



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DO CAULE DE *MACHAERIUM STIPITATUM*.
VOG.**

Londrina
2011

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DO CAULE DE *MACHAERIUM STIPITATUM*.
VOG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Cornélio Andrei

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A481e	<p>Amador, Ismael Rodrigues. Estudo químico e avaliação da atividade antifúngica do caule de <i>Machaerium stipitatum</i>. VOG./ Ismael Rodrigues Amador. – Londrina, 2011. 139 f.: il.</p> <p>Orientador: César Cornélio Andrei. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011. Inclui bibliografia</p> <p>1. Química orgânica – Teses. 2. Produtos de ação antimicrobiana – Teses. 3. Antígenos de fungos – Teses. 4. <i>Machaerium stipitatum</i> – Teses. I. Andrei, César Cornélio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 547.08</p>
-------	---

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO
CAULE DE *MACHAERIUM STIPITATUM*. VOG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof. Dr César Cornélio Andrei
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a Silvana Maria de Oliveira Santin
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dr^a Terezinha de Jesus Faria
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de agosto de 2011.

AMADOR, Ismael Rodrigues. **Estudo químico e avaliação da atividade antifúngica do caule de *Machaerium stipitatum*. vog.** Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Machaerium stipitatum é relatada como planta medicinal, cuja a casca do caule, conhecida como “xapuiy” pelos índios Kaingáng, é usada em preparações para curar feridas e infecções na boca. O estudo químico do extrato de acetato de etila (AcOEt) do caule de *M. stipitatum* resultou no isolamento de oito constituintes sendo quatro triterpenos (lupeol, acetato de lupeol, lupenona e acetato do ácido oleanóico), três fitoesteroides (β -sitosterol, acetato de β -sitosterol e sitostenona) e um pterocarpano (medicarpina). O isolamento dos constituintes foi feito através de métodos cromatográficos de adsorção em coluna e placa com sílica gel (fase normal). A determinação estrutural das substâncias foi feita com base na análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (uni e bidimensionais), de infravermelho e espectrometria de massas. A avaliação da atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos *Alternaria* sp e *Botryosphaeria ribis* indicou resultado significativa de inibição de crescimento para o extrato aquoso, enquanto que os extratos e frações de solventes orgânicos não inibiram o crescimento dos micro organismos testados. O estudo da espécie mostrou sua relevância pelo fato da planta ainda não ter sido estudada quimicamente e por haver poucos relatos da presença de triterpenos e fitoesteróis no gênero, sendo os estilbenos e flavonóides apontados na literatura como principais constituintes isolados nas quatorze espécies até aqui estudadas.

Palavras-chave: *Machaerium*. *Machaerium stipitatum*. Fitoesteróis. Triperpenos. Fungos filamentosos. Cromatografia.

AMADOR, Ismael Rodrigues. **Estudo químico e avaliação da atividade antifúngica do caule de *Machaerium stipitatum*. vog.** Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Machaerium stipitatum is reported as a medicinal plant, whose stem bark, known as "xapuiy" Kaingáng by the indians, is used in preparations to heal wounds and infections in the mouth. The chemical study of the ethyl acetate extract (EtOAc) of the stem of *M. stipitatum* resulted in the isolation of eight constituents and four triterpenes (lupeol, lupeol acetate, and acetate lupenona oleanolic acid), three phytosteroid (β -sitosterol, acetate β -sitosterol and sitostenone) and a Pterocarpan (medicarpin). The isolation of the constituents was done by chromatographic adsorption column and plate with silica gel (normal phase). The structural determination of the substances was based on the analysis of nuclear magnetic resonance spectra of hydrogen and carbon (and uni-dimensional), infrared and mass spectrometry. The antimicrobial activity against filamentous fungi *Alternaria* sp and *Botryosphaeria ribis* results indicated significant inhibition of growth for the aqueous extract, while the extracts and fractions of organic solvents did not inhibit the growth of microorganism tested. The study of the species showed its relevance because the plant has not been studied chemically and because there are few reports of the presence of triterpenes and phytosterols in the genre, and stilbenes and flavonoids found in the literature as major constituents isolated fourteen species studied so far.

Keywords: *Machaerium*. *Machaerium stipitatum*. Phytosterols. Triterpenes. Filamentous fungi. Chromatography.

DEDICO

A todas as pessoas que fazem parte da minha
vida, por elas me mostrarem que temos que
participar e lutar, por que no final
sempre vale a pena.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha amável mamãe, pois acredito que sem ela as coisas seriam mais difíceis, também aos meus irmãos, por sempre me apoiarem.

Ao meu orientado Dr César Cornélio Andrei, ou simplesmente “César”, pelo conhecimento passado, pela dedicação dispensada e principalmente por mostra que sempre podemos um pouco mais, pois são estas pessoas que contribuem verdadeiramente na nossa formação.

A professora Doutora Maria Inés Rezende, pela orientação nos ensaios biológicos, sempre disposta e atenciosa.

Ao Jurandir Pereira Pinto, ou simplesmente “Didi”, um parceiro de toda hora e um amigo para vida toda, lhe devo muito.

Aos meus parceiros de laboratório, foram bons momentos passado juntos, fico grato pela parceria, pela ajuda, pelos concelhos e pela complacência.

Ao Manoel R. C. Paiva pela coleta e identificação da planta, sem ele não haveria esse trabalho.

A Ivânia T. A. Schuquel da UEM pela obtenção dos espectros de RMN, também pelas valosas dicas que nos foi dadas.

A Regina Braga e o Anderson Perira do Nascimento da secretaria de Pós-graduação, são pessoas fantásticas e muito prestativas.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado, pois muitas das vezes temos muita ajuda que não nos é evidenciada, então a vocês, obrigado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Fotografia da espécie <i>Machaerium stipitatum</i>	22
Figura 02 – Quatro exemplos de estilbenos, (01) machaeriol C (02) machaeridiol A citado por Muhammad et al. (2003), (03) machaeriol A e (04) machaerial B citado por Muhammad et al. (2001)	26
Figura 03 – Quatro exemplos de isoflavonóides reportados por Kurosawa et al. (01) vestitol e (04) vesticarpan (1978b), (02) mucronulatol e (03) mucroquinona (1978b)	26
Figura 04 – Quatro exemplos de neoflavonóides, (02) dalbergiona por Yoshimoto et al. (1975), (01) (kuhlmannin, dalbergiona, (03) Kuhlmanniquinol, (04) kuhlmannene por Ollis et al. (1968b)	27
Figura 05 – Quatro exemplos de cinamilfenóis, (02) petrostireno por Ollis (1978b), (03) mucronustirena e (04) mucronulastirena(01) macharistol por Kurosawa et al. (1978a, 1978b).....	27
Figura 06 – Condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato na formação do esqualeno precursor biossintético dos triterpenos e esteroides	29
Figura 07 – Ciclização do esqualeno através de intermediário 2,3-epoxi formando o carbocátion protosterila, deste gerando o lanosterol e o cicloartenol.....	30
Figura 08 – Ciclização do cátion damarila (tetra cíclico) formando o lupeol (lupânico) e a β -amirina (Oleânico).....	31
Figura 09 – Modificação de um triterpeno com sistemas tetracíclicos perdendo uma metila na posição 14 (I) e duas metilas na posição 4 (II) para formar fitoesteróides	32
Figura 10 – Etapas de inclusão de carbonos via S-adenisilmetionina, isomerização alílica e dehidrogenação	33
Figura 11 – Estrutura da lupenona (MSI-01).....	52
Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01).....	53

Figura 13 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01) em (A) 14,0 a 31,0 ppm, (B) 31,0 a 60,0 ppm e (C) 100,0 a 220,0 ppm	54
Figura 14 – Espectro de DEPT 90 e 135 da lupenona (MSI-01).....	55
Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01).....	56
Figura 16 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01) em (A) 0,78 a 1,74 ppm e (B) 4,35 a 4,85 ppm.....	57
Figura 17 – Cromatograma do CG (A) e espectro de massas (B) da lupenona (MSI-01)	58
Figura 18 – Proposta de fragmentação da Lupenona (MSI-01).....	59
Figura 19 – Espectro no infravermelho da lupenona (MSI-01).....	60
Figura 20 – Estrutura do acetato de β -sitosterol (MSI-03)	63
Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)	65
Figura 22 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 12,0 a 22,0 ppm e (B) 23,0 a 33,0 ppm (MSI-03).....	66
Figura 23 Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 34,0 a 44,0 ppm e (B) 44,0 a 58,0 ppm (MSI-03).....	67
Figura 24 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 73,0 a 83,0 ppm e (B) 108,0 a 152,0 ppm (MSI-03).....	68
Figura 25 – Ampliação do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em 168, a 205,0 ppm	69
Figura 26 – Espectro no infravermelho da mistura de acetato β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03).....	70
Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03).....	71

Figura 28 – Ampliações do RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 0,60 a 2,10 ppm e (B) 4,40 a 5,60 ppm	72
Figura 29 – Cromatograma do CG (A) e espectro de massas (B) da mistura de acetato de β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03).....	73
Figura 30 – Estrutura do acetato de lupeol (MSI-03)	64
Figura 31 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 11,5 a 22,0 ppm.....	74
Figura 32 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 22,5 a 32,0 ppm.....	75
Figura 33 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 32,5 a 42,0 ppm.....	76
Figura 34 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 45,0 a 57,5 ppm.....	77
Figura 35 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 65,0 a 89,0 ppm.....	78
Figura 36 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 105,0 a 155,0 ppm.....	79
Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido travez da reação de acetilação	80
Figura 38 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido travez da reação de acetilação em (A) 0,78 a 2,60 ppm e (B) 4,40 a 5,4 ppm	81
Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido através da reação de acetilação	82
Figura 40 – Estrutura do lupeol (MSI-08).....	86

Figura 41 – Espectrometria de massas do lupeol (MSI-08), (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação e (C) sugestão da biblioteca do massas	87
Figura 42 – Ampliações do RMN de ¹³ C (CDCl ₃ ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 14,5 a 26,0 ppm e (B) 27,0 a 36,0 ppm.....	88
Figura 43 – Ampliações do RMN de ¹³ C (CDCl ₃ ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 37,0 a 56,0 ppm e (B) 75,0 a 155,0 ppm (MSI-08).....	89
Figura 44 – Espectro de DEPT 90 e 135 do lupeol (MSI-08).....	90
Figura 45 – Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 300 MHz) do lupeol (MSI-8).....	91
Figura 46 – Ampliações do RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 0,76 a 1,76 ppm e (B) 2,26 a 3,34 ppm.....	92
Figura 47 – Ampliação do RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em 4,34 a 5,20 ppm	93
Figura 48 – Espectro no infravermelho do lupeol (MSI-08).....	94
Figura 49 – Estrutura do β --sitosterol (MSI-11).....	96
Figura 50 – Espectrometria de massas do □-sitosterol (MSI-11), (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação e (C) sugestão da biblioteca do massas	97
Figura 51 – Espectro no infravermelho do β -sitosterol (MSI-11).....	98
Figura 52 – Estrutura da sitostenona (estigmast-4-en-3-ona) (MSI-16).....	100
Figura 53 – Espectrometria de massas da sitostenona, (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação (C) sugestão da biblioteca do massas	101
Figura 54 – Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ ; 300 MHz) da sitostenona (MSI-16).....	102
Figura 55 – Ampliações do RMN de ¹³ C (CDCl ₃ ; 300 MHz) da sitostenona (MSI-16) em (A) 10,0 a 27,0 ppm, (B) 27,0 a 59,0 ppm e (C) 120,0 a 210,0 ppm	103
Figura 56 – Espectro de DEPT 90 e 135 do sitostenona (estigmast-4-en-3-ona) (MSI-16).....	104
Figura 57 – Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 300 MHz) da sitostenona (MSI-16).....	105
Figura 58 – Ampliações do RMN de ¹ H (CDCl ₃ ; 300 MHz) da sitostenona (MSI-16) em (A) 0,69 a 1,27 ppm e (B) 5,40 a 5,98 ppm.....	106

Figura 59 – Apliação do espectro de HSQC da sitostenona (MSI-16) em 0,60 a 1,20 ppm por 10,0 a 21,0 ppm	107
Figura 60 – Estrutura do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)	110
Figura 61 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)	111
Figura 62 – Apliações do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17) em (A) 15,0 a 35,0 ppm, (B) 35,0 a 60 ppm e (C) 80,0 a 200,0 ppm	112
Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)	113
Figura 64 – Espectro de DEPT 90 e 135 do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17).....	114
Figura 65 – Espectro no infravermelho do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17).....	115
Figura 66 – Espectro de HSQC do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)	116
Figura 67 – Espectro de HMBC do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)	117
Figura 68 – Espectro de COSY do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17).....	118
Figura 69 – Estrutura do medicarpina (MSI-18)	122
Figura 70 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18).....	123
Figura 71 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18) em (A) 3,40 a 4,40 ppm e (B) 5,00 a 6,00 ppm.....	124
Figura 72 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18) em 6,36 a 7,76 ppm.....	125
Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18).....	126
Figura 74 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18) em (A) 25,0 a 69,0 ppm e (B) 78,0 a 166,0 ppm.....	127
Figura 75 – Espectro de DEPT da medicarpina (MSI-18).....	128
Figura 76 – Estrutura parcial da medicarpina	121
Figura 77 – Estrutura parcial da medicarpina	122
Figura 78 – Espectro de HMBC da medicarpina (MSI-18).....	129
Figura 79 – Espectro de NOEDIF da medicarpina (MSI-18).....	130

- Figura 80** – Foto do ensaio com o fungo filamentososo *Alternaria* em extrato aquoso, sendo (A) Quaduplicata do extrato na concentração 2,0 mg/placa, (B) Quaduplicata do extrato na concentração 3,0 mg/placa, (C) Quaduplicata do extrato na concentração 4,0 mg/placa, (D) Duplicata do controle positivos (sem extrato) e (E) Controle negativo com o antifúngico captan (0,18%).....132
- Figura 81** – Foto do ensaio com o fungo filamentososo *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 2 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)133
- Figura 82** – Foto do ensaio com o fungo filamentososo *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 3,0 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)134
- Figura 83** – Foto do ensaio com o fungo filamentososo *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 4,0 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)134

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 01 – Rota esquemática de isolamento da MSI-03	43
Fluxograma 02 – Rota esquemática de isolamento da MSI-01	44
Fluxograma 03 – Rota esquemática de isolamento da MSI-08	45
Fluxograma 04 – Rota esquemática de isolamento da MSI-11	46
Fluxograma 05 – Rota esquemática de isolamento da MSI-16	47
Fluxograma 06 – Rota esquemática de isolamento da MSI-17	47
Fluxograma 07 – Rota esquemática de isolamento da MSI-18	48
Fluxograma 08 – Esquema de inoculação do ensaio antimicrobiano com fungos filamentosos em extratos de diferentes solventes da <i>M. stipitatum</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Levantamento bibliográfico no Chemical Abstracts (SciFinder Scholar) das espécies estudadas do gênero <i>Machaerium</i> descrevendo classes e constituintes isolados	23
Tabela 02 – Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento primário do extrato de AcOEt de <i>M. stipitatum</i>	41
Tabela 03 – Série eluotrópica em polaridade crescente, intervalo das frações retiradas para cada eluente e agrupamento e massa das frações da fração Ac2 (Hexano-AcOEt 10%).....	42
Tabela 04 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona isolada da <i>M. stipitatum</i> e da lupenona (CDCl_3 ; 75 MHz) relatada no trabalho de Luz et al. (2010).....	61
Tabela 05 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato β -sitosterol do isolado da <i>M. stipitatum</i> e do acetato de β -sitosterol (CDCl_3 ; 100 MHz) relatado por Kovganko et al. (1999).....	83
Tabela 06 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato do lupeol isolado da <i>M. stipitatum</i> , do acetato de lupeol da reação de acetilação e do relatado (CDCl_3 ; 200 MHz) por Sobrinho et al. (1991)	84
Tabela 07 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol isolada da <i>M. stipitatum</i> e do lupeol relatado (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Fotie et al. (2006).....	95
Tabela 08 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitostenona isolada da <i>M. stipitatum</i> e da sitostenona relatada (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Prachayasittikul et al. (2009)	108
Tabela 09 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz), COSY e HMBC do ácido 3-O-acetiloleanólico isolada da <i>M. stipitatum</i>	119
Tabela 10 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-O-acetiloleanólico isolada da <i>M. stipitatum</i> e do 3-O-acetiloleanólico relatado (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Kwon et al. (2008).....	120

Tabela 11 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina isolada da <i>M. stipitatum</i> e da medicarpina relatada (CD_3OD ; 150 MHz) no trabalho de Piccinelli et al. (2005).....	131
Tabela 12 – Valores da taxa de inibição contra fungos filamentosos para as frações e os extratos de <i>M. stipitatum</i> em solventes orgânicos, alcoólico e aquoso nas concentrações 2,0, 3,0 e 4,0 mg/placa para os fungos filamentosos <i>Alternaria</i> sp e <i>B. ribis</i>	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac1	Fração em Hexano 100%
Ac2	Fração em Hexano/acetado de etila 10%
Ac3	Fração em Hexano/acetado de etila 50%
Ac4	Fração em acetado de etila 100%
Ac5	Fração em acetado de etila/metanol 2%
Ac6	Fração em acetado de etila/metanol 5%
Ac7	Fração em acetado de etila/metanol 10%
Ac8	Fração em metanol 100%
AcOEt	Acetato de etila
<i>B. ribis</i>	<i>Botryosphaeria ribis</i>
BDA	Batata dextrose ágar
C/MeOH	Dicloro metano/metanol
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia a gás
CG/EM	Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
FPP	Farnesilpírofosfato
FUEL	Fundação Universidade Estadual de Londrina
H/A	Hexano/Acetato de etila
H/C	Hexano/dicloro metano
Hex	Hexano
HHDBP's	Hexaidrodibenzopiranos
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
<i>M. acutifolium</i>	<i>Machaerium acutifolium</i>
<i>M. aristulatum</i>	<i>Machaerium aristulatum</i>

<i>M. floribundum</i>	<i>Machaerium floribundum</i>
<i>M. incorruptibile</i>	<i>Machaerium incorruptibile</i>
<i>M. kuhlmannii</i>	<i>Machaerium kuhlmannii</i>
<i>M. mucronulatum</i>	<i>Machaerium mucronulatum</i>
<i>M. multiflorum</i>	<i>Machaerium multiflorum</i>
<i>M. nictitans</i>	<i>Machaerium nictitans</i>
<i>M. opacum</i>	<i>Machaerium opacum</i>
<i>M. pedicellatum</i>	<i>Machaerium pedicellatum</i>
<i>M. scleroxylon</i>	<i>Machaerium scleroxylon</i>
<i>M. sp.</i>	<i>Machaerium sp.</i>
<i>M. stipitatum</i>	<i>Machaerium stipitatum</i>
<i>M. vestitum</i>	<i>Machaerium vestitum</i>
<i>M. villosum</i>	<i>Machaerium villosum</i>
<i>m/z</i>	Massa/carga
MeOH	Metanol
N.D.	Não detectado
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOEDIF	Nuclear Overhauser Effect Difference
OPP	diphosphate
P. A.	Padrão analítico
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
t	Tripleto
UEL	Universidade Estadual de Londrina
δ_C	Deslocamento químico de carbono
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	MATERIAIS	39
3.1.1.	Material botânico	39
3.1.2	Reagentes, Solventes e Micro-Organismos	39
3.1.3	Equipamentos	40
3.2	MÉTODOS	40
3.2.1	Extração	40
3.2.2	Fracionamento do Extrato	41
3.2.3	Isolamento e Purificação dos Constituintes.....	41
3.2.3.1	Elaboração da fração Ac2 (Hexano-AcoEt 10%)	41
3.2.3.2	Frações (126 – 135)	43
3.2.3.3	Frações (136 – 149)	44
3.2.3.4	Frações (167 – 195)	45
3.2.3.5	Frações (225 – 260)	45
3.2.3.6	Frações (261 – 300)	46
3.2.3.7	Frações (323 –380)	47
3.2.3.8	Frações (421 – 440)	48
3.2.4	Ensaio de Atividade Contra Fungos Filamentosos.....	48
3.2.5	Condições para Cromatografia Gasosa	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	50
4.1.1	Lupenona (MSI-01)	51
4.1.2	Mistura de Acetato de β -sitosterol e Acetato de Lupeol (MSI-03)	62
4.1.3	Lupeol (MSI-08).....	85
4.1.4	β -sitosterol (MSI-11).....	96

4.1.5	Sitostenona (MSI-16)	99
4.1.6	Ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17).....	109
4.1.7	Medicarpina (MSI-18).....	121
4.2	ENSAIO ANTIMICROBIANO CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS	131
4.2.1	<i>Alternaria</i> sp	132
4.2.2	<i>Botryosphaeria ribis</i>	132
5	CONCLUSÕES	136
	REFERÊNCIAS	137

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas na cura dos males dos homens vem desde os primórdios da civilização, junto a essa utilização veio a necessidade em saber qual característica da planta é o responsável por essa cura, dessa forma, os homens procuram estabelecer um elo entre a ação de curar que a planta possui e essa característica. Nesse sentido, muitas abordagens já foram feitas para tentar identificar esse elo, sendo abandonadas e retomadas de tempos em tempos. A “doutrina das assinaturas” que Paracelso (considerado o pai de medicina) utilizou como justificativa em suas medicações é um exemplo disso.

Atualmente as plantas continuam sendo utilizadas, mas hoje se procura fundamentos químicos para estabelecer esse elo. Entende-se que a ação que as plantas medicinais possuem é fruto dos metabólitos que elas produzem para o seu desenvolvimento e sua manutenção.

Nesse aspecto Simões et al. (2004) argumenta que as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Também é apontado por Cechinel Filho e Yunes (1998) que nos últimos anos verificaram grandes avanços científicos envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas.

Sendo a cromatografia uma técnica muito importante para a análise de materiais com variadas estruturas e propriedades físicas, como foi reportado por Ciola (1998), ela é largamente utilizada no isolamento e purificação desses fármacos. Tendo os métodos físicos de análises como a espectrometria de massas, a espectroscopia no ultravioleta, no visível e no infravermelho e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13, na determinação de suas estruturas.

Como sugerem Cechinel Filho e Yunes (1998), para procurar por substâncias bioativas em plantas, devem ser observadas as informações da medicina popular, uma vez que aproximadamente 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo essas recomendações. Além disso, como é observado por Hostettmann et al. (2003), em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma forma quanto

ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos.

No aspecto da medicina popular, Medeiros (2000) relata a *Machaerium stipitatum* como planta medicinal, pelo fato da casca do caule, conhecida como “xapuiy” pelos índios Kaingáng, ser preparado um remédio usado para curar feridas e infecções na boca conhecidas como candidíase, mas não há relatos na literatura quanto ao seu estudo químico.

A espécie *M. stipitatum* segundo Lorenzi (2002), pertence à família Leguminosea (Fabaceae) que compreende cerca de 400 gêneros e 12.000 espécies. O gênero *Machaerium*, segundo Sartori e Tozzi (1998), é um dos maiores gêneros arbóreos tropicais de leguminosas, com cerca de 130 espécies, distribuídas do México à Argentina e um representante ocorrendo na costa oeste africana. No Brasil observa-se o maior número de espécies, que variam de árvores a arbustos.

Também conhecida como sapuvinha, sapuva, sapuvuçu, pau-de-malho, jacarandá-roxo e canela-do-brejo, a *M. stipitatum* é descrita por Lorenzi (2002) como uma árvore de porte alto (10 a 20 m de altura), com tronco de 40 a 50 cm de diâmetro, folhas compostas e frutos do tipo vagem. Sua copa apresenta-se de forma piramidal com ramos pendentes, florescendo de fevereiro a abril. A maturação dos frutos verifica-se nos meses de setembro a outubro. A planta ocorre principalmente em formações secundárias nas regiões sul e sudeste do Brasil, sendo menos frequente no interior das florestas primárias densas. Apresenta nítida preferência por solos férteis, tanto os situados em baixadas úmidas como em terrenos pedregosos.

Sua madeira é moderadamente pesada e resistente, sendo largamente utilizada em construção civil. Apesar do porte arbóreo é considerada ornamental, pois suas flores pequenas e de coloração creme se encontram em densas inflorescências nas extremidades dos ramos com folhas, como pode ser visto na Figura 01, proporcionando belo efeito conforme é apontado por Marchiori (1997) e Lorenzi (2002). Este último indica sua utilização no plantio misto em áreas degradadas de preservação permanente.

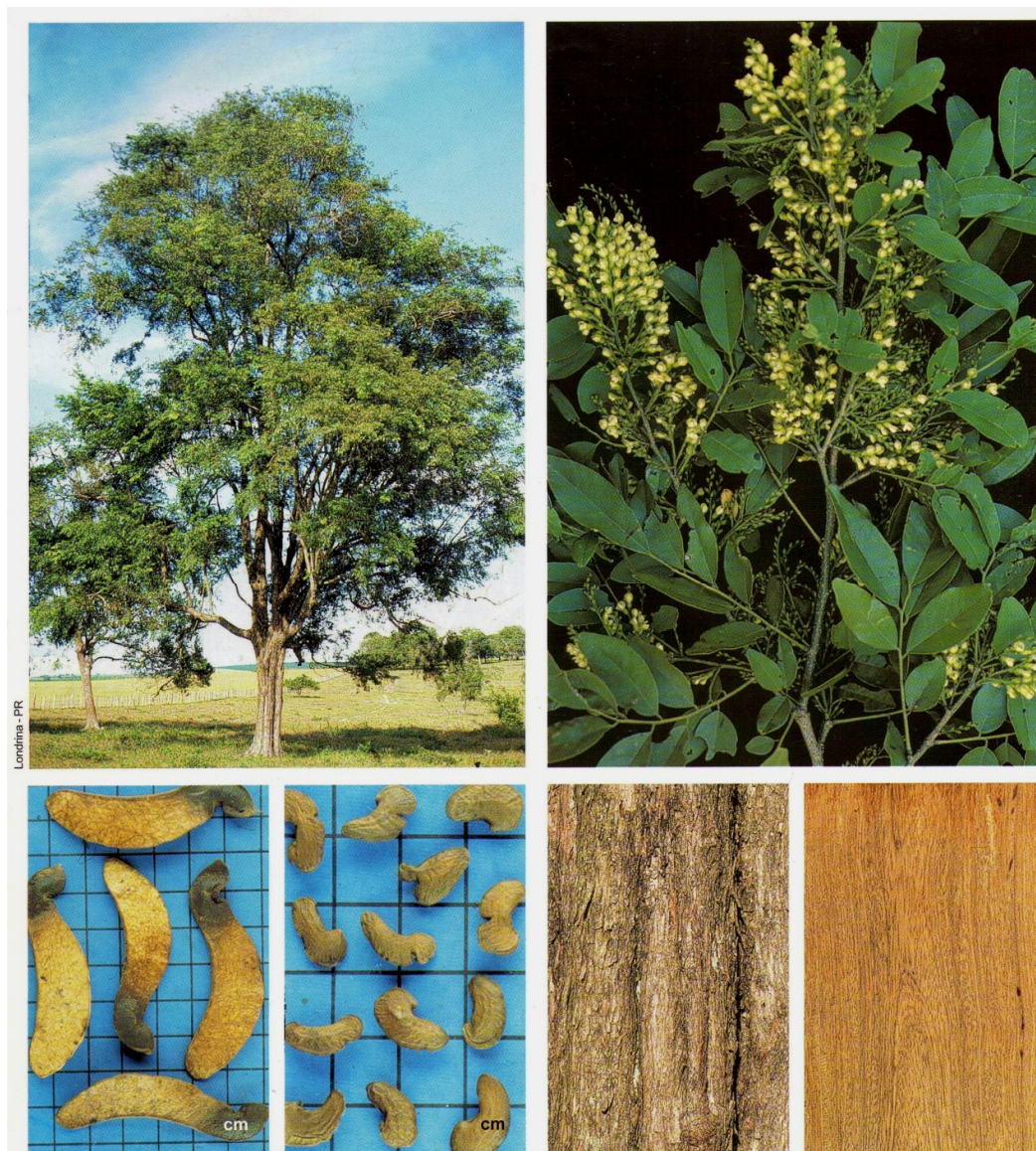


Figura 01 – Fotografia da espécie *Machaerium stipitatum*

Em uma busca na literatura (SciFinder Scholar) com a palavra chave “*Machaerium*” foram encontrados estudos químicos para 14 espécies, estes foram apresentados na Tabela 01 mostrando suas principais classes e constituintes químicos observados nesse gênero.

Tabela 01 – Levantamento bibliográfico no Chemical Abstracts (SciFinder Scholar) das espécies estudadas do gênero *Machaerium* descrevendo classes e constituintes isolados

Espécie	Classes e Constituintes Isolados	Ref.
<i>M. acutifolium</i>	Pinosilvina, medicarpina e o cinamilfenol petrostireno.	01
	Duartina, mucronulatol, vestitol (isoflavanas).	02
<i>M. aristulatum</i>	Cinamilfenol e pterocarpano como constituintes citotóxicos.	03
	Isoflavonas: formonetina e calicosina.	04
<i>M. floribundum</i>	Procianidina.	05
<i>M. incorruptibile</i>	Triterpenóides isolados da seiva da árvore.	06
	Triterpenóides isolados da seiva da árvore.	07
<i>M. kuhlmannii</i>	Neoflavonóides: kuhlmanniquinol, kuhlmanneno, kuhlmannina, dalbergiona, dalbergiquinol, dalbergina, isoflavonóides, diidrocinamato e fenóis.	08
	Kuhlmannina, kuhlmanniquinol e kuhlmanneno.	09
	Neoflavonóide kuhlmannistireno.	10
<i>M. mucronulatum</i>	Isoflavonóides: duartina, mucronulatol, mucroquinona e mucrocarpana.	11
	Chalconas, neoflavonóides e os cinamilfenóis mucronustireno e mucronulastireno.	12
	Neoflavonóides mucronustireno, mucronulastireno e villostireno.	10
	Duartina, mucronulatol, vestitol (isoflavanas) e mucroquinona (isoflavanquinona).	02
<i>M. multiflorum</i>	Hexaidrodibenzopiranos (HHDBP's): machaeriol C, machaeriol D, machaeridiol A, machaeridiol B e machaeridiol C, com atividades antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , antiparasitária contra <i>Plasmidium falsiparum</i> e <i>Leishmania donovani</i> e antifúngica contra <i>Candida albicans</i> .	13
	Hexaidrodibenzopiranos (HHDBP's): machaeriol A e machaeriol B e sesquiterpeno.	14

Espécie	Classes e Constituintes Isolados	Ref.
<i>M. nictitans</i>	Neoflavonóides: kuhlmanniquinol, kuhlmanneno, kuhlmannina, dalbergiona e dalbergiquinol.	08
	Kuhlmannina, kuhlmanniquinol e kuhlmanneno.	09
<i>M. opacum</i>	Dimetoxifenol, pinosilvina, duartina e mucronulatol.	15
	Duartina, mucronulatol, vestitol (isoflavanas).	02
	Duartina, isoflavona do interior da madeira.	16
<i>M. pedicellatum</i>	Constituintes isolados do extrato metanólico do interior da madeira. Dalbergiona, dalbergiona quinol, dalbergina e kuhlmannina. Isoflavanas: machaerol-A, machaerol-B e machaerol-C.	17
<i>M. scleroxylon</i>	Dalbergiona, quinol, hentriacontano e kuhlmanneno isolados do extrato hexânico do interior da madeira.	18
	Proposta de que dalbergionas, dalberginas e benzofenonas estão relacionados com os neoflavonóides.	19
	Dalberginas, β -sitosterol, triterpeno, dalbergiona, hidroquinona e, provavelmente, benzofenona.	20
<i>M. sp.</i>	Ocorrência de dalbergionas, dalbergiquinóis, arilcumarinas e neoflavonas.	21
	Neoflavonóides isolados do extrato metanólico do interior da madeira da planta: benzoquinona e duas isoflavanas.	22
	Pterocarpanos, neoflavonóides e isoflavonas.	23
	Isoflavanas, isoflavanquinonas.	24
	Flavonóides, antraquinonas e triterpenóides.	25
	β -sitosterol, formonetina, daidzeina, pterocarpina, isoliquiritigenina e vestitol.	26
	3-aril-4-hidroxycumarinas, sterocarpanas, isoflavanas, neoflavonóides e cinamilfenóis.	27
	Neoflavonóide petrostireno.	10
	Dalbergionas isolados do interior da madeira e da seiva.	28

Espécie	Classes e Constituintes Isolados	Ref.
<i>M. vestitum</i>	Isoflavonóides isolados do caule: vestitol, vesticarpano, formonetina, medicarpina e mucronulatol e aldeído acetiloleanólico.	29
	Duartina, mucronulatol, vestitol (isoflavanos).	02
<i>M. villosum</i>	Isoflavonóides: duartina, mucronulatol, mucroquinona e mucrocarpana.	11
	Isoflavonóides e o cinamilfenol villostireno.	12
	Terpenóides isolados do extrato da madeira.	30
	Isoflavonas, chalconas e flavanona isolados do extrato etanólico do interior da madeira.	31
	Pterocarpano, estireno, isoflavona isolados da madeira.	32
	Neoflavonóide mucronulastireno e villostireno.	10
	Duartina, mucronulatol, vestitol (isoflavanos).	02

Nota: As referências (somente o abstract) contidas nessa tabela se encontram ao final da introdução.

Os dados da Tabela 01 identificam 4 classes principais de produtos naturais, estilbenos, isoflavonóides, neoflavonóides e cinamilfenóis. Algumas estruturas representativas podem ser observadas nas Figuras 02, 03, 04 e 05.

Estilbenos:

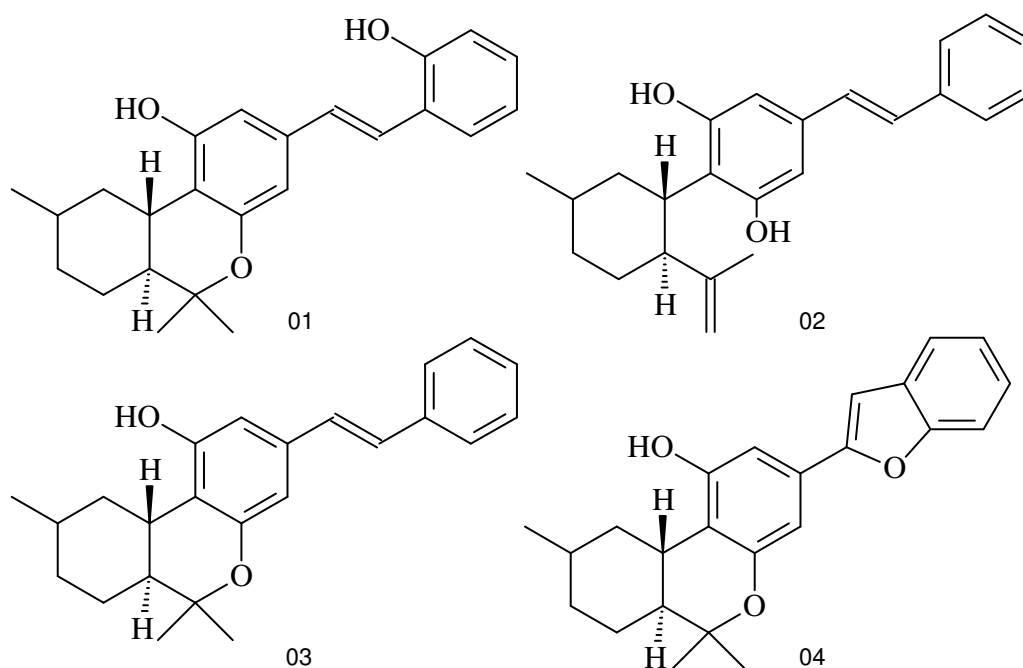


Figura 02 – Quatro exemplos de estilbenos, (01) machaeriol C (02) machaeridiol A citado por Muhammad et al. (2003), (03) machaeriol A e (04) machaerial B citado por Muhammad et al. (2001)

Isoflavonóides:

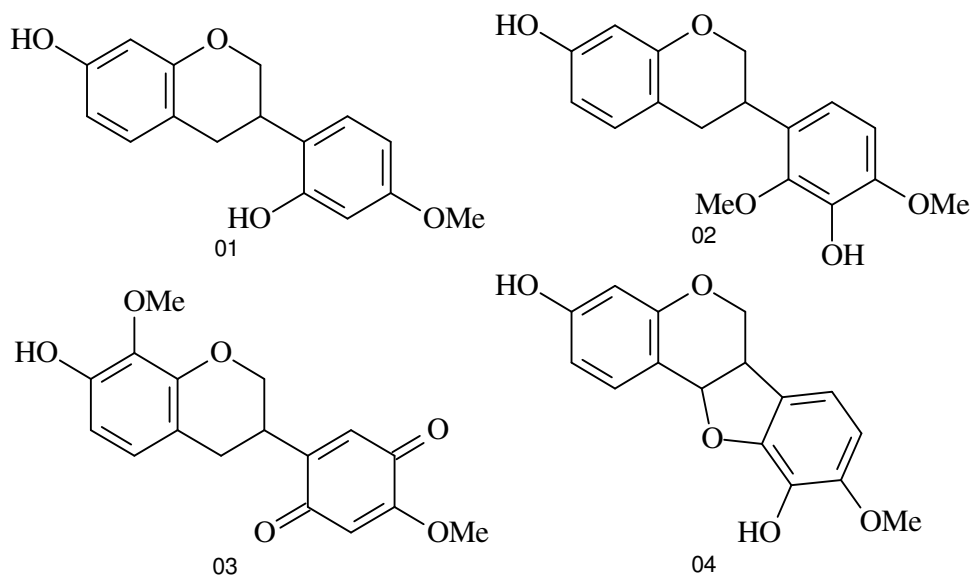


Figura 03 – Quatro exemplos de isoflavonóides reportados por Kurosawa et al. (01) vestitol e (04) vesticarpan (1978b), (02) mucronulatol e (03) mucroquinona (1978b)

Neoflavonóides:

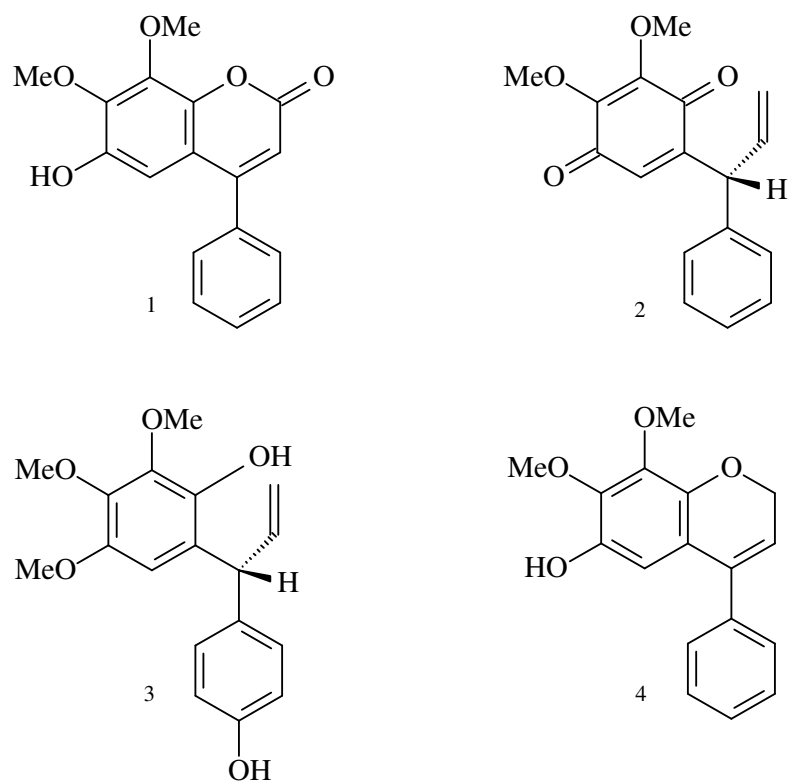


Figura 04 – Quatro exemplos de neoflavonóides, (02) dalbergiona por Yoshimoto et al. (1975), (01) (kuhlmannin, dalbergiona, (03) Kuhlmanniquinol, (04) kuhlmannene por Ollis et al. (1968b)

Cinamilfenóis:

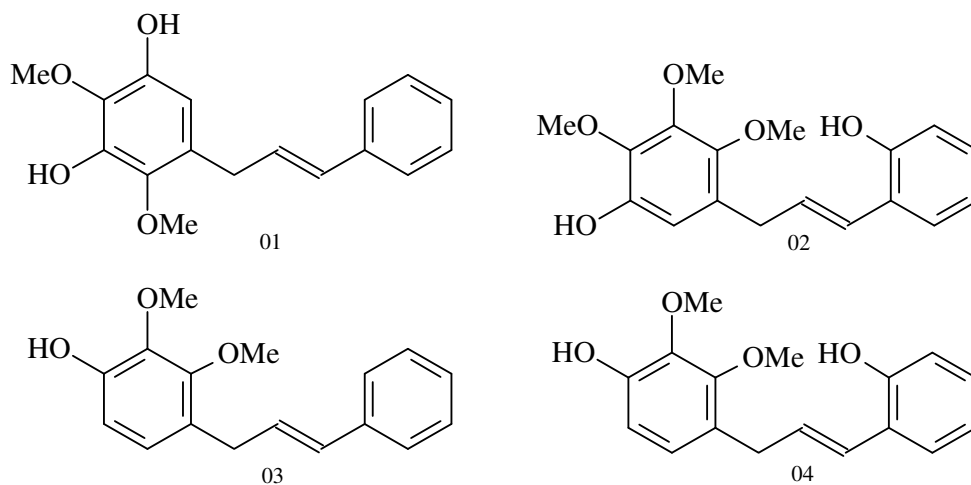


Figura 05 – Quatro exemplos de cinamilfenóis, (02) petrostireno por Ollis (1978b), (03) mucronustirena e (04) mucronulastirena(01) macharistol por Kurosawa et al. (1978a, 1978b)

No levantamento do gênero *Machaerium*, chama a atenção o fato dos fitoesteroides e triterpenos aparecer apenas na *M. incorruptibile*, na *M. scleroxylon*, na *M. sp.* e na *M. villosum* (Tabela 01), já que se trata de duas classes de substâncias relativamente comuns em plantas. Os fitoesteróis e os triterpenos são importantes componentes estruturais das membranas das plantas, e fitoesteróis livres servem para estabilizar as bicamadas de fosfolipídeos nas membranas celulares nos vegetais como foi reportado por Dewick (2002, p. 237). Além disso, Gupta (2011) traz que o β -sitosterol foi promissor em testes antidiabéticos, e também seu efeito antioxidante pode ser considerado em estudos clínicos para desenvolvimento de novas drogas. Nos triterpenos há relatos de atividades biológicas como de Oliveira (1971) na proteção contra infestação de *Schistosoma mansoni*.

Diversos constituintes dessas duas classes foram isoladas da *M. stipitatum*, por esta razão a biossíntese esquemática dos mesmos é reportada na sequência de forma resumida da apresentada por Dewick (2002, p. 212-225). Onde a condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato resulta na formação do esqualeno (Figura 06) e este é o precursor biossintético dos triterpenos e esteróides.

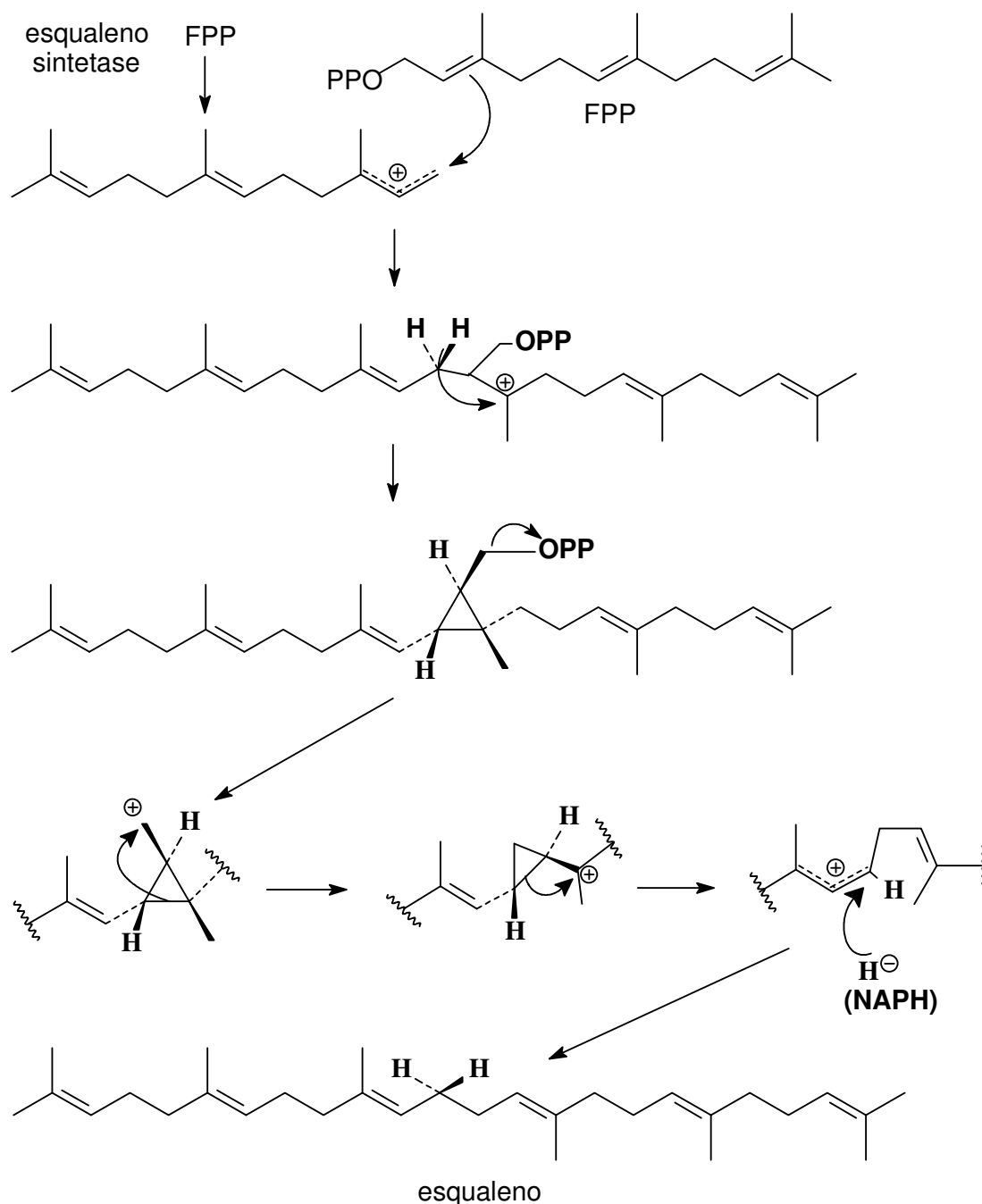


Figura 06 – Condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato na formação do esqualeno precursor biossintético dos triterpenos e esteróides
Fonte: Dewick (2002)

A ciclização do esqualeno através de intermediário 2,3-epoxi (Figura 07) fornece o carbocátion terciário protosterila. Este cátion após vários rearranjos do tipo Wagner-Meerwein (1,2) pode resultar no lanosterol, precursor de esteróides em animais e fungos, ou cicloartenol, precursor de fitoesteróis.

