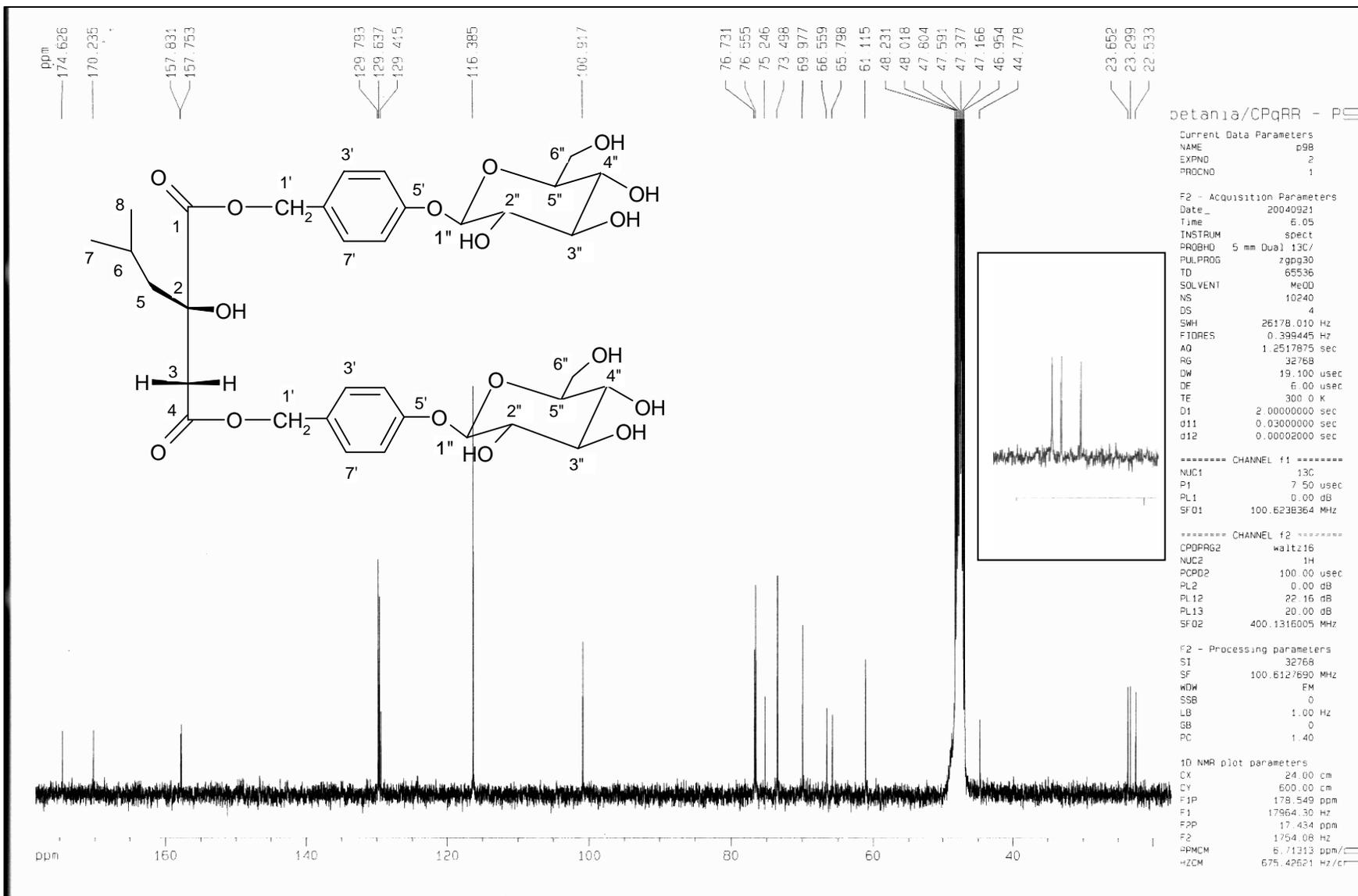
Espectro no IV da substância VIII (KBr, cm^{-1}).



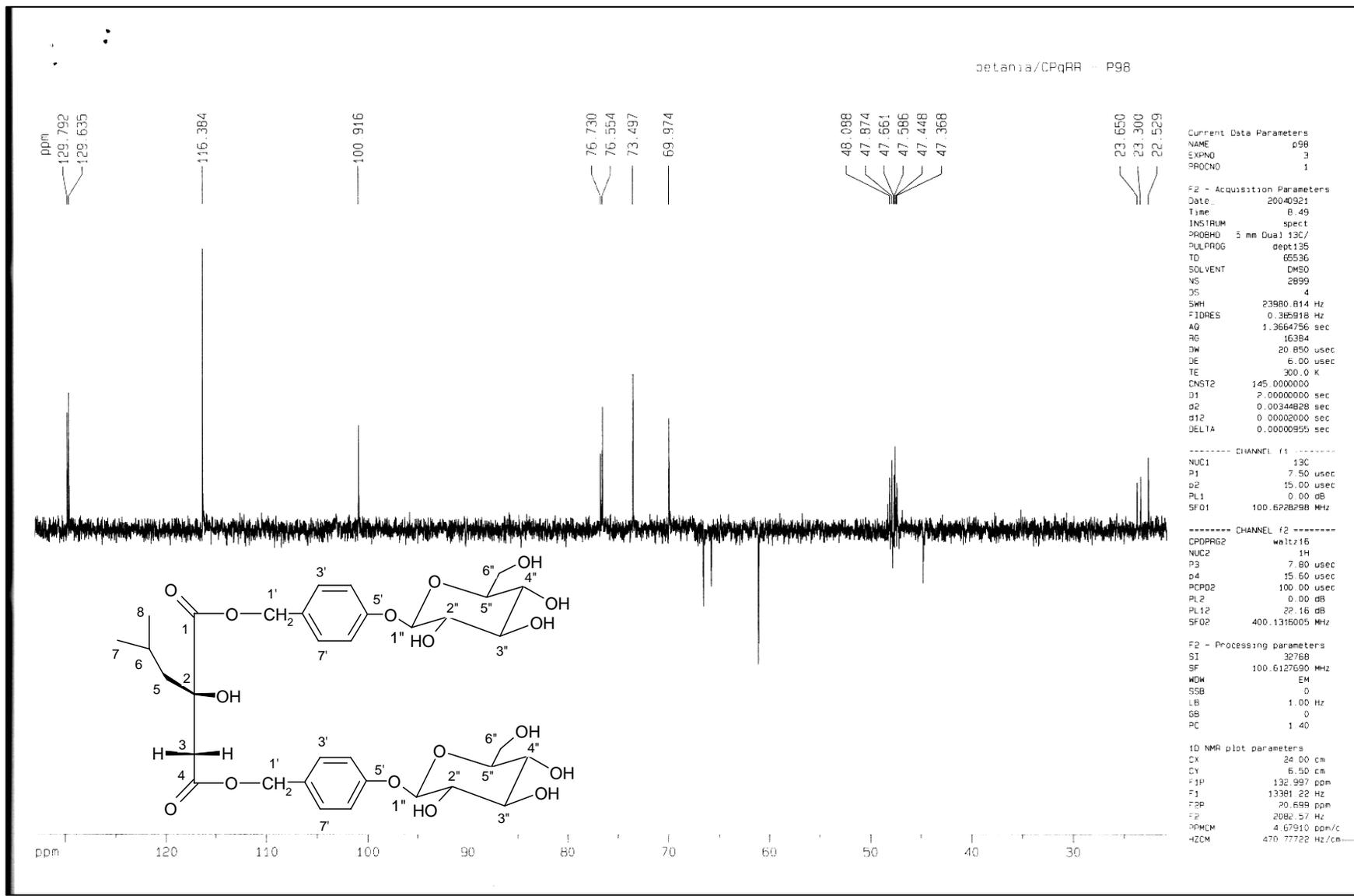
Espectro de massas, com ionização por “electrospray”, da substância **VIII**.



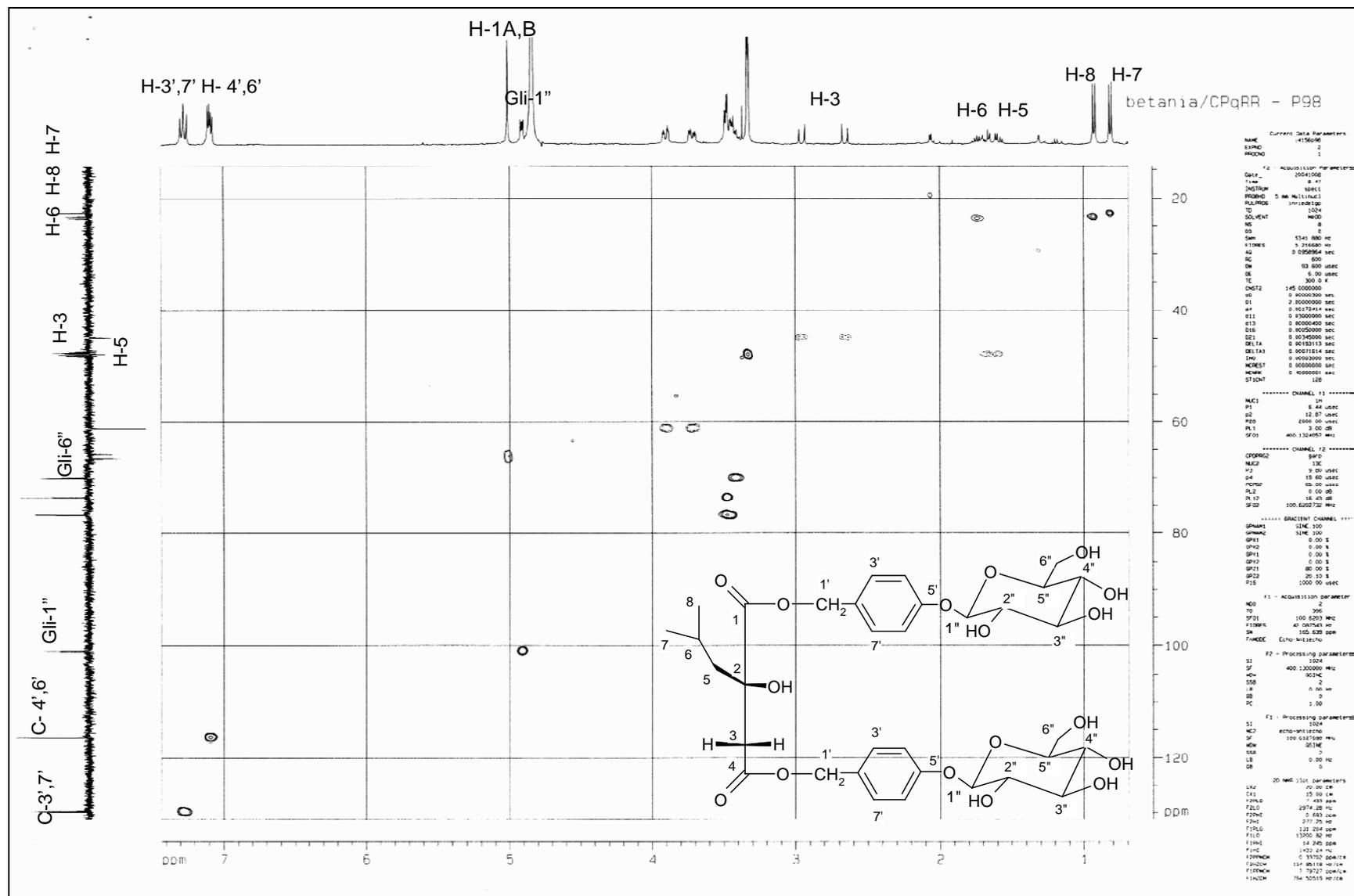
Espectro de RMN ¹H da substância VIII (400 MHz, MeOD, δ).



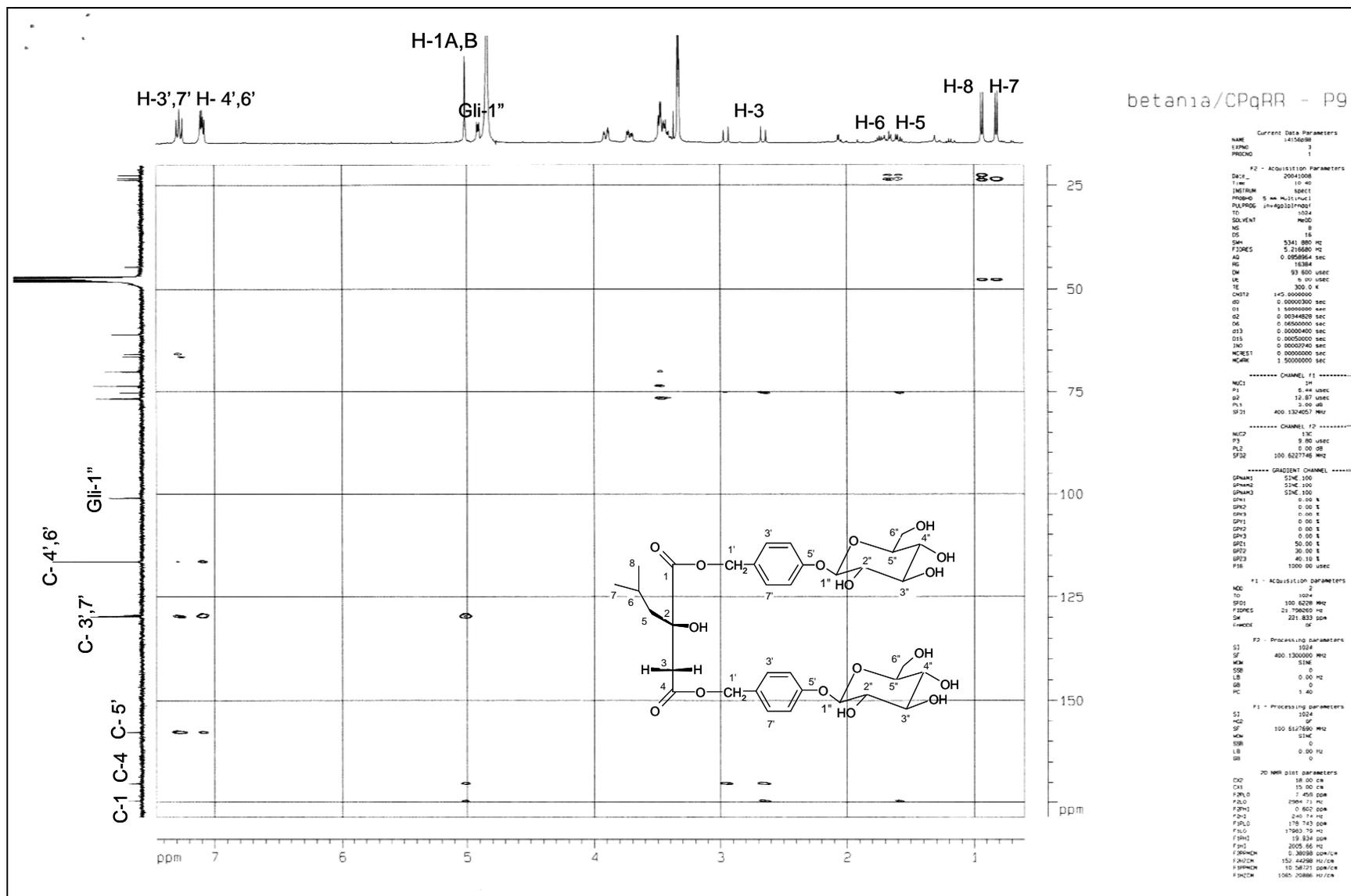
Espectro de RMN ¹³C da substância VIII (100 MHz, MeOD, δ).



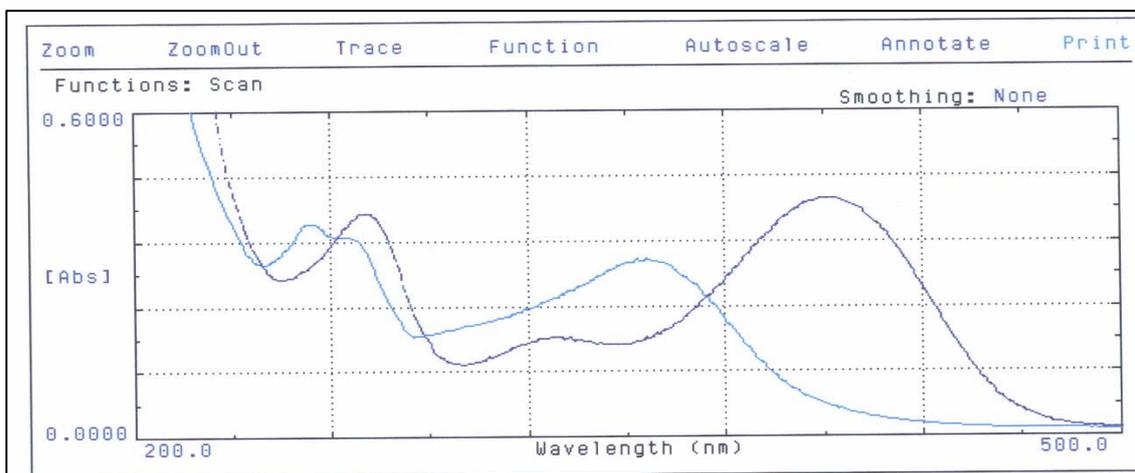
Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, MeOD, δ) da substância VIII.



