

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

TAINÁ SOUZA SILVA

Constituintes químicos e atividades farmacológicas
de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae)

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa – PB

2013

TAINÁ SOUZA SILVA

**Constituintes químicos e atividades farmacológicas
de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa – PB

2013

S586c *Silva, Tainá Souza.*

*Constituintes químicos e atividades
farmacológicas de Calliandra umbellifera Benth.
(Fabaceae) / Tainá Souza Silva.- João Pessoa,
2013.*

159f. : il.

Orientador: Josean Fechine Tavares

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

*1. Produtos Naturais. 2. Calliandra umbellifera
Benth. 3. Constituintes químicos. 4. Atividade
antimicrobiana. 5. Atividade antinociceptiva.*

TAINÁ SOUZA SILVA

**Constituintes químicos e atividades farmacológicas
de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae)**

Dissertação aprovada em 22 de fevereiro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

PhD em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(orientador)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

PhD em Química Orgânica
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinadora Interna)

Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

PhD em Química
Departamento do Medicamento da Faculdade de Farmácia
Universidade Federal da Bahia
(Examinador Externo)

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas, e os resultados somente através das experiências”.

Carl Gustav Jung

Dedico este trabalho a família Souza Silva, em especial aos meus pais, José Luciano Silva e Maria Isonete de Goes Souza por todo o afeto, apoio, motivação e, principalmente, pelo amor e carinho incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de aqui demonstrar o meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte desta etapa tão importante em minha vida. Este foi apenas o começo de muitos outros projetos ainda em construção, e é preciso saber reconhecer que sozinhos não conseguiríamos nada...

Quero agradecer primeiramente aos meus pais, **José Luciano Silva** e **Maria Isonete de Goes Souza**, por todo o amor, o carinho, a preocupação e a dedicação que sempre demonstraram ter a mim. Pelos esforços e noites mal dormidas em favor de minha educação e que me permitiram chegar até aqui. Saibam que esta vitória é NOSSA. Que estas palavras sejam a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo. Amo vocês.

As minhas irmãs, **Lara Souza Silva** pelo carinho e convivência quase sempre harmoniosa, a **Dandara Souza Silva** pelo carinho e por toda ajuda nessa reta final do mestrado. A meu sobrinho, Luca Silva Lucena, que trouxe alegria para nossa casa e que a cada dia me ensina mais e mais sobre a vida.

A meu namorado **João Jarllys Nóbrega de Souza**, por todo amor, carinho, amizade, apoio, dedicação, incentivo, compreensão e ajuda (até nos testes da psico...hehehe).

As minhas tias **Luciene Maria**, **Maria Helena** e **Vera Lúcia**, por todo apoio, amizade e carinho em todos os momentos da minha vida ("Essa é minha tia").

Aos meus sogros, **Geralda e João** por todo carinho, acolhimento e apoio em todas as refeições oferecidas durante esse período. A tia **Maria**, pelos doces e tapiocas que fez especialmente para mim (hehe). A meus cunhados, **Pedro Jali**, **Carla**, **João**, **Suzy**, **Leandro**, **Suênia**, **Denise** e **Maurício** pelo incentivo, carinho e apoio.

Ao meu orientador, o professor **Josean Fechine Tavares**, por todos os ensinamentos, por ter confiado e acreditado sempre em mim, aceitando ser meu orientador e por permitir e apoiar a realização desse trabalho.

A professora **Celidarque da Silva Dias**, pela amizade, ensinamentos, por ter me recebido como sua aluna de iniciação científica e me inserido na pesquisa de produtos naturais.

As alunas de iniciação científica **Thamires e Juliana**, pela realização conjunta deste trabalho, pela dedicação e companhia. Agradeço a Juliana, que é uma excelente iniciação científica, sempre atenta e disposta a ajudar. Obrigada pelos fins de semana em que foi olhar se os camundongos estavam bem e alimentá-los e por me ajudar principalmente na pesagem dos camundongos (já que eu tenho medo...kkkk).

Ao professor **Reinaldo Nóbrega** e ao mestrando **Diogo** pelos testes antinociceptivos. Obrigada Diogo, pela amizade desde a graduação e por estar sempre disposto a ajudar mesmo estando cheio de coisa para fazer, tendo sempre muita paciência para ensinar tudo.

A professora **Edeltrudes**, a **Camilla Pinheiro** e a **Jéssica** por se disponibilizarem a me ajudar a fazer os testes antimicrobianos e pela amizade.

Aos amigos e técnicos do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL), **Vicente Carlos de Oliveira Costa, Alexandro e Sócrates**, pela amizade, paciência, generosidade e pelo apoio na obtenção dos espectros de RMN, Massas e α -D.

A **Fábio Tenório de Souza**, meu eterno co-co-orientador, que mesmo tão atolado de trabalhos e aulas sempre deu um jeitinho de ajudar. Obrigada por todos os ensinamentos...quero ser igual a você quando crescer...hehehe

As amigas **Camila Holanda** (a menina dos flavonoides), **Eugênia** (a menina do HPLC) e **Graciele** (a garota das feoftinas), que fiz durante o

mestrado e que espero mantê-las por muito tempo. Obrigada por todos os momentos de felicidade e angústia que compartilhamos.

A **Ana Silvia, Jaqueline, Narlize Lira, Madalena e Élide**, pela amizade, carinho e excelente convivência no laboratório.

A equipe de pesquisa do professor Marcelo e Josean, em especial a **Heloisa, Anne Dayse e Sara**, pela amizade e ajuda durante esses dois anos.

As alunas de Iniciação Científica, em especial, **Roseane, Cléria, Karliene e Mayza**, pela amizade, companheirismo e constante ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Farmacobotânica, **Niara e Nathalia Diniz**, pela amizade, conselhos, incentivos e ajuda com a identificação da espécie.

Aos meus amigos **Cinthia, Rafaela, Raquel, Bruna, Pedro, Jaqueline Bueno, Sandro e Evandro**, pela amizade, pela compreensão, por serem amigos para todas as horas e por todos os momentos divertidos que passamos juntos. Desculpa aí as festas não idas, e as visitas bastante irregulares. Agradeço em especial a Bruna, Rafaela e Evandro pela ajuda até nos testes da psico.

Aos professores da Pós-Graduação, em especial, a **Bagnólia Araújo Costa, Eduardo de Jesus Oliveira e Maria de Fátima Vanderlei de Souza**, por todos os ensinamentos específicos da área e para vida.

A professora **Maria de Fátima Agra** pela coleta, identificação da espécie e pela amizade.

A todos os meus amigos da turma de Mestrado 2010 pela boa convivência durante e após o término das disciplinas.

A todos os técnicos de laboratório, em especial, **Raimundo Nonato da Silva Filho e Ataíde** pela enorme ajuda nos experimentos, bem como, pela

amizade, excelente convivência e por serem exemplos de funcionários públicos. A **Carol**, secretária do curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e a todos os seguranças e funcionários da limpeza e da manutenção por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

A **Wellington** pelos Infravermelhos e a **Crispim** por sempre dar um jeitinho de conseguir os camundongos sempre que eu precisava fazer os experimentos.

A Universidade Federal da Paraíba pelo suporte técnico e estrutural; ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido e a todos os brasileiros que por meio do pagamento dos impostos, torna possível o desenvolvimento de pesquisas em nosso país.

A **Deus**, que com certeza foi e é responsável para que tudo isto fosse real no dia de hoje, a quem eu devo a vida e o privilégio de conhecer todas estas pessoas.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

Tainá Souza Silva

RESUMO

SILVA, T. S. Constituintes químicos e atividades farmacológicas de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae). 2013. 150 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

O gênero *Calliandra* Benth. pertence a família Fabaceae e é composto por 200 espécies que se distribuem na América tropical, Madagascar e Índia, sendo conhecidas no Brasil como esponjinhas e podendo ser encontradas em seu habitat natural, na região do cerrado, chegando até áreas de caatinga no nordeste. Espécies desse gênero são usadas popularmente para dores renais, cistites, uretrites, inflamações da próstata, febre e dor de dente. *Calliandra umbellifera* Benth. é uma espécie em extinção que foi coletada apenas no Ceará e no Piauí e não apresenta relatos de uso popular, nem atividade farmacológica e fitoquímica. Desta forma, este trabalho objetivou contribuir com os estudos farmacognósticos do gênero *Calliandra* e da família Fabaceae por meio do estudo fitoquímico e farmacológico de *Calliandra umbellifera* Benth. Para isto, o material vegetal foi coletado no Pico do Jabre (município de Maturéia - estado da Paraíba) e uma exsicata deste foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) com o código 7430. Para o estudo farmacoquímico, o vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração com metanol, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. A estrutura química das substâncias isoladas foi elucidada mediante métodos espectroscópicos, tais como: Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparações com modelos da literatura. Da fase hexânica obteve-se uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol), da fase diclorometano (CH_2Cl_2) foi isolado e identificado um ácido aromático: ácido atrárico, da fase acetato de etila (AcOEt) obteve-se o ácido gálico, o pinitol e a iriflofenona glicosilada, sendo esta última isolada pela primeira vez na família Fabaceae, e da fase hidrobutanólica isolou-se a mistura de esteróides glicosilados (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados). No estudo farmacológico foram analisadas a atividade antimicrobiana do extrato bruto, das fases acetato de etila e hidrobutanólica e dos constituintes isolados (iriflofenona glicosilada e pinitol), e atividade antinociceptiva do extrato bruto. Na atividade antimicrobiana foi observado que o extrato e as fases testadas possuem forte atividade antibacteriana, tendo sua concentração inibitória mínima (CIM) estabelecida entre 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$, entretanto não apresentaram atividade antifúngica. Enquanto que, as substâncias isoladas (Iriflofenona glicosilada e pinitol) não apresentaram atividade antibacteriana, no entanto, apresentaram forte atividade antifúngica, com uma CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$. Com relação a atividade antinociceptiva, o extrato metanólico bruto apresentou atividade significativa para o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e para o modelo de nocicepção induzido pela formalina e pelo glutamato, sugerindo possível atividade analgésica periférica.

Palavras-chave: Fabaceae, *Calliandra umbellifera* Benth., constituintes químicos, antimicrobiana, antinociceptiva.

ABSTRACT

SILVA, T. S. Constituintes químicos e atividades farmacológicas de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae). 2013. 150 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

The genus *Calliandra* Benth. belongs to the Fabaceae family and composes 200 species distributed in tropical America, Madagascar and India, being known in Brazil as “esponjinhas” and can be found in their natural habitat, the Cerrado region, reaching the Caatinga areas in Northeast. Species of this genus are popularly used for kidney pain, cystitis, urethritis, inflammation of the prostate gland, fever and toothache. *Calliandra umbellifera* Benth is an extincted species that was collected only in Ceará and Piauí and has no reports of popular use, or phytochemical and pharmacological activity. Thereby, this study aimed to contribute with the pharmacognostic studies of *Calliandra* and Fabaceae through the pharmacological and phytochemical study of *Calliandra umbellifera* Benth. For this, the plant material was collected in Pico do Jabre (Maturéia - Paraíba) and an exsicata was deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) with code 7430. For the phytochemical study, the vegetable, after drying and pulverization, was submitted to extraction process with methanol, partition and chromatography for isolating the chemical constituents. The chemical structure of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic methods such as InfraRed (IR), Mass Spectrometry (MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C uni and bi-dimensional and comparisons with literature. From the hexane phase was obtained a mixture of steroids (β -sitosterol and stigmasterol), from the the dichloromethane phase (CH_2Cl_2) was isolated and identified one aromatic acid: atraric acid, from the ethyl acetate (AcOEt) phase was obtained gallic acid, the pinitol and the iriflofenona glucosyde, the last one being first isolated in the Fabaceae family, and from the phase hydrobutanolic was isolated the mixture of glycosides steroid (β -sitosterol and stigmasterol glycosylated). In the pharmacological study were analyzed the antimicrobial activity of the crude extract, the ethyl acetate and hydrobutanolic phases and the isolated constituents (iriflofenona glycosylated and pinitol), and antinociceptive activity of the crude extract. In antimicrobial activity was observed that the extract and the tested phases show strong antibacterial activity, having established its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) between 256 and 128 mg/mL, however showed no antifungal activity. While the isolated compounds (Iriflofenona glycosylated and pinitol) showed no antibacterial activity, however, showed strong antifungal activity, with an MIC of 128 mg / mL. Concerning the antinociceptive activity, the crude methanol extract showed significant activity for the abdominal contractions test induced by acetic acid and for the model of nociception induced by formalin and glutamate, suggesting a possible peripheral analgesic activity.

Keywords: Fabaceae, *Calliandra umbellifera* Benth., Chemical constituents, antimicrobial, antinociceptive.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AcOEt	Acetato de Etila
AINE	Anti-inflamatórios não-esteroidais
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BPS	Benzofenona sintase
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃OH	Metanol
cm	Centímetro
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DL₅₀	Dose letal 50%
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EMB	Extrato Metanólico Bruto
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
H₂O	Água
Hb	Hidrobutanólica
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz

IES-EM	Espectro de massas por ionização de electrospray
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
Kg	Quilograma
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Massa/carga
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MEP	Via do metileritritol-fosfato
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
n-BuOH	n-butanol
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Análise
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKS	Policetídeo sintase
PAL	Fenilalanina amônio liase
ppm	Partes por milhão
pyd5	Piridina deuterada
<i>q</i>	Quarteto
<i>R_f</i>	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>S</i>	Simpleto
<i>s/</i>	Simpleto largo
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>t</i>	Triplete
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em ppm
μg	Micrograma

µm

Micromètre

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	46
Esquema 2.	Fracionamento da fase acetato de etila do extrato metanólico bruto de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	49
Esquema 3.	Fracionamento da fase diclorometano do extrato metanólico bruto de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	50
Esquema 4.	Fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico bruto de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	51
Esquema 5.	Fracionamento da fase hidrobutanólica do extrato metanólico bruto de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação do número de espécies apresentadas por algumas famílias do Reino Vegetal: (a) Asteraceae, (b) Orchidaceae, (c) Leguminosae, (d) Rubiaceae e (e) Graminae.....	22
Figura 2.	Distribuição de espécies da família Fabaceae no mundo.....	23
Figura 3.	Distribuição de espécies da família Fabaceae nas regiões brasileiras.....	24
Figura 4.	Distribuição de espécies da família Fabaceae nos domínios fitogeográficos brasileiros.....	24
Figura 5.	Distribuição de espécies do gênero <i>Calliandra</i> Benth no mundo...	26
Figura 6.	Distribuição das espécies de <i>Calliandra</i> Benth nas regiões brasileiras.....	27
Figura 7.	<i>Calliandra</i> em floração.....	27
Figura 8.	Fotos de <i>Calliandra umbelífera</i>	30
Figura 9.	Estrutura básica das benzofenonas.....	31
Figura 10.	Esquema da biossíntese das benzofenonas.....	31
Figura 11.	Possíveis configurações encontradas para os inositóis.....	33
Figura 12.	Conversão da d-glicose para myo-inositol: (A) Hexoquinase; (B) Sintase de 1L-myoinositol-1-P; (C) monofosfatase de myo-inositol.....	33
Figura 13.	Mecanismo enzimático da sintase de 1L-myoinositol-1-P.....	34
Figura 14.	Estrutura química básica dos esteroides.....	36
Figura 15.	Visão geral do circuito da nocicepção.....	42
Figura 16.	Microplaca de 96 poços.....	57
Figura 17.	Caixa de observação para o teste da formalina.....	60
Figura 18.	Contorção abdominal seguida de extensão dos membros posteriores.....	63
Figura 19.	Camundongo lambendo a pata posterior que recebeu a formalina.....	64

Figura 20.	Espectro de RMN ^1H de Ca-1 (200 MHz, CD_3OD).....	67
Figura 21.	Possibilidades estruturais de Ca-1.....	68
Figura 22.	Espectro de RMN ^{13}C de Ca-1 (200 MHz, CD_3OD).....	68
Figura 23.	Possibilidades estruturais para Ca-1: (a) ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico; (b) ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico.....	69
Figura 24.	Estrutura do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico).....	69
Figura 25.	Espectro de IV (KBr , cm^{-1}) de Ca-2.....	71
Figura 26.	Espectro de RMN ^1H de Ca-2 (500 MHz, CD_3OD).....	72
Figura 27.	Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-2 na região de 6,0 a 7,8 (500 MHz, CD_3OD).....	73
Figura 28.	Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-2 na região de 3,0 a 4,9 ppm (500 MHz, CD_3OD).....	73
Figura 29.	Espectro de RMN ^{13}C - APT de Ca-2 (125 MHz, CD_3OD).....	74
Figura 30.	Estrutura básica de uma benzofenona.....	75
Figura 31.	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Ca-2.....	77
Figura 32.	Espectro NOESY (500 x 500 MHz, CD_3OD) de Ca-2.....	78
Figura 33.	Valores de RMN ^{13}C para os carbonos 2, 4 e 6 em (a) 2,6,4'-Trihidroxibenzofenona 4-O- β -d-Glicopiranosídeo, (b) 2,4,3',4'-tetrahidroxibenzofenona 6-O- β -glicopiranosídeo e (c) 4,6,4'-trihidroxibenzofenona 2-O- β -d-Glicopiranosil.....	78
Figura 34.	Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Ca-2.....	79
Figura 35.	Espectro de massas ESI-MS de Ca-2.....	81
Figura 36.	Proposta de fragmentação de Ca-2.....	82
Figura 37.	Estrutura química de Ca-2: 4,6,4'- trihidroxibenzofenona 2-O- β -d-Glicopiranosil ou Iriflofenona 2-O- β -d-Glicopiranosídeo.....	82
Figura 38.	Espectro de IV (KBr , cm^{-1}) de Ca-3.....	84
Figura 39.	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Ca-3.....	85
Figura 40.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Ca-3 na região de 40 a 100 ppm.....	86

Figura 41.	Estrutura de um poliol ciclohexânico metoxilado.....	86
Figura 42.	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-3.....	87
Figura 43.	Expansão do RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-3 na região de 3,00 a 4,00 ppm.....	88
Figura 44.	Estrutura dos inositóis.....	88
Figura 45.	Expansão do espectro HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Ca-3 na região de (3,0 - 4,0 ppm) x (60 – 90 ppm).....	89
Figura 46.	Expansão do espectro HMQC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Ca-3 na região de (3,0 – 4,2 ppm) x (55 – 100 ppm).....	90
Figura 47.	Estrutura espacial do <i>chiro</i> -inositol.....	90
Figura 48.	Espectro de massas ESI-MS de Ca-3.....	92
Figura 49.	Estrutura química do 3- <i>O</i> -metil- <i>D-chiro</i> -inositol (pinitol).....	92
Figura 50.	Conversão bioquímica do <i>myo</i> -inositol para pinitol. Os colchetes indicam um intermediário teórico.....	93
Figura 51.	Espectro de RMN ^1H de Ca-4 (200 MHz, CDCl_3).....	95
Figura 52.	Espectro de RMN ^{13}C de Ca-4 (50 MHz, CDCl_3).....	96
Figura 53.	Estrutura química do 2,4-diidroxi-6,3-dimetil-benzoato de metila (ácido atrárico).....	97
Figura 54.	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5.....	100
Figura 55.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5 na região de 3,3 a 5,5 ppm.....	101
Figura 56.	Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5 na região de 0,5 a 2,4 ppm.....	101
Figura 57.	Espectro RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5.....	102
Figura 58.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5 na região de 35,0 – 58,0 ppm.....	103
Figura 59.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5 na região de 11,0 – 34,0 ppm.....	103
Figura 60.	Estruturas químicas de Ca-5: β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita).....	104

Figura 61.	Espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6.....	104
Figura 62.	Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 2,2 a 5,8 ppm.....	106
Figura 63.	Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 3,8 a 5,6 ppm.....	107
Figura 64.	Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 0,5 a 1,2 ppm.....	107
Figura 65.	Espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6.....	108
Figura 66.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 12 a 52 ppm.....	109
Figura 67.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 56 a 104 ppm.....	109
Figura 68.	Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 114 a 156 ppm.....	110
Figura 69.	Estrutura de sitosterol-3-O-D-glicopiranosídeo (Ca-6a) e estigmasterol-3-O-D-glicopiranosídeo (Ca-6b).....	110
Figura 70.	Efeito do EMB de <i>C. umbellifera</i> nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg por via oral sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais em camundongos (n=8). **p < 0,01. ***p < 0,001.....	120
Figura 71.	Efeito de EEHc nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg (oral) e morfina na dose de 10 mg/kg, na primeira fase do teste da formalina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=8). ***P<0,001 (ANOVA seguido do teste de Dunnett).....	122
Figura 72.	Efeito de EEHc nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg (oral) e morfina na dose de 10 mg/kg, na segunda fase do teste da formalina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=8). ***p<0,001 (ANOVA seguido do teste de Dunnett).....	123
Figura 73.	Figura 73. Efeito do pré-tratamento (1h; oral) dos animais com veículo (grupo controle) ou EMB nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg sobre a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$), em camundongos. Cada barra representa a média do tempo de lambida da pata (s) de 6-8 animais durante os 15 min iniciais $\pm$ E.P.M. **p < 0,01 representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparados com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).....	124

LISTA QUADROS

Quadro 1.	Estrutura de algumas substâncias isoladas de espécies de <i>Calliandra</i>	29
Quadro 2.	Quantificação da atividade antinociceptiva de acordo com tempo	62
Quadro 3.	Possibilidades estruturais de Ca-2	76
Quadro 4.	Substâncias isoladas de <i>Calliandra umbellifera</i>	113
Quadro 5.	Principais alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração de diferentes doses de EMB. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso]. (n=8).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase acetato de etila de <i>Calliandra umbelífera</i>	48
Tabela 2.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ca-1 (200 MHz e 50 MHz, CD_3OD) em comparação com dados da literatura (200 MHz e 50 MHz, CD_3OD).....	70
Tabela 3.	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância Ca-2, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CD_3OD	80
Tabela 4.	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ca-2 e da Iriflofenona 2-O- β -d-glicopiranosídeo da literatura em CD_3OD	81
Tabela 5.	Dados de RMN ^1H e ^{13}C em metanol deuterado de Ca-3 e dados de RMN ^{13}C do pinitol (CD_3OD) presente na literatura.....	92
Tabela 6.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ca-4 (200 MHz e 50 MHz, CDCl_3) em comparação com dados da literatura.....	98
Tabela 7.	Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de Ca-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Tomaz (2008) para as mesmas substâncias.....	104
Tabela 8.	Dados de RMN ^{13}C (pyd5, 500 MHz) para Ca-6 e comparação com os dados da literatura.....	111
Tabela 9.	Valores de CIM do EMB e das fases AcOEt e Hidrobutanólica (Hb) de <i>Calliandra umbellifera</i> Benth. sobre os microrganismos testados.....	114
Tabela 10.	Valores de CIM das substâncias isoladas (iriflofenona glicosilada e pinitol) de <i>Calliandra umbellifera</i> sobre seis bactérias e seis leveduras.....	116

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE.....	22
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Calliandra</i> Benth	26
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth	30
3.4 CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS, BIOLÓGICAS, FARMACOLÓGICAS E BIOSSINTÉTICAS SOBRE AS CLASSES DE CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	30
3.4.1 Benzofenonas	30
3.4.2 Ciclitóis	32
3.4.3 Compostos fenólicos	34
3.4.4 Esteroides	35
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS	37
3.5.1 Atividade antibacteriana	37
3.5.2 Atividade antifúngica	38
3.6 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PRODUTOS NATURAIS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.	45
4.1.1 Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto (EMB)	45
4.1.2 Isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	47
a) <i>Processamento cromatográfico da fase acetato de etila.....</i>	48

b) Processamento cromatográfico da fase diclorometano.....	49
c) Processamento cromatográfico da fase hexânica.....	51
d) Processamento cromatográfico da fase n-butanólica.....	51
4.1.3. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados.....	52
a) Espectroscopia de Infravermelho (IV)	53
b) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	53
c) Espectrometria de Massas (EM)	54
d) Rotação óptica e ponto de fusão	54
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO, DAS FASES ACETATO DE ETILA E HIDROBUTANÓLICA E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	55
4.2.1 Local de trabalho	55
4.2.2 Produtos testados.....	55
4.2.3 Antimicrobianos sintéticos.....	55
4.2.4 Microrganismos.....	55
4.2.5 Meios de cultura.....	66
4.2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	56
4.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	68
4.3.1 Local de trabalho.....	58
4.3.2 Material.....	58
4.3.2.1 Animais.....	58
4.3.2.2 Substâncias usadas.....	59
4.3.2.3 Caixa de observação para o teste da formalina.....	59
4.3.3 Testes preliminares.....	60
4.3.3.1 Determinação da DL ₅₀	60
4.3.3.2 Triagem farmacológica experimental.....	61
4.3.4 Teste das contorções abdominais induzida por ácido acético.....	63
4.3.5 Teste da formalina.....	64
4.3.6 Teste do glutamato.....	65
4.3.7 Análise estatística.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-1.....	67

5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-2.....	71
5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-3.....	84
5.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-4.....	95
5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-5 e Ca-6.....	100
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO, DAS FASES ACETATO DE ETILA E HIDROBUTANÓLICA E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	114
5.7 AVALIAÇÕES DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE <i>Calliandra umbellifera</i> Benth.....	118
5.7.1 Determinação da DL₅₀.....	118
5.7.2 Triagem.....	118
5.7.3 Testes Específicos.....	119
5.7.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	119
5.7.3.2 Teste da formalina.....	121
5.7.3.3 Modelo de nocicepção induzido por glutamato.....	123
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	126
REFERÊNCIAS.....	129

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Através da observação e da experimentação das civilizações primitivas as propriedades terapêuticas das plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, passando desse modo a fazer parte da cultura popular (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006 *apud* SOUZA *et al.*, 2012).

Amenizar o sofrimento e tentar curar doenças pela ingestão de ervas e folhas, possivelmente foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2006). A utilização de diversas plantas na medicina popular representa uma investigação pré-clínica que não pode ser ignorada ou desprezada. Aproximadamente 74% dos principais produtos medicinais obtidos de vegetais foram descobertos através de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular (CENTRY, 1993).

No Brasil, a relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos permitem diagnosticar e destacar as plantas brasileiras como fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, além de outros produtos que podem ser utilizados para finalidades sociais adicionais (BRAZ-FILHO, 2010).

A caatinga é a vegetação predominante no Nordeste do Brasil (PRADO, 2003), apresentando uma heterogeneidade marcante com várias fisionomias, o que faz dela um ambiente de extrema importância biológica (MMA, 2002). Apesar de a caatinga apresentar uma alta taxa de diversidade e endemismo, este é o bioma menos estudado entre as regiões fitogeográficas brasileiras e o menos protegido pelas unidades de conservação e proteção integral (LEAL *et al.*, 2003). Faz-se necessário, portanto, um melhor conhecimento de sua flora para possíveis medidas de conservação de suas áreas (PRADO, 2003).

A diversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais isoladas de plantas da flora brasileira, o potencial relevante deste arsenal químico para o desenvolvimento social e econômico e a correspondente contribuição da química de produtos naturais para o avanço científico e tecnológico nos levam a perceber a importância da pesquisa contínua e crescente de produtos naturais (BRAZ-FILHO, 1994).

Na atualidade, as plantas com propriedades medicinais vêm contribuindo gradativamente para os cuidados básicos com a saúde. Estimativas atuais evidenciam que mais de 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular e de medicamentos a base de plantas como fontes primárias de cuidados à saúde (MS, 2009).

A procura por antimicrobianos de ocorrência natural vem sendo incentivada cada vez mais devido à resistência cada vez maior dos micro-organismos prejudiciais à saúde frente à maioria dos antimicrobianos conhecidos. Linhas de pesquisas têm sido desenvolvidas com êxito por diversos pesquisadores, baseadas nas propriedades anti-infecciosas de muitas plantas de utilização consagrada pela medicina popular e poderão contribuir inovadoramente na terapêutica antimicrobiana (SARTORI, 2005; DUARTE, 2006).

O tratamento da dor também tem sido motivo de preocupação e de vários estudos para pesquisadores, pois apesar da variedade de substâncias e do avanço no desenvolvimento das terapias de controle da dor, ainda há uma necessidade urgente de analgésicos potentes e com menos efeitos adversos, principalmente para os casos de dor crônica. Neste sentido, inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo têm voltado sua atenção para busca por novos analgésicos derivados de produtos naturais (CALIXTO *et al.*, 2000; LIRA, 2002; SIMÕES, 2007).

Percebendo o potencial das substâncias isoladas de espécies da família Fabaceae e a ocorrência de muitas espécies de *Calliandra* ainda não devidamente exploradas do ponto de vista químico e farmacológico, optou-se pelo estudo de *Calliandra umbellifera* Benth., que se trata de uma espécie em extinção e cujos estudos químicos e farmacológicos ainda não foram realizados. Neste aspecto, este trabalho pode incentivar o cultivo dessa espécie, levando a inclusão de uma nova espécie no rol de plantas a serem pesquisadas, a obtenção de novas substâncias e aplicação terapêutica.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento do gênero *Calliandra* e da família Fabaceae enfatizando os aspectos fitoquímico e farmacológico de *Calliandra umbellifera* Benth.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar fitoquimicamente a espécie *Calliandra umbellifera* Benth., por meio do isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos, a fim de obter modelos moleculares bioativos, bem como, traçar um perfil químico da planta.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto, das fases acetato de etila e hidrobutanólica e das substâncias isoladas de *Calliandra umbellifera* Benth. sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.
- Avaliar a atividade antinociceptiva do extrato metanólico bruto em modelos experimentais de nocicepção induzida por agentes químicos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A Caatinga é o bioma predominante no Nordeste do Brasil, se estendendo do Piauí a Minas Gerais. Sua vegetação apresenta-se extremamente heterogênea, incluindo pelo menos uma centena de diferentes tipos de paisagens únicas, fazendo dela um ambiente de extrema importância biológica (MMA, 2002).

No ambiente de Caatinga, a família Fabaceae é a melhor representada, correspondendo a aproximadamente 30% do total de espécies vegetais descritas para esse bioma, onde foram registrados 77 gêneros e 293 espécies. Além disso, as espécies de Leguminosae estão completamente inseridas na cultura da população rural da Caatinga, sendo utilizada como alimento, lenha, forragem, produtos medicinais e até nos rituais religiosos destas populações, indicando ser esse grupo de plantas uma fonte significativa de recursos naturais, especialmente para os habitantes do semiárido (QUEIROZ, 2006; QUEIROZ, 2009).

De acordo com Juchum (2007), a família Fabaceae (anteriormente classificada como Leguminosae) é a terceira maior família das Angiospermas relatadas (Figura 1), maior divisão do reino vegetal, que compreende as plantas superiores que contém sementes encerradas no ovário e, portanto podem formar frutos (JOLY, 2002 *apud* VIRTUOSO, 2005).

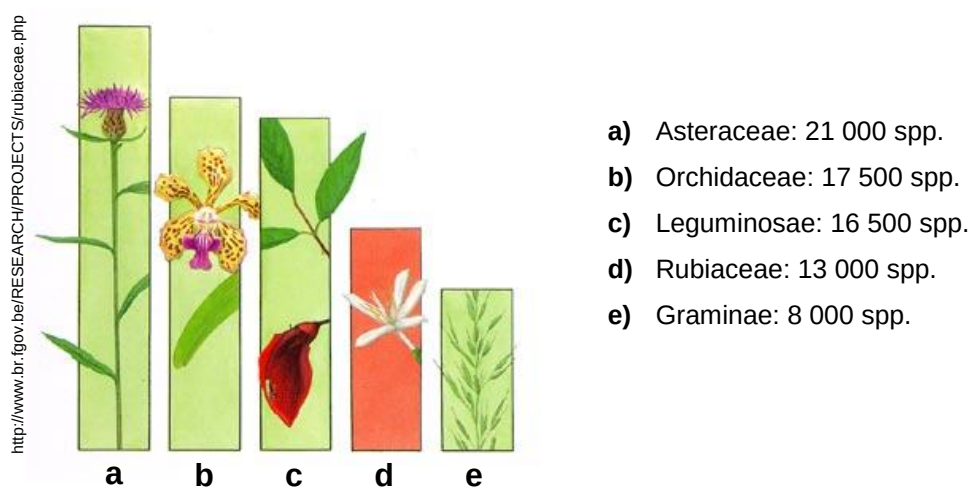


Figura 1. Comparação do número de espécies apresentadas por algumas famílias do Reino Vegetal: (a) Asteraceae, (b) Orchidaceae, (c) Leguminosae, (d) Rubiaceae e (e) Graminae (BACKLUND *et al.*, 2000).

Três subgrupos são geralmente reconhecidos como pertencentes à família Fabaceae: Caesalpinoide, Mimosidae e Faboideae (Papilionoideae). Em muitas classificações, estas são consideradas como subfamílias, mas algumas vezes são tratadas como famílias separadas. Dentre estes três grupos, Faboideae apresenta-se como o maior, seguido por Caesalpinoideae e Mimosoideae (JUDD *et al*, 1999 *apud* MAIA, 2008).

Os três subgrupos têm em comum: ovário súpero, unicarpelar, legume e a capacidade de apresentar nodosidades nas raízes (SOUZA & SOUZA, 2011). Entretanto, uma diferença entre elas é a capacidade de fixação de nitrogênio, pois, esta propriedade é manifestada na maioria das espécies de Papilionoideae, enquanto que em Caesalpinoideae, considerado o grupamento mais primitivo das leguminosas, os indivíduos que nodulam são a minoria (CORBY, 1988).

Segundo Juchum (2007), a família das leguminosas compreende mais de 730 gêneros que reúnem mais de 19.400 espécies no mundo (uma das maiores dentre as dicotiledôneas) e estão espalhadas em todo o mundo especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 2).

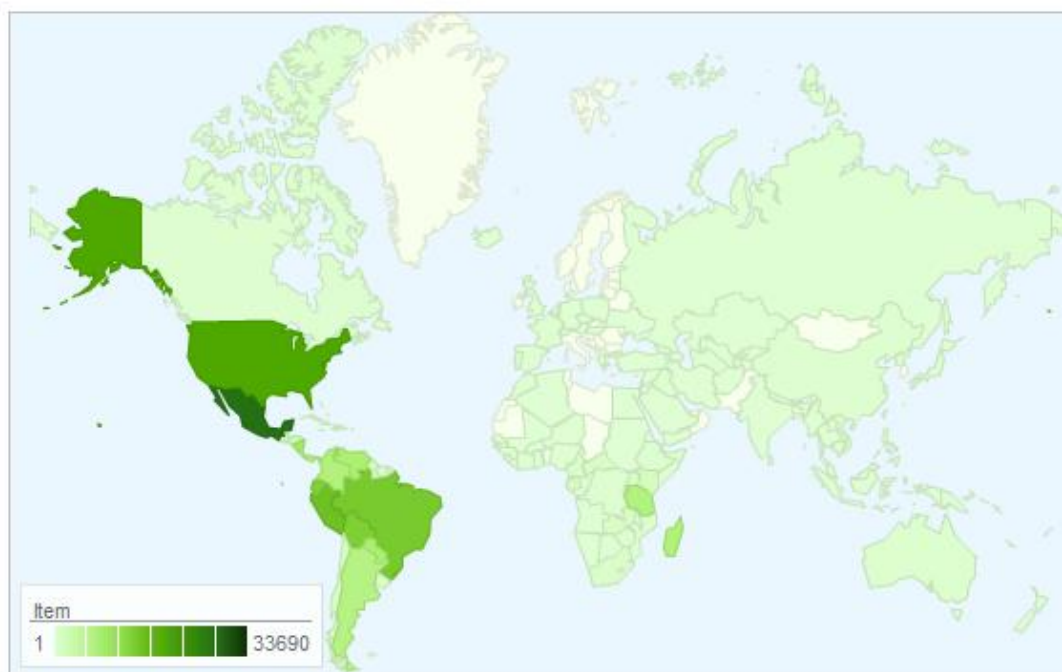


Figura 2. Distribuição de espécies da família Fabaceae no mundo (Fonte: Missouri Botanical Garden, 2012).

No Brasil, foram catalogados 212 gêneros e 2716 espécies da família Fabaceae, sendo encontrados em maior quantidade na região norte, no domínio do cerrado (Figuras 3 e 4) (LIMA *et al.*, 2012).

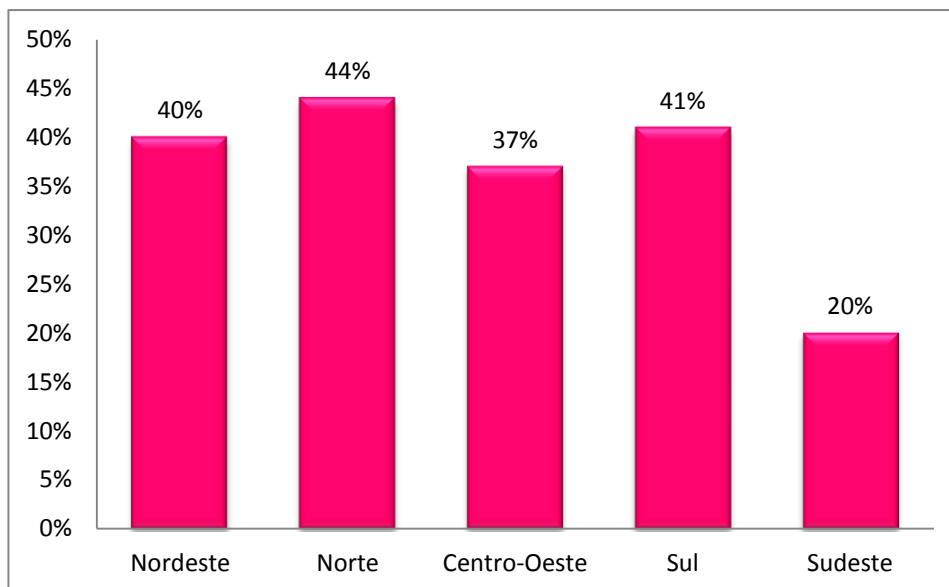


Figura 3. Distribuição de espécies da família Fabaceae nas regiões brasileiras (LIMA *et al.*, 2012).

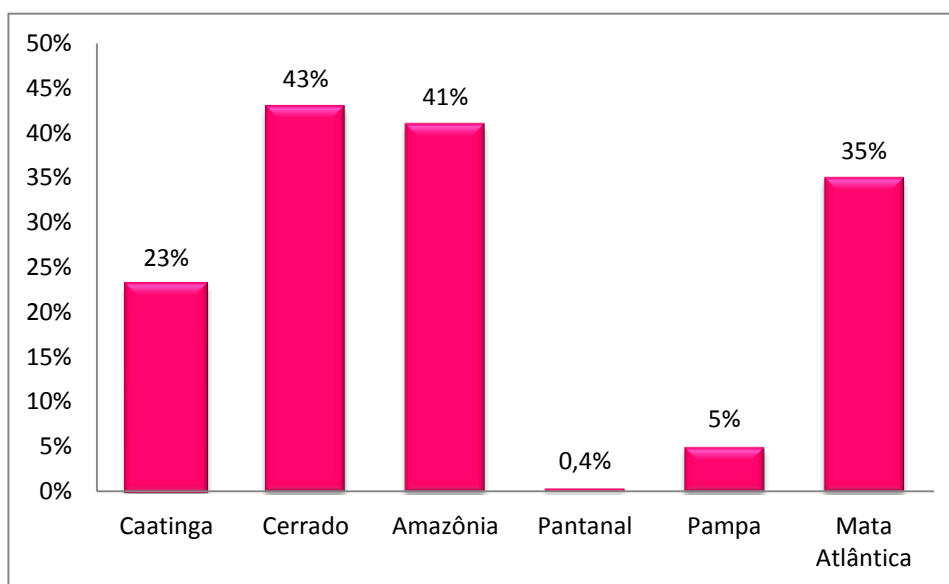


Figura 4. Distribuição de espécies da família Fabaceae nos domínios fitogeográficos brasileiros.

De modo geral, plantas dessa família caracterizam-se como ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas ou escadentes, subarbustos, arbustos eretos e árvores de pequeno, médio e grande porte, com sistema

radicular bem desenvolvido e predominância da raiz principal sobre suas ramificações (MAIA, 2008).

Seu valor econômico é significativo e junto com as gramíneas representam as mais importantes famílias produtoras de alimentos vegetais (SALINAS, 1992). São cultivadas desde a antiguidade como alimentícias (lentilha, ervilha, feijão); forrageiras (alfafa, trevos, ervilhacas); oleaginosas (soja, amendoim); adubo verde (tremoços); tintóreas (índigo, pau-brasil); tânicas (acácia-negra); fornecedoras de celulose (bracatinga); melíferas (alfafa, trevos-de-cheiro); medicinais (pata-de-vaca, erva-de-touro); florestais (canafístula, angico); ornamentais (guapuruvú, corticeiras) (MIOTTO, 2008), fixadoras de nitrogênio, através da simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios (*Rhizobiaceae*) presentes no solo, permitindo que sejam utilizadas na agricultura como plantas para adubação verde (SOUZA & SOUZA, 2011).

O uso medicinal das plantas pertencentes à família *Fabaceae* pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo nos estudos científicos, que comprovam a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais.

Espécies desta família são utilizadas popularmente como antifúngicas (FENNER *et al.*, 2006), no tratamento de doenças respiratórias, de diabetes, de infecções renais e de doenças hepáticas, (COVA & MONDADORI, 2006; VIEIRA, 1992 *apud* SOUZA & SOUZA, 2011), para dores de estômago, flatulência, dores de cabeça (LEVI-STRAUSS, 1997 *apud* SOUZA & SOUZA, 2011), no tratamento de insônia, desordens do sistema nervoso central e processos inflamatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Cientificamente, já foram relatados diversos efeitos biológicos ou farmacológicos para espécies dessa família, entre eles, efeito antibacteriano, analgésico, anti-inflamatório, antifúngico e antidiabético (SILVA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Espécies dessa família são reputadas pelo grande número de ocorrências de flavonoides, em especial isoflavonoides com atividade antimicrobiana, como também pela presença de alcaloides com atividade cardioativa, terpenoides, taninos e esteroides (CORDELL *et al.*, 2001).