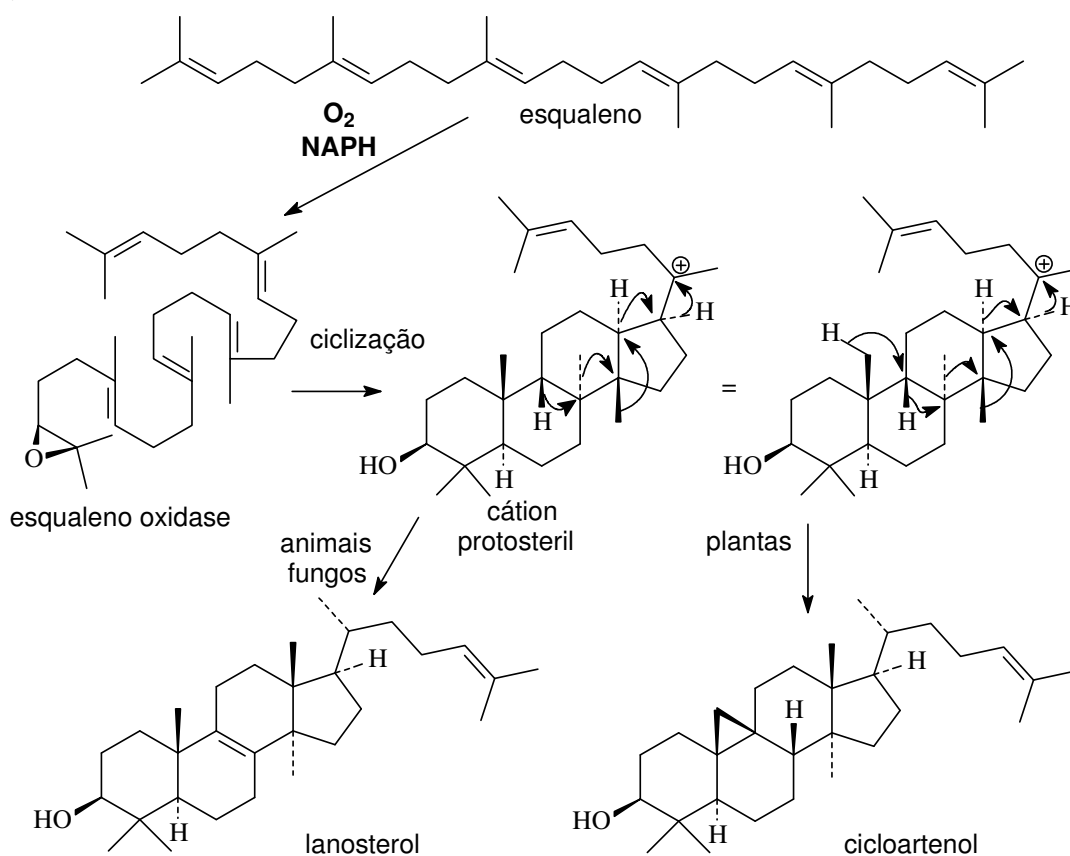


Figura 07 – Ciclização do esqualeno através de intermediário 2,3-epoxi formando o carbocátion protosterila, deste gerando o lanosterol e o cicloartenol

Fonte: Dewick (2002)

Em outro tipo de conformação do esqualeno (cadeira-cadeira-cadeira-barco) para a ciclização, mas seguindo idêntico mecanismo como na formação do cátion protosterila, porem é obtido o cátion damarila e este origina dentre outros, os esqueletos lupânico e oleânico (Figura 08). Este mecanismo foi observado na biossíntese do lupeol em *Lupinus luteus* da família Leguminosae (Fabaceae).

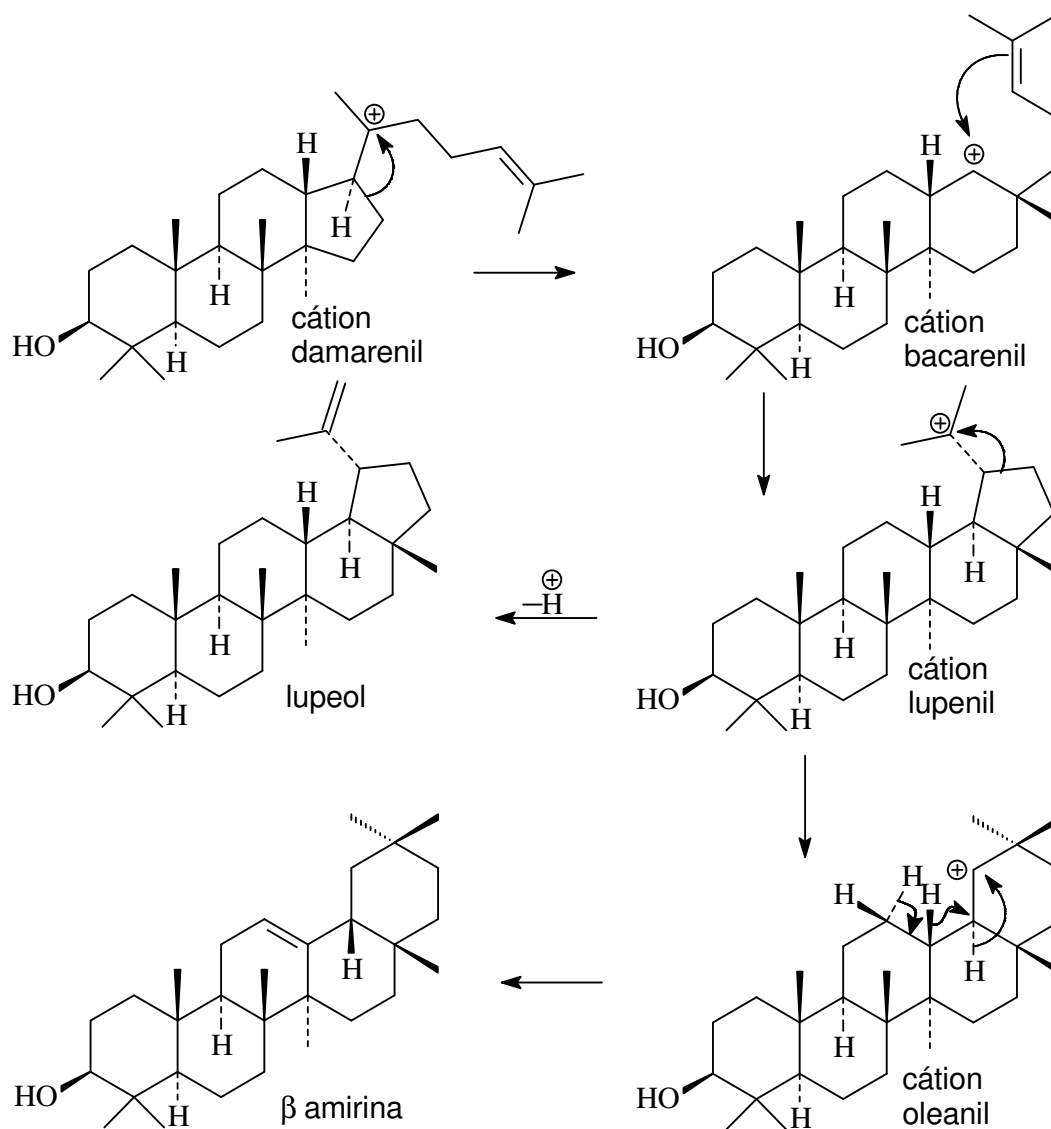


Figura 08 – Ciclização do cátion damarila (tetra cíclico) formando o lupeol (lupânico) e a β -amirina (Oleânânico)

Fonte: Dewick (2002)

Os esteróides são triterpenos modificados com sistemas tetracíclicos podendo ser obtidos a partir do lanosterol com a perda das metilas ligadas ao carbono 4 e da metila do carbono 14 (Figura 09).

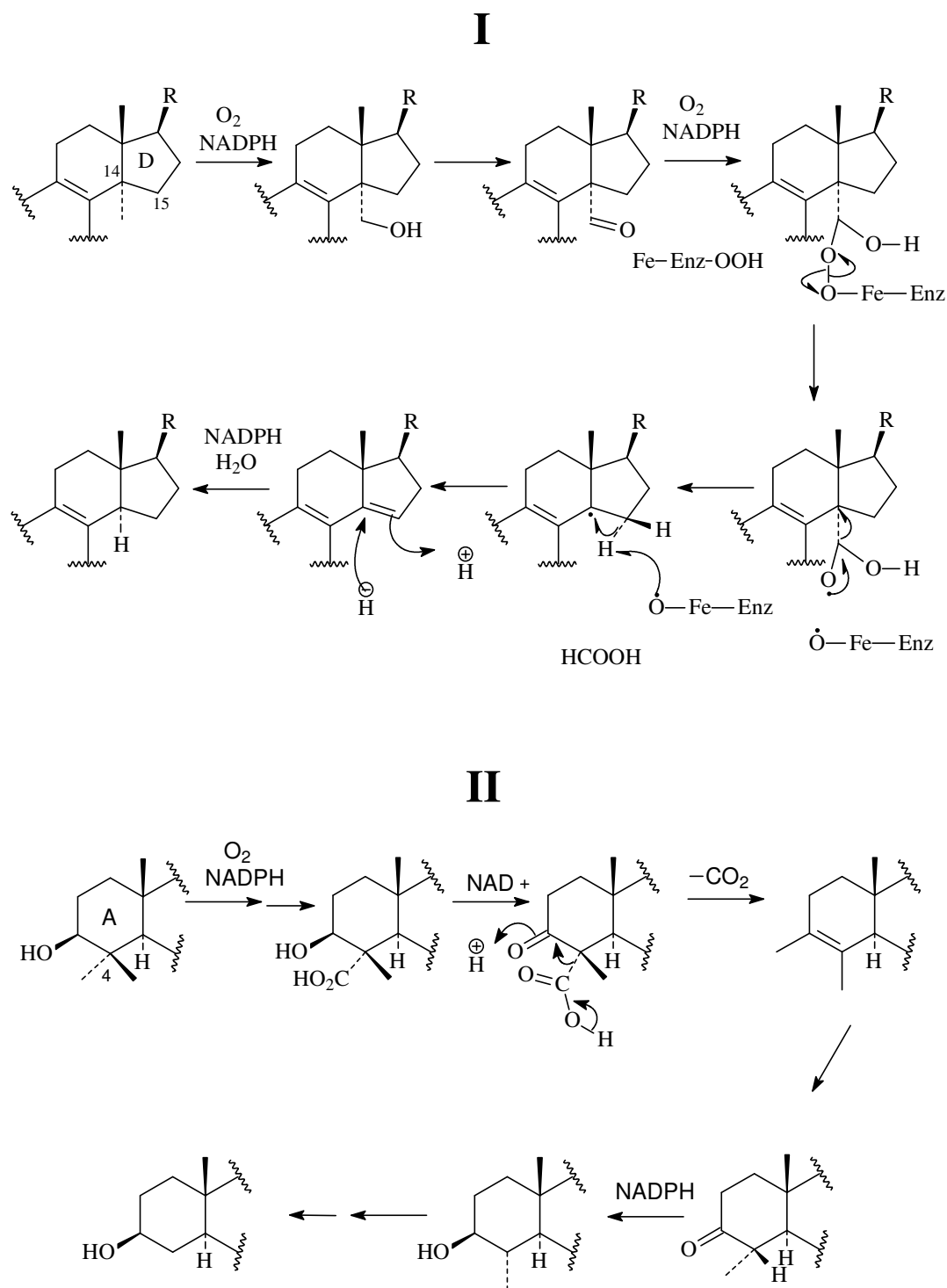


Figura 09 – Modificação de um triterpeneo com sistemas tetracíclicos perdendo uma metila na posição 14 (I) e duas metilas na posição 4 (II) para formar fitoesteróides
Fonte: Dewick (2002)

Esta redução do número de carbonos leva a um esqueleto básico de 27 carbonos como o observado nos colestanois. Nas plantas observa-se com frequência

o aumento da cadeia lateral com a inclusão de mais um carbono (campesterol) ou dois (sitosterol). A inclusão dos carbonos em ambos os casos ocorre via S-adenisilmetionina que efetua as alquilações carbons olefínicos (Figura 10).

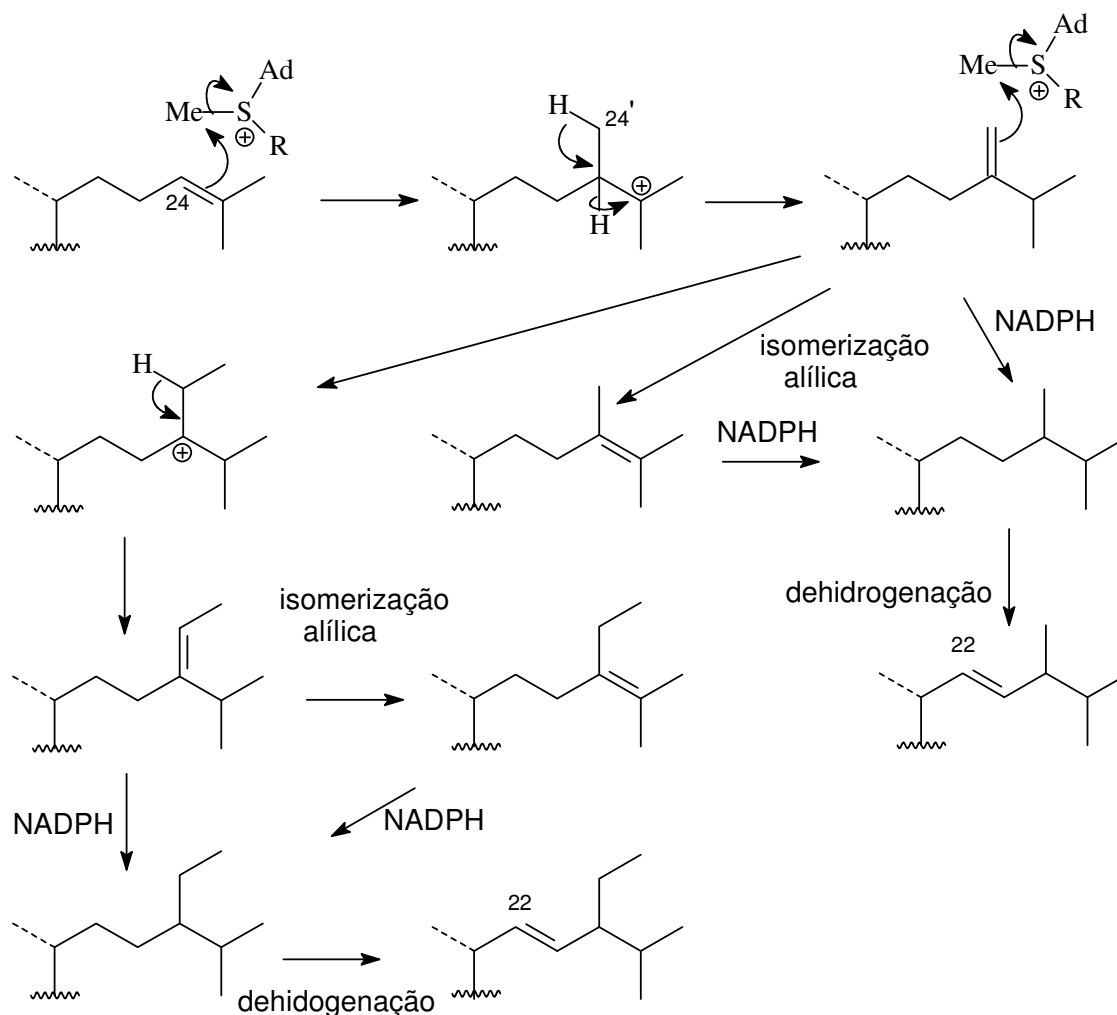


Figura 10 – Etapas de inclusão de carbonos via S-adenisilmetionina, isomerização alílica e dehidrogenação
Fonte: Dewick (2002)

Outro aspecto também presente em algumas das espécies de *Machaerium* é sua bioatividade, alguns trabalhos descrevem atividade anti-giardial e antitumoral por Yu; Wang; Yang (2007) para a *M. multiflorum*, atividade antimalária e antibacteriana por Muhammad et al. (2001) este mesmo autor em 2003 relata atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitárias para *M. multiflorum*.

Estes relatos mostram que além dos estudos químicos, é necessário efetuar também algum tipo de investigação de bioatividade na espécie. Esta investigação

pode ser realizada utilizando substâncias isoladas ou mesmo extratos brutos e fracionados, um exemplo disso é reportado por Quiroga, Sampietro e Vattuone (2001), onde é avaliado a utilização de extrato bruto contra fungos filamentosos.

Alguns fungos filamentosos como o *Botryosphaeria ribis* são causadores de doenças em plantios jovens, com até dois anos de idade, são lesões necróticas nos tecidos do caule, ao longo do tronco e nos ramos, manifestando-se inicialmente pelo escurecimento do tecido da casca e do lenho, podendo haver formação de um calo cicatricial ou mesmo o anelamento do tronco (FERREIRA, 1989). A *Alternaria solani*, por exemplo, é causadora da pinta preta, frequente doença da cultura do tomateiro no Brasil. A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. Existe poucos cultivares com resistência genética a essa doença (BALBI-PEÑA et al., 2006).

REFERÊNCIAS (TABELA 01)

- ⁰¹OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; e GOTTLIEB, O. R.. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1379-1381, 1978.
- ⁰²OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.. Natural occurrence of isoflavans and isoflavanquinone. *Chemical Communications*. n.20, p.1263-1264, 1968.
- ⁰³SEO, EUN-KYOUNG; KIM, NAM-CHEOL; MI, QIUWEN; CHAI, H.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; NAVARRO, H. A.; BURGESS, J. P.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; TAN, G. T.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; e KINGHORN, D. A. D.. Macharistol, a new cytotoxic cinnamylphenol from the stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**. v.64, n.11, p.1483-1485, 2001.
- ⁰⁴ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S. e NIMROD, A. C.. Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*. **Planta Medica**. v.65, n.5, p.490, 1999.
- ⁰⁵WAAGE, S. K.; HEDIN, P. A. e GRIMLEY, E... A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. **Phytochemistry**. v.23, n.12, p.2785-2787, 1984.
- ⁰⁶ALVES, H. M.; ARNDT, V. H.; OLLIS, W. D.; EYTON, W. B.; GOTTLIEB, O. R. e MAGALHÃES, M. T.. Triterpenoids isolated from *Machaerium incorruptibile*. **Phytochemistry**. v.5, n.6, p.1327-1330, 1966.
- ⁰⁷ALVES, H. M. et al. β -Amyrin constituents of *Machaerium incorruptibile*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.37, n.1, p.49-50, 1965.
- ⁰⁸OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e MAGALHÃES, M. T.. Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. nictitans*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1383-1388, 1978.
- ⁰⁹OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J. e SUTHERLAND, I. O.. Neoflavonoids from *Machaerium kuhlmannii* and *Machaerium nictitans* and the recognition of a new neoflavonoid type, the neoflavenes. **Chemical Communications**. n.22, p.1392-1393, 1968.
- ¹⁰GREGSON, M.; KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J.; SUTHERLAND, I. O.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; EYTON, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DIETRICH, H. H.. Natural occurrence of cis- and trans-cinnamylphenols. **Chemical Communications**. n.22, p.1390-1392, 1968.
- ¹¹KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e DE OLIVEIRA, A. B.. Mucronulatol, mucroquinone and mucrocarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1405-1411, 1978.

- ¹²KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e DE OLIVEIRA, A. B.. Mucronustyrene, mucronulastyrene and villostyrene, cinnamylphenols from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1389-1394, 1978.
- ¹³MUHAMMAD, I.; LI, XING-CONG; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; DUNBAR, D. C. e FERREIRA, D.. Antimicrobial and antiparasitic (+)-trans-hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v.66, n.6, p.804-809, 2003.
- ¹⁴MUHAMMAD, I.; LI, XING-CONG; DUNBAR, D. C.; ELSOHLI, M. A. e KHAN, I. A.. Antimalarial (+)-trans-hexahydrodibenzopyran derivates *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v.64, n.10, p.1322-1325, 2001.
- ¹⁵OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; ALVES, H. M. e GOTTLIEB, O. R.. Duartin, an isoflavan from *Machaerium opacum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1401-1403, 1978.
- ¹⁶ALVES, H. M. et al. Duartin and isoflavan of *Machaerium opacum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.39, n.1, p.127-130, 1967.
- ¹⁷OGIYAMA, K.; YASUE, M. Constituents of *Machaerium pedicellatum* heartwood. **Phytochemistry**. v.12, n.10, p.2544-2545, 1973.
- ¹⁸YOSHIMOTO, T.; MAKINO, TETSUYA; MINAMI, KYOJI. n-Hexane extracts from the heartwoods of the genera *Machaerium* and *Proposis*. **Mokuzai Gakkaishi**. v.21, n.12, p.686-689, 1975.
- ¹⁹EYTON, W. B.; OLLIS, W. D.; FINEBERG, M.; GOTTLIEB, O. R.; GUIMARÃES, I. S. DE S. e MAGALHÃES, M. T.. Examination of *Machaerium scleroxylon* and biogenetic proposals regarding the neoflavanoids. **Tetrahedron**. v.21, n.9, p.2697-2705, 1965.
- ²⁰GOTTLIEB, O. R. et al. The constituents of *Machaerium scleroxylon*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.36, n.1, p.33-34, 1964.
- ²¹DONNELLY, D. M. X. Metabolites of *Dalbergia*: new structural variants of the neoflavanoids. **Studies in Organic Chemistry**. v.11, p.263-278, 1982.
- ²²IMAMURA, H. et al. A benzoquinone and two isoflavans from the heartwood of *Machaerium sp.* (Leguminosae). **Mokuzai Gakkaishi**. v.28, n.3, p.174-178, 1982.
- ²³COOK, J. T. et al. Pterocarpanes from *Dalbergia spruceana*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1419-1419, 1978.
- ²⁴KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; ALVES, H. M.; e GOTTLIEB, O. R.. Absolute configurations of isoflavans. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1423-1426, 1978.

- ²⁵FORMIGA, M. D.; GOTTLIEB, O. R.; MENDES, P. H.; KOKESTSN, M.; ALLMEIDA M. E. L.; PERECIRA, M. O. e MAGALHÃES, M. T.. Constituents of Brazilian Leguminosae. **Phytochemistry**. v.14, n.3, p.828-829, 1975.
- ²⁶MATOS, F. J. A. et al. Flavanoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.42, supl., p.61-64, 1970.
- ²⁷OLLIS, W. D.. New structural variants among the isoflavonoid and neoflavonoid classes. **Recent Advances in Phytochemistry**. v.1, p.329-378, 1968.
- ²⁸OLLIS, W. D. Neoflavanoids, a new class of natural products. **Experientia**. v.22, n.12, p.777-783, 1966.
- ²⁹KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1413-1415, 1978.
- ³⁰GILBERT, B.; DE SOUZA, J. P.; FASCIO, M.; KITAGAWA, M.; NASCIMENTO, S. S. C.; FORTES, C. C.; SEABRA, DO PRADO e PELLEGRINO, J.. Schistosomiasis. Protection against infection by terpenoids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.42, supl., p.397-400, 1970.
- ³¹DE OLIVEIRA, A. B.; GOTTLIEB, O. R. e OLLIS, W. D.. Constituents of *Machaerium villosum* 2. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.40, n.2, p.147-150, 1968.
- ³²BRAGA, A. DA S.; GOTTLIEB, O. R.; EYTON, W. B.; KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.. Constituents from *Machaerium villosum* 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.40, n.1, p.33-37, 1968.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudo químico do extrato de acetato de etila do caule de *M. stipitatum*.
- Avaliação das atividades antifúngicas do extrato bruto de acetato de etila do caule de *M. stipitatum*.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Isolar, purificar, identificar e determinar as estruturas através de métodos espectroscópicos dos constituintes químicos (metabólitos secundários) do extrato de acetato de etila do caule da espécie.
- Efetuar bioensaios antifúngicos no extrato bruto e/ou frações elaboradas e/ou substâncias puras obtidas tentando correlacionar as atividades com as estruturas de substâncias isoladas ou classes às quais pertencem.
- Contribuir para o estudo químico do gênero *Machaerium* com a investigação química de uma espécie ainda não estudada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Material botânico

Partes do caule (galhos e ramos) da *Machaerium stipitatum* foram coletados sob a supervisão do biólogo Manoel R. C. Paiva, em abril de 2007, na Rua Foz do Iguaçu próxima ao número 1217, na cidade de Londrina, Paraná. Uma exsicata da planta está registrada no Herbário FUEL, sob o número 40.658, no Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina.

Após a coleta, o material foi pulverizado em triturador de facas, seco à sombra a temperatura ambiente.

3.1.2 Reagentes, Solventes e Micro-organismos

Os solventes e reagentes (acetato de etila, hexano, diclorometano, metanol, álcool etílico, éter etílico, dimetilsulfóxido (DMSO), piridina, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e hidróxido de sódio) empregados no trabalho foram de grau P.A. principalmente das marcas Nuclear, Index, Merck, Macheri Nagel, Quimex e Biotec.

Os adsorventes cromatográficos para coluna (sílica-gel 20-230 mesh) e camada delgada (sílica gel 60 com e sem fluoresceína) foram da marca Merck e Macheri Nagel. Também foram utilizadas cromatoplacas com fluoresceína da marca Macheri Nagel. As colunas cromatográficas utilizadas foram de diâmetros e comprimentos variados.

Nos ensaios biológicos foram utilizados os fungos filamentosos *Alternaria* sp e *Botryosphaeria ribis*, ambos cedidos gentilmente pela professora Maria Inés Rezende do departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual

de Londrina (UEL), o antifúngico Captan, o meio de cultivo Potato Dextose Agar da marca Himedia e placas de Petri (90x20mm).

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram rota evaporador Premem BM-102 ER, Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Shimadzu QP500 (CG/EM), Espectrômetro de Infravermelho Shimadzu FTIR-8300 e Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Varian Mod. Gemini Multinuclear 300Hz, Magnetom NMR 300-Oxford.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração

As extrações utilizando solventes orgânicos foram feitas por maceração a frio, no primeiro instante em acetato de etila e posteriormente em etanol a partir de 6,970 kg de material seco. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a pressão reduzida, dando uma massa de 62,33 g para o extrato em acetato de etila e 55,3 g em etanol, sendo mantidos em freezer posteriormente.

O extrato aquoso foi obtido por sonicação de 300 g de material seco em 500 ml de água ultra pura durante 30 min, após um breve repouso o material foi filtrado e acrescido de mais 500 ml de água ultra pura, sonicando novamente por 30 min, repetindo essa ultima etapa mais uma vez. O extrato resultante (15000 ml) foi congelado e liofilizado dando uma massa de 1,51 g.

3.2.2 Fracionamento do Extrato

O extrato de acetato de etila (AcOEt) de massa 63,33g, foi submetida um fracionamento em coluna de adsorção em sílica-gel (fase normal) com solventes em polaridade crescente como mostrados na Tabela 02.

Tabela 02 – Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento primário do extrato de AcOEt de *M. stipitatum*

Fração	Eluente	Massa / g
Ac1	Hexano	1,08
Ac2	Hexano – AcOEt 10%	7,13
Ac3	Hexano – AcOEt 50%	11,86
Ac4	AcOEt	31,68
Ac5	AcOEt – MeOH 2%	0,82
Ac6	AcOEt – MeOH 5%	0,41
Ac7	AcOEt – MeOH 10%	0,43
Ac8	MeOH	2,82

3.2.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes

As frações primárias obtidas foram refractionadas por técnicas cromatográficas preparativas na tentativa de isolar e purificar seus constituintes. Inicialmente, o primeiro método de purificação foi de cromatografia em coluna (CC) em sílica-gel em fase normal. Além da CC também foram empregados outros métodos preparativos, tais como cromatografia em camada delgada preparativa (CCD).

3.2.3.1 Elaboração da fração Ac2 (Hexano-AcOEt 10%)

A fração Ac2 (Hexano-AcOEt 10%) 6,457g foi submetida à cromatografia em coluna em sílica gel em fase normal (150g), utilizando-se eluentes em polaridade crescente conforme indicado na Tabela 03.

Tabela 03 – Série eluotrópica em polaridade crescente, intervalo das frações retiradas para cada eluente e agrupamento e massa das frações da fração Ac2 (Hexano-AcoEt 10%)

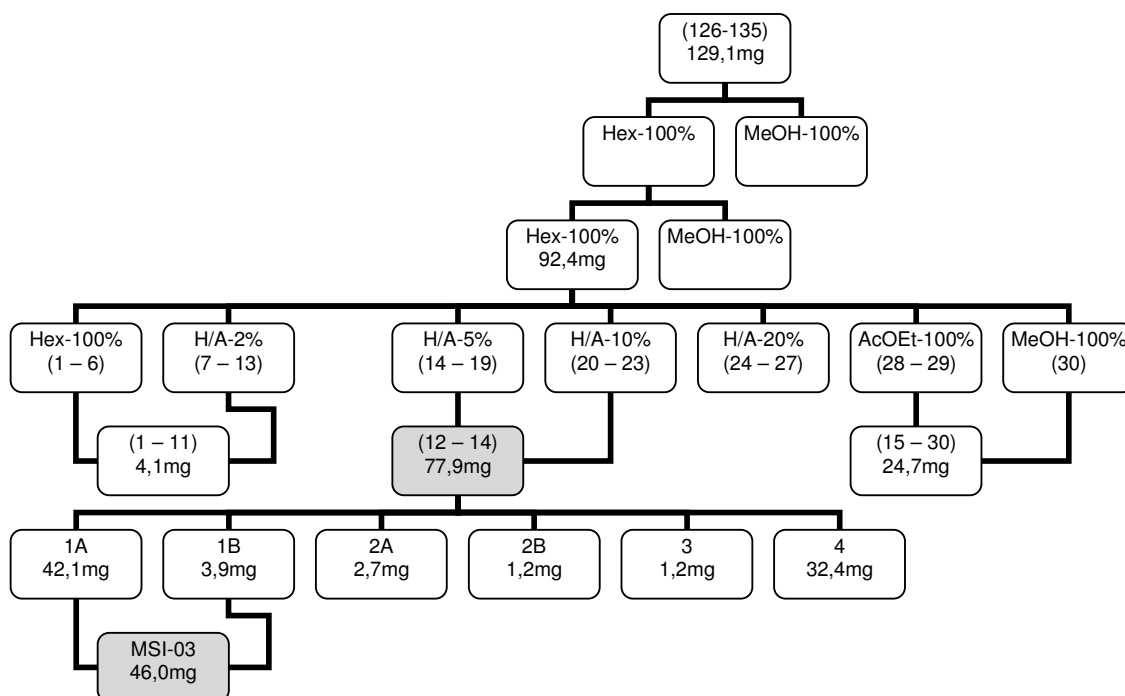
Eluente	Fração	Agrupamentos	Massa / mg
Hexano – 100%	(01 – 45)	(01 – 45)	-
Hexano – CH ₂ Cl ₂ 5%	(46 – 75)	(46 – 75)	-
Hexano – CH ₂ Cl ₂ 10%	(76 – 95)	(76 – 95)	-
Hexano – CH ₂ Cl ₂ 20%	(96 – 115)	(96 – 125)	275,7
		(126 – 135)	129,1
Hexano – CH ₂ Cl ₂ 50%	(116 – 217)	(136 – 149)	211,7
		(150 – 166)	239,7
		(167 – 195)	282,6
		(196 – 224)	109,4
Hexano – CH ₂ Cl ₂ 70%	(218 – 300)	(225 – 260)	1206,3
		(261 – 300)	478,4
		(301 – 310)	136,4
CH ₂ Cl ₂ – 100%	(301 – 420)	(311 – 322)	214,2
		(323 – 380)	560,8
		(381 – 420)	140,8
		(421 – 440)	251,1
		(441 – 442)	1921,2
		(443 – 444)	451,1
CH ₂ Cl ₂ – MeOH 2%	(421 – 490)	(445 – 448)	516,4
		(449 – 450)	395,1
		(451 – 458)	221,9
		(459 – 468)	37,4
		(469 – 472)	15,4
		(473 – 478)	14,6
AcOEt – 100%	(491 – 541)	(479 – 490)	12,6
		(491 – 498)	167,6
		(499 – 514)	22,4
		(515 – 521)	12,9
		(522 – 533)	14,6
		(542 – 545)	607,0
AcOEt – MeOH 2%	(542 – 560)	(546 – 560)	-
AcOEt – MeOH 5%	(561 – 576)	(561 – 576)	-
AcOEt – MeOH 20%	(577 – 581)	(577 – 581)	-
MeOH – 100%	(582 – 610)	(582 – 610)	-

Todos os grupos e frações apresentados na Tabela 03 passaram por processos de separações analíticos e preparativos com finalidade de isolar, identificar e caracterizar os possíveis metabólitos.

A sequência a seguir mostra de forma descritiva e esquemática como alguns metabólitos da fração Ac2 foram isolados e purificados.

3.2.3.2 Frações (126 – 135)

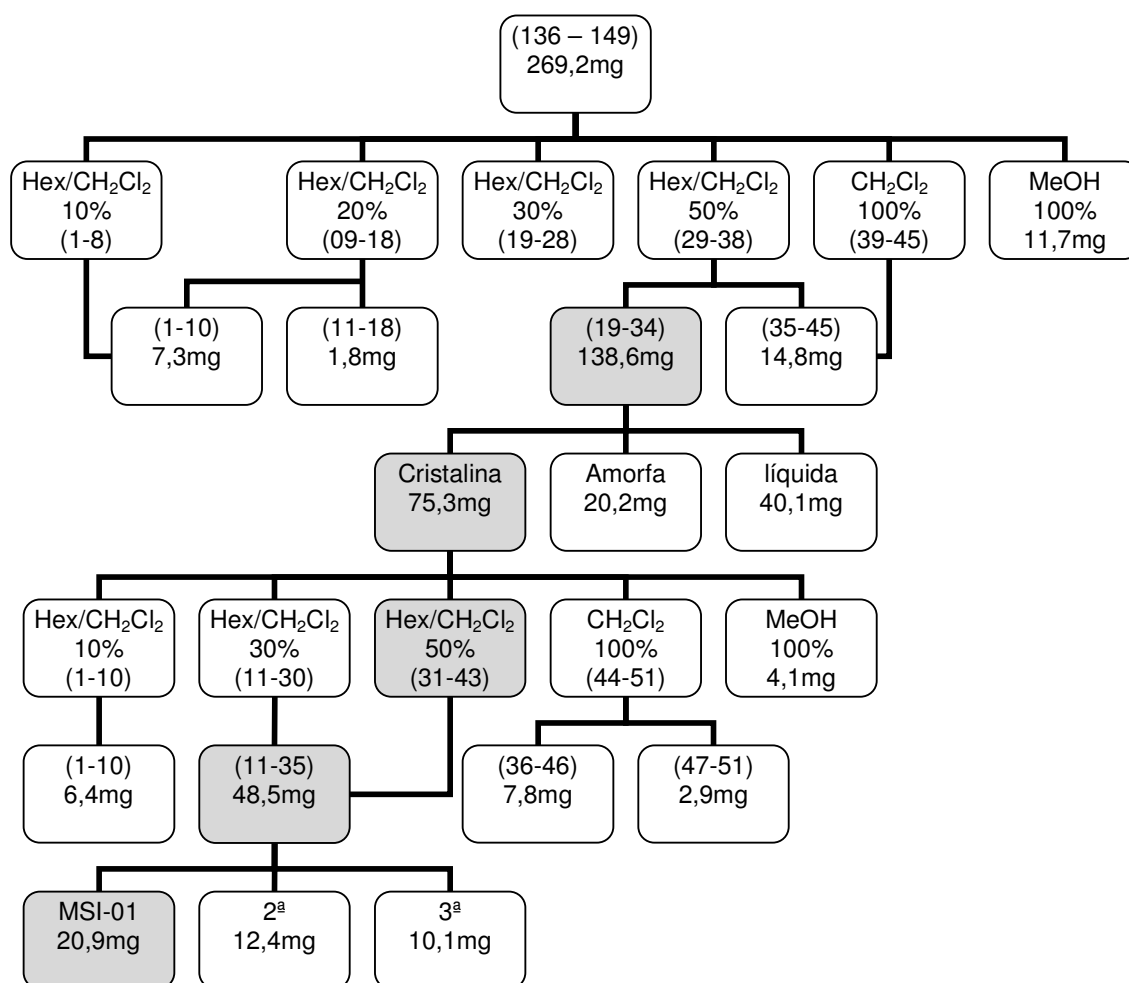
A reunião dessas frações se deram após análise por CCD resultando em uma fração de 129,1 mg. Esta fração passou posteriormente por duas partições em Hexano/MeOH sendo descartada a parte extraída em MeOH. Na parte hexânica (9,24mg) foram feitas uma separação em coluna cromatográfica seguida de uma CCD preparativa, resultando no isolamento da MSI-3 (46,0 mg) como é mostrado no (Fluxograma 01).



Fluxograma 01 – Rota esquemática de isolamento da MSI-03

3.2.3.3 Frações (136 – 149)

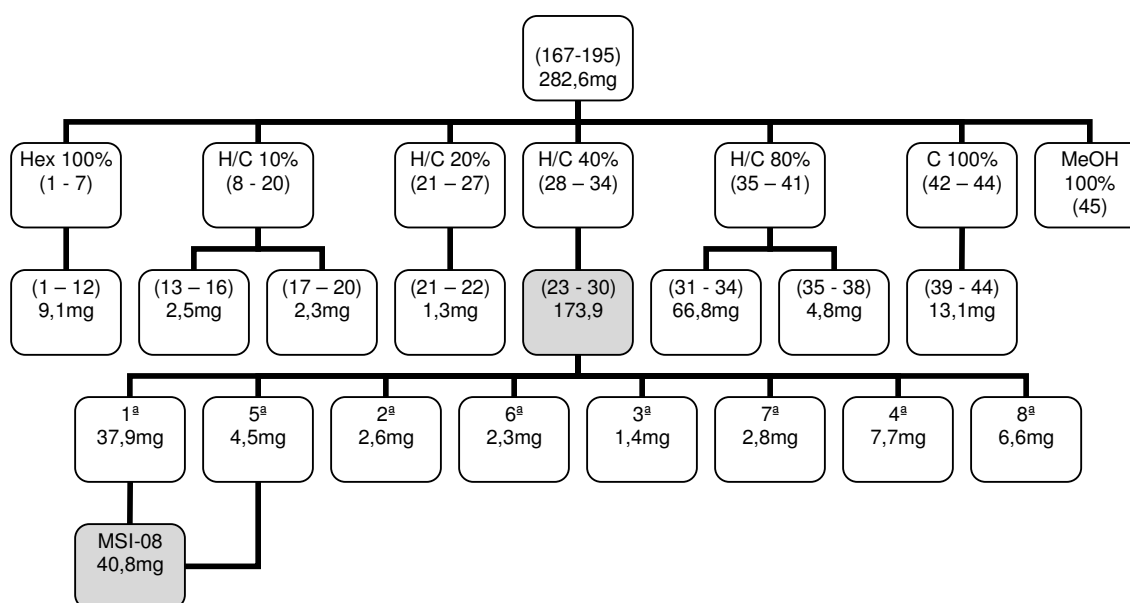
Estas frações foram agrupadas por semelhanças em CCD, sua massa foi 269,2 mg. Uma cromatografia de colula foi feita com esta fração (269,2 mg) nos eluentes Hex/CH₂Cl₂ 10%, Hex/CH₂Cl₂ 20%, Hex/CH₂Cl₂ 30%, Hex/CH₂Cl₂ 50%, CH₂Cl₂ 100% e MeOH100%. A fração 19-34 (138,6 mg) foi submetida a uma recristalização em MeOH 100% que gerou três novas frações, uma cristalina de 75,3 mg, uma sólida amorfa (20,2 mg) e outra líquida (40,1 mg seca). Com a fração cristalina (75,3 mg) foi feita uma coluna cromatográfica em sílica gel nos eluentes Hex/CH₂Cl₂ 10%, Hex/CH₂Cl₂ 30%, Hex/CH₂Cl₂ 50%, CH₂Cl₂ 100% e MeOH100%, a fração de 48,5 mg (11-35) dessa última coluna, passou por uma CCD preparativa que resultou no isolamento da MSI-01 (20,9 mg) (Fluxograma 02).



Fluxograma 02 – Rota esquemática de isolamento da MSI-01

3.2.3.4 Frações (167 – 195)

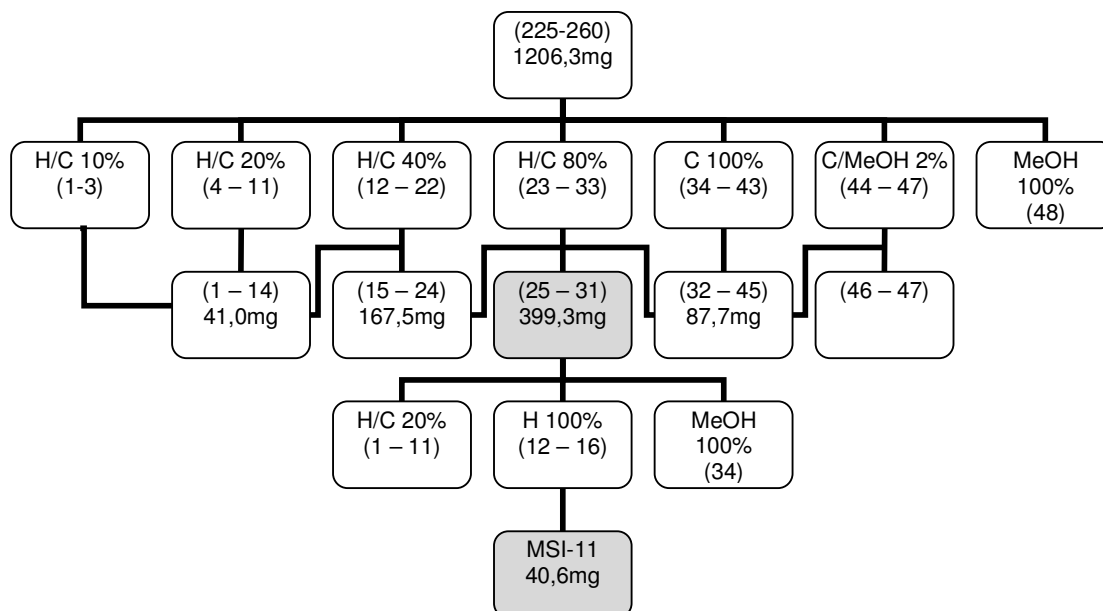
Após uma análise por CCD estas frações foram agrupadas resultando em uma massa de 282,6mg. Posteriormente foi feita uma coluna cromatográfica em hexano 100%, Hex/CH₂Cl₂ 10%, Hex/CH₂Cl₂ 20%, Hex/CH₂Cl₂ 40%, Hex/CH₂Cl₂ 80%, CH₂Cl₂ 100% e MeOH100%, as frações resultantes dessa coluna foram agrupadas por semelhanças, dessas, a fração (23 – 30) de 173,9 mg foi submetida a uma separação em CCD preparativa que resultou no isolamento da MSI-08 (40,0 mg) como é reportado no Fluxograma 03.



Fluxograma 03 – Rota esquemática de isolamento da MSI-08

3.2.3.5 Frações (225 – 260)

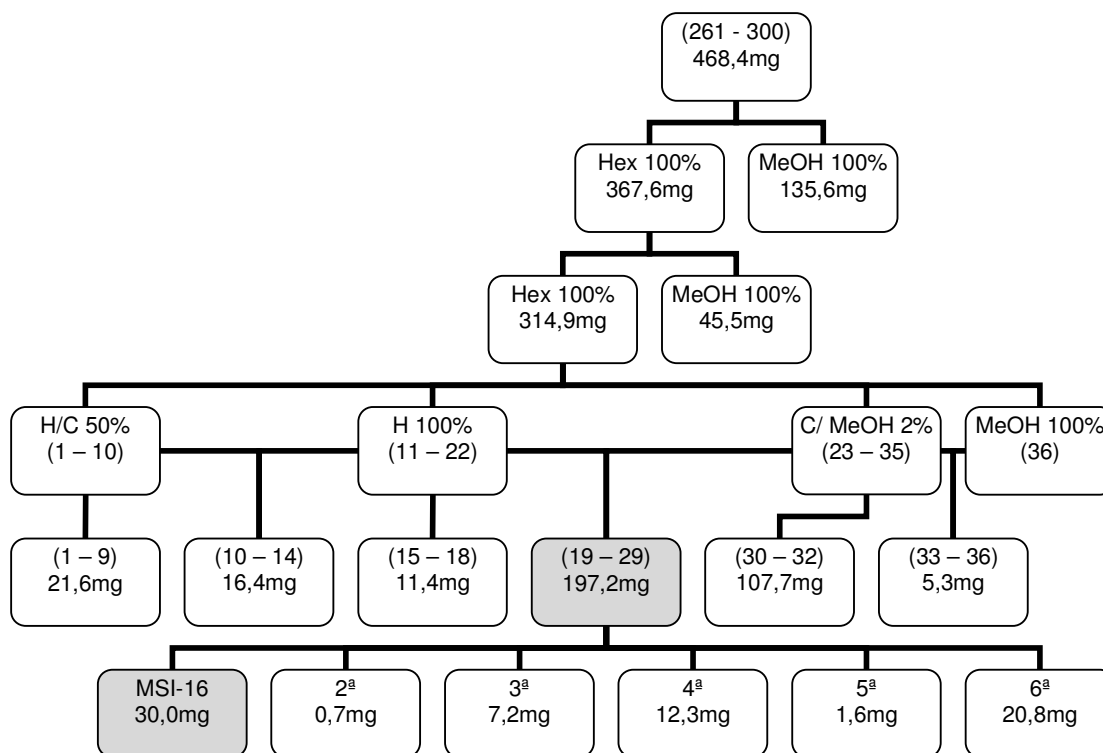
O agrupamento dessas frações resultaram em uma fração de 1206,3 mg. As etapas de isolamento dessa fração (reunida) passou por duas CC (Fluxograma 04), onde a primeira teve início em Hex/CH₂Cl₂ 10%, Hex/CH₂Cl₂ 20%, Hex/CH₂Cl₂ 40%, Hex/CH₂Cl₂ 80%, CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂/MeOH 2% e MeOH100%,. A fração (25 – 31) dessa coluna sofreu uma nova separação em CC resultando na MSI-11 (40,6 mg).



Fluxograma 04 – Rota esquemática de isolamento da MSI-11

3.2.3.6 Frações (261 – 300)

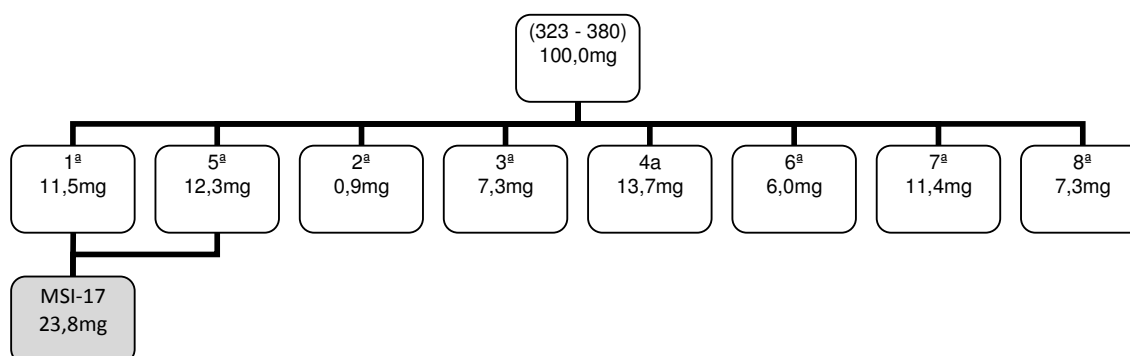
Após constatar que se tratava de frações semelhantes por análise em CCD elas foram reunidas resultando em uma fração de massa 478,4 mg. Após esse agrupamento essa fração passou por duas partições em Hexano/MeOH, descartando a parte metanólica e reservando a parte hexânica. O resultado da segunda partição foi submetida a uma CC em Hex/CH₂Cl₂ 50%, CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂/MeOH 2% e MeOH100%,. de onde foram retiradas 36 frações, a fração de 197,2 mg (19 - 29) dessa coluna foi submetida a uma CCD preparativa, que resultou no isolamento da MSI-16 (30 mg) como é reportado no Fluxograma 05.



Fluxograma 05 – Rota esquemática de isolamento da MSI-16

3.2.3.7 Frações (323 – 380)

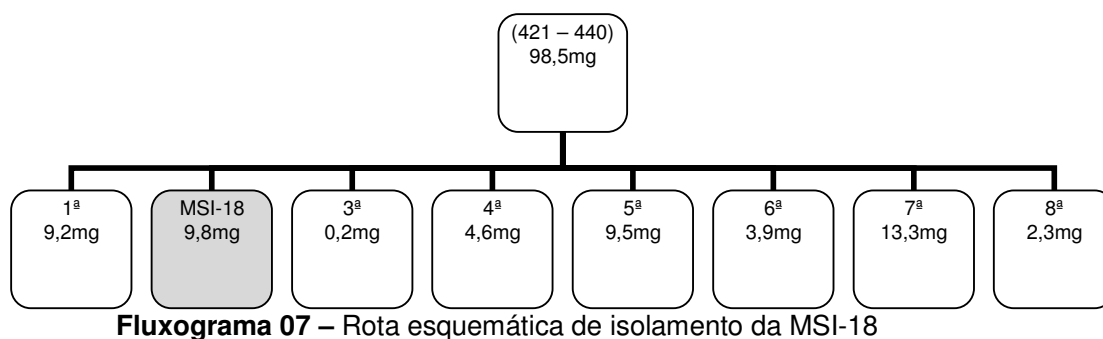
Essas frações foram agrupadas por semelhança em análise de CCD, sua massa foi de 560,8 mg. Uma parte de 100 mg dessa fração (560,8 mg) foi submetida a uma CCD preparativa, que resultou em 8 frações, sendo as frações 1ª e 5ª agrupadas, estas resultaram na MSI-17 (23,8mg) como é demonstrado no Fluxograma 06.