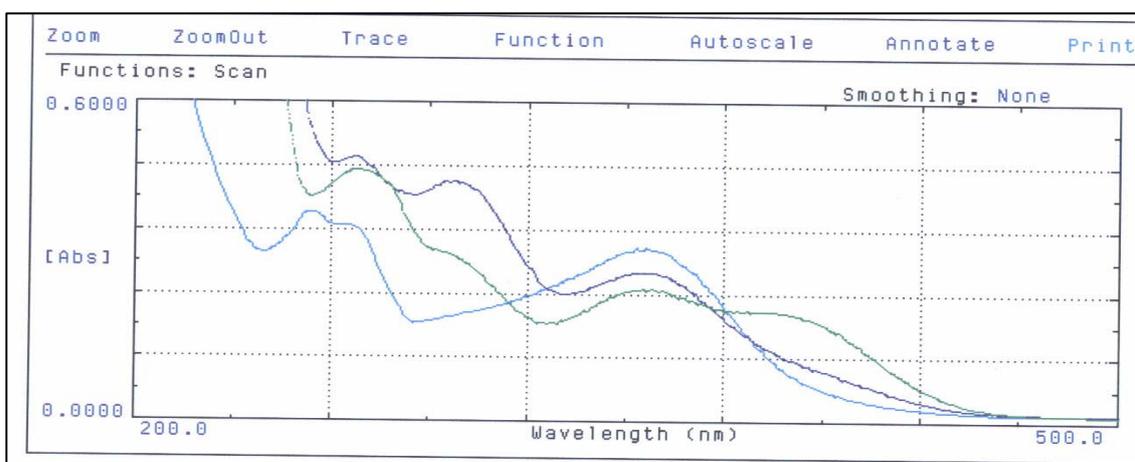
Mapa de contornos HMQC da substância VIII.



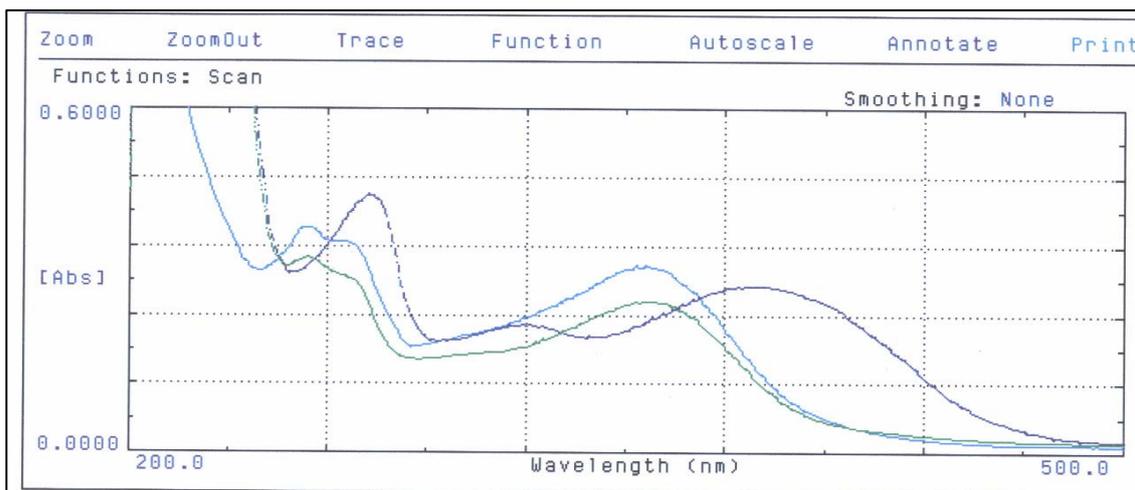
Mapa de contornos HMBC da substância VIII.



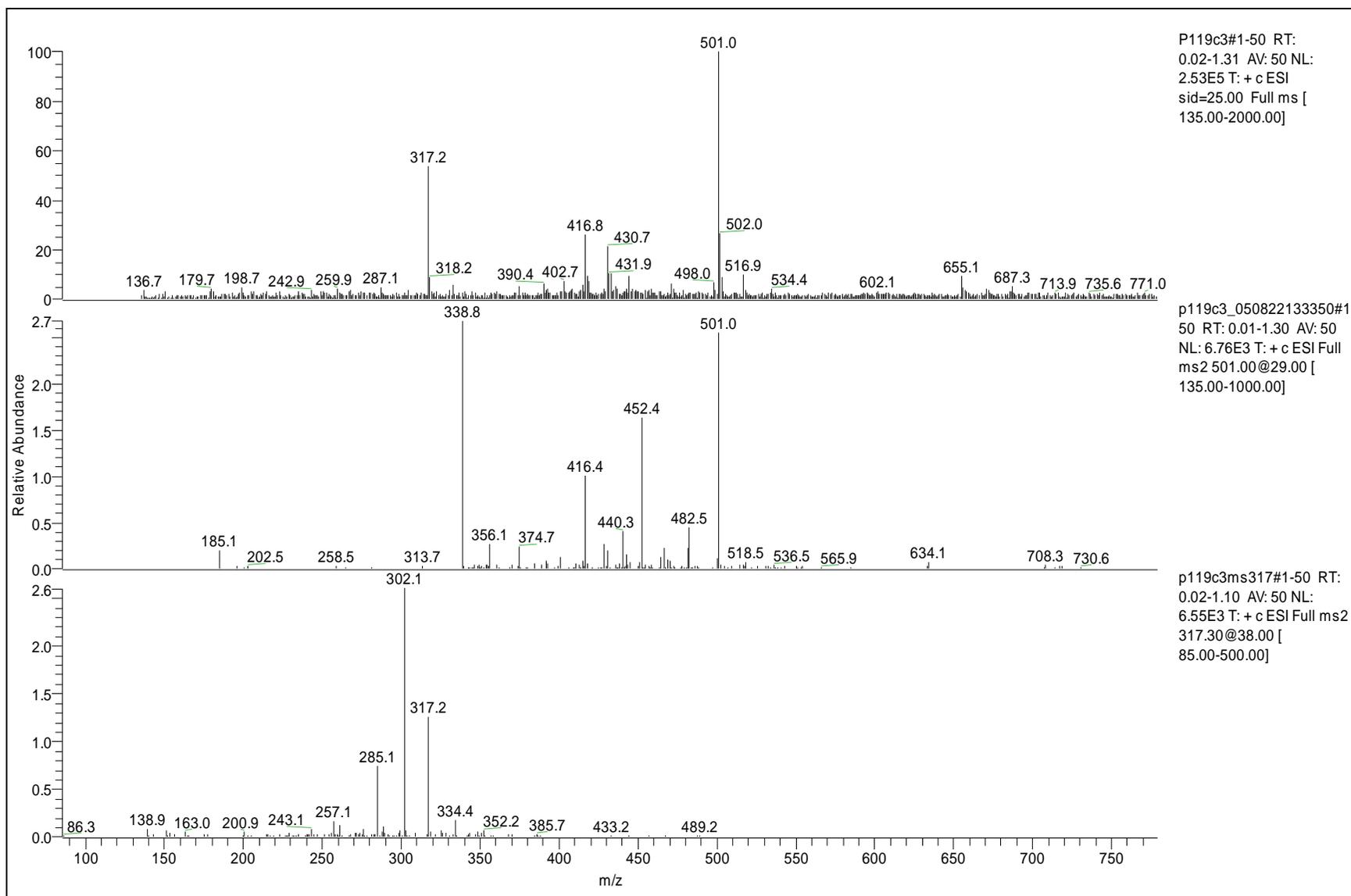
Espectro da substância **IX** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: NaOH (2,5% p/v).



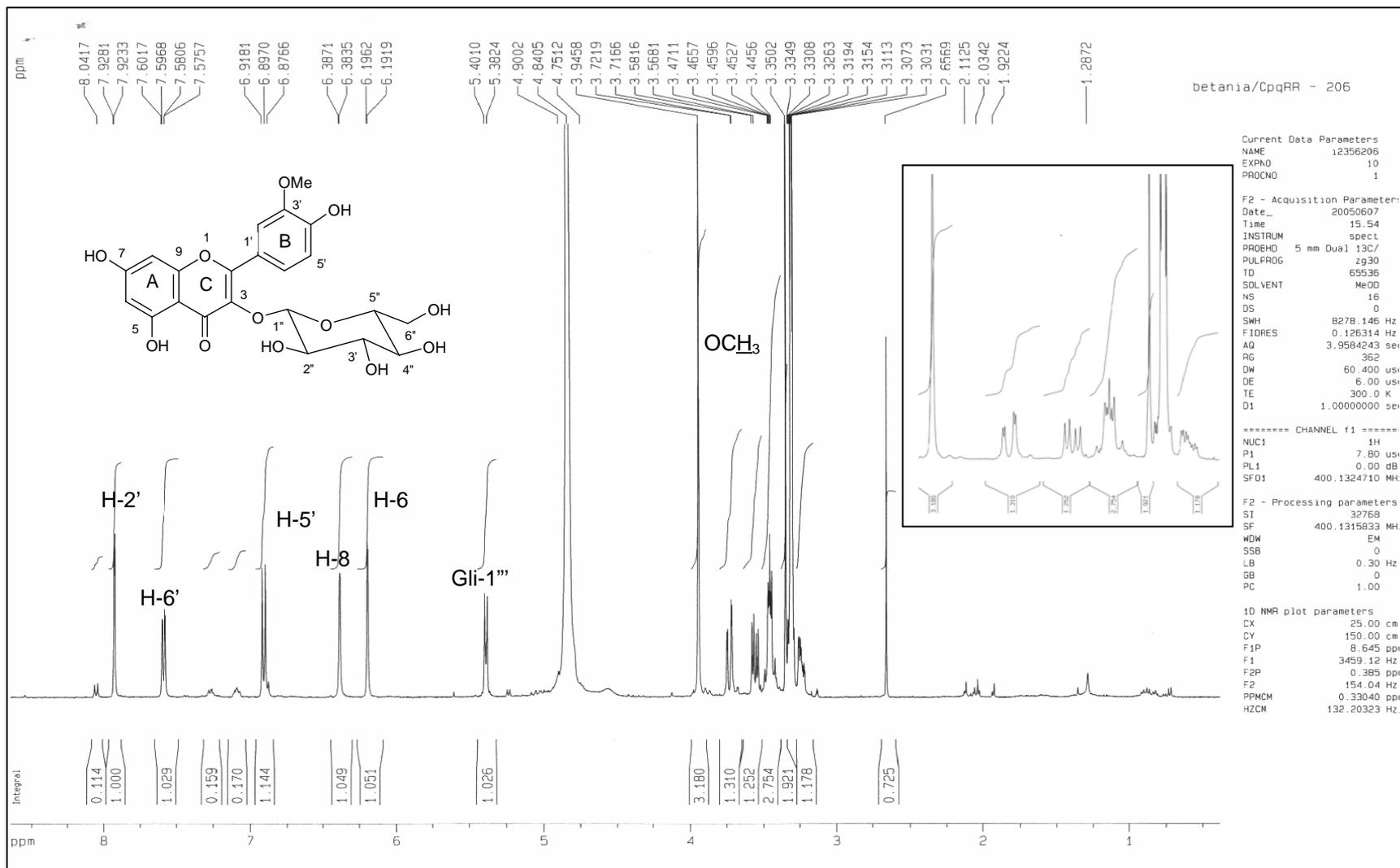
Espectro da substância **IX** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: AlCl₃ (5% p/v). Curva verde: AlCl₃ + HCl (50% p/v).



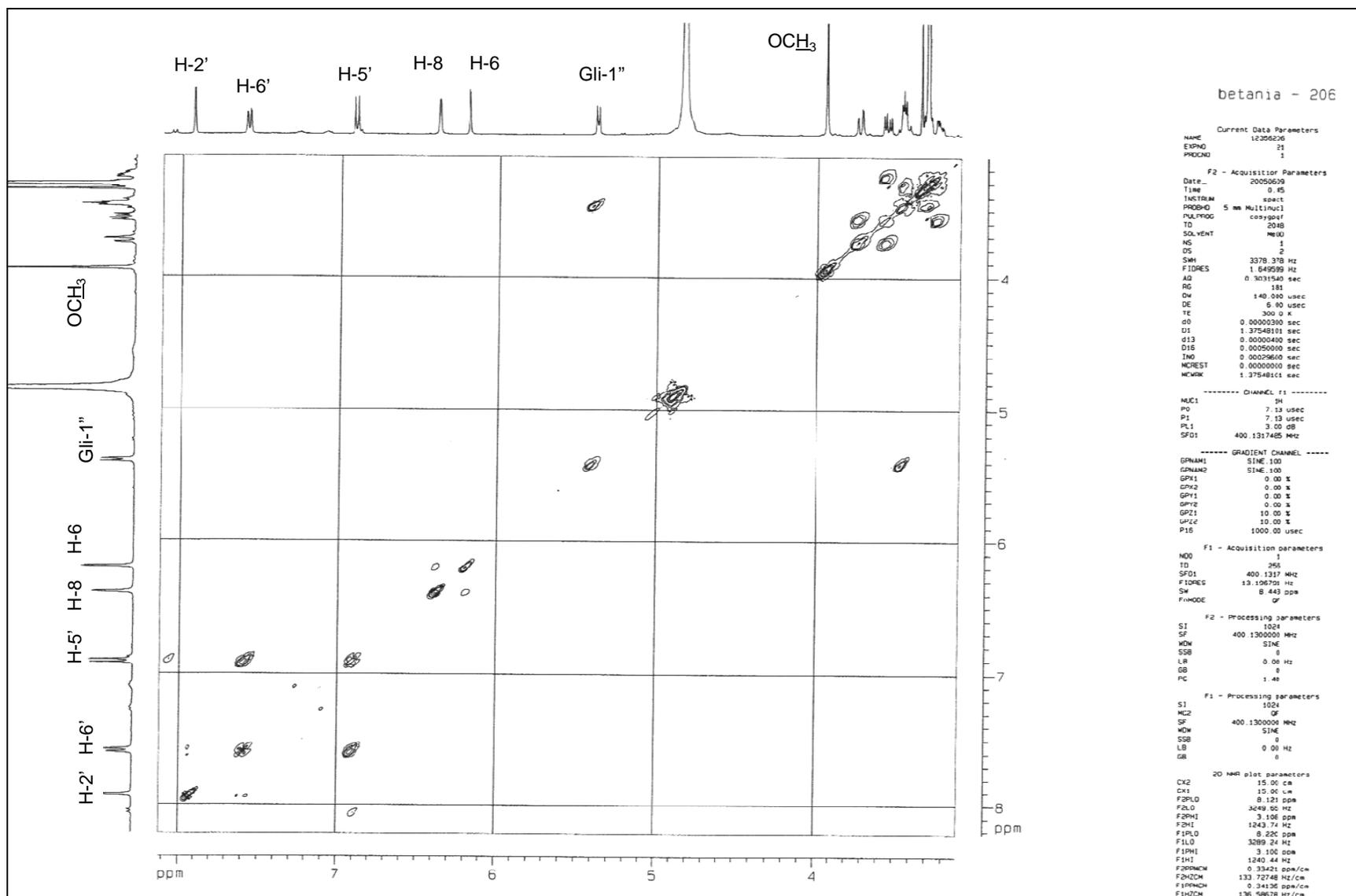
Espectro da substância **IX** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva verde: NaOAc (pó). Curva roxa: NaOAc + H₃BO₃ (sat.).