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Calliandra* Benth.

O gênero *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoideae) é composto por 200 espécies que se distribuem a partir do sudeste dos Estados Unidos ao Uruguai, região de clima temperado quente da Argentina e norte do Chile (Figura 5). Trinta espécies são restritas à América do Norte, quatro espécies distribuídas na América do Norte ao norte da América do Sul, seis espécies endêmicas do Caribe, setenta e quatro espécies concentradas no Brasil - principalmente no nordeste (Figura 6), vinte e seis espécies restritas ao norte, nordeste e leste da América do Sul (a partir das Guianas, ao sul do Peru e leste da Bolívia), sendo encontradas também em Madagascar e na Índia (MATTAGAJASINGH *et al.*, 2006; LEWIS & RICO 2005; SOUZA, 2012).



Figura 5. Distribuição de espécies do gênero *Calliandra* Benth. no mundo. Fonte: Missouri Botanical Garden, 2012.

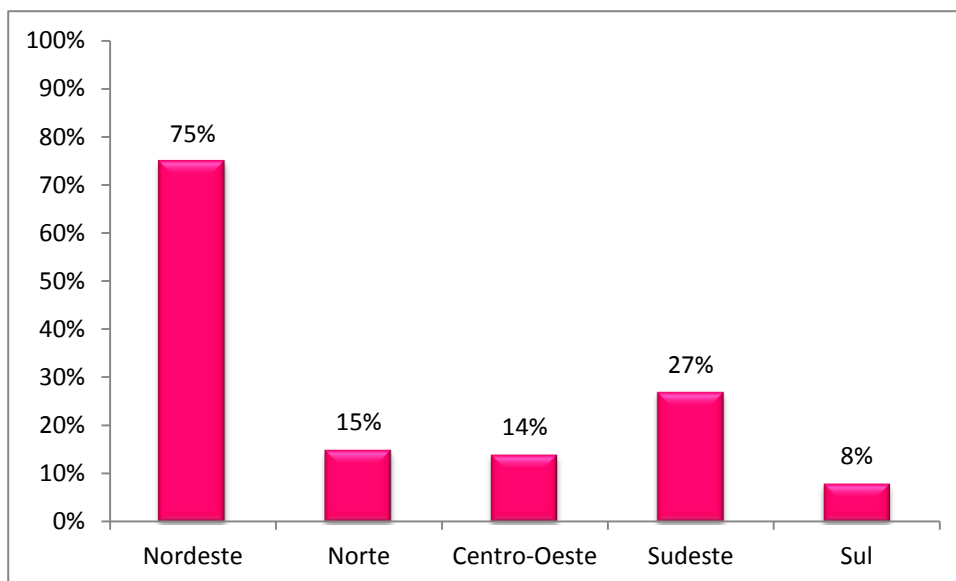


Figura 6. Distribuição das espécies de *Calliandra* Benth nas regiões brasileiras (Fonte: SOUZA, 2012).

Muitas espécies de *Calliandra* são cultivadas em jardins como plantas ornamentais devido a sua aparência atrativa com lindas flores esféricas com longos estames de cores diferentes e com folhas pinadas ou bipinadas, ou seja, as folhas apresentam-se divididas em folíolos, e estes por sua vez divididos em outras folhas ainda menores (Figura 7) (MATTAGAJASINGH *et al.*, 2006).



Figura 7. *Calliandra* em floração (BARBOSA, 2008)

No Brasil são conhecidas como esponjinhas e podem ser encontradas em seu habitat natural, na região do cerrado, chegando até as áreas da

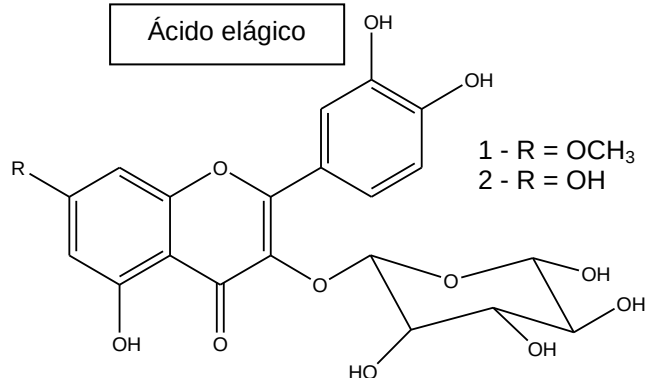
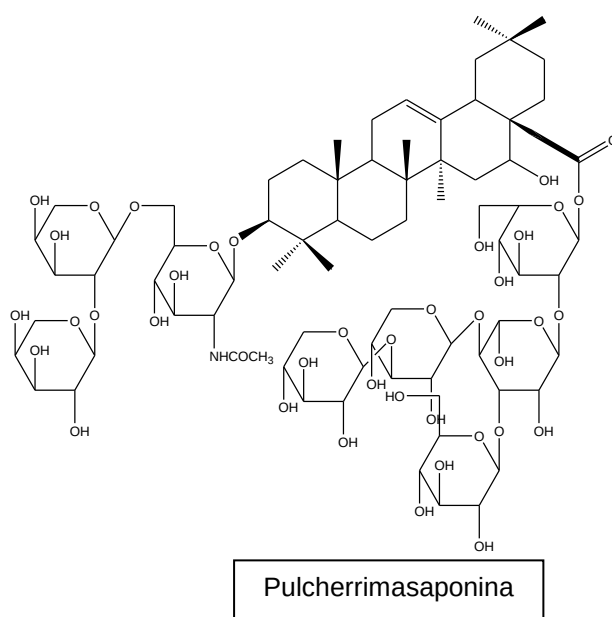
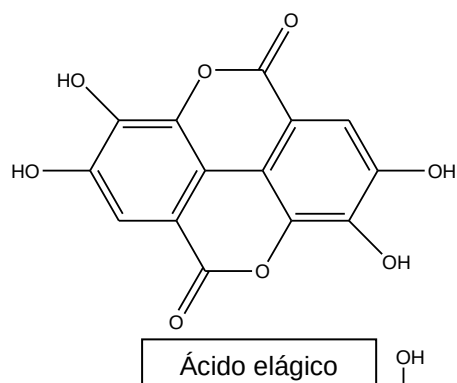
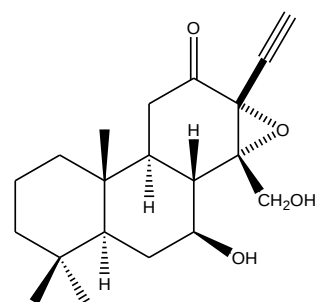
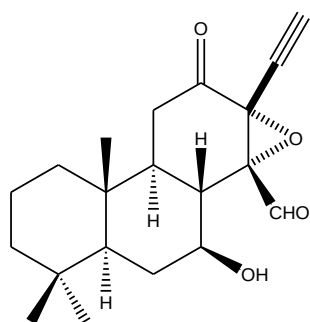
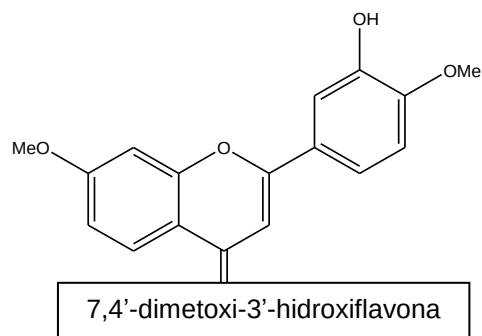
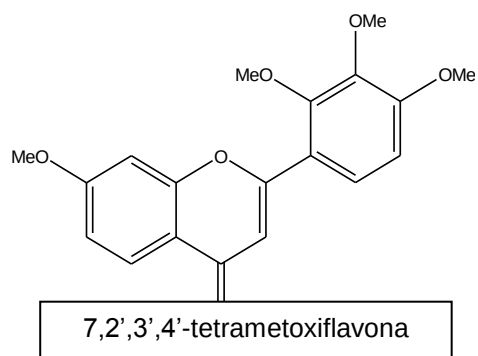
caatinga no nordeste, mas também em outras regiões com climas mais amenos (MILIKEN, 1997 *apud* BARBOSA, 2008).

Na medicina popular espécies deste gênero são usadas como laxativa e abortiva (ADESINA, 1976 *apud* ORISHADIPE *et al*, 2010), anti-helmíntica e antidepressiva (NIA *et al*, 1999), no tratamento de uretrites, cistites, dores renais, cálculos biliares, inflamações da próstata, dor de dente, cólicas, febre (DIMAYUGA *et al*, 2006), no tratamento da malária e Leishmaniose (BARBOSA, 2008), gonorreia, constipação, alívio de dores (AGUNU *et al*, 2005), contra infecções da garganta (AGRA *et al.*, 2008).

Também são relatadas atividades anticonvulsivantes (ADESINA, 1982 *apud* ORISHADIPE *et al*, 2010), antidiarréica, antiespasmódica, antipirética, antireumática, analgésica (AGUWA & LAWAL, 1988; AGUNU *et al*, 2005), anticolinérgica, antiácida, antiulcerogênica, antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecium* e *Candida albicans* (ADESINA, 1982 *apud* ORISHADIPE *et al*, 2010), e antioxidante (CHEW *et al*, 2011).

As principais classes de metabólitos secundários encontradas em *Calliandra* são diterpenos cassanos (DIMAYUGA *et al*, 2006), saponinas (SILVA *et al.*, 2005), flavonoides e taninos (MURILLO *et al*, 2008) (Quadro 1).

Quadro 1. Estrutura de algumas substâncias isoladas de espécies de *Calliandra*.



1 - 7-metoxiquercitrina
2 - quercitrina

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Calliandra umbellifera* Benth.

Calliandra umbellifera Benth. é uma espécie endêmica do Brasil, entretanto pouco conhecida, tendo sido coletada apenas no sul do Ceará e sudoeste do Piauí, tendo como domínio fitogeográfico a caatinga (SOUZA, 2012).

É um arbusto de 1-1,5 m altura, com a presença de umbelas heteromórficas, flores pentâmeras e estames brancos. Esta espécie pode ser diagnosticada pela presença de tricomas glandulares pedunculados sobre o pedicelo e o perianto. A morfologia geral é semelhante à de *C. ulei*, incluindo os folíolos relativamente largos e oblongos destas duas espécies. Os principais caracteres diferenciais entre estas espécies são folhas mais agrupadas no ápice dos ramos e folíolos menores (3-5 x 1-1,5 mm em *C. ulei* vs. 6-8 x 2-3 mm em *C. umbellifera*), lacínias do cálice mais longas do que o tubo e ausência de tricomas glandulares pedunculados (Figura 8) (QUEIROZ, 2009).



Figura 8. Fotos de *Calliandra umbellifera* (J. F. Tavares).

Esta espécie ainda não tem relato de estudo fitoquímico, farmacológico e nem uso popular.

3.4 CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS, BIOLÓGICAS, FARMACOLÓGICAS E BIOSINTÉTICAS SOBRE AS CLASSES DE CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Calliandra umbellifera* Benth.

3.4.1 Benzofenonas


O=C(c1ccccc1)c2ccccc2

The reaction scheme illustrates the synthesis of 4,4',6-tetrahydroxybenzofenone from L-phenylalanine. The process begins with L-phenylalanine, which is converted to cinnamic acid (Ácido cinâmico) via a reaction labeled PLA. Cinnamic acid is then converted to benzoyl-CoA (Benzoil-CoA) and three molecules of malonyl-CoA (3x Malonil-CoA) through a series of steps indicated by dashed arrows. The reaction of benzoyl-CoA and three malonyl-CoA molecules, catalyzed by BPS, forms a large intermediate complex shown in brackets. This complex is then converted to 2,4,6-trihydroxybenzofenone, which is finally converted to 4,4',6-tetrahydroxybenzofenone.

As hidroxibenzofenonas e seus derivados têm a habilidade de absorver e dissipar a radiação UVA, porém absorvendo em menor intensidade, na região

UVB (SUZUKI *et al.*, 2005 *apud* SANTOS, 2007). Essa habilidade ocorre devido a deslocalização por ressonância, a qual tem participação do grupo carbonila como receptor de elétrons e é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições *orto* e/ou *para* (SHAATH, 1997 *apud* SANTOS, 2007).

As benzofenonas têm diversas atividades farmacológicas como antinociceptiva e antiinflamatória (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2011), antioxidante (ALMANZA *et al.*, 2011), antitumoral (ITO *et al.*, 1999), inibidora da α – glicosidade (FENG *et al.*, 2011), anticancerígena (MONTHAKANTIRAT *et al.*, 2004), antibacteriana contra bactérias patogênicas do trato gastro intestinal (*S. pyogenes*, *S. viridans*, *H. pylori*, *Enterococcus sp.*, e *S. aureus*) (SAKUNPAK & PANICHAYUPAKARANANT, 2011) e antifúngica (RUBIO *et al.*, 1998).

3.4.2 Ciclitóis

Ciclitóis são derivados cicloexânicos que contém pelo menos três hidroxilas no anel. Quando a estrutura básica for derivada do 1,2,3,4,5,6-hexaidróxicicloexano, geralmente é utilizado o termo inositol (IUPAC, 2006).

Segundo Kiatkoski (2011), assim como os monossacarídeos, os inositóis podem apresentar diversas configurações em seus carbonos, todos assimétricos, relacionadas a orientação axial/equatorial de suas hidroxilas, resultando em diferentes tipos de inositóis (Figura 11).

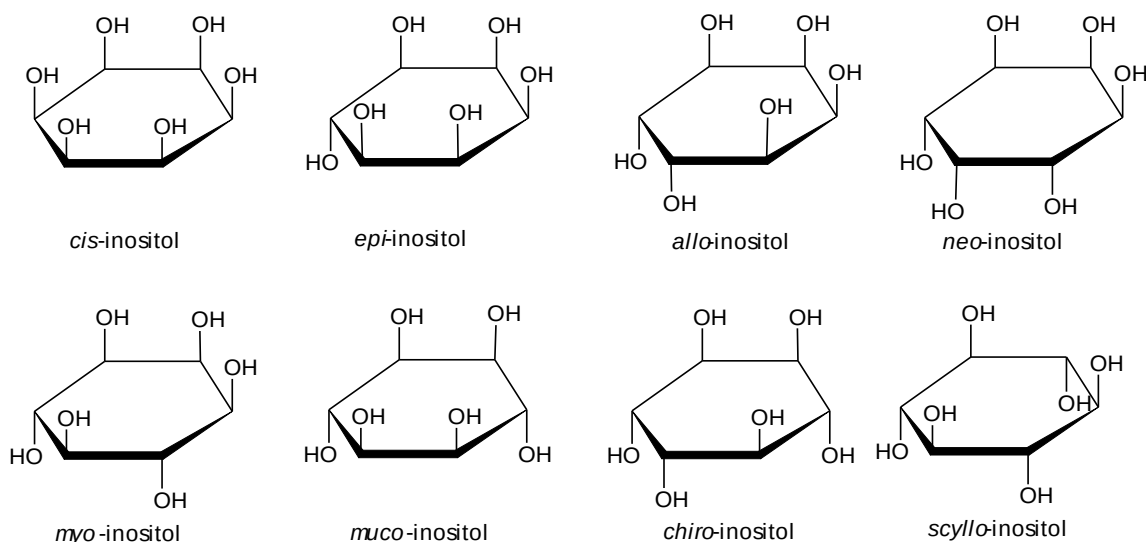


Figura 11. Configurações encontradas para os inositóis. Fonte: Adaptado de IUPAC (1976).

Os inositóis ou ciclitóis têm como precursora a D-glicose (1) (Figura 12). Esta é convertida em *myo*-inositol livre através de quatro reações enzimáticas. Inicialmente a glicose é convertida em D-glicose-6-P (2) pela hexoquinase, sendo posteriormente ciclizada para 1L-*myo*-inositol-1-P (3) pela sintase de 1L-*myo*-inositol-1-P. No terceiro passo, a perda do fosfato através da monofosfatase de *myo*-inositol, deixa o *myo*-inositol livre (4) (LOEWUS & MURTHY, 2000).

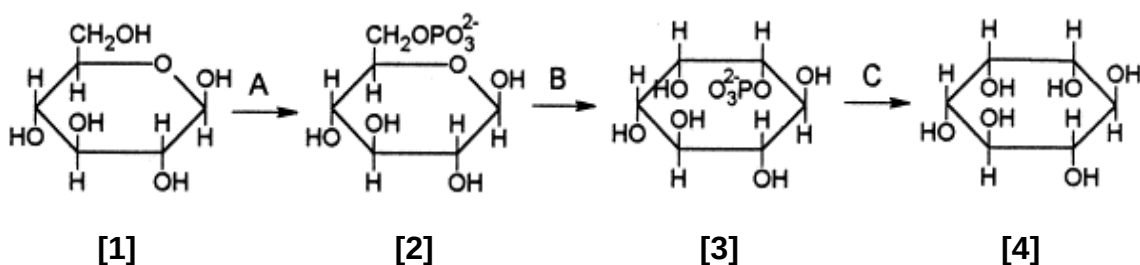


Figura 12. Conversão da d-glicose para *myo*-inositol: (A) Hexoquinase; (B) Sintase de 1L-*myo*-inositol-1-P; (C) monofosfatase de *myo*-inositol (LOEWUS & MURTHY, 2000).

Funcionalmente, a conversão da glicose-6-P em 1L-*myo*-inositol-1-P envolve três subpassos (Figura 13): oxidação acoplada ao NAD^+ do carbono 5 da D-glicose-6-P, condensação aldólica entres os carbonos 1 e 6 da 5-ceto-D-glicose-6-P (D-xylo-5-hexose-6-P) e redução da 2-*myo*-inosose-1-P (D-2,4,6:3,5-pentahidroxi-ciclohexano-2-P) para 1L-*myo*-inositol-1-P catalisada pela NADH (LOEWUS & MURTHY, 2000).

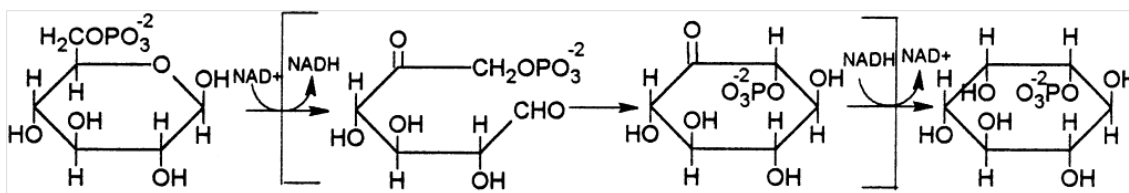


Figura 13. Mecanismo enzimático da síntese de 1L-*myo*-inositol-1-P (LOEWUS & MURTHY, 2000).

Nos animais, os inositóis ocorrem preferencialmente na forma fosforilada, enquanto que nas plantas eles aparecem fosforilados, metilados (por ligação éter) ou na forma livre (PODESCHWA *et al.*, 2003 *apud* SEVERI, 2010).

Inositóis e seus derivados são de ocorrência natural e a eles têm sido atribuídas importantes atividades biológicas, como por exemplo, os fosfatidilinositóis, que estão envolvidos no sistema intracelular de segundo mensageiro, promovendo aumento da concentração de cálcio intracelular (BERRIDGE, 1993; IRVINE & SCHELL, 2001 *apud* SEVERI, 2010).

Além disso, ainda apresentam atividade antiinflamatória (SINGH *et al.*, 2001), hipoglicemiante (BATES *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2007), antitumoral (ZHAN & LOU, 2007), imunoestimulante (LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b), capacidade de aumentar a força muscular, com aplicações no tratamento de perda de massa muscular provocada por doenças como AIDS/HIV, câncer e tuberculose (DYKSTRA & PRAIRIE, 2001), atividade antimicrobiana, no tratamento de condições associadas à resistência à insulina, como diabetes, obesidade, hiperlipidemias e deslipidemias, aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, e no tratamento de doenças autoimunes como o lúpus eritematoso (OSTLUND & SHERMAN, 1996). Eles têm a capacidade de inibir o estágio de iniciação da doença de Alzheimer ou de inibir a sua progressão (PASINETTI, 2006) e também apresentam atividade analgésica (MALAIRAJAN *et al.*, 2006).

3.4.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além de se

formarem em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO & JORGE, 2007).

Esses compostos podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Eles podem ser sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (KEGG, 2008). A rota do ácido chiquímico participa da biossíntese da maioria dos fenóis vegetais, enquanto que, a rota do ácido mavalônico, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os denominados de não flavonoides são classificados como: os derivados das estruturas químicas C6-C1, específicas dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico; os derivados das estruturas químicas C6-C3 específicas dos ácidos cafêico, p-hidrox cumárico e cinamatos; e os derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do trans-resveratrol e cis-resveratrol (MELO & GUERRA, 2002 *apud* MAIA, 2008).

Muitos desses compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Estes compostos apresentam diversas funções de defesa nas plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas para fatores internos incluindo diferenças genéticas, nutrientes e hormônios, contribuindo para a sua síntese (MAIA, 2008).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão geralmente relacionadas com a atividade antioxidante que cada composto exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação de radicais livres e de oxigênio singlete, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE & PASTORE, 2004).

3.4.4 Esteroides

Os esteroides contém um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno (Figura 14) e apresentam um grupo hidroxila no carbono 3. A maioria dos esteroides

naturais possui uma cadeia lateral de 8 a 10 átomos de carbono e uma dupla ligação no carbono 5 (HUNG-LLAMOS *et al.*, 2005).

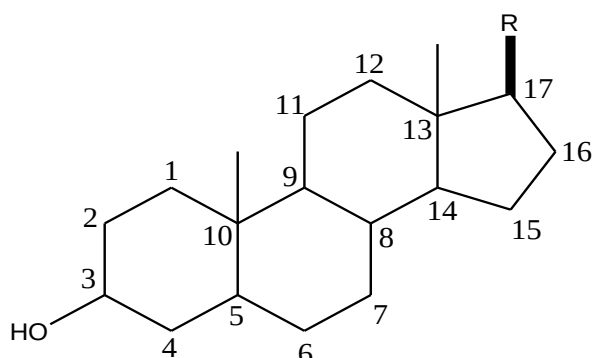


Figura 14. Estrutura química básica dos esteroides.

Esses compostos estão amplamente distribuídos na natureza. Nos animais superiores se encontra fundamentalmente o colesterol, o qual é um constituinte fundamental de membranas e precursor de substâncias fisiologicamente importantes (hormônios, ácidos biliares, vitamina D, etc), enquanto que nas plantas superiores se encontram principalmente os fitosteroides, dos quais já foram identificados mais de 100 tipos, sendo os mais abundantes o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Os fitosteroides são compostos sintetizados somente pelas plantas, estando presentes nos animais devido a sua ingestão na dieta (HUNG-LLAMOS *et al.*, 2005).

Os fitosteroides estão presentes em quase todas as partes das plantas, sobretudo nas sementes e talos, como alcoóis livres, esterificados com ácidos graxos de cadeia longa e conjugados com glicosídeos (HUNG-LLAMOS *et al.*, 2005).

Esses compostos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica por suas propriedades físico-químicas e farmacológicas e se comercializam em várias formas, segundo suas aplicações (COSSÍO, 2002).

Já foram repostadas diversas atividades dos fitosteróis, entre elas estão, redução do colesterol sérico diminuindo o risco de enfermidades cardiovasculares, inibição do crescimento de células cancerígenas, ação antiinflamatória, antipirética, antiulcérica, liberação de insulina e imunomodulação (HUNG-LLAMOS *et al.*, 2005).

Vários estudos pré-clínicos e clínicos vêm demonstrando que o β -sitosterol melhora alguns sintomas clínicos nos homens em tratamento de hiperplasia prostática benigna, tais como o volume e a frequência da urina (BERGES *et al.*, 1995; KLIPPEL *et al.*, 1997; MAHONEY, 1995; CARBIN *et al.*, 1990; KOBAYASHI *et al.*, 1998 *apud* HUNG-LLAMOS, 2005).

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS

Microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos, são reconhecidos por serem causadores de diversas infecções em humanos. Apesar das indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo e efetivo número de novos antibióticos e antifúngicos nos últimos anos, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou (MATASYOH *et al.*, 2009).

O uso de extratos de plantas como agentes com atividade antioxidante e antimicrobiana tem sido de extrema importância visto que apresentam diversidade molecular muito superior àquela derivada de produtos sintéticos (NOVAIS *et al.*, 2003).

Devido aos microorganismos terem a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos, é necessário o controle no uso de antimicrobianos, o desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e estudos acerca de novas substâncias antimicrobianas, sintéticas e naturais (LOGUERCIO *et al.*, 2005).

3.5.1 Atividade antibacteriana

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microorganismos. (PEDERSON, 1944 *apud* SARTORI, 2005).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou síntese de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microorganismos (RANG *et al.*, 1997).

A atividade antibacteriana dos extratos pode variar de acordo com a concentração e o tipo de bactéria a ser estudada. (MATASYOH *et al.*, 2009). Variações nas estruturas da parede de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar danos diferenciados quando a bactéria é submetida a compostos antimicrobianos (WU *et al.*, 2008). As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Nas bactérias Gram positivas, a parede consiste de muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida e contém ácidos teióicos (formados a partir do glicerol e ribitol), em contrapartida, a parede de bactérias Gram-negativas é mais complexa que a das Gram positivas, sendo formada de poucas camadas de peptidoglicanas e uma membrana externa, sendo esta formada por uma dupla camada lipídica: uma camada interna composta de fosfolipídeos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas (TORTORA *et al.*, 2005).

3.5.2 Atividade antifúngica

Os fungos são organismos eucarióticos, com núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear; uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular; mitocôndrias; aparelho de Golgi; ribossomos ligados ao retículo endoplasmático e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Essa descrição demonstra que esses fungos possuem células tão semelhantes às hospedeiras, compartilhando a maioria das vias de metabolismo intermediário e utilizando enzimas muito similares, não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para um antifúngico seguro (SCHAECHTER *et al.*, 2002; URBINA *et al.*, 2000).

Diante dessa problemática, muitos dos fármacos atualmente disponíveis apresentam efeitos colaterais indesejáveis, eficácia duvidosa contra fungos reemergentes, ou desenvolvem uma rápida resistência sendo necessária urgentemente uma nova geração de agentes antifúngicos (SARTORI, 2005).

A incidência de infecções fúngicas causadas por leveduras e pelos fungos filamentosos tem crescido nos últimos 20 anos. O quadro é reflexo do aumento do número de pacientes susceptíveis a estas infecções devido à quimioterapia intensiva no tratamento do câncer, ao desenvolvimento de transplantes de medula óssea e de órgãos, à implantação de técnicas cirúrgicas e procedimentos invasivos, ao uso excessivo de antifúngicos e à epidemia da AIDS (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2008).

Paralelamente ao aumento do número de pacientes com maior risco de contrair infecções fúngicas, há também o aumento de indivíduos imunologicamente vulneráveis, devido à maior expectativa de sobrevivência de neonatos e da longevidade dos indivíduos idosos, como resultado das tecnologias e avanços na medicina (YAMAGUCHI, 2009).

As espécies de *Candida* permanecem como a quarta maior causa de morbidade e mortalidade nos unidades de terapia intensiva (RUEPING *et al.*, 2009). Os pacientes com candidemia e infecções invasivas por *Candida* estão associados a taxas de mortalidade entre 44 a 71% (TSAI *et al.*, 2008; BOUZA & MUÑOZ, 2008).

Espécies de *Candida* têm sido associadas às infecções micóticas superficiais e sistêmicas, podendo ser isoladas em até 60% da cavidade oral de adultos, estando *Candida albicans* e *C. tropicalis* entre as mais prevalentes (MARSH & MARTIN, 2005). Tais espécies apresentam fatores de virulência envolvidos com a formação de biofilmes, sendo os fatores ambientais (saliva, fluido gengival, pH e nutrientes) favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros microorganismos, incluindo as bactérias envolvidas com as principais patologias da cavidade oral, cárie dentária e doenças periodontais (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE, 1994). Destaca-se que essa habilidade para formação de biofilme está intimamente associada com a capacidade de causar infecções, representando um aumento na resistência às drogas antifúngicas e às defesas imunológicas do hospedeiro (HENRIQUES *et al.*, 2004; RAMAGE *et al.*, 2005).

Candida albicans é um patógeno oportunista que habita o corpo humano de forma comensal e é a maior causa de infecções fúngicas em humanos. Estas infecções normalmente ocorrem como consequência de uma alteração na resposta imunológica e virulência da *C. albicans*, que apresenta considerável plasticidade morfológica (MONGE *et al.*, 2006).

Candida krusei é encontrado em superfícies mucosas, sendo identificado recentemente como um agente patogênico notável com um espectro de manifestações clínicas, tais como artrite fungêmica, endoftalmite, endocardite e, em grupos de pacientes comprometidos em um ambiente hospitalar. Estudos têm mostrado que *C. Krusei* é geralmente menos virulenta do que a *C. albicans* em termos da sua aderência às superfícies epiteliais e protéticas, potencial proteolítico e de produção de fosfolipases (SAMARANAYAKE & SAMARANAYAKE, 1994).

Atualmente, os agentes disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas da cavidade oral, caracterizadas como superficiais, são representados pelos poliênicos (anfotericina B, nistatina, entre outros) e azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol, cetoconazol, entre outros), sendo estes últimos os eleitos em primeira instância para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos (WINGETER *et al.*, 2007).

Diante das limitações desses antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microorganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tais eventos. Essa situação tem impulsionado investigadores a estudarem novas substâncias antimicrobianas de várias fontes, incluindo as plantas medicinais (BANSOD & RAI, 2008).

3.6 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PRODUTOS NATURAIS

O nosso organismo tem vários mecanismos que são responsáveis pelo controle da homeostasia, a dor desempenha um papel de destaque, uma vez que atua como mecanismo de alerta do corpo (WALL, 1999). Atualmente, a dor é considerada o quinto sinal vital humano junto com temperatura corpórea, pressão arterial, ritmo cardíaco e frequência respiratória (MERSKEY, 1990).

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER & MELZACK, 1999). Entretanto, a dor é uma experiência complexa e não envolve apenas a transdução do estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Uma distinção entre a dor e a nocicepção se faz necessário, portanto nocicepção é o mecanismo pelo qual os estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central (DICKENSON & BESSON, 1997). Por outro lado a dor envolve tanto o componente sensorial como o emocional e racional associados aos quadros dolorosos, ou seja, a dor é uma experiência subjetiva, nem sempre associada com nocicepção (COUTAX *et al.*, 2005).

Segundo Jones (1992) os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Logo, os termos dor e analgesia são mais apropriados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção são mais adequados aos animais.

A nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambe ou morder a área lesada, vocalização, ou reflexo de retirar a parte do corpo agredida do contato com o estímulo nocivo (DOUGLAS, 1999).

O termo nociceptor é uma abreviatura de “nocirreceptor” e denota um receptor para o estímulo nociceptivo. Esse termo foi introduzido por Sherrington (1906) que definiu nociceptores como terminações livres de neurônios aferentes primários, que podem ser despolarizados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (KRESS & ZEILHOFER, 1999).

A dor rápida, geralmente, pode ser provocada por estímulos mecânicos e térmicos, enquanto a dor lenta pode ser provocada pelos três estímulos. Embora todos os receptores da dor serem terminações nervosas livres, eles utilizam duas vias diferentes para a transmissão dos sinais de dor para o sistema nervoso central, que são a via da dor rápida aguda e a via da dor lenta-crônica. Os sinais da dor aguda são transmitidos pelos nervos periféricos, para a medula espinhal, pelas pequenas fibras A δ , com velocidade entre 6 e 30 m/s, e a dor do tipo lenta-crônica é transmitida pelas fibras do tipo C, com velocidade de 0,5 a 2 m/s (GUYTON & HALL, 2002).

A nocicepção envolve a ativação específica de subpopulações de neurônios sensoriais primários que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal de onde é retransmitida para níveis supra-espinhais (Figura 15). Após a lesão tecidual, pode haver a ativação de nociceptores através da liberação de vários neurotransmissores e neuromoduladores tais como, a substância P, glutamato, bradicinina, prostaglandinas, histamina, serotonina e citocinas, como o fator de necrose tumoral- α . Como resultado, a sensibilização de fibras aferentes primárias transmite a informação da dor para os neurônios do corno-dorsal e, subsequentemente, para o centro superior do cérebro, resultando no estabelecimento da dor (GILCHRIST *et al.*, 1996; MILLAN, 1999 *apud* PEREIRA, 2009).

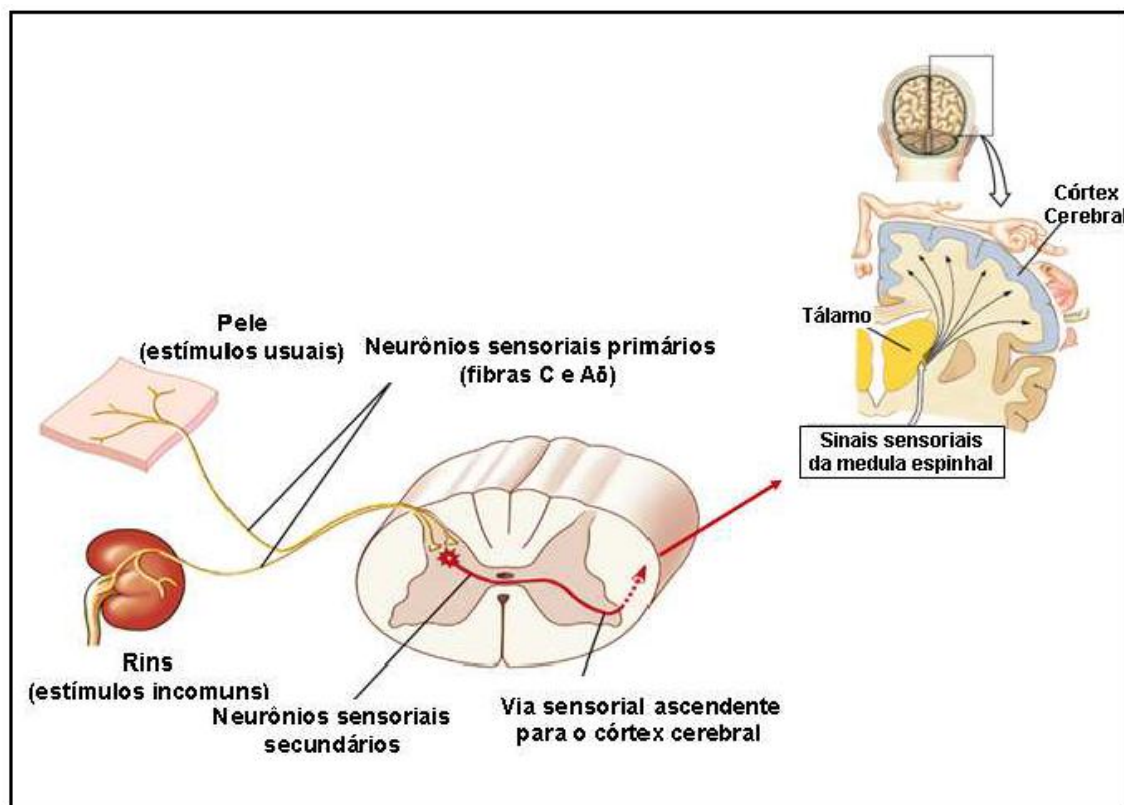


Figura 15. Visão geral do circuito da nocicepção (Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2003).

Atualmente, vários medicamentos para o controle da dor encontram-se disponíveis para uso clínico, tais como analgésicos, dentre eles os opióides (ex. morfina) e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) (SILVA, 2009).

Os opióides possuem destacada ação central, desencadeando potente analgesia associada à depressão das funções neurovegetativas e da consciência. Somam-se a esta ação analgésica as características sedativas e

hipnóticas, tendência a produzir dependência psíquica e física, e produção de tolerância, sendo estes dois últimos fatores limitantes para uso em tratamentos prolongados (OLIVEIRA, 2003; GILBERT *et al*, 2004).

Fármacos AINE são os medicamentos mais usados no alívio da dor e inflamação. Os AINE atualmente disponíveis agem, em sua maioria, inibindo a atividade das COX-1 (cicloxigenase 1) e COX-2 (cicloxigenase 2), suprimindo assim a síntese de prostaglandinas e tromboxanos (BURIAN & GEISLINGER, 2005).

Apesar dos avanços no conhecimento das drogas antinociceptivas, naturais, sintéticas e semi-sintéticas, compreendendo uma grande variedade farmacêutica, deparamos com efeitos adversos importantes que provocam o abandono, a falta de adesão e a limitação do uso dessas drogas por tipos diferentes de indivíduos, deixando uma lacuna que poderá ser preenchido por novos produtos naturais e sintéticos bioativos (BENEDITO, 2009).

Diante disso, muitas plantas na qual a indicação popular aborda a resposta inflamatória e analgésica são alvos para o estudo de novos tratamentos terapêuticos para esta área. O uso popular é muitas vezes confirmado pelos resultados das pesquisas científicas, como, por exemplo, o salgueiro (*Salix spp*) que teve sua atividade analgésica e antipirética confirmada, o gengibre (*Zingiber officinale*), que teve sua atividade antiinflamatória confirmada, o picão (*Bidens pilosa* L.) com atividade imunossupressora e a unha de gado (*Uncaria tomentosa*) com atividade antiinflamatória (CASTARDO, 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Calliandra umbellifera* Benth.

4.1.1 Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto (EMB)

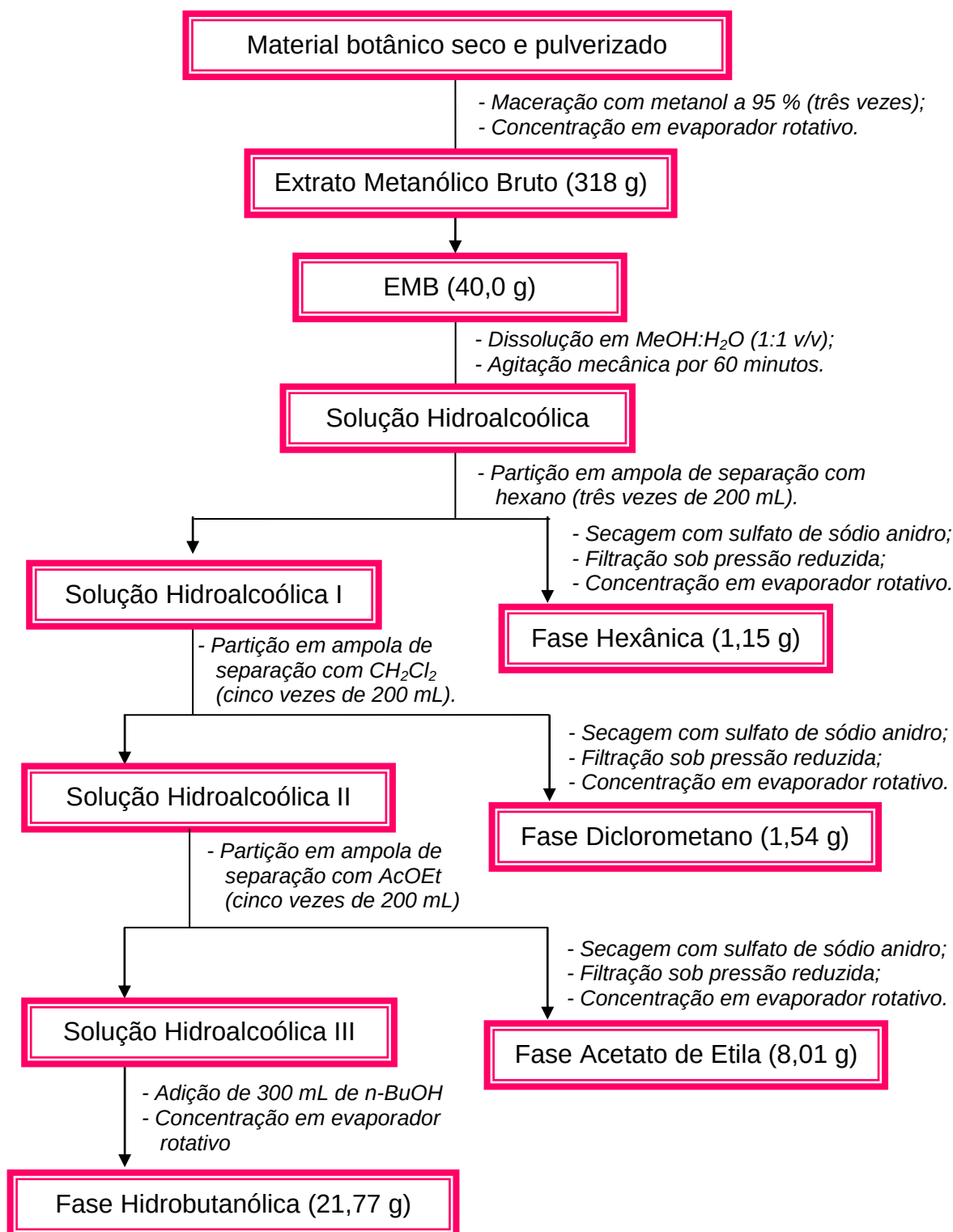
Foram coletados 5,0 kg de partes aéreas de *Calliandra umbellifera* Benth. no Pico do Jabre (município de Maturéia - estado da Paraíba), sendo o material coletado e identificado pela professora doutora Maria de Fátima Agra. As exsicatas foram depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, com o número de exsicata 7430.

O material vegetal foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura média de 45,0 °C durante 72 horas e reduzido a pó com auxílio de moinho mecânico. Posteriormente, os constituintes químicos do pó da planta foram extraídos com metanol (MeOH) a 95 % em recipiente de aço inoxidável sob maceração por 72 horas, sendo este processo repetido por quatro vezes, obtendo-se uma solução metanólica (Esquema 1).

