



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SANDY CRISTINA RIEGER

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, BACTERIOSTÁTICA E ANTI-HELMÍNTICA
DE *Inga marginata* Willd**

SANDY CRISTINA RIEGER

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, BACTERIOSTÁTICA E ANTI-HELMÍNTICA
DE *Inga marginata* Willd**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R554c Rieger, Sandy Cristina.

Constituintes químicos e atividades antioxidante, bacteriostática e anti-helmíntica de *Inga marginata* Willd / Sandy Cristina Rieger. – Londrina, 2011.
126 f. : il.

Orientador: Terezinha de Jesus Faria

Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Inga marginata*. – Teses. 2. CLAE-DAD. Teses. 3. Antraquinona.– Teses. 4. Anti-helmíntico. – Teses. 5. Compostos Fenólicos. – Teses. I. Faria, Terezinha de Jesus. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Universidade Estadual de Londrina. IV. Título.

CDU 579.9

SANDY CRISTINA RIEGER

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
BACTERIOSTÁTICA E ANTI-HELMÍNTICA DE *Inga marginata* Willd**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Maria das Graças Lins Brandão
UFMG – Belo Horizonte - MG

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
UEL – Londrina - PR

Londrina, 5 de dezembro de 2011.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Marta e Dago, que sempre se
esforçaram para que eu alcançasse
sucesso profissional e pessoal.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus pelo conforto nos momentos mais difíceis e, sobretudo, pela proteção durante todo o percurso.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À professora Terezinha, pela paciência, compreensão, estímulo, didática, orientação minuciosa e esclarecedora em todos os momentos, e, principalmente, pela confiança depositada.

A todo corpo docente do mestrado, principalmente aos professores Fernando, Dalva e Maria Cristina pelo incentivo e relevância das disciplinas ministradas durante o curso, e, principalmente, agradeço ao professor Cesar, que, além disso, ainda sempre se mostrou muito interessado e disposto a ajudar.

A todos os companheiros do laboratório e do departamento, que me auxiliaram prontamente de uma forma ou outra para a conclusão deste trabalho, especialmente aos meus amigos Jeseka, Malandrão, Tiago, Camila, Silvieli, Flávia e ao técnico Didi, pelas imprescindíveis colaborações, pelos “quebra-galhos” que vez ou outra eu precisava e principalmente pela ótima convivência.

À professora Suzana, que gentilmente disponibilizou seu laboratório para as análises de CLAE-DAD, me ajudando muito, sempre bem humorada, e ao amigo Matheus que teve muita paciência e demonstrou durante todo o trabalho muita compreensão e prestatividade, sem o qual não obteria resultados tão positivos.

À professora Rúbia, pelos testes antioxidantes e teores de fenólicos e flavonóides. Ao doutorando Eidi pelo teste anti-helmíntico e prestatividade e à mestranda Barbara pelo teste antibacteriano. Aos estagiários Lucas e Jorge pelo empenho e colaboração nos resultados.

Agradeço especialmente aos meus tios Marcio e Clau, à minha avó Eloah e ao meu avô Walter que sempre se fizeram presentes me apoiando e me ajudando. Ao meu namorado, Zé, pelo companheirismo.

E agradeço, principalmente, aos meus pais, Marta e Dago, pelo incentivo ao estudo, sempre!, pela dedicação, estímulo e apoio em minhas iniciativas e por serem exemplos de seres humanos honestos e batalhadores, sem os quais não teria conseguido mais esta vitória.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar, é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RIEGER, Sandy Cristina. **Constituintes químicos e atividades antioxidante, bacteriostática e anti-helmíntica de *Inga marginata* Willd.** 2011. 126 fls. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Inga marginata Willd é uma espécie da família Fabaceae nativa da Mata Atlântica e uma das dez espécies mais importantes da região do Médio Tibagi, no estado do Paraná. Sobre a espécie existe apenas um estudo fitoquímico relatando a presença de saponinas, taninos, fitosteróis e triterpenóides, cujas estruturas não foram elucidadas. No presente estudo foram realizados o estudo químico, as análises dos compostos fenólicos por CLAE-DAD, por reativo de Folin-Ciocalteu e avaliações de atividades biológicas dos extratos de *I. marginata*. O fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel do extrato em acetato de etila da folhas (IFA) resultou no isolamento de uma mistura de alcanos de cadeias longas e do estimasterol, enquanto que do extrato em acetato de etila dos galhos (IGA) foram isolados o lupeol, uma mistura de lupenona e friedelina e as antraquinonas fisciona e emodina, todas as substâncias relatadas pela primeira vez em *I. marginata*. As determinações estruturais foram realizadas através de técnicas espectrométricas incluindo experimentos bidimensionais de RMN do tipo COSY, HMBC e HSQC. Através das análises por CLAE-DAD foi possível quantificar no extrato IFA as seguintes substâncias: Emodina, quercetina, fisciona e ácido caurenóico. Nos extratos IGA, etanólicos das folhas (IFE) e dos galhos (IGE) foram quantificados, além dos compostos presentes em IFA, os ácidos fenólicos: gálico, 4-hidroxibenzóico, cafeico, tânico, p-cumárico, ferrúlico e cinco flavonóides: vicenina-2, rutina, apigenina, catequina e a naringenina, que foi apenas detectada e não quantificada. No extrato IFE verificou-se também a presença de uma quantidade considerável de flavonóis ou flavonas glicosilados, porém com estruturas não identificadas. O conteúdo de fenólicos foi determinado pelo método espectrométrico Folin-Ciocalteu, obtendo-se maior concentração em mg equivalente em ácido gálico/g de extrato seco para IFE (31,63) seguido pelos extratos IGE, IGA e IFA (16,69; 9,89 e 8,36, respectivamente). Pelo método espectrométrico de complexação com $AlCl_3$ foi possível verificar que o único extrato que apresentou teor de flavonóides foi IFE (18,70 mg EQ/g de extrato). Os testes de atividade antioxidante foram realizados pelo método do radical livre DPPH•, sendo positivos para os quatro extratos, porém, os extratos que apresentaram maior atividade foram IFE ($IC_{50} = 29,65 \mu g mL^{-1}$) e IGE ($IC_{50} = 74,00 \mu g mL^{-1}$). Pela técnica de microdiluição (ANVISA) foi verificado que IFE apresentou atividade bacteriostática contra *Pseudomonas aeruginosa* e IFA contra *Proteus mirabilis*. Os extratos IFA, IFE, IGA e IGE apresentaram atividade contra *Artemia salina*, sendo IFE o que apresentou maior toxicidade ($DL_{50} = 48,54 \mu g mL^{-1}$). Os quatro extratos também apresentaram atividade anti-helmíntica, destacando-se IFE ($CL_{50} = 44,70 \mu g mL^{-1}$) e IGA ($CL_{50} = 48,60 \mu g mL^{-1}$) que apresentaram taxas de letalidade equivalentes ao encontrado em *Acacia molíssima*, espécie frequentemente usada para combater helmintoses de ruminantes. As propriedades químicas e biológicas de *Inga marginata* W constatadas neste trabalho evidenciaram a espécie como promissora para uso como antioxidante e no controle de helmintose de ruminantes.

Palavras-chave: *Inga marginata* Willd. CLAE-DAD. Antraquinona. Anti-helmíntico. Compostos fenólicos

RIEGER, Sandy Cristina. **Chemical constituents and antioxidant activity, bacteriostatic and antihelmintic of *Inga marginata* Willd.** 2011. 126 fls. Dissertation (Master of Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Inga marginata Willd is a specie of the Fabaceae family native of the Mata Atlantica. It is among the ten most important species of the Middle Tibagi region in the state of Paraná. There exists just one phytochemical study on this specie regarding the presence of saponins, tannins, phytosterols and triterpenoids, however, the structures of these constituents have not been elucidated. In the present study, therefore chemical study, analysis of the phenolic compounds by HPLC-PDA and by Folin-Ciocalteu reagent and evaluation of the biological activities of extracts of the leaves and stems of *I. marginata* were conducted. Chromatographic fractionation of the ethyl acetate extract of the leaves (IFA) led to the isolation of a mixture of long chain alkanes and stigmasterol, while a study of the ethyl acetate extract obtained from the branches (IGA) resulted in the isolation of lupeol, a mixture of lupenone and friedelin, and also of the anthraquinones fisicina and emodin, the latter classe of substances unknown in *I. marginata*. The structural determinations were made by mass spectrometric analysis, IR, ^1H and ^{13}C NMR, including COSY-type two dimensional experiments HMBC and HSQC. By means of HPLC-PDA analysis it was possible to quantify the following substances in the ethyl acetate extract of the leaves (IFA): emodin, quercetin, fisicina and kaurenoic acid. In addition to the compounds quantified in IFA, the phenolic acids: gallic, 4-hydroxybenzoic, caffeic, tannic, p-cumaric, ferulic and five flavonoids: vicenina-2, rutin, apigenin, catechin and naringenin, were only detected but not quantified in the ethyl acetate extracts of the stems (IGA) and ethanolics of the leaves (IFE) and branches (IGE) besides a quantification of the fisicina and emodin. It was also possible to verify the presence of a considerable amount of flavonols or flavones glycosides using HPLC-PDA, whose structures were not identified. The phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, obtaining a high concentration in miligram equivalent of gallic acid/g of extract for IFE (31,63), followed by the extracts IGE, IGA e IFA (16,69; 9,89 e 8,36, respectively). It was possible to verify using the spectrophotometric method of complexation with AlCl_3 that the only extract which contained flavonoids was IFE (18,70 mg EQ/g de extrato). Antioxidant activity tests were performed using the free radical DPPH method, obtaining positive results for the four extracts, but extracts which presented high activity were IFE ($\text{IC}_{50} = 29,65 \mu\text{g mL}^{-1}$) and IGE ($\text{IC}_{50} = 74,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Using the microdilution technique (ANVISA) it was verified that IFE showed a bacteriostatic activity against *Pseudomonas aeruginosa* and IFA against *Proteus mirabilis*. The extracts IFA, IFE, IGA and IGE showed activity against *Artemia salina*, with IFE being the one that presented the highest toxicity ($\text{DL}_{50} = 48,54 \mu\text{g mL}^{-1}$). The four extracts also showed anthelmintic activity with IFE ($\text{CL}_{50} = 44,70 \mu\text{g mL}^{-1}$) and IGA ($\text{CL}_{50} = 48,60 \mu\text{g mL}^{-1}$) showing rates of mortality equivalent to that found in *Acacia mólissima*, a specie often used to combat helminths in ruminants. The chemical and biological properties of *Inga marginata* W observed in this study confirmed the specie as promising natural source for use as antioxidant and to control of helminths in ruminants.

Keywords: *Inga marginata* Willd. HPLC-PDA. Anthraquinone. Antihelmintic. Phenolic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química do ácido gálico (1) e dos flavonóides identificados em <i>I. edulis</i> : catequina (2); epicatequina (3); miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (4); quercetina-3-O- α -L-glucopiranosídeo (5); quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (6)22
Figura 2 –	Estruturas químicas identificados em <i>I. edulis</i> : procianidina B1 e B2.....23
Figura 3 –	Estruturas de substâncias identificadas em <i>I. edulis</i> : 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-metoxiflavona (1); 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona (2) e 6,3',4'-triidroxiaurona (3).....24
Figura 4 –	Estruturas da procianidina trímera epicatequina-4- β -8-catequina-4- α -8-epicatequina de <i>I. goldmanii</i> (1); e da procianidina dímera catequina-3-O- β -D-glucopirano-(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-glucopirano-(6-cinamoil)-piranosídeo de <i>I. umbellifera</i> (2).....25
Figura 5 –	(+)-Catequina-3-O- β -D-glucopirano-(2-cinamoil)-piranosídeo (1); (+)-Catequina-3-O- β -D-glucopirano-(6-cinamoil)-piranosídeo (2); (+)-Catequina-3-O- β -D-glucopirano-(2,6-bis-cinamoil)-piranosídeo (3); Catequina-3-O- β -D-glucopirano-(4 α -8)-catequina-3-O- β -D-glucopirano-(2-cinamoil)-piranosídeo (4) e Catequina-3-O- β -D-glucopirano-(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-glucopirano-(6-cinamoil)-piranosídeo (5).....27
Figura 6 –	5,6-epoxidoluteína.28
Figura 7 –	Estrutura do ácido elágico29
Figura 8 –	Estrutura do galoil L-tirosina (1); <i>m</i> -digaloil L-tirosina (2); <i>m</i> -trigaloil L-tirosina (3) e L-tirosina (4)30
Figura 9 –	<i>Inga marginata</i> Willd.32
Figura 10 –	<i>Inga marginata</i> Willd segundo Flora Brasiliensis.....33
Figura 11 –	Fluxograma da preparação dos extratos em acetato de etila e etanólico das folhas e galhos de <i>I. marginata</i>38
Figura 12 –	Fluxograma da purificação dos constituintes do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Inga marginata</i> W. (IFA) Gp: grupo; f: frações41

Figura 13 –	Fluxograma da purificação do extrato em acetato de etila dos galhos de <i>I. marginata</i>	48
Figura 14 –	Espectro no Infravermelho de IFH-1	59
Figura 15 –	Cromatograma obtido por CG-EM de IFH-1	60
Figura 16 –	Curva de correlação Tempo de retenção x número de carbonos dos padrões de alcanos.....	60
Figura 17 –	Resultado do teste de Liebermann-Burchard para IFA-1	61
Figura 18 –	Estrutura do Estigmasterol (IFA-1)	62
Figura 19 –	Cromatograma obtido por CG-EM de IFA-1 e respectivo espectro de massas.....	63
Figura 20 –	Espectro no infravermelho de IFA-1	64
Figura 21 –	Espectro de RMN de ^1H de IFA-1 em CDCl_3 (300MHz)	65
Figura 22 –	Espectro de RMN de ^{13}C de IFA-1 em CDCl_3 (75MHz).....	67
Figura 23 –	Resultado do teste de Liebermann-Burchard para IGA-1.....	68
Figura 24 –	Cromatograma obtido por CG-EM de IGA-1	68
Figura 25 –	Estrutura da Lupenona (IGA-1)	69
Figura 26 –	Estrutura da Friedelina (IGA-1).....	69
Figura 27 –	Espectro de massas do pico A de IGA-1	70
Figura 28 –	Espectro de massas do pico B de IGA-1	70
Figura 29 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-1 em CDCl_3 (300MHz).....	71
Figura 30 –	Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-1 em CDCl_3 (75MHz)	74
Figura 31 –	Espectro no infravermelho de IGA-2	75
Figura 32 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-2 em CDCl_3 (300MHz).....	77
Figura 33 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-2 em CDCl_3 (300MHz) expandido	78
Figura 34 –	Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-2 em CDCl_3 , (300MHz)	79
Figura 35 –	Estrutura da fisciona (IGA-2)	81
Figura 36 –	Espectro de massas de IGA-3.....	81
Figura 37 –	Estrutura do Lupeol (IGA-3).....	82
Figura 38 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-3 em CDCl_3 (300MHz).....	83
Figura 39 –	Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-3 em CDCl_3 (75MHz)	85
Figura 40 –	Espectro no infravermelho de IGA-5	86
Figura 41 –	Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-5 em DMSO (75MHz)	88
Figura 42 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-5 em DMSO (300MHz).....	89

Figura 43 –	Espectro de RMN de ^1H de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido	90
Figura 44 –	Espectro no 2D COSY de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido	91
Figura 45 –	Espectro no 2D HSQC de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido	92
Figura 46 –	Espectro no 2D HMBC de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido	93
Figura 47 –	Estrutura da Emodina (IGA-5)	94
Figura 48 –	Representação da reação de doação de hidrogênios para o DPPH*	97
Figura 49 –	Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical estável DPPH*. Curva concentração-resposta para IGE (A), IFE (B) e IGA (C). As concentrações usadas no meio reacional foram de 12,5 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IGE e IGA e 2 – 80 $\mu\text{g/mL}$ para IFE. Os resultados são representados pela média \pm EPM.....	98
Figura 51 A –	Cromatogramas dos extratos A) IFA; B) IFE, em 280 nm (preto) e 370nm (azul).....	103
Figura 51 B –	Cromatogramas dos extratos C) IGA e D) IGE, em 280 nm (preto) e 370nm (azul)	103
Figura 52 –	Sobreposição dos cromatogramas de IFE em 280 nm (preto) e 370nm (azul) expandido	107
Figura 53 –	Sobreposição dos espectros no UV-Vis dos picos a e f (A) e b , c , d e e (B) de IFE em 370 nm	107
Figura 54 –	Núcleo comum dos flavonóides.....	108
Figura 55 –	Núcleo comum das flavonas (A) e dos flavonóis (B).....	108
Figura 56 –	Perfil no ultravioleta da quercetina (A) e rutina (B).....	109
Figura 57 –	Substâncias identificadas por CLAE-PDA nos extratos de <i>Inga marginata</i>	110
Figura 58 –	Curva de regressão linear para cálculo de DL_{50} contra <i>A. salina</i>	114
Figura 59 –	Cálculo através do software R versão 2.13 para CL_{50}	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas (IFA)	38
Tabela 2 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração hexano/acetato de etila 50%	39
Tabela 3 – Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração hexano/acetato de etila 50%	40
Tabela 4 – Reunião das frações do grupo 7 do extrato em hexano/acetato de etila 50% das folhas	41
Tabela 5 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do extrato em acetato de etila dos galhos (IGA)	42
Tabela 6 – Reunião das frações da coluna cromatográfica do extrato em acetato de etila dos galhos (IGA)	42
Tabela 7 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica <i>flash</i> do grupo 8 de IGA	43
Tabela 8 – Reunião das frações coluna cromatográfica <i>flash</i> do grupo 8 de IGA	43
Tabela 9 – Reunião das frações coluna cromatográfica <i>flash</i> do grupo 10 de IGA	44
Tabela 10 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 11 de IGA	45
Tabela 11 – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 11 de IGA	45
Tabela 12 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 12 de IGA	46
Tabela 13 – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 12 de IGA	46
Tabela 14 – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 14 de IGA	47
Tabela 15 – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 14 de IGA	47
Tabela 16 – Gradiente utilizado na identificação compostos de <i>I. marginata</i> W	51
Tabela 17 – Hidrocarbonetos identificados em IFH-1	61
Tabela 18 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IFA-1 comparados com a literatura	66

Tabela 19 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IGA-1 comparados com a literatura	72
Tabela 20 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IGA-1 comparados com valores da literatura	73
Tabela 21 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IGA-2 comparados com a literatura	80
Tabela 22 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IGA-3 comparados com os dados da literatura para o lupeol.....	84
Tabela 23 – Deslocamentos de RMN ¹³ C de IGA-5 comparados com a literatura	94
Tabela 24 – Correlações observadas no experimento 2D COSY de IGA-5.....	94
Tabela 25 – Doenças associadas ao estresse oxidativo.....	95
Tabela 26 – Concentrações dos extratos de <i>I. marginata</i> W. necessárias para inibir o processo oxidativo em 50% (IC ₅₀), realizado em triplicata.....	97
Tabela 27 – Concentrações de polifenóis nos extratos de <i>I. marginata</i> W	99
Tabela 28 – Concentrações de flavonóides totais nos extratos de <i>I. marginata</i> W.....	100
Tabela 29 – Coeficientes de determinação das curvas de calibração dos padrões	103
Tabela 30 – Quantificação das substâncias nos extratos IFA, IFE, IGA e IGE.....	103
Tabela 31 – DL ₅₀ para os extratos de <i>I. marginata</i> W	115
Tabela 32 – Valores da CL ₅₀ para os extratos IFA, IFE, IGA e IGE.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CL₅₀	Concentração letal em 50%
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector arranjo de diodos
COSY	Correlation spectroscopy – Espectroscopia de correlações
d	Dupleto.
dd	Duplo dupleto
DIC	Detector de Ionização de Chama
DL₅₀	Dose letal em 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
EAG/g FS	Equivalente em ácido gálico por grama de fração seca do extrato
EQ/g FS	Equivalentes em quercetina por grama de fração seca do extrato
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
IC₅₀	Concentrações dos extratos capazes de interceptar 50% do DPPH
IV	Espectrometria no infravermelho
J	Constante de acoplamento.
m	Multiplete.
m/z	Relação massa/carga.
MHz	Megahertz
NOE	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13.
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
s	Singleto.
sl	Singleto largo.
t	Triplete.
UV	Ultravioleta
vis	Visível

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	17
II	OBJETIVOS	18
II.1	GERAL.....	18
II.2	ESPECÍFICOS.....	18
III	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
III.1	O GÊNERO <i>Inga</i>	19
III.1.1	Aspectos Etnofarmacológicos e Propriedades Biológicas do Gênero <i>Inga</i>	20
III.1.2	Aspectos Químicos do Gênero <i>Inga</i>	21
III.1.3	<i>Inga Marginata</i> Willd.....	30
IV	PARTE EXPERIMENTAL	35
IV.1	MATERIAIS E MÉTODOS	35
IV.1.1	Equipamentos	35
IV.1.2	Reagentes	36
IV.1.3	Coleta e Preparação da Espécie Vegetal.....	37
IV.1.4	Preparação dos Extratos	37
IV.2	ELABORAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Inga marginata</i> W (IFA)	38
IV.2.1	Fracionamento Cromatográfico	38
IV.2.2	Purificação das Frações	39
IV.2.2.1	Fração hexânica	39
IV.2.2.2	Fração hexano:acetato de etila	39
IV.2.2.2.1	<i>Purificação do grupo 7</i> (f27-39)	41
IV.3	ELABORAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DOS GALHOS DE <i>Inga marginata</i> W (IGA).....	41
IV.3.1	Purificação do Grupo 8 (Frações 23-26)	43
IV.3.2	Purificação do Grupo 10 (Frações 29-37)	44
IV.3.3	Purificação do Grupo 11 (Frações 38-46)	44

IV.3.4	Purificação do Grupo 12 (Frações 47-104)	45
IV.3.5	Purificação do Grupo 14 (Frações 121-142)	46
IV.4	ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	48
IV.4.1	Teste de Atividade Antioxidante	48
IV.4.2	Determinação do Conteúdo de Polifenóis	49
IV.4.3	Determinação do Conteúdo de Flavonóides totais	50
IV.4.4	Análise por CLAE-DAD	50
IV.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	52
IV.5.1	Ensaio de Toxicidade Contra <i>Artemia salina</i> Leach	52
IV.5.2	Ensaio de Atividade Antibacteriana	53
IV.5.3	Teste de Atividade Anti-Helmíntica – Eclodibilidade (EGG)	53
IV.6	DADOS ESPECTRAIS E ESTRUTURAS DAS SUBSTANCIAS ISOLADAS DE <i>I. marginata</i>	55
IV.6.1	Estigmasterol (IFA-1 e IGA-4)	55
IV.6.2	Mistura de Lupenona e Friedelina (IGA-1)	55
IV.6.3	Fisciona (IGA-2)	56
IV.6.4	Lupeol (IGA-3)	57
IV.6.5	Emodina (IGA-4)	57
V	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
V.1	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	59
V.1.1	Extrato em Acetato de Etila das Folhas de <i>Inga Marginata</i> (IFA)	59
V.1.1.1	IFH-1	59
V.1.1.2	IFA-1	61
V.1.2	Extrato em Acetato de Etila dos Galhos de <i>Inga marginata</i> (IGA)	68
V.1.2.1	IGA-1	68
V.1.2.2	IGA-2	75
V.1.2.3	IGA-3	81
V.1.2.4	IGA-4	86
V.1.2.5	IGA-5	86
V.2	ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	95
V.2.1	Teste de Atividade Antioxidante	96
V.2.2	Determinação do Conteúdo de Polifenóis	99

V.2.3	Determinação do conteúdo de flavonóides totais.....	100
V.2.4	Análise por CLAE-DAD	101
V.2.4.1	Análise dos extratos de <i>Inga marginata</i> por CLAE-DAD	101
V.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS	112
V.3.1	Ensaio de Toxicidade Frente a <i>Artemia salina</i> Leach.....	112
V.3.2	Ensaio de Atividade Antibacteriana	115
V.3.3	Teste de atividade Anti-Helmíntica	115
VI	CONCLUSÃO	118
VII	COLABORADORES	120
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

I INTRODUÇÃO

A diversificada flora brasileira constitui uma rica fonte para pesquisa de novos fármacos e de produtos agroquímicos. Entre as famílias botânicas destaca-se a família *Fabaceae*, também conhecida como *Leguminosae*, que apresenta espécies economicamente importantes, usadas na alimentação humana e animal, na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas, apresentando também uso medicinal e agrônômico (FERREIRA, 2004).

Na bacia do rio Tibagi no estado do Paraná, a família *Fabaceae* é a segunda em quantidade de espécies, estando atrás somente da família *Myrtaceae*. Embora ocorra em toda a bacia, as espécies de *Fabaceae* são encontradas em maior número no baixo Tibagi e em parte do médio, onde predominam as florestas estacionais semidecíduais (DIAS; VIEIRA; PAIVA, *et al.* 2002). *Inga* é um dos gêneros da família *Fabaceae*, indicado para recomposição de matas ciliares e de áreas degradadas, produção de lenha e estabilização de solos ácidos (MATA; FELIX, 2007), sendo capaz de suportar encharcamento e inundações temporárias (LEBLANC; NYGREN; MCGRAW, 2006). *Inga marginata* é uma *Fabaceae* nativa da Mata Atlântica e se encontra entre as dez espécies mais importantes da região do Médio Tibagi, ocupando o sexto lugar (DIAS; VIEIRA; PAIVA, *et al.* 2002). Apesar disso, a espécie possui apenas um estudo onde se relata em sua composição química a presença de saponinas, taninos, fitosteróis e triterpenóides no córtex da planta (ALVAREZ *et al.*, 1998), porém não foram descritos na literatura suas estruturas químicas e há pouco sobre a avaliação das atividades biológicas desta espécie.

No presente estudo, portanto, foram realizados os estudos químicos, as análises dos compostos fenólicos por CLAE-DAD, e as determinações dos teores de compostos fenólicos e de flavonóides de *Inga marginata*, coletada na região de Londrina, estado do Paraná. Os extratos de *Inga marginata* foram ainda avaliados quanto à capacidade antioxidante, à toxicidade contra *Artemia salina*, e às atividades antibacteriana e anti-helmíntica.

II OBJETIVOS

II.1 GERAL

- Realizar o estudo da composição química de *Inga marginata* W e avaliar algumas de suas propriedades biológicas

II.2 ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os constituintes químicos dos extratos em acetato de etila das folhas e dos galhos de *I. marginata*;
- Caracterizar compostos fenólicos dos extratos de *I. marginata* por CLAE-DAD;
- Quantificar o conteúdo de polifenóis e flavonóides nos extratos de *I. marginata*;
- Avaliar a capacidade antioxidante, as atividades antibacteriana e anti-helmíntica e a toxicidade contra *Artemia salina* dos extratos de *I. marginata*.

III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1 O GÊNERO *Inga*

O gênero *Inga* conta com cerca de 350 espécies (LEON, 1966), constituindo-se em um dos maiores gêneros da família Fabaceae, pertencendo à sub-família Mimosoidaeae e à tribo Ingae. A família Fabaceae é composta por 2800 espécies e aproximadamente 154 gêneros, a maioria dos quais encontrados nos trópicos, na África, América e sudeste da Ásia. A família é sub-dividida em sub-famílias: Faboidaea (Papilinoideae), Caesalpinoideae (Casalpiniaceae) e Mimosoideae (Mimosaceae) (BIONDO *et al.*, 2005). Estudos filogenéticos recentes reconhecem três tribos (Mimoseae, Acacieae e Ingae) para a subfamília Mimosoideae, indicando afinidades evidentes entre Ingae e Acacieae (MILLER *et al.* 2003).

O gênero *Inga* é restrito aos trópicos americanos com origem nas florestas tropicais de baixa altitude do Brasil e extensões de norte para o centro do México (LEON, 1966). O nome do gênero *Inga* deriva do vulgar indígena (tupi), angá = ingá, que significa “que tem semente envolvida” (RODRIGUES, 1905 apud. POSSETE; RODRIGUES 2010).

Inga parece ser o único membro de sua tribo (Ingae) a resistir em florestas tropicais úmidas de alta altitude e a delimitação de suas espécies é difícil devido à variação intra-específica (LEON, 1966). As espécies de *Inga* spp. (Mimosaceae) são muito utilizados na agricultura sustentável, pois tem alta produtividade de biomassa e tolerância a solos ácidos, além de fornecer nutrientes, formam uma cobertura que ajuda a controlar ervas daninhas e quebra a força erosiva das chuvas dos trópicos. *Inga edulis* Mart tem sido utilizada como uma árvore de sombra em plantações de café (*Coffea arabica* L) e cacau (*Theobroma cacao* L) (HANDS, 1998).

A nomenclatura das espécies de *Inga* é bastante confusa e muitas espécies são consideradas provisórias e a confirmação das mesmas, ainda depende de novos estudos. Como o gênero apresenta uma grande variação morfológica, que dificulta o tratamento taxonômico. Os metabólitos secundários podem ser usados para delimitar as fronteiras entre as espécies e a relação entre os táxons. Os derivados do ácido pipecólico, presentes em 47 espécies de *Inga*,

constituem uma forma de se confirmar a taxonomia dessas espécies (MORTON, 1998).

III.1.1 Aspectos Etnofarmacológicos e Propriedades Biológicas do Gênero *Inga*

Os povos ameríndios usavam a decocção das folhas de *Inga strigillosa* para descolorir a pele e *Inga cecropietorum* para tratar dores de ouvido. As flores de *Inga rubiginosa* são usadas para descongestão nasal durante resfriados. Alguns aborígenes usam a polpa e os frutos de *Inga macrophylla* Willd para limpar os dentes e as flores de *Inga myriocephala* para fortalecer o cabelo (VIVOT *et al.* 2001).

Segundo Silva *et al.* (2007) a espécie *Inga edulis*, usada na medicina amazônica como anti-diarréico e antiinflamatório, apresentou elevada atividade antioxidante e outras propriedades biológicas como a capacidade de prevenção contra a oxidação da LDL (Lipoproteína de baixa densidade).

As sementes cozidas de *Inga brachystachya* são usadas popularmente no Peru para reduzir flatulência, enquanto que as partes aéreas da planta são tradicionalmente usadas no tratamento de gota por inibirem a xantina oxidase (VIVOT *et al.* 2001).

Extratos de *Inga verna affinis* também foram avaliados como inibidores da xantina-oxidase, enzima responsável pela oxidação da hipoxantina e xantina em ácido úrico, e como captadores do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzido pela ação da enzima. O extrato etanólico de *I. verna affinis* apresentou propriedades inibidoras da xantina oxidase ($IC_{50} = 27,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), com uma capacidade adicional de seqüestro de superóxido ($IC_{50} = 12,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). O potencial antioxidante foi confirmado pelo método DPPH \cdot (2,2-difenilpicrilhidrazil), que mostrou que o extrato etanólico apresentou seqüestro de 50% de radicais livres de DPPH na concentração de $11,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (VIVOT *et al.* 2001).

Inga umbratica é usada como alimento na região dos trópicos e seus frutos, com aproximadamente 13 cm de comprimento, são consumidos freqüentemente pelos macacos, aves e humanos (CALDERON *et al.* 2001). Os frutos secos da espécie mostraram atividade hemolítica e inibitória contra tripsina e quimotripsina de 85,8% e 99,1%, respectivamente. Entre as espécies estudadas pelo autor, esta foi a única que não mostrou potencial inibitório contra o fator

humano Xa, que converte a protrombina em trombina, impedindo a conversão de fibrogênio em fibrina, responsável por cessar perda de sangue em um vaso lesado (CALDERON *et al.* 2001).

Estudos químicos das espécies *Inga goldmanii* e *Inga umbellifera* revelaram a presença de misturas complexas de compostos fenólicos em altas concentrações, produzidos pelas plantas para inibição de insetos (LOKVAM; KURSAR, 2005).

Segundo Wrangham e Waterman (1981), os fenóis podem influenciar as escolhas alimentares dos herbívoros e / ou afetar o desenvolvimento destes, pois, atuam contra agentes patogênicos e assim protegem a planta contra microorganismos (ZUCKER, 1983), juntamente com o alto conteúdo de taninos que reduz a assimilação de nitrogênio em animais, tendo efeito negativo sobre a digestibilidade de proteínas (WATERMAN *et al.* 1980).

Folhas jovens sofrem maiores taxas de herbivoria em relação às folhas maduras da mesma espécie (LOKVAM; KURSAR, 2005). Coley e Barone (1996) afirmaram que quase 70% da herbivoria ocorre durante os dias de expansão foliar, levando a uma variedade de metabólitos de defesa.

Bioensaios com larvas de *Heliothis virescens* mostraram que *I. goldmanii* é quase três vezes mais eficiente na inibição da larva que *I. umbellifera*. Em ambas as espécies, a maior parte da atividade inibitória reside em misturas complexas de monômeros e polímeros de flavan-3-óis. Este grupo compreende mais de 30% do peso seco de folhas jovens de *I. goldmanii* e *I. umbellifera* (LOKVAM; KURSAR, 2005).

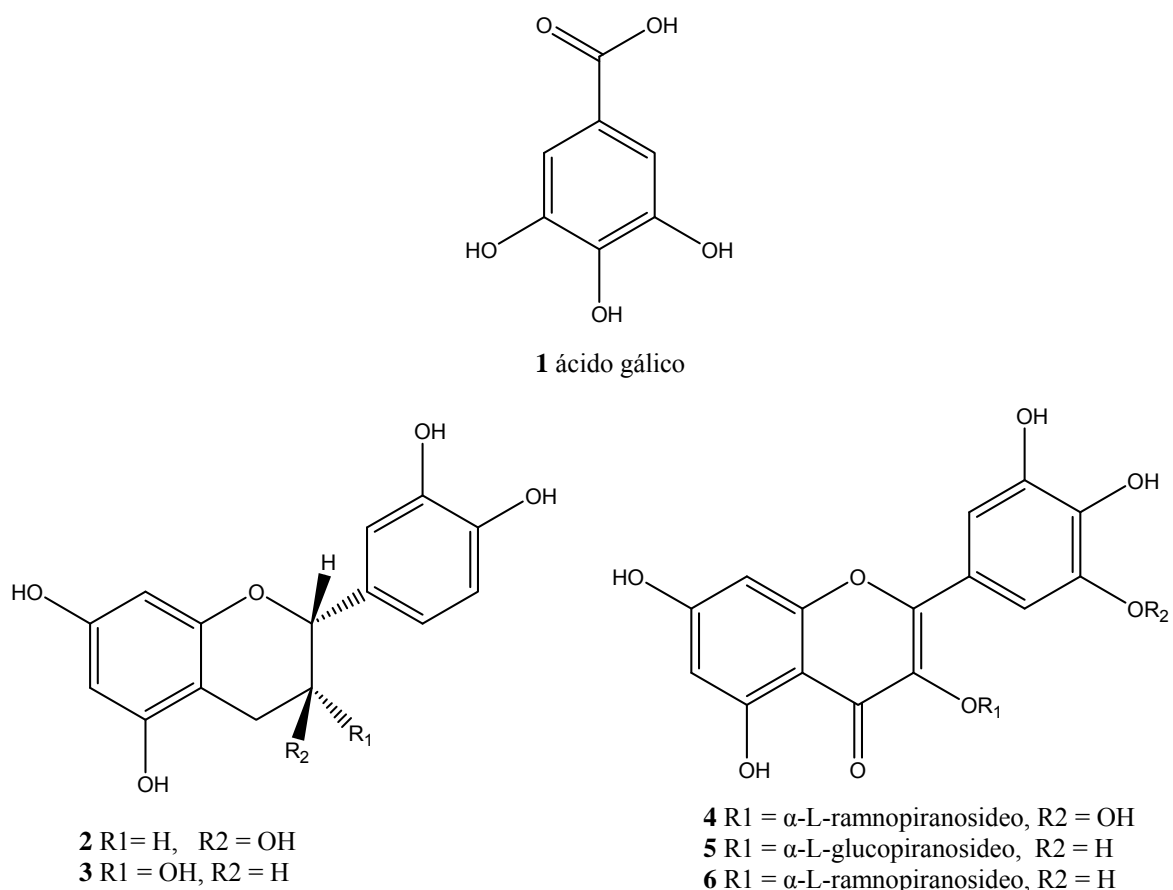
III.1.2 Aspectos Químicos do Qênero *Inga*

As folhas de espécies do gênero *Inga* possuem grandes quantidades de compostos fenólicos (5-20% da massa seca). As folhas novas e as velhas das plantas que crescem em altas altitudes possuem quantidade de fenóis substancialmente maior do que as que crescem em baixas altitudes (KOPTUR, 1985).

Extratos de folhas de *Inga edulis* possui elevados valores de capacidade antioxidante e conteúdo fenólico, apresentando os seguintes compostos principais: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-O- α -L-

ramnopiranosídeo, quercetina-3-O- α -L-glucopiranosídeo e miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo, cujas estruturas são apresentadas na Figura 1. Estes constituintes correspondem a 10% do total de compostos fenólicos da planta (SOUZA *et al.* 2007).

