

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica* (MELIACEAE)

ELAINE RODRIGUES FIGUEIREDO

VOLUME 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
JULHO - 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica* (MELIACEAE)

ELAINE RODRIGUES FIGUEIREDO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Ivo José Curcino Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO - 2010

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica* (MELIACEAE)

ELAINE RODRIGUES FIGUEIREDO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 23 de julho de 2010

Comissão Examinadora:

Profa. Lanamar de Almeida Carlos (Doutora, Produção Vegetal) – UFSJ-MG

Profa. Maria Raquel Garcia Veja (Doutora, Ciências)

Prof. Walter Luis B. Medeiros (Doutor, Química Orgânica) – IFF - Campos-RJ

Prof. Ivo José Curcino Vieira (Doutor, Ciências) - UENF
Orientador

*“Guiar-me-ás com o Teu conselho, e depois
me receberás em glória.” Salmos, 73:24*

*Ofereço este trabalho a Deus, que tem me
sustentado a todo momento,*

*Aos meus pais,
dedico sempre!*

AGRADECIMENTO

A Jesus Cristo, acima de qualquer coisa, agradeço pela minha vida, sustento e pelas vitórias;

Ao meu orientador, professor Ivo, que me confiou o trabalho em equipe, orientando-me de forma a obter o crescimento científico, ético e humano. Agradeço também sempre pela paciência e disponibilidade que me dispensou em todos os momentos requisitados;

Ao professor Raimundo Braz Filho, pela co-orientação, pelas informações valiosas ao longo da jornada científica e por toda a atenção;

Aos professores Edmilson José Maria do LCQUI-UENF, Silvério de Paiva Freitas e Walter Luis Brasil Medeiros do IFF-Campos dos Goytacazes pela contribuição no ato da qualificação, bem como ao professor Carlos Mattos pela contribuição em toda a jornada de trabalho;

Ao professor Milton, do Laboratório de Biologia do Reconhecer do CBB-UENF, pela grande ajuda na provenção da realização dos ensaios antitumorais, que diretamente não seriam possíveis sem a grande ajuda dos amigos Layla e Willian;

Aos professores Antonio Eduardo Miller Crotti, da UNIFRAN-SP, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, do Departamento de Farmácia do Centro de

Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - UFCE e Lanamar de Almeida Carlos, da UFSJ e à aluna Juliana, pela contribuição na realização dos ensaios biológicos e pelo incentivo ao processo acadêmico-científico;

Aos colegas Ana Cristina, Cecília, Gisele, Fernanda, Hádria, Heloisa, Jucimar, Marcelo, Milena, Roberta, Vinícius e Virgínia pelo agradável ambiente e convívio, bem como experiências trocadas em meio a tantos “cafés”. Agradeço especialmente a Lara pela dedicação nas análises de RMN ^1H e ^{13}C e pelo carinho na jornada e a Moema, pela realização dos testes biológicos, pelo carinho, incentivo e motivação durante estes anos de convívio;

À professora Raquel pela contribuição na obtenção de espectros de RMN na UFRRJ, onde igualmente agradeço aos técnicos Maurício, da UFRRJ, Renata e Ceíça da UFCE;

Um agradecimento especial a dois colegas de trabalho de laboratório, Vagner Aquino e Wagner Terra. A contribuição inicial e dedicação durante todo o trabalho de Vagner foi imprescindível na realização deste trabalho e deixo aqui meu agradecimento sincero. Agradeço igualmente a Wagner pelo profissionalismo e dedicação dispensada ao trabalho;

Às funcionárias Tânia, da Secretaria do Laboratório de Ciências Químicas; Fátima, Luciana e Patrícia, da Secretaria da Pós-Graduação do CCTA pelo apoio necessário;

À Técnica de Laboratório Maristela pelo carinho e pela obtenção das análises de Infravermelho e Ultravioleta.

Aos demais funcionários, técnicos, professores e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Jorgina e Antonio Carlos, pela presença e apoio em todo o momento, à minha irmã Rose pelo carinho expresso e ao meu sobrinho Pedro Lucas pelas conversas ao telefone que tornaram momentos tensos em momentos muito mais suaves com sua simplicidade e amor expresso em perguntas como “quantos dias faltam pra você chegar?”

Às amigas Karine, Vivian, Merinha, Joice e familiares pelo apoio incondicional, incentivo na continuidade deste trabalho, pelos momentos de risos e choros e pela receptividade em família. Obrigada por tudo!

A FAPERJ, UENF e CNPq pelo suporte financeiro concedido sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xvi
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. FAMÍLIA MELIACEAE.....	6
3.1.1. Atividades biológicas de espécies da família Meliaceae	7
3.1.2. Constituintes químicos de Meliaceae.....	10
3.2. O GÊNERO <i>Trichilia</i>	14
3.2.1. Atividades Biológicas do Gênero <i>Trichilia</i>	36

3.2.2. <i>Trichilia casarettii</i> C. DC.....	41
3.2.2.1. Aspectos botânicos e geográficos de <i>Trichilia casarettii</i> C. DC.	42
3.2.3. <i>Trichilia silvatica</i> C. DC.....	44
3.2.3.1. Aspectos botânicos e geográficos de <i>Trichilia silvatica</i> C. DC.	
3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	47
3.3.1. <i>Artemia salina</i> Leach.....	47
3.3.2. Teste anticancerígeno.....	47
3.3.3. <i>Aedes aegypti</i>	48
3.3.4. Microorganismos presentes na flora bucal.....	49
3.3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4. MATERIAIS E METODOLOGIA UTILIZADA.....	51
4.1. ESCOLHA DA PLANTA.....	51
4.2. COLETA DA PLANTA.....	51
4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	52
4.4. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	57
4.4.1. Isolamento dos constituintes químicos de <i>T. casarettii</i>	58
4.4.1.1. Extrato em diclorometano dos galhos (TCLD).....	58
4.4.1.1.1. Isolamento do constituinte químico da fração TCLD-4....	58
4.4.1.2. Extrato hexânico das folhas (TCFH).....	60
4.4.1.2.1. Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-5...	60
4.4.1.2.2. Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-7...	61
4.4.1.2.3. Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-9...	61
4.4.1.3. Extrato metanólico das folhas (TCFM).....	63
4.4.1.3.1. Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-5...	63
4.4.1.3.2. Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-6...	64
4.4.1.3.3. Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-7...	65
4.4.2. Isolamento dos constituintes químicos de <i>T. silvatica</i>	68

4.4.2.1. Extrato em diclorometano dos galhos (TSLD).....	68
4.4.2.1.1 Isolamento do constituinte químico da fração TSLD-9.....	68
4.4.2.2. Extrato em acetato de etila das folhas (TSFA).....	69
4.5. TESTES BIOLÓGICOS.....	70
4.5.1. Atividade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.....	70
4.5.2. Atividade antitumoral – Linhagens de células tumorais não-pequenas do pulmão H460.....	71
4.5.3. Atividade larvicida frente <i>Aedes aegypt</i>	72
4.5.4. Atividade antimicrobiana.....	72
4.5.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	72
4.5.4.1.1. Método de Determinação.....	74
4.5.4.1.1.1. Difusão em Ágar.....	74
4.5.4.1.1.2. Método das Diluições Seriadas.....	75
4.5.4.2. Patógenos na Flora Bucal.....	75
4.5.4.2.1. Outros Microorganismos Presentes na Flora Bucal.....	76
4.5.4.2.1.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição em caldo usando microplacas.....	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
5.1. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Trichilia casarettii</i> E <i>Trichilia silvatica</i>	79
5.1.1. Determinação estrutural dos triterpenos cicloartanos.....	81
5.1.1.1. Determinação estrutural de ELA-2.....	83
5.1.1.2. Determinação estrutural de ELA-19.....	87
5.1.1.3. Determinação estrutural de ELA-22.....	90
5.1.1.4. Determinação estrutural de ELA-29.....	94
5.1.1.5. Determinação estrutural de ELA-13.....	97
5.1.2. Determinação estrutural dos esteróides.....	100
5.1.2.1. Determinação estrutural de ELA-11.....	100
5.1.2.2. Determinação estrutural de ELA-18.....	102
5.1.2.3. Determinação estrutural de ELA-14.....	106

5.1.3. Determinação estrutural do diterpeno ELA-10.....	109
5.1.4. Determinação estrutural do triterpeno ELA-12.....	111
5.1.5. Determinação estrutural do sesquiterpeno ELA-26.....	114
5.1.6. Determinação estrutural da cumarina ELA-16.....	117
5.2. TESTES BIOLÓGICOS.....	119
5.2.1. <i>Artemia salina</i> Leach.....	119
5.2.2. Teste antitumoral.....	120
5.2.3. <i>Aedes aegypti</i>	120
5.2.4. Atividade antimicrobiana.....	121
5.2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	121
5.2.4.1.1. Avaliação do efeito de cada extrato do Quadro 3, p. 74 sobre as seis cepas de <i>S. aureus</i>	125
5.2.4.1.2. Avaliação de concentrações diversas do extrato 5 (TSMa) sobre as cepas ATCC25923 e LSA88 através da contagem de UFC.....	126
5.2.4.2. Microorganismos na Flora Bucal.....	127
5.2.4.2.1. <i>Streptococcus mutans</i>	127
5.2.4.2.2. Outros Microorganismos na Flora Bucal.....	127
6. CONCLUSÃO.....	129
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Cepas de <i>S. aureus</i> utilizados nos testes de inibição pelo método de difusão em Ágar.....	73
Quadro 2.	Descrição dos extratos obtidos a partir dos gêneros <i>Trichilia</i> ..	74
Quadro 3.	Descrição dos extratos testados na segunda etapa de testes.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gêneros da família Meliaceae (Waterman e Grundon, 1983).	7
Tabela 2.	Algumas atividades biológicas apresentadas por espécies de <i>Trichilia</i>	39
Tabela 3.	Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano dos galhos.....	58
Tabela 4.	Fracionamento cromatográfico da fração TCLD-4.....	59
Tabela 5.	Fracionamento cromatográfico da fração TCLD-4-5.....	59
Tabela 6.	Fracionamento cromatográfico da fração hexânica das folhas.....	60
Tabela 7.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-5.....	60
Tabela 8.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-7.....	61
Tabela 9.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-9.....	62
Tabela 10.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-9-4.....	62
Tabela 11.	Fracionamento cromatográfico da fração metanólica das folhas.....	63
Tabela 12.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-5.....	63
Tabela 13.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-6.....	64
Tabela 14.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7.....	65

Tabela 15.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-5.....	65
Tabela 16.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-6.....	66
Tabela 17.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-9.....	67
Tabela 18.	Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-9-2.....	67
Tabela 19.	Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano dos galhos.....	68
Tabela 20.	Fracionamento cromatográfico da fração TSLD-9.....	69
Tabela 21.	Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas	70
Tabela 22.	Extratos testados frente ao microorganismo <i>Streptococcus mutans</i>	76
Tabela 23.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância ELA-2 , em CDCl ₃ , e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Dados de RMN ¹³ C dos modelos ELA-2a (¹ H a 600 MHz, Py-d ₅ + D ₂ O) e ELA-2b	86
Tabela 24.	Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância ELA-19 , em CDCl ₃ , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, em comparação com valores da literatura para o 24-metilenocicloartano-3β,22-diol (ELA-19a).....	89
Tabela 25.	Dados de RMN ¹ H (500 MHz) (CDCl ₃) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância ELA-22 , em piridina-d ₅ , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.....	93
Tabela 26.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância ELA-29 e ELA-29a , em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.....	96
Tabela 27.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância ELA-13 , em CDCl ₃ , e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.....	99
Tabela 28.	Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ , para a mistura de esteróides e comparação com valores de literatura (Moreira, 2009). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.....	101
Tabela 29.	Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) do esteróide ELA-18 em CDCl ₃ , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos δ estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz.....	105
Tabela 30.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura ELA-14 , em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ)	

	estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i>) em Hz...	108
Tabela 31.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) do diterpeno ELA-10 , em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.....	110
Tabela 32.	Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância ELA-12 , e do triterpeno lupeol em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.....	113
Tabela 33.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C-APT (100 MHz) do sesquiterpeno ELA-26 em CDCl ₃ , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.....	116
Tabela 34.	Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância ELA-16 , em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (<i>J</i>) em Hz.....	118
Tabela 35.	Extratos testados de <i>Trichilia casarettii</i> com respectivos resultados.....	119
Tabela 36.	IC ₅₀ para extratos testados frente às células tumorais NCI-H460.....	120
Tabela 37.	Extratos brutos analisados com relação à atividade larvicida de <i>Aedes Aegypti</i>	121
Tabela 38.	Valores médios, em milímetros, dos diâmetros dos halos de inibição provenientes dos tratamentos (extratos mencionados no Quadro 3 , p. 74) com numeração de 1 a 7, pelo controle positivo (Gentamicina) e pelo controle negativo (DMSO p.a.).....	123
Tabela 39.	Avaliação da atividade do extrato 5 frente às cepas ATCC 25923 e LSA88.....	126
Tabela 40.	Concentração mínima inibitória frente aos microorganismos da flora bucal.....	128

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Substâncias com representação química e biológica importantes na Química de Produtos Naturais.....	3
FIGURA 2.	Folhas da espécie <i>Trichilia casarettii</i> (Figueiredo, 2006a).....	41
FIGURA 3.	Tronco da espécie <i>Trichilia casarettii</i> (Figueiredo, 2006b).....	41
FIGURA 4.	<i>Trichilia casarettii</i> C. DC. A, hábito. B, inflorescência. C, flor sem corola, mostrando o tubo estaminal. D, flor em corte longitudinal, mostrando androceu e gineceu. E, pétala. F, gineceu. G, tubo estaminal aberto – face ventral. H, fruto. I, semente.....	43
FIGURA 5.	Espécie <i>Trichilia silvatica</i> (Figueiredo, 2006c).....	44
FIGURA 6.	<i>Trichilia silvatica</i> C. DC. A, hábito. B, flor estaminada. C, flor em corte longitudinal, mostrando androceu e gineceu. D, tubo estaminal aberto – face dorsal. E, pétala. F, flor pistilada. G, gineceu. H, tubo estaminal aberto – face dorsal. I, fruto.....	46
FIGURA 7.	Substâncias isoladas das espécies <i>Trichilia casarettii</i> e <i>Trichilia silvatica</i>	80
FIGURA 8.	Esqueleto carbônico básico de um triterpeno cicloartânico.....	81
FIGURA 9 a 123.	vol. 2
FIGURA 124.	Interações espaciais apresentadas no mapa de correlação ¹ H- ¹ H-NOESY do sesquiterpeno ELA-26	116
FIGURA 125 a 128.	vol. 2

- FIGURA 129.** Atividade antimicrobiana contra as cepas SE (A), LSA (B), SD (C), ATCC (D), COL (E) e RN (F). TCMA (1), TCFB (2), TCFM (3), TSMD (4), solvente DMSO p.a. (5) e Gentamicina (6)..... 122
- FIGURA 130.** Formação dos halos de inibição dos extratos do Quadro 3, p. 74 [(1) TCMM, (2) TCMB, (3) TCFH, (4) TCFA, (5) TSMA, (6) TSMB, (7) TSFM, (G) Gentamicina na concentração 10 µg/mL e (D) DMSO p.a. frente às cepas (A) ATCC10832, (B) Smith Diffuse ATCC13709, (C) COL, (D) ATCC25923, (E) RN e (F) LSA-88]..... 124
- FIGURA 131.** Atividade antimicrobiana do extrato 5 (TSMA) frente à cepa ATCC2593: **(A)** controle **(B)** efeito bactericida na concentração de 150 µg de extrato/mL **(C)** crescimento bacteriano na concentração de 75 µg de extrato/mL..... 126

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	Partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis dos galhos de <i>Trichilia casarettii</i>	53
ESQUEMA 2.	Partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis das folhas de <i>Trichilia casarettii</i>	54
ESQUEMA 3.	Partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis dos galhos de <i>Trichilia silvatica</i>	55
ESQUEMA 4.	Partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis das folhas de <i>Trichilia silvatica</i>	56
ESQUEMA 5.	Principais fragmentos observados nos espectros de massas LRMS (baixa resolução) e HRMS (alta resolução) para ELA-22.....	v. 2, 42
ESQUEMA 6.	Principais fragmentos observados nos espectros de massas e HRMS (alta resolução) para ltesmol.....	v. 2, 87
ESQUEMA 7.	Principais fragmentos observados nos espectros de massas para o Fitol.....	v. 2, 107
ESQUEMA 8.	Principais fragmentos observados nos espectros de massas para Ambrosanoli-11,10-diol.....	v. 2, 121
ESQUEMA 9.	Principais fragmentos observados nos espectros de massas para Escopoletina.....	v. 2, 126

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatógrafo de gás/ espectrômetro de massas
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto longo
DL_{50}	Dose letal para 50% da amostra
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMBC	Heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento

m	Multiplete
McF	Escala de McFarland
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
M^+	Pico do íon molecular
Me	Metila
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Megahertz
nm	Nanômetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
s	Simpleto
t	Triplete
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

FIGUEIREDO, Elaine Rodrigues; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho, 2010. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica* (MELIACEAE). Orientador: Ivo José Curcino Vieira. Co-orientador: Raimundo Braz Filho.

O presente trabalho apresenta o estudo químico e a avaliação da atividade biológica de extratos das folhas e dos galhos de *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*, ambas pertencentes à família Meliaceae. As espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* não apresentam relato na literatura a respeito de estudo fitoquímico ou de atividade biológica justificando então o interesse no estudo destas espécies. De *Trichilia casarettii* foram isolados os triterpenos 24-metilenocicloartano-12-oxo-3 β ,22 α -diol (inérito), 24-metilenocicloartano-3 β ,22-diol, Trichiliol (inérito), 24,25-dihidroxicicloart-22-enol (inérito), 22-hidroxicicloart-24-enol, lupeol, o diterpeno fitol, os esteróides β -sitosterol, estigmasterol, estigmas-5,20(22)-dien-3 β -ol (inérito) e itesmól, e a cumarina escopoletina. De *Trichilia silvatica* foram isolados os esteróides β -sitosterol e estigmasterol, o sesquiterpeno ambrosanoli-11,10-diol (inérito) e a cumarina escopoletina. As estruturas foram estabelecidas por técnicas espectrométricas, principalmente uni e bidimensional RMN (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^1H -NOESY, HMQC e HMBC), e

espectrometria de massas de baixa e alta resolução. Este estudo revelou um predomínio de substâncias terpênicas, tanto em *T. silvatica* quanto em *T. casarettii*. Os extratos das espécies foram testados preliminarmente frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, à bactéria *Staphylococcus aureus*, a microrganismos na flora bucal, às larvas de *Aedes aegypti* e a linhagem de células tumoral de pulmão NCI-H460. O extrato em metanol de *Trichilia casarettii* testado para o microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi ativo, apresentando $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ indicando possível presença de substâncias bioativas. O extrato em acetato de etila das folhas de *T. casarettii*, o de acetato de etila e *n*-butanol dos galhos de *T. silvatica* apresentaram os melhores resultados para atividade antimicrobiana quando testados para diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*. O extrato em *n*-butanol das folhas de *T. silvatica* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mutans* com IC_{50} abaixo de $100 \mu\text{g/mL}$. Todos os extratos não apresentaram atividade frente às larvas de *Aedes aegypti*. Na avaliação da atividade anticancerígena, todos os extratos testados apresentaram IC_{50} abaixo de 1000 ppm , o que pode ser um indicativo de bioatividade, visto que não há relatos na literatura para testes realizados com extratos vegetais frente à linhagem de células utilizada.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Elaine Rodrigues; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2010. PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGIC AVALIATION OF EXTRACTS OF *Trichilia casarettii* AND *Trichilia silvatica* (MELIACEAE). Advisor: Ivo José Curcino Vieira. Counselor: Raimundo Braz Filho.

This paper presents the chemical and evaluation of biological activity of extracts of leaves and twigs of *Trichilia casarettii* and *Trichilia silvatica* and both belonging to the Meliaceae family. The species *Trichilia casarettii* and *Trichilia silvatica* have no report in the literature as to study phytochemical or biological activity then justifying the interest in studying these species. From *Trichilia casarettii* were isolated the triterpenes 24-metilenecicloartane-12-oxo-3 β ,22 α -diol (unpublished), 24-metilenecicloartane-3 β ,22-diol, Trichiliol (unpublished), 24,25-diidroxicicloart-22-enol (unpublished), 22-hidroxicicloart-24-enol, lupeol, the diterpene phytol, the steroids β -sitosterol, stigmasterol, stigmata-5,20(22)-dien-3 β -ol (unpublished) and itesmol, and coumarin scopoletin. From *Trichilia silvatica* were isolated steroids β -sitosterol and stigmasterol, the sesquiterpene ambrosanoli-11,10-diol (unpublished) and the coumarin scopoletin. The structures were established by spectrometric techniques, mainly one and two dimensional

NMR (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, HMQC and HMBC) and mass spectrometry of low and high resolution. This study revealed the predominance of substances terpenics in both *T. casarettii* and *T. silvatica*. The extracts of the species were preliminarily tested against the *Artemia salina* Leach, the bacterium *Staphylococcus aureus*, the microorganisms in the oral flora, the larvae of *Aedes aegypti* and cell line and lung tumor NCI-H460. The methanol extract of *Trichilia casarettii* tested for *Artemia salina* Leach was active, with $\text{LD}_{50} < 1000$ mg / mL indicating possible presence of bioactive substances. The ethyl acetate extract of leaves of *T. casarettii*, the ethyl acetate and n-butanol from the branches of *T. silvatica* showed the best results for antimicrobial activity when tested for various strains of *Staphylococcus aureus*. The n-butanol extract of the leaves of *T. silvatica* showed antimicrobial activity against the microorganisms *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus mutans* with IC_{50} below 100 mg / mL. All extracts showed no activity against the larvae of *Aedes aegypti*. In the evaluation of anticancer activity, all extracts tested had IC_{50} values below 1000 ppm, which may be indicative of bioactivity, since there are no reports in the literature for testing with plant extracts front of the cell line used.

1. INTRODUÇÃO

No decorrer da história o homem vem utilizando espécies vegetais para fins medicinais, alimentícios, agrônômicos, etc.. Com o decorrer dos anos esse uso foi se intensificando, e estas espécies vegetais passaram a constituir a base da terapêutica (Schenkel, 1985). O grande interesse do homem pelos vegetais deve-se ao fato destes apresentarem imenso potencial em vários campos de aplicação, sobretudo na terapêutica de enfermidades.

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Este papiro enumera cerca de 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (Vilela, 1977).

O isolamento de substâncias a partir de vegetais, praticamente começa a acontecer a partir do século XVIII, o qual no século seguinte merece destaque o isolamento dos alcalóides morfina (1) (1806), quinina (2) e estriquinina (3) (1820) (**Figura 1**, p. 3) (Bolzani et al., 2002).

No século XX, com a modernização e introdução dos métodos espectroscópicos, e de diferentes modalidades de técnicas cromatográficas na Química dos Produtos Naturais (fitoquímica), os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e determinação estrutural de Produtos Naturais, foram alterados gradativamente, permitindo a redução das quantidades de material necessário para análise, e a diminuição no tempo da determinação de estruturas complexas (Bolzani et al., 2002).

Assim como na medicina, os produtos naturais também têm se destacado no campo agroquímico, onde substâncias com atividade inseticida têm despertado a atenção de pesquisadores da área no mundo todo.

Um exemplo disto ocorreu na cidade do vaticano no ano de 1976, com a semana de estudos denominada “Produtos Naturais e a Proteção de Plantas”. Nesta semana foram discutidos os papéis de determinados metabólitos secundários na defesa de plantas contra organismos predadores. Este encontro teve forte impacto, visto que as buscas por inseticidas naturais aumentaram depois da descoberta dos efeitos nocivos aos ecossistemas dos inseticidas sintéticos, os quais têm no DDT seu principal vilão (Bolzani et al., 2002).

Com o intuito da diminuição do uso de inseticidas sintéticos, o uso de extratos vegetais surge como uma boa alternativa para o controle dos insetos e ácaros nocivos às plantas (Gervásio e Vendramim, 2004), pois além de colaborar no manejo de uma determinada praga, podem causar menor impacto ambiental (Klocke, 1987; Bogorni e Vendramim, 2005).

O limonóide azadiractina (**4**) (**Figura 1**, p. 3) é um exemplo de inseticida natural, isolado de *Azadirachta indica* (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), ambos, gêneros pertencentes à família Meliaceae, sendo muito ativo sobre uma espécie de gafanhoto do deserto, *Schistocerca gregaria* (Bolzani et al., 2002).

Além da grande importância na agricultura, os produtos naturais têm uma importância marcante na terapêutica. Diversos fármacos são originados de diferentes classes químicas e categorias terapêuticas, como por exemplo, os alcalóides de *Cinchona*, morfina (**1**), pilocarpina (**5**), efedrina (**6**), atropina (**7**) e outros como os da espécie *Cataranthus roseus*, que foi utilizada na medicina tradicional como agente hipoglicêmico oral no tratamento de diabetes (Sottomayor et al., 2004). Fonte de pelo menos 60 alcalóides, a investigação de suas

atividades contra diabetes levou à descoberta dos alcalóides vimblastina (**8**) e vincristina (**9**), efetivos no tratamento da leucemia infantil (Shiva, 1990).

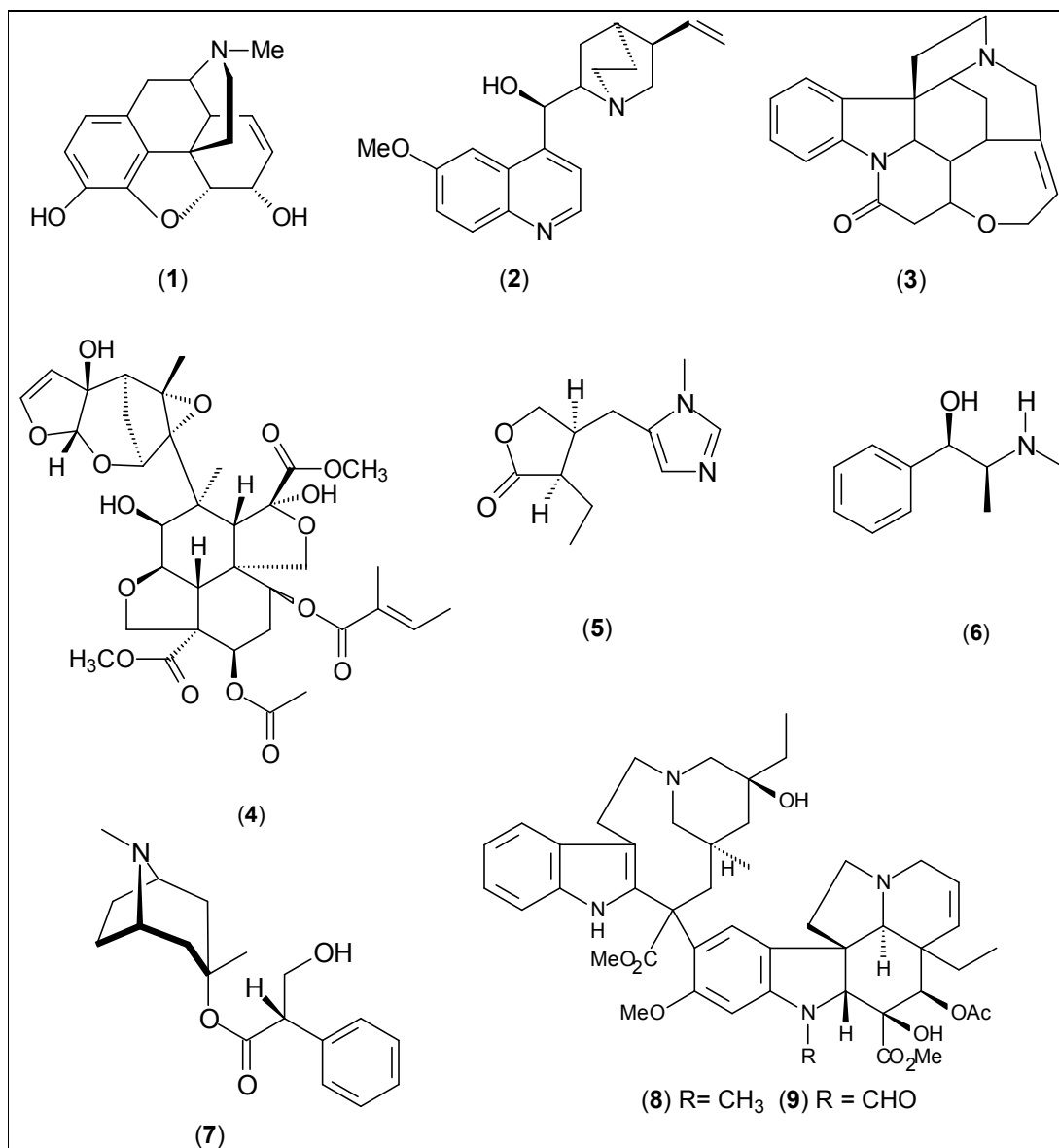


Figura 1: Substâncias com representação química e biológica importantes na Química de Produtos Naturais

Além da marcante atividade inseticida, a família Meliaceae também possui espécies dotadas de outras atividades biológicas. Dentre estas, pode-se citar *Aglaiia elliptifolia*, a qual apresentou atividade antitumoral contra a linhagem de células leucêmicas P388, exibida pela rocaglamida (Proksch et al., 2001). De *Azadirachta indica* (Nim) (folhas, cascas, frutos, flores e óleo) é reportada várias propriedades entre elas, a anticarcinogênica (Balasenthil et al., 1999).

Portanto, diante da importância da busca por substâncias naturais que possuam atividade biológica, bem como ampliação de dados químicos da família Meliaceae com o estudo de duas espécies que não possuem estudo fitoquímico e/ou farmacológico, realizou-se o estudo com as espécies, *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* no Setor de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

2. OBJETIVOS

Constituem objetivos deste trabalho:

a) O estudo fitoquímico das espécies vegetais *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*, fornecendo ferramentas para quimiosistemática do gênero *Trichilia* através do isolamento e elucidação estrutural dos constituintes químicos destas espécies;

b) Avaliar as atividades biológicas dos extratos das espécies citadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, larvas de *Aedes aegypti*; efeito antimicrobiano frente a várias cepas de *Staphylococcus aureus* e microorganismos na flora bucal, e linhagem de células tumoral de pulmão NCI-H460.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. FAMÍLIA MELIACEAE

A família Meliaceae é formada por 51 gêneros (**Tabela 1**, p. 7) (Waterman e Grundon, 1983), e com aproximadamente 1400 espécies (Marinho, 2005).

Está distribuída nos trópicos e subtropicais em ambos os hemisférios, ocorrendo em habitat de florestas chuvosas e inundadas, bem como em ambientes secos (Muellner et al., 2006).

Tabela 1: Gêneros da família Meliaceae (Waterman e Grundon, 1983)

<i>Cedrela</i>	<i>Azadirachta</i>	<i>Aphanamixis</i>	<i>Reinwardtiodendron</i>	<i>Ruagea</i>
<i>Toona</i>	<i>Schmardaëa</i>	<i>Chisocheton</i>	<i>Entandrophragma</i>	<i>Vavaea</i>
<i>Khaya</i>	<i>Sandoricum</i>	<i>Neobeguea</i>	<i>Humbertioturraea</i>	<i>Lansium</i>
<i>Owenia</i>	<i>Turreanthus</i>	<i>Naregamia</i>	<i>Pseudobersama</i>	<i>Turraea</i>
<i>Aglaia</i>	<i>Anthocarapa</i>	<i>Xylocarpus</i>	<i>Pseudocedrela</i>	<i>Nymania</i>
<i>Lovoa</i>	<i>Capurianthus</i>	<i>Dysoxylum</i>	<i>Sphaerosacme</i>	<i>Walsura</i>
<i>Carapa</i>	<i>Quivisianthe</i>	<i>Hecheldora</i>	<i>Pseudoparapa</i>	<i>Soymida</i>
<i>Melia</i>	<i>Pterorhachis</i>	<i>Cipadessa</i>	<i>Megaphyllaea</i>	<i>Cabralea</i>
<i>Guarea</i>	<i>Malleastrum</i>	<i>Ekebergia</i>	<i>Calodecaryia</i>	<i>Munronia</i>
<i>Synoum</i>	<i>Astrotrichilia</i>	<i>Chukrasia</i>	<i>Lepdotrichilia</i>	<i>Swietenia</i>
<i>Trichilia</i>				

Segundo Pennington e Styles (1975), a família Meliaceae está dividida em quatro subfamílias: Capuronianthoideae, Quivisianthoideae, Swietenioideae, Melioideae, sendo que na flora brasileira apenas as duas últimas possuem representantes. A Swietenioideae compreende os gêneros *Carapa* Aubl., *Cedrela* P. Browne e *Swietenia* Jacq., enquanto que a subfamília Melioideae inclui os gêneros *Cabralea* A. Juss., *Guarea* Allemand ex Linnaeus e *Trichilia* P. Browne (Barroso et al., 1984).

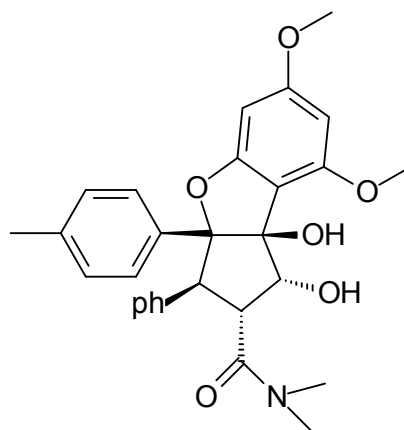
Também conhecida como família Mahogany (Muellner et al., 2006), esta família possui uma grande importância econômica por fornecer madeira de grande valor, como as do gênero *Cedrela* (Cedro rosa) (Marinho, 2005), *Swietenia* (Mogno), *Cabralea* (Cedro), *Guarea*, *Trichilia* e *Carapa* (Garcez et al., 1997).

3.1.1. Atividades biológicas de espécies da família Meliaceae

Uma das atividades mais relevantes descoberta em plantas da família Meliaceae é a atividade fagoinibidora sobre várias espécies de insetos (Pupo et al., 1996; Pupo et al., 1997 e Pupo et al., 1998), motivo pelo qual vem sendo bastante estudada (Rodríguez, 1995; Wheeler et al., 2001b). Substâncias fagoinibidoras ou fagorrepelentes inibem a alimentação, porém, não matam diretamente os indivíduos, que morrem de fome, ao invés de comerem as folhas tratadas com esse tipo de substância (Rembold, 1989).

A substância mais conhecida com essa atividade é a Azadiraquitina (**4**) (**Figura 1**, p. 3) (Proksch et al., 2001), um limonóide isolado por Butterworth e Morgan que impede o desenvolvimento da ecdise nos insetos (Rembold, 1989). Sua estrutura levou mais de 17 anos para ser elucidada (Butterworth e Morgan, 1968).

Assim como a Azadiraquitina (**4**), outros limonóides (chamados também tetranortriterpenóides) estão sendo isolados de várias espécies da família Mahogany e apresentam atividades variadas já reportadas na literatura (Roel et al., 2000; López-Olguín et al., 2002; Gervásio e Vendramim, 2004). Por essa razão, várias espécies dessa família vêm sendo estudadas como é o caso das já citadas *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* (López-Olguín et al., 2002; Gervásio e Vendramim, 2004), que possuem grande quantidade de triterpenóides que alteram o comportamento e a fisiologia de um grande número de insetos fitófagos (López-Olguín et al., 2002), além de espécies pertencentes ao gênero *Aglaia* que produzem derivados de rocaglamida (**10**), que são fortes inseticidas naturais (Chaidir et al., 1999; Nugroho et al., 1997).



(10)

Além dessas atividades marcantes, espécies dessa família também possuem grande importância quando se trata de atividades anticancerígenas, já possuindo histórico de uso na medicina tradicional para este fim de acordo com Hartwell em 1970. Como exemplo pode-se citar a espécie *Aglaia elliptica*, que exibe uma atividade significativa contra o crescimento de várias linhagens de células tumorais humanas (Lee et al., 1998), atividade atribuída às lignanas (Braga et al., 2006).

A família também apresenta outros tipos de bioatividades como no caso do extrato etanólico das raízes de *Melia azedarach*, que pode atuar como abortivo conforme pesquisa em colônia de fêmeas adultas de ratos (Keshri, Lakshmi e Singh, 2003). Essa atividade também ocorre com o óleo de Nim (*Azadirachta indica*), testado com aplicações intra-uterinas em colônias de ratas comprovando o bloqueio de fertilidade (Garg et al., 1998), além de antiviral *in vitro* (Badam, Joshi e Bedakar, 1999).

A pasta do Nim tem sido utilizada para adubar plantações comerciais, principalmente as de cana-de-açúcar e hortaliças como fonte de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio e potássio. No solo, protege as plantas de nematóides e alguns tipos de formigas (Neves, Oliveira e Nogueira, 2003). Várias partes do Nim são também utilizadas para tratamento antibacteriano, antifúngico, infecções virais (Dasgupta et al., 2004) e antimicrobianos (Sai Ram et al., 2000).

A espécie *Toona ciliata* (*Cedro australiano*), outra representante da família, apresenta ação inibidora do fotossistema II (Veiga et al., 2007). Já a *Cedrela sinensis* é usada na China e Korea na medicina tradicional para o

tratamento de urticárias e disenteria, muito conhecida por conter limonóides além de flavonóides e substâncias fenólicas (Mitsui et al., 2005).

Toona sinensis é uma árvore largamente distribuída na China, tendo a casca, o óleo, semente, flores e folhas usadas na medicina tradicional Chinesa. Suas folhas foram usadas para tratamento de helioses, vômitos, diarréia, falta de apetite e enterites, além de possuir efeitos de detoxificação e antiinflamatório. Já foi também reportado que o extrato das folhas induz apoptose em células cancerosas (Wang, Yang e Zhang, 2007).

A investigação fitoquímica de *T. sinensis* mostrou que as folhas eram ricas em flavonóides, alcalóides, terpenos e antraquinonas. Entretanto, não existem estudos detalhados reportando a atividade antioxidante de *T. sinenses* e seus constituintes (Wang, Yang e Zhang, 2007).