A solução extrativa resultante foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45,0 °C, sendo obtidos 318,5 g de extrato metanólico bruto (EMB). Parte deste extrato (40,0 g) foi parcialmente dissolvido numa mistura metanol:água destilada (1:1) e homogeneizado sob agitação mecânica por 60 minutos, obtendo-se uma solução aquosa. Essa solução foi particionada com adição de hexano à solução aquosa I, diclorometano à solução aquosa II, acetato de etila (AcOEt) à solução aquosa III e n-butanol (n-BuOH) à solução aquosa IV (Esquema 1).

As soluções hexânica, diclorometano, acetato de etila e hidrobutanólica obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro para secagem, submetidas à filtração sob pressão reduzida, sendo as três primeiras concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de 45,0 °C e a hidrobutanólica submetida à liofilização, obtendo-se quatro fases: 1,15 g de fase hexânica, 1,54 g de fase diclorometano, 8,01 g de fase AcOEt e 21,77 g de fase hidrobutanólica (Esquema 1).

Esquema 1. Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera* Benth.



4.1.2 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos de *Calliandra umbellifera* foram realizados utilizando cromatografia clássica em coluna (CC), cromatografia a média pressão e cromatografia em camada delgada analítica preparativa (CCDP) e analítica (CCDA).

Para as CC utilizou-se sílica gel (ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 0,063 – 0,200 mm e 70 – 230 mesh) e Sephadex LH-20 (AMERSHAM BIOSCIENCES), tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra cromatografada. As amostras foram acondicionadas sobre o topo da coluna, procedendo-se então a eluição com os solventes comerciais hexano, CHCl_3 , MeOH e água destilados no CBiotec/UFPB, puros ou em misturas binárias.

A CCDA e a CCDP foram empregadas para análise e purificação das frações obtidas por CC, respectivamente. Para isto, foram usadas placas de vidro (10,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm) preparadas com uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ (ART 7749 da MERCK) em água destilada (1:2 m/v para CCDA e 1:2,5 m/v para CCDP) distribuída sobre a placa de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo *quick fit*. As cromatoplasas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 100 °C durante duas horas.

A revelação das substâncias em CCDA foi executada pela exposição das cromatoplasas à lâmpada de radiação ultravioleta (UV) sob dois comprimentos de ondas, 254 e 366 nm, em aparelho MINERALIGHT (modelo UVGL-58), bem como, pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas com vapores de iodo.

Por CCDA, as frações semelhantes foram reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f) e o grau de pureza foi determinado quando observada uma única mancha após revelação da cromatoplasa, além da observação dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos referidos compostos.

A recuperação das amostras separadas por CCDP foi feita por extração com CH_2Cl_2 e/ou CH_2Cl_2 :MeOH (9:1 v/v), seguida de filtração sob pressão reduzida e concentração em evaporador rotativo.

a) *Processamento cromatográfico da fase acetato de etila*

Uma alíquota da fase acetato de etila (4,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de média pressão, utilizando como fase estacionária a sílica-gel e como fase móvel hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), em sistema gradiente e isocrático, distribuídos em oito ciclos (Tabela 1).

Tabela 1. Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase acetato de etila de *Calliandra umbellifera*.

Método		Tempo
1º Ciclo	Isocrático (100% Hexano)	30 min
2º Ciclo	Gradiente (100% Hexano a Hexano 8:2 AcOEt)	1h40min (1%/10 min)
3º Ciclo	Gradiente (Hexano 8:2 AcOEt a Hexano 4:6 AcOEt)	3h20min (1%/5 min)
4º Ciclo	Gradiente (Hexano 4:6 AcOEt a 100% AcOEt)	2h (1%/3 min)
5º Ciclo	Gradiente (100% AcOEt a AcOEt 99:1 MeOH)	15min (1%/15 min)
6º Ciclo	Gradiente (AcOEt 99:1 MeOH a AcOEt 9:1 MeOH)	1h30min (1%/10min)
7º Ciclo	Gradiente (AcOEt 9:1 MeOH a AcOEt 1:1 MeOH)	3h20 min (1%/5min)
8º Ciclo	Gradiente (AcOEt 1:1 MeOH a 100% MeOH)	15 min

Ao final dos oito ciclos foram obtidas 80 frações, as quais foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com seus R_fs (Esquema 2).

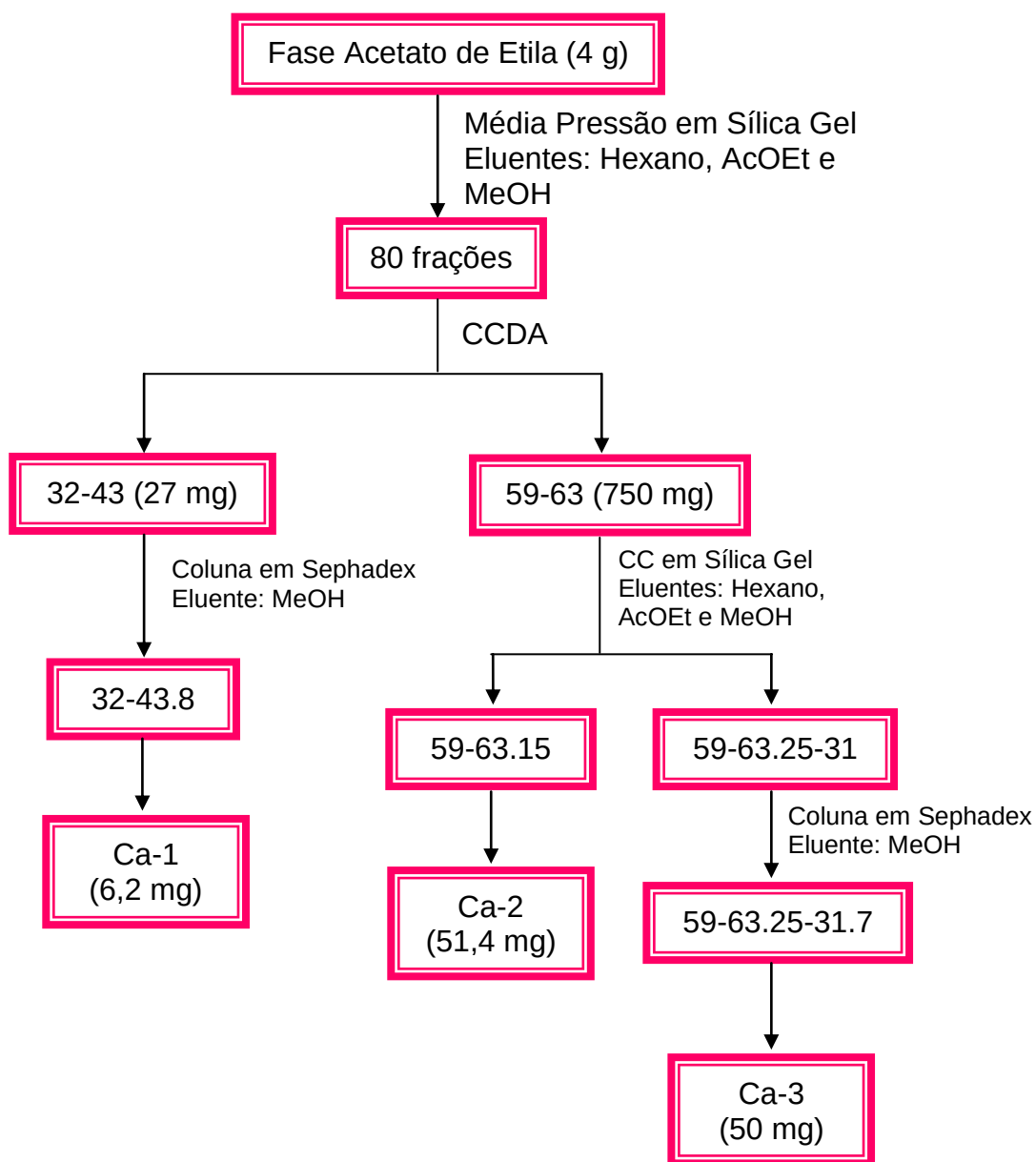
A fração 32-43 (27,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente, obtendo-se 10 frações. As frações foram monitoradas por CCDA e a fração 32-43.8 (6,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo castanho, sendo codificada como Ca-1 e encaminhada para RMN ¹H.

A fração 59-63 (750 mg) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e hexano, acetato de etila e metanol, puros e em misturas binárias como eluentes. A fração 59-63.15

apresentou-se como um precipitado castanho, sendo codificada como Ca-2 e foi submetido à RMN ^1H .

A fração 59-63.25-31 (81,2 mg) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando Sephadex como fase estacionária e metanol como fase móvel, obtendo-se 17 frações. A fração 59-63.25-31.7 apresentou significativo grau de pureza após análise por CCDA, sendo codificada como Ca-3 e encaminhada para análise de RMN ^1H .

Esquema 2. Fracionamento da fase acetato de etila do extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera* Benth.

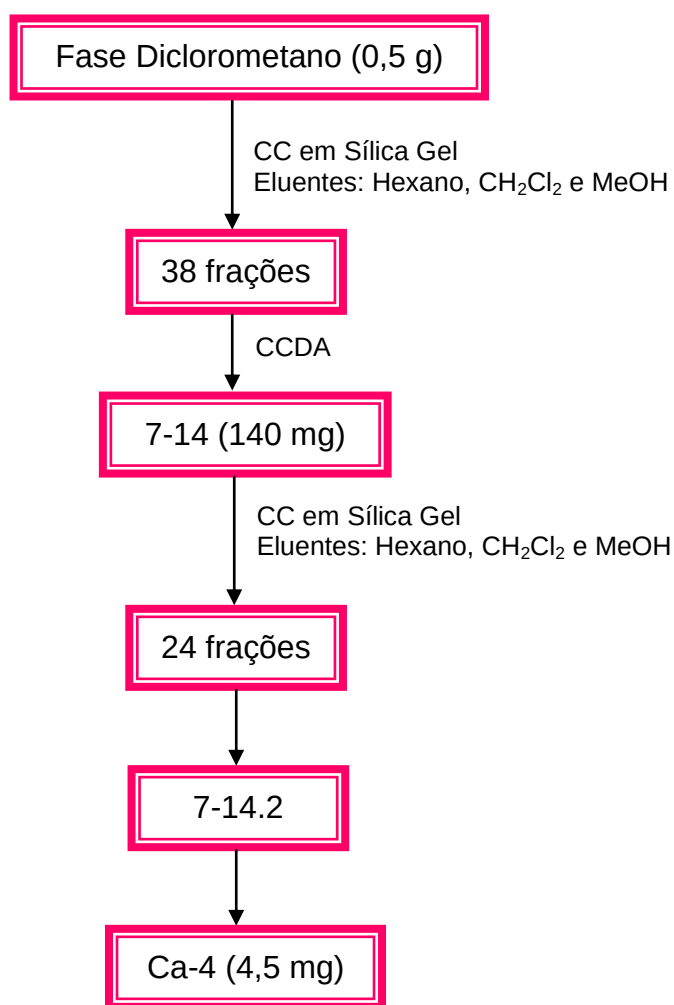


b) *Processamento cromatográfico da fase diclorometano*

Uma alíquota da fase diclorometano (0,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel como fase estacionária e como fase móvel hexano, diclorometano e metanol, puros e em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas trinta e oito frações, as quais foram monitoradas por CCDA e reunidas de acordo com seus Rf's.

A fração 7-14 (140 mg) foi então submetida à cromatografia em coluna utilizando Sílica *flash* como fase estacionária e hexano, diclorometano e metanol como fase móvel, obtendo-se 24 frações. A fração 7-14.2 (4,5 mg), após análise por CCDA, foi codificada como Ca-4 e encaminhada para análise de RMN ^1H (Esquema 3).

Esquema 3. Fracionamento da fase diclorometano do extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera*.

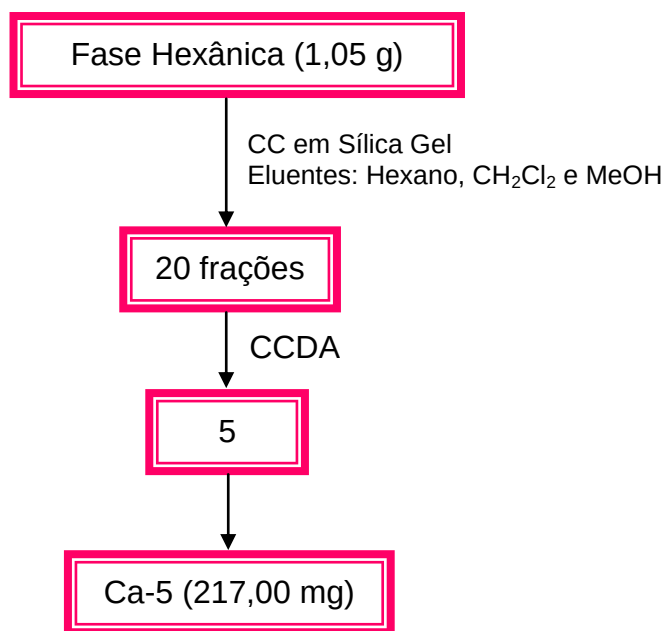


c) *Processamento cromatográfico da fase hexânica*

Uma alíquota da fase hexânica (1,05 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel como fase estacionária e como fase móvel hexano, diclorometano e metanol, puros e em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas vinte frações, as quais após serem monitoradas por CCDA foram reunidas de acordo com seus Rfs.

A fração 5 (217,0 mg) apresentou significativo grau de pureza após análise por CCDA, sendo codificada como Ca-5 e encaminhada para análise de RMN ^1H (Esquema 4).

Esquema 4. Fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera*.

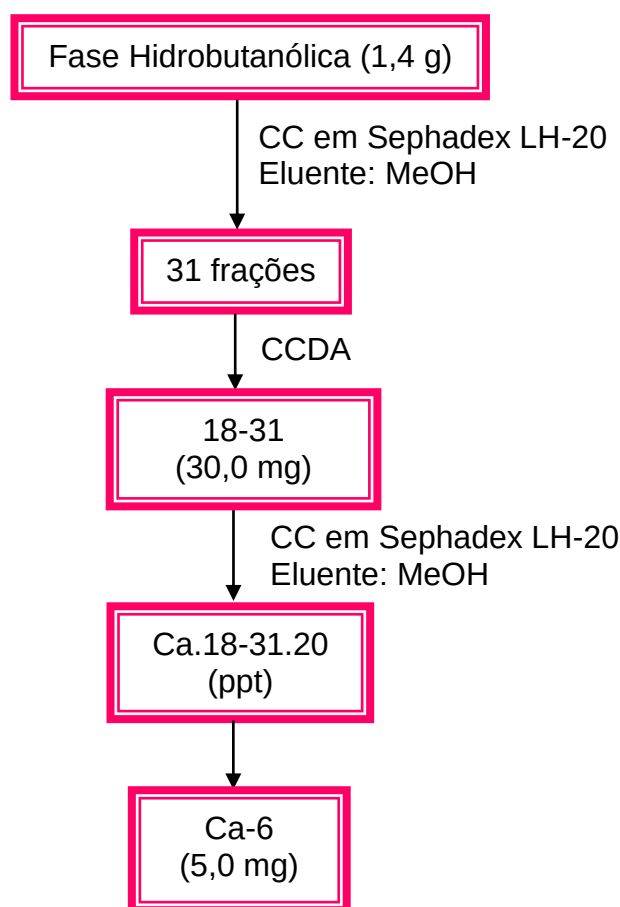


d) *Processamento cromatográfico da fase hidrobutanólica*

Uma alíquota da fase hidrobutanólica (1,4 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, Foram obtidas trinta e uma frações, as quais após serem monitoradas por CCDA foram reunidas de acordo com seus Rfs.

A fração 18-31 (30 mg) foi então submetida à cromatografia em coluna utilizando Sílica *flash* como fase estacionária e hexano, diclorometano e metanol como fase móvel, obtendo-se 29 frações. A fração 18-31.20 (5 mg), após análise por CCDA, foi codificada como Ca-6 e encaminhada para análise de RMN ^1H (Esquema 5).

Esquema 5. Fracionamento da fase hidrobutanólica do extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera*.



4.1.3. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A estrutura química das substâncias isoladas foi caracterizada mediante o uso de métodos espectroscópicos, experimentos de rotação óptica e determinação dos pontos de fusão.

a) Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV (4000 a 400 cm^{-1}), que dão informações sobre os prováveis grupos funcionais presentes na molécula (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010), foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR (modelo MB 100), utilizando uma pequena quantidade de amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

b) Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que informa sobre os diferentes hidrogênios e carbonos da molécula, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010), foram obtidos em espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN MERCURY-NMR-SYSTEM 200 MHz, ambos do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da UFPB. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da marca *Cambridge Isotope Laboratories*: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e piridina (Pyd_5) deuterados.

Os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: CHCl_3 (7,24 ppm), CH_3OH (3,30 ppm) e Pyd_5 (7,58 ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: CDCl_3 (77,0 ppm) e CD_3OD (49,0 ppm), Pyd_5 (135,91 ppm).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *tq* (tripletos de quintetos), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT com a seguinte convenção: os sinais de carbonos não-hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base.

Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (^2J) e três (^3J) ligações; COSY, estabelece as correlações entre hidrogênios que são responsáveis, entre si, pelo desdobramento do sinal, e assim permite discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H ; e NOESY, técnica homonuclear que mostra correlações espaciais entre os hidrogênios da molécula (KAISER, 2000).

Os dados espectrais foram comparados com modelos da literatura, quando possível, permitindo fazer a maioria das atribuições, e os demais foram feitos com base na análise dos espectros bidimensionais.

c) Espectrometria de Massas

O espectro de massas IES-EM de Ca-2 e Ca-3 foi obtido um espectrômetro de massas (Bruker, Ion Trap Amazon) em modo de íons positivos pela técnica de Ionização por Eletrospray (+) e utilizando o analisador íon trap.

A amostra foi dissolvida e diluída em uma solução de MeOH:H₂O (1:1 v/v) com hidróxido de amônia 0,1 % até a concentração de 1,0 µg mL⁻¹.

d) Rotação Óptica e ponto de fusão

Os experimentos de rotação óptica foram feitos em um polarímetro digital JASCO P-2000 do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da UFPB, com a amostra diluída em 5,0 mL (200 µg/mL) de MeOH absoluto. O desvio da luz plano-polarizada foi determinado por comparação com um controle negativo que consistia no mesmo solvente utilizado para diluição da amostra.

O ponto de fusão de cada substância foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão (PFD III – REV 01) da Marte Equipamentos para Laboratório Ltda., com temperatura variando de 0 – 350 °C.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO, DAS FASES ACETATO DE ETILA E HIDROBUTANÓLICA E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Calliandra umbellifera* Benth.

4.2.1 Local de trabalho

As atividades antibacteriana e antifúngica foram avaliadas no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (Centro de Ciências da Saúde), Universidade Federal da Paraíba, sob a coordenação da professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

4.2.2 Produtos testados

Foram testados o extrato metanólico bruto, as fases acetato de etila e hidrobutanólica e as substâncias isoladas (iriflofenona glicosilada e pinitol) de *Calliandra* sp. Todos os produtos foram testados nas concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64 e 32 µg/mL, sendo em diluições seriadas na razão de 1:2, partindo de 100µL até 3,125µL. Os mesmos foram solubilizados em dimetilsufóxido-DMSO (LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda.), numa proporção, respectivamente, de até 10%, para não interferir sobre os microrganismos (ALLEGRINI *et al.*, 1976 *apud* SANTANA, 2012).

4.2.3 Antimicrobianos sintéticos

Para o controle de atividade antimicrobiana, foram usados cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias e nistatina (100 UI/mL) para as leveduras (Sigma Chemical).

4.2.4 Microrganismos

Nos ensaios microbiológicos foram incluídas as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (P - 03), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

9027) e *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Escherichia coli* (ATCC 8733). As espécies fúngicas utilizadas foram *Candida albicans* (HIV⁺ - 101), *Candida albicans* (LM - 111), *Candida krusei* (LM - 13), *Candida krusei* (LM - 08), *Candida tropicalis* (ATCC - 13803) e *Candida tropicalis* (LM -14).

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados e conservadas a 4 °C e a 30 °C.

A suspensão dos microrganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10⁶ UFC/mL (NCCLS 2000; HADACECK & GREEGER, 2000; CLEELAND & SQUIRES, 1991).

4.2.5 Meios de cultura

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados, respectivamente, em caldo Mueller-Hinton (Merck/USA) e caldo Sabouraud dextrose – CSD (Difco Lab./USA/France) para bactérias e fungos, respectivamente. Os mesmos foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

4.2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de diluição seriada em meio líquido - técnica de microdiluição (CLEELAND & SQUIRES, 1991; BAWER *et al.*, 1996; HADACECK & GREEGER, 2000; NCCLS, 2000).

A determinação da CIM dos compostos em estudo foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se microplacas contendo 96 poços com fundo chato e tampa (DISPOPETRI/INTERLAB) (Figura 16).

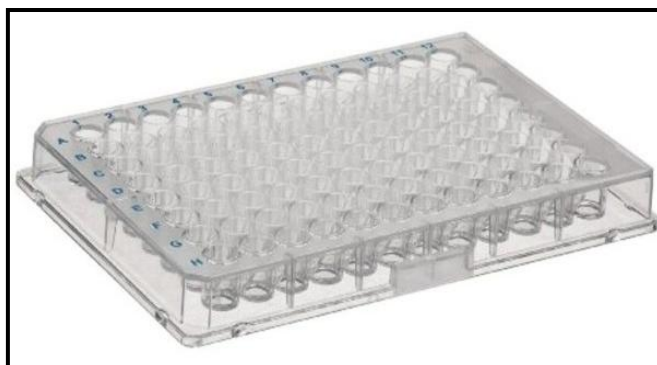


Figura 16. Microplaca de 96 poços (<http://www.pro-analise.com.br>).

Inicialmente, adicionou-se aos poços, 100 μL de caldo nutriente (para bactérias) e caldo Sabouraud (para leveduras) duplamente concentrado. Em seguida, foi inoculado 100 μL da solução dos produtos e foram feitas as diluições seriadas à razão de dois, nas concentrações de 1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Dessa forma, na primeira fila de cavidades, os compostos se encontravam na maior concentração e na menor concentração na sexta fileira. Posteriormente, 10 μL da suspensão dos microrganismos foram inoculados em todas as cavidades da placa. Em paralelo, foram feitos controle do crescimento das espécies bacterianas e de leveduras, como também com os antimicrobianos padrão: cloranfenicol (50 $\mu\text{g/mL}$) para bactérias e nistatina (100UI/mL) para leveduras. O sistema foi incubado a 35°C/24 horas (VILJOEN *et al.*, 2003; SAHIN *et al.*, 2004).

Após o tempo de incubação adequado, foi feita a leitura dos resultados para determinação da CIM dos compostos frente os dois grupos de microrganismos ensaiados: a determinação da CIM dos compostos sobre os microrganismos foi realizada através de observação visual, tomando como base o fato de que o crescimento nos poços da placa de microdiluição ocorreu através da formação dos chamados botões de crescimento - aglomerado de células (ESPINEL INGROFF *et al.*, 1991; ESPINEL INGROFF *et al.*, 1992).

A atividade biológica do produto foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-100 $\mu\text{g/mL}$ = excelente/ótima atividade; 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ = atividade moderada; >1000 $\mu\text{g/mL}$ = produto inativo (MISTCHER *et al.*, 1972; ALIGIANNIS *et al.*, 2001; HOLETZ *et al.*, 2002; HOUGHTON *et al.*, 2007).

4.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Calliandra umbellifera* Benth.

4.3.1 Local de trabalho

A avaliação da atividade antinociceptiva foi desenvolvida no Laboratório de Psicofarmacologia e no Setor de Experimentação Comportamental do Biotério Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba, sob a coordenação do professor doutor Reinaldo Nóbrega de Almeida.

4.3.2 Material

4.3.2.1 Animais

No desenvolvimento do presente estudo foram utilizados grupos de oito camundongos (*Mus musculus*), quatro fêmeas e quatro machos albinos da linhagem *Swiss*, pesando entre 25 a 35g, para os a triagem farmacológica e grupos de oito machos para os demais testes. Todos os camundongos foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba. Para essa definição do número de animais foi levado em consideração dados estatísticos que possibilitam o menor número de animais sem alterar a significância dos dados.

No biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos cada, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo *pellets* (Purina), e água. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas e a fase escura de 18:00 às 6:00 horas.

Na sala de experimentação comportamental, onde foram realizados os testes, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo quatro animais cada, com pelo menos 60 minutos de antecedência a execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal

bem como permitir uma adaptação ao novo ambiente. Os camundongos foram privados de água e ração 12 horas antes dos testes.

Todos os experimentos foram executados no período compreendido entre às 8:00 horas da manhã e às 14:00 horas, sendo os animais utilizados uma única vez e sacrificados por deslocamento cervical.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo CEUA – Comitê de ética para Uso de Animais do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia da UFPB, sob a certidão nº 0809/12.

4.3.2.2 Substâncias usadas

- EMB de *Calliandra umbellifera* Benth.;
- Solução de formalina 1% (Formaldeído 37%)
- DMSO (Sigma – E.U.A.)
- Ácido glutâmico (Sigma – E.U.A.)
- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Cloridrato de morfina (Merck – E. U. A.);
- Etanol (LTF / UFPB – Brasil);

4.3.2.3 Caixa de observação para o teste da formalina

Para a realização do teste da formalina foi utilizado um aparato formado por um encaixe de metal que forma uma caixa triangular em ângulo de 45°, com os lados e altura medindo 25 cm cada, sendo duas paredes formadas por espelho e uma de vidro transparente, dando ao observador um maior campo de visão (Figura 17).



Figura 17. Caixa de observação para o teste da formalina (PEREIRA, 2009).

4.3.3 Testes preliminares

Segundo Almeida (2006), o teste para avaliar a toxicidade aguda compreende uma etapa que antecede os ensaios farmacológicos, sendo desenvolvido com o objetivo de obter dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância e seus efeitos adversos num organismo submetido a tratamento de curta duração.

Respeitando o aspecto de racionalização do uso de animais, o que está em concordância com os princípios éticos que norteiam pesquisas envolvendo animais de laboratório como sujeitos experimentais, bem como a redução da quantidade de droga utilizada, procedemos a realização da determinação da dose letal 50% (DL_{50}) juntamente com a triagem farmacológica comportamental.

4.3.3.1 Determinação da DL_{50}

A determinação da dose letal 50% (DL_{50}) possibilita investigar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias e extratos, determinando a dose responsável pela morte de 50% dos animais em estudo (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949), permitindo a realização dos testes farmacológicos utilizando doses seguras (GRACIOSO *et al.*, 1998).

Para realização desse teste, grupos de oito camundongos foram tratados com doses crescentes do EMB de *Calliandra umbellifera* por via i.p. (250 e 500 mg/kg) e oral (500 e 1000 mg/kg), num volume de 0,1 mL/10 mg do peso do animal. Após a administração, os camundongos foram colocados em caixas de polietileno, em grupos de quatro animais cada e observados por um período de 4 horas. Em seguida, os animais receberam água e comida, sendo observados por um período de 14 dias para o registro de eventuais mortes.

4.3.3.2 Triagem farmacológica experimental

Neste estudo, são estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. De forma que, ocorrendo alterações comportamentais em decorrência de tratamentos, é possível inferir uma relação com atividade no SNC.

Foram utilizados 4 grupos de 8 camundongos (4 machos e 4 fêmeas), sendo 2 grupos desses tratados com EMB de *Calliandra umbellifera* Benth. por via i.p nas doses de 250 e 500 mg/kg e 1 grupo por via oral na dose de 500 mg/kg. Esses animais foram comparados com os animais do grupo controle que receberam o veículo utilizado nas preparações (água destilada e uma gota de DMSO) e foram observados durante um período de 4 horas, sendo os efeitos ocorridos, registrados de acordo com a metodologia descrita por ALMEIDA *et al.* (1999) (Quadro 2).

Essa metodologia possibilita o direcionamento do estudo farmacológico para utilização de testes que levem à caracterização de um efeito específico.

Quadro 2. Quantificação da atividade antinociceptiva de acordo com tempo.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Esteriotipia					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
b – Depressora					
Abdução das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					
Analgesia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonia					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo do endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2 – SNA					
Constipação					
Defecação					
Diarréia					
Micção					
Lacrimejamento					
Salivação					
Respiração					
Cianose					
Piloereção					
Força para agarrar					
Tônus muscular					
3- Mortes					

4.3.4 Teste das contorções abdominais induzida por ácido acético

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal do ácido acético a 0,85% provoca irritação dos tecidos dessa área envolvendo a estimulação do nociceptores que gera reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (Figura 18) (BENEDITO, 2009).



Figura 18. Contorção abdominal seguida de extensão dos membros posteriores (VENÂNCIO, 2006).

Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. Embora a especificidade do modelo não seja alta, ele ainda é um dos meios mais utilizados para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos de extratos e compostos isolados (BENEDITO, 2009).

Para este experimento, quatro grupos de 8 camundongos receberam por via oral os seguintes tratamentos: veículo, 100, 200 e 300 mg/kg do EMB de *C. umbellifera*, além de um grupo que recebeu a droga padrão, morfina (6mg/kg).

Trancorrida 1 hora dos tratamentos iniciais, os animais foram tratados por via i.p. com solução de ácido acético 0,85% em água destilada (10mL/kg) e alocados separadamente em gaiolas de polietileno durante o período experimental para observação. A intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada pela contagem do número total de contorções que ocorreram cinco minutos após a injeção do estímulo nociceptivo, durante um período de 10 minutos de observação (QUEIROZ, 2011).

4.3.5 Teste da formalina

O teste da formalina foi conduzido como descrito por VAZ *et al.* (1996), que representa uma modificação do modelo original de HUNSKAAR & HOLE (1985) e SANTOS *et al.* (1995).

Nessa metodologia, uma solução de formalina é injetada na região subplantar do camundongo, o que leva à estimulação dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata considerado indicativo de resposta nociceptiva (Figura 19) (SOUZA *et al.*, 2000). Foram observadas duas fases nas quais foi quantificado o tempo de lambida da pata. A primeira fase, ocorreu durante os 5 primeiros minutos após a injeção levando a uma resposta neurogênica, em seguida houve uma interfase de aproximadamente 10 minutos caracterizada por mecanismos inibitórios da dor e de 15 a 30 minutos (segunda fase) foi quantificado novamente o tempo de lambida da pata, sendo esta fase conhecida principalmente por uma resposta inflamatória (HUNSKAAR & HOLE, 1987).



Figura 19. Camundongo lambendo a pata posterior que recebeu a formalina (Foto: Diogo V. da Fonseca).

Cinco grupos de 8 camundongos receberam os seguintes tratamentos por via oral: veículo, 100, 200 e 300 mg/kg do EMB de *Calliandra umbellifera*, e morfina (10 mg/kg). Após 30 minutos pós-tratamento com morfina e 1 hora pós-tratamento com o EMB, 20 μ L de solução de formalina 2,5%, que consiste em 0,92% de fomaldeído em solução, foram injetadas na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos. Em seguida, esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo de

lambida da pata que recebeu a formalina durante 5 minutos (1ª fase). Após um período de 10 minutos (interfase), novamente contabilizou-se o parâmetro citado por mais 15 minutos (2ª fase).

4.3.6 Teste do glutamato

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nocicepção e da antinocicepção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL & NEECK, 2001). Com o objetivo de obter evidências mais diretas a respeito da interação do EMB de *Calliandra umbellifera* com o sistema glutamatérgico, foi testado seu efeito frente à injeção intraplantar de glutamato.

Os camundongos foram divididos em grupos e tratados por oral com veículo ou EMB nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg, uma hora antes da injeção de 20 µL de uma solução de glutamato (20 µmol/pata) na região intraplantar (i.pl.) da pata posterior direita. Em seguida, os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por um período de 15 min, iniciados imediatamente após a injeção de glutamato, como descrito anteriormente (BEIRITH *et al.*, 2002). O tempo despendido pelos animais para lamber ou morder a pata injetada foi considerado como indicativo de nocicepção.

Como controle positivo foi administrado, 30 minutos antes da estimulação com o glutamato, o MK-801 (0,03 mg/kg i.pl.), que é um antagonista do glutamato.

4.3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA, seguido do Teste de Dunnett. Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism versão 4,02.

RESULTADOS E DISCUSSÕES



5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-1

O composto codificado como Ca-1 foi obtido como sólido castanho com massa de 6,2 mg (correspondendo a 0,0019% em relação ao EMB), apresentou ponto de fusão entre 251-254 °C (254-255 °C, segundo OLIVEIRA *et al*, 2006).

No espectro de RMN ^1H de Ca-1 (200 MHz, CD_3OD) (Figura 20) foi observado um sinal característico de hidrogênio aromático em δ_{H} 7,04 (s), nos possibilitando inferir a existência de anel aromático para o composto (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). A presença de apenas um sinal para hidrogênio aromático, nos fez sugerir que Ca-1 se tratava se um anel aromático pentassubstituído ou tetrassubstituído (molécula simétrica) (Figura 21).

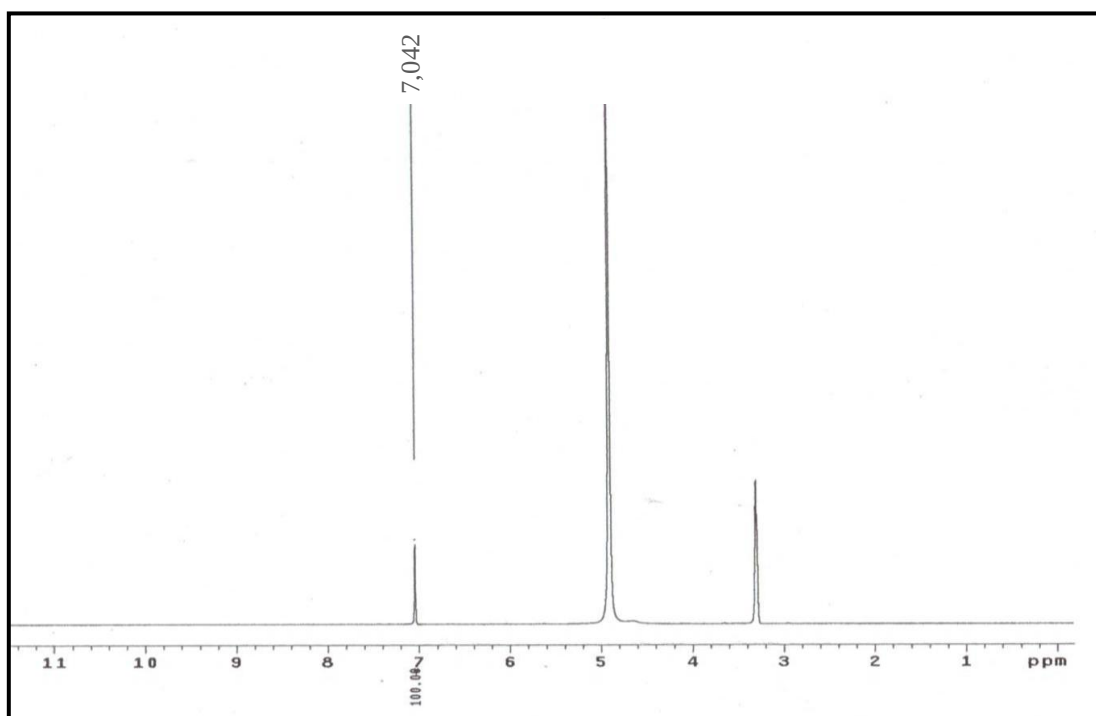


Figura 20. Espectro de RMN ^1H de Ca-1 (200 MHz, CD_3OD).

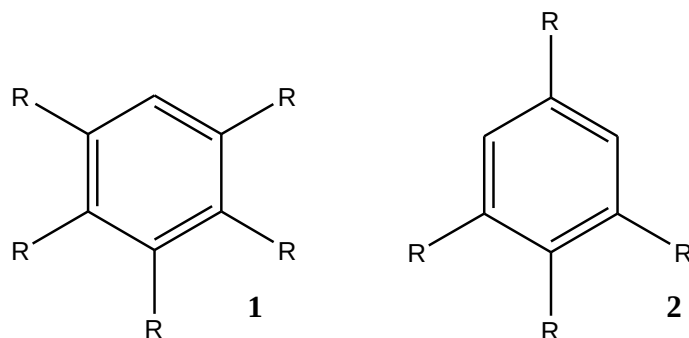


Figura 21. Possibilidades estruturais de Ca-1.

No espectro de RMN de ^{13}C de Ca-1 (Figura 22) foram observados cinco sinais correspondentes as sete átomos de carbono, sendo um em δ_c 170,5, característico de carbonila, três em δ_c 146,2, 139,5 e 121,4, característicos de carbonos não hidrogenados e um em δ_c 110,3, característico de carbono metínico (PAVIA *et al.*, 2010).

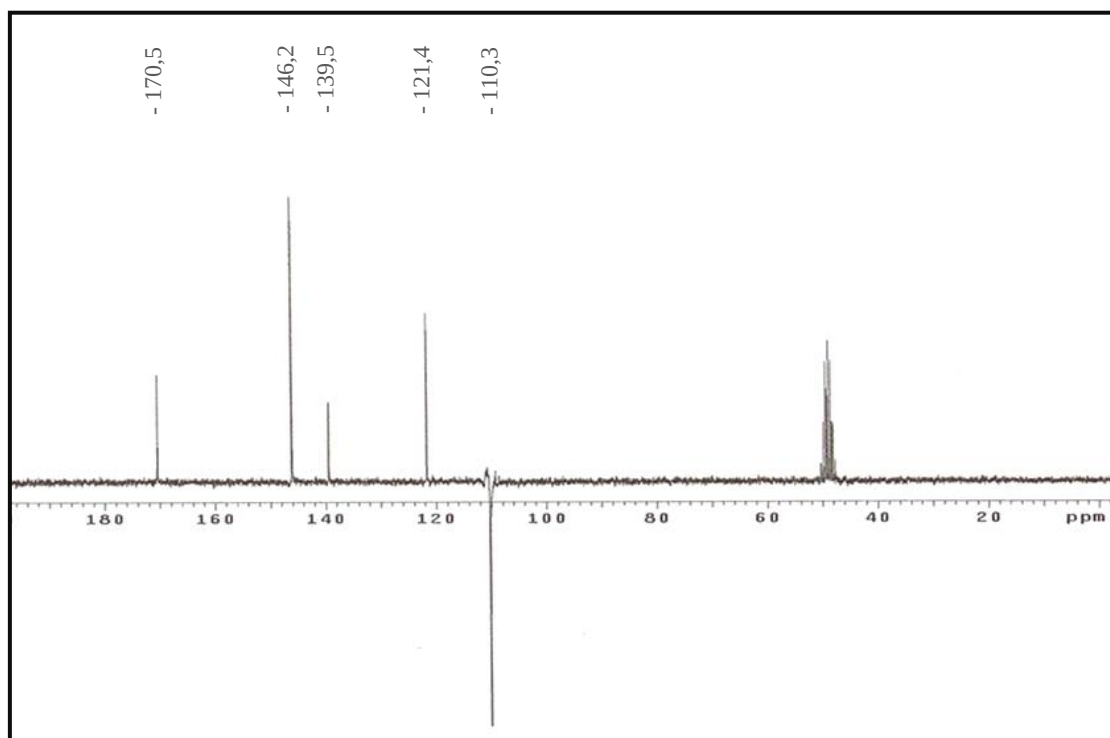


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de Ca-1 (200 MHz, CD_3OD).

Esses dados nos permitiram sugerir que Ca-1 se tratava de um anel tetrassubstituído (**2**), uma vez que os sinais em δ_c 110,3 e 146,2 foram atribuídos a dois carbonos cada devido a sua intensidade. A ausência de outros sinais para hidrogênios no espectro de RMN ^1H , nos fez sugerir a

presença de hidroxilas como substituintes no anel aromático. Sendo assim, foi possível determinar os dois padrões de substituição a seguir (Figura 23).

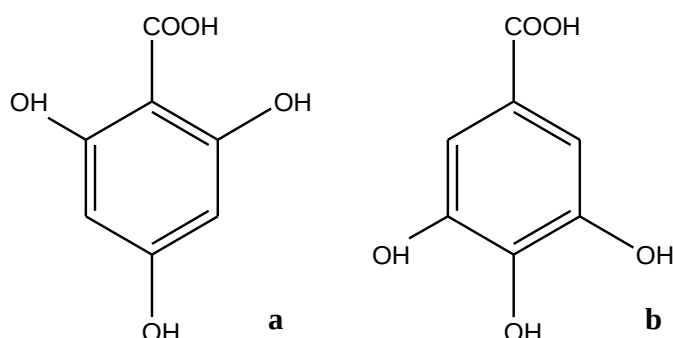


Figura 23. Possibilidades estruturais para Ca-1: **(a)** ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico; **(b)** ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico.

Como o sinal observado para os dois hidrogênios está em 7,04, Ca-1 está condizente com a possibilidade estrutural **b**, uma vez que, no caso da possibilidade estrutural **a**, os hidrogênios estariam mais protegidos ($\delta_H \sim 6,0$) (YANG *et al.*, 2008) que os hidrogênios da possibilidade **b** ($\delta_H \sim 7,0$), visto que, em **a** os hidrogênios estão orto à duas hidroxilas e em **b** os hidrogênios estão orto a carbonila e a hidroxila (CORRADI, 2012).

Diante disso, após comparação desses dados espectrais com a literatura (CORRADI, 2012) (Tabela 2) foi possível identificarmos Ca-1 como o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, mais conhecido como ácido gálico (Figura 24), sendo este isolado pela primeira vez em *C. umbellifera* Benth.