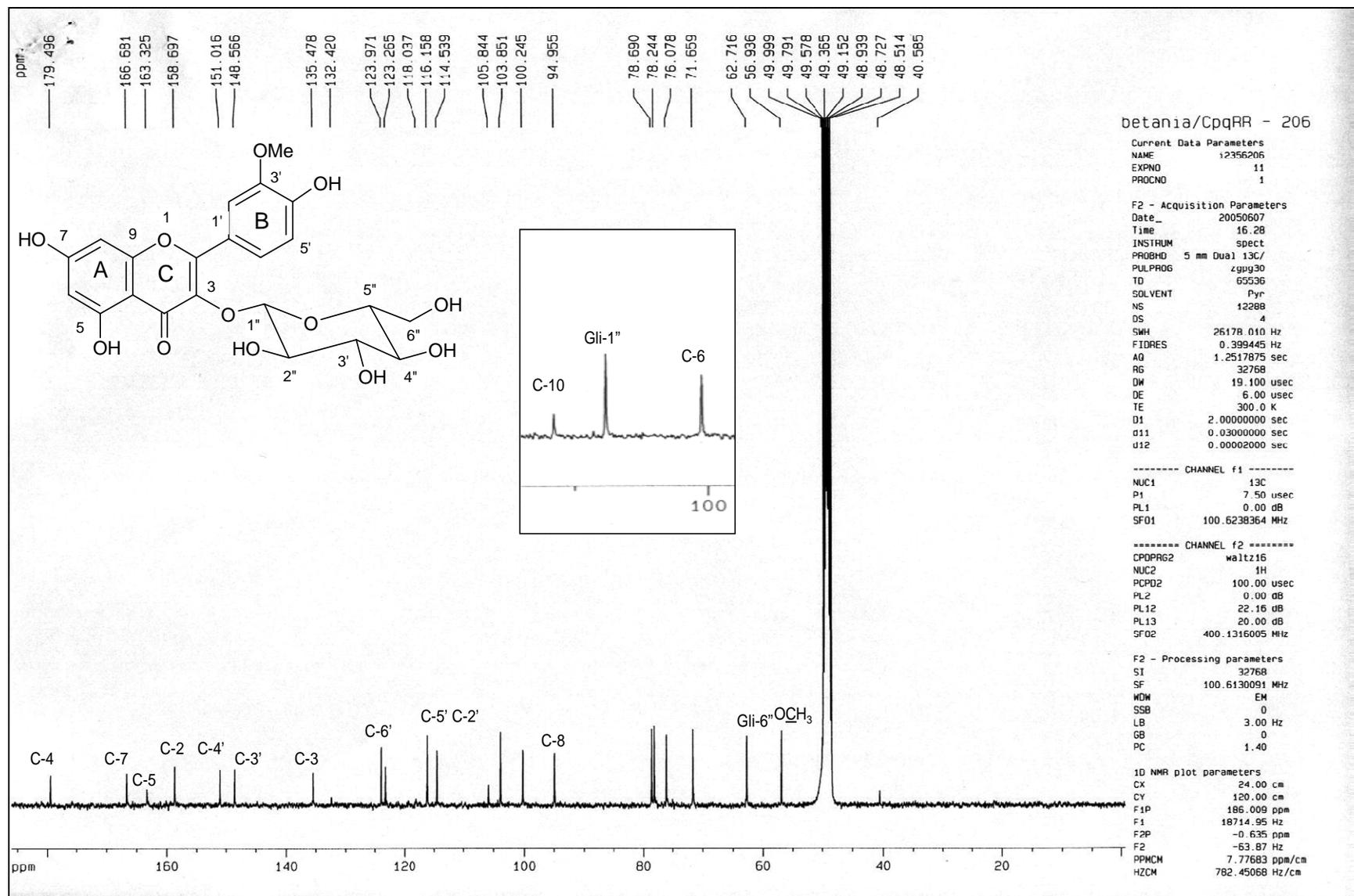
Espectro de massas, com ionização por "electrospray", no modo positivo da substância IX.



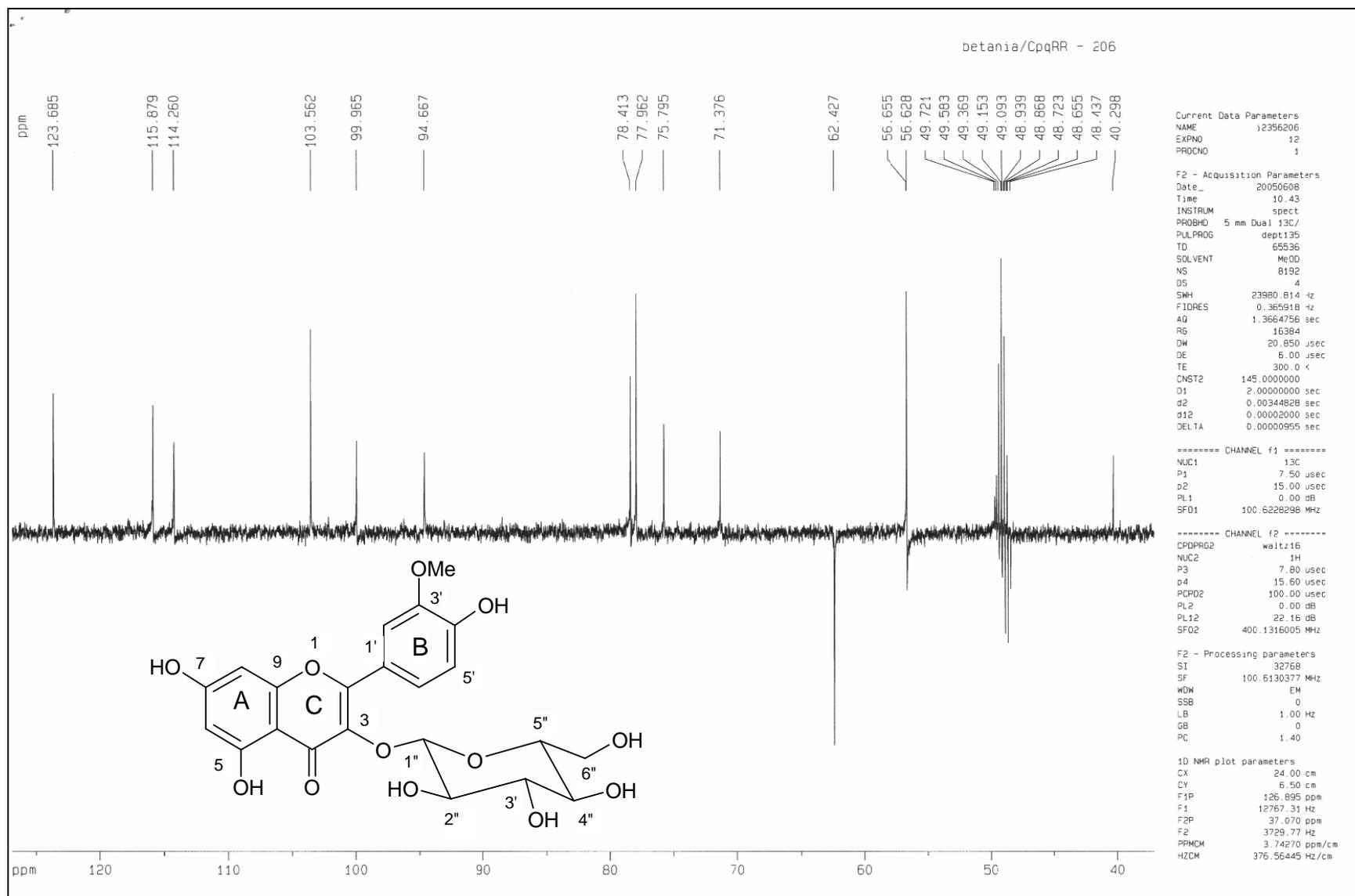
Espectro de RMN ¹H da substância IX (400 MHz, MeOD, δ).



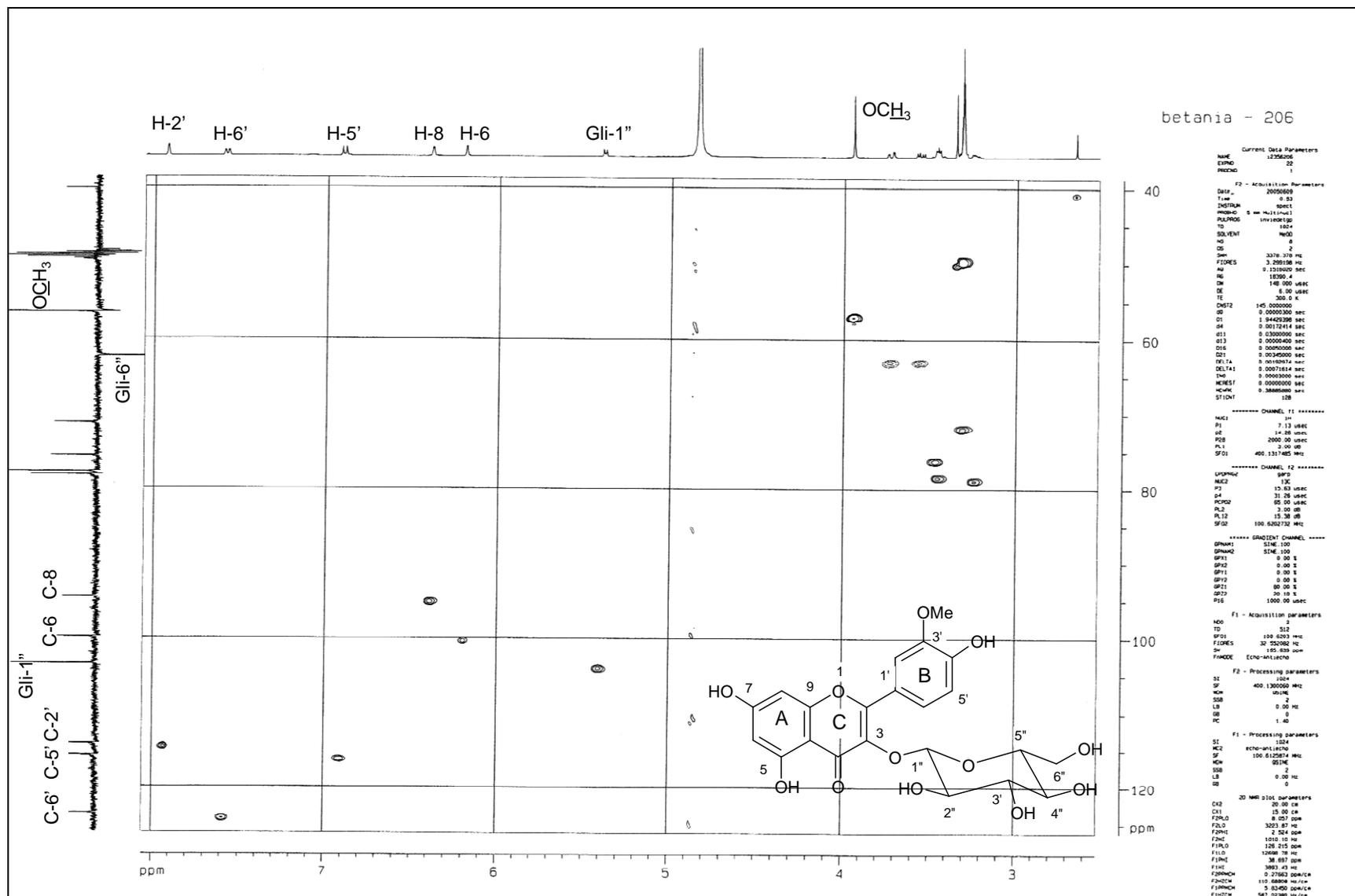
Mapa de contornos COSY da substância IX (400 MHz, MeOD, δ).



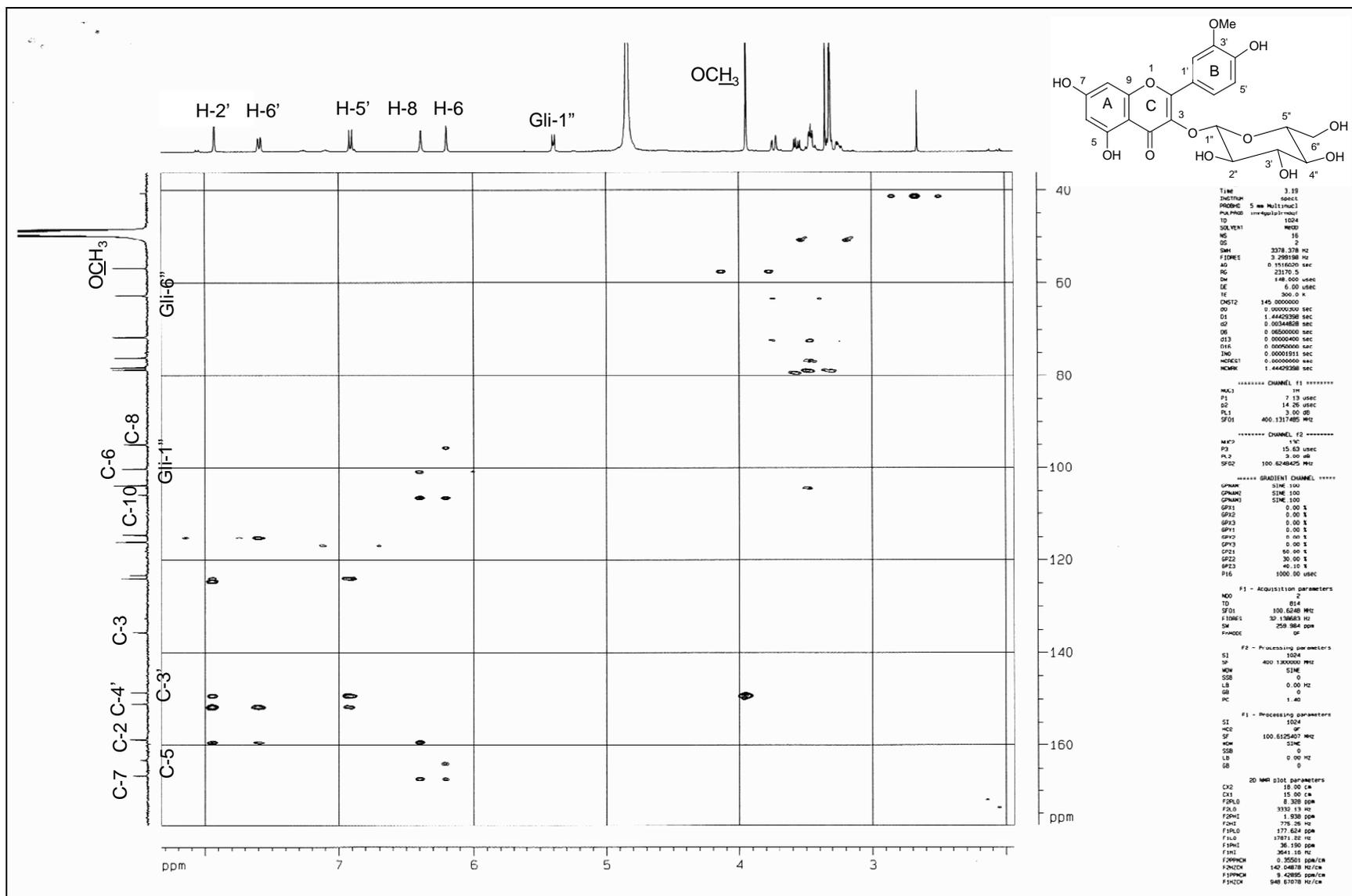
Espectro de RMN ¹³C da substância IX (100 MHz, MeOD, δ).

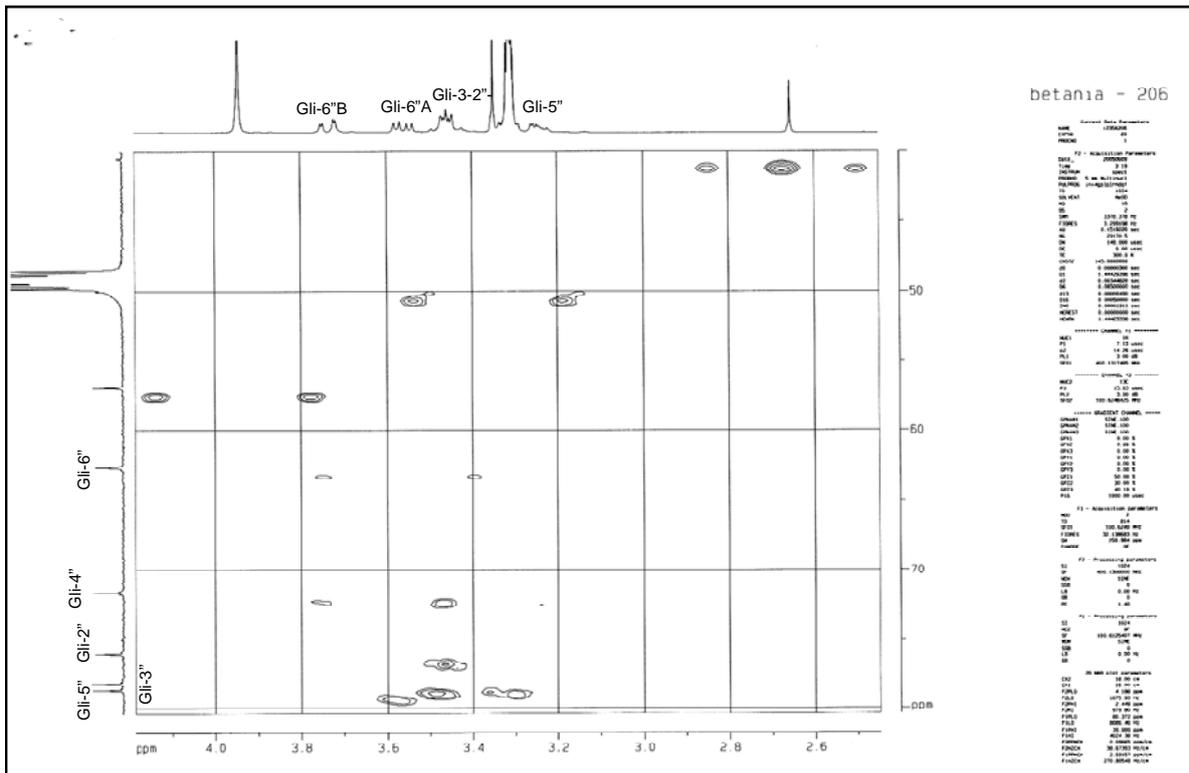


Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, MeOD, δ) da substância IX.