Em razão dos excelentes resultados verificados com o Nim e outras espécies dessa família, vários gêneros de Meliaceae também passaram a despertar o interesse de pesquisadores no intuito de encontrar novas moléculas com atividade inseticida, e o gênero *Trichilia* é um deles, pois além de apresentar substâncias com atividade inseticida conhecida, como as trichilinas (Nakatani, James e Nakanishi, 1981) é bastante abundante nas regiões tropicais da América, com mais de 550 espécies conhecidas (Bogorni e Vendramim, 2005).

3.1.2. Constituintes químicos de Meliaceae

Os limonóides são um largo grupo de triterpenos isolados de diferentes plantas e restritos nas famílias Meliaceae, Rutaceae (Rodriguez et al., 2003) e Cneoraceae (Connolly, 1983). São altamente oxigenados e classificados como tetranortriterpenóides (Roy e Saraf, 2006).

A sua rota Biossintética em plantas prevê como precursor um triterpeno, que origina os tetranortriterpenóides pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original. Esta rota Biossintética envolve vários passos reacionais levando às mais variadas estruturas, mas que invariavelmente contêm 26 átomos de carbono no seu esqueleto central.

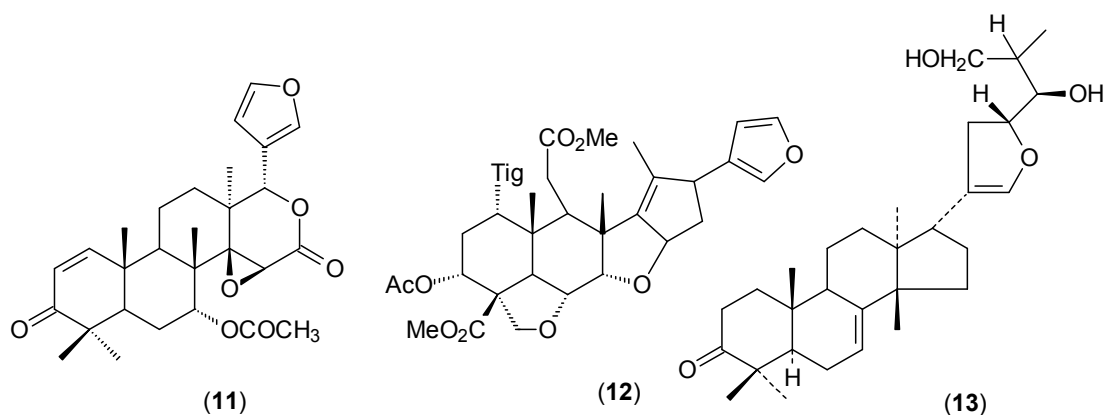
As variações estruturais dos limonóides encontrados na família Rutaceae são menores do que na família Meliaceae, que são mais complexos e com alto grau de oxidação exibindo rearranjos (Roy e Saraf, 2006).

Conhecidos como Meliacinas (Rodriguez et al., 2003; Roy e Saraf, 2006) os limonóides de Meliaceae recentemente vêm atraindo atenção porque as substâncias que pertencem a esse grupo exibem uma larga atividade biológica como inseticida, inibidor de apetite, atividade na inibição e regulação do crescimento (IRG) em insetos bem como antibacteriano, antifúngico, antimalárico, anticancerígeno, antiviral (Koul, 2004; Endo et al., 2002; Nakagawa, Duan e Takaishi, 2001), antidiabética, espermicida, hipoglicêmico, e imunomodulatório (Rodriguez et al., 2003).

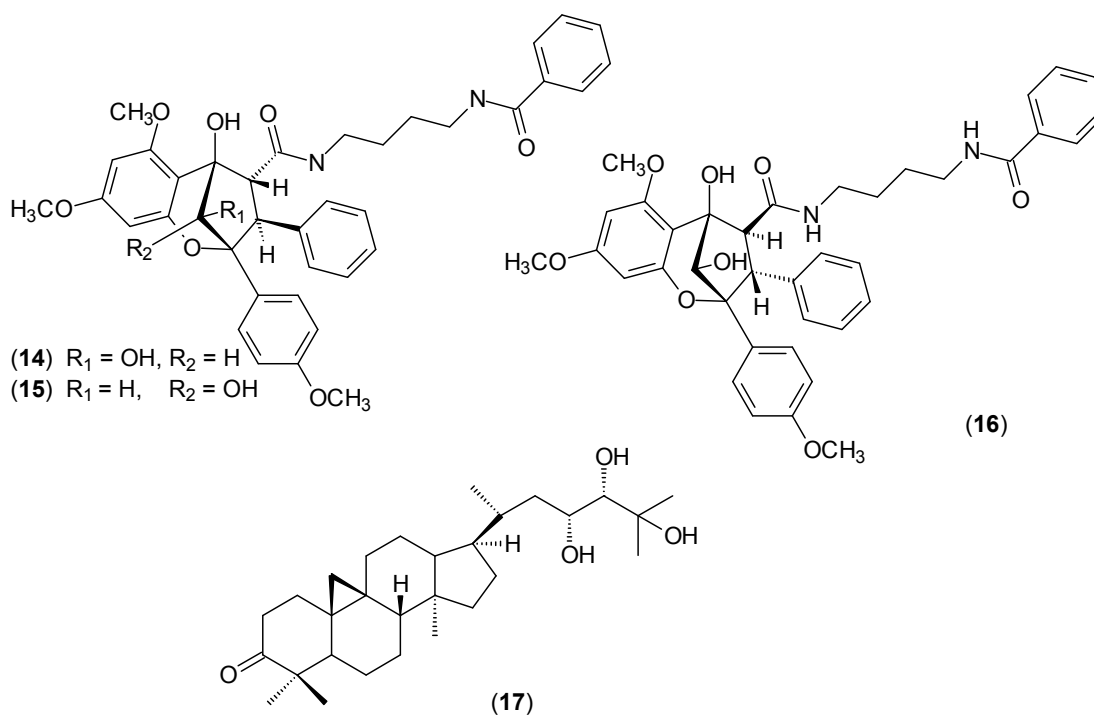
O interesse na pesquisa por limonóides teve início na busca por responsáveis pelo amargor e azedume dos citrus (Devakumar, 1996) e pelo aroma exalado ao se descascar frutas cítricas frescas (Roy e Saraf, 2006). A história dos limonóides teve início na família Meliaceae com o isolamento da gedunina (**11**) da espécie *Entandrophragma angolense*. A importância então na pesquisa por esses metabólitos foi aumentada na tentativa de se diminuir o impacto negativo de azedume das frutas cítricas para exportação (Jacob et al., 2000).

A salanina (**12**), um limonóide que ocorre em maiores quantidades que azadirachtina (**4**) em *A. indica*, não é tóxica para os insetos. Entretanto, com uma simples reação de hidrogenação, onde o grupo tigloíla e o anel furânico são reduzidos, torna a salanina (**12**) mais potente que a azadirachtina contra o inseto *Leptinotarsa decemlineata* (praga da batata do Colorado) (Yamasaki e Klocke, 1989).

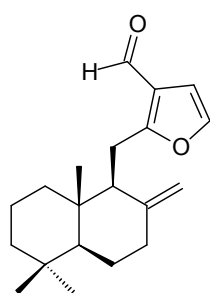
Mas não somente pela presença de limonóides que as Meliáceas são conhecidas. São também reportadas pela produção de triterpenos, como a nimbocinona (**13**), isolada pela primeira vez da espécie *Azadirachta indica* (Siddiqui et al., 1986).



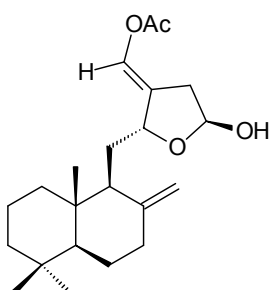
No gênero *Aglaiia*, por exemplo, estudos fitoquímicos estabeleceram a ocorrência de bisamidas, benzo[b]oxepinas, ciclopenta[b]benzofuranos e ciclopenta[bc]benzopiranos (Proksch, 2001) onde alguns deles mostraram propriedades farmacológicas interessantes incluindo antiviral (Saifaha et al., 1999) e antiinflamatória (Proksch, 2005). Da espécie *Aglaiia forbesii* foram isolados das folhas, pela primeira vez, três flavaglinas benzopirano (**14-16**) e um cicloartano (**17**) (Joycharat et al., 2008).



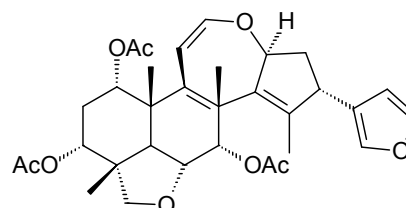
Das sementes de *Turraanthus africanus* foram isolados, pela primeira vez, dois diterpenos do tipo labdano (**18**, **19**) e um limonóide (**20**) (Tane et al., 2004). Das sementes de *Turraea floribunda* foram isolados seis novos limonóides do tipo Turraflorinas (D-I) (**21-26**) (McFarland, Mulholland e Fraser, 2004).



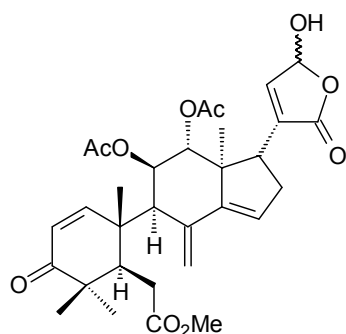
(18)



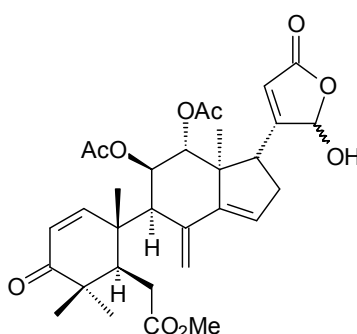
(19)



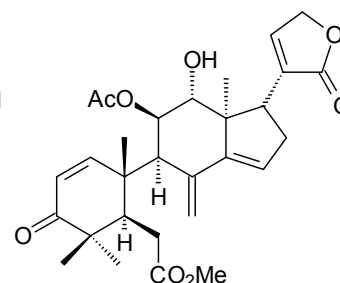
(20)



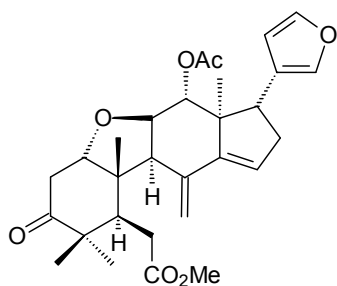
(21)



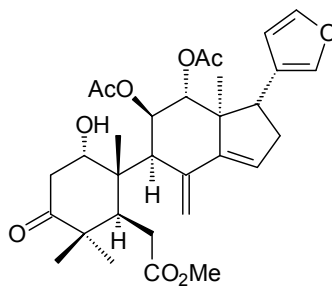
(22)



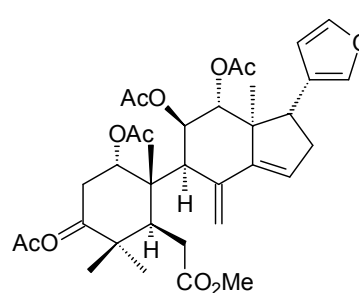
(23)



(24)



(25)

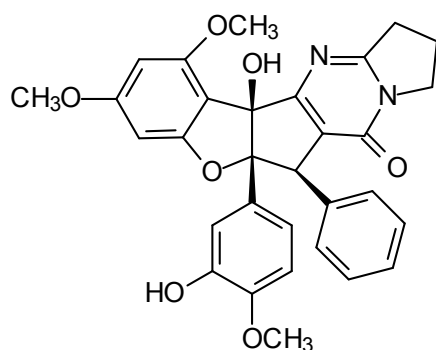
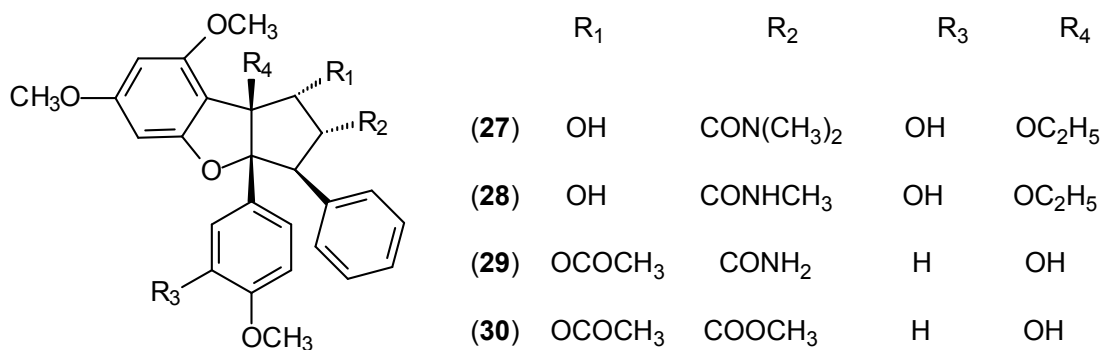


(26)

Em 2001, Luo e colaboradores reportaram que as folhas de *Toona sinensis* eram ricas em flavonóides, alcalóides e antraquinonas. Seis anos depois,

Wang e colaboradores reportaram o isolamento de doze substâncias fenólicas (Wang, Yang e Zhang, 2007).

Das flores de *Aglaia duperreana* foram isolados treze derivados de rocaglamida, sendo cinco inéditos até então (**27-31**) (Chaidir et al., 1999).



(31)

3.2. O GÊNERO *Trichilia*

O nome *Trichilia* (três) refere-se aos três lóculos do ovário e três valvas do fruto (Patrício e Cervi, 2005). Este gênero foi descrito por Browne em 1756, compreendendo em torno de 230 espécies distribuídas nas planícies tropicais Americanas se destacando pela produção de diversas estruturas de limonóides possuindo diversas atividades biológicas contra insetos (Champagne et al., 1992), além de ser um dos gêneros com o maior número de espécies, e possuidor da maioria das características morfológicas na família (Salles, 1995).

Vários estudos da família Meliaceae têm identificado o gênero *Trichilia*, como um gênero em potencial no desenvolvimento de espécies que podem servir como base de estudos para inseticidas em potencial (Wheeler et al., 2001a), onde em várias investigações fitoquímicas foi observada a presença de protolimonóides (Garcez et al., 1996), e limonóides, os quais apresentaram efeitos biológicos nos insetos, incluindo inibidor de crescimento (Wheeler et al., 2001a).

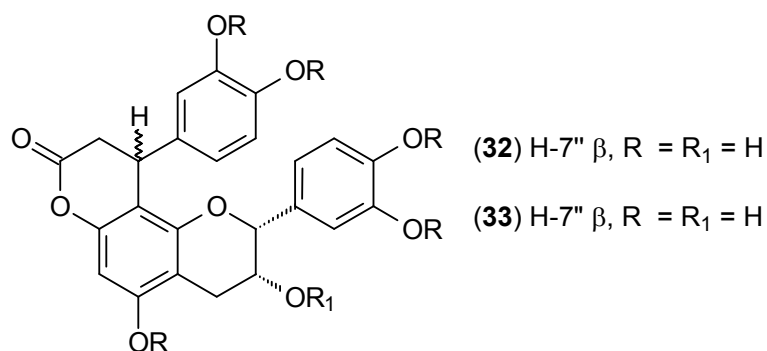
Mesmo contando com inúmeras investigações, o gênero ainda encontra-se pouco explorado. Por exemplo, os extratos etanólicos das sementes de *T. priureana*, *T. roka* e *T. connaroides*, mostram inibição no crescimento de insetos (Wheeler et al., 2001b), atividade também demonstrada na triagem dos extratos etanólicos de *T. hirta*, *T. glabra* (Wheeler et al., 2001a).

Além de limonóides, a ocorrência de representantes de outras substâncias também tem sido relatada em algumas espécies de *Trichilia*, podendo se destacar os seco-protolimonóides. Por exemplo, os três seco-protolimonóides inéditos isolados das cascas do caule de *T. elegans* representados na p. 22 (**91**, **92** e **93**), e também triterpenóides derivados de cicloartano (*T. schomburgkii*, *T. connaroides*, *T. claussenii*). Outras substâncias obtidas incluem os sesquiterpenos (*T. claussenii*, *T. catigua*), esteróides (*T. schomburgkii*, *T. claussenii*, *T. hirta*) ácidos ω fenil-alcanóicos / alquenóicos; aminoácidos (*T. claussenii*) e um fenil-alquil-hidroxiбутanolídeo (*T. schomburgkii*) (Garcez et al., 1997).

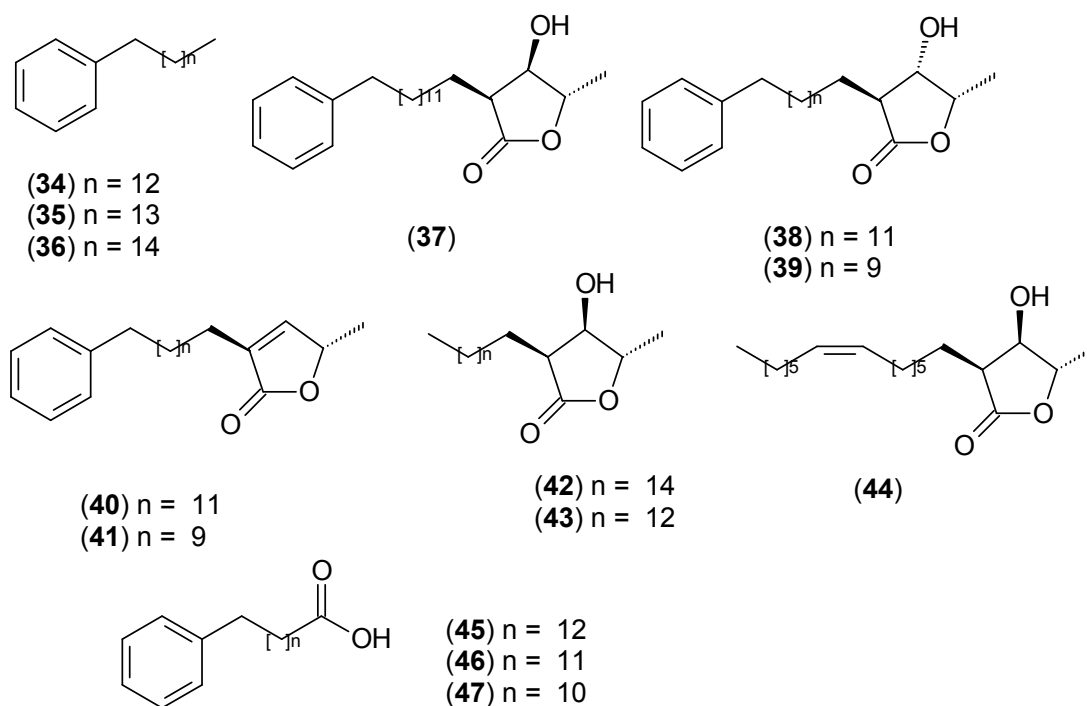
Devido ao grande interesse no gênero, vários estudos fitoquímicos vêm sendo realizados, proporcionando o isolamento de vários metabólitos. Dentre eles, alguns estão relacionados a seguir:

Trichilia catigua (Pizzolatti et al., 2002) (Pizzolatti et al., 2004) (Tang et al., 2007)

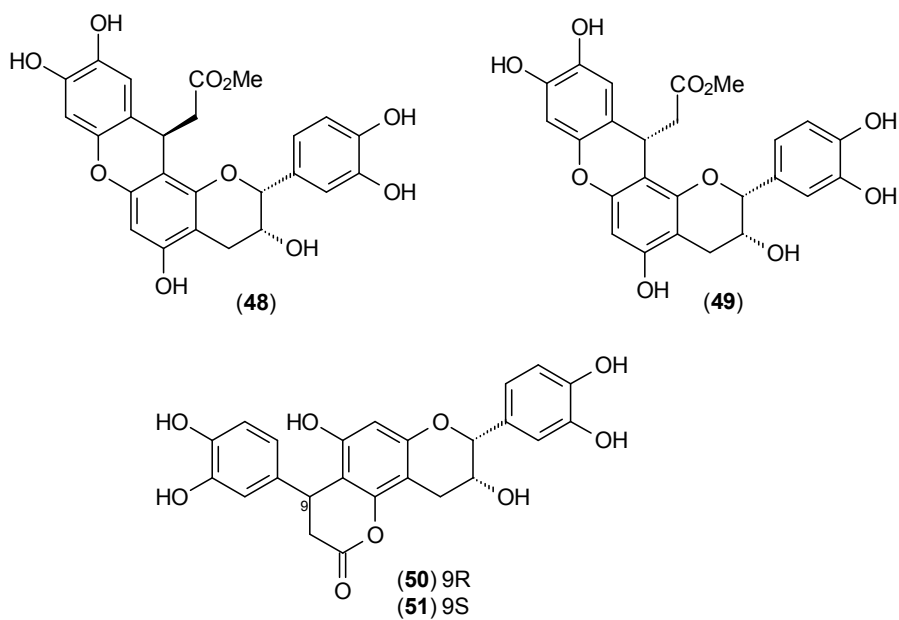
Cinchonaina Ia (**32**), cinchonaina Ib (**33**)



ω -fenil dodecano (34), ω -fenil tetradecano (35), ω -fenil hexadecano (36), ω -fenil-i-lactona (37-41), alquil-i-lactona (42-43), alcenil-i-lactona (44), ácido metil ester ω -fenil tetradecanóico (45), ácido metil ester ω -fenil tridecanóico (46) e ácido metil ester ω -fenil dodecanóico (47).

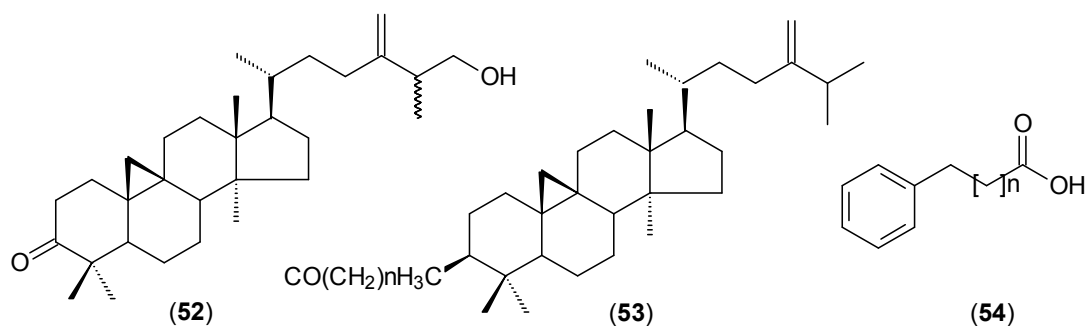


catiguanina A (48), catiguanina B (49), cinchonaina Ic (50), cinchonaina Id (51).

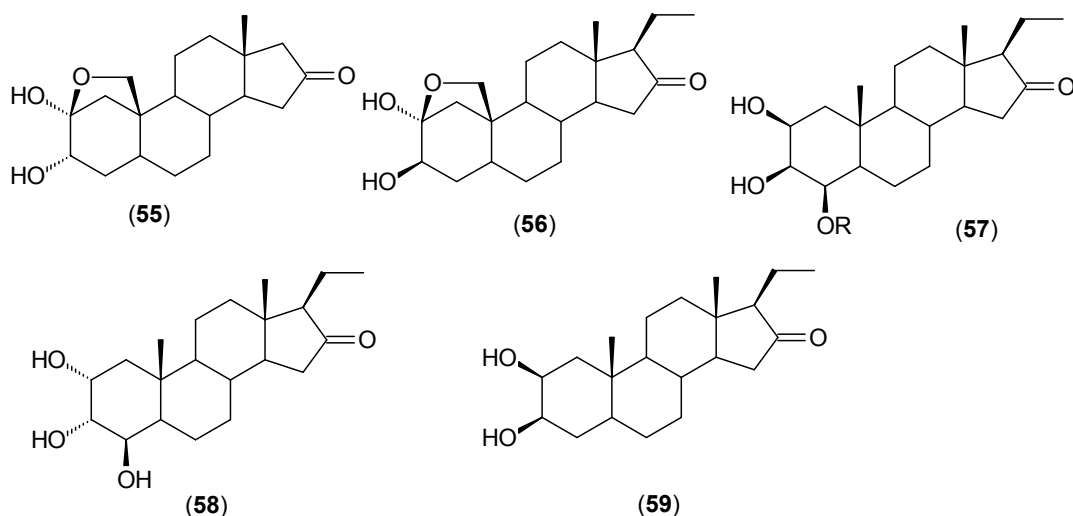


Trichilia clausenii (Pupo et al., 1996) (Pupo et al., 1997) (Pupo et al., 1998)
(Pupo et al., 2002)

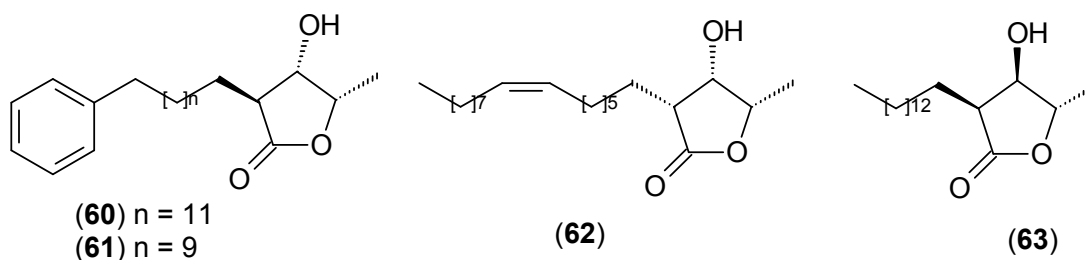
24-metileno-26-hidroxicicloartan-3-ona (52), 24-metilenocicloartanol eterificado por ácido graxo (53) e ω -fenil-alcanoico (54).



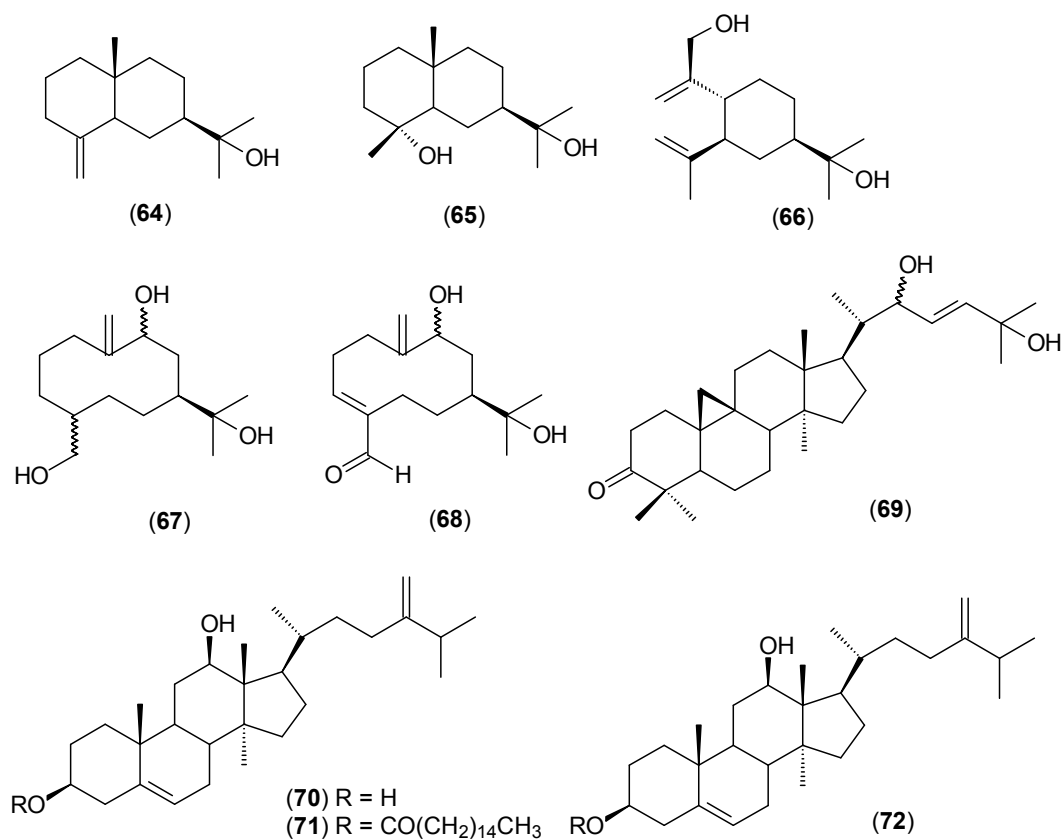
2 α ,3 α -diidroxiandrostan-16-ona 2 β ,19-hemicetal (55), 2 α ,3 β -diidroxipregnan-16-ona 2 β ,19-hemicetal (56), 2 β ,3 β ,4 β -trihidroxipregnan-16-ona (57), 2 α ,3 α ,4 β -trihidroxipregnan-16-ona (58), 2 β ,3 β -diidroxipregnan-16-ona (59).



(2*R*,3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-metil-2-(13'-fenil-1'-*n*-tridecil)-butanolidio (**60**),
 (2*R*,3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-metil-2-(11'-fenil-1'-*n*-undecil)-butanolidio (**61**),
 (2*R*,3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-metil-2-(1'-*n*-hexadec-7'(Z)-enil)-butanolidio(**62**),
 (2*R*,3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-metil-2-(1'-*n*-tetradecil)-butanolidio (**63**).

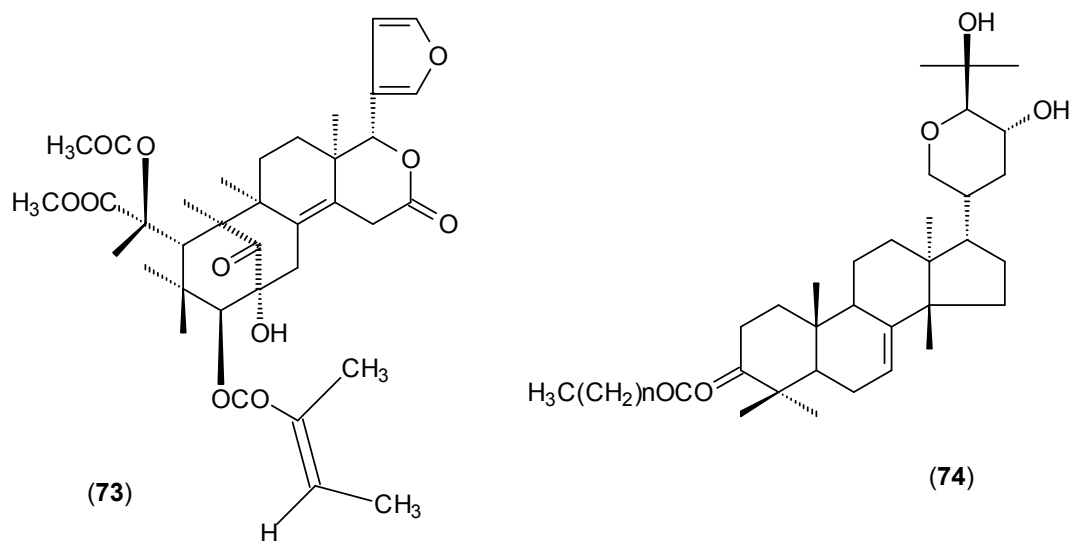


β -eudesmol (**64**); criptomeridiol (**65**), 14-hidroxiemol (**66**), germacra-10(14)-en-9,11,15-triol (**67**), germacra-3,10(14)-dien-9,11-diol-4-carbaldeido (**68**), 22,25-diidroxi-9 β ,19-ciclolanost-23-en-3-ona (**69**), 24-metileno-12 β -hidroxicolesterol (**70**), 24-metileno-12 β -hidroxicoles-4-en-3-palmitato (**71**), 24-metil-12 β -hidroxicolest-4-en-3-ona (**72**).

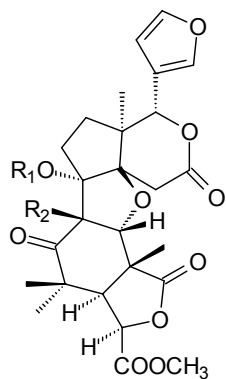


Trichilia connaroides (Inada et al., 1994) (Wang et al., 2008) (Geng et al., 2009)

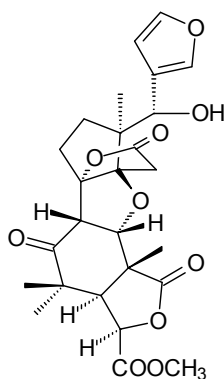
2-hidroxi-3-O-tigloil-6-O-acetilswietenolideo (73), lipo-3-episapelina A (74).



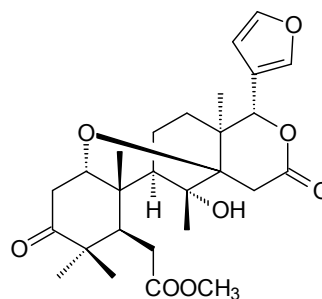
trijugina D a H (**75-79**), metil-8 α -hidroxi-8,30-diidroangolensato (**80**), trichiconnarina A e B (**81, 82**), 3 β ,4 α -diidroxipregnan-21-ona (**83**), trijugina C (**84**), 3 β ,4 α -diidroxipregnan-16-ona (**85**).



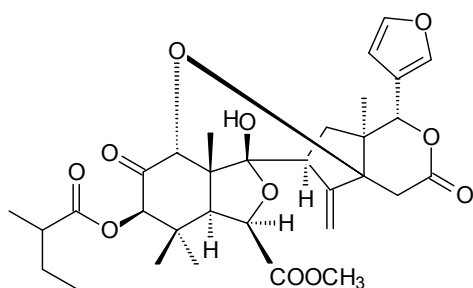
(**75**) $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$
 (**76**) $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{OH}$
 (**84**) $R_1 = R_2 = \text{H}$



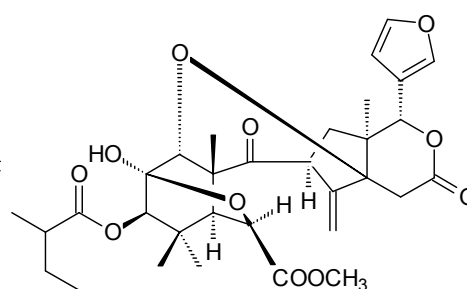
(**77**)



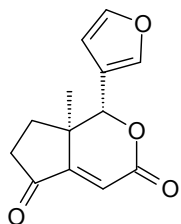
(**80**)



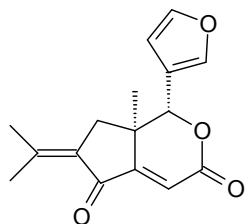
(**78**)



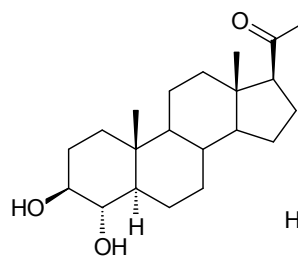
(**79**)



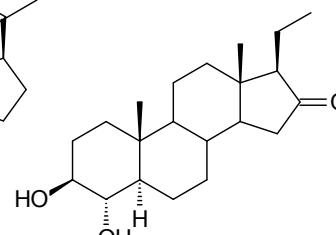
(**81**)



(**82**)

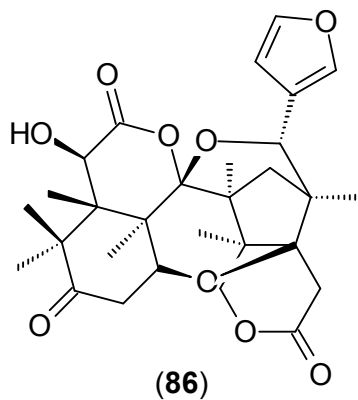


(**83**)



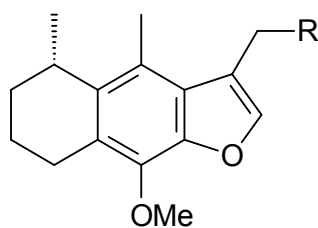
(**85**)

Trichilina B (**86**)

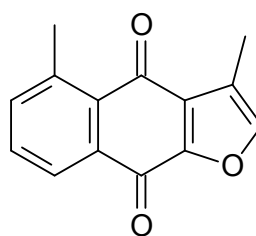


Trichilia cuneata (Doe et al., 2005)

13-hidroxi-14-nordeidroacalohastina (87), 13-acetoxi-14-nordeidroacalohastina (88), Maturinona (89).