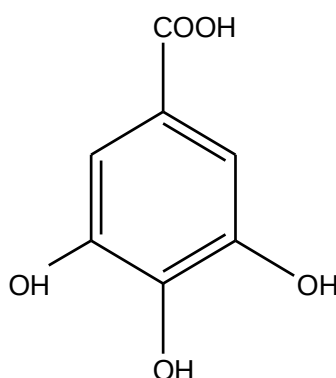


Figura 24. Estrutura do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico).

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ca-1 (200 MHz e 50 MHz, CD_3OD) em comparação com dados da literatura (200 MHz e 50 MHz, CD_3OD) (CORRADI, 2012).

	Ca-1		Ácido gálico	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
1	121,4		122,1	
2	110,3	7,04	110,5	7,06
3	146,2		146,5	
4	139,5		139,7	
5	146,2		146,5	
6	110,3	7,04	110,5	7,06
COOH	170,5		170,6	

Segundo a literatura, o ácido gálico apresenta diversas atividades farmacológicas, entre elas, atividade antitumoral *in vitro* (SANTANA *et al.*, 2012), antimiotóxica (COSTA, 2010), antifúngica frente a *Candida albicans* (PETRÔNIO *et al.*, 2008), antioxidante (HAIDA *et al.*, 2011), antimutagênica, antialérgica, antiinflamatória, inibidor da enzima conversora de angiotensina (NEGI *et al.*, 2005; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Além dessas atividades, o ácido gálico é usado como protótipo, originando diversos derivados com importantes ações farmacológicas, tais como antitumorais, inibidora do HIV-1, antioxidantes e antimalariais (PELLEGRINA *et al.*, 2005).

5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-2

A substância Ca-2 foi obtida como um sólido amorfo castanho com massa de 51,4 mg (correspondendo a 0,016% em relação ao EMB) apresentando ponto de fusão entre 118,0 e 120,0°C e fluorescência à luz ultravioleta que indica a presença de grupo cromóforo na estrutura química da molécula.

O espectro de IV (KBr, cm^{-1}) (Figura 25) deste composto mostrou uma banda larga de absorção em 3419 cm^{-1} , típica de deformação axial de O-H e uma banda de absorção em 1163 cm^{-1} característica de estiramento de C-O de alcoóis e fenóis. Também foram observadas bandas em 2922 cm^{-1} , característica de estiramento de C-H de alcanos, em 1602 cm^{-1} , característica de estiramento de carbonila de cetona conjugada, duas bandas em 920 e 828 cm^{-1} , características de anel para e meta-substituído, respectivamente, e duas absorções em 1276 e 1070 cm^{-1} , referente a estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de C-O de éter arílico. (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010).

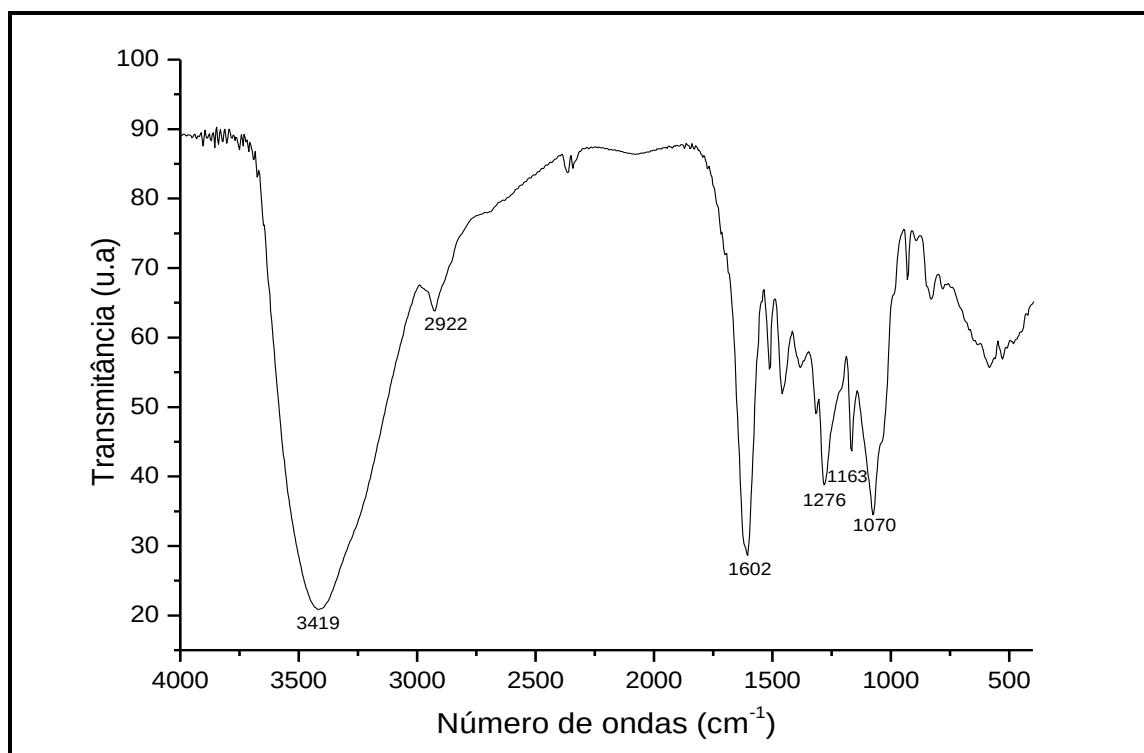


Figura 25. Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ca-2.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-2 e as expansões (Figuras 26, 27 e 28) foram observados dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando orto entre si, em δ_{H} 7,67 e 6,78 ($J = 9,0$ Hz), e outros dois dupletos integrando para um hidrogênio cada, acoplando *meta* entre si, em δ_{H} 6,24 e 6,07 ($J = 2,0$ Hz), nos permitindo sugerir a presença de sistemas AA'BB' e AX na estrutura de Ca-2, respectivamente (LEE *et al*, 2010).

Nestes mesmos espectros também foram observadas absorções na região de hidrogênios alifáticos entre δ_{H} 3,0 e 4,0, sendo quatro duplos dupletos com integral para 1 hidrogênio cada em δ_{H} 3,85 ($J = 2,5$ e 12 Hz), 3,67 ($J = 6$ e 12 Hz) e 3,07 ($J = 8$ e 9 Hz), um tripleto com integral para 1 hidrogênio em δ_{H} 3,27 ($J = 9$ Hz) e um multipletto com integral para 2 hidrogênios em δ_{H} 3,35. Estes sinais associados com a presença de um duplete em δ_{H} 4,81 ($J = 8,0$ Hz), característico de hidrogênio anomérico, nos possibilitou sugerir a presença de uma unidade osídica, mais especificamente uma glicose, ligada ao esqueleto base.

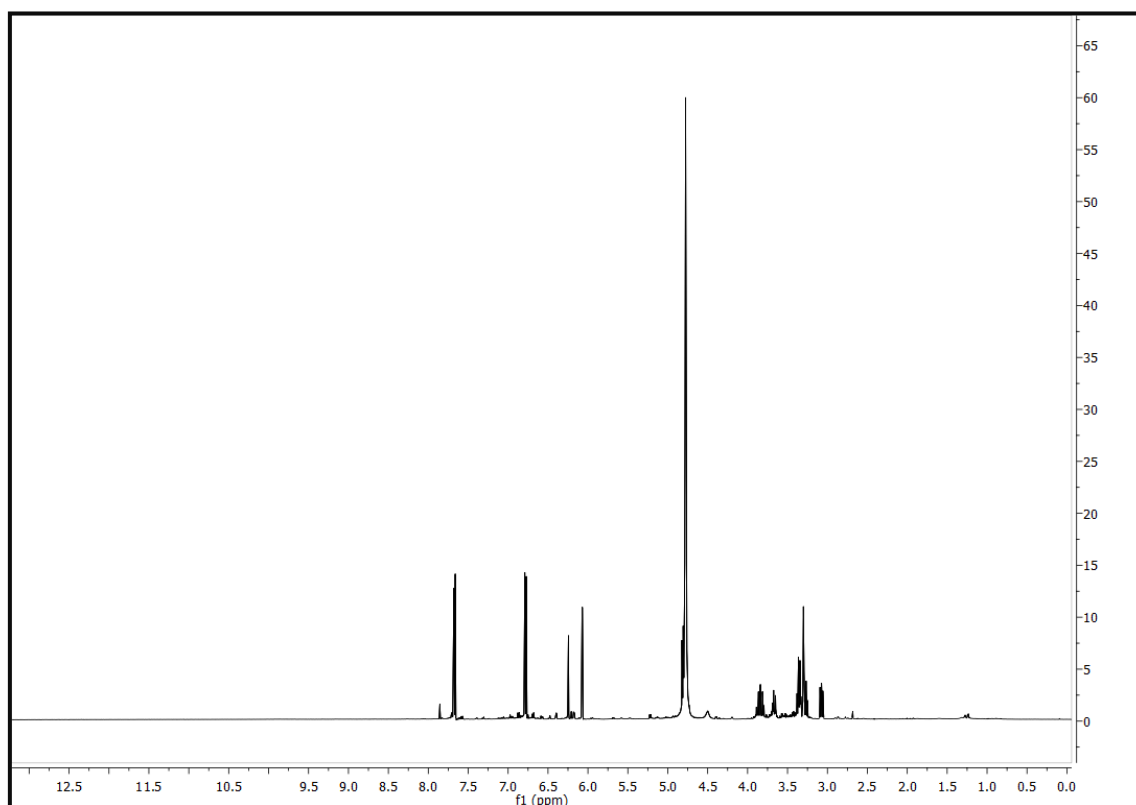


Figura 26. Espectro de RMN ^1H de Ca-2 (500 MHz, CD_3OD).

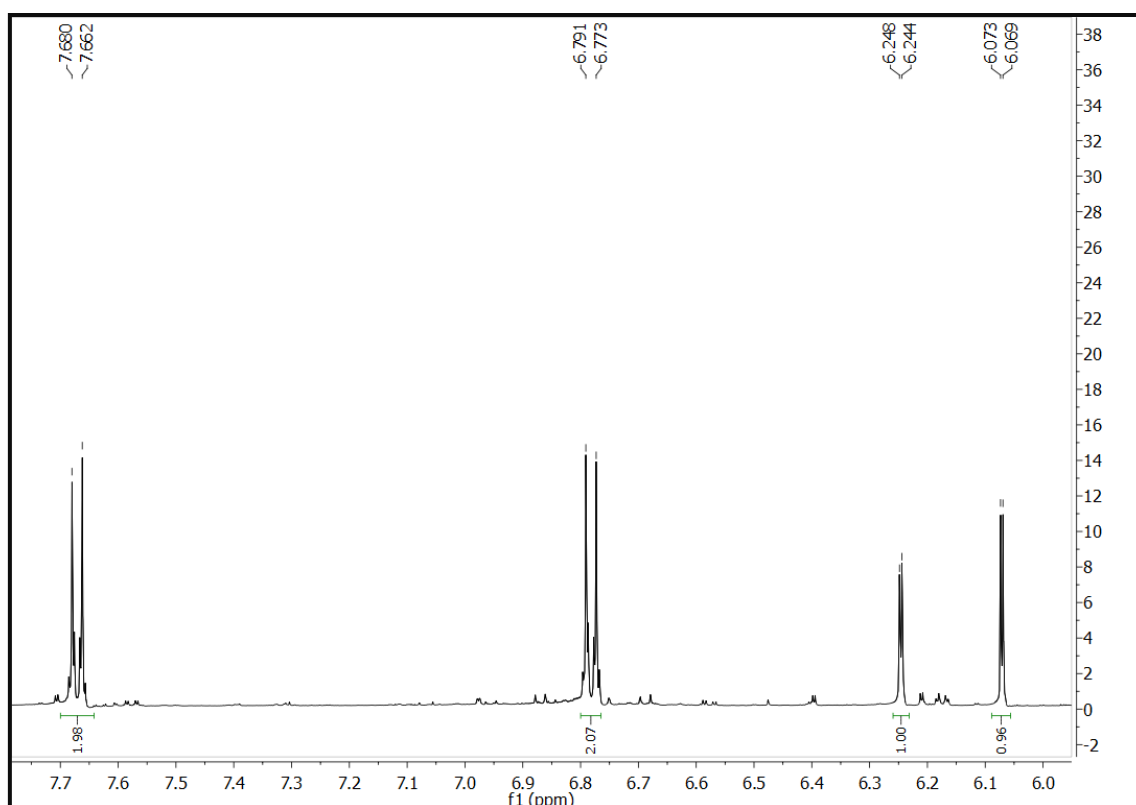


Figura 27. Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-2 na região de 6,0 a 7,8 ppm (500 MHz, CD_3OD).

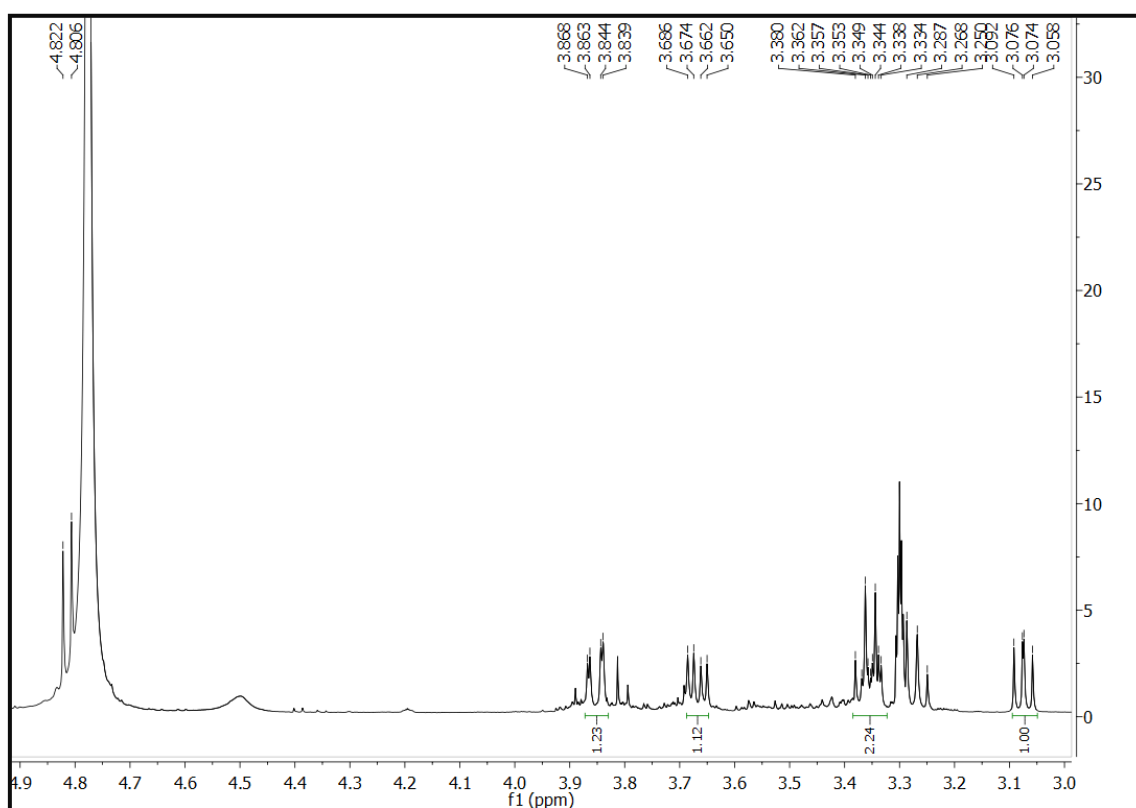


Figura 28. Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-2 na região de 3,0 a 4,9 ppm (500 MHz, CD_3OD).

No espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CD_3OD) de Ca-2 (Figura 29) foram observados dezessete sinais correspondentes a dezenove carbonos. O sinal em δ_{C} 197,5, característico de carbonila conjugada de cetona (WU *et al*, 2012) associado com o deslocamento de dez sinais, correspondentes a doze carbonos, entre δ_{C} 165,0 e 95,0 nos possibilitou sugerir a presença de dois anéis aromáticos conectados por uma carbonila (KAYA *et al*, 2011).

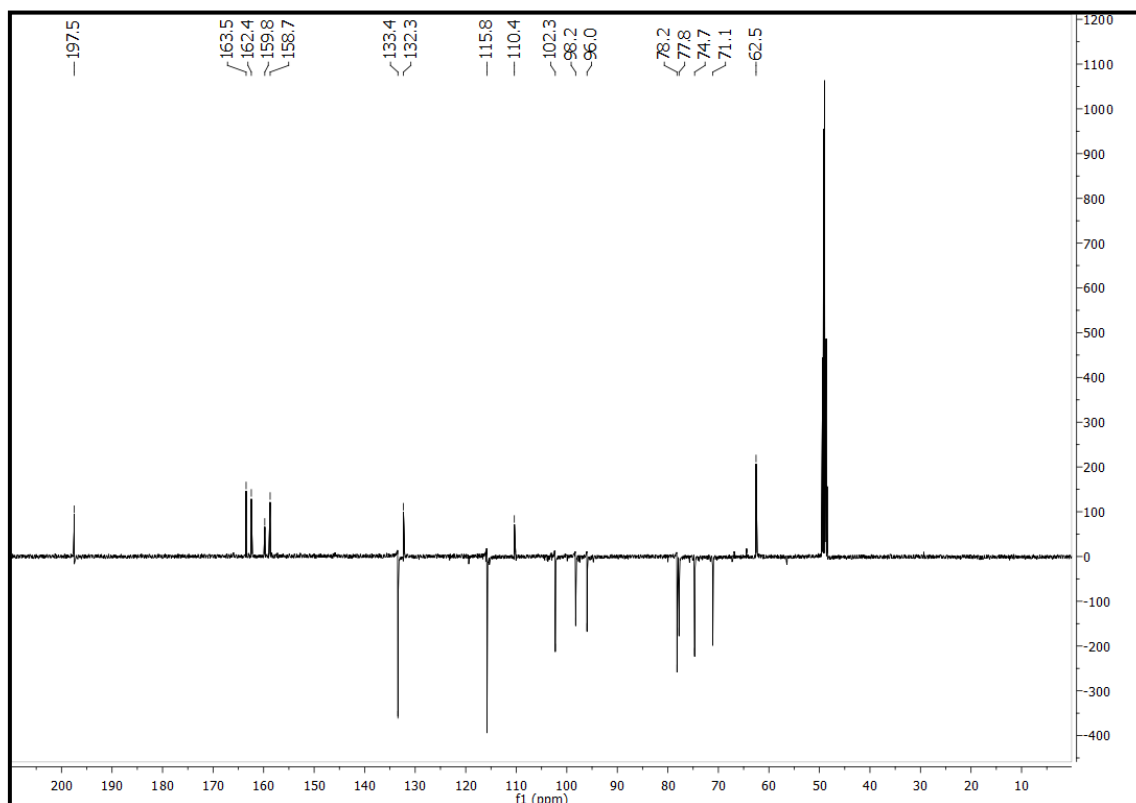


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C - APT de Ca-2 (125 MHz, CD_3OD).

Destes dez sinais, os deslocamentos para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 98,2 e 95,9, bem como, sinais intensos em δ_{C} 133,4 e 115,8 corroboraram com o espectro de RMN ^1H para presença de um anel A 5,7-dissubstituído (sistema AX) e um sistema AA'BB', respectivamente (TENÓRIO-SOUZA, 2010).

Esses dados nos permitiram inferir que Ca-2 tratava-se de uma benzofenona, substituída nas posições 2, 4, 6, afim de que exista um sistema AX, e em 4', para que seja observado o sistema AA'BB' (Figura 30).

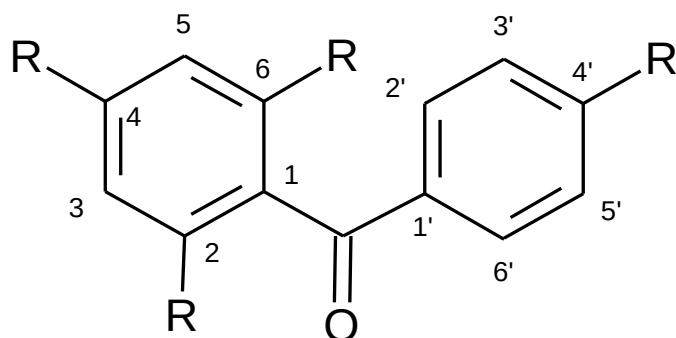
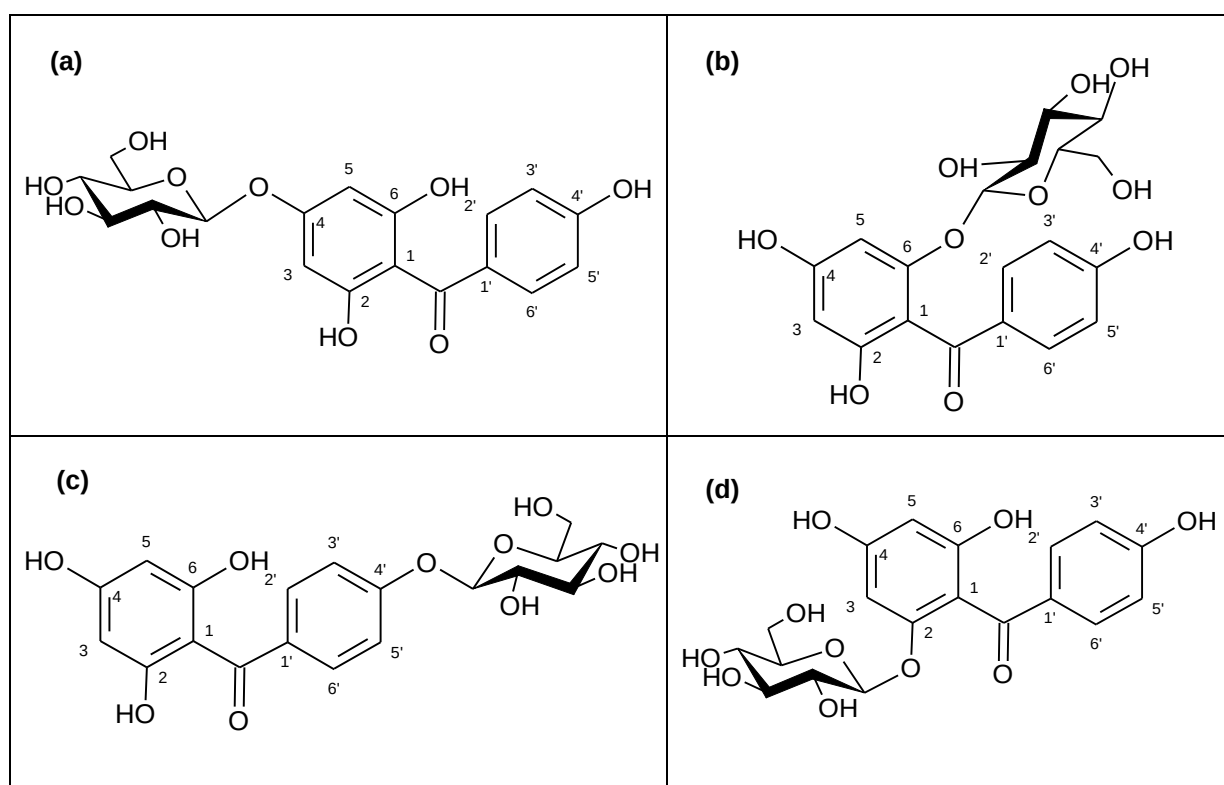


Figura 30. Estrutura básica de uma benzofenona.

Ainda no espectro de RMN ^{13}C , o deslocamento de quatro dos seis sinais (δ_{C} 163,5; 162,4; 159,8 e 158,7) para carbonos aromáticos não hidrogenados nos permitiram sugerir que estes estariam ligados diretamente a oxigênio, nos possibilitando então atribuir os outros dois sinais em δ_{C} 132,3 e 110,4 aos carbonos 1 e 1' ligados a carbonila.

Os sinais para carbonos alifáticos em δ_{C} 62,5; 71,1; 74,7; 77,8 e 78,1, associados com o sinal em δ_{C} 102,3 (característico de carbono anomérico), corroboraram com a presença de uma unidade osídica (glicose) como substituinte na estrutura. A ausência de outros sinais para substituintes associada com a observação de bandas características de hidroxila no espectro de IV (Figura 25), nos possibilitou inferir na molécula de Ca-2, além da presença da unidade de glicose, quatro hidroxilas, entretanto havia quatro posições possíveis (2, 4, 6 e 4') para inserção da glicose e das hidroxilas (Quadro 3).



Quadro 3. Possibilidades estruturais de Ca-2.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Figura 31) foi observada uma correlação entre os dois dupletos em δ_H 6,24 e 6,07 ($J = 2,0$ Hz), correspondentes aos hidrogênios do sistema AX (H3/5) e o sinal para carbono não hydrogenado e não oxigenado em 110,4, nos permitiu atribuir esse sinal ao carbono 1. Da mesma forma, a correlação entre os dois duplos dupletos em δ_H 7,67 e 6,78 ($J = 9,0$ Hz), característicos dos hidrogênios do sistema AA'BB' (H2'/6'; 3'/5') e o sinal para carbono quaternário não oxigenado em δ_C 132,3, nos permitiu atribuir esse sinal ao carbono 1'.

A correlação entre o duplo duplete em δ_H 7,67 e o sinal em δ_C 197,5, característico da carbonila, nos permitiu atribuir esse sinal aos hidrogênios 2' e 6'. Com isso, foi possível sugerir que o duplo duplete em δ_H 6,78 seria correspondente aos hidrogênios 3' e 5'. A correlação entre esses dois duplos dupletos (H2'/6'; 3'/5') e o carbono em δ_C 163,5 nos permitiu também atribuir esse sinal ao carbono 4'.

Neste mesmo espectro foi observada uma correlação entre o hidrogênio anomérico (H1'') em δ_H 4,81 e o sinal em δ_C 158,7, sendo um indicativo de que

a unidade osídica não estaria inserida no carbono 4' (δ_C 163,5), havendo então uma hidroxila ligada a este carbono. Desta forma, foi possível eliminarmos a possibilidade estrutural **(c)**.

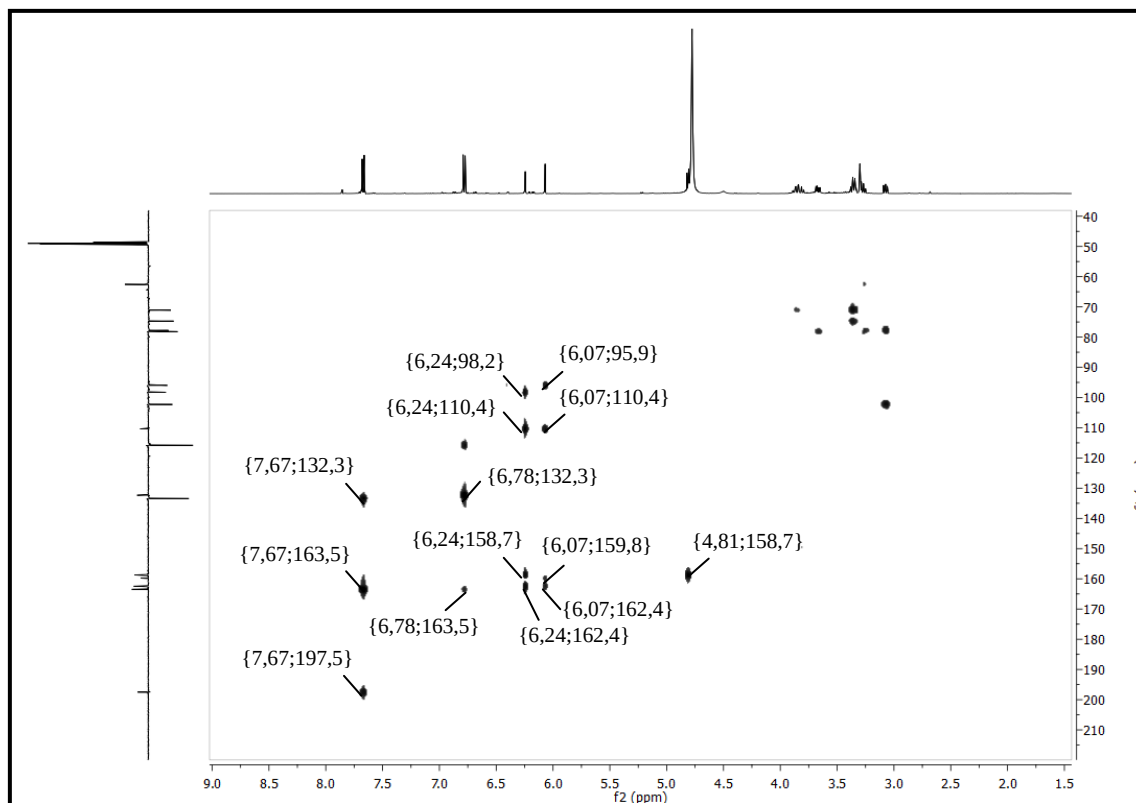


Figura 31. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Ca-2.

No espectro bidimensional de correlação homonuclear NOESY (Figura 32) foi observada uma correlação entre o hidrogênio anomérico 1'' em δ_H 4,81 e apenas um hidrogênio em δ_H 6,24 (H3), nos permitindo sugerir que a glicose não estaria inserida na posição 4 **(a)**, já que nesse caso seriam esperadas correlações entre o hidrogênio anomérico e os hidrogênios 3 e 5 (LEE *et al*, 2010).

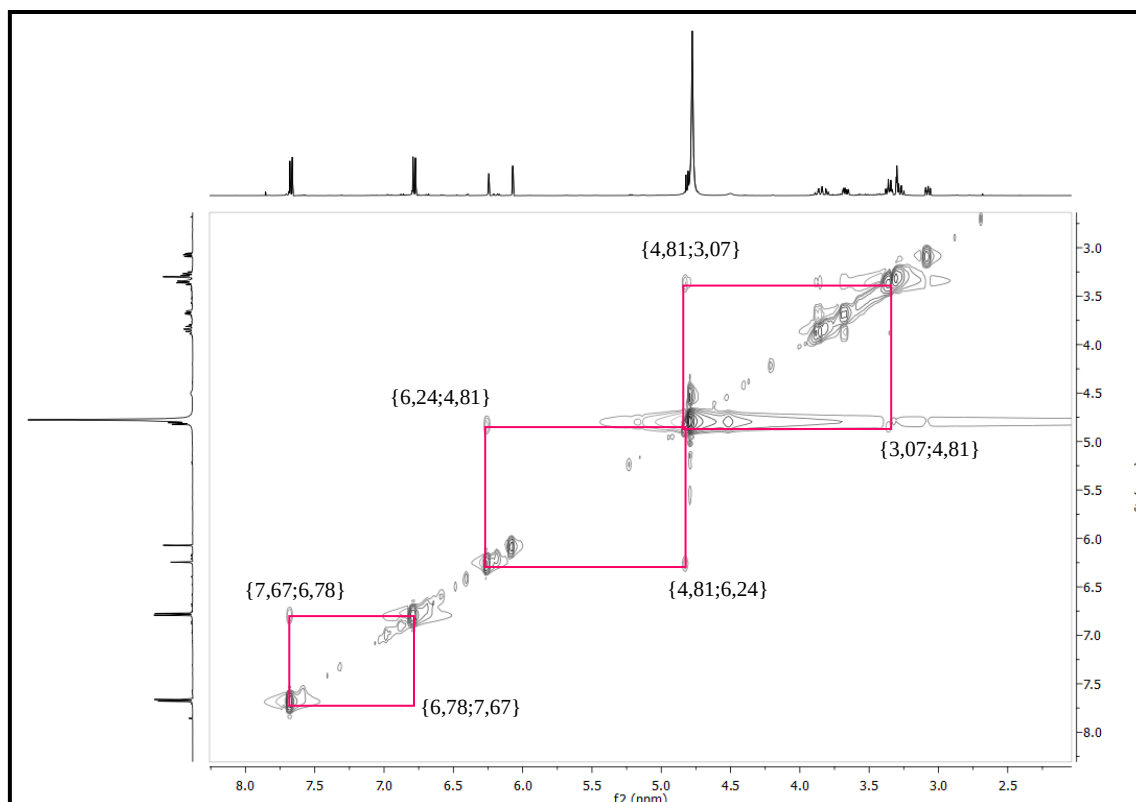


Figura 32. Espectro NOESY (500 x 500 MHz, CD₃OD) de Ca-2.

Após comparação dos valores presentes na literatura (LEE *et al*, 2010; KAYA *et al*, 2011; RANCON *et al*, 2001) para o deslocamento dos carbonos 2, 4 e 6 de benzofenonas quando a glicose está inserida em cada um destes carbonos (Figura 33), com os sinais presentes no espectro de RMN ¹³C de Ca-2 (δ_C 158,7; 162,4 e 159,8), foi possível confirmar que a glicose não estaria inserida nas posições 4 e 6, descartando assim as possibilidades estruturais **(a)** e **(b)**. Dessa forma, esses dados nos permitiram inferir que a glicose estaria inserida na posição 2 e as hidroxilas nas posições 4 e 6.

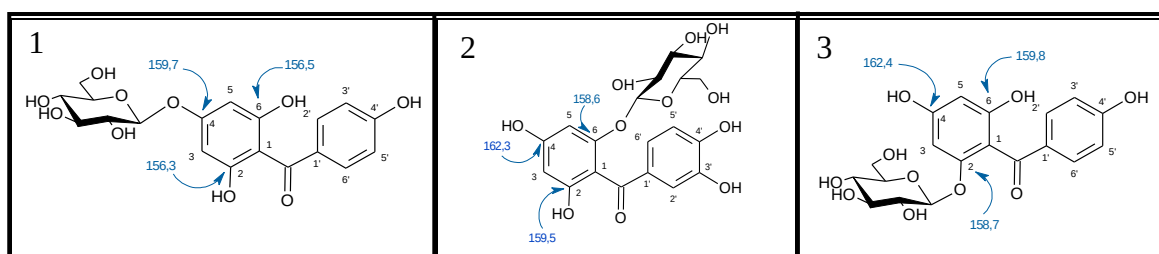


Figura 33. Valores de RMN ¹³C para os carbonos 2, 4 e 6 em **(1)** 2,6,4'-Trihidroxibenzofenona 4-O-β-d-Glicopiranosídeo, **(2)** 2,4,3',4'-tetrahidroxibenzofenona 6-O-β-glicopiranosídeo e **(3)** 4,6,4'- trihidroxibenzofenona 2-O-β-d-Glicopiranosil.

Segundo Kaya e colaboradores (2011), o hidrogênio que fica entre uma unidade osídica e hidroxila é mais desprotegido que o hidrogênio que fica entre duas hidroxilas. Diante disto, pôde-se atribuir o duplete em δ_H 6,24 ao hidrogênio 3 e o duplete em δ_H 6,07 ao hidrogênio 5. As correlações observadas no espectro bidimensional de correlação heteronuclear direta HMQC (Figura 34) entre o sinal em δ_H 6,24 (H3) e o sinal em δ_C 95,9 e entre o hidrogênio em δ_H 6,07 (H5) e o carbono em δ_C 98,2, possibilitaram a atribuição dos sinais em δ_C 95,9 e 98,2 aos carbonos 3 e 5, respectivamente.

Neste mesmo espectro foi possível atribuir os dois sinais intensos em δ_C 133,4 e 115,8 aos carbonos 2'/6' e 3'/5', respectivamente, ao observar a correlação entre o duplo duplete em δ_H 7,67 (H2'/6') e o sinal em δ_C 133,4; e entre o outro duplo duplete em δ_H 6,78 (H3'/5') com o sinal em δ_C 115,8.

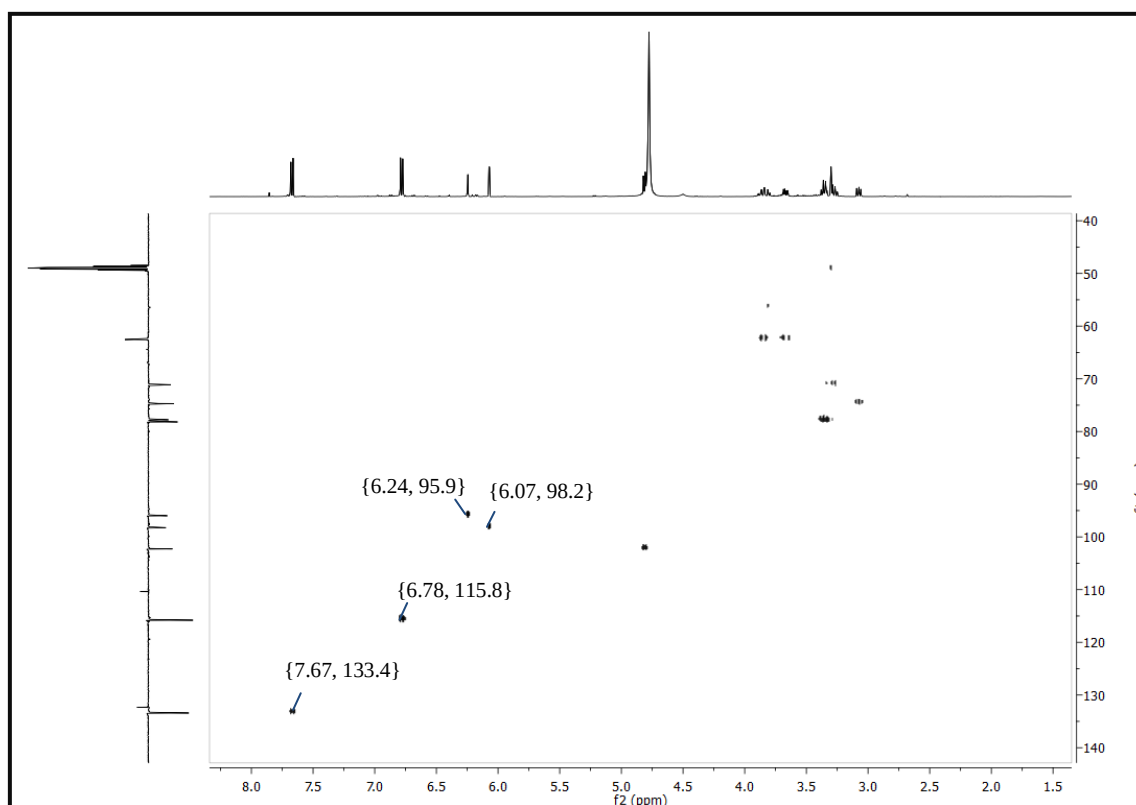


Figura 34. Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de Ca-2.

Os deslocamentos químicos e as principais correlações observadas nos espectros de RMN uni e bidimensionais para Ca-2 estão compilados na Tabela 3. A Tabela 4 faz uma comparação dos valores de RMN ^1H e ^{13}C apresentados

por esta substância com os dados citados por Lee e colaboradores (2010) para iriflofenona glicosilada, que reforçam a proposta estrutural **(d)** para Ca-2.

Tabela 3. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono e hidrogênio da substância Ca-2, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CD_3OD .

C	HMQC		HMBC		NOESY	COSY
	δ_{H}	δ_{C}	J^2	J^3		
1	-	110,4	-	-	-	-
2	-	158,7	-	-	-	-
3	6,24 (d, $J = 2$ Hz)	95,9	C-2, C-4	C-1, C-5	C-1"	C-5
4	-	162,4	-	-	-	-
5	6,07 (d, $J = 2$ Hz)	98,2	C-4, C-6	C-1, C-3	-	C-3
6	-	159,8	-	-	-	-
1'	-	132,3	-	-	-	-
2'/6'	7,67 (d, $J = 9$ Hz)	133,4	C-1'	C-4', C-7	C-3'/5'	C-3'/5'
3'/5'	6,78 (d, $J = 9$ Hz)	115,8	C-4'	C-1'	C-2'6'	C-2'6'
4'	-	163,5	-	-	-	-
7	-	197,5	-	-	-	-
1"	4,81(d, $J = 8$ Hz)	102,3	-	C-2	C-3, C-2"	C-2"
2"	3,07 (dd, $J = 8/9$ Hz)	74,7	C-1", C-3"	-	-	C-1", C-3"
3"	3,35 (m)	77,8	C-4", C-2"	-	-	C-2", C-4"
4"	3,27 (dd, $J = 9/9,5$ Hz)	71,1	C-3", C-5"	C-6"	-	C-3", C-5"
5"	3,34-3,38 (m)	78,2	C-4"	-	-	C-4, C-6a"
6a"	3,85 (dd, $J = 2,5/12$ Hz)	62,5	-	C-4"	-	C-5, C-6b"
6b"	3,67 (dd, $J = 6/12$ Hz)		C-5"	-	-	C-6a"

Tabela 4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ca-2 e da Iriflofenona 2-O- β -d-glicopiranosídeo da literatura em CD_3OD (*LEE *et al.*, 2010).

Ca-2		Iriflofenona 2-O- β -d-Glicopiranosídeo*	
	δ_{H}	δ_{C}	
1		110,4	110,3
2		158,7	158,7
3	6,24 (d, $J = 2,0$ Hz)	95,9	6,24 (d, $J = 1,8$ Hz)
4		162,4	162,4
5	6,07 (d, $J = 2,0$ Hz)	98,2	6,06 (d, $J = 2,0$ Hz)
6		159,8	159,6
1'		132,3	132,1
2'/6'	7,67 (d, $J = 9,0$ Hz)	133,4	7,65 (d, $J = 8,8$ Hz)
3'/5'	6,78 (d, $J = 9,0$ Hz)	115,8	6,74 (d, $J = 8,8$ Hz)
4'		163,5	163,6
7'		197,5	197,5
1''	4,81(d, $J = 8,0$ Hz)	102,3	4,82 (d, $J = 7,6$ Hz)
2''	3,07 (dd, $J = 8,0/9,0$ Hz)	74,7	3,09 (dd, $J = 7,6/8,8$)
3''	3,35 (m)	77,8	3,37 (dd, $J = 8,8/9,3$)
4''	3,27 (dd, $J = 9,0/9,5$ Hz)	71,1	3,27 (t, $J = 9,3$)
5''	3,34-3,38 (m)	78,2	3,33 – 3,37 (m)
6''	3,85 (dd, $J = 2,5/12,0$ Hz)	62,5	3,86 (dd, $J = 2,3/12,3$)
	3,67 (dd, $J = 6,0/12,0$ Hz)		3,67 (dd, $J = 5,3/12,3$)

O espectro de massas ESI-MS no modo de ionização positivo de Ca-2 (Figura 35) corroborou com as propostas dos espectros anteriores ao mostrar um pico de íon molecular em m/z 409,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. Neste espectro também foi possível observar um fragmento em m/z 289,0, tendo como sugestão o seguinte mecanismo de fragmentação (Figura 36).