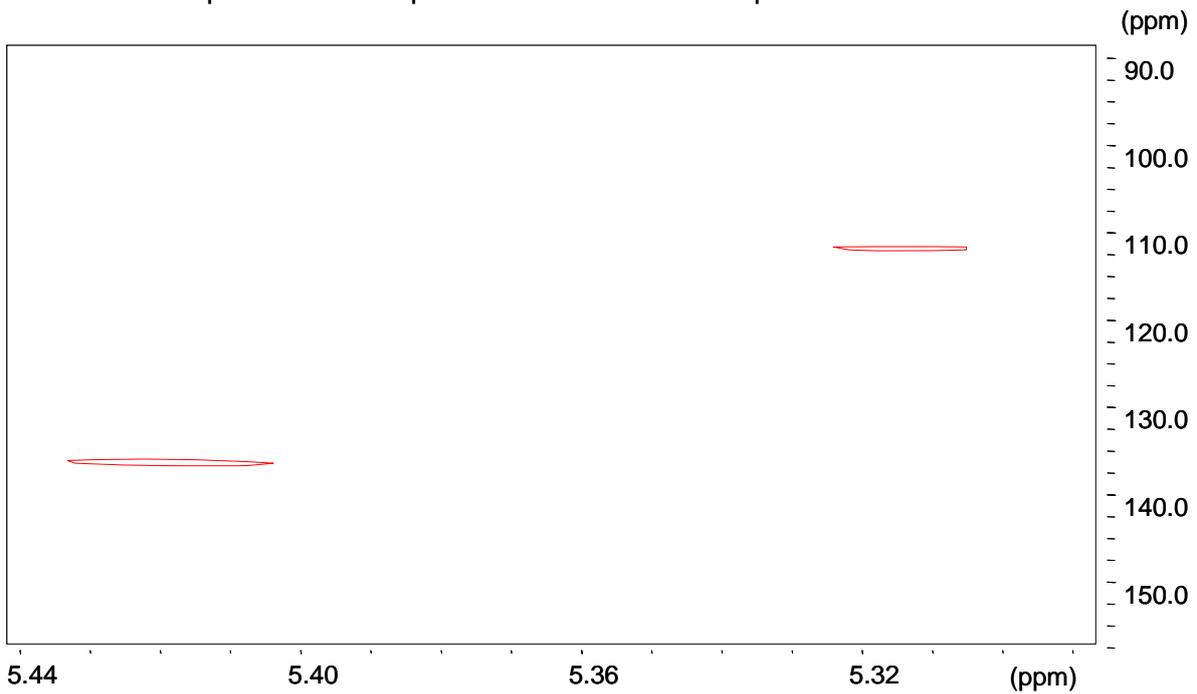


Mapa de contornos HMQC para substância IX.

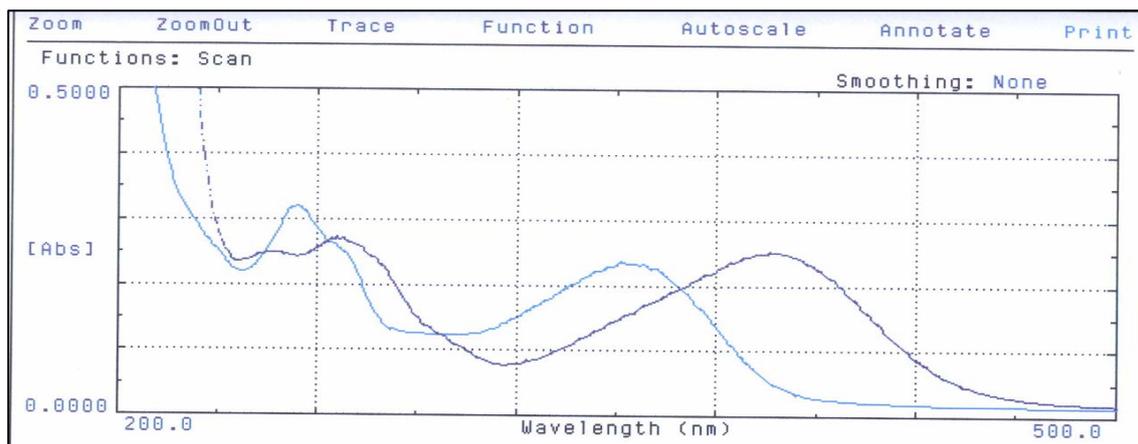




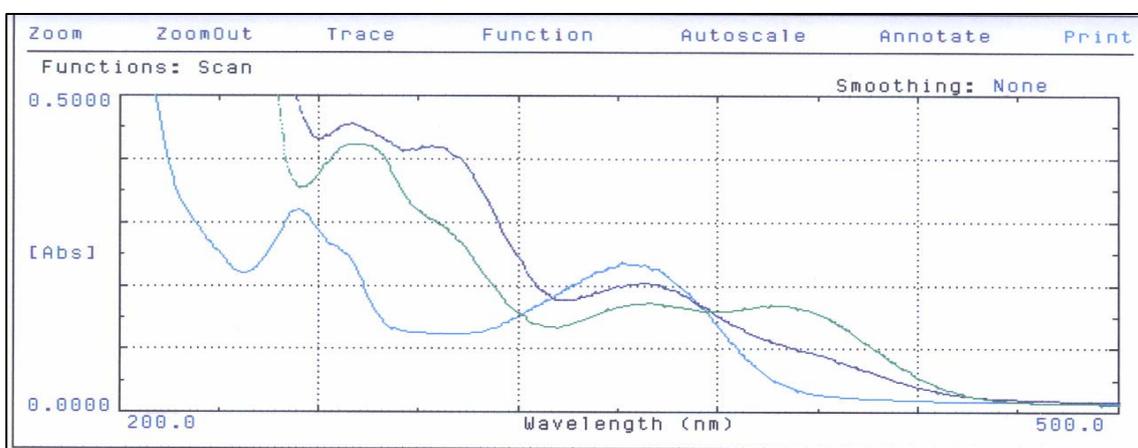
Expansão do mapa de contornos HMBC para substância IX.



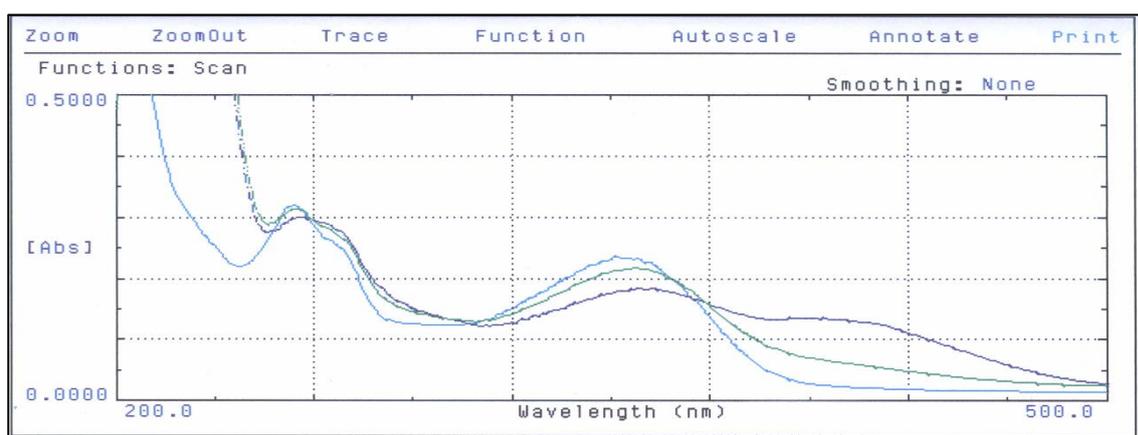
Expansão do mapa de contornos HMBC da substância IX.



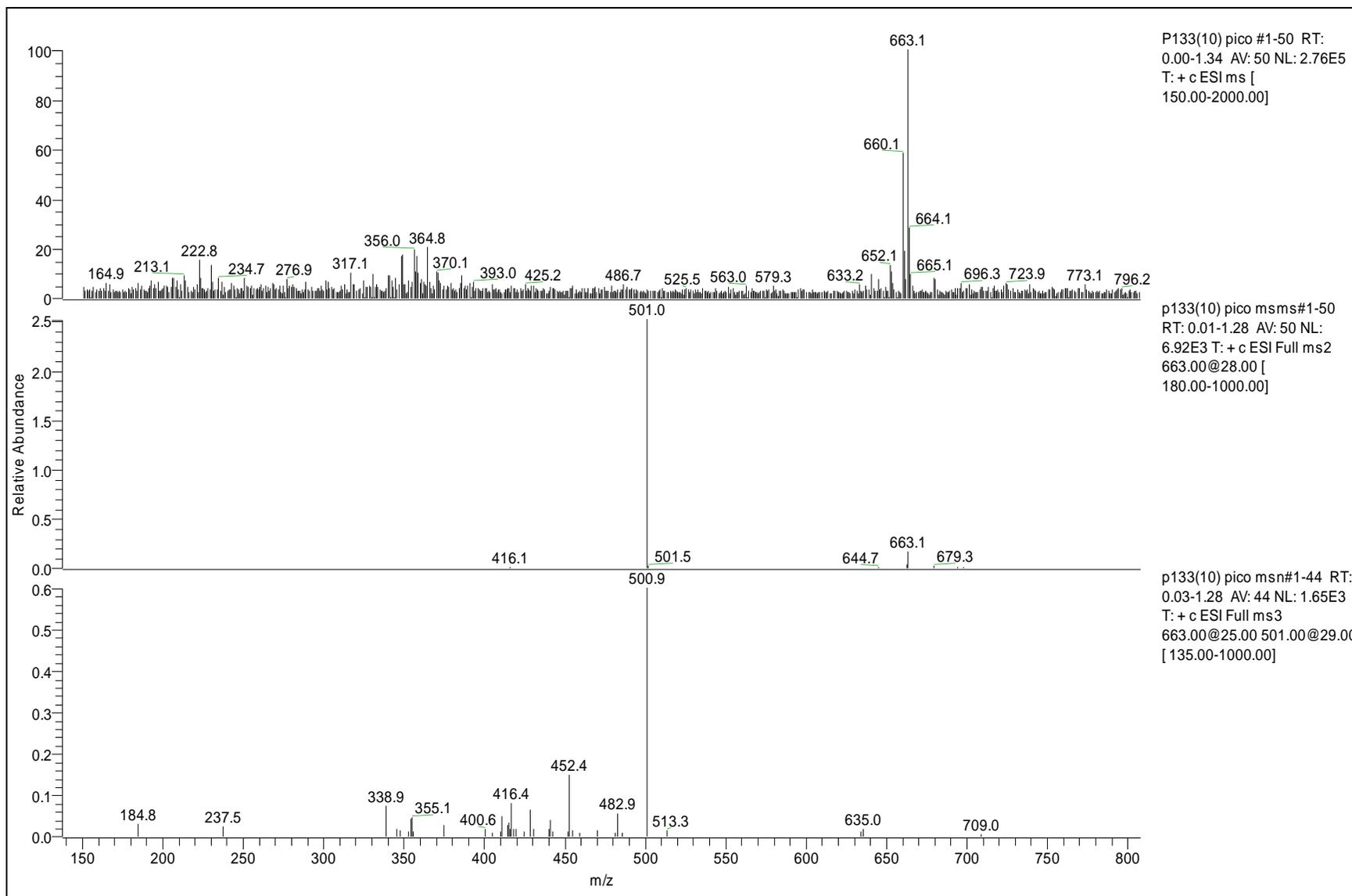
Espectro da substância **X** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: NaOH (2,5% p/v).



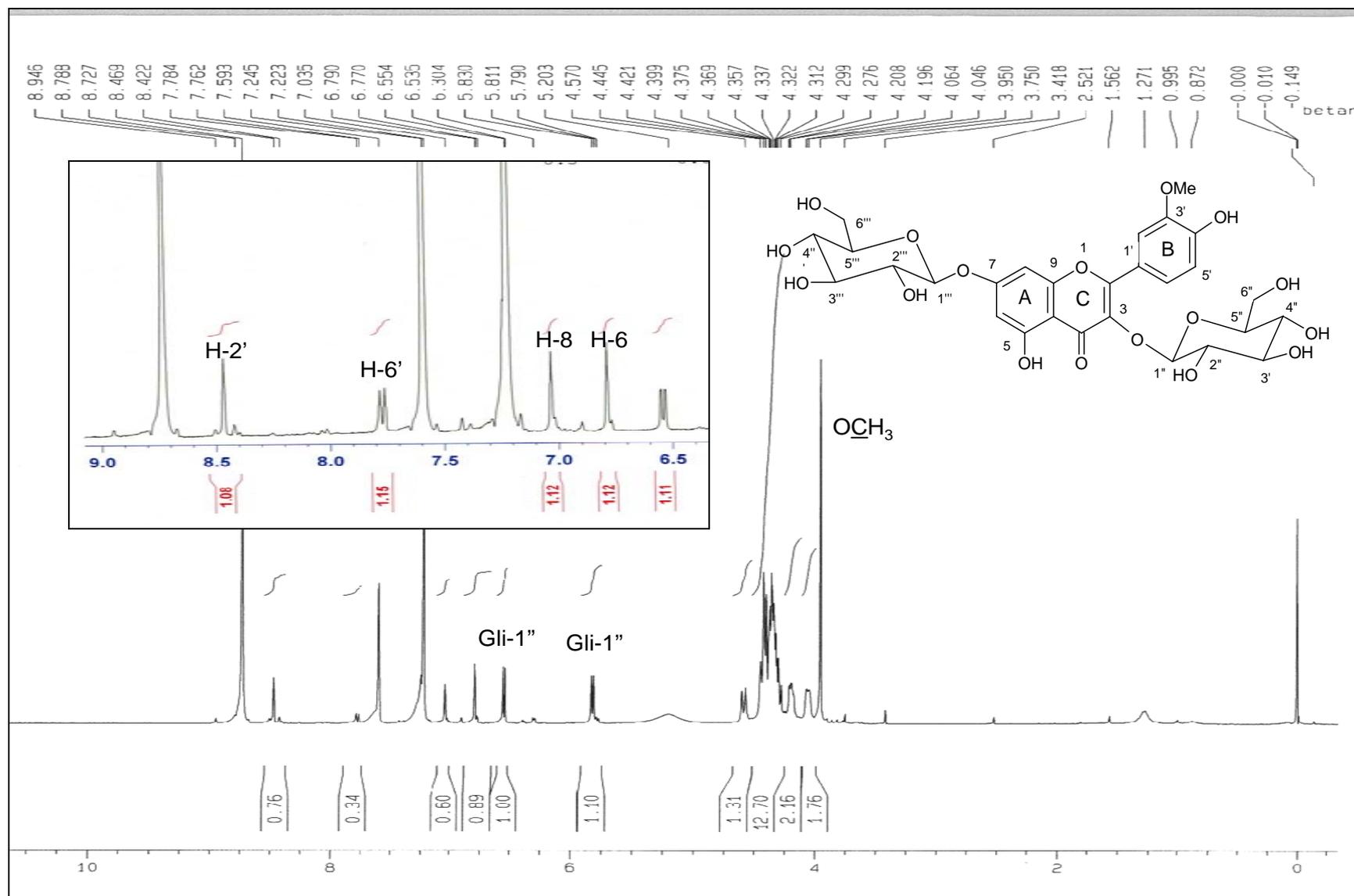
Espectro da substância **X** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: AlCl₃ (5% p/v). Curva verde: AlCl₃ + HCl (50% p/v).