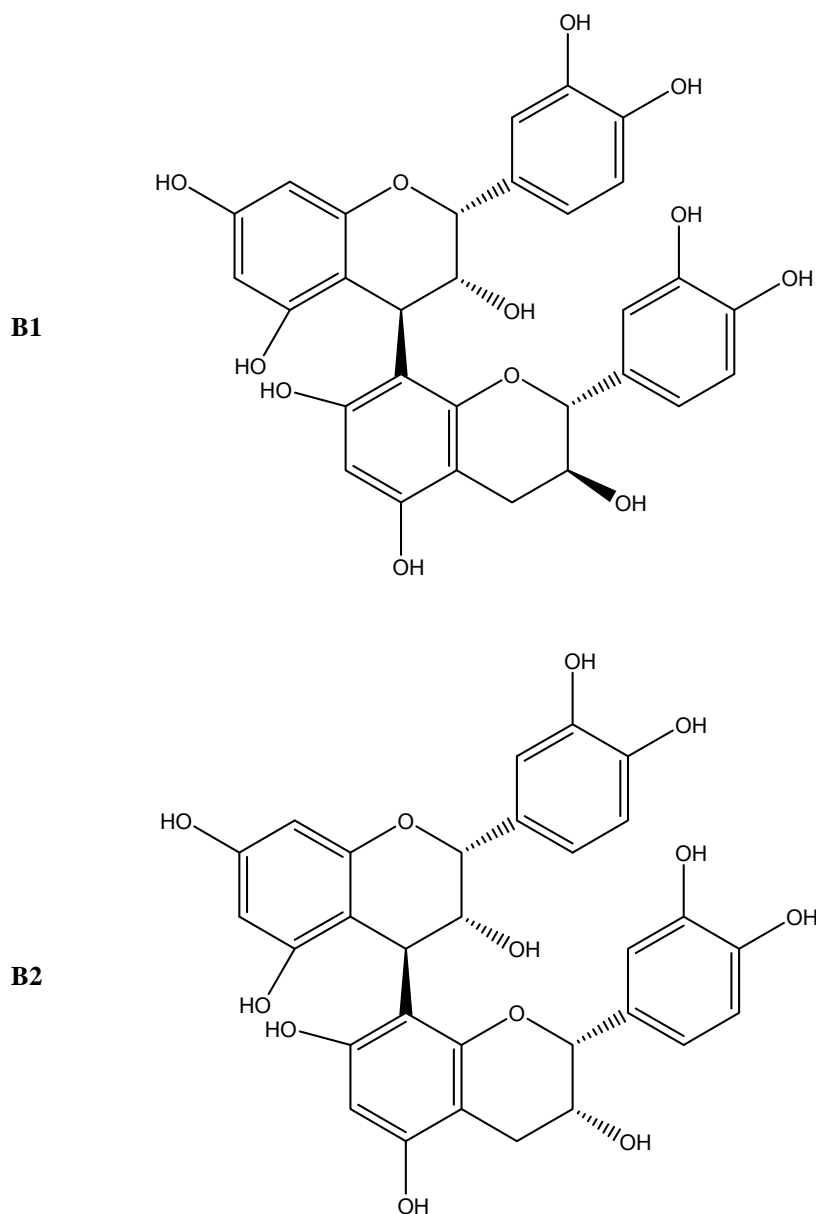
Figura 1 - Estrutura química do ácido gálico (**1**) e dos flavonóides identificados em *I. edulis*: catequina



(**2**); epicatequina (**3**); miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**4**); quercetina-3-O- α -L-glucopiranosídeo (**5**); quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**6**).

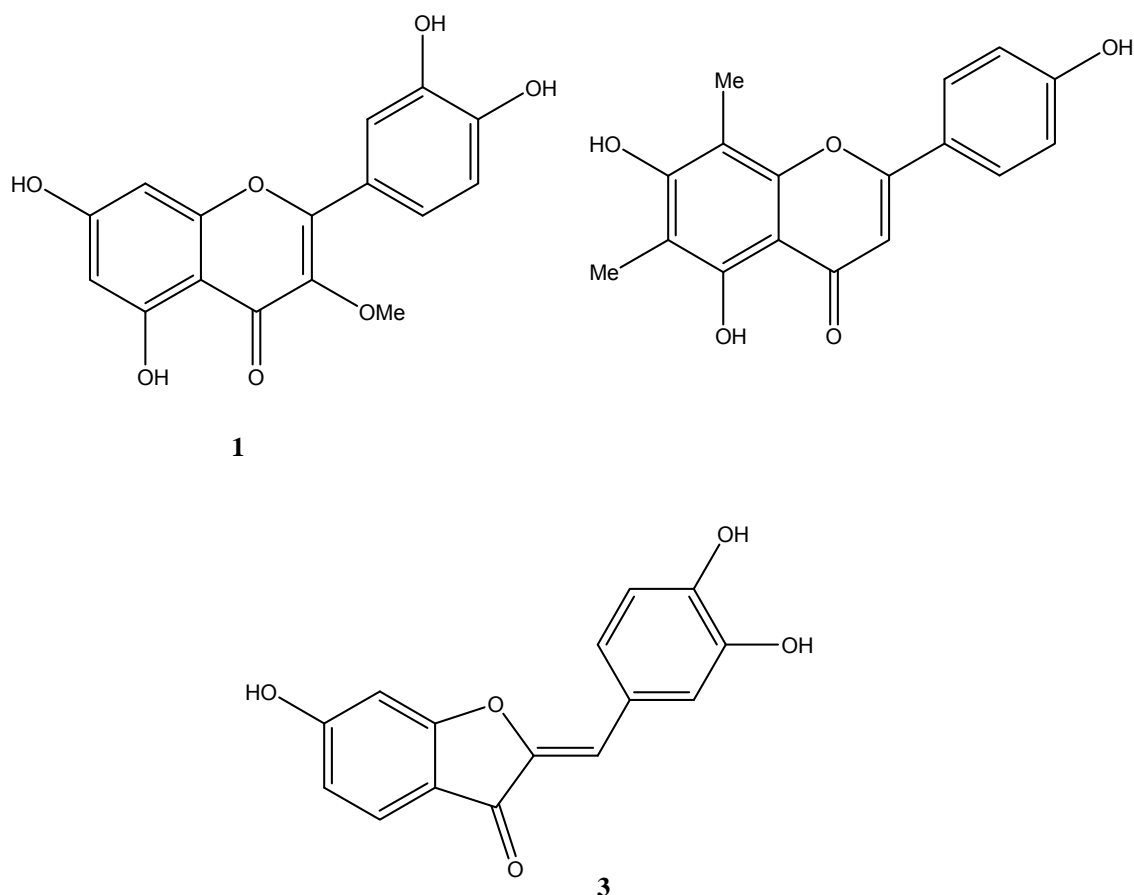
Segundo Dias, Souza e Rogez (2010), foram identificados nas folhas de *I. edulis* também a procianidina B1 e a procianidina B2 (Figura 2).

Figura 2 - Estruturas químicas identificados em *I. edulis*: procianidina B1 e B2.



Nas raízes da mesma planta foram identificadas a 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-metoxiflavona, a 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona e a 6,3',4'-triidroxi aurona (sulfuretina) (Figura 3) (CORREA *et al.* 1995).

Figura 3 –Estruturas de substâncias identificadas em *I. edulis*: 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-metoxiflavona

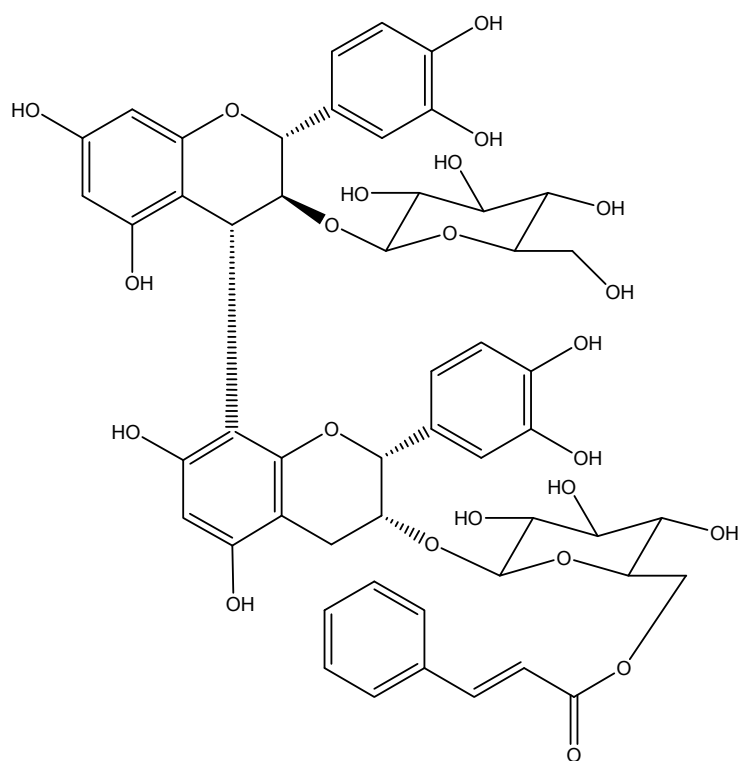
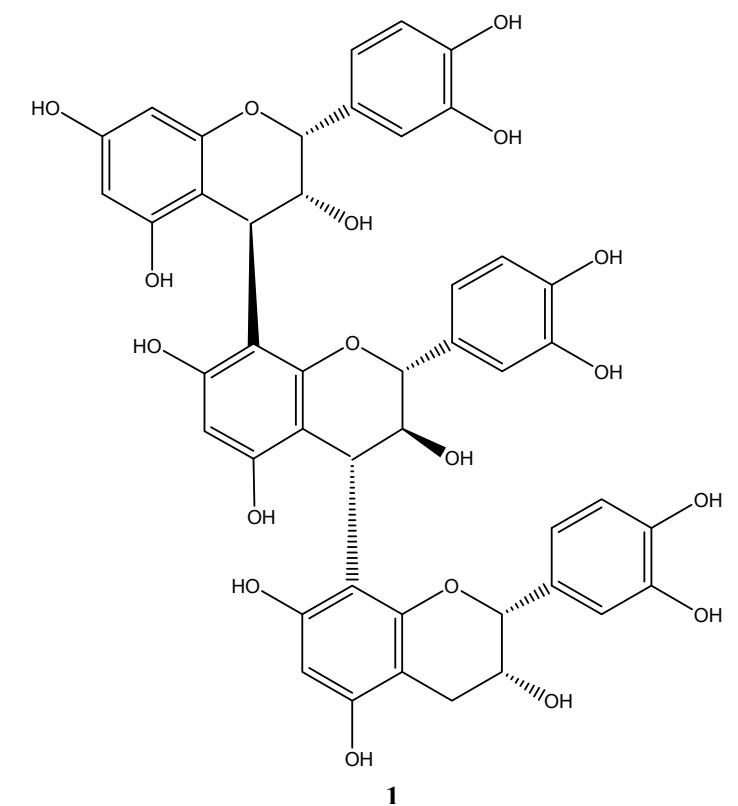


(1); 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona (2) e 6,3',4'-triidroxi-aurona (3).

Extratos de folhas jovens de *I. goldmanii* e *I. umbellifera* quando testados em *Heliothis virescens* foram mais tóxicos do que os extratos de folhas maduras. A alta toxicidade dos flavonóides sugere que estes sejam os componentes mais bioativos de ambas as espécies. Os extratos de folhas jovens de *I. goldmanii* apresentou efeito tóxico sobre *H. virescens* maior do que *I. umbellifera* (ARGUEDAS *et al.* 2006).

Lokvam e Kursar (2005) realizaram o estudo de compostos fenólicos nas espécies *I. goldmanii* e *I. umbellifera* e identificaram uma procianidina trímica, denominada epicatequina-4 β -8-catequina-4 α -8-epicatequina em *I. goldmanii* e procianidinas flavan-3-ol dímica denominada catequina-3-O- β -D-glucopirano-(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-gluc(6-cinamoil)-piranosídeo em *I. umbellifera* (Figura 4).

Figura 4 –Estruturas da procianidina trímica epicatequina-4- β -8-catequina-4- α -8-epicatequina de *I. goldmanii*

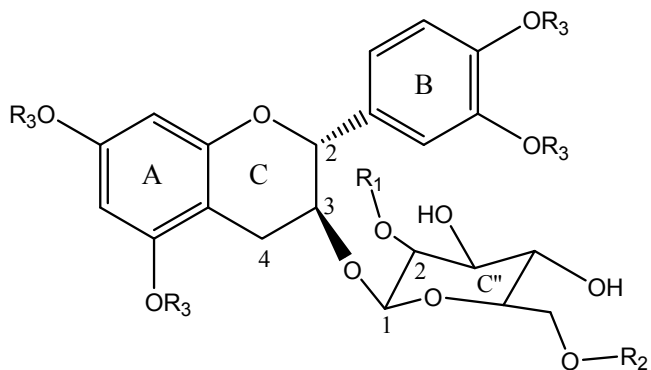


(1); e da procianidina dímica catequina-3-O- β -D-glucopirano-(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-gluco(6-cinamoil)-piranosídeo de *I. umbellifera* (2).

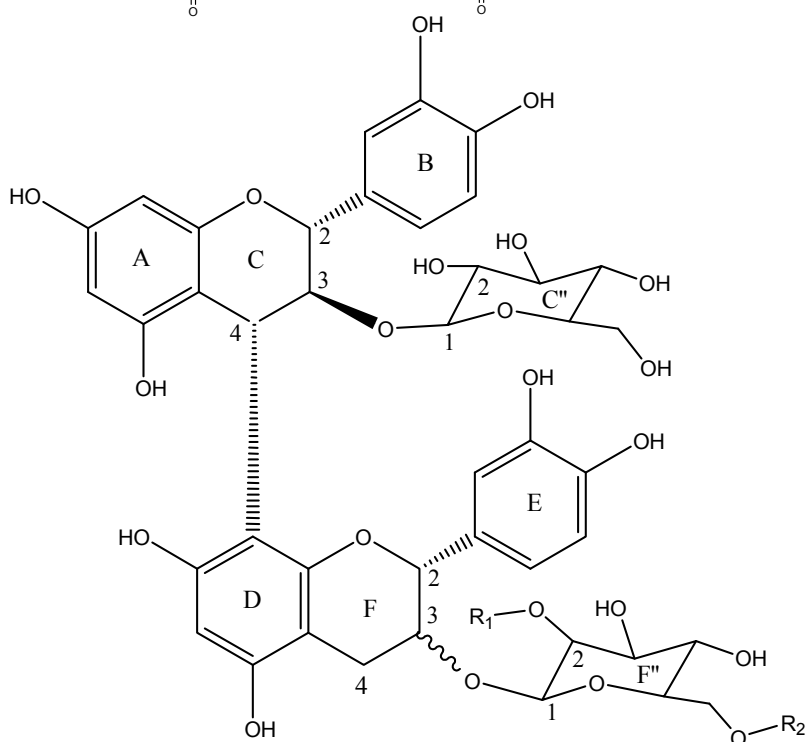
Folhas jovens de *I. umbellifera* sintetizam altas concentrações de flavonóides monômeros e dímeros de catequina/epicatequina-3-O-gluco(cinamoil) piranosídeo como metabólito fenólico majoritário. Flavan-3-óis como as catequinas ocorrem na natureza como monômeros substituídos ou procianidinas, ocasionalmente encontrados como galatos, benzoatos e glicosídeos sendo os menos comuns os glicosídeos acilados (LOKVAM; COLEY e KURSAR, 2004).

Em *I. umbellifera* foram identificadas cinco novas estruturas de flavan-3-óis, entre elas, três monômeros de catequinas (+)-catequina-3-O- β -D-gluco(2-cinamoil)-piranosídeo **(1)**, (+)-catequina-3-O- β -D-gluco(6-cinamoil)-piranosídeo **(2)** e (+)-catequina-3-O- β -D-gluco(2,6-bis-cinamoil)-piranosídeo **(3)**, como produtos majoritários, e duas procianidinas dímeras, catequina-3-O- β -D-gluco(4 α -8)-catequina-3-O- β -D-gluco(2-cinamoil) piranosídeo **(4)** e a catequina-3-O- β -D-gluco(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-gluco(6-cinamoil) piranosídeo **(5)** (LOKVAM; COLEY e KURSAR, 2004) como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - (+)-Catequina-3-O- β -D-gluco(2-cinamoil)-piranosídeo



Composto	R ₁	R ₂	R ₃
1	H		H
2		H	H
2 ^a	H	H	CH ₃
3			H

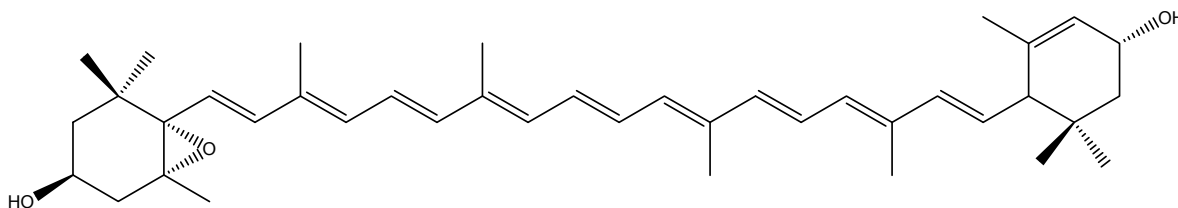


Composto	R ₁	R ₂	~~~~~
4		H	
5	H		

(1); (+)-Catequina-3-O-β-D-gluco(6-cinamoil)-piranosídeo (2); (+)-Catequina-3-O-β-D-gluco(2,6-bis-cinamoil)-piranosídeo (3); Catequina-3-O-β-D-glucopirano-(4α-8)-catequina-3-O-β-D-gluco(2-cinamoil)-piranosídeo (4) e Catequina-3-O-β-D-glucopirano-(4α-8)-epicatequina-3-O-β-D-gluco(6-cinamoil)-piranosídeo (5).

Em *Inga sapindoides* foi encontrada grande quantidade de 5,6-epóxidoluteína (Figura 6) atuando como um fotoprotetor da planta (MATSUBARA *et al.* 2007).

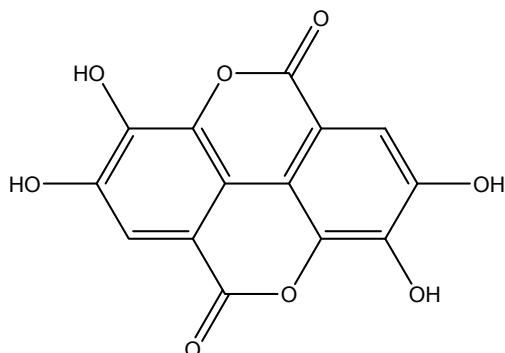
Figura 6 - 5,6-epoxidoluteína.



Testes para glicosídeos cianogênicos, alcalóides e saponinas foram todos negativos para as espécies *I. brenesii*, *I. densiflora*, *I. longispica*, *I. mortoniana* e *I. punctata*, no entanto houve resposta positiva para o teste com p-nitroanilina, indicando a presença de compostos fenólicos. Representado em porcentagem de massa seca, a concentração fenólica em *I. densiflora* foi igual a 5,05% ± 1,6% e em *I. punctata* igual a 2,55% ± 0,84%, ambas as amostras foliares utilizadas foram coletadas imaturas e a uma altitude de 600 m (KOPTUR, 1985).

Em *I. verna affinis* foram detectados ácido gálico e ácido elágico (Figura 7) como principais constituintes.

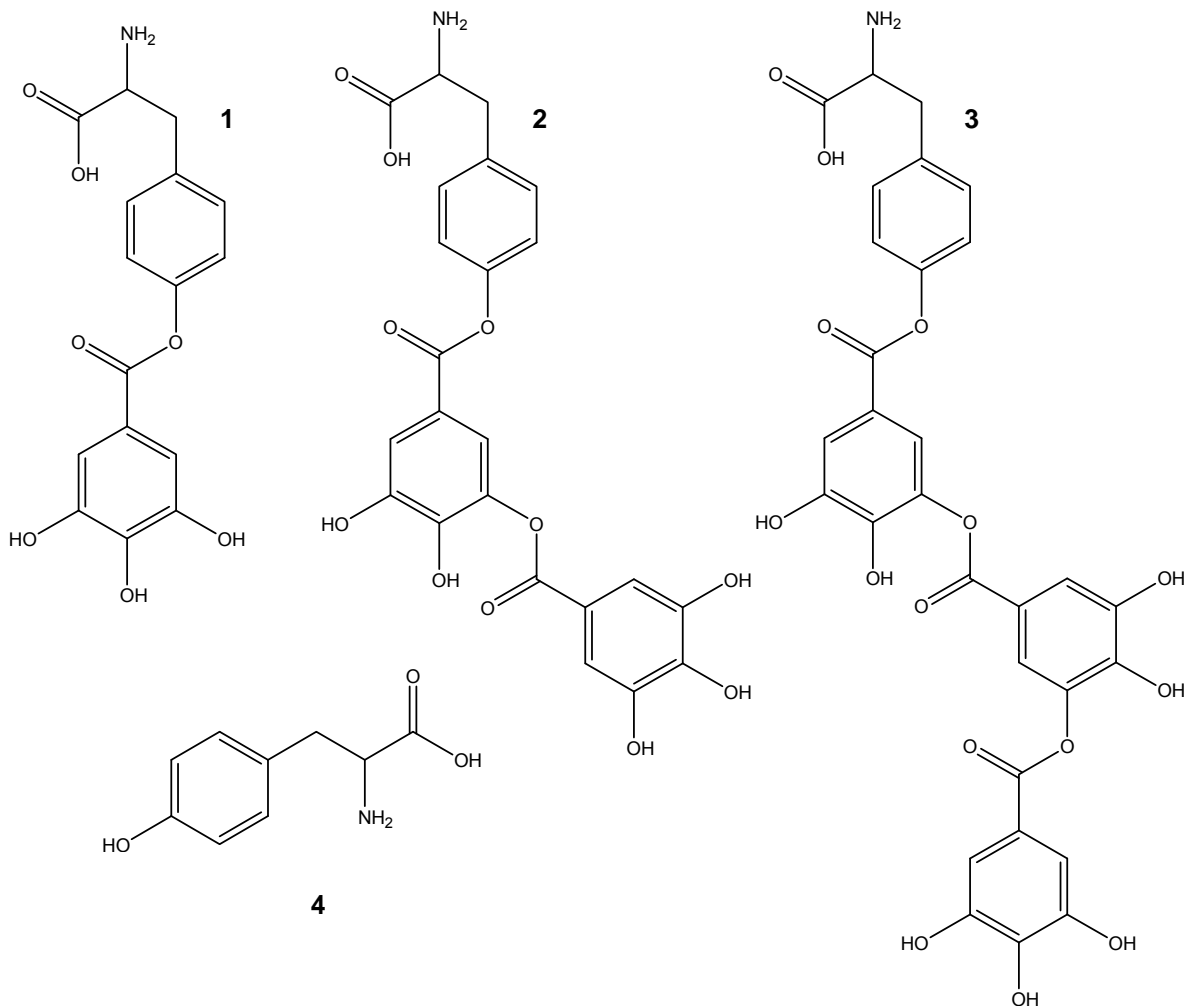
Figura 7 - Estrutura do ácido elágico.



Depsídeos são ésteres de duas ou mais unidades de ácidos hidroxibenzóicos. Em plantas superiores, um grupo com uma química depsídica menos elaborada que a dos líquens, a fonte mais comum de depsídeos é o ácido gálico. Depsídeos poligaloil são relativamente comuns entre as plantas, que sintetizam galotaninos com um núcleo de hexose, no entanto, em casos em que o núcleo galotanino é aromático, são observados novos galotaninos como galatos L-tirosina identificados em *Inga laurina* (LOKVAM *et al.* 2007).

Além do aminoácido L-tirosina, as folhas jovens de *Inga laurina* acumulam altas concentrações de três depsídeos novos, galoil, *m*-digaloil, e *m*-trigaloil L-tirosina, Figura 8. As estruturas destes compostos foram determinadas espectroscopicamente e por meio de experimentos de degradação e derivatização. Os compostos ocorrem em folhas jovens, nos seguintes percentuais de massa em base seca: 10,4% de tirosina livre; 3,1% de galoil; 5,0% de *m*-digaloil e 1,3% de *m*-trigaloil L-tirosina. Estas substâncias são importantes para a defesa química da planta durante a fase vulnerável da expansão foliar. Tirosina livre e o depsídeo galoil não estão presentes em folhas maduras (LOKVAM *et al.* 2007).

Figura 8 - Estrutura do galoil L-tirosina (1); *m*-digaloiil L-tirosina (2); *m*-trigaloiil L-tirosina (3) e L-tirosina (4).



III.1.3 *Inga Marginata* Willd

A classificação botânica para a espécie *Inga marginata* Willd, segundo Cronquist (1988) e a Flora Brasiliensis, é a seguinte:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae (Leguminosae)

Subfamília: Mimoseae

Tribo: Ingae

Gênero: *Inga*

Espécie: *Inga marginata* Willd

Inga marginata Willd (Figura 9 e 10) conhecida também como ingá-feijão, ingá-mirim, ou somente ingá, é encontrada nos países da América do Sul e Central, e no Brasil em todo o país. Possui uma ampla faixa de adaptação ecológica e altitudinal, situada em solos úmidos, abundante em orla de matas, beira de rios, e ao longo de estradas (LORENZI, 2002). Segundo Pennington (1997) é uma das espécies mais comuns e amplamente distribuídas do gênero e floresce o ano todo.

A árvore possui cerca de 5 a 20 m de altura, o tronco é um pouco tortuoso, com 20 a 50 cm de diâmetro e casca mais ou menos lisa de cor marrom-escura, provida de lenticelas, as folhas medem cerca de 10 a 30 cm de comprimento, verde-escuro e lustroso, suas flores são brancas e numerosas arranjadas em cachos, seu fruto mede de 5 a 15 cm de comprimento por 1 a 1,5 cm de largura, sua polpa é comestível com sabor adocicado, podendo ser utilizado na fabricação de refrigerantes (LORENZI, 2002).

Figura 9 - *Inga marginata* Willd.



Fonte: Disponível em: http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie_detalhes.php?nome_filtrado=inga-feijao_inga&PHPSESSID=d96cdbcb035d242410167a1a6a90c468. Acessado em: 27 jul. 2010.

Figura 10 - *Inga marginata* Willd segundo Flora Brasiliensis.



Fonte: Disponível em: http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=3229. Acesso em 27 jul. 2010.

A forragem de *I. marginata* apresenta 20% a 22% de proteína bruta e 2,9% a 5,8% de taninos (LEME; DURIGAN; RAMOS, 1994). Na medicina popular, o fruto é indicado no tratamento de úlceras vaginais. A casca cozida é adstringente e vasoconstritora (LOPEZ *et al.*, 1987). Segundo Alvarez *et al.* (1998) a espécie possui atividade anti-bacteriana e fungicida.

A espécie é pouco estudada, havendo apenas um estudo fitoquímico sobre a planta onde Alvarez *et al.* (1998) relatam que o córtex de *I. marginata* contém saponinas, taninos, fitoesteróis e triterpenóides, porém as estruturas dos constituintes não foram elucidadas. Os autores avaliaram também as atividades biológicas do extrato etanólico e de cinco saponinas identificadas somente em CCD. As saponinas apresentaram atividade depressora sobre o sistema nervoso central de ratos. O extrato etanólico não apresentou atividade antibacteriana, enquanto as saponinas apresentaram atividade baixa. O extrato etanólico e as saponinas foram

ativos contra fungos *Mucor* sp., *Pithium debaryanum* e contra a levedura *Candida albicans*. Nos ensaios de ictiotoxicidade contra o peixe *Poecilia reticulata* Peters, a concentração letal para as saponinas foi 5,5 mg L⁻¹ e para o extrato etanólico foi 6,8 mg L⁻¹. Tanto o extrato etanólico como as saponinas apresentaram alta atividade no ensaio antitumoral.

IV PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1.1 Equipamentos

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo CG 17A acoplado a espectrômetro MS-QP5000 Shimadzu, utilizando o *software* CLASS 5000 com as bibliotecas NIST12, NIST62, NIST147 e NIST27. Os dados foram obtidos em uma coluna capilar DB-1 J&W Scientific (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 μm). As condições de análise utilizadas foram: Hélio como gás de arraste; vazão de 1,5 mL min^{-1} ; temperatura do injetor 300°C; temperatura da coluna programada, sendo iniciada a 60°C por 4 min, rampa de 10°C min^{-1} até 250°C, 20°C min^{-1} até 330 °C, permanecendo em 330 °C por 10 min; modo “split” 1:10; faixa de massa 45 a 700 Da.

A análise por cromatografia em fase gasosa (CG) foi realizada em equipamento Shimadzu modelo CG-17A equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar DB5 (J&W Scientific) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com vazão de 1,2 mL min. As temperaturas estabelecidas para o injetor e detector foram 220°C e 300°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C por 1 min, sendo programada para acréscimos de 7°C por minuto até 320°C permanecendo nesta temperatura por 5 min. Os dados foram coletados com *Software* CLASS-CR10 Shimadzu.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no sistema da Waters modulo de separação Alliance e2695 (Milford, MA) acoplado a um detector UV/VIS-DAD 2998 (Milford, MA). Utilizou-se uma coluna C-18 MetaSil ODS (250 x 4,6 mm, 5 μm , MetaChem, Torrance, CA, USA). A detecção foi feita por varredura ajustada de 200 a 600 nm selecionando comprimentos de onda fixos em 280 e 370 nm. Todas as análises foram feitas em temperatura controlada de 4°C no injetor para as amostras e 28°C para a coluna. Em seguida, os dados foram adquiridos pelo *software* Empower 2.0. Os picos cromatográficos foram identificados por coinjeção, comparação dos tempos de retenção e dos espectros de

absorção no UV (DAD) com as substâncias padrão. Este sistema de CLAE está localizado no Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas (CCE) desta Universidade (LAPA-DIA).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um aparelho Bruker DRX-500, operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , os espectros foram realizados a 27°C, os deslocamentos químicos foram dados em ppm utilizando CDCl_3 , CD_3OD ou DMSO como solventes. Este sistema está localizado no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Os espectros de infravermelho foram obtidos no equipamento Shimadzu FTIR – 8300 e os dados foram obtidos pelo *software* Shimadzu HYPER IR.

O ponto de fusão foi determinado no aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-302 da Microquímica equipamentos.

IV.1.2 Reagentes

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados utilizando-se como adsorvente sílica-gel 60 (0,063 a 0,200 mm) ACROS e sílica flash 40-63 μm 230-400 mesh (Riedel). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas com sílica gel G UV254 (Macherey-Nagel). A revelação das placas cromatográficas foi realizada por meio luz ultravioleta (254 nm), com solução de vanilina sulfúrica (vanilina/ metanol/ H_2SO_4) e revelador de Dragendorf.

Foram utilizados os solventes éter de petróleo, hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol grau p.a., marca LabSynth.

Na preparação das amostras para análise CLAE-DAD foi utilizada água ultra pura purificada pelo sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA). A Acetonitrila e o Metanol (grau HLPC) foram procedentes da J.T.Baker. O Ácido fórmico (p.a.) utilizado foi procedente da LabSynth (Diadema, SP, BR).

Foram utilizados os padrões de quercetina, ácido cafeico, ácido tânico, ácido gálico, (+) catequina, rutina (Sigma, Steinheim, Alemanha), ácido ferrúlico, ácido p-cumárico (Fluka, Steinheim, Alemanha), ácido caurenóico anteriormente isolado, vicenina, naringenina, apigenina Sigma Chemicals Co. (St.

Louis, EUA), ácido 4-hidroxibenzóico (Acros Organics, New Jersey, USA) e fisciona (isolada da espécie).

IV.1.3 Coleta e Preparação da Espécie Vegetal

As folhas e os galhos de *Inga marginata* foram coletados nas proximidades e no Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) – PR, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Odete Santos Vieira do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Uma exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o registro 40.918.

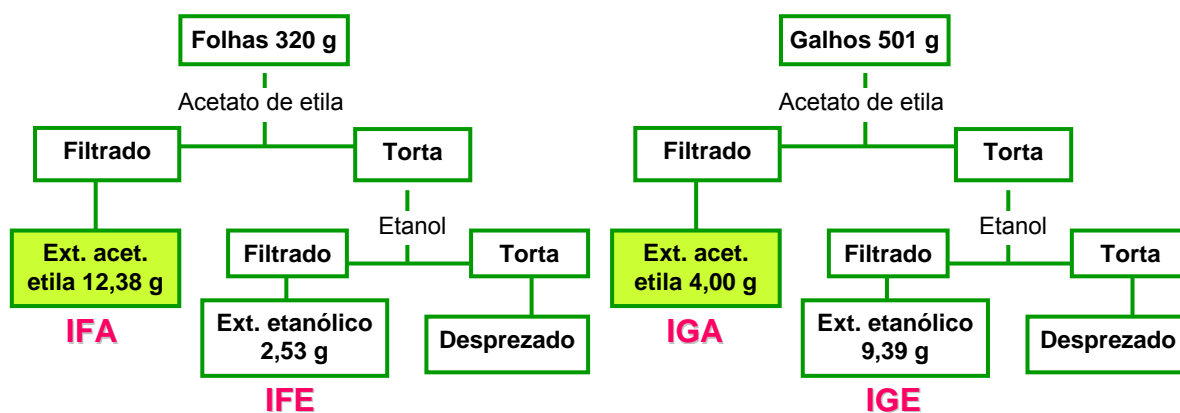
As folhas e os galhos foram secos em estufa de circulação de ar forçado a temperatura de 45°C. As folhas secas foram trituradas em liquidificador e os galhos secos foram moídos em moinho de facas, obtendo-se 320 g de folhas e 501 g de galhos triturados.

IV.1.4 Preparação dos Extratos

As drogas vegetais secas, folhas (320 g) e galhos (501 g), foram submetidos a extrações exaustivas com acetato de etila à temperatura ambiente. As misturas resultantes foram filtradas e os sobrenadantes concentrados através da destilação do solvente em evaporador rotativo, obtendo-se 12,38 g de extrato em acetato de etila das folhas (IFA) e 4 g de extrato em acetato de etila dos galhos (IGA).

As tortas obtidas foram extraídas exaustivamente com etanol de forma idêntica à anterior, obtendo-se 2,53 g de extrato etanólico das folhas (IFE) e 9,39 g de extrato etanólico dos galhos (IGE), conforme Figura 11. As tortas finais foram descartadas. Posteriormente, foram obtidas quantidades adicionais dos quatro extratos nas mesmas condições anteriores, para realização de testes biológicos.

Figura 11 - Fluxograma da preparação dos extratos em acetato de etila e etanólico das folhas e galhos de *I. marginata*.



Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar até a realização dos fracionamentos cromatográficos e dos testes biológicos.

Os extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e em acetato de etila dos galhos (IGA) foram selecionados para fracionamento cromatográfico.

IV.2 ELABORAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *INGA MARGINATA* W (IFA)

IV.2.1 Fracionamento Cromatográfico

Parte do extrato em acetato de etila das folhas (IFA) (9 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel filtrante, eluída exaustivamente com hexano, mistura hexano:acetato de etila (50:50 v/v), acetato de etila e etanol. Após a evaporação dos solventes das frações, foram obtidas quatro frações conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas (IFA)

Reuniões	Frações	Eluente	Massa (g)
1 ^a	11 frações (200mL)	Hexano	0,10
2 ^a	15 frações (200mL)	Hexano/acetato de etila 50%	3,43
3 ^a	10 frações (250 mL)	Acetato de Etila	0,55
4 ^a	10 frações (250 mL)	Etanol	2,40

IV.2.2 Purificação das Frações

IV.2.2.1 Fração hexânica

A fração hexânica (0,1 g) consistiu de um material ceroso, denominado IFH-1, que foi analisado por espectrometria no infravermelho, CG-DIC e CG-EM.

A amostra de IFH-1 e a mistura dos padrões de alcanos C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈, C₃₀, C₃₂, C₃₄, C₃₆ e C₃₈, foram injetadas nas mesmas condições no cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (CG-DIC) para cálculo do índice de retenção. Os tempos de retenção da mistura dos padrões de alcanos (9DRH-004S-R1-5X LUFT/LUST), foram plotados contra os respectivos números de átomos de carbono, obtendo-se um gráfico Tempo de retenção x números de carbonos.

IV.2.2.2 Fração hexano:acetato de etila

A fração hexano:acetato de etila (3,43 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel, eluída com hexano, diclorometano e etanol em misturas de polaridades crescentes (Tabela 2). As frações de 125 mL foram concentradas em evaporador rotatório. O processo de purificação desta fração encontra-se esquematizado no fluxograma da Figura 12.

Tabela 2 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração hexano/acetato de etila 50%

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-15
Hexano/diclorometano 10%	16-21
Hexano/diclorometano 20%	22-26
Hexano/diclorometano 30%	27-36
Hexano/diclorometano 50%	37-47
Diclorometano/hexano 30%	48-72
Diclorometano	73-79
Diclorometano/etanol 10%	80-89
Diclorometano/etanol 30%	90-97
Diclorometano/etanol 50%	98-104
Etanol/diclorometano 30%	105-107
Etanol/diclorometano 10%	108-109
Etanol	110-113

As 113 frações coletadas (125 mL) foram concentradas em evaporador rotatório, comparadas em CCD revelada com vanilina sulfúrica e reunidas em onze grupos, conforme apresentado na Tabela 3:

Tabela 3 - Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração hexano/acetato de etila 50%

Grupos	Frações	Massa (mg)
1	1-5	26,6
2	6-10	1,5
3	11-16	1,2
4	17-18	38,9
5	19-23	138,9
6	24-26	81,2
7	27-39	233,7
8	40-48	94,6
9	49-79	618,9
10	80-85	405,5
11	86-113	287

O grupo 7 (frações 27-39), 233,7 mg foi selecionado para ser purificado devido à maior quantidade e pureza observada em CCD.