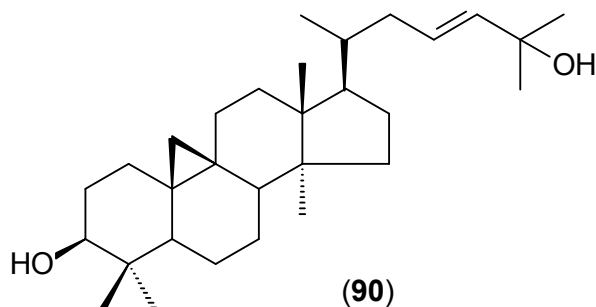
(87) R = OH
(88) R = OAc



(89)

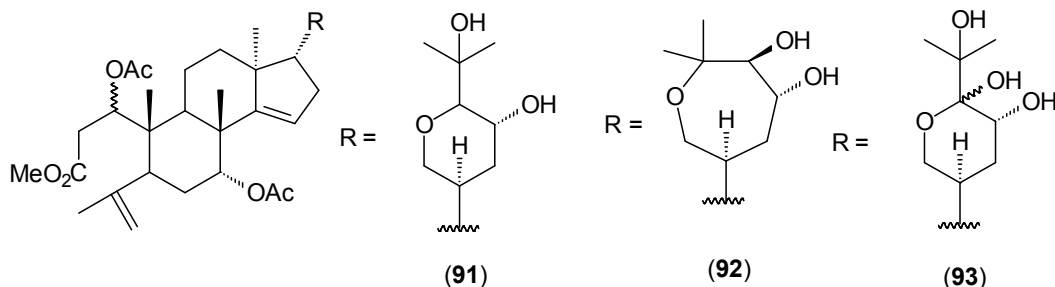
Trichilia dregeana (Eldeen, Heerden e Staden, 2007)

Cicloart-23-eno-3,25-diol (90)

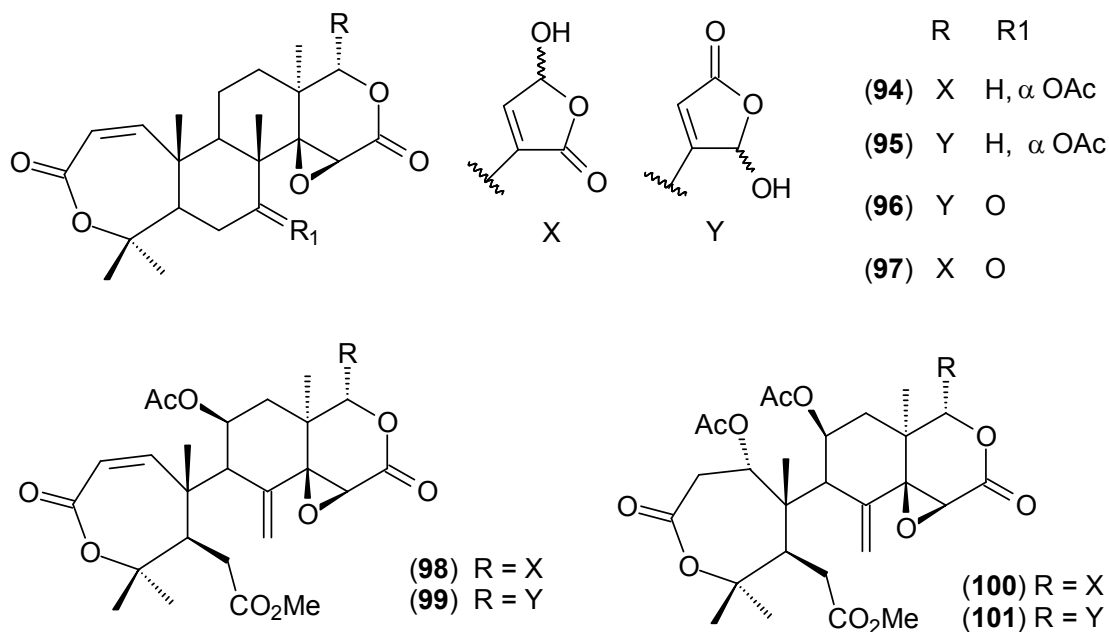


Trichilia elegans (Garcez et al., 1996) (Garcez et al., 1997) (Garcez et al., 2000)

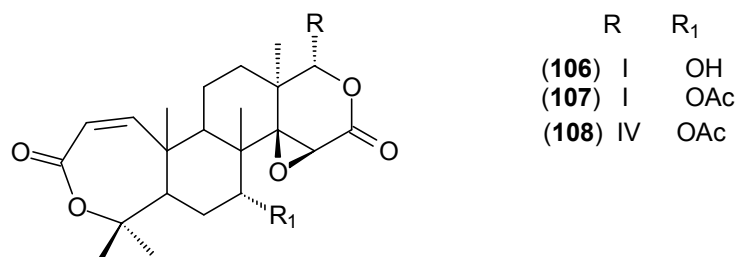
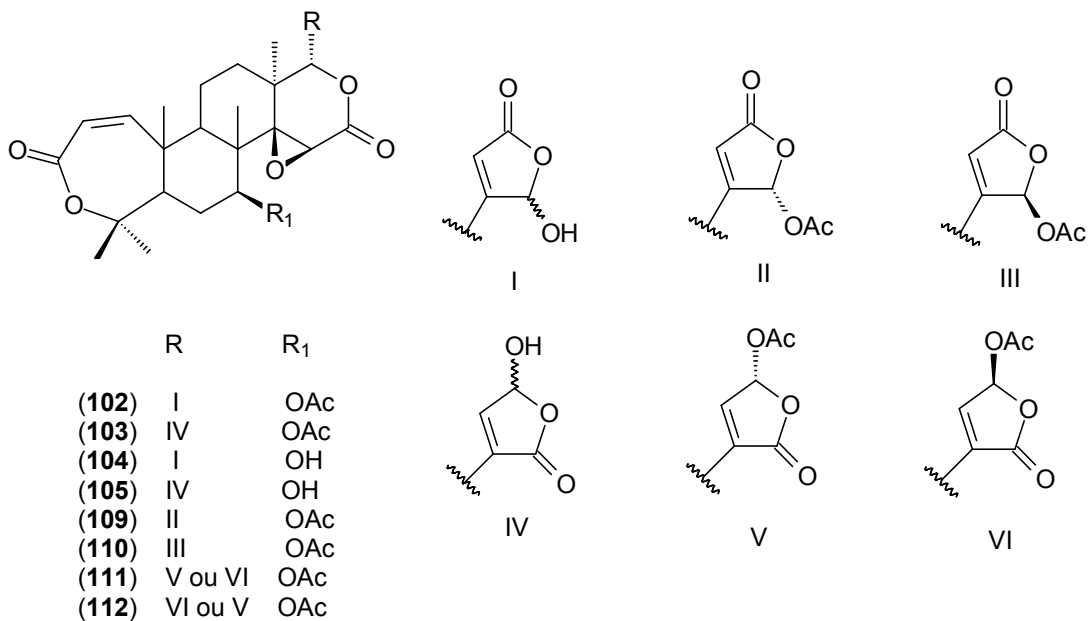
metil-1 ξ ,7*R*-diacetoxi-23*R*,25-diidroxi-20*S*,24*R*-21,24-epoxi-3,4-seco-apotirucal-4(28),14(15)-dien-3-oato (**91**), metil-1 ξ ,7*R*-diacetoxi-23*R*,25*S*-diidroxi-20*S*,21,24-epoxi-3,4-seco-apotirucal-4(28),14(15)-dien-3-oato (**92**), metil-1 ξ ,7*R*-diacetoxi-23*R*,24,25-triidroxi-20*S*,21,24-epoxi-3,4-seco-apotirucal-4(28),14(15)-dien-3-oato (**93**).



7-dioxo-7 α -acetoxiciadanina B (**94**), 7-dioxo-7 α -acetoxiciadanina A (**95**), ciadanina A (**96**), ciadanina B (**97**), elegantina A (**98**), elegantina B (**99**), 1,2-diidro-1 α -acetoxielegantina A (**100**), 1,2-diidro-1 α -acetoxielegantina B (**101**).

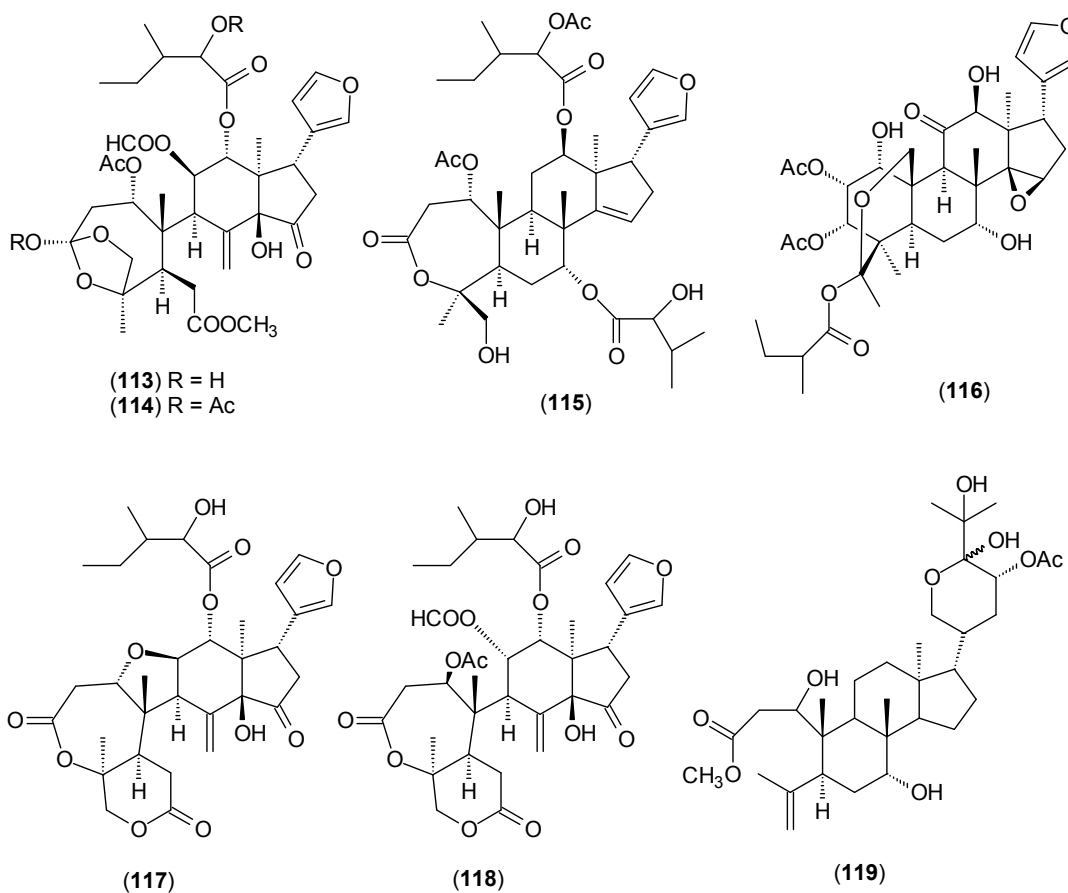


7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina A (**102**), 7-dioxo-7 α -acetoxiciadanina B (**103**), 7-dioxo-7 β -hidroxiciadanina A (**104**), 7-dioxo-7 β -hidroxiciadanina B (**105**), 7-dioxo-7 α -hidroxiciadanina A (**106**), 7-dioxo-7 α -acetoxiciadanina A (**107**), 7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina B (**108**), 7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina A-21S-acetato (**109**), 7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina A-21R-acetato (**110**), 7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina B-23 ξ -acetato (**111**), 7-dioxo-7 β -acetoxiciadanina B-23 ξ -acetato (**112**).



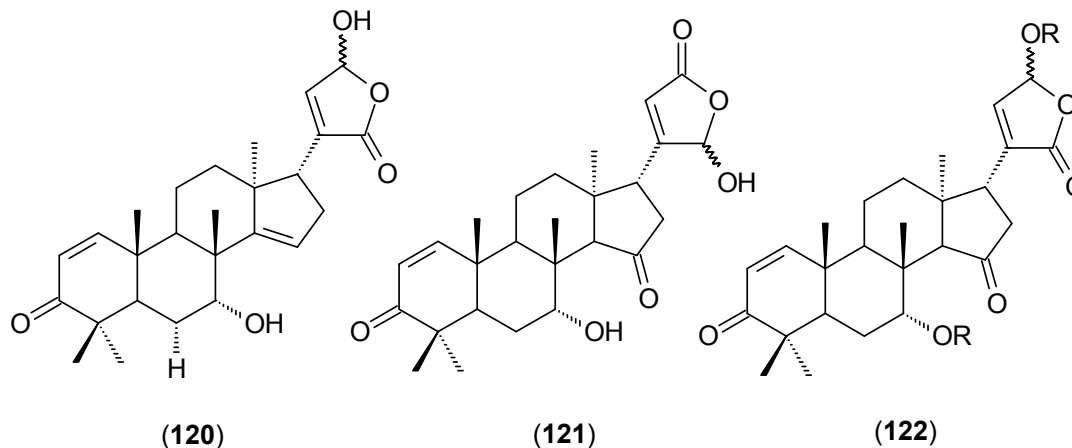
Trichilia emetica (Gunatilaka et al., 1998)

Nimania (**113**), diacetil nimania (**114**), dregeana 4 (**115**), trichilina A (**116**), rohituka 3 (**117**), Tr-B (**118**), metil 1(S), 23(R)-diacetoxi-7(R),24 ξ ,25-triidroxi-(20S)-21,24-epoxi-3,4-seco-apatirucala-4(28),14(15)-dien-3-oato (**119**).

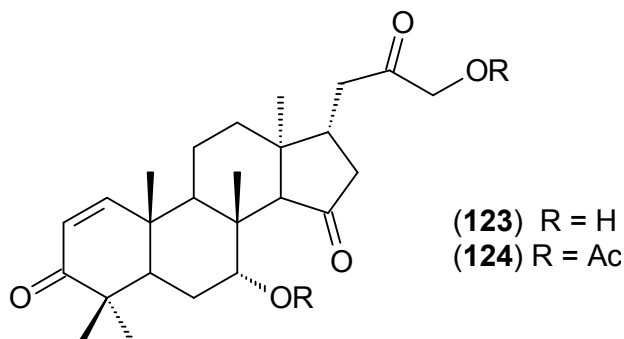


Trichilia estipulata (Cortez et al., 1998) (Cortez et al.; 2000)

7 α -23-diidroxi-3-oxo-24,25,26,27-tetranorapotirucal-1,14,20(22)-trien-21,23-olida (120), 7-diacetil-23-hidroxineotrichilenonelida (121) e 7-diacetil-21-hidroxineotrichilenonelida (122).

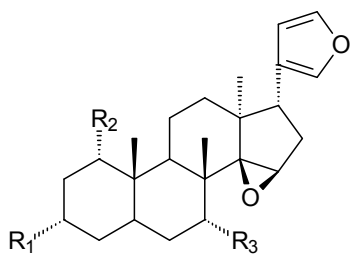


21,24,25,26,27-pentanor-15,22-oxo-7 α ,23-dihidroxi-apotirucala-1-en-3-ona (123),
21,24,25,26,27-pentanor-15,22-oxo-7 α ,23-diacetato-apotirucala-1-en-3-ona (124).

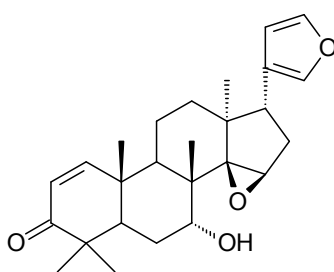


Trichilia havanensis (Chan, Gibbs e Taylor, 1967) (Chan, Gibbs e Taylor, 1973)
(Rodríguez-Hahn, Cárdenas e Arenas, 1996) (Lopez-Olguin, 1998) (Rodríguez et al., 2003)

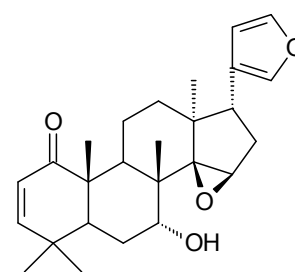
Havanensina (125), triacetato havanensina (126), 1,7-diacetato havanensina (127), 3,7-diacetato havanensina (128), trichilenona (129), isotrichilenona (130), neohavanensin (131), triacetato de neohavanensin (132), tetracetona (133), neutriquilenona (134).



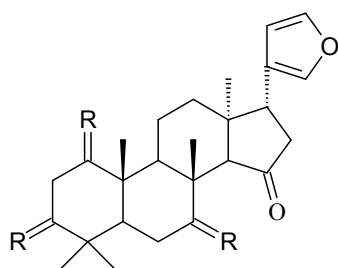
(125) R₁ = R₂ = R₃ = H
(126) R₁ = R₂ = R₃ = OAc
(127) R₁ = OH, R₂ = R₃ = OAc
(128) R₁ = R₃ = OAc, R₂ = OH



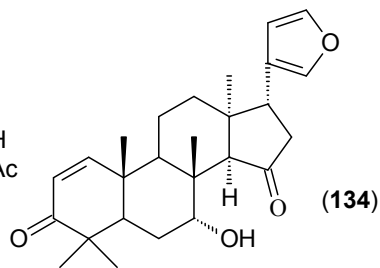
(129)



(130)

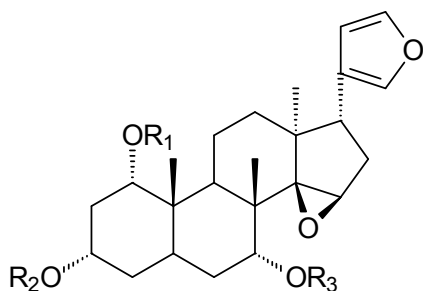


(131) R = H, α -OH
(132) R = H, α -OAc
(133) R = O

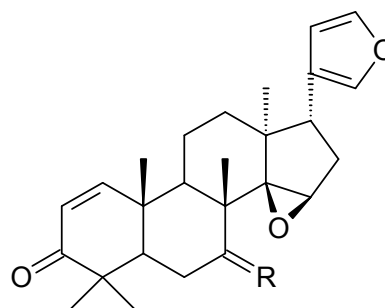


(134)

triacetato havanensina (**135**), 3,7-diacetato havanensina (**136**), 1,7-diacetato havanensina (**137**) e acetato trichilenona (**138**).

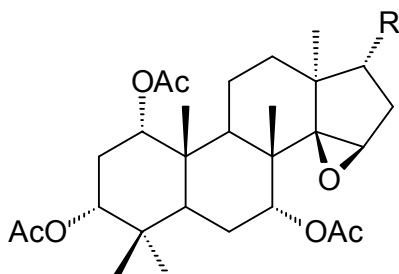


(**135**) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$
 (**136**) $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{Ac}$
 (**137**) $R_2 = \text{H}, R_1 = R_3 = \text{A}$



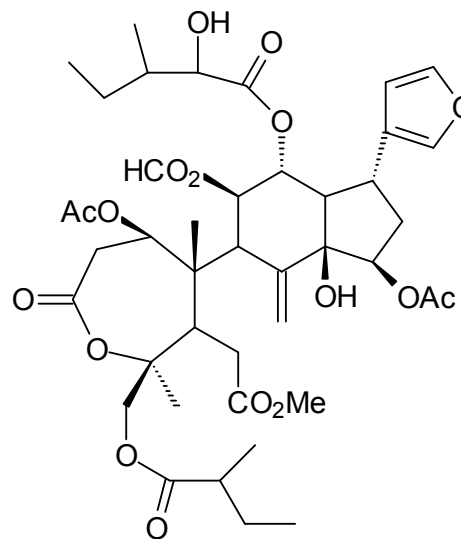
(**138**) $R = \text{H}, \alpha - \text{OAc}$

triacetato havanensina (**135**), derivado hidroxibutenolida (**139**) e trichavensina (**140**).



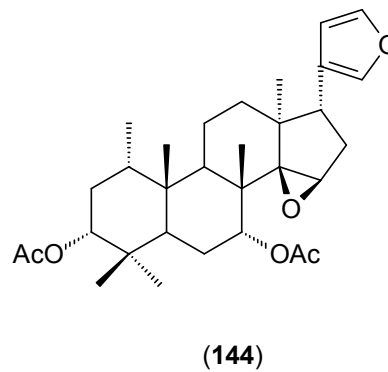
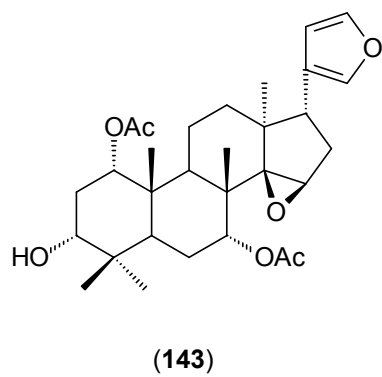
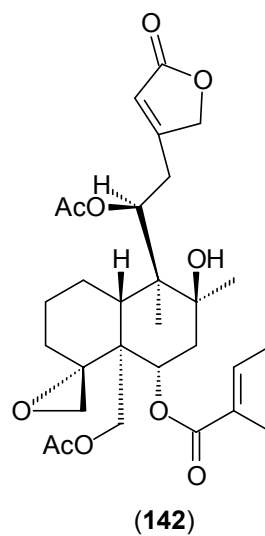
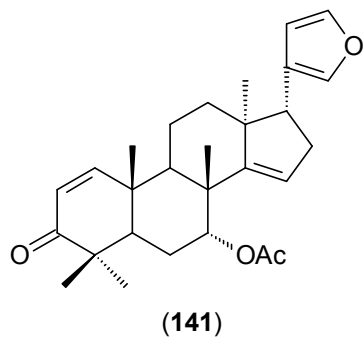
(**135**) $R =$

(**139**) $R =$

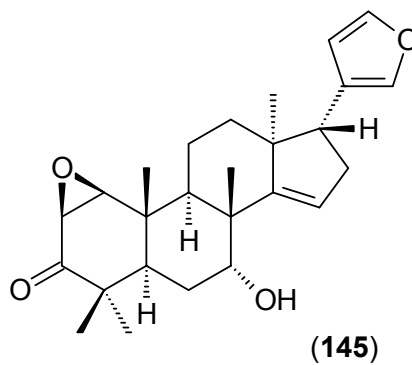


(**140**)

Azadirona (**141**), Escutalpina-B (**142**), 1,7-di-O-acetil-havanensina (**143**) e 3,7-di-O-acetil-havanensina (**144**).

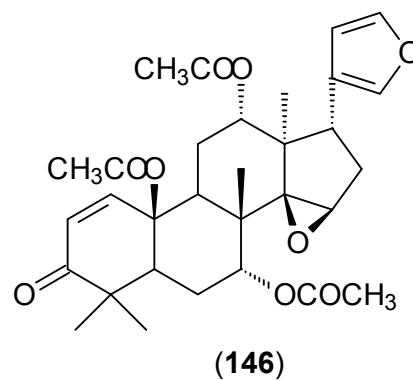


1 β ,2 β ,21,23-diepoxi-7 α -hidroxi-24,25,26,27-tetranor-apotirucala-14,20,22-trien-3-ona (**145**).

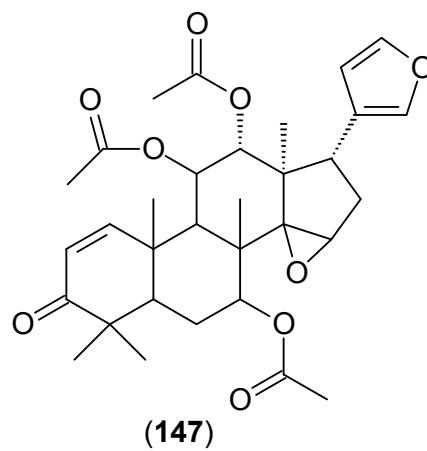


Trichilia heudelottii (Okorie e Taylor, 1967) (Okorie e Taylor, 1972) (Aladesanmi e Odediran, 2000)

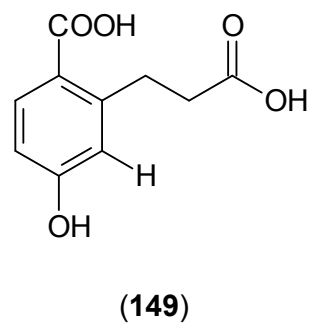
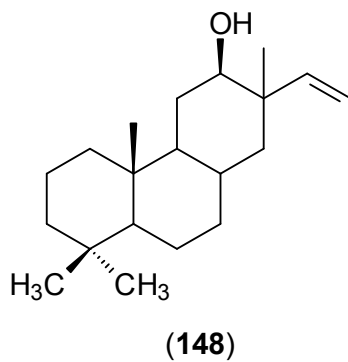
Heudelottina (146)



Triacetato heudelottina (147)

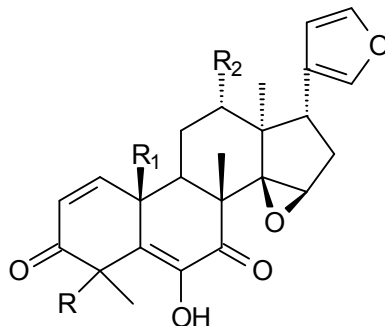


12 β -hidroxisandaracopimar-15-eno (148) e ácido 2-propionoxi- β -resorcílico (149)



Trichilia hirta (Chan e Taylor, 1966) (Chauret, Durst e Arnason, 1996)

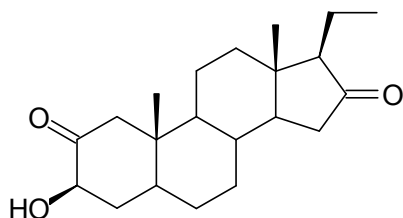
Hirtina (**150**) e diacetilhirtina (**151**)



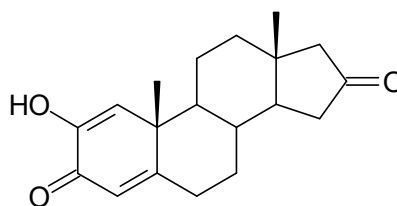
(**150**) R = CO₂Me, R₁ = OAc, R₂ = OCOEt

(**151**) R = CO₂Me, R₁ = OH, R₂ = OCOEt

3-hidroxipregnana-2,16-diona (**152**) e 2-hidroxiandrosta-1,4-dieno-3,16-diona (**153**).



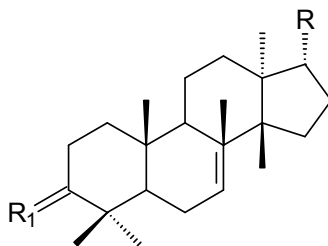
(**152**)



(**153**)

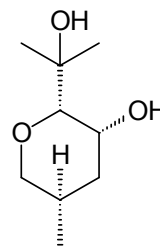
Trichilia hispida (Breen et al., 1966) (Jolad et al., 1980)

Sapelina A (**154**) e
sapelina B (**155**)

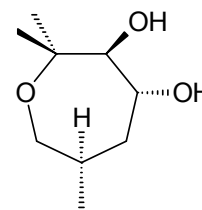


(**154**) R = X, R₁ = H, α - OH

(**155**) R = Y, R₁ = H, α - OH

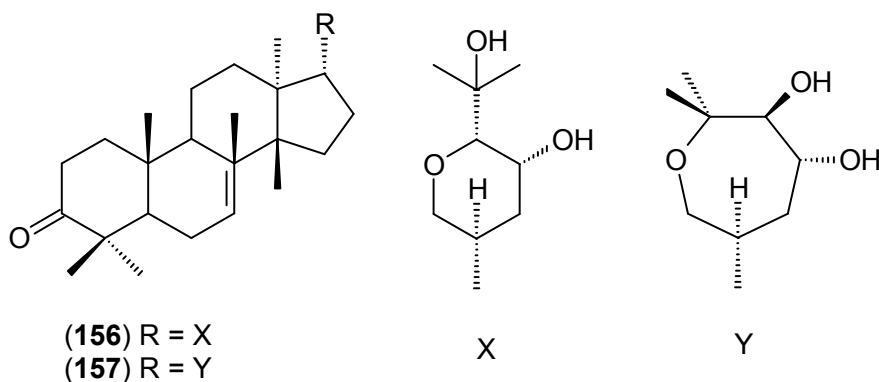


X



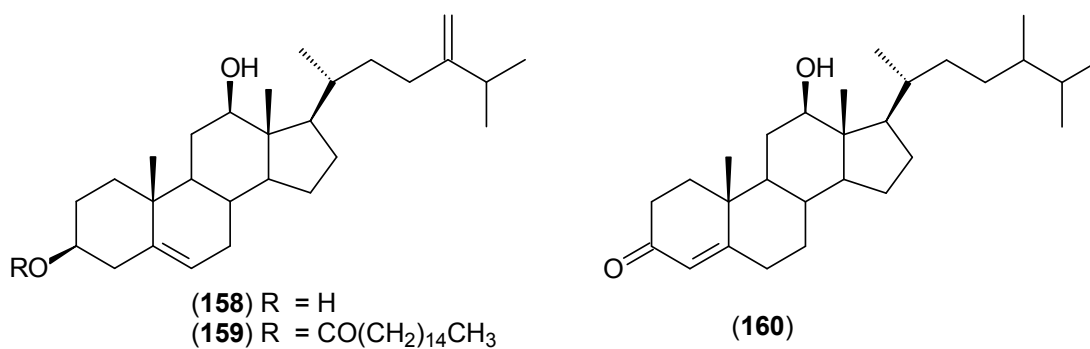
Y

Bourjotinolona A (**156**) e hispidona (**157**)

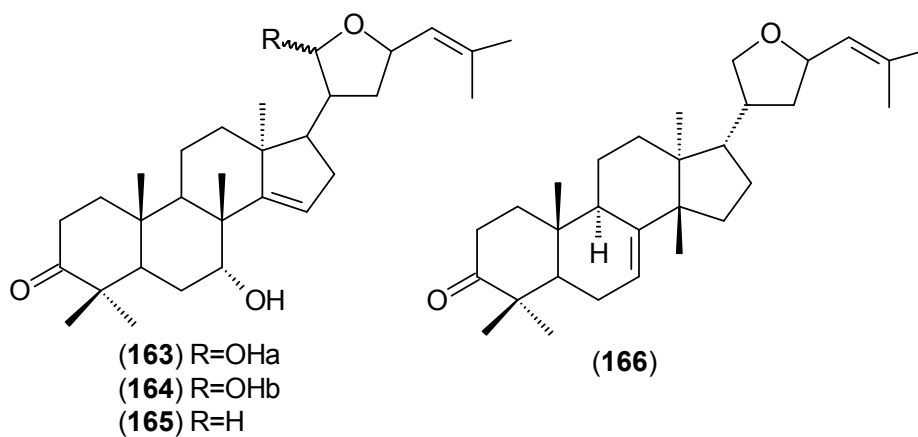
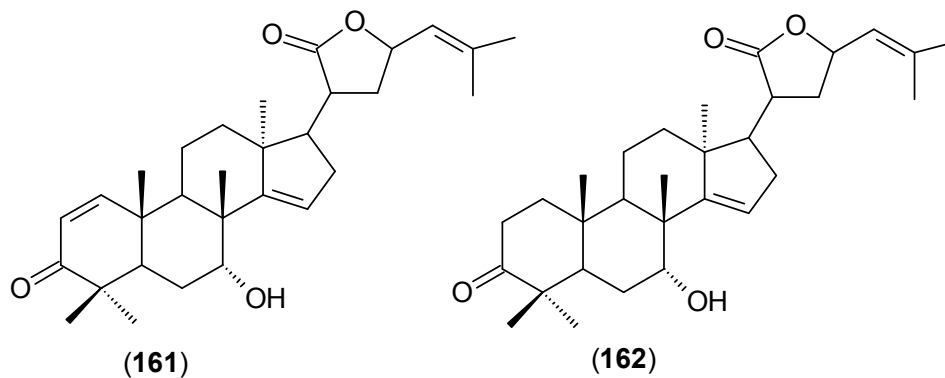


Trichilia lepidota (Pupo et al., 2002); (Terra, 2010)

24-metileno-12 β -hidroxicolesterol (**158**), 3-palmitato de 24-metil-12-hidroxicolest-5-eno (**159**), 24-metil-12 β -hidroxicolest-4-em-3-ona (**160**).

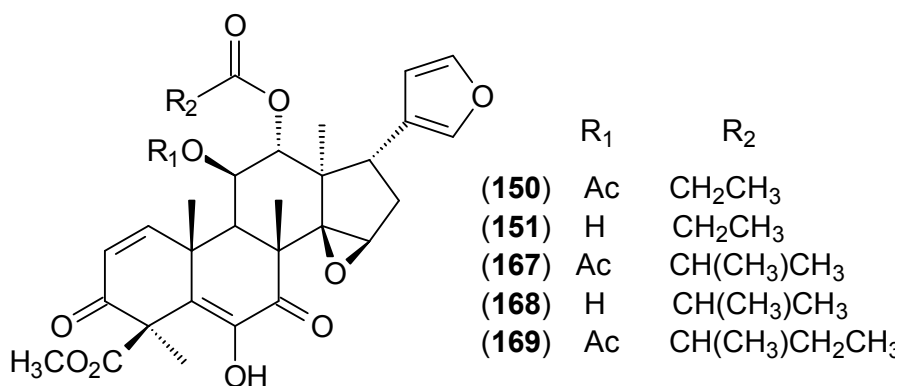


Inéditas (**161**) e (**162**), 21,23-epoxi-7 α ,21 α -diiidroxiapotirucalla-14, 24-dien-3-ona (**163**) 21,23-epoxi-7 α ,21 β -diiidroxiapotirucalla-14,24-dien-3-ona (**164**), disorona (**165**), desoxiflindissona (**166**).

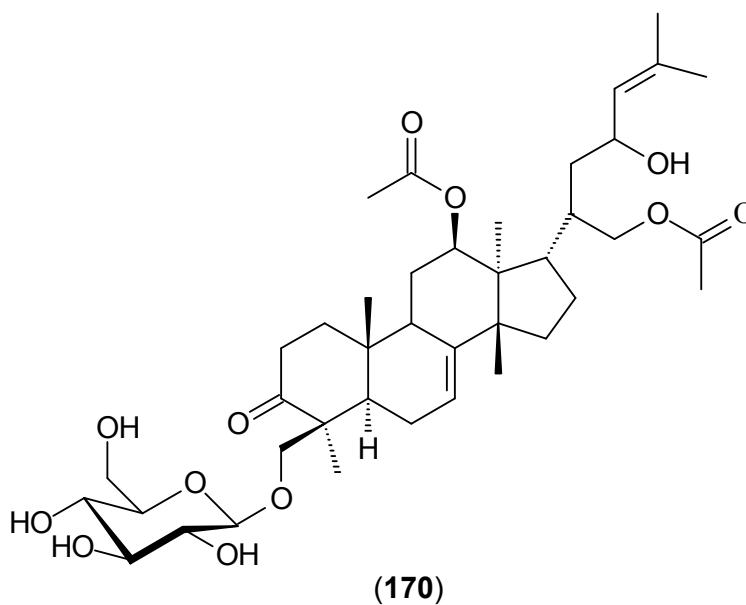


Trichilia pallida (Simmonds et al., 2001)

Hirtina (**150**), diacetilhirtina (**151**), metil 6-hidroxi-11 β -acetoxi-12 α -(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato (**167**), metil 6,11 β -diidrossi-12 α -(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato (**168**), metil 6-hidroxi-11 β -acetoxi-12 α -(2-metilbutanoiloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato (**169**).

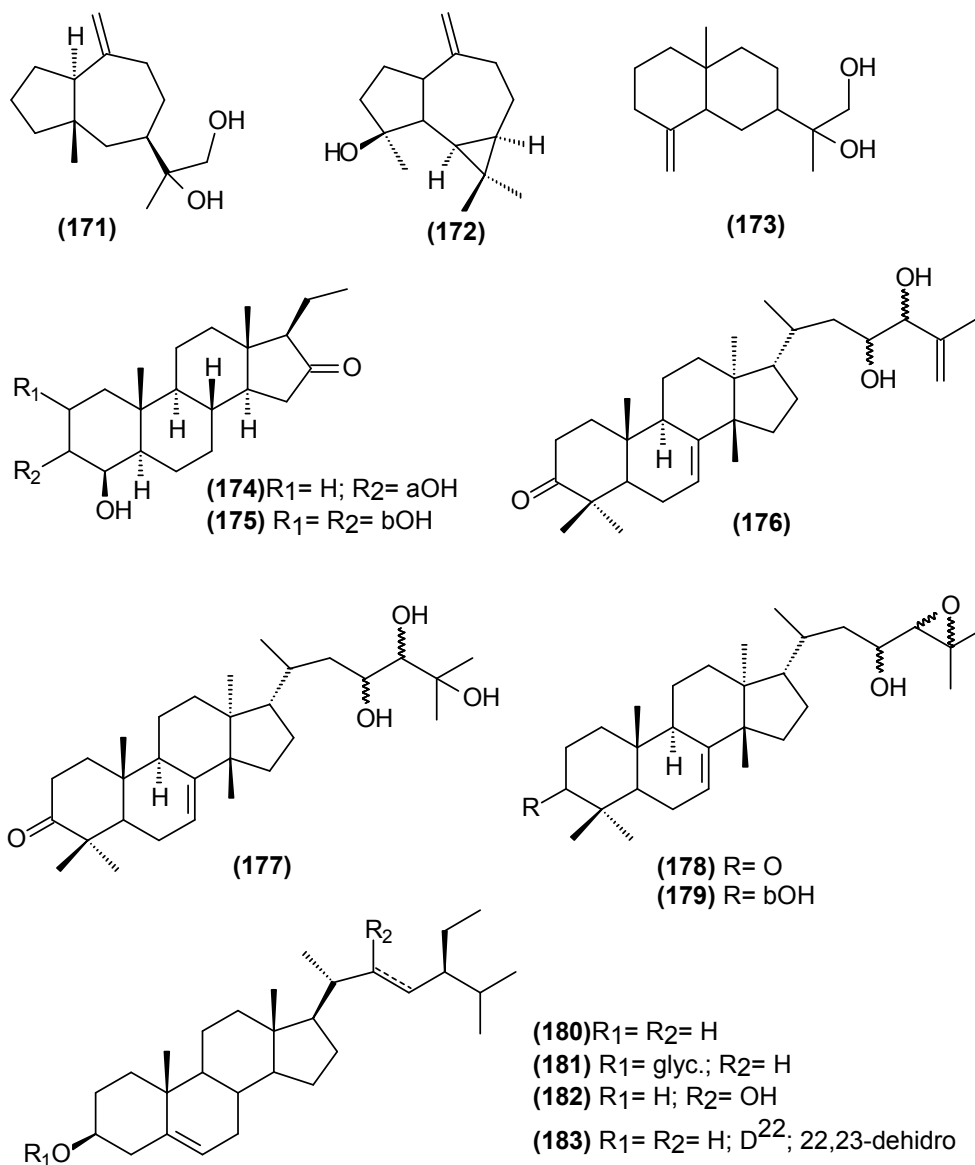
***Trichilia prieuriana*** (Olugbade e Adesanya, 2000)

Prieurianosido (**170**)



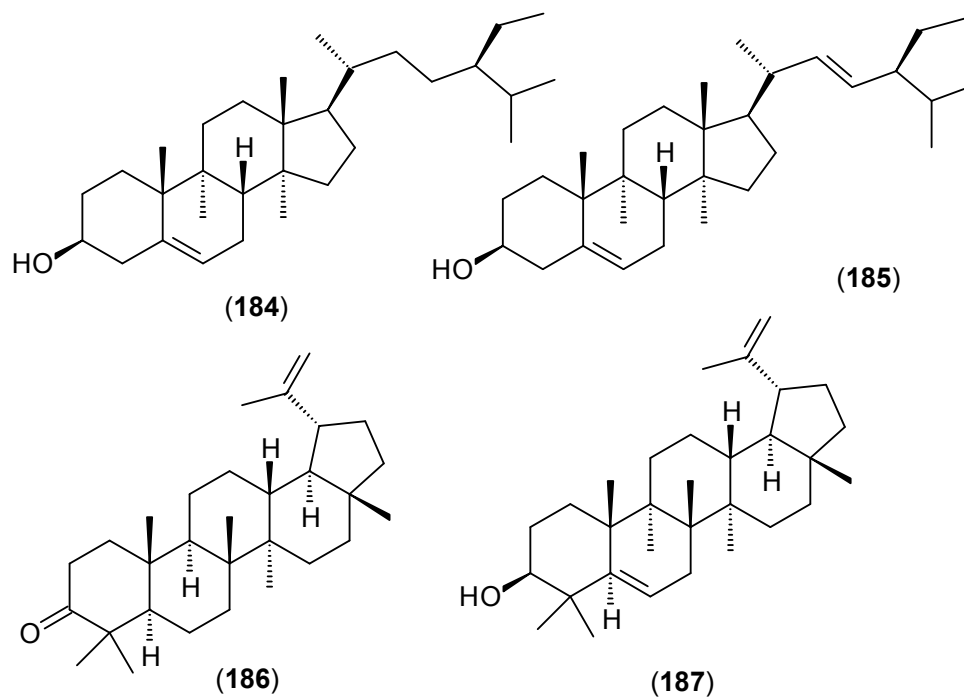
T. quadrijuga (Rodrigues, 2009)

Quadrijugol (**171**), espatulenol (**172**), kuditidiol (**173**), 3 α ,4 β -diidroxipregnan-16-ona (**174**), 2 β ,3 β ,4 β -triidroxipregnan-16-ona (**175**), bourjotinolona B (**176**), piscidinol (**177**), nilocitina (**178**), diidronilocitina (**179**), sitosterol (**180**), 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (**181**), itesmol (**182**), estigmasterol (**183**).