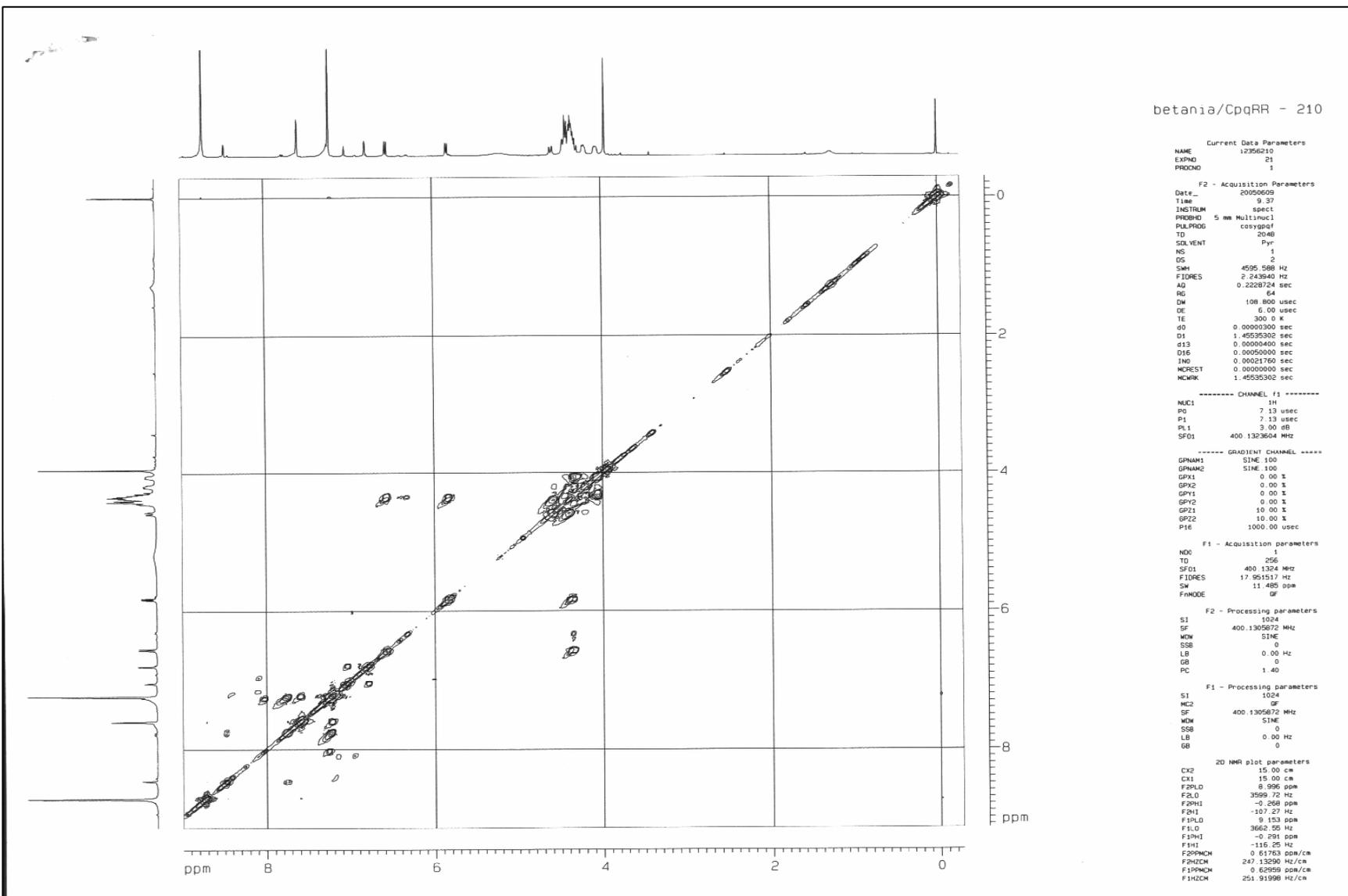
Espectro da substância **X** (1mg%/mL) obtido no UV-VIS (200-500 nm). Curva azul: MeOH. Curva roxa: NaOAc (pó). Curva verde: NaOAc + H₃BO₃ (sat.).



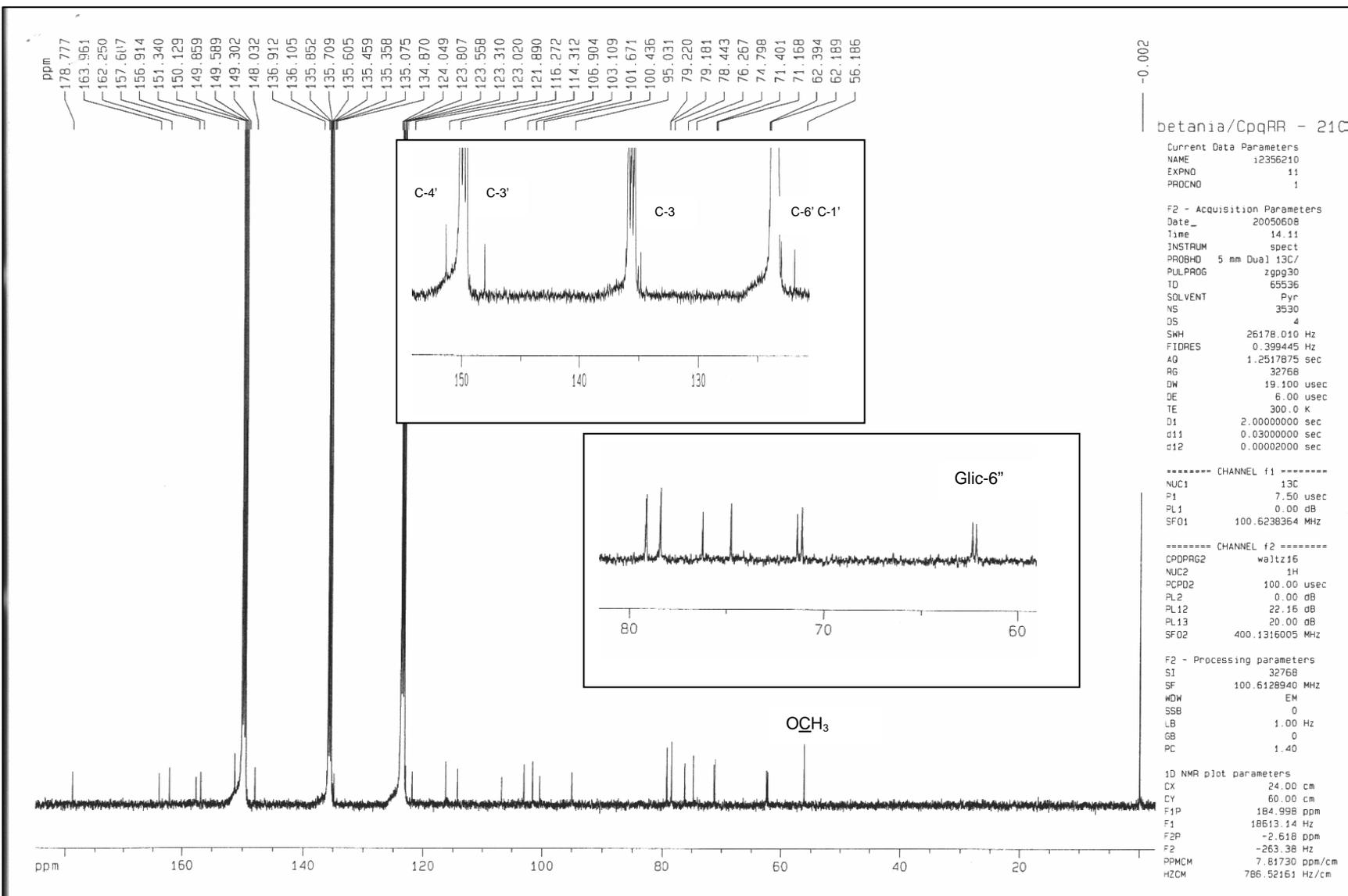
Espectro de massas, com ionização por “electrospray”, no modo positivo da substância X.



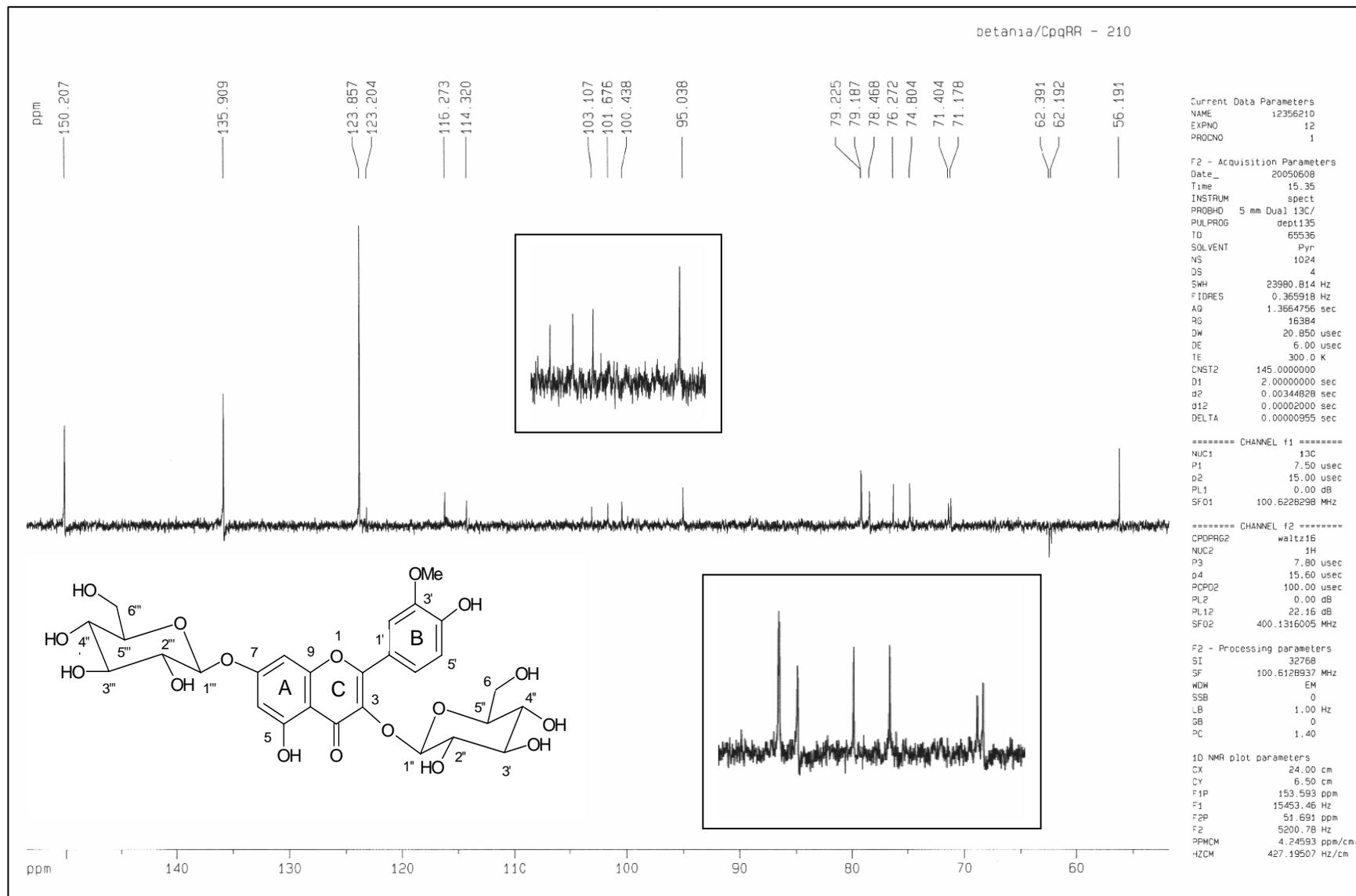
Espectro de RMN ¹H da substância X (400 MHz, piridina-d₅, δ).



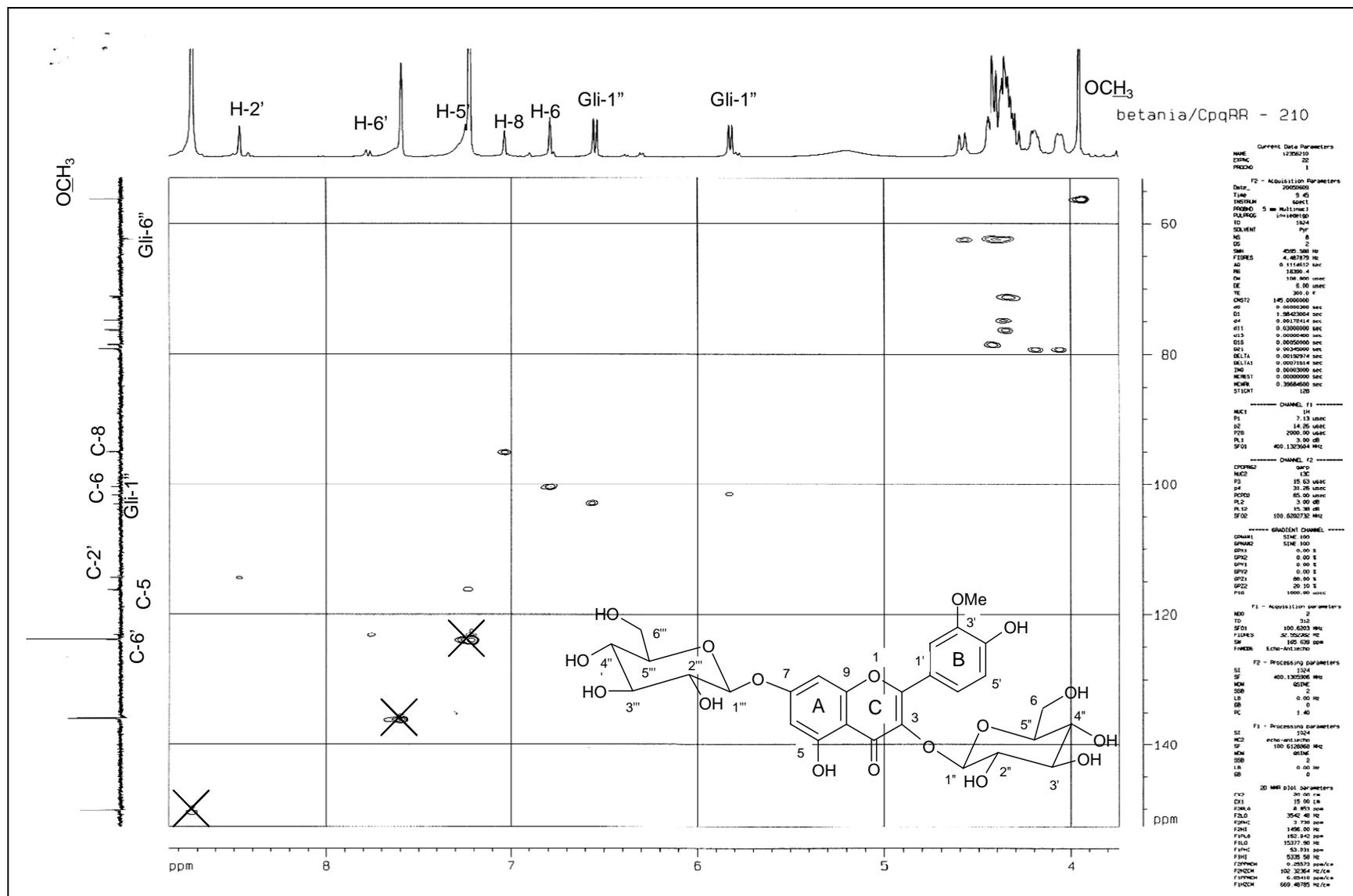
Mapa de contornos COSY para substância X (400 MHz,).