IV.2.2.2.1 Purificação do grupo 7 (f27-39)

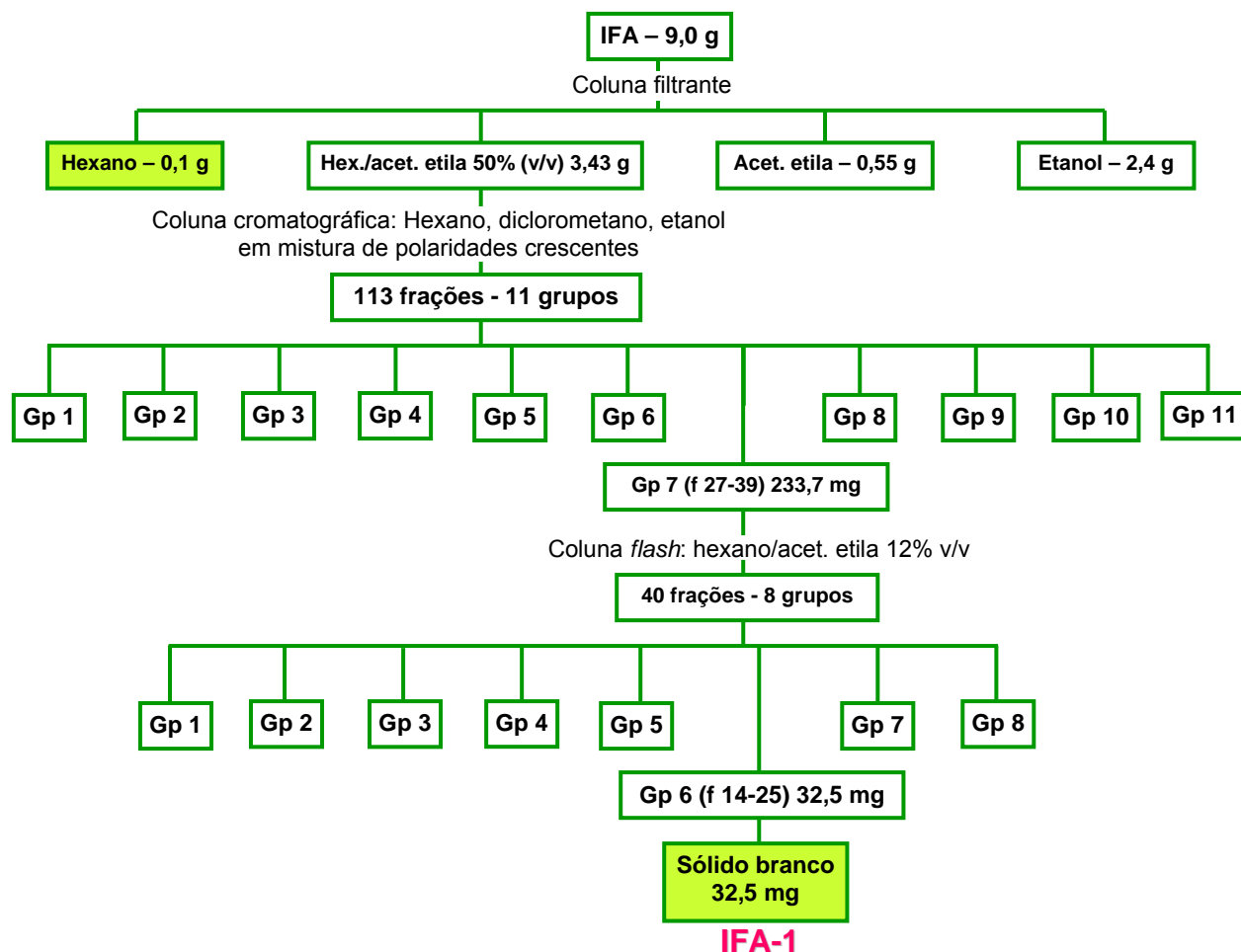
O grupo 7 foi purificado em coluna cromatográfica com 14,55 g de sílica *flash*, eluída com mistura hexano/acetato de etila (12:88, v/v), conforme descrito por Still, *et al.* (1978). As 40 frações de 15 mL obtidas foram secas a temperatura ambiente e reunidas de acordo com a similaridade apresentada em CCD revelada com vanilina sulfúrica, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Reunião das frações do grupo 7 do extrato em hexano/acetato de etila 50% das folhas

Grupos	Frações	Massa (mg)
1	1-3	62,4
2	4-5	29,4
3	6-9	29,6
4	10-12	7,3
5	13	3,1
6	14-25	32,5
7	26-36	7,3
8	37-40	44,8

Entre os grupos de frações, o grupo 6 (frações 14-25) apresentou um sólido branco, 32,5 mg que foi denominado IFA-1 e analisado por CGMS, IV e RMN de ^1H e de ^{13}C .

Figura 12 - Fluxograma da purificação dos constituintes do extrato em acetato de etila das folhas de *Inga marginata* W (IFA) Gp: grupo; f: frações.



IV.3 ELABORAÇÃO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DOS GALHOS DE *Inga marginata* W (IGA)

A partir de 2,5 g de IGA realizou-se coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com hexano, diclorometano, etanol e água ultra pura em misturas de polaridades crescentes conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica do extrato em acetato de etila dos galhos (IGA)

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-11
Hexano/diclorometano 10%	12-62
Hexano/diclorometano 30%	63-95
Hexano/diclorometano 50%	96-109
Diclorometano/hexano 30%	110-144
Diclorometano	145-151
Diclorometano/etanol 5%	152-164
Diclorometano/etanol 10%	165-168
Diclorometano/etanol 30%	169-171
Etanol/diclorometano 40%	172-174
Etanol/diclorometano 10%	175-176
Etanol	177-180
Etanol/Água 50%	181-183
Água	184

As 184 frações coletadas (125 mL) foram concentradas em evaporador rotatório, comparadas em CCD e reveladas com solução de vanilina sulfúrica. As frações semelhantes foram reunidas em vinte e dois grupos conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6 - Reunião das frações da coluna cromatográfica do extrato em acetato de etila dos galhos (IGA)

Grupos	Frações	Massa (mg)
1	1-3	0,5
2	4-8	0,5
3	9-11	1,4
4	12	3,6
5	13-17	33,7
6	18-20	26,5
7	21-22	14,2
8	23-26	52,0
9	27-28	23,5
10	29-37	57,4
11	38-46	62,9
12	47-104	521,1
13	105-120	121,3
14	121-142	89,8
15	143-152	20,0
16	153	350,9
17	154-161	295,4
18	162-165	21,6
19	166-168	18,5
20	169	106,5
21	170-181	990,2
22	182-184	132

Foram considerados significativos para análise os **grupos 8** (frações 23-26) 52 mg, **10** (frações 29-37) 57,4 mg, **11** (frações 38-46) 42,9 mg, **12** (frações 47-104) 521,1 mg e **14** (frações 121-142) 79,8 mg. Os demais grupos apresentaram material bastante polar e não foram purificados.

IV.3.1 Purificação do Grupo 8 (frações 23-26)

Para a purificação do grupo 8 (52 mg) utilizou-se coluna cromatográfica com 2,38 g de sílica gel *flash*, 0,5 cm x 15 cm, e os eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol em misturas de polaridades crescentes (Tabela 7).

Tabela 7 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica *flash* do grupo 8 de IGA

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1
Hexano/diclorometano 20%	2
Hexano/diclorometano 40%	3
Diclorometano/hexano 40%	4
Diclorometano/hexano 20%	5
Diclorometano	6
Diclorometano/acetato de etila 20%	7
Diclorometano/acetato de etila 40%	8
Acetato de etila/diclorometano 40%	9
Acetato de etila/diclorometano 20%	10
Acetato de etila	11
Acetato de etila/etanol 20%	12
Acetato de etila/etanol 40%	13
Etanol/acetato de etila 40%	14
Etanol/metanol 50%	15

As 15 frações (125 mL) obtidas foram comparadas por cromatografia em camada delgada, reveladas com solução de vanilina sulfúrica e as frações semelhantes foram reunidas (Tabela 8).

Tabela 8 - Reunião das frações da coluna cromatográfica *flash* do grupo 8 de IGA

Grupos	Fração	Massa (mg)
1	1-4	33,9
2	5	7,1
3	6	3,0
4	7-8	2,4
5	9-15	1,3

O processo resultou na obtenção de um sólido branco (7,1 mg), grupo 2, denominado IGA-1, que foi analisado por CG-EM e RMN de ^1H e de ^{13}C .

IV.3.2 Purificação do Grupo 10 (frações 29-37)

O grupo 10 (57,4 mg) foi purificado em coluna cromatográfica de 1,4 cm de diâmetro com 15,51 g de sílica gel *flash*, utilizando-se como eluente mistura de éter de petróleo: acetato de etila (90:10 v/v). As 45 frações coletadas (15 mL) foram reunidas em cinco grupos conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Reunião das frações da coluna cromatográfica *flash* do grupo 10 de IGA

Grupos	Fração	Massa (mg)
1	1-2	4,4
2	3-41	27,0
4	42	2,0
5	43	4,1
6	44-45	2,1

O grupo 2 (frações 3-41) 27 mg, foi purificado em placas preparativas de sílica gel, eluídas com diclorometano. O processo resultou na obtenção de um sólido amarelo (8,5 mg), denominado IGA-2. Este foi submetido à análise por CG-EM, espectrometria no infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .

IV.3.3 Purificação do Grupo 11 (frações 38-46)

O grupo 11 (42,9 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica (1,4 cm de diâmetro) com 8,9 g de sílica gel de, utilizando-se como eluentes hexano, diclorometano e etanol em misturas de polaridades crescentes, fornecendo 179 frações (15 mL), conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 11 de IGA

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-2
Hexano/diclorometano 10%	3-9
Hexano/diclorometano 15%	10-74
Hexano/diclorometano 25%	75-84
Hexano/diclorometano 30%	85-115
Hexano/diclorometano 45%	116-125
Diclorometano	126-144
Diclorometano/etanol 2%	145-156
Diclorometano/etanol 4%	157-164
Diclorometano/etanol 10%	165-167
Diclorometano/etanol 20%	168-172
Diclorometano/etanol 50%	173-178
Diclorometano	179

As frações obtidas foram comparadas por cromatografia em camada delgada, reveladas com vanilina sulfúrica e as frações semelhantes foram reunidas em cinco grupos como indicado na Tabela 11.

Tabela 11 - Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 11 de IGA

Grupos	Fração	Massa (mg)
1	1-48	0,2
2	49-95	39,0
3	96-141	5,4
4	142-150	2,8
5	151-179	7,0

O grupo 2 (frações 49-95 39mg), foi purificado em placas preparativas de sílica gel, eluídas com mistura de diclorometano:hexano (55:45 v/v), conduzindo à obtenção de um sólido branco (22 mg), denominado IGA-3, o qual foi submetido às análises por CG-EM e RMN de ^1H e de ^{13}C .

IV.3.4 Purificação do Grupo 12 (frações 47-104)

O grupo 12 (521,1 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica (1,5 cm de diâmetro) com 18 g de sílica gel, usando-se como eluentes hexano, diclorometano e etanol em misturas de polaridades crescentes, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 12 de IGA

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-36
Hexano/diclorometano 50%	37-39
Diclorometano/hexano 20%	40-43
Diclorometano	44-45
Diclorometano/etanol 10%	46
Diclorometano/etanol 30%	47-53
Diclorometano/etanol 50%	54
Etanol/diclorometano 20%	55
Etanol 100%	56-58

As 58 frações coletadas (15 mL) foram reunidas em dez grupos, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 12 de IGA

Grupos	Fração	Massa (mg)
1	1-11	40,0
2	12-17	2,5
3	18-21	4,9
4	22-25	5,5
5	26-29	2,7
6	30-40	8,5
7	41-42	22,0
8	43	10,1
9	44-50	33,0
10	51-58	269,9

O material do grupo 9 (frações 44-50), 33,0 mg, foi purificado em placas preparativas de sílica gel, eluídas duas vezes com mistura de hexano:diclorometano (70:30 v/v), conduzindo à obtenção de um sólido branco (23,0 mg), denominado IGA-4, que foi submetido à análise por CG-EM e RMN de ^1H e de ^{13}C .

IV.3.5 Purificação do Grupo 14 (frações 121-142)

O material do grupo 14 foi fracionado em coluna cromatográfica (1 cm de diâmetro) com 6,71 g de sílica gel, utilizando-se como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e água ultra pura em misturas de polaridades crescentes, conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo 14 de IGA

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-2
Hexano/diclorometano 20%	3-4
Hexano/diclorometano 40%	5-6
Diclorometano/hexano 40%	7-8
Diclorometano/hexano 20%	9
Diclorometano	10-18
Diclorometano/acetato de etila 10%	19-20
Diclorometano/acetato de etila 20%	21-27
Diclorometano/acetato de etila 40%	28-29
Acetato de etila/diclorometano 40%	30-31
Acetato de etila/diclorometano 20%	32
Acetato de etila 100%	33
Acetato de etila/etanol 20%	34
Acetato de etila/etanol 40%	35
Etanol/acetato de etila 40%	36
Etanol/acetato de etila 20%	37-41
Etanol	42-44
Etanol/água 50%	45
Água	46-47

As 47 frações coletadas (15 mL) foram reunidas em oito grupos conforme similaridade em CCD revelada com vanilina sulfúrica, como indicado na Tabela 15.

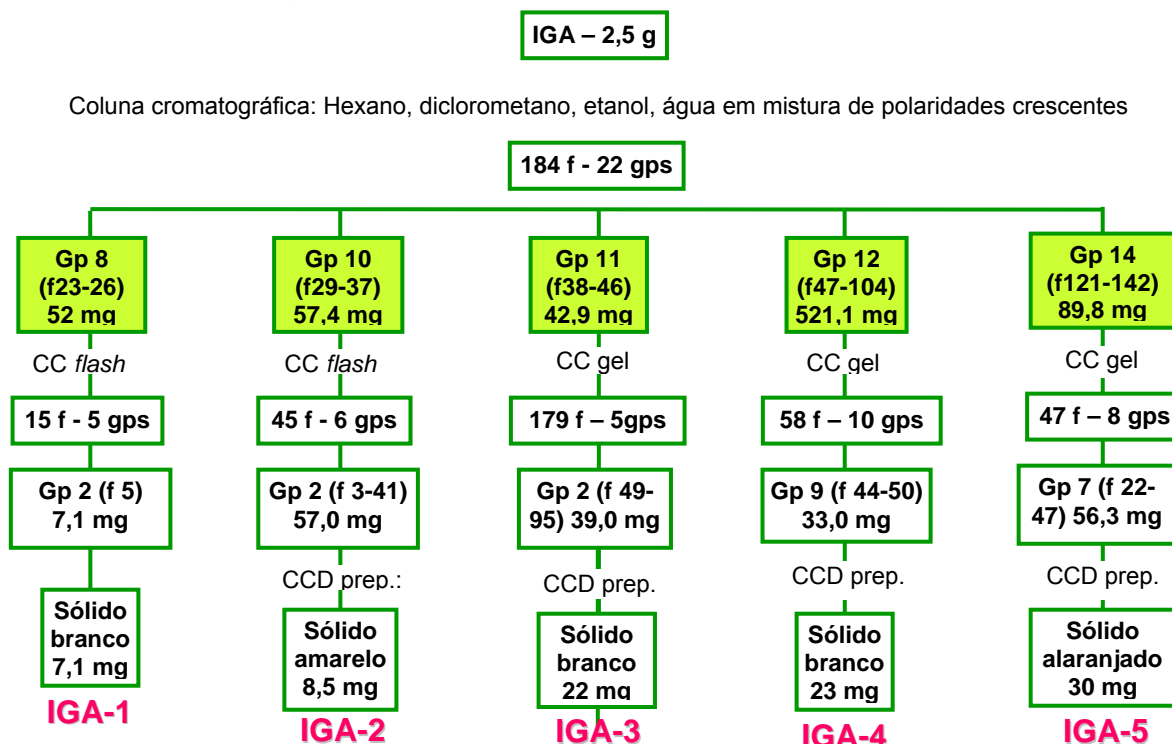
Tabela 15 - Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo 14 de IGA

Grupos	Fração	Massa (mg)
1	1-7	5,2
2	8-10	1,6
3	11-12	4,2
4	13-17	1,2
5	18-19	0,4
6	20-21	1,5
7	22-47	56,3

O grupo 7 (frações 22-27) 56,3 mg, foi purificado em placas preparativas de sílica gel, eluídas três vezes com diclorometano, conduzindo à obtenção de um sólido alaranjado (30,0 mg), denominado IGA-5, o qual foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), espectrometrias no infravermelho, e de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C .

O fluxograma a seguir, Figura 13, mostra o procedimento experimental desenvolvido para esta etapa do fracionamento.

Figura 13 - Fluxograma da purificação do extrato em acetato de etila dos galhos de *I. marginata*.



Gp: grupo; f: frações.

IV.4 ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

IV.4.1 Teste de Atividade Antioxidante: Determinação da Atividade Doadora de Átomos de Hidrogênio ao Radical Estável DPPH* (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil).

A redução do radical DPPH* foi determinada pela mudança colorimétrica medida em 517 nm (BLOIS, 1958). Para a medida do seqüestro do radical, os extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e dos galhos (IGA) e extratos etanólico das folhas (IFE) e dos galhos (IGE) foram diluídos em DMSO, obtendo-se concentrações no meio de reação de 12,5 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IGE e IGA; 2 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IFE e 6,25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IFA.

Alíquotas de 50,0 μL de cada solução de extrato foram adicionadas à mistura de reação contendo 1,0 mL de solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 5.5), 1,0 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH* 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A mudança na absorvância foi medida após 15 min de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em triplicata. O controle

positivo foi preparado sem a amostra e o branco foi constituído de 1,0 mL de solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5.5) e 1,5 mL de etanol. A absorvância da solução resultante foi medida em 517 nm.

As concentrações de extrato que inibiram o processo oxidativo em 50% (IC₅₀), foram estimadas pelo *software* GraphPad Prism[®], versão 4.00 de abril de 2003, utilizando uma curva hiperbólica. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM).

A atividade seqüestradora de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoloramento do DPPH, usando a equação 1:

$$\%ASR = \frac{ACN - AA}{ACN} \times 100 \quad (1)$$

onde AA é a absorvância da amostra em determinada concentração e ACN é a absorvância do controle.

IV.4.2 Determinação do Conteúdo de Polifenóis

O conteúdo de polifenóis totais nos extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e galhos (IGA) e para os extratos etanólicos das folhas (IFE) e galhos (IGE) foi determinado pelo método colorimétrico utilizando o Folin-Ciocalteu como reagente (KUMATZAWA, *et al.*, 2004; GEORGETTI, *et al.*, 2007). As amostras dos extratos IGA e IGE foram preparadas utilizando-se 0,02 g de cada extrato, 5 mL de DMSO e 20,0 mL de etanol 80%. As amostras de IFA e IFE foram preparadas utilizando-se 0,02 g de cada extrato e 10,0 mL de etanol. A solução de IFA foi diluída 2,5 vezes e a de IFE 5 vezes em etanol 80%.

Alíquotas de 0,5 mL de cada amostra foram misturadas a 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de solução de Na₂CO₃ 10%. Após de 1 h de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro UV-Vis V-1200 Pró-Análise[®]. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O branco foi preparado com 0,5 mL do solvente da amostra, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na₂CO₃ 10% (m/v). Foi preparado também um controle para cada fração utilizando-se 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de H₂O deionizada e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu para eliminação de interferentes de cor. O

conteúdo total de polifenóis foi calculado em mg g^{-1} de extrato, tendo o ácido gálico como padrão.

IV.4.3 Determinação do Conteúdo de Flavonóides Totais

O conteúdo de flavonóides totais presentes nos extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e galhos (IGA) e para os extratos etanólicos das folhas (IFE) e galhos (IGE) foi determinado pelo método descrito por Georgetti *et al.* (2007). As amostras do extrato IGA foram preparadas utilizando-se 0,02 g do extrato, 5,0 mL de DMSO e 45,0 mL de etanol 80%. As amostras de IFA foram preparadas utilizando-se 0,02 g do extrato e 10,0 mL de DMSO. Esta solução foi diluída 25 vezes em etanol 80%. As amostras de IGE e IFE foram preparadas utilizando-se 0,02 g de cada extrato e 10,0 mL de etanol 80%. A solução de IFE foi diluída 2 vezes em etanol 80%.

Alíquotas de 1,5 mL de cada amostra foram misturadas a 1,5 mL de solução de AlCl_3 2% (m/v) em etanol 80% (v/v). Após 1 h de incubação a temperatura ambiente, a absorvância foi determinada em 420 nm em espectrofotômetro UV-Vis V-1200 Pró-Análise[®]. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. O branco foi preparado com 1,5 mL do solvente da amostra e 1,5 mL de solução de AlCl_3 2%. Também foi preparado um controle para cada fração utilizando-se 1,5 mL de amostra e 1,5 mL de etanol 80% para eliminação de interferentes de cor. O conteúdo de flavonóides foi expresso em mg g^{-1} de extrato, tendo quercetina como padrão.

IV.4.4 Análise por CLAE-DAD

A metodologia de análise por CLAE-DAD foi baseada em Dias, Souza e Rogez (2010) aumentando-se o tempo de eluição e modificando-se o gradiente. A fase móvel foi composta de: (A) água ultra pura com 2% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 2% de ácido fórmico. Essas soluções seguiram o gradiente apresentado na Tabela 16, totalizando 110 minutos de corrida.

Tabela 16 – Gradiente utilizado na identificação dos compostos de *I. marginata* W

Tempo (min)	% A	% B
0-5	0,0	100,0
5-20	2,5	97,5
20-30	5,0	95,0
30-50	15,0	85,0
50-60	25,0	75,0
60-65	30,0	70,0
65-70	45,0	55,0
70-75	50,0	50,0
75-80	70,0	30,0
80-85	90,0	10,0
85-90	100,0	0,0
90-95	100,0	0,0
95-110	0,0	100,0

Gradiente: **A**= Água (ácido acético 2% v/v); **B**= Acetonitrila (ácido acético 2% v/v); Vazão de 0,75 mL min⁻¹

Os volumes de amostra e padrões injetados foram de 20,0 µL e a vazão de eluição foi de 0,75 mL min⁻¹. Todas as análises foram feitas em temperatura controlada de 4°C no injetor para as amostras e 28°C para a coluna.

Na preparação das amostras foi utilizada água ultra pura purificada pelo sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA). A Acetonitrila e o Metanol (grau HPLC) foram procedentes da J.T.Baker. O Ácido fórmico (p.a.) utilizado foi procedente da LabSynth (Diadema, SP, BR)

Foram utilizados os padrões quercetina, ácido cafeico, ácido tânico, ácido gálico, (+) catequina, rutina (Sigma, Steinheim, Alemanha), ácido ferrúlico, ácido p-cumárico (Fluka, Steinheim, Alemanha), ácido caurenóico, isolado anteriormente, vicenina, naringina, apigenina (Sigma Chemicals Co. St. Louis, EUA), ácido 4-hidroxibenzóico (Acros Organics, New Jersey, USA) e emodina e fisciona (isoladas de *I. marginata* neste trabalho).

Os padrões foram diluídos em metanol, em concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg mL⁻¹ para obtenção da curva de calibração utilizada na quantificação; os extratos brutos de IFE, IGA e IGE foram diluídos em metanol na concentração de 5,0 mg mL⁻¹, com exceção do extrato IFA que foi diluído na concentração de 2,5 mg mL⁻¹. A todas as soluções foi adicionado 1,0 mg de ácido ascórbico para evitar oxidação dos constituintes químicos (NUUTILA; KAMMIOVIRTA e OKSMAN-CALDENTY, 2002). Antes das injeções, as soluções

foram filtradas em membranas filtrantes de nylon de 0,2 μm , 33 mm de diâmetro, não esterilizadas.

Para a quantificação das substâncias foram utilizadas as áreas dos picos de interesse, previamente identificados. A quantificação foi realizada com curvas de calibração construídas com padrões. As concentrações dos compostos identificados foram expressas em mg de composto/g de extrato.

A detecção foi monitorada no intervalo de 200 a 600 nm, sendo selecionados como comprimentos de onda fixos 280 nm, que envolveu todos os compostos fenólicos, e 370 nm, envolvendo os flavonóides (DIAS; SOUZA e ROGEZ, 2010). A identificação dos compostos foi feita através da coinjeção dos padrões com as amostras dos extratos, pela comparação com os tempos de retenção dos padrões e perfis dos espectros dos padrões no UV.

IV.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

IV.5.1 Ensaio de Toxicidade Contra *Artemia Salina* Leach

O ensaio de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com o método de Meyer e colaboradores (1982). Os ovos de *A. salina* (marca Maramar) foram incubados em água de mar artificial, a 20-30 °C. A composição da água do mar artificial foi: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4,0 g de Na_2SO_4 , 1,3 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,7 g de KCl em 1000 mL de água destilada.

Para a eclosão dos ovos, no período de 48 horas, foi utilizada uma caixa plástica contendo em seu interior uma divisória com microperfurações, de forma que apenas um dos lados ficasse iluminado para permitir a migração das larvas por fototropismo.

Amostras dos extratos (100,0 mg) foram dissolvidas em 2,0 mL de DMSO e, em seguida, diferentes volumes das soluções foram adicionadas a cinco tubos de ensaio contendo 5,0 mL de água do mar artificial e 9 a 12 larvas de *A. salina*, resultando em cinco concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

As análises foram realizadas em quadruplicata. As larvas mortas e vivas foram contadas após 24 horas e os valores de DL_{50} (Dose Letal-50%) calculados através de métodos estatísticos de regressão linear. Os resultados são

considerados positivos para os valores de DL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MEYER *et al.*, 1982).

IV.5.2 Ensaios de Atividade Antibacteriana

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos IFA, IFE, IGA e IGE foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (ANVISA, 2003). Os extratos foram diluídos em DMSO na concentração de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O teste foi realizado em microplacas de 96 orifícios. Foram testadas as bactérias *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Nos orifícios da primeira coluna da microplaca, foram depositados $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton (ANVISA, 2003) e $50,0 \mu\text{L}$ dos extratos IFA, IFE, IGA e IGE na concentração de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$, em seguida $100,0 \mu\text{L}$ do conteúdo do poço 1 foram homogeneizados com o meio e transferidos para o poço seguinte (coluna 2), com a finalidade de se obter microdiluições seriadas a partir de $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, totalizando 7 concentrações, sendo os $100,0 \mu\text{L}$ finais desprezados. Em seguida, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ das suspensões de cada bactéria, separadamente, previamente padronizadas, nos orifícios com o meio e extratos em diferentes concentrações.

As placas foram fechadas e incubadas por 24 horas a 36°C para o crescimento das bactérias. Na seqüência, foram acrescentados $50,0 \mu\text{L}$ de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5% e a placa foi novamente incubada por 3 horas à temperatura de 37°C . O indicador TTC colore de vermelho o meio em que há o crescimento bacteriano e, quando não há o crescimento dos microrganismos, o meio permanece com a coloração inicial.

A CBM (concentração bactericida mínima) foi avaliada repicando $10,0 \mu\text{L}$ dos poços que não apresentaram crescimento microbiano, em placas contendo o meio Mueller-Hinton para as bactérias (incubação de 24 horas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). As amostras que demonstrarem crescimento dos microrganismos após a repicagem para o teste de CBM foram consideradas com efeito bacteriostático.

IV.5.3 Teste de Atividade Anti-Helmíntica – Eclodibilidade (egg)

O ensaio de atividade anti-helmíntica foi baseado na metodologia descrita por Coles, *et al.* (1992), amplamente utilizada para avaliação do potencial anti-helmíntico de plantas.

Fezes de ovinos com infecção natural foram coletadas diretamente da ampola retal para isolamento dos ovos de nematódeos gastrintestinais. Os ovos foram recuperados segundo metodologia descrita por Coles *et al.* (1992) adaptado por Bizimenyera *et al.* (2006).

As fezes foram homogeneizadas em água e filtradas em um conjunto de peneiras. Os ovos retidos na peneira de 25 μm foram lavados com água destilada e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos em tubos Falcon de 50,0 mL. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foi adicionada solução salina saturada, densidade = 1,2, para a ressuspensão dos ovos. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi lavado na peneira de 25,0 μm e os ovos coletados armazenados em cálice de sedimentação por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, 100,0 μL do material armazenado foram colocados em cada poço da placa de cultivo celular, resultando em aproximadamente 100 ovos por poço. 400,0 μL dos extratos IFA, IFE, IGA e IGE foram adicionados em diferentes concentrações em cada poço totalizando um volume de 500,0 μL . As soluções dos extratos e o controle negativo foram analisados em triplicata.

Os extratos foram diluídos em DMSO 3% (v/v) e posteriormente adicionou-se água destilada até a obtenção da solução padrão com concentração de 10,0 mg mL^{-1} para cada extrato e, a partir desta, foram realizadas as seguintes diluições:

IFE mg mL^{-1} : 0,125; 0,09375; 0,0625; 0,046875; 0,03125; 0,023438;
0,015625

IGE mg mL^{-1} : 0,375; 0,25; 0,1875; 0,125; 0,09375; 0,0625; 0,046875;
0,015625

IFA mg mL^{-1} : 0,1875; 0,125; 0,09375; 0,0625; 0,046875; 0,015625

IGA mg mL^{-1} : 0,1875; 0,125; 0,09375; 0,0625; 0,046875; 0,015625

Como controle negativo utilizou-se água destilada acrescida de DMSO. As placas foram homogeneizadas manualmente e acondicionadas em estufa B.O.D. (27°C e UR >80%) por 48 h. Após esse período, foi adicionado uma gota de

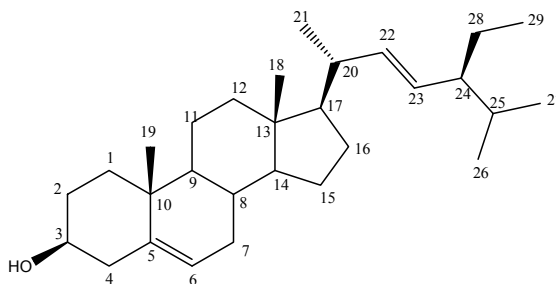
lugol em cada poço e os ovos e larvas eclodidas (L₁) quantificados para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larval, de acordo com técnica descrita por COLES *et al.* (1992) (2).

$$\% \text{ Inibição para cada concentração} = \frac{\text{número de L}_1}{\text{número de ovos} + \text{número de L}_1} \quad (2)$$

A concentração letal para 50% dos ovos (CL₅₀) foi calculada através de regressão logística pelo *software* R versão 2.13.

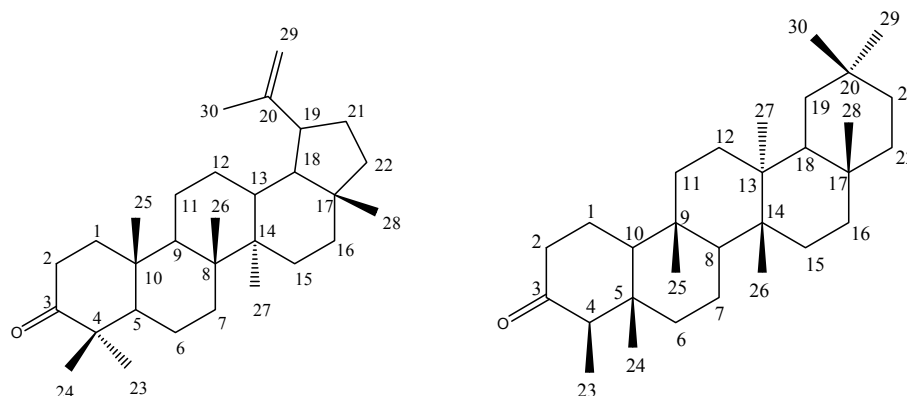
IV.6 DADOS ESPECTRAIS E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *I. MARGINATA*

IV.6.1 Estigmasterol (IFA-1 e IGA-4)



Sólido branco (32,5 mg); P.F.: 147-150 °C; CG-MS (m/z): 412, 394, 271, 253, 207, 55; IR (KBr) $\sqrt{\text{max}}$ 3414, 2962, 2933, 2871, 1638, 1616, 1456, 1373, 969 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ H 0.56 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, d, J= 6.6 Hz, H-21), 3.60 (1H, m, H-3), 5.00 (1H, d, J= 8.4 Hz, H-23), 5.01 (1H, d, J= 8.4 Hz, H-22), 5.1 (1H, m, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ C 38.2 (C-1), 29.9 (C-2), 71.3 (C-3), 41.1 (C-4), 139.8 (C-5), 117.7 (C-6), 31.7 (C-7), 32.1 (C-8), 49.6 (C-9), 37.3 (C-10), 21.6 (C-11), 39.7 (C-12), 43.5 (C-13), 56.1 (C-14), 23.2 (C-15), 28.7 (C-16), 55.3 (C-17), 12.2 (C-18), 19.2 (C-19), 40.4 (C-20), 21.7 (C-21), 138.4 (C-22), 129.6 (C-23), 51.4 (C-24), 34.4 (C-25), 21.3 (C-26), 25.6 (C-28), 12.5 (C-29).

IV.6.2 Mistura de Lupenona e Friedelina (IGA-1)

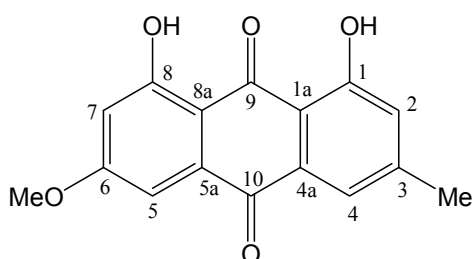


Sólido branco (7,1 mg); P.F.: 143-145 °C.

Lupenona: CG-MS (m/z): 424, 409, 313, 245, 218, 205, 189, 175, 161, 149, 135, 121, 109, 95, 81, 69, 55; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δH 4.57 (*dd*, $J = 2.4$ e 1.2 Hz, H-29), 4.68 (*d*, $J = 2.1$ Hz, H-29), 2,2 (*m*); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δC 39.8 (C-1), 34.3 (C-2), 218.4 (C-3), 47.5 (C-4), 55.1 (C-5), 19.8 (C-6), 33.7 (C-7), 40.9 (C-8), 49.9 (C-9), 37.0 (C-10), 21.6 (C-11), 25.3 (C-12), 38.3 (C-13), 43.0 (C-14), 27.6 (C-15), 36.1 (C-16), 43.1 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.0 (C-20), 30.0 (C-21), 40.1 (C-22), 26.8 (C-23), 21.2 (C-24), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.8 (C-27), 18.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.5 (C-30).

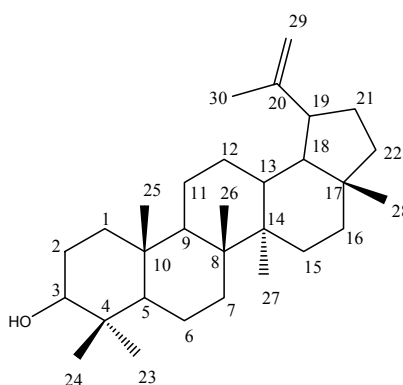
Friedelina: CG-MS (m/z): 426, 411, 231, 218, 204, 191; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δH 2,5 (*m*); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δC 22.4 (C-1), 41.7 (C-2), 213.5 (C-3), 58.4 (C-4), 42.9 (C-5), 41.4 (C-6), 18.4 (C-7), 53.2 (C-8), 37.6 (C-9), 59.6 (C-10), 35.7 (C-11), 30.7 (C-12), 39.8 (C-13), 38.4 (C-14), 32.6 (C-15), 35.8 (C-16), 30.1 (C-17), 42.3 (C-18), 35.5 (C-19), 28.3 (C-20), 32.9 (C-21), 39.4 (C-22), 7.0 (C-23), 14.6 (C-24), 18.1 (C-25), 20.4 (C-26), 18.8 (C-27), 32.2 (C-28), 35.2 (C-29), 31.9 (C-30).

IV.6.3 Fisciona (IGA-2)



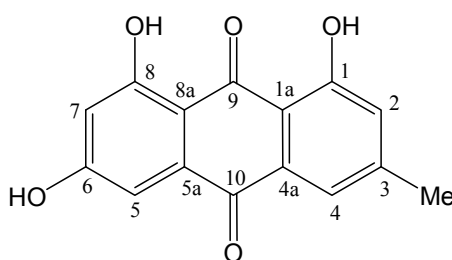
Sólido amarelo (8,5 mg); P.F.: 180 °C; IR (KBr) ν_{max} 3445, 1662, 1630, 1472, 1561, 1100, cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.06 (1H, s, H-O), 12.26 (1H, s, H-O), 7.01 (1H, dl, H-2), 7.56 (1H, dl, H-4), 7.30 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.62 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 3.87 (3H, s, O-Me), 2.38 (3H, s, Me); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 162.6 (C-1), 124.7 (C-2), 148.6 (C-3), 121.5 (C-4), 108.4 (C-5), 166.7 (C-6), 106.9 (C-7), 165.3 (C-8), 191.0 (C-9), 182.2 (C-10), 133.4 (C-4a), 110.4 (C-8a), 113.8 (C-1a), 135.4 (C-5a), 56.3 (O-Me), 22.3 (Me).

IV.6.4 Lupeol (IGA-3)



Sólido branco (22 mg); P.F.: 170-175 °C; CG-MS (m/z): 426, 315, 218, 207, 189, 175, 135, 95, 81, 55; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.57 (1H, s, H-29), 4.69 (1H, s, H-29), 3.2 (1H, dd, $J = 10,8$ e $5,1$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 38.9 (C-1), 30.0 (C-2), 79.2 (C-3), 37.3 (C-4), 55.4 (C-5), 18.5 (C-6), 34.4 (C-7), 41.0 (C-8), 50.6 (C-9), 39.0 (C-10), 21.1 (C-11), 25.3 (C-12), 38.2 (C-13), 43.0 (C-14), 27.6 (C-15), 35.7 (C-16), 43.2 (C-17), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 151.2 (C-20), 29.9 (C-21), 40.2 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.5 (C-29), 19.5 (C-30).

IV.6.5 Emodina (IGA-4)



Sólido alaranjado (30 mg); P.F.: 254-256 °C; IR (KBr) ν_{max} 3459, 1097, 1654, 1627 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ H 12.06 (1H, s, H-O), 12.09 (1H, s, H-O), 7.17 (1H, dd, J = 1.5 e 0.6, H-2), 7.54 (1H, dd, J = 1.5 e 0.6, H-4), 7.10 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.54 (1H, d, J=2,4 Hz), 2.38 (3H, s, Me); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ C 161.3 (C-1), 124.0 (C-2), 148.1 (C-3), 120.4 (C-4), 109.1 (C-5), 166.1 (C-6), 107.9 (C-7), 164.4 (C-8), 189.4 (C-9), 181.5 (C-10), 132.8 (C-4a), 108.6 (C-8a), 113.4 (C-1a), 135.0 (C-5a), 21.4 (Me).