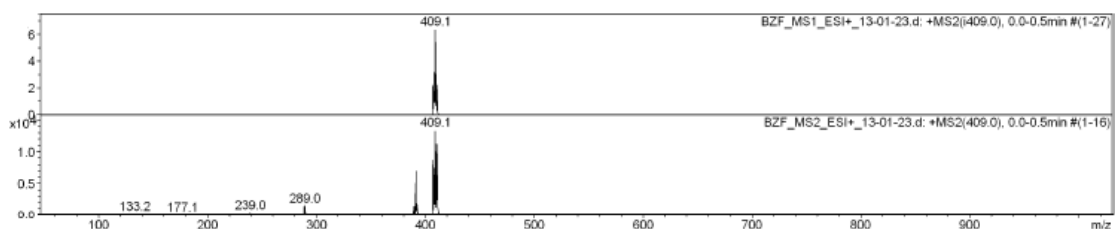


Figura 35. Espectro de massas ESI-MS de Ca-2.

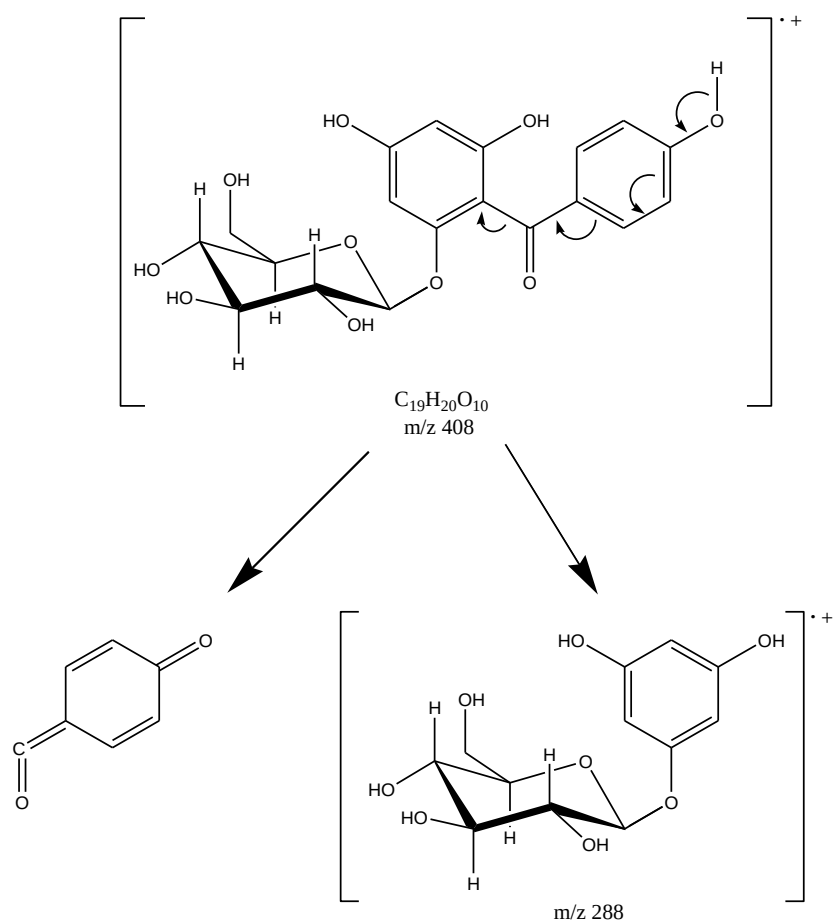


Figura 36. Proposta de fragmentação de Ca-2.

Diante disto, os dados dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e ESI-EM, bem como, comparações com os dados apresentados na literatura permitiram identificar Ca-2 como sendo 4,6,4'-trihidroxibenzofenona 2-O-β-d-Glicopiranosídeo ou Iriflofenona 2-O-β-d-Glicopiranosídeo (Figura 37).

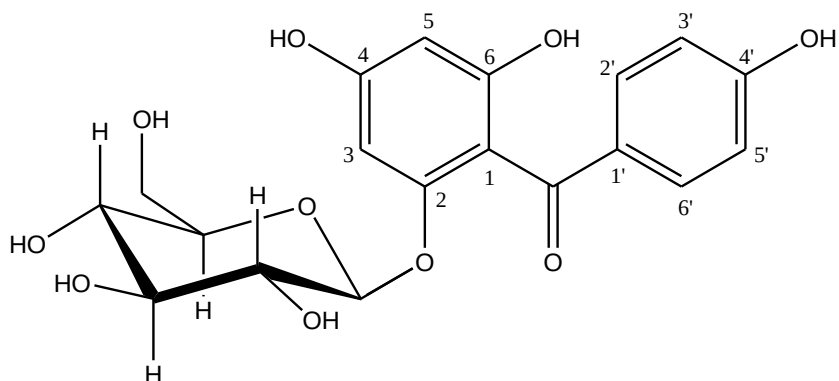


Figura 37. Estrutura química de Ca-2: 4,6,4'-trihidroxibenzofenona 2-O-β-d-Glicopiranosil ou Iriflofenona 2-O-β-d-Glicopiranosídeo.

A Iriflofenona 2-O- β -d-Glicopiranosídeo foi isolada anteriormente de *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg (Thymelaeaceae), *Planchonella obovata* (R. Br.) Pierre (Sapotaceae), *Coleogyne ramosissima* Torr. (Rosaceae), entretanto esse trabalho é o primeiro relato dessa substância na família Fabaceae, contribuindo para o conhecimento farmacognóstico desta família.

Farmacologicamente, Iriflofenona 2-O- β -d-Glicopiranosídeo trata-se de uma substância pouco estudada, no entanto, estudo realizado por Feng e colaboradores (2011), mostrou que a iriflofenona glicosilada é inibidora da enzima alfa-glicosidase, sendo, um indicativo da possível atividade no tratamento da diabetes tipo II, uma vez que esta é umas das principais enzimas que permitem a absorção da glicose no sangue.

5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-3

A substância Ca-3 foi obtida como um sólido amorfo castanho com massa de 50,0 mg (correspondendo a 0,015% em relação ao peso do EMB) apresentando ponto de fusão na faixa de 178,0 e 180°C (180-182°C, segundo ABDEL-HAMEED *et al.*, 2007).

O espectro de IV (KBr) (Figura 38) de Ca-3 mostrou uma banda larga de absorção em 3404 cm^{-1} , típica de deformação axial de O-H e uma banda de absorção em 1076 cm^{-1} , característica de estiramento de C-O de álcool cíclico. Também foi observada banda em 2935 cm^{-1} , característica de estiramento de C-H de alcanos (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010).

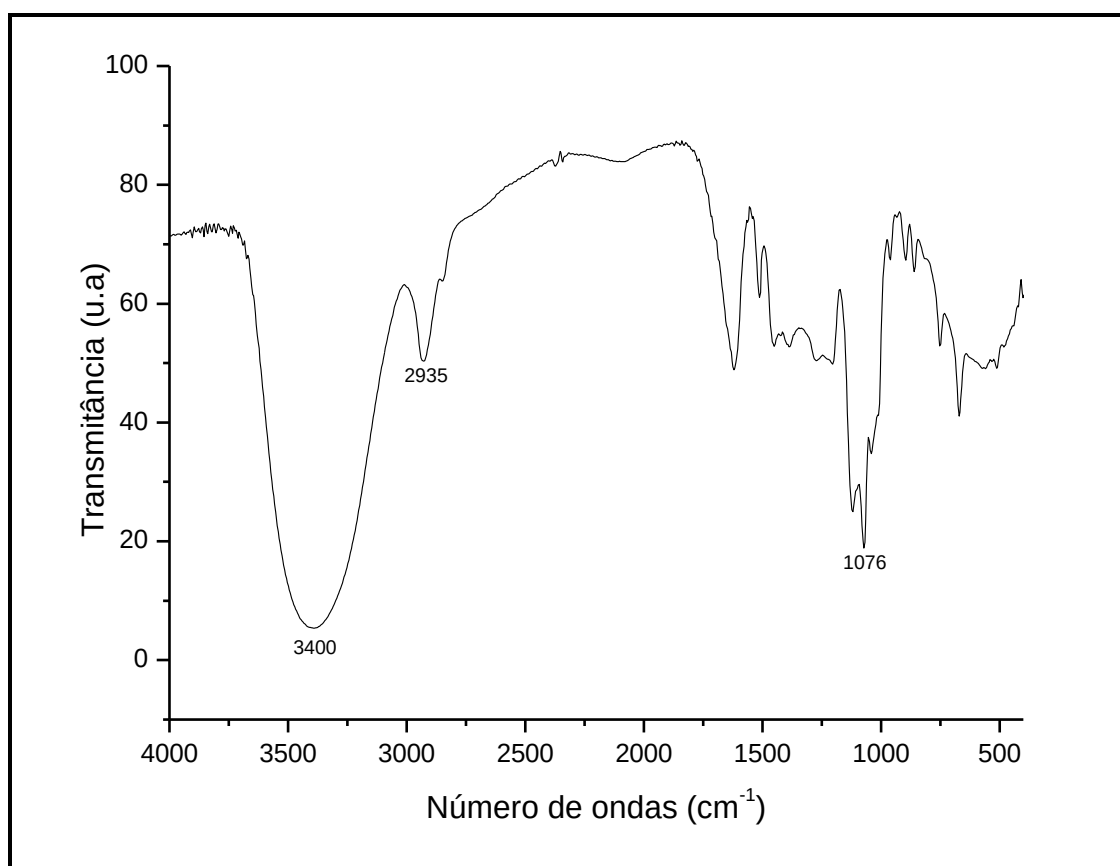


Figura 38. Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ca-3.

No espectro de RMN ^{13}C e sua expansão (125 MHz, CD_3OD) (Figuras 39 e 40) de Ca-3 foram observados sete sinais característicos de carbonos alifáticos ligados a oxigênio (δ_c 84,9; 74,3; 73,8; 73,5; 72,6; 72,1; 60,8), sendo o

sinal em δ_c 60,8, característico de metoxila. A ausência de sinal referente e carbono anomérico ($\delta_c \sim 100,0$) descartou a possibilidade de Ca-3 ser um monossacarídeo, levando a pensar que Ca-3 poderia se tratar de um composto semelhante a um monossacarídeo (hexose), sendo um poliol ciclohexânico metoxilado (Figura 41) (SHEVTS, 1974; ANGYAL, ODIER; 1983; SURESHAN *et al.*; 2003 apud ENDRINGER, 2007).

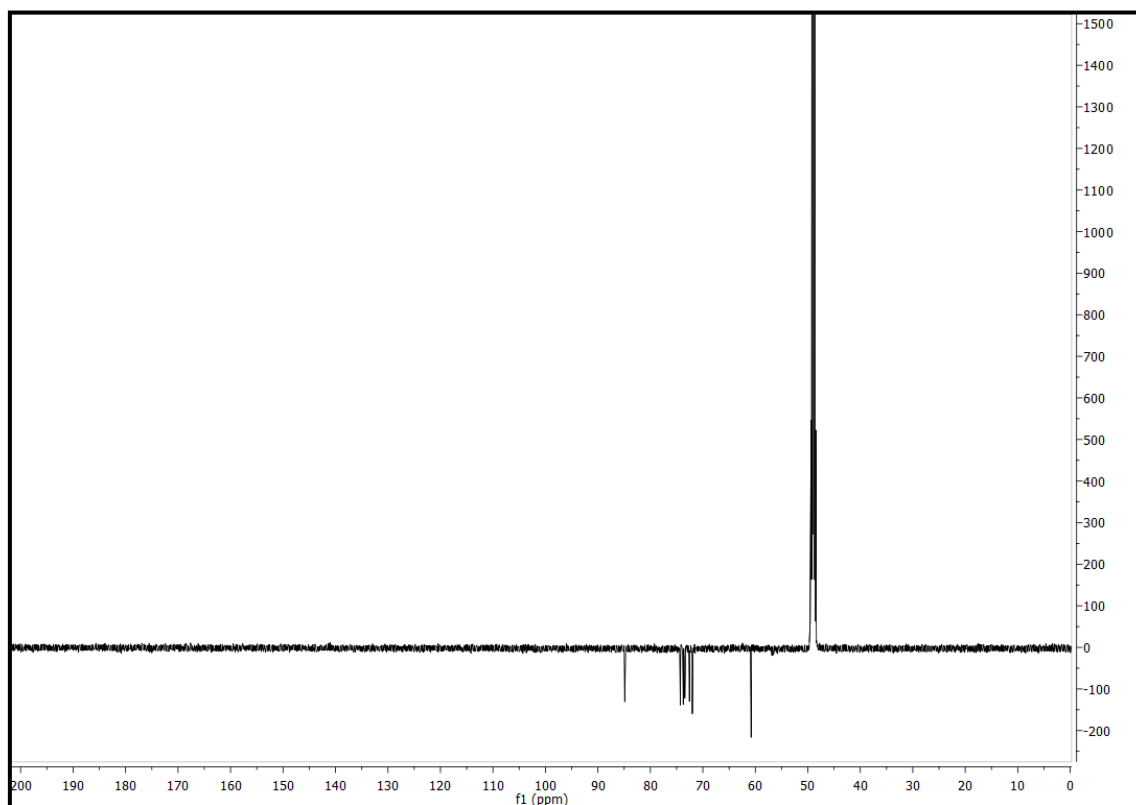


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Ca-3.

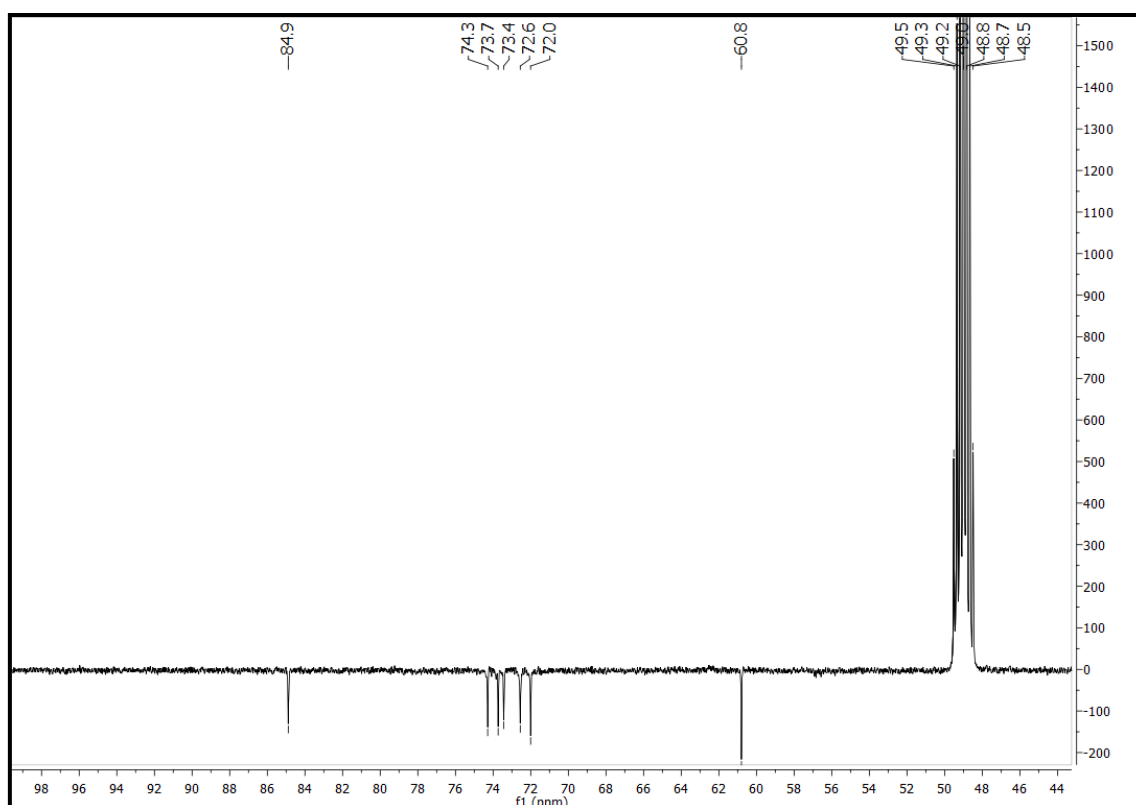


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Ca-3 na região de 40 a 100 ppm.

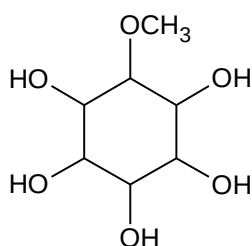


Figura 41. Estrutura de um poliol ciclohexânico metoxilado.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-3 (Figura 42) foram observados seis sinais, correspondentes a nove hidrogênios, característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados (δ_{H} 3,0 a 4,0). Esses sinais associados com a ausência de sinal na região de δ_{H} 4,30 corroboraram com a proposta de um poliol ciclohexânico (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010).

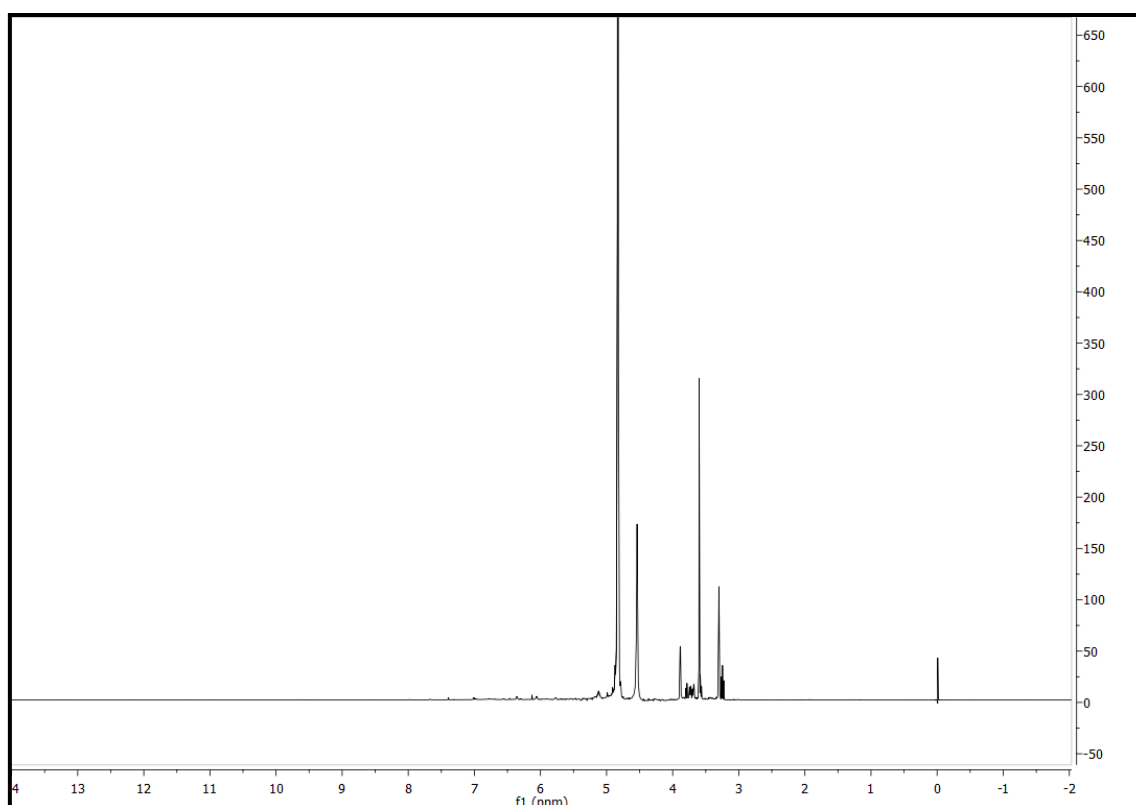


Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-3.

Na expansão desse espectro (Figura 43), foram observados dois dupletos, em δ_{H} 3,69 (1H) e 3,73 (1H), com constantes de acoplamento de 10,0 e 2,5 Hz, os quais nos possibilitaram sugerir a presença de dois sistemas de acoplamento axial-axial e axial-equatorial para os dois hidrogênios ($\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{eq}}$). Foram observados também dois tripletos em δ_{H} 3,58 e 3,25, com integral para um hidrogênio cada e constante de acoplamento de 9,5 Hz, nos permitindo sugerir a presença de sistema de acoplamento $\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}$. O duplete em δ_{H} 3,88, com integral para dois hidrogênios e constante de acoplamento de 2,0 Hz nos permitiu propor um acoplamento equatorial-axial ou equatorial-equatorial, enquanto que o simpleto intenso observado em δ_{H} 3,60, com integral para três hidrogênios, foi atribuído a um grupo metoxila, corroborando com o espectro de RMN ^{13}C .

A banda de estiramento de O-H observada no espectro de infravermelho (Figura 38) associada a ausência de sinais para outros substituintes, nos levar a sugerir a presença de hidroxilas como substituintes na molécula.

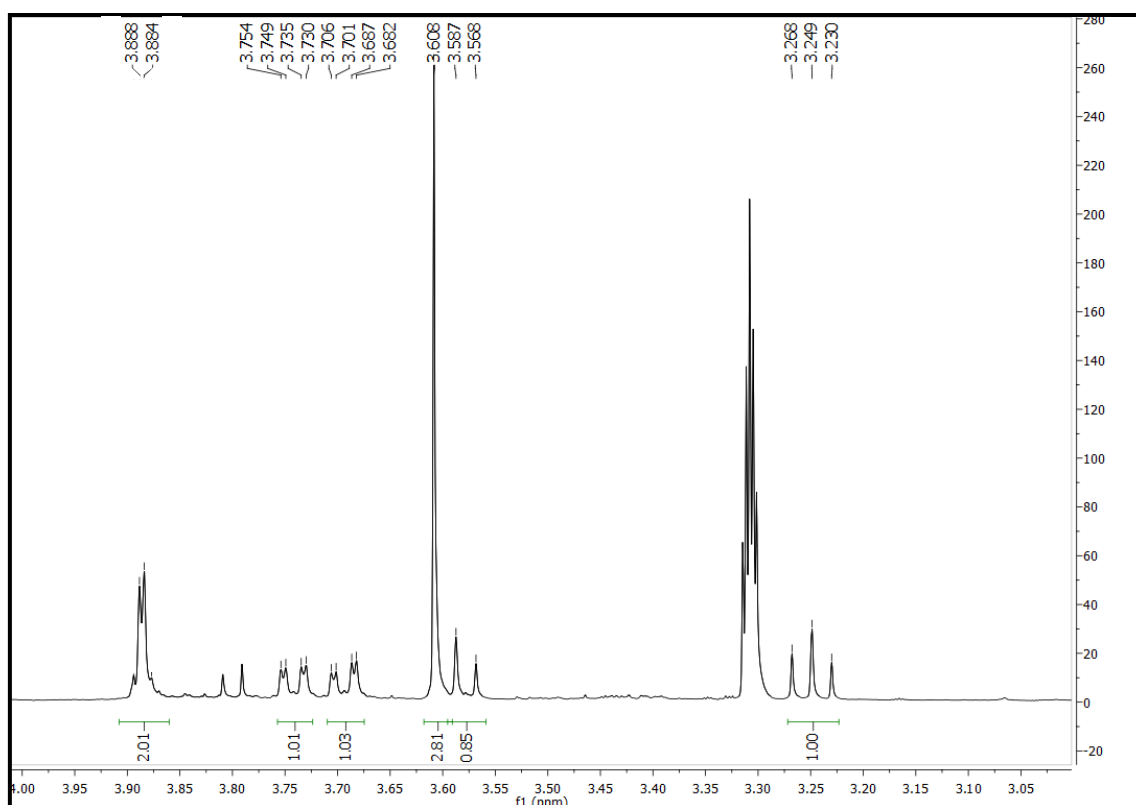


Figura 43. Expansão do RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ca-3 na região de 3,00 a 4,00 ppm.

Esses sistemas de acoplamento observados no espectro de RMN ^1H (2 sistemas $\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}$, 2 $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}$ e 1 $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{eq}}$ ou $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{ax}}$), após serem comparados com a literatura (IUPAC, 2006) (Figura 44), nos permitiram sugerir que Ca-3 se tratava de um derivado do *chiro*-inositol.

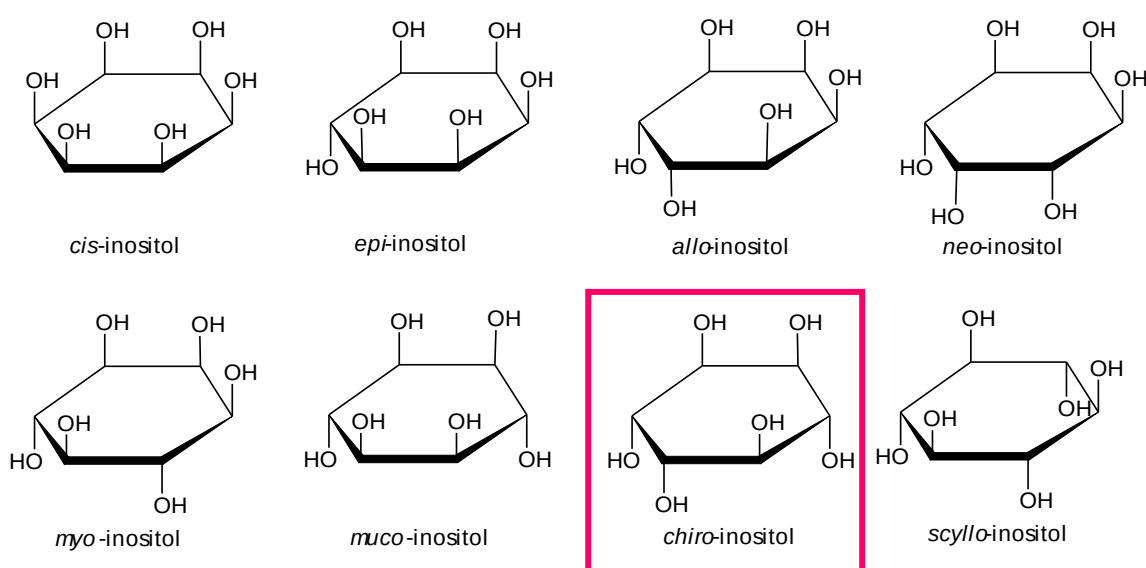


Figura 44. Estrutura dos inosítois (IUPAC, 2006).

Sabendo que o singlete em δ_H 3,60 é característico da metoxila, a correlação observada no espectro bidimensional de correlação heteronuclear indireta HMBC (Figura 45) entre esse singlete e o sinal em δ_C 84,89 nos possibilitou atribuir esse sinal ao carbono diretamente ligado a metoxila. Diante disso, a correlação observada no espectro bidimensional de correlação direta HMQC (Figura 46) entre o sinal em δ_H 3,25 e esse carbono em δ_C 84,89 nos possibilitou atribuir esse sinal ao hidrogênio ligado ao carbono em que a metoxila está inserida.

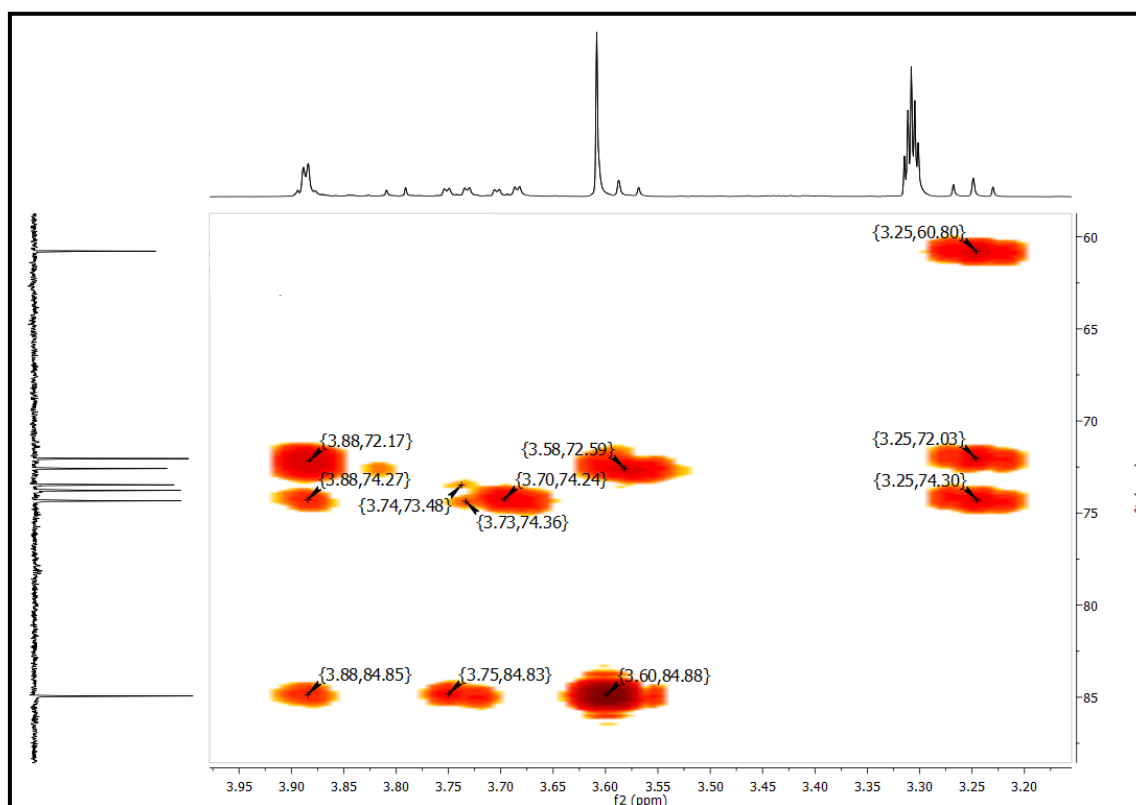


Figura 45. Expansão do espectro HMBC (CD₃OD, 500 e 125 MHz) de Ca-3 na região de (3,0 - 4,0 ppm) x (60 – 90 ppm).

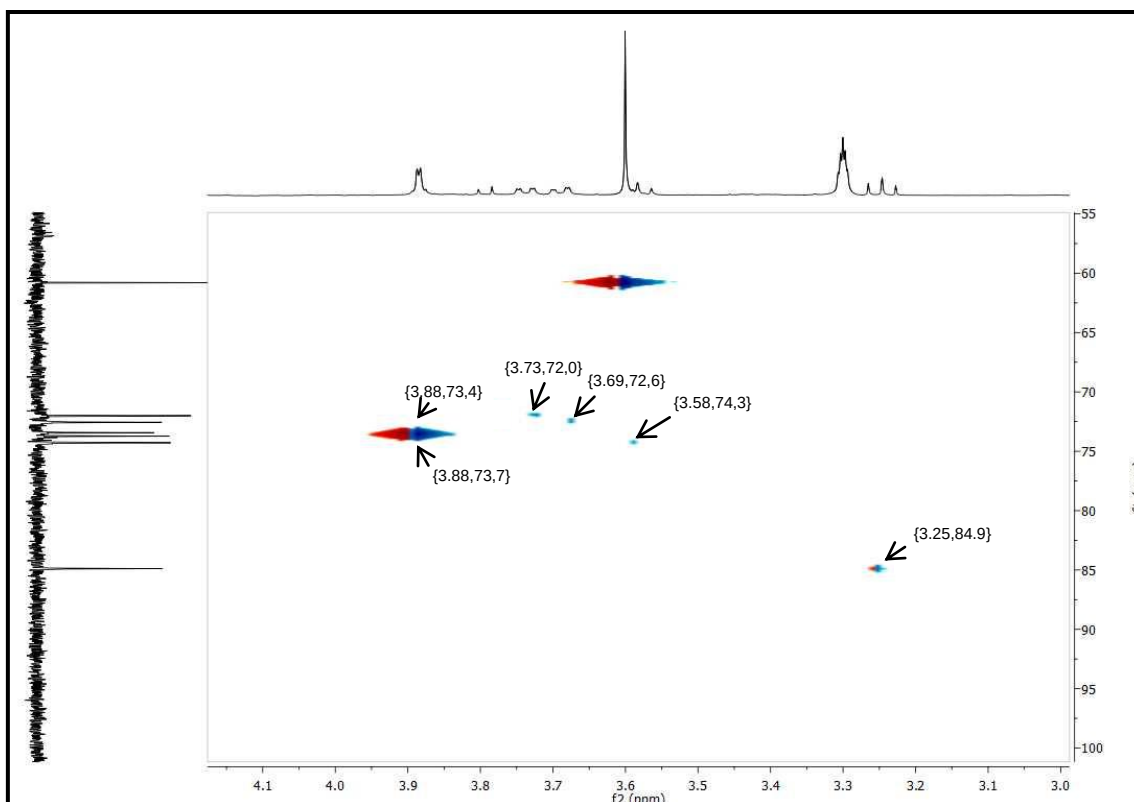


Figura 46. Expansão do espectro HMQC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Ca-3 na região de (3,0 – 4,2 ppm) x (55 – 100 ppm).

O sistema de acoplamento $\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}$ desse triplete em δ_{H} 3,25, nos fez então sugerir que a metoxila estaria inserida na posição 3 ou 4, já que ambas apresentam o mesmo sistema de acoplamento (Figura 47). Entretanto, Anderson e colaboradores (1952), através de reações de acetonação e metilação do inositol, definiram que a metoxila estava inserida no carbono 3.

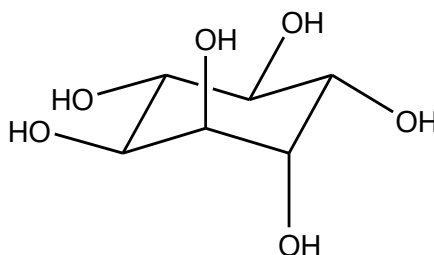
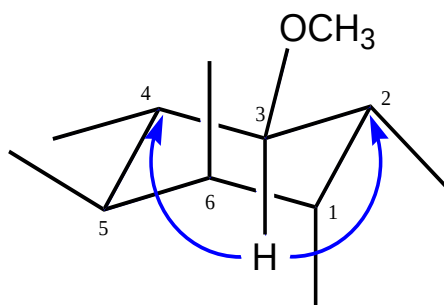


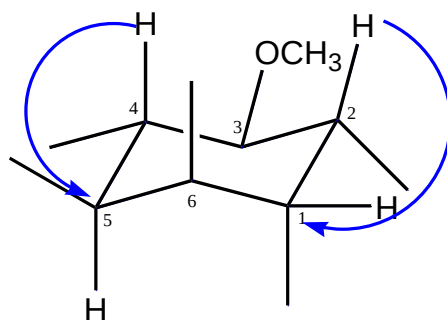
Figura 47. Estrutura espacial do *chiro*-inositol.

Partindo dessa premissa, no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC foram observadas correlações entre o hidrogênio 3 (δ_{H} 3,25) e os sinais em δ_{C} 74,31 e 72,01, sendo estes então correspondentes aos carbonos 2 e 4. No espectro bidimensional de correlação direta HMQC foi

possível identificarmos os hidrogênios 2 e 4 através das correlações observadas entre o duplo duplete em δ_H 3,73, com constante de acoplamento característica de sistema $H_{eq}-H_{ax}-H_{ax}$, e o sinal em δ_C 72,01, e entre o tripleto em 3,58, com constante de acoplamento característica de sistema $H_{ax}-H_{ax}-H_{ax}$, e o sinal em δ_C 74,31. Através destes sistemas de acoplamento foi possível sugerirmos que os sinais δ_H 3,73 e δ_C 72,01 são característicos do hidrogênio e carbono 2, enquanto os sinais em δ_H 3,58 e δ_C 74,31 referem-se aos hidrogênio e carbono 4, respectivamente.



Ainda no que diz respeito ao espectro HMBC, também foi possível observarmos uma correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,58 (H-4) e o sinal em δ_C 72,56, e entre hidrogênio em δ_H 3,73 (H2) e o carbono em δ_C 73,43, nos permitindo sugerir que os sinais em δ_C 72,56 e 73,43 se referiam aos carbonos 5 e 1, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios ligados a esses carbonos foram atribuídos através da análise do HMQC, sendo o duplo duplete em δ_H 3,69 correspondente ao hidrogênio 5 e o duplete em δ_H 3,88 correspondente ao hidrogênio 1. Como o duplete em δ_H 3,88 tem integral para dois hidrogênios, atribuímos esse sinal aos hidrogênios 6 e 1. Dessa forma, ao observarmos a correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,88 e o sinal em δ_C 73,73 no HMQC, atribuímos esse sinal ao carbono 6.



Como os derivados do chiro-inositol podem ter configuração d ou l, foi realizado o experimento de rotação óptica, obtendo-se o valor de + 55 (c = 0,01g/mL, CH₃OH) para o α-D, indicando que se trata do isômero D.

O espectro de massas ESI-MS, no modo de ionização positivo, de Ca-3 (Figura 48) corroborou com as propostas dos espectros anteriores ao mostrar um pico de íon molecular em m/z 195,0 $[M + H]^+$, condizente com a fórmula molecular C₇H₁₄O₆.

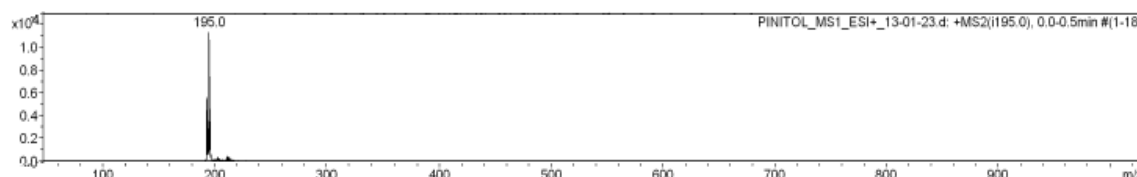


Figura 48. Espectro de massas ESI-MS de Ca-3.

Após análise dos espectros RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e do experimento de rotação óptica, e sua comparação com a literatura (Tabela 5) foi possível identificarmos Ca-3 o 3-O-metil-D-chiro-inositol, conhecido como pinitol (Figura 49), sendo este isolado pela primeira vez no gênero *Calliandra*.

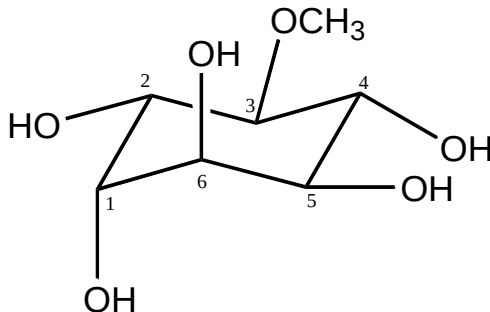


Figura 49. Estrutura química do 3-O-metil-D-chiro-inositol (pinitol).

Tabela 5. Dados de RMN ¹H e ¹³C em metanol deuterado de Ca-3 e dados de RMN ¹³C do pinitol (CD₃OD) presente na literatura (DELLAGRECA, 2007).

Ca-3			Pinitol
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)
1	3,88 (d, J = 2,0 Hz, 2H)	73,4	74,2
2	3,73 (dd, J = 2,5; 10,0 1H)	72,0	73,4
3	3,25 (t, J = 9,5 Hz, 1H)	84,9	85,4
4	3,58 (t, J = 9,5 Hz, 1H)	74,3	74,8
5	3,69 (dd, J = 2,5; 10,0 Hz, 1H)	72,6	73,0
6	3,88 (d, J = 2,0 Hz, 2H)	73,7	74,0
OCH ₃	3,60 (s, 3H)	60,8	61,2

O pinitol é um ciclitol abundante em algumas plantas sendo um componente importante das famílias Pinaceae, Leguminosae e Caryophyllaceae. Sua rota biossintética tem sido elucidada nas gimnospermas e em plantas leguminosas, incluindo o myo-inositol como seu precursor (Figura 50). Nas plantas, esse composto está relacionado com a adaptação a condições osmóticas drásticas (NGUYEN e LAMANT, 1988; LOEWUS e MURTHY, 2000).