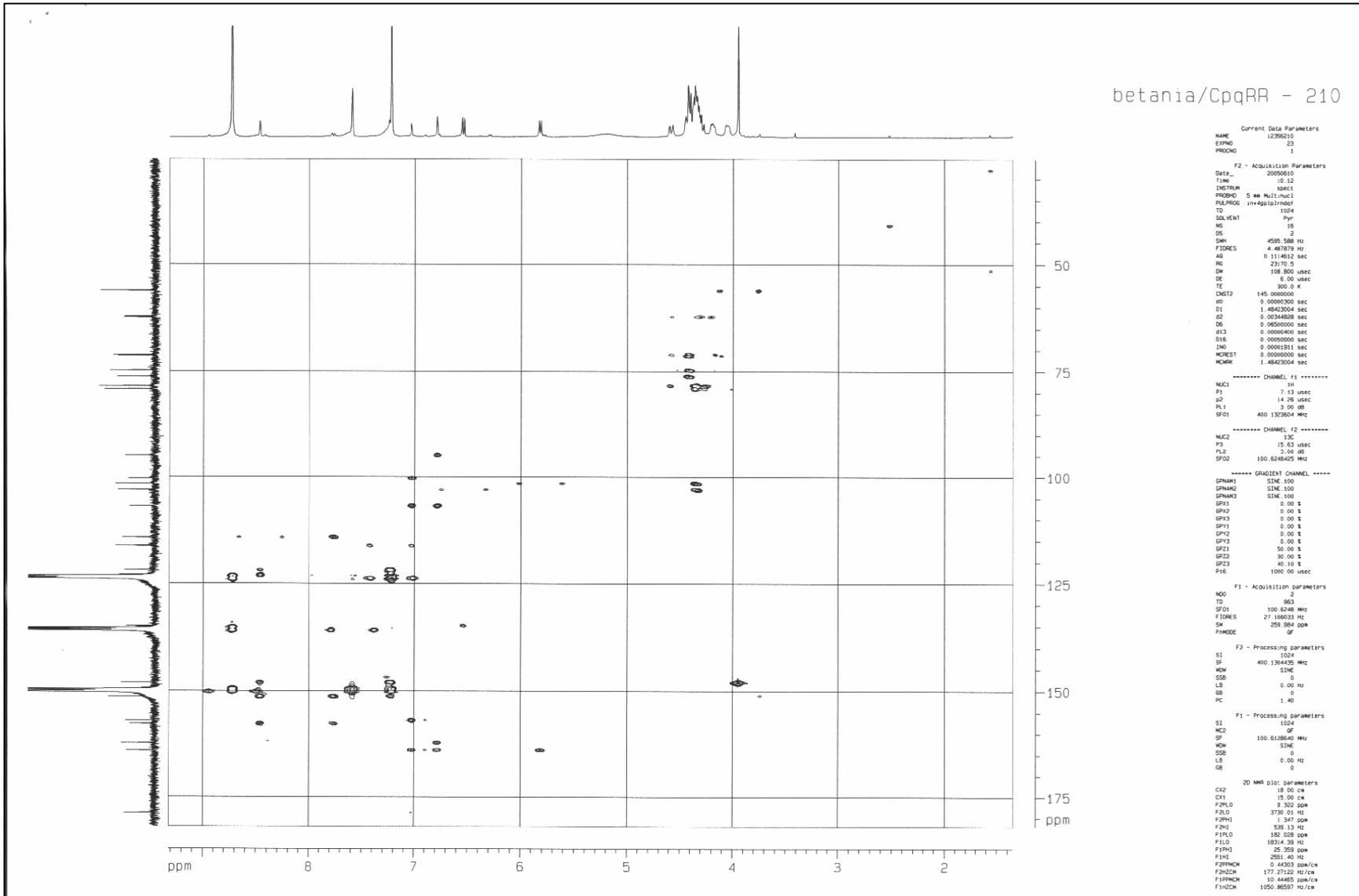
Espectro de RMN ¹³C da substância X (100 MHz, piridina, δ).



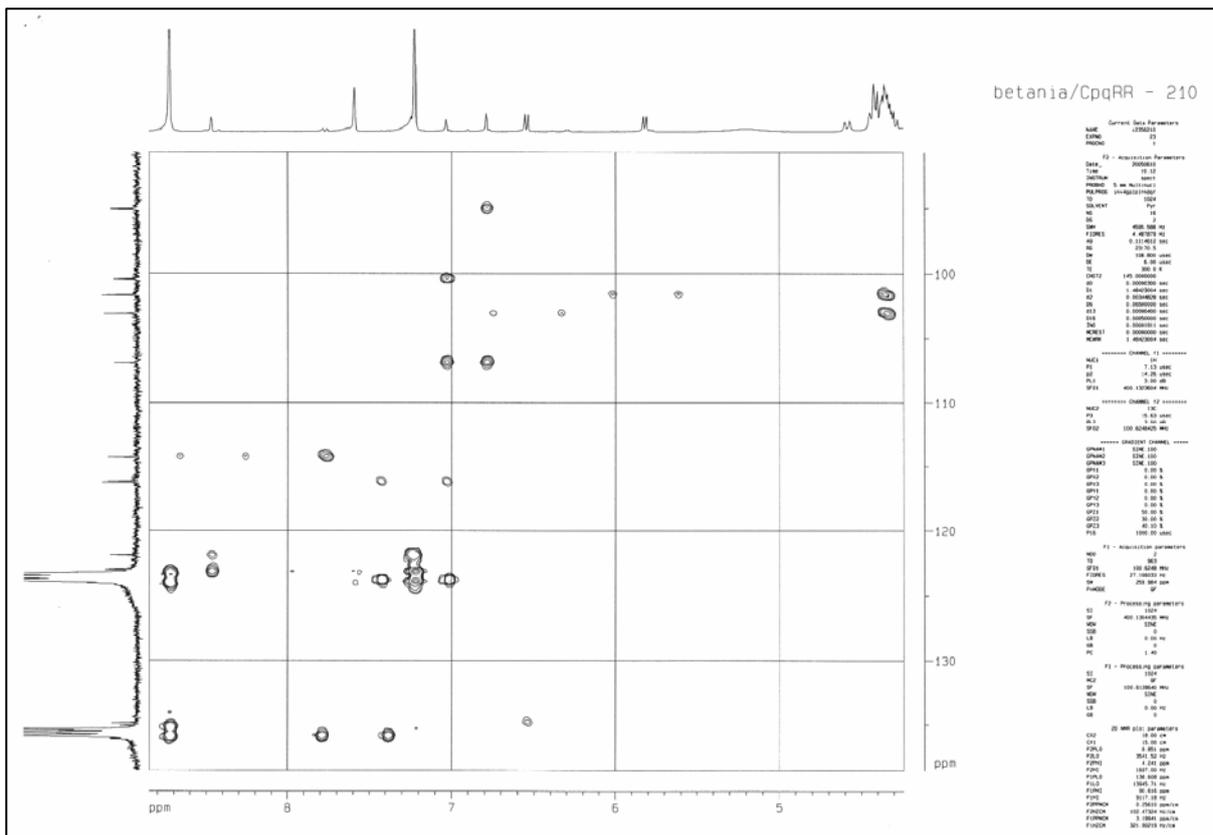
Espectro de RMN ¹³C (DEPT-135, 100MHz, piridina, δ) da substância X.



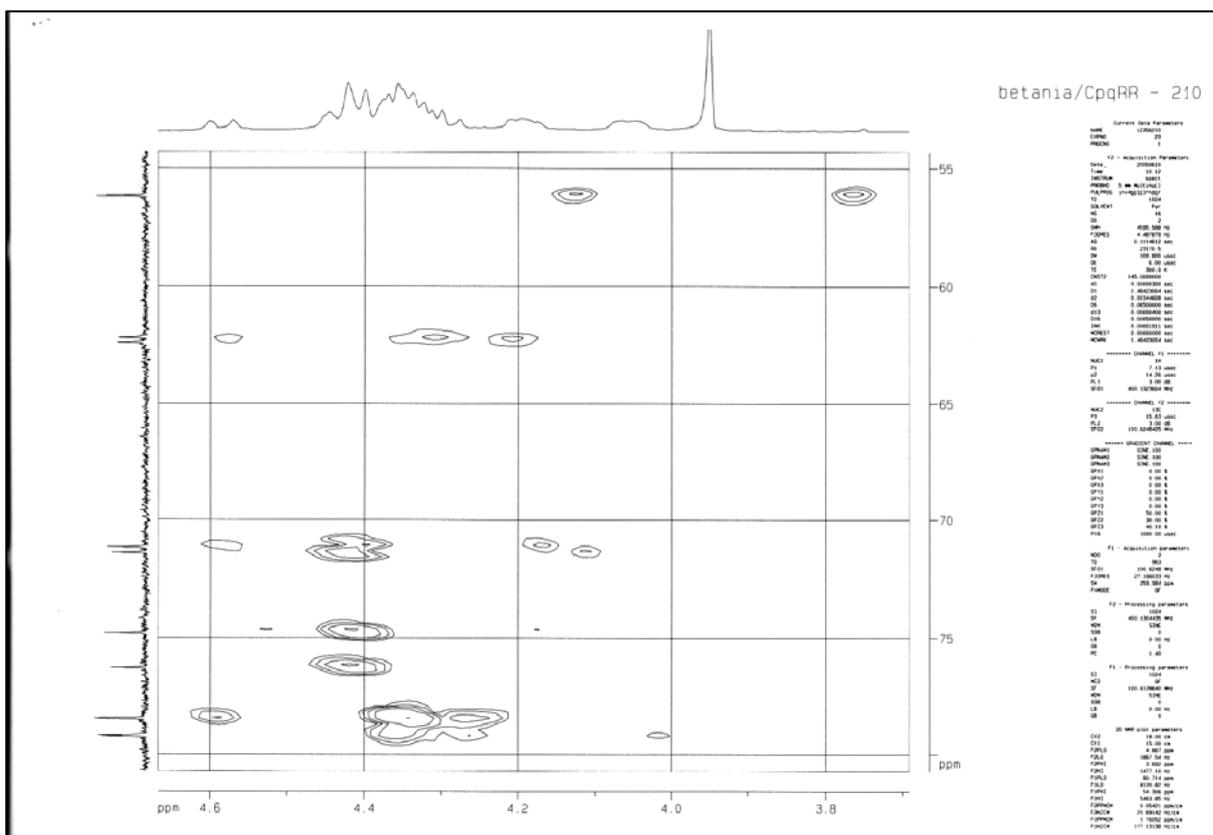
Mapa de contornos HMQC da substância X.



Mapa de contornos HMBC da substância X.



Expansão do mapa de contornos HMBC da substância X.



Expansão do mapa de contornos HMBC da substância X.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aasen A, Behr D, Leander K. Studies on Orchidaceae glycosides. The structures of loriglossine and militarine, two glucosides from *Orchis militaris* L. Acta Chem Scand B. 1975; 29: 1002-1004.

Abate D, Abraham W R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. J Antibiot. 1994; 47:1348-1350.

Ades T, Gansler T, Miller M, Rosenthal DS PC-SPEs: Current Evidence and Remaining Questions. CA Cancer J Clin. 2001; 51:199-204.

Akbay P, Basaran AA, Undeger U, Basaran N. *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. Phytother Res. 2003; 17: 34-37.

Anchel M, Hervey A, Kavanagh F, Polatnick J, Robins W. Antibiotic substances from Basidiomycetes *Coprinus similis* and *Lentinus degener*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1948; 34: 498-502.

Anuradha V, Rao Prakasa NS. Aeridin: a phenanthropyran from *Aerides crispum*. Phytochemistry 1998; 48: 185-186.

Anuradha V, Rao Prakasa NS, Udayabhaskar M. Ochrolone, a pyrene from *Coelogyne ochracea*. Phytochemistry 1995; 39: 1429-1431.

Appolonia C, Marston A, Hostettmann K. Additional constituents of *Orchis militaris*. J Nat Prod. 1986; 49: 725.

Arnone A, Nasini G, Vajna de Pava O. Marasmane sesquiterpenes from the basidiomycete *Clitocybe hydrogramma*. Phytochemistry 1997; 46: 1099-1101.

Arnone A, De Gregorio C, Nasini G, Vajna de Pava O. Isolation and structure elucidation of tsugicolines F-H, novel furosesquiterpenes, and tsugicoline I from the fungus *Laurilia tsugicola*. Tetrahedron 1998; 54: 10199-10204.

Bai L, Yamaki M, Takagi S. Lignans and a bichroman from *Pleione bulbocodioides*. Phytochemistry 1997; 44: 341-343.

Bai L, Yamaki M, Takagi S. Flavan-3-ols and dihydrophenanthropyranes from *Pleione bulbocodioides*. Phytochemistry 1998; 47: 1125-1129.

Bai L, Yamaki M, Yamagata Y, Takagi S. Shanciol, a dihydrophenanthropyran from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry* 1996; 44: 625-628.

Barros F. Distribuição geográfica de orquídeas do Planalto Central do Brasil. In: Barros F, Kerbauy G. editores. *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica*. São Paulo: SMA, 2004. p.147-153.

Barua AK, Ghosh BB, Ray S, Patra A. Cymbinobin-A, a phenanthraquinone from *Cymbidium aloifolium*. *Phytochemistry* 1990; 29: 3046-3047.

Basqué E, Pautrat F, Zard SZ. A flexible strategy for the divergent modification of pleuromutilin. *Chem Commun.* 2002, 2312-2313.

Batista JAN, Bianchetti LB. An overlooked new species of *Habenaria* (Orchidaceae) from central Brazil. *Novon St. Louis Mo.* 2003;13: 397-402.

Batista JAN, Bianchetti LB, Nogueira RE, Pellizzaro KF, Ferreira FE. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Itacolomi state park, Minas Gerais, Brazil. *Sitentibus* 2004; 4: 25-36.

Behr D, Leander K. Three steroid glycosides of the stigmastane type from *Dendrobium ochreatum*. *Phytochemistry* 1976; 15: 1403-1406.

Benoit PS, Fong HH, Svoboda GH, Farnsworth NR. Biological and phytochemical evaluation of plants. XIV. Antiinflammatory evaluation of 163 species of plants. *Lloydia* 1976; 39: 160-171.

Bhandari SR, Kapadi AH, Majumder PL, Joardar M, Shoolery JN. Nudol, a phenanthrene of the orchids *Eulophia nuda*, *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Phytochemistry* 1985; 24: 801-804.

Bi X, Lopez C, Bacchi CJ, Rattendi D, Woster PW. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16: 3229-3232.

Bond CS, Zhang Y, Berriman M, Cunningham ML, Fairlamb AH, Hunter WN. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure based discovery of new natural product inhibitors. *Structure* 1999; 7: 81-89.

Borba EL, Trigo JR, Semir J. Variation of diastereoisomeric pyrrolizidine alkaloids in *Pleurothallis* (Orchidaceae). *Biochem Sys Ecol.* 2001; 29: 45-52.

Borges A, Cunningham AL, Tovar J, Fairlamb AH. Site-directed mutagenesis of the redox-active cysteines of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *Eur J Biochem.* 1995; 228: 745-752.

Boyd MR. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. In: B. Teicher, editor. *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval.* Totowa: Humana Press; 2004. p. 23-42. [acesso em 2005 Jun]. Disponível em: http://home.ncifcrf.gov/mtdp/full_text/Paper309/Paper309.pdf.

Bradley J. Udem, Lawrence M. Lichtenstein. Fármacos usados no tratamento da asma. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (Ed.). *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.* Chile: Salesianos S.A., 1996.

Brandänge S, Granelli I. Studies on Orchidaceae alkaloids XXXVI. Alkaloids from some *Vanda* and *Vandopsis* species. *Acta Chem Scand.* 1973; 27: 1096-1097.

Brandänge S, Lüning B, Moberg C, Sjöstrand E. Studies on Orchidaceae alkaloids. XXIV. A pyrrolizidine alkaloid from *Phalaenopsis cornu-cervi* Rchb. f. *Acta Chem Scand.* 1971; 25: 349-350.

Brandänge S, Lüning B, Moberg C, Sjöstrand E. Studies on Orchidaceae alkaloids. XXX. Investigation of fourteen *Phalaenopsis* species. A new pyrrolizidine alkaloid from *Phalaenopsis equestris* Rchb.f. *Acta Chem Scand.* 1972; 26: 2558-2560.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; 4: 389-396.

Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iber Micol.* 1998;15: 69-74.

Buckner FS, Verlinde CLMJ, La Flamme AC, van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2592-2597.

Bulpitt CJ. The uses and misuses of orchids in medicine. *Q J Med.* 2005; 98: 625-631

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004; 67: 2141-2153.

Bythrow JD. Vanilla as a medicinal plant. *Semin Integr Méd.* 2005; 3: 129-131.

Calabresi P, Chabner BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, editores. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.* Chile: Salesianos S.A.; 1996. p. 903-907.

Capelari M. *Agaricales* do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (exceto Tricholomataceae); 1989. Mestrado [Dissertação] - Universidade de São Paulo.

Chang SJ, Lin TH, Chen CC. Constituents from the stems of *Dendrobium clavatum* var. *aurantiacum*. *Chin Med J.* 2001; 12: 211-218.

Chen CC, Wu LG, Ko FN, Teng CM. Antiplatelet aggregation principles of *Dendrobium loddigesii*. *J Nat Prod.* 1994; 57: 1271-1274.

Circosta C, Limardi F, Occhiuto F. Antibronchospastic activity of flavonol glycosides of different extracts from *Parietaria officinalis* L. *Riv Ital EPPOS* 1992; 3: 42-8.

Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature* 2004; 432: 829-837.

Clericuzio M, Toma L, Vidari G. Fungal Metabolites, 44. Isolation of a new caryophyllane ester from *Lactarius subumbonatus*: Conformational analysis and absolute configuration. *Eur J Org Chem.* 1999; 9: 2059-2065.

Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:3-24.

Club Peruano de Orquideas. [acesso em 2007 Jun]. Disponível em: <http://www.peruorchids.com>.

Dähmen J, Leander K. The structure of parishin, a glucoside from *Vanda parishii*. *Phytochemistry* 1976; 15: 1986-1987.

Dähmen J, Leander K. A new triterpene glucoside from *Cymbidium giganteum*. *Phytochemistry* 1978; 17: 1975-1978.

Desta B. Ethiopian traditional herbal drugs. Part III: Anti-fertility activity of 70 medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1994; 44: 199-209.

Di Blasi G, Sandes ARR. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 2000; 13: 28-32.

Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des.* 2001; 7: 1157-1164.

Du XM, Sun NY, Shoyama Y. Flavonoids from *Goodyera schlechtendaliana*. *Phytochemistry* 2000; 53: 997-1000.

Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 1997; 16: 2590-2598.

Duran S, Karran P. Vanillins: a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 5501-5512.

D'Silva C, Daunes S. The therapeutic potential of inhibitors of the trypanothione cycle. *Expert Opin Investi Drugs* 2002; 11: 217-231.

El Kamar FG, Grossbard ML, Kozuch PS. Metastatic pancreatic cancer: emerging strategies in chemotherapy and palliative care. *Oncologist* 2003; 8: 18-34.

El-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 1998; 49:1651-7.

El-Waer A, Douglas KT, Smith K, Fairlamb AH. Synthesis of n-benzyloxycarbonyl-L-cysteinylglycine 3-dimethylaminopropylamide disulfide: a cheap and convenient new assay for trypanothione reductase. *Anal Biochem.* 1991; 198: 212-216.

Erkel G, Anke T 1997. Products from basidiomycetes. In: Kleinkauf H & von Döhren H (Ed.) *Biotechnology. Products of secondary metabolism.* VCH Verlag, 2a ed. Edition, Vol. 7, pp. 489-533.

Erkel G, Anke T, Sterner O. Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226: 214-221.

Erkel G, Anke T, Gimenez A, Steglich W. Antibiotics from basidiomycetes. xli. Clavicornic acid, a novel inhibitor of reverse transcriptases from *Clavicornia pyxidata* (Pers. ex Fr.) J Antibiot. 1992; 45:29-37.

Estrada S, Rojas A, Mathison Y, Israel A, Mata R. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. Planta Med. 1999; 65: 199-114.

Estrada S, Toscano RA, Mata R. New phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. J Nat Prod. 1999; 62: 1175-1178.

Fairlamb AH. Target discovery and validation with special reference to trypanothione. In: AH, Ridley RG, Vial HJ, editores. Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. Discoveries and drug development. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR); 2003. p. 107-118. Disponível em:< <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/prd-drug.pdf>> Acesso em: maio de 2003.

Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science 1985; 227: 1485-1487.

Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. Annu Rev Microbiol. 1992; 46: 695-729.

Fan C, Wang W, Wang Y, Qin G, Zhao W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. Phytochemistry 2001; 57: 1255-1258.

Ferreira S. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências; 1998.

Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. International J Food Microbiol. 2003; 86: 113-122.

Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. J Appl Microbiol. 2004; 97: 104.

Fisch MH, Flisch BH, Arditti J. Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. Phytochemistry 1973; 12: 437-441.

Fossen T, Øvstedal DO. Anthocyanins from flowers of the orchids *Dracula chimaera* and *D. cordobae*. *Phytochemistry* 2003; 63: 783-787.

Fries DS, Fairlamb AH. Antiprotozoal agents In: Abraham DJ, editor. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents*. 6a ed., Vol. 5, John Wiley & Sons; 2003.

Gawell L, Leander K. The constitution of aduncin, a sesquiterpene related to picrotoxinin, found in *Dendrobium aduncum*. *Phytochemistry* 1976; 15: 1991-1992.

Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune response during human schistosomiasis mansoni X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol*. 1983; 130: 2891-2895.

Gianetti BM, Steffan B, Steglich W, Kupka J, Anke T. Antibiotics from basidiomycetes. Part 24. Antibiotics with a rearranged hirsutane skeleton from *Pleurotellus hypnophilus* (Agaricales). *Tetrahedron* 1986; 42: 3587-3593.

Giulietti AM, Harley RM, Queiroz LP, Wanderley MGL, Van Den Berg C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Cons Biol* 2005; 19: 632-639.

Güvenalp Z, Demirezer LO. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. *Turk J Chem*. 2005; 29: 163-169.

Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assay for trypanothione reductase. *Biochem J*. 2003; 369: 529-537.

Hanssen HP. Sesquiterpene hydrocarbons from *Lentinus lepideus*. *Phytochemistry* 1982; 21: 1159-1160.

Hanssen HP. Sesquiterpene alcohols from *Lentinus lepideus*. *Phytochemistry* 1985; 24: 1293-1294.

Hartig U, Anke T, Scherer A, Steglich W. Antibiotics from basidiomycetes, 36. Leaianafulvene, a sesquiterpenoid fulvene derivative from cultures of *Mycena leaiana*. *Phytochemistry* 1990; 29: 3942 – 3944.

Hawksworth DI. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 1991; 95: 641-655.

Hawksworth DI. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Stud Mycol.* 2004; 50: 9-18.

Hayashi J, Sekine T, Deguchi S, Lin Q, Horie S, Tsuchiya S, Yano S, Watanabe K, Ikegami F. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compound on isolated smooth muscle preparation. *Phytochemistry* 2002; 59: 513-519.

Heinemann U, Benet-Buchholz J, Etzel W, Schindler M. Fluoxastrobin (HEC 5725) – the new dimension in strobilurin fungicides. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 2004; 57: 299-318.

Hellwig V, Dasenbrock J, Schumann S, Steglich W, Leonhardt K, Anke T. New Triquinane-Type Sesquiterpenoids from *Macrocyttidia cucumis* (Basidiomycetes). *Eur J Org. Chem.* 1998; 73-79.

Hernández-Romero Y, Rojas JI, Castillo R, Rojas A, Mata R. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relations of stilbenoids from *Nidema boothii*. *J Nat Prod.* 2004; 67: 160-167.

Honda C, Yamaki M. Phenanthrenes from *Dendrobium plicatile*. *Phytochemistry* 2000; 53: 987-990.

INCA - Instituto Nacional do Câncer Brasil 2004. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/versaofinal.pdf>>. Acesso em: agosto de 2005.

Inoue S, Wakai A, Konishi T, Kiyosawa S. Studies on *Galeola septentrionalis* Reichb. Fil. I. Isolation and structures of the constituents of "Dotuuso". *Yakugaku Zasshi* 1984; 104: 42-49.

Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MD. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Braz J Microbiol.* 2001; 32: 205-210.

Ito H, Miyake M, Nishitani E, Mori K, Hatano T, Okuda T, Konoshima T, Takasaki M, Kozuka M, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer Lett.* 1999;143: 5-13.

Jayaprakasha GK, Rao LJ, Sakariah KK. Antioxidant activities of flavidin in different *in vitro* model systems. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12: 5141-5146.

Jiang J, Xu Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 85: 53-59.

Jin M, Kim M, Kim K B. Induction of cell proliferation and NF- κ activation by a water-soluble glycan from *Lentinus lepideus*. *Int J Immunopharmacol*. 1996; 18: 439-448.
Judd WS, Campbell CS, Kellogg, EA, Stevens PF, Donoghue MJ 1999. *Plant Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, USA. Second Edition, 576p.

Juneja RK, Sharma SC, Tandon JS. Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium*. *Phytochemistry* 1987; 26: 1123-1125.

Kang TH, Jeong SJ, Kim NY, Higuchi, R, Kim YC. Sedative activity of 2 flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin*. *J Ethnopharmacol*. 2000; 71: 321-323.

Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res*. 2003; 90: 55-62.

Keshava C, Keshava N, Ong T, Nath J. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberration in V79 cells. *Mut Res* 1998; 397:149-159.

Kim H-Y, Byung H-M, Lee HJ, Choi DH. Flavonol glycosides from leaves of *Eucommia ulmoides* with glycation inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93: 227-230.

Kim H-Y, Kim YC, Chung SK. Identification and *in vitro* biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J Sci Food Agric*. 2005; 85: 633-640.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA 2001. *Ainsworth & Bisby's: Dictionary of the fungi*. 9a ed., Britain: CABI Publishing, 654p.

Kis Z, Glosse A, Sigg HP, Hruban L, Snatzke G. Die struktur von panepoxydon und verwandten pilzmetaboliten. *Helv Chem Acta* 1970; 53: 1577-1597.

Kizu H, Kaneko EI, Tomimori T. Studies on Nepalese crude drugs. XXVI. Chemical constituents of Panch Aunle, the roots of *Dactylorhiza hatagirea* D. Don. *Chem Pharm Bull.* 1999; 47: 1618-1625.

Kong JM, Goh NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Phamacol Sin.* 2003; 24: 7-21.

Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiology* 2000; 35: 542-552.

Kubo Y, Tanaka A, Yamada K. Dendrobine, an antagonist of β -alanine, taurine and of presynaptic inhibition in the frog spinal cord. *Br. J Pharmacol.* 1983; 78: 709-715.

Kupchan SM, Fessler DC, Eakin MA, Giacobbe TJ. Reaction of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science* 1970; 168: 376-377.

Kupka J, Anke T, Lipmann F 1980. Comparison of the cytotoxic effect of three antibiotics from basidiomycetes in different cell systems p.17. Abstract Annu. Meeting ASM. Washington. D.C.: ASM Press, pp. 489-533. In: *Biotechnology. Products of secondary metabolism.* 2a ed., vol. 7: Kleinkauf, H.& von Döhren, H (Ed.).

Kupka J, Anke T, Gianetti BM, Steglich W. Antibiotics from basidiomycetes. XIV. Isolation and biological characterization of hypnophilin, pleurotellol, and pleurotellic acid from *Pleurotus hypnophilus* (Berk.) Sacc. *Arch Microbiol.* 1981; 130: 223-227.

Kuppusamy U, Muniandy P. Effects of flavonoids on superoxide dismutase: a structure-activity study. *Malaysian J Biochem Mol Biol.* 2004; 10: 15-21.

Lauer U, Anke T, Hansske F. Antibiotics from basidiomycetes. XXXVIII. 2-methoxy-5-methyl-1,4-benzochinone, a thromboxane A2 receptor antagonist from *L. adherens*. *J Antibiot.* 1991; 44: 59-65.

Lawler LJ, Slaytor M. The distribution of alkaloids in new south wales and queensland Orchidaceae. *Phytochemistry* 1969; 8: 1959-1962.

Lee YH, Park JD, Baek NI, Kim SL. *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med.* 1995; 61:178-180.

Lee M-H, Lin, R-D, Shen L-Y, Yang L-L, Yen, J-Y, H W-C. Monoamine oxidase B and free radical scavenging activities of natural flavonóides in *Melastoma candidum* D. Don. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 5551-5555.

Leong YW, Kang CC, Harrison LJ, Powell AD. Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry* 1997; 44: 157-165.

Leong YW, Harrison LJ, Powell AD. Phenanthrene and other aromatic constituents of *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry* 1999; 50: 1237-1241.

Leong YW, Harrison LJ. A biphenanthrene and a phenanthro[4,3-b]furan from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *J Nat Prod.* 2004; 67: 1601-1603.

Levy LM, Cabrera GM, Wright JE, Seldes AM. 5-H-Furan-2-ones from fungal cultures of *Aporpium caryae*. *Phytochemistry* 2003; 62: 239-243.

Li YM, Zhou ZL, Hong YF. Studies on the phenolic derivatives from *Galeola faberi* Rolfe. *Yao Xue Xue Bao* 1993; 28: 766-771.

Lin JH, Liu YC, Hau JP, Wen KC. Parishins B e C from rhizomes of *Gastrodia elata*. *Phytochemistry* 1996; 42: 549-551.

Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich Wolf-Dieter. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2005; 2: 285-299.

Lindström B, Lüning B, Siirala-Hansén K. Studies on Orchidaceae alkaloids. XXVI. A new glycosidic alkaloid from *Malaxis grandifolia* Schltr. *Acta Chem Scand.* 1971; 25:1900-1903.

Lindström B, Lüning B. Studies on Orchidaceae alkaloids. XXXV. Alkaloids from *Hammarbya paludosa* (L.) O.K. and *Liparis keitaoensis* Hay. *Acta Chem Scand.* 1972; 26:2963-2965.

Lomascolo, A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* 1999; 17: 282-288.

Lübken T, Schmidt J, Porzel A, Arnold N, Wessjohann L. Hygrophorones A–G: fungicidal cyclopentenones from *Hygrophorus* species (Basidiomycetes) *Phytochemistry* 2004; 65: 1061–1071.

Lüning B. Studies on Orchidaceae alkaloids-IV. Screening of species for alkaloids 2. *Phytochemistry* 1967; 6: 857-861.

Majumder PL, Bandyopadhyay D, Joardar S. Coelogin and Coelogin: two novel 9,10-dihydrophenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata*. *J C S Perkin I* 1982; 1131-1136.

Majumder PL, Banerjee S. A ring-B oxygenated phenanthrene derivative from the orchid *Bulbophyllum gymnopus*. *Phytochemistry* 1988; 27: 245-248.

Majumder PL, Banerjee S. Two stilbenoids from the orchid *Eria flava*. *Phytochemistry* 1990; 29: 3052-3055.

Majumder PL, Banerjee S, Sen S. Three stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum callosum*. *Phytochemistry* 1996; 2: 847-852.

Majumder PL, Basak M. Cirrhopetalin, a phenanthrene derivative from *Cirrhopetalum andersonii*. *Phytochemistry* 1990; 29: 1002-1004.

Majumder PL, Basak M. Two bibenzyl derivatives from the orchid *Cirrhopetalum andersonii*. *Phytochemistry* 1991; 30: 321-324.

Majumder PL, Datta N, Sarkar AK, Chakraborti J. Flavidin, a novel 9,10-dihydrophenanthrene derivative of the orchids *Coelogyne flavida*, *Pholidota articulate* and *Otochilus fusca*. *J Nat Prod.* 1982; 45:730-732.

Majumder PL, Ghosal S. Two stilbenoids from the orchid *Arundina bambusifolia*. *Phytochemistry* 1993; 32: 439-444.

Majumder PL, Ghosal S. Two stilbenoids from the orchid *Arundina bambusifolia*. *Phytochemistry* 1994; 35: 205-208.

Majumder PL, Guha S, Sen S. Bibenzyl derivatives from the orchid *Dendrobium amoenum*. *Phytochemistry* 1999; 52: 1365-1369.

Majumder PL, Kar A. Confusarin and confusaridin, two phenanthrene derivatives of the orchid *Eria confusa*. *Phytochemistry* 1987; 26: 1127-1129.

Majumder PL, Kar A. Erianol, a 4 α -methylsterol from the orchid *Eria convallarioides*. *Phytochemistry* 1989; 28: 1487-1490.

Majumder PL, Kar A, Shoorley. Bulbophyllanthrin, a phenanthrene of the orchid *Bulbophyllum leopardium*. *Phytochemistry* 1995; 24: 2083-2087.

Majumder PL, Lahiri S. Lusianthrin and lusianthridin, two stilbenoids from the orchid *Lusia indivisa*. *Phytochemistry* 1990a; 29: 621-623.

Majumder PL, Lahiri S. Volucrin, a new dimeric phenanthrene derivative from the orchid *Lusia volucris*. *Phytochemistry* 1990b; 46: 3621-3626.

Majumder PL, Lahiri S, Mukhoti N. Chalcone and dihydrochalcone derivatives from the orchid *Lusia volucris*. *Phytochemistry* 1995; 40: 271-274.

Majumder PL, Lahiri S, Mukhoti N. Four stilbenoids from the orchid *Agrostophyllum khasiyanum*. *Phytochemistry* 1996; 42: 1157-1161.

Majumder PL, Maiti DC. Flaccidin, a 9,10-dihydrophenanthropyran derivative from the orchid *Coelogyne flaccida*. *Phytochemistry* 1988; 27: 899-901.

Majumder PL, Majumder S, Sen S. Triterpenoids from the orchids *Agrostophyllum brevipes* and *Agrostophyllum callosum*. *Phytochemistry* 2003; 62: 591-596.

Majumder PL, Pal S. A steroidal ester from *Coelogyne uniflora*. *Phytochemistry* 1990; 29: 2717-2720.

Majumder PL, Pal S. Rotundatin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative from *Dendrobium rotundatum*. *Phytochemistry* 1992; 31: 3225-3228.

Majumder PL, Pal S. Rotundatin, a new 9,10-dihydrophenanthrene derivative from *Dendrobium rotundatum*. *Phytochemistry* 1992; 31:3225-3228.

Majumder PL, Pal S, Joardar M. Cirrhopetalanthrin, a dimeric phenanthrene derivative from the orchid *Cirrhopetalum maculosum*. *Phytochemistry* 1990; 29: 271-274.

Majumder PL, Pal S, Majumder S. Dimeric phenanthrenes from orchids *Bulbophyllum reptans*. *Phytochemistry* 1999; 50: 891-897.

Majumder PL, Roychowdhury M, Chakraborty S. Bibenzyl derivatives from the orchid *Bulbophyllum protractum*. *Phytochemistry* 1997; 44: 167-172.

Majumder PL, Roychowdhury M, Chakraborty S. Thunalbene, a stilbene derivative from the orchid *Thunia alba*. *Phytochemistry* 1998; 49: 2375-2378.

Majumder PL, Sarkar AK, Chakraborti J. Isoflavidinin and iso-oxoflavidinin, two 9,10-dihydrophenanthrenes from the orchids *Pholidota articulate*, *Otochilus porecta* and *Otochilus fusca*. *Phytochemistry* 1982; 21: 2713-2716.