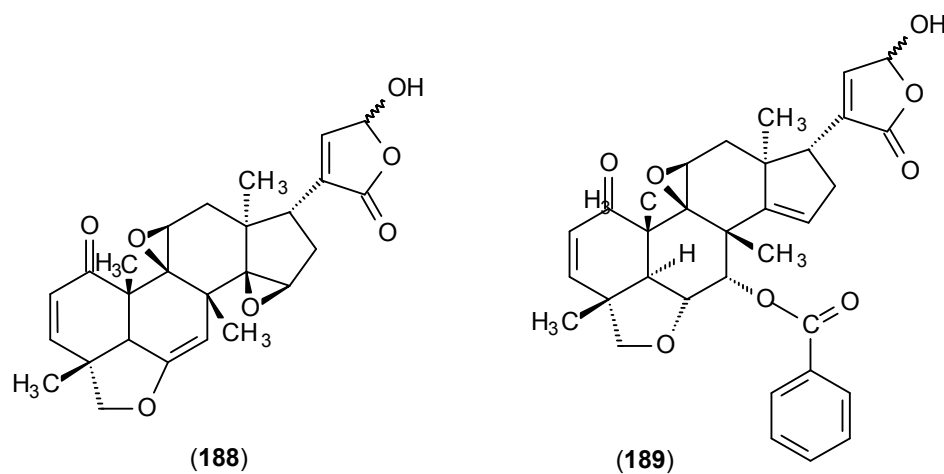


Trichilia ramalhoi (Ambrozim, 2004)

β -sitosterol (**184**), estigmasterol (**185**), lupenona (**186**), lupeol (**187**)

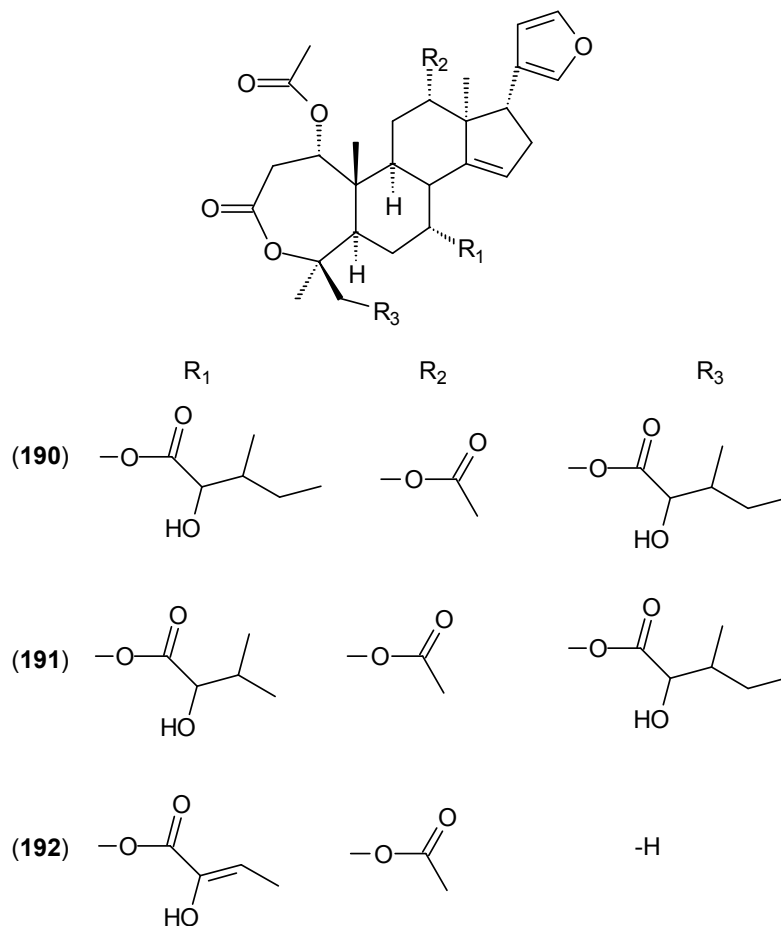
***Trichilia rubescens*** (Krief et al., 2004)

trichirubina A (**188**) e trichirubina B (**189**)



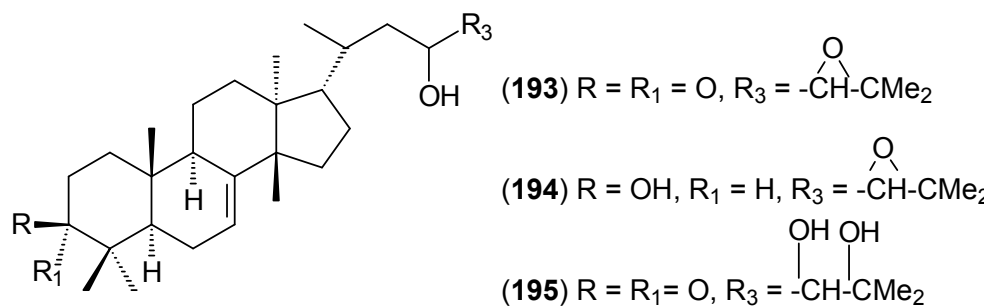
Trichilia rubra (Musza et al., 1995)

Rubralina A (**190**), rubralina B (**191**) e rubralina C (**192**).

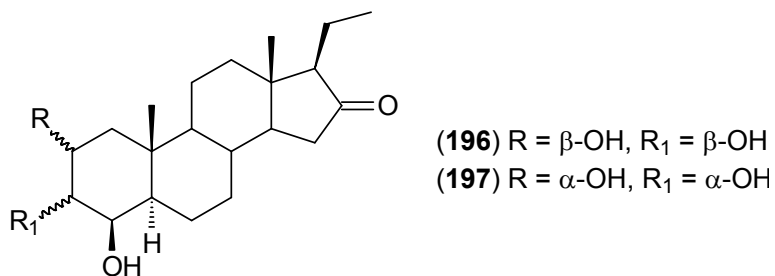


Trichilia schomburgkii (Tinto, Jagessar e Ketwaru, 1991) (Ketwaru, Klass e Tinto, 1993)

Niloticina (**193**), diidroniloticina (**194**) e piscidinol A (**195**).

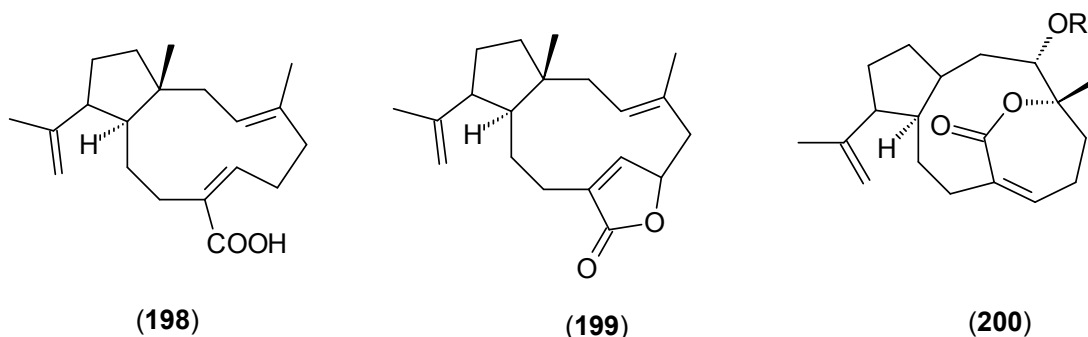


2 β ,3 β ,4 β -triidroxipregnan-16-ona (**196**) e 2 α ,3 α ,4 β -triidroxipregnan-16-ona (**197**)



Trichilia trifolia (Ramírez et al., 2000)

ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-17-óico (**198**),
 (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-6,17-olida (**199**) e
 (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxidolabela-7,18-dien-4,17-olida (**200**).

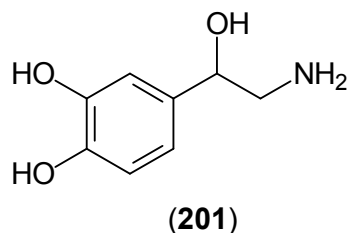


3.2.1. Atividades biológicas do gênero *Trichilia*

Com relação às atividades biológicas reportadas a esse gênero, pode-se citar a espécie *T. emetica*, comumente conhecida como Sulafinzan, na linguagem popular de Bambara (tribo Africana), possuindo efeito hepatoprotetor através de uso popular. Os estudos fitoquímicos das raízes desta espécie resultaram no isolamento de limonóides (Nakatani et al., 1981), relatando a atividade contra o *Plasmodium* (Germanò et al., 2005). Também foram encontrados taninos nas raízes e casca do caule (Germanò et al., 2006).

Outra espécie destacada é *T. catigua* que cresce abundantemente em várias regiões do Brasil (Campos et al., 2005). Muito conhecida como Catuaba, pode ainda ser chamada de pau ervilha e catuaba do norte (Beltrane et al., 2006), sendo utilizada como tônico para o tratamento de stress, fadiga, impotência, déficit de memória (Campos et al., 2005), estimulante sexual, afrodisíaco, purgativo e no tratamento de reumatismo (Zanolari et al., 2003; Kletter et al., 2004).

Por esse histórico de estimulante, a Catuaba passou por um teste comparativo de ação antidepressiva com a Dopamina (**201**), apresentando excelentes resultados (Campos et al., 2005).



Os sesquiterpenos isolados do gênero *Trichilia* também vêm apresentando atividades interessantes, como no caso dos dois isolados em *T. cuneata*, (**87** e **88**), que demonstraram atividade inibitória para peroxidação em membranas lipídicas em mitocôndrias e alta atividade antibacteriana (Doe et al., 2005).

Na China, para o tratamento de artrite, faringite, amigdalite e outras enfermidades, são utilizadas as raízes da espécie *T. connaroides* (Inada et al., 1994). Já os galhos de *T. ramalhoi* possuem altíssima atividade contra *Tripanossoma cruzi* (doença de Chagas) (Ambrozin et al., 2004).

A atividade de redução do apetite em insetos foi reportada a vários extratos vegetais de *Trichilia*, como para o extrato etanólico de *T. trifolia* que tem atividade sobre as larvas de *Peridroma sauci* e o extrato de diclorometano da madeira sobre larvas de *Sitophilus arylae*, que devoram plantações de arroz (Ramírez et al., 2000). Extratos da espécie *T. havanensis* também têm ação frente às larvas de *Leptinotarsa decemlineata* e *Spodoptera exigua* (Rodriguez et

al., 2003), bem como o extrato metanólico da madeira de *T. americana* que além da redução no apetite, também tem ação de dessensibilização em larvas de *Spodoptera litura* (Wheeler et al., 2001a).

Atividade citóxica também é relatada sobre a espécie *T. pallida* sobre as espécies *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (Roel et al., 2000), *Bemisia tabaci* (larvas da mosca-branca) (Souza e Vendramim, 2001; Souza, 2004) e *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) (Gonçalves-Gervásio, 2003; Cunha et al., 2006).

Desta forma, algumas atividades estão mostradas de forma resumida na **Tabela 2**, a seguir:

3.2.2. *Trichilia casarettii* C. DC.

A espécie possui como sinônimos: *Trichilia casarettii* var. *trifoliolata* C. DC.; *Trichilia casarettii* var. *microphyllina* C. DC. e *Trichilia oblonga* C. DC. (Patrício e Cervi, 2005) observada nas **Figuras 2 e 3** abaixo:

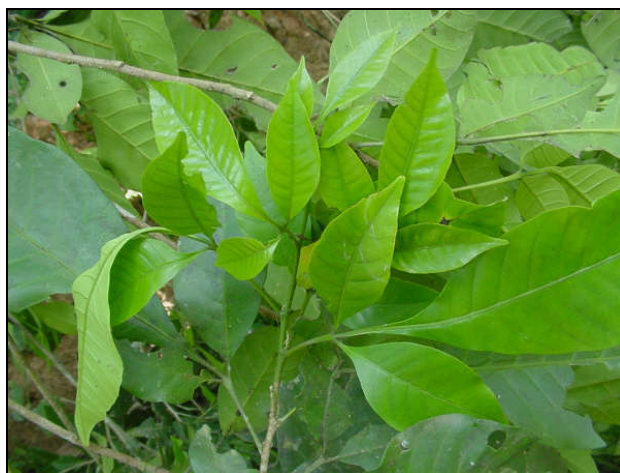


Figura 2: Folhas da espécie *Trichilia casarettii* (Figueiredo, 2006a).



Figura 3: Tronco da espécie *Trichilia casarettii* (Figueiredo, 2006b).

3.2.2.1. Aspectos botânicos e geográficos de *Trichilia casarettii* C. DC.

Suas árvores podem chegar a alturas entre 5-8 m. Ramos jovens marrons, pubescentes com lenticelas. Folhas imparipinadas, 7-15 cm compr.; pecíolos 3-10 mm compr., os terminais maiores. Folíolos 3-5, opostos a subopostos; elípticos, obovado-lanceolados, ápice acuminado ou atenuado, base assimétrica cuneada nos folíolos laterais, simétrica nos terminais, geralmente decorrente; cartáceos; 4,5-8,5 cm X 1,4-3,5 cm; face adaxial glabra, face abaxial glabrescente, com tufo de pêlos nas axilas da nervura central, com glândulas pontuadas vermelhas; venação eucamptódroma ou broquidódroma. Inflorescência axilar, panícula; 3-7 cm compr.; brácteas na base dos ramos laterais; bractéolas na base do pedicelo e nas articulações; pedicelo 1-1,5 mm compr.; glabro. Flores unissexuais, plantas dióicas; Cálice pateliforme, 0,5-1 mm compr., 5 sépalas largamente ovaladas ou triangulares, ápice agudo ou obtuso, bordos levemente ciliados, persistente no fruto. Corola imbricada. Pétalas 5, livres, 2,5-4,5 mm X 0,75-1,5 mm, lanceoladas ou elípticas, ápice agudo, glabro. Androceu com tubo estaminal urceolado; filetes gamostêmones, glabros, margem com 9-10 lobos alternando-se com as anteras. Anteras 9-10 com 0,7-0,8 mm compr., glabras. Nectário em forma de anel em torno do ovário ou ausente. Gineceu com ovários ovóides, glabros, 3-oculares, lóculos com 2 rudimentos seminiais colaterais. Estilete glabro. Estigma capitado cônico 3-lobado. Fruto cápsula elipsóide, 1,5-2 cm X 0,8-1 cm, ápice arredondado, emarginado ou acuminado, base obtusa com suspensor curto até 1 mm compr.; superfície levemente verrugosa, glabra. Sementes 1 por fruto, 1 cm X 0,6 cm. Ovaladas, parcial ou completamente recobertas por um arilo alaranjado, carnosos; testa membranácea. (Figura 4, p. 43) (Patrício e Cervi, 2005).

Esta espécie floresce de dezembro a fevereiro e seus frutos maduros podem ser coletados nos meses de abril a setembro. É distribuída nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Espírito Santo, ocorrendo em floresta ombrófila densa submontana, floresta ombrófila mista e floresta estacional semidecidual, entre 50-300 m de altitude.

Trichilia casarettii recebeu esse nome em homenagem ao médico e botânico italiano Giovanni Casaretto (1812-1879) que viajou pelo Brasil coletando

plantas (Klein, 1984), e apresenta como nomes vulgares: Murta-vermelha (SC), Catiguá-branco (RS), Baga-de-morcego (SC) e Catiguá (PR, SC e RS) (Klein, 1984), Orvalho (MG), Mateus (ES).

Figura 4: *Trichilia casarettii* C. DC. A, hábito. B, inflorescência. C, flor sem corola, mostrando o tubo estaminal. D, flor em corte longitudinal, mostrando androceu e gineceu. E, pétala. F, gineceu. G, tubo estaminal aberto – face ventral. H, fruto. I, semente.

3.2.3. *Trichilia silvatica* C. DC.

A espécie possui como sinônimos: *Trichilia cuspidata* C. DC. (Patrício e Cervi, 2005) e pode ser visualizada na **Figura 5** abaixo:

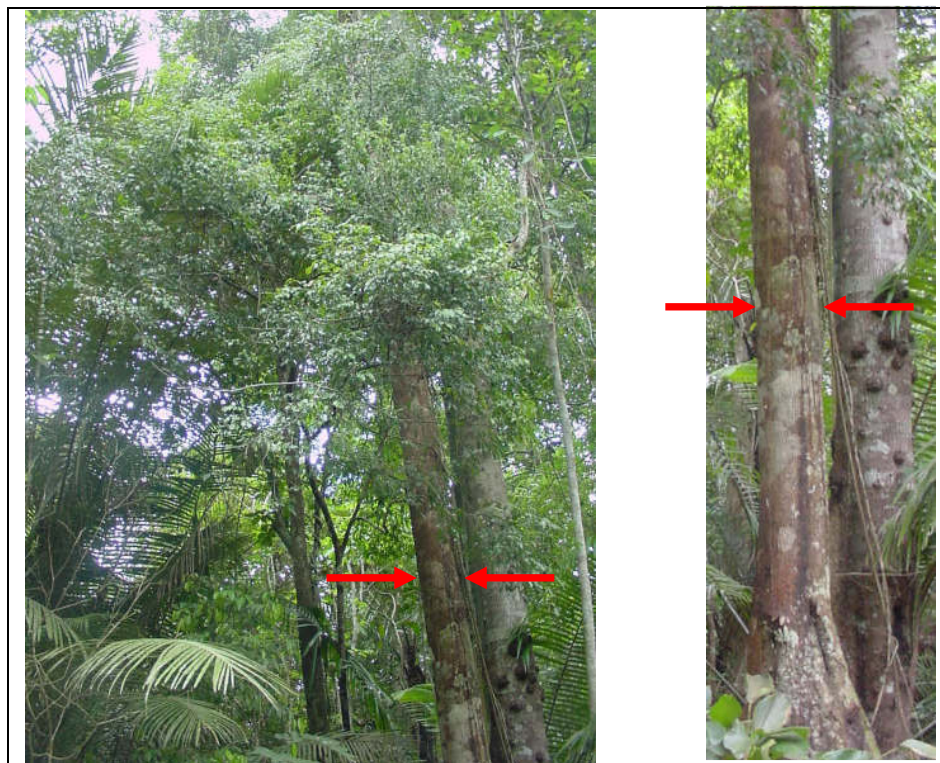


Figura 5: Espécie *Trichilia silvatica* (Figueiredo, 2006c).

3.2.3.1. Aspectos botânicos e geográficos de *Trichilia silvatica* C. DC.

Ela apresenta-se como árvore 5-10 m. *Ramos* jovens acinzentados a marrons-escuro, adpresso-pubérculos, com lenticelas esparsas. Folhas imparipinadas, 8-24 cm compr., pecíolo e ráquis caniculados na fase superior, glabros; pecíolulo 1,5-2,5 mm compr.. Folíolos 5-7, alternos raramente opostos, alípticos, obovados; base atenuada ou cuneada a decurrente, nos folíolos inferiores com base simétrica ou ligeiramente assimétrica; ápice estreitamente acuminado; cartáceos; 8-13 cm X 2,7-4,1 cm, folíolos inferiores menores; ambas as faces glabras; venação eucamptódroma. Inflorescência axilar, panícula, 4,5-7 cm compr.; pedicelo 0,75-2 mm compr.. Flores unissexuais, plantas dióicas. Cálice pateliforme 0,5-1,5 mm compr., (3)4-5 sépalas, triangulares ou ovaladas,

ápice agudo ou obtuso, esparsamente adpresso-pubérulo na face abaxial. Corola 4-5 pétalas livres ou concrecidas, volvadas, reflexas, 2,5-3 mm X 0,7-5 mm, lanceoladas, ápice agudo, face abaxial adpressa-pubérula a glabra, face adaxial glabra. Androceu com tubo estaminal ciatifoema ou urceolado; filetes gamostêmone, 1-2 mm compr., margem com 6-7 lobos agudos alternando com as anteras, face extarena glabra eventualmente pubérula com tricomas crespos no ápice e face interna pubescente. Anteras 6-7; 0,9-1 mm compr., glabras. Nectário ausente. Gineceu com ovário ovóide, pubescente a estrigoso, 3-locular; Estilete glabro; Estigma discóide até capitado. Fruto cápsula estreitamente oblonga, 2 cm X 0,6 cm, ápice e base arredondados, lisa e discretamente verrugosa pubescente. Semente 1 por fruto, 1,5-2 cm compr.; completamente circundada por um arilo carnosos tripartido; testa membranácea (Figura 6, p. 46) (Patrício e Cervi, 2005).

Apresenta floração de agosto a outubro e seus frutos maduros podem ser coletados a partir de novembro. No Brasil, distribui-se pelos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo.

Do latim *silvatica*, significando que vive na floresta (Klein, 1984), apresenta como nomes vulgares: Catiguá (SC), Catiguá-branco (SC), Cutia-vermelha (SC), Rosa-branca (BA) (Pennington et al., 1981).

Figura 6: *Trichilia silvatica* C. DC. A, hábito. B, flor estaminada. C, flor em corte longitudinal, mostrando androceu e gineceu. D, tubo estaminal aberto – face dorsal. E, pétala. F, flor pistilada. G, gineceu. H, tubo estaminal aberto – face dorsal. I, fruto.

3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Em virtude da grande importância pela busca por substâncias bioativas naturais, à medida que os produtos sintéticos estão apresentando menor eficácia ao combate a microorganismos, foram selecionados cinco ensaios biológicos para serem realizados, dos quais seguem abaixo:

3.3.1. *Artemia salina* Leach

É comum hoje em dia a inserção de diversos ensaios biológicos simples em laboratórios de Química de Produtos Naturais, com o objetivo de biomonitorar o estudo fitoquímico de extratos na busca por substâncias bioativas (Hamburger e Hostettmann, 1991). Dentre estes bioensaios, pode-se citar o teste de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach (TAS), um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, muito dependente do meio onde se encontra (Galotta e Boaventura, 2005).

Este ensaio é caracterizado por ser um ensaio rápido e barato, fornecendo informações interessantes sobre o biomonitoramento de extratos brutos, onde são considerados ativos $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (Ferrigni et al., 1984 e Meyer et al., 1982), existindo relatos de correlação entre a toxicidade de *Artemia salina* com atividades como antifúngica, antimicrobiana e viruscida (MacRey, Hudson e Towers, 1988), tripanossomicida (Zani et al., 1995), parasiticida (Sahpaz et al., 1994) dentre outras.

Boas correlações entre a toxicidade frente à *Artemia salina* com a atividade antitumoral vêm sendo obtidas por McLaughlin e colaboradores, e quando testadas substâncias puras, Dolabela (1997) afirma que, quando apresentam toxicidade $DL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$, podem apresentar atividade antitumoral.

3.3.2. Teste anticancerígeno

O câncer de pulmão é o tipo mais comum de tumores malignos, apresentando um aumento de 2% na incidência mundial. Segundo a última

estimativa mundial, para este ano no Brasil foram estimados 17.800 novos casos de câncer de pulmão para homens e 9.830 para mulheres (INCA, 2009).

A resistência à quimioterapia convencional é uma característica inerente ao câncer do pulmão, o que faz necessária a descoberta de novas substâncias antineoplásicas, ou que sirvam de modelo para novas substâncias ativas sintéticas, o que vem motivando cada vez mais testes com extratos brutos vegetais e substâncias puras isoladas destes.

A classificação histológica do câncer de pulmão mais aceita pela literatura mundial é a da Organização Mundial de Saúde (OMS). São encontrados basicamente dois grupos de câncer de pulmão: carcinoma de células não pequenas de pulmão (CPNPC) e grupo celular carcinoma de células pequenas. Este, caracterizado por um rápido crescimento, grande capacidade de disseminação e, inclusive com invasão cerebral precoce. Apesar do alto grau de resposta ao tratamento, apresenta baixo percentual de cura (Uehara, 1998).

3.3.3. *Aedes aegypti*

A incidência da dengue aumentou drasticamente no fim do século passado. Ela é endêmica em mais de 100 países, e mais de 25 bilhões de pessoas já foram contaminadas em várias regiões do mundo, além do mosquito também ser transmissor da febre amarela. Em vista disso, testes contra as larvas *Aedes aegypti* são efetuados exaustivamente, como exemplo com a espécie *Melia azedarach*, conhecida como Santa Bárbara no Brasil. O óleo e extratos orgânicos das folhas e frutos dessa árvore mostram várias bioatividades contra insetos e outros organismos conferidas a limonóides e tetranortriterpenóides. Na comparação de extratos de Nim com os de *Melia azedarach* contra as larvas *Aedes aegypti*, os extratos de *Melia* foram mais efetivos (Wandscheer et al., 2004).

3.3.4. Microorganismos presentes na flora bucal

A cavidade oral é o habitat de uma rica flora microbiana, integrada por vírus, bactérias e fungos convivendo em situação de anfibiose com o hospedeiro (Lacaz, 1970).

Estudos indicam que a responsável pelas cáries, dentre um grupo específico de microorganismos que habitam a cavidade oral, é a bactéria *Streptococcus mutans*, que corrói o esmalte dos dentes dando início ao processo de doenças gengivais de forma geral, e por consequência, outras doenças associadas como as cardíacas devido à sua capacidade de adesão à superfície dentária, através da formação da placa dental bacteriana, ou seja, o biofilme dentário (Beck et al., 1996).

O Gênero *Enterococcus* inclui diversas espécies resistentes do trato gastrointestinal, da vagina e da cavidade bucal como comensais (Paradella, Kogalito e Jorge, 2007), tendo a espécie *Enterococcus faecalis* como responsável por mais de 90% das infecções humanas e enterocócicas (Jett, Huycke e Gilmore, 1994).

Bactéria coco gram-positiva com alta resistência ao pH alcalino, *Enterococcus faecalis* está associada a infecções endodônticas em odontologia. Vem despertando o interesse da comunidade científica, visto que faz parte do grupo de microorganismos isolados e cultivados de canais com tratamento endodôntico fracassado (Cháves de Paz, et al., 2003). Vários autores relatam testes com extratos vegetais frente aos patógenos orais (Crotti et al., 2010; Martins, et al., 2009), incluindo *E. faecalis*, o que motivou também, visto que os medicamentos à base de plantas medicinais têm por meta prevenir, (Rasooli, 2008), controlar (Gusmão, 2004), e inibir a formação de biofilme bacteriano, (Pereira, 2006) como principal modo de ação no combate às afecções bucais.

O Nim, por exemplo, é considerado ativo como anti-séptico bucal, antiúlcera e na limpeza em várias doenças dentárias (Parida et al., 2002). Suas folhas são usadas no tratamento de gengivites e periodontites (Husain et al., 1992) além de se mostrar eficaz na inibição do crescimento de placa bacteriana, como mostrou o estudo comparativo de extrato de Nim (na forma de gel) com placebo e solução de gluconato de clorexidina (Pai et al., 2004).

3.3.5. *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* habita freqüentemente a mucosa nasal, a partir das quais contamina as mãos. Ele também é uma causa freqüente de infecções cutâneas nas mãos. Destas fontes, pode facilmente penetrar no alimento (Tortora et al., 2004).

A intoxicação alimentar causada por este microrganismo é devido à contaminação de alimentos pelas exotoxinas (enterotoxinas) produzidas pela bactéria. Estas exotoxinas são termoestáveis e podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento. Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana, cerca de 45% destas no mundo estão relacionadas com esta bactéria (Franco e Landgraf, 1996).

Teste feito por Pizzolatti e colaboradores em 2002 mostrou que o extrato em acetato de etila de *Trichilia catigua* apresentou boa inibição no crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, bem como a mistura de flavolignanas isolada desta espécie se mostrou também ativa.

Devido ao aumento gradual da resistência apresentada por diferentes espécies de *Staphylococcus* sobre antibióticos atualmente existentes, faz-se a necessidade constante de se testar extratos vegetais com o intuito de que se encontre novas substâncias com atividades antibacterianas.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA UTILIZADA

4.1. ESCOLHA DA PLANTA

As espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* foram escolhidas por pertencerem à família Meliaceae, rica em substâncias terpenoídicas, das quais muitas são dotadas de diversas atividades biológicas, e ainda devido ao fato dessas espécies não apresentarem estudos químicos e ou farmacológicos prévios.

4.2. COLETA DA PLANTA

O material vegetal, constituído por folhas e galhos das espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*, foi coletado nas proximidades da Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce em Linhares-ES, no mês de novembro de 2006. Suas exsicatas encontram-se no herbário da Companhia Vale do Rio Doce em Linhares, sob a numeração CVRD-449 e CVRD-521, respectivamente.

4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os galhos e folhas foram secos à temperatura ambiente, logo após a coleta e moídos separadamente em moinho de martelo. A extração do material das espécies foi feita por maceração utilizando metanol, e as soluções foram evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo fornecendo os extratos brutos.

Em seguida os extratos das espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* foram submetidos à partição líquido-líquido, conforme ilustrado nos **Esquemas 1 a 4** (p. 53 a 56):

4.4. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

No isolamento e purificação das substâncias por técnicas cromatográficas foi utilizado gel de sílica (Merck Darmstadt) PF₂₅₄ para as cromatografias em camada delgada preparativa (20 x 20 cm), e sílica gel 0,20 mm a 0,063 mm (60-230 Mesh ASTM) para as cromatografias em coluna aberta. A visualização das substâncias em camada delgada preparativa foi feita por irradiação de luz ultravioleta a 254 nm e 365 nm, e/ou pulverizadas com solução de vanilina a 2% em ácido sulfúrico.

As análises cromatográficas utilizando cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolha de alumínio com gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck. As substâncias foram visualizadas através de irradiação com lâmpada ultravioleta (Aldrich) com comprimento de onda de 254 nm e 365 nm e/ou pulverizadas com solução de vanilina a 2% em ácido sulfúrico.

Os critérios de pureza adotados foram uma única mancha em CCDA, usando-se diferentes sistemas de eluentes.

Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em aparelho tipo Kofler marca Microquímica modelo MQAPF-301.

Na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H, 400 MHz e ¹³C, 100 MHz) foram utilizados aparelhos da marca Jeol, modelo Eclipse, e Brüker TOPSPIN Advance (¹H, 500 MHz e ¹³C, 125 MHz) em solventes deuterados, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades adimensionais (δ) representando partes por milhão da frequência aplicada. As constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em Hz.

Os espectros de massas de baixa resolução e cromatogramas em fase gasosa foram obtidos em um equipamento de CG/EM marca Shimadzu modelo QP-5050 A. Os de alta resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste – LeMaNor no equipamento VG AUTOSPES FYSONE INSTRUMENT.

A eliminação dos solventes de extratos e frações de colunas cromatográficas foi feita sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios Fisaton.

Ao longo das descrições de isolamento a seguir, várias frações deixaram de ser trabalhadas. As análises por cromatografia em camada delgada analítica mostraram a similaridade destas frações com as demais além de, em sua maioria, a presença de misturas complexas justificando o seu não fracionamento.

4.4.1. Isolamento dos Constituintes Químicos de *Trichilia casarettii*

4.4.1.1. Extrato em diclorometano dos galhos (TCLD)

O extrato em diclorometano (8,5 g) foi submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica e eluído com CH₂Cl₂/MeOH com gradiente de polaridade. Originou-se 18 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada analítica em 4 novas frações. Os dados estão mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano dos galhos.

Frações reunidas	Código	Quantidade (g)
1 a 3	TCLD-1	1,78
4 a 7	TCLD-2	0,90
8 a 11	TCLD-3	1,60
12 a 18	TCLD-4	4,00

Dentre as quatro frações acima, apenas a TCLD-4 foi submetida a posteriores fracionamentos pois foi a que se apresentou em melhores condições de separação avaliada por cromatografia em camada delgada analítica, além de apresentar a maior massa.

4.4.1.1.1. Isolamento do constituinte químico da fração TCLD-4.

A fração TCLD-4 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 31 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 15 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 4**, p. 59.

Tabela 4: Fracionamento cromatográfico da fração TCLD-4

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1	TCLD-4-1	24,2
2	TCLD-4-2	20,2
3	TCLD-4-3	28,0
4	TCLD-4-4	50,2
5 a 6	TCLD-4-5	90,1
7 a 10	TCLD-4-6	309,3
11 a 12	TCLD-4-7	227,9
13 a 14	TCLD-4-8	199,0
15 a 20	TCLD-4-9	528,9
21 a 22	TCLD-4-10	267,6
23 a 24	TCLD-4-11	261,2
25	TCLD-4-12	299,4
26	TCLD-4-13	113,1
27 a 29	TCLD-4-14	615,9
30 a 31	TCLD-4-15	963,0

Cristais presentes nas frações TCLD-4-9 a TCLD-4-11 foram analisados e identificados como a mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**ELA-11**).

As frações TCLD-4-5 e TCLD-4-6 foram reunidas e renomeadas para TCLD-4-5, que foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade. Foram coletadas 51 frações que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 6 novas frações, mostrado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Fracionamento cromatográfico da fração TCLD-4-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 13	TCLD-4-5-1	138,0
14 a 19	TCLD-4-5-2	122,1
20 a 23	TCLD-4-5-3	26,3
24	TCLD-4-5-4	19,5
25 a 40	TCLD-4-5-5	11,4
41 a 51	TCLD-4-5-6	57,9

A fração TCLD-4-5-5 forneceu a cumarina escopoletina (**ELA-16**).

4.4.1.2. Extrato hexânico das folhas (TCFH)

O extrato hexânico das folhas (2,0 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, eluído com hexano/acetato de etila, com gradiente de polaridade. Originou-se 33 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada analítica em 11 novas frações. Os dados são mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Fracionamento cromatográfico da fração hexânica das folhas

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 9	TCFH-1	99,40
10	TCFH-2	78,00
11 a 14	TCFH-3	57,20
15 a 16	TCFH-4 (5)	227,40
17 a 18	TCFH-5(7)	430,80
19	TCFH-6	70,00
20 a 21	TCFH-7(9)	517,10
22 a 23	TCFH-8	52,80
24 a 25	TCFH-9	72,30
26 a 27	TCFH-10	163,90
28 a 33	TCFH-11	143,30

4.4.1.2.1. Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-5

A fração TCFH-5 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica (com uma pequena quantidade de carvão ativo), e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 52 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 9 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 2	TCFH-5-1	2,9
3 a 13	TCFH-5-2	4,3
14 a 22	TCFH-5-3	3,9
23 a 26	TCFH-5-4	6,1
27 a 33	TCFH-5-5	23,3

34 a 40	TCFH-5-6	68,0
41 a 44	TCFH-5-7	21,2
45 a 46	TCFH-5-8	66,0
47 a 52	TCFH-5-9	29,9

A fração TCFH-5-2 forneceu o diterpeno Fitol (**ELA-10**).

4.4.1.2.2. Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-7.

A fração TCFH-7 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 50 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 9 novas frações. Os dados estão mostrados na **Tabela 8**:

Tabela 8: Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-7

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 16	Descartada	-
17 a 18	TCFH-7-1	7,40
19 a 23	TCFH-7-2	27,00
24	TCFH-7-3	5,70
25 a 29	TCFH-7-4	29,30
30 a 32	TCFH-7-5	34,30
33 a 37	TCFH-7-6	89,90
38 a 40	TCFH-7-7	22,20
41 a 44	TCFH-7-8	163,40
45 a 48	TCFH-7-9	49,60
49 a 50	Descartadas	-

A fração TCFH-7-2 apresentou-se como uma mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol (**ELA-11**), também isolada na fração TCFH-8.

4.4.1.2.3 Isolamento do constituinte químico da fração TCFH-9

A fração TCFH-9 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 50 frações, que posteriormente, após evaporação dos

solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 6 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-9

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 4	Descartada	-
5 a 10	TCFH-9-1	13,80
11 a 15	TCFH-9-2	53,50
16 a 25	TCFH-9-3	106,20
26 a 38	TCFH-9-4	297,60
39 a 45	TCFH-9-5	27,3
46 a 50	TCFH-9-6	18,10

A fração TCFH-9-4 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 49 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 6 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10: Fracionamento cromatográfico da fração TCFH-9-4

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 4	Descartada	-
5 a 10	TCFH-9-4-1	10,10
11 a 15	TCFH-9-4-2	14,70
16 a 25	TCFH-9-4-3	33,80
26 a 38	TCFH-9-4-4	34,70
39 a 45	TCFH-9-4-5	19,80
46 a 49	TCFH-9-4-6	42,30

A fração TCFH-9-4-1 forneceu o cicloartano **ELA-13**, e a fração TCFH-9-4-5 foi novamente purificada por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, resultando no isolamento de 8,0 mg do esteróide **ELA-14**.

4.4.1.3. Extrato metanólico das folhas (TCFM)

O extrato metanólico das folhas (8,0 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade. Originou-se 31 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada analítica em 8 novas frações onde os dados são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Fracionamento cromatográfico da fração metanólica das folhas

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 3	TCFM-1	19,3
4 a 9	TCFM-2	100,8
10 a 11	TCFM-3	23,0
12 a 13	TCFM-4	55,8
14 a 23	TCFM-5	518,0
24 a 26	TCFM-6	462,3
27 a 28	TCFM-7	6736,9
29 a 31	TCFM-8	13,9

4.4.1.3.1 Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-5

A fração TCFM-5 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 67 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 11 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 12**.