Fluxograma 06 – Rota esquemática de isolamento da MSI-17

3.2.3.8 Frações (421 – 440)

Esse grupo de frações foram reunidos após se mostrarem semelhantes em análise de CCD, sua massa foi de 251,1 mg. Uma parte de 98,5 mg dessa fração (251,1 mg) foi aplicada em uma CCD preparativa, nessa separação foram obtidas 8 frações, na fração denominada 2^a foi isolada a MSI-18 (Fluxograma 07).



3.2.4 Ensaio Antimicrobiano Contra Fungos Filamentosos

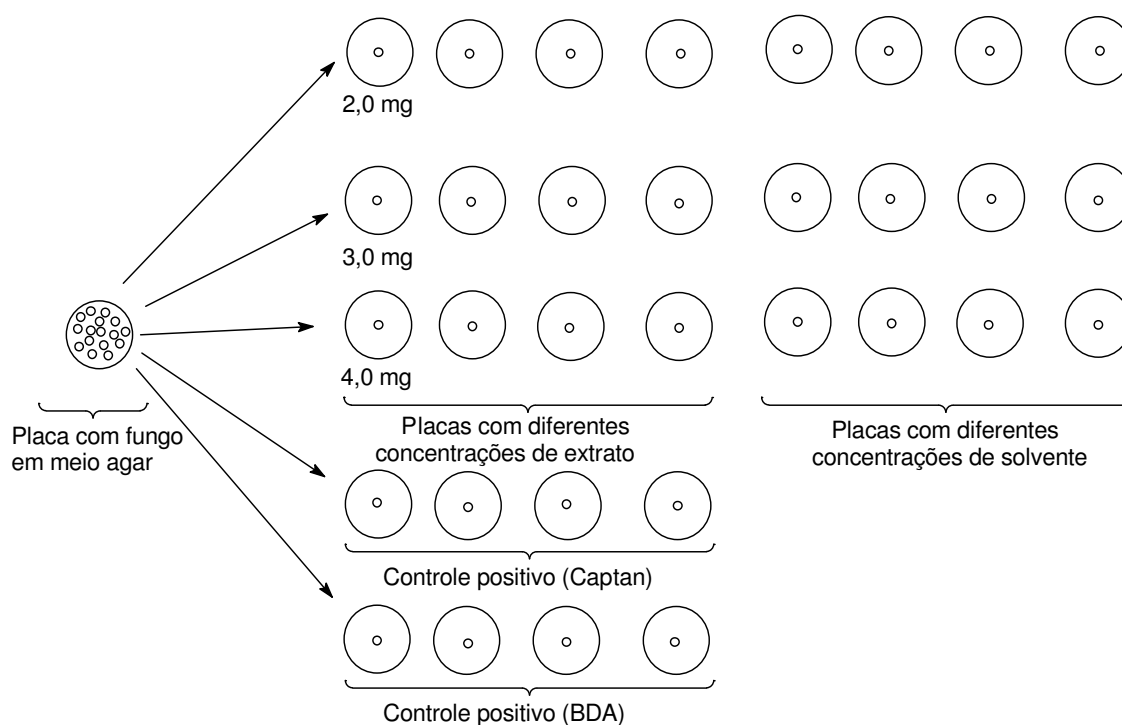
Os micro-organismos utilizados foram os fungos filamentosos *Alternaria* sp e *Botryosphaeria ribis*, mantidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) preparado a partir de 39 g desse meio em 1 litro de água destilada. Os fungos foram cultivados em tubos de ensaio contendo BDA inclinado, armazenados em refrigerador a 4 ± 2 °C e repicados trimestralmente.

Nestes ensaios foram utilizados os extratos aquoso, AcOEt 100% e etanólico, as frações AcOEt 10% (Ac2) e AcOEt (Ac4). Para cada extrato e cada fração foi preparada uma solução concentrada de 10 mg/ml. Com essa solução concentrada preparou-se diferentes concentrações por placa (2, 3 e 4 mg), adicionando distintos volumes (200, 300 e 400 μ l) dessa solução a cada erlenmeyer contendo (16,8, 16,7 e 16,6 ml) meio de BDA esterilizado e aquecido. Após homogeneização a mistura foi vertida em placa de Petri (90 x 15mm). Um disco de 7 mm de diâmetro de meio contendo o fungo crescido (previamente) apenas em BDA foi colocado no centro de placa de Petri (Fluxograma 08) contendo extrato, a qual foi

incubada a 28 °C até que o micro-organismo da placa controle ocupasse-a totalmente.

Paralelamente, foram preparados controles negativo de inibição com antifúngico comercial (Captan), um controle positivo de crescimento contendo somente o meio BDA e um de solvente (DMSO para os extratos aquoso, AcOEt 100% e EtOH, as frações AcOEt 10% (Ac2) e AcOEt (Ac4).

Todos os procedimentos foram feitos em quaduplicatas. O halo de crescimento considerado foi à média aritmética da medida dos quatro diâmetros de cada placa descontando a esfera (7 mm) de inoculação.



Fluxograma 08 – Esquema de inoculação do ensaio antimicrobiano com fungos filamentosos em extratos de diferentes solventes da *M. stipitatum*

Os ensaios antimicrobianos dos extratos da *M. stipitatum* contra fungos filamentosos foram avaliadas com base na taxa de crescimento radial das hifas de acordo com Quiroga, Sampietro e Vattuone (2001), onde a taxa de inibição é igual ao diâmetro das hifas no controle menos o diâmetro das hifas no extrato, dividido pelo diâmetro das hifas no controle vezes cem (Equação 01).

$$\text{Equação 01: \% de inibição} = \left[\frac{\text{Diâmetro das hifas controle} - \text{Diâmetro das hifas do extrato}}{\text{Diâmetro das hifas controle}} \right] \cdot 100$$

3.2.5 Condições para Cromatografia Gasosa

Para análise do perfil cromatográfico dos constituintes presentes nos extratos, frações e substâncias puras foi utilizado um cromatógrafo a gás, CG/EM-QP5000 da Shimadzu, que consiste de:

- Um injetor manual, para a volatilização e introdução de parte da amostra, com temperatura de 275 °C.
- Uma coluna de 100 % polidimetilsiloxano (DB-1), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.
- Um forno de temperatura programada com rampa de temperatura iniciada em 80 °C/0,1 min, subindo 25 °C/min até 245 °C. No tempo de 25,5 minutos a temperatura foi aumentada para 270 °C e em 60 °C/min ficou durante 8 minutos.
- O gás utilizado foi o hélio com fluxo de 0,5 ml/min.
- Foi utilizado modo split em 30 ml/min e a purga do septo foi fixado em 1 ml/min.
- Detector de massas com interface a 290 °C, no modo impacto de elétrons.
- Um microcomputador que utilizou o software CLASS 5000 para aquisição e tratamento dos dados via detector de massas.
- Para a identificação de algumas substâncias, foi utilizada a biblioteca de espectros de massas NIST 12 e NIST 62 do conjunto CG-EM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

No trabalho com o extrato de acetato de etila do caule da *M. stipitatum*, foi possível isolar, identificar e determinar a estrutura de forma conclusiva a oito substâncias. A determinação estrutural das substâncias se deu por espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância

magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (uni e bidimensional), comparação com os dados da literatura e comparação com padrão em CCD.

4.1.1 Lupenona (MSI-01)

A estrutura da lupenona (Figura 11) foi proposta principalmente, pela presença de 30 sinais de carbonos no espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 12, 13A, 13B e 13C) condizentes com o esqueleto triterpênico. Os carbonos olefínicos da isopropopenila C-20 e C-29 (δ_{C} 150,1 e 109,6 respectivamente) e o carbono da carbonila cetônica em C-03 (δ_{C} 218,6) foram caracterizados pelos deslocamentos químicos diferenciados dos outros carbonos alifáticos.

O espectro de DEPT 90 e 135 (Figura 14), evidenciou os 20 sinais dos carbonos CH_3 , CH_2 e CH . Das 7 metilas da lupenona, três são bem características, as ligadas ao carbono quaternário C-4 que são as mais desblindada (δ_{C} 26,6 e 21,0) e a metila vinílica em δ_{C} 19,3 (C-30).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 15 e 16A) permitiu verificar todas as 7 metilas evidenciando principalmente a vinílica mais desblindada (δ_{H} 1,69). O multiplete em δ_{H} 2,32 a 2,55 é característico do CH_2 -2 α -carbonila e CH -19, a integração dessa região reforçou essa ideia. Outros sinais destacados no espectro são em δ_{H} 4,56 e 4,57 dd (1,2 Hz) e δ_{H} 4,70 d (2,1 Hz) referente aos hidrogênios terminais vinílicos do carbono 29 (Figura 16B).

O espectro de massas (Figura 17) apresentou o pico do íon molecular em 424D, pico base (m/z) 205, e sua proposta de fragmentação com a presença dos íons o 409 (A), 381 (B), 218 (C), 205 (D) e 189 (E) (m/z) (Figura 18) foi apresentada e discutida por Budzikiewicz et al. (1963) e Heinzen et al. (1996). Os dados do espectro de massas corroboraram para a identificação da lupenona.

O espectro no infravermelho (Figura 19) também evidenciou as duas metilas geminais em C-04 (1380 cm^{-1}) o grupamento carbonila em C-03 com a banda intensa em 1704 cm^{-1} . A banda de intensidade média em 1643 cm^{-1} sugere a presença de grupo vinílico terminal.

A confirmação final da estrutura foi dada pela comparação dos dados de deslocamentos químicos dos carbonos (Tabela 04) da lupenona isolada na *M. stipitatum* com os encontrados na literatura (LUZ et al., 2010).

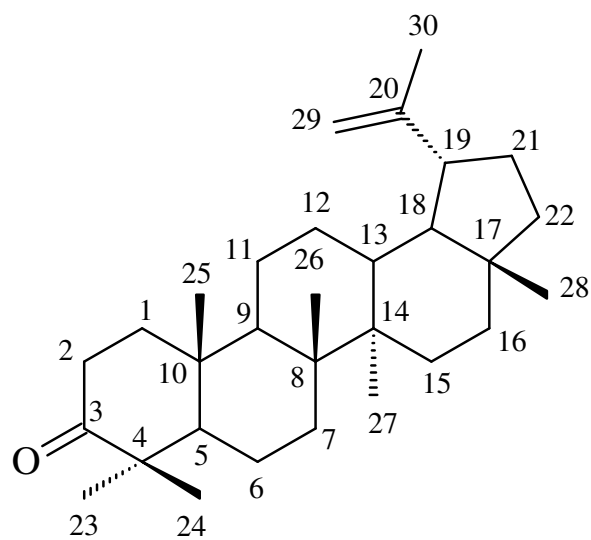


Figura 11 – Estrutura da lupenona (MSI-01)

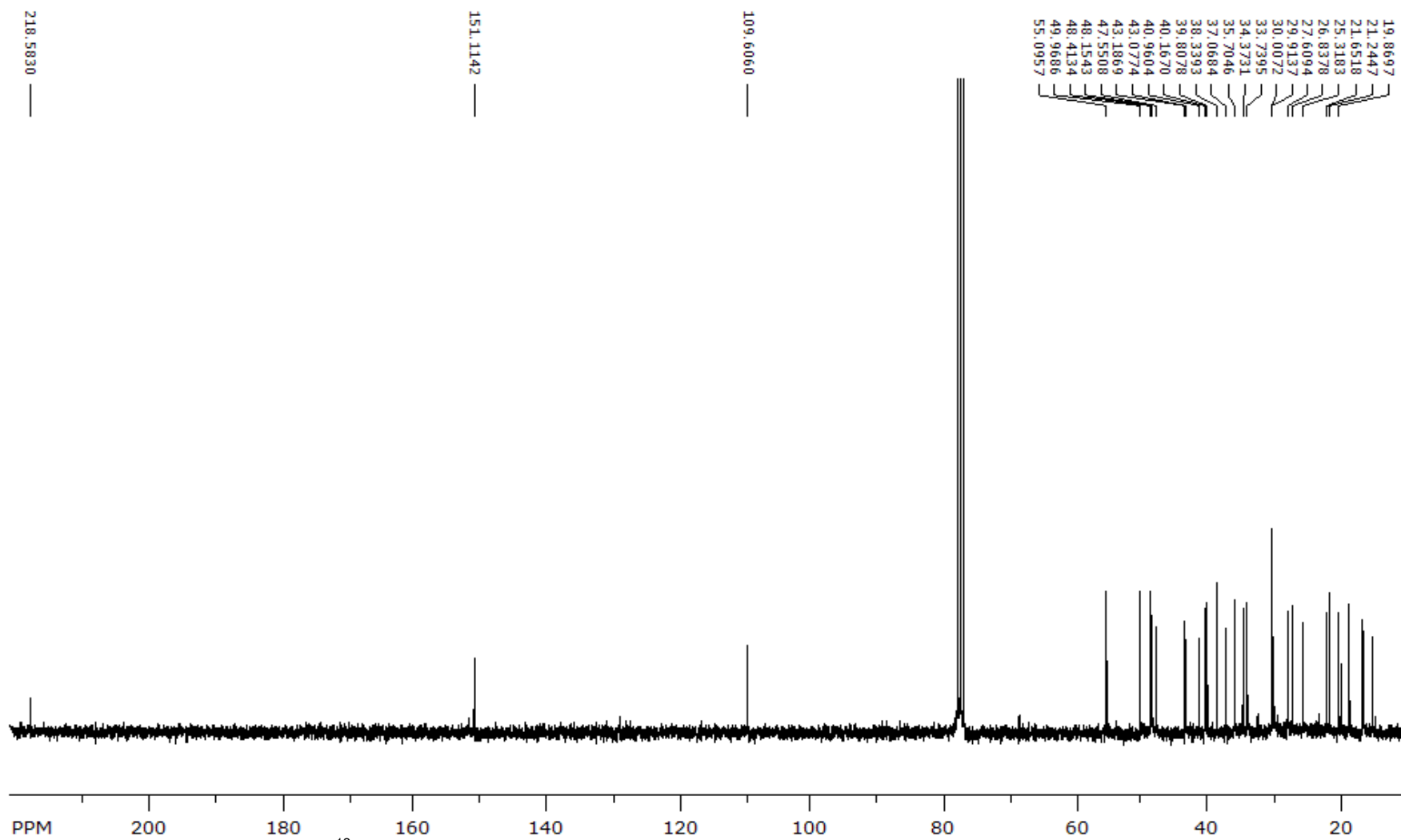


Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01)

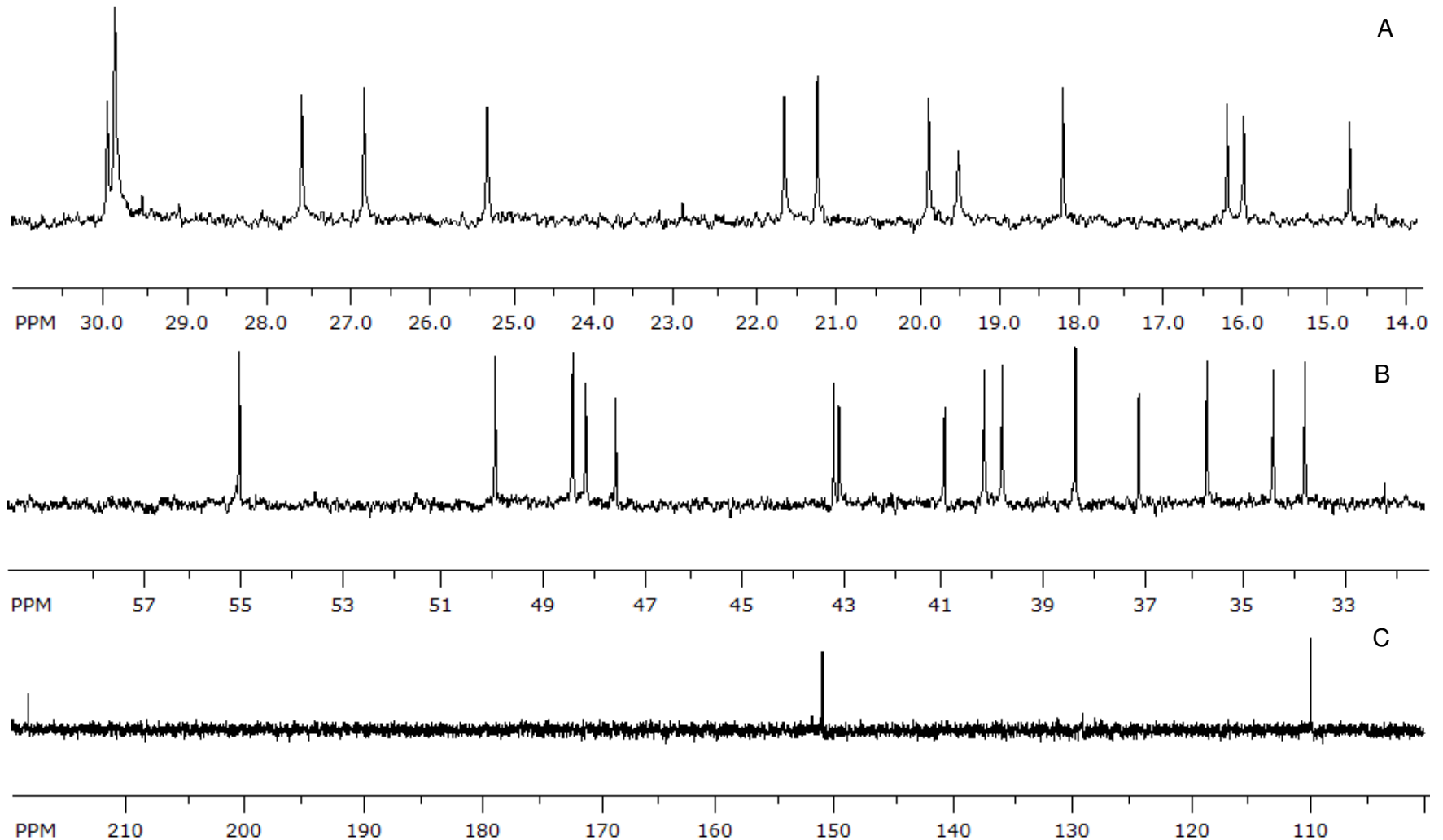


Figura 13 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01) em (A) 14,0 a 31,0 ppm, (B) 31,0 a 60,0 ppm e (C) 100,0 a 220,0 ppm

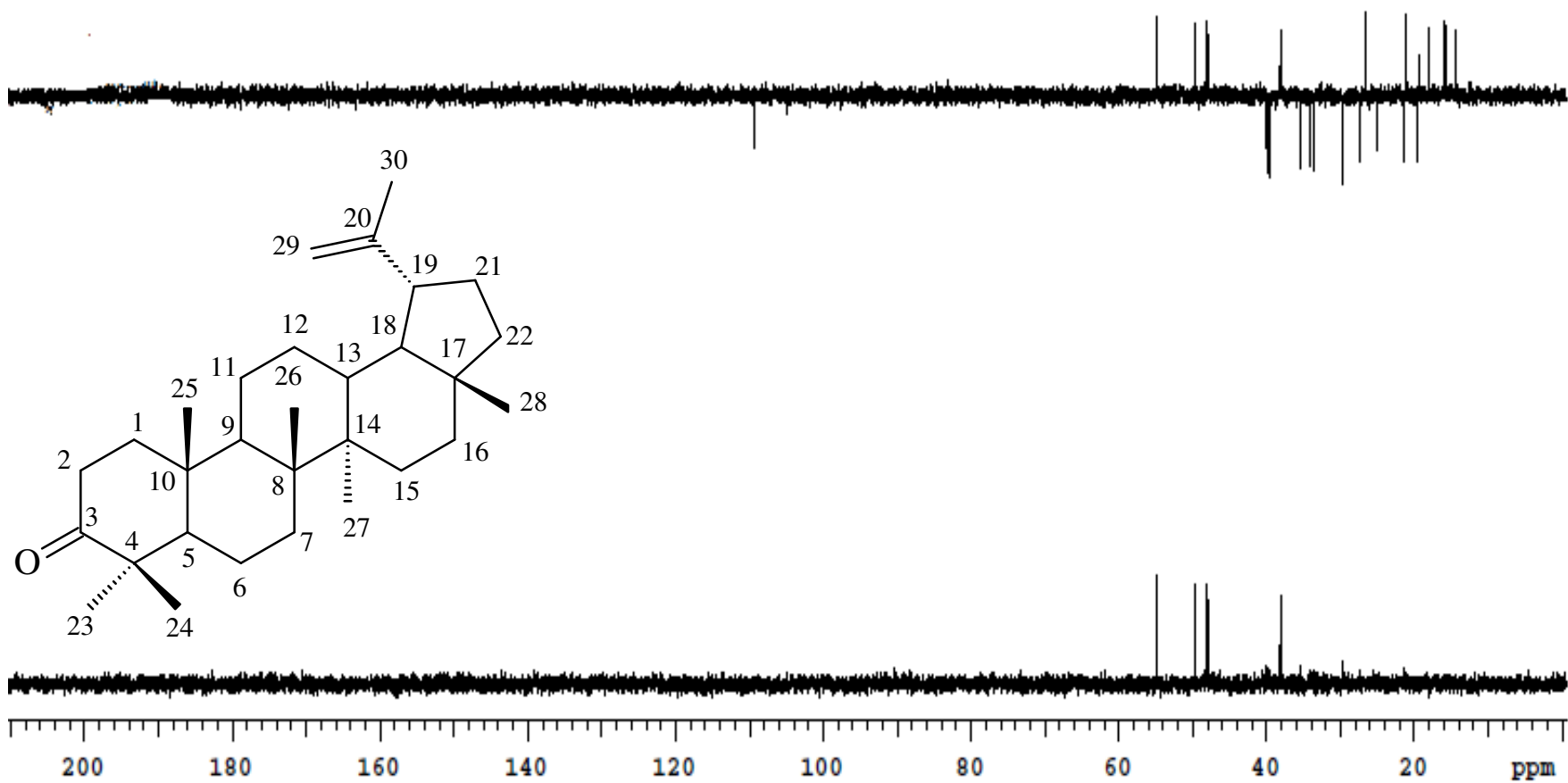


Figura 14 – Espectro de DEPT 90 e 135 da lupenona (MSI-01)

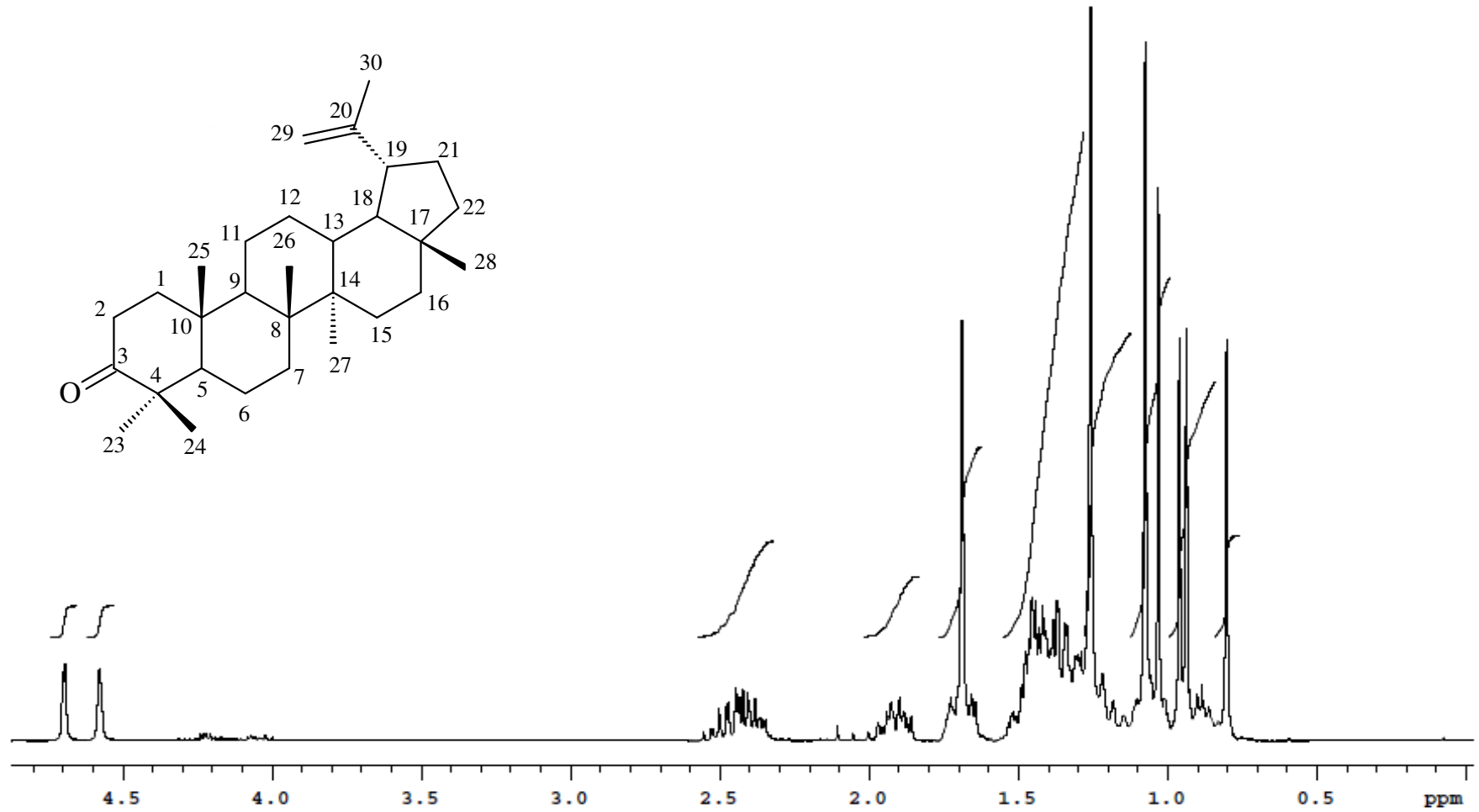


Figura 15 – Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz) da lupenona (MSI-01)

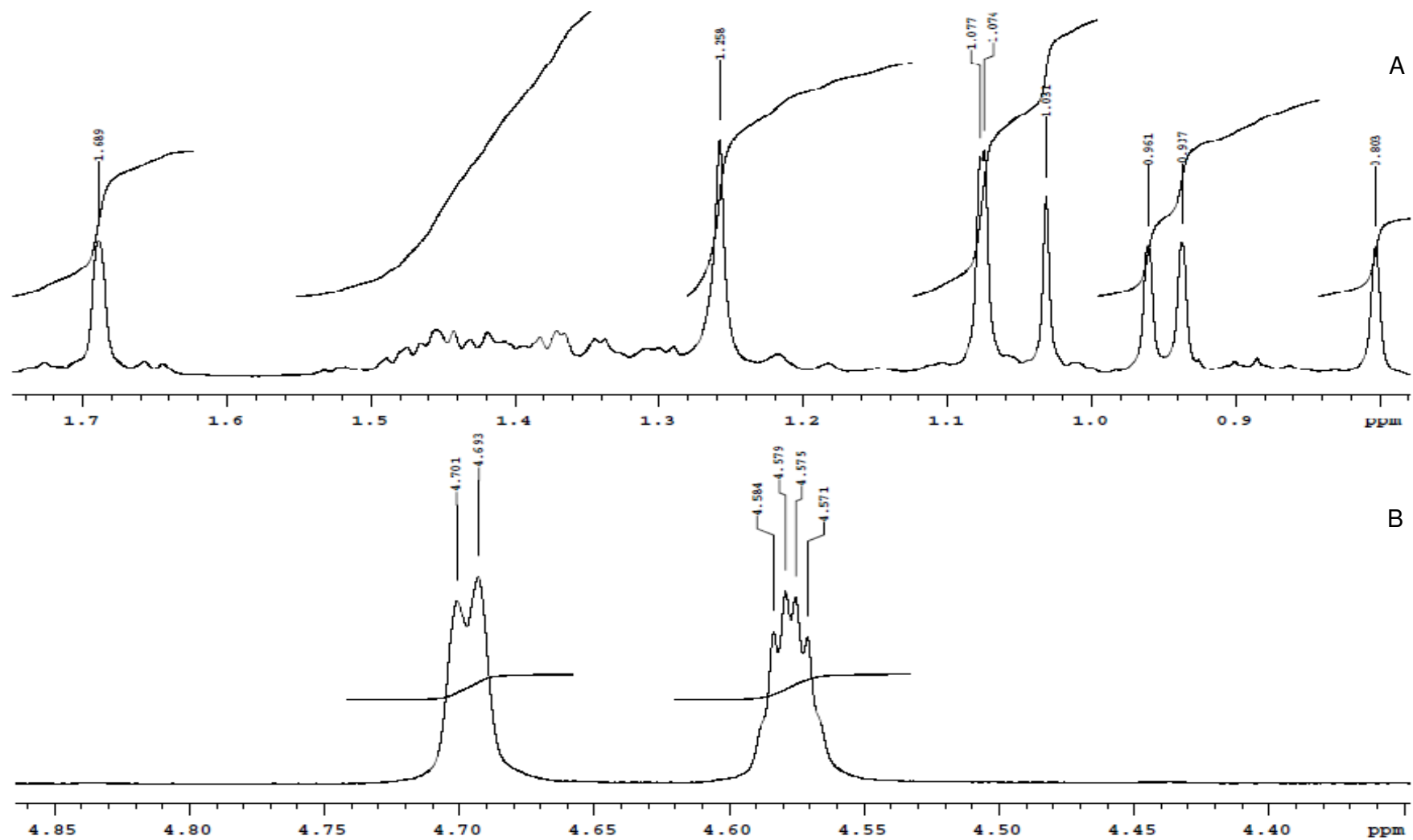


Figura 16 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona (MSI-01) em (A) 0,78 a 1,74 ppm e (B) 4,35 a 4,85 ppm

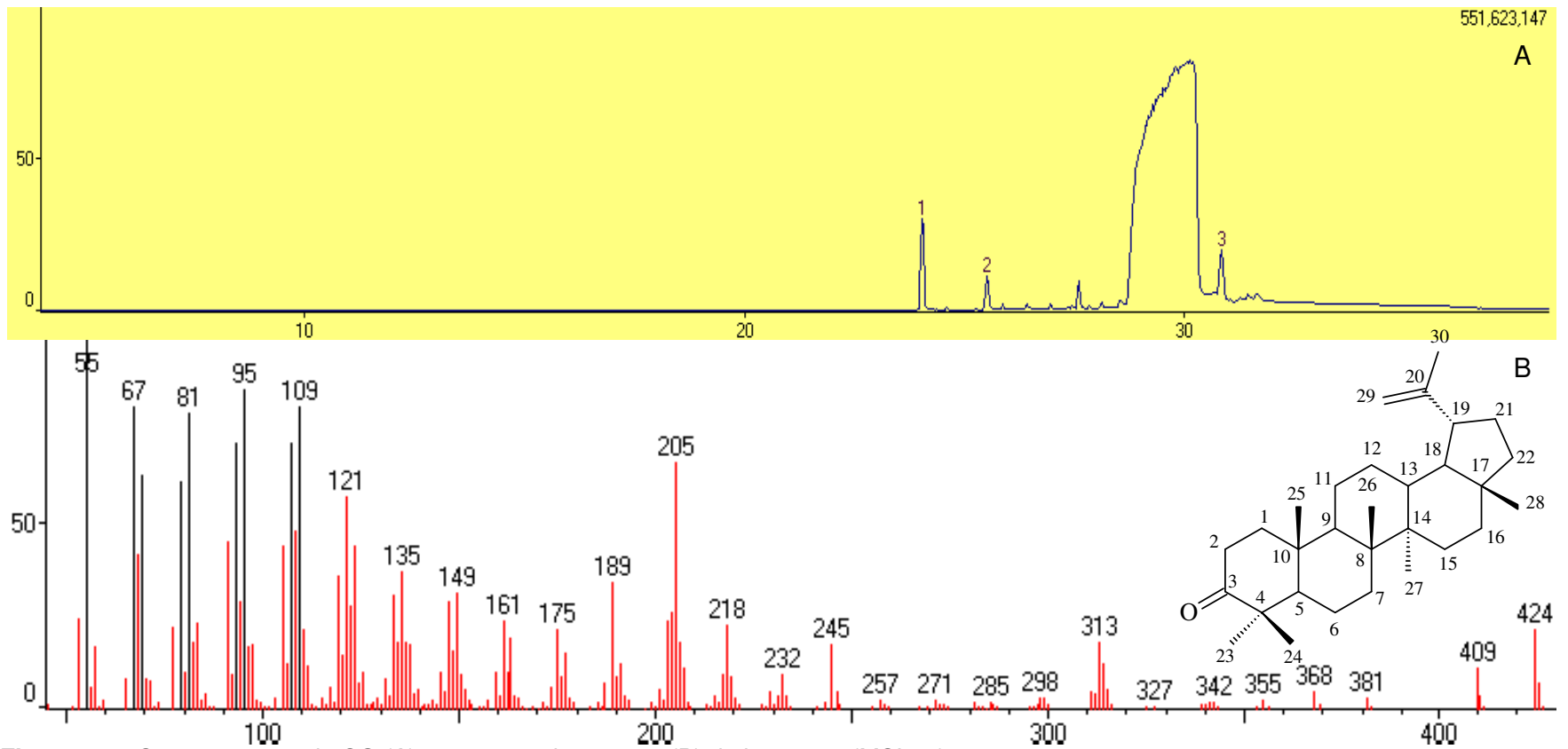


Figura 17 – Cromatograma do CG (A) e espectro de massas (B) da lupenona (MSI-01)

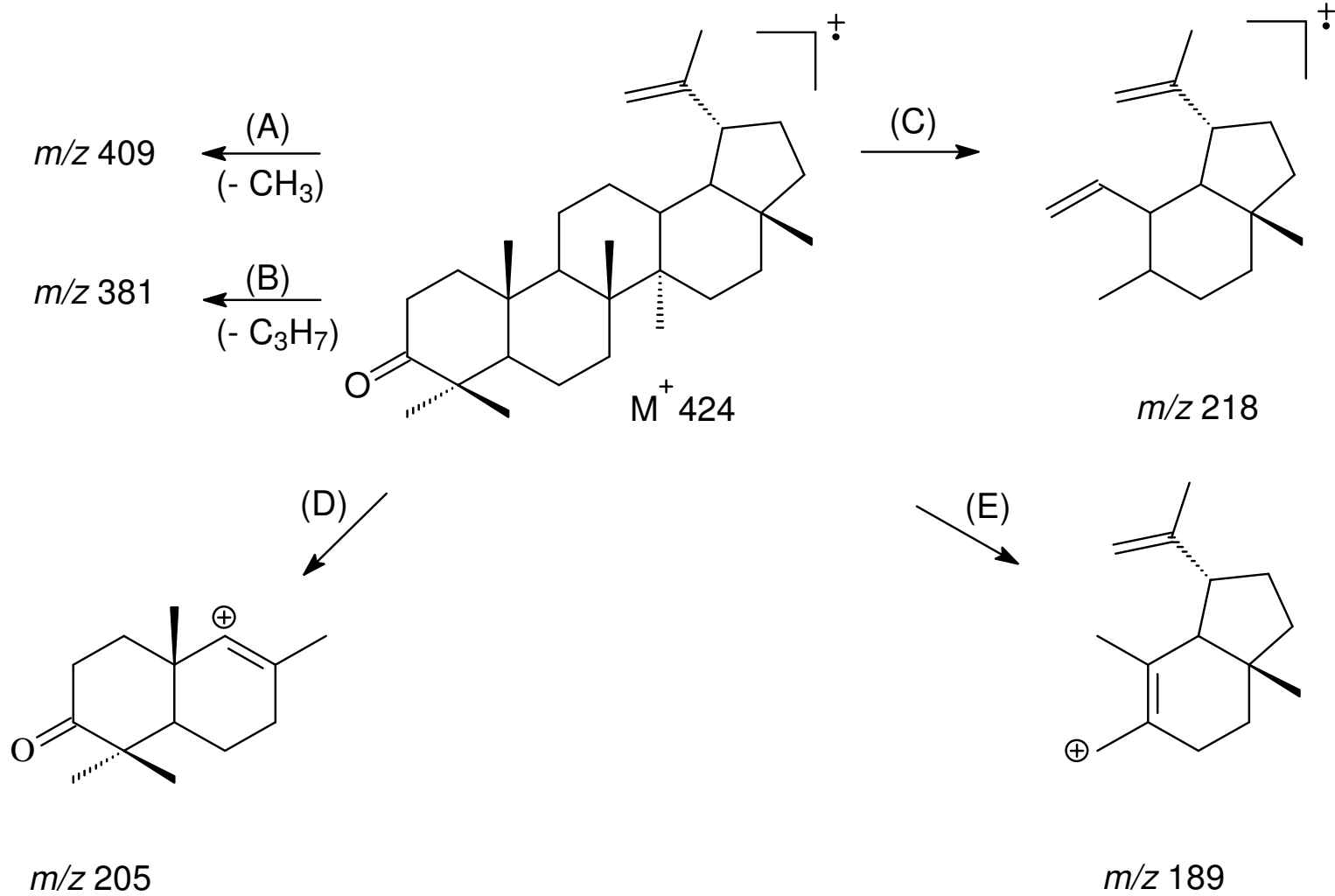


Figura 18 – Proposta de fragmentação da Lupenona (MSI-01)
Fonte: (BUDZIKIEWICZ et al., 1963) e (HEINZEN et al., 1996)

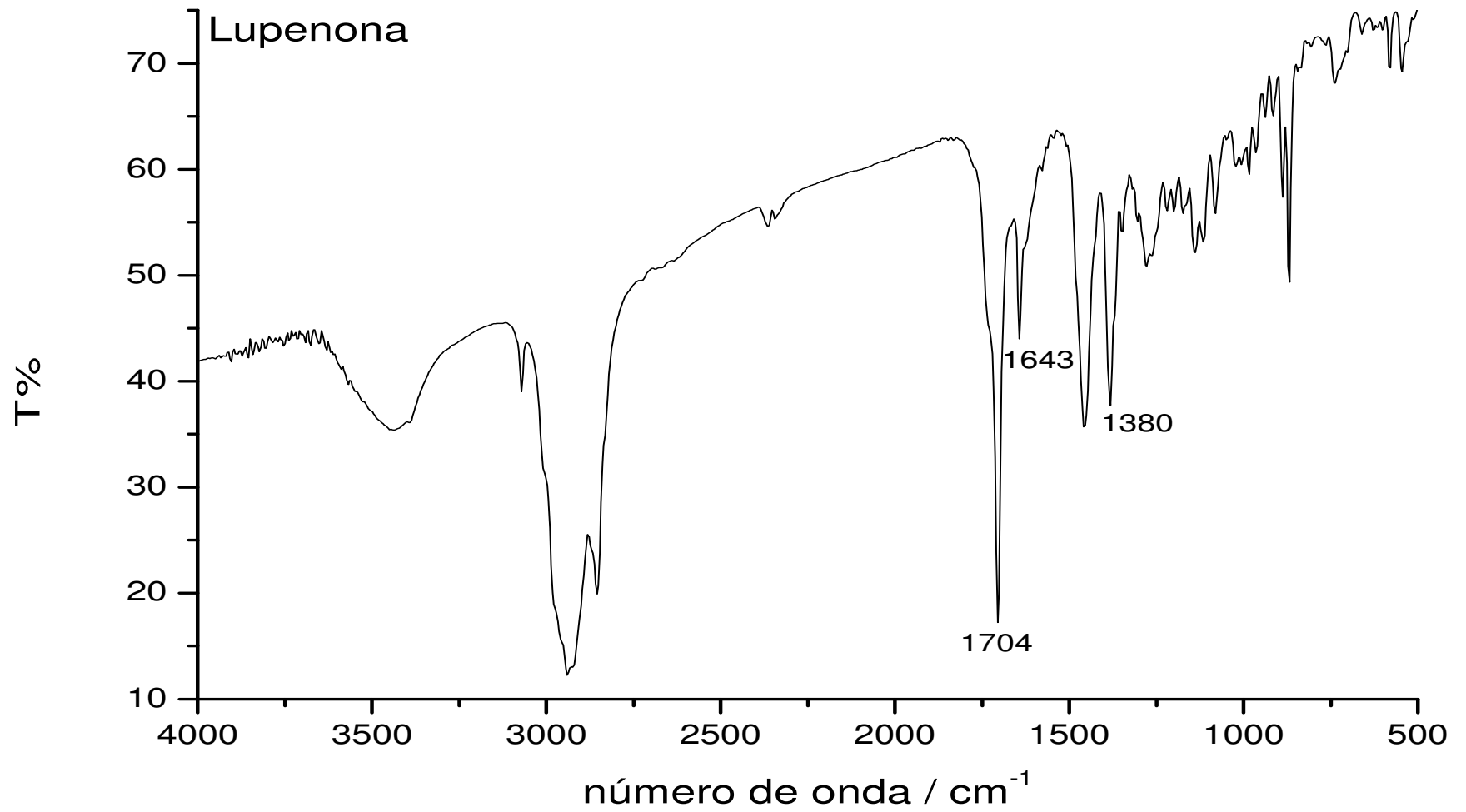


Figura 19 – Espectro no infravermelho da lupenona (MSI-01)

Tabela 04 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da lupenona isolada da *M. stipitatum* e da lupenona (CDCl_3 ; 75 MHz) relatada no trabalho de Luz et al. (2010)

N. da cadeia	DEPT	δ_c (Literatura)	δ_c (<i>M. stipitatum</i>)
01	CH ₂	39,5	39,8
02	CH ₂	34,1	34,6
03	C	218,5	218,6
04	C	47,3	47,6
05	CH	54,8	55,1
06	CH ₂	19,6	19,9
07	CH ₂	33,5	33,7
08	C	40,7	41,0
09	CH	49,7	50,0
10	C	36,8	37,1
11	CH ₂	21,4	21,7
12	CH ₂	25,1	25,3
13	CH	38,1	38,3
14	C	42,9	43,1
15	CH ₂	27,4	27,6
16	CH ₂	35,4	35,7
17	C	42,9	43,2
18	CH	48,2	48,4
19	CH	47,9	48,2
20	C	150,8	150,1
21	CH ₂	29,8	30,0
22	CH ₂	39,9	40,2
23	CH ₃	26,6	26,8
24	CH ₃	21,0	21,3
25	CH ₃	15,7	16,0
26	CH ₃	15,9	16,2
27	CH ₃	14,4	14,7
28	CH ₃	17,9	18,2
29	CH ₂	109,3	109,6
30	CH ₃	19,3	19,5

4.1.2 Mistura de acetato de β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)

A proposição da estrutura do acetato de β -sitosterol (Figura 20) constituinte majoritário na mistura com acetato de lupeol, baseou-se inicialmente no dados de RMN de ^{13}C (Figuras 21, 22A e B, 23A e B, 24A e B e 25) onde os 31 sinais de carbonos apresentados eram condizentes com sinais de fitoesteroides acetilado, evidenciando os sinais característico de insaturação em δ_{C} 139,8 e 122,9 (C-05 e C-06 respectivamente), carbono carbinólico em δ_{C} 74,2 (C-03) e de carbono carbonílico em δ_{C} 170,8 (C-01'), este último confirmado no infravermelho (Figura 26).

O RMN de ^1H (Figura 27) reforçou o caráter de fitoesteróide acetilado apresentando os deslocamentos de sete metilas, um duplete de hidrogênio metínico CH-6 em δ_{H} 5,38 (4,8 Hz), um multiplete de hidrogênio carbinólico (δ_{H} 4,54 – 4,66) e hidrogênios alifáticos na região entre δ_{H} 0,80 a 2,00 (Figura 28).

O espectro de massas apresentou o pico base 396 (m/z), esse pico corresponde à perda de ácido acético do íon molecular, o pico do íon molecular 456D não foi observado (Figura 29A e 29B). O restante da fragmentação foi compatível com a molécula do β -sitosterol, tendo sido essa efetivamente indicada pela biblioteca do equipamento.

Baseado nos sinais de RMN de ^{13}C e de ^1H com deslocamentos típicos de fitoesteroides acetilados, somado à sugestão do espectro de massas, foi feita uma busca na literatura sendo observado que Kovganko et al. (1999) atribuíram valores de RMN de ^{13}C para o acetato de β -sitosterol semelhantes de aos encontrados para o isolada da *M. stipitatum* (Tabela 05).

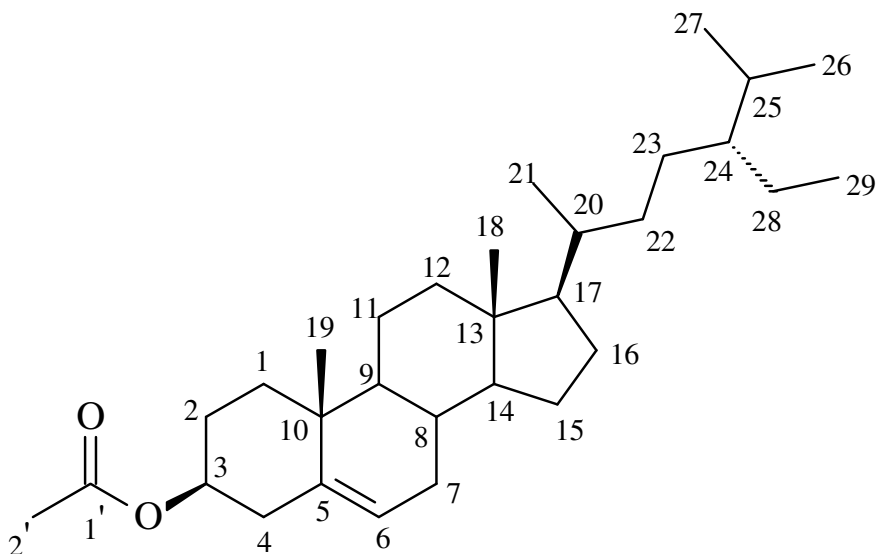


Figura 20 – Estrutura do acetato de β -sitosterol (MSI-03)

O acetato de lupeol foi isolado como componente minoritário da mistura com o acetato de β -sitosterol. Sua estrutura (Figura 30) foi proposta baseada no espectro de RMN de ^{13}C que evidenciou 32 sinais de carbonos (Figuras 21, 22A e B, 23A e B, 24A e B e 25), onde foram observados sinais característicos para grupo isoprenil (C-20, C-29 e C-30 δ_{C} 151,2, 109,6 e 19,5 respectivamente), 6 metilas alifáticas, um sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 171,3 (C-01') e um sinal de carbono carbinólico em δ_{C} 81,2 (C-03).

O espectro de DEPT 90 e 135 (Figuras 31, 32, 33, 34, 35 e 36) mostrou principalmente as 8 metilas (C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-30 e C-2'), os 10 carbonos metilênicos (C-01, C-02, C-06, C-07, C-11, C-12, C-15, C-16, C-21 e C-22) e os 6 carbonos metínicos (C-03, C-05, C-09, C-13, C-18 e C-19), sendo esses sinais característicos de triterpeno lupânico acetilado.

O espectro de RMN de ^1H reforça a proposta de triterpeno pentacíclico lupânico pela presença dos sinais característicos do metilênico terminal em δ_{H} 4,56 e 4,57 dd (1,2 Hz) e δ_{H} 4,69 d (2,1 Hz) (CH_2 -29), as 6 metilas ligadas a carbonos saturados e uma metila vinílica (CH_3 -30) (Figura 27, 28A e 28B). O espectro de massas da mistura indicou a presença do acetato de lupeol pela presença do pico do íon molecular em 468D (Figura 29A e 29B).

A partir da reação de acetilação do lupeol (através da MSI-08) foi obtida maior quantidade dessa substância com objetivo de registra-se novos espectros de ressonância do constituinte puro. O espectro de RMN de ^1H confirma a presença de todos os sinais das metilas e do H carbinólico em relação ao espectro da mistura. Alguns sinais como os H vinílicos por exemplo, antes encobertos no espectro da mistura apareceram de forma mais clara (Figuras 37, 38A e 38B). Os dados observados nos espectros de RMN de ^{13}C da mistura e na reação de acetilação (Figura 39) estão de acordo com os apresentados por Sobrinho et al. (1991) (Tabela 06).