Majumder PL, Sen S 1987. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the orchid *Dendrobium moscatum*. *Phytochemistry* 26: 2121-2124.

Majumder PL, Sen S. Pendulin, a polyoxygenated phenanthrene derivative from the orchid *Cymbidium pendulum*. *Phytochemistry* 1991; 30: 2432-2434.

Majumder PL, Sen S, Banerjee. Agrostophyllol and isoagrostophyllol, two novel diastereomeric 9,10-dihydrophenanthropyran derivatives from the orchid *Agrostophyllum callosum*. *Tetrahedron* 1999; 55: 6691-6702.

Majumder PL, Sen S, Majumder S. Phenanthrene derivatives from the orchid *Coelogyne cristata*. *Phytochemistry* 2001; 58: 581-586.

Marbry TJ, Markham KR, Thomas MB 1970. The systematic identification of flavonoids Berlin: Springer-Verlag. 354p.

Manako Y, Wake H, Tanaka T, Shimomura K, Ishimaru K. Phenanthropyran derivatives from *Phalaenopsis equestris*. *Phytochemistry* 2001; 58: 603-605.

Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews* 2002; 2: 143-148.

Mans D R A, Rocha AB, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 2000; 5: 185-198.

Matsumara K, Ishihara K, Mizushina Y, Mori M, Nakajima N. Anti-angiogenic activity of quercetin and its derivatives. *Lett Drugs Des Discovery* 2004; 1: 329-333.

Melzig MF, Pertz HH, Krenn L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae herba*. *Phytomedicine* 2001; 8: 225-229.

Min BS, Nakamura N, Miyashiro H, Bae KW, Hattori M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull.*1998; 46: 1607-1612.

Mittermeier RA, Gil PR, Mittermeier, CG 1997. Megadiversity: earth's biologically wealthiest nations. Mexico: CEMEX, Agrupación Sierra Madre.

Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura SI, KameoKa H. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J Agric Food Chem.* 1997; 45: 2849-2853.

Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura SI, Sugiura W, Kosaka H, KameoKa H. Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antumutagenic activity. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 2163-2167.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal Natl Cancer Inst.* 1991; 83:757-766.

Morita H, Fujiwara M, Yoshida N, Kobayashi J. New picrotoxinin-type and dendrobine-type sesquiterpenoids from *Dendrobium* Snowflake 'Red Star'. *Tetrahedron* 2000; 56: 5801-5805.

Mothana RAA, Awadh Ali NA, Jansen R, Wegner U, Mentel R, Lindequist U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia* 2003; 74: 177-180.

NAPRALERT. Org [homepage na Internet]. Chicago: Natural Products Database. [atualizada em , acesso em 2005 Aug]. Disponível em: <<http://www.stninternational.de/stndatabases/databases/napraler.html>>.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000; 17: 215-234.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003; 66: 1022-1037.

Nishida R, Tan KH, Wee SL, Hee AKW, Toong YC. Phenylpropanoids in the fragrance of the fruit fly orchid, *Bulbophyllum cheiri*, and their relationship to the pollinator, *Bactrocera papayae*. *Biochem Sys Ecol.* 2004; 32: 245-252.

Niwa M, Kihira N, Hirata Y, Tori M, Wu TS, Kuoh CS 1987. Cis-clerodane-type diterpene lactones from *Ephemerantha comata*. *Phytochemistry* 26: 3293-3295.

Noda N, Kobayashi Y, Miyahara K, Fukahori S. 2,4-bis(4-hydroxybenzyl)phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochemistry* 1995; 39: 1247-1248.

Nodari RO, Guerra MP. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Ros Petrovick P, editores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Rio grande do sul: Editora da Universidade/ufrgs/ editora da ufsc; 2002. p. 13-26.

Oliveira JM, Jordão BQ, Ribeiro LR, Eira AF, Mantovani MS. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 1775-1780.

Pabst GFJ. Orquídeas do cerrado. In: Ferri MG, coordenador. *III Simpósio sobre o Cerrado*. São Paulo: Edgard Blücher et Universidade de São Paulo; 1971. p. 161-163.

Pabst GFJ, Dungs F. *Orchidaceae Brasiliensis* – Hildesheim: Brücke – Verlag; 1975.

Paccola AS, Maki CS, Nobrega GMA, Paccola-Meirelles LD. Antagonistic effect of edible mushrooms extract on *Candida albicans* growth. *Braz J Microbiol.* 2001; 32: 176-178.

Pagani, F. 1976. *Boll. Chim. Farm.* 115: 407. In: Williams CA. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry* 1979; 18: 803-813.

Pecoul B, Chirac C, Trouiller P, Pinel J. Access to essential drugs in poor countries: A lost battle? *J Am Med Assoc.* 1999; 281: 361-367.

Pegler DN 1983. The genus *Lentinus* a world monography. *Kew Bulletin Additional Series* 10.

Pio Corrêa M 1984. Dicionário das Plantas Utéis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 777p.

Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Cvitkovic E, Waters SJ, Larsen AN. Enhanced antitumor activity of irifolven in combination with 5-fluorouracil and cisplatin in human colon and ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2003; 23:1347-1355.

Reis MG, Faria AD, Bittrich V, Amaral MCE, Marsaioli AJ. The chemistry of flower rewards – *Oncidium* (Orchidaceae). *J Braz Chem Soc.* 2000; 11: 600-608.

Reis MG, Faria AD, Amaral MCE, Marsaioli AJ. Oncidinol – a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) flora oil. *Tetrahedron Lett.* 2003; 44: 8519-8523.

Ripley PH, Klein U, Mars A, Merialdi G, Bonilauri P, Kessler M. Trends in resistance patterns of *Brachyspira pilosicoli* to valnemulin (Econor®) in Europe and the USA Papers on Econor presented at the 18th International Pig Veterinary Society Congress Hamburg, Germany. 2004 Jun [acesso em 2005 Fev 27]; Disponível em: <www.econor.com/pdf/18th%20IPVS%20Papers%20-%20Econor%20-%20final.pdf>.

Rolén T. Taxonomy and phylogeny of *Lentinus* Fr. and *Panus* Fr. (Basidiomycota-Polyporaceae) from Costa Rica, 2001. Thesis, University of Oslo, Oslo, Norway.

Rosa LH. Substâncias bioativas produzidas por fungos basidiomicetos tropicais. Minas Gerais; 2004. Doutorado [Tese em Ciências Biológica - Microbiologia] - Universidade Federal de Minas Gerais.

Rosa LH, Machado KMG, Jacob CC, Capelari M, Rosa CA, Zani CL. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 967-974.

Rukachaisirikul V, Tansakul C, Saithong S, Pakawatchai C, Isaka M, Suvannakad R. Hirsutane sesquiterpenes from the fungus *Lentinus connatus* BCC 8996. *J Nat Prod.* 2005; 68: 1674-1676).

Rute V, Mota-Filipe H, Teixeira G, Borges C, Rodrigues AI, Teixeira A, Paula A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol.* 2004; 93: 363-370.

Sachdev K, Kulshreshtha DK. Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry* 1986; 25: 499-502.

Saito N, Ku M, Tatsuzama F, Lu TS, Yokoi M, Shigihara A, Honda T. Acylated cyaniding glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry* 1995; 40: 1523-1529.

Saito N, Toki K, Uesato K, Shigihara A, Honda T. An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*. *Phytochemistry* 1994; 37: 245-248.

Schirmer RH, Müller JG, Krauth-Siegel RL. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for Trypanosomiasis and malaria. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1995; 34:141-154.

Schidmidt A, Krauth-Siegel RL. Enzymes of the Trypanothione metabolism as target for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2: 1239-1259.

Seidl PR. Prospects for Brazilian natural products. *An Acad Bras Cienc.* 1999; 71: 239-247.

Sekiguchi J, Gaucher, GM. Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochem. J.* 1979, 182: 445-453.

Sekizawa R, Ikeno S, Nakamura H, Naganawa H, Matsui S. Panepophenanthrin from a mushroom strain, a novel inhibitor of the ubiquitin-activating enzyme. *J Nat Prod.* 2002; 65:1491-1493.

Sempinska E, Kostla B, Krolikowska M, Kalisiak, E. Effect of flavonoids on the platelet adhesiveness in repeatedly bred rats. *Polish J Pharmacol Pharm.* 1977; 29: 7-10.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 117-143.

Sheng-Yang H, Shi JG, Yang YC, Hu S. Studies on the chemical constituents of *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter. *Yao Xue Xue Bao* 2002; 37: 199-203.

Sheng-Yang H, Shi JG, Yang YC, Tu PF. Two new tartrate derivative glucosides from *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter. *Chin Chem Lett.* 2003; 14: 814-817.

Sheng-Yang H, Shi JG, Mo SY, Wang SJ, Yang YC. Chemical constituents of the rhizomes of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum*. J Asian Nat Prod Res. 2004; 6: 49-61.

Shibata CK, Demiate, IM. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde Ponta Grossa 2003; 9: 21-32

Shotwell JB, Hu S, Medina E, Abe M, Cole R, Crewsb CM, Wooda JL. Efficient stereoselective syntheses of isopanepoxydone and panepoxydone: a re-assignment of relative configuration. Tetrahedron Letters 2000, 41: 9639–9643.

Silverstein RM, Bassler GC, Morrill, TC. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994.

Simon, B, Anke T, Anders U, Neuhaus M, Hansske F. Collybial, a new antibiotic sesquiterpenoid from *Collybia confluens* (Basidiomycetes). Z Naturforsch. 1995; 50c:173-180.

Stermitz FR, Suess TR, Fink NH, Puzziferri N. Phytochemical screening of some rocky mountain plants. J Nat Prod. 1981; 44: 693-695.

Strack D, Bush E, Klein E. Anthocyanin patterns in European orchids and their taxonomic and phylogenetic relevance. Phytochemistry 1989; 28: 2127-2139.

Strack D, Bush E, Wray V, Grotjahn L, Klein E. Cyanidin 3-oxalyglucoside in orchids. Z. Naturforsch. 1986; 41:707-711.

Stamets P. Novel antimicrobial from mushrooms. Herbalgram 2002; 54: 28-33.

Tagushi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim IH. Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. Chem Pharm Bull. 1981; 29: 55-62.

Takagi S, Yamaki M, Inoue K. Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. Phytochemistry 1983; 4: 1011-1015.

Takazawa H, Kashino S. Incarnal A new antibacterial sesquiterpene from Basidiomycetes. Chem Pharm Bull. 1991; 39: 555–557.

Talapra SK, Bhaumik A, Talapra B. Denfigenin, a diosgenin derivative from *Dendrobium fimbriatum*. Phytochemistry 1992; 7: 2431-2434.

Tatsuzawa F, Saito N, Seki H, Hara R, Yokoi M, Honda T. Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. *Phytochemistry* 1997; 45: 173-177.

Tatsuzama F, Saito N, Yokoi M, Shigihara A, Honda T. An acylated cyanidin glycoside in the red-purple flowers of x *Laeliocattleya* cv mini purple. *Phytochemistry* 1994; 37: 1179-1183.

Tatsuzawa F, Saito N, Seki H, Yokoi M, Yukawa T, Shinoda K, Honda T. Acylated anthocyanins in the flowers of *Vanda* (Orchidaceae). *Biochem Sys Ecol.* 32: 2004; 651-664.

Tezuka Y, Ueda M, Kikuchi T. Studies on the constituents of orquidaceous plants. VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames var. *amoena* (M. Bieberson) Hara. (1) Isolation and structure elucidation of spiranthol-A, spiranthol-B, and spirasineol-A, new isopentenylidihydrophenanthrenes. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37: 3195-3199.

Tezuka Y, Hirano H, Kikuchi T, Xu GJ. Constituents of *Ephemerantha lonchophylla*. Isolation and structure elucidation of new phenolic compounds, ephemeranthol-A, ephemeranthol-B, and ephemeranthoquinone, and of a new diterpene glucoside, ephemeranthoside. *Chem Pharm Bul.* 1991;39: 593-598.

Tira S. Monocotyledonae Orchidaceae. Isoquercitrin from *Orchis sambucina*. *Phytochemistry* 1971;10: 1975-1976.

Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5311-5316.

Toscano L AB, Moraes MM Saiba mais sobre orquídeas. [homepage na Internet]. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2002. [acesso em 2005 maio]. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br/saibamais/orquideas>>.

Tsai TF, Hsieh CH, Lin YS, Tsai WJ, Kuo YC. Enhancement of cell proliferation and cytokines production in human peripheral blood mononuclear cells by extracts from blood-enriching dang-gui decoction. *J Chin Med.* 2001; 12: 191-202.

Valencia-Islas NA, Paul RN, Shier WT, Mata R, Abbas HK. Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna paucicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry* 2002; 61: 141-148.

Van Laar ES, Weitman S, MacDonald JR, Waters SJ. Antitumor activity of irifolven monotherapy and in combination with mitoxantrone or docetaxel against human prostate cancer models. *Prostate* 2004; 59: 22-32.

Veerraju P, Rao Prakasa NS, Rao Jagannadhana L, Rao Jagannadha KV, Rao Mohana PR. Amoenumin, a 9,10-dihydro-5H-phenanthro-(4,5-b,c,d)pyran from *Dendrobium amoenum*. *Phytochemistry* 1989; 28: 950-951.

Waechter JL, Baptista LRM 2004. Abundância e distribuição e distribuição de orquídeas epifíticas em uma floresta turfosa do Brasil meridional. In: Barros F & Kerbauy GB (Org.). *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica*. São Paulo: SMA, p. 135-145.

Wagner H, Bladt S, Zgainski Plant drug analysis. a thin layer chromatography atlas. Germany: Springer-Verlag; 1984.

Wasser S, Weis A. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 1999; 19: 65-96.

Wasser SP. Review of medicinal mushrooms advances: good news from old allies. *HerbalGram* 2002; 56: 28-33.

WHO. Org. Chagas Disease: Strategic Direction for Research. Disease Burden and Epidemiological Trends. Suíça: The World Health Report, 2002 [acesso 2005 Ago]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>.

WHO. Org. Leishmaniasis, World Health Organization, Geneva. Suíça: The World Health Report, 2004 [acesso 2005 Ago]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.

Williams CA 1979. The leaf flavonoids of the Orchidaceae. *Phytochemistry* 18: 803-813.

Williams CA, Greenham J, Harbone JB, Kong JM, Chia LS, Goh NK, Saito N, Toki K, Tatsuzawa F. Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv. 'Pompadour'. *Biochem Sys Ecol*. 2002; 30: 667-675.

Wilson DM, Fenical W, Hay M, Lindquist N, Bolser R. Habenariol, a freshwater feeding deterrent from the aquatic orchid *Habenaria repens* (Orchidaceae). *Phytochemistry* 1999; 50: 1333-1336.

Yamaki M, Bai L, Kato T, Inoue K, Takagi S, Yamagata Y, Tomita KI. Blespirol, a phenanthrene with a spiro-lactone ring from *Bletilla striata*. *Phytochemistry* 1993; 33: 1497-1498.

Ye Q, Qin G, Zhao W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile*. *Phytochemistry* 2002; 61: 885-890.

Yeskaliyeva B, Mesaik MA, Abbaskhan A, Kulsoom A, Burasheva GSH, Abilov ZHA, Choudhary MI, Atta-Ur-Rahman. Bioactive flavonoids and saponins from *Climacoptera obtusifolia*. *Phytochemistry* 2006; 67: 2392-2397.

Yi-Ming L, Zhuo-Lun Z, Yong-Fu H. New phenolic derivatives from *Galeola faberi*. *Planta Med.* 1993; 59: 363-365.

Yunes RA, Cechinel Filho V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Calixto JB, Yunes RS, editores. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Editora Universitária Argos; 2001. p. 237-296.

Zenteno R, Chávez R, Portugal D, Páez A, Lascurain R, Zenteno E. Purification of a n-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Phytochemistry* 1995; 40: 651-655.

Zhang C, Li C, Lian L, Chen Q, Abdulmalik O, Vassilev V, Lai CS, Asakura T. Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an *in vivo* study using rodents. *Br J Haematol.* 2004; 125: 788-795.

Zhang GH, Lin-Yang Z, Annie Bligh SW, Guo YL, Zhang CF, Zhang M, Wang ZT, Xu LS. Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thyrsiflorum*. *Phytochemistry* 2005; 66: 1113-1120.

Zhao C, Liu Q, Halaweish F, Shao B, Ye Y, Zhao W. Copacamphane, picrotoxane, and alloaromadendrane sesquiterpene glycosides and phenolic glycosides from *Dendrobium moliniforme*. *J Nat Prod.* 2003; 66: 1140-1143.

Zhao W, Ye Q, Tan X, Jiang H, Li X, Chen K, Kinghorn AD. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. J Nat Prod. 2001; 64: 1196-1200.

Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. J Nat Prod. 2004; 67: 300-310.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)