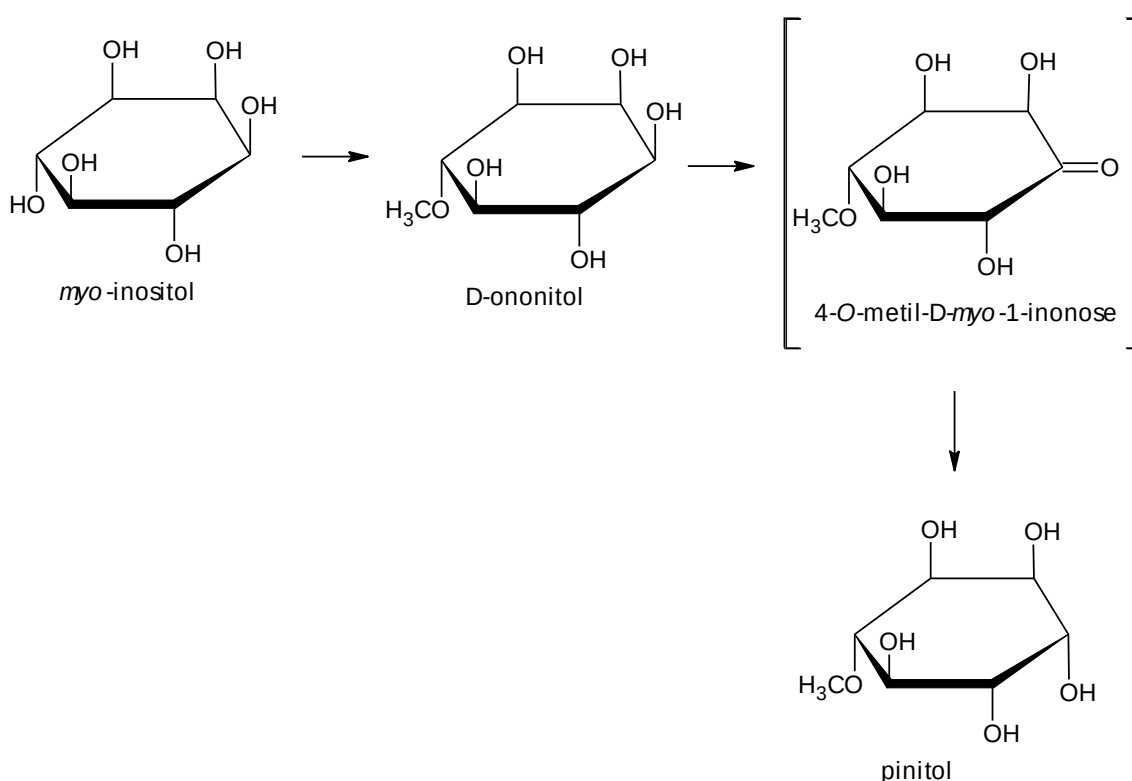


Figura 50. Conversão bioquímica do myo-inositol para pinitol. Os colchetes indicam um intermediário teórico (LOEWUS & MURTHY, 2000)

Foram realizados diversos estudos *in vitro* e *in vivo* com o pinitol, os quais relataram atividade antidiabética (BATES *et al.*, 2000), anti-inflamatória (CUÉLLAR *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001), antimicrobiana (AGNESE *et al.*, 2001 apud ENDRINGER, 2007), antitumoral (OSTLUND; SHERMAN, 1996; ZHAN; LOU, 2007), imunoestimulante (LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b) e larvívica (CHAUBAL *et al.*, 2005).

Diversas patentes foram depositadas para o pinitol, relacionadas à sua capacidade de aumentar a força muscular, com aplicações no tratamento de perda de massa muscular provocada por doenças como AIDS/HIV, câncer e

tuberculose (DYKSTRA; PRAIRIE, 2001), a sua atividade no tratamento de condições associadas à resistência à insulina, como diabetes, obesidade, hiperlipidemias e deslipidemias, aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, e no tratamento de doenças autoimunes como o lúpus eritematoso (OSTLUND; SHERMAN, 1996); a capacidade de mimetizar e antagonizar fosfoglicano inositol (MARTIN-LOMAS *et al.*, 2005); e, por fim uma patente mais recente discorre sobre a capacidade de inibir o estágio de iniciação da doença de Alzheimer ou de inibir a sua progressão (PASINETTI, 2006).

5.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-4

O composto codificado como Ca-4 foi obtido como cristais brancos com massa de 4,5 mg (correspondendo a 0,0014% em relação ao peso do EMB) apresentando ponto de fusão na faixa de 140 e 142°C (141-143°C, segundo BITTENCOURT, 2003).

No espectro de RMN ^1H de Ca-4 (200 MHz, CDCl_3) (Figura 51) foi observado um sinal característico de hidrogênio aromático em δ_{H} 6,19 (s, 1H), nos possibilitando inferir a existência de anel aromático para Ca-4. Foram observados também simpletos com integral para três hidrogênios cada, sendo um em δ_{H} 3,90, característico de metoxila e dois em δ_{H} 2,44 e 2,08, característicos de hidrogênios metílicos ligados a núcleos aromáticos. A presença de apenas um sinal para hidrogênio aromático, associada com os sinais das metilas, metoxila e hidroxila em δ_{H} 5,19, nos fez sugerir que a estrutura de Ca-4 se tratava de um anel aromático pentassubstituído.

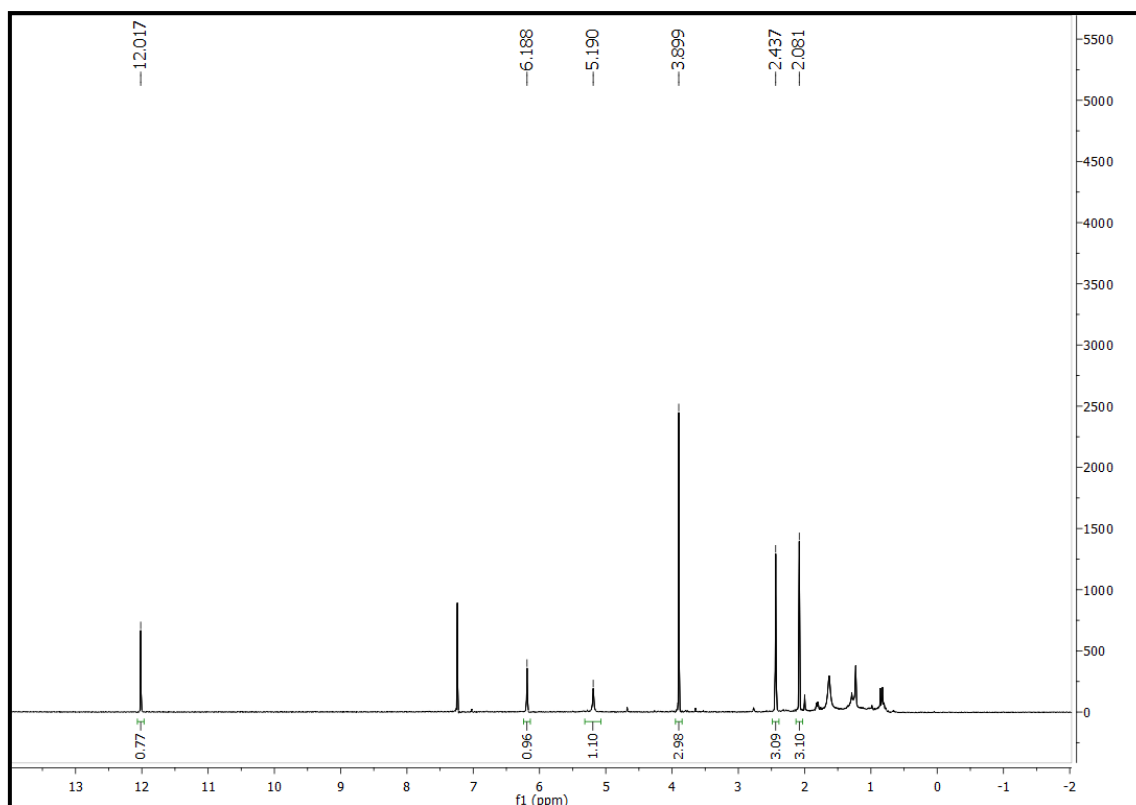


Figura 51. Espectro de RMN ^1H de Ca-4 (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 52) foram observados 10 sinais. A presença de seis sinais entre δ_{C} 100 e 165, sendo dois característicos de carbonos oxigenados (δ_{C} 163,1 e 158,0), três de não hidrogenados e não oxigenados em δ_{C} 140,1, 108,4 e 106,2 e um de carbono metínico em δ_{C} 110,5, corroborou com a presença de anel aromático pentassubstituído para Ca-4.

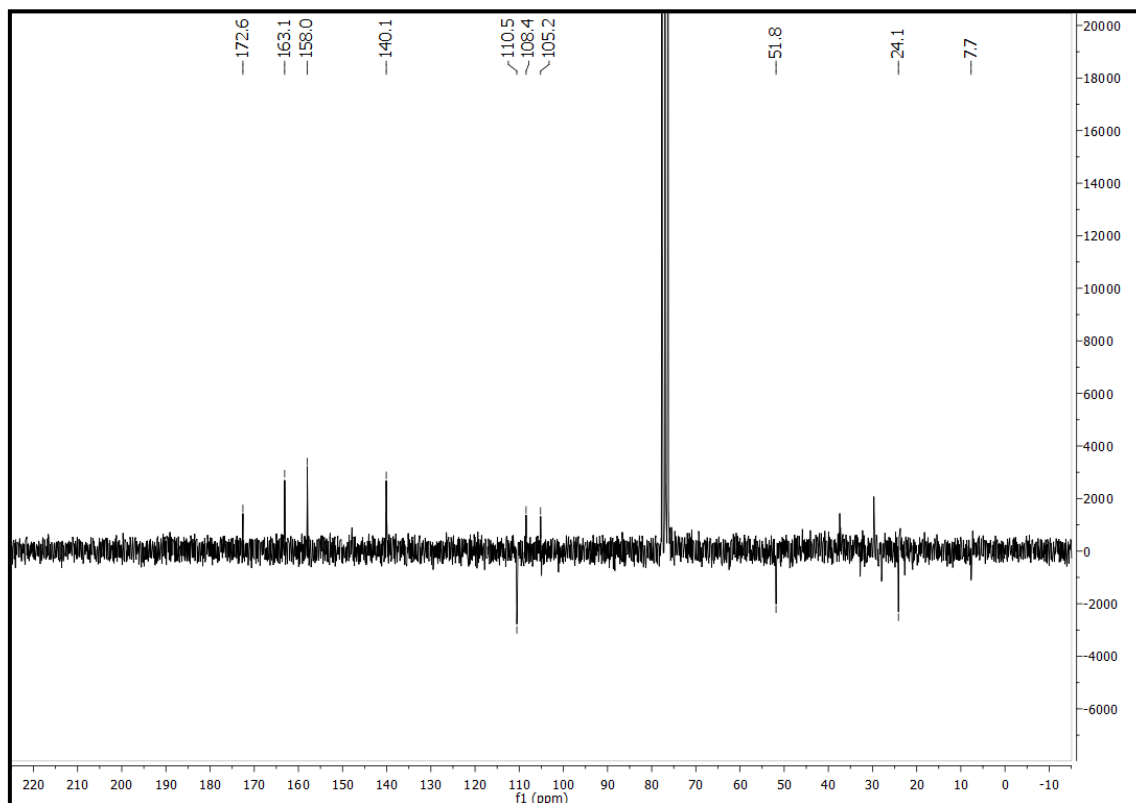
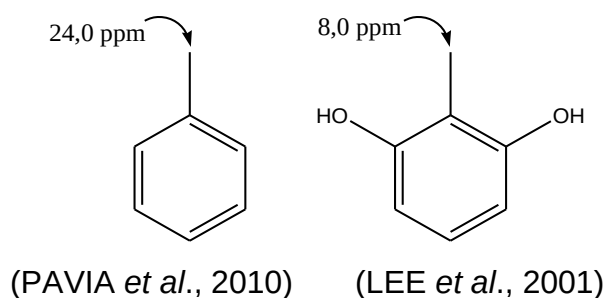
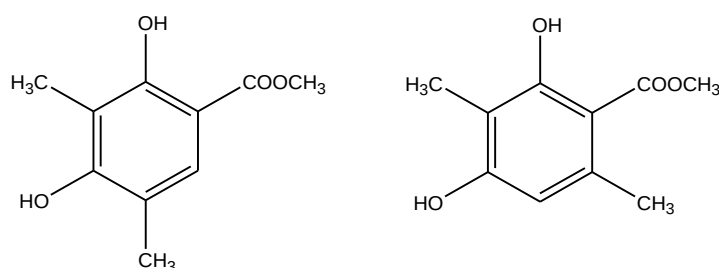


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C de Ca-4 (50 MHz, CDCl_3).

O sinal em δ_{C} 172,6, característico de carbonila, associado com o sinal em δ_{C} 51,8, característico de metoxila, nos possibilitou sugerir a presença de uma carbonila de éster como substituinte no anel aromático. Já os sinais em δ_{C} 7,67 e 24,13 corroboraram com o RMN ^1H , para presença de duas metilas como substituintes no anel, entretanto o deslocamento em δ_{C} 7,67 nos permitiu sugerir, através de comparação com a literatura, que esta metila estaria inserida entre duas hidroxilas.



A presença de sinal em δ_C 12,02, característico de hidroxila fenólica quelada no RMN ^1H e o fato de que uma das metilas estaria inserida entre duas hidroxilas, nos permitiu sugerir duas possibilidades estruturais para Ca-4.



Segundo Pavia *et al.* (2010), hidrogênios orto a grupos retiradores de elétrons (carbonila de éster) são mais desprotegidos que os hidrogênios meta a estes. Desta forma, o sinal em δ_H 6,20, associado com a comparação dos sinais observados nos espectro de RMN ^1H e ^{13}C com a literatura (MAIA, 2008) (Tabela 6), nos levou a identificar Ca-4 como o 2,4-diidroxi-6,3-dimetil-benzoato de metila, mais conhecido como ácido atrárico (Figura 53).

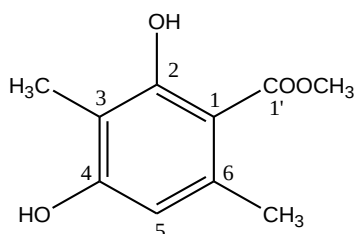


Figura 53. Estrutura química do 2,4-diidroxi-6,3-dimetil-benzoato de metila (ácido atrárico).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ca-4 (200 MHz e 50 MHz, CDCl_3) em comparação com dados da literatura (MAIA, 2008).

	Ca-4		Ácido atrárico	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	105,2	-	105,0	-
2	163,1	-	163,1	-
3	108,4	-	108,4	-
4	157,9	-	157,4	-
6	140,1	-	140,1	-
1'	172,6	-	172,6	-
CH				
5	110,5	6,19	110,5	6,18
CH₃				
3-CH₃	7,7	2,08	7,6	2,08
6-CH₃	24,1	2,44	24,1	2,43
OCH₃	51,8	3,90	51,8	3,90
OH				
2-OH	-	12,02	-	12,02
4-OH	-	5,19	-	5,15

O 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (ácido atrárico) é um metabólito raramente encontrado em plantas superiores, tendo sido isolado de *Newbouldia laevis*, *Alseodaphne andersonii*, *Acer nikense*, *Frullania brasiliensis* (GORMANN *et al.*, 2003, BARDÓN *et al.*, 2002, LEE *et al.*, 2001, NAGUMO *et al.*, 1996 apud ROEL, 2011) e *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae) (MAIA, 2008). Entretanto, não se sabe se este se trata de um metabólito secundário da biossíntese das plantas ou se é produzido por líquens que as colonizam.

Apresenta atividade nematocida, potente atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Curvularia sp.*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Rhizoctonia solani*, *Corynespora cassicola* e *Fusarium sp.* (AHAD *et al.*, 1991; ATHUKORALAGE *et al.*, 2001 apud MAIA, 2008), é usada no tratamento da hiperplasia prostática,

carcinoma de próstata ou da atrofia muscular espino-bulbar (BANIANHMAD *et al.*, 2006).

5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Ca-5 E Ca-6

O composto codificado como Ca-5 foi obtido na forma de cristais incolores com massa de 217,0 mg (correspondendo a 0,068% em relação ao peso do EMB).

No espectro de RMN ^1H e suas expansões de Ca-5 (Figuras 54, 55 e 56) foi observado um envelope de sinais entre δ_{H} 0,60 e δ_{H} 2,50 característico de núcleo esteroidal ou triterpênico (KOJIMA *et al.*, 1990), além se deslocamentos químicos condizentes com a presença de hidrogênios oximetínico [δ_{H} 3,49 (m, H-3)] e hidrogênios olefínicos [δ_{H} 5,32 (sl, H-6); 5,13 (dd, $J = 8,2$ e $15,2$ Hz, H-22) e 5,13 (dd, $J = 8,2$ e $15,2$ Hz, H-23) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2010).

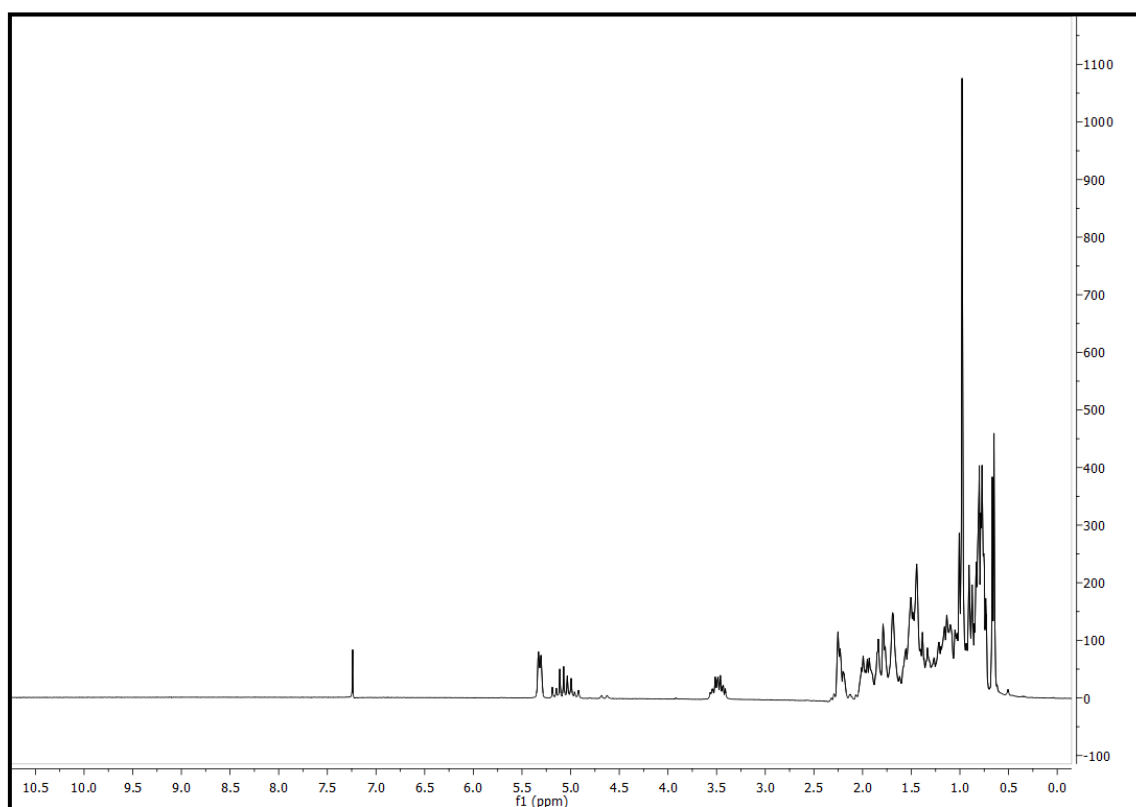


Figura 54. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5.

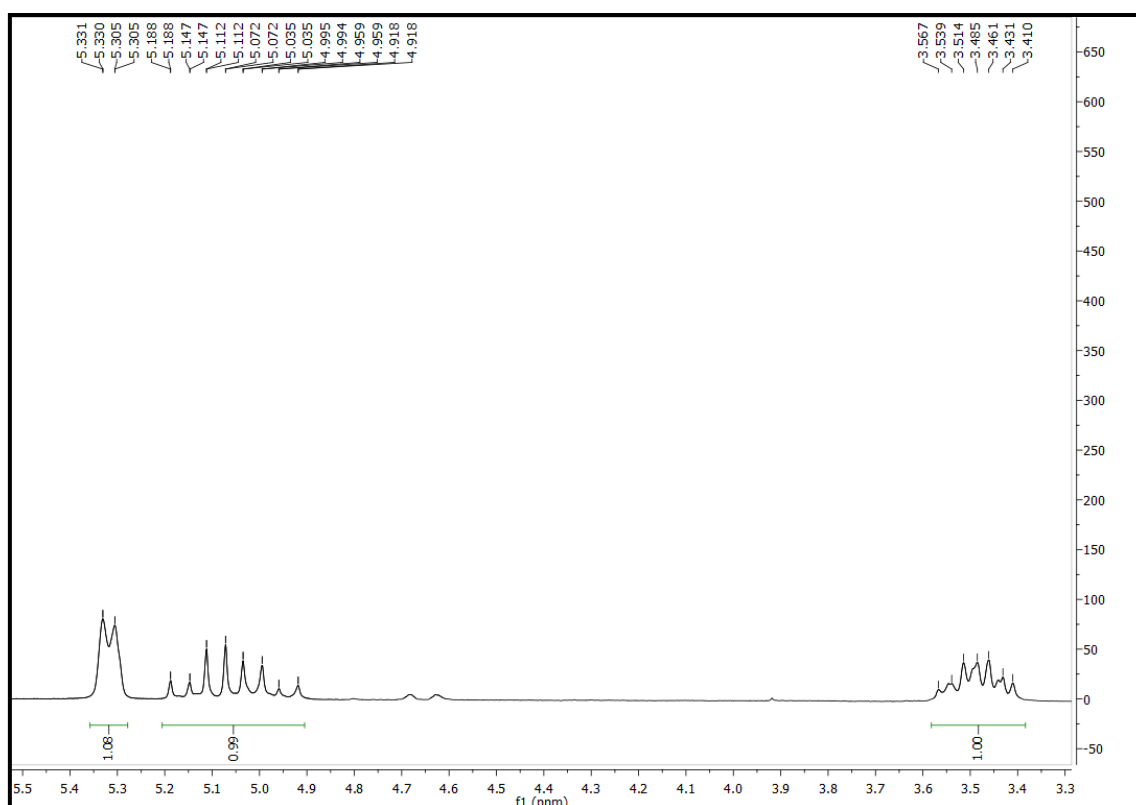


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5 na região de 3,3 a 5,5 ppm.

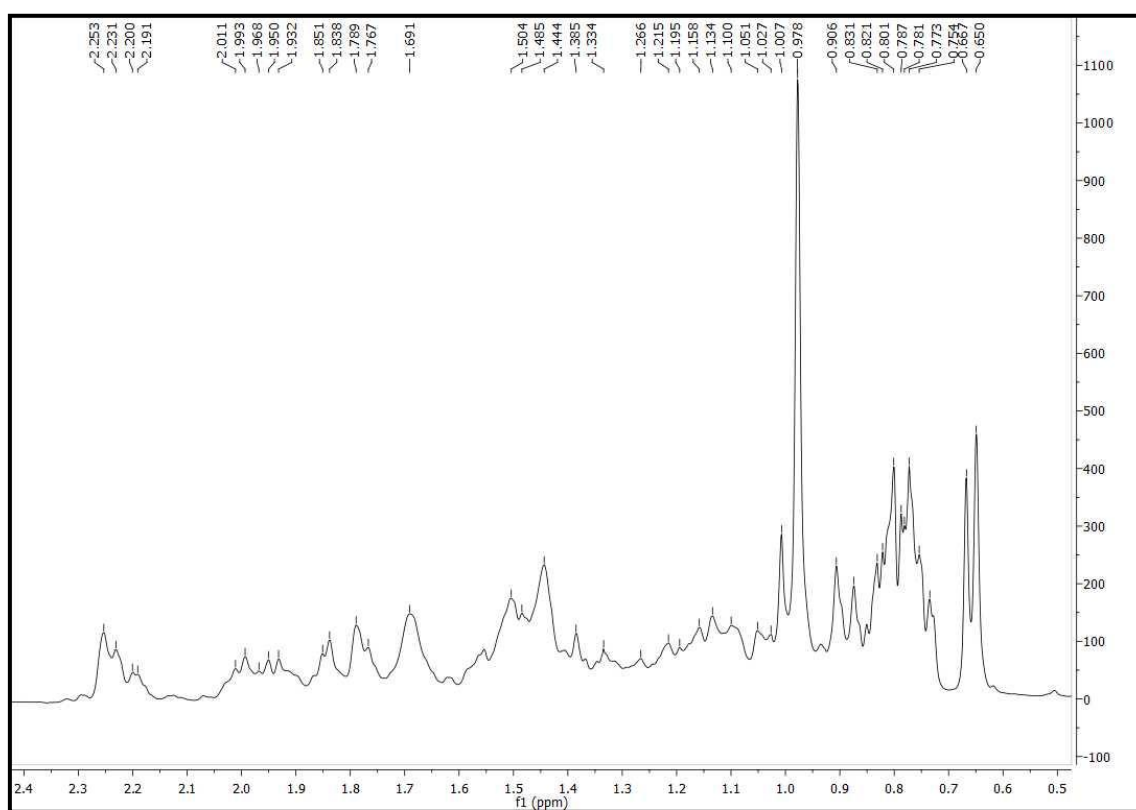


Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ca-5 na região de 0,5 a 2,4 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de Ca-5 e suas expansões (Figuras 57, 58 e 59), obtidos segundo a técnica APT, foram observados sinais intensos e outros duplicados permitindo identificar Ca-5 como uma mistura de esteroides (KOJIMA *et al.*, 1990).

Neste espectro foram observados picos referentes a carbonos metílicos de esteróides, com valores entre δ_{C} 11,9 e 19,9 (BREITMAIER & VOELTER, 1990), sinais em δ_{C} 140,7 e δ_{C} 121,7, correspondentes, respectivamente, aos carbonos 5 e 6 do esqueleto de esteróides como o sitosterol e o estigmasterol, sendo que, para este último, observou-se ainda dois picos em δ_{C} 138,3 e δ_{C} 129,2, referentes aos carbonos olefínicos 22 e 23 do estigmasterol, respectivamente, confirmando a presença de uma mistura do β -sitosterol e estigmasterol.

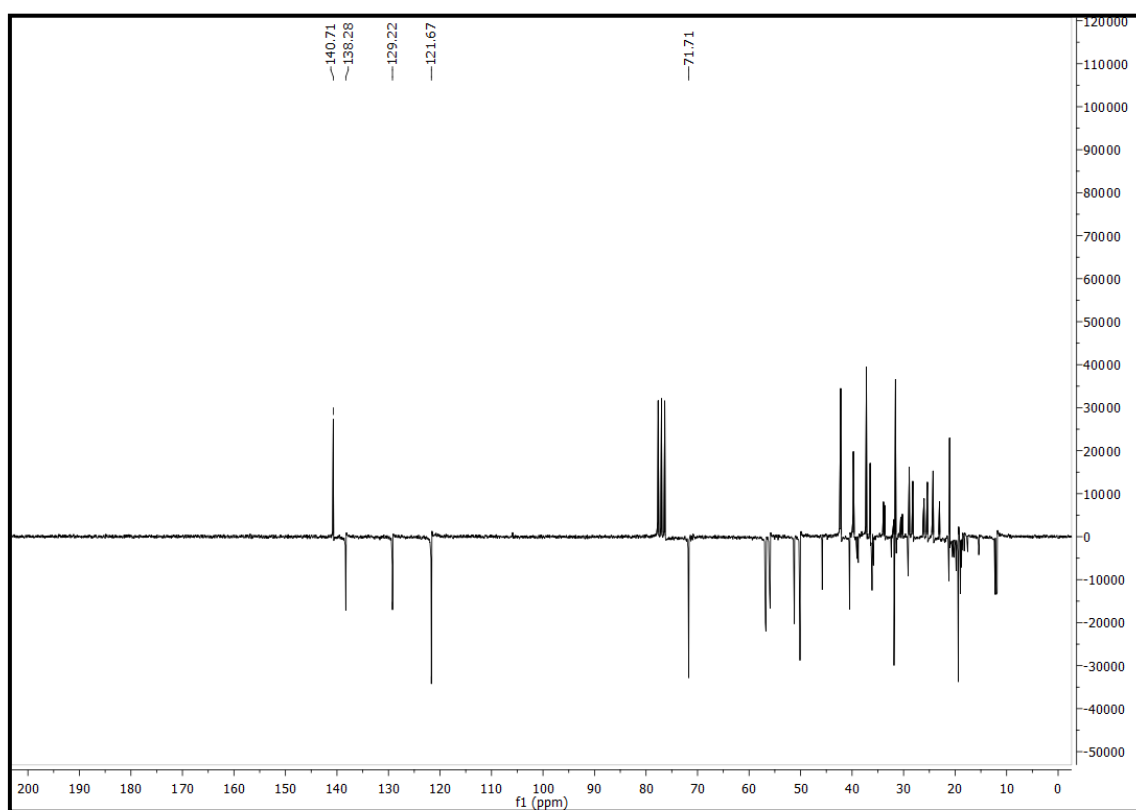


Figura 57. Espectro RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5.

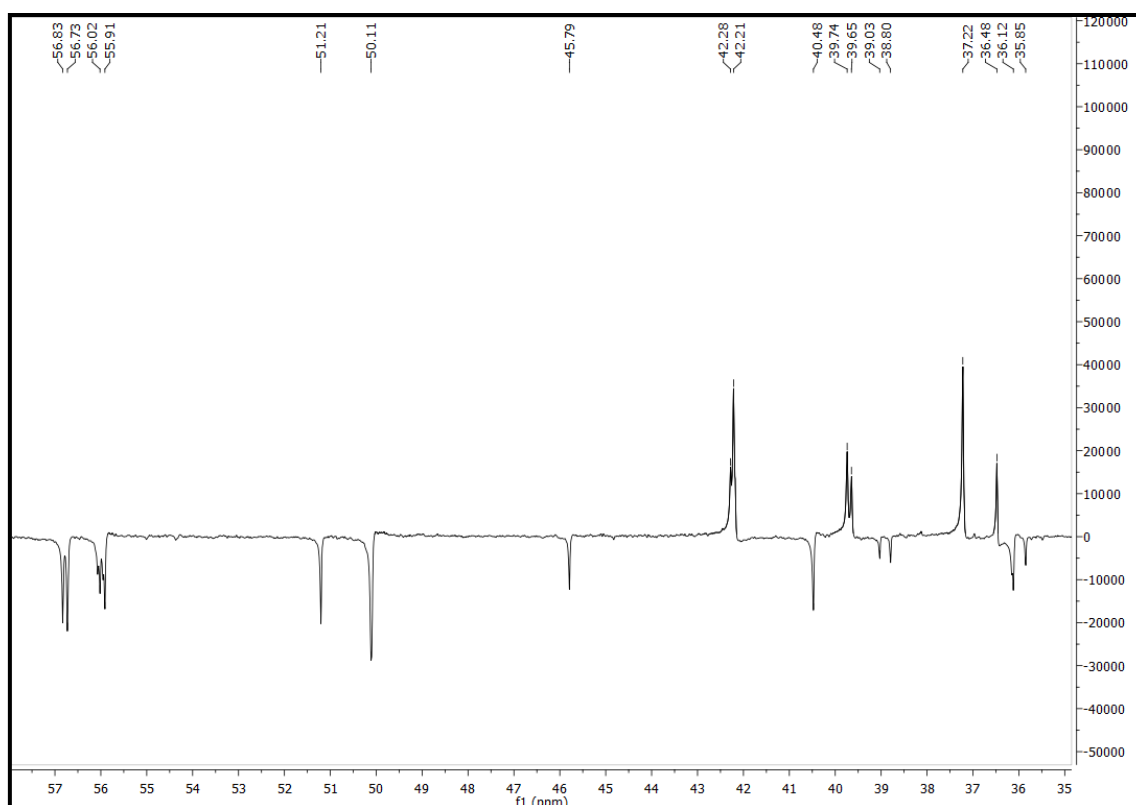


Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5 na região de 35,0 – 58,0 ppm.

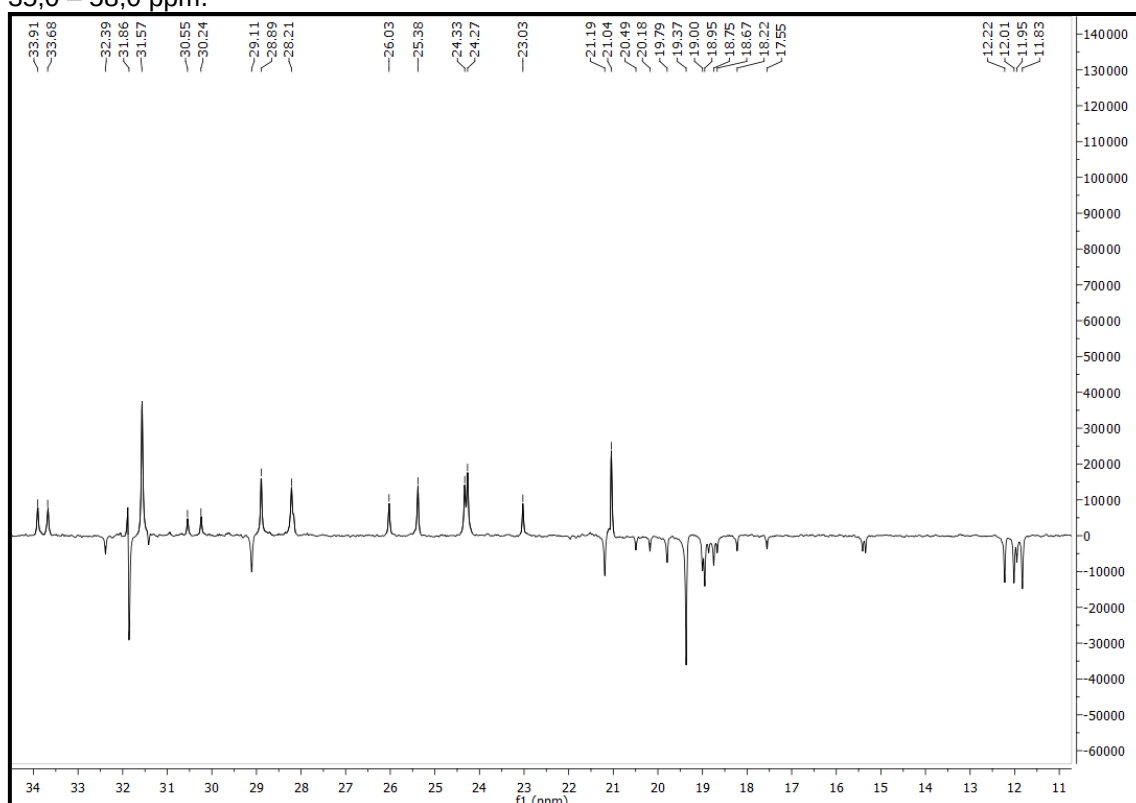


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ca-5 na região de 11,0 – 34,0 ppm.

Após observação dos dados espectrais de dessa substância e sua comparação com a literatura (Tabela 7) (TOMAZ, 2008) foi possível identificarmos Ca-5 como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Figura 60).

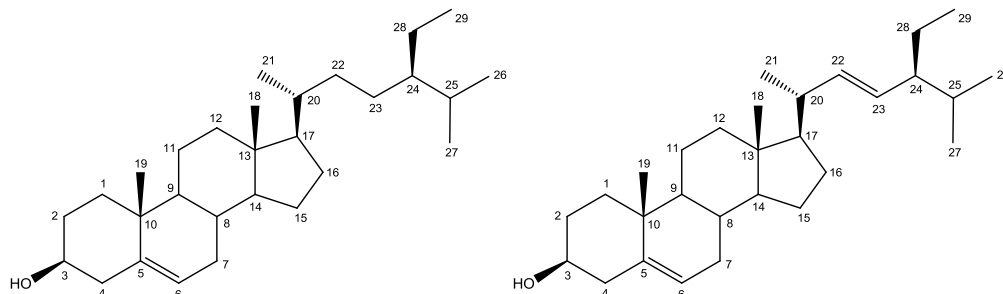


Figura 60. Estruturas químicas de Ca-5: β -sitosterol (à esquerda) e estigmasterol (à direita).

Tabela 7. Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de Ca-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Tomaz (2008) para as mesmas substâncias.

C	β -sitosterol			Estigmasterol		
	δ_{C}	δ_{C}^*	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*	δ_{H}
1	37,2	37,2	-	37,2	37,2	-
2	31,6	31,4	-	31,6	31,4	-
3	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)
4	42,2	42,1	-	42,2	42,1	-
5	140,7	140,7	-	140,7	140,7	-
6	121,7	121,6	5,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H)	121,7	121,6	5,32 (d, J = 5,0 Hz, 1H)
7	31,9	31,9	-	31,9	31,9	-
8	31,9	31,8	-	31,9	31,8	-
9	50,1	50,1	-	50,1	50,1	-
10	36,5	36,4	-	36,5	36,4	-
11	21,0	21,0	-	21,0	21,0	-
12	39,7	39,7	-	39,6	39,6	-
13	42,2	42,2	-	42,2	42,2	-
14	56,7	56,7	-	56,8	56,8	-
15	24,3	24,3	-	24,3	24,3	-
16	28,2	28,2	-	28,9	28,9	-
17	56,0	56,0	-	55,9	55,9	-
18	11,8	11,8	0,65 (s, 3H)	11,9	11,9	0,67 (s, 3H)
19	19,4	19,3	0,98 (s, 3H)	19,4	19,3	0,98 (s, 3H)
20	36,1	36,1	-	40,5	40,5	-
21	18,8	18,7	-	21,2	21,2	-
22	33,9	34,0	-	138,3	138,3	-
23	26,0	26,0	-	129,2	129,2	-
24	45,8	45,7	-	51,2	51,2	-
25	29,1	29,0	-	32,4	29,0	-
26	19,8	19,8	0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H)	20,2	20,1	0,89 (d, J = 6,4 Hz, 3H)
27	19,0	19,0	0,79 (d, J = 5,6 Hz, 3H)	18,9	18,9	0,79 (d, J = 5,6 Hz, 3H)
28	23,0	23,0	-	25,4	25,4	-
29	12,0	12,0	-	12,2	12,2	-

β -Sitosterol e estigmasterol são relatados em todo o Reino Vegetal, entretanto não há relato do isolamento dessas substâncias em *Calliandra*.

Os fitosteróides são compostos sintetizados somente pelas plantas e se encontram presentes nos animais como consequência de sua ingestão na dieta. Diversos estudos epidemiológicos demonstram uma estreita correlação no consumo de dietas ricas em vegetais e frutas com a redução da incidência de diversas enfermidades (HUNG LLAMOS, 2005).

O β -sitosterol é conhecido por apresentar atividades antiúlcera (LING & JONES, 1995), gastroprotetora (NAVARRETE *et al.*, 2002), anticancerígena (AWAD *et al.*, 2005), antiofídica (GALOTTA & BOAVENTURA, 2005) e hipoglicemiante (LINDO, 1999 *apud* MCANUFF *et al.*, 2005). Já o estigmasterol, de acordo com a literatura, revelou atividades anti-inflamatória (PEREIRA *et al.*, 2006), anticancerígena (AWAD *et al.*, 2005), bem como, antihepatotóxica, hipocolesterolêmica e sedativa (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICES, 2009).

No espectro de RMN ^1H e suas expansões de Ca-6 (Figuras 61 a 64) também foram observados sinais característicos de fitosteróides assim como Ca-5, entretanto a presença de um conjunto de picos entre δ_{H} 4,00 e δ_{H} 4,60 nos permitiu sugerir a presença de uma unidade osídica, sendo estes, típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade. Esta proposta foi fortalecida pela presença de um duplete em δ_{H} 5,07 com $J = 7,5$ Hz, atribuído ao hidrogênio anomérico, comum em unidade de glicose com configuração β (KASAI *et al.*, 1987).

Ainda nesse espectro, um multiplete em δ_{H} 4,00, referente ao hidrogênio carbinólico, permitiu propor a inserção de unidade osídica em C-3, tendo em vista seu deslocamento para campo baixo em Ca-6 quando comparado com o mesmo hidrogênio (H-3) no Ca-5, que absorve em δ 3,87 (KOJIMA *et al.*, 1990).

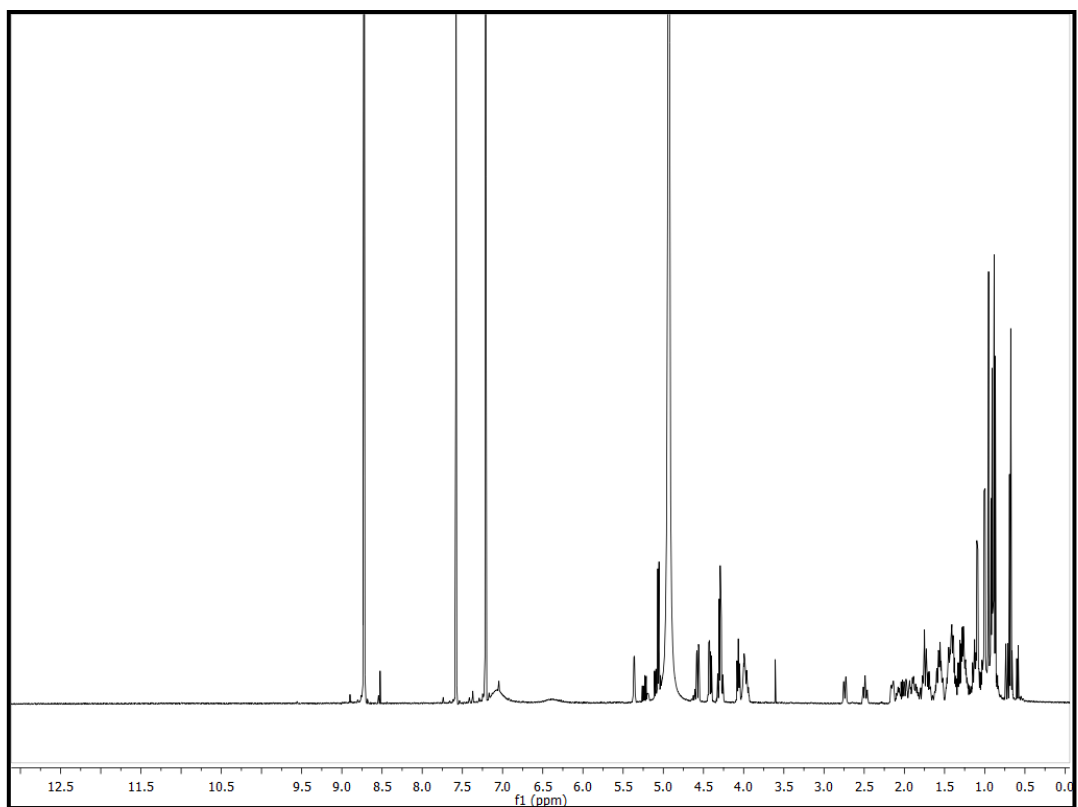


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6.