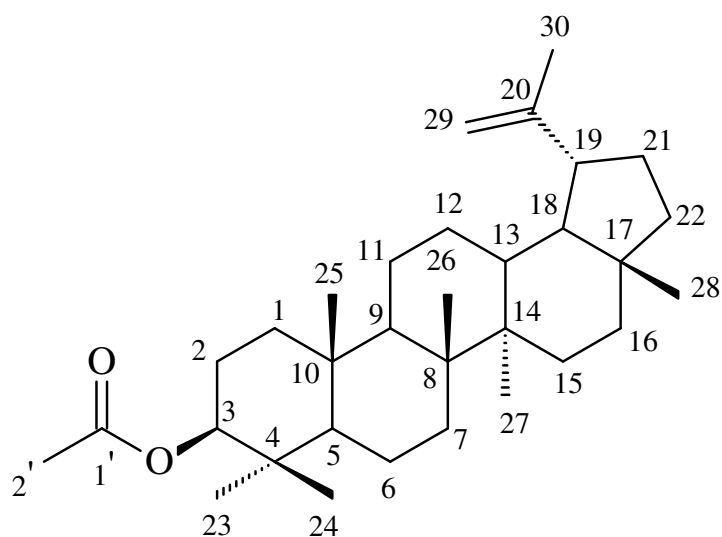


Figura 30 – Estrutura do acetato de lupeol (MSI-03)

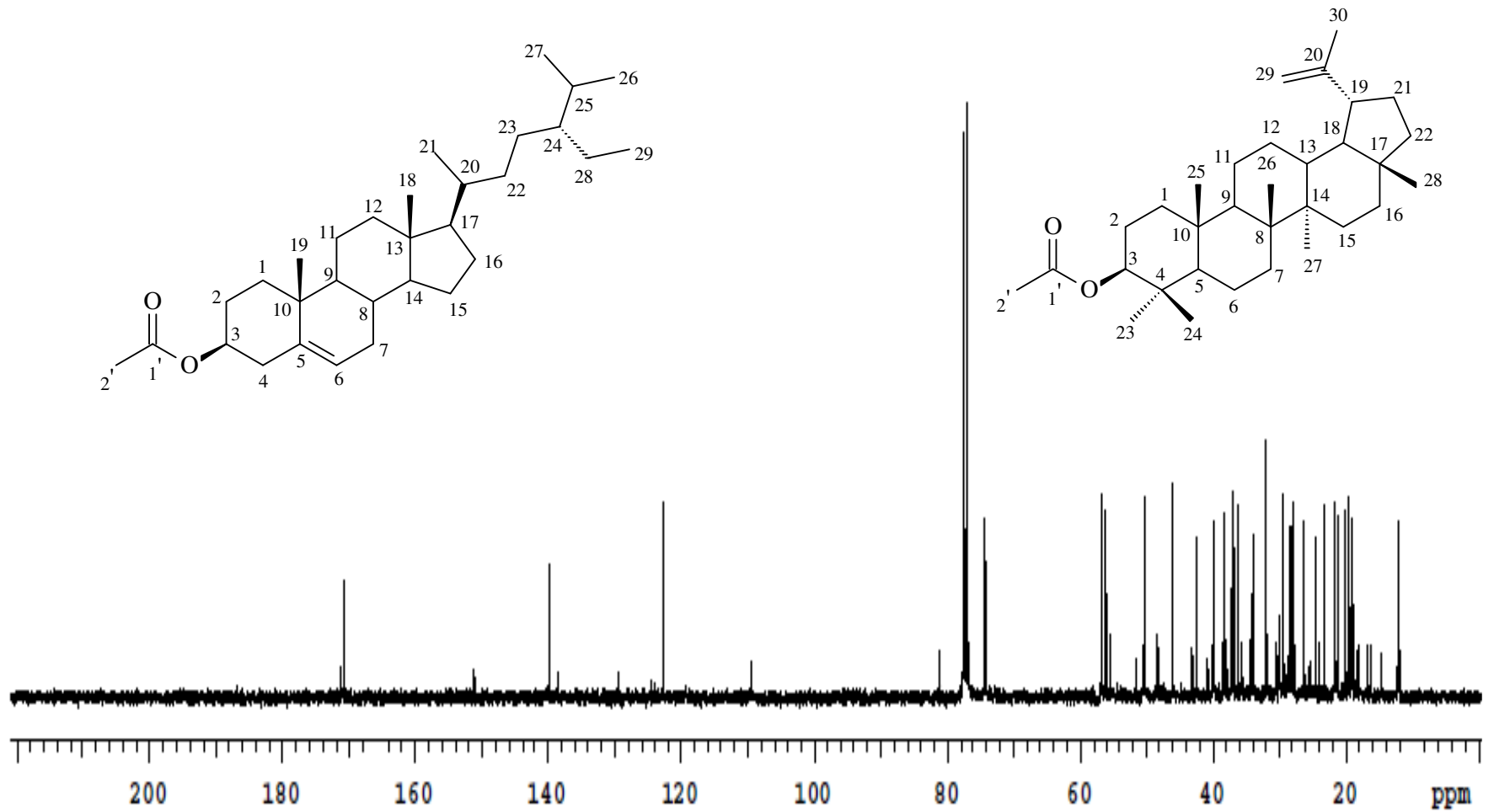


Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)

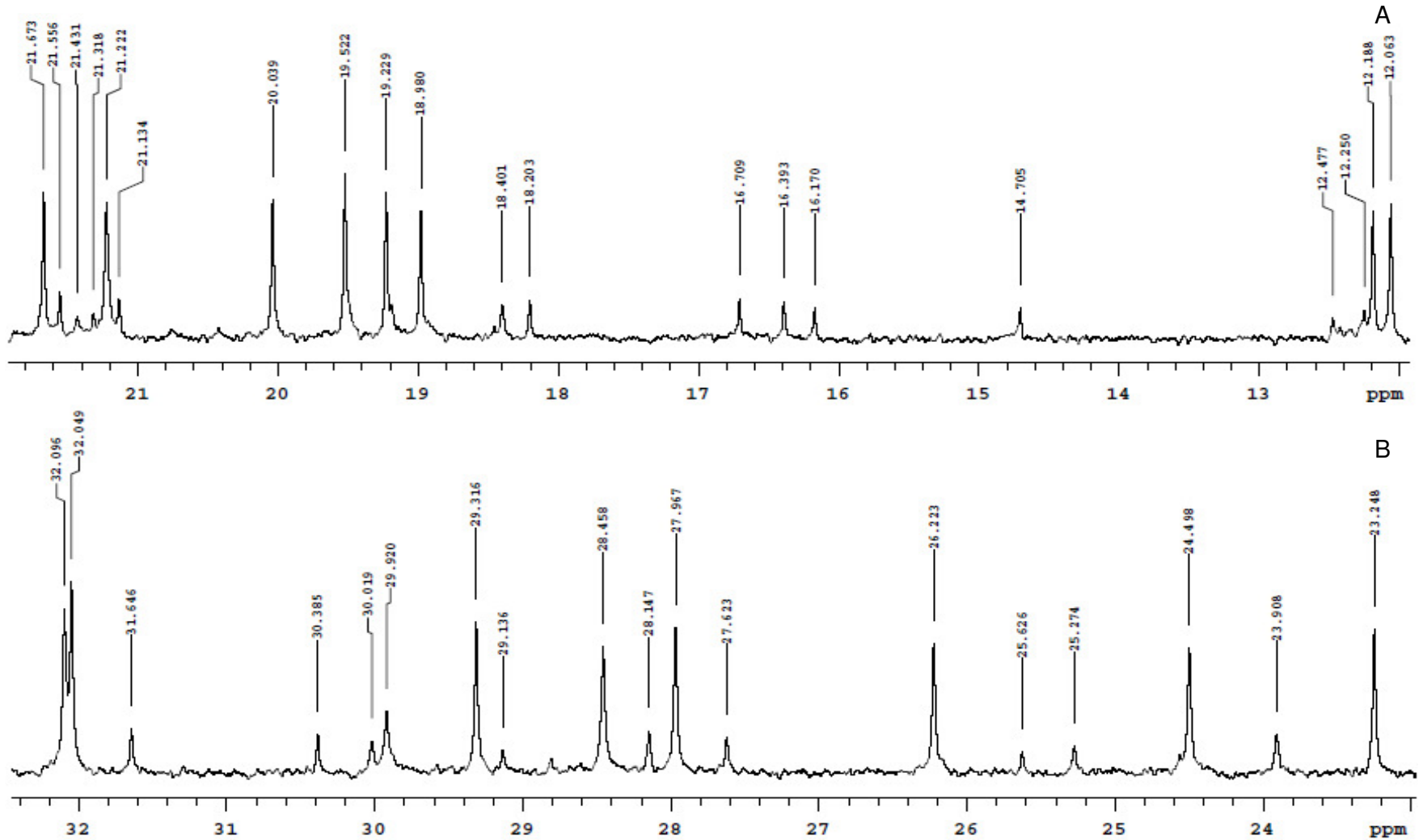


Figura 22 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 12,0 a 22,0 ppm e (B) 23,0 a 33,0 ppm (MSI-03)

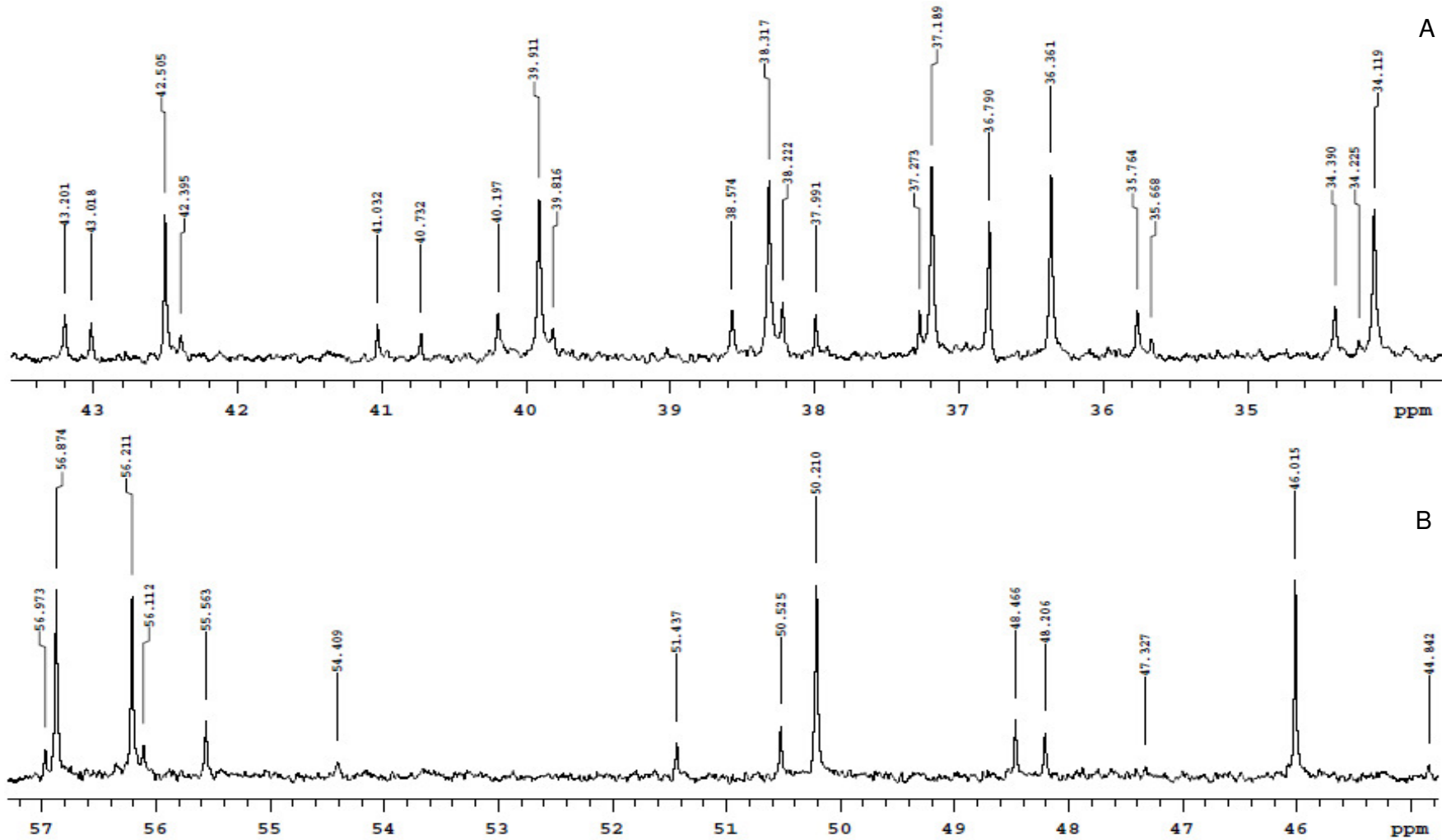


Figura 23 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 34,0 a 44,0 ppm e (B) 44,0 a 58,0 ppm (MSI-03)

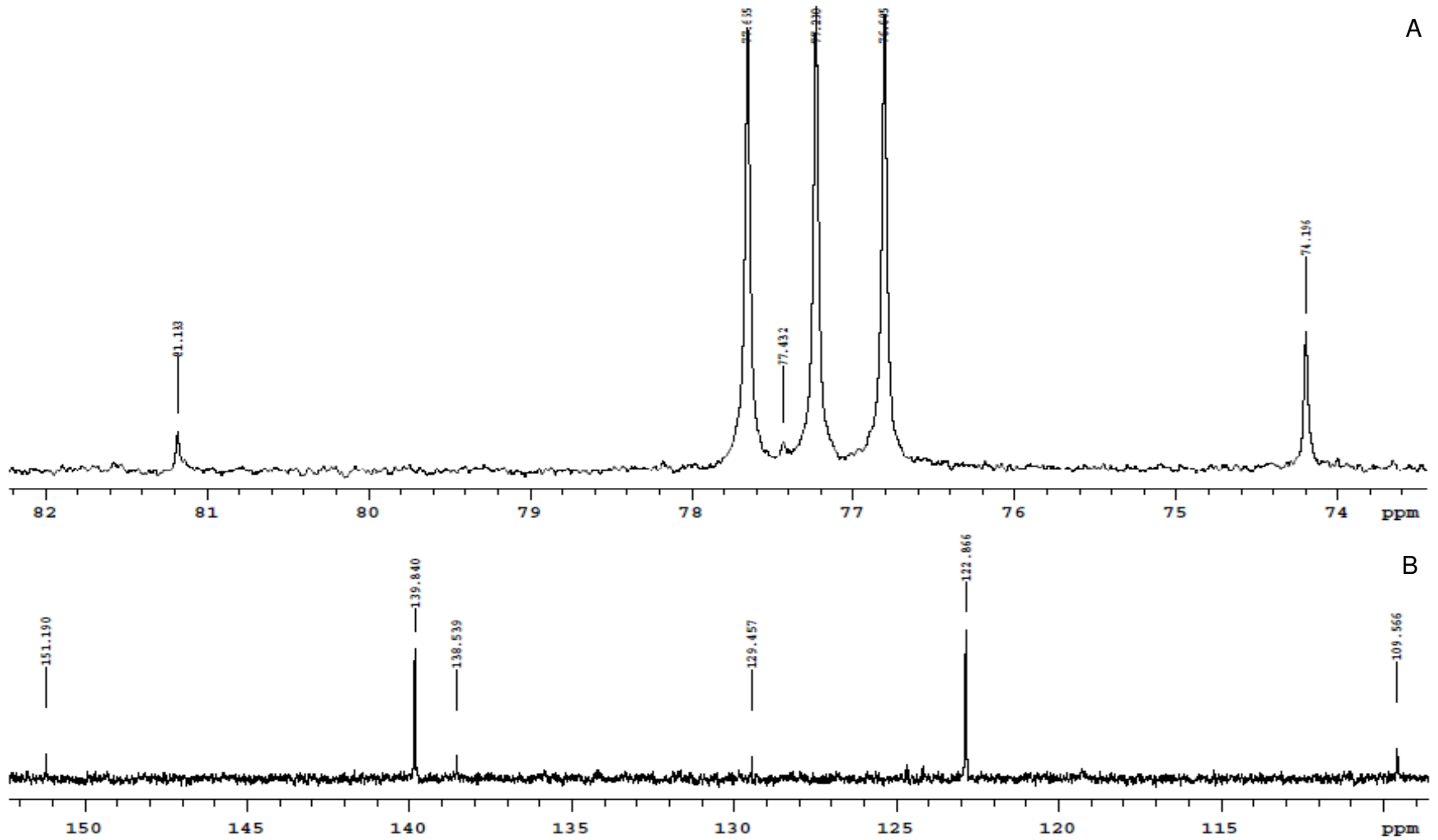


Figura 24 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 73,0 a 83,0 ppm e (B) 108,0 a 152,0 ppm (MSI-03)

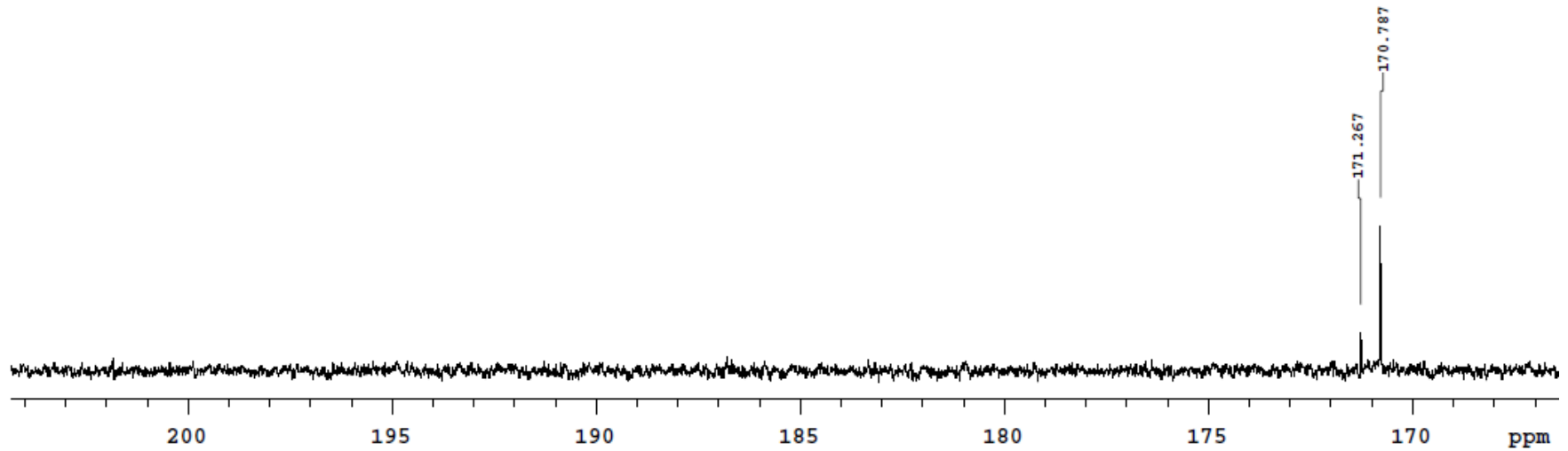


Figura 25 – Ampliação do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em 168, a 205,0 ppm

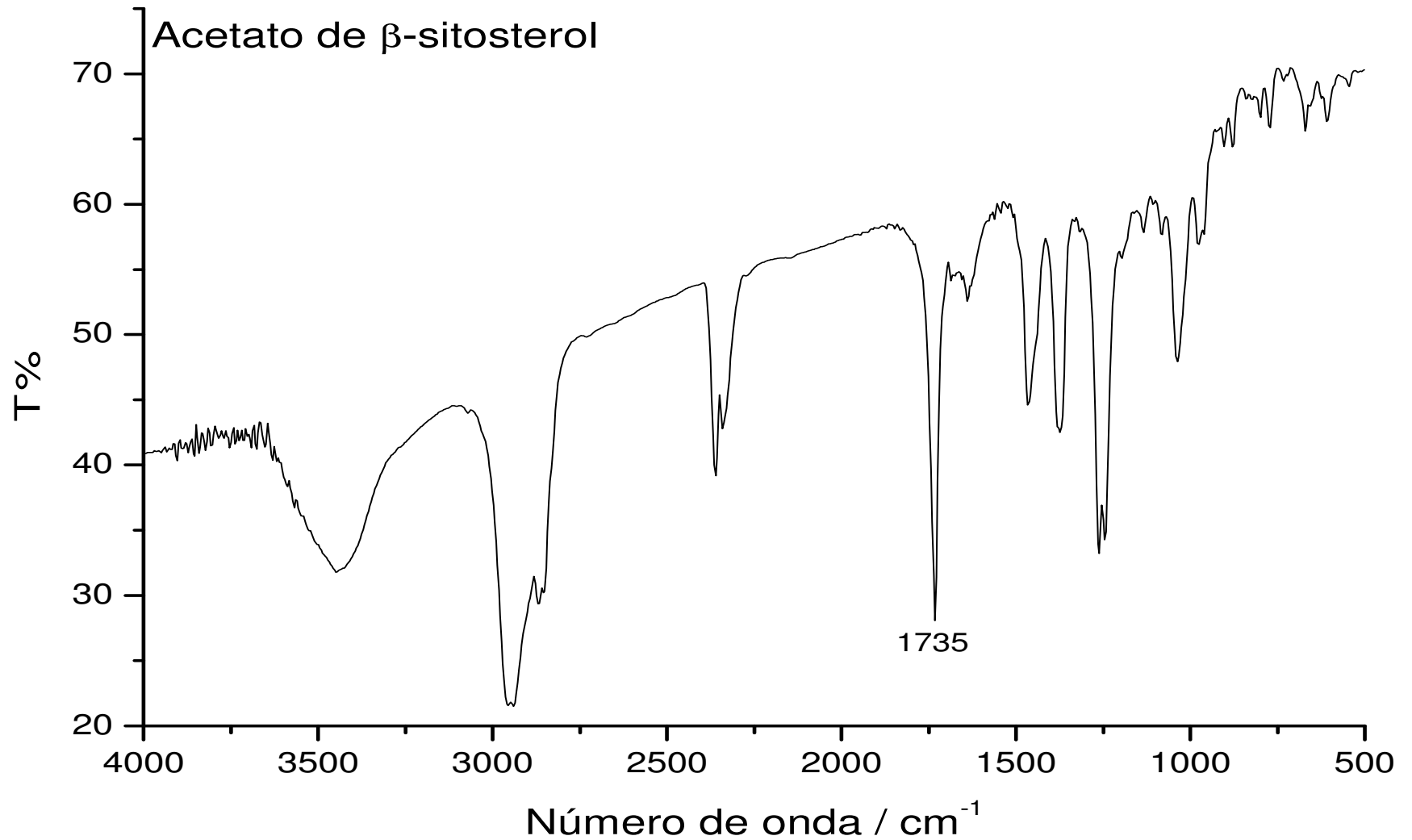


Figura 26 – Espectro no infravermelho da mistura de acetato β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)

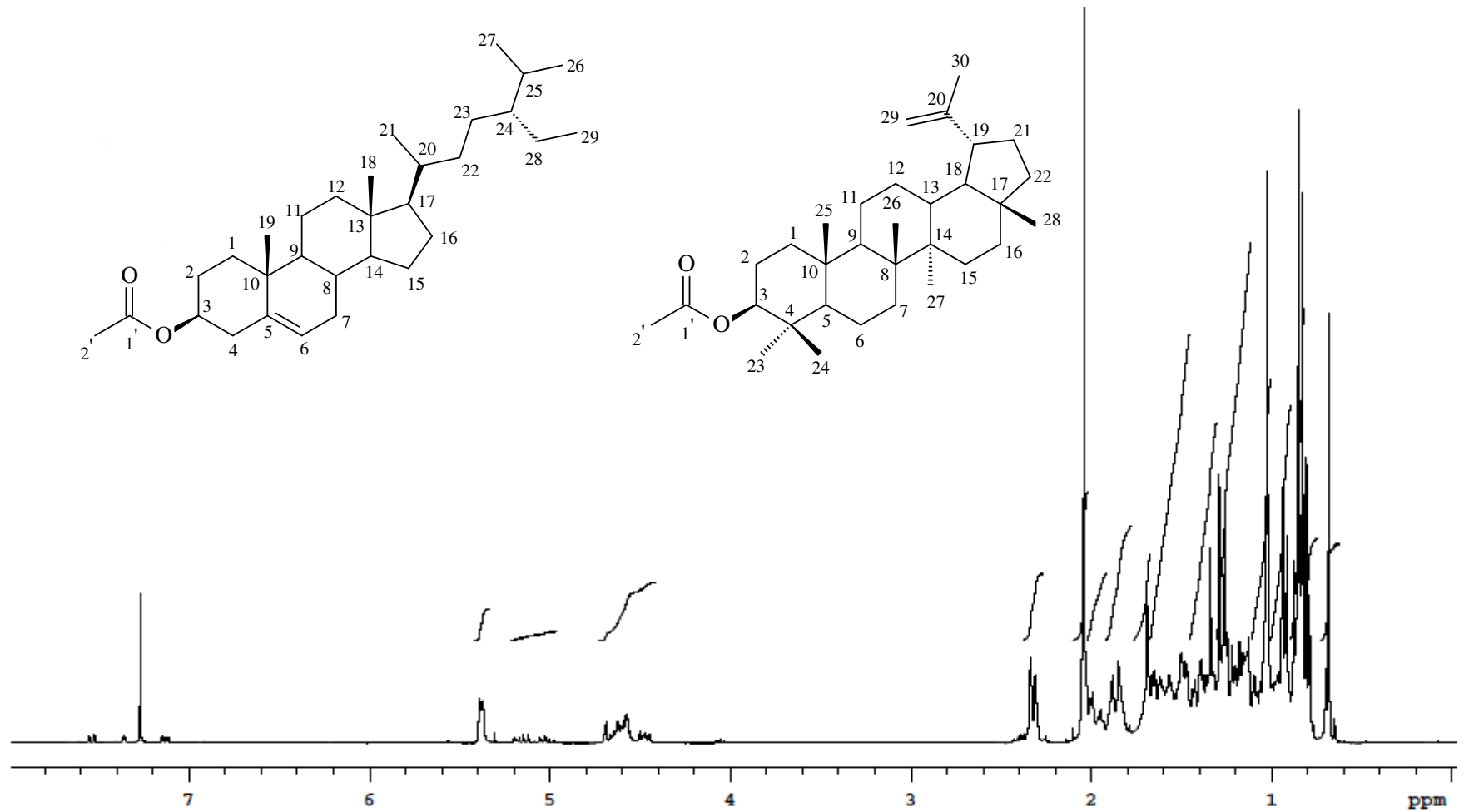


Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)

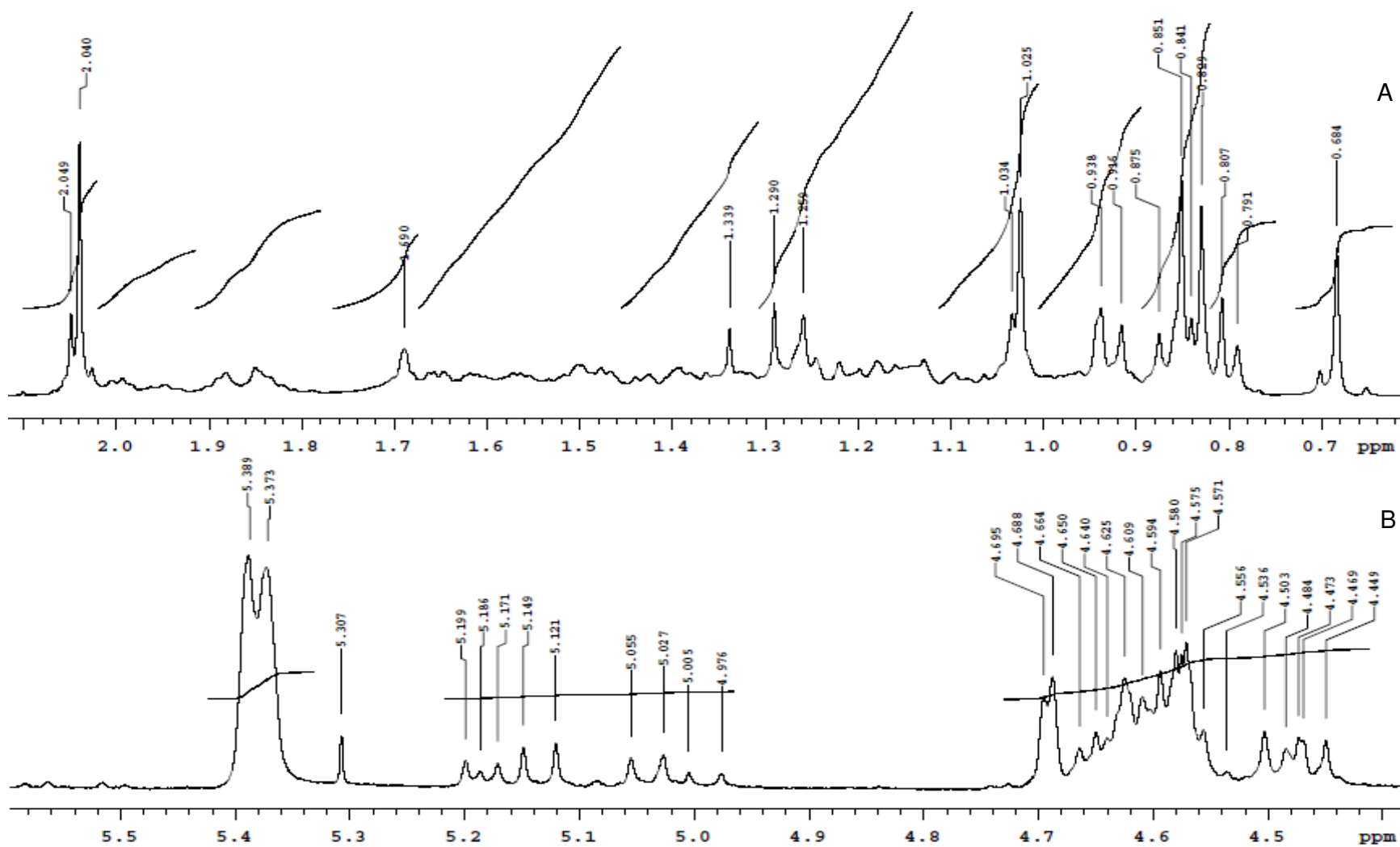


Figura 28 – Ampliações do RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da mistura de acetato de β -sitosterol e de acetato de lupeol (MSI-03) em (A) 0,60 a 2,10 ppm e (B) 4,40 a 5,60 ppm

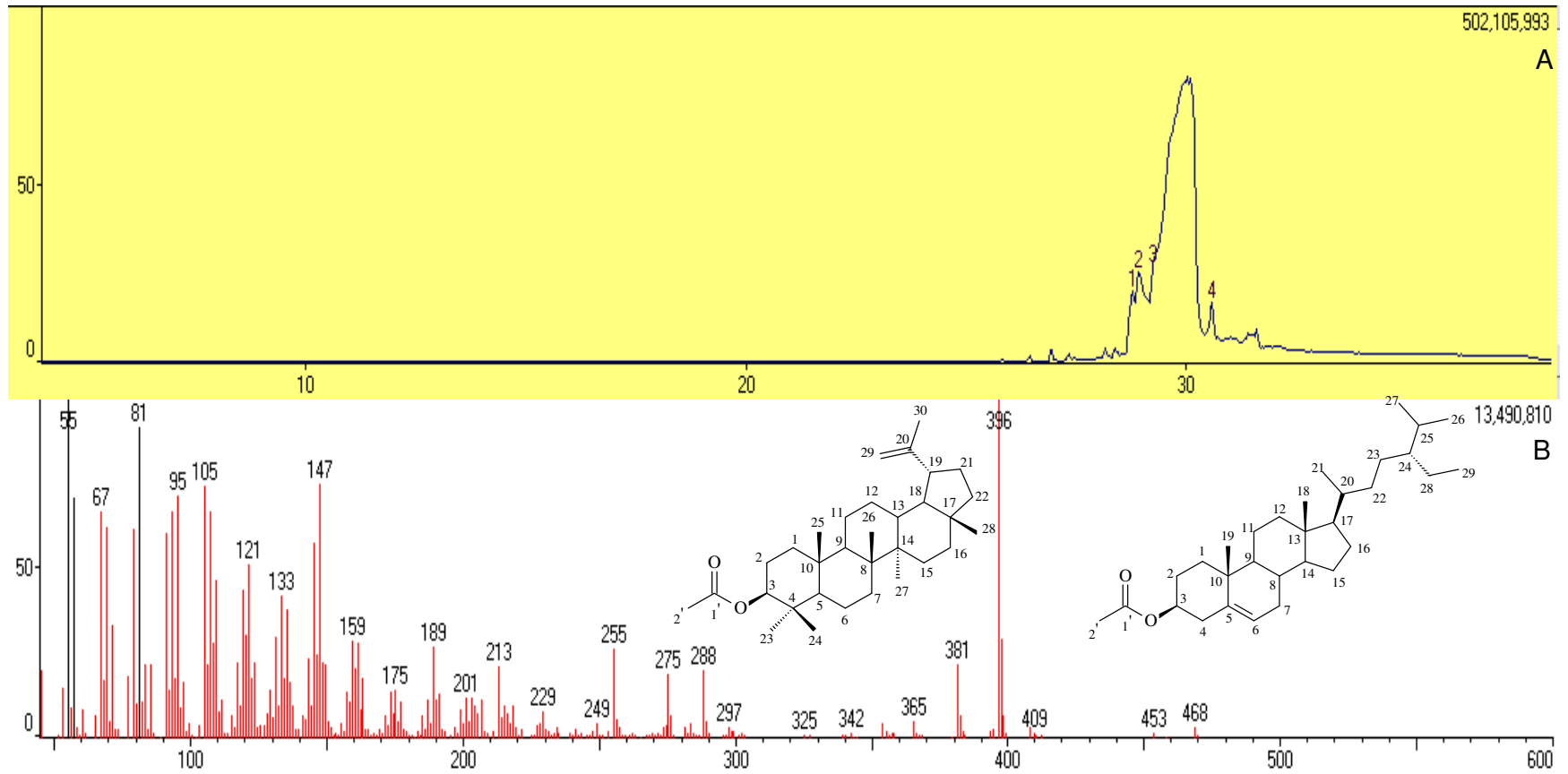


Figura 29 – Cromatograma do CG (A) e espectro de massas (B) da mistura de acetato de β -sitosterol e acetato de lupeol (MSI-03)

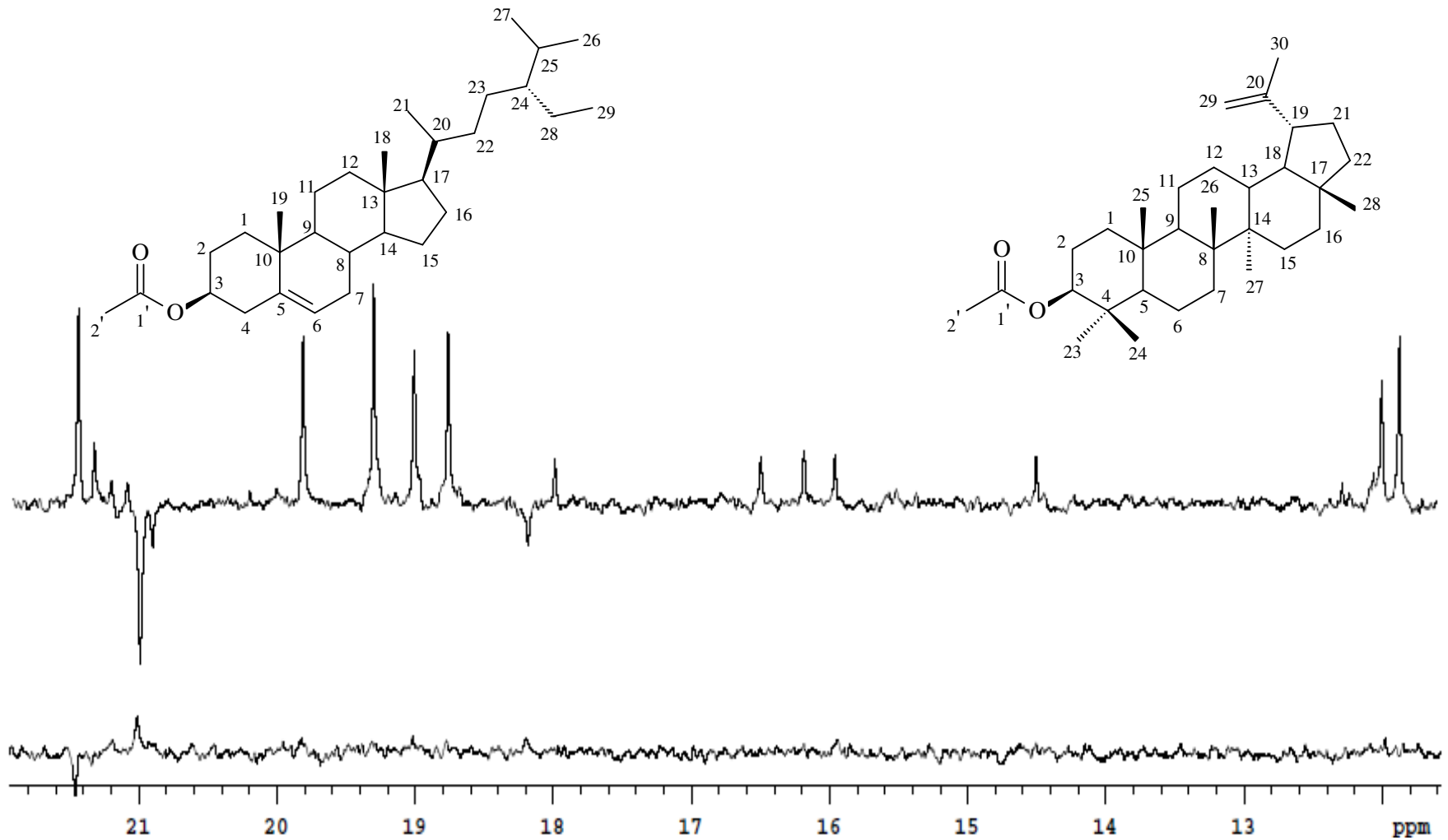


Figura 31 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 11,5 a 22,0 ppm

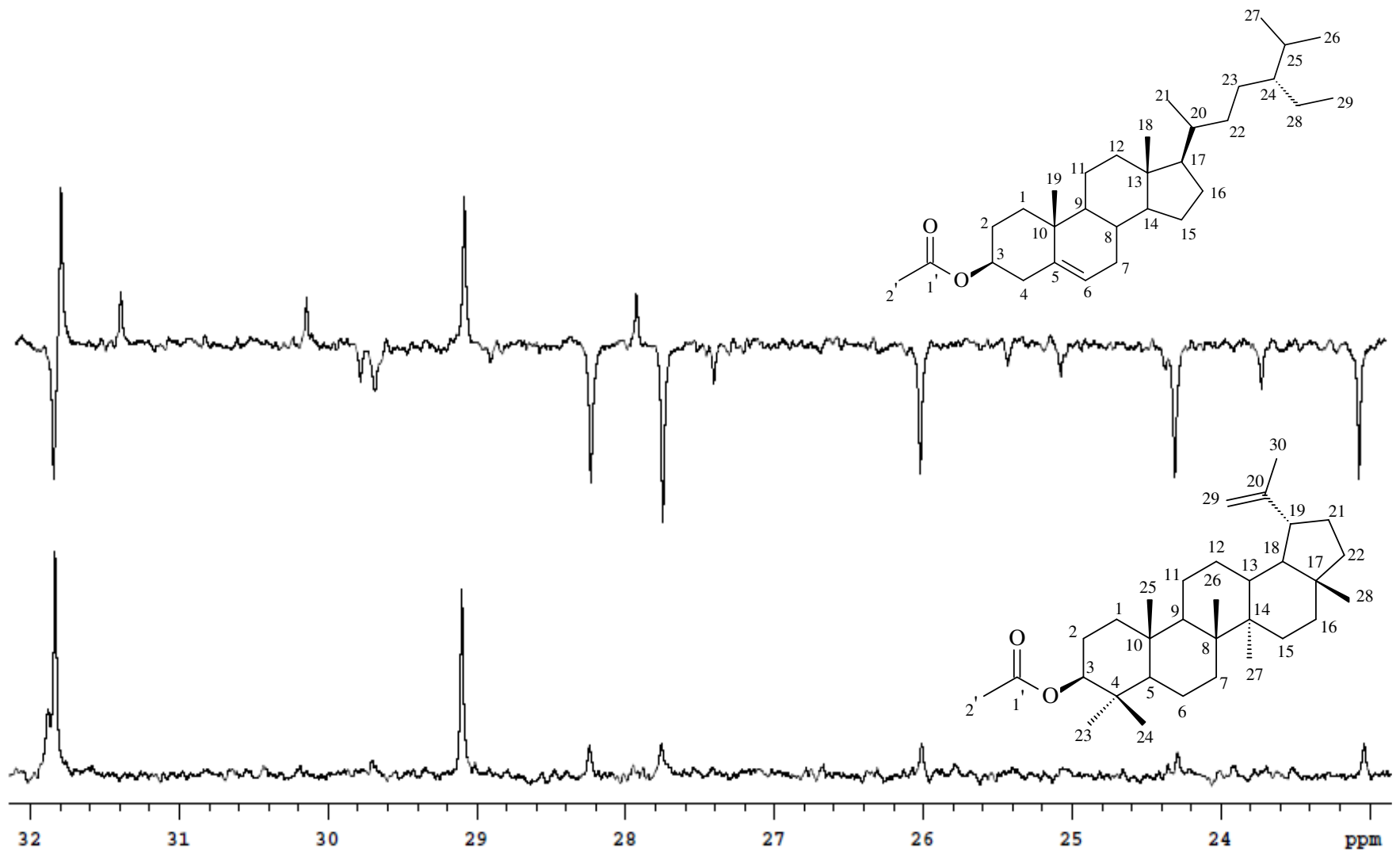


Figura 32 – Aplicação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 22,5 a 32,0 ppm

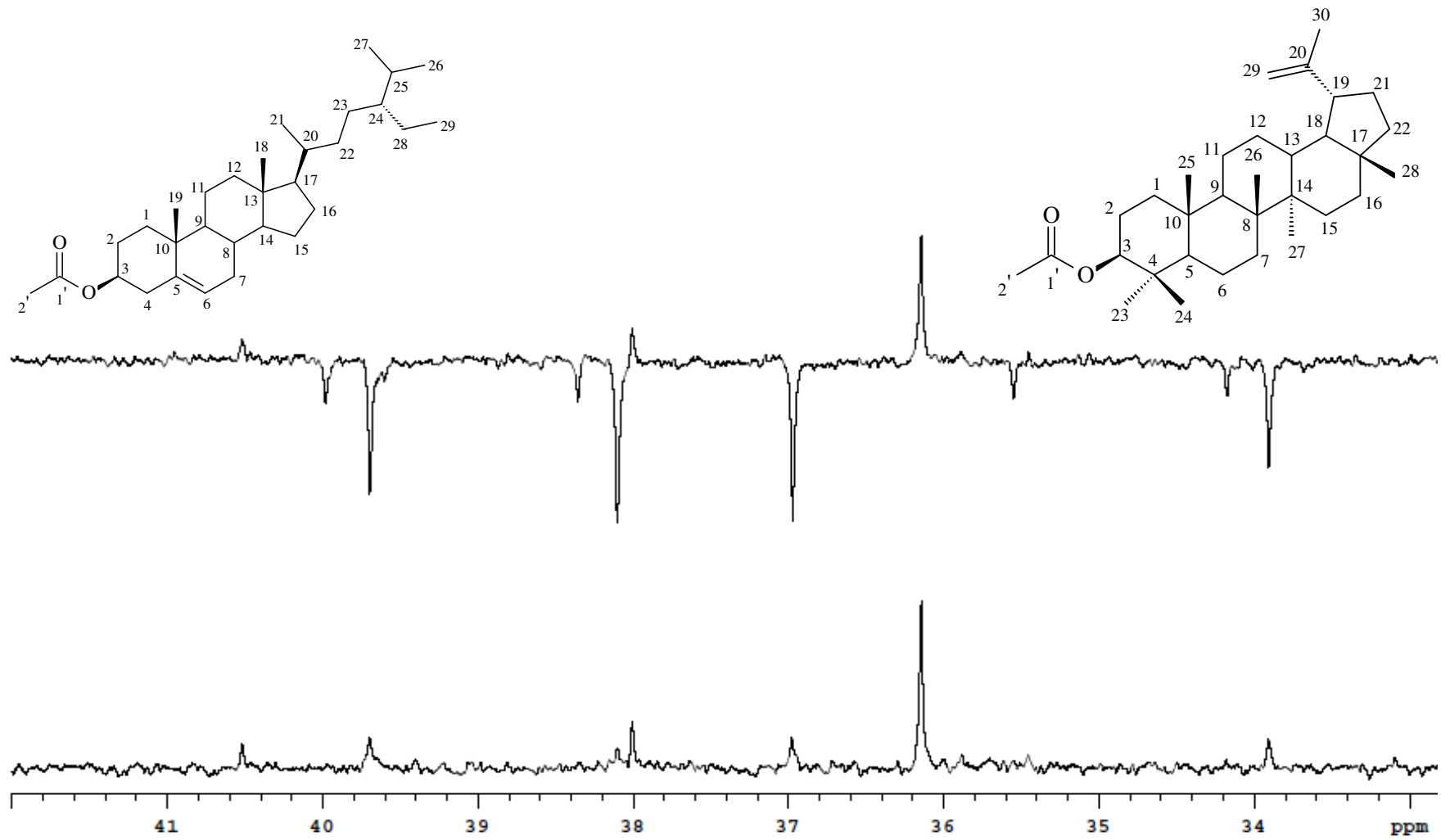


Figura 33 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 32,5 a 42,0 ppm

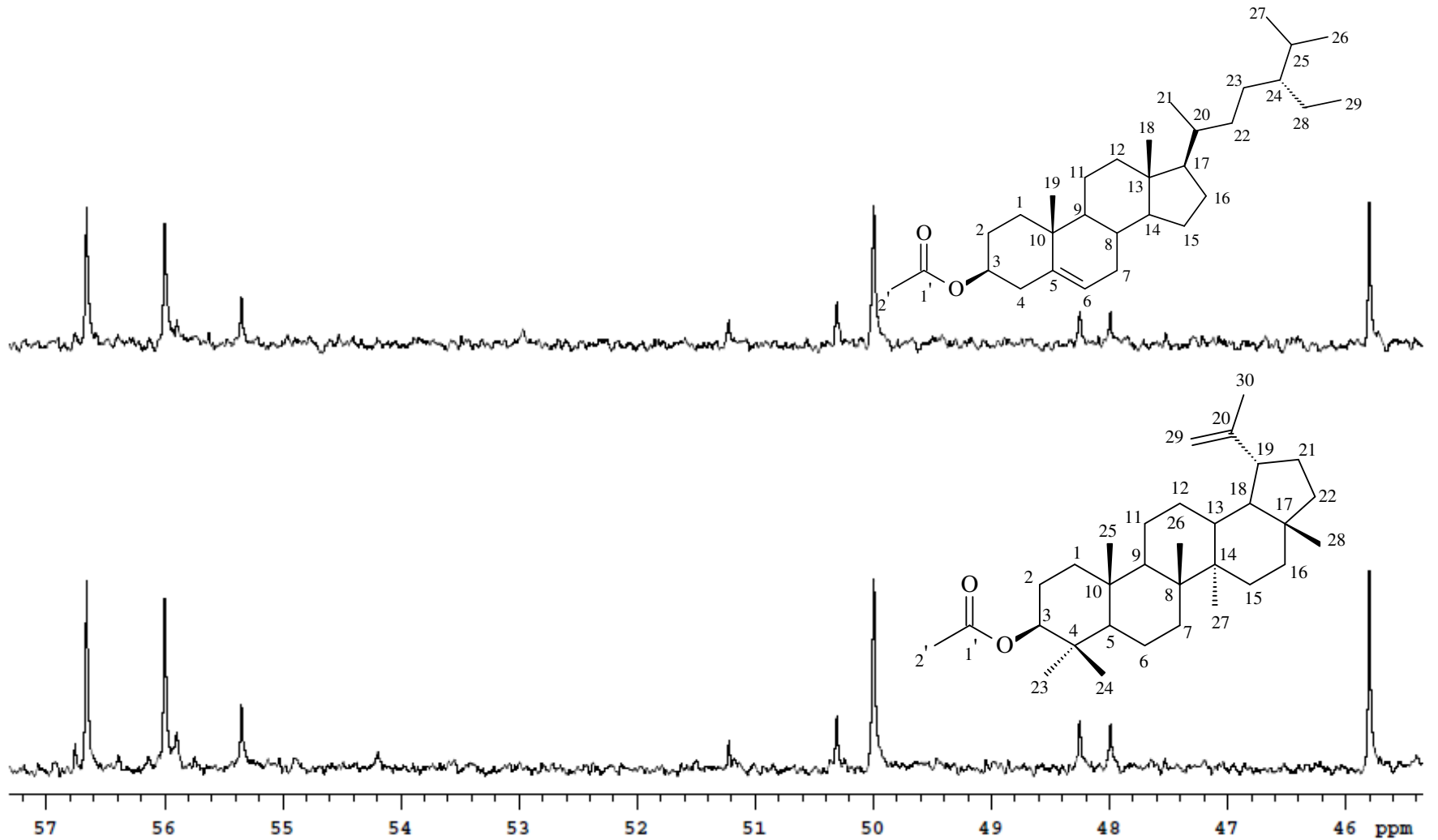


Figura 34 – Aplicação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 45,0 a 57,5 ppm