Tabela 12: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 3	TCFM-5-1	47,78
4 a 6	TCFM-5-2	57,90
7 a 9	TCFM-5-3	55,82
10 a 15	TCFM-5-4	54,49
16 a 19	TCFM-5-5	22,00
20 a 27	TCFM-5-6	18,99
28 a 37	TCFM-5-7	66,81

38 a 45	TCFM-5-8	58,00
46 a 54	TCFM-5-9	78,87
55 a 66	TCFM-5-10	37,90
67	TCFM-5-11	14,32

A fração TCFM-5-7 foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com hexano/acetato 30% fornecendo 3,3 mg do cicloartano **ELA-29**.

4.4.1.3.2 Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-6

A fração TCFM-6 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 89 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 14 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 13**.

Tabela 13: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-6

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 4	TCFM-6-1	20,1
5 a 10	TCFM-6-2	2,0
11 a 13	TCFM-6-3	17,0
14 a 20	TCFM-6-4	1,8
21 a 29	TCFM-6-5	2,5
30 a 37	TCFM-6-6	119,1
38 a 46	TCFM-6-7	98,0
47 a 51	TCFM-6-8	20,5
52 a 66	TCFM-6-9	12,7
67a 73	TCFM-6-10	5,6
74 a 77	TCFM-6-11	2,3
78 a 80	TCFM-6-12	20,4
81 a 83	TCFM-6-13	88,9
84 a 89	TCFM-6-14	41,6

A fração TCFM-6-8 forneceu o esteróide **ELA-18**.

4.4.1.3.3 Isolamento do constituinte químico da fração TCFM-7

A fração TCFM-7 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 49 frações. Após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 15 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 14**.

Tabela 14: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 3	TCFM-7-1	367,8
4 a 6	TCFM-7-2	811,8
7 a 9	TCFM-7-3	443,0
10 a 11	TCFM-7-4	255,8
12 a 15	TCFM-7-5	1.300,9
16 a 20	TCFM-7-6	567,7
21 a 25	TCFM-7-7	152,3
26 a 30	TCFM-7-8	123,4
31 a 36	TCFM-7-9	1.065,9
36 a 37	TCFM-7-10	359,7
38 a 40	TCFM-7-11	203,8
40 a 43	TCFM-7-12	567,0
44	TCFM-7-13	129,8
45 a 46	TCFM-7-14	318,0
47	TCFM-7-15	66,2

A fração TCFM-7-5 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 78 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 14 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 15**:

Tabela 15: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-5

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 3	TCFM-7-5-1	448,00
4 a 6	TCFM-7-5-2	5,70

7 a 9	TCFM-7-5-3	46,90
10 a 17	TCFM-7-5-4	155,60
18 a 20	TCFM-7-5-5	24,70
21 a 32	TCFM-7-5-6	12,60
33 a 39	TCFM-7-5-7	43,50
40 a 46	TCFM-7-5-8	145,90
47 a 50	TCFM-7-5-9	46,50
51 a 58	TCFM-7-5-10	14,20
59 a 69	TCFM-7-5-11	9,20
70 a 73	TCFM-7-5-12	42,30
74 a 76	TCFM-7-5-13	44,80
77 a 78	TCFM-7-5-14	24,60

As frações TCFM-7-5-3 e TCFM-7-5-4 foram reunidas e renomeadas para TCFM-7-5-3. A nova fração foi então purificada através de uma nova cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, fornecendo 8,9 mg do cicloartano **ELA-22**.

A fração TCFM-7-6 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 56 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 9 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 16**.

Tabela 16: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-6

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 5	TCFM-7-6-1	10,0
6 a 12	TCFM-7-6-2	8,9
13 a 14	TCFM-7-6-3	3,5
15 a 18	TCFM-7-6-4	23,5
19 a 23	TCFM-7-6-5	20,0
24 a 31	TCFM-7-6-6	72,9
32 a 43	TCFM-7-6-7	24,4
44 a 51	TCFM-7-6-8	102,8
52 a 56	TCFM-7-6-9	293,4

A fração TCFM-7-6-7 forneceu o cicloartano **ELA-19**.

A fração TCFM-7-9 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 57 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 6 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 17**.

Tabela 17: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-9

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 5	TCFM-7-9-1	50,5
6 a 12	TCFM-7-9-2	226,4
13 a 14	TCFM-7-9-3	597,1
15 a 18	TCFM-7-9-4	96,6
19 a 23	TCFM-7-9-5	32,0
52 a 56	TCFM-7-9-6	6,6

A fração TCFM-7-9-2 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 67 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 10 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 18**.

Tabela 18: Fracionamento cromatográfico da fração TCFM-7-9-2

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 6	TCFM-7-9-2-1	1,5
7 a 11	TCFM-7-9-2-2	50,3
12 a 27	TCFM-7-9-2-3	76,0
28 a 47	TCFM-7-9-2-4	40,8
48 a 49	TCFM-7-9-2-5	6,3
50 a 52	TCFM-7-9-2-6	5,3
53 a 58	TCFM-7-9-2-7	36,6
59 a 61	TCFM-7-9-2-8	2,0
62 a 64	TCFM-7-9-2-9	3,7
65 a 67	TCFM-7-9-2-10	1,6

Parte da fração TCFM-7-9-2-2 (50,3 mg) foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com hexano/acetato 25% fornecendo 11,0 mg do cicloartano **ELA-2**.

4.4.2. Isolamento dos constituintes químicos de *Trichilia silvatica*

4.4.2.1. Extrato em diclorometano dos galhos (TSLD)

A fração em diclorometano (7,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, e eluída com CH₂Cl₂/MeOH com gradiente de polaridade. Originou-se 23 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada analítica em 9 novas frações onde os dados são mostrados na **Tabela 19**.

Tabela 19. Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano dos galhos

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 2	TSLD-1	8,20
3	TSLD-2	112,00
4	TSLD-3	96,60
5 a 7	TSLD-4	299,50
8 a 10	TSLD-5	38,40
11 a 15	TSLD-6	141,1
16 a 19	TSLD-7	87,1
20 a 21	TSLD-8	60,60
22 a 23	TSLD-9	5.934,30

A fração TSLD-7 forneceu o triterpeno Lupeol (**ELA-12**).

4.4.2.1.1. Isolamento do constituinte químico da fração TSLD-9

A fração TSLD-9 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, obtendo-se 49 frações, que posteriormente, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade em cromatografia em camada delgada analítica, resultando em 19 novas frações. Os dados encontram-se resumidos na **Tabela 20**, p. 69.

Tabela 20: Fracionamento cromatográfico da fração TSLD-9

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 2	TSLD-9-1	17,30
3 a 9	Descartadas	-
10	TSLD-9-2	27,10
11	TSLD-9-3	242,00
12	TSLD-9-4	213,10
13	TSLD-9-5	2.352,80
14 a 18	TSLD-9-6	26,00
19 a 23	TSLD-9-7	124,40
24 a 25	TSLD-9-8	49,90
26 a 27	TSLD-9-9	47,10
28 a 29	TSLD-9-10	66,10
30 a 35	TSLD-9-11	152,80
36 a 38	TSLD-9-12	90,70
39 a 41	TSLD-9-13	112,90
42 a 43	TSLD-9-14	135,50
44 a 45	TSLD-9-15	159,60
46	TSLD-9-16	372,50
47	TSLD-9-17	220,90
48	TSLD-9-18	50,10
49	TSLD-9-19	1.369,20

A fração TSLD-9-16 foi submetida a outros três fracionamentos cromatográficos em coluna empacotada com gel de sílica e eluída com hexano/acetato de etila com gradiente de polaridade, forneceu 30,00 mg do sesquiterpeno **ELA-26** na fração TSLD-9-16-5-6-9.

4.4.2.2. Extrato em acetato de etila das folhas (TSFA)

A fração em acetato de etila (4,0 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, e eluída com CH₂Cl₂/MeOH com gradiente de polaridade. Originaram-se 34 frações que foram reunidas por similaridade através de cromatografia em camada delgada analítica em 12 novas frações onde os dados são mostrados na **Tabela 21**, p. 70.

Tabela 21: Fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas

Frações reunidas	Código	Quantidade (mg)
1 a 3	TSFA-1	6,6
4	TSFA-2	3,0
5	TSFA-3	1,7
6 a 8	TSFA-4	7,9
9 a 10	TSFA-5	5,3
11 a 15	TSFA-6	30,1
16	TSFA-7	63,6
17	TSFA-8	42,4
18 a 20	TSFA-9	175,6
21 a 23	TSFA-10	369,2
24 a 28	TSFA-11	1.866,0
29 a 34	TSFA-12	692,7

Desse fracionamento foram obtidas novamente as substâncias Lupeol (**ELA-12**) da fração TSFA-6-1; a mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**ELA-11**) da fração TSFA-6-2 e escopoletina (**ELA-16**) da fração TSFA-6-15.

4.5. TESTES BIOLÓGICOS

4.5.1. Atividade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach

O teste de citotoxicidade dos extratos foi efetuado de acordo com a metodologia sugerida por McLaughlin, Chang e Smith em 1991: a massa de 50 mg de extrato foi solubilizada em 5 mL da mistura de solventes H₂O:DMSO (3:2), com a obtenção de uma solução mãe de 10.000 ppm. Os ovos do microcrustáceo foram colocados em um microaquário com água do mar artificial (24 g de NaCl, 1,5 g de CaCl₂.2H₂O, 0,1 g de KBr, 0,7 g de KCl, 4,0 g de Na₂SO₄, 0,2 g de NaHCO₃ e 11 g de MgCl₂.6H₂O para 1 L de solução) por 48 horas em presença de luz para eclodirem, dividido em duas partes por uma peneira.

Após eclosão, 15 larvas foram transferidas para um tubo de ensaio 1, onde foram transferidos 25 μ L da solução mãe. O volume então foi completado para 5 mL com água do mar artificial, obtendo-se uma solução de concentração de 50 ppm. Seguindo o mesmo procedimento para os 4 tubos seguintes, obtendo-

se as concentrações de 100, 200, 300 e 500 ppm. O branco conteve apenas a mistura de H₂O:DMSO (3:2) e água do mar artificial, sendo o teste realizado em quadruplicata.

Depois de 24 horas em presença de luz, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas, onde os dados foram analisados pelo método Probitos de análise para obtenção das DL₅₀ e respectivos intervalos de confiança (Finney, 1971) que segue a variação de atividade para extratos com valores de DL₅₀ < 1000 mg/mL (Meyer et al., 1982).

Teste realizado no Laboratório de Ciências Químicas - LCQUI da UENF.

4.5.2. Atividade Antitumoral - Linhagens de Células Tumorais Não-Pequeñas do Pulmão NCI-H460

As amostras foram preparadas primeiramente solubilizando-se os extratos em DMSO. Em seguida uma alíquota foi transferida para tubo de ensaio e o volume completado com meio D-MEM-F12 de forma a se obter a concentração de 1000 ppm. Pela técnica da diluição obtive-se mais 3 concentrações: 500, 250 e 125 ppm.

A viabilidade celular foi determinada através do microensaio colorimétrico utilizando MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazolium de bromo] (Mosmann, 1983). Este teste baseia-se na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando captação do corante vital. Ele mede, portanto, a viabilidade celular de linfócitos de linhagem tumoral NCI-H460. O MTT é reduzido pela enzima NADH desidrogenase mitocondrial gerando cristais de cor violácea conhecidos como formazam. Como a atividade enzimática só ocorre em células vivas, a reação de redução reflete a viabilidade das células na cultura.

As células foram incubadas por 72 horas com os extratos nas quatro concentrações e após o tempo determinado (72 horas) foram adicionados 10 µL de MTT (Sigma, 5mg/mL) para cada 100 µL de cultivo, sendo utilizado Triton como controle negativo. As placas foram mantidas na estufa por quatro horas. Após esse período foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 µL de uma solução de HCl com isopropanol,

homogeneizando bem para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial.

A placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram então analisados através da absorbância de cada poço e os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados analisados pelo método estatístico Graph Pad Prism5, com a obtenção do IC₅₀ (concentração do extrato bruto que inibiu 50% da atividade enzimática).

No presente trabalho foram testadas células não pequenas do pulmão – NCI-H460 em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer – LBR do Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF.

4.5.3. Atividade larvicida *Aedes aegypti*

Alíquotas contendo 1 mg, 2 mg, 5 mg e 10 mg, em triplicata das amostras foram dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido, e transferidas para um béquer de 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas de terceiro estágio (Gadelha e Toda, 1985) juntamente com 19,7 mL de água. Paralelamente, foram feitos testes em branco, utilizando-se água e DMSO a 1,5 %. Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas exterminadas e calculada a CL₅₀ (Oliveira et al., 2002).

Os testes foram realizados em parceria com o Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

4.5.4. Atividade Antimicrobiana

4.5.4.1. *Staphylococcus aureus*

O experimento foi realizado com seis cepas de *S. aureus*, descritas no **Quadro 1**, p. 73, da coleção do Laboratório de Sanidade Animal (LSA)/CCTA e com onze extratos das espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*, obtidos no

Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) – Setor de Produtos Naturais/CCT da UENF.

O preparo dos inóculos consistiu em reativação individual de cada cepa em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia, EUA), com incubação a 37°C por 24 horas, seguido de suspensão também em caldo BHI com turvação equivalente 0,5 McF em fotômetro (Densimat®, bio Mérieux, França) com leitor ótico de comprimento de onda 550 nm.

Quadro 1. Cepas de *S. aureus* utilizados nos testes de inibição pelo método de difusão em ágar.

Staphylococcus aureus

LSA-88: esta cepa foi isolada do leite de vacas com mastite subclínica em um rebanho da região norte fluminense. Esta cepa é produtora de enterotoxinas.

COL: esta cepa corresponde ao perfil metilcilina-resistente (MRSA)

Smith Diffuse (ATCC 13709): cepa produtora de cápsula

Wood 46 (ATCC 10832): cepa fracamente produtora de cápsula

RN 6390B (ATCC 55620): cepa selvagem ágar positivo

ATCC 25923: cepa-padrão para testes de sensibilidade a drogas

Após a remoção completa do solvente de origem de cada extrato, as amostras foram preparadas com a solubilização dos extratos em DMSO p.a. (dimetilssulfóxido – VETEC, Brasil), obtendo-se as concentrações de 10 mg/mL. O antibiótico (concentração 10 µg/mL) de referência usado como controle positivo foi a gentamicina (Sigma, EUA) e o solvente DMSO p.a. foi utilizado como controle negativo.

Os **Quadros 2 e 3** (p. 74) descrevem os extratos vegetais testados em duas etapas distintas:

Quadro 2. Descrição dos extratos obtidos a partir dos gêneros *Trichilia*

Planta	Parte	Solvente	Sigla	Número
<i>T. casaretii</i>	Galhos	Acetato de etila	TCMA	1
	Folhas	<i>n</i> -butanólico	TCFB	2
		Metanólico	TCFM	3
<i>T. silvatica</i>	Galhos	Diclorometano	TSMD	4

Quadro 3. Descrição dos extratos testados na segunda etapa de testes

Planta	Parte	Solvente	Sigla	Número
<i>T. casaretii</i>	Galhos	Diclorometano	TCMD	1
		<i>n</i> -butanólico	TCMB	2
	Folhas	Hexano	TCFH	3
		Acetato de etila	TCFA	4
<i>T. silvatica</i>	Galhos	Acetato de etila	TSMA	5
		<i>n</i> -butanólico	TSMB	6
	Folhas	Metanólico bruto	TSFM	7

4.5.4.1.1. Métodos de Determinação

4.5.4.1.1.1. Difusão em Ágar

Este ensaio foi realizado de acordo com o método da difusão em ágar (método de Kirby-Bauer modificado) descrito por e Rojas e colaboradores (2006).

Alíquotas de 100 µL das suspensões de microorganismos foram semeadas em placas contendo ágar BHA (Acumedia, EUA), com auxílio de um swab estéril. O ágar foi perfurado com o auxílio de um perfurador formando orifícios circulares com 5,0 mm de diâmetro, onde foram adicionados individualmente 35 µL de cada extrato (apresentados nos **Quadros 2 e 3**), 35 µL do antibiótico gentamicina e 35

μL do solvente DMSO. Após a incubação das placas por 24 horas em estufa tipo B.O.D. a 37° C, foi analisada a formação dos halos de inibição do crescimento em torno dos poços e medidos com o auxílio de um paquímetro.

O experimento foi realizado em triplicata e as médias das medidas dos halos foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o pacote estatístico SAEG.

4.5.4.1.1.2. Método das diluições seriadas

O extrato em acetato de etila dos galhos de *T. silvatica* [TSMA (5)] foi selecionado dentre os extratos testados do Quadro 3, p. 74 por apresentar maiores halos de inibição para todas as cepas. Para este experimento foram utilizadas as cepas ATCC 25923 e LSA 88 como inóculos. O extrato foi submetido a uma diluição seriada em caldo BHI de maneira a se obter tubos com as concentrações: 150, 75, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em seguida cada tubo da diluição recebeu 100 μL dos inóculos recém-preparados com turvação de 0,5 McF. Após incubação a 37° C por 24 horas em estufa tipo B.O.D., 100 μL do conteúdo de cada tubo foram semeados em ágar BHA contido em placas de Petri com 10 cm de diâmetro, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa tipo B.O.D. e posteriormente foram submetidas a contagem de colônias. Os resultados em triplicatas foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

4.5.4.2. Patógenos na flora bucal

A atividade biológica dos extratos frente ao *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (adquirido no estoque da FIOCRUZ) foi avaliada através do método de difusão em Ágar descrito no item 4.5.4.1.1.1., com pequenas modificações, a saber, utilizando ágar sangue e todo o procedimento de crescimento em estufa tipo B.O.D. com as placas contidas em jarras de anaerobiose. Foram testados os extratos descritos na **Tabela 22**, p. 76. Os poços foram individualmente preenchidos com 50 μL de cada tratamento: gentamicina (1 mg/mL), DMSO P.A.

(solvente utilizado para a diluição das amostras) e extratos (nas concentrações de 50 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados das medidas dos halos foram expressos em mm.

Tabela 22: Extratos testados frente ao microorganismo *Streptococcus mutans*

<i>T. casarettii</i>	Folhas	Diclorometano	TCFD*
		Acetato de Etila	TCFA*
		Hexânico	TCFH
	Galhos	Butanólico	TCFB
		Acetato de Etila	TCMA
		Butanólico	TCMB

* Extratos submetidos à análise das microdiluições para obtenção da CMI

O teste para a bactéria *Streptococcus mutans* foi efetuado em parceria com o LSA, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF.

4.5.4.2.1. Outros microorganismos presentes na flora bucal

Foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578) para o teste de concentração mínima inibitória seguindo a metodologia seguinte:

Os meios de cultura e reagentes utilizados foram: Ágar sangue BD[®]; Caldo triptona soja (TSB) BD[®]; Sangue desfibrinado estéril de carneiro, Biotério Rodrigues[®]; Resazurina, Aldrich[®]; Digluconato de clorexidina - Sigma[®], Cloreto de Sódio - Cinética[®], Dimetil sulfóxido - Merck[®].

O teste com as bactérias *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mitis* foi realizado no ensaio de Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo LaPeMa – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UNIFRAN – Universidade de Franca.

4.5.4.2.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo usando microplacas.

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram adicionados o caldo triptona soja, as soluções das amostras (extratos, das frações ou substâncias puras) e as suspensões padronizadas dos microorganismos, totalizando 100 μL . As amostras foram avaliadas nas seguintes concentrações: 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas concentrações foram obtidas através do método de microdiluição em microplaca sendo que a solução de menor concentração, onde ocorreu a inibição do crescimento microbiano detectado após a adição de resazurina, corresponde ao valor de concentração mínima inibitória (CMI). Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, tomando-se os cuidados necessários e empregando-se vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados.

Foram realizados os seguintes controles negativos: controle de esterilidade do caldo (TSB) (100 μL de caldo triptona soja), controle das culturas - inóculo (que devem apresentar crescimento microbiano, devido à ausência de agentes antimicrobianos) (80 μL de caldo triptona soja + 20 μL do inóculo) e controle de esterilidade do sistema solvente utilizado na solubilização dos extratos e das substâncias isoladas (99 μL de caldo triptona soja e 1 μL de DMSO), que devem apresentar ausência de crescimento. Além disso, foi realizado também o controle do DMSO (mistura de 1 a 5 μL de DMSO, de 75 a 79 μL de caldo triptona soja e 20 μL de inóculo em 5 orifícios), que devem apresentar crescimento bacteriano, indicando a ausência de interferência do DMSO no crescimento dos microorganismos.

Como controle positivo frente aos microorganismos indicadores utilizou-se digluconato de clorexidina a 0,02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Conforme mencionado anteriormente, as atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,0115 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 5,9 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As microplacas foram seladas com parafilme e permaneceram incubadas a 37°C durante 24 h. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei* foram incubados em

microaerofilia (5% CO₂), enquanto *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus faecalis* foram incubados em aerofilia. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02 %. A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microorganismo sensível à substância avaliada).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica*

O estudo fitoquímico das duas espécies de *Trichilia* permitiu o isolamento e identificação de 13 substâncias, apresentadas na **Figura 7**, p. 80.

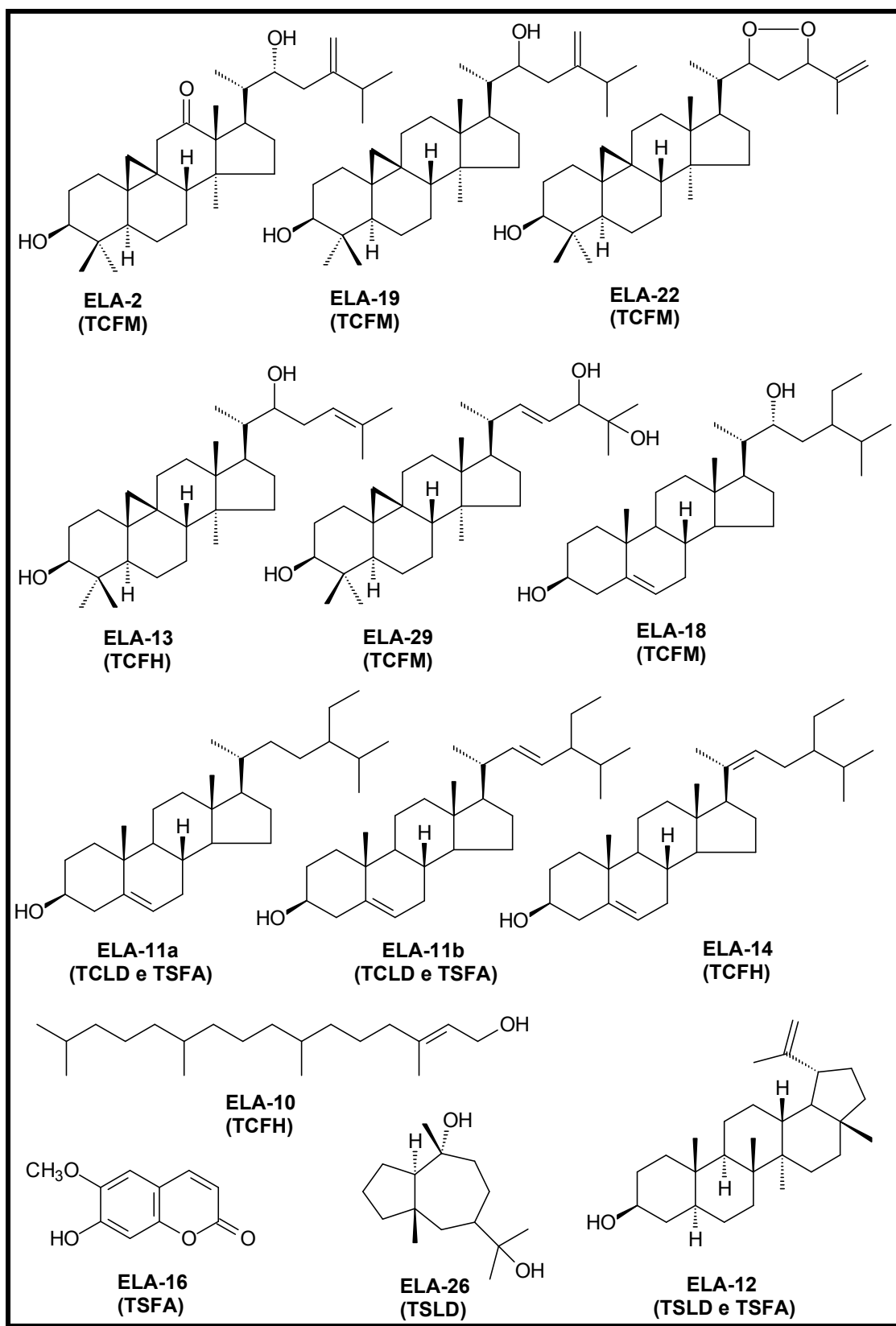


Figura 7: Substâncias isoladas das espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*

5.1.1. Determinação Estrutural dos Triterpenos Cicloartanos

Os cicloartanos são triterpenos que possuem uma característica marcante, a presença de um anel de três membros, advindo de uma nova ligação entre os átomos de carbono C-9 e C-19. A **Figura 8** abaixo mostra um esqueleto carbônico básico de um triterpeno cicloartânico, bem como a numeração dos seus respectivos átomos de carbono.

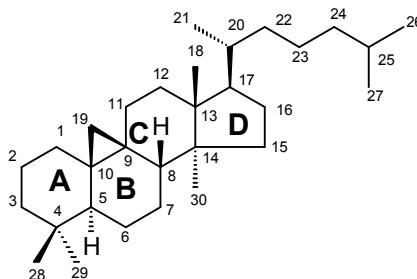


Figura 8: Esqueleto carbônico básico de um triterpeno cicloartânico

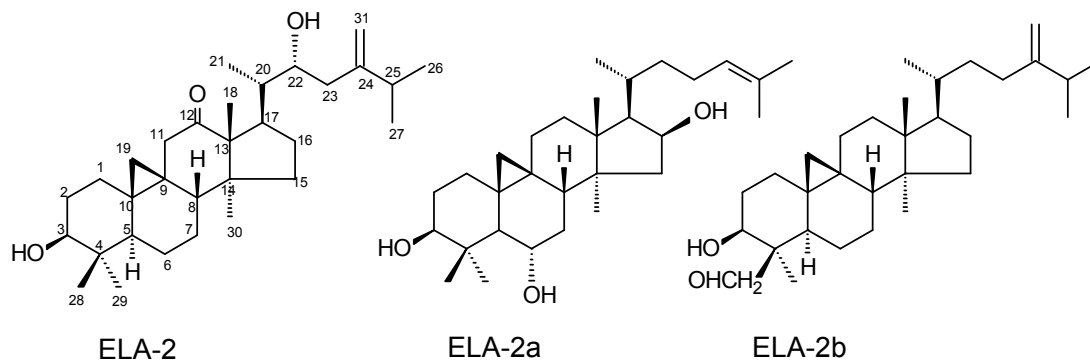
Os esqueletos carbônicos dos triterpenos cicloartânicos possuem algumas características estruturais que podem ser discutidas de forma geral (Pupo, 1997):

- A presença de dois sinais duplos no espectro de RMN ^1H na região entre δ_{H} 0,3 e 0,8, acoplado entre si com uma constante de acoplamento (J) de aproximadamente 4,0 Hz, são absorções indicativas da ponte metilênica formando um anel ciclopropânico, referente aos dois hidrogênios ligados ao átomo de carbono CH_2 -19 (Furlan, Roque e Wolter-Filho, 1993).
- A presença de substituintes nos anéis A e C afetam os deslocamentos químicos (δ) dos átomos de hidrogênios do anel ciclopropânico. Por exemplo, a presença de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3, provoca alterações nos valores de δ dois sinais duplos no espectro de RMN ^1H , passando agora para a região entre δ_{H} 0,3 e 0,5.
- A conformação dos triterpenos cicloartanos definida por análise de Raios-X, mostrou as seguintes conformações: Anel A (conformação cadeira), Anel B (conformação cadeira torcida), Anel C (conformação bote). A junção dos anéis B/C é *cis* e o Anel D tem forma de envelope. O anel de três membros possui estereoquímica β .

- d. Em um triterpeno cicloartânico sem funcionalizações observa-se a presença de sete grupos metila.

Da espécie *Trichilia casaretti* foram isolados um total de cinco triterpenos cicloartânicos: quatro do extrato metanólico das folhas: **ELA-2**, **ELA-19**, **ELA-22** e **ELA-29** dos quais, **ELA-2**, **ELA-22** e **ELA-29** são inéditos na literatura pelo melhor do conhecimento; e um do extrato hexânico das folhas, **ELA-13**. A seguir far-se-á a determinação estrutural dos cinco triterpenos cicloartânicos.

5.1.1.1. Determinação estrutural de ELA-2



A substância **ELA-2** (11,0 mg) foi isolada como um sólido amorfo, apresentando ponto de fusão 156°C e poder de rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} +27,3$ (0,02 mg/mL, CHCl_3). A substância **ELA-2** mostrou a presença de dois sinais duplos no espectro de RMN ^1H (Figuras 9 e 10, v. 2, pgs. 3 e 4) em δ_{H} 0,56 e 0,35 acoplando entre si, e comprovado pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (Figuras 17 e 18, v. 2, pgs. 11 e 12) com uma constante de acoplamento de $J = 4,1$ Hz, referentes aos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico presente em esqueleto carbônico de um triterpeno cicloartânico.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 11 e 12, v. 2, pgs. 5 e 6) revelou a presença de 31 sinais de átomos de carbono para **ELA-2**, o que levou a propor a estrutura de um triterpeno cicloartânico com um átomo de carbono a mais na cadeia lateral. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 14, v.2, p. 5) exibiu também a presença de dois átomos de carbono sp^2 em δ_{C} 153,5 (C-24) e 109,8 (CH_2 -31), característicos de grupo metileno exocíclico (Silverstein, 2007), corroborado pelas correlações heteronucleares $^1J_{\text{CH}}$ entre δ_{C} 109,8 (CH_2 -31) com dois sinais simples em δ_{H} 4,93 (Ha-31) e 4,84 (Hb-31) apresentadas no espectro de HMQC (Figuras 15 e 16, v. 2, pgs. 9 e 10), confirmando assim a presença adicional de um átomo de carbono.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 11 e 12, v. 2, pgs. 5 e 6) revelou ainda a presença de um carbono carbinólico adicional em δ_{C} 70,3 correlacionando a $^1J_{\text{CH}}$ com um sinal duplo em δ_{H} 3,78 ($J = 10,6$ Hz) no espectro de HMQC (Figuras 15 e 16, v. 2, pgs. 9 e 10), corroborando com a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral.

Os valores dos deslocamentos químicos dos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico, a presença de um sinal em δ_C 78,8 no espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 14, v. 2, p. 5), correlacionando com um sinal duploduplete no espectro de HMQC (Figuras 15 e 16, v. 2, pgs. 9 e 10) em δ_H 3,28 ($J= 11,1$ e $4,1$ Hz) indicam a estrutura de um triterpeno cicloartânico para **ELA-2**, com a presença de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 com estereoquímica β .

A confirmação da presença do grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 em **ELA-2** foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-3 (δ_C 78,8) com os dois grupos metila em δ_H 0,97 (Me-28) e 0,81 (Me-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 13 e 14, v. 2, pgs. 7 e 8).

Esses dados sugerem que a cadeia lateral possui a fórmula molecular expandida $(C)(C=)(CH)_2(CH-OH)(CH_2)(CH_2=)(CH_3)_3 = C_9H_{17}O$.

A localização do grupo hidroxila no átomo de carbono CH-22 foi confirmada pela correlação heteronuclear a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-22 (δ_C 70,3) com o sinal duplo em δ_H 0,89 ($J= 6,0$ Hz) relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-21, apresentada no espectro de HMBC (Figuras 13 e 14, v. 2, pgs. 7 e 8).

A localização do grupo metileno no átomo de carbono C-24 foi confirmada através das correlações heteronucleares a longa distância $^2J_{CH}$ entre o átomo de carbono C-24 (δ_C 153,5) com os dois hidrogênios 2H-23 em δ_H 2,24 (H-23b) e 1,95 (H-23a), e $^3J_{CH}$ com hidrogênios dos grupos metila em δ_H 1,08 (Me-27) e 1,05 (Me-26) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 13 e 14, v. 2, pgs. 7 e 8). As demais correlações heteronucleares estão apresentadas na **Tabela 23**, p. 86.

A localização do grupo carbonila no átomo de carbono C-12 foi apoiada na correlação heteronuclear a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono C-12 (δ_C 218,0) com o sinal simples em δ_H 0,90 relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-18, apresentada no espectro de HMBC (Figuras 13 e 14, v. 2, pgs. 7 e 8).

A estereoquímica do grupo HO-3 β , foi definida através das interações espaciais entre o átomo de hidrogênio H-3 α com o hidrogênio H-5 α e com os hidrogênios 3H-29 α , enquanto que a estereoquímica do grupo hidroxila HO-22 α

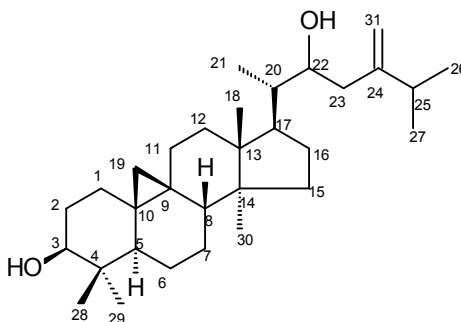
foi definida através das interações espaciais entre H-22 β com o hidrogênio H-20 β e com o hidrogênio H-23 β , ambas apresentadas no espectro de ^1H - ^1H -NOESY (Figuras 19 e 20, v. 2, pgs. 13 e 14). As demais interações encontram-se sumarizadas na **Tabela 23** p. 86.

A comprovação final da proposta estrutural para o triterpeno cicloartânico **ELA-2** veio com o espectro de massas de alta resolução (EM/EM) (Figura 21, v. 2, p. 15) mostrando um sinal em m/z 471,3475 ($\Delta m/z = 0,036$) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 11, v. 2, p. 5), pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$ para o triterpeno **ELA-2**, comprovando assim a proposta estrutural para o triterpeno cicloartânico **ELA-2** como o 24-metilenocicloartano-12-oxo-3 β ,22 α -diol, inédito na literatura pelo melhor do conhecimento. Os dados de RMN do triterpeno cicloartânico **ELA-2** foram comparados com dados de dois modelos de triterpenos cicloartânicos (**Tabela 23**, p. 86) presentes na literatura, ELA-2a e ELA-2b (Verotta et al., 1998; Haba et al., 2007).

Tabela 23: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **ELA-2**, em CDCl_3 , e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Dados de RMN ^{13}C dos modelos **ELA-2a** (^1H a 600 MHz, $\text{Py-d}_5 + \text{D}_2\text{O}$) e **ELA-2b**.

	ELA-2				ELA-2a	ELA-2b
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{C}
C						
4	40,7	-	3H-28; 3H-29		42,7	43,8
9	19,5	-			21,3	19,9
10	29,9	-			29,3	26,5
12	218,0	-		3H-18	-	-
13	49,0	-	3H-18	3H-30	45,8	45,2
14	48,0	-	3H-30	3H-18	47,0	49,0
24	153,5	-	2H-23; 2H-31	3H-26; 3H-27	-	156,9
25	-	-	-	-	130,0	-
CH						
3	78,8	3,28 (dd, 11,1; 4,1)		3H-28; 3H-29	89,2	77,1
5	48,0	1,30 (dd)		3H-28; 3H-29	54,1	42,5
6	-	-	-	-	68,0	-
8	47,1	-	-	3H-30	47,0	47,9
16	-	-	-	-	83,0	-
17	49,0	1,53 (m)		3H-18; 3H-21	57,0	52,2
20	40,9	1,84 (m)	3H-21		30,4	36,1
22	70,3	3,78 (dl, 10,6)	2H-23	3H-21	-	-
24	-	-			126,9	-
25	33,1	-			-	33,8
CH₂						
1	32,8			2H-19	32,6	31,3
2	32,0				30,4	30,4
6	21,6				-	21,6
7	25,4				38,5	25,9
11	27,2	1,98 (m); 1,34 (m)		2H-19	26,4	28,1
12	-	-			33,0	35,7
15	45,7			3H-30	48,2	32,8
16	25,4				-	26,5
19	30,3	0,56 (d, 4,1) 0,35 (d, 4,1)			30,3	30,2
22		-			37,1	35,1
23	36,1	2,24 (td, 13,5; 7,0) 1,95 (m)			25,8	31,7
28	-	-			-	71,3
31	109,8	4,93 (s), 4,84 (s)		2H-23	-	106,1
CH₃						
18	12,1	0,90 (s)			19,1	18,0
21	19,5	0,89 (d, 6,0)			17,9	18,3
26	22,3	1,05 (s)			17,9	21,8
27	21,6	1,08 (s)			25,9	21,9
28	25,4	0,97 (s)		3H-29	29,1	-
29	14,2	0,81 (s)		3H-28	16,8	10,1
30	18,0	1,01 (s)			20,4	19,2

5.1.1.2. Determinação Estrutural de ELA-19



A substância **ELA-19** foi isolada como um óleo amarelo. A presença de dois sinais duplos no espectro de RMN ^1H (Figuras 22 e 23, v. 2, pgs. 16 e 17) em δ_{H} 0,56 e 0,35 acoplando entre si, e comprovado pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (Figuras 31 e 32, v. 2, pgs. 25 e 26) com uma constante de acoplamento de $J=4,0$ Hz, referentes aos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico presente em esqueleto carbônico de um triterpeno cicloartânico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 24 e 25, v. 2, pgs. 18 e 19) revelou a presença de 31 sinais de átomos de carbono para **ELA-19**, semelhante ao triterpeno **ELA-2**, o que levou a propor a estrutura de um triterpeno cicloartânico com um átomo de carbono a mais na cadeia lateral. O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 24 e 25, v. 2, pgs. 18 e 19) exibiu também a presença de dois átomos de carbono sp^2 em δ_{C} 153,6 (C-24) e 110,0 (CH₂-31), característicos de grupo metileno exocíclico (Silverstein, 2007), corroborado pelas correlações heteronucleares $^1J_{\text{CH}}$ entre δ_{C} 109,99 (CH₂-31) com dois sinais simples em δ_{H} 4,94 (Ha-31) e 4,84 (Hb-31) apresentadas no espectro de HSQC (Figuras 29 e 30, v. 2, pgs. 23 e 24), confirmando assim a presença adicional de um átomo de carbono.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 24 e 25, v. 2, pgs. 18 e 19) revelou ainda a presença de um carbono carbinólico adicional em δ_{C} 70,49 correlacionando a $^1J_{\text{CH}}$ com um sinal duplo em δ_{H} 3,78 ($J=10,5$ Hz) no espectro de HSQC (Figuras 29 e 30, v. 2, pgs. 23 e 24), corrobora com a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral.