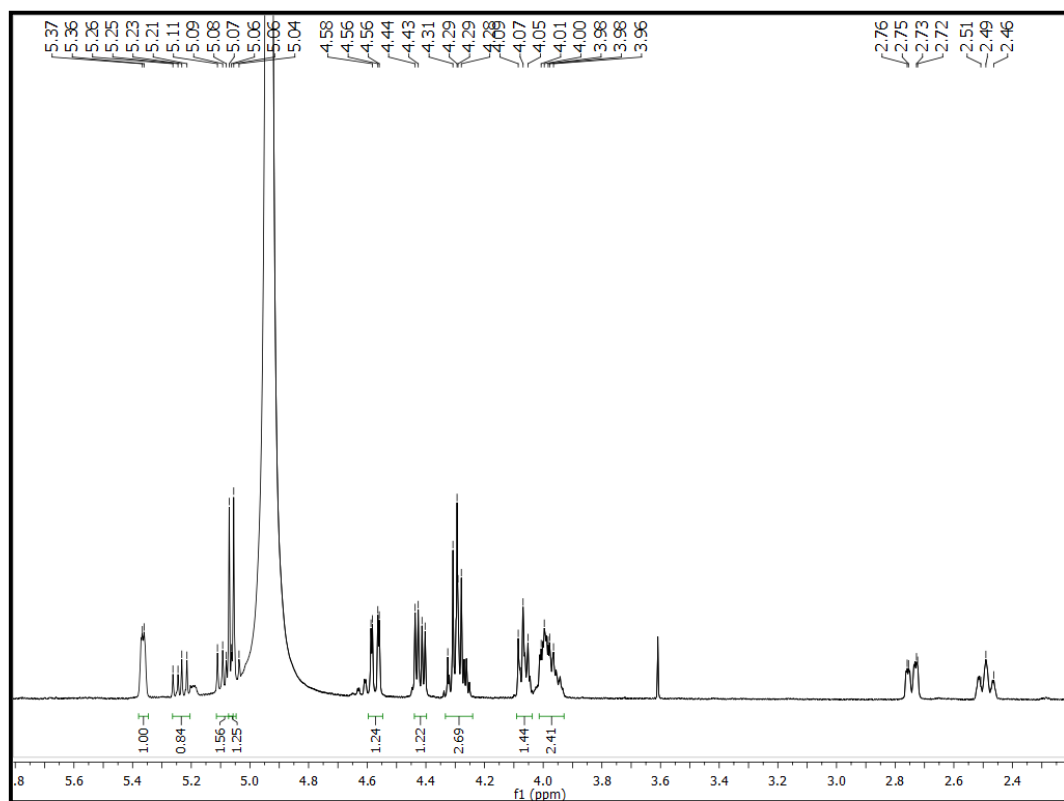


Figura 62. Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 2,2 a 5,8 ppm.

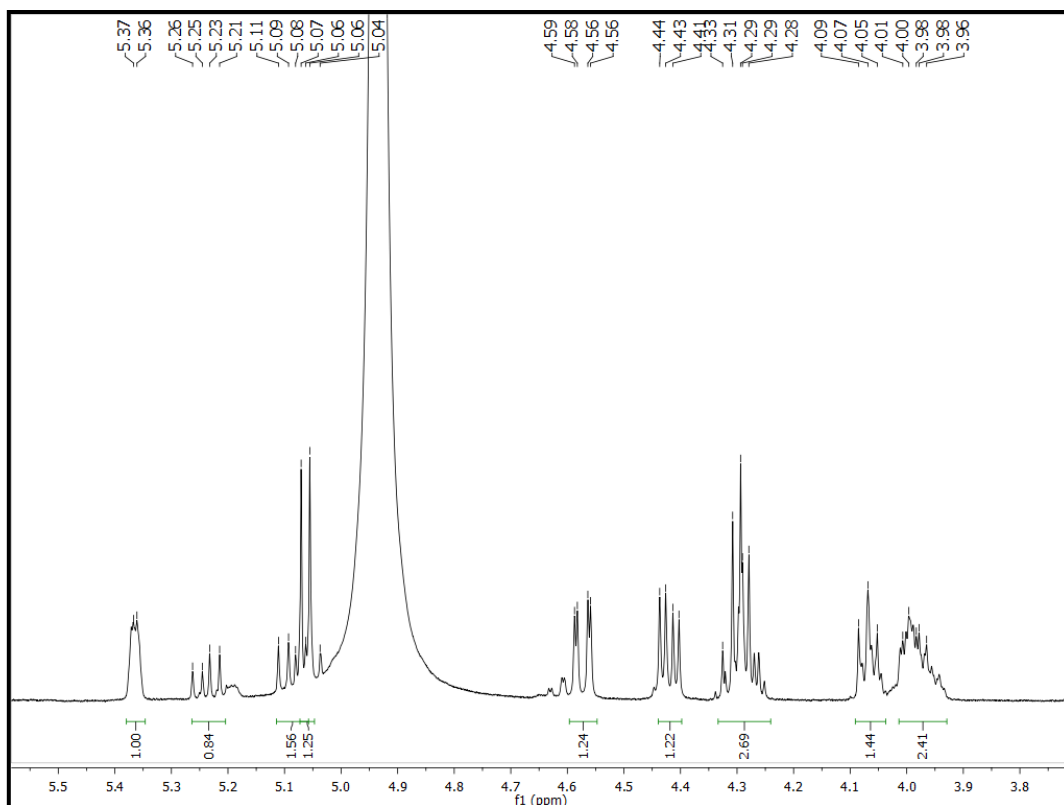


Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 3,8 a 5,6 ppm.

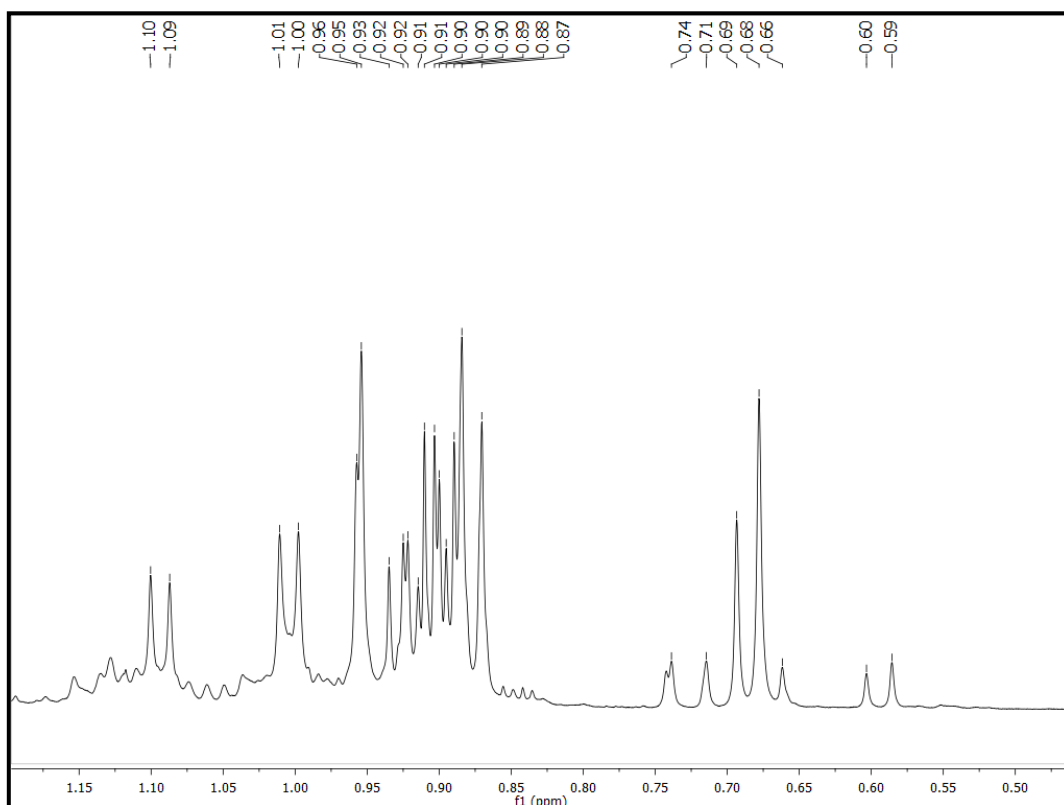


Figura 64. Expansão do espectro de RMN ^1H (pyd5, 500 MHz) de Ca-6 na região de 0,5 a 1,2 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, pyd5) e suas expansões, (Figuras 65 a 68), corroboraram com a proposta anterior, da presença da unidade de glicose, ao mostrar um sinal em δ_{C} 102,9 referente ao carbono anomérico (C-1') da unidade osídica (AQUINO *et al.*, 1988).

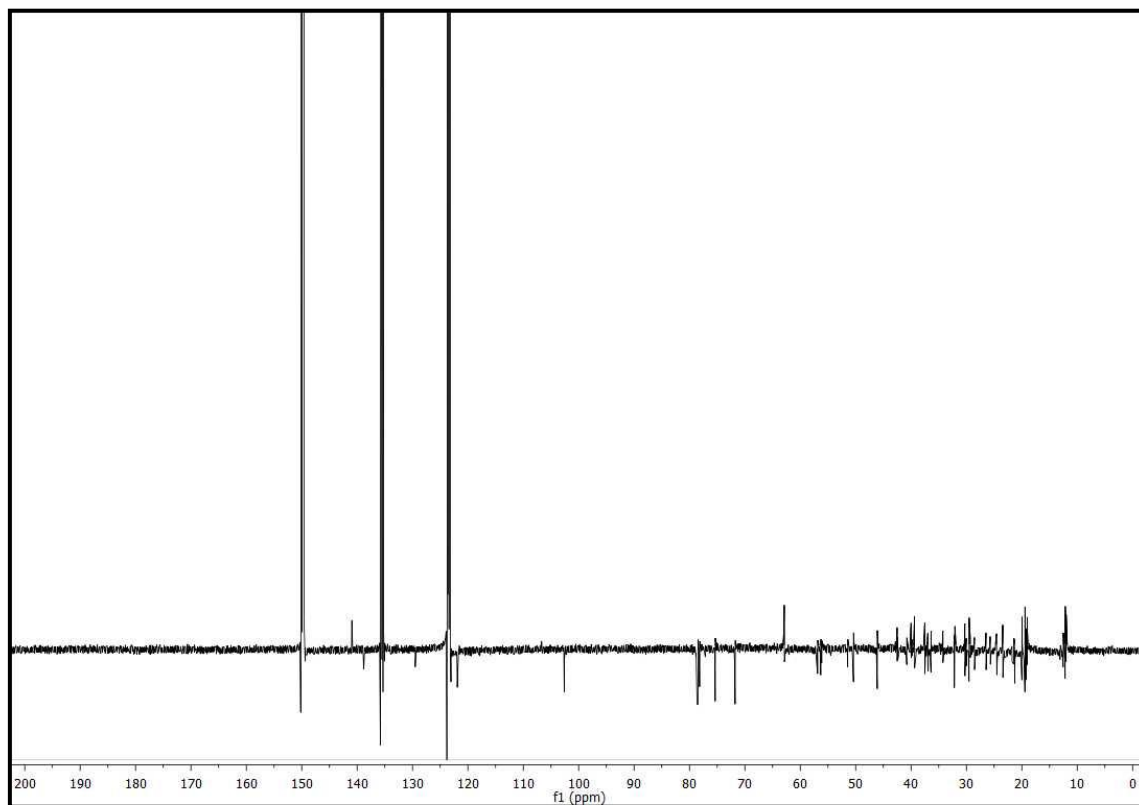


Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6.

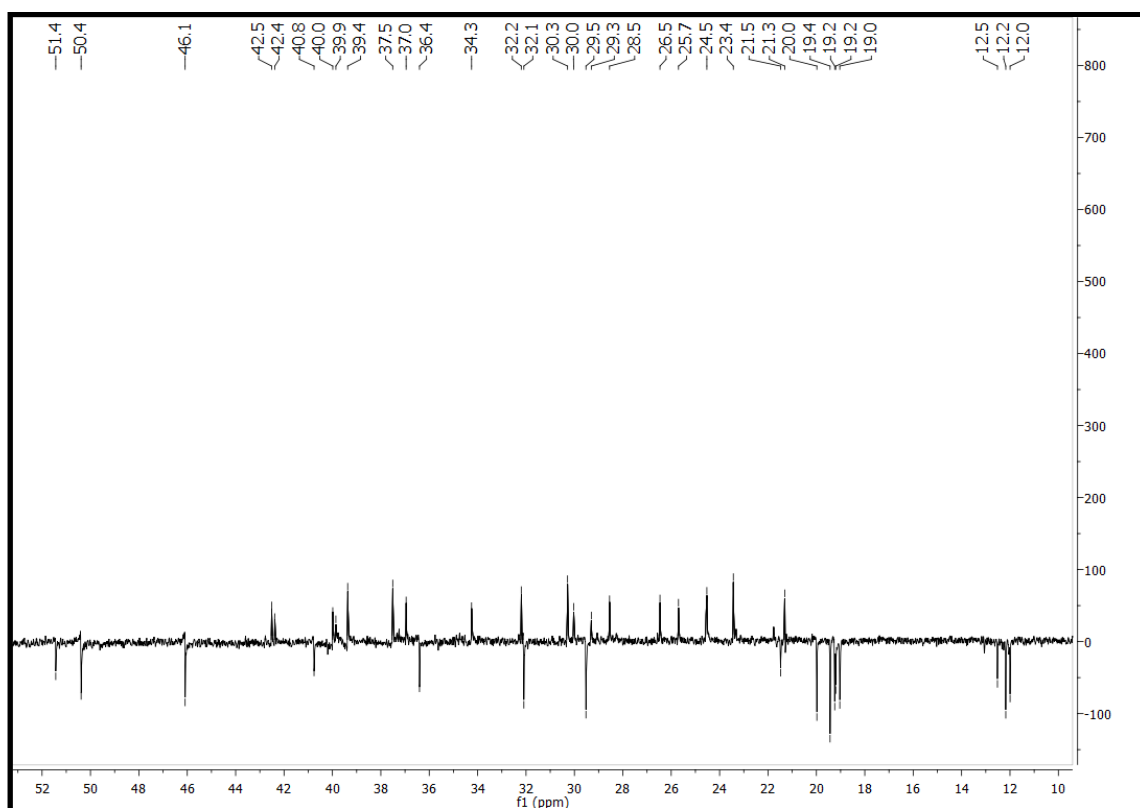


Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 12 a 52 ppm.

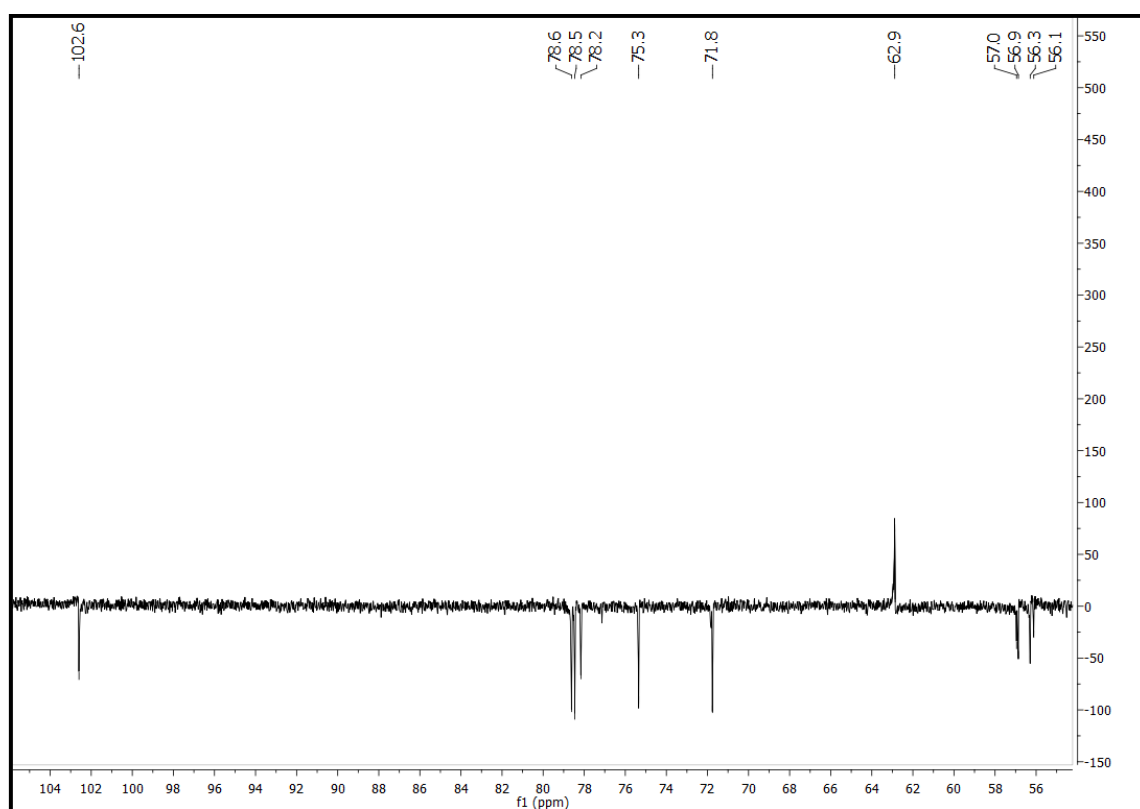


Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 56 a 104 ppm.

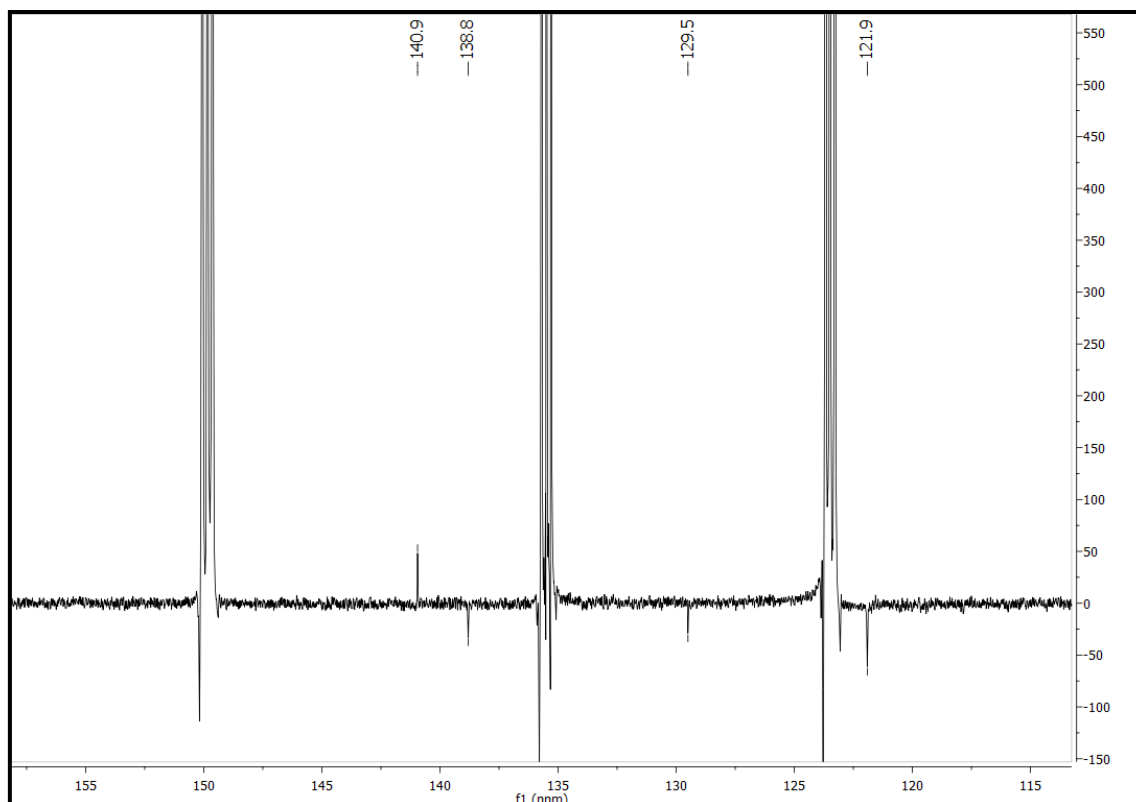


Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (pyd5, 125 MHz) de Ca-6 na região de 114 a 156 ppm.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da mistura foram comparados com valores da literatura (Tabela 8), permitindo identificá-la como estigmasterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo (Ca-6a) sitosterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo (Ca-6b) e (Figura 69), substâncias isoladas pela primeira vez no gênero *Calliandra*.

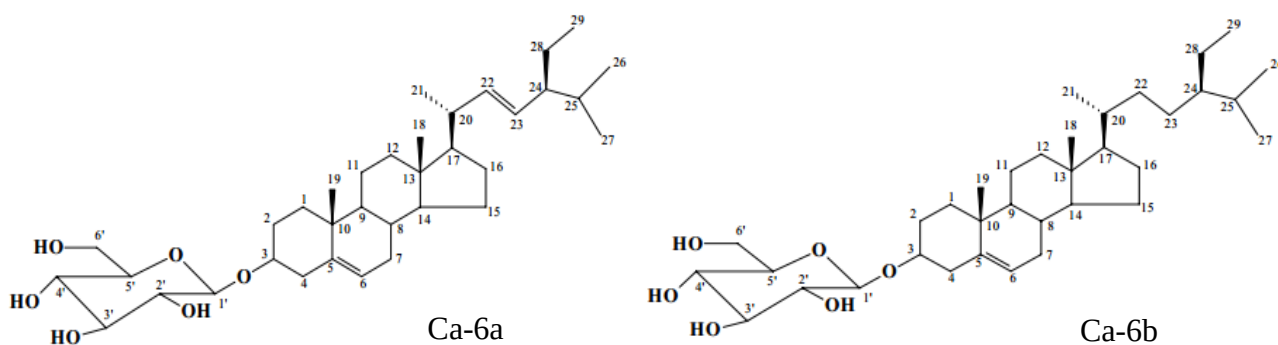


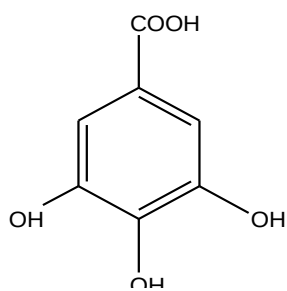
Figura 69. Estrutura de sitosterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo (Ca-6a) e estigmasterol-3-*O*-D-glicopiranosídeo (Ca-6b).

Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C (pyd5, 500 MHz) para Ca-6 e comparação com os dados da literatura (SAEIDNIA *et al.*, 2011; MAIA, 2008).

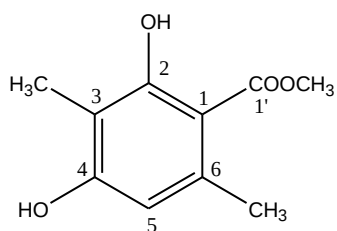
	Estigmasterol Glicosilado (SAEIDNIA <i>et al.</i>, 2011)	Ca-6a	Ca-6b	β-sitosterol Glicosilado (MAIA, 2008)
1	37,4	37,5	37,5	37,3
2	30,2	30,3	30,0	30,1
3	78,5	78,5	78,5	78,3
4	43,9	42,5	39,4	39,4
5	141,5	140,9	140,9	141,0
6	121,1	121,7	121,7	122,0
7	31,9	32,2	32,2	32,2
8	31,9	32,1	32,1	32,1
9	50,7	50,4	50,4	50,4
10	36,9	36,9	36,9	37,0
11	21,1	21,3	21,3	21,4
12	39,9	39,9	39,9	40,0
13	43,0	42,4	42,4	42,4
14	56,9	56,9	56,3	56,3
15	24,5	24,6	24,5	24,6
16	28,9	29,3	28,5	28,7
17	56,0	56,1	56,9	56,5
18	12,0	12,0	12,0	12,0
19	19,4	19,2	19,2	19,3
20	40,5	40,7	36,4	36,3
21	21,9	21,7	19,2	19,1
22	138,9	138,8	34,2	34,3
23	129,1	129,5	26,5	26,4
24	52,1	51,4	46,1	46,1
25	32,9	29,5	29,5	29,5
26	19,0	19,0	19,4	19,5
27	21,7	21,5	19,9	20,1
28	25,6	25,7	23,4	23,4
29	12,2	12,5	12,2	12,2
1'	102,8	102,6	102,6	102,6
2'	74,2	75,3	75,3	75,4
3'	79,8	78,6	78,6	78,7
4'	70,6	71,8	71,8	71,7
5'	76,7	78,2	78,2	77,5
6'	62,3	62,9	62,9	62,9

Estudos *in vivo* em animais demonstraram que o β -sitosterol glicosilado exibiu atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imunomodulatória (BOUIC *et al.*, 1999). Apesar de ser uma substância bastante comum em plantas, esse é o primeiro relato do isolamento desse composto em *Calliandra*.

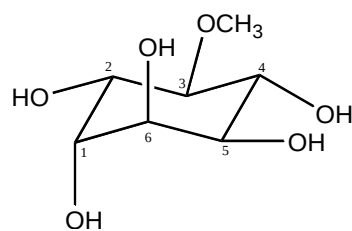
Quadro 4. Substâncias isoladas de *Calliandra umbellifera*.



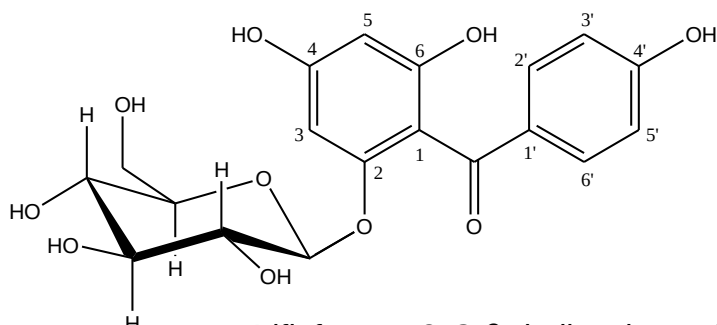
Ácido gálico



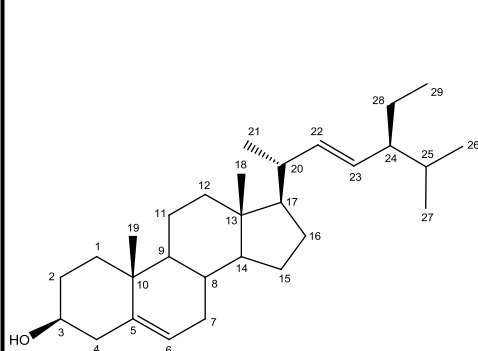
Ácido atrárico



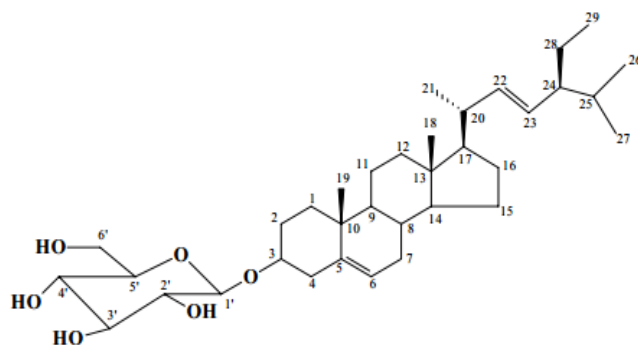
Pinitol



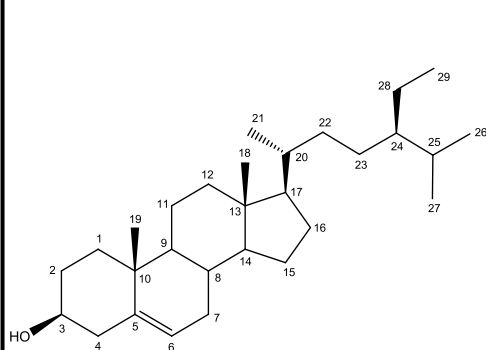
Iriflofenona 2-O-β-d-glicopiranosídeo



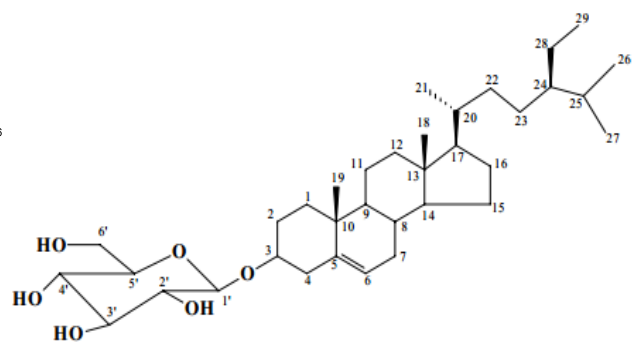
Estigmasterol



Estigmasterol glicosilado



β-sitosterol



β-sitosterol glicosilado

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO, DAS FASES ACETATO DE ETILA, HIDROBUTANÓLICA E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Calliandra umbellifera* Benth.

Os valores de CIM do extrato metanólico bruto (EMB), das fases acetato de etila (AcOEt) e hidrobutanólica (Hb) de *Calliandra umbellifera* sobre seis cepas de bactérias e seis leveduras determinados pelo método de microdiluição bem como os referentes controles realizados encontram-se representados na tabela 9.

Tabela 9. Valores de CIM do EMB e das fases AcOEt e Hidrobutanólica (Hb) de *Calliandra umbellifera* Benth. sobre os microrganismos testados.

Microorganismos	CIM (µg/mL)			Nistatina (100 UI) / Cloranfenicol (100µg/mL)	Controle de cepa*
	BEM	F. AcOEt	F. Hb		
<i>C. albicans</i> HIV ⁺ - 101	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. albicans</i> LM 111	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. krusei</i> LM-14	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. krusei</i> LM-08	> 1024	> 1024	> 1024	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC 13150	256	512	256	-	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	256	256	128	-	+
<i>P. aeruginosa</i> P-03	128	256	128	-	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	128	256	128	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 10536	128	256	128	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 8733	128	256	128	-	+

* Crescimento do microrganismo em CSD e RPMI, DMSO (5%), sem adição do produto ou antifúngico/antibacteriano (antimicrobiano padrão).

(+) crescimento microbiano; (-) inibição do crescimento microbiano

Todas as cepas fúngicas e bacterianas foram capazes de crescer em CSD e RPMI sem adição dos produtos o que caracteriza sua viabilidade (controle de microrganismo).

Como pôde ser observado, os produtos não apresentaram efeito inibitório sobre os fungos testados, entretanto, os três produtos inibiram o crescimento de 100 % das bactérias ensaiadas, tendo sua CIM estabelecida entre 256 e 128 µg/mL, com exceção apenas da CIM da fase AcOEt frente a *S. aureus* (ATCC 13150) que foi de 512 µg/mL.

Segundo os critérios relatados por Mistcher *et al.* (1972), Alligianis *et al.* (2001), Sartoratto *et al.* (2004) e Houhgton *et al.* (2007), os extratos de produtos naturais com CIM entre 50 e 500 µg/mL são classificados com forte atividade antimicrobiana, produtos com CIM de 500 a 1500 µg/mL possuem moderada atividade e produtos com CIM acima de 1500 µg/mL são considerados com fraca atividade antimicrobiana.

Desta forma pode-se considerar que o extrato metanólico bruto e as fases acetato de etila e hidrobutanólica de *Calliandra umbellifera* possuem forte atividade antibacteriana frente a todas as bactérias testadas, tanto gram positivas quanto gram negativas, com exceção da fase AcOEt frente a *S. aureus* (ATCC 13150).

A atividade antibacteriana observada nesse trabalho está condizente com as informações contidas na literatura sobre as atividades antibacterianas de espécies de *Calliandra* como, por exemplo, Aguwa e Lawal (1987) que observaram atividade antibacteriana dos extratos aquoso e alcoólico de *Calliandra portoricensis* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *S. faecalis* nas concentrações de 0,3 a 0,5 mg/mL; Orishadipe e colaboradores (2010) que observaram que o extrato hexânico de *C. portoricensis* apresentava atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella galinallum*; Nia e colaboradores (1999) que observaram atividade antibacteriana de *C. haematocephala* frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; Sikder *et al.* (2012) que mostraram a atividade antibacteriana da fase clorofórmica de *C. surinamensis* frente a *Salmonella typhi*; Encarnacion e colaboradores (1994) que observaram atividade inibitória de *C. californica* frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*.

Os estudos que determinam inicialmente a CIM fornecem importantes informações sobre a potência dos produtos analisados e podem guiar outros estudos que visam a empregabilidade clínica dos produtos, uma vez que, é essencial que um produto natural, como um novo candidato a ser empregado clinicamente como antibacteriano, obtenha relevantes resultados nesses estudos *in vitro* para justificar a continuidade dos estudos (CLEELAND, SQUIRES, 1991).

O método de microdiluição escolhido para a determinação da CIM se apresenta como uma forma simples e econômica de avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais. Possui grande reprodutibilidade, sendo trinta vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra e meio de cultura, além de poder ser usado para grande número de amostras (SCORZONI *et al.*, 2007, OSTROSKY *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o extrato metanólico e as fases acetato de etila e hidrobutanólica apresentam atividade antibacteriana promissora, devendo ser encaminhados a testes mais específicos.

Os valores de CIM das substâncias isoladas (iriflofenona glicosilada e pinitol) de *Calliandra umbellifera* sobre seis cepas de bactérias e seis leveduras determinados pelo método de microdiluição bem como os referentes controles realizados encontram-se representados na tabela 10.

Tabela 10. Valores de CIM das substâncias isoladas (iriflofenona glicosilada e pinitol) de *Calliandra umbellifera* sobre seis bactérias e seis leveduras.

	CIM (µg/mL)		Nistatina (100 UI) / Cloranfenicol (100µg/mL)	Controle de cepa*
	Iriflofenona glicosilada	Pinitol		
<i>C. albicans</i> HIV ⁺ - 101	128	128	-	+
<i>C. albicans</i> LM 111	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. krusei</i> LM-14	> 1024	> 1024	-	+
<i>C. krusei</i> LM-08	128	128	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC 13150	> 1024	> 1024	-	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	> 1024	> 1024	-	+

<i>P. aeruginosa</i> P-03	> 1024	> 1024	-	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 1024	> 1024	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 10536	> 1024	> 1024	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 8733	> 1024	> 1024	-	+

* Crescimento do microrganismo em CSD e RPMI, DMSO (5%), sem adição do produto ou antifúngico/antibacteriano.
(+) crescimento bacteriano/fúngico; (-) inibição do crescimento bacteriano/fúngico

Neste teste, as substâncias isoladas não apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias testadas, entretanto, ambas inibiram o crescimento de *Candida albicans* HIV⁺ - 101 e *Candida krusei* LM-08, tendo sua CIM estabelecida em 128 µg/mL, sendo esta, considerada uma forte atividade de acordo com Houhgton *et al* (2007).

A atividade antifúngica frente a *C. albicans* observada para o pinitol está de acordo com Agnese *et al.* (2001), o qual mostrou a atividade antimicrobiana deste. Enquanto que a atividade observada para a iriflofenona glicosilada frente a *C. albicans* e *C. krusei* para o pinitol frente a *C. krusei* está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

Esse resultado nos mostra que a atividade antibacteriana do extrato e das fases não é proveniente desses constituintes isolados, podendo ser decorrente da associação desses com outros metabólitos ou então de outros metabólitos que não foram isolados nesse trabalho. Da mesma forma, a presença dessas substâncias testadas associadas a tantos outros constituintes provavelmente leva a inatividade observada pelos extratos e fases contra os fungos testados.

5.7 AVALIAÇÕES DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Calliandra umbellifera* Benth.

5.7.1 Determinação da DL₅₀

O EMB de *Calliandra umbellifera* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg não promoveu mortalidade dos camundongos. Dessa forma, não foi possível determinar a DL₅₀, sendo possível inferir apenas que a DL₅₀ foi maior que 1000 mg/kg, apresentando portanto uma baixa toxicidade (ALMEIDA *et al.*, 1999). Diante disso, foram utilizadas as doses de 100, 200 e 300 mg/kg nos testes específicos.

5.7.2 Triagem

As alterações comportamentais apresentadas pelos camundongos tratados com EMB de *Calliandra umbellifera* em relação ao grupo controle são mostradas no Quadro 5.

Na dose de 250 mg/kg por via i.p. foram observadas analgesia, diminuição da ambulação e da defecação até 1 hora após o tratamento tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Os animais que receberam 500 mg/kg do EMB por via oral e intra-peritonal, mostraram atividade analgésica intensa na primeira hora, diminuição da defecação, persistindo-se este efeito durante as quatro horas de observação. Foi observado também nos primeiros trinta minutos diminuição dos reflexos auricular e corneal.

Com a análise desses dados, é possível sugerir que os camundongos tratados com EMB apresentaram alterações comportamentais sugestivas de atividade depressora do SNC.

Quadro 5. Principais alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração de diferentes doses de EMB. [-] efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito presente intenso]. (n=8).

Dose (mg/kg)	Tempo (min)	Efeitos observados
250 (i.p.)	30'	(+) analgesia; (-) defecção
	1h	(+) ambulação diminuída (-) defecção
	2h	Ausência de alterações comportamentais
	3h	Ausência de alterações comportamentais
	4h	Ausência de alterações comportamentais
500 (i.p.)	30'	(++) analgesia (+) perda do reflexo auricular
	1h	(++) analgesia (+) perda do reflexo auricular
	2h	(+) analgesia (+) perda do reflexo auricular
	3h	(+) analgesia
	4h	(+) analgesia
500 (oral)	30'	(++) analgesia; (-) defecção
	1h	(++) analgesia; (-) defecção
	2h	(+) analgesia; (-) defecção
	3h	(+) analgesia; (-) defecção
	4h	(+) analgesia; (-) defecção

A triagem farmacológica comportamental é um teste preliminar de fácil execução e capaz de detectar, de forma qualitativa, algumas importantes ações centrais (ALMEIDA et al., 1999). Neste teste, as doses de EMB citadas acima provocaram alterações comportamentais sugestivas de substâncias que reduzem a atividade do SNC, entre elas, analgesia e perda do reflexo auricular.

5.7.3 Testes Específicos

5.7.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Neste estudo, a atividade antinociceptiva do EMB de *C. umbellifera* foi primeiramente avaliada pelo modelo das contorções abdominais, que é simples, rápidos e confiável para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias (SHINDE *et al.*, 1999) e é caracterizado por ser uma metodologia de alta sensibilidade, sendo sensível a drogas centrais e periféricas (VAZ *et al.*, 1996; VOGEL & VOGEL, 1997; RAMEZANI *et al.*, 2001 *apud* QUEIROZ, 2011).

A administração intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de prostaglandinas, mas também a liberação de mediadores (aminas – norepinefrina e acetilcolina) do SNC (DUARTE *et al.*, 1988; BORSATO *et al.*, 2000). Desta forma, tanto as substâncias com atividade anti-inflamatória, como os anticolinérgicos ou os anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA *et al.*, 2003).

No gráfico 70 estão registrados os efeitos do EMB de *C. umbellifera* nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg via oral sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais em camundongos (n=8). Esses resultados mostraram que neste modelo de nocicepção o EMB de *C. umbellifera* foi capaz de diminuir, de maneira dose dependente, o número de contorções abdominais nas três doses testadas, quando comparada ao grupo controle.

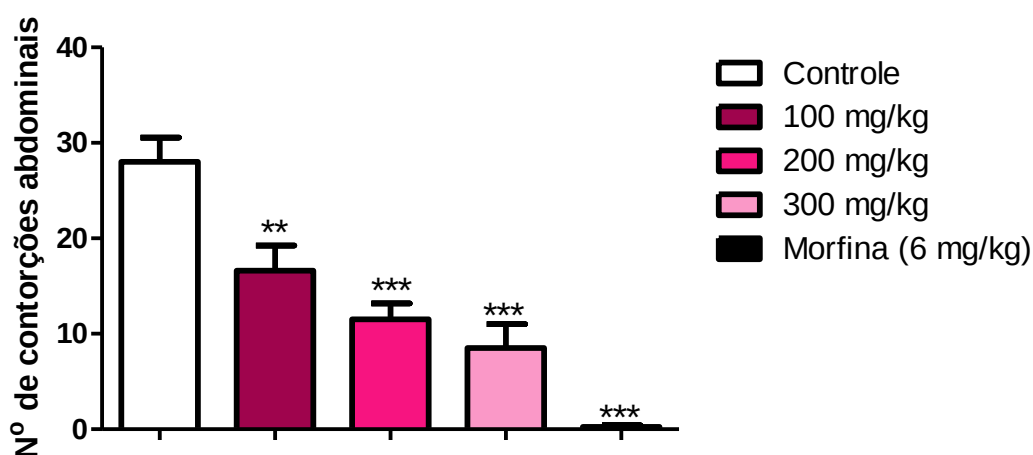


Figura 70. Efeito do EMB de *C. umbellifera* nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg por via oral sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais em camundongos (n=8). **p < 0,01. ***p < 0,001.

Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférico, este não é um modelo específico, pois os analgésicos opióides, antidepressivos tricíclicos, anti-

histamínicos, além das substâncias já mencionadas, também inibem as contorções induzidas por ácido acético.

Desta forma, apesar o EMB de *C. umbellifera* reduzir a quantidade de contorções, foi necessário a utilização de outros modelos de nocicepção para reforçar e melhor caracterizar tais efeitos, sendo eles, o teste da formalina e do glutamato.

5.7.3.2 Teste da formalina

O teste da formalina é um modelo químico de nocicepção que fornece uma resposta mais específica, além de ser considerado, atualmente, o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJOLSEN & HOLE, 1997).