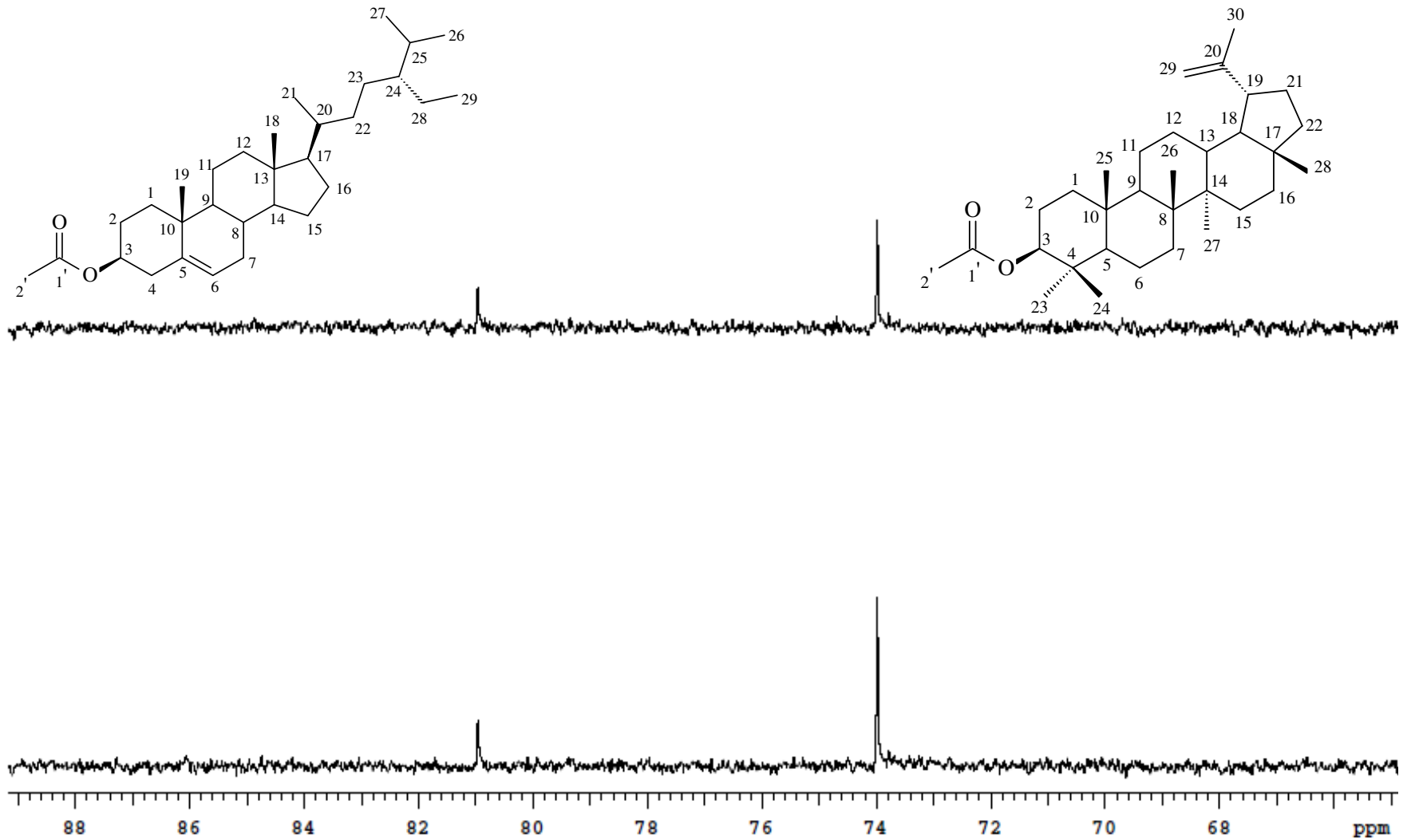


Figura 35 – Apliação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 65,0 a 89,0 ppm

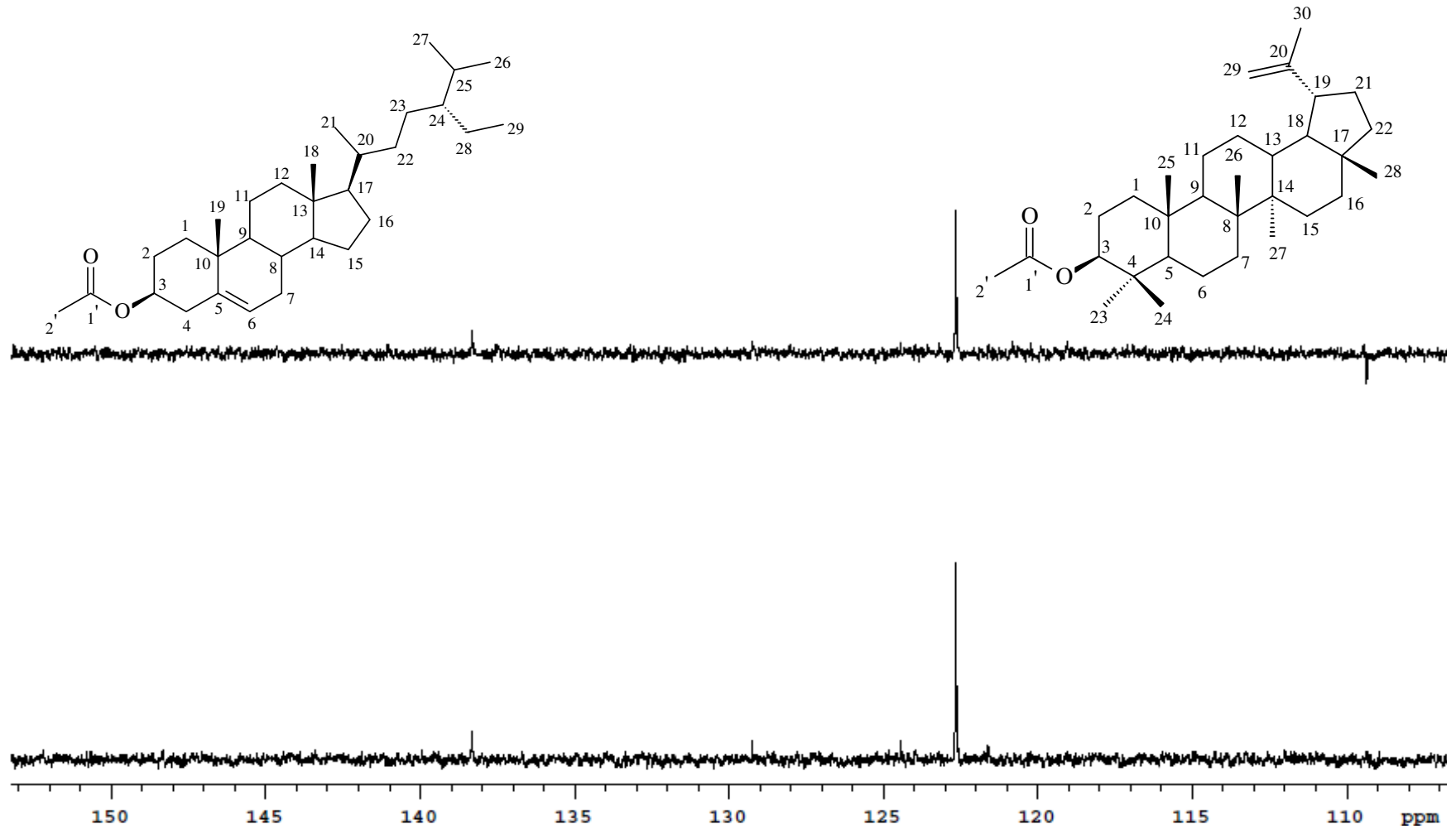


Figura 36 – Aplicação do espectro de DEPT 90 e 135 da mistura do acetato de β -sitosterol e do acetato de lupeol (MSI-03) em 105,0 a 155,0 ppm

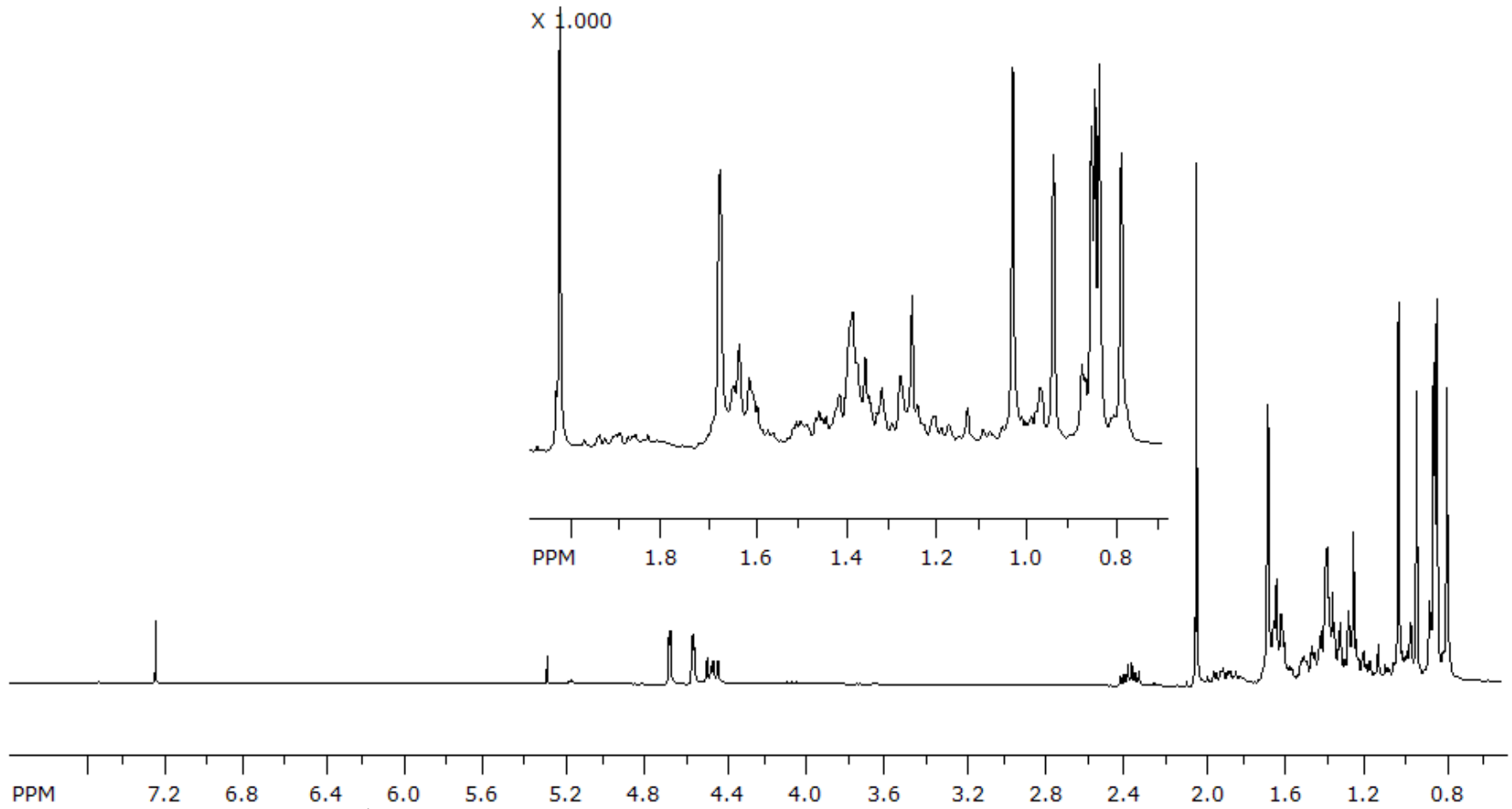


Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido através da reação de acetilação

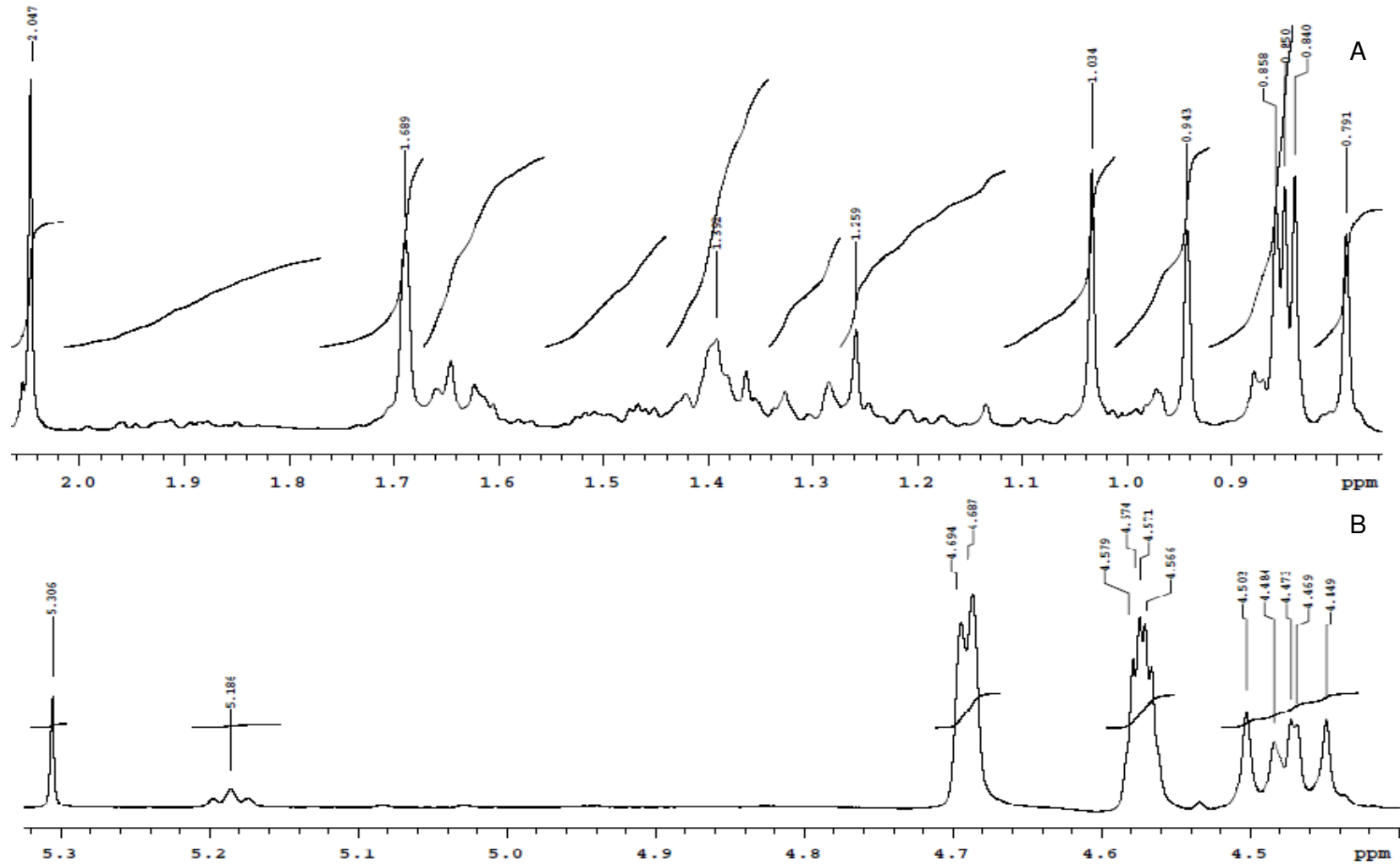


Figura 38 – Apliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido travez da reação de acetilação em (A) 0,78 a 2,60 ppm e (B) 4,40 a 5,4 ppm

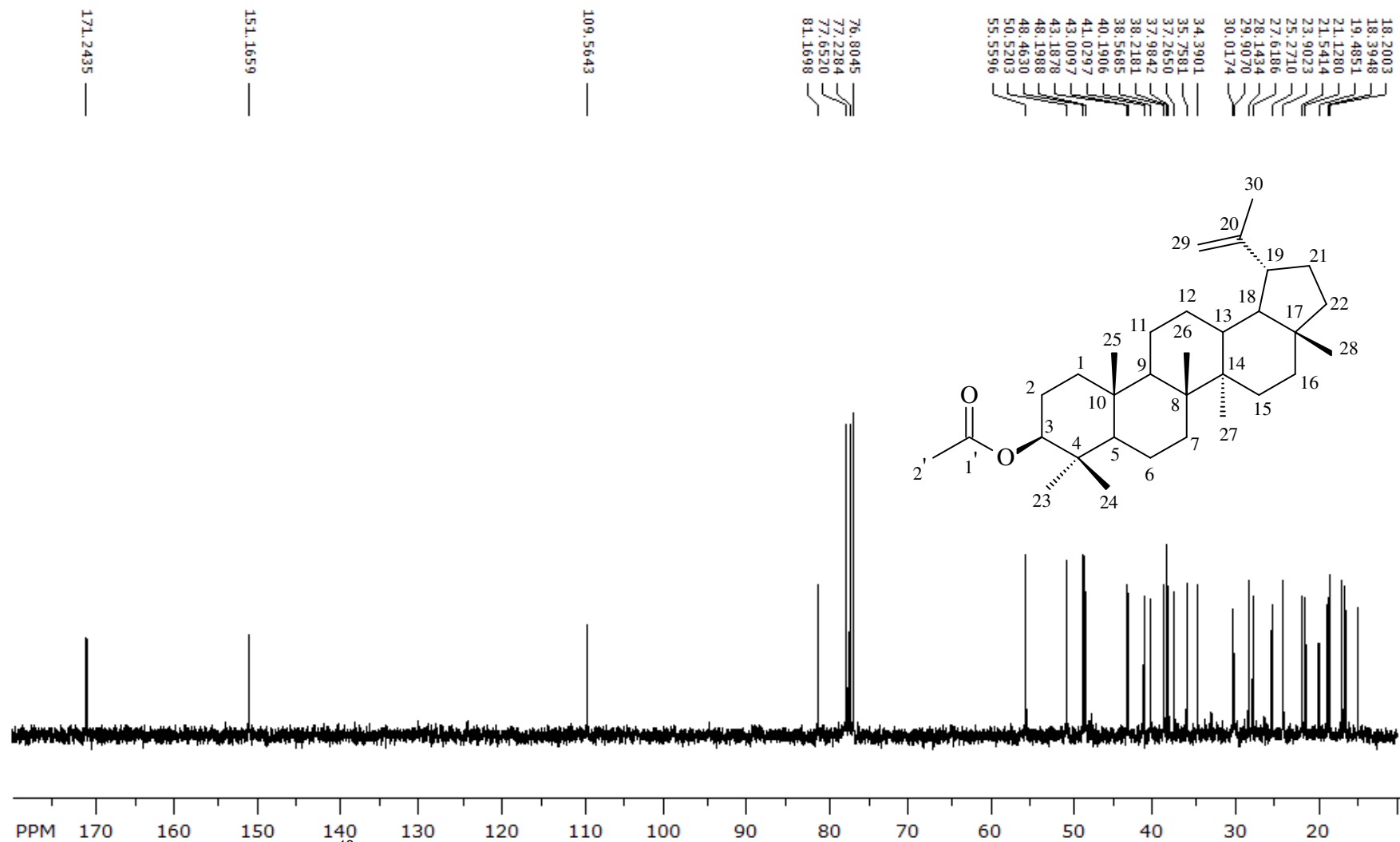


Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato de lupeol obtido através da reação de acetilação

Tabela 05 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato β -sitosterol do isolado da *M. stipitatum* e do acetato de β -sitosterol (CDCl_3 ; 100 MHz) relatado por Kovganko et al. (1999)

N. da cadeia	DEPT	δ_{C} (Literatura)	δ_{C} (<i>M. stipitatum</i>)
01	CH ₂	38,2	37,2
02	CH ₂	27,9	28,0
03	CH	73,9	74,2
04	CH ₂	39,8	38,3
05	C	139,7	139,8
06	CH	122,6	122,9
07	CH ₂	32,0	32,1
08	CH	32,0	32,1
09	CH	50,2	50,2
10	C	37,1	36,8
11	CH ₂	21,1	21,2
12	CH ₂	39,8	39,9
13	C	42,4	42,5
14	CH	56,8	56,9
15	CH ₂	24,4	24,5
16	CH ₂	28,3	28,5
17	CH	56,2	56,2
18	CH ₃	11,9	12,2
19	CH ₃	19,1	19,5
20	CH	36,7	36,4
21	CH ₃	18,8	19,2
22	CH ₂	34,1	34,1
23	CH ₂	26,3	26,2
24	CH	46,0	46,0
25	CH	29,1	29,3
26	CH ₃	19,3	19,0
27	CH ₃	19,8	20,4
28	CH ₂	23,2	23,3
29	CH ₃	11,9	12,1
1'	C	170,4	170,8
2'	CH ₃	21,4	21,7

Tabela 06 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do acetato do lupeol isolado da *M. stipitatum*, do acetato de lupeol da reação de acetilação e do relatado (CDCl_3 ; 200 MHz) por Sobrinho et al. (1991)

N. da cadeia	DEPT	δ_{C} (Literatura)	δ_{C} (<i>M. stipitatum</i>)	δ_{C} (acetilação)
01	CH ₂	38,56	38,57	38,57
02	CH ₂	23,61	23,91	23,90
03	CH	80,68	81,18	81,17
04	C	37,68	37,99	37,98
05	CH	55,29	55,56	55,56
06	CH ₂	17,95	18,40	18,40
07	CH ₂	34,17	34,39	34,40
08	C	40,77	41,03	41,03
09	CH	50,26	50,52	50,52
10	C	36,98	37,27	37,27
11	CH ₂	20,61	21,13	21,13
12	CH ₂	26,54	25,27	25,27
13	CH ₂	37,96	38,22	38,22
14	C	42,73	43,02	43,01
15	CH ₂	27,38	27,62	27,62
16	CH ₂	35,50	35,76	35,76
17	C	42,88	43,20	43,19
18	CH	48,21	48,47	48,46
19	CH	47,89	48,21	48,20
20	C	150,39	151,19	151,16
21	CH ₂	29,75	30,02	30,02
22	CH ₂	39,94	40,20	40,19
23	CH ₃	28,00	28,15	28,14
24	CH ₃	15,94	16,71	16,70
25	CH ₃	16,14	16,17	16,16
26	CH ₃	16,46	16,39	16,38
27	CH ₃	14,46	14,70	14,70
28	CH ₃	17,49	18,20	18,20
29	CH ₂	109,27	109,57	109,57
30	CH ₃	19,24	19,50	19,48
1'	C	170,43	171,27	171,24
2'	CH ₃	21,17	21,56	21,54

4.1.3 Lupeol (MSI-08)

A estrutura do lupeol (Figura 40) foi sugerida principalmente pelos dados da espectrometria de massas (Figura 41A, 41B e 41C), ela apresentou o pico do íon molecular 426D e os picos das fragmentações em 409, 218, 207 e 189 (m/z), estando estes últimos de acordo com o padrão de fragmentação proposto por Fotie et al. (2006).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 30 sinais de carbonos, sendo os mais evidentes os sinais do grupo isopropenil em δ_{C} 151,2, 109,5 e 19,5 (C-20, C-29 e C-30 respectivamente), das 6 metilas alifáticas e do sinal de carbono carbinólico em δ_{C} 79,2 (C-03) (Figuras 42A, 42B, 43A e 43B). O espectro de DEPT 90 e 135 (Figura 44) confirmou a presença das 7 metilas (C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28 e C-30), dos 10 carbonos metilênicos (C-01, C-02, C-06, C-07, C-11, C-12, C-15, C-16, C-21 e C-22) e dos 6 carbonos metínicos (C-03, C-05, C-09, C-13, C-18 e C-19), sendo esse sinais compatíveis aos de um triterpeno lupânico.

O espectro de RMN de ^1H reforça a proposta pela presença dos sinais característicos do metilênico terminal em δ_{H} 4,56 e 4,57 dd (1,2 Hz) e 4,69 d (2,1 Hz) (CH_2 -29), das 6 metilas ligadas a carbonos saturados em δ_{H} 0,76, 0,79, 0,95, 0,97 e 1,03, da metila vinílica em δ_{H} 1,68 (CH_3 -30) e do dd de H carbinólico em δ_{H} 3,18 (10,5 Hz) e 3,20 (11,1 Hz) (H-03) (Figuras 45, 46A, 46B e 47).

O espectro no infravermelho (Figura 48) apresenta banda de estiramento O-H (3425 cm^{-1}), duas metilas geminais em C-04 (1380 cm^{-1}) e os estiramentos do CH_2 metileno vinílico terminal em 1649 e 883 cm^{-1} (deformação angular).

Também foi observado que os dados do espectro de RMN de ^{13}C do lupeol isolado da *M. stipitatum* (Tabela 07) são similares aos apresentados por Fotie et al.(2006).

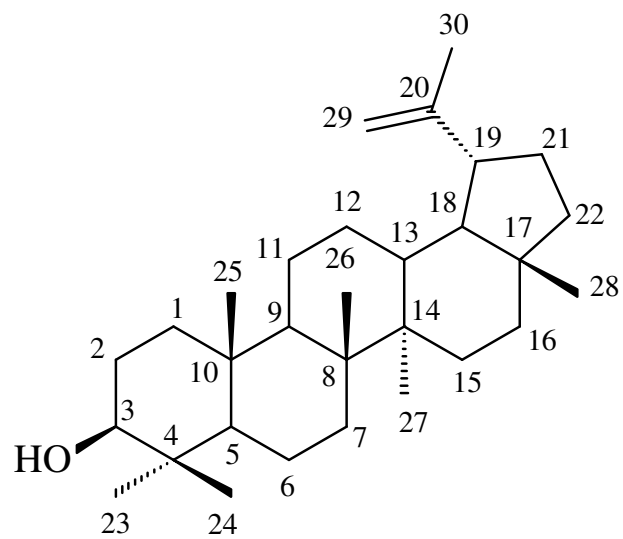


Figura 40 – Estrutura do lupeol (MSI-08)

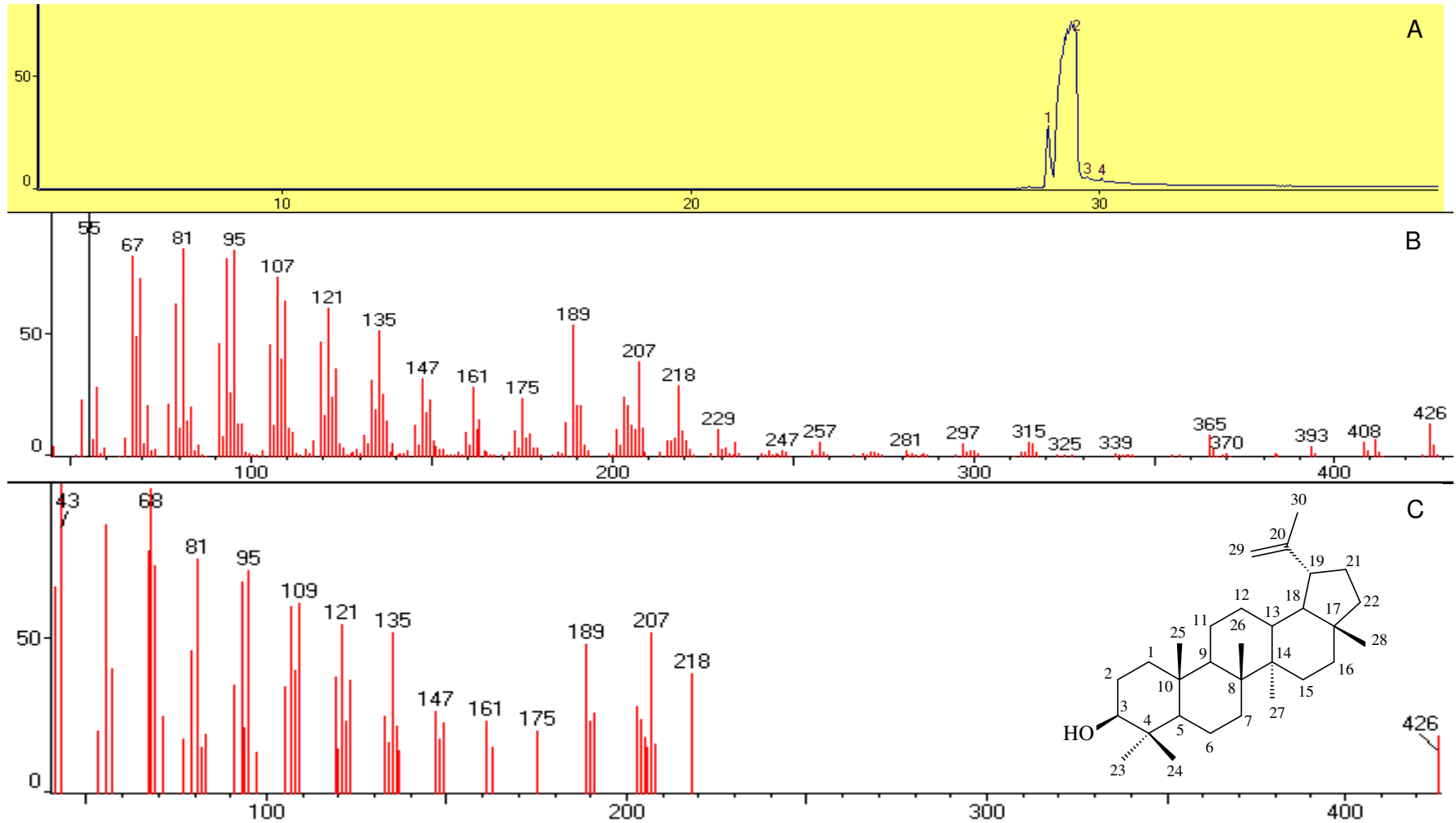


Figura 41 – Espectrometria de massas do lupeol (MSI-08), (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação e (C) sugestão da biblioteca do massas

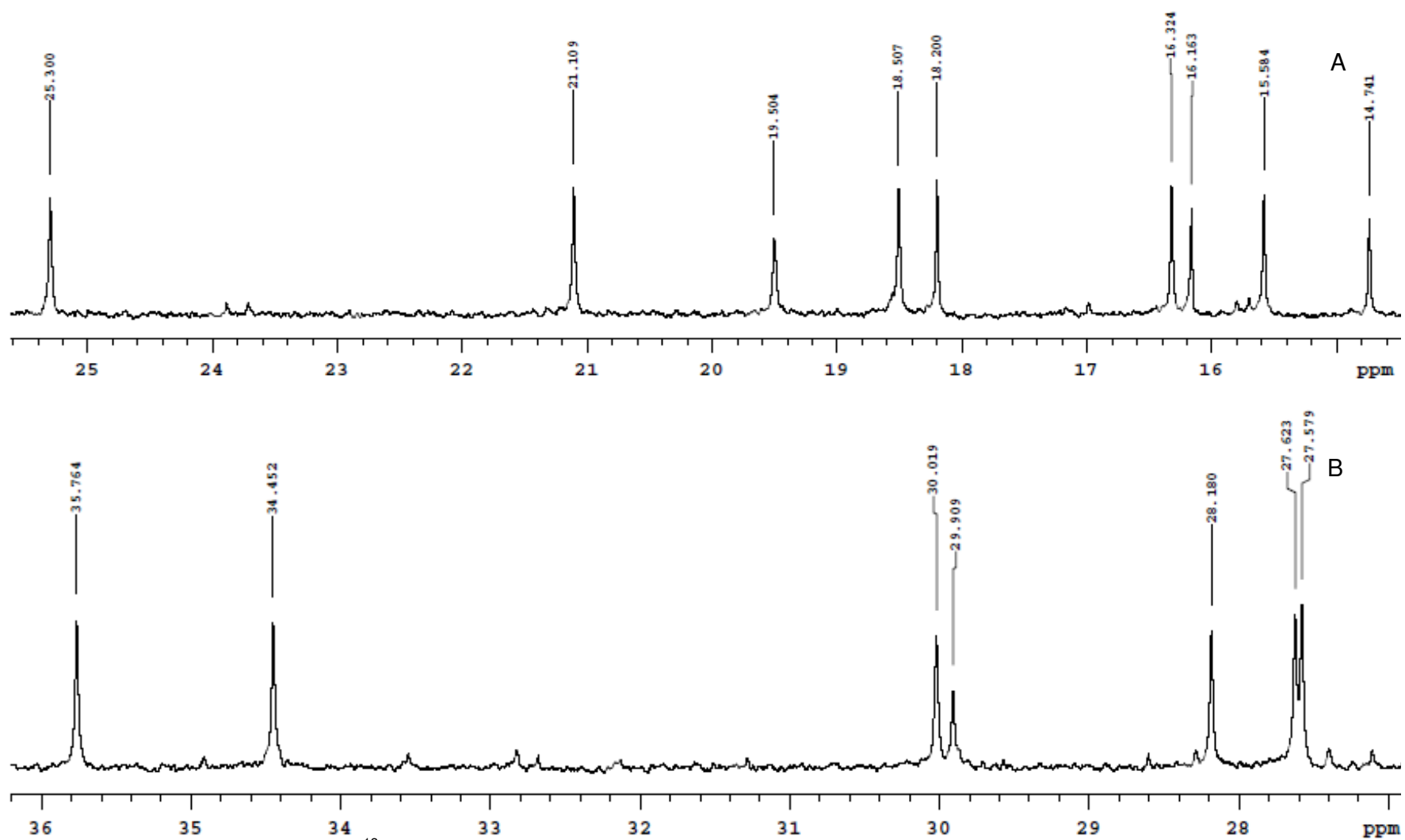


Figura 42 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 14,5 a 26,0 ppm e (B) 27,0 a 36,0 ppm

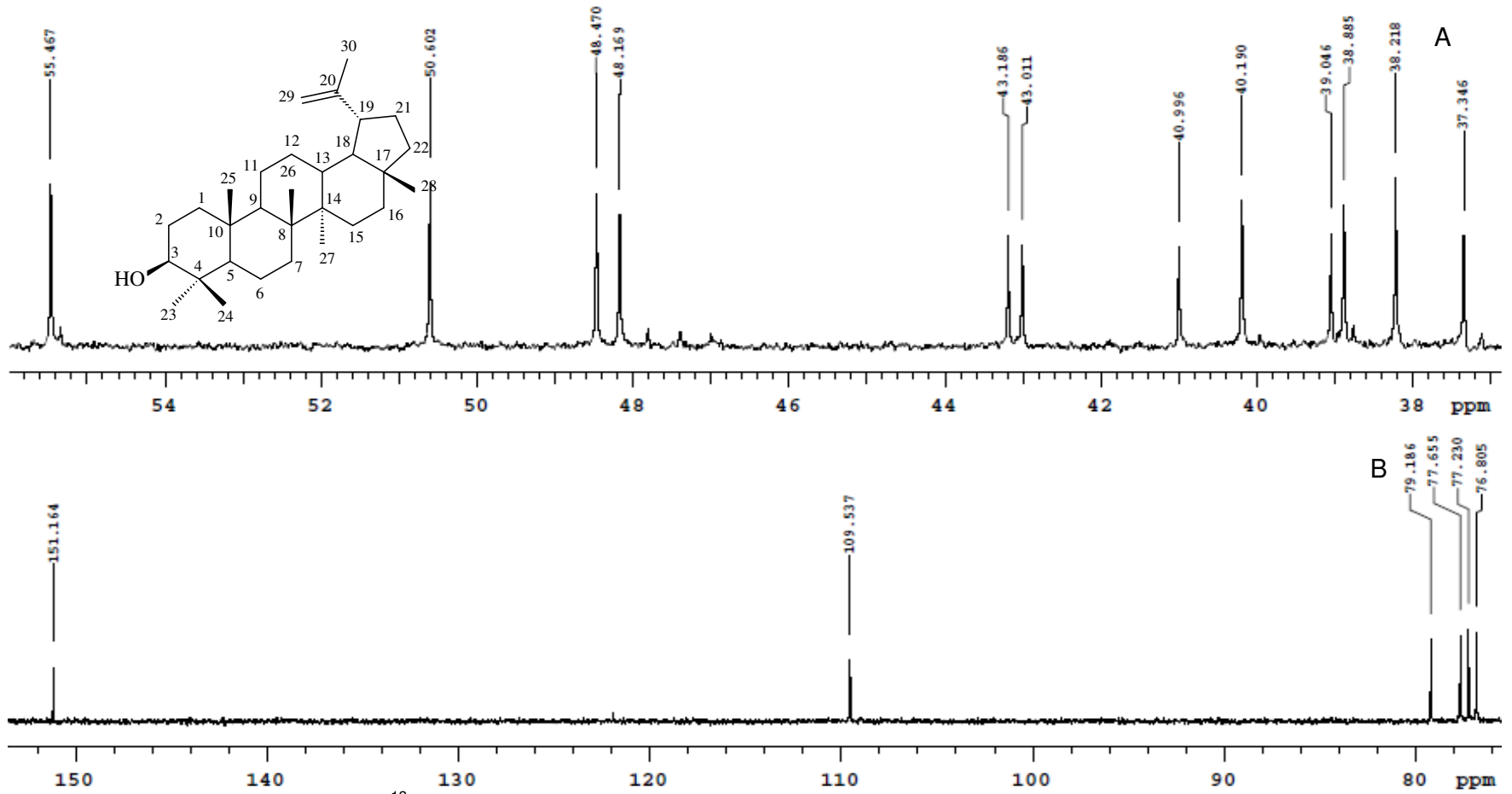


Figura 43 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 37,0 a 56,0 ppm e (B) 75,0 a 155,0 ppm (MSI-08)

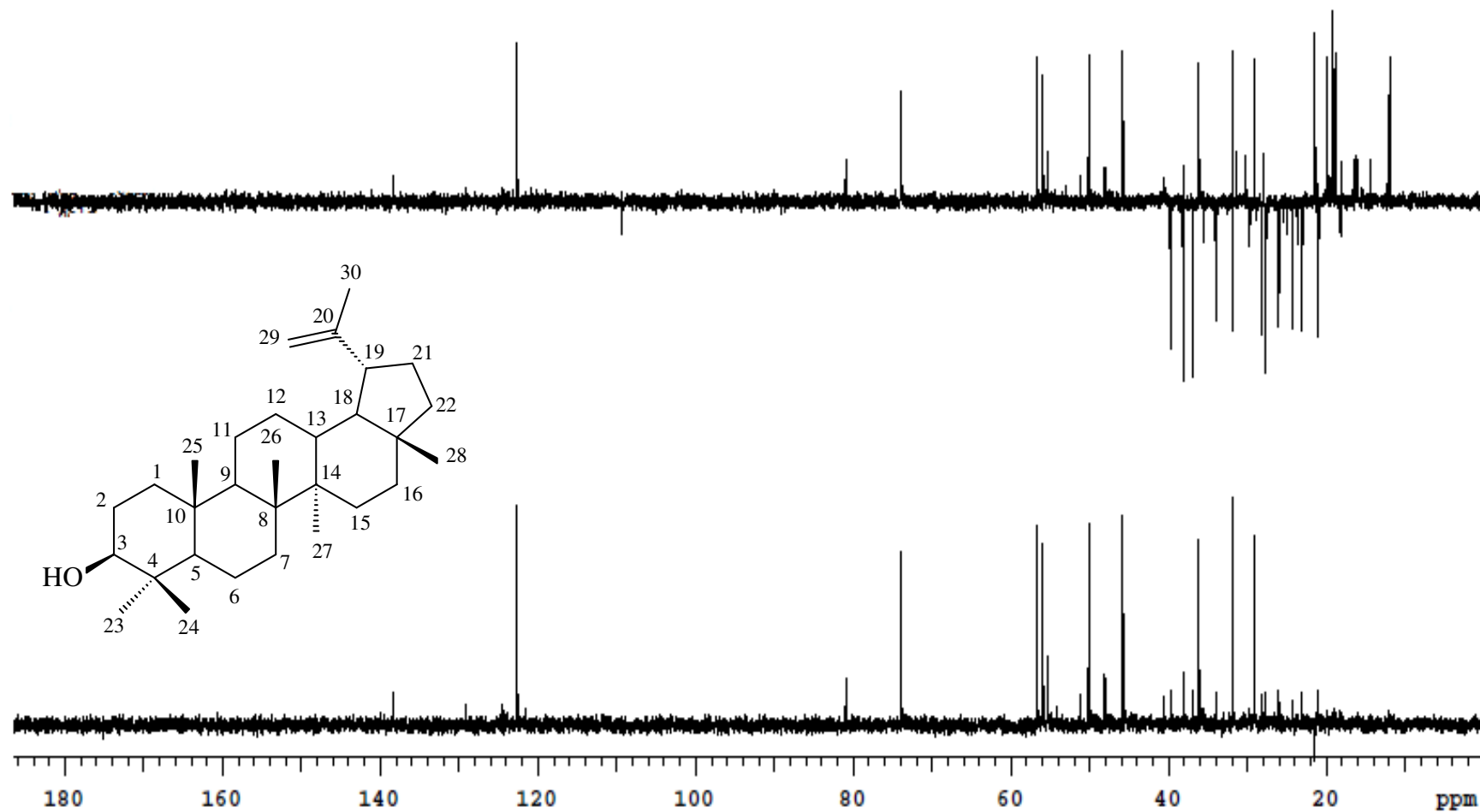


Figura 44 – Espectro de DEPT 90 e 135 do lupeol (MSI-08)

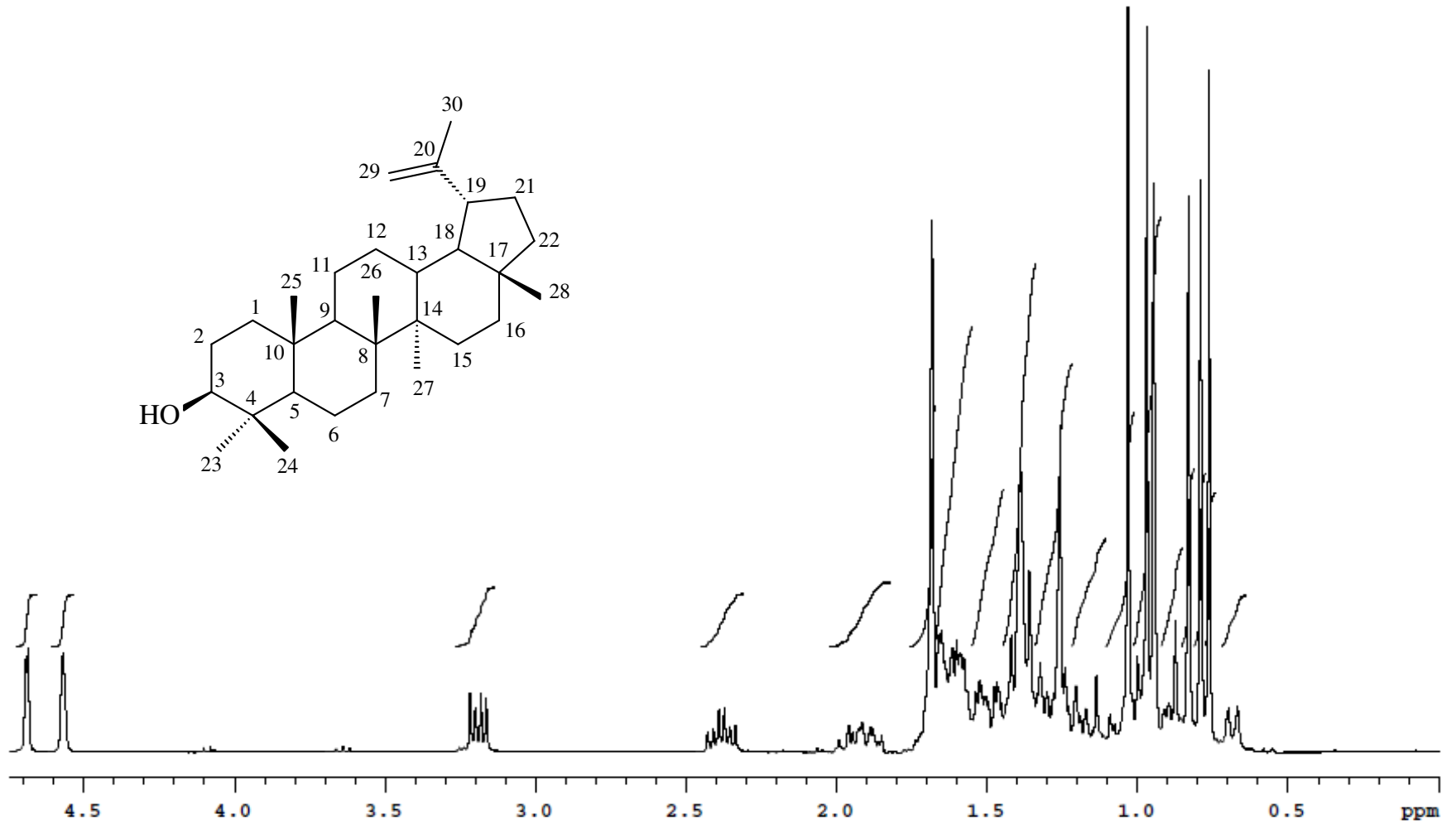


Figura 45 – Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz) do lupeol (MSI-8)

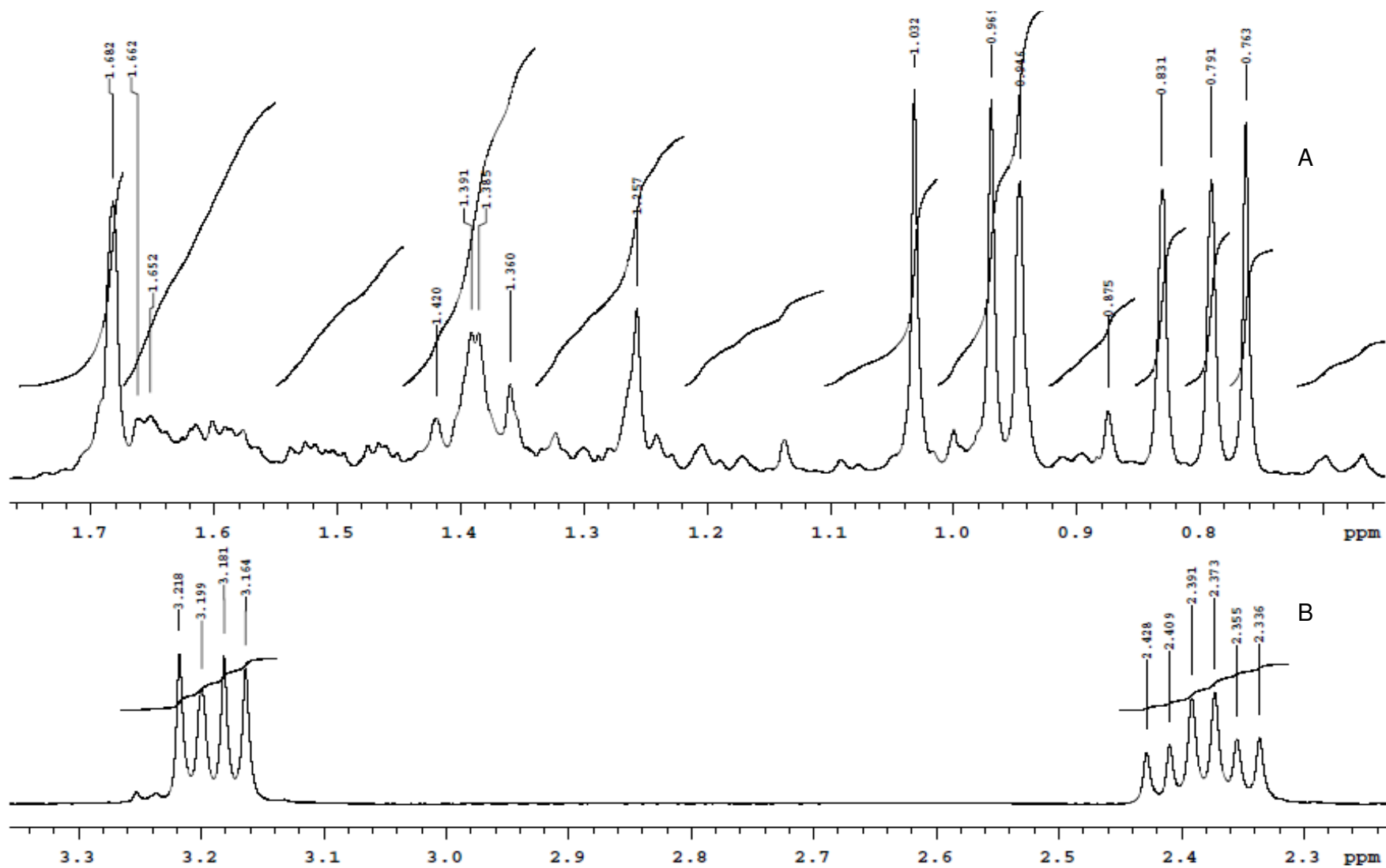


Figura 46 – Ampliações do RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em (A) 0,76 a 1,76 ppm e (B) 2,26 a 3,34 ppm