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

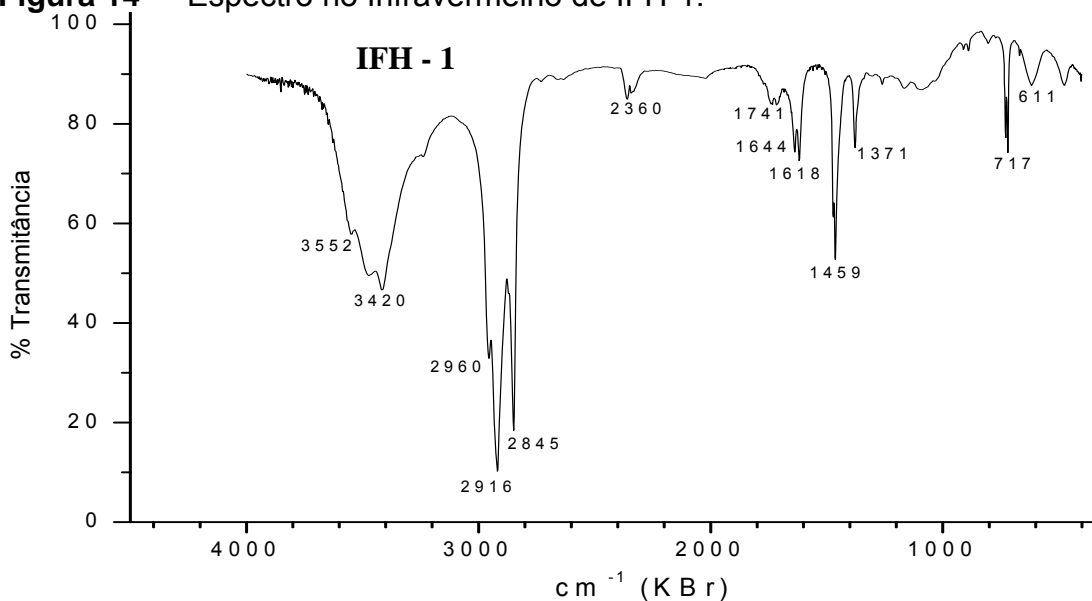
V.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

V.1.1 Extrato em Acetato de Etila das Folhas de *Inga Marginata* (IFA)

V.1.1.1 IFH-1

O espectro no infravermelho de IFH-1, Figura 14, apresentou bandas de absorção em 3420 cm^{-1} (ν O-H), bandas em 2960 , 2916 e 2845 cm^{-1} (ν C-H) características de compostos contendo carbonos saturados. As bandas em 1371 e 1459 cm^{-1} caracterizaram a presença de grupos metila (δ C-H) e as absorções em 1644 e 1618 cm^{-1} (ν C=C) indicaram a presença de carbonos sp^2 , a banda em 717 cm^{-1} (δ CH_2) confirmou a presença de cadeias longas de carbonos saturados.

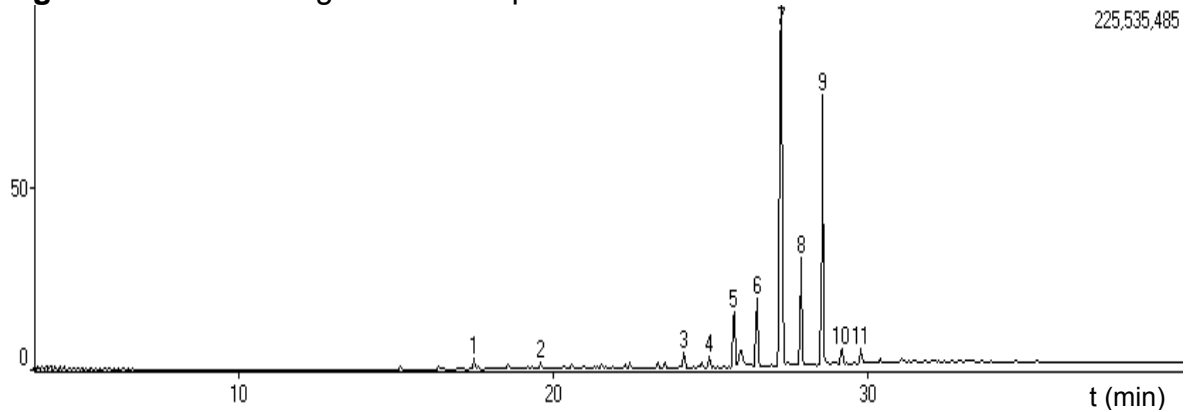
Figura 14 - Espectro no Infravermelho de IFH-1.



A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, Figura 15, demonstrou que IFH-1 tratava-se de uma mistura constituída quase que exclusivamente por hidrocarbonetos saturados de cadeias longas, fato demonstrado pelo espectro de massas dos compostos referentes aos picos 3 a 11. O padrão de fragmentação destes compostos são característicos de hidrocarbonetos

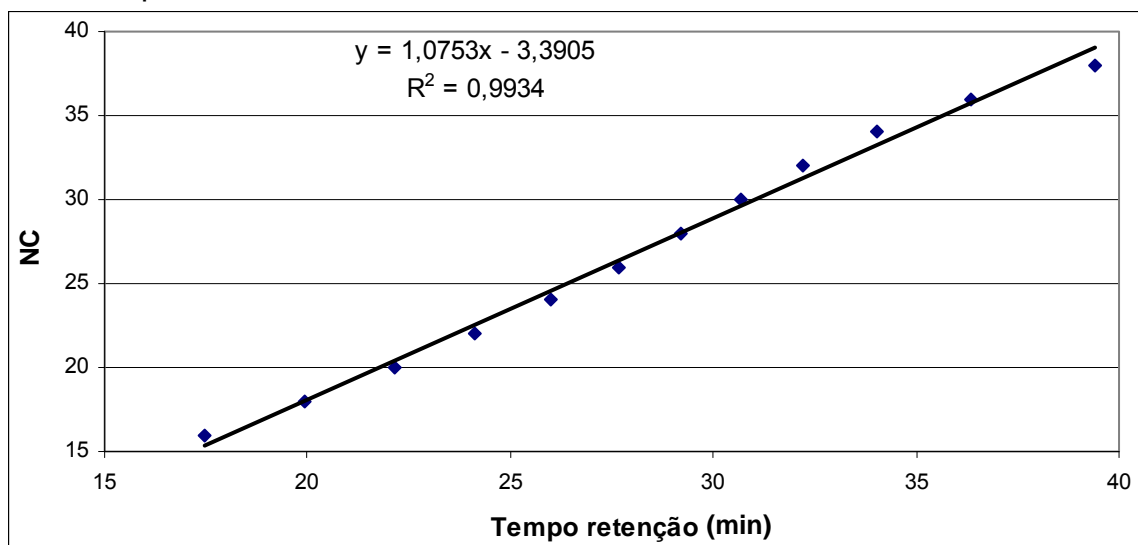
de cadeias longas, por apresentarem uma série de conjunto de picos separados por 14 unidades.

Figura 15 - Cromatograma obtido por CG-EM de IFH-1.



A amostra de IFH-1 e uma mistura dos padrões de alcanos, C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32} , C_{34} , C_{36} , C_{38} e C_{40} , foram injetados nas mesmas condições no cromatógrafo a gás (CG-DIC). Os tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos foram plotados contra os respectivos números de carbonos, obtendo-se um gráfico de tempo de retenção x números de carbonos (NC), Figura 16. A partir do gráfico foram calculados os índices de Kovats dos hidrocarbonetos que foram comparados aos índices da literatura para identificação dos mesmos, conforme apresentado na Tabela 17.

Figura 16 - Curva de correlação Tempo de retenção x número de carbonos dos padrões de alcanos.



Por interpolação dos valores dos tempos de retenção dos hidrocarbonetos presentes em IFH-1 foi possível identificá-los, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 - Hidrocarbonetos identificados em IFH-1

Hidrocarboneto	IFH-1 (%) ^a	IK	IK literatura ^b
Pentacosane (C ₂₅ H ₅₂)	+	2525	2500
Hexacosane (C ₂₆ H ₅₄)	+	2613	2600
Heptacosane (C ₂₇ H ₅₆)	3,96	2702	2702
Octacosane (C ₂₈ H ₅₈)	7,31	2785	2800
Nonacosane (C ₂₉ H ₆₀)	49,04	2906	2900
Triacotane (C ₃₀ H ₆₂)	10,52	2957	3000
Hentriacotane (C ₃₁ H ₆₄)	24,17	3049	3100
Dotriacotane (C ₃₂ H ₆₆)	1,20	3113	3200
Tritriacotane (C ₃₃ H ₆₈)	1,02	3205	3300

^a Porcentagem relativa dos hidrocarbonetos, os compostos marcados com + estão presentes em uma concentração menor que 1,0%.

^b Índice de Kovats (THE PHEROBASE)

A presença de hidrocarbonetos de cadeias longas condiz com a “cera vegetal” que recobre as folhas para sua proteção contra desidratação.

V.1.1.2 IFA-1

IFA-1 consistiu de um sólido branco de ponto de fusão 147 – 150°C, cujo teste de Liebermann-Burchard indicou tratar-se de um esteróide pelo desenvolvimento de coloração azul seguida de cor verde persistente (MATOS, 1997), Figura 17.

Figura 17 - Resultado do teste de Liebermann-Burchard para IFA-1.



IFA-1 foi comparada por CCD revelada com solução de vanilina sulfúrica com o padrão da mistura de estigmasterol/sitosterol e apresentou mesmo R_f e coloração semelhante ao da mistura.

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, entretanto, revelou a presença de um único constituinte e o espectro de massas deste foi idêntico ao espectro do estigmasterol (24 α -etil-colesta-5,22dienol), Figura 18, obtido da biblioteca NIST, apresentando pico do íon molecular em $m/z = 412$ e pico base em $m/z 55$. O fragmento em $m/z 394$ indicou perda de água, enquanto o fragmento em $m/z 300$ foi característico de esteróides com ligação dupla entre C₂₂ e C₂₃. Os picos em $m/z 394$, 271, 253, 207 e 253, Figura 19, também foram compatíveis com dados registrados na literatura para o estigmasterol (MISRA e TIWARI, 1973).

Figura 18 – Estrutura do Estigmasterol (IFA-1).

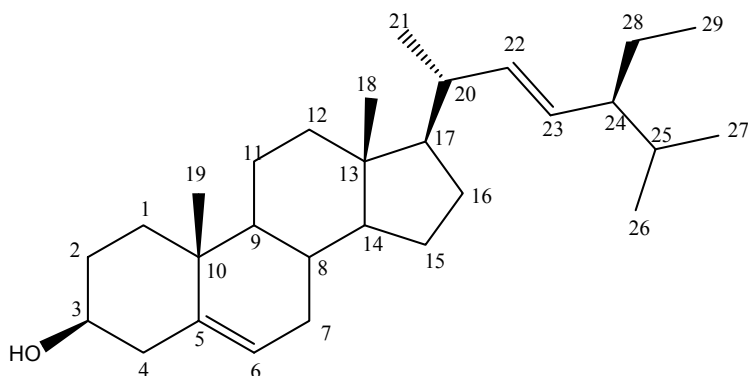
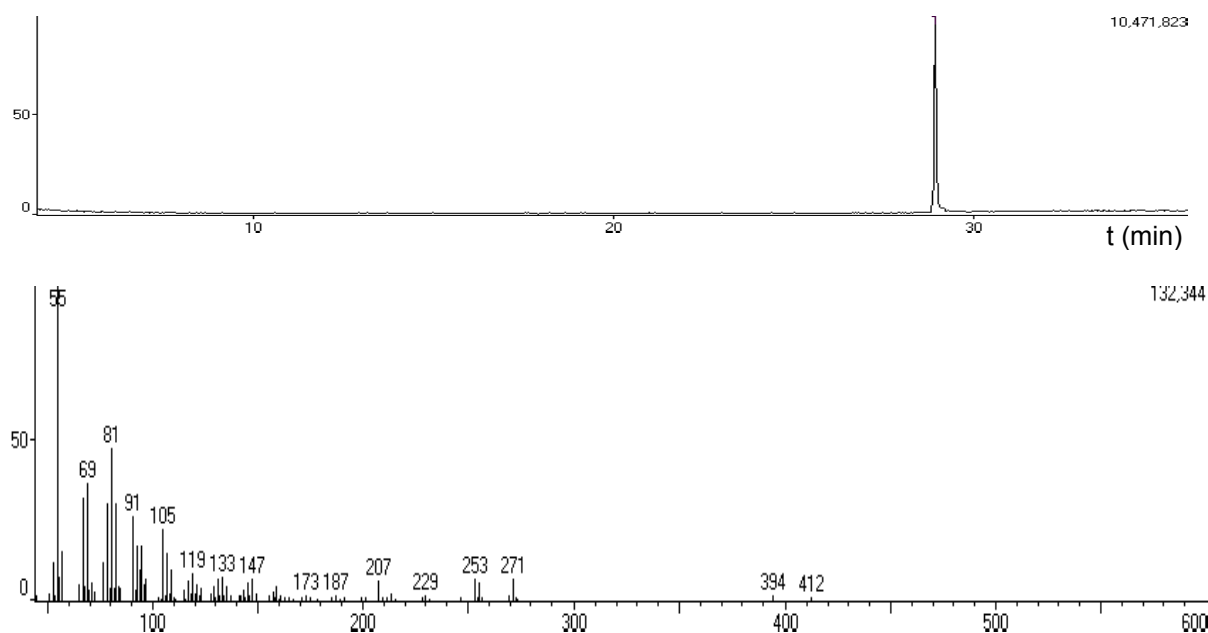
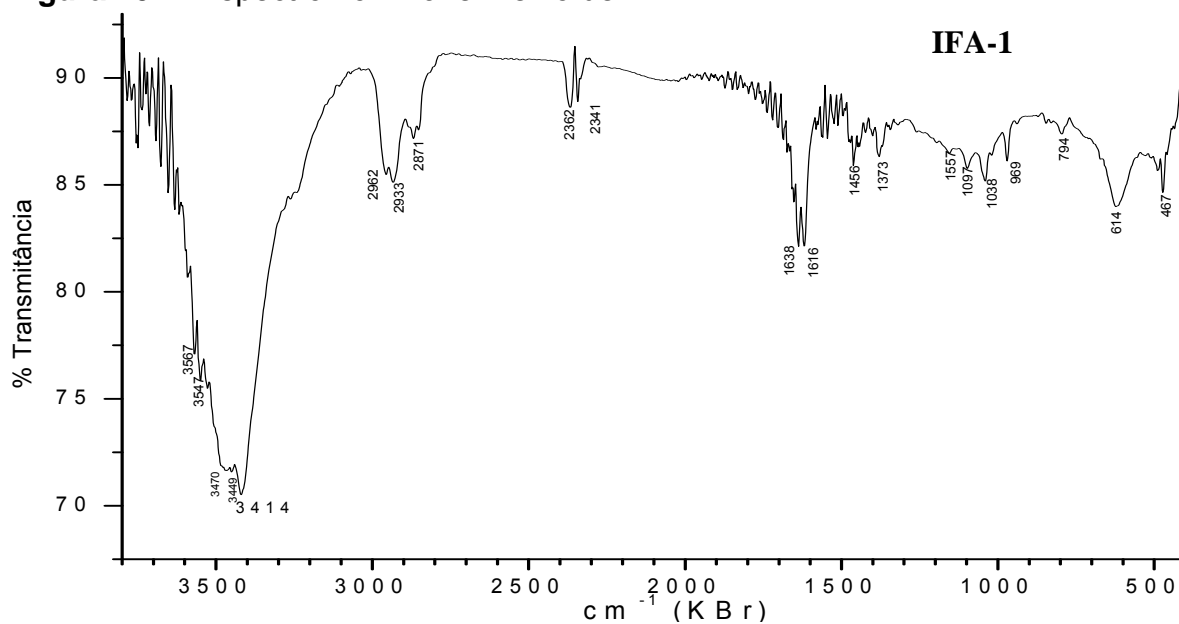


Figura 19 - Cromatograma obtido por CG-EM de IFA-1 e respectivo espectro de massas.

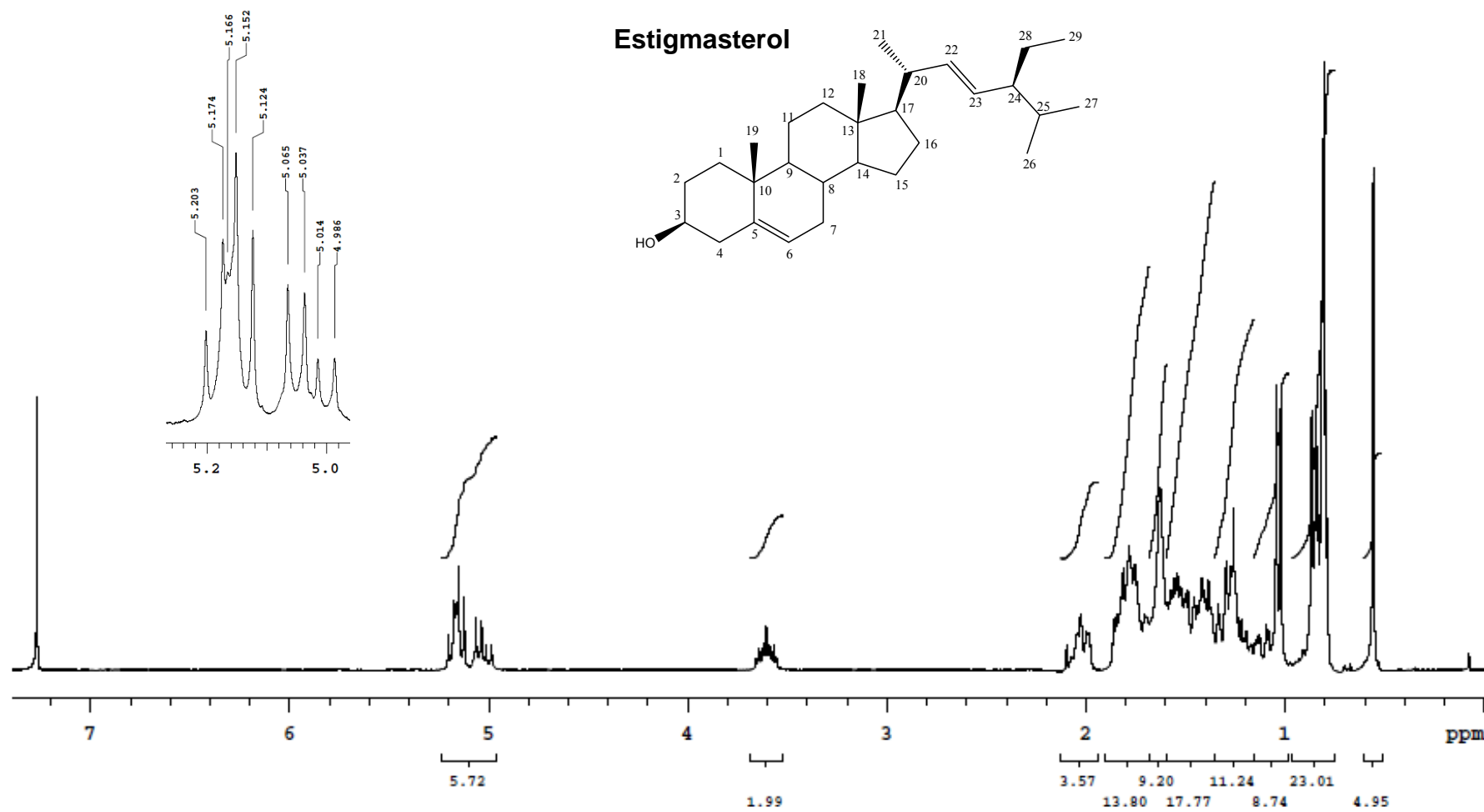


O espectro no infravermelho do constituinte, Figura 20, também foi compatível com a molécula do estigmasterol, apresentando bandas de absorção em 3414 cm^{-1} (ν O-H) e 1097 cm^{-1} (ν C-O), indicativas da presença de hidroxila alcoólica; as absorções em 2962 , 2933 e 2871 cm^{-1} (ν C-H) foram características de compostos contendo carbonos saturados, enquanto as bandas em 1373 e 1456 cm^{-1} caracterizaram a presença de grupos metila (ν CH_3). As bandas de absorção em 1638 e 1616 cm^{-1} (ν C=C) indicaram a presença de duas ligações duplas, uma delas com estereoquímica *trans*, indicada pela banda de absorção em 969 cm^{-1} (ν C-H) (OLIVEIRA, 2007).

Figura 20 - Espectro no infravermelho de IFA-1.

O espectro de RMN de ¹H, Figura 21, também indicou tratar-se do estigmasterol, apresentando vários sinais na região de δH 0,56 a 1,8 referentes a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos do núcleo esteroidal, um multipeto em δH 3,6, correspondente a hidrogênio ligado a carbono carbinólico (C-3), dois dupletos em δH 5,00 e 5,01 relativos aos hidrogênios das posições 23 e 22, e um multipeto em δH 5,1 relativo ao hidrogênio olefínico em C-6.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de IFA-1 em CDCl_3 (300MHz).

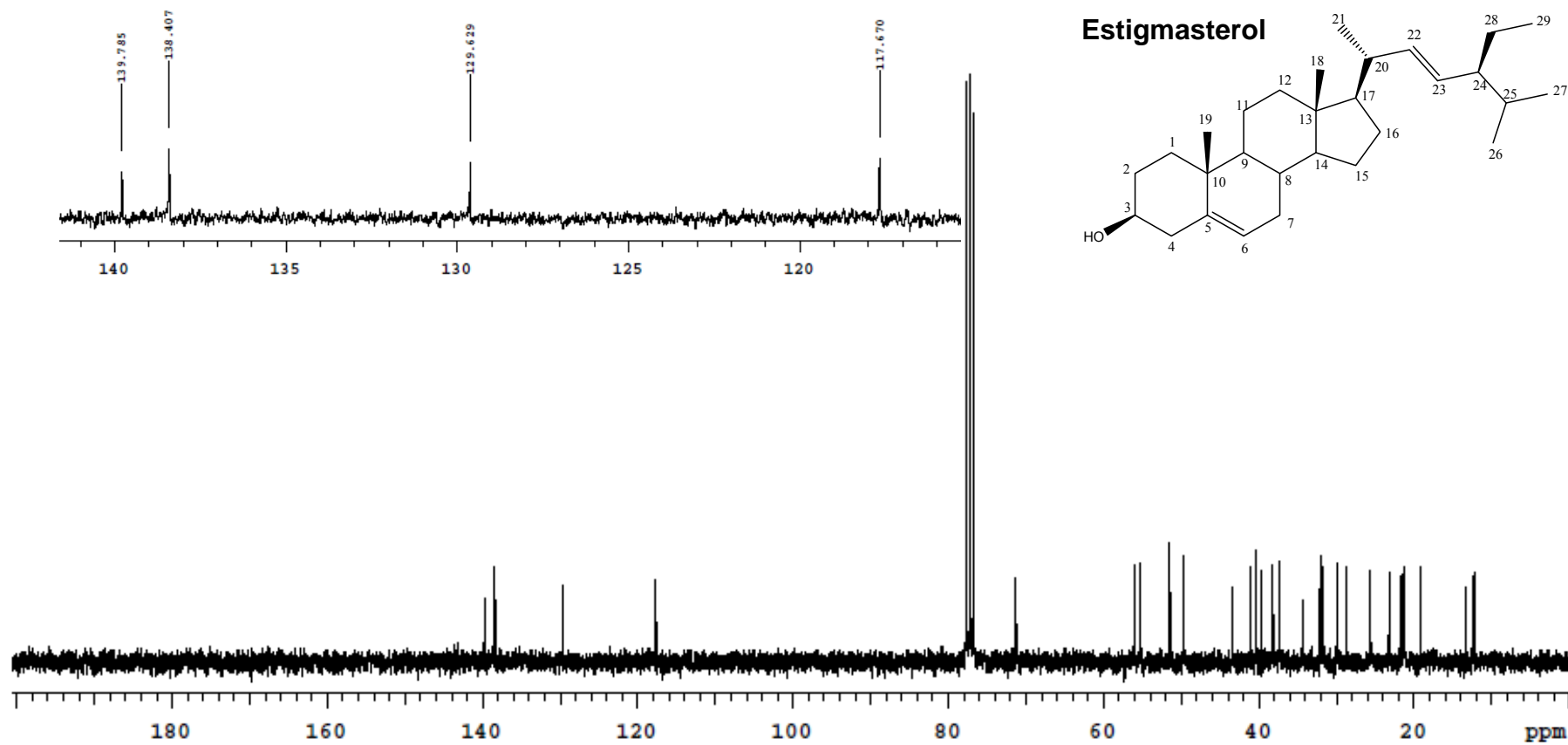


O espectro de RMN de ^{13}C , Figura 22, confirmou a estrutura do estigmasterol, apresentando sinais em δC 71,3, característico de carbono carbinólico (C-3); em δC 139,8 e 117,7, atribuídos aos carbonos da ligação dupla (C-5) e (C-6), respectivamente, e em δC 138,4 e 129,6, atribuídos aos carbonos da ligação dupla (C-22) e (C-23), respectivamente. Os demais sinais apresentados na Tabela 18 também foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos do estigmasterol registrados na literatura (FALCÃO, 2003; HUNG e YEN, 2001), com exceção do sinal do carbono C-27 que não foi identificado no espectro, por estar, provavelmente sobreposto ao sinal do carbono metílico C-18.

Tabela 18 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IFA-1 comparados com a literatura

Carbono (n)	IFA-1 ^{13}C CDCl ₃	Estigmasterol ^{13}C (FALCÃO, 2003) CDCl ₃	Estigmasterol ^{13}C (HUNG e YEN, 2001) CDCl ₃
1	38,2	37,1	37,2
2	29,9	31,5	31,6
3	71,3	71,7	71,8
4	41,1	42,1	42,3
5	139,8	139,8	140,7
6	117,7	121,6	121,7
7	31,7	31,8	31,9
8	32,1	31,8	31,9
9	49,6	50,0	50,1
10	37,3	36,4	36,5
11	21,6	21,1	21,2
12	39,7	39,7	39,6
13	43,5	42,1	42,3
14	56,1	56,7	56,8
15	23,2	24,2	24,3
16	28,7	28,8	28,9
17	55,3	55,9	55,9
18	12,2	11,9	12,0
19	19,2	19,3	19,4
20	40,4	40,4	40,5
21	21,7	21,1	21,2
22	138,4	138,2	138,3
23	129,6	129,1	129,2
24	51,4	51,1	51,2
25	34,4	31,8	31,9
26	21,3	21,0	21,0
27	-----	18,9	19,0
28	25,6	25,3	25,4
29	12,5	12,1	12,2

Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C de IFA-1 em CDCl_3 (75MHz).



O estigmasterol, em grande número de plantas, é isolado em mistura com o sitosterol que ocorre, quase sempre, em maior proporção. Foi verificado que a incidência de luz na planta causa a bioconversão do sitosterol em estigmasterol (GALOTTA e BOAVENTURA, 2005), o que explicaria a presença somente do estigmasterol nas folhas de *I. marginata*, as quais sofrem grande exposição à luz solar.

V.1.2 Extrato em Acetato de Etila dos Galhos de *Inga Marginata* (IGA)

V.1.2.1 IGA-1

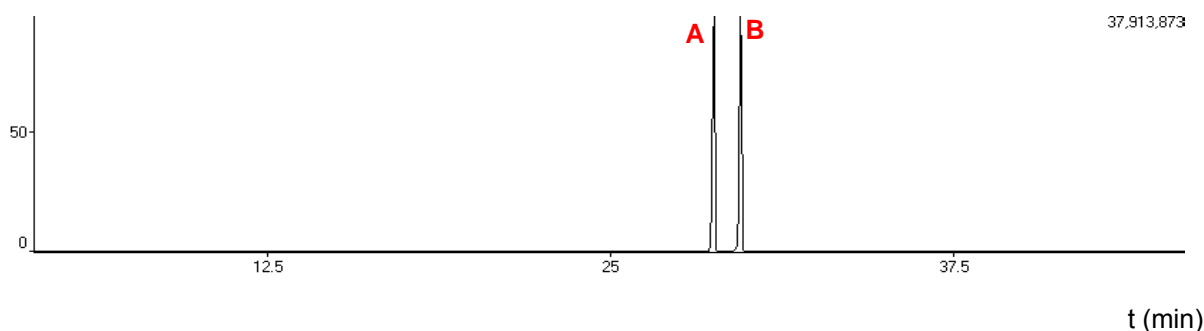
ICA1 consistiu de um sólido branco que apresentou uma única mancha quando analisado em CCD revelada com vanilina sulfúrica. O teste de Liebermann-Burchard indicou tratar-se de triterpeno pentacíclico pelo desenvolvimento da coloração rósea avermelhada (MATOS, 1997), Figura 23.

Figura 23 - Resultado do teste de Liebermann-Burchard para IGA-1.



A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, entretanto, indicou tratar-se de uma mistura de dois constituintes, Figura 24.

Figura 24 - Cromatograma obtido por CG-EM de IGA-1.



A comparação do espectro de massas de IGA-1 com os espectros do banco de dados da biblioteca NIST sugeriu para o constituinte correspondente ao pico A, a estrutura da lupenona (3-oxolup-20(29)-eno), Figura 25, e, para o constituinte correspondente ao pico B, a estrutura da friedelina (3-oxo-friedelano), Figura 26. De fato o pico do íon molecular em 424 e os picos em 409, 313, 245, 218, 205, 189, 175, 161, 149, 135, 121, 109, 95, 81, 69 e 55 do espectro do constituinte A de IGA-1, Figura 27, coincidiram com os dados registrados na literatura para a lupenona (XIAO *et al.* 2009). O espectro de massas do constituinte correspondente ao pico B do cromatograma de IGA-1 apresentou pico do íon molecular em 426 e um padrão de fragmentação com picos em m/z : 411, 231, 218, 204 e 191, Figura 28, condizentes com registros da literatura para friedelina (SILVA, 2007).

Figura 25 - Estrutura da Lupenona (IGA-1).

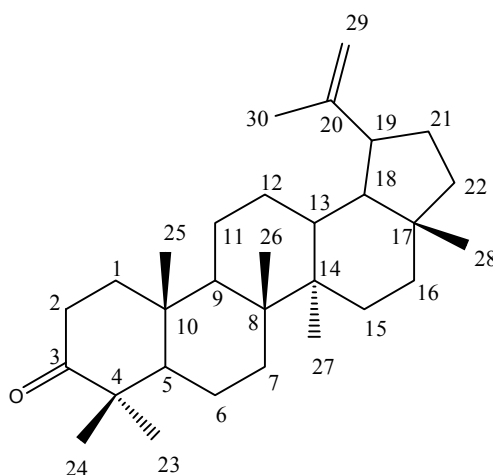


Figura 26 - Estrutura da Friedelina (IGA-1).

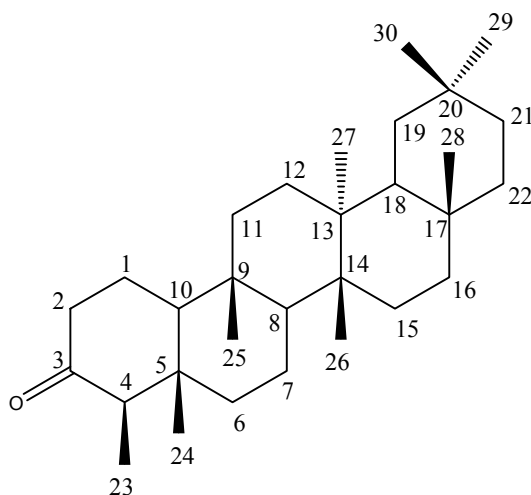
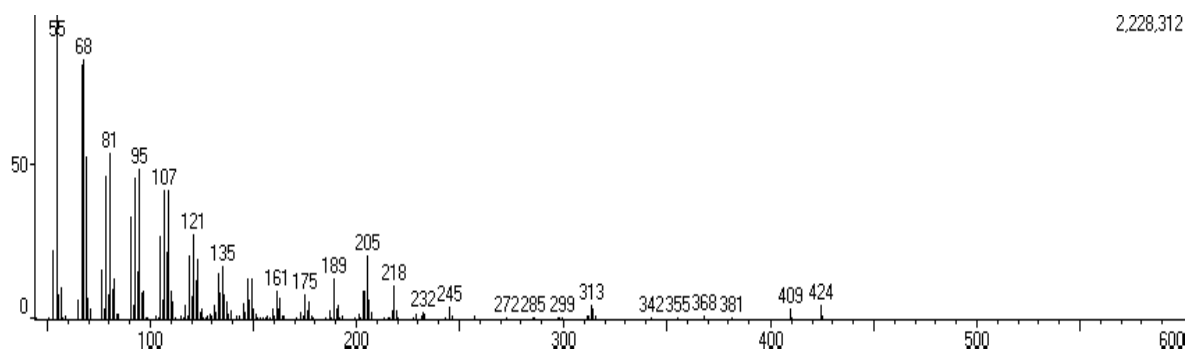
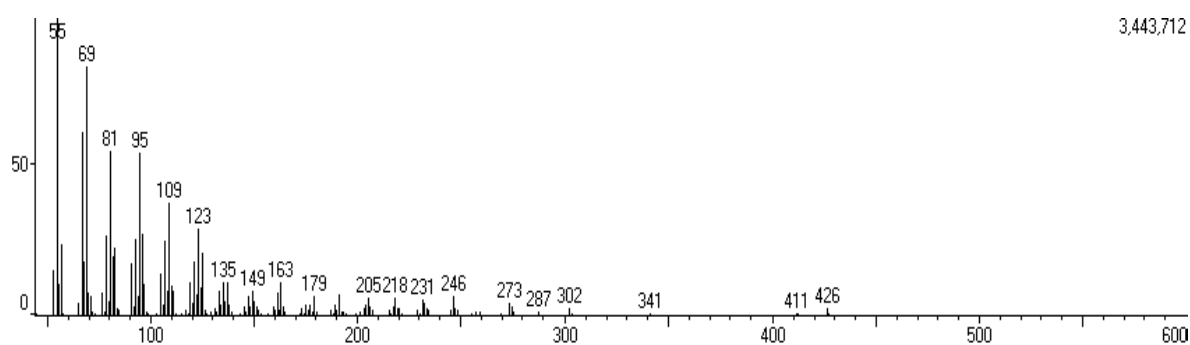
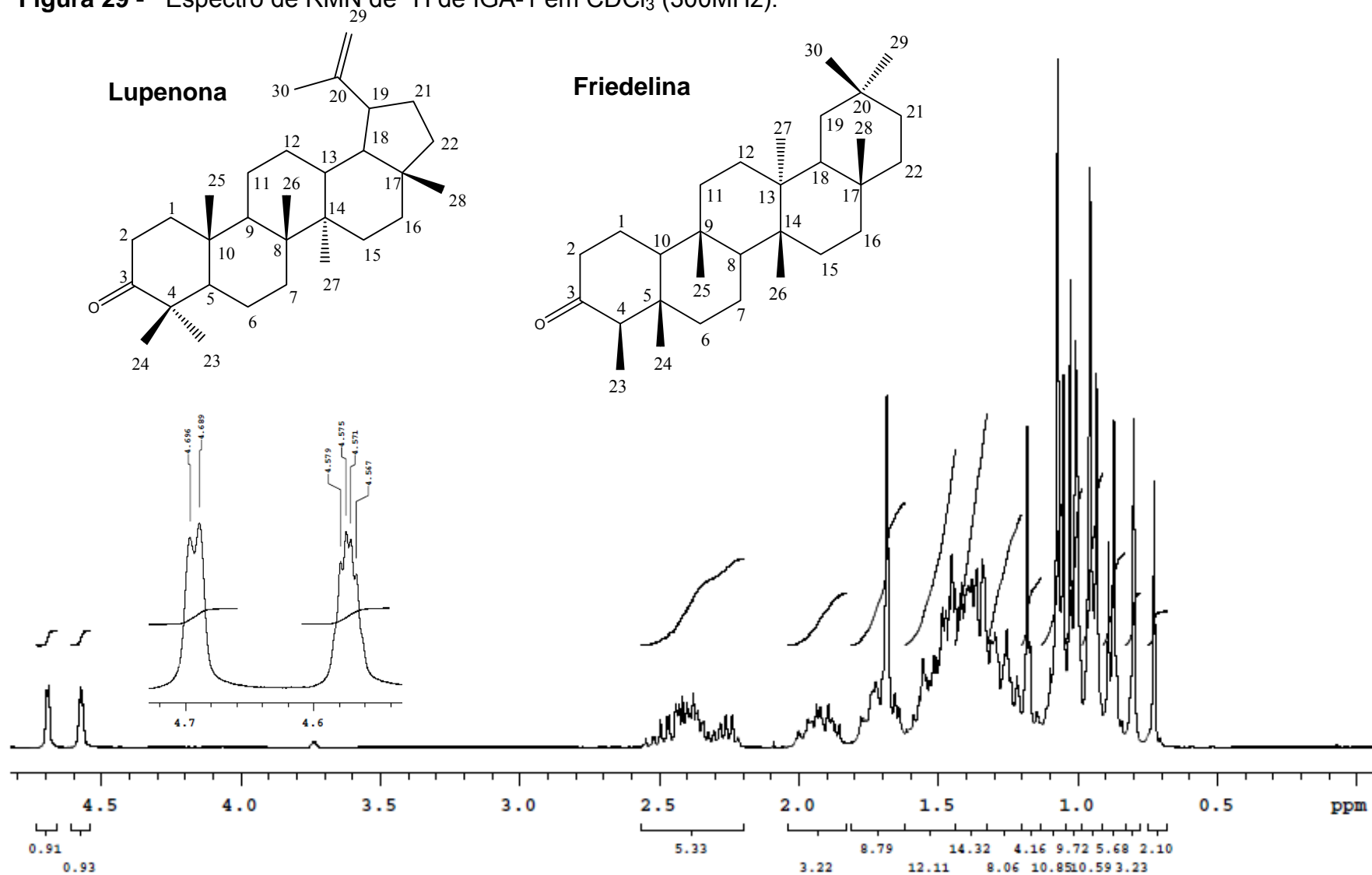


Figura 27 – Espectro de massas do pico A de IGA-1.**Figura 28** – Espectro de massas do pico B de IGA-1.