A principal característica desse teste é o fato de que o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção, que parece envolver estímulos distintos. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e estende-se pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A δ , ela está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros, os quais induzem mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal que, ao longo do tempo, promovem a facilitação da transmissão em nível espinhal (HUNSKAAR & HOLE, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Entre a primeira e a segunda fase do teste da formalina, há um período de repouso chamado de “interfase” que ocorre devido a uma ativação de processos inibitórios não regulados por mecanismos que envolvem o GABA, já que agonistas gabaérgicos de receptores tipo A inibem a diminuição de manifestações de dor durante esse período (HENRY *et al.*, 1999).

Drogas que atuam em nível central, tais como analgésicos opióides, inibem ambas as fases do teste da formalina, entretanto, drogas de ação periférica como os antiinflamatórios somente são eficazes na segunda fase (SANTOS *et al.*, 1994; FARSAM *et al.*, 2000). Segundo HUNSKAAR e HOLE

(1987), tanto antiinflamatórios não-esteroidais quanto os corticosteroides agem na segunda fase da formalina, a exemplo do AAS (ácido acetilsalicílico), indometacina e dexametasona (RUJJANAWATE *et al.*, 2003).

Com base na figura 71, os camundongos tratados com 100 mg/kg ($95,3 \pm 8,2$), 200 mg/kg ($92,3 \pm 6,5$) e 300 mg/kg ($73,6 \pm 7,3$) do EMB não demonstraram redução significativa do tempo de lambida da pata em relação ao controle ($93,4 \pm 6,9$), na primeira fase do teste da formalina. O grupo padrão tratado com morfina na dose de 10 mg/kg reduziu de forma significativa o tempo de lambida das patas ($50,0 \pm 4,6$).

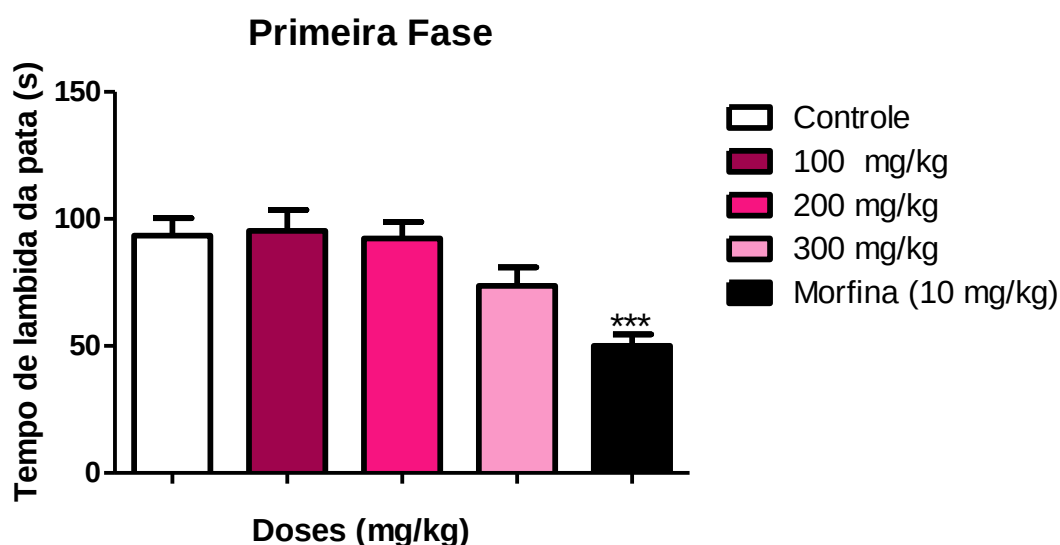


Figura 71. Efeito de EEHc nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg (oral) e morfina na dose de 10 mg/kg, na primeira fase do teste da formalina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=8). ***P<0,001 (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Entretanto conforme os resultados apresentados na figura 72, o EMB de *Calliandra umbellifera* diminui significativamente o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina nas doses de 100 mg/kg ($16,1 \pm 16,0$), 200 mg/kg ($40,7 \pm 15,6$) e 300 mg/kg ($10,3 \pm 7,3$), quando comparada ao grupo controle ($126,0 \pm 20,5$). A morfina produziu redução significativa ($5,4 \pm 3,0$) em relação ao controle e dessa forma, os resultados foram semelhantes ao grupo padrão tratado com morfina.

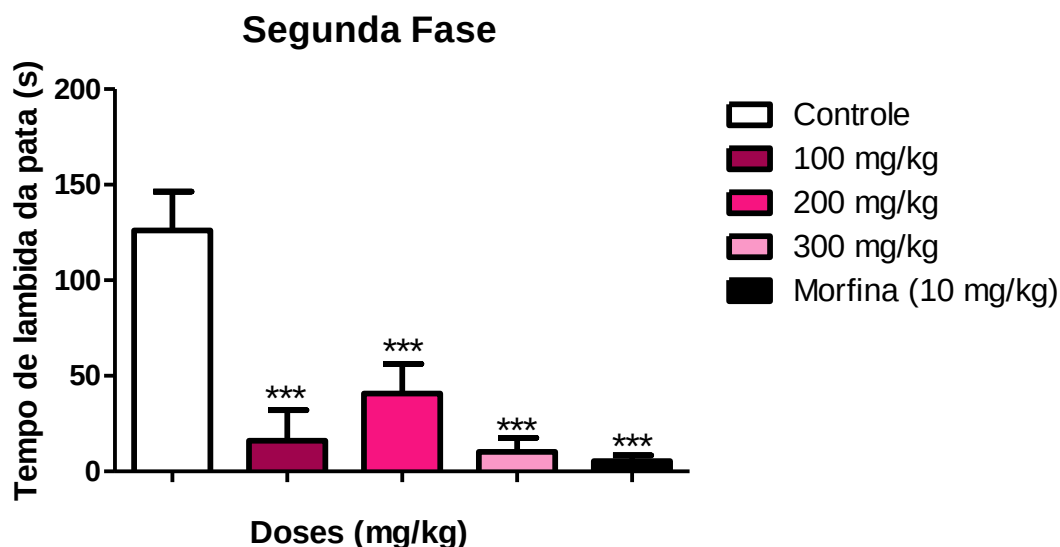


Figura 72. Efeito de EEHc nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg (oral) e morfina na dose de 10 mg/kg, na segunda fase do teste da formalina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Em suma, as três doses utilizadas no teste da formalina (100, 200 e 300 mg/kg) não promoveram uma diminuição do tempo de lambida na primeira fase do teste, entretanto, todas as doses testadas diminuiram significativamente o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina, sendo este efeito, indicativo de uma ação periférica assim como os anti-inflamatórios não esteroidais e corticosteróides, os quais somente são eficazes na segunda fase.

5.7.3.3 Modelo de nocicepção induzido por glutamato

Este modelo proposto por Beirith, Santos e Calixto (1998) é aplicado para substâncias que atuam sobre o sistema glutamatérgico envolvido na transmissão nociceptiva (BUZZI *et al.*, 2009). A injeção de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. Portanto, este teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos compostos com o sistema glutamatérgico.

O glutamato exerce seus efeitos pós-sinápticos via diversos receptores de membranas, pertencentes tanto a classe dos ionotrópicos quanto metabotrópicos.

Com relação aos receptores ionotrópicos, o receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) recebe particular atenção devido aos diversos papéis que

desempenha na transmissão sináptica excitatória, na plasticidade neuronal e na neurodegeneração do SNC (PETRENKO *et al.*, 2003).

Segundo Beirith e colaboradores (1998) a resposta nociceptiva induzida por glutamato parece envolver sítios de ação periféricos, espinhais e supraespinhais, os quais são mediados por ambos os tipos de receptores: NMDA e não NMDA, assim como, pela liberação de óxido nítrico ou por algumas vias de transdução moduladas por nitro derivados (BEIRITH *et al.*, 2002, 2003; ROSA *et al.*, 2005).

Evidências mostram que a dor associada com a injúria tecidual ou nervosa periférica envolve ativação dos receptores NMDA (PETRENKO *et al.*, 2003). Os antagonistas do NMDA têm demonstrado efeitos no alívio da dor, tanto em modelos animais como em situações clínicas (FISHER *et al.*, 2000).

Os resultados a seguir referem-se ao modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. Na figura 73, pode-se observar que o extrato metanólico bruto de *Calliandra umbellifera* promoveu efeito antinociceptivo significativo quando comparado aos animais do grupo controle.

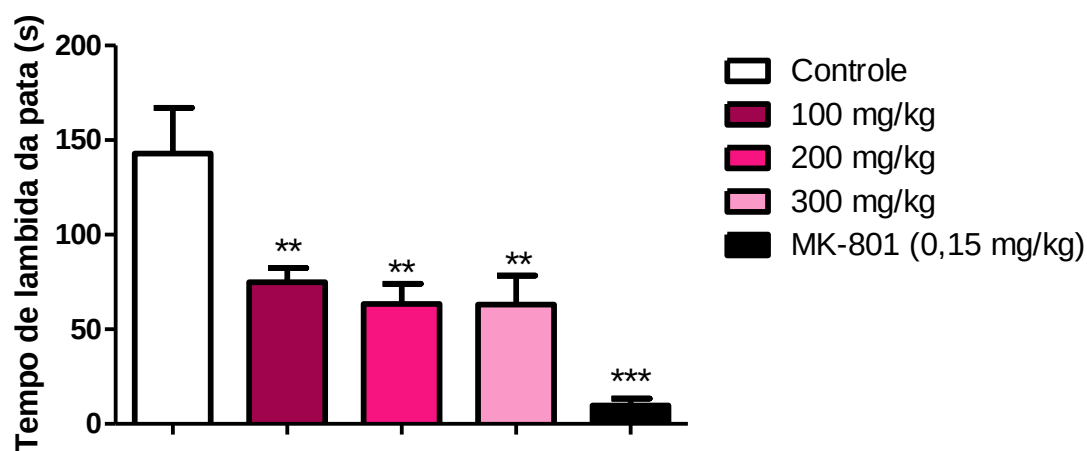


Figura 73. Efeito do pré-tratamento (1h; oral) dos animais com veículo (grupo controle) ou EMB nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg sobre a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 μ mol/pata), em camundongos. Cada barra representa a média do tempo de lambida da pata (s) de 6-8 animais durante os 15 min iniciais $\pm$ E.P.M. ** $p < 0,01$ representa as diferenças estatisticamente significativas dos grupos, quando comparados com o grupo controle (ANOVA seguido de Dunnett).

Nesse sentido, sugere-se que o EMB de *C. umbellifera* pode estar inibindo diretamente a ação do glutamato através do antagonismo de seus receptores ou inibindo a liberação de outros mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o EMB de *C. umbellifera* não apresenta perfil de substância com atividade antinociceptiva do tipo central. Entretanto por apresentar resultados em metodologias comportamentais não específicas (contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e teste da formalina) e específicas (teste do glutamato), esta substância pode correlacionar-se com uma possível atividade anti-inflamatória, que pode estar envolvida na atividade analgésica periférica.

Esses resultados estão de acordo com a utilização de espécies de *Calliandra* como analgésicas pela população e também com as atividades farmacológicas observadas para tais, como por exemplo, Agunu e colaboradores (2005), que realizaram o teste do ácido acético e da formalina nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg com raízes e folhas de *Calliandra portoricensis*, observando que estas apresentam atividade analgésica, sendo esta atividade dose-dependente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico de *Calliandra umbellifera* Benth evidencia a espécie como bioprodutora de diferentes classes de metabólitos: esteróides, benzofenona, ácidos fenólicos e ciclitól.

A espécie apresentou em sua constituição química uma benzofenona, Iriflofenona 2-O- β -D-Glicopiranosídeo, sendo esta isolada pela primeira vez na família Fabaceae; dois compostos fenólicos, o ácido gálico e o ácido atrárico, sendo o primeiro isolado pela primeira vez na espécie; um ciclitól, 3-O-metil-D-chiro-inositol (pinitol), sendo este e o ácido atrárico isolados pela primeira vez no gênero *Calliandra* e 4 esteróides, β -sitosterol e estigmasterol, glicosilados e não glicosilados.

O extrato metanólico bruto e as fases acetato de etila e hidrobutanólica de *Calliandra umbellifera* possuem forte atividade antibacteriana frente à cepas de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*) e gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), tendo sua CIM estabelecida entre 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da fase AcOEt frente a *S. aureus* (ATCC 13150)

Em contrapartida, o extrato bruto e as fases testadas não apresentaram atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Já as substâncias isoladas (Iriflofenona glicosilada e pinitol) não apresentaram atividade antibacteriana, entretanto, apresentaram forte atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Candida albicans* HIV⁺ - 101 e *Candida krusei* LM-08 com uma CIM estabelecida em 128 $\mu\text{g/mL}$.

Com relação a atividade antinociceptiva, o extrato metanólico bruto apresentou significativa atividade para o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e para o modelo de nocicepção induzido pela formalina e pelo glutamato, sugerindo possível atividade analgésica periférica.

Por se tratar do primeiro estudo fitoquímico e farmacológico da espécie *Calliandra umbellifera*, este trabalho fornece importantes conhecimentos básicos sobre a espécie, mostrando o potencial químico e farmacológico da espécie e das substâncias isoladas, podendo incentivar o cultivo dessa espécie, que está em extinção, levando a inclusão de uma nova espécie no rol de plantas a serem pesquisadas e embasando novos estudos.

Diante do potencial fitoquímico e farmacológico da espécie estudada pretende-se continuar este estudo com a quantificação do pinitol no extrato de *C. umbellifera* e avaliação da atividade antidiabética deste extrato, uma vez que as substâncias isoladas apresentam diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, entre elas, atividade no tratamento da diabetes.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M.; HOCH, J.; BERGER, J. M. *et al.* Two Bioactive Saponins from *Albizia subdimidiata* from the Suriname Rainforest 1. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 4, p. 536–539, 2001.

ADESINA, G. A. Personal Communication. Chemistry Department, University of Ibadan, Ibadan Nigeria, 1976.

AGNESE, A. M.; PÉREZ, C.; CABRERA, J. L. *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 389 - 394, 2001.

AGRA, M.F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICES. **Phytochemical and Ethnobotanical databases**. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chemical.plstigmasterol>.

AGUNU, A.; ABDURAHMAN, E.; SHOK, M.; YUSUF, S. A. Analgesic activity of the roots and leaves extracts of *Calliandra portoricensis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 442–445, 2005.

AGUWA, C. N.; LAWAL, A. M. Pharmacologic studies on the active principles of *Calliandra portoricensis* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 63-71, 1988.

AHAD, A.M., GOTO, Y., KIUCHI, F., TSUDA, Y., KONDO, K., SATO, T. Nematocidal principles in “oakmoss absolute” and nematocidal activity of 2,4-dihydroxybenzoates. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1043–1046, 1991.

ALLEGRIANI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Emulsions d’huiles essentielles, fabrication et applications in microbiologia. *Society Pharmacy Montpellier*, v. 33, n. 1, p. 73- 86, 1976.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALMANZA, G. R.; QUISPE, R.; MOLLINEDO, P.; RODRIGO, G.; FUKUSHIMA, O.; VILLAGOMES, R.; AKESSON, B.; STERNER, O. Antioxidant and antimutagenic polyisoprenylated benzophenones and xanthenes from *Rheedia acuminata*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1269-1274, 2011.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para

avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANDERSON, A. B., MCDONALD, D. L., FISCHER, H. O. L., **Journal of American Chemical Society**, v. 74, p. 1479, 1952.

ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANGYAL, S. J.; ODIER, L. The effect of methylation on chemical shifts in the ^1H and ^{13}C nmr spectra of cyclic polyols. **Carbohydrate research**, v. 123, n. 1, p. 23–29, 1983.

AQUINO, R. DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELOO, J. F. Quinovic acid glycosides from Guettarda platypoda. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2927-2930, 1988.

ATHUKORALAGE, P. S.; HARATH, H. M. T. B.; DERANIYAGALA, S. A.; WIJESUNDERA, R. L. C.; WEERASINGHIE, P. A. Antifungal constituent from *Gordonia dassanayakei*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 565-567, 2001.

AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and β -sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essencial Fatty Acids**, v. 72, p. 219-226, 2005.

BACKLUND, M.; OXELMAN, B.; BREMER, B. Phylogenetic relationships within the Gentianales based on ndhf and rbcL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 7, p. 1029-1043, 2000.

BANIANHMAD, A.; HOFFMANN, H. R.; MATUSCH, R. Uso de 2,4-dihidroxi-3-metilbenzoato, medicamento para o tratamento da hiperplasia prostática, carcinoma de próstata ou da atrofia muscular espino-bulbar, 2,4-dihidroxi-3-metilbenzoato, processo para o isolamento do ácido atrárico e partir do um material biológico e processo para a síntese de derivados do ácido atrárico. WO 2006/081997, 2006

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essencial oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. **World Journal of Modelling and Simulation**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BARDON, A.; MITRE, G. B.; KAMIYA, N.; TOYOTA, M. AND ASAKAWA, Y. Eremophilanoids and other constituents from the Argentine liver-wort *Frullania brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 205-213, 2002.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. Bailey & Scott's - Diagnostic microbiology, 8 ed. The C. V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BATES, S. H.; JONES, R. B.; BAILEY, C. J. Insulin-like effect of pinitol. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1944-1948, 2000.

BAWER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 493-496, 1996.

BEERHUES, L.; LIU, B. Biosynthesis of biphenyls and benzophenones- Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1719-1727, 2009.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 233-245, 1998.

BEIRITH, A., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BEIRITH, A., SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, p. 110-6, 2003.

BENEDITO, R. B. Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-álcool perílico em camundongos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa, 2009.

BERGES R. R., WIDELER J., TRAMPISCH H. J., SENGE, T. H. And the b-phytosterol study group. Randomised, placebocontrolled, double blind clinical trial of b-phytosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. **The Lancet**, v. 345, p. 1529-1532, 1995.

BERRIDGE M. J. Inositol triphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, p. 15-325, 1993.

BITTENCOURT, C. M. S. Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Alurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 809-813, 2000.

BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant sterol and sterolins: A review of their immune-modulating properties. **Alternative Medicine Review**, v. 4, p. 170-177, 1999.

BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 87-91, 2008

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, 1994.

BRAZ FILHO, R. Phytochemical contribution to development of a emergent country. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. Carbono-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods And Applications In Organic Chemistry And Biochemistry. 3ª Ed. Weinheim, New York: VHC, 1990.

BURIAN, M; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacological Therapy**, v. 107, p. 139-154, 2005.

BUZZI, C.; FRANZOI, F. C. L.; ANTONINI, G.; FRACASSO, M.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; NIERO, R. Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4596-602, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-89, 2000.

CARBIN, B. -E., LARSSON, B. & LINDAKE, O. Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols. **Brazilian Journal of Urology**, v. 66, p. 639-641, 1990.

CASTARDO, J. D. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia gardneriana* (planchon & triana) zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2007.

CENTRY, A. H. Human Medicinal Agents from Plant, Ed. American Chemical Societ, p. 13-24, 1993.

CHAUBAL, R.; PAWAR, P. V.; HEBBALKAR, G. D.; TUNGIKAR, V. B.; PURANIK, V. G.; DESHPANDE, V. H.; DESHPAND, N. R. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol – a bioactive carbohydrate. **Chemistry & Biodiversity**. v. 2, n. 5, p. 684-688, 2005.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L. *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of

Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 12, 2011.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: V.M.D. Lorian. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 739-788, 1991.

CORBY, H. D. L. Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. **Kirkia**, v. 13, p. 53-123, 1988.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytochemistry Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

CORRADI, I. F. Plantas do cerrado: obtenção e caracterização espectroscópica de extratos e avaliação do potencial de inibição da tirosinase. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

COSSÍO G., Búsqueda de información sobre fitosteroles, Resumen ejecutivo, Consultoría Biomundi, Instituto de Documentación e Información Científico Técnica, Ciudad de La Habana, Cuba, 1-8, 2002.

COSTA, T. R. Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

COUTAX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Spine J. B.**, 2005.

COVA, B.; MONDADORI, H. Levantamento bibliográfico das espécies medicinais pertencentes à família Fabaceae (Leguminosae), *Amburana cearensis* A. C. SMITH., *Anadenanthera colubrina*, *Erythrina velutina* Willd. Universidade Federal da Bahia, 2006.

CUÉLLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; JUST, M. J.; MANEZ, S.; CERDA, M.; HOSTETTMANN, K.; RIOS, J. L. Zanthasaponins A and B, antiphospholipase A2 saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 11, p. 1158 - 1160, 1997.

CUENCA-ESTRELLA, M., A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, L. ALCAZAR-FUOLI, L. BERNALMARTINEZ, A. GOMEZ-LOPEZ, M. J. BUITRAGO, E. MELLADO, AND J. L. RODRIGUEZTUDELA. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 1136–1139, 2008.

DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; IZZO, A. *et al.* Phytotoxicity of secondary metabolites from *Aptenia cordifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 118–128, 2007.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. The Pharmacology of Pain Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-verlang, Berlin, 1997.

DIMAYUGA, R. E.; ESPINOZA, J. A.; GARCIA, A.; DELGADO, G.; MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNANDEZ, S. Two new cassane-type diterpenes from *Calliandra californica* with antituberculosis and cytotoxic activities. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 757-761, 2006.

DOUGLAS, C. R. Tratado de Fisiologia Aplicado à Ciência da Saúde. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais, 2006.

DYKSTRA, J. C.; PRAIRIE, J. C. E. A combination of pinitol and creatine to enhance uptake and retention of creatine. WO/2001/080853, 2001.

ENCARNACION D, R.; OCHOA A, N.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; NIELSEN, P. H. Two new flavones from *Calliandra californica*. **Journal of natural products**, v. 57, n. 9, p. 1307–1309, 1994.

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocyanaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

ESPINEL INGROFF, A.; KERKERING, T.M.; GOLDSOON, P.R.; SHADOMY, S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 1089-1095, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A.; KIHNS JUNIOR, C. W.; KERKERING, T. M. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3128-3145, 1992.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FENG, J.; YANG, X. W.; WANG, R. F. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 242-247, 2011.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006.

FERREIRA, D. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; TURATTI, T. C.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 84, p. 47-49, 2003

FISHER, K.; CODERRE, T. J.; HAGEN, N. A. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor of chronic pain management preclinical animal studies, recent clinical experience and future research. **Journal of Pain and Symptom Management** v. 20, p. 58-73, 2000.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, p. 29-58, 2001.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mont., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, 2005.

GILBERT, A. K., HOSZTAFI, S., MAHURTER, L., PASTERNAK, G.W. Pharmacological characterization of dihydromorphine, 6-acetyldihydromorphine and dihydroheroin analgesia and their differentiation from morphine. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 123-130, 2004.

GILCHRIST, H. D.; ALLARD, B. L.; SIMONE, D. A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, v. 67, p. 179-188, 1996.

GORMANN, R.; KALOGA, M.; LI, X. C. *et al.* Furanonaphthoquinones, atraric acid and a benzofuran from the stem barks of *Newbouldia laevis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 583–587, 2003.

GRACIOSO, J. S.; PAULO, M. Q.; LIMA, C. A. H.; BRITO, A. R. M. Antinociceptive effect in mice of a hydroalcoholic extract of *Neurolaena lobata* (L.) and its organic fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p. 1425-1429, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

HADACECK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAIDA, K. S.; BARON, A.; HAIDA, K. S.; FACI, D.; HAAS, J.; SILVA, F. J. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 9, 2011.

HENNIG, S.; NYUNT WAY, S.; ZIEBUHR, W. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an ica-positive *Staphylococcus epidermidis* isolat. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 2, p. 117-122, 2007.

HENRY, J.L.; YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; CODERRE, T.J. Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. **Pain** v. 82, p. 57–63, 1999.

HENRIQUES, M.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. **Biointerfaces**, v. 33, n. 1, p. 235-241, 2004.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the brasilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. R. ; FANG, I.; TECHATANAWAT, G.; STEVENSON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites carcinoma in swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177-184, 2007.

HUNG-LLAMOS, B. R.; MOREJÓN, A. F.; BOLAÑOS, P. C.; MORALES, T. S.; QUIÑONES, B. Y.; RODRÍGUES, P. M. Fitosteroles. Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomedicas. **Revista CENIC. Ciências Biológicas**, v. 36, n. 1, p. 23-33, 2005.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IRVINE, R. F.; SCHELL, M. J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. **Nature Reviews**, v. 2, p. 327-338, 2001.

ITO, H.; MIYAKE, M.; NISHITANI, E. *et al.* Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. **Cancer letters**, v. 143, n. 1, p. 5–13, 1999.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. **Biochemical Journal**, v. 153, p. 23-31, 1976.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY.
Nomenclature of cyclitols. Disponível em:<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol/>.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13^a Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JONES, P. J. H.; NTANIOS, F. Y.; RAENI-SARJAZ, M.; VANSTONE, C. A. Cholesterol lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1144-50, 1999.

JUCHUM, F. S. Análise filogenética das variantes morfológicas foliares de *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) na Região Sul Baiana com base em sequências de DNA. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematics. A phylogenetic approach. Inglaterra, Sinauer Associates Inc.. p. 383-5, 1999.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-10, 2001.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KASAI, R.; MATSOMOTO, K.; NIE, R. L.; MORITA, T.; AWAZU, A.; ZHOU, A.; ZHOU, J.; TANAKA, O. Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1371-1376, 1987.

KAYA, D.; YAL\CCIN, F. N.; BEDIR, E. *et al.* New benzophenone glucosides from the aerial parts of *Gentiana verna* L. subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 459–461, 2011.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em <<http://www.genome.jp/kegg/>>

KIATKOSKI, E. C. Estudo fitoquímico dos frutos e sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KIM, M. J.; YOO, K. H.; KIM, J. H. Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 77, n. 3, p. S247–S251, 2007.

KLIPPEL, K. F.; HILTL, D. M.; SCHIPP, B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for treatment of benign

prostatic hyperplasia. German BPH-Phyto Study group. **British Journal of Urology International**, v. 80, n. 3, p. 427-432, 1997.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S.; MITSUHASHI, H. 10-hydroxypheophytins and a new norlabdame diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3348-3349, 1991.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KRESS, M.; ZEILHOFER, H. U. Capsaicin, protons and heart: new excitement about receptors. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 112-118, 1999.
LEAL, I. R.; TABARELLI, M. & SILVA, J. M. C. Ecologia e conservação da caatinga. Ed. Universitária da UFPE, Recife, 804p. 2003.

LEE, D.; BHAT, K. P. L.; FONG, H. H. S. *et al.* Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 10, p. 1286-1293, 2001.

LEE, J.S.; LEE, C. M.; JEONG, Y. I.; JUNG, I. D.; KIM, B. H., SEONG, E. Y.; KIM, J. I.; CHOI, I. W.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. M. D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin - induced asthma. **FEBS Letters**, v. 581, n. 1, p. 57 - 64, 2007a.

LEE, J.S.; JUNG, I. D.; JEONG, Y. I.; LEE, C. M.; SHIN, Y. K.; LEE, S. Y.; SUH, D. S.; YOON, M. S.; LEE, K. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. M. D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 791 - 804, 2007b.

LEE, S.; TSENG, C.; CHEN, C. Three New Benzophenone Glucosides from the Leaves of *Planchonella obovata*. **Helvetica Chemical Acta**, v. 93, n. 3, p. 522-529, 2010.

LEVI-STRAUSS, C. O uso de plantas silvestres da America do Sul Tropical. In: RIBEIRO, Berta G.(Org.) **Suma Etnológica Brasileira: I Etnobiologia**. 3. ed. Belém: Ed. Universitária UFPA, p. 19 - 42, 1997.

LEWIS, G.; L. RICO. Legumes of the World. In: Lewis, G., B. Schride, B. Mackinder and M. Lock (Eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 577 p, 2005.
LIMA, H. C. DE; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R. DE; FILARDI, F. L. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELES, J. E.; LIMA, L. C. P. ; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; COSTA, L. C. DA; SILVA, M. J. DA; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V. DE; SILVA, M. C. R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R.

Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>).

LINDO, L. A. The hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* (Cashew). Ph.D. Thesis, University of the West Indies, Mona, Jamaica, 1999.

LING, W. H.; JONES, P. J. H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, p. 195-206, 1995.

LIRA, S. R. D; ALMEIDA, R. N.; ALMEIDA, F. R. D.; OLIVEIRA, F. D.; DUARTE, J. C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical biology**, v. 40, n. 3, p. 213-215, 2002.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. Simplified method of evaluations dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, p. 99-113, 1949.

LOESER, J. D. & MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-9, 1999.

LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. *myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v. 150, n. 1, p. 1-19, 2000.

LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A., WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MAHONEY J. E. Plant extracts in the medical management of benign prostatic hyperplasia: fact or fiction. **Canadian Journal of Urology**, v. 2, p. 125-9, 1995.

MAIA, G. L. A. Estudo Fitoquímico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MALAIRAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI, K. J. K. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 425-428, 2006.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, 2004.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. Microbiologia oral. 4th ed. São Paulo: Editora Santos, 2005.

MARTIN - LOMAS, M.; RADEMACHER, T. W.; CARO, H. N.; FRANCOIS, I. **Compounds and their uses**. US 6939857, 2005.

MATASYOH, J. C., MAIYO, Z. C., NGURE, R. M., CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 526-529, 2009.

MATTAGAJASINGH I.; ACHARYA L.; MUKHERJEE A. K.; PANDA P. C.; DAS, P. Genetic relationships among nine cultivated taxa of *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoidae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 98-103, 2006.

MCANUFF, M. A.; HARDING, W. W.; OMORUYI, F. O.; JACOBS, H.; MORRISON, E. Y.; ASEMOTA, H. N. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoids*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1667-1672, 2005.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MERSKEY H. Conversion symptoms revised. **Seminars in Neurology**, v. 10, n. 221-228, 1990

MILIKEN M. Plants for malaria, Plants for fever. Medicinal species in Latin America- a bibliographic study. 1a edição, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MIOTTO, S. T. S.; LUDTKE, R.; OLIVEIRA, M. L. A. A. DE; OTHERS. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.

Missouri Botanical Garden, 2012. Disponível em: www.missouribotanicalgarden.org/. Acessado em 15/06/2012.

MISTCHER, L. A.; LEU, R-P.; BATHALA, M. S.; WU, W-U.; BEAL, J. L.; WHITE, R. Antimicrobial agents from Hightler plant. **Lloydia**, v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972.

MMA. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Universidade Federal de Pernambuco, EMBRAPA, 2002.

MONGE, R. A.; ROMA'N, E.; NOMBELA, C.; PLA, J. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 905-912, 2006.

MONTHAKANTIRAT, O.; DE-EKNAMKUL, W.; UMEHARA, K. *et al.* Phenolic Constituents of the Rhizomes of the Thai Medicinal Plant *Belamcanda chinensis* with Proliferative Activity for Two Breast Cancer Cell Lines. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 361-364, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definição.htm>. Acessado em 15/08/2012.

MURILLO, B. M.; SÁNCHEZ, A.; QUEVEDO, R.; PABÓN, M. L., CARULLA, J. E. F. **Revista Colombiana De Química**, v. 37, n. 3, p. 287-295, 2008.

NAGUMO, S., ISHIZAWA, S., NAGAI, M., INOUE, T. Studies on the constituents of Aceraceae plants. XIII. Diarylheptanoids and other phenolics from *Acer nikoense*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 1086–1089, 1996.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 383-388, 2002.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEGI, A. S.; DAROKAR, M. P.; CHATTOPADHYAY, S. K., GARG, A.; BHATTACHARYA, A. K.; SRIVASTAVA, V.; KHANUJA, S. P. S. Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1243-1247, 2005.

NGUYEN, A.; LAMANT, A. Pinitol and *myo*-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3423-3427, 1988.

NIA, R.; ADESANYA, S. A.; OKEKE, I. N.; ILLOH, H. C. ADESINA, S. K. Antibacterial constituents of *Calliandra haematocephala*, **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 3, 1999.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 05-08, 2003.

OLIVEIRA, L. M. Farmacologia da dor. In: Dor – Cavalcante, I. L.: Madalena, M. L. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, 37-52, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e da folha *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, F. S.; DE SOUZA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone, **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 588-591, 2008.

OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 672-676, 2009.

ORISHADIPE, A.; OKOGUN, J.; MISHELIA, E. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of the hexane extract of *Calliandra portoricensis* and its antimicrobial activity. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 131–134, 2010.

OSTLUND, R. E. AND SHERMAN, W. R., U.S. Patent, 1996, 5550166; 1998, 5827896.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–7, 2008.

OTTO, M., SUSSMUTH, R., JUNG, G. & GOTZ, F. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. **FEBS Letters** v. 424, p. 89–94, 1998.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews**, v. 7, p. 555-567, 2009

PASINETTI, G. M. Compositions and methods for treating Alzheimer's disease and related disorders and promoting a healthy nervous system. WO/2006/047544, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia, Tradução da 4ª ed, Editora Cengage Learning, 2010.

PEDERSON, C. S.; FISHER, P. Bactericidal activity of vegetable juice. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 47, p. 421-422, 1944.

PELLEGRINA CD, PADOVANI G, MAINENTE F, ZOCCATELLI G, BISSOLI G, MOSCONI S, VENERI G, PERUFFO A, ANDRIGHETTO G, RIZZI C, CHIGNOLA R. Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. **Cancer Letters**, v. 226, p. 17-25, 2005.

PEREIRA, M. M.; SOUZA-JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae), **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n.3, p.1-8, 2006.

PEREIRA, C. K. S. Estudo da ação psicofarmacológica de *Herissantia crispa* (L.) Brizicky (Malvaceae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

PETRENKO, A. B.; YAMAKURA, T.; BADA, H.; SCHIMOJI, K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. **Anesthesia and Analgesia**, v. 97, p. 1108-1116, 2003.

PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; GIANNINI, M. J. M.; SILVA, D. H. S. Atividade antifúngica de ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos, 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

PODESCHWA, M.; PLETTENBURG, O.; BROCKE, J. V.; BLOCK, O.; ADEL, S.; ALTENBACH, H. J. Stereoselective synthesis of myo-, neo-, L-chiro, D-chiro, allo-, scyllo, and epi-Inositol systems via conduritols prepared from p-benziquinone. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1958-1972, 2003.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. Pp 3-74 in I. R. LEAL, M. Tabarelli & J.M.C. da Silva (eds.), *Ecologia e conservação da caatinga*. Ud. Univ. Fed. de Pernambuco, Recife, 2003.

QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do semi-árido brasileiro. Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

QUEIROZ, R. B. Evidências pré-clínicas da ação antinociceptiva do 3-fenil-5-(4-etilfenil)-imidazolidina-2,4-diona em estudos psicofarmacológicos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, 2011.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LOPES-RIBOT, J. L. *Candida biofilms*: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 633-638, 2005.

RAMEZANI, M.; HOSSINZADEH, H.; DANESHMAND, N. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 255-262, 2001

RANCON, S.; CHABOUD, A.; DARBOUR, N. *et al.* Natural and synthetic benzophenones: interaction with the cytosolic binding domain of P-glycoprotein. **Phytochemistry**, v. 57, n. 4, p. 553-557, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997.

RIEDEL, W., NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 60, p. 404-15, 2001.

ROELL, D.; BANIAHMAD, A. The natural compounds atraric acid and N-butylbenzene-sulfonamide as antagonists of the human androgen receptor and inhibitors of prostate cancer cell growth. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 332, n. 1, p. 1–8, 2011.

ROSA, K.A., GADOTTI, V.M., ROSA, A.O., RODRIGUES, A.L., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**, v. 381, p. 185-8, 2005.

RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N. *et al.* A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1013–1015, 1999.

RUEPING, M. J.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future prespectives, **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, p. 735-748, 2009.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91-95, 2003.

SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; MALMIR, M. MORADI-AFRAPOLI, F.; AJANI, Y. Tryptophan and Sterols from *Salvia limbata*. **Journal of Medicinal Plants**, v. 10, n. 37, p. 41-47, 2011.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMENEA, SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549-557, 2004..

SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 826–831, 2012.

SALINAS, M. H. R. Famílias de dicotiledôneas vazeoelanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: evolution, filogenia, gêneros. **Mérida**, 1992.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of medical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 295–310, 1994.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; FREITAS, L. A. S.; VILELA, F. C.; VELOSO, C. D.; DA ROCHA, C. Q.; MOREIRA, M. E. C.; DIAS, D. F.; GIUSTI-PAIVA, A.; DOS SANTOS, M. H. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280-285, 2011

SANTANA, S. V. Nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012

SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; NIERO, R.; VIANA, A. M.; MORENO, F. N.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analgesic effects of Callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 755-759, 1994.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. **Planta Medica**, v. 61, p. 329-331, 1995.

SANTOS, V. M. Preparação de filtros solares em nanosistema visando a maior ação protetora. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SARTORATTO A., MACHADO A. L. M., DELARMELINA C., FIGUEIRA G. M., DUARTE M. C. T., REHDER V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 273- 280, 2004.

SARTORI, M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SCHAECHTER, M. E.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SEVERI, J. A. Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Guaripa spp. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

SHAATH, N.A. Evolution of moderns sunscreen Chemicals. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

SHERRINGTON CS. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. **Journal of Physiology**. v. 34, p. 1-50, 1906.

SHEVTS, V. I. The chemistry of *myoinositol*. **Russian Chemical Reviews**, v. 43, n. 6, p. 488 - 502, 1974.

SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 21-27, 1999.

SIKDER, A. A.; MILLAT, S.; SULTANA, A.; KAISAR, M. A.; RASHID, M. A. In vitro membrane stabilizing activity, total phenolic content cytotoxic, thrombolytic and antimicrobial activities of *Calliandra surinamensis* (Wall). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 3, p. 45-50, 2012.

SILVA, B. P.; SOARES, J. B. R. C.; SOUZA, E. P.; PALATNIK, M.; SOUSA, C. B. P.; PARENTE, J. P. Pulcherrimasaponin, from the leaves of *Calliandra pulcherrima*, as adjuvant for immunization in the murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 23, p. 1061-1071, 2005.

SILVA, C. L.; SILVA, K. G. S.; FEITOSA, A. C. S. A expansão do diabetes e o uso do fitoterápico extraído das plantas do gênero *Bauhinia*. **Revista Digital de Pesquisa CONQUER da Faculdade São Francisco de Barreiras**, v. 3, 2008.

SILVA, J. P. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. Dissertação de mestrado na Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

SILVA, F. C. Benzofenonas em Guttiferae e perfil fitoquímico dos extratos lipofílicos de *Clusia criuva*, *Clusia fluminensis* e *Hypericum carinatum*. Trabalho de conclusão da disciplina de estágio curricular em farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 7ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVERTHORN, D. U. O sistema nervoso. In: SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. Ed. Artmed, 2ª Ed., 2003, cap. 8, p. 214-250.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

SINGH, R. K.; PANDEY, B. L.; TRIPATHI, M.; PANDEY, V. B. Anti-inflammatory effect of (+)- pinitol. **Fitoterapia**, v. 72, p. 168-70, 2001.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

SOUZA, N. M.; SOUZA, L. A. G. Levantamento do potencial de aproveitamento das leguminosas no distrito da barreira do Andirá, Barreirinha, AM. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiania, v. 7, n. 12, 2011.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Farmacognosia - Coletânea Científica. Ed. UFOP, Ouro Preto, 2012.

SURESHAN, K. M.; MURAKAMI, T.; WATANABE, Y. Total syntheses of cyclitol based natural products from *myo*-inositol: brahol and pinpollitol. **Tetrahedron**, v. 65, n. 20, p. 3998–4006, 2009.

SUZUKI, T. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.

TAIZ, L. ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Armed Editora, 2004.

TENÓRIO-SOUZA, F. H. Estudo fitoquímico e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animals models of analgesia. In: Dickenson, A. H. & Besson, J. M. (org.), The Pharmacology of pain (Handbook of Experimental Pharmacology series, v. 25). Germany: Springer-Verlag, p. 1-20, 1997.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 47-52, 2008.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE; C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.p .920.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999.

TSAI, C. C.; WANG, C. C.; KUO, H. Y.; CHIANG, D. H.; LIN, M. L.; LIU, C. Y.; YANG, S. P. Adult candidemia at a medical center in northern Taiwan: a retrospective study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 41, p. 14-21, 2008.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

URBINA, J. M.; CORTÉS, J. C.G; PALMA, A.; LOPEZ, S. N.; ZACCHINO, S. A.; ENRIZ, R. D.; RIBAS, J. C.; KOUZNETZOV, V. V. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 691-698, 2000.

VADYVALOO, V.; OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 28, n. 11, p. 1069-78, 2005.

VANDECASTEELE, S. J., PEETERMANS, W. E., MERCKX, R. & VAN ELDERE, J. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 730-737, 2003.

VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. BARREIRO, E. J. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, S.L. Fitoterapia da Amazônia. Manual das plantas medicinais. Ed. Ceres, São Paulo, p. 347, 1992.

VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B.E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 88, p. 137-143, 2003.

VIRTUOSO, S. Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. – FABACEAE (LEGUMINOSAE – PAPILIONOIDEAE). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2005.

VOGEL, H. G.; VOGEL, W. H. Drug discovery and evaluation, pharmacological assays, Berlin: Springer, p. 370-371, 1997.

VUONG, C; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

WALL, P. D.; MELZACK, R. Textbook of pain, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

WU, V. C.; QIU, W. Q.; BUSHWAY, A.; HARPER, L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1834-1841, 2008.

WU, X. D.; CHENG, J. T.; HE, J. *et al.* Benzophenone glycosides and epicatechin derivatives from *Malania oleifera*. **Fitoterapia**, 2012.

YAMAGUCHI, M. U. Atividade antifúngica de telimagrandina II isolada da *Ocotea odorifera* e de derivados semi-sintéticos da tiossemicarbazida. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

YANG, X.; KHONG, T. T.; CHEN, L.; CHOI, H. D.; KANG, J. S.; SON, B. W. 8'-hydroxyzearalanone and 2'-hidroxyzearalanol: resorcyclic acid lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 9, p. 1355-1356, 2008.

ZHAN, T.; LOU, H. Synthesis of azole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 6, p. 865–869, 2007.