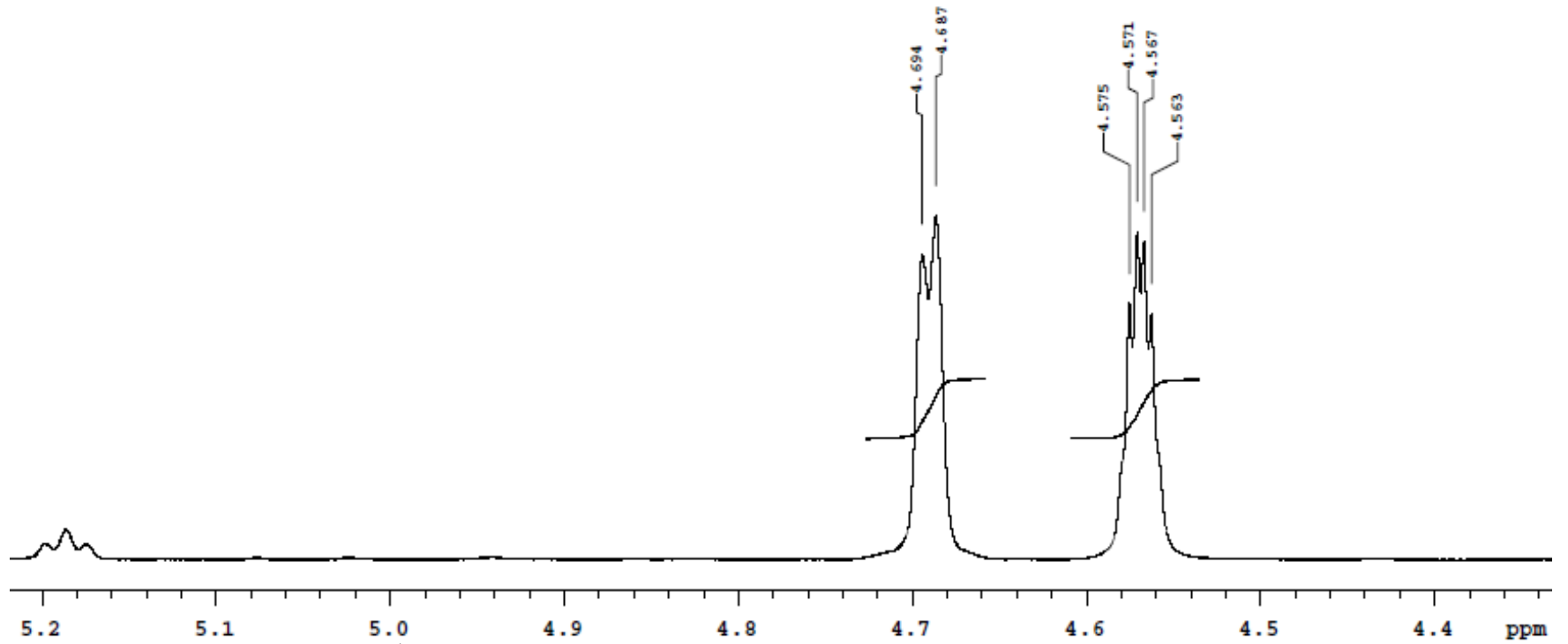


Figura 47 – Ampliação do RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol (MSI-08) em 4,34 a 5,20 ppm

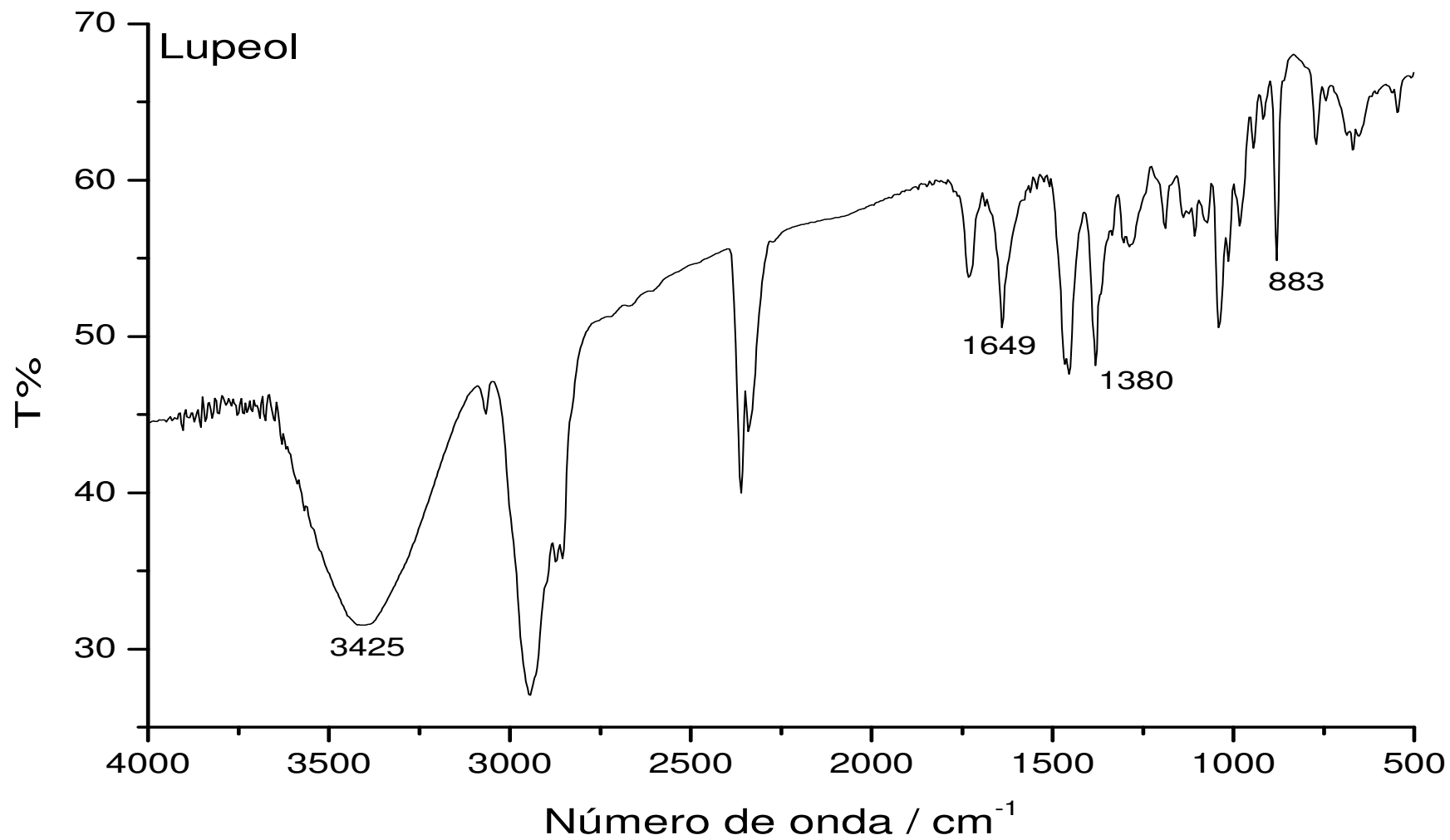


Figura 48 – Espectro no infravermelho do lupeol (MSI-08)

Tabela 07 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do lupeol isolada da *M. stipitatum* e do lupeol relatado (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Fotie et al. (2006)

N. da cadeia	DEPT	δ_c da Literatura	δ_c do MSI-08
01	CH ₂	39,1	38,9
02	CH ₂	27,8	27,6
03	CH	79,3	79,2
04	C	39,2	39,1
05	CH	55,6	55,5
06	CH ₂	18,7	18,5
07	CH ₂	34,6	34,5
08	C	41,2	41,0
09	CH	50,7	50,6
10	C	37,5	37,4
11	CH ₂	21,3	21,1
12	CH ₂	25,5	25,3
13	CH	38,4	38,2
14	C	43,2	43,0
15	CH ₂	27,8	27,6
16	CH ₂	35,9	35,8
17	C	43,4	43,2
18	CH	48,3	48,2
19	CH	48,6	48,5
20	C	151,1	151,2
21	CH ₂	30,2	30,0
22	CH ₂	40,4	40,0
23	CH ₃	28,4	28,2
24	CH ₃	15,8	15,6
25	CH ₃	16,5	16,3
26	CH ₃	16,3	16,2
27	CH ₃	14,9	14,7
28	CH ₃	18,4	18,2
29	CH ₂	109,6	109,5
30	CH ₃	19,7	19,5

4.1.4 β -sitosterol (MSI-11)

A caracterização do β -sitosterol (Figura 49), um sólido branco com ponto de fusão de 130 °C, se deu por comparação em cromatografia de camada delgada (CCD) com padrão autêntico, confirmado por espectrometria de massas (Figura 50) e infravermelho.

Na espectrometria de massas a sugestão vem da presença do pico do íon molecular em 414D e principais fragmentações em 396, 381, 329, 288 e 255 (m/z).

O espectro no infravermelho (Figura 51) apresentou bandas em 3420 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-H, bandas em 2958, 2935, 2866, 1465 e 1380 cm^{-1} que evidenciam o caráter alifático, em 1639 cm^{-1} indicam a presença de ligação dupla e banda 1060 cm^{-1} referente ao estiramento C-OH.

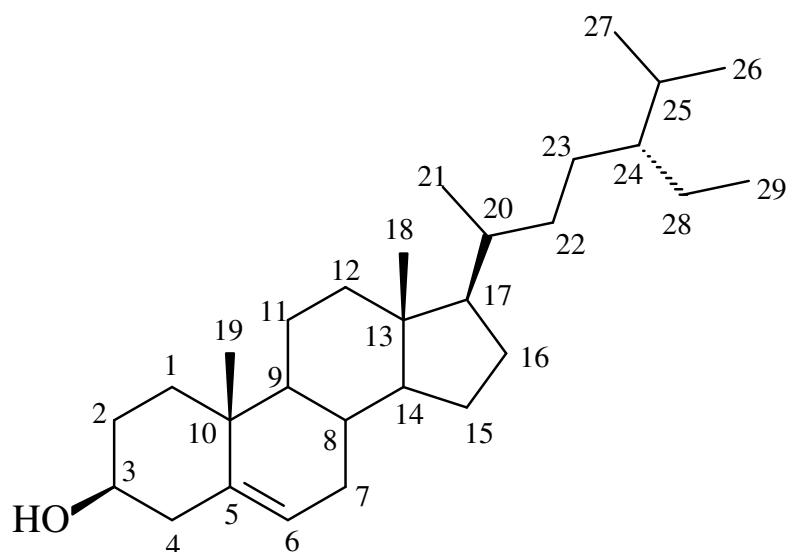


Figura 49 – Estrutura do β -sitosterol (MSI-11)

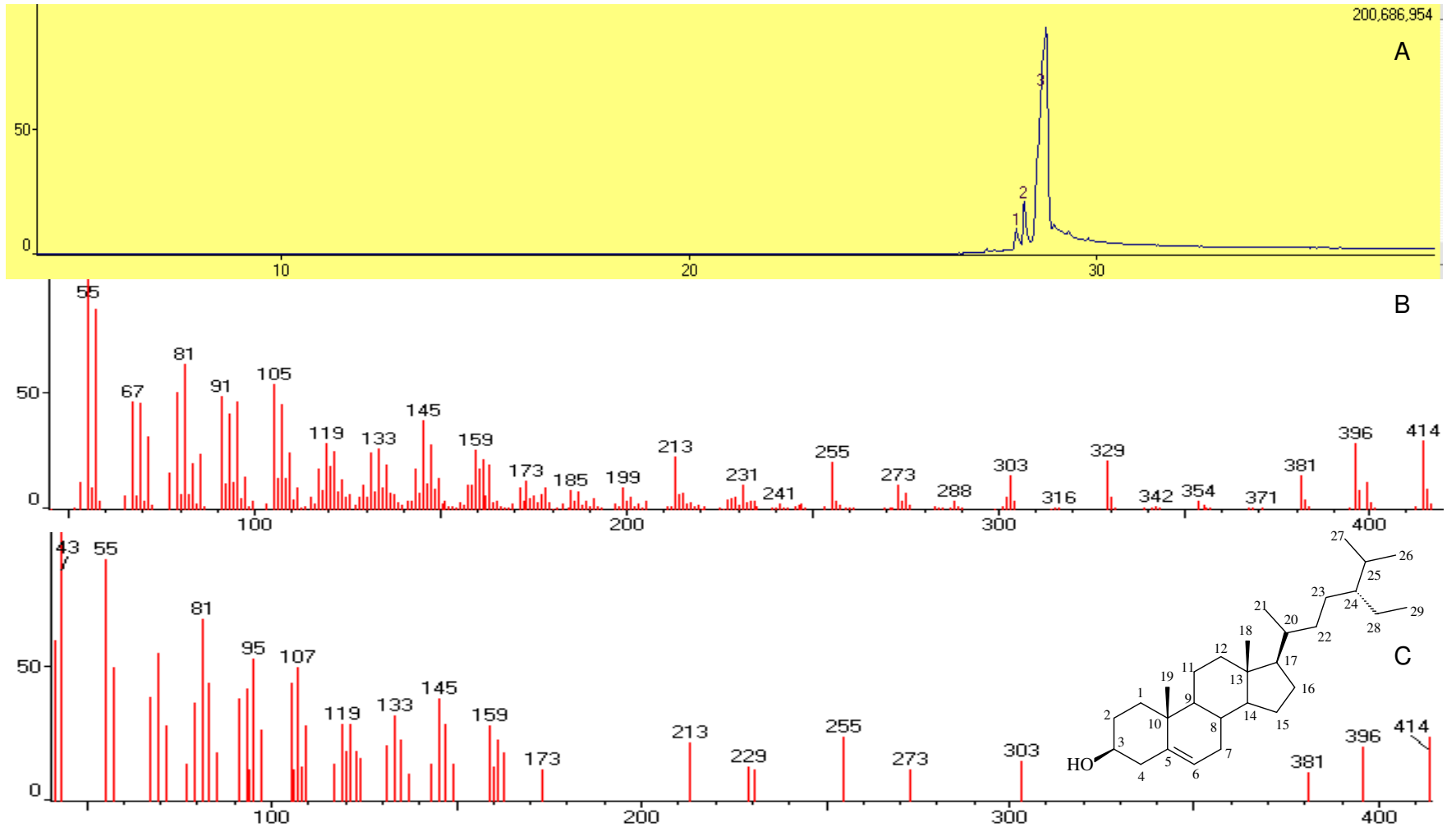


Figura 50 – Espectrometria de massas do β -sitosterol (MSI-11), (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação e (C) sugestão da biblioteca do massas

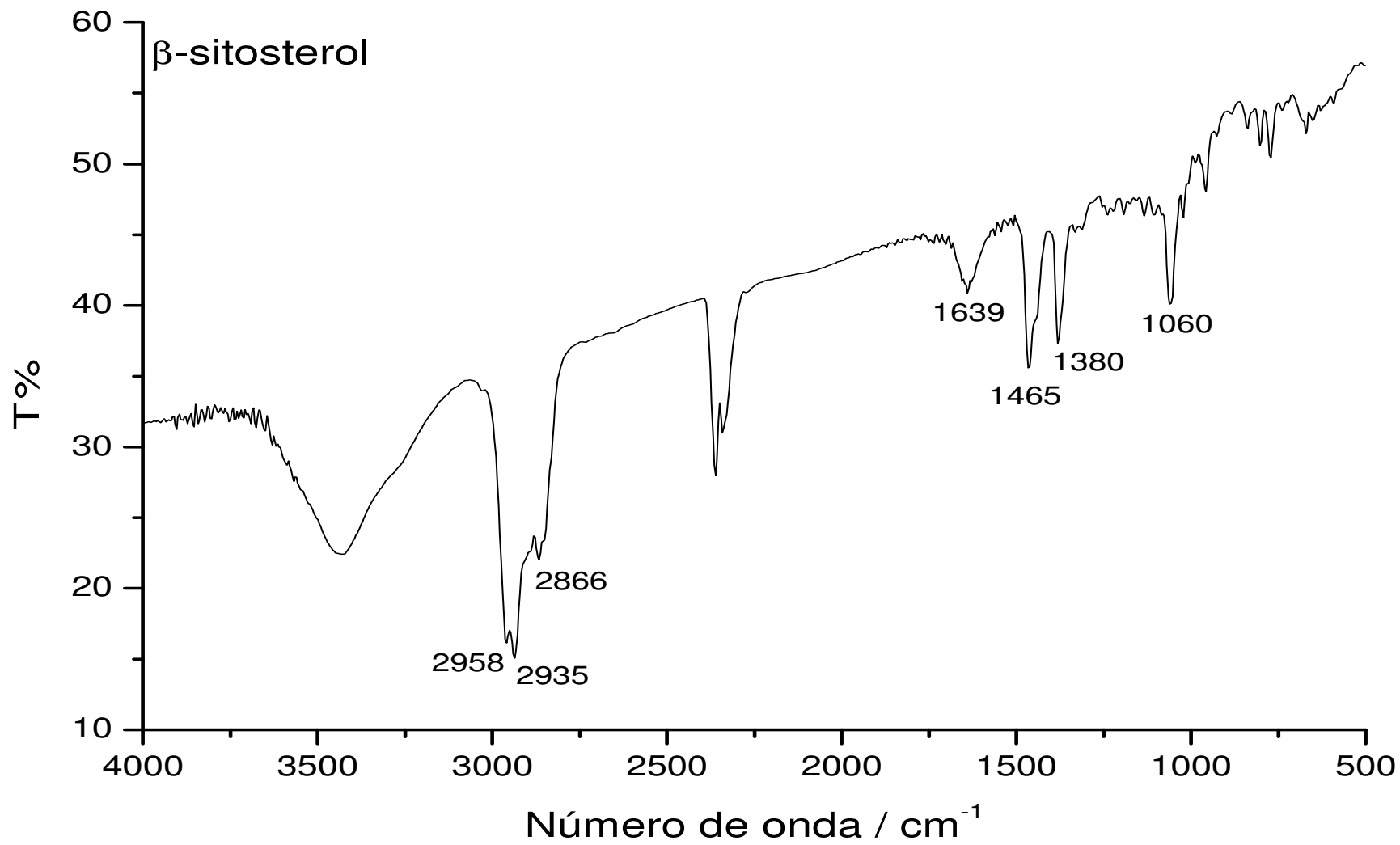


Figura 51 – Espectro no infravermelho do β -sitosterol (MSI-11)

4.1.5 Sitostenona (MSI-16)

A estrutura da sitostenona (estigmast-4-en-3-ona) (Figura 52) foi definida principalmente pelo dados da espectrometria de massas (Figura 53), sendo observados o pico do íon molecular M^+ 412 e os picos das fragmentações em 370, 289, 271, 229, 147, 124 (m/z). Estes dados se mostraram similares ao padrão de fragmentação proposto por Jin, Yuan-Peng; Wei, Xiao-Ning e Shi, Yan-Ping (2007).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 54, 55A, 55B e 55C) reforçou a proposta da estrutura apresentando todos os 29 sinais de carbonos, desses os mais destacados foram os sinais característicos de carbonila conjugada com $\text{C}=\text{C}$ (δ_{C} 200,0 e δ_{C} 172,1, C-03 e C-05 respectivamente).

No espectro de DEPT 90 e 135 (Figura 56) também foi possível observar a concordância com a proposta da estrutural pelos sinais de 6 carbonos de metilas (C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 e C-29), dos 11 carbonos metilênicos (C-01, C-02, C-06, C-07, C-11, C-12, C-15, C-16, C-22, C-23 e C-28) e dos 8 carbonos metínicos (C-04, C-08, C-09, C-14, C-17, C-20, C-24 e C-25).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 57, 58A, 58B e 58C) corroborou com a proposta apresentando sinais característicos de um hidrogênio metínico (H-04) com um singleto largo em δ_{H} 5,72, de 6 metilas em δ_{H} 0,71s, 1,18s, 0,92d (6,6 Hz), 0,81d (6,9 Hz), 0,83d (6,3 Hz) e 0,84t (7,2 Hz) (H-18, H-19, H-21, H-26, H-27 e H-29 respectivamente) e de uma região em δ_{H} 0,70 a 2,10 condizentes a de um fitoesteroides. As multiplicidades das metilas foram confirmadas pelos sinais no espectro de HSQC (Figura 58)

Por fim foi feita uma busca na literatura sendo observado que Prachayasittikul et al. (2009) atribuíram valores de deslocamento químicos de carbonos para sitostenona similares aos encontrado para a isolada da *M. stipitatum* (Tabela 08).

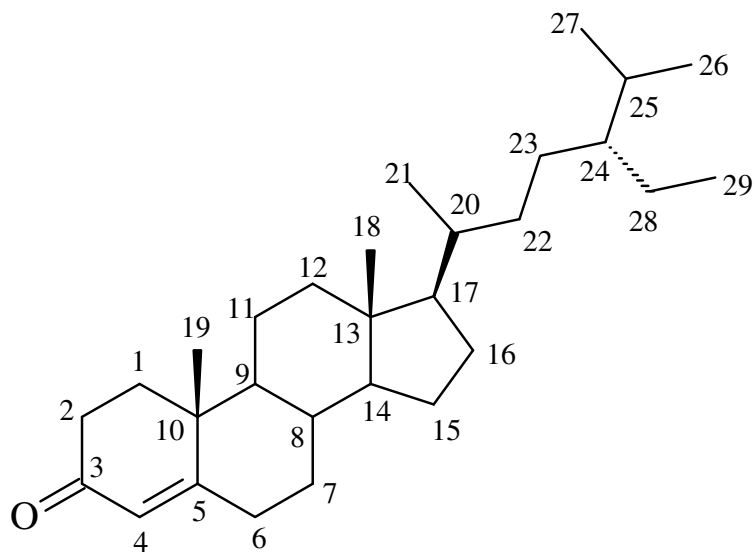


Figura 52 – Estrutura da sitostenona (estigmast-4-en-3-ona) (MSI-16)

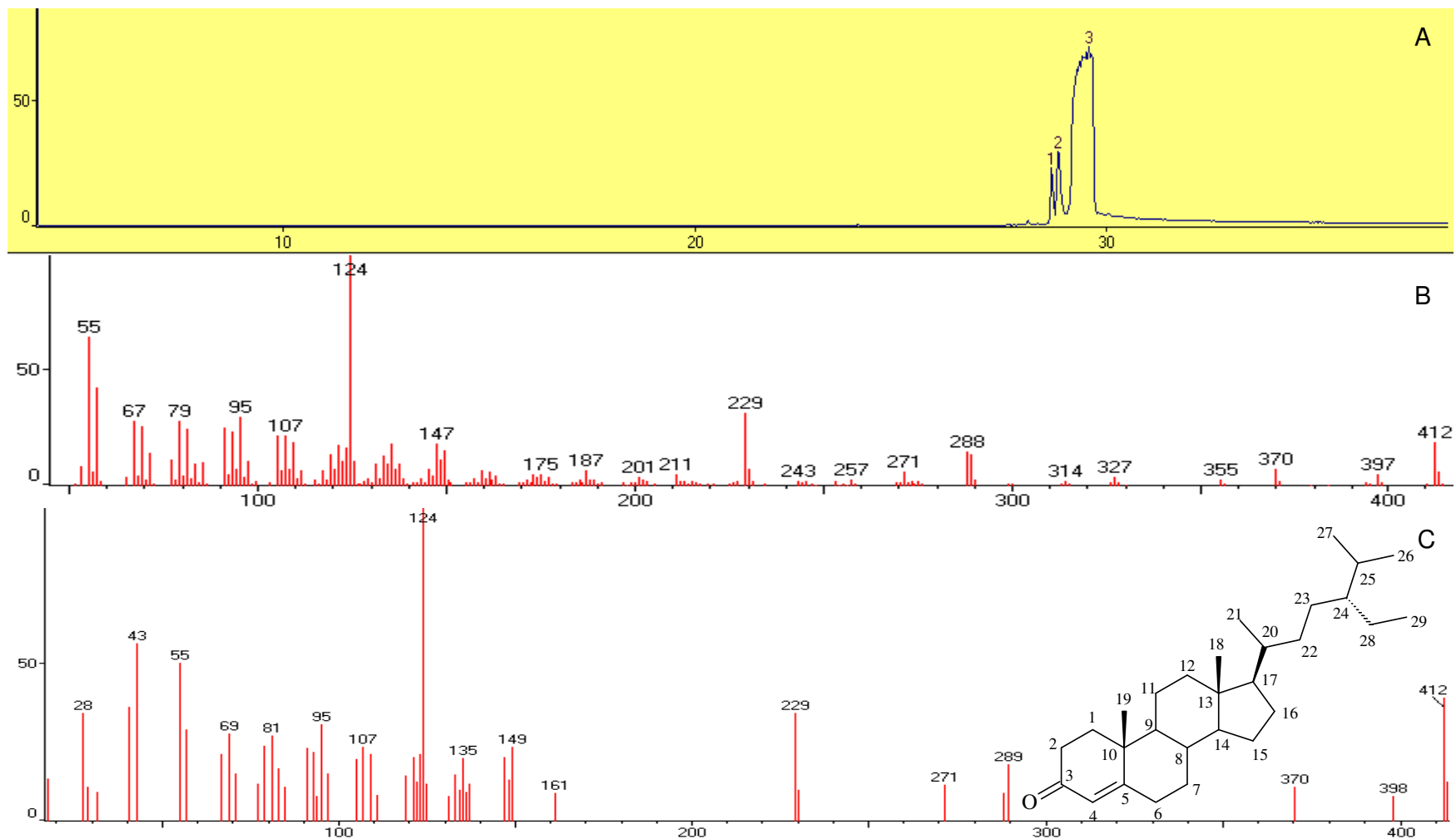


Figura 53 – Espectrometria de massas da sitostenona, (A) cromatograma do CG, (B) espectro da fragmentação (C) sugestão da biblioteca de massas

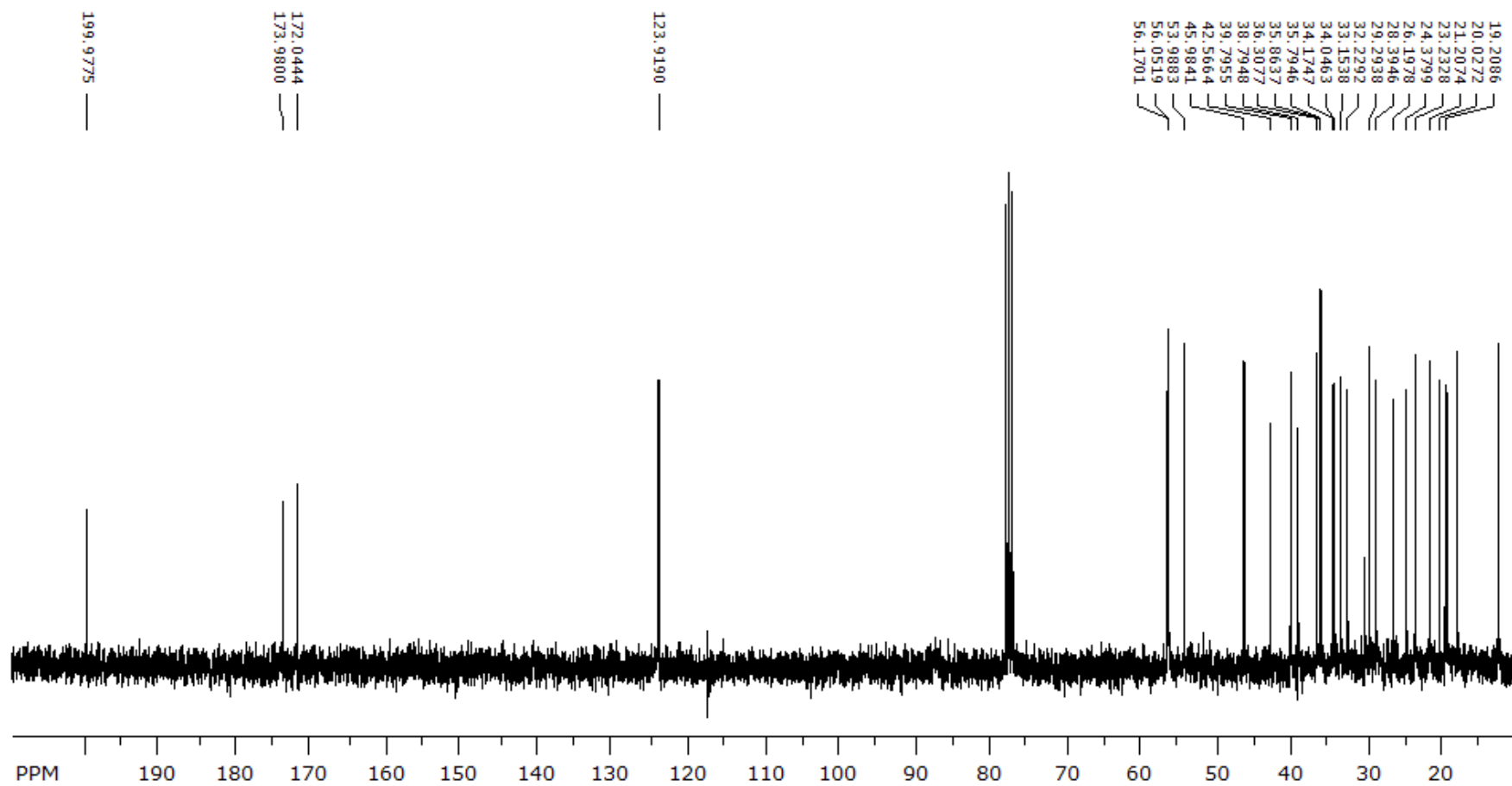


Figura 54 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitosterona (MSI-16)

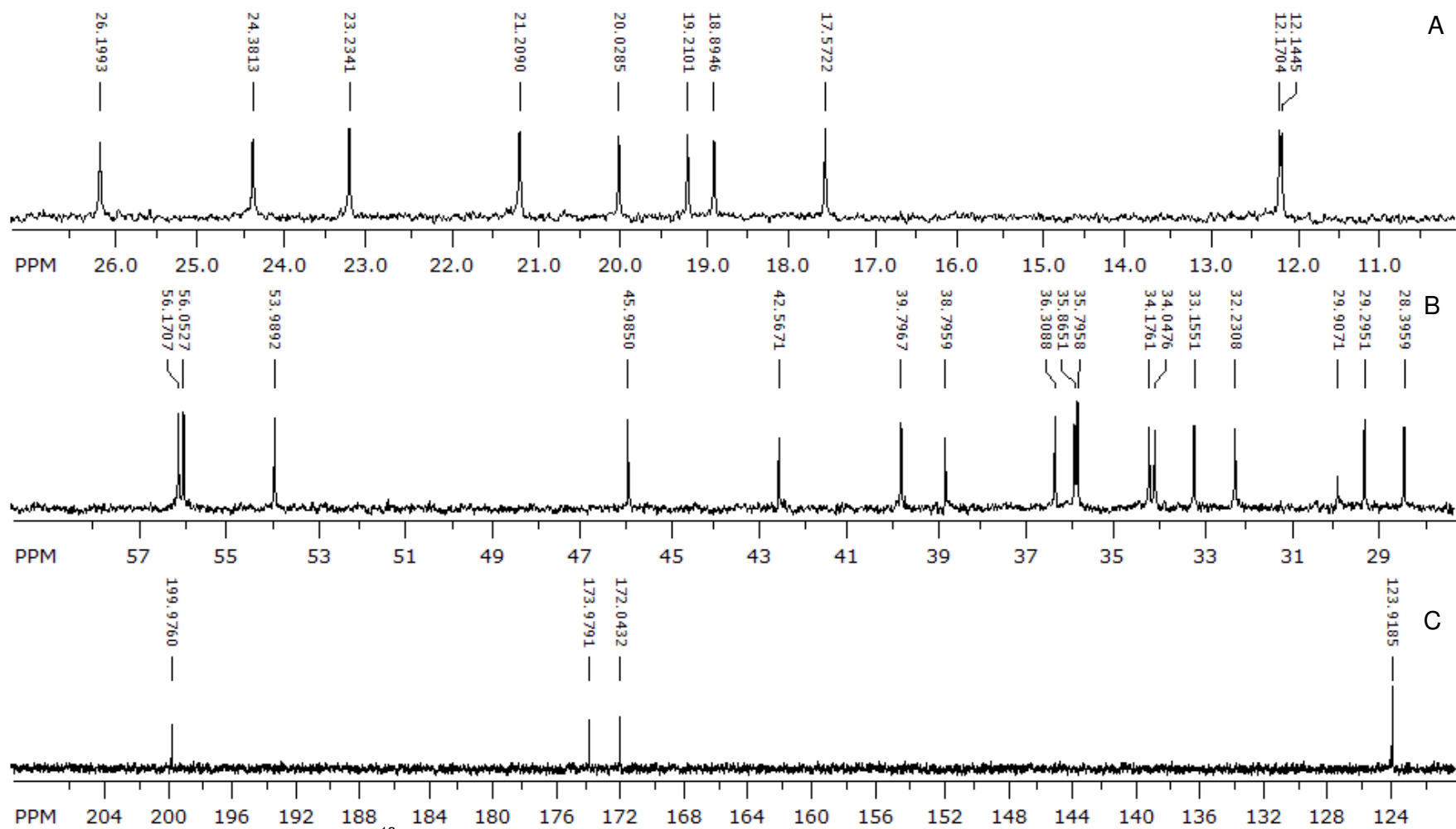


Figura 55 – Ampliações do RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitosterona (MSI-16) em (A) 10,0 a 27,0 ppm, (B) 27,0 a 59,0 ppm e (C) 120,0 a 210,0 ppm

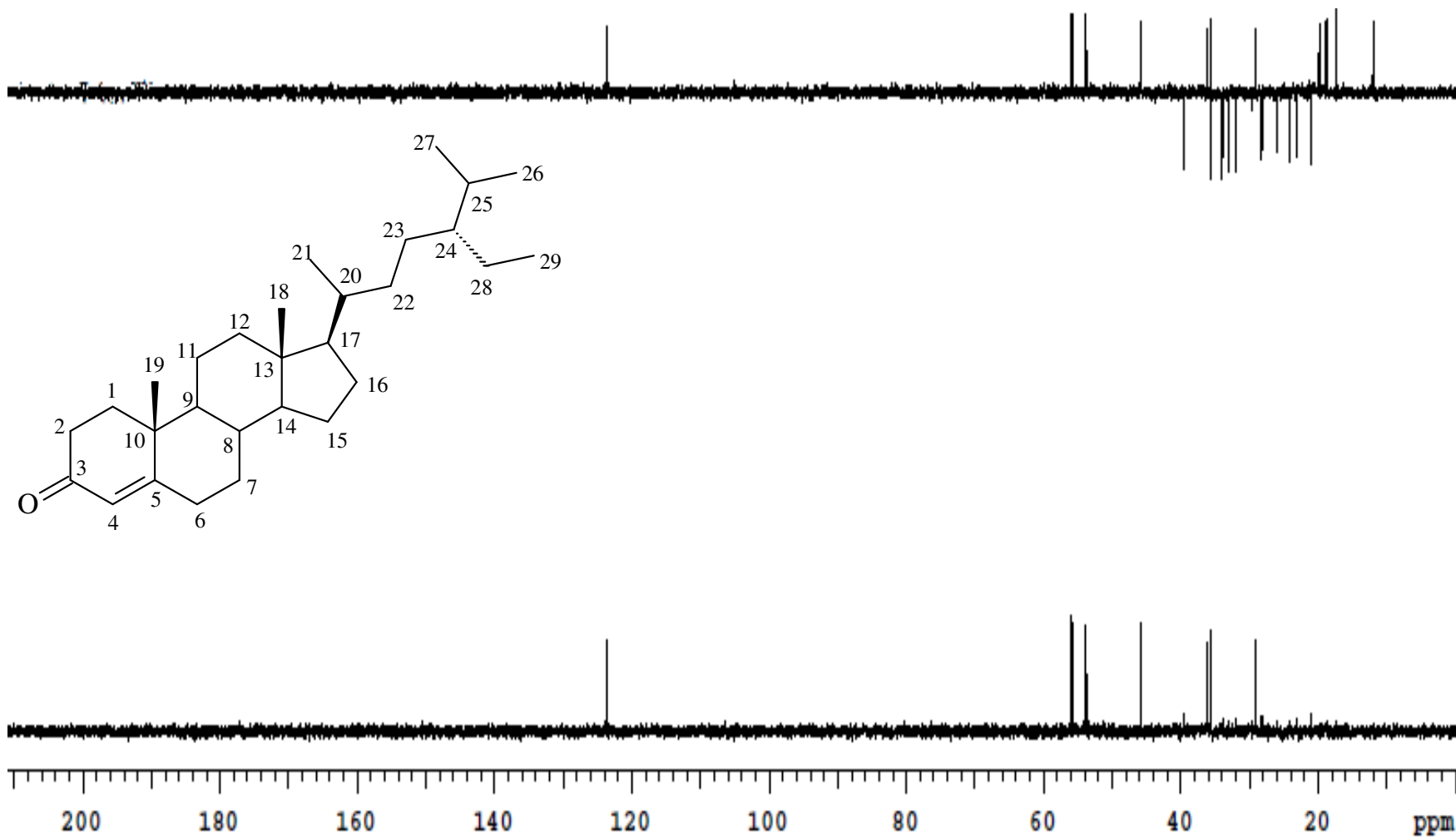


Figura 56 – Espectro de DEPT 90 e 135 do sitosterona (estigmaster-4-en-3-ona) (MSI-16)

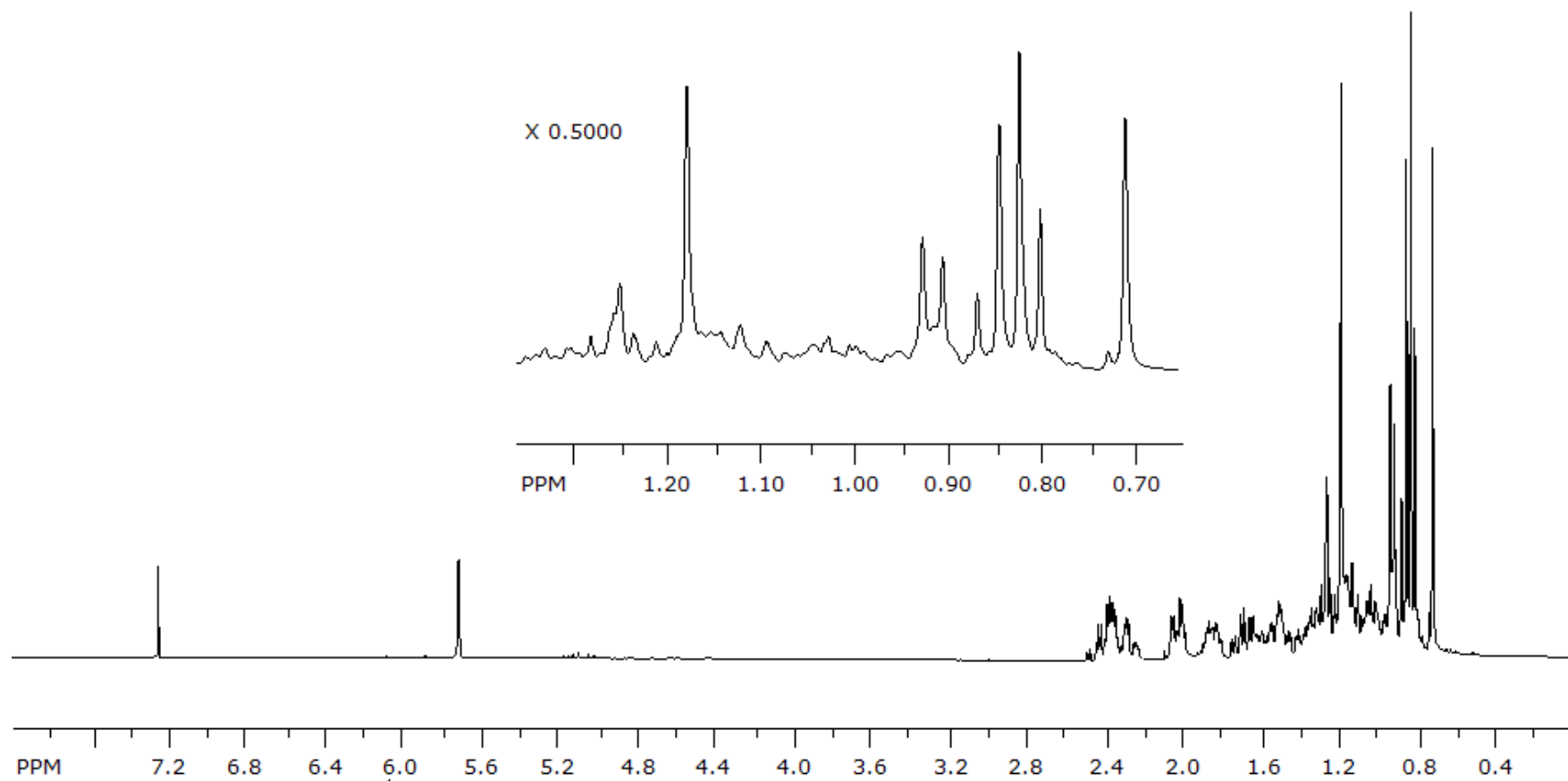


Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitostenona (MSI-16)

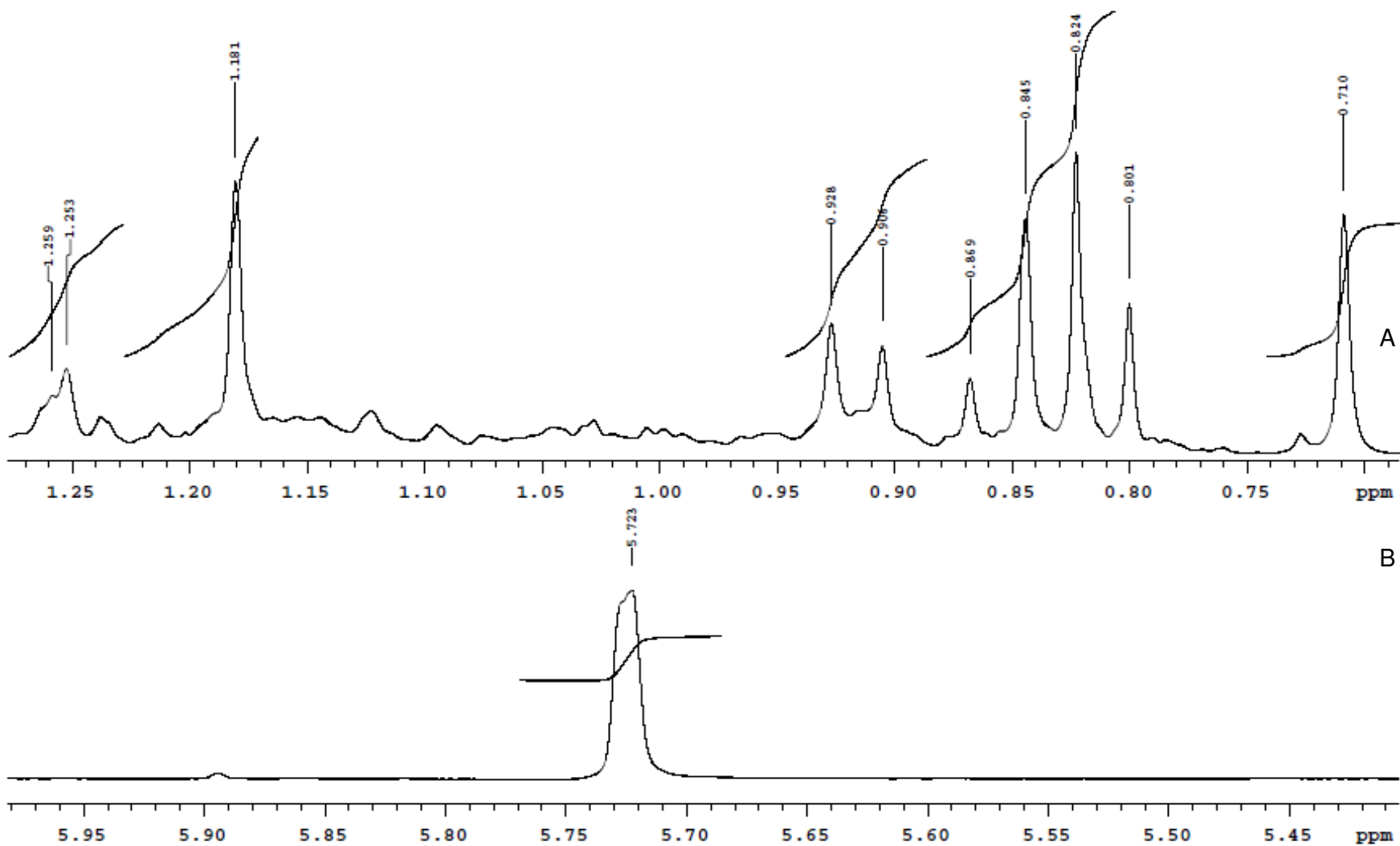


Figura 58 – Ampliações do RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitosterona (MSI-16) em (A) 0,69 a 1,27 ppm e (B) 5,40 a 5,98 ppm

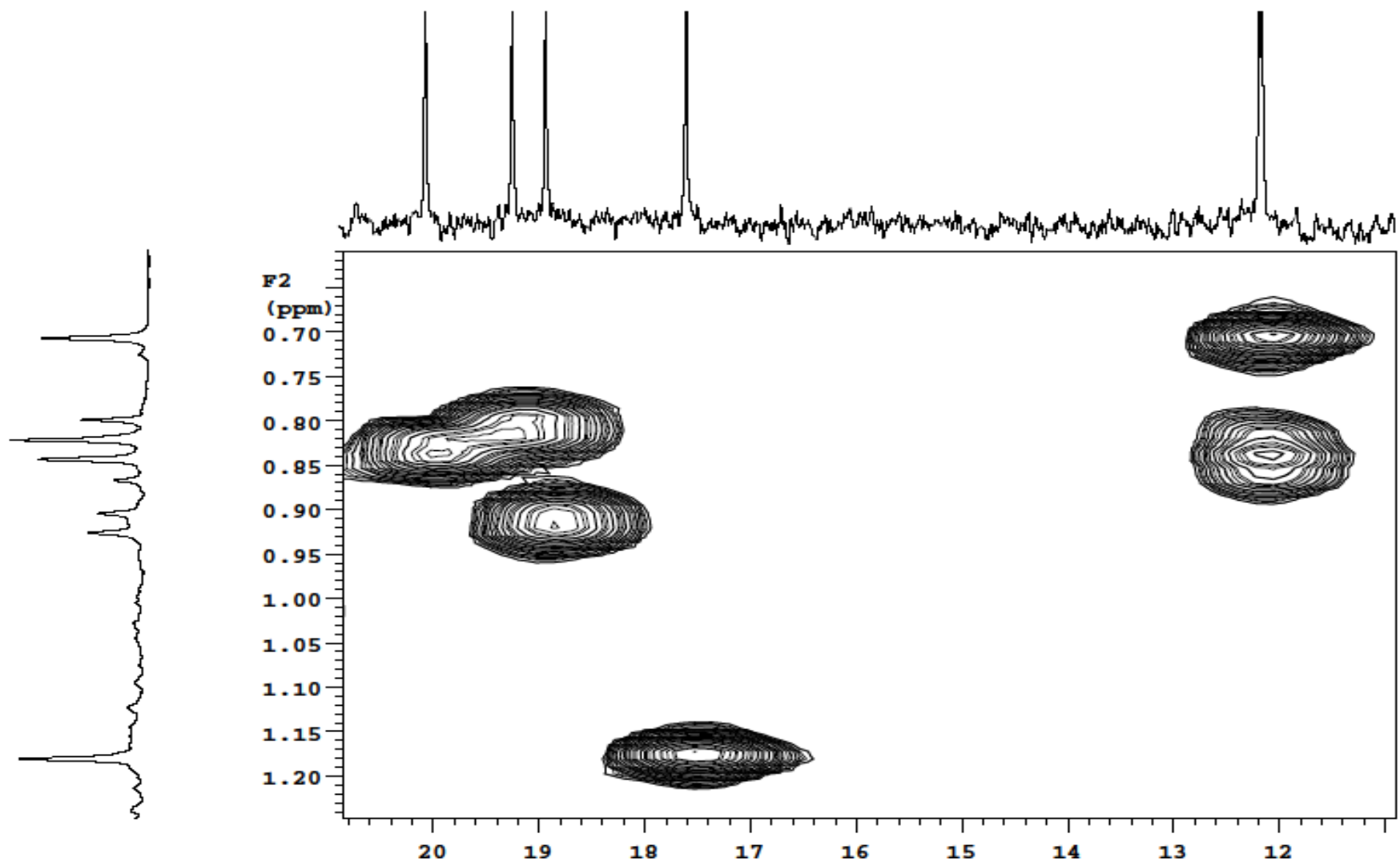


Figura 59 – Aplicação do espectro de HSQC da sitosterona (MSI-16) em 0,60 a 1,20 ppm por 10,0 a 21,0 ppm

Tabela 08 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da sitostenona isolada da *M. stipitatum* e da sitostenona relatada (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Prachayasittikul et al. (2009)

N. da cadeia	DEPT	δ_{C} (literatura)	δ_{C} (<i>M. stipitatum</i>)
01	CH ₂	36,06	35,9
02	CH ₂	33,93	34,1
03	C	199,58	200,0
04	CH	123,69	123,9
05	C	171,64	172,0
06	CH ₂	33,86	33,2
07	CH ₂	32,91	32,2
08	CH	35,60	34,2
09	CH	53,79	54,0
10	C	39,59	39,8
11	CH ₂	21,10	21,2
12	CH ₂	38,57	38,8
13	C	42,35	42,6
14	CH	55,85	56,1
15	CH ₂	24,14	24,4
16	CH ₂	28,13	28,4
17	CH	55,99	56,2
18	CH ₃	11,90	12,2
19	CH ₃	18,65	17,6
20	CH	36,07	36,3
21	CH ₃	18,98	18,9
22	CH ₂	35,65	35,8
23	CH ₂	26,08	26,2
24	CH	45,81	46,0
25	CH	29,64	29,3
26	CH ₃	20,99	20,0
27	CH ₃	19,75	19,2
28	CH ₂	23,04	23,2
29	CH ₃	11,14	12,1

4.1.6 Ácido 3-*O*-acetiloleanólico (MSI-17)

A determinação da estrutura do ácido 3-*O*-acetiloleanólico (Figura 60) baseou-se inicialmente no espectro de RMN de ^{13}C de onde foi possível observar 32 sinais de carbonos (Figura 61, 62A, 62B e 62C), sendo que os deslocamentos em δ_{C} 81,1 (C-03), 122,8 (C-12) e 143,8 (C-13), 183,6 (C-28) e 171,2 (C-01') apontavam para sinais característicos de carbono carbinólico, vinílico, carboníla de ácido e carboníla de éster respectivamente.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 63) foram observados os sinais característicos de 8 metilas em δ_{H} 0,87s, 0,85s, 0,94s, 0,75s, 1,13s, 0,91s, 0,93s e 2,04s (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29, H-30 e H-2' respectivamente), um carbinólico em δ_{H} 4,50t (8,0 Hz) (H-03), um vinílico em δ_{H} 5,28t (3,3 Hz) (H-12) e um alílico em δ_{H} 2,82dd (3,9 Hz) (H-18).