O espectro de RMN de ^1H , Figura 29, também foi compatível com as estruturas das moléculas propostas, apresentando singletos entre δH 0,7 e 1,7 referentes a grupos metilas, metilênicos e metínicos da lupenona e da friedelina. Os dois sinais em δH 4,57 (*dd*, $J = 2,4$ e $1,2\text{Hz}$) e 4,68 (*d*, $J = 2,1\text{Hz}$) foram atribuídos aos dois hidrogênios olefínicos pertencentes à lupenona e os dois multipletos entre δH 2,2 e 2,5 foram atribuídos aos hidrogênios α -carbonílicos da lupenona e friedelina.

Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-1 em CDCl_3 (300MHz).



O espectro de RMN de ^{13}C , Figura 30, confirmou a presença de 60 carbonos dos dois triterpenos, apresentando sinais em δC 218,4, atribuído ao carbono carbonílico e os sinais em δC 151,1 e 109,6 atribuídos, respectivamente, aos carbonos da ligação dupla nas posições (C-20) e (C-29) da molécula da lupenona. O sinal em δC 213,5 foi atribuído à carbonila da friedelina. Os demais sinais também foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos da lupenona, (Tabela 19) e da friedelina (Tabela 20) registrados na literatura (SILVA, 2007; LUZ *et al.*, 2010 e TREVISAN, 2010).

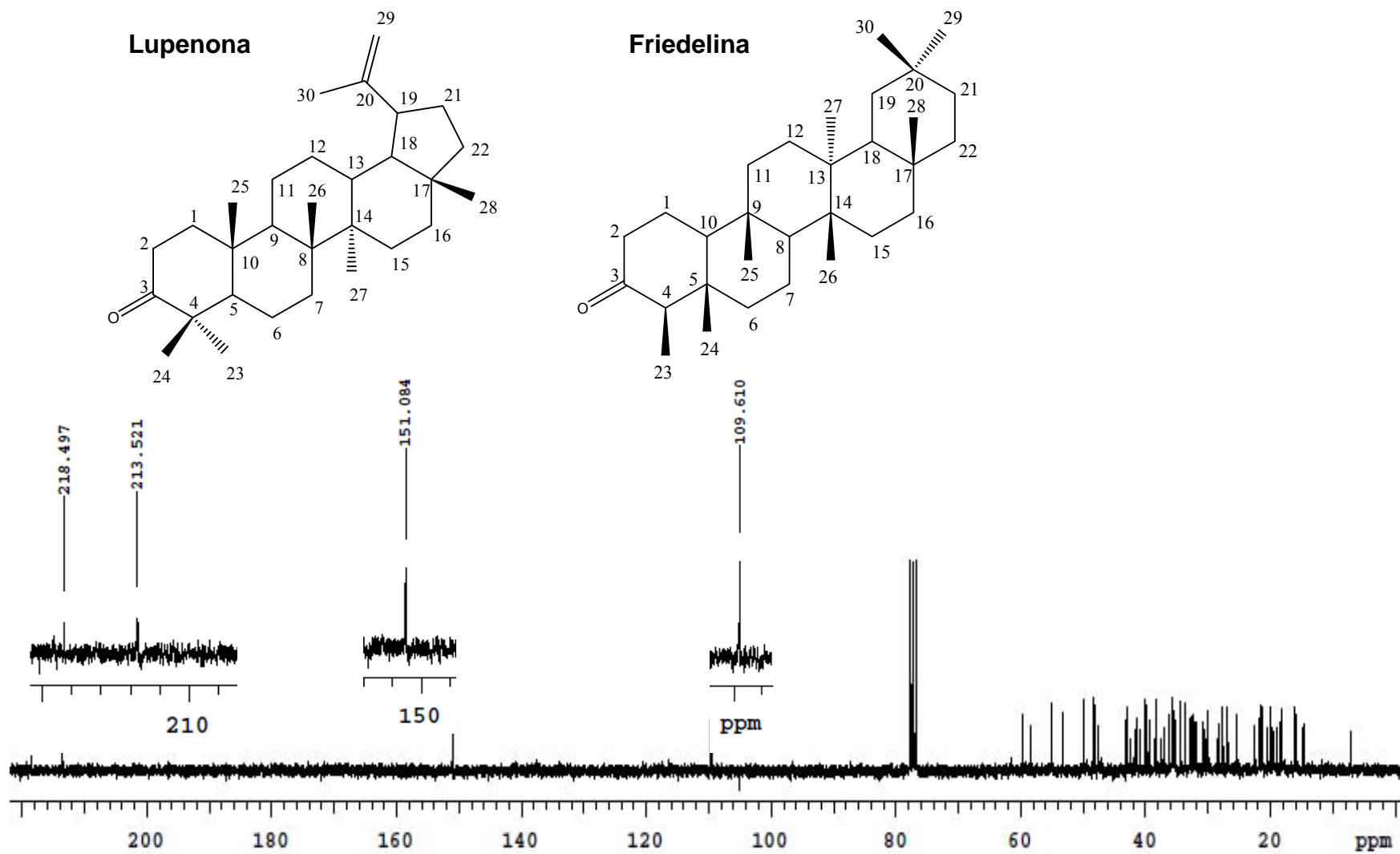
Tabela 19 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IGA-1 comparados com a literatura

Carbono (n)	IGA-1 ^{13}C	Lupenona ^{13}C	Lupenona ^{13}C
	CDCl_3	(SILVA, 2007) CDCl_3	(LUZ, <i>et al.</i> 2010) CDCl_3
C1	39,8	39,6	39,5
C2	34,3	34,1	34,1
C3	218,4	218,1	218,5
C4	47,5	47,3	47,3
C5	55,1	54,9	54,8
C6	19,8	19,7	19,6
C7	33,7	33,5	33,5
C8	40,9	40,8	40,7
C9	49,9	49,8	49,7
C10	37,0	36,9	36,8
C11	21,6	21,4	21,4
C12	25,3	25,1	25,1
C13	38,3	37,4	38,1
C14	43,0	42,8	42,9
C15	27,6	27,4	27,4
C16	36,1	35,5	35,4
C17	43,1	43,0	42,9
C18	48,4	48,2	48,2
C19	48,1	47,9	47,9
C20	151,1	154,8	150,8
C21	30,0	29,8	29,8
C22	40,1	39,9	39,9
C23	26,8	26,6	26,6
C24	21,2	21,0	21,0
C25	16,1	15,9	15,7
C26	15,9	15,8	15,9
C27	14,8	14,5	14,4
C28	18,2	18,0	17,9
C29	109,6	109,4	109,3
C30	19,5	19,3	19,3

Tabela 20 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IGA-1 comparados com valores da literatura

Carbono (n)	IGA-1 ^{13}C CDCl_3	Friedelina ^{13}C (SILVA, 2007) CDCl_3	Friedelina ^{13}C (TREVISAN, 2010) CDCl_3
C1	22,4	22,2	22,3
C2	41,7	41,5	41,5
C3	213,5	213,3	213,0
C4	58,4	58,2	58,2
C5	42,9	42,1	42,1
C6	41,4	41,2	41,3
C7	18,4	18,2	18,6
C8	53,2	53,0	53,1
C9	37,6	37,4	37,4
C10	59,6	59,4	59,5
C11	35,7	35,6	35,0
C12	30,7	30,5	32,4
C13	39,8	39,6	38,3
C14	38,4	38,2	39,2
C15	32,6	32,4	30,5
C16	35,8	35,9	36,0
C17	30,1	29,9	29,7
C18	42,3	42,7	42,8
C19	35,5	35,3	35,6
C20	28,3	28,1	28,2
C21	32,9	32,7	32,8
C22	39,4	39,2	39,2
C23	7,0	6,8	6,8
C24	14,6	14,6	14,6
C25	18,1	17,9	17,9
C26	20,4	20,2	20,2
C27	18,8	18,6	18,3
C28	32,2	32,0	32,1
C29	35,2	35,0	31,8
C30	31,9	31,7	35,3

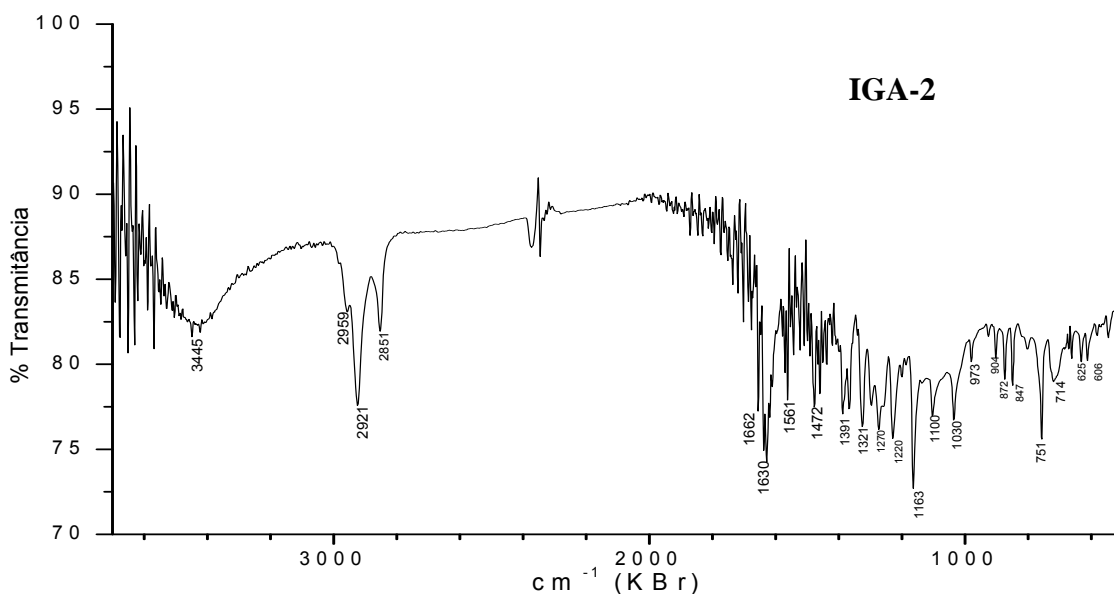
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-1 em CDCl_3 (75MHz).



V.1.2.2 IGA-2

IGA-2 consistiu de um sólido amarelo, cujo espectro de infravermelho, Figura 31, apresentou bandas de absorção em 1472 e 1561 cm^{-1} , características de sistema aromático, o qual foi confirmado pelos sinais na região δH 6,62 a 7,56 do espectro de RMN de ^1H (Figura 32). O espectro de infravermelho apresentou ainda bandas em 3445 cm^{-1} (ν O-H) e 1100 cm^{-1} (ν C-O), indicativas da presença de grupo hidroxila. As bandas de absorção em 1662 e 1630 cm^{-1} indicaram a presença de duas carbonilas conjugadas. Os singletos em δH 12,06 e 12,26 no espectro de RMN de ^1H , Figura 32, confirmaram a existência de duas hidroxilas queladas a grupo carbonila. No espectro de RMN de ^{13}C , Figura 34, os sinais em δC 191,0 e 182,3 confirmaram a presença de duas carbonilas, sendo que somente uma delas, a de maior deslocamento químico, encontra-se quelada a grupo hidroxila, sugerindo a estrutura de uma antraquinona (1,8 dihidroxiantraquinona) (CANAVIRI; BERGQUIST e VILA, 2006; ABU-GABAL e AL SAIGH, 2008; CHU, SUN e LIU, 2005). Partindo deste princípio, a banda de absorção no infravermelho do grupo carbonila de valor mais baixo, 1630 cm^{-1} , foi atribuída à carbonila quelada ao grupo hidroxila.

Figura 31 - Espectro no infravermelho de IGA-2.



O espectro de RMN de ^1H , Figura 32, evidenciou também a existência de dois substituintes: Um grupo metila, caracterizado pelo singlete em δH 2,38 (3H) e um grupo metoxila evidenciado pelo singlete em δH 3,87 (3H). A posição do grupo metila foi estabelecida em C-3 devido à observação do acoplamento a longa distância (Figura 33) dos hidrogênios metílicos com H-2 e H-4, acoplamento este evidenciado pelo alargamento dos sinais em δH 7,01 (*dl*, 1H) e 7,56 (*dl*, 1H), atribuídos a H-2 e H-4, respectivamente. A relação *meta* entre os hidrogênios no outro anel aromático do núcleo antraquinônico, evidenciada pelos sinais em δH 6,62 (H-7, *d*, 1H, *J* 2,7 Hz) e 7,30 (H-5, *d*, 1H, *J* 2,4 Hz) (Figura 33), permitiu estabelecer a posição do grupo metoxila em C-6.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-2 em CDCl_3 (300MHz).

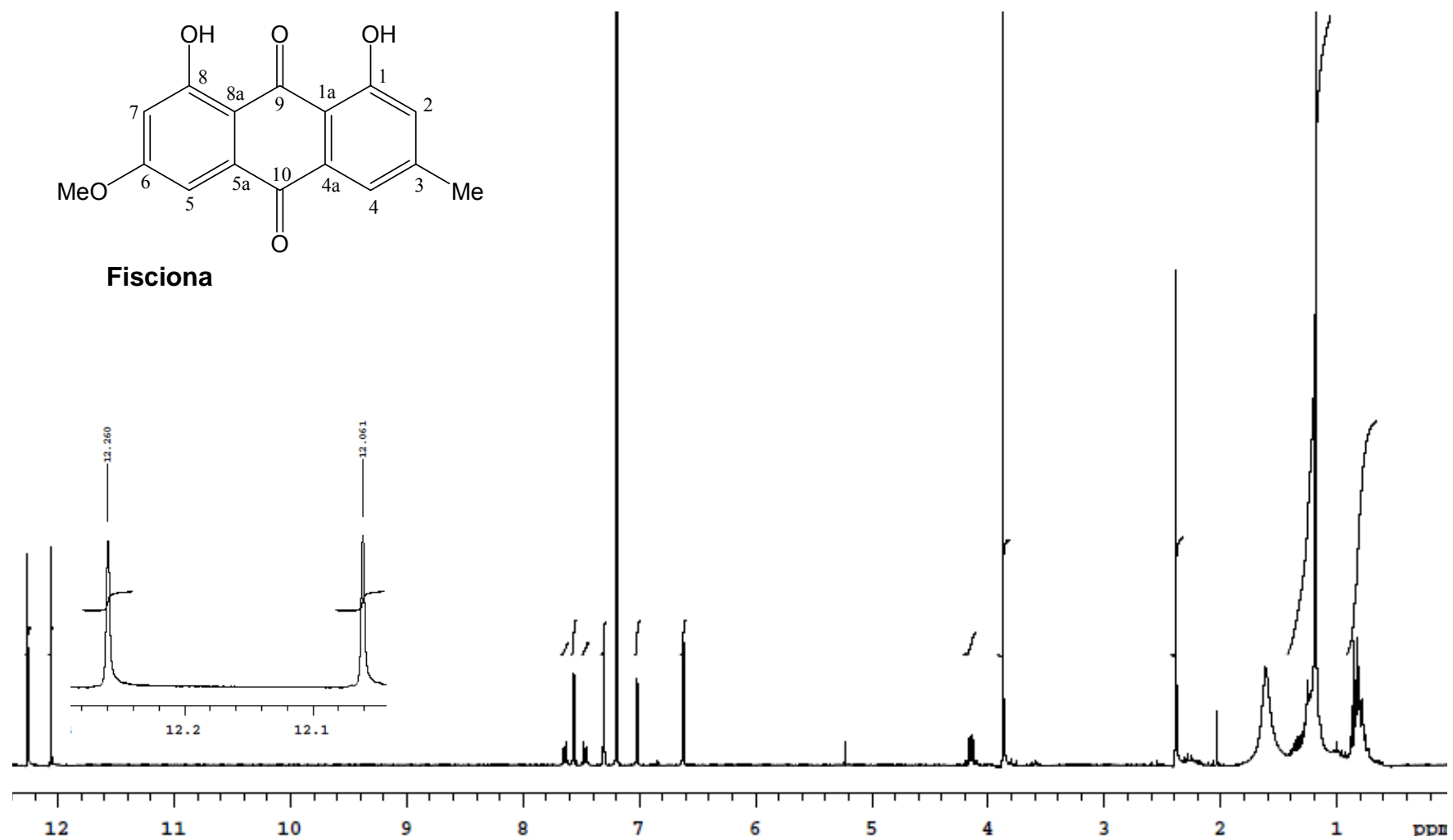


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-2 em CDCl_3 (300MHz) expandido.

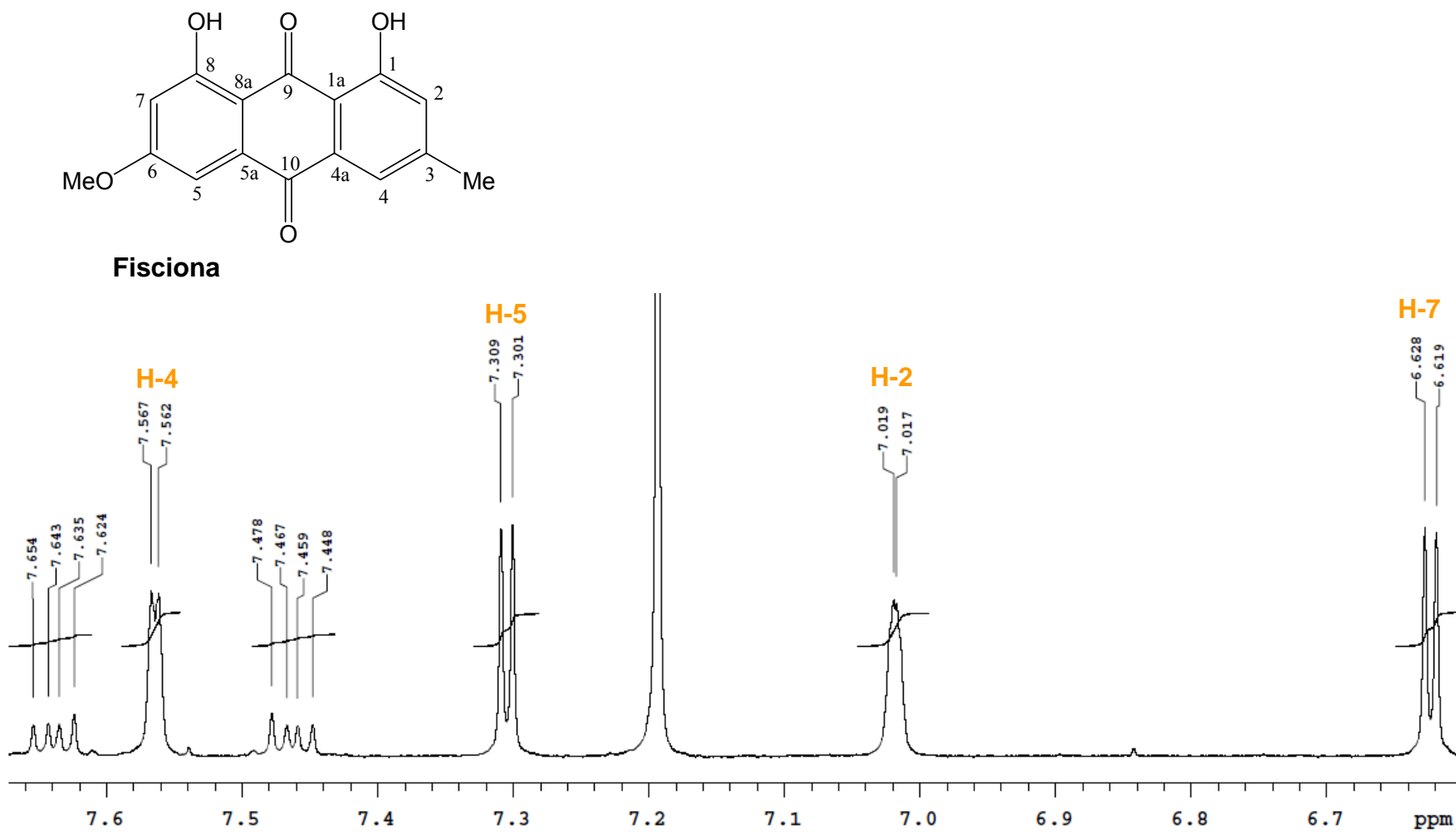
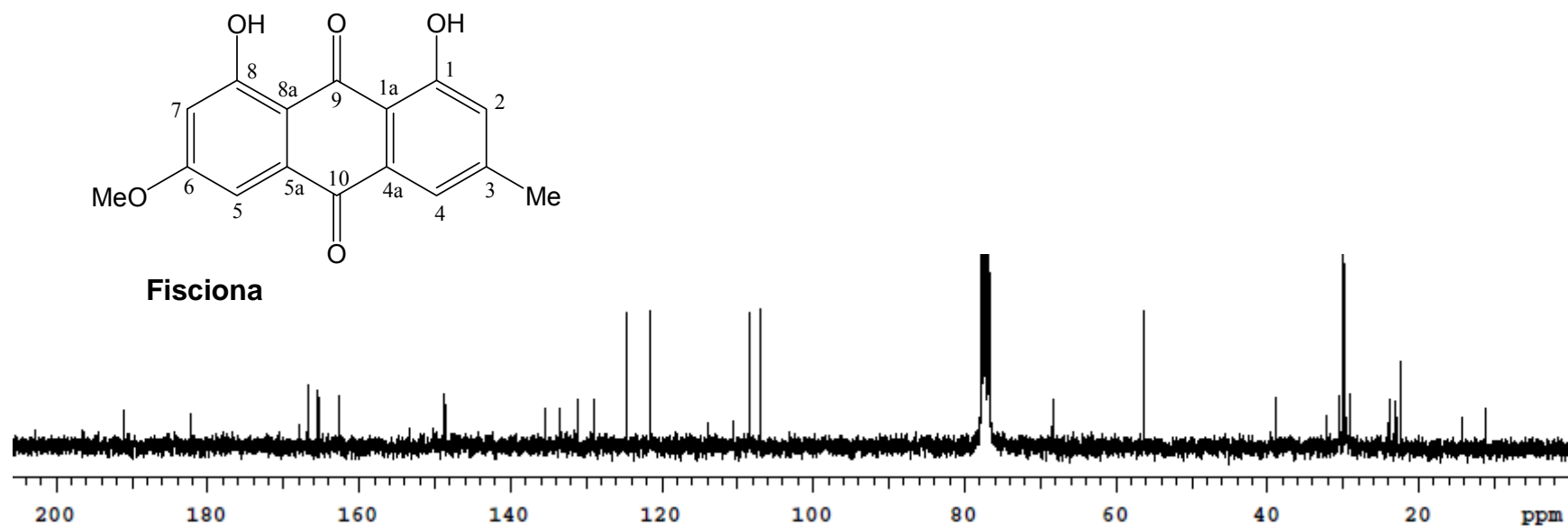


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-2 em CDCl_3 , (300MHz).

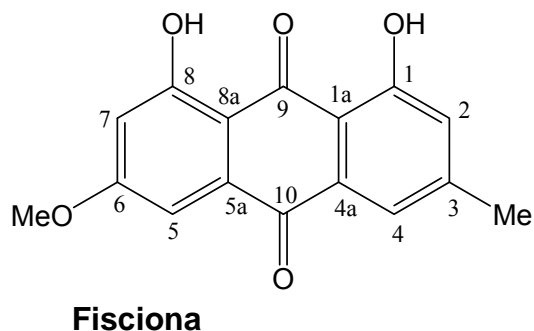


Os dados apresentados indicaram, portanto, para IGA-2 a estrutura da 1,8-diidroxí-3-metil-6-metoxiantraquinona, conhecida como fisciona (Figura 35), o que foi confirmado pela análise do espectro de RMN de ^{13}C . Os dados dos espectros foram comparados aos dados apresentados por Chu, Sun e Liu, (2005) e Canaviri; Bergquist e Vila (2006), onde se observou uma grande divergência entre os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos, C-1; C-2; C-4; C-6; C-4a; C-5a; C-8a e C-1a, conforme Tabela 21. Entretanto, as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos de IGA-2 foram baseadas nos dados obtidos por Canaviri, Bergquist e Vila (2006), devido a confirmação dos dados dessa referência ter sido baseadas em experimentos 2D COSY, HBMC e HMQC. A estrutura da substância foi confirmada definitivamente através de sua comparação com amostra autêntica de fisciona em CCD.

Tabela 21 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IGA-2 comparados com a literatura

	IGA-2		Fisciona			
	^{13}C	^1H	(CANAVIRI; BERGQUIST e VILA, 2006)		(CHU, SUN e LIU, 2005)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C1	162,6	12,06 (s, 1H)	162,7	12,1 (s, 1H)	166,1	12,06 (s, 1H)
C2	124,7	7,01 (dl, 1H)	124,7	7,1 (d, 1H, J 2,0 Hz)	120,7	7,09 (s, 1H)
C3	148,6		148,7		148,0	
C4	121,5	7,56 (dl, 1H)	121,5	7,6 (d, 1H, J 2,0 Hz)	124,0	7,64 (s, 1H)
C5	108,4	7,30 (d, 1H, J 2,4 Hz)	108,4	7,4 (d, 1H, J 2,0 Hz)	107,8	7,32 (s, 1H),
C6	166,7		166,8		161,9	
C7	106,9	6,62 (d, 1H, J 2,7 Hz)	107,0	6,7 (d, 1H, J 2,0 Hz)	106,1	6,74 (s, 1H)
C8	165,3	12,26 (s, 1H)	165,4	12,3 (s, 1H)	164,7	12,19 (s, 1H)
C9	191,0		191,3		190,2	
C10	182,2		182,2		181,6	
C4a	133,4		132,2		134,7	
C8a	110,4		110,4		113,1	
C1a	113,8		113,9		110,2	
C5a	135,4		135,3		132,7	
O-Me	56,3	3,87 (s, 3H)	55,4	3,0 (s, 3H)	55,7	3,92 (s, 3H)
Me	22,3	2,38 (s, 3H)	21,7	1,8 (s, 3H)	21,7	2,42 (s, 3H)

Figura 35 - Estrutura da fisciona (IGA-2).



V.1.1.2.3 IGA-3

IGA-3 consistiu de um sólido branco, cujo teste de Liebermann-Burchard indicou tratar-se de triterpeno pentacíclico pelo desenvolvimento da coloração rósea avermelhada (MATOS, 1997). O espectro de massas de IGA-3, Figura 36, quando comparado com os espectros a biblioteca NIST foi semelhante ao do lupeol (3β -hidroxilup-20(29)-eno), Figura 37, apresentando pico do íon molecular em $m/z = 426$. O padrão de fragmentação do constituinte, com picos em m/z 315, 218, 207, 189, 175, 135, 95, 81 e 55, também foi compatível com os registros encontrados na literatura para o lupeol (XIAO *et al.*, 2009).

Figura 36 - Espectro de massas de IGA-3.

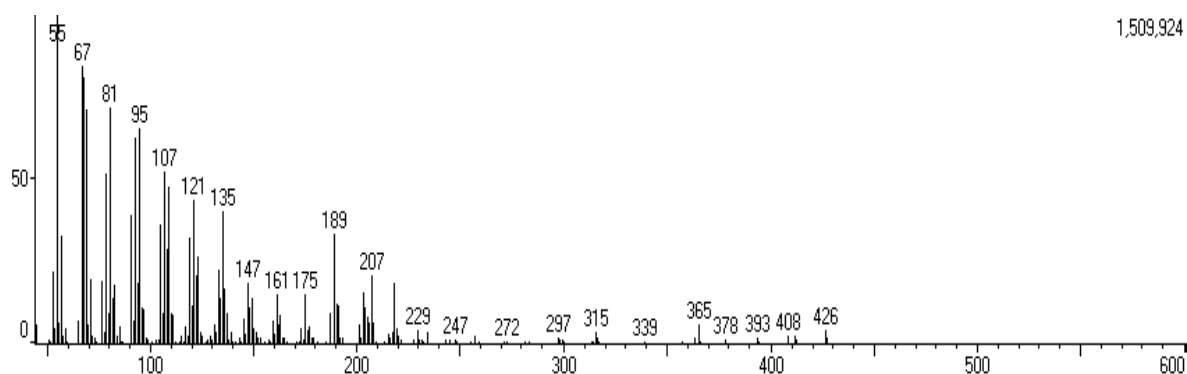
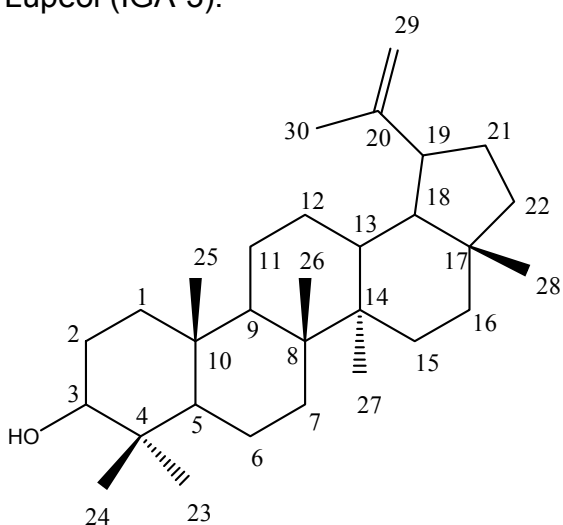
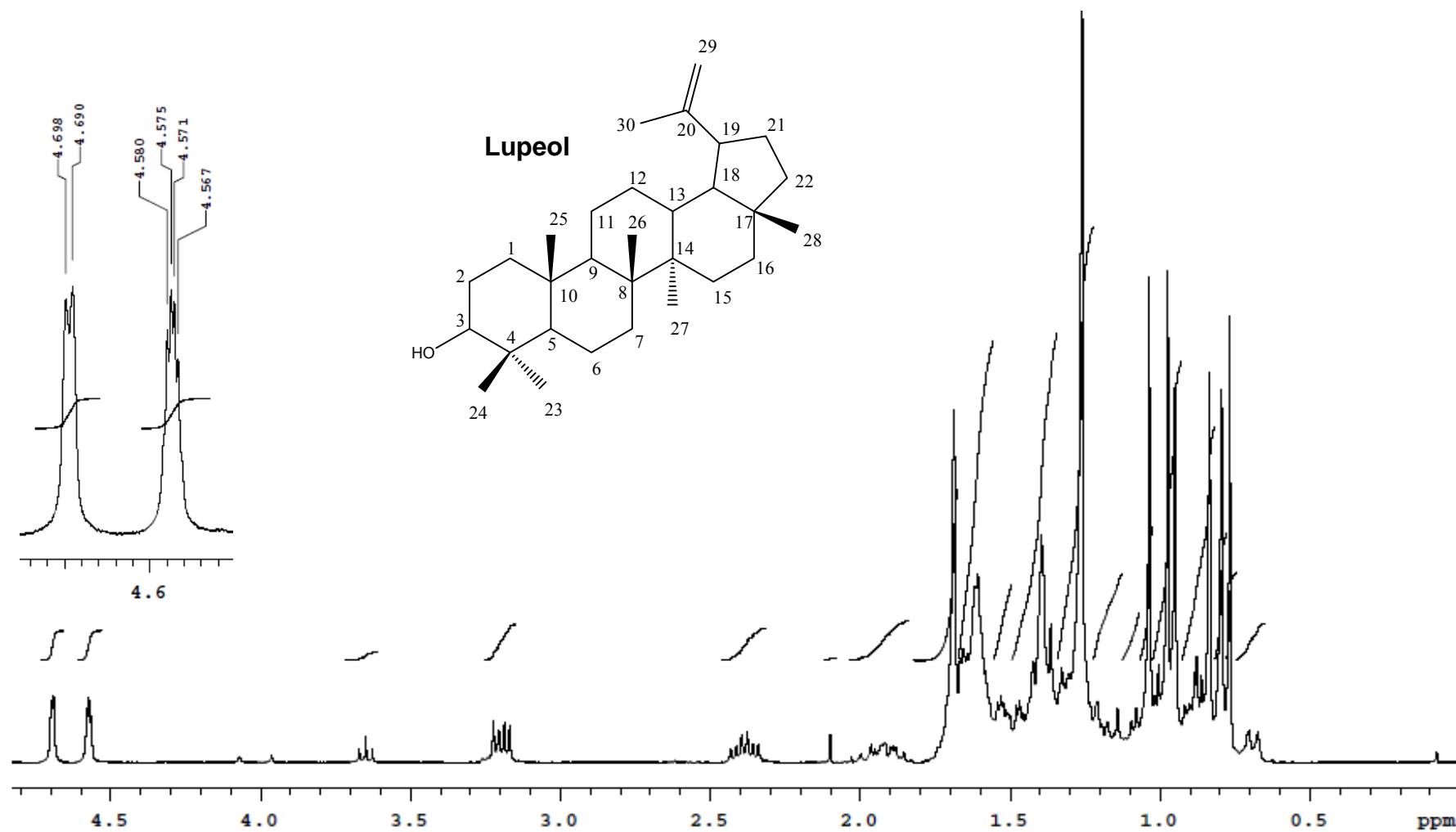


Figura 37 - Estrutura do Lupeol (IGA-3).

O espectro de RMN de ^1H , Figura 38, também foi compatível com a molécula proposta, apresentando dois sinais em δH 4,57 (sl) e 4,69 (sl) atribuídos aos hidrogênios metilênicos terminais em (C-29), sinal em δH 3,2 (dd, $J = 10,8$ e $5,1$) referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (C-3), além de vários sinais na região entre δH 0,7 e 1,8 correspondentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do triterpeno.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-3 em CDCl_3 (300MHz).

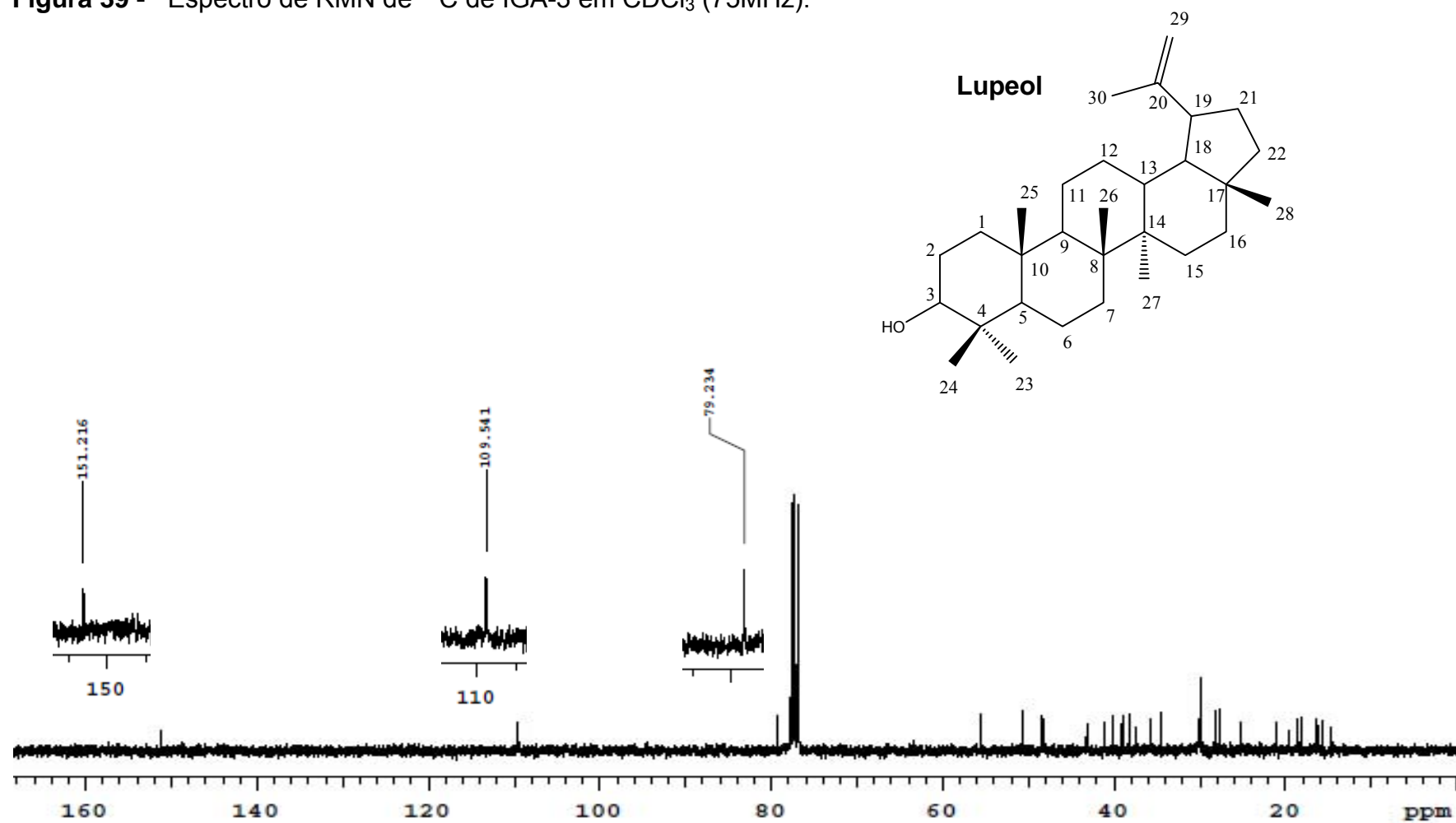


O espectro de RMN de ^{13}C , Figura 39, confirmou a presença de 30 carbonos, apresentando sinais em δC 79,2, atribuído ao carbono carbinólico e em δC 151,2 e 109,5, referentes aos carbonos da ligação dupla (C-20) e (C-29) respectivamente. Os demais sinais também foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos do lupeol registrados na literatura (Tabela 22).