Os valores dos deslocamentos químicos dos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico, a presença de um sinal em δ_{C} 79,0 no espectro de RMN ^{13}C

e DEPT 135° (Figuras 24 a 26, v. 2, pgs. 18 a 20) correlacionando com um sinal duploduplete no espectro de HSQC (Figuras 29 e 30, v. 2, pgs. 23 e 24) em δ_H 3,28 ($J= 10,5$ e $6,0$ Hz) indicam a estrutura de um triterpeno cicloartânico para **ELA-19**, com a presença de grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 com estereoquímica β .

A confirmação da presença do grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 em **ELA-19** foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-3 (δ_C 79,01) com os dois grupos metila em δ_H 0,81 (Me-28) e 0,97 (Me-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 27 e 28, v. 2, pgs. 21 e 22).

Esses dados sugerem que a cadeia lateral possui a fórmula molecular expandida $(C)(C=)(CH)_2(CH-OH)(CH_2)(CH_2=)(CH_3)_3 = C_9H_{17}O$.

A localização do grupo hidroxila no átomo de carbono CH-22 foi confirmada pela correlação heteronuclear a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-22 (δ_C 70,48) com o sinal duplo em δ_H 0,90 ($J= 6,5$ Hz) relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-21, apresentada no espectro de HMBC (Figuras 27 e 28, v. 2, pgs. 21 e 22).

A localização do grupo metileno no átomo de carbono C-24 foi confirmada através das correlações heteronucleares a longa distância $^2J_{CH}$ entre o átomo de carbono C-24 (δ_C 153,79) com os dois hidrogênios 2H-23 em δ_H 2,25 (H-23b) e 1,94 (H-23a), e $^3J_{CH}$ com hidrogênios dos grupos metila em δ_H 1,08 (Me-27) e 1,06 (Me-26) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 27 e 28, v. 2, pgs. 21 e 22). As demais correlações heteronucleares estão apresentadas na **Tabela 24** (p. 89).

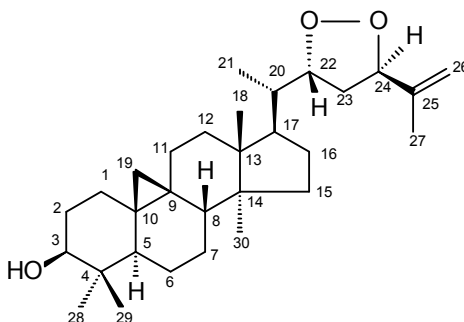
Todos esses dados estão consistentes com a estrutura para o triterpeno cicloartânico **ELA-19** como sendo o 24-metilenocicloartano-3 β ,22-diol, isolado de *Guarea macrophylla* (Lago e Roque, 2002), confirmando assim a proposta estrutural.

Os dados de RMN apresentados na **Tabela 24** (p. 89) permitiram ainda, corrigir os valores de deslocamentos químicos (δ) para os átomos de carbono CH₂-12 e CH₂-15, assinalados erroneamente (trocados) para o triterpeno 24-metilenocicloartano-3 β ,22-diol, isolado de *Guarea macrophylla* (Lago e Roque, 2002).

Tabela 24: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **ELA-19**, em CDCl_3 , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, em comparação com valores da literatura para o 24-metilenocicloartano-3 β ,22-diol (**ELA-19a**).

	ELA-19				ELA-19 ^a
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}
C					
4	40,7	-	H-5; 3H-28; 3H-29		40,8
9	20,2	-	2H-19		20,1
10	26,3	-	H-5; 2H-19	H-8	26,1
13	45,9	-	3H-18	H-15; H-20; 3H-30	45,8
14	48,6	-	H-8; H-15; 3H-30	H-17; 3H-18	48,4
24	153,7	-	2H-23	3H-26; 3H-27	153,6
CH					
3	79,0	3,28 (dd, 10,5, 6,0)		H-1a; 3H-28; 3H-29	78,8
5	47,3	1,32 (m)		3H-28; 3H-29	47,1
8	48,3	1,52 (dd, 12,0, 4,0)		2H-19; 3H-30	48,8
17	49,2	1,65 (m)	H-20	3H-18; 3H-21	49,0
20	40,9	1,80 (m)	3H-21		40,5
22	70,5	3,78 (d, 10,5)	H-23b	3H-21	70,4
CH₂					
1	32,2	1,57; 1,28	2H-2	2H-19	32,0
2	30,6	1,78; 1,57			30,4
6	21,3	1,58; 0,80	H-5		21,1
7	26,6	1,42; 1,10	H-8	H-5	27,2
11	26,3	2,00; 1,35		2H-19	26,1
12	33,0	1,68 (m)		3H-18	35,7
15	35,9	1,35 (m)		H-8; 3H-30	32,9
16	27,4	1,80 (m); 1,15 (m)			26,4
19	30,2	0,56 (d, 4,0); 0,35 (d, 4,0)		H-5; H-8	29,9
23	36,3	2,25, 1,94		H-20	36,1
31	110,0	4,94 (s); 4,84 (s)			109,7
CH₃					
18	18,2	1,01 (s)			18,0
21	12,2	0,90 (d, 6,5)			12,0
26	21,8	1,08 (s)		3H-27	22,3
27	22,6	1,06 (s)		3H-26	21,6
28	19,7	0,97 (s)		3H-29; H-5	19,5
29	14,2	0,81 (s)		3H-28	14,0
30	25,6	0,91 (s)		H-8	25,4

5.1.1.3. Determinação Estrutural de ELA-22



A substância **ELA-22** foi isolada como um sólido amorfo, com poder de rotação ótica de $[\alpha]_D^{20} +48$ (0,001 mg/mL, CHCl_3), mostrando-se bastante semelhante ao triterpeno cicloartânico **ELA-19**, com a presença de dois sinais largos no espectro de RMN ^1H (Figuras 33 e 34, v. 2, pgs. 27 e 28) em δ_{H} 0,54 e 0,33 acoplando entre si, e comprovado pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (Figuras 43 e 44, v. 2, pgs. 37 e 38), referentes aos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico presente em esqueleto carbônico de um triterpeno cicloartânico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 35 e 36, v. 2, pgs. 29 e 30) revelou a presença de 30 sinais de átomos de carbono para **ELA-22**, diferente do triterpeno cicloartânico **ELA-19**, o qual possui 31 sinais de átomos de carbono. O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 35 e 36, v. 2, pgs. 29 e 30) exibiu também a presença de dois átomos de carbono sp^2 em δ_{C} 147,8 (C-25) e 112,5 (CH_2 -26), característicos de grupo metileno exocíclico (Silverstein, 2007), corroborado pelas correlações heteronucleares $^1J_{\text{CH}}$ entre δ_{C} 112,48 (CH_2 -26) com dois sinais simples largos em δ_{H} 5,32 (Ha-26) e 5,10 (Hb-26) apresentadas no espectro de HSQC (Figuras 41 e 42, v. 2, pgs. 35 e 36), confirmando assim a presença grupo metileno exocíclico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 34 e 36, v. 2, pgs. 29 e 30) revelou ainda a presença de dois carbonos carbinólicos adicionais em δ_{C} 69,9 e 86,6, correlacionando a $^1J_{\text{CH}}$ com um sinal duplo duplete em δ_{H} 4,55 ($J= 10,0$) e um sinal simples largo em δ_{H} 5,32, respectivamente, no espectro de HSQC (Figuras 41 e 42, v. 2, pgs. 35 e 36), corrobora com a presença de duas oxidações na cadeia lateral. Outras correlações são observadas na ampliação do espectro de HSQC (Figuras 41 e 42, v. 2, pgs. 35 e 36).

Os valores dos deslocamentos químicos dos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico, a presença de um sinal em δ_C 78,3 no espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 35 a 38, v. 2, pgs. 29 a 32) correlacionando com um sinal duploduplete no espectro de HSQC (Figuras 41 e 42, v. 2, pgs. 35 e 36) em δ_H 3,57 ($J= 9,0$ e x Hz) indicam a estrutura de um triterpeno cicloartânico para **ELA-22**, com a presença de um grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 com estereoquímica β , semelhante ao triterpeno cicloartânico **ELA-19**.

A confirmação da presença do grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 em **ELA-22** foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-3 (δ_C 78,3) com os dois grupos metila em δ_H 1,25 (Me-28) e 1,22 (Me-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 39 e 40, v. 2, pgs. 33 e 34).

A localização das oxidações na cadeia lateral nos átomos de carbono CH-22 e CH-24 foi confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-22 (δ_C 69,87) com o sinal duplo em δ_H 1,22 ($J= 6,3$ Hz) relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-21, do átomo de carbono CH-24 (δ_C 86,62) com o sinal simples em δ_H 2,01, relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-27 (característica de grupo metila ligado a carbono sp^2), formando um anel heterocíclico de cinco membros. Ambas as correlações foram apresentadas no espectro de HMBC (Figura 39, v. 2, p. 33).

A localização do grupo metileno no átomo de carbono C-25 foi confirmada através das correlações heteronucleares a longa distância $^2J_{CH}$ entre o átomo de carbono C-25 (δ_C 147,8) com os hidrogênios Me-26 em δ_H 2,01, e $^3J_{CH}$ do átomo de carbono C-26 (δ_C 112,5) com hidrogênios dos grupos metila em δ_H 2,01 (Me-27), ambas apresentadas no espectro de HMBC (Figura 39, v. 2, p. 33). As demais correlações heteronucleares podem ser observadas na ampliação do espectro (Figura 40, v. 2, p. 34) e estão apresentadas na **Tabela 24** (p. 93).

A estereoquímica do grupo HO-3 β , foi definida através das interações espaciais entre o átomo de hidrogênio H-3 α com o hidrogênio H-5 α e com os hidrogênios 3H-28 α , ambas apresentadas no espectro de 1H - 1H -NOESY (Figuras 45 e 46, v. 2, pgs. 39 e 40). A estereoquímica dos átomos de carbono CH-22 e CH-24 foi definida através da interação espacial entre H-22 β com o grupo metila

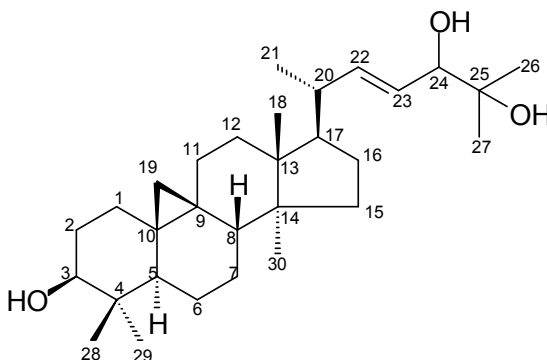
Me-27 apresentada no espectro de ^1H - ^1H -NOESY (Figuras 45 e 46, v. 2, pgs. 39 e 40). As demais interações encontram-se sumarizadas na **Tabela 25** (p. 93).

A comprovação final da proposta estrutural para o triterpeno cicloartânico **ELA-22** veio com o espectro de massas de alta resolução (EM/EM) (Figura 47, v. 2, p. 41) que mostrou um sinal em m/z 457,3502 ($\Delta m/z = 0,0179$) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$, e no espectro de massas de baixa resolução apresentou sinal em m/z 456 correspondente ao pico $[\text{M}]^+$ (Figura 47, v. 2, p. 41), que juntamente com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figuras 37 e 38, v. 2, pgs. 31 e 32), pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_3$ para o triterpeno **ELA-22**. Os principais fragmentos observados no espectro de massas (Figura 47, v. 2, p. 41) estão apresentados no **Esquema 5** (v. 2, p. 42), comprovando assim a proposta estrutural para o triterpeno cicloartânico **ELA-22**, nomeado temporariamente Trichiliol, inédito a literatura pelo melhor do conhecimento.

Tabela 25: Dados de RMN ^1H (500 MHz) (CDCl_3) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **ELA-22**, em piridina- d_5 , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

ELA-22				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
4	41,5	-	3H-28; 3H-29	
9	20,3	-	2H-19	
10	26,9	-	H-5; 2H-19	
13	46,2	-	3H-18	3H-30
14	48,9	-	3H-30	3H-18
24	-	-	-	-
25	147,8	-	3H-27	
CH				
3	78,3	3,57 (dl, 9,0)		3H-28; 3H-29
5	47,9	1,35		3H-28; 3H-29
8	48,6	1,48		3H-30
17	49,9	1,80		3H-18; 3H-21
20	43,6	2,10	3H-21	
22	69,7	4,55 (dl, 10,0)		3H-21
24	86,6	5,32 (sl)		3H-27
CH₂				
1	32,8	1,60; 1,28		2H-19
2	31,6	2,00; 1,90		
6	21,8	1,60; 0,78	H-5	
7	26,8	1,12; 1,05	H-8	
11	27,0	2,00; 1,90		2H-19
12	33,4	1,68; 1,15		3H-18
15	36,3	1,60; 1,30		3H-30
16	28,0	2,18; 1,90		
19	30,5	0,54 (sl); 0,33 (sl)		
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	34,5	2,10; 1,90		
26	112,5	5,32 (sl); 5,10 (sl)		3H-27
31	-	-	-	-
CH₃				
18	18,7	1,03 (s)		
21	12,8	1,22 (d, 6,3)		
26	-	-	-	-
27	18,5	2,01 (sl)		
28	26,6	1,25 (s)		3H-29
29	15,2	1,22 (s)		3H-28
30	20,1	0,89 (s)		

5.1.1.4. Determinação estrutural de ELA-29



A substância **ELA-29** foi isolada como um sólido amorfo. A presença de dois sinais múltiplos no espectro de RMN ^1H (Figuras 48 e 49, v. 2, pgs. 43 e 44) em δ_{H} 0,56 e 0,34 acoplado entre si, corroborado pela correlação apresentada no espectro de ^1H - ^1H -COSY (Figuras 56 e 57, v. 2, pgs. 51 e 52) confirma a presença de dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico presentes em esqueleto carbônico de um triterpeno cicloartânico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 50, v. 2, pgs. 45) revelou a presença de 30 sinais de átomos de carbono para **ELA-29**, bem como a presença de dois átomos de carbono sp^2 em δ_{C} 135,6 (CH-22) e 129,5 (CH-23), característicos de ligação dupla (Silverstain, 2007), corroborado pela correlação heteronuclear $^1J_{\text{CH}}$ com o sinal múltiplo em δ_{H} 5,73 (H-23) apresentada no espectro de HSQC (Figuras 53 e 54, v. 2, pgs. 48 e 49) comprovada pelo acoplamento entre H-22 e H-23 mostrada no espectro ^1H - ^1H -COSY (Figuras 56 e 57, v. 2, pgs. 51 e 52).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 50, v. 2, p. 45) revelou ainda a presença de mais dois carbonos carbinólicos, um em δ_{C} 74,4 correlacionando a $^1J_{\text{CH}}$ com um sinal múltiplo em δ_{H} 4,25, no espectro de HSQC (Figuras 53 e 54, v. 2, pgs. 48 e 49), outro em δ_{C} 82,0, sugerindo a presença de um carbono carbinólico quaternário, corroborando com a presença de dois grupos hidroxila na cadeia lateral.

Os valores dos deslocamentos químicos dos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico, a presença de um sinal em δ_{C} 78,8 no espectro de RMN ^{13}C (Figura 50, v. 2, p. 45) correlacionando com um sinal multiplete no espectro de

HSQC (Figuras 53 e 54, v. 2, pgs. 48 e 49) em δ_H 3,29 indicam a estrutura de um triterpeno cicloartânico para **ELA-29**, com a presença de grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 com estereoquímica β .

Esses dados sugerem que a cadeia lateral possui a fórmula molecular expandida $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}-\text{OH})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH} = \text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2$.

As estereoquímicas foram definidas através das interações espaciais apresentadas no espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY (Figuras 58 e 59, v. 2, pgs. 53 e 54).

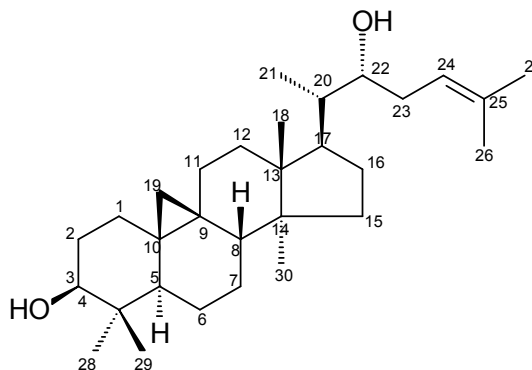
Os demais dados estão dispostos na **Tabela 26**, p. 96.

Esses dados em comparação com o triterpeno 22,25-diidroxícicloart-23(*E*)-en-2-ona (**ELA-29a**) isolado de *Guarea macrophylla* (Lago e Roque, 2002) permitiram postular a estrutura para o triterpeno **ELA-29** como sendo o 24,25-diidroxícicloart-22-enol. Pelo melhor do conhecimento a estrutura do triterpeno **ELA-29** encontra-se inédito na literatura.

Tabela 26: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **ELA-29** e **ELA-29a**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

	ELA-29		ELA-29a
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
C			
3	-	-	216,5
4	40,5	-	50,2
9	20,0	-	21,1
10	26,1	-	26,0
13	45,6	-	45,7
14	48,4	-	48,4
25	82,0	-	70,8
CH			
3	78,8	3,29 (m)	-
5	47,9	1,32 (m)	48,4
8	47,0	1,52 (m)	47,8
17	49,2	1,65	49,2
20	42,4	1,80	42,4
22	135,6	5,80 (m)	74,4
23	129,5	5,73 (m)	125,3
24	74,4	4,2 (m)	140,5
CH₂			
1	31,9	1,57, 1,28	33,4
2	30,3	1,78, 1,57	37,4
6	21,1	1,58, 0,80	21,5
7	27,4	1,42, 1,10	27,4
11	25,9	2,00, 1,35	25,8
12	35,6	1,68	35,7
15	32,8	1,35	32,8
16	26,3	1,80, 1,15	26,7
19	29,8	0,56 (m), 0,35 (m)	29,5
CH₃			
18	18,1	1,09 (s)	18,2
21	14,0	0,89 (d, 6,4)	12,0
26	24,5	1,09 (s)	30,1
27	24,4	1,06 (s)	29,9
28	19,3	0,97 (s)	19,3
29	13,9	0,81 (s)	22,2
30	25,4	0,91 (s)	20,8

5.1.1.5. Determinação estrutural de ELA-13



A substância **ELA-13** foi isolada como um sólido amorfo. A presença de dois sinais duplos no espectro de RMN ^1H (Figuras 60 e 62, v. 2, pgs. 55 e 57) em δ_{H} 0,58 e 0,35 acoplado entre si, e comprovado pelo espectro de ^1H - ^1H -COSY (Figura 73, v. 2, pgs. 68) com uma constante de acoplamento de $J= 4,1$ Hz, confirma a presença de dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico presente em esqueleto carbônico de um triterpeno cicloartânico.

O espectro de RMN ^{13}C e APT (Figuras 63 e 65 v. 2, pgs. 58 e 60) revelou a presença de 30 sinais de átomos de carbono para **ELA-13**, bem como a presença de dois átomos de carbono sp^2 em δ_{C} 121,4 (CH-24) e 135,2 (C-25), característicos de grupo metileno (Silverstein, 2007), corroborado pelas correlações heteronucleares $^1J_{\text{CH}}$ entre δ_{C} 121,4 (CH-24) com sinal triplo largo em δ_{H} 5,20 (H-24, $J= 7,2$ Hz) apresentada no espectro de HMQC (Figuras 71 e 72, v. 2, pgs. 66 e 67), confirmando assim a presença de uma insaturação na cadeia lateral.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 63, v. 2, p. 58) revelou ainda a presença de um carbono carbinólico em δ_{C} 73,5 correlacionando a $^1J_{\text{CH}}$ com um multiplete em δ_{H} 3,69 no espectro de HMQC (Figuras 71 e 72, v. 2, pgs. 66 e 67), corrobora com a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral.

Os valores dos deslocamentos químicos dos dois hidrogênios 2H-19 do anel ciclopropânico, a presença de um sinal em δ_{C} 78,9 no espectro de RMN ^{13}C e APT (Figuras 63 e 65, v. 2 pgs. 58 e 60) correlacionando com um sinal duploduplete no espectro de HMQC (Figuras 71 e 72, v. 2, pgs. 66 e 67) em δ_{H}

3,30 ($J= 11,4$ e $4,0$ Hz) indicam a estrutura de um triterpeno cicloartânico para **ELA-13**, com a presença de grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 com estereoquímica β .

A confirmação da presença do grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-3 em **ELA-13** foi corroborada pelas correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-3 (δ_C 78,9) com os dois grupos metila em δ_H 0,83 (Me-28) e 0,99 (Me-29) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 68 e 69, v. 2, pgs. 63 e 64).

Esses dados sugerem que a cadeia lateral possui a fórmula molecular expandida $CH(CH_3)(CH-OH)CH_2(CH)C(CH_3)_2 = C_8H_{16}O$.

A localização do grupo hidroxila no átomo de carbono CH-22 foi confirmada pela correlação heteronuclear a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono CH-22 (δ_C 73,5) com o sinal duplo em δ_H 0,93 ($J= 7,0$ Hz) relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-21, apresentada no espectro de HMBC (Figuras 68 e 69, v. 2, pgs. 63 e 64).

A localização do grupo metileno no átomo de carbono C-24 foi confirmada através das correlações heteronucleares a longa distância $^3J_{CH}$ entre o átomo de carbono C-24 (δ_C 121,4) com os dois hidrogênios dos grupos metila em δ_H 1,8 (Me-27) e 1,7 (Me-26) apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 68 e 69, v. 2, pgs. 63 e 64). As demais correlações heteronucleares estão apresentadas na **Tabela 27** (p. 99).

A estereoquímica do grupo HO-3 β , foi definida através das interações espaciais entre o átomo de hidrogênio H-3 α com o hidrogênio H-5 α e com os hidrogênios 3H-29 α , enquanto que a estereoquímica do grupo hidroxila HO-22 α foi definida através das interações espaciais entre H-22 β com o hidrogênio H-20 β e com o hidrogênio H-23 β , ambas apresentadas no espectro de 1H - 1H -NOESY (Figuras 74 e 75, v. 2, pgs. 69 e 70).

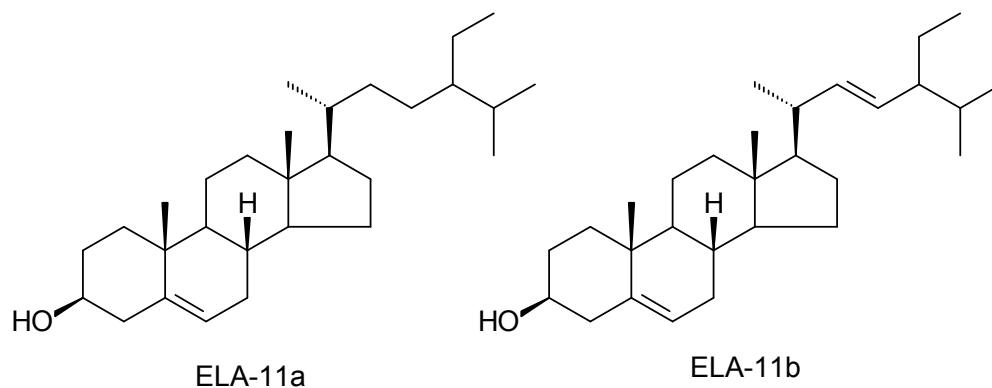
Todos esses dados estão consistentes com a estrutura para o triterpeno cicloartânico **ELA-13** como sendo o 22(*R*)-hidroxicloart-24-en-3-ol, isolado anteriormente de *Balsamorhiza sagittata* (Bohlmann et al., 1985).

Tabela 27: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **ELA-13**, em CDCl_3 , e as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

ELA-13				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
4	40,5	-	3H-28, 3H-29	
9	20,0	-		
10	26,2	-		
13	45,7	-	3H-30	
14	48,4	-	3H-30	
24	-	-	-	-
25	135,2		3H-26; 3H-27	2H-23
CH				
3	78,9	3,30 (dd, 11,4, 4,0)		3H-28; 3H-29
5	48,0	1,52 (m)		3H-28; 3H-29
8	47,1	1,32 (m)		3H-30
17	49,1	1,64		3H-18; 3H-21
20	41,4	1,80		
22	73,5	3,69 (m)	2H-23	3H-21
24	121,4	5,20 (t, 7,2)	H-23	3H-26; 3H-29
CH₂				
1	32,0	1,50, 1,25		
2	29,9			
6	21,1			
7	26,5			
11	25,9			
12	32,9			3H-18
15	35,7			3H-30
16	27,2			
19	30,4	0,58 (d, 4,1), 0,36 (d, 4,1)		
22	-	-	-	
23	29,2	2,08 (m)		
CH₃				
18	18,0	1,02 (s)		
21	12,1	0,93 (d, 7,0)		
26	18,0	1,68 (s)		3H-27
27	26,0	1,78 (s)		3H-26
28	25,5	0,99 (s)		3H-29
29	14,0	0,83(s)		3H-28
30	19,4	0,91 (s)		

5.1.2. Determinação estrutural dos esteróides

5.1.2.1. Determinação estrutural de ELA-11



A amostra se apresentou como sólido cristalino em forma de agulhas e foi identificada através da análise dos experimentos de RMN ^1H (Figura 76, v. 2, p. 71), RMN ^{13}C -APT (Figura 77, v. 2, p. 72) e por comparação com dados na literatura como mistura de esteróides.

Devido à semelhança estrutural desses dois esteróides, eles quase sempre ocorrem em mistura e assim são identificados. Com a análise dos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 77, v. 2, p. 72) pode-se confirmar a distinção entre os dois esteróides. Em δ_c 121,8 e 140,8 (CH-6 e C-5) observa-se os sinais comuns às duas estruturas. Já os sinais observados em δ_c 127,0 e 138,2 (CH-23 e CH-22), estão presentes apenas no esteróide estigmasterol. Ainda no espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 77, v. 2, p. 72) observa-se o sinal em δ_c 71,9 característico do carbono oxigenado indicando a presença de um grupamento hidroxila no átomo de carbono CH-3 das substâncias presentes na mistura.

O espectro de RMN ^1H apresentou um sinal largo em δ_H 5,35 e um multiplete em δ_H 3,51, característicos dos hidrogênios H-6 e H-3 respectivamente dos esteróides β -sitosterol. Ainda pode-se observar dois multipletos em δ_H 5,14 e δ_H 5,01 (que foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos do estigmasterol, que juntamente com os sinais sobrepostos na região de δ_H 0,67-2,30 referente a

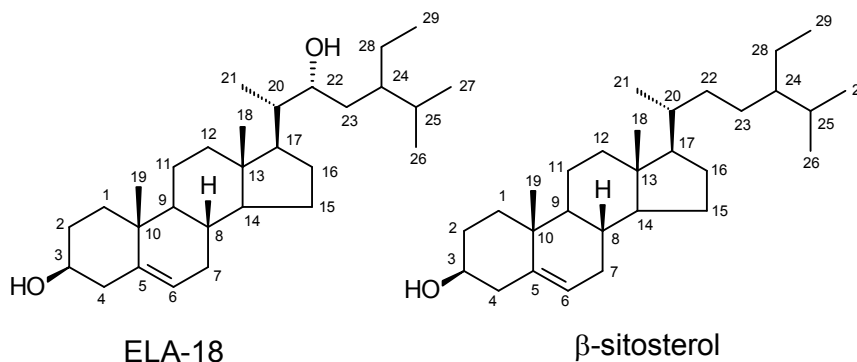
vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos caracterizam o esqueleto esteroidal (Deeb et al., 2003).

O conjunto desses dados em comparação com dados da literatura (Moreira, 2009) permitiu identificar a mistura de esteróides em **ELA-11** como sendo β -sitosterol e estigmasterol e seus dados de RMN encontram-se descritos na **Tabela 28**.

Tabela 28: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 , para a mistura de esteróides e comparação com valores de literatura (Moreira, 2009). Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

C	ELA-11a	ELA-11b	sitosterol	estigmasterol
5	140,8	140,8	140,7	140,7
10	36,0	36,0	36,1	36,1
13	42,4	42,4	42,3	42,3
CH				
3	71,9	71,9	71,8	71,8
6	121,8	121,8	121,7	121,7
8	32,0	32,0	31,6	31,6
9	50,2	50,2	50,1	50,1
14	56,9	56,9	56,8	56,8
17	56,1	56,1	56,0	56,0
20	39,8	39,8	39,7	39,7
22	-	138,2	-	138,3
24	45,9	51,2	45,8	51,2
25	29,2	32,0	29,0	31,9
CH₂				
1	37,3	37,3	37,3	37,3
2	32,1	32,1	31,9	31,9
4	42,4	42,4	42,3	42,3
7	34,0	34,0	33,9	33,9
11	21,2	21,2	21,2	21,2
12	39,9	39,9	39,7	39,7
15	24,4	24,4	24,3	24,3
16	28,3	28,3	28,9	28,9
22	31,8	-	31,9	-
23	26,1	129,2	26,0	129,2
28	23,3	26,8	23,0	25,4
CH₃				
18	12,0	12,0	12,2	12,2
19	19,5	19,5	19,4	19,4
21	18,8	19,1	18,9	21,0
26	20,0	20,0	19,8	21,2
27	20,0	20,0	19,8	19,8
29	12,0	12,0	11,8	12,0

5.1.2.2. Determinação estrutural de ELA-18



A substância **ELA-18**, isolada do extrato metanólico das folhas de *T. casarettii*, apresentou-se como um cristal de cor branca apresentando ponto de fusão 143,5°C.

Os espectros de RMN da substância **ELA-18**, se assemelharam muito aos espectros do esteróide β -sitosterol (**ELA-11a**).

Os espectros de RMN ^{13}C (Figuras 80 e 81, v. 2, pgs. 75 e 76) e DEPT 135 (Figura 82, v. 2, p. 77) apresentaram sinais para 29 átomos de carbono, sendo seis sinais para grupos metílicos (CH_3), dez sinais para grupos metilênicos (CH_2), dez sinais para grupos metínicos (CH), sendo dois ligados a átomos de oxigênio em δ_{C} 72,0 (CH-3) e 71,5 (CH-22) e um característico de ligação dupla δ_{C} 121,8 (CH-6) e três sinais para átomos de carbono quaternário sendo um característico de ligação dupla em δ_{C} 140,9 (C-5), que juntamente com o espectro de massas de alta resolução (EM/EM) (Figura 91, v. 2, p. 86), o qual mostrou sinais em m/z 431,3348 ($\Delta m/z = 0,054$) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 413,3556 ($\Delta m/z = 0,022$) correspondente ao pico $[\text{M}+\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ pôde-se propor a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ para a substância **ELA-18**.

Dos sinais no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 80 e 81, v. 2, pgs. 75 e 76) para átomos de carbono quaternários, dois são atribuídos a átomos de carbono sp^3 , C-10 (δ_{C} 36,7) e C-13 (δ_{C} 42,9).

Os dois sinais no espectro de HSQC (Figuras 86 e 87, v. 2, pgs. 81 e 82) na região de carbonos carbinólicos (Silvertein, 2007) em δ_{C} 72,0 (CH-3) e 71,5 (C-22) correlacionando com os hidrogênios a $^1J_{\text{CH}}$ em δ_{H} 3,52 (H-3) e 3,71 (H-22),

respectivamente, sugerem uma estrutura com dois grupos hidroxilas, ou seja, um grupo hidroxila a mais do que o esteróide β -sitosterol.

A posição dos dois grupos hidroxila ligados aos átomos de carbono CH-3 e CH-22 foi confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância entre o átomo de carbono CH-3 (δ_C 72,0) a $^2J_{CH}$ com o multipletto relativo aos dois hidrogênios 2H-4 (δ_H 2,30-2,20), e do átomo de carbono CH-22 (δ_C 71,5) a $^3J_{CH}$ com o dupletto em δ_H 0,92, relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-21, apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 83 a 85, v. 2, pgs. 78 a 80).

Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 80 e 81, v. 2, pgs. 75 e 76) pôde-se observar os sinais em δ_C 140,9 (C-5) e 121,8 (CH-6), que sugerem a ocorrência de uma insaturação entre esses dois átomos de carbono.

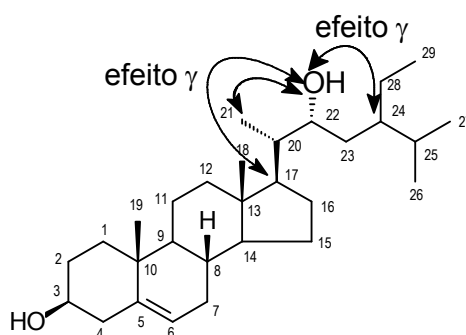
A posição da ligação dupla nos átomos de carbono C-5 e CH-6 foi confirmada pelas correlações heteronucleares a longa distância entre o átomo de carbono C-5 (δ_C 140,9) a $^3J_{CH}$ com o sinal simples relativo aos hidrogênios do grupo metila Me-19 (δ_H 1,01), e do átomo de carbono CH-6 (δ_C 121,8) a $^3J_{CH}$ com o multipletto relativo aos dois hidrogênios 2H-4 (δ_H 2,30-2,20) e a $^2J_{CH}$ com os sinais em δ_H 2,00 e 1,86, relativos aos dois hidrogênios 2H-7, ambas apresentadas no espectro de HMBC (Figuras 83 a 85, v. 2, pgs. 78 a 80).

O espectro de RMN 1H (Figura 78, v. 2, p. 73) para a substância **ELA-18** apresentou um dupletto em δ_H 5,35 (H-6, $J = 4,5$ Hz) acoplado com os sinais em δ_H 2,00 e 1,86, relativos aos dois hidrogênios 2H-7, confirmado pelo espectro de 1H - 1H -COSY (Figuras 88 e 89, v. 2, pgs. 83 e 84), corroborando a insaturação na estrutura.

No espectro de 1H - 1H -COSY (Figuras 88 e 84, v. 2, pgs. 83 e 84), observou-se, ainda, um dupletto em δ_H 0,92 ($J = 6,5$ Hz), relativo ao 3H-21 acoplado com um sinal em δ_H 1,70, relativo ao hidrogênio H-20, e ainda dois dupletos em δ_H 0,89 e 0,79 ($J = 6,5$ Hz), relativo aos 3H-27 e 3H-26 acoplado com um sinal em δ_H 1,80, referente ao hidrogênio H-25.

Os valores de RMN ^{13}C (Figuras 80 e 81, v. 2, pgs. 75 e 76) da substância **ELA-18** mostraram-se diferentes do β -sitosterol para os carbonos CH-17, CH-22, CH-24 e CH₃-21. Tal alteração pode ser justificada pelo efeito γ do grupo hidroxila.

A inclusão de uma hidroxila na molécula afeta os deslocamentos químicos do carbono ao qual se liga (α) e dos carbonos vizinhos (β e γ). A hidroxila desprotege o carbono ao qual está ligada (CH-22), aumentando assim o valor de deslocamento (δ_H 71,5). Sobre os carbonos adjacentes, seu efeito geralmente é de desproteção, podendo, no entanto, ser anômalo em alguns casos como este, onde ocorreu a proteção dos carbonos adjacentes (γ), diminuindo o deslocamento químico em aproximadamente 3,0 ppm para CH-17; 4,5 ppm para CH-24 e 6,5 ppm para CH₃-21 (Garcez et al., 1981).



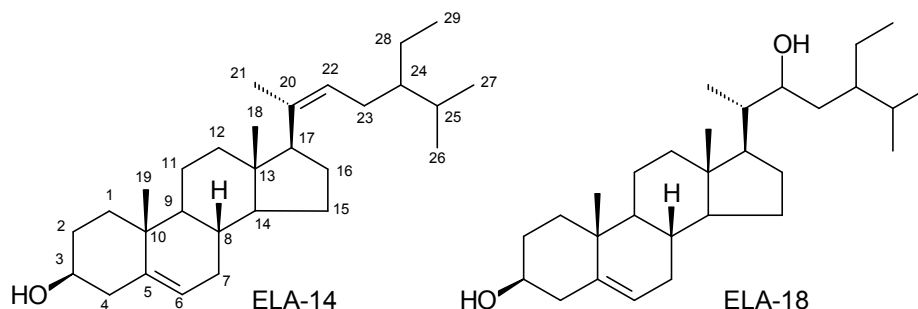
A estereoquímica do grupo hidroxila ligado ao átomo de carbono CH-22 foi definida através da interação espacial entre H-22 e o átomo de hidrogênio H-20 β , observada no espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (Figura 90, v. 2, p. 85), comprovando a estereoquímica β para o hidrogênio H-22.

Os dados espectrais do esteróide **ELA-18** estão de acordo com os dados de RMN ^{13}C descritos em literatura (Nascimento, 2008) para o esteróide Itesmol (Tabela 29, p. 105).

Tabela 29: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) do esteróide **ELA-18** em CDCl_3 , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos δ estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz.

ELA-18				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
5	141,0	-	2H-4	3H-19
10	36,7	-		H-1a
13	42,9	-	2H-12; 3H-18	H-15b; H-20
CH				
3	72,0	3,52 (m)	2H-4	
6	121,8	5,35 (d, 4,5)	2H-7	2H-4
8	32,1	1,48		
9	50,3	0,95	H-8	H-7; 3H-19
14	56,5	1,00	H-8; 2H-15	H-7; 3H-18
17	53,2	1,10	2H-16	2H-15; 3H-18; 3H-21
20	42,7	1,70		
22	71,5	3,71 (m)		3H-21
24	41,6	1,26		3H-26; 3H-27
25	28,9	1,80	3H-26; 3H-27	
CH₂				
1	37,4	1,86, 1,08		3H-19
2	30,1	1,80, 1,50		
4	42,5	2,30-2,20		
7	31,8	2,00, 1,86	H8	
11	21,3	1,53	2H-12	
12	40,0	2,00, 1,18	H-11a	3H-18
15	24,6	1,62, 1,15		
16	27,7	1,75, 1,38		
23	32,2	1,86, 1,55		
28	23,8	1,38, 1,25	3H-29	
CH₃				
18	12,0	0,70 (s)		2H-12
19	19,6	1,01 (s)		2H-1
21	12,5	0,92 (d, 6,5)	H-20	H-22
26	17,8	0,79 (d, 6,5)		3H-27
27	20,8	0,89 (d, 6,5)	H-25	3H-26
29	12,1	0,88 (t)	2H-28	

5.1.2.3. Determinação estrutural de ELA-14



A amostra apresentou-se como sólido cristalino em forma de agulhas.