No espectro de DEPT 90 e 135 (Figura 64) foram confirmados os sinais das 8 metilas em δ_{C} 28,3, 16,9, 15,6, 17,4, 26,1, 33,3, 23,8, 21,5 (C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-29, C-30 e C-2' respectivamente), dos 10 CH_2 em δ_{C} 38,2, 23,7, 18,4, 32,8, 23,6, 27,9, 23,1, 46,1, 34,0 e 32,7 (sequencialmente C-01, C-02, C-06, C-07, C-11, C-15, C-16, C-19, C-21 e C-22) e dos 5 CH em δ_{C} 81,1, 55,5, 47,8, 122,8, e 41,2 (simultaneamente C-03, C-05, C-09, C-12 e C-18).

O espectro no infravermelho (Figura 65) apresentou banda de estiramento C=O (1730 e 1724 cm^{-1} de éster e de ácido respectivamente), das metilas geminadas em 1380 cm^{-1} (C-04 e C-20) e 1369 cm^{-1} indicando C=C.

A conectividade dos carbonos foi confirmada pelos espectros bi dimensional de HSQC, HMBC e COSY (Figuras 66, 67 e 68) apresentados na Tabela 09. Também foi feita uma busca na literatura de onde foi encontrado que Kwon et al. (2008) obtiveram sinais de RMN de ^{13}C para o ácido 3-*O*-acetiloleanólico similares aos encontrados para o isolada da *M. stipitatum* (Tabela 10).

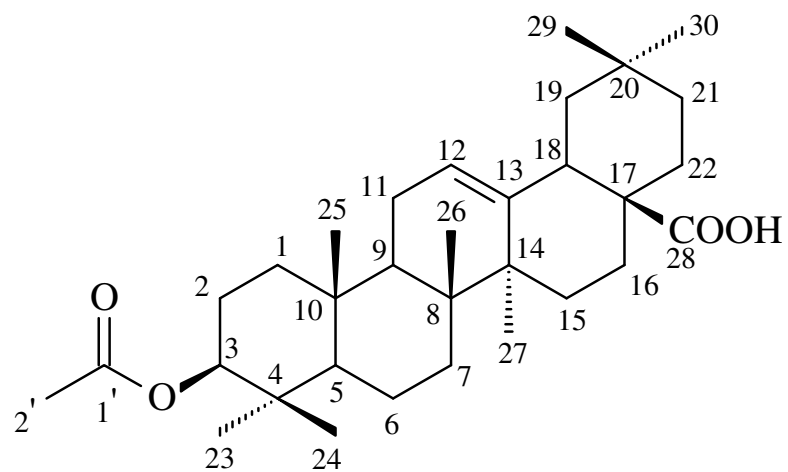


Figura 60 – Estrutura do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)

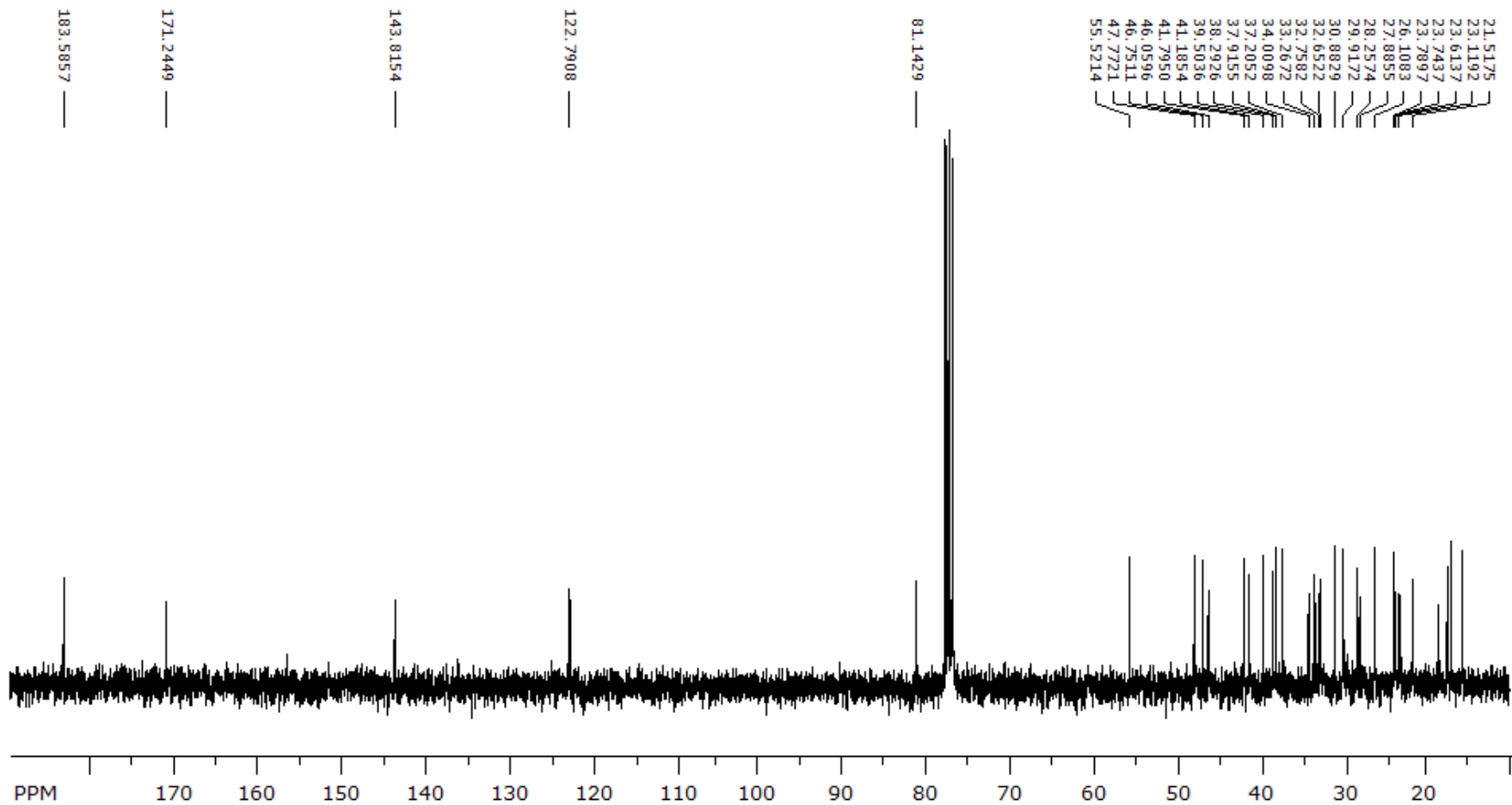


Figura 61 – Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃; 300 MHz) do ácido 3-O-acetilleanólico (MSI-17)

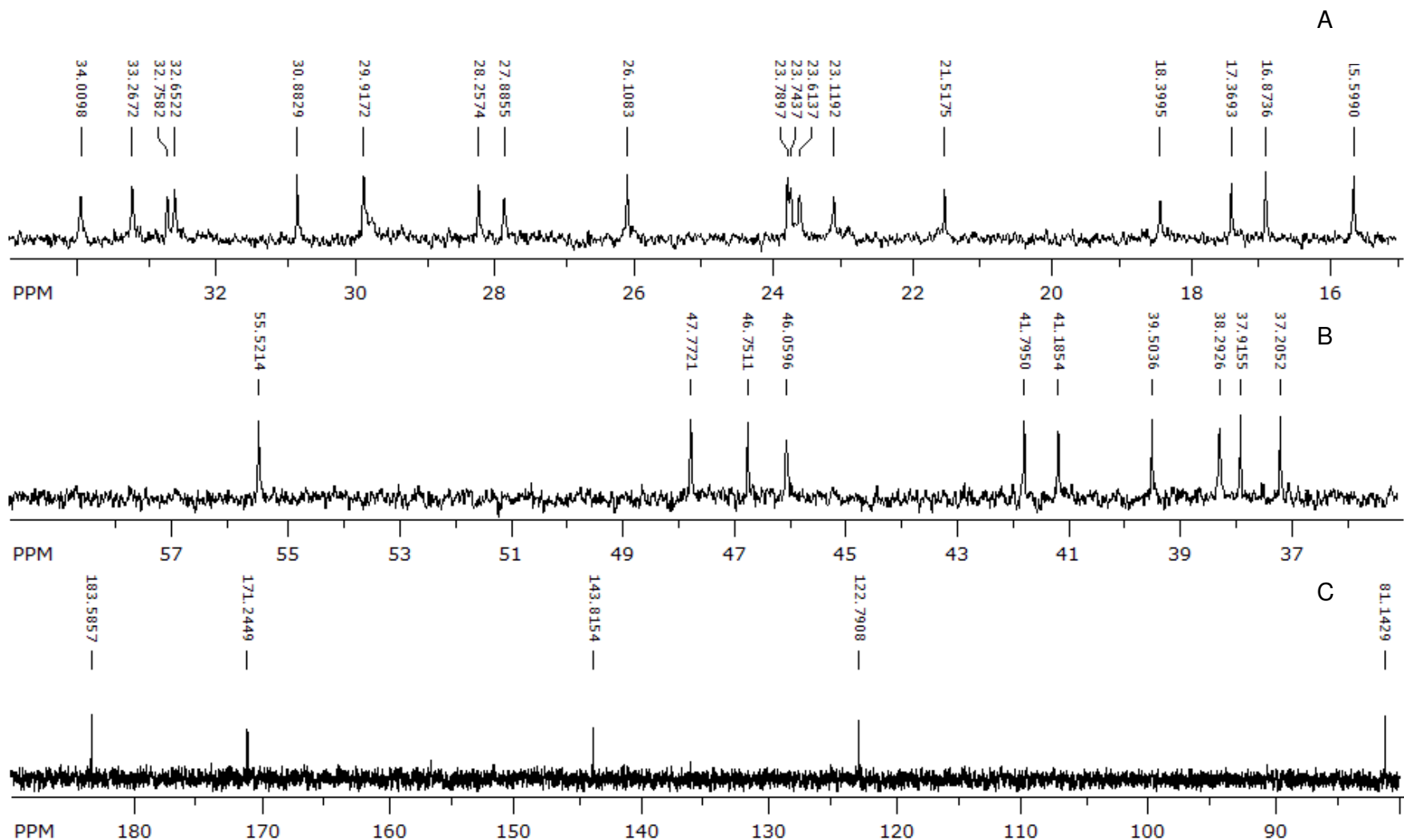


Figura 62 – Apliações do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-*O*-acetilleanólico (MSI-17) em (A) 15,0 a 35,0 ppm, (B) 35,0 a 60 ppm e (C) 80,0 a 200,0 ppm

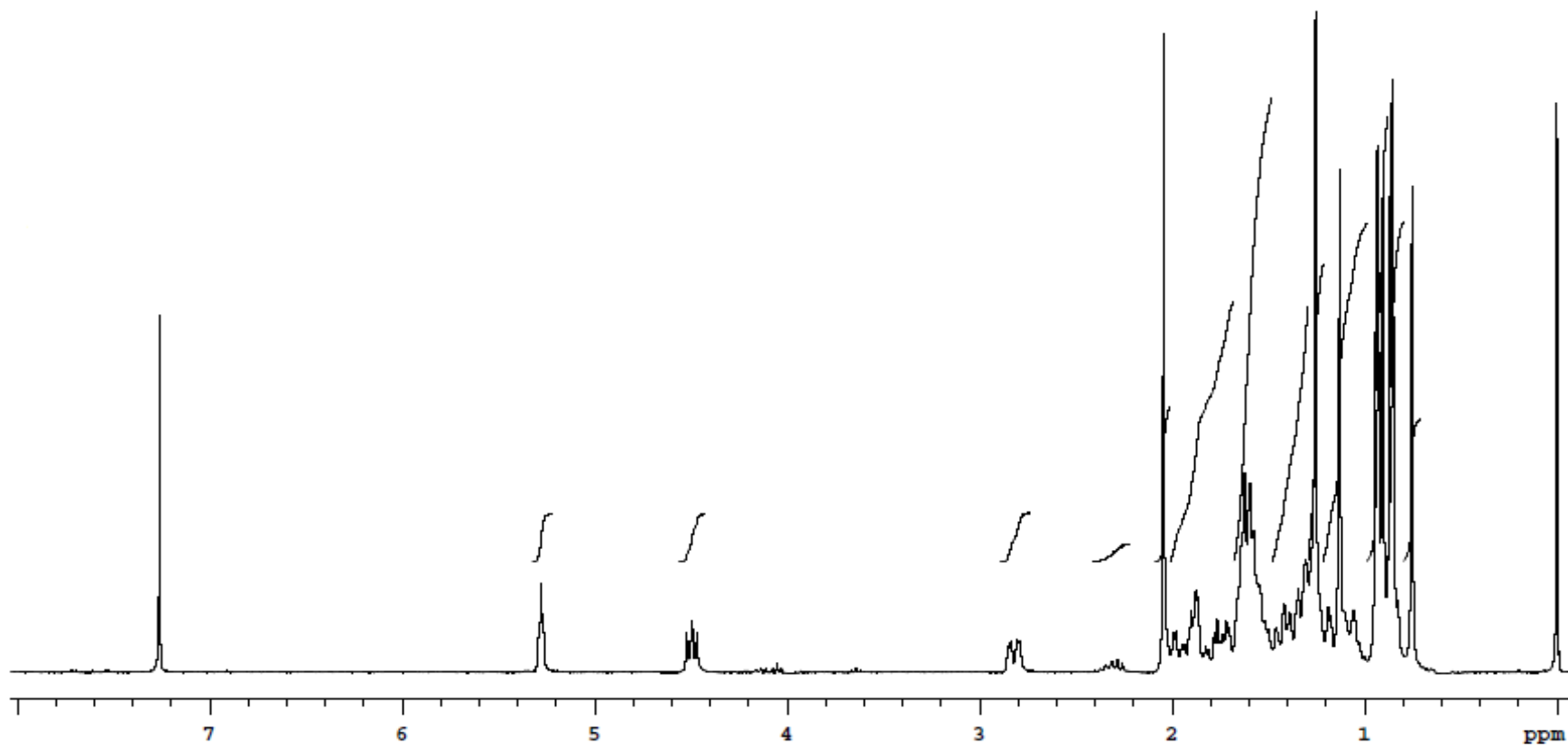


Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)

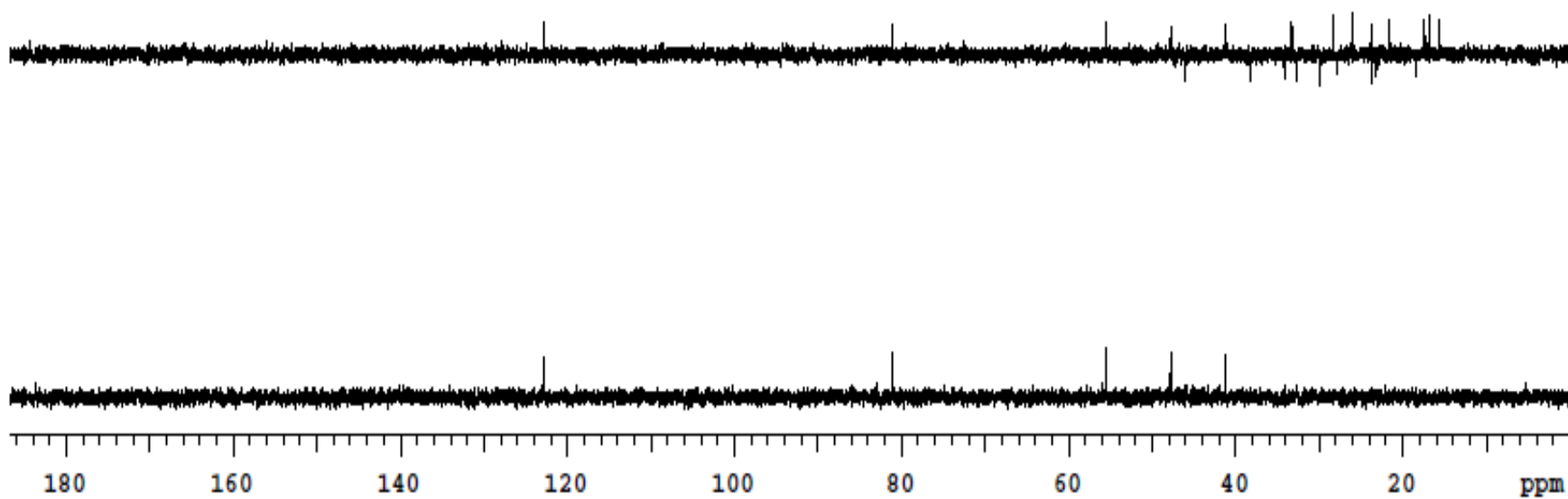


Figura 64 – Espectro de DEPT 90 e 135 do ácido 3-*O*-acetiloleanólico (MSI-17)

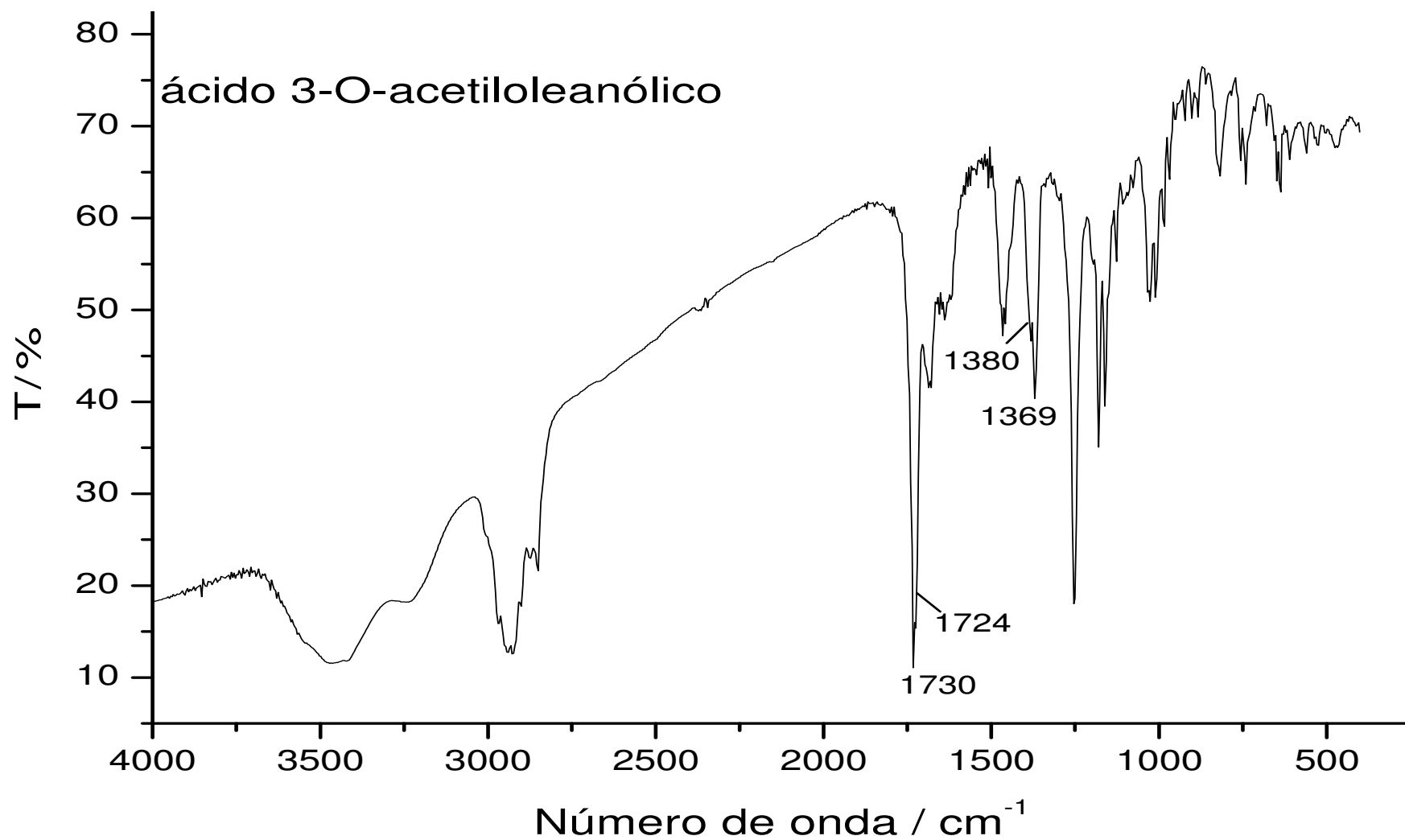


Figura 65 – Espectro no infravermelho do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)

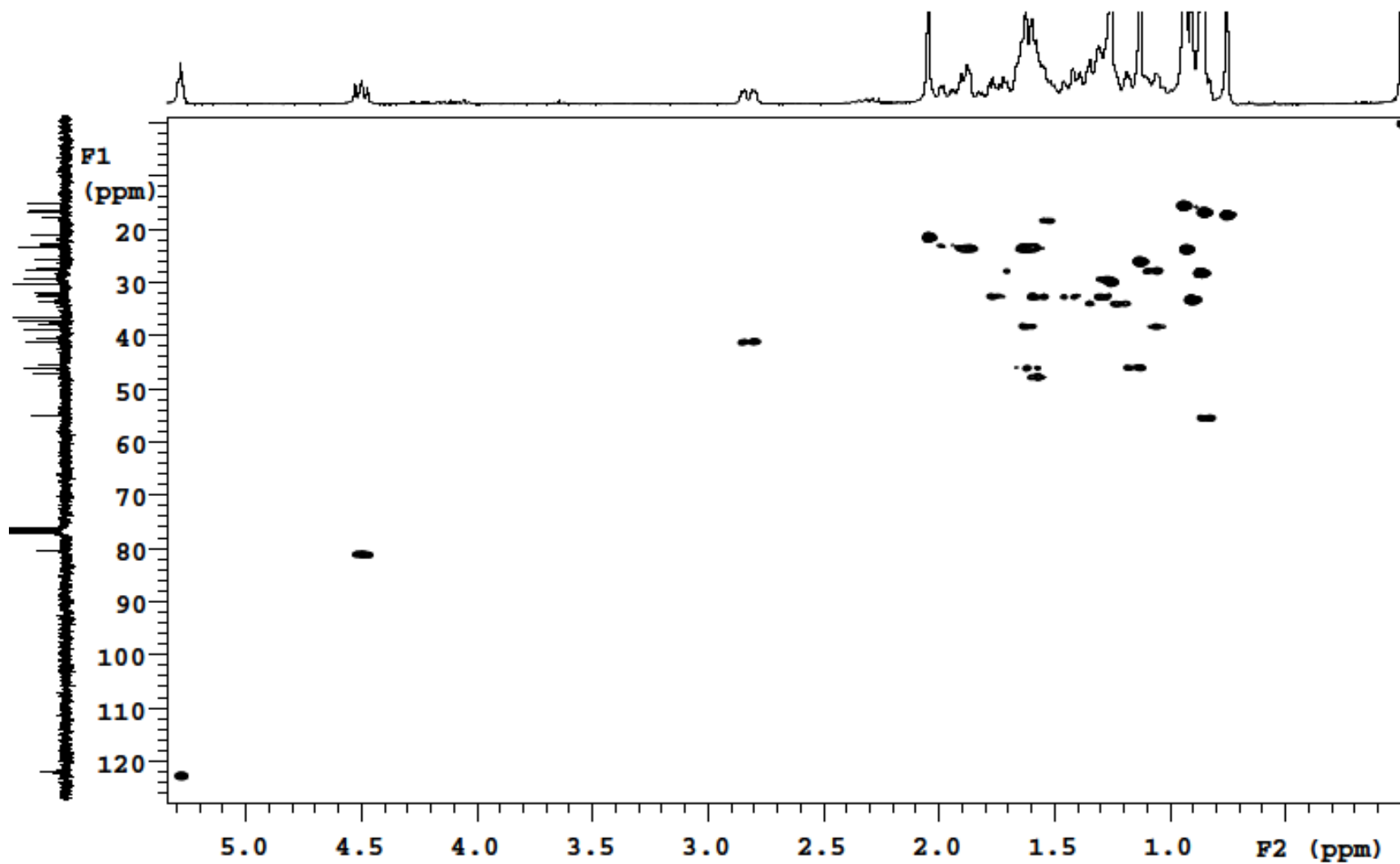


Figura 66 – Espectro de HSQC do ácido 3-O-acetiloleanólico (MSI-17)

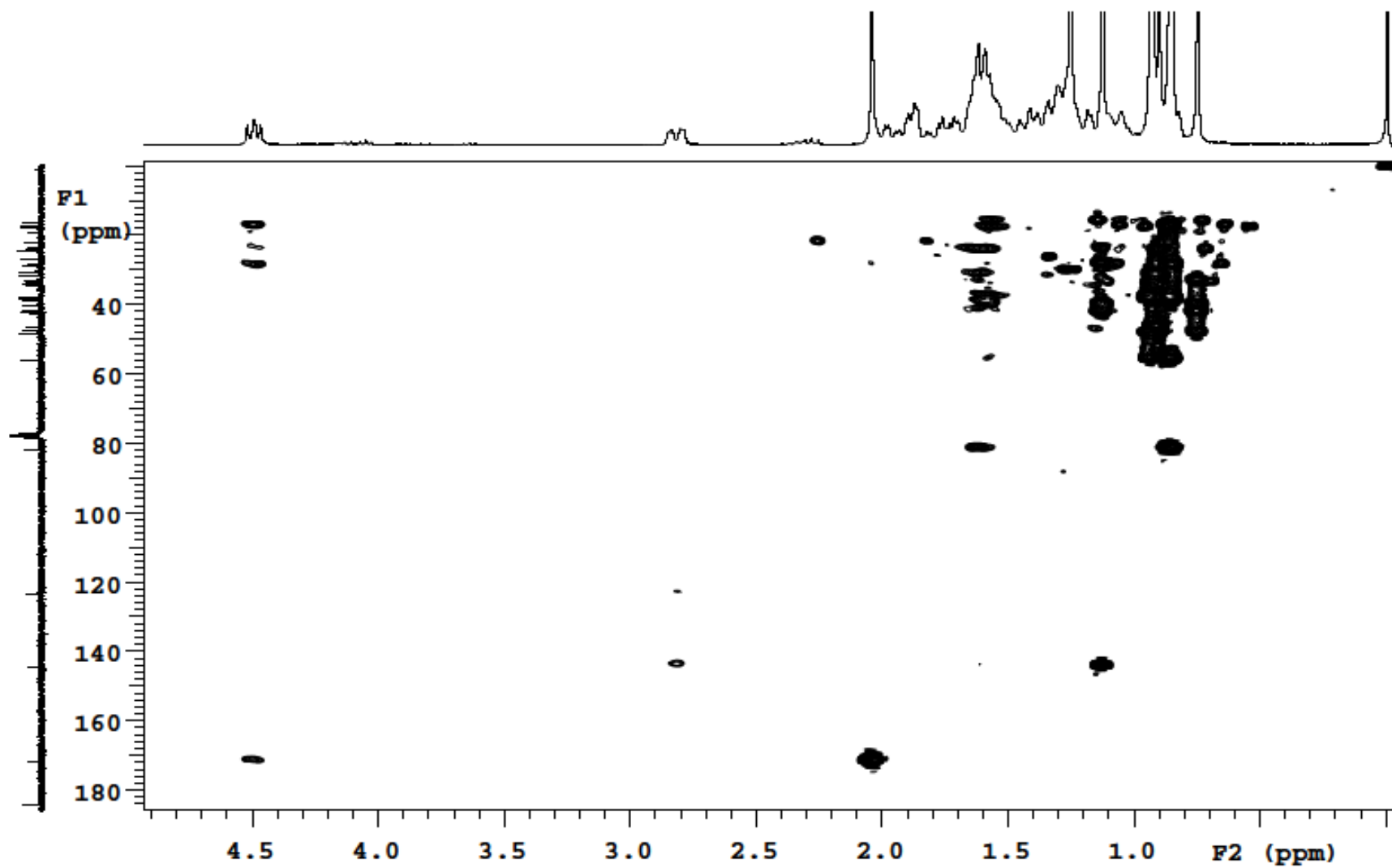


Figura 67 – Espectro de HMBC do ácido 3-O-acetiloleanóico (MSI-17)

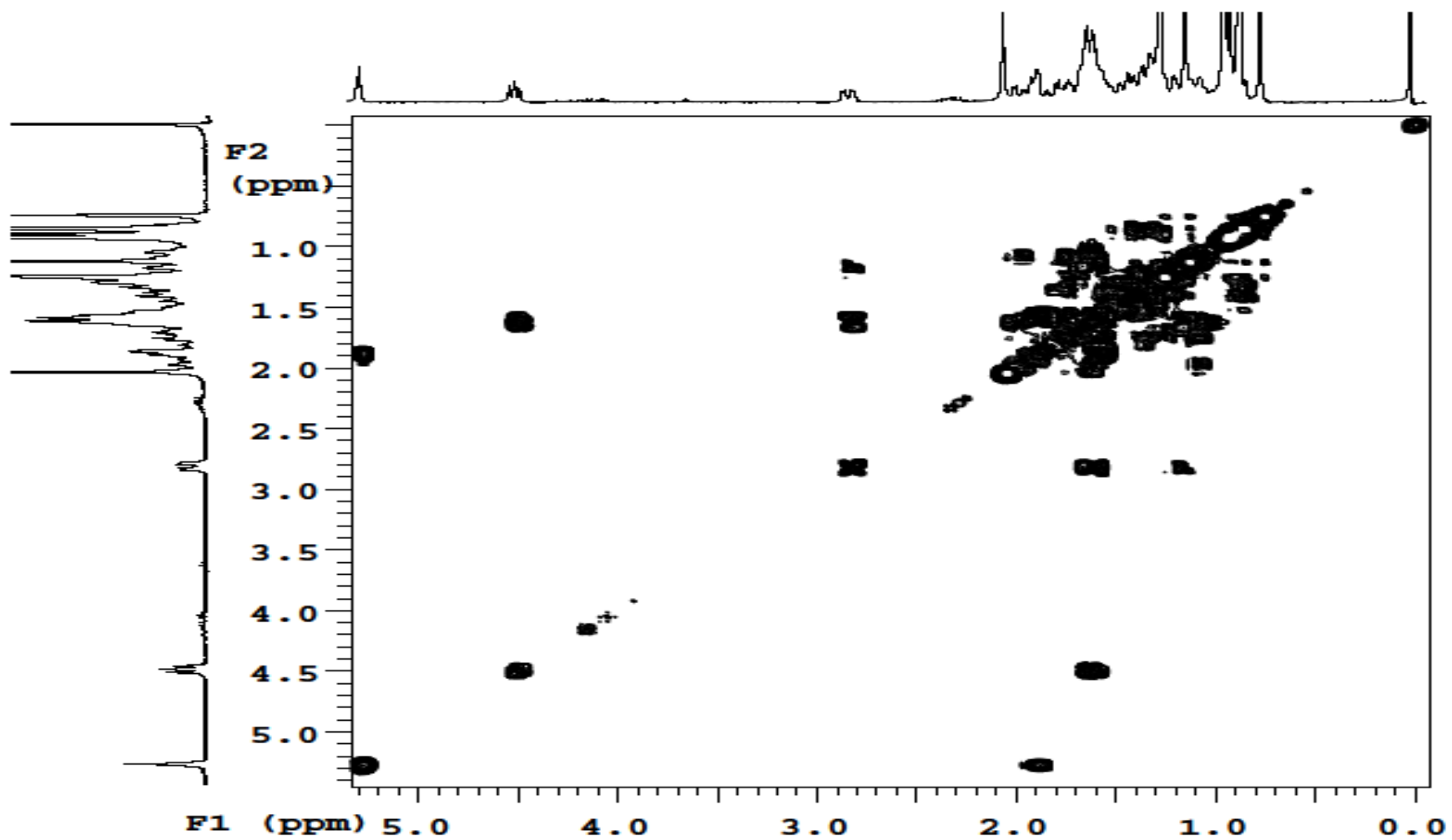


Figura 68 – Espectro de COSY do ácido 3-O-acetiloleanóico (MSI-17)

Tabela 09 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz), COSY e HMBC do ácido 3-O-acetiloleanólico isolada da *M. stipitatum*

C	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult</i> , <i>J</i> em Hz)	COSY	HMBC
1 (CH ₂)	38,3	1,06 (<i>m</i>); 1,62 (<i>m</i>)		
2 (CH ₂)	23,7	1,62 (<i>m</i>)	4,50	4,50 (H-3)
3 (CH)	81,1	4,50 (<i>dd</i> ,...)	1,62	1,62 (H-1,2); 0,85/0,87 (H-23/H-24)
4 (C)	37,9	-	-	4,50 (H-3)
5 (CH)	55,5	0,83 (<i>m</i>)		1,57 (H-7); 0,94 (H-25); 0,85/0,87 (H-23/H-24)
6 (CH ₂)	18,4	1,40 (<i>m</i>); 1,56 (<i>m</i>)		
7 (CH ₂)	32,8	1,31 (<i>m</i>); 1,57 (<i>m</i>)		0,75 (H-26)
8 (C)	39,5	-	-	0,75 (H-26); 1,13 (H-27)
9 (CH)	47,8	1,55 (<i>m</i>)		5,28 (H-12); 0,94 (H-25); 0,75 (H-26)
10 (C)	37,2	-	-	
11 (CH ₂)	23,6	1,88 (<i>m</i>)	5,28	5,28 (H-12)
12 (CH)	122,8	5,28 (<i>t</i> ; 3,3)	1,88	2,82 (H-18); 1,88 (H-11)
13 (C)	143,8	-	-	2,82 (H-18); 1,13(H-27); 1,88 (H-11); 1,62 (H-19)
14 (C)	41,8	-	-	2,82 (H-18); 0,75 (H-26); 1,13 (H-27)
15(CH ₂)	27,9	1,07 (<i>m</i>); 1,72(<i>m</i>)		1,13 (H-27)
16(CH ₂)	23,1	1,62 (<i>m</i>); 1,97 (<i>m</i>)		2,82 (H-18)
17 (C)	46,8	-	-	
18 (CH)	41,2	2,82 (<i>dd</i> ; 13,5; 3,9)	1,18;1,62	
19(CH ₂)	46,1	1,18 (<i>m</i>); 1,62 (<i>m</i>)	2,82	0,91 (H-29)
20 (C)	30,9	-	-	0,91/0,93 (H-29/H-30)
21(CH ₂)	34,0	1,10 (<i>m</i>); 1,36 (<i>m</i>)		0,91 (H-29)
22(CH ₂)	32,7	1,44 (<i>m</i>); 1,77 (<i>m</i>)		
23(CH ₃)	28,3	0,87 (<i>s</i>)	-	4,50 (H-3); 0,85 (H-24)
24(CH ₃)	16,9	0,85 (<i>s</i>)	-	4,50 (H-3); 0,87 (H-24)
25(CH ₃)	15,6	0,94 (<i>s</i>)	-	
26(CH ₃)	17,4	0,75 (<i>s</i>)	-	
27(CH ₃)	26,1	1,13 (<i>s</i>)	-	
28 (C)	183,6	-	-	1,77 (H-22); 1,97 (H-16)
29(CH ₃)	33,3	0,91 (<i>s</i>)	-	0,93 (H-30)
30(CH ₃)	23,8	0,93 (<i>s</i>)	-	0,91 (H-29)
2'(CO)	171,2	-	-	4,50 (H-3); 2,04 (CH ₃)
1'(CH ₃)	21,5	2,04 (<i>s</i>)		

Tabela 10 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) do ácido 3-*O*-acetiloleanólico isolada da *M. stipitatum* e do 3-*O*-acetiloleanólico relatado (CDCl_3 ; 100 MHz) no trabalho de Kwon et al. (2008)

N. da cadeia	DEPT	δ_{C} (literatura)	δ_{C} (<i>M. stipitatum</i>)
01	CH ₂	38,2	38,3
02	CH ₂	23,7	23,7
03	CH	81,1	81,1
04	C	37,9	37,9
05	CH	55,5	55,5
06	CH ₂	18,4	18,4
07	CH ₂	32,6	32,8
08	C	39,5	39,5
09	CH	47,7	47,8
10	C	37,1	37,2
11	CH ₂	23,6	23,6
12	CH	122,7	122,8
13	C	143,8	143,8
14	C	41,7	41,8
15	CH ₂	27,9	27,9
16	CH ₂	23,0	23,1
17	C	46,7	46,8
18	CH	41,1	41,2
19	CH ₂	46,0	46,1
20	C	30,9	30,9
21	CH ₂	34,0	34,0
22	CH ₂	32,7	32,7
23	CH ₃	28,2	28,3
24	CH ₃	16,9	16,9
25	CH ₃	15,6	15,6
26	CH ₃	17,3	17,4
27	CH ₃	26,1	26,1
28	C	184,4	183,6
29	CH ₃	33,3	33,3
30	CH ₃	23,8	23,8
1'	C	171,1	171,2
2'	CH ₃	21,5	21,5

4.1.7 Medicarpina (MSI-18)

Diferente das demais substâncias isoladas, o espectro de RMN de ^1H da medicarpina (Figura 69) indicava uma natureza aromática. A integração do espectro apresentou 6 H aromáticos, sendo 3 dupletos com J compatíveis a acoplamento *orto* (δ_{H} 6,55 J = 7,5Hz, δ_{H} 7,13 J = 8,7 Hz e δ_{H} 7,39 J = 8,1Hz) e outros 3 hidrogênios na região de 6,42 a 6,46 ppm. Também foram observados a presença de metoxila pelo singleto em δ_{H} 3,77, um C-H carbinólico e benzílico pelo duplete em δ_{H} 5,49 (J = 6,6 Hz) e também 2 multipletos em δ_{H} 4,21 a 4,26 e em δ_{H} 3,49 a 3,66 integrando para 3 hidrogênios (Figuras 70, 71A, 71B e 72).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 73, 74A e 74B) apresentou 16 sinais sugerindo a estrutura de um flavonóide metoxilado. Pela ausência de sinal referente a carbono carbonílico somados aos deslocamentos dos carbonos apresentados no espectro de DEPT 90 e 135 (Figura 75) em δ_{H} 39,7 (CH), 66,8 (CH_2) e 78,7 (CH) (6a, 6 e 11a respectivamente) indicaram a estrutura de um pterocarpano. Com estes dados foi possível postular a estrutura parcial de um pterocarpano dissubstituído com metoxila e hidroxila (Figura 76), por ter apresentado sinais de carbonos aromáticos oxigenados em δ_{H} 156,9, 157,3, 160,9 e 161,4 (4a, 3, 10a e 9 respectivamente).

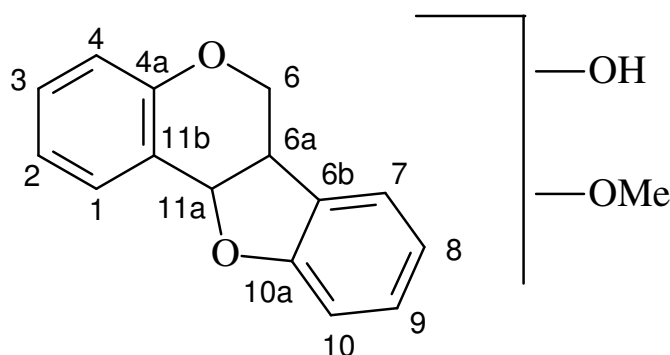


Figura 76 – Estrutura parcial da medicarpina

O padrão de substituição do pterocarpano para a hidroxila e metoxila ficou evidente pela presença dos 3 dupletos com acoplamentos *orto*. Para esta situação a hidroxila foi prevista em C-3, por razões biossintéticas a outra posição oxigenada seria em C-8 ou C-9 (Figura 77).

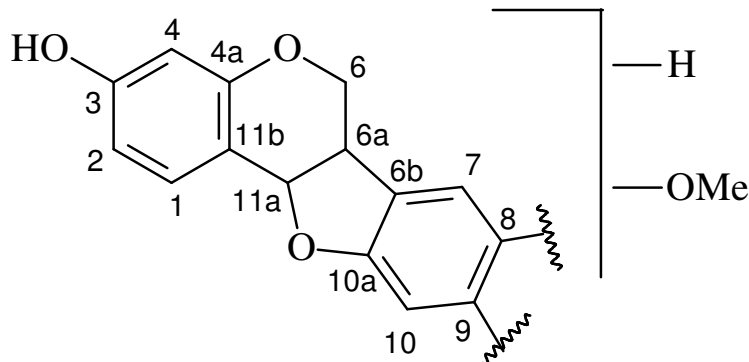


Figura 77 – Estrutura parcial da medicarpina

A substituição em C-9 foi a mais provável por atender a presença de um C-H aromático bastante protegido *orto* a dois oxigênios (C-10, δ_c 97,2), pela presença de uma correlação no espectro de HMBC (Figura 78) entre o Ar-H (H-8) e o C-6b, pela proteção *orto* oxigenado no C-8 (δ_c 106,6) e pelo experimento de NOEDIF (Figura 79) ter confirmado que C-8 e C-10 estão *orto* a metoxila. Outro fato que reforçou essa ideia foi a falta do efeito de proteção *orto* oxigenado em C-7 (δ_c 125,0) eliminando-se assim a substituição em C-8.

Uma busca pela literatura foi encontrado por Piccinelli et al. (2005) valores de deslocamento químicos de carbono da medicarpina similares aos valores da isolada na *M. stipitatum* (Tabela 11).