Tabela 22 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IGA-3 comparados com os dados da literatura para o lupeol

Carbono (n)	IGA-3 ^{13}C	Lupeol ^{13}C	
	CDCl_3	(SOUZA, et. al., 2001) CDCl_3	(LUZ, et. al., 2010) CDCl_3
C1	38,9	38,7	38,6
C2	30,0	27,4	28,3
C3	79,2	78,9	79,0
C4	37,3	38,8	38,8
C5	55,4	55,3	55,2
C6	18,5	18,3	18,3
C7	34,4	34,2	34,2
C8	41,0	40,8	40,8
C9	50,6	50,4	50,4
C10	39,0	37,1	37,1
C11	21,1	20,9	20,9
C12	25,3	25,1	24,8
C13	38,2	38,0	38,0
C14	43,0	42,8	42,8
C15	27,6	27,4	27,3
C16	35,7	35,5	35,5
C17	43,2	43,0	43,0
C18	48,5	48,2	48,2
C19	48,2	47,9	48,0
C20	151,2	150,9	150,9
C21	29,9	29,8	29,8
C22	40,2	40,0	40,0
C23	28,1	28,0	27,9
C24	15,5	15,4	15,4
C25	16,3	16,1	16,1
C26	16,1	15,9	15,9
C27	14,7	14,5	14,5
C28	18,2	18,0	18,0
C29	109,5	109,3	109,3
C30	19,5	19,3	19,3

Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-3 em CDCl_3 (75MHz).



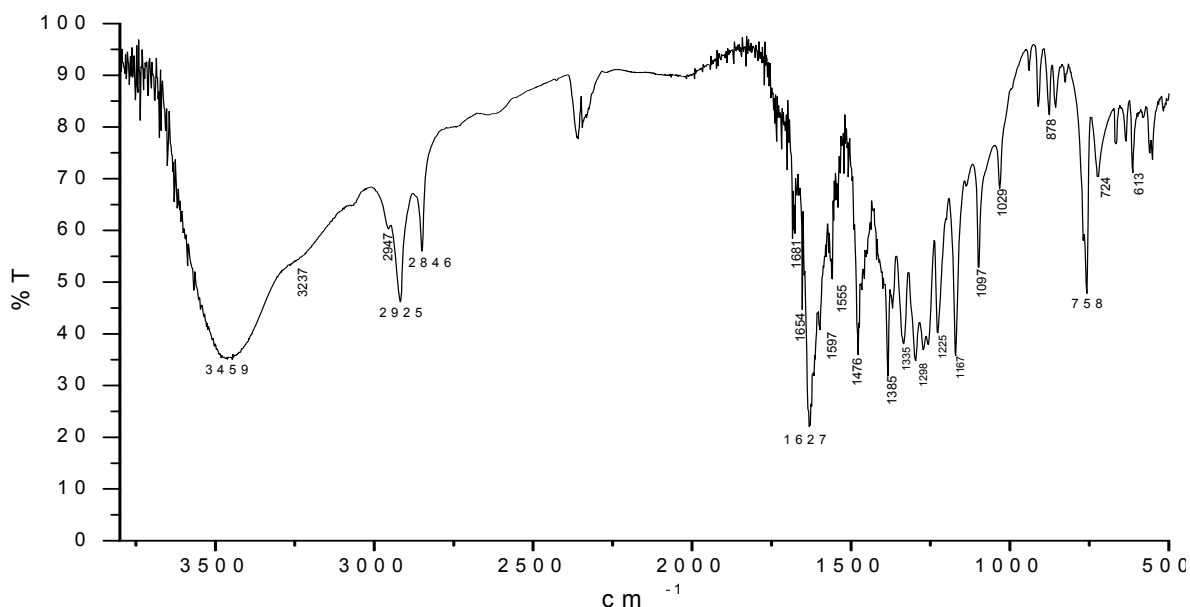
V.1.2.4 IGA-4

IGA-4, a partir da comparação por CCD revelada com solução de vanilina sulfúrica e dos dados de CG-EM e dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H , mostrou ser idêntico a IFA-1 identificado como estigmasterol, Figura 18.

V.1.2.5 IGA-5

IGA-5 consistiu de um sólido alaranjado, com ponto de fusão 254-256 °C, cujo espectro no infravermelho (Figura 40) apresentou bandas de absorção em 1654 e 1627 cm^{-1} , atribuíveis a duas carbonilas conjugadas, sugerindo tratar-se de uma antraquinona 1,8 diidroxilada. O núcleo antraquinônico foi indicado também pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C que apresentaram deslocamentos químicos em δH 12,04 e 12,09, correspondentes a duas hidroxilas queladas, e em δC 181,5 e 189,4, Figura 41, indicativos da presença de duas carbonilas.

Figura 40 - Espectro no infravermelho de IGA-5.



O espectro de RMN de ^1H , Figura 42, apresentou aspecto semelhante ao da fisiona, IGA-2, a não ser pela ausência do sinal referente ao grupo metoxila em δH 3,87. O espectro indicou a presença de dois substituintes no esqueleto 1,8-diidroxiantraquinônico através dos quatro dupletos referentes a hidrogênios em posições relativas *meta* (Figura 43 e Tabela 23). Como verificado no

espectro da fisiona, observa-se um alargamento dos dupletos referentes a H-2 e H-4, indicando o acoplamento a longa distância destes hidrogênios com o grupo metila em C-3. Estes acoplamentos foram comprovados inequivocamente pelas correlações de H-2 e H-4 com os hidrogênios metílicos observadas no experimento 2D COSY conforme apresentado na Figura 44 e Tabela 24. Estes resultados permitiram corrigir, portanto, os dados relatados por Chu; Sun e Liu (2005) e Cohen e Towers (1995) que atribuíram valores de deslocamentos invertidos para H-2 e H-5 em relação aos encontrados neste trabalho e por Santos, Silva e Braz (2008), como mostrado na Tabela 23. O experimento 2D confirmou também o acoplamento entre H-5 e H-7. Um dos substituintes, portanto, foi identificado como grupo metila pelo singlete em δ H 2,4, enquanto o substituinte em C-6 seria um grupo hidroxila, cujo sinal de hidrogênio não foi detectado no espectro.

Através das correlações do experimento de HSQC foi possível confirmar os valores de deslocamentos químicos para os carbonos C-2, C-4, C-5 e C-7, conforme Figura 45 e Tabela 24. O experimento de HMBC, Figura 46, evidenciou o acoplamento entre H-2 e C-1 (2J), o que possibilitou atribuir inequivocamente o valor de δ C 161,3 ao carbono C-1. Os deslocamentos químicos dos carbonos C-6 e C-8 foram atribuídos com base no observado por Cohen e Towers (1995), pois, no espectro de HMBC de IGA-5 só foi observada uma correlação de H-7 com um dos carbonos hidroxilados (C-6 ou C-8), e o espectro não apresentou a correlação entre H-5 e C-6. Portanto, foi atribuído o valor de deslocamento químico de δ C 164,4 a C-8 de IGA-5. Estes dados permitiram identificar o equívoco de Chu; Sun e Liu (2005) nas atribuições dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-4 e C-6.

Os dados apresentados indicaram para IGA-5 a estrutura da 1,6,8-triidroxi-3-metilantraquinona (Figura 47), o que foi confirmado pela comparação com amostra autêntica de emodina em cromatografia de camada delgada.

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C de IGA-5 em DMSO (75MHz)

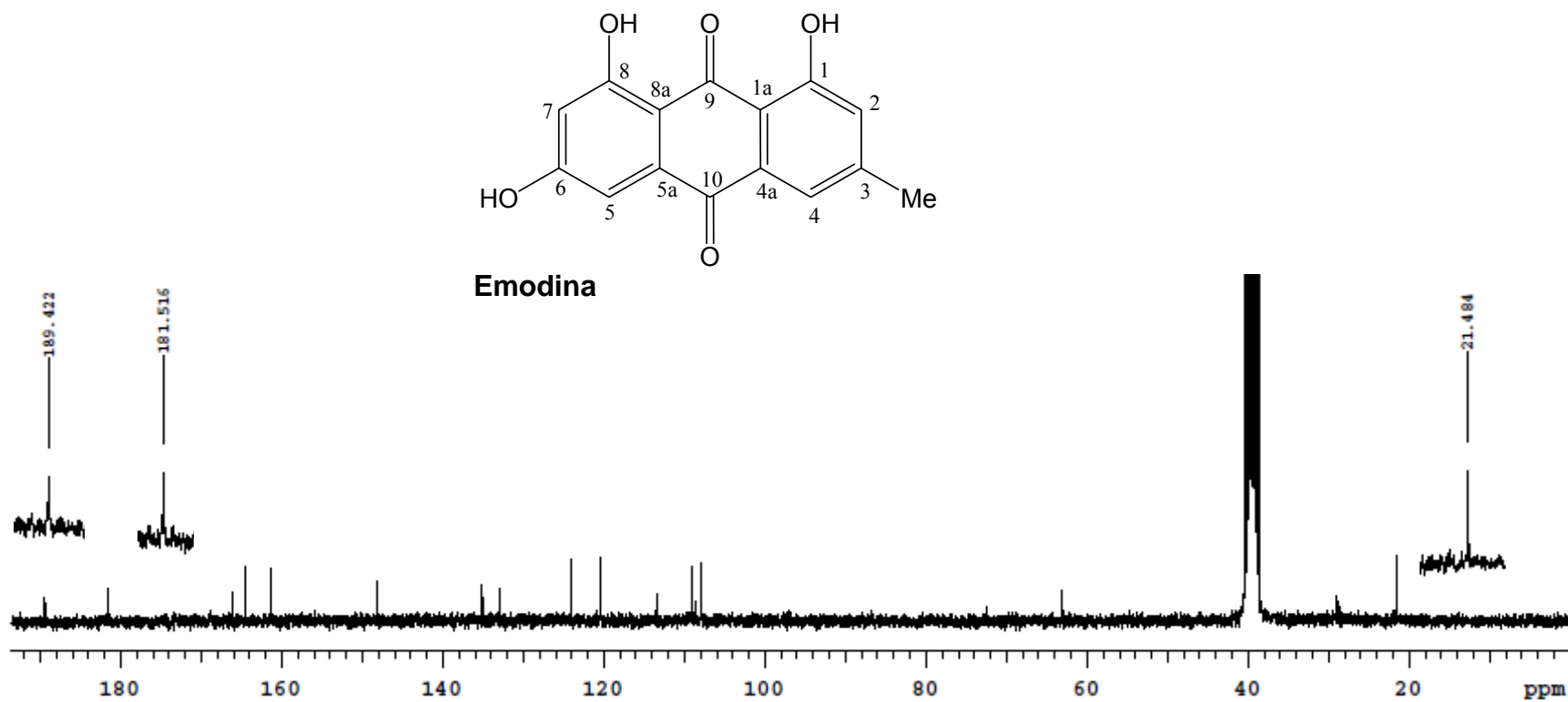


Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-5 em DMSO (300MHz).

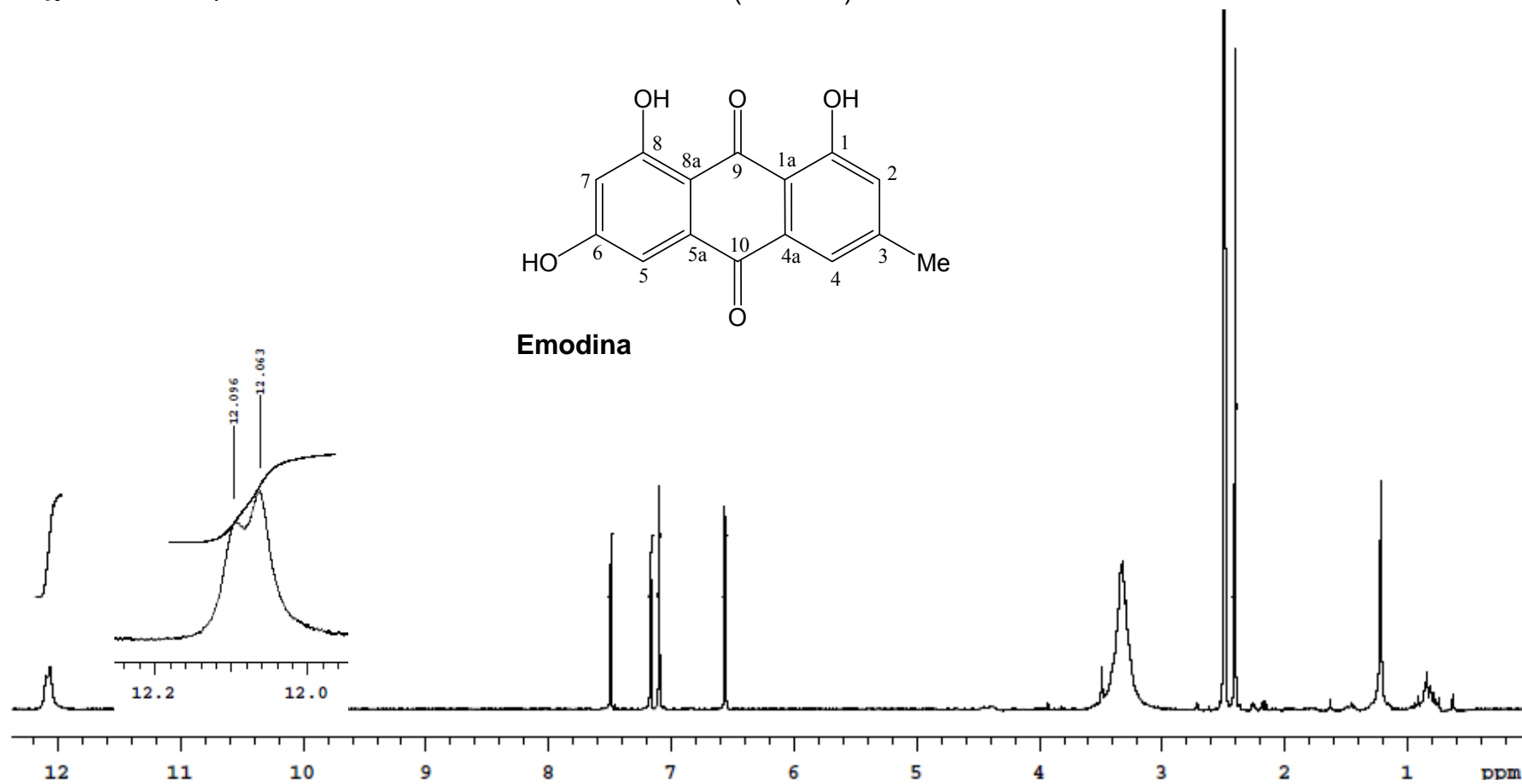


Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido.

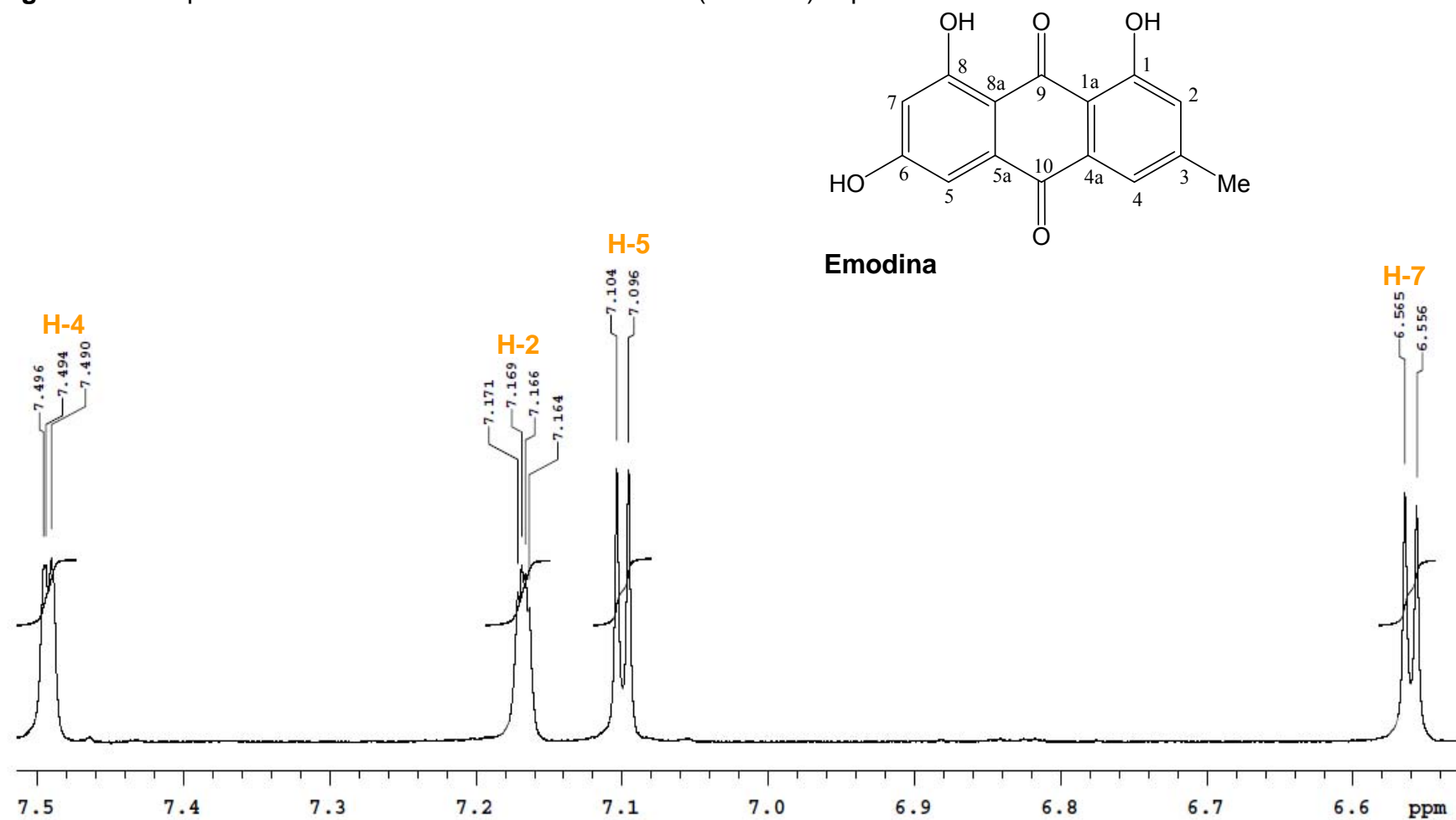


Figura 44 - Espectro no 2D COSY de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido.

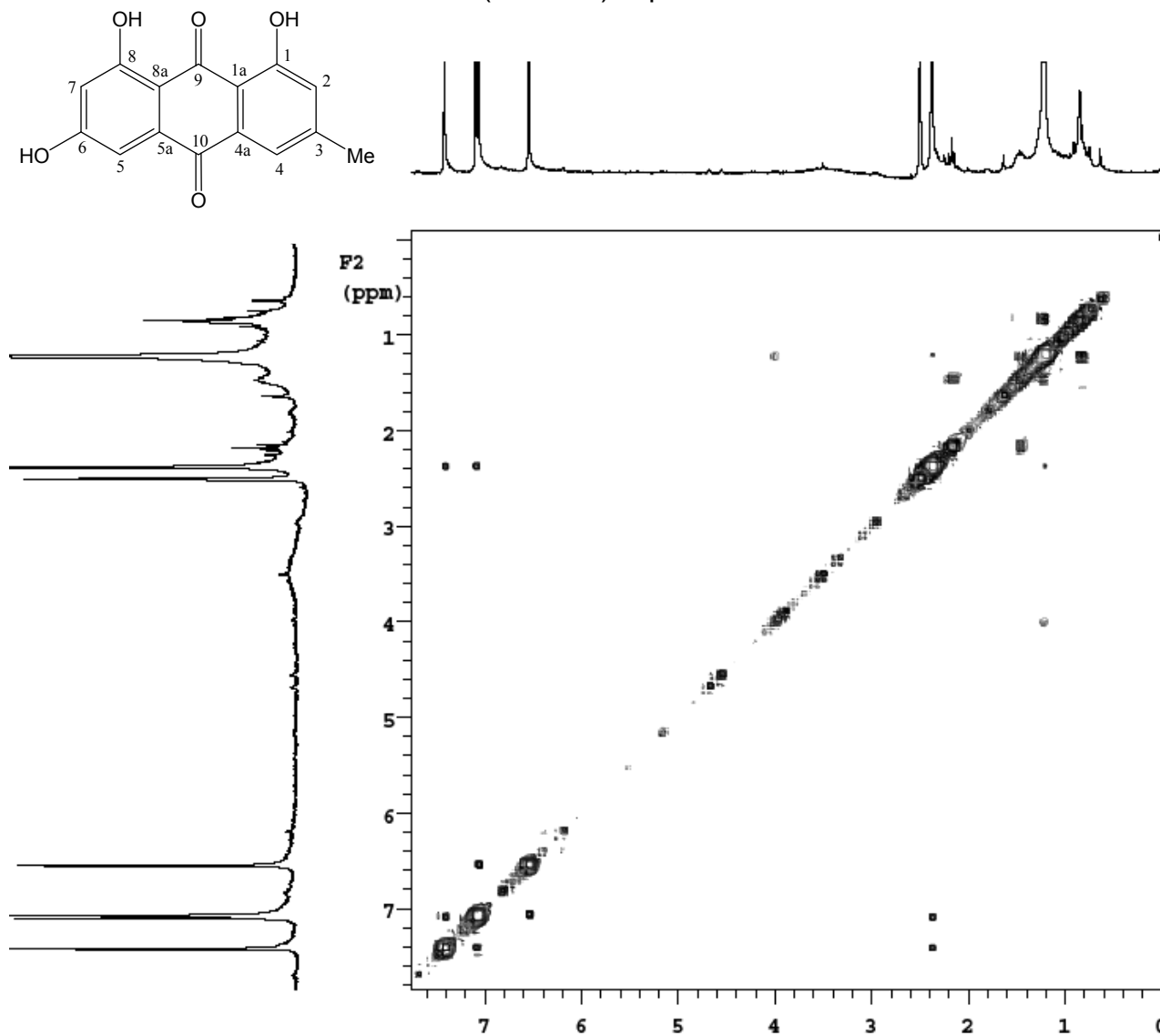


Figura 45 - Espectro no 2D HSQC de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido.

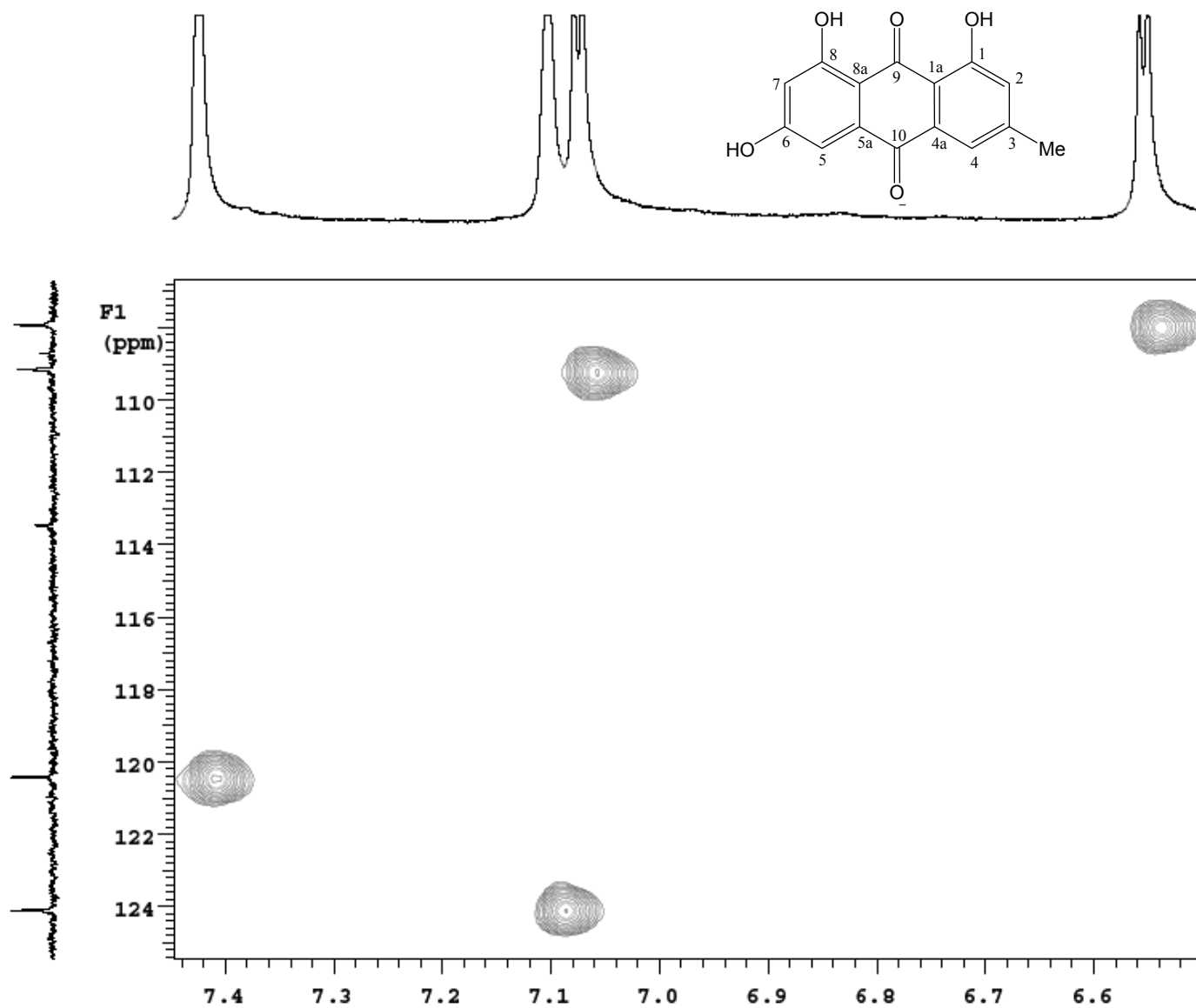


Figura 46 - Espectro no 2D HMBC de IGA-5 em DMSO (300MHz) expandido.

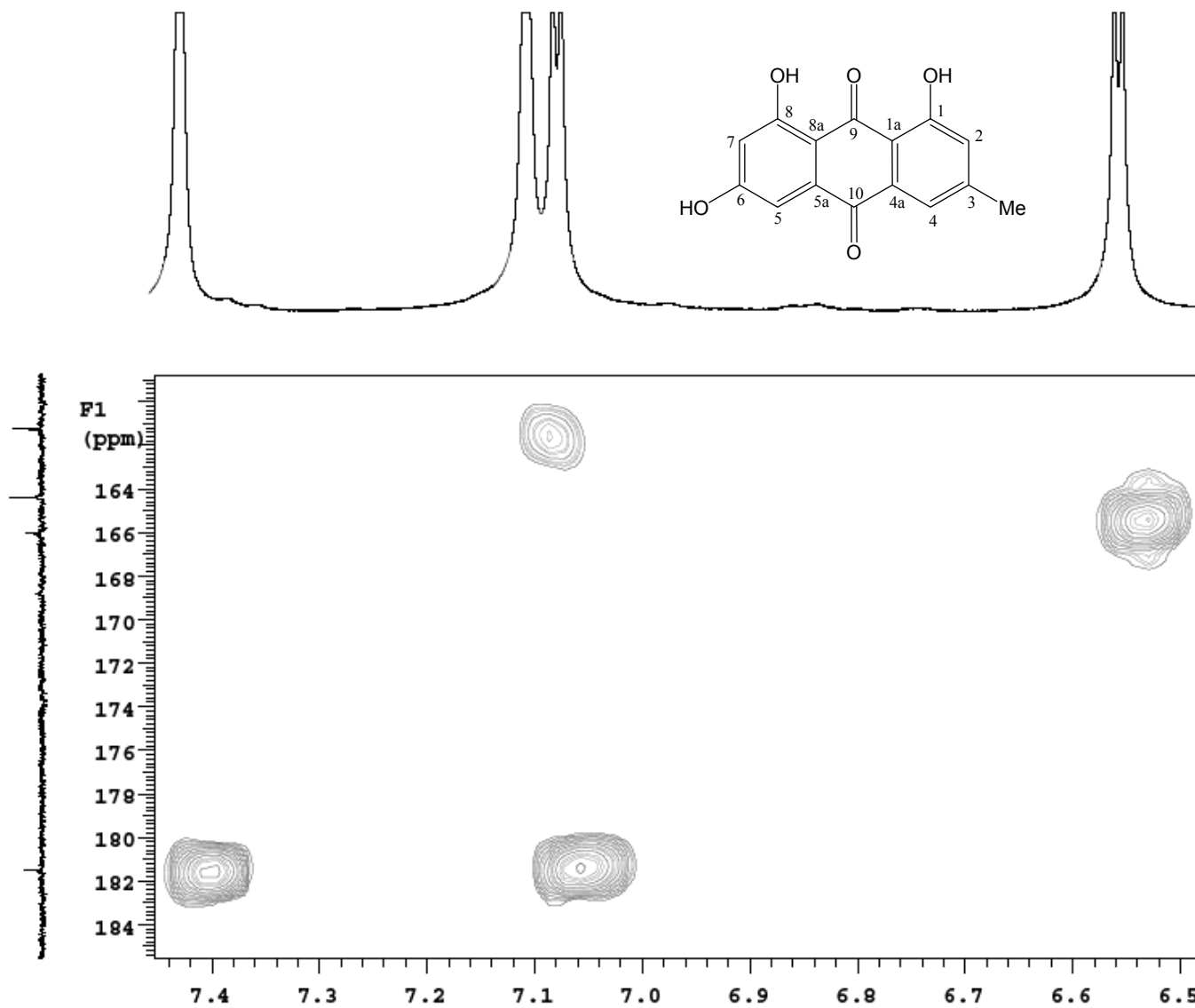
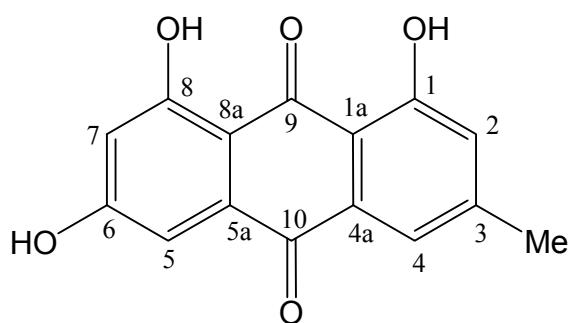


Tabela 23 - Deslocamentos de RMN ^{13}C de IGA-5 comparados com a literatura

	IGA-5		Emodina					
	^{13}C	^1H	(SANTOS, SILVA e BRAZ FILHO, 2008)		(CHU; SUN e LIU, 2005)		(COHEN e TOWERS, 1995)	
			^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
C1	161,3	12,06 (s, 1H)			164,4	11,96 (s, 1H)	161,9	
C2	124,0	7,17 (dd, 1H, <i>J</i> 1,5 e 0,6 Hz)	124,1	7,18	120,4	7,07 (s, 1H)	124,8	7,19 (s, 1H)
C3	148,1				148,2		149,3	
C4	120,4	7,49 (dd, 1H, <i>J</i> 1,5 e 0,6)	120,4	7,51	124,0	7,42 (s, 1H)	121,2	7,57 (s, 1H)
C5	109,1	7,10 (d, 1H, <i>J</i> 2,4 Hz)	108,7	7,13	108,8	7,11 (s, 1H)	109,7	7,26 (d, 1H, <i>J</i> 2,5 Hz)
C6	166,1				161,4		167,0	
C7	107,9	6,54 (d, 1H, <i>J</i> 2,4 Hz)	107,9	6,60	107,9	6,56 (s, 1H)	108,6	6,69 (d, 1H, <i>J</i> 2,5 Hz)
C8	164,4	12,09 (s, 1H)			165,6	12,04 (s, 1H)	165,9	
C9	189,4				189,6		191,9	
C10	181,5				181,2		182,2	
C4a	132,8				132,7		134,0	
C8a	108,6				108,7		110,0	
C1a	113,4				113,3		114,4	
C5a	135,0				135,0		136,6	
Me	21,4	2,40 (s, 3H)	21,4	2,42 (s, 3H)	21,5	2,38 (s, 3H)	21,8	2,48 (s, 3H)

Tabela 24 - Correlações observadas no experimento 2D COSY de IGA-5

Próton	COSY H-H	HSQC	HMBC
H-2	H-4	C-2	C-1a; C-1; C-4; C-Me
H-4	H-2	C-4	C-1a; C-2; C-10; C-Me
H-5	H-7	C-5	C-5; C-7; C-10
H-7	H-5	C-7	C-5; C-8

Figura 47 - Estrutura da Emodina (IGA-5).

V.2 ESTUDO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Durante o metabolismo normal em células aeróbicas, moléculas de oxigênio, embora indispensáveis para a produção de energia, geram espécies reativas incluindo radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}), óxido nítrico (NO), radical lipídico (L^{\bullet}) entre outros. Estes subprodutos da redução de oxigênio à água nas mitocôndrias estão presentes no processo de fagocitose, realizado por células do sangue, contra vírus e bactérias, entre outras funções importantes para o organismo, sendo esta a origem endógena de espécies reativas (PEREIRA, 2009).

Há ainda as fontes exógenas de espécies reativas, que incluem a exposição a radiações ionizantes e não-ionizantes (radiação UV), poluição atmosférica, cigarro, fármacos, uma grande variedade de xenobióticos com atividade pró-oxidante (toxinas, pesticidas, herbicidas entre outros), infecções microbianas e os alimentos (PEREIRA, 2009).

O acúmulo de espécies reativas, geradas pelo organismo como subproduto de suas reações, pode danificar proteínas, carboidratos, ácidos graxos poliinsaturados, e DNA, levando ao estresse oxidativo que pode provocar envelhecimento precoce e doenças degenerativas como as apresentadas na Tabela 25 (SORG, 2004; PEREIRA, 2009).

Tabela 25 - Doenças associadas ao estresse oxidativo

Alvo	Patologias
Trato gastrointestinal	Diabetes; Pancreatite; Dano hepático
Cérebro e Sistema Nervoso	Doença de Parkinson; Doença de Alzheimer; Hipertensão; Esclerose múltipla
Coração e vasos sanguíneos	Aterosclerose; Trombose coronária
Pulmão	Asma; Enfisema pulmonar
Olho	Cataratas; Retinopatia
Articulações	Artrite reumatóide
Rim	Glomerulonefrite
Pele	Manchas de envelhecimento; Rugas
Diversos	Envelhecimento; Cancro; Doenças auto-imunes; Estados inflamatórios; SIDA; Lupus.

Fonte: SORG, 2004.

Antioxidantes presentes em frutas e espécies vegetais desempenham um papel fundamental no sistema de proteção do organismo contra

espécies oxidantes, exercendo efeito protetor quando presentes ou adicionados a alimentos, preservando suas qualidades organolépticas e nutricionais e prolongando o seu prazo de validade (PEREIRA, 2009).

Os antioxidantes de origem natural são compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundários de plantas que neutralizam ou seqüestram os radicais livres originando substâncias relativamente estáveis, devido ressonância do anel aromático presente nessas substâncias (CHUN et. al., 2005). Neste contexto, observa-se um interesse crescente na descoberta de novos antioxidantes naturais que possam substituir os de origem sintética, pois estes podem apresentar alguma toxicidade, quando utilizados na preservação de alimentos, cosméticos e medicamentos (PEREIRA, 2009).

Neste trabalho foi feita avaliação da atividade antioxidante, determinação do conteúdo de polifenóis e de flavonóides e a identificação e a quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD de extratos de *Inga marginata*.

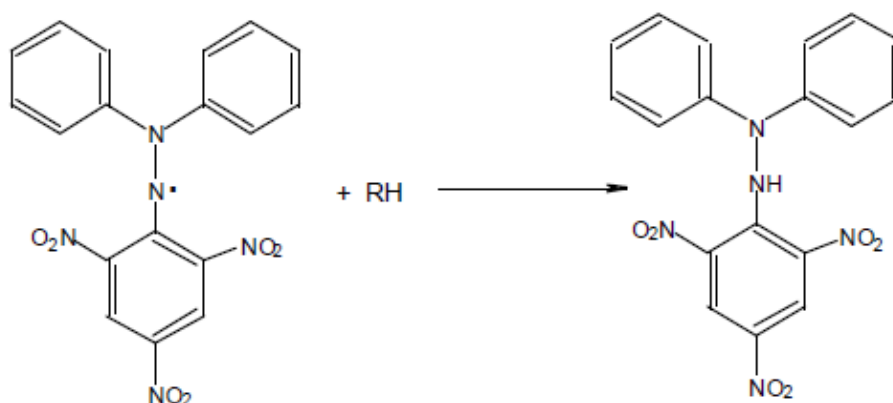
V.2.1 Teste de Atividade Antioxidante

Determinação da atividade doadora de íons hidrogênio ao radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Com o crescente interesse em substâncias antioxidantes, vários métodos de determinação da atividade antioxidante têm sido desenvolvidos (PRIOR et al., 2005; ROGINSKY e LISSI, 2005). O radical DPPH[•], tem sido amplamente utilizado para a determinação da atividade antioxidante, tanto de substâncias puras como de extratos de plantas (KATALINIC; MILOS e JUKIC, 2006).