Com a análise dos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 94 e 95, v. 2, pgs. 90 e 91) pode-se confirmar a mistura dos dois esteróides. Em δ_c 140,9; 121,7 e 32,0 observam-se os sinais referentes aos carbonos C-5, CH-6 e CH₂-23 respectivamente para ambos. Já os sinais observados para CH-22 em δ_c 125,1 para **ELA-14** e δ_c 71,4 para **ELA-18** e δ_c 136,0 (C-20, **ELA-14**) δ_c 42,4 (CH-20, **ELA-18**) vêm confirmar a presença da mistura. Ainda no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 94 e 95, v. 2, pgs. 90 e 91) observa-se o sinal em δ_c 71,9 característico do carbono oxigenado indicando a presença de um grupamento hidroxila no átomo de carbono CH-3 das substâncias presentes na mistura.

Analisando os espectros de RMN ^1H (Figuras 92 e 93, v. 2, pgs. 88 e 89) e de RMN ^{13}C (Figuras 94 e 95, v. 2, pgs. 90 e 91) foi possível afirmar a presença da mistura de dois esteróides (**ELA-14** e **ELA-18**). O espectro de RMN ^1H (Figura 92, v. 2, p. 88) apresentou dois multipletos em δ_H 3,46 e δ_H 5,29 característicos dos hidrogênios H-3 e H-6 respectivamente de ambas as estruturas. Ainda puderam-se observar três multipletos em δ_H 5,3; δ_H 5,1 e δ_H 3,66 que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6, H-22 (**ELA-14**) e H-22 (**ELA-18**), que juntamente com os sinais sobrepostos na região de δ_H 0,63 a δ_H 2,28 referente a vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos caracterizam o esqueleto esteroidal (Deeb et al., 2003).

A presença da mistura, bem como a confirmação da estrutura proposta pôde ser reafirmada pela análise do espectro ^1H - ^1H -COSY (Figura 99 e 100, v. 2, pgs. 95 e 96), onde observaram as correlações existentes entre 2H-23 com H-22 e 3H-21 com H-22 de **ELA-14**. Para **ELA-18** observou-se a correlação entre H-22

e H-20 (ausente para **ELA-14**), bem como 3H-21 com H-20 observado nas Figuras 99 e 100, v. 2, pgs. 95 e 96.

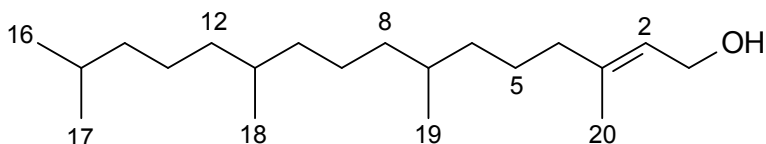
Podem-se observar ainda as correlações heteronucleares apresentadas na proposta para **ELA-14** entre 3H-21 e CH₃-21; 3H-21 e C-20; 3H-19 e CH₃-19; 3H-27 e CH₃-27; 3H-26 e CH₃-26; 3H-18 e CH₃-18 e 3H-29 e CH₃-29, observadas no espectro de HMQC (Figura 97 e 98 v. 2, pgs. 93 e 94). As demais correlações estão descritas na **Tabela 30**, p. 108.

O conjunto desses dados em comparação com dados da literatura para o estigmasterol (**ELA-11b**) (Moreira, 2009) permitiu identificar a mistura de esteróides em **ELA-14** como sendo ltesmol (**ELA-18**) e (24*R*)-estigmas-5,20(22)-dien-3β-ol (**ELA-14**) onde no melhor do entendimento, foi obtido até o momento sob a forma sintetizada (Ayanoglu, Chan e Djerassi, 1979; Giner, Margot e Djerassi, 1988) ainda não tendo sido isolado como produto natural até o momento. Os demais dados são observados na **Tabela 30**, p. 108.

Tabela 30: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura **ELA-14**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

	ELA-14			Estigmasterol
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
5	140,9	-		3H-19
10	36,6	-	3H-19	
13	42,6	-	3H-18	
20	42,4	-	3H-21	
CH				
3	71,9	3,46 (m)		
6	121,7	5,29 (sl)		
8	32,0	1,48 (m)		
9	50,2	0,98		3H-19
14	56,4	1,02		3H-18
17	53,1			3H-18, 3H-21
20	-	-		
22	71,4	5,06 (sl)	3H-21	
24	41,5	1,40		3H-26, 3H-27
25	28,9	1,79	3H-26, 3H-27	
CH₂				
1	37,3	1,89, 1,08		3H-19
2	30,0			
4	41,5			
7	31,7	2,00		
11	21,2			
12	39,8	1,19		3H-18
15	24,5			
16	27,6			
22	-			
23	32,0	1,97		
28	23,7			
CH₃				
18	12,0	0,64 (s)		
19	19,5	0,94 (s)		
21	12,4	1,61 (s)		
26	17,7	0,82 (d, 7,0)		3H-27
27	20,6	0,82 (d, 7,0)		3H-26
29	11,9	0,87		

5.1.3. Determinação estrutural do diterpeno ELA-10



A substância **ELA-10** foi isolada como óleo amarelo. No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 102, v. 2, p. 98) foram observados 20 sinais de carbono: cinco metílicos, dez metilênicos (sendo um carbinólico), quatro metínicos (sendo um sp^2) e um quaternário (sendo um sp^2).

O sinal em δ_{C} 59,4 corresponde ao carbono carbinólico. Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (Figuras 102 e 103, v. 2, pgs. 98 e 99) em δ_{C} 123,1 e δ_{C} 140,3 confirmam a presença de uma insaturação na cadeia. Os demais sinais na região de δ_{C} entre δ_{C} 16,2 e 39,9 sugerem uma cadeia alifática ramificada.

Estas ramificações foram confirmadas através das correlações heteronucleares a longa distância, observadas no espectro de HMBC (Figuras 107 e 108, v. 2, pgs. 103 e 104) entre 3H-20 (δ_{H} 1,66) e CH_2 -4 (δ_{C} 39,9); 3H-20 e C-3 (δ_{C} 140,3); 3H-16 e 3H-17 (δ_{H} 0,87) com CH_2 -14 (δ_{C} 39,4); 3H-18 (δ_{H} 0,85) com CH_2 -12 (δ_{C} 37,3) e 3H-19 (δ_{H} 0,85) com CH_2 -8 (δ_{C} 37,4).

O espectro de RMN ^1H (Figura 101, v. 2, p. 97) mostra um conjunto de sinais em δ_{H} entre 0,82 e 0,87, característicos de hidrogênios metílicos. Mostra também o sinal triplo em δ_{H} 5,40 ($J = 8,0$ Hz) referente ao hidrogênio H-2 acoplado com os dois hidrogênios carbinólicos 2H-1, confirmando a insaturação entre CH-2 e C-3. A insaturação foi também confirmada pelo espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 107 e 108, v. 2, pgs. 103 e 104) através das correlações a longa distância entre os hidrogênios de Me-20 (δ_{H} 1,66) com o carbono CH-2 (δ_{C} 123,1) e C-3 (δ_{C} 140,3), e H-2 (δ_{H} 5,40) com C-3 (δ_{C} 140,3). As demais correlações estão descritas na **Tabela 31**, p. 110.

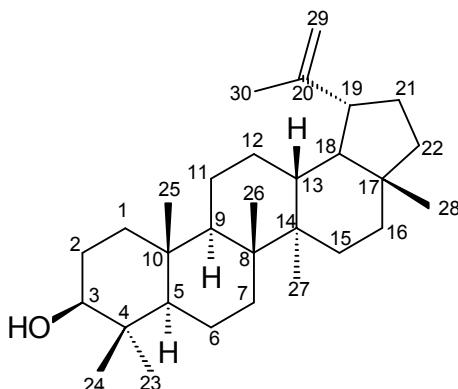
Espectro de massas (Figura 110, v. 2, p. 106) e Esquema 7 (v. 2, p. 107), juntamente com espectro de RMN ^{13}C (Figuras 102 e 103, v. 2, pgs. 98 e 99) e com espectro de HSQC (Figura 109, v. 2, p. 105) permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$ com m/z 296 (ausente) para o diterpeno **ELA-10**.

A comparação dos dados RMN obtidos com os da literatura (Melos et al., 2007; Rahman e Ahmad, 1992) permitiu a identificação do diterpeno fitol [(*E*)-3,7,11,15-tetrametilexadec-2-en-1-ol].

Tabela 31: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) do diterpeno **ELA-10**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

	ELA-10				Fitol	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
3	140,3	-	3H-20		140,1	
CH						
2	123,1	5,40 (t, 8,0)		3H-20	123,1	5,36 (t, 6,7)
7	32,7	1,27	3H-19		32,7	
11	32,9	1,27	3H-18		32,6	
15	28,0	1,25			27,9	
CH₂						
1	59,4	4,15 (d, 8,0)			59,4	4,12 (d, 6,7)
4	39,9	1,98		3H-20	39,8	1,94 (t, 7,5)
5	25,1	1,50 – 1,25			25,1	
6	36,7	1,5-1,07		3H-19	36,6	
8	37,4	1,5-1,07		3H-19	37,2	
9	24,5	1,50 – 1,25			24,5	
10	37,4	1,5-1,07		3H-18	37,3	
12	37,3	1,5-1,07		3H-18	37,3	
13	24,8	1,50 – 1,25		3H-16; 3H-17	24,7	
14	39,4	1,08			39,3	
CH₃						
16	22,7	0,87			22,7	
17	22,6	0,87			22,6	
18	20,0	0,85			19,7	
19	19,7	0,85			19,7	
20	16,2	1,66 (sl)			16,1	1,64 (s)

5.1.4. Determinação estrutural do triterpeno ELA-12



A substância **ELA-12** foi isolada na forma de um sólido branco amorfo com faixa de ponto de fusão de 161-162°C. Foi caracterizada através das análises de RMN ^1H e ^{13}C , CG-EM e por comparação com dados publicados na literatura.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 112, v. 2, p. 109) permitiu reconhecer a presença de trinta átomos de carbono, sendo sete carbonos metílicos, onze metilênicos (um sp^2 e dez sp^3), seis carbonos metínicos e seis quaternários (um sp^2 e cinco sp^3) (Silverstein, 2007). Os sinais em δ_c 151,0 e 109,3 são referentes à dupla ligação terminal e o sinal em δ_c 79,0 foi atribuído ao carbono carbinólico CH-3, confirmando a estereoquímica β -equatorial (Abreu, 2002).

A confirmação da ligação dupla entre os carbonos C-20 e CH₂-29 se deu com a verificação dos deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^{13}C (Figura 112, v. 2, p. 109) δ_c 151,0 e 109,3 respectivamente, compatíveis com triterpenos da série lupano (Ahmad e Rahman, 1994).

O espectro de RMN ^1H (Figura 111, v. 2, p.108) indica a presença de sete metilas, e os sinais apresentam-se como simpletos a δ_H 0,75; 0,78; 0,82; 0,94; 0,96, 1,02 e 1,67 ppm. Observou-se também um sinal em δ_H 4,68 ($J= 4,0$ Hz) atribuído ao hidrogênio olefínico H-29; um sinal em δ_H 3,17 (dd, $J= 4,0$ e 11,0 Hz) atribuído ao hidrogênio H-3 e um multipletto em δ_H 2,38 atribuído ao hidrogênio H-19.

O espectro de massas (Figura 114, v. 2, p. 111) da substância **ELA-12** apresentou o sinal do íon molecular em m/z 426 Daltons estando de acordo com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$, bem como os fragmentos em m/z 218, 203 e 189, que permitiram propor a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ para a substância **ELA-12**, sugerindo a presença do triterpeno Lupeol (Abreu, 2002).

A estereoquímica relativa aos átomos de carbono estereogênicos proposta para **ELA-12** foi feita com base em dados biogenéticos, visto que esqueletos de triterpenos do tipo lupano apresentam as configurações dos carbonos estereogênicos como apresentadas em **ELA-12** (Dewick, 1997).

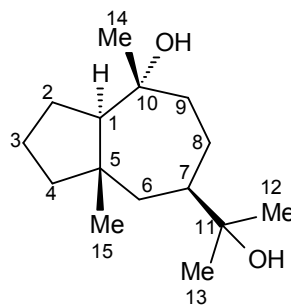
Com base nos dados RMN obtidos, e comparando-os com os da literatura (Barbosa, 2008) foi possível propor para a substância **ELA-12** a estrutura do triterpeno Lupeol (Lup-20(29)-eno).

Na **Tabela 32** (p. 113) estão apresentados os dados de RMN ^{13}C da substância **ELA-12**, bem como para o Lupeol (Abreu, 2002).

Tabela 32: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **ELA-12**, e do triterpeno **Lupeol** em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm.

	ELA-12	Lupeol
	δ_{C}	δ_{C}
C		
4	39,8	39,7
8	40,9	41,9
10	37,3	37,4
14	42,9	43,2
17	43,1	43,2
20	151,0	151,3
CH		
3	79,0	79,2
5	55,2	55,5
9	50,5	50,7
13	38,8	38,0
18	48,1	48,5
19	47,8	48,2
CH₂		
1	39,0	38,9
2	27,2	27,4
6	18,4	18,5
7	34,4	34,5
11	21,0	21,2
12	25,2	25,4
15	27,5	27,6
16	35,7	35,8
21	30,0	30,1
22	39,9	40,2
29	109,4	109,5
CH₃		
23	28,1	28,2
24	15,7	15,6
25	16,5	16,3
26	16,2	16,2
27	14,6	14,8
28	18,0	18,2
30	19,4	19,4

5.1.5. Determinação estrutural do sesquiterpeno ELA-26



A substância **ELA-26**, isolada da fração diclorometânica dos galhos de *T. silvatica*. Tal substância apresentou-se como um sólido amarelo, com valor de rotação óptica $[\alpha]_D^{20} - 20,4$ (CHCl_3 , 0,001 mg/mL) e faixa de ponto de fusão 120,5-121,5 °C.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 117 e 118, v. 2, pgs. 114 e 115) apresentou dois sinais na região de carbonos carbinólicos (δ_{C} 73,39 e 72,94), confirmando a proposta de uma estrutura dihidroxilada.

Análise comparativa dos espectros de RMN ^1H (Figuras 115 e 116, v. 2, pgs. 112 e 113) e RMN ^{13}C -APT (Figuras 117 e 118, v. 2, pgs. 114 e 115) revelou sinais correspondentes a 15 átomos de carbono, sendo três sinais para carbonos não hidrogenados (C), dos quais, dois oxigenados em δ_{C} 73,4 (C-11) e 72,9 (C-10) e um sp^3 em δ_{C} 34,5 (C-5) e dois sinais de carbonos metínicos (CH) e seis sinais de carbonos metilênicos (CH_2) e quatro para carbonos metílicos (CH_3), sendo três ligados a átomos de carbono oxigenados em δ_{C} 27,8 (CH_3 -12), 26,5 (CH_3 -13) e 22,8 (CH_3 -14).

O espectro de massas (Figura 123, v. 2, p. 120) apresentou o íon molecular m/z 240 Daltons $[\text{M}]^{+}$, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_2$. A proposta de fragmentação dos principais íons está descrita no Esquema 8 (v. 2, p. 121).

A fórmula molecular foi proposta baseada, principalmente, nos dados de RMN ^{13}C -APT, e remeteu a: $(\text{C})(\text{COH})_2(\text{CH})_2(\text{CH}_2)_6(\text{CH}_3)_4 = \text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_2$.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 115 e 116, v. 2, pgs. 112 e 113), foram observados ainda quatro sinais simples para quatro grupos metila ligados a

carbonos quaternários em δ_H 1,23 (H₃-12), 1,21 (H₃-13), 1,11 (H₃-14) e 0,86 (H₃-15) comprovando assim que os quatro grupos metila presentes são do tipo presentes em esqueletos sesquiterpênicos tipo ambrosanolideo (Rahman e Ahmad, 1992) que não sofreram oxidação (**Tabela 33**, p. 116).

A localização de três grupos metila ligados a átomos de carbono carbinólicos foi confirmada através das correlações a longa distância entre o átomo de carbono metínico CH-7 em δ_C 49,8 a $^3J_{CH}$ com os dois grupos metila em δ_H 1,23 (Me-12) e 1,21 (Me-13), e do átomo de carbono C-10 a $^2J_{CH}$ em δ_H 72,9 com o grupo metila em δ_H 1,11 (Me-14), ambas apresentadas no espectro de HMBC (Figura 119, v. 2, p. 116).

A localização do outro grupo metila Me-15 foi definida também com base nas correlações a longa distância entre o átomo de carbono metínico CH-1 em δ_C 54,6 a $^3J_{CH}$ com o grupo metila em δ_H 0,86 (Me-15), e do átomo de carbono C-5 a $^2J_{CH}$ em δ_H 34,5 com o grupo metila Me-15, ambas apresentadas no espectro de HMBC (Figura 119, v. 2, p. 116).

A localização dos grupos hidroxila ligados aos átomos de carbono C-11 e C-10 foi apoiada nos valores dos deslocamentos químicos para os átomos de carbono C-11 em δ_C 73,4 e C-10 em δ_C 72,9, observados no espectro de RMN ^{13}C -APT (Figuras 117 e 118, v. 2, pgs. 114 e 115), característicos para carbonos carbinólicos (Silverstein, 2007).

A análise conjunta dos dados obtidos pelos mapas de correlação HMBC (Figura 119, v. 2, p. 116) e HSQC (Figura 120, v. 2, p. 117) confirmaram as atribuições inequívoca dos átomos de hidrogênio e carbono do sesquiterpeno com esqueleto ambrosanolideo **ELA-26**.

A análise do espectro de 1H - 1H -NOESY (Figura 121, v. 2, p. 118) permitiu caracterizar a junção de um anel de cinco membros com um anel de sete membros formando um sistema bicíclico através de uma junção *trans*. A estereoquímica relativa foi definida da análise das interações espaciais apresentadas no espectro 1H - 1H -NOESY entre, Me-14 (δ_H 1,11) e a Me-15 (δ_H 0,86), H-2a (δ_H 1,60) e H-14a (δ_H 4,69) e 3H-13 (δ_H 1,12) e H-14a (δ_H 4,69), juntamente com a não correlação entre H-14a e H-1 (Figuras 121 e 122, v. 2, pgs. 118 e 119).

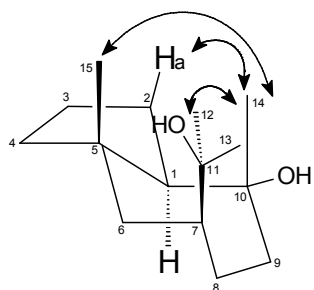


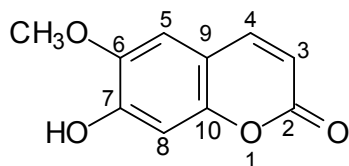
Figura 124: Interações espaciais apresentadas no mapa de correlação ^1H - ^1H -NOESY do sesquiterpeno **ELA-26**.

Os dados espectrais da substância **ELA-26**, estão de acordo para a proposta de um novo sesquiterpeno, o ambrosanoli-11,10-diol, pelo melhor do conhecimento.

Tabela 33: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C -APT (100 MHz) do sesquiterpeno **ELA-26** em CDCl_3 , e as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

ELA-26				
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
5	35,6	-	3H-15	
10	72,9	-	3H-14	
11	73,4	-		
CH				
1	54,6	1,20 (m)		3H-14; 3H-15
7	49,8	1,40 (m)		3H-12; 3H-13
CH₂				
2	20,2	1,57 (m)		
3	21,5	1,90 (m); 1,05 (m)		
4	44,5	1,48 (m); 1,18 (m)		3H-15
6	41,1	1,42 (m); 1,10 (m)		3H-15
8	22,8	1,60 (m); 1,25 (m)		
9	43,4	1,80 (m); 1,40 (m)		3H-14
12	-	-		-
14	-	-	-	-
CH₃				
12	27,8	1,23 (s)		3H-13
13	26,5	1,21 (s)		3H-12
14	22,0	1,11 (s)		
15	18,6	0,86 (s)		

5.1.6. Determinação estrutural da cumarina ELA-16

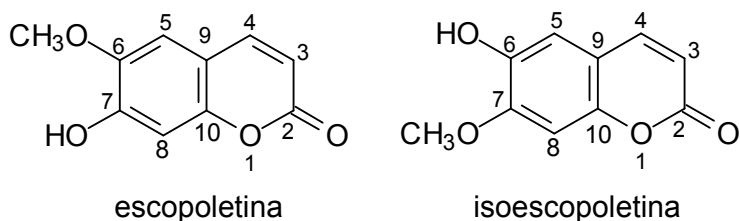


A substância **ELA-16** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarela apresentando ponto de fusão 179°C.

Quando analisada por CCDA, observou-se uma mancha de coloração azul intenso sob a luz de UV (365). A análise dos espectros de RMN ^1H (Figuras 125 e 126, v. 2, pgs. 122 e 123) apresenta dois dupletos acoplado entre si, em δ_{H} 6,27 (d, $J = 9,4$ Hz) e 7,60 (d, $J = 9,4$ Hz), relativos aos hidrogênios H-3 e H-4, caracterizando os hidrogênios de uma dupla ligação *cis* conjugada com grupo carbonila e com anel aromático, característicos para núcleos cumarínicos, nos quais, o átomo de carbono C-5 não se encontra substituído (Murray, et al., 1982). Na região de hidrogênios aromáticos observam-se ainda dois sinais simples em δ_{H} 6,92 e 6,85, relativos aos hidrogênios H-8 e H-5, evidenciando o modo de substituição nos átomos de carbono C-6 e C-7 do anel benzênico.

Um simpleto em δ_{H} 3,96 integrando para três hidrogênios no espectro de RMN ^1H (Figuras 125 e 126, v. 2, pgs. 122 e 123) evidencia a presença de um grupo metoxila no anel, sem ser atribuída, entretanto, a sua posição de substituição no anel benzênico. A presença de um sinal simples largo em δ_{H} 6,14 foi atribuído a um hidrogênio de um grupo hidroxila substituído podendo estar substituído nos átomos de carbono C-6 ou C-7.

Conclui-se então que tem-se uma cumarina dissustituída (escopoletina e isoescopoletina) nas posições C-6 e C-7 pelos grupamentos hidroxila e metoxila, onde sua distinção não pode ser feita através do espectro de RMN ^{13}C (Figura 127, v. 2, p. 124).



Uma alternativa na distinção dos dois isômeros foi a análise por espectrometria de massas, onde a escopoletina apresenta um sinal m/z 177, cuja abundância relativa é em torno de 70%, ao passo que seu isômero pode apresentar o mesmo sinal com intensidade não tão alta (Vieira, 1999). Isto ocorre em virtude de que o íon correspondente m/z 177 formado pela escopoletina pode ser mais estabilizado do que o formado pela isoescopoletina (Figura 128, v. 2, p. 125 e Esquema 9, v. 2, p. 126).

Com base nessas informações obteve-se o espectro de CG/EM da cumarina **ELA-16** (Figura 128, v. 2, p. 125), onde se observou a presença do íon m/z 177 com abundância relativa de 62%, o que leva a concluir que a cumarina **ELA-16** isolada é a escopoletina, e não a isoescopoletina.

Então, a análise do espectro de massas para **ELA-16** levou à fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$ (M^{+} 192), onde os principais fragmentos estão descritos no Esquema 9, v. 2, p. 126.

Tabela 34: Dados de RMN 1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **ELA-16**, em $CDCl_3$. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

ELA-16		
	δ_C	δ_H
C		
2	ND	-
6	ND	-
7	ND	-
9	ND	-
10	ND	-
CH		
3	113,5	6,27 (d, 9,4 Hz)
4	143,1	7,60 (d, 9,4 Hz)
5	103,3	6,85 (s)
8	107,6	6,92 (s)
CH₃		
OMe-6	56,5	3,96 (s)
HO-7	-	6,14 (sl)

ND= não detectado

5.2. TESTES BIOLÓGICOS

5.2.1. *Artemia salina* Leach

De acordo com Dolabela (1997), os critérios de classificação de toxicidade de extratos com base nos níveis de DL₅₀ em *Artemia salina* podem ser assim interpretados:

DL₅₀ < 80 µg/mL, altamente tóxicos;

entre 80 µg/mL e 250 µg/mL, moderadamente tóxico e;

DL₅₀ > 250 µg/mL, com baixa toxicidade ou não tóxico.

Na tabela abaixo são observados os valores de DL₅₀ encontrados para cada extrato testado:

Tabela 35: Extratos testados de *Trichilia casarettii* com respectivos resultados

		DL ₅₀ (ppm)	Intervalo de Confiança 99% (ppm)
Folhas	Metanólico	3,372	1,610–7,678
	Hexânico	254,260	157,538-644,426
	<i>n</i> -Butanólico	245,410	161,376-495,004
Galho	Diclorometano	186,329	145,924-250,812
	Metanólico	221,960	179,120-286,109
	<i>n</i> -Butanólico	207,520	77,75-431,106 (95%)

Em virtude do valor baixíssimo encontrado para extrato metanólico de folhas, DL₅₀ ($1,874 \times 10^{-2}$ ppm), o teste para este extrato foi repetido baixando-se as concentrações para 1; 2,5; 5 e 10 ppm. O valor da DL₅₀ para estas concentrações é o expresso na tabela acima.

Portanto, com exceção do extrato butanólico das folhas de *Trichilia casarettii* (por muito pouco), todos os extratos testados sugerem a presença de substâncias bioativas, com um destaque para o extrato metanólico das folhas, que apresentou um excelente resultado citotóxico, justificando testes biológicos futuros para as substâncias puras isoladas.

5.2.2. Teste antitumoral

Tabela 36: IC₅₀ para extratos testados frente às células tumorais NCI-H460

		IC ₅₀ ppm	
<i>T. casarettii</i>	Folhas	Butanólico	583,0
	Galhos	Diclorometano	617,8
		Acetato	139,2
		Butanólico	708,6
<i>T. silvatica</i>	Folhas	Diclorometano	257,5
		Acetato de Etila	714,6
	Galhos	Diclorometano	311,4
		Acetato de Etila	264,3
		Butanólico	550,7

Os resultados apresentados na **Tabela 36** para os extratos de *T. casarettii* e *T. silvatica* são preliminares, visto que, para este tipo de linhagem de célula tumoral não há relato na literatura de testes com extratos vegetais brutos.

Desta forma, mesmo não sendo possível propor uma análise comparativa, vê-se que todos os extratos apresentaram resultados de IC₅₀ abaixo de 1000 ppm, permitindo verificar que os extratos em acetato de etila dos galhos de *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* foram os que apresentaram os melhores resultados, podendo ser um indicativo de continuidade nos estudos para testar as substâncias puras isoladas desses extratos pelo teste colorimétrico MTT e na seqüência, o teste de fluorescência para avaliação de morte apoptótica celular ou não, não ignorando os outros extratos.

5.2.3. *Aedes aegypti*

Na **Tabela 37**, p. 121 estão relacionados os extratos vegetais testados frente às larvas de *Aedes aegypti*:

Tabela 37: Extratos brutos analisados com relação à atividade larvicida de *Aedes Aegypti*

<i>T. casarettii</i>	Folha	Butanólico
		Acetato
	Galho	Diclorometano
		Hexano
<i>T. silvatica</i>	Folha	Diclorometano
		Acetato
	Galho	Acetato
		Butanólico

Não foi observado nenhum tipo de atividade dos extratos testados frente às larvas de *Aedes aegypti*, visto que não se observou morte larvar.

5.2.4. Atividade antimicrobiana

5.2.4.1. *Staphylococcus aureus*

✓ *Extratos relacionados no Quadro 2, p. 74*

Com relação aos extratos citados no Quadro 2, p. 74, o extrato 1 (TCMA) apresentou atividade superior aos demais frente a todas as cepas, com valores médios dos halos variando de 25 mm para a RN6390B, 17 mm para ATCC 25923, 14 mm para SD a 13 mm para LSA-88 e COL. Os extratos 2 (TCFB) e 4 (TSMD) não se diferiram e também apresentaram atividade significativa para todas as cepas, com as medidas dos halos de inibição variando entre 11 e 17 mm, enquanto que o extrato 3 (TCFM) não apresentou atividade, na concentração avaliada para nenhuma das cepas, sendo similar ao controle DMSO, conforme se pode observar na **Figura 129**, p. 122.

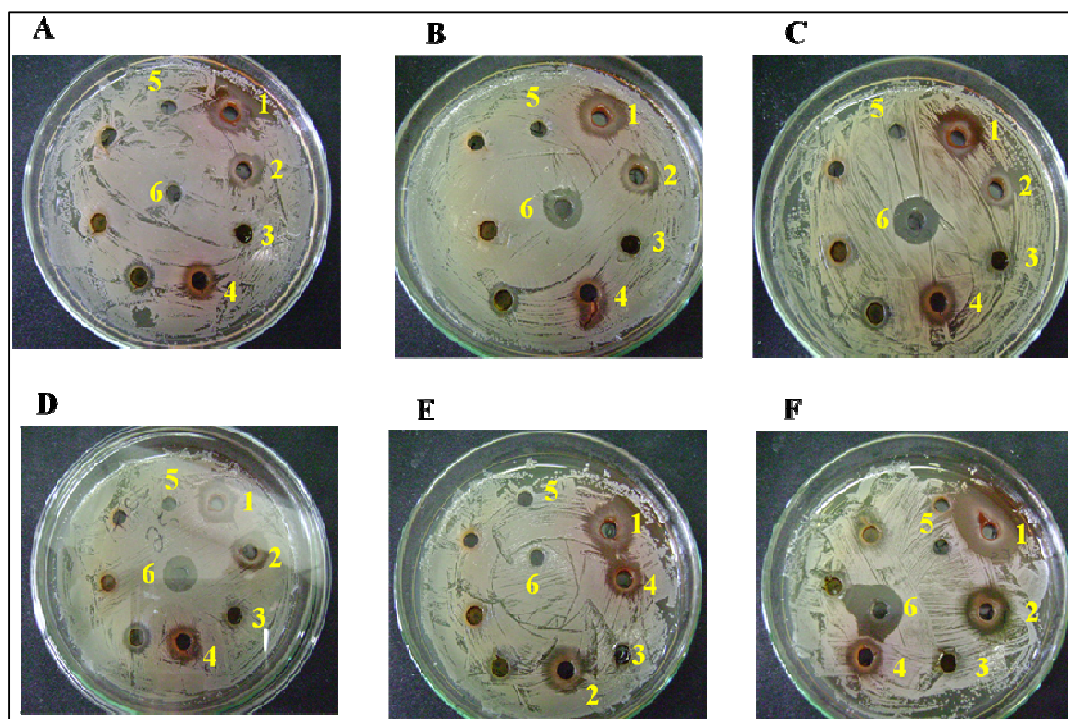


Figura 129: Atividade antimicrobiana contra as cepas SE (A), LSA (B), SD (C), ATCC (D), COL (E) e RN (F). TCMA (1), TCFB (2), TCFM (3), TSMD (4), solvente DMSO p.a. (5) e Gentamicina (6) Quadro 2, p. 74.

✓ *Extratos relacionados no Quadro 3, p. 74*

Os valores médios dos halos de inibição promovidos pelos extratos definidos no Quadro 3, p. 74 apresentaram níveis variados, conforme ilustrado na **Tabela 38**, p. 123.

Tabela 38. Valores médios, em milímetros, dos diâmetros dos halos de inibição provenientes dos tratamentos (extratos mencionados no **Quadro 3**, p. 74) com numeração de 1 a 7, pelo controle positivo (Gentamicina) e pelo controle negativo (DMSO p.a.)

Extratos	Cepas de <i>Staphylococcus</i>					
	ATCC 108032	COL	SD	ATCC 25923	RN	LSA 88
1	8,00 ^{cdeA}	3,10 ^{bcAB}	7,733 ^{aA}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{cB}	8,00 ^{abA}
2	4,90 ^{defAB}	2,767 ^{bcA} _B	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}	6,50 ^{bA}	2,767 ^{bcAB}
3	6,00 ^{deA}	0,00 ^{cB}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{bB}	0,00 ^{cB}	2,80 ^{bcAB}
4	9,067 ^{bcdB}	3,133 ^{bcC}	12,00 ^{aAB}	6,733 ^{aB}	14,80 ^{aA}	11,733 ^{aAB}
5	13,367 ^{abc} _A	11,467 ^a _A	13,433 ^a _A	11,567 ^a _A	14,967 ^a _A	11,533 ^{aA}
6	13,933 ^{abA}	6,733 ^{abB}	12,167 ^a _A	9,20 ^{aAB}	13,733 ^a _A	10,367 ^{aAB}
7	3,50 ^{defA}	0,00 ^{cA}	0,00 ^{bA}	0,00 ^{bA}	0,00 ^{cA}	10,00 ^{cA}
Gentamicina	15,233 ^{aA}	0,00 ^{cC}	13,10 ^{aA}	11,60 ^{aAB}	14,70 ^{aA}	12,90 ^{aA}
DMSO	0,00 ^{fA}	0,00 ^{cA}	0,00 ^{bA}	0,00 ^{bA}	0,00 ^{cA}	0,00 ^{cA}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (extrato) e pela mesma letra maiúscula na linha (microorganismo) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pode-se observar, na **Figura 130**, p. 124, bem como na **Tabela 38**, que os extratos 4, 5 e 6 apresentaram halos de inibição comparáveis aos halos formados pelo antibiótico de referência, a Gentamicina, frente a todas as cepas testadas, sendo que para a cepa COL, que é Meticilina resistente, observou-se que o extrato 5 apresentou maior grau de inibição em relação aos demais, inclusive ao antibiótico, que não apresentou nenhum halo na concentração mencionada.

Cada extrato foi considerado ativo quando apresentou halo de inibição comparável ao promovido pelo padrão Gentamicina, cujas medidas dos diâmetros dos halos variaram de 0 a 15,2 mm. O teste com o solvente (DMSO) mostrou que não houve qualquer interferência do mesmo sobre o crescimento microbiano.

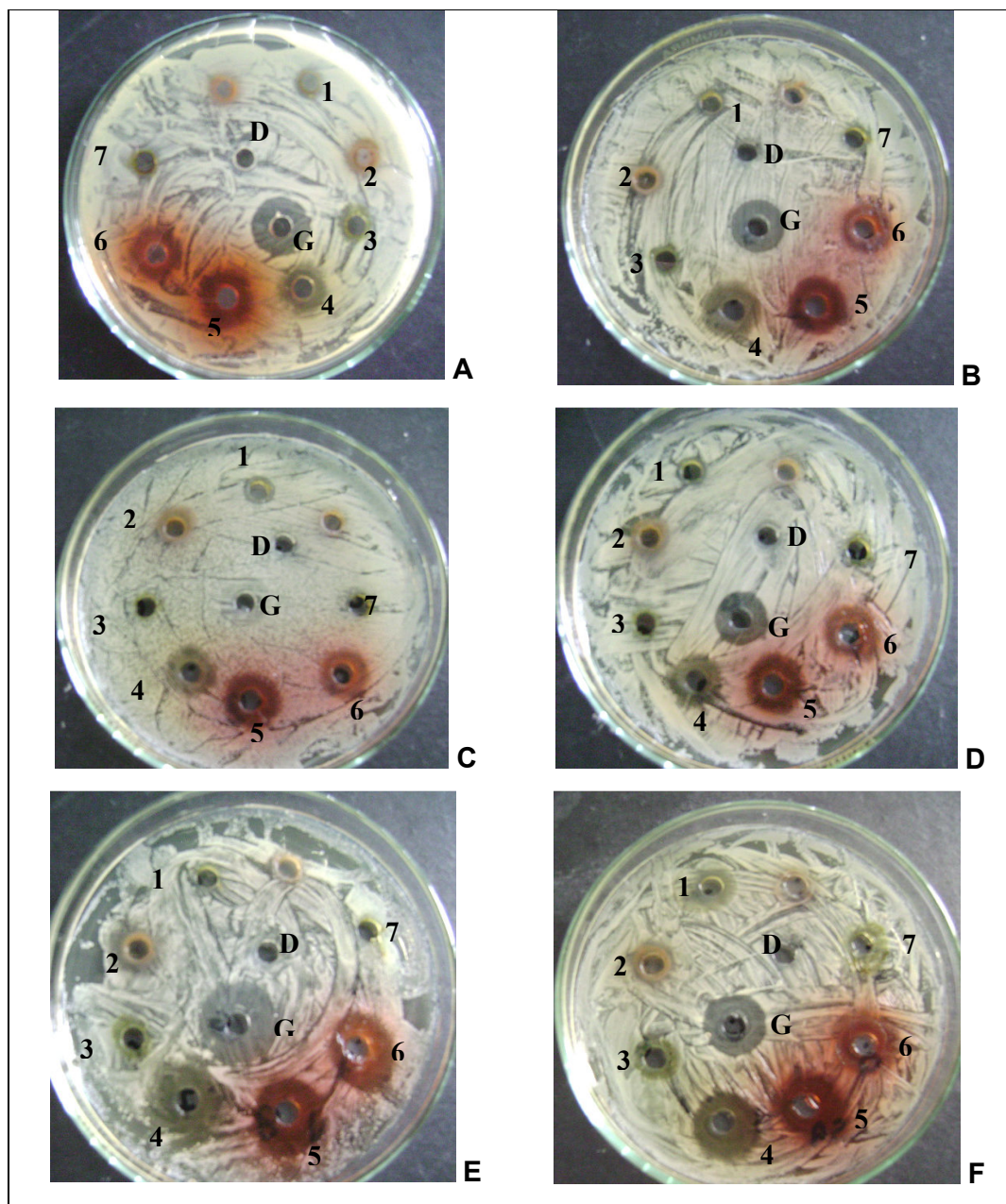


Figura 130: Formação dos halos de inibição dos extratos do Quadro 3, p. 74 [TCMM (1), TCMB (2), TCFH (3), TCFA (4), TSMA (5), TSMB (6), TSFM (7), Gentamicina (G) na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ e DMSO (D) p.a. frente às cepas ATCC10832 (A), Smith Diffuse ATCC13709 (B), COL (C), ATCC25923 (D), RN (E) e LSA-88 (F)]

5.2.4.1.1. Avaliação do efeito de cada extrato do Quadro 3, p. 74 (Tabela 38, p. 123) sobre as seis cepas de *S. aureus*

O extrato 1 apresentou maior efeito de inibição sobre as cepas ATCC10832, SD (ATCC13709) e LSA-88.