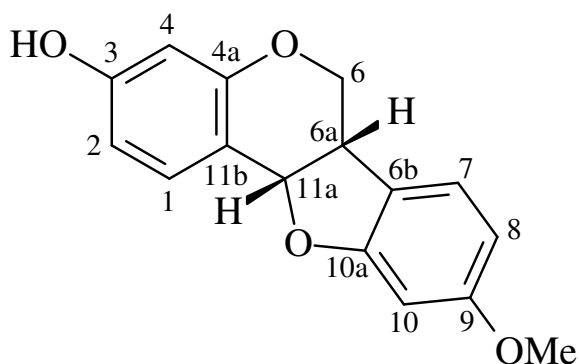
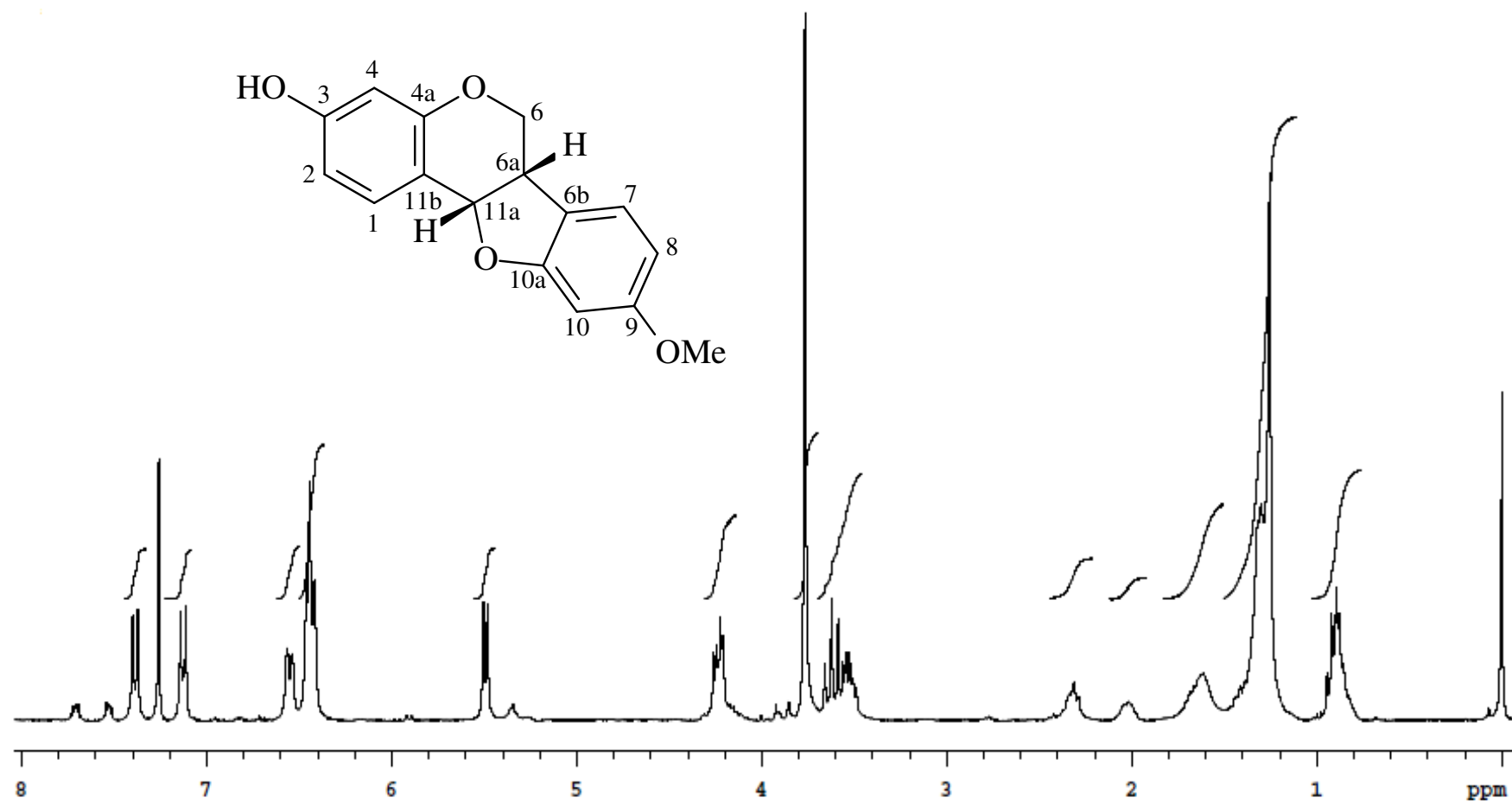


Figura 69 – Estrutura do medicarpina (MSI-18)



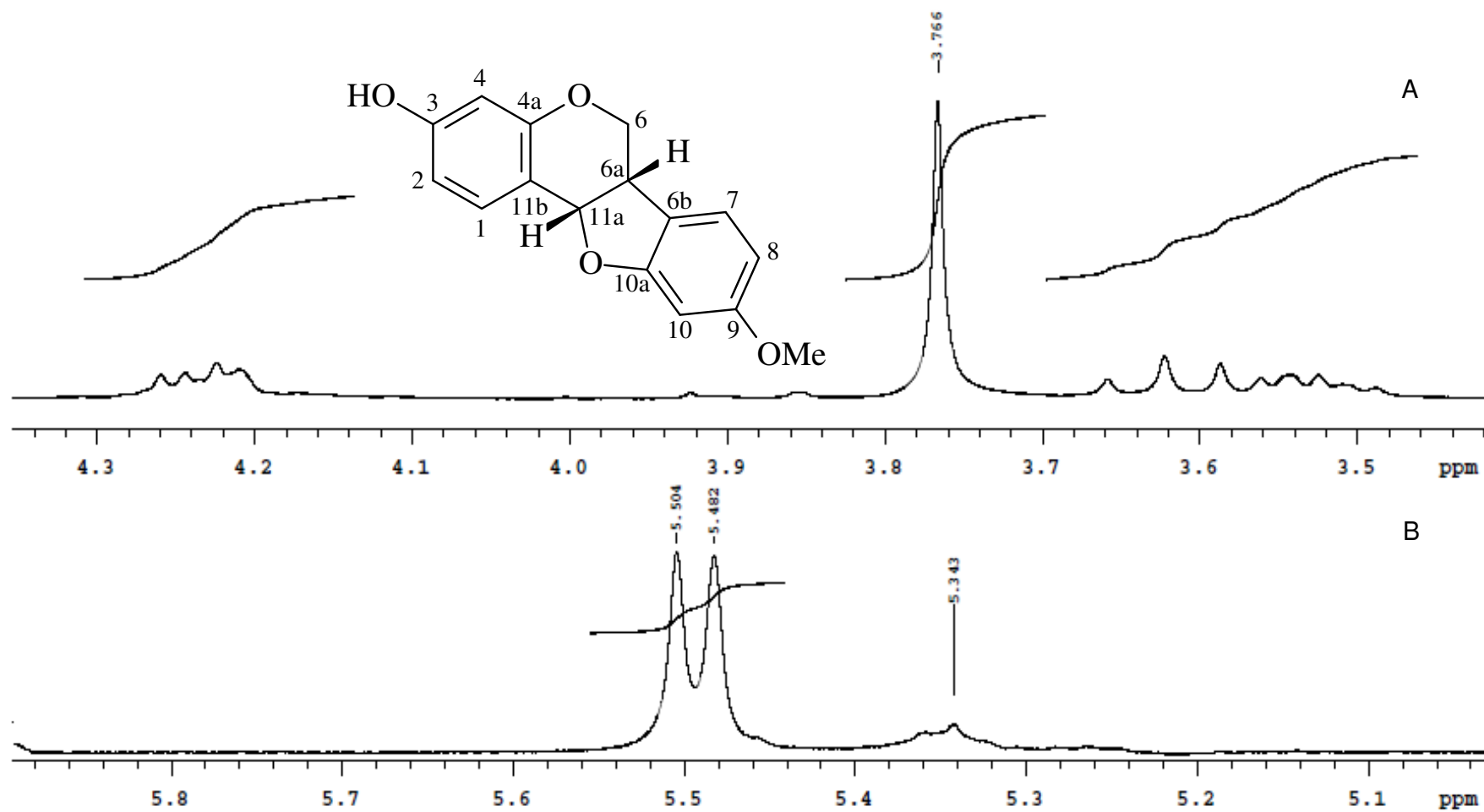


Figura 71 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18) em (A) 3,40 a 4,40 ppm e (B) 5,00 a 6,00 ppm

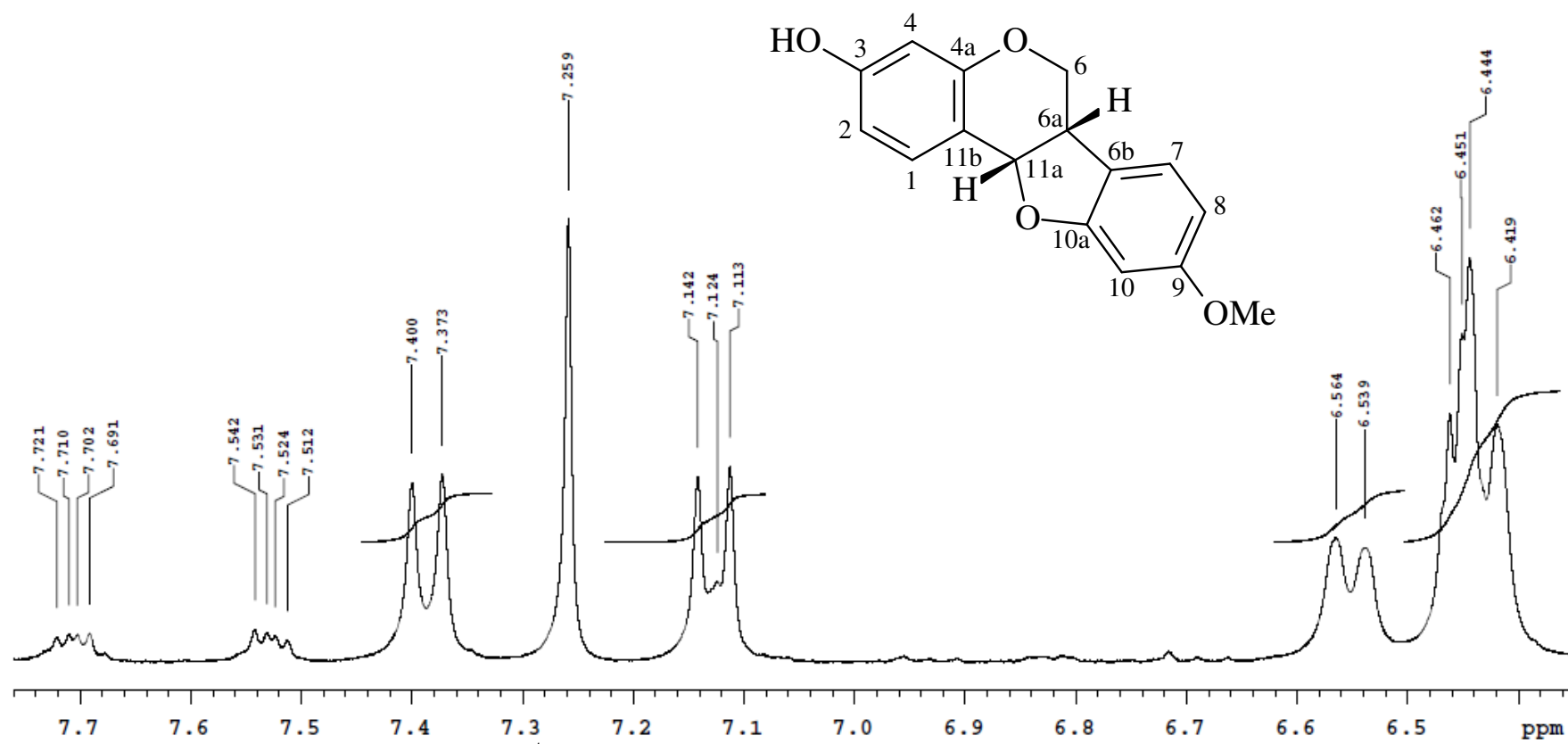


Figura 72 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18) em 6,36 a 7,76 ppm

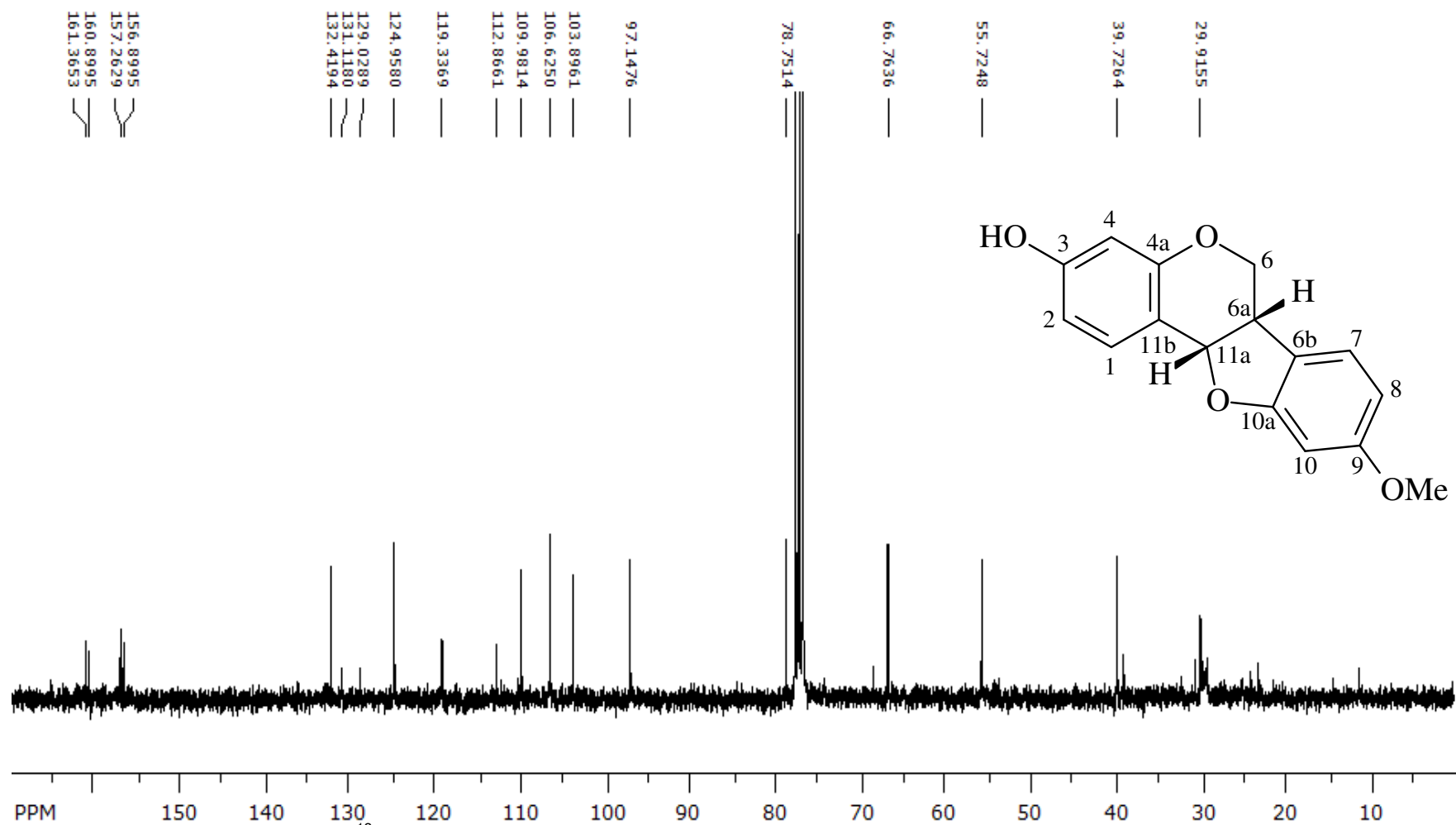


Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina (MSI-18)

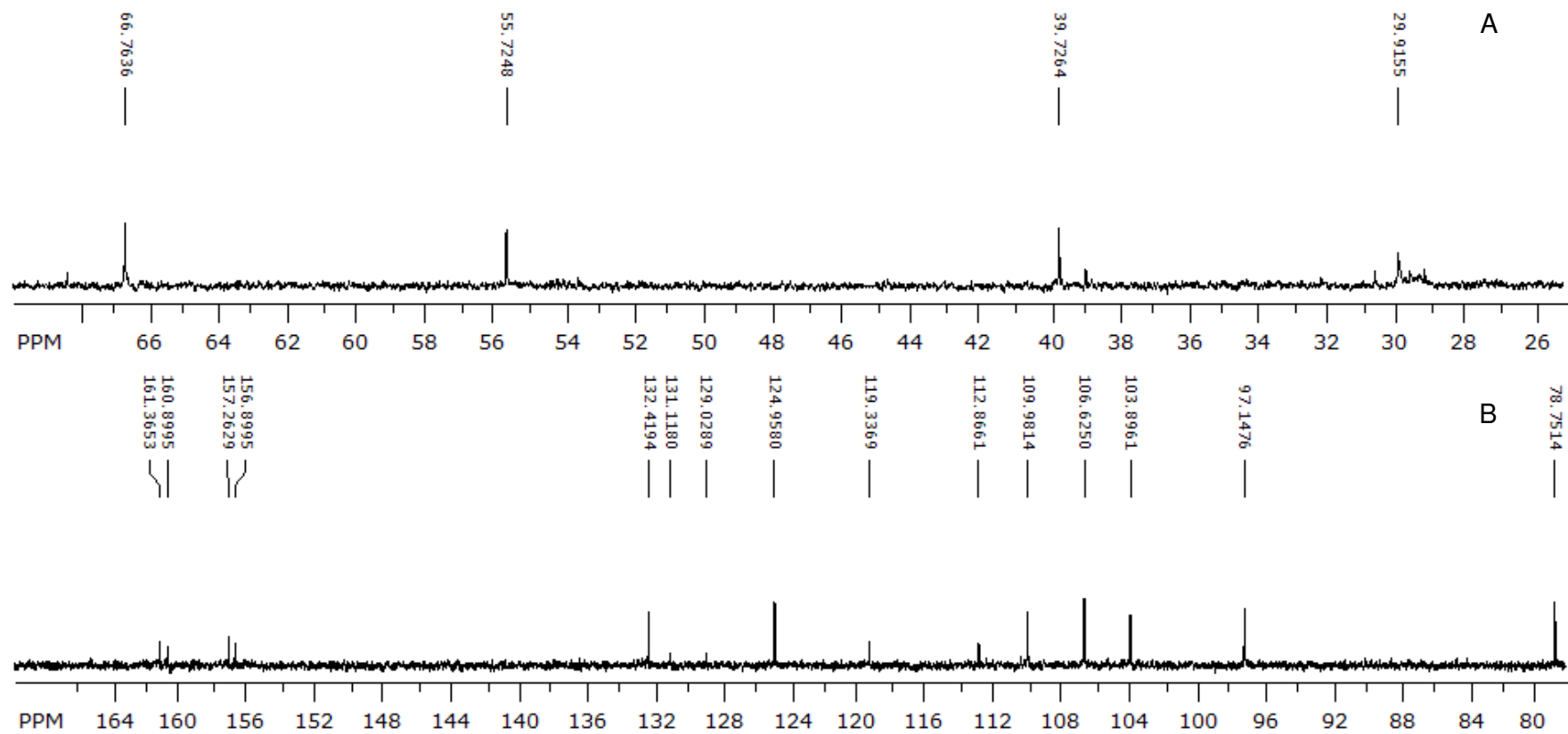


Figura 74 – Ampliações do RMN de ^{13}C da medicarpina (MSI-18) em (A) 25,0 a 69,0 ppm e (B) 78,0 a 166,0 ppm

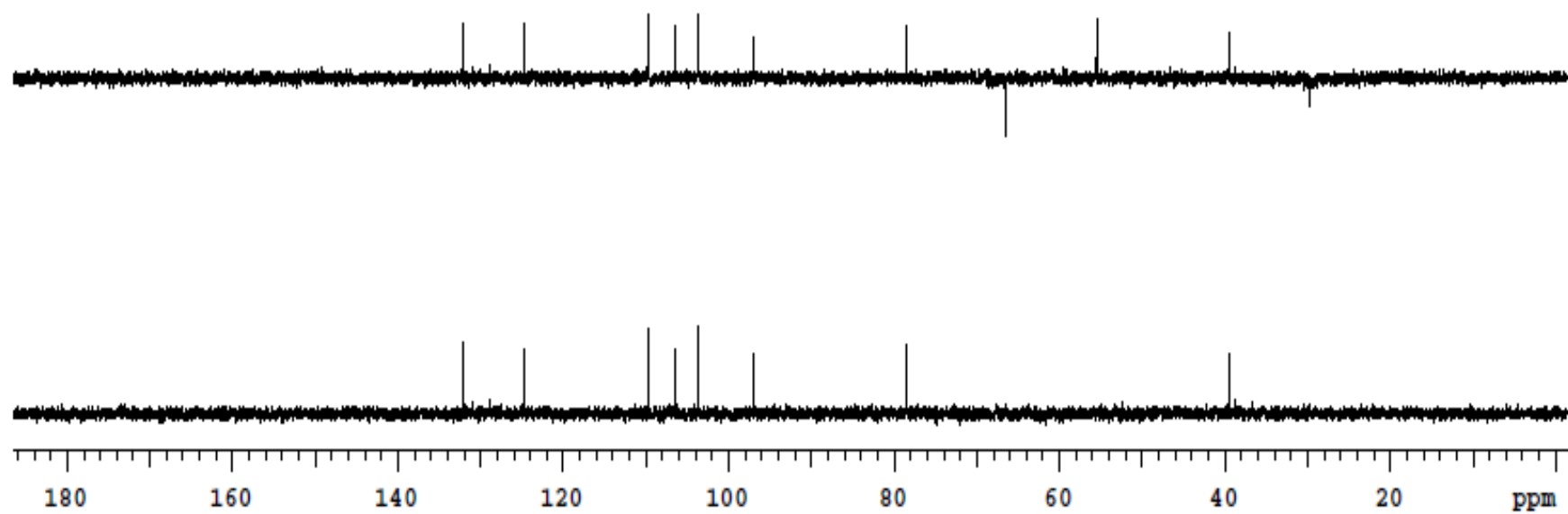


Figura 75 – Espectro de DEPT da medicarpina (MSI-18)

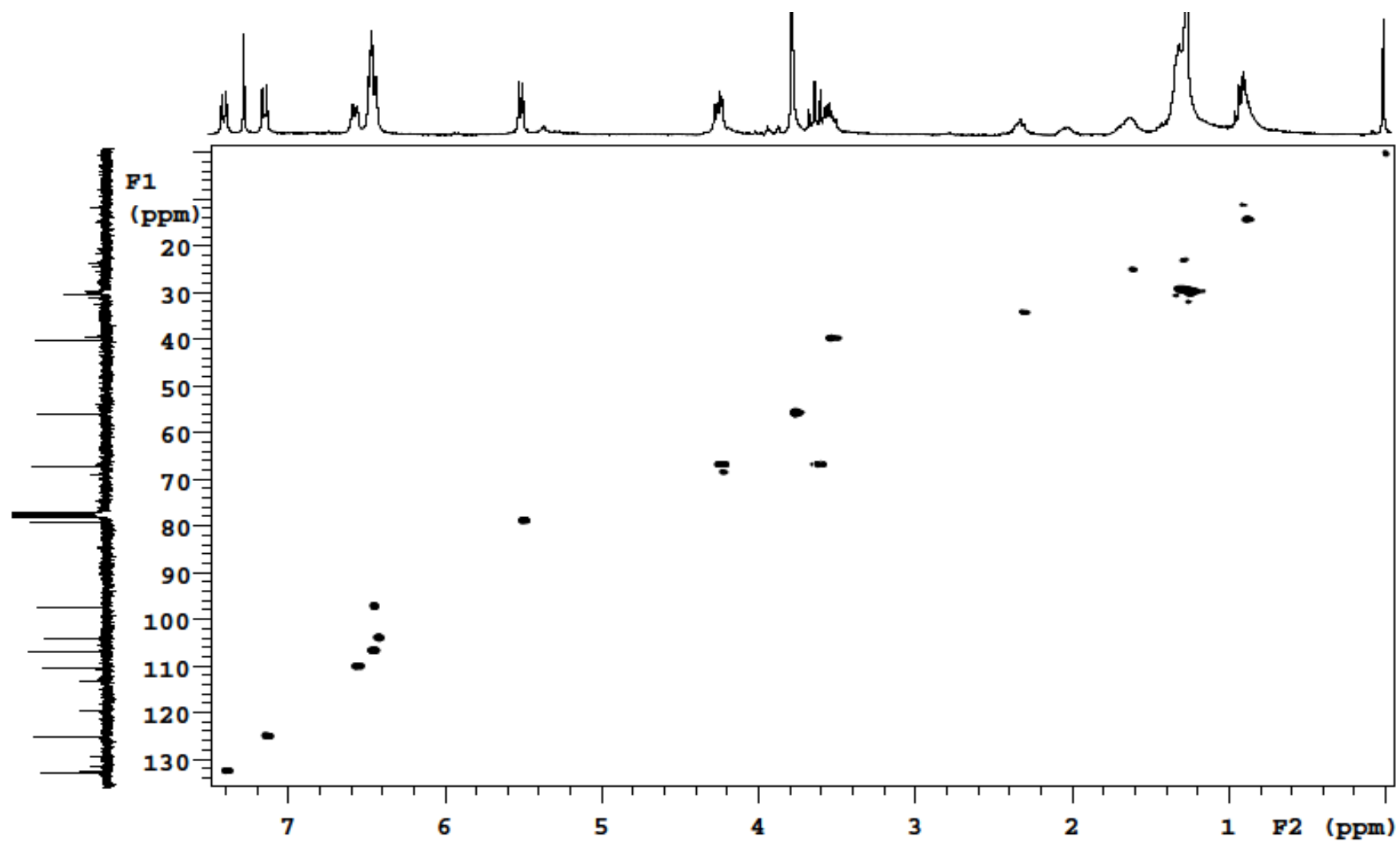


Figura 78 – Espectro de HMBC da medicarpina (MSI-18)

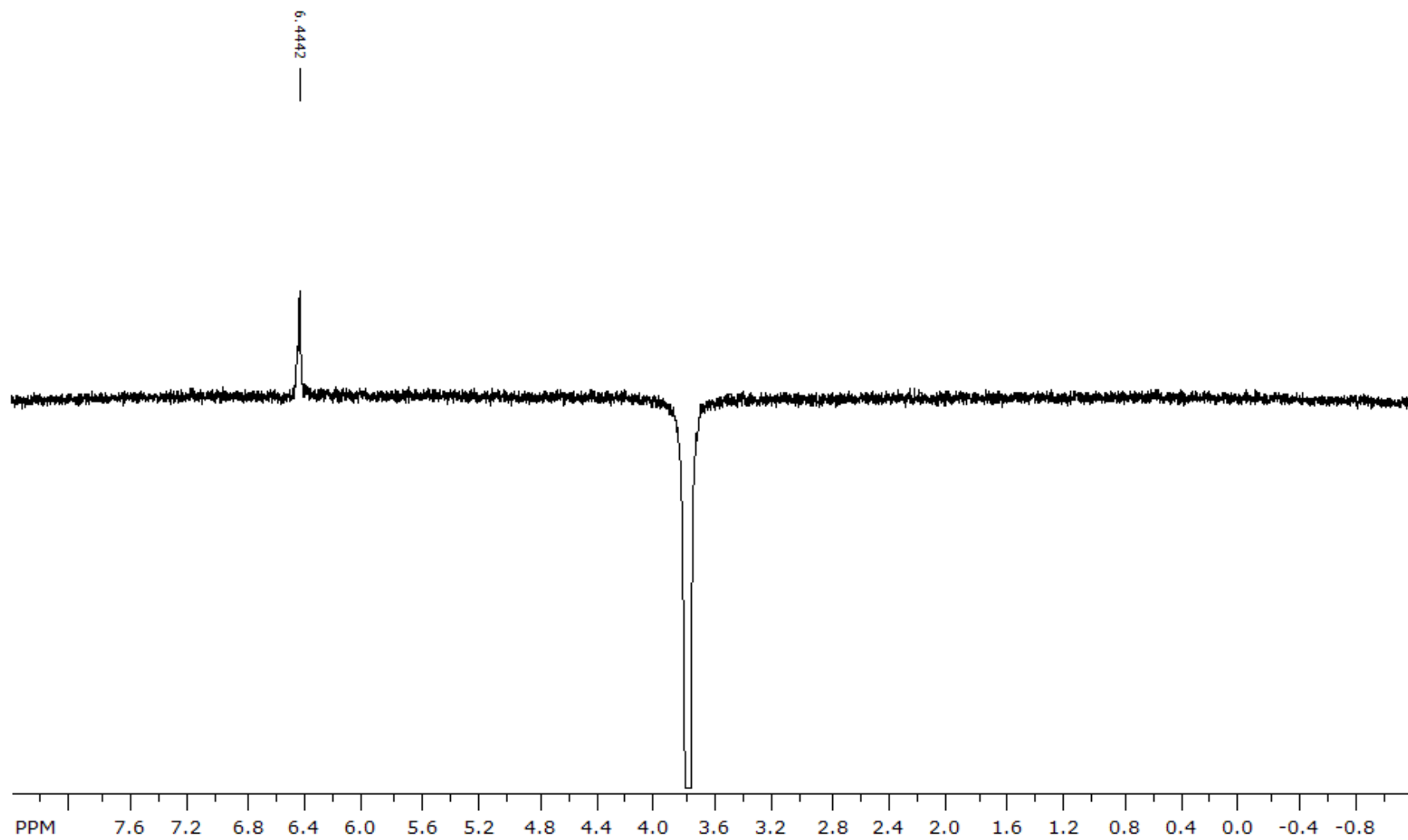


Figura 79 – Espectro de NOEDIF da medicarpina (MSI-18)

Tabela 11 – Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 MHz) da medicarpina isolada da *M. stipitatum* e da medicarpina relatada (CD_3OD ; 150 MHz) no trabalho de Piccinelli et al. (2005)

N. da cadeia	DEPT	δ_{C} (Literatura)	δ_{C} (<i>M. stipitatum</i>)	δ_{H} (<i>M. stipitatum</i>)
01	CH	133,2	132,4	7,39 (d) 8,1Hz
02	CH	110,7	110,0	6,55 (d) 7,8 Hz
03	C	160,1	157,3	-
04	CH	104,1	103,9	6,42 (s)
4a	C	158,0	156,9	-
6	CH ₂	67,6	66,8	3,60 (d) 10,5 Hz, 4,23 (dd) 4,8 Hz
6a	CH	40,9	39,7	3,51 (m)
6b	C	120,9	119,3	-
07	CH	126,0	125,0	7,13 (d) 8,1 Hz
08	CH	107,3	106,6	6,45 (d) 7,23
09	C	162,6	161,4	-
10	CH	97,6	97,2	6,45 (s)
10a	C	162,0	160,9	-
11a	CH	80,1	78,7	5,49 (d) 6,6 Hz
11b	C	112,9	112,9	-
MeO-	CH ₃	55,9	55,7	3,77 (s)

4.2 ENSAIO ANTIMICROBIANO CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS

Os ensaios contra fungos filamentosos foram desenvolvidos no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, para isso foram utilizados os fungos *Alternaria* sp e *Botryosphaeria ribis* (*B. ribis*). Os ensaios consistiram em avaliar a capacidade das frações ou dos extratos do caule de *M stipitatum* em inibir o crescimento desses fungos em meio de cultivo (BDA).

4.2.1 *Alternaria* sp

As frações (AcOEt 10% e AcOEt 100%) e os extratos (AcOEt 100%) de solventes orgânicos e o alcoólico não apresentaram nenhuma taxa de inibição contra o fungo *Alternaria* sp. Já o extrato aquoso apresentou considerável taxa de inibição em ambas as concentrações, sendo de 35,2, 35,0 e 38,4 % para as concentrações 2,0, 3,0 e 4,0 mg respectivamente, como é observado na Figura 80 e Tabela 12.

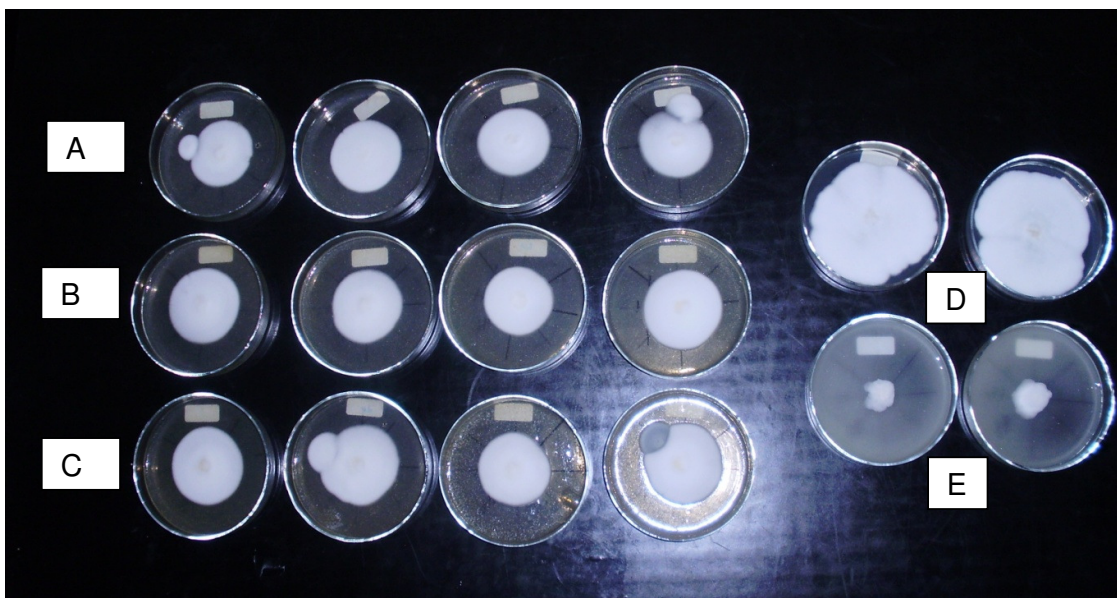


Figura 80 – Foto do ensaio com o fungo filamentosso *Alternaria* em extrato aquoso, senado (A) quaduplicata do extrato na concentração 2,0 mg/placa, (B) quaduplicata do extrato na concentração 3,0 mg/placa, (C) quaduplicata do extrato na concentração 4,0 mg/placa, (D) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (E) controle negativo com o antifúngico captan (0,18%)

4.2.2 *Botryosphaeria ribis*

No ensaio antimicrobiano utilizando o fungo *B. ribis* não apresentou resultado consistente para as frações e os extratos de solventes orgânicos. A fração AcOEt 10% não apresentou taxa de inibição na concentração 3,0 mg, mas apresentou nas concentrações 2,0 e 4,0 mg (17,0 e 14,3% respectivamente). A

fração AcOEt 100% não inibiu o crescimento do fungo nas concentrações 2,0 e 4,0 mg, somente a concentração 3,0 mg mostrou uma pequena taxa de inibição (2,6%). O extrato AcOEt não apresentou resposta na concentração 2,0 mg, mas houve nas as concentrações 3,0 e 4,0 mg (18,5 e 24,8% respectivamente), no extrato alcoólico novamente não mostrou nenhuma taxa de inibição para todas as concentrações (Tabela 12).

O ensaio com o extrato aquoso apresentou maior taxa de inibição em relação aos demais. Na concentração de 2,0 mg a taxa foi de 64,9% e nas concentrações de 3,0 e 4,0 mg a taxa de inibição foi de 71,2% (Figuras 81, 82 e 83, Tabela 12). Como houve uma contaminação por bactéria numa primeira tentativa, foi utilizado antibiótico nos meios de cultivos, fazendo-se necessário então a utilização de um controle positivo contendo somente o antibiótico.

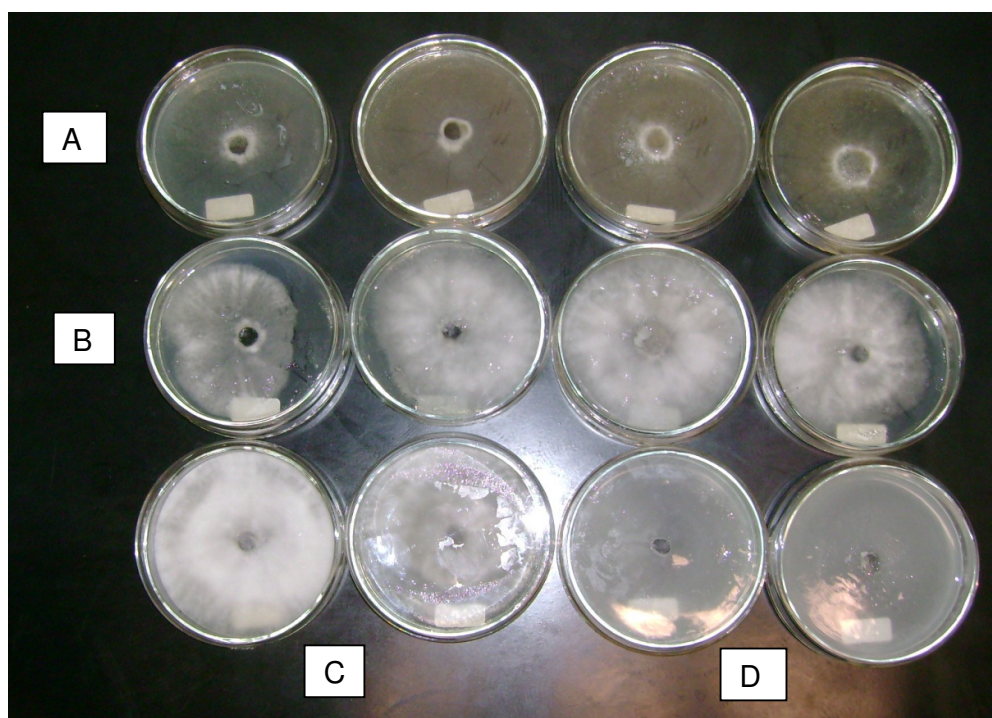


Figura 81 – Foto do ensaio com o fungo filamentoso *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 2 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)

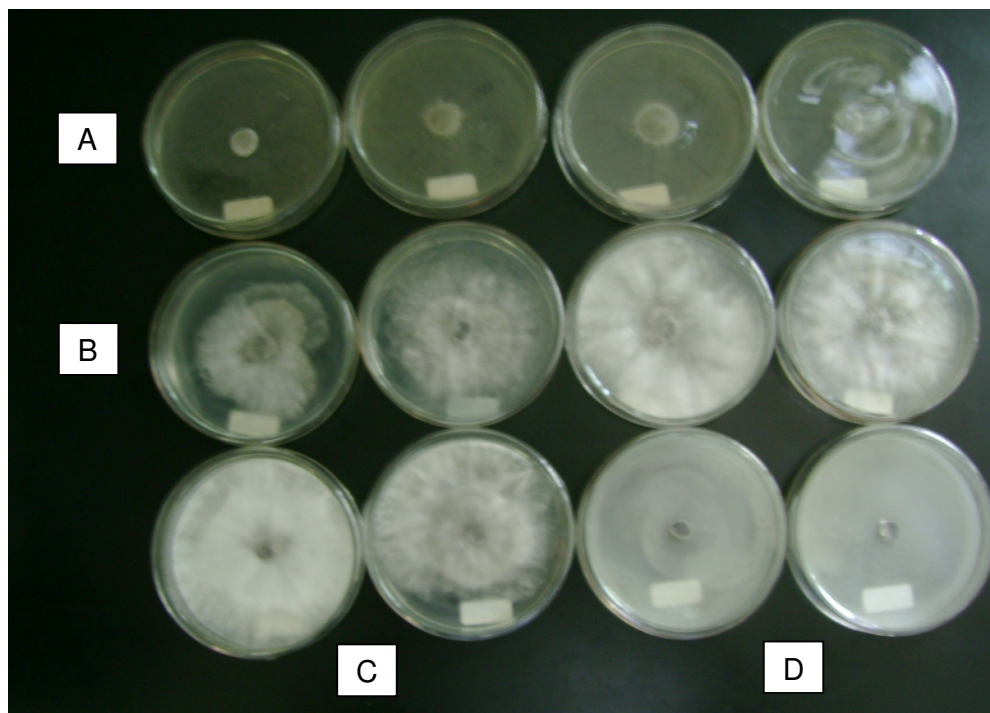


Figura 82 – Foto do ensaio com o fungo filamentosso *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 3,0 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)

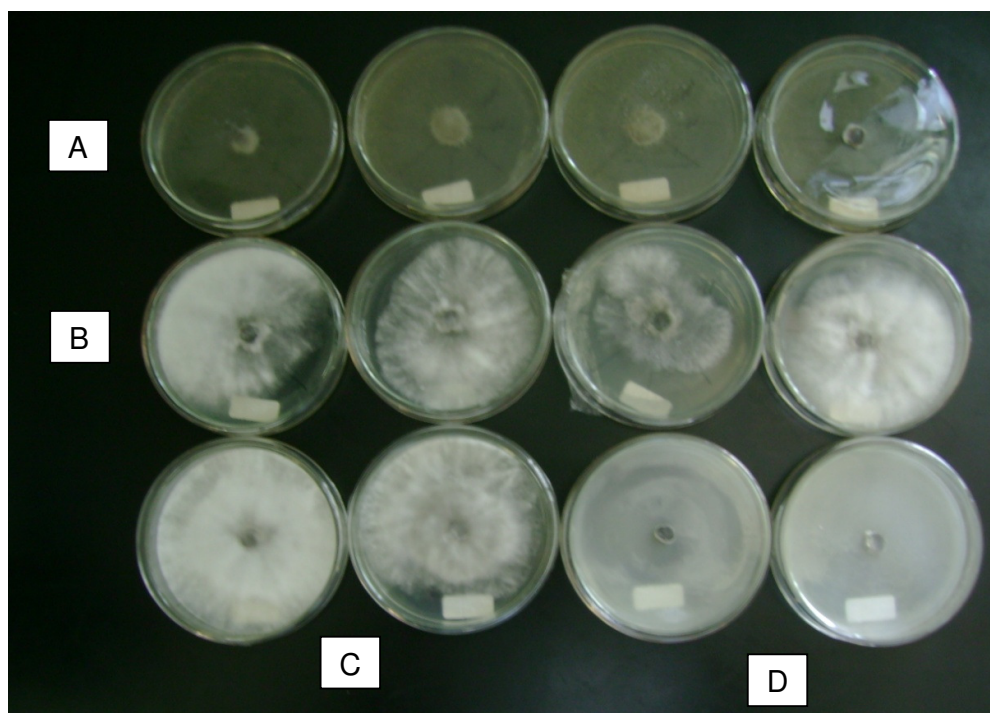


Figura 83 – Foto do ensaio com o fungo filamentosso *B. ribis* em extrato aquoso, sendo (A) quaduplicata do extrato na concentração 4,0 mg/placa, (B) quaduplicata de meio com antibiótico, (C) duplicata do controle positivo (sem extrato) e (D) controle negativo com antifúngico captan (0,18%)

A Tabela 12 apresenta a taxa de inibição das frações e dos extratos contra os fungos filamentosos *Alternaria* sp e *B. ribis*. Fica evidenciado a diferença de inibição do extrato aquoso em relação as frações, o extrato AcOEt e o extrato alcoólico. O extrato aquoso com a taxa de inibição de 64,9 e 71,2%, frente ao *B. ribis*, se aproxima da melhor taxa de inibição (80%) relatado por Quiroga, Sampietro e Vattuone (2001) em seu trabalho.

Tabela 12 – Valores da taxa de inibição contra fungos filamentosos para as frações e os extratos de *M. stipitatum* em solventes orgânicos, alcoólico e aquoso nas concentrações 2,0, 3,0 e 4,0 mg/placa para os fungos filamentosos *Alternaria* sp e *B. ribis*

Frações/Extratos	[Extrato] / (mg / placa)	Taxa de inibição / %	
		<i>Alternaria</i>	<i>B. ribis</i>
AcOEt 10%	2,0	N.D.	17,0
	3,0	N.D.	N.D.
	4,0	N.D.	14,3
AcOEt 100%	2,0	N.D.	N.D.
	3,0	N.D.	2,6
	4,0	N.D.	N.D.
Bruto AcOEt 100%	2,0	N.D.	N.D.
	3,0	N.D.	18,5
	4,0	N.D.	24,8
Etanólico	2,0	N.D.	N.D.
	3,0	N.D.	N.D.
	4,0	N.D.	N.D.
Aquoso	2,0	35,2	64,9
	3,0	35,0	71,2
	4,0	38,4	71,2

N.D. (Não detectado)

5 CONCLUSÕES

No estudo químico do extrato de AcOEt do caule de *M. stipitatum* apresentou predominância a duas classes de compostos (triterpenos e fitoesteróides) nos constituintes isolado. Considerando que os triterpenos são relatados como agentes antimicrobianos, os fitoesteroides estão sendo estudados quanto a sua ação antioxidante somados aos poucos relatos da presença dessas duas classes de compostos no gênero *Machaerium*, o resultado do estudo foi bastante satisfatório.

Outro resultado relevante foi a identificação de um isoflavonóide (medicarpina) no extrato de AcOEt do caule de *M. stipitatum*. Além dessa classe de composto ser bastante estudada, a medicarpina é relatada em outras espécies do gênero *Machaerium*, abrindo assim uma possibilidade, através de novos estudo, dela vir a se tornar um bio marcados da espécie.

Os ensaios contra fungos filamentosos apresentaram bons resultados utilizando o extrato aquoso. Além do bons resultados para taxa de inibição, a natureza desse solvente foi também um ponto positivo, já que para uma possível aplicação direta não haveria a influência do solvente.

Novos estudos na espécie *M. stipitatum* se fazem necessários pelos bons resultados obtidos. A possibilidade da investigação do agente responsável pela inibição do crescimento do fungo no extrato aquoso e o estudo químico buscando novas classes de compostos, pode ser um exemplo disso.

REFERÊNCIAS

- BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C. e SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.. Controle de *Alternaria solani* em Tomateiro por Extratos de Curcuma longa e Curcumina - II. Avaliação in vivo. **Fitopatol. Bras.** v. 31, n. 4, p. 401-404, jul - ago 2006.
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M.; CARL, D. **Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems XXXII Pentacyclic Triterpenes**. Disponível em:< <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00905a036>>. Acesso em: 5 nov. 2010.
- CECHINEL FILHO, VALDIR e YUNES, ROSENDO A.. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.
- CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 1998, 179 p.
- DEWICK, P. M.. The Mevalonate And Deoxyxylulose Phosphate Pathways. In:_____. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. 2ª Ed, England: John Wiley & Sons, 2002, p. 212-225 e 237.
- FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. **Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais**, 1989. 590p.
- GUPTA, RAJNISH; SHARMA, A. K.; DOBHAL, M. P. SHARMA, M. C. e GUPTA, R.S.. Antidiabetic and antioxidant potential of b-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. **Journal of Diabetes**. v. 3, p. 29-37, 2011.
- HEIZEN, HORACIO; DE VRIES, J. X.; MOYNA, P.; REMBERG, GERD; MARTINEZ, R. e TIETZE, L. F.. Mass Sprctrometry of Labelled Triterpenoids: Thermospray and Electron Impact Ionization Analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 7, p. 237-244, 1996.
- HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152 p.
- JIN, YUAN-PENG; WEI, XIAO-NING E SHI, YAN-PING. Chemical Constituents from *Cynoglossum gansuense*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p. 776-782, 2007.
- KOVGANKO, N. V.; KASHKAN, Z. N.; BORISOV, E. V. e BATURA, E. V.. ¹³C NMR Spectra of β-Sitosterol Derivatives With Oxidized Rings A and B. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 35, n. 6, 1999.
- KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1413-1415, 1978.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e DE OLIVEIRA, A. B.. Mucronulatol, mucroquinone and mucrocarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1405-1411, 1978.

KUROSAWA, K.; OLLIST, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e DE OLIVEIRA, A. B.. Mucronustyrene, mucronulastyrene and villostyrene, cinnamylphenols from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1389-1394, 1978.

KWON, JOO-HEE; CHANG, MIN-JUNG; SEO, HYO-WON; LEE, JEONG-HUN; MIN, BYUNG-SUN; NA, MINKYUN; KIM, JIN CHEOL; WOO, MI HEE; CHOI, JAE SUE; LEE, HYEONG KYU e BAE, KIHWAN. Triterpenoids and a Sterol from the Stem-bark of *Styrax japonica* and Their Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activities. **Phytotherapy Research**. v.22, p. 1303-1306, 2008.

LORENZI, HARRI. **Ávores brasileiros: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Ed. Platarum, 2002. v.1, 368 p.

LUZ, S. M.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILLOHN, G. M. S. P. e VILHENA, K. S. S.. . Atividade Alelopática de Substâncias Químicas Isoladas da *Acacia Mangium* e Suas Variações em Função do pH¹, **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 3, p. 479-487, 2010.

MARCHIORI, JOSÉ NEWTON CARDOSO. **Dendrologia das angiospermas: Leguminosas**. Santa Maria: Ed. UFSM, 1997. 200p.

MEDEIROS, A. C. S. e ZANON, A. Armazenamento de Sementes de Sapuva (*Machaerium stipitatum*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p. 59, jan./jun., 2000. Disponível em: <http://ww2.cnpf.embrapa.br/internet/internet/boletim/boletarqv/boletim40/medeiros.pdf>.

MUHAMMAD, I.; LI, XING-CONG; DUNBAR, D. C.; ELSOHLI, M. A. e KHAN, I. A.. Antimalarial (+)-trans-hexahydrodibenzopyran derivatives *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v.64, n.10, p.1322-1325, 2001.

MUHAMMAD, I.; LI, XING-CONG; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; DUNBAR, D. C. e FERREIRA, D.. Antimicrobial and antiparasitic (+)-trans-hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**. v.66, n.6, p.804-809, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; GOTTLIEB, O. R.; OLLIS, W. D. e RIZZINI, C. T.. A phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*. **Phytochemistry**. v.10, n.8, p.1863-1876, 1971.

OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. e MAGALHAÃES, M. T.. Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. nictitans*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1383-1388, 1978.

OLLIS, W. D.; REDMANA, B. T.; SUTHERLANDA, I. O.; e GOTTLIEB, O. R.. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**. v.17, n.8, p.1379-1381, 1978.

OLLIS, WILLIAM. D. New structural variants among the isoflavonoid and neoflavonoid classes. **Recent Advances in Phytochemistry**. v.1, p.329-378, 1966 ERA1968, MAS O CERTO É 1966, CORRIGIR.

OTIE, JEAN; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G. e NKENGFACK, A. E.. Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 1, p. 62-67, 2006.

PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I. M.; DE SIMONE, F. E RASTRELLI, L.. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p. 9010-9016, 2005.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S. e PRACHAYASITTIKUL, V.. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**. v. 14, p. 850-867, 2009.

QUIROGA, E. N., SAMPIETRO, A. R. e VATTUONE, M.A. **Screening antifungal activities of selected medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 89–96, 2001.

SARTORI, A. L. B. e TOZZI, A. M. G. A. As espécies de *Machaerium* Pers. (Leguminosae - Papilionoideae - Dalbergieae) ocorrentes no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 3, São Paulo, dez. 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^aed. Porto Alegre/Florianópolis, **Editora da UFRGS/Editora da UFSC**, v. 14, p. 242, 2004.

SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APPLOLÍNARIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G. e BRAZ-FLILHO, R.. Triterpenoids Isolated From *Parahancornia amapa*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 2, n. 1, p. 15-20, 1991.

YOSHIMOTO, T.; MAKINO, TETSUYA; MINAMI, KYOJI.. n-Hexane extracts from the heartwoods of the genera *Machaerium* and *Proposis*. **Mokuzai Gakkaishi**. v.21, n.12, p.686-689, 1975.

YU, XIAOLIN; WANG, WEN; YANG, MING. Antioxidant activities of compounds isolated from *Dalbergia odorifera* T. Chen and their inhibition effects on the decrease of glutathione level of rat lens induced by UV irradiation, **Food Chemistry**, v.104, p.715-720, 2007.