O DPPH[•] é um radical orgânico de coloração roxa que apresenta absorvância máxima em $\lambda = 515$ e 528 nm. Moléculas antioxidantes podem suprimir o radical DPPH[•], doando um átomo de hidrogênio, um elétron ou via ataque radicalar, promovendo assim a alteração da cor roxa do radical para a cor amarela da forma reduzida do DPPH (AMAROWICZ et al., 2004), como representado na Figura 48.

Figura 48 - Representação da reação de doação de hidrogênios para o DPPH[•].



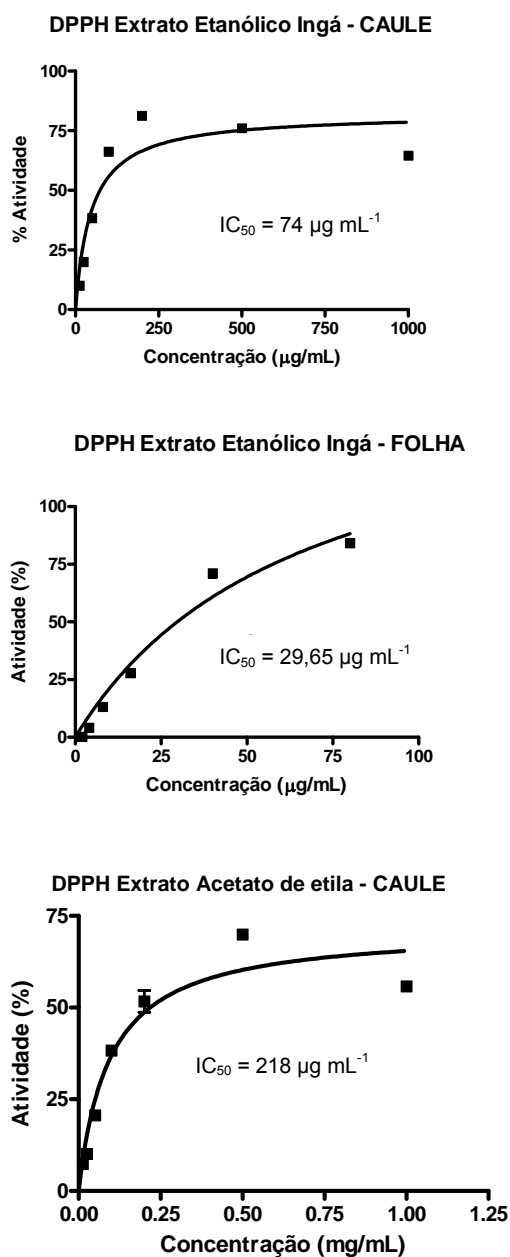
O método do radical livre DPPH[•], foi o escolhido para a determinação da atividade antioxidante dos extratos em acetato de etila (IFA; IGA) e etanólico (IFE; IGE das folhas e galhos de *I. marginata*. A atividade doadora de hidrogênio ao radical DPPH[•] foi obtida em diferentes concentrações dos extratos testados (IFA, IFE, IGA e IGE). As concentrações dos extratos capazes de interceptar 50% do DPPH (IC₅₀) estão apresentadas na Tabela 26, onde os resultados foram expressos pela média ± erro padrão médio, Figura 49.

Tabela 26 - Concentrações dos extratos de *I. marginata* necessárias para inibir o processo oxidativo em 50% (IC₅₀), realizado em triplicata

Extratos	IFA	IFE (µg mL ⁻¹)	IGA (µg mL ⁻¹)	IGE (µg mL ⁻¹)
IC ₅₀	n.d.	29,65 ± 0,02	218 ± 0,02	74 ± 0,02

*n.d.: não detectado.

Figura 49 - Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical estável DPPH[•]. Curva concentração-resposta para IGE (A), IFE (B) e IGA (C).



As concentrações usadas no meio reacional foram de 12,5 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IGE e IGA e 2 - 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IFE. Os resultados são representados pela média \pm EPM.

O extrato em acetato de etila das folhas não apresentou atividade antioxidante, enquanto o extrato em acetato de etila dos galhos apresentou baixa atividade antioxidante, o que está de acordo com o esperado, uma vez que as substâncias antioxidantes normalmente se concentram nos extratos mais polares.

Já os extratos IFE e IGE apresentaram alta atividade antioxidante quando se compara seus valores de IC_{50} ao do extrato Isoflavin Beta[®], um extrato

comercial padronizado usado para reposição hormonal, rico em isoflavonóides, que apresentou $IC_{50} = 160 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GEORGETTI *et al.*, 2007). Resultados significativos também foram encontrados para o extrato etanólico dos galhos e folhas de *Inga verna affinis*, que apresentou $IC_{50} = 11,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ (VIVOT *et al.* 2001), comprovando o alto potencial antioxidante dos extratos etanólicos do gênero *Inga* estudados até o presente momento.

V.2.2 Determinação do conteúdo de polifenóis

Os resultados das determinações de polifenóis nos extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e dos galhos (IGA) e nos extratos etanólicos das folhas (IFE) e galhos (IGE) foram calculados em mg de equivalente em ácido gálico/g de fração seca do extrato (EAG/g FS) e estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 - Concentrações de polifenóis nos extratos de *I. marginata* W

Extratos	IFA	IFE	IGA	IGE
mg EAG/g FS	8,37 ± 0,09	31,63 ± 0,52	9,89 ± 0,31	16,69 ± 0,51

O extrato etanólico das folhas (IFE) apresentou maior conteúdo de polifenóis do que o extrato etanólico dos galhos (IGE), o que está de acordo com o esperado, pois a biossíntese de polifenóis é acelerada pela exposição à luz e serve como mecanismo de defesa contra a radiação UV-B (HARBONE e WILLIAMS, 2000) e a exposição à luz é maior nas folhas do que nos galhos. Os extratos IFA e IGA apresentaram menores quantidades de polifenóis, resultados que podem ser justificados pela menor polaridade destes extratos.

Observou-se, ainda, uma correlação positiva entre o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante dos extratos, confirmando que a maior atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas (IFE) decorre da presença de maior quantidade de compostos fenólicos deste extrato.

Segundo Silva *et al.* (2007), extratos de folhas, cascas, frutas e sementes de *Inga edulis*, extraídos com metanol:etanol:água:ácido clorídrico (69:20:10:1 v/v/v/v), apresentaram respectivamente 9,8; 14,8; 0,7 e 0,4 mg EAG/g FS. Por outro lado, Dias, Souza e Rogez (2010) relataram que folhas de *Inga edulis*, extraídas com acetona:água : ácido acético (70:28:2, v/v/v), e enriquecidas, atingiram a concentração de 571,4 mg EAG/g FS, mostrando a eficiência da técnica

utilizada para concentração de compostos fenólicos. No entanto, os extratos de *Inga marginata* analisados neste trabalho não foram enriquecidos, estando os resultados condizentes com o esperado para as plantas do gênero.

O potencial antioxidante dos extratos de *I. marginata* fica evidenciado quando se compara os resultados obtidos com os registrados na literatura para extratos ricos em compostos fenólicos. Foi constatado que, enquanto o extrato comercial de Isoflavin Beta[®] com um conteúdo de compostos fenólicos de 75 mg EAG/g FS apresentou uma atividade antioxidante com $IC_{50} = 160 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GEORGETTI, et. al., 2007), os extratos etanólicos das folhas e galhos apresentaram menor quantidade de compostos fenólicos (IFE = 31,63 e IGE = 16,69 mg EAG/g FS) e maior atividade antioxidante (IC_{50} IFE = 29,65 e IGE = 74,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O potencial antioxidante dos extratos de *Inga marginata* também pode ser comprovado pela comparação de seu conteúdo de compostos fenólicos com o encontrado em chá verde (*Camellia sinensis*), que varia de 32,0 a 133,0 mg EAG/g FS, e que é uma das mais ricas fontes de polifenóis usadas na medicina (PRIOR; CAO, 1999).

V.2.3 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

O conteúdo de flavonóides totais presentes nos extratos em acetato de etila das folhas (IFA) e galhos (IGA) e dos extratos etanólicos das folhas (IFE) e galhos (IGE) foram expressos em mg equivalentes em quercetina/g de fração seca do extrato (mg EQ/g FS) e estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Concentrações de flavonóides totais nos extratos de *I. marginata* W

Extratos	IFA	IFE	IGA	IGE
mg EQ/g FS	n.d.	18,70 ± 0,13	n.d.	n.d.

*n.d.: não detectado.

Os flavonóides foram detectados somente no extrato etanólico das folhas (IFE), na concentração de 18,70 mg EQ/g FS, superior ao teor de flavonóides da espécie *Cassia leptophylla* (3,3 mg EQ/g FS), também pertencente à família Leguminosae (BURGO, 2010), e a amostras de chá verde cuja concentração de flavonóides variou de 0,46 a 1,10 mg EQ/g FS (PEREIRA et al. 2009). O resultado obtido também foi superior ao observado por Silva e colaboradores (2007) que

obtiveram a concentração de $3,31 \pm 2,10$ mg EQ/g FS para extratos das folhas e $5,50 \pm 0,14$ mg EQ/g FS para extrato das cascas de *Inga edulis*, utilizando catequina como padrão.

O conteúdo de flavonóides totais obtidos no extrato etanólico das folhas está de acordo com os resultados relatados para a atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis, os quais apresentaram valores maiores para este mesmo extrato.

V.2.4 Análise por CLAE-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) é uma ferramenta muito utilizada na identificação e quantificação de substâncias para o controle de qualidade na indústria e no estudo de extratos mais polares de espécies vegetais. Através do perfil estabelecido pelo UV é possível não só determinar a classe de substâncias, mas também identificar substâncias já conhecidas através da comparação do tempo de retenção e espectro no UV com padrões comerciais ou anteriormente isolados (SOARES, 2009; LUENGAS-CAICEDO, 2005; COENTRÃO, 2005).

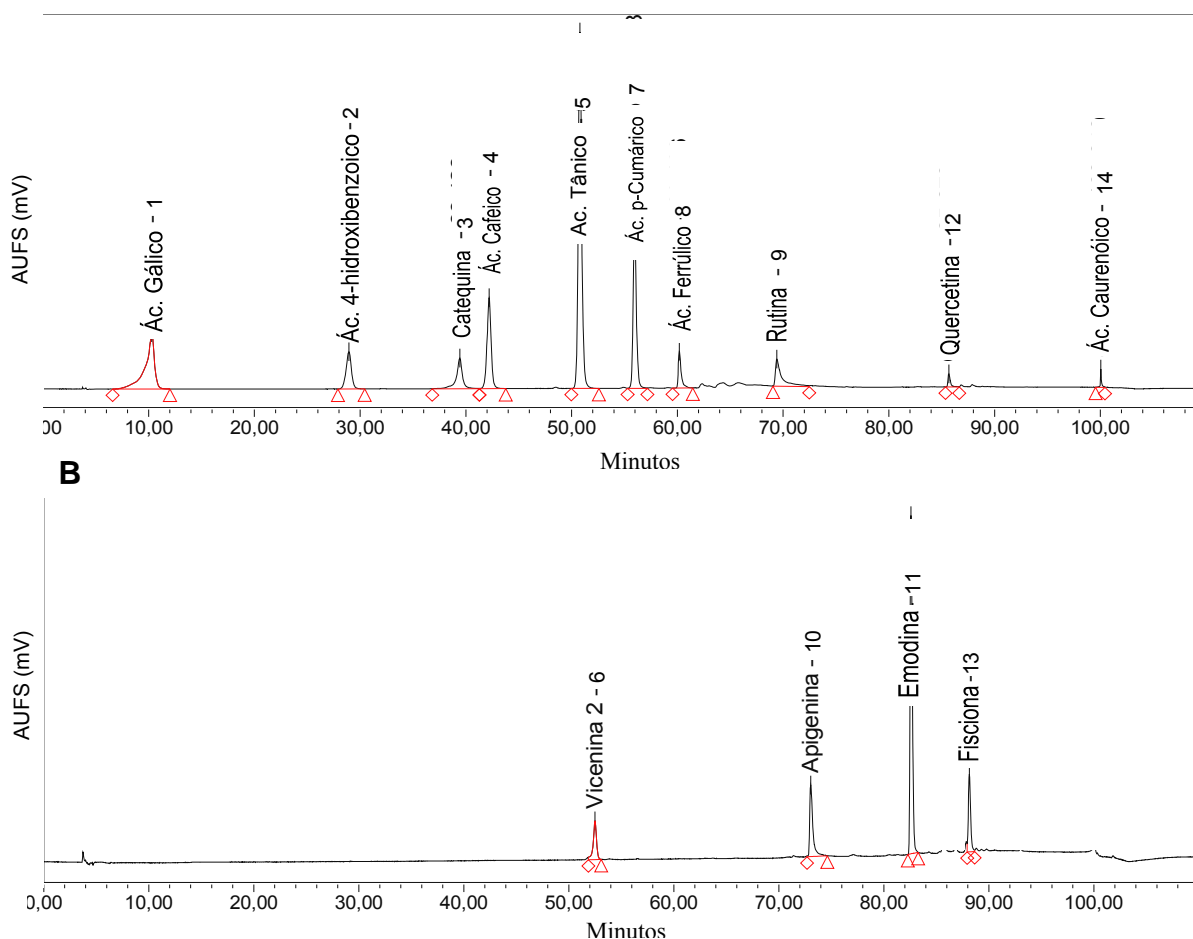
A técnica de CLAE-DAD vem sendo empregada eficientemente no estudo de plantas que contenham compostos fenólicos, como ácidos orgânicos e flavonóides, pois, os polifenóis atuam como agentes redutores, doando hidrogênios a oxigênios singletos, altamente reativos chamados de radicais livres, que são gerados pelo organismo, sendo estas substâncias fenólicas antioxidantes eficientes. Os antioxidantes estão relacionados a atividades moluscidas, anti-helmínticas, antiepatóxicas, inibição da replicação viral da imunodeficiência humana (HIV), vírus simplex humano (SHV), caries, atividades antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antialérgicas, antivirais, vasodilatadoras, entre outras (PROESTOS et. al., 2005).

V.2.4.1 Análise dos Extratos de *Inga Marginata* por CLAE-DAD

Os compostos detectados nos extratos IFA, IFE, IGA e IGE foram identificados através da comparação de seus tempos de retenção e perfis dos espectros de UV com os de treze padrões comerciais e de duas substâncias isoladas neste trabalho, fisiona e emodina. As substâncias de referência foram numeradas

como a seguir: (1) ácido gálico (10,2 min); (2) ácido 4-hidroxibenzoico (28,9 min); (3) catequina (39,4 min); (4) ácido cafeico (42,2 min); (5) ácido tânico (50,7 min); (6) vicenina 2 (52,4 min); (7) ácido p-cumárico (55,9 min); (#) naringenina (58,9 min), (8) ácido ferrúlico (60,1 min); (9) rutina (69,4 min); (10) apigenina (73,0 min); (11) emodina (82,5); (12) quercetina (85,6 min); (13) fisciona (88,1 min) além do diterpeno (14) ácido caurenóico (100,0 min). Os cromatogramas dos padrões foram obtidos em 280nm, como exemplos, são apresentados na Figura 50 A e B os cromatogramas das misturas de padrões nas concentrações de 40µg/mL.

Figura 50 A - Cromatograma da mistura de 10 padrões e respectivos tempos de retenção (40µg/mL).



A quantificação dos compostos foi realizada com curvas de calibração construídas com padrões externos diluídos em metanol nas concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg mL⁻¹. Os coeficientes de correlação foram calculados com base nos cinco pontos de cada curva de calibração no comprimento de onda de 280 nm, onde obteve-se o maior número de respostas. Os

coeficientes de correlação das curvas de calibração dos diferentes padrões estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Coeficientes de determinação das curvas de calibração dos padrões

Padrão	Coeficiente (R^2)
Ác. 4-Hidroxibenzóico	0,9999
Ác. Cafeico	0,9996
Ác. Caurenóico	0,9466
Ác. Ferrúlico	0,9998
Ác. p-Cumárico	0,9996
Ác. Tânico	0,9998
Acido Gálico	0,9999
Apigenina	0,9982
Catequina	0,9999
Emodina	0,9993
Fisciona	0,998
Quercetina	0,9496
Rutina	0,9831
Vicenina 2	0,9999

Através de coinjeções das amostras e dos padrões foi possível obter a quantificação dos compostos detectados nos extratos, sendo que apenas a naringenina não foi quantificada por falta de quantidade suficiente de padrão para a curva de calibração. Os resultados encontram-se na Tabela 30.

Tabela 30 – Quantificação das substâncias nos extratos IFA, IFE, IGA e IGE.

Composto	IFA (mg/g)	IFE (mg/g)	IGA (mg/g)	IGE (mg/g)
(1) ácido gálico (10,2 min)	n.d.	2,815	0,110	0,258
(2) ácido 4-hidroxibenzóico (28,9 min)	n.d.	0,301	0,285	0,187
(3) catequina (39,4 min)	n.d.	0,796	0,959	0,060
(4) ácido cafeico (42,2 min)	n.d.	0,279	0,133	0,087
(5) ácido tânico (50,7 min)	n.d.	0,273	0,092	0,051
(6) vicenina 2 (52,4 min)	n.d.	0,282	n.d.	n.d.
(7) ácido p-cumárico (55,9 min)	n.d.	1,160	0,376	0,493
(#) naringenina	n.d.	+	n.d.	+
(8) ácido ferrúlico (60,1 min)	n.d.	0,972	0,064	0,632
(9) rutina (69,4 min)	n.d.	1,066	1,385	2,285
(10) apigenina (73,0 min)	n.d.	0,546	1,850	0,426
(11) emodina (82,5)	0,183	n.d.	13,102	0,260
(12) quercetina (85,6 min)	32,401	26,841	58,250	32,550
(13) fisciona (88,1 min)	4,350	0,867	10,610	0,428
(14) ácido caurenóico (100,0 min)	218,503	18,662	27,122	21,806

n.d.: Não detectado; +: detectado e não quantificado.

Analisando os cromatogramas dos quatro extratos (Figuras 51 A, B, C e D), verifica-se que os picos do cromatograma do extrato em acetato de etila das folhas, IFA (Figuras 51 A), concentram-se na região de tempos de retenção maiores que 80 minutos, correspondendo, portanto, a compostos menos polares do que os ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados, observados na região de tempo de retenção abaixo de 80 minutos dos cromatogramas dos outros três extratos (IFE, IGA e IGE). Estes resultados estão de acordo com o relato da literatura (LUENGAS-CAICEDO, 2005), onde se verifica que em uma coluna de fase reversa, os compostos mais polares saem antes da coluna, na seguinte ordem de eluição: ácidos orgânicos e catequinas, seguida de flavonóides glicosilados e finalmente flavonóides livres. Qualitativamente, os demais extratos (IFE, IGA e IGE) são bastante semelhantes, possuindo uma grande diversidade de compostos mais polares, além dos menos polares presentes em IFA e outros constituintes não identificados neste trabalho. Entre os flavonóides quantificados, a quercetina é a que está presente em maior quantidade, principalmente em IGA. Segundo Liandra (2009) a quercetina é um dos flavonóis mais comuns em plantas. Vale ressaltar que IGA foi o extrato que apresentou as maiores concentrações de fisicina e emodina, o que permitiu o isolamento destas substâncias no fracionamento deste extrato, descrito no estudo químico (páginas 68 e 79). Nos demais extratos, as duas antraquinonas foram detectadas pela análise por CLAE-DAD, mas não foram isoladas no fracionamento, possivelmente devido à pequena quantidade destas substâncias nestes extratos.

Figura 51 A - Cromatogramas dos extratos A) IFA; B) IFE, em 280 nm (preto) e 370nm (azul).

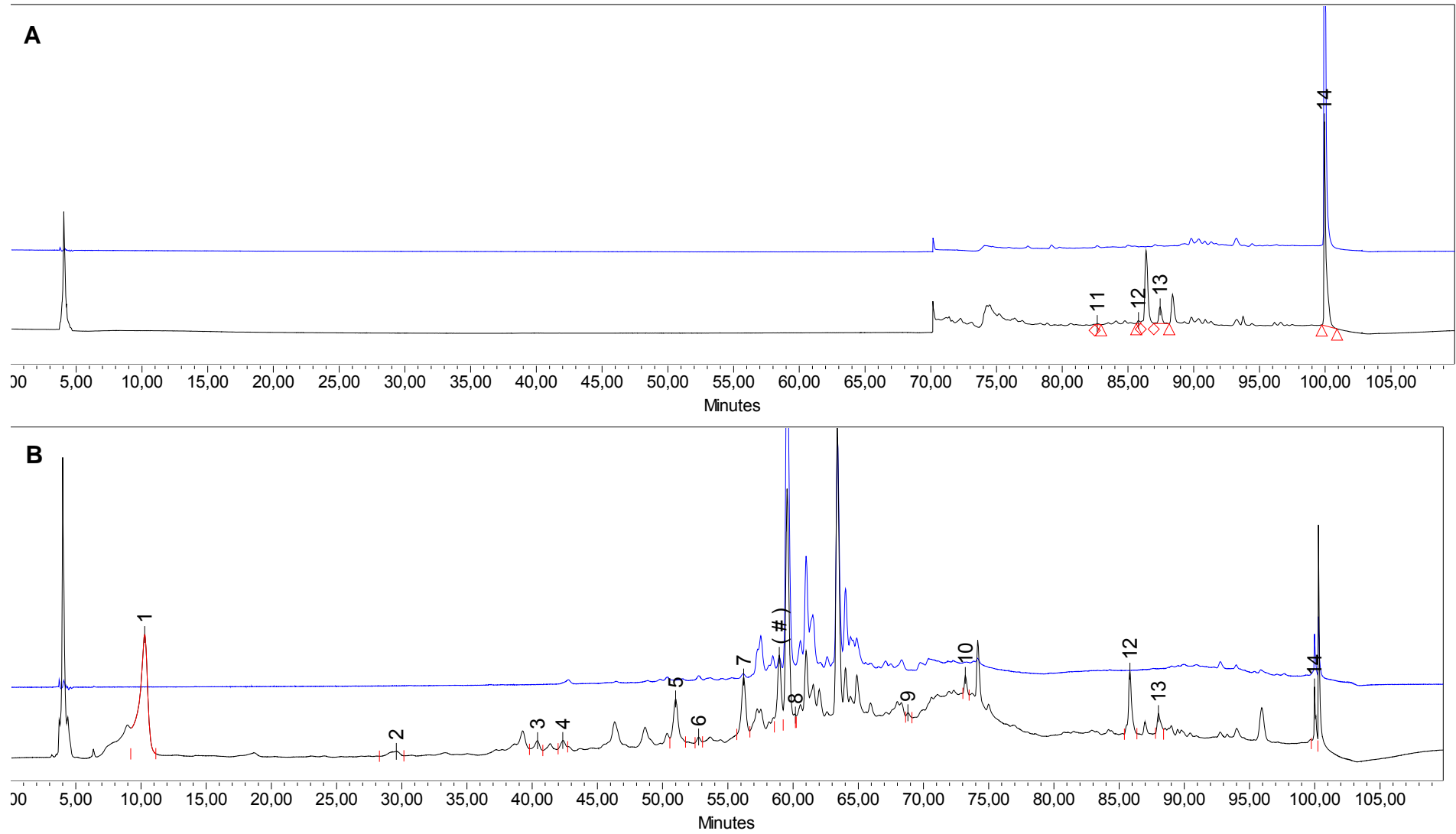
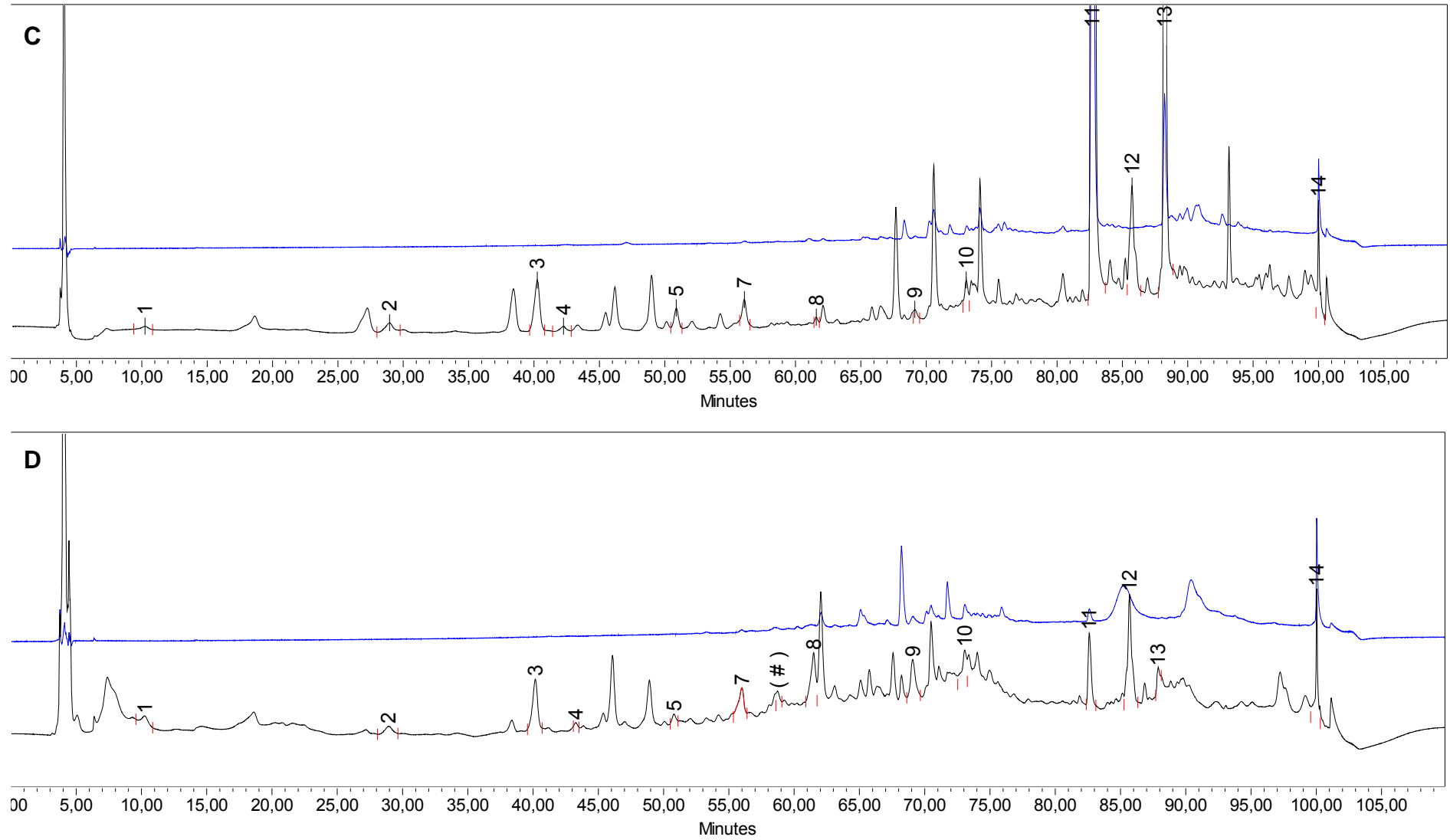


Figura 51 B - Cromatogramas dos extratos C) IGA e D) IGE, em 280 nm (preto) e 370nm (azul).



Na análise dos cromatogramas de IFE obtidos em 280 nm e 370 nm (Figura 51 A ítem b) chamou atenção a grande quantidade de compostos na região entre 60 e 65 minutos, os quais não foram todos identificados por falta de padrões. Entretanto, através da análise dos espectros de UV, foi possível inferir a classe das substâncias correspondentes aos picos a, b, c, d, e, f detectadas naquela região do cromatograma, conforme mostrado na Figura 52. Através da sobreposição dos espectros de UV, verificou-se a similaridade dos perfis dos compostos a, b, c, d, e, f, Figura 53 A e B, indicando pertencerem à mesma classe de substâncias.

Figura 52 - Sobreposição dos cromatogramas de IFE em 280 nm (preto) e 370nm (azul) expandido.

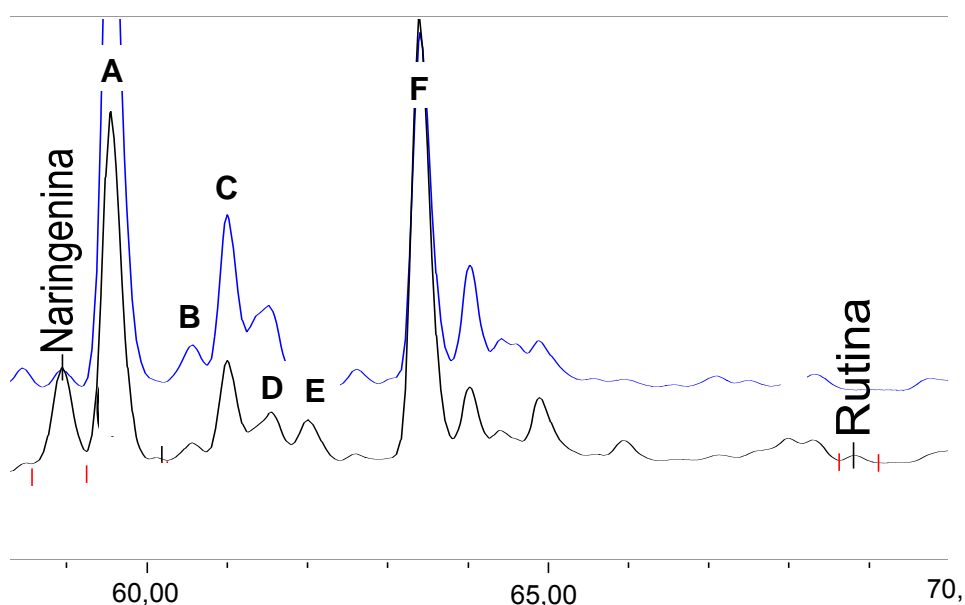
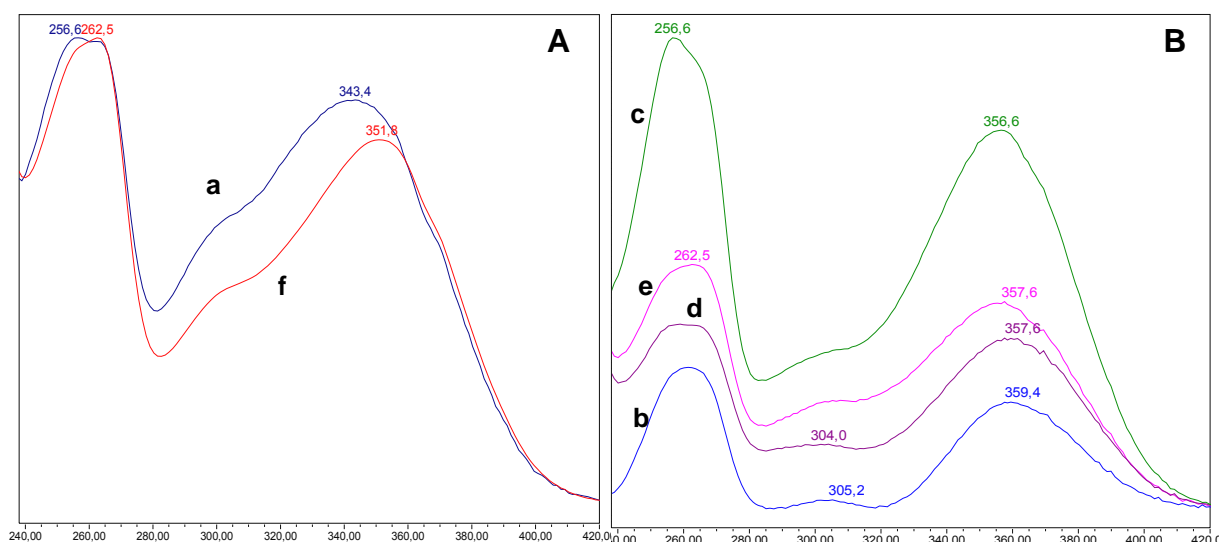
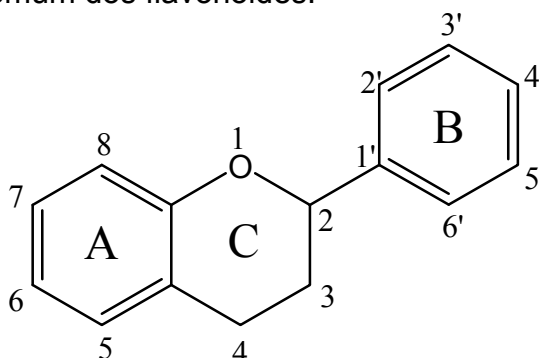


Figura 53 - Sobreposição dos espectros no UV-Vis dos picos a e f (A) e b, c, d e e (B) de IFE em 370 nm.



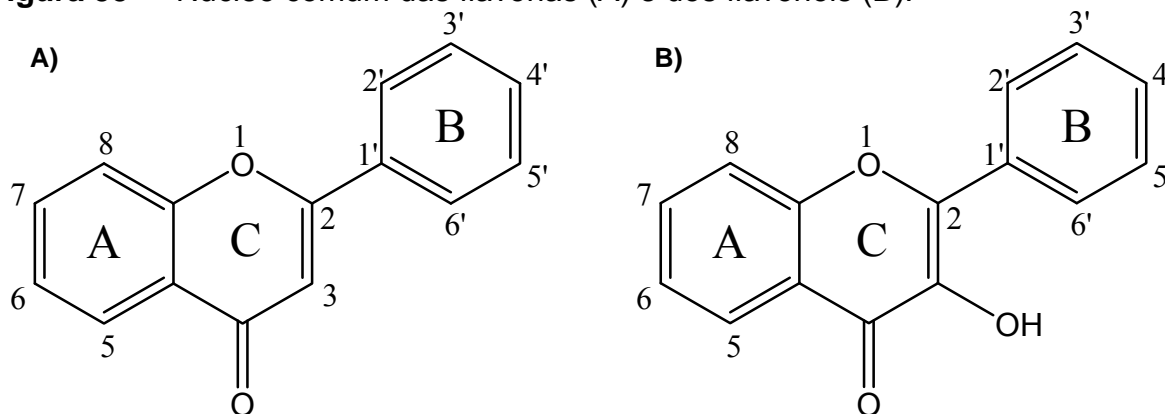
Os espectros de UV dos compostos referentes aos picos a, b, c, d, e, f possuem absorções que os enquadram na classe dos flavonóides, apresentando dois máximos de absorção, um ocorrendo entre 240-285 nm e outro entre 300-340 nm, atribuídos, respectivamente, à banda I do anel A e à banda II do anel B do núcleo comum dos flavonóides, representado na Figura 54. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

Figura 54 – Núcleo comum dos flavonóides.



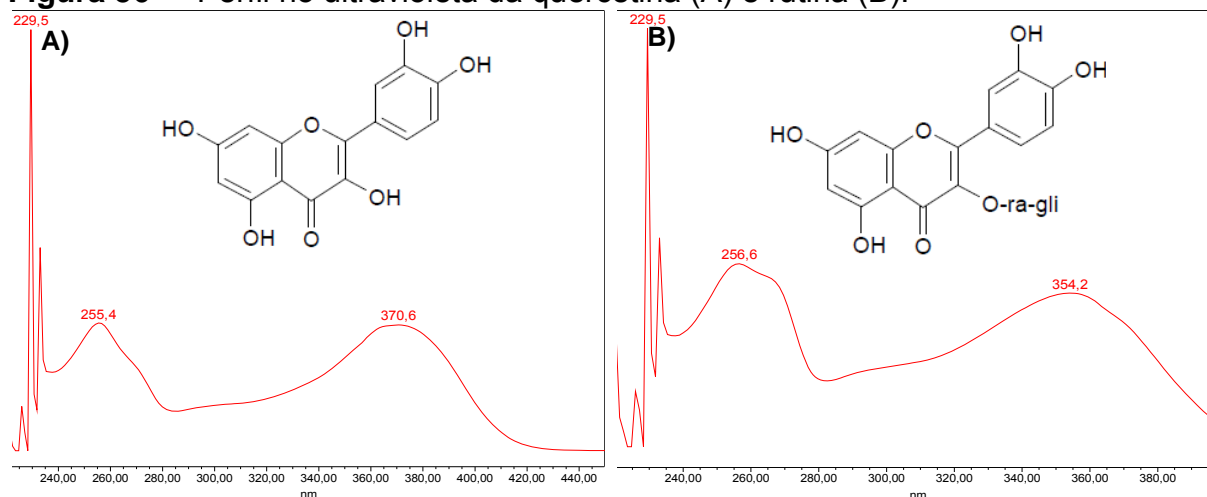
Segundo Luengas-Caicedo (2005) as flavonas e flavonóis apresentam um máximo em 220 nm, banda II com máximo de absorção entre 250 e 270 e a banda I com máximo de absorção entre 330 e 370 nm. A banda II dos compostos 1 a 6 possuem um λ máx variando entre 256,6 e 262,5 e a banda I dos mesmos compostos possuem um λ máx entre 343,4 e 359,4, indicando que estes compostos pertencem à classe das flavonas ou dos flavonóis, Figura 55 A e B.

Figura 55 – Núcleo comum das flavonas (A) e dos flavonóis (B).



Os perfis dos espectros no UV dos compostos a, b, c, d, e, f, foram muito semelhantes aos observados para os flavonóis quercetina e rutina, (Figura 56 A e B), eluídas nos tempos de retenção 85,6 e 69,4 minutos, respectivamente.