O extrato 2 apresentou maior atividade inibitória para a cepa RN, seguida da ATCC10832, COL e LSA-88. As cepas ATCC25923 e SD não apresentaram nenhuma sensibilidade a este extrato.

O extrato 3 apresentou maior inibição para a cepa ATCC10832 que não se diferiu significativamente da LSA-88. Não foi observado nenhum efeito destes extratos sobre as cepas COL, SD (ATCC13709), ATCC25923 e RN.

O extrato 4 foi mais efetivo sobre a cepa RN que não se diferiu significativamente da SD (ATCC13709) e LSA-88.

O extrato 5 foi mais efetivo dentre todos os extratos e apresentou inibição similar para todas as seis cepas testadas, conforme ilustra a **Figura 129**, p. 122. Observou-se maior atividade antimicrobiana frente à cepa RN (halo 14,967 mm), que não se diferiu da Gentamicina (diâmetro de halo 14,700 mm).

Frente à cepa LSA-88, os extratos 4 e 5 foram os que apresentaram maior ação antimicrobiana, conforme pode-se observar na **Figura 130**, p. 124, e não se diferiram significativamente da Gentamicina (halo 12,900 mm). Esta cepa, que foi isolada de amostra de leite de vaca com mastite subclínica, na região de Campos dos Goytacazes – RJ, apresenta resistência a outras drogas, porém trata-se de uma cepa sensível à Meticilina (Motta 2000a). É uma cepa enterotoxigênica, ou seja, produtora de enterotoxinas, o que denota maior patogenicidade da mesma (Motta e colaboradores, 2001).

Não foi observada nenhuma atividade antimicrobiana significativa para o extrato 7 frente às cepas testadas.

Dessa forma, os resultados observados pelas zonas de inibição, relativas aos extratos testados, são relevantes e justificam estudos posteriores envolvendo a influência dos mesmos sobre a produção de enterotoxinas.

5.2.4.1.2. Avaliação de concentrações diversas do extrato 5 (TSMA) sobre as cepas ATCC25923 e LSA-88 através da diluição seriada.

Depois da triagem feita pelo método da difusão em Ágar, verificou-se que para as cepas testadas, o extrato que apresentou maior efeito antimicrobiano foi o número 5, obtido pela extração com acetato de etila dos galhos de *T. silvatica*. Assim foi feita uma avaliação da sua atividade frente às cepas ATCC25923 e LSA-88 do método de diluição em meio líquido.

Na **Figura 131** pode-se observar o evidente efeito do extrato TSMA, e na Tabela 39, pode-se analisar o resultado para CMI.

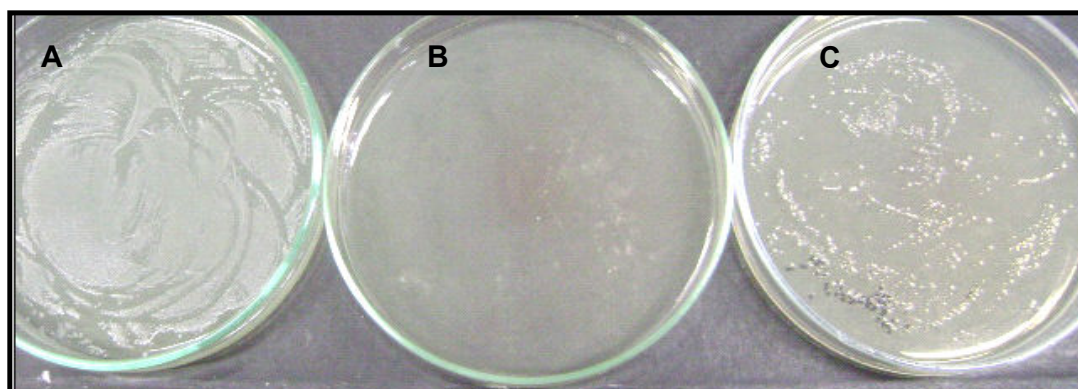


Figura 131: Atividade antimicrobiana do extrato 5 (TSMA) frente à cepa ATCC25923: (A) controle, (B) efeito antibacteriano na concentração de 150 µg de extrato/mL, (C) crescimento bacteriano na concentração de 75 µg de extrato/mL.

Tabela 39: Avaliação da atividade do extrato 5 frente às cepas ATCC 25923 e LSA-88

Cepa	Concentração do extrato 5 (µg/mL)				Controle	
	150	75	32	16,3	1	2
ATCC25923	10	$7,3 \times 10^3$	>300	C	$2,3 \times 10^7$	0
LSA-88	$1,8 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	10^5	>300	$2,3 \times 10^7$	0

C: UFC \geq 300 (confluência de colônias).

Controle 1: meio de crescimento sem extrato e com inóculo.

Controle 2: meio de crescimento com antibiótico gentamicina na concentração de 20 µg/mL sem extrato e com inóculo.

Observou-se que o referido extrato teve acentuado efeito bacteriostático quando na concentração 150 µg/mL para ATCC25923, porém este efeito não foi observado para a cepa LSA-88 nas concentrações testadas. Este estudo corrobora os estudos realizados por Pizzolatti e colaboradores (2002), quando verificaram a concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida frente à cepa ATCC 25923 de uma mistura de flavolignanas isoladas do extrato em acetato de etila de *T. catigua* foi de 310 µg /mL.

De uma maneira geral observou-se que houve uma redução do número de UFC em presença do extrato 5 nas diversas concentrações, tanto para ATCC25923 quanto para a LSA-88, quando comparadas ao controle, cujas placas apresentaram confluência de colônias.

Estes resultados permitem sugerir que o efeito do extrato 5 pode estar associado ao conjunto de seus componentes ou a algum componente isolado.

5.2.4.2. Microorganismos na flora bucal

5.2.4.2.1. *Streptococcus mutans*

Nenhum dos extratos testados, citados na **Tabela 22**, p. 76, apresentaram halo de inibição significativo para esta bactéria.

5.2.4.2.2. Outros microorganismos na flora bucal

Na **Tabela 40**, p. 128 estão apresentados os resultados obtidos para CMI dos extratos de *T. silvatica* testados frente a um conjunto de bactérias presentes na flora bucal:

Tabela 40: Concentração mínima inibitória frente aos microorganismos na flora bucal

Amostra	Resultados - µg/mL						
	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	<i>L. casei</i> ATCC 11578	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
TSLA	400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	> 400
TSFA	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	> 400
TSFB	60	> 400	400	> 400	300	300	90
Clorexidina	0,0922	0,3688	0,1844	0,3688	0,0922	0,3688	0,0922

Concentrações dos extratos testados = 20 µg/mL a 400 µg/mL

Concentrações do controle positivo testado = 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL

Ríos e Recio em 2005 afirmaram que um extrato pode apresentar uma atividade antimicrobiana interessante quando valores de IC₅₀ ficarem abaixo de 100 µg/mL, o que pode ser observado com o extrato TSFB para dois microorganismos: *S. salivarius* ATCC 25975 e *S. mutans* ATCC 25175. Os resultados podem sugerir, portanto, a possibilidade da existência de substâncias (ou grupo de substâncias) ativas no extrato.

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* resultou no isolamento de treze substâncias: os triterpenos 24-metilenocicloartano-12-oxo-3 β ,22 α -diol (ainda não descrito na literatura), 24-metilenocicloartano-3 β ,22-diol, Trichiliol (ainda não descrito na literatura), 24,25-diidroxícicloart-22-enol (ainda não descrito na literatura), 22-hidroxícicloart-24-enol, lupeol, o diterpeno fitol, os esteróides β -sitosterol, estigmasterol, estigmas-5,20(22)-dien-3 β -ol (ainda não descrito na literatura) e itesmol, e a cumarina escopoletina de *Trichilia casarettii*.

Da espécie *Trichilia silvatica* foram isolados os esteróides β -sitosterol e estigmasterol, o sesquiterpeno ambrosanoli-11,10-diol (ainda não descrito na literatura) e a cumarina escopoletina, revelando um predomínio de substâncias terpênicas tanto em *T. silvatica* quanto em *T. casarettii*, o que está de acordo com a representação do gênero.

As estruturas foram estabelecidas por técnicas espectrométricas, principalmente uni e bidimensional RMN (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^1H -NOESY, HMQC e HMBC), e espectrometria de massas de baixa e alta resolução.

Para os testes preliminares efetuados, obteve-se uma série de resultados importantes, a saber:

Frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, todos os extratos testados apresentaram toxicidade relatada, porém, o extrato metanólico das folhas da espécie *Trichilia casarettii* foi o que se caracterizou com alta toxicidade.

A análise anticancerígena frente à linhagem tumoral NCI-H460 sugere uma avaliação das substâncias puras que forem isoladas dos extratos em acetato de etila dos galhos de *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica*, pois se apresentaram mais ativos.

À análise frente às larvas de *Aedes aegypti* conclui-se que as espécies não possuem atividade larvicida, o que não descarta a atividade inseticida, que pode ser avaliada futuramente com o inseto adulto.

Com relação à análise de atividade antibacteriana tem-se que: os extratos TCMA, TCFA, TSMA e TSMB apresentaram atividade frente às seis cepas testadas da bactéria *Staphylococcus aureus*; para *Streptococcus mutans*, foi observada atividade apenas para o extrato TSFB, que também se mostrou ativo para a bactéria *Streptococcus salivarius*.

As atividades observadas para os extratos brutos, descritas acima, sugerem um possível potencial antitumoral e antibacteriana para as substâncias (ou um grupo delas) presentes em cada extrato ativo, revelando a importância na continuidade de estudos com o gênero *Trichilia*.

7. REFERÊNCIAS

- Abreu, L. F. (2002) *Estudo fitoquímico de Dalbergia nigra (Vell.) Fr. Allem. (Fabaceae)*. Tese (Mestre em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 216p.
- Ahmad, V. U.; Rahman, A. U. (1994). *Handbook of Natural Products Data, Pentacyclic Triterpenoids*, V. 2, Ed. Elsevier, 1556p.
- Aladesanmi, A. J.; Odediran, S. A.; (2000) Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves. *Fitoterapia*, 71:179-182.
- Ambrozin, A. R. P. (2004) *Estudo fitoquímico de plantas das família Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses*. Dissertação (Doutorado) São Carlos-SP, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 241p.

- Ayanoglu, E.; Chan, A.; Djerassi, C. (1979) Use of n-lithioethylenediamine in the double bond isomerization and degradation of sterol side chains. *Tetrahedron*, 35:1591-1594.
- Badam, L.; Joshi, S. P.; Bedakar, S. S. (1999) 'In vitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) leaf extract against group B Coxsackie viruses. *The Journal of Communicable Diseases*. 31:79-90.
- Balasenthil, S.; Arivazhagan, S.; Ramachandran, C. R.; Ramachandran, V.; Nagini, S. (1999) Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7,12-dimethylbenz(a) anthrance (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*. 67:189-195.
- Barbosa, L. F. (2008) *Constituintes Químicos de Aspidosperma ilustre*. Tese (Mestrado em Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, 187p.
- Barroso, G. M.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Guimarães, E. F.; Lima, H. C. (1984) Sistemática das Angiospermas do Brasil, UFV, Imprensa Universitária, Viçosa, 2:283-303.
- Beck, J.; Garcia, R.; Heiss, G.; Vokonas, P.S.; Offenbacher, S. (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, 67:1123–1137.
- Beltrane, F. L.; Filho, E. R.; Barros, F. A. P.; Cortez, D. A. G.; Cass, Q. B. (2006) A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals os *Trichilia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography A*, 1119:257-263.
- Bolzani, V. S.; Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. (2002) Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, 25:45-61.

- Bogorni, P. C.; Vendramim, J. D. (2005) Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* ssp sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, 34:311-317.
- Bohlmann, F.; Misra, L. N.; Jakupovic, J.; King, R. M.; Robinson, H. (1985) Guaianolides, heliangolides, diterpenes and cycloartenol derivatives from *Balsamorhiza sagittata*. *Phytochemistry*, 24:2029-2036.
- Braga, P. A. C.; Soares, M. S.; Silva, M. F. das G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Pinheiro, A. L. (2006) Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34:282-290.
- Breen, G. J. W.; Ritchie, E.; Sidwell, W. T. L.; Taylor, W. C. (1966) The chemical constituents of Australian *Flindersia* species. XIX. Triterpenoids from the leaves of *F. bourjotiana* F. Muell. *Australian Journal of Chemistry*, 19:455 – 481.
- Browne, P. (1756) *Civil and natural history of Jamaica*. London: T. Osborne and J. Shipton, 279 p.
- Butterworth, J. H.; Morgan, E. D. (1968) Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Journal of Chemistry Society, Chemistry Commun*, 1:23.
- Chaidir, Hiort, J.; Nugroho, B. W.; Bohnenstengel, F. I.; Wray, V.; Witte, L.; Hung, P. D.; Kiet, L. C.; Sumaryono, W.; Proksch, P. (1999) New insecticidal rocaglamide derivatives from flowers of *Aglaia duperreana* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 52:837-842.
- Champagne, D. E.; Koul, O.; Isman, M. B.; Scudder, G. G. E.; Towers, G. H. N. (1992) Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31:377-394.

- Chan, W. R.; Taylor, D. R. (1966) Hirtin and Deacetylhirtin: new "limonoids" from *Trichilia hirta*. *Chemical Communications*, 7:206-207.
- Chan, W. R.; Gibbs, J. A.; Taylor, D. R. (1967) The limonoids of *Trichilia havanensis* Jacq.: an epoxide rearrangement. *Chemical Communications*, 720-721.
- Chan, W. R.; Gibbs, J. A.; Taylor, D. R. (1973) Triterpenoids from *Trichilia havanensis* Jacq. Part I. The acetates of havanensis and Trichilenone, new tetracarbocyclic tetranorteiterpenes. *Journal of the Chemical Society, Perkin I*, 1047-1050.
- Chauret, D. C.; Durst, T.; Arnason, J. T. (1996) Novel steroids from *Trichilia hirta* as identified by nanoprobe Inadequade 2D-NMR spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, 37:7875-7878.
- Chaves de Paz, L. E.; Dahlén, G.; Molander, A.; Möller, A.; Bergenholtz, G. (2003) Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal*, 36:500-508.
- Connolly, J. D. (1983) In: Waterman, P. O.; Orundon, M. F. (eds), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*, Academic Press, London, 175p.
- Corrêa, A. G.; Vieira, P. C. (2007) *Produtos naturais no controle de insetos*. EdUFSCar, São Carlos, 150p.
- Cortez, D. A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Ferreira, A. G.; Cass, Q. B.; Pirani, J. R. (1998) Meliacin butenolides from *Trichilia estipulata*. *Phytochemistry*, 49:2493-2496.
- Cortez, D. A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Ferreira, A. G. (2000) A limonoid from *Trichilia estipulata*. *Phytochemistry*, 55:711-713.

- Crotti, A. E. M.; Ferreira, M. A.; Carvalho, T. C.; Turatti, I. C. C.; Furtado, N. A. J. C.; Martins, C. H. G.; Lopes, N. P.; Cunha, W. R. (2010) Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham., Lamiaceae, against oral pathogens. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20:246-249.
- Cunha, U. S.; Vendramim, J. D.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C. (2006) Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41:1579-1585.
- Dasgupta, T.; Banerjee, S.; Yadava, P. K.; Rao, A. R. (2004) Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 92:23-36.
- Deeb, K. S.; Al-Haidari, R. A.; Mossa, J. S.; Ateya, A. (2003) Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11:184-191.
- Dewick, P. M. (1997) *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, 442 p.
- Doe, M.; Shibue, T.; Haraguchi, H.; Morimoto, Y. (2005) Structures, biological activities, and total syntheses of 13-hydroxy- and 13-acetoxy-14-nordehydrocacalohastine, Novel Modified Furanoeremophilane- Type Sesquiterpenes from *Trichilia cuneata*. *Organic Letters*, 7:1765-1768.
- Dolabela, M. F. (1997) *Atividade antiplasmódica e citotoxicidade de Essenbeckia febrifuga (A.St.Hil.) Juss. Ex Mart. (Rutaceae) e espécies do gênero Aspidosperma (Apocynaceae)*. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 128 p.
- Endo T.; Kita M.; Shimada T.; Moriguchi T.; Hidaka T.; Matsumoto R.; Hasegawa S.; Omura M. (2002) Modification of limonoid metabolism in suspension cell culture of citrus. *Plant Biotechnology*. 19:397-403.

- Ferrigni, N. R.; McLaughlin, J. L.; Powell, R. G.; Smith, J. R. (1984) Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *Journal of Natural Products*, 47:347-352.
- Figueiredo, E. R. (2006a) Folhas da espécie *Trichilia casarettii* 1 fot.: color 6x8 cm
- Figueiredo, E. R. (2006b) Tronco da espécie *Trichilia casarettii*. 1 fot.: color; 10x8 cm.
- Figueiredo, E. R. (2006c) Espécie *Trichilia silvatica*. 2 fot.: color 11x 8cm e 11x3 cm.
- Finney, D. L. (1971) *Probit Analysis*; 3^o ed., Cambridge University Press:Cambridge, , 333p.
- Franco, B. G. M.; Landgraf, M. (1996) *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182p.
- Furlan, M.; Roque, N. F.; Wolter Filho, W. (1993) *Cycloartane derivatives from Guarea trichilioides*. *Pytochemistry*, 32:1519-1611.
- Gadelha, D. P.; Toda, A. T. (1985) Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais*, 37:29-36.
- Galotta, A. L. Q. A.; Boaventura, M. A. D. (2005) Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* MART. ARECACEAE). *Química Nova*, 28:610-613.
- Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Rodrigues, E. D.; Pott, V. J.; Roque, N. F. (1996) Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, 42:1399-1403.

- Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Tsutsumi, M. T.; Roque, N. F. (1997) Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, 45:141-148.
- Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; Roque, N. F.; Castellano, E. E.; Zukerman-Schpector, J. (2000) 7 β -Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, 55:733-740.
- Garcez, W. S.; Pereira, A. L.; Queiroz, P. P. S.; Silva, R. S.; Valente, L. M. M.; Peixoto, E. M.; Pinto, A. C. (1981) RMN ^{13}C de diterpenos com esqueleto pimarano. *Química Nova*, 116-122.
- Garg, S.; Talwar, G. P.; Upadhyay, S. N. (1998) Immunocontraceptive activity guided fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 60:235-246.
- Geng, Z. L.; Fang, X.; Di, Y. T.; Zhang, Q.; Zeng, Y.; Shen, Y. M.; Hao, X. J. (2009) Trichilin B, a novel limonoid with highly rearranged ring system from *Trichilia connaroides*. *Tetrahedron Letters*, 50:2132-2134.
- Germanò, M. P.; Angelo, V. D.; Sanogo, R.; Catania, S.; Alma, R.; De Pasquale, R.; Bisignano, G. (2005) Hepatoprotective and antibacterial effects extracts from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 96:227-232.
- Germanò, M. P.; D'Angelo, V.; Biasini, T.; Sanogo, R.; De Pasquale, R.; Catania, S. (2006) Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*, 105:368-373.
- Gervásio, R. C. R.; Vendramim, J. D. (2004) Efeito de extratos de Meliáceas sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology*, 33:607-612.

- Giner, J. L.; Margot, C.; Djerassi, C. (1988) Stereospecificity and regiospecificity of the phosphorus oxychloride dehydration of sterol side chain alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 54:369-373.
- Gonçalves-Gervásio, R. C. R. (2003) *Efeito de extratos de Trichilia pallida Swartz e Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) sobre Tuta absoluta (Meyrick) e seu parasitóide Trichogramma pretiosum Riley*. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, 88p.
- Gunatilaka, A. A. L.; Bolzani, V. S.; Dagne, E.; Hofmann, G. A.; Johnson, R. K.; McCabe, F. L.; Mattern, M. R.; Kingston, D. G. I. (1998) Limonoids showing selective toxicity to DNA repair-deficient yeast and other constituents of *Trichilia emetica*. *Journal of Natural Products*, 61:179-184.
- Gusmão, E.; S.; Diniz, E.; S.; Duarte, I.; L.; Carvalho, T.; M.; A.; Silveira, R.; C.; J.; Filho Milhomens, J.; A. (2004) Mechanic-chemical control of dental biofilme clinical rehearsal with two toothpastes: herbal and conventional. *International Journal of Dentistry*, 3: 345-348.
- Haba, H.; Lavaud, C.; Harkat, H.; Magid, A. A.; Marcourt, L.; Benkhaled, M. (2007) Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, 68:1255-1260.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K. (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30:3864-3874.
- Husain, A.; Virmani, O.P.; Popli, S.P.; Misra, L.N.; Gupta, M.M.; Srivastava, G.N.; Abraham, Z.; Singh, A.K. (1992) *Dictionary of Indian Medicinal Plants*. Vap Enterprises, New Delhi, 62-63p.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde (2009) *Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil*, 98p.

- Inada, A.; Konishi, M.; Murata, H.; Nakanishi, T. (1994) Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*. *Journal of Natural Products*, 57:1446-1449.
- Jacob R., Hasegawa S., Manners G. (2000). The Potential of Citrus Limonoids as Anticancer Agents. *Perishables Handling*, 102:6-8.
- Jett, B. D.; Huycke, M. M.; Gilmore, M. S. (1994) Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7:462-478.
- Jolad, S. D.; Hoffmann, J. J.; Cole, J. R.; Tempest, M. S.; Bates, R. B. (1980) Partial formula R1 in this reference depicts the wrong configuration at C24. *The Journal of Organic Chemistry*, 45:3132.
- Joycharat, N.; Greger, H.; Hofer, O.; Saifah, E. (2008) Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. *Phytochemistry*, 69:206-211.
- Keshri, G.; Lakshmi, V.; Singh, M. M. (2003) Pregnancy interceptive activity of *Melia azedarach* Linn. in adult female Sprague-Dawley rats. *Contraception*, 68:303-306.
- Ketwaru, P.; Klass, J.; Tinto, W. F. (1993) Pregnane steroids from *Trichilia schomburgkii*. *Journal of Natural Products*, 56:430-431.
- Krief, S.; Martin, M. T.; Grellier, P.; Kasenene, J.; Sévenet, T. (2004) Novel antimalarial compounds Isolated in a survey of self-medicative behavior of wild Chimpanzees in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:3196-3199.
- Klein, R. M. (1984) *Meliaceae*. Flora Illustrada Catarinense, Itajaí, 1-138p.
- Kletter, C.; Glasl, S.; Presser, A.; Werner, I.; Reznicek, G.; Narantuya, S.; Cellek, S.; Haslinger, E.; Jurenitsch, J. (2004) Morphological, Chemical and Functional Analysis of Catuaba Preparations. *Planta Medica*, 70:993.

- Klocke, J. A. (1987) *Natural plant compounds useful in insect control*, p.396-415. In G. R. Wallerd (ed.), *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*. Washington, American Chemical Society (*American Chemical Society Symposium Series*, 330), 606p.
- Koul, O., Singh, G., Singh, R., Daniewski, W. M., Berlozecki, S. (2004) Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteron larvae. *Journal Bioscience*. 29:409–416.
- Lacaz, C. S., Minani, O. S., Purchio, A. (1970) *O grande mundo dos fungos*. São Paulo, Polígono Editora da Universidade de São Paulo, 248p.
- Lago, J. H. G.; Roque, N. F. (2002) Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*. *Phytochemistry*, 60:329-332.
- Lee, S. K.; Cui, B.; Mehta, R. R.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. (1998) Cytostatic mechanism and antitumor potencial of novel 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from *Aglaya elliptica*. *Chemico-Biological Interactions*, 115:215-228.
- López-Olguín, J. F.; Adán, A.; Ould-Abdallahi, E.; Budia, F.; Del Estal, P.; Vinuela, E. (2002) Actividad de *Trichilia havanensis* Jacq (Meliaceae) en la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 28:299-306.
- MacRae, W. D.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N. (1988) Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 143-172.
- Marinho, A. M. R. (2005) *Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero Penicillium associados às plantas Murraya paniculata (Rutaceae) e*

Melia azedarach (Meliaceae). Dissertação (Doutor em Ciências) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 316p.

- Martins, C. H. G.; Severino, V. G. P.; Silva, M. F. G. F.; Lucarini, R.; Montanari, L. B.; Cunha, W. R.; Vinholis, A. H. C. (2009) Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:535-540.
- McFarland, K.; Mulholland, D. A.; Fraser, L. A. (2004) Limonoids from *Turrea floribunda* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 65:2031-2037.
- McLaughlin, J. L.; Chang, C.-J.; Smith, D. L. (1991) *In Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 9, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam p. 383-409.
- Melos, J. L. R.; Silva, L. B.; Peres, M. T. L. P.; Mapeli, A. M.; Faccenda, O.; Anjos, H. H.; Torres, T. G.; Tiviroli, S. C.; Batista, A. L.; Almeida, F. G. N.; Flauzino, N. S.; Tibana, L. A.; Hess, S. C.; Honda, N. K. (2007) Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). *Quimica Nova*, 30:292-297.
- Meyer, B. N.; Ferrigini, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. (1982) Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
- Mitsui, K.; Maejima, M.; Saito, H.; Fukaya, H.; Hitotsuyanagi, Takeya, K. (2005) Triterpenoids from *Cedrela sinensis*. *Tetrahedron*, 61:10569-10582.
- Moreira V. F. (2009) *Constituintes Químicos de Borreria verticillata* (Rubiaceae). Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 168p.

- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- Muellner, A. N.; Savolainem, V.; Samuel, R.; Chase, M. W. (2006) The mahogany family “out-of-Africa”: Divergence time estimation, global biogeographic patterns inferred from plastid *rbcL* DNA sequences, extant, and fossil distribution of diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40:236-250.
- Musza, L. L.; Killar, L. M.; Speight, P.; Barrow, C. J.; Gillum, A. M.; Cooper, R. (1995) Minor limonoids from *Trichilia rubra*. *Phytochemistry*, 39:621-624.
- Murray, R. D. H.; Méndez, J.; Brown, S. A. (1982) *The Natural Coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 702p.
- Nakagawa, H.; Duan, H.; Takaishi, Y. (2001) Limonoids from *Citrus sudachi*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49:649-651.
- Nakatani, M.; James, J. C.; Nakanishi, K. (1981) Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the Southern army worm. *Journal of the American Chemical Society*. 103:1228-1230.
- Nascimento, M. C. B. S. (2008) *Constituintes bioorgânicos isolados de Annona cacans Warming (Annonaceae) e avaliação de bioatividade*. Tese (Doutorado em Química) – Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 41p.
- Neves, B. P.; Oliveira, I. P.; Nogueira, J. C. M. (2003) Cultivo e Utilização do Nim Indiano. *EMBRAPA, Circular Técnica*, 62:1-12.
- Nugroho, B. W.; Edrada, R. A.; Gussregen, B.; Gras, V.; Witte, L.; Proksch, P. (1997) Insectidal rocaglamide derivatives from *Aglaya dupprearw*. *Phytochemistry*, 44:1455.

- Okorie, D. A.; Taylor, D. A. H. (1967) The structure of heudelottin, an extractive from *Trichilia heudelottii*. *Chemical Communications*, 2:83-84.
- Okorie, D. A.; Taylor, D. A. H. (1972) Limonoids from *Trichilia heudelottii*. Part II. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1488-1490.
- Oliveira, M. F.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; Segundo, T. A.; Santiago, G. M. P.; Braz-Filho, R. (2002) New enamines derivatives of lapachol and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74:211-221.
- Olugbade, T. A.; Adesanya, S. A. (2000) Prieurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia prieuriana*. *Phytochemistry*, 54:867-870.
- Pai, M. R.; Acharya, L. D.; Udupa, N. (2004) Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel-a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 90:99-103.
- Paradella, T. C.; Koga-Ito, C. Y.; Jorge, A. O. C. (2007) *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*, 36:163-168.
- Parida, M.M.; Upadhyay, C.; Pandya, G.; Jana, A.M. (2002) Inhibitory potential of neem *Ethnopharmacology* 79, 273–278. (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:273–278.
- Patrício, P. C.; Cervi, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, Brasil (2005) *Acta Biológica Paranaense*, 34:27-71.
- Pennington, T. D.; Styles, B. T. (1975) A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea*, 22:419-540.
- Pennington, T. D.; Styles, B. T.; Taylor, D. A. H. (1981) Meliaceae. *Flora Neotropica*, New York, 28:1-470.

- Pereira J.V, Pereira M.S.V, Sampaio F.C, Sampaio M.C.C, Alves P.M, Araújo C.R.F, Higino J.S. (2006). Efeito antimicrobiano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Púnica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16:88-93.
- Pizzolatti, M. G.; Venson, A. F.; Júnior, A. S.; Smânia, E. F. A.; Braz-Filho, R. (2002) Two Epimeric Flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with Antomicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57:483-488.
- Pizzolatti, M. G.; Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Madureira, L. A. S.; Braz-Filho, R. (2004) Minor γ -lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS. *Natural Product Research*, 18:433-438.
- Proksch, P.; Edrada, R.; Ebel, R.; Bohnenstengel, F. I.; Nugroho, B. W. (2001) Chemistry and biological activity of rocaglamide derivatives and related compounds in *Aglaia* species (Meliaceae). *Current Organic Chemistry*, 5:923-938.
- Proksch, P.; Giaisi, M.; Treiber, M. K.; Palfi, K.; Merling, A.; Spring, H.; Krammer, P. H.; Weber, M. L. (2005) Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *Journal of Immunology*, 174:7075-7084.
- Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. (1996) A cycloartane triterpenoid and ω -phenyl alkanolic and alkenolic acids from *Trichilia clausenii*. *Phytochemistry*, 42:795-798.
- Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; F., E. R. (1997) Androstane and pregnane 2 β , 19-hemiketal steroids from *Trichilia clausenii*. *Phytochemistry*, 45:1495-1500.
- Pupo, M. T. (1997) Constituintes Químicos de *Trichilia clausenii* (Meliaceae). Dissertação (Doutor em Ciências) - São Carlos - SP, Universidade Federal de São Carlos –UFSCar.

- Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. (1998) γ -Lactones from *Trichilia claussenii*. *Phytochemistry*, 48:307-310.
- Pupo, M. T.; Adorno, M. A. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Pirani, J. R. (2002) Terpenoids and Steroids from *Trichilia* Species. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 13:382-388.
- Rahman, A.; Ahmad, V. U. (1992) *¹³C-NMR of Natural Products, Monoterpenes and Sesquiterpenes*, Vol. 1, Plenum Press, New York. 1578p.
- Ramírez, M. C.; Toscano, R. A.; Arnason, J.; Omar, S.; Rojas, C. M. C. G.; Mata, R. (2000) Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. *Tetrahedron*, 56:5085-5091.
- Rasooli, I.; Sayegh, S.; Taghzadeh, M.; Astaneh, S. D. (2008) Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytotherapy Research*, 22:1162-1167.
- Rembold, H. (1989) In: Amason, J. T.; Philogene, B.; Morand, P. (eds.), *Insecticides of Plant Origin-ACS Symposium Series 387*, ACS, Washington DC, 150 p.
- Ríos, J. L.; Recio, M. C. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:80-84.
- Rodrigues, V. F. (2009) *Constituintes químicos de Trichilia quadrijuga (Meliaceae)*. Tese (Mestre em Ciências Naturais) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 303 p.
- Rodríguez, H. C. (1995) *Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Dissertação (Doutor em Entomologia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ/USP, 100p.

- Rodríguez, B.; Caballero, C.; Ortego, F.; Castañera, P. (2003) A new tetranortriterpenoid from *Trichilia havanensis*. *Journal Natural Products*, 66:452-454.
- Rodríguez-Hahn, L.; Cárdenas, J.; Arenas, C. (1996) Trichavensin, a priedurianin derivative from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry*, 43:457-459.
- Roel, A. R.; Vendramim, J. D.; Frighetto, R. T. S.; Frighetto, N. (2000) Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantina*, 59:53-58.
- Rojas, R.; Bustamate, B.; Ventosilla, P.; Fernández, I.; Caviedes, L.; Gilman, R. H.; Lock, O.; Hammond, G. B. (2006) Larvicidal, antimicrobacterial and antifungal compounds from bark of the Peruvian Plant *Swartzia polyphylla* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54:278-279.
- Roy, A.; Saraf, S. (2006) Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*, 29:191-201.
- Sahpaz, S.; Boris, C. H.; Loieau, P. M.; Cortes, D; Hacquemiller, R.; Laurens A.; Cavé, A. (1994) Citotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Medica*, 60:538-540.
- Sai Ram, M.; Ilvazhagan, G.; Sharma, S. K.; Dhanraj, S. A.; Suresh, B.; Parida, M. M.; Jana, A. M.; Devendra, K.; Selvamurthy, W. (2000) Antimicrobial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *Journal of Ethnopharmacology*, 71:377-382.
- Saifaha, E.; Suttisria, R.; Shamsuba, S.; Pengsuparpb, T.; Lipipu, V. (1999) Bisamides from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry*, 52:1085-1088.

- Salles, L. R. V. O. (1995) *Evolução de Limonóides em Meliaceae e estudo fitoquímico de Khaya senegalensis (Meliaceae)*. Dissertação (Doutor em Ciências) - São Carlos- SP, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 277 p.
- Schenkel, E. P. (1985). *Saponinas*. In Simões, C.M.O. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, Universidade UFRGS/UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 64p.
- Siddiqui, S.; Mahmood, T.; Siddiqui, B. S.; Faizi, S. (1986) Isolation of a triterpenoid from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, 25:2183-2185.
- Silverstein, R. M. (2007) *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos / Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle; tradução Ricardo Bicca de Alencastro – 7ª Edição*, Rio de Janeiro: LTC, 490 p.
- Simmonds, M. S. J.; Stevenson, P. C.; Porter, E. A.; Veitch, N. C. (2001) Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. *Journal of Natural Products*, 64:1117-1120.
- Sottomayor, M.; Cardoso I.L.; Pereira, L.G.; Barceló, A.R. (2004) Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews*, 3:159-171.
- Souza, A. P.; Vendramim, J. D. (2001) Atividade inseticida de extratos aquosos de Meliáceas sobre a Mosca-branca *Bemisia tabaci* (genn.) biótipo B (Hemíptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*, 30:133-137.
- Souza, A. P. (2004) *Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliaceas sobre Bemisia tabaci (Genn., 1889) biótipo B*. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, 101p.

- Tane, P.; Akam, M. T.; Tsopmo, A.; Ndi, C. P.; Sterner, O. (2004) Two labdane diterpenoids and a seco-tetranortriterpenoid from *Turreanthus africanus*. *Phytochemistry*, 65:3083-3087.
- Tang, W.; Hioki, H.; Harada, K.; Kubo, M.; Fukuyama, Y. (2007) Antioxidant Phenylpropanoid-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Natural Products*, 70:2010–2013.
- Terra, W. S.; Gonçalves, M. S.; Braz-Filho, R.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C. (2010) *Constituintes químicos das folhas de Trichilia lepidota*. Anais da 33^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - RASBQ, QPN-077, Águas de Lindóia-SP.
- Tinto, W. F.; Jagessar, P. K.; Ketwaru, P. (1991) Constituents of *Trichilia schomburgkii*. *Journal of Natural Products*, 54:972-977.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2004). *Microbiologia*. 8^a ed. Porto Alegre: ARTMED, 920p.
- Uehara, C.; Jamnik, S.; Santoro, I.L. (1998) *Câncer de pulmão*. Medicina, Ribeirão Preto, 31: 266-276.
- Veiga, T. A. M.; Vázquez, R. G.; Neto, J. O.; Silva, M. F. G. F.; Díaz, B. K.; Hensen, B. L. (2007) Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as photosystem II inhibitor on spinach thylakoids. *Archives of Biochem. and Biophysics*, 1-6.
- Verotta, L.; Orsini, F.; Tato, M.; El-Sebakhy, N. A.; Toaima, S. M. (1998) A cycloartane triterpene 3 β , 16 β diglucoside from *Astragalus trigonus* and its non natural 6-hydroxy epimer. *Phytochemistry*, 49:845-852.
- Vieira, I. J. C. (1999) *Uma Contribuição a Família Simaroubaceae*. Dissertação (Doutor em Química Orgânica) - São Carlos-SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 318p.

- Vieira-da-Motta, O.; Donatele, D. M.; Oliveira, P. R. de; Folly, M. M. (2000) *Staphylococcus aureus* sensíveis à metilina provenientes de leite mastítico no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 7:123-126.
- Vieira-da-Motta, O.; Folly, M. M.; Sakiyama, H. (2001) Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brasílian Journal Microbiology*, 32:27-31.
- Vilela, J. D. (1977) Mummification and medicine in ancient Egypt. *Revista Paulista de Medicina*, 89, 115.
- Wandscheer, C. B.; Duque, J. E.; Silva, M. A. N.; Fukuyama, Y.; Wohlke, J. L.; Adelman, J.; Fontana, J. D. (2004) Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 44:829-835.
- Wang, K.; Yang, C.; Zhang, Y. (2007) Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food Chemistry*, 101:365-371.
- Wang, X. N.; Fan, C. Q.; Yin, S.; Gan, L. S.; Yue, J. M. (2008) Structural elucidation of limonoids and steroids. *Phytochemistry*, 69:1319-1327.
- Waterman, P. G.; Grundon, M. F. (1983) *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*. *Symposia/Phytochemical Society of Europe*, number 22. London, 464p.
- Wheeler, D. A.; Isman, M. B.; Sanchez-Vindas, P. E.; Arnason, J. T. (2001a) Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29:347-358.

- Wheeler, D. A.; Isman, M. B. (2001b) Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98:9-16.
- Yamasaki, R. B.; Klocke, J. A. (1989) Structure-bioactivity relationships of salanin as na antifeedant against the Colorado potato beetle (*Letinotarsa decemlineata*), *Journal Agriculture Food Chemistry*, 37:1118.
- Zanolari, B.; Guilet, D.; Marston, A.; Queiroz, E. F.; Paulo, M. Q.; Hostettmann, K. (2003) Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*, 66:497-502.
- Zani, C. L.; Chaves, P. P. G.; Queiroz, R.; De Oliveira, A. B.; Cardoso, J. E.; Anjos, A. M. G.; Grandi, T. S. M. (1995) Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti *Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2:47-50.

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](#)