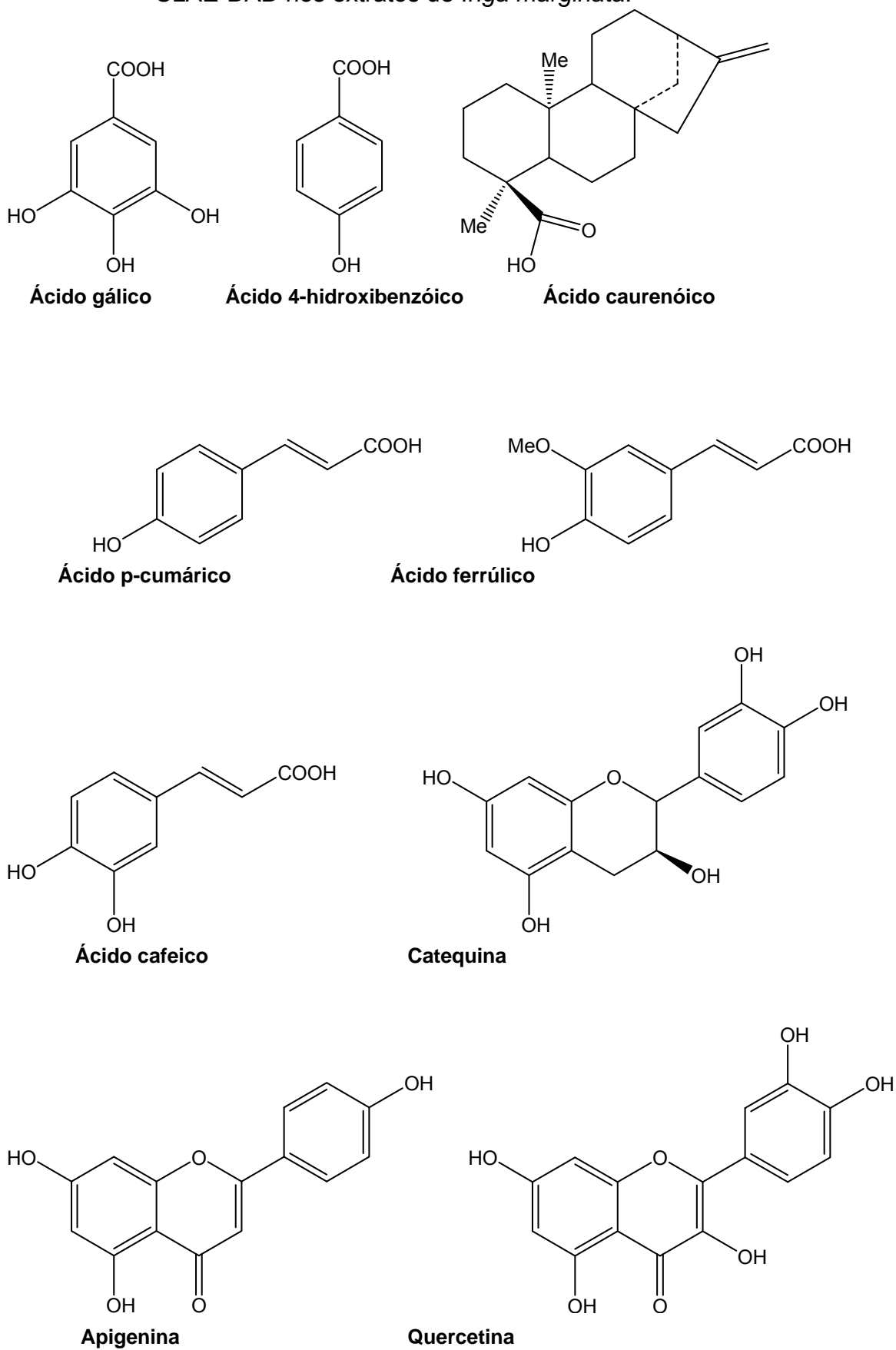
Figura 56 – Perfil no ultravioleta da quercetina (A) e rutina (B).

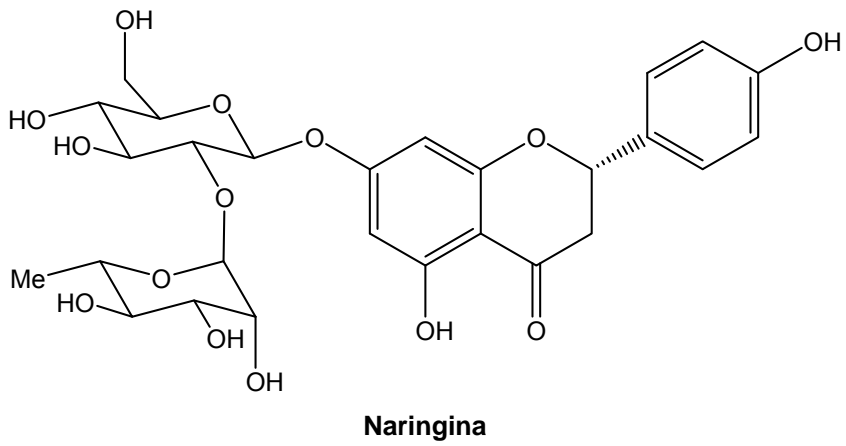
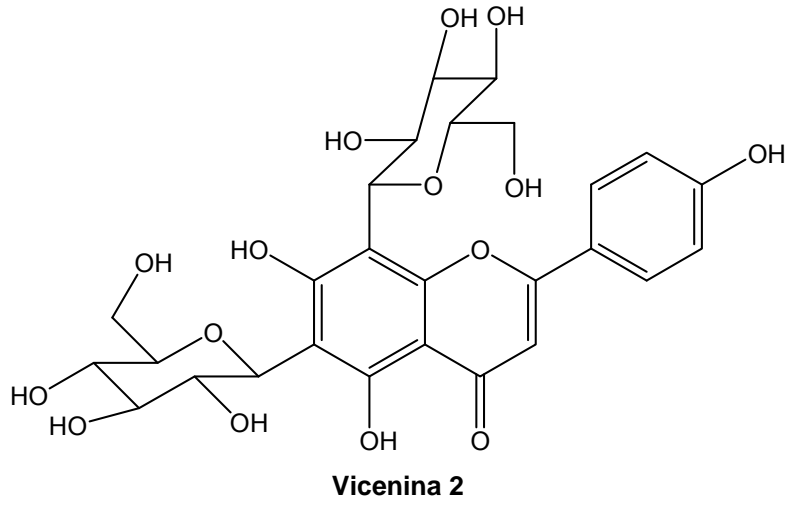
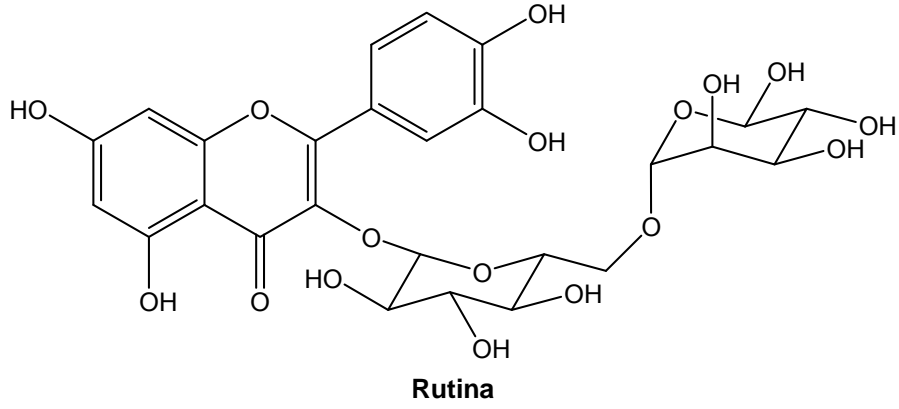


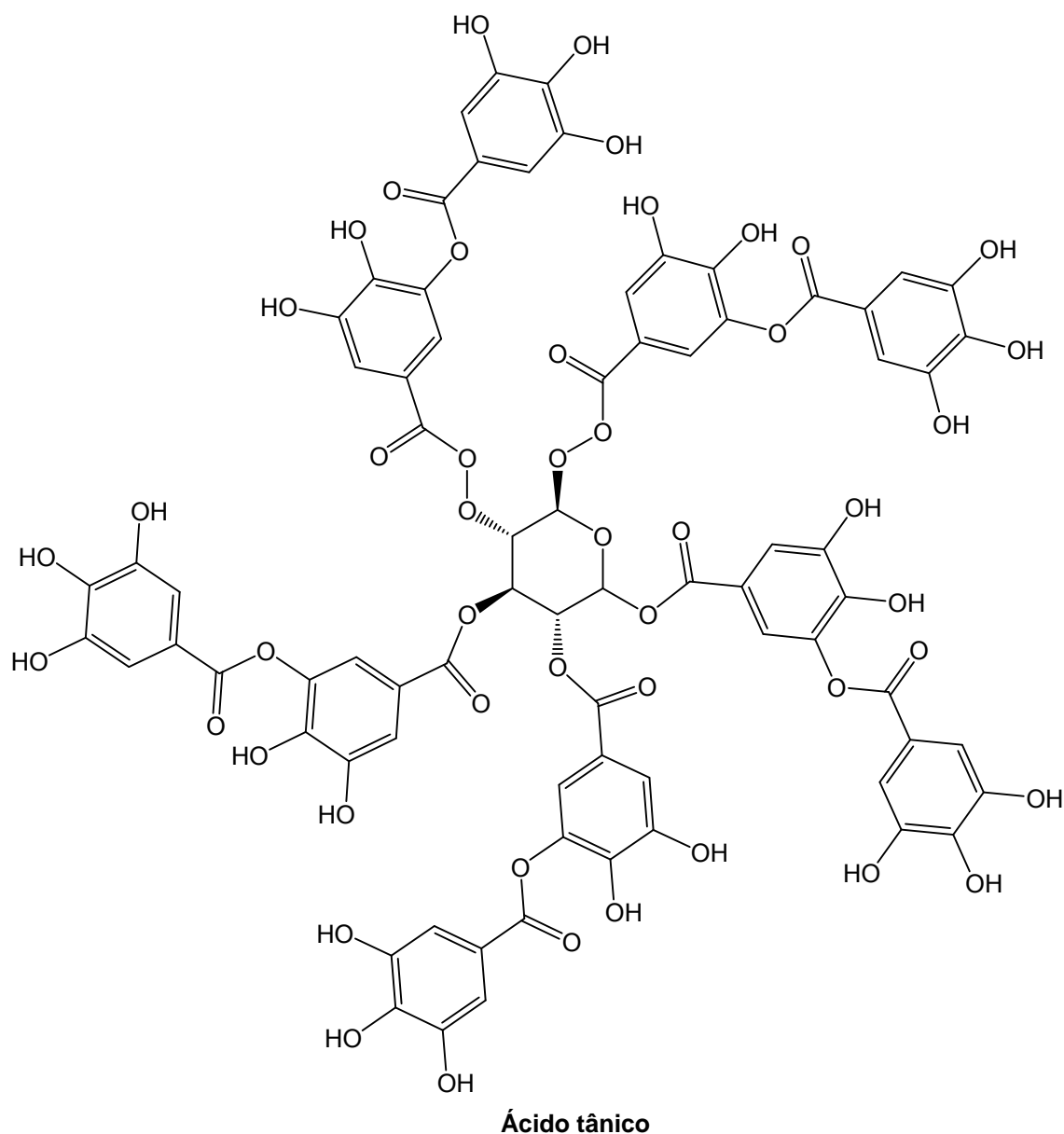
Lianda (2009) verificou a semelhança nos espectros de absorção dos flavonóides, tanto para a classe dos flavonóis glicosilados, como a rutina e isoquercetina, como para os flavonóis e flavonas agliconas, como a quercetina, morina, canferol e tricetina, o que foi verificado também neste trabalho pela comparação dos espectros da quercetina e rutina. O fato de os compostos a, b, c, d, e, f, terem sido eluídos entre 60 e 65 minutos, indica que os compostos pertencem à classe dos flavonóis ou flavonas glicosilados. De acordo com o relato de Lianda (2009), os flavonóis e as flavonas ocorrem geralmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz.

A Figura 57 apresenta as estruturas das substâncias identificadas neste trabalho.

Figura 57 – Substâncias determinadas qualitativamente e quantitativamente por CLAE-DAD nos extratos de *Inga marginata*.







V.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

V.3.1 Ensaios de Toxicidade Frente a *Artemia Salina* Leach

Substâncias bioativas, geralmente, são tóxicas em altas doses e o teste de toxicidade contra *A. salina* tem sido usado para verificação de toxicidade geral de extratos, frações e substâncias isoladas. Este bioensaio também tem mostrado boa correlação com a citotoxicidade sobre células 9Kb, carcinoma da nasofaringe, e 9PS (célula tronco), confirmando ser ferramenta útil para a determinação preliminar de atividade antitumoral (MEYER *et al.*, 1982). Segundo Siqueira *et al.* (1998), há uma correlação positiva entre a toxicidade sobre as larvas

do microcrustáceo *A. salina* e atividades antifúngicas, viruscidas, antimicrobianas e antitumorais.

Os resultados dos ensaios realizados com os extratos de *I. marginata* foram calculados através de método estatístico de regressão linear, Figura 58, e os valores de DL₅₀ (dose letal para 50% dos microcrustáceos *A. salina*) estão discriminados na Tabela 31. Os resultados são considerados positivos para valores de DL₅₀ inferiores a 1000 µg mL⁻¹ (MEYER *et al.* 1982).

Os extratos de *Inga marginata* apresentaram alta atividade contra *A. salina*, principalmente o extrato etanólico das folhas, IFE, cujo valor de DL₅₀ foi de apenas 48,54 µg mL⁻¹. Coincidentemente, este foi também o extrato que apresentou maior atividade antioxidante e valores mais altos de conteúdos de polifenóis e flavonóides. Segundo Proestos *et al.* (2005), os polifenóis possuem um papel determinante na inibição da replicação viral da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus simplex humano (SHV) e para as atividades moluscicida, anti-helmíntica, antiepatotóxica, antiinflamatória, anticarcinogênica, antialérgica, antiviral, vasodilatadora, entre outras.

Figura 58 – Curva de regressão linear para cálculo de DL₅₀ contra *Artemia Salina*.

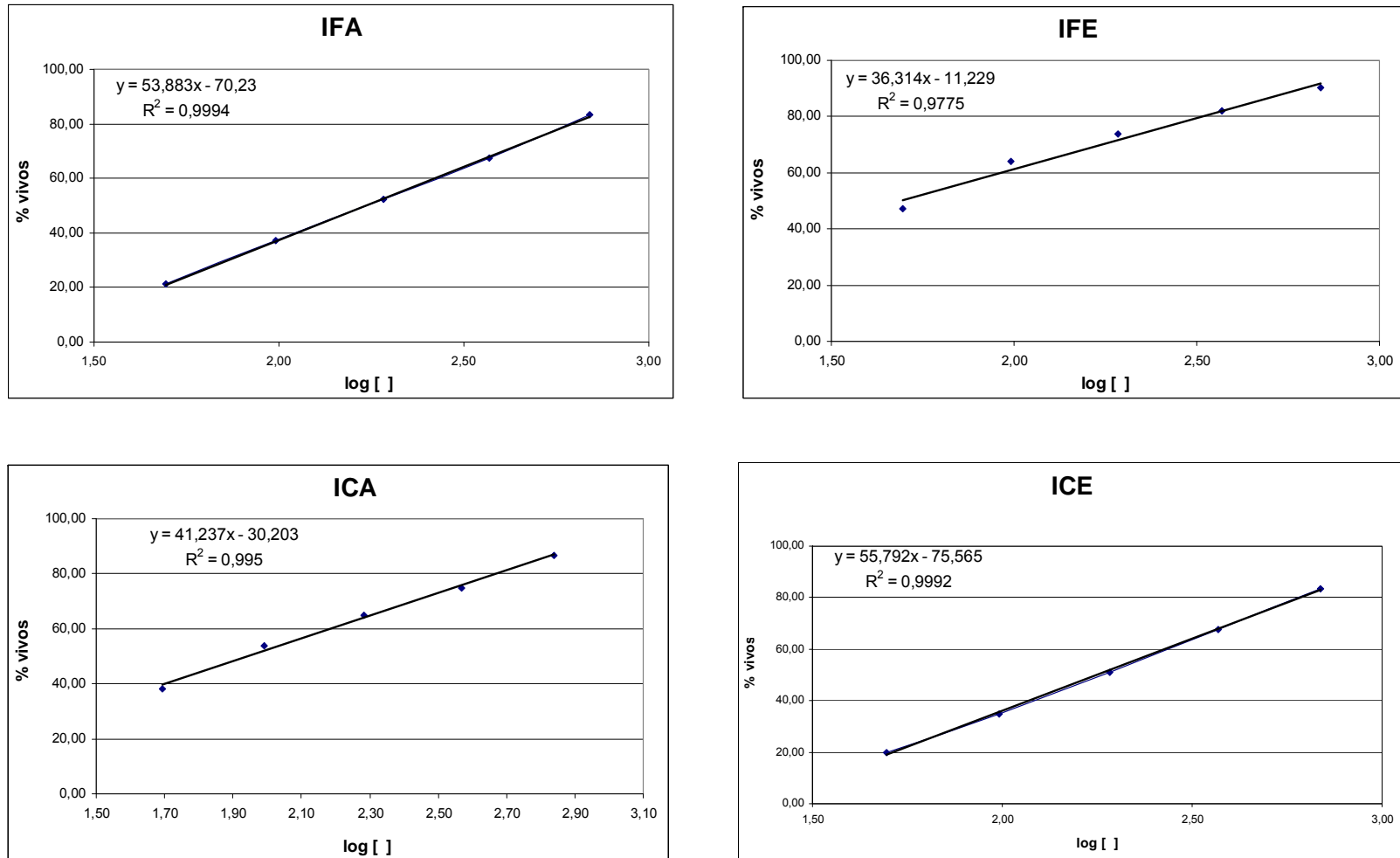


Tabela 31 – DL₅₀ para os extratos de *I. marginata* W

Extratos	IFA	IFE	IGA	IGE
DL ₅₀ (µg/mL ⁻¹)	170,34	48,54	88,08	178,09

IFA: Inga folha em acetato de etila; IFE: Inga folha em etanol; IGA: Inga galhos em acetato de etila e IGE: Inga galhos em etanol.

De fato, trabalhos da literatura (ALVAREZ *et al.*, 1998) relatam a atividade do extrato bruto e de cinco saponinas de *I. marginata* contra o peixe *Poecilia reticulata* Peters, com concentrações letais de 6,8 mg L⁻¹ e 5,5 mg L⁻¹, respectivamente. Tanto o extrato etanólico como as saponinas apresentaram, ainda, alta atividade no ensaio antitumoral.

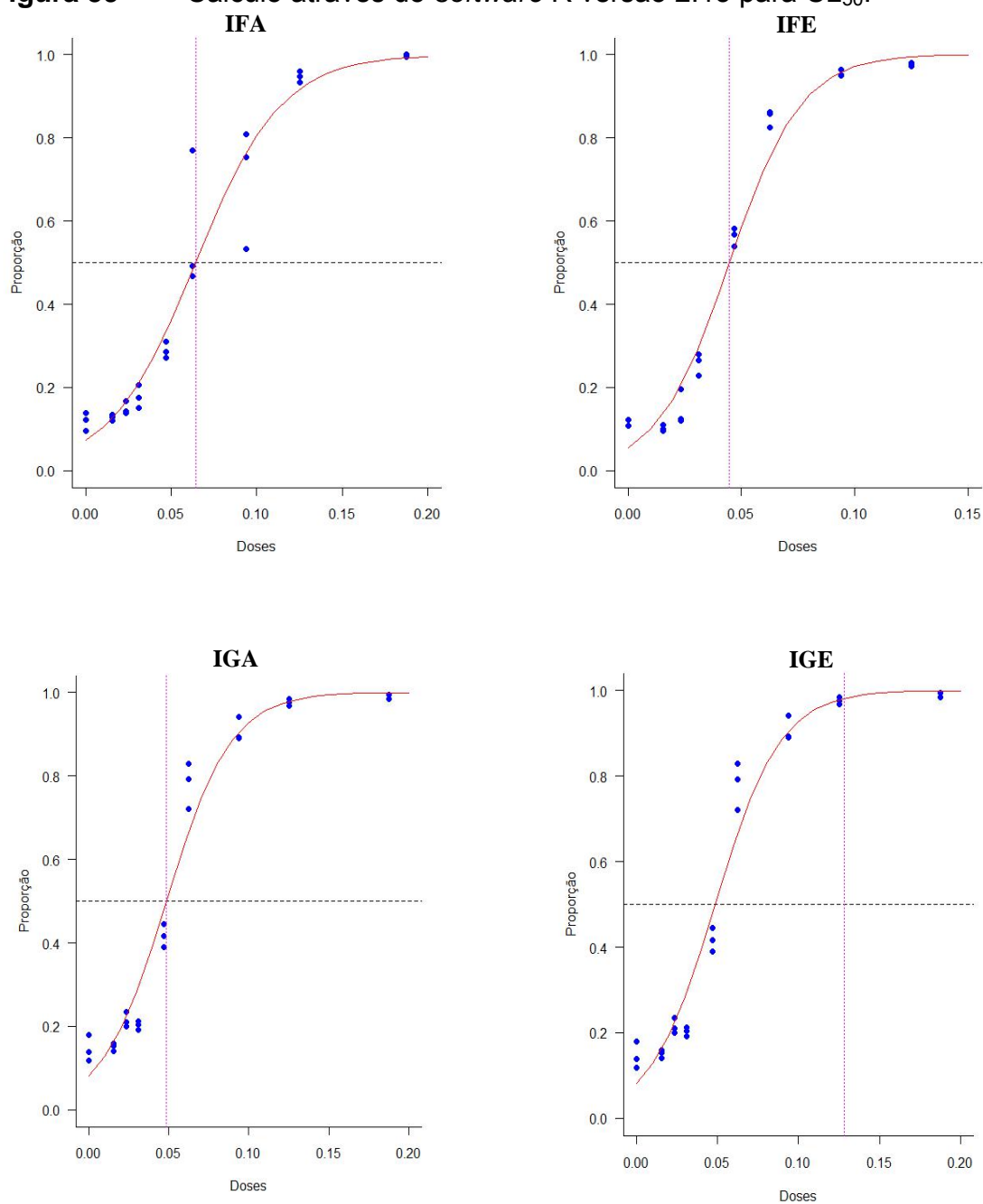
V.3.2 Ensaio de Atividade Antibacteriana

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos IFA, IFE, IGA e IGE foi aplicada a técnica de microdiluição em caldo (ANVISA, 2003), utilizando as bactérias *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

O extrato IFE apresentou efeito bacteriostático sobre *Pseudomonas aeruginosa* na concentração inibitória mínima de 500 µg mL⁻¹, enquanto o extrato IFA inibiu o crescimento de *Proteus mirabilis* também na concentração inibitória mínima de 500 µg mL⁻¹. Os extratos IGA e IGE não atuaram sobre as bactérias testadas neste experimento.

V.3.3 Teste de Atividade Anti-Helmíntica

O ensaio de atividade anti-helmíntica foi baseado na metodologia descrita por Coles *et al.* (1992) e a concentração letal para 50% dos ovos (CL₅₀) para cada extrato analisado, IFA, IFE, IGA e IGE, foi calculada através do software R versão 2.13 para todas as concentrações de cada extrato realizadas em triplicata, de acordo com os gráficos apresentados na Figura 59. As CL₅₀ para cada extrato estão discriminadas na Tabela 32.

Figura 59 – Cálculo através do *software* R versão 2.13 para CL₅₀.**Tabela 32** – Valores da CL₅₀ para os extratos IFA, IFE, IGA e IGE

EXTRATO	CL ₅₀ (mg mL ⁻¹)
IFA – (Acetato de etila das folhas)	0,0643
IFE – (Etanólico das folhas)	0,0447
IGA – (Acetato de etila dos galhos)	0,0486
IGE – (Etanólico dos galhos)	0,1282

Os extratos que apresentaram as maiores atividades anti-helmínticas foram IFE e IGA, Tabela 32, muito próximos ao apresentado por *Acacia molissima*

(Fabacea) cujos valores de CL_{50} foram de 0,043, 0,038 e 0,050 $mg mL^{-1}$ para os nematódeos *H. contortus*, *T. vitrinus* e *T. circumcincta*, respectivamente. *Acacia molíssima* vem sendo largamente utilizada no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos por possuir alta atividade anti-helmíntica devido à alta concentração de taninos condensados (15% do peso seco), que se constituem de polímeros de flavonóides conhecidos como proantocianidinas. Taninos condensados agem como anti-helmíntico diminuindo a fecundidade dos nematódeos fêmeas ou inviabilizando os ovos desses nematódeos (MINHO, 2006).

A maior atividade anti-helmíntica nos extratos de *I. marginata* ocorreu para IFE, que também foi o extrato que apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e de flavonóides. Entretanto a atividade anti-helmíntica dos extratos de *I. marginata* parece não estar relacionada somente aos compostos fenólicos, pois, IGA apresentou alta atividade anti-helmíntica e possui menor concentração de polifenóis que IGE que teve a menor atividade anti-helmíntica.

As atividades anti-helmínticas dos extratos testados também foram condizentes com os resultados obtidos nos testes de letalidade contra *Artemia salina*, apresentando a mesma ordem decrescente de letalidade: IFE, IGA, IFA e por último IGE, fazendo de *Inga marginata* uma espécie promissora para o combate às helmintoses de ruminantes.

VI CONCLUSÃO

O estudo químico dos extratos em acetato de etila e etanólico de *Inga marginata* Willd resultaram no isolamento de uma mistura de hidrocarbonetos de cadeias longas, estigmasterol, mistura de friedelina e lupenona, lupeol e as antraquinonas fisciona e emodina.

Através da técnica de CLAE-DAD foi possível identificar 15 compostos e quantificar 14, nos extratos de *Inga marginata* W, sendo 6 ácidos fenólicos orgânicos: ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido tânico, ácido p-cumárico e ácido ferrúlico; 5 flavonóides: catequina, vicenina-2, rutina, apigenina, quercetina, em maior concentração em todos os extratos, 2 antraquinonas: emodina e fisciona, isoladas da espécie neste trabalho; o composto não fenólico ácido caurenóico, e o flavonóide naringenina, não quantificado. O estudo dos extratos por esta técnica possibilitou ainda a visualização de um conjunto de flavonóides, no extrato IFE, pertencentes às classes das flavonas ou flavonóis glicosilados, não identificados neste trabalho por falta de padrões de referência.

Inga marginata W possui potencial para uso como agente antioxidante, uma vez que três de seus extratos apresentaram atividade antioxidante significativa, principalmente IFE e IGE com IC_{50} de 29,65 e 74,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, superiores ao valor encontrado para o extrato Isoflavin Beta[®].

Todos os extratos apresentaram conteúdo de polifenóis, porém, este foi maior em IFE que apresentou 31,63 EAG/g FS. Os flavonóides foram detectados somente no extrato etanólico das folhas (IFE), na concentração de 18,70 mg EQ/g FS, superior ao teor de flavonóides da espécie *Cassia leptophylla* (Fabaceae) e próximos ao encontrado em amostras de chá verde.

O teste de toxicidade contra *Artemia salina* apresentou resultado muito positivo para todos os extratos de *I. marginata*, principalmente para IFE, DL_{50} 48,54 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, sugerindo atividade antitumoral, viruscida e antimicrobiana.

Testes antimicrobianos apresentaram resposta positiva contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para o extrato IFE e *Proteus mirabilis* para o extrato IFA. Os testes de atividade anti-helmíntica foram positivos para todos os extratos, sendo o de maior letalidade IFE, extrato este muito promissor, uma vez que animais portadores de helmintoses que geralmente comem as folhas, como meio de encontrar substâncias que eliminem estas helmintoses gastrintestinais.

Neste estudo foram caracterizadas 19 substâncias em *Inga marginata* W. As propriedades químicas e biológicas de *Inga marginata* Willd constatadas neste trabalho, certamente evidenciam a espécie como uma alternativa natural de produto antioxidante, potencialmente anticancerígena e antiviral, e, provavelmente, aplicável *in natura* para combate às helmintoses gastrintestinais na pecuária, diminuindo drasticamente o prejuízo econômico causados por estes parasitas, reforçando assim, a importância deste trabalho para aplicações futuras.

VII COLABORADORES

- Departamento de Química/UEL – Laboratório de Pesquisa em Moléculas Bioativas: Realização do estudo químico de *Inga marginata* e dos testes de letalidade sobre *Artemia salina*.
- Departamento de Química/UEL - Laboratório de Desenvolvimento e Metodologia Analítica (LAPA-DIA): Realização das análises por CLAE-DAD.
- Departamento de Medicina Veterinária/UEL: Realização dos testes de eclodibilidade (anti-helmíntica).
- Departamento de Ciências Farmacêuticas/UEL: Realização de testes de atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos e flavonóides.
- Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM): Obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-GABAL, N. S.; AL SAIGH, S. M. Anthraquinones from *Aloe vere*. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 519-522, 2008.

ÁLVAREZ, J. C. et al. Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 27, p.17-19, 1998.

AMAROWICZ, R. et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from Canadian prairies. **Food Chemistry**, v.84, p.551-562, 2004.

ANVISA, 2003. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico. M7-A6. v.23, n.2, 6 ed. 2003.

ARGUEDAS, T. B. et al. Contrasting mechanisms of secondary metabolite accumulation during leaf development in two tropical tree species with different leaf expansion strategies. **Oecologia**, v.149, p.91-100, 2006.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 797-808, out.-dez. 2005.

BIZIMENYERA, E. S. et al. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**. v. 142, p. 336–343, 2006.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature** n.181, p. 1199-1200, 1958.

BURGO, R. P. **Estudo químico e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Cássia leptophylla* e do óleo essencial de *Tynnanthus micranthus***. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais). Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR. 2010.

CALDERON, L. A. et al. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: Purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 6, p. 485-493, 2001.

CANAVIRI, P.; BERGQUIST, K-E.; VILA, J. Estúdio fitoquímico Del líquen *Teloschistes flavicans*. **Revista Boliviana de Química**. v. 23, n. 1, p. 9-12, 2006.

CHU, X., SUN, A., LIU R. Preparative isolation and purification of five compounds from the chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1097, p. 33-39, 2005.

- CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 809–816, 2005.
- COENTRÃO, P. A. M. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**. 2005. 109p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ. 2005.
- COHEN, P. A.; TOWERS, G. H. N. The anthraquinones of *Heterodermia obscurata*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 911-915, 1995.
- COLES, G.C. et al. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v. 44, p. 35–43, 1992.
- COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 27, p. 305–35, 1996.
- CORREA, S. M. V. C.; CONSERVA, L. M.; MAIA, J. G. S.; Constituents of roots of *Inga edulis* var. *parviflora*. **Fitoterapia**. v.66, n. 4, p. 379, 1995.
- CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants, Second edition, 1988.
- DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p. 38-42. 2010.
- DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; PAIVA, M. R. C. Florística e fitossociologia das espécies arbóreas das florestas da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do Rio Tibagi**. 1. ed. Londrina: Editores, 2002. p. 109-114.
- FALCÃO, D. Q. **Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul**. 2003. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. 2003.
- FERREIRA, G. C.; HOPKINS, M. J. G.; SECCO, R. S. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosae comercializadas no estado do Pará, como “angelim”. **Acta Amazônica**. v. 34, n. 2, p. 219-232, 2004.
- FLORA BRASILIENSIS. Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp (Universidade de Campinas). Disponível em: http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=3229. Acesso em 27 jul. 2010.
- GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo das folhas do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 610-613, 2005.

- GEORGETTI S. R. et al. Assessment of the antioxidant activity of two plants extracts containing isoflavonoids by different *in vitro* methods. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, p.252- 257, 2007.
- HANDS, R.M., The use of Inga in the acid soils of the rainforest zone: alley-cropping sustainability and soil-regeneration. In: Pennington, T.D., Fernandez, E.C.M., The Genus Inga Utilization. **The Royal Botanic Gardens**, Kew, Londres, Inglaterra, 1998, p. 53–86.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.
- HUNG, C.Y.; YEN, G.C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsiantso (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 34, p. 306-311, 2001.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**. v. 94, p. 550-557, 2006.
- KOPTUR, S. Alternative defenses against herbivores in Inga (Fabaceae: Mimosoideae) over an elevational gradient. **Ecology**, v. 66, n. 5, p. 1639-1650, 1985.
- KUMATZAWA S, HAMASAKA T, NAKAYAMA T (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**. v.84, p.329-339, 2004.
- LEBLANC, H. A.; NYGREN, P.; MCGRAW, R. L. Green mulch decomposition and nitrogen release from leaves of two Inga spp. in an organic alley-cropping practice in the humid tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 349–358, 2006.
- LEME, M.C.J.; DURIGAN, M.E.; RAMOS, A. Avaliação do potencial forrageiro de espécies florestais. In: **Seminário sobre Sistemas Agroflorestais na Região Sul do Brasil**. 1 ed. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. p.147-155.
- LEON, J. Central American and West Indian species of *Inga* (Leguminosae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 53, n. 3, p.265-359. 1966.
- LIANDA, R. L. P. **Perfil de Substancias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 185p. Tese (Doutorado em Química dos Produtos Naturais). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, RJ. 2009.
- LOKVAM, J. et al. Galloyl Depsides of Tyrosine from Young Leaves of *Inga laurina*. **Journal Natural Products**. v. 70, n. 1, p. 134-136, 2007.
- LOKVAM, J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). **Phytochemistry**. v. 65, p. 351–358, 2004.
- LOKVAM, J; KURSAR, T. A. Divergence in structure and activity of phenolic defences in young leaves of two co-occurring *Inga* species. **Journal of Chemical Ecology**. v. 31, n. 11, nov. 2005.

LOPEZ, J.A. et al. **Arboles comunes del Paraguay**: ñande yvyra mata kuera. Washington: Cuerpo de Paz, 425p. 1987.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum Ltda. v. 2. 368 p. 2002.

LUENGAS-CAICEDO. P. E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* snethl**: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vaso-relaxante. 2005. 292p. Tese (Doutorado em Ciências Farmaceuticas). Universidade Federal de minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG. 2005.

LUZ, S.M. et al. Atividade alelopática de substancias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, n. 3, p. 479-487, 2010.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**. v. 46, p. 13-18, 1998.

MATA, M. F.; FELIX, L. P. Flora da Paraíba, Brasil: *Inga* Mill. (Leguminosae - Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 135-137, jul. 2007.

MATSUBARA, S. et al. Short- and Long-Term Operation of the Lutein-Epoxide Cycle in Light-Harvesting Antenna Complexes. **Plant Physiology**, v.144, p. 926-941, jun. 2007.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: UFC. p. 52. 1997.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILLER, J. T. et al. A phylogenetic analysis of the *Acacieae* and *Ingeae* (Mimosoideae: Fabaceae) based on *trnK*, *psbA-trnH*, and *trnL/trnF* sequence data. **Systematic Botany**, v. 28, p. 558-566, 2003

MINHO, A. P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos**. 2006. 168p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2006.

MISRA, A. N.; TIWARI, H. P. Mass Spectral Studies of Phytosterolins and Ketone from *Trianthema pentandra*. **Phytochemistry**. v. 12, p. 393-395, 1973.

MORTON, T. C. Chemotaxonomic significance of hydroxylated piperolic acids in Central American *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae: *Ingeae*). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 26, p.379-401, 1998.

NUUTILA, A. M. KAMMIOVIRTA, K. OKSMAN-CALDENTY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**. v. 76, p. 519-525, 2002.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. 2007. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR. 2007.

PEREIRA, O. C. F. ***Rumex induratus*: Caracterização Química e Potencial Antioxidante**. 2009. 113p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade). Universidade do Porto (UP), Porto, PT. 2009.

PENNINGTON, T.D. 1997. The Genus *Inga*. Botany. **Royal Botanical Garden**. p. 844. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/293/5538/2242>. Acesso em 27 jul. 2010.

POSSETTE, R. F. S.; RODRIGUES, W. A. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 24, n.2, p.354-368. 2010.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant Capacity and Polyphenols Components of Teas: Implications for Altering In Vivo Antioxidant Status. **Proceeding of the Society for Experimental Biology Medicine**. v. 220, p. 255-261, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p.4290-4302, 2005.

PROESTOS, C. et al. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1190-1195, 2005.

RODRIGUES, J.B. **A Botânica, Nomenclatura indígena e seringueiras**. Edição comemorativa do sesquicentenário de João Barbosa Rodrigues. 1905. Edição Fac – simulada das obras "*MBAÉ KAA-TAPYIYETÁ ENOYNDAVA E AS HEVEAS*" pertencentes à biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

ROGINSKY, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235–254, 2005.

SANTOS, R. N.; SILVA, M. G. V.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Química Nova**. v. 31, n. 8, p. 1979-1981, 2008.

SILVA, S. R. S. S. **Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek**. 2007. 230p. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG. 2007.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**. v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SIQUEIRA, J. M. et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, 1998.

SOARES, A. Q. **Desenvolvimento e validação de metodologia por HPLC-PDA para monitoração terapêutica dos níveis plasmáticos de zidovudina e favirenz**. 2009. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO. 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. **Comptes Rendus Biologies**. n. 327, p. 649–662, 2004.

SOUZA, A. D. L. et al. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 4, p.439-442, 2001.

SOUZA, J. N. S. et al. Identification and Antioxidant Activity of Several Flavonoids of *Inga Edulis* Leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 18, p.1276, 2007.

THE PHEROBASE. Kovats Retention Index of Organic Compounds. Disponível em: <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>. Acesso em 27 out. 2011.

TREVISAM, T. T. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae. 2010. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná (UFP), Curitiba, PR. 2010.

VIVOT, E. et al. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 76, p. 65-71, 2001.

WATERMAN, P. et al. African rainforest vegetation and rumen microbes: phenolic compounds and nutrients as correlates of digestibility. **Oecologia** (Berlin) n. 47, p.22-33, 1980.

WRANGHAM, R. W.; WATERMAN, P. G. Feeding behavior of vervet monkeys on *Acacia tortilis* and *Acacia xanthophloea*: with special reference to reproductive strategies and tannin production. **Journal of Animal Ecology**. v. 50, p.715-731, 1981.

XIAO, H. T. et al. Chemical constituents from *Saussurea deltoidea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 4, p. 539-541, 2009.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function?. **American Naturalist**. v.121, p.335-365, 1983.