



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG – CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**JOÃO LUIZ BALDIM ZANIN**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOPROSPECÇÃO DE *Caesalpinia*  
*pluviosa* var. *peltophoroides***

**ALFENAS/MG**  
**2012**

**JOÃO LUIZ BALDIM ZANIN**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOPROSPECÇÃO DE *Caesalpinia*  
*pluviosa* var. *peltophoroides***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares.

**Alfenas/MG**

**2012**

Zanin, João Luiz Baldim.

Estudo químico e bioprospecção de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* / João Luiz Baldim Zanin. - 2012.

138 f. -

Orientador: Marisi Gomes Soares

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. *Caesalpinia* - química. 2. Antiinflamatórios. 3. Antioxidantes. 4. Analgésicos. 5. Biflavonóides. I. Soares, Marisi Gomes. II. Título.

CDD: 547

**JOÃO LUIZ BALDIM ZANIN**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOPROSPECÇÃO DE *Caesalpinia pluviosa* var.  
*peltophoroides***

A banca examinadora abaixo assinada aprova o manuscrito, referente à dissertação, apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

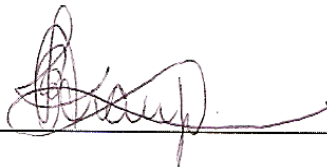
**Aprovado em: 16/Fevereiro/2012**



---

Prof<sup>o</sup>. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

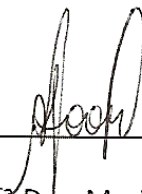
Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)



---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG)



---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Marisi Gomes Soares

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG)

***“D***edico a todos que acreditam que  
a vida é uma eterna busca à sabedoria.  
E especialmente para as pessoas que me  
fizeram acreditar.”

## AGRADECIMENTOS

**Primeiramente** toda a orientação, atenção e segurança dadas pela Professora Dra. Marisi Gomes Soares, acompanhando minuciosamente cada detalhe e etapa da evolução deste trabalho e da minha formação.

**Aos professores coordenadores do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM)**, Professor Dr. Cláudio Viegas Júnior, nos ensinando a disciplina e todo o valor e a importância do conhecimento, Professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos pelas grandes ideias e grande senso de humor, Professora Dra. Márcia Paranho Veloso pelos ensinamentos e mais uma vez, a Professora Dra. Marisi Gomes Soares, fazendo parte dessa coordenação, meu profundo respeito e admiração.

**Aos professores do programa de pós-graduação em química da Unifal (PPGQ-Unifal-MG)**, Dr. Eduardo Tonon de Almeida, Dr. Fábio Luiz Pisseti; Dr. Marcelo Henrique dos Santos; Dr. Fábio Herbst Florenzano; Dr. Luciano Tavares Costa; Dra. Márcia Paranho Veloso; Dra. Marisi Gomes Soares por todos os ensinamentos nas disciplinas cursadas. Sem o conhecimento adquirido na minha formação, a conclusão deste trabalho não seria possível. Obrigado por tudo. Tenho grande admiração e respeito a todos vocês.

**Agradeço aos professores componentes da banca avaliadora** da defesa de dissertação: Dr. João Henrique Ghilardi Lago (UNIFESP); Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula (UNIFAL-MG) e Dra. Marisi Gomes Soares (UNIFAL-MG) por todas as correções que serão de imenso valor para a conclusão do trabalho realizado nestes dois anos.

**As alunas de iniciação científica** que me auxiliaram neste processo de aprendizado: Paloma Salles Matineli, por todo seu companheirismo, amizade e sorrisos; Olívia Silva Domingos por auxiliar o desenvolvimento deste; e a aluna Ísis Siqueira por sua seriedade com ótimo senso de humor, que transforma toda a dinâmica de nosso trabalho.

***Aos amigos e colegas de trabalho no LFQM***, sempre presentes, especialmente aos mestrandos, Vanessa (Bombante e Delirante), Jack (Fessora), Ítalo (Pequeno), Miguel (Padre Miguel), Fábio (Toda a sua calma, amizade, didática e suas palavras muito bem pensadas e tudo mais que lhe cabe como agradecimento. Um grande amigo), Flávia Viegas (Oi Pessoa!), Cláudia Mara (Meninaaaaa!), Maria Cecília (Ciça e Astolfo, claro), Fabiano (“Melhores Pessoas!”), Gabriel (e seu grande humor e otimismo); Kris (por toda atenção); Bianca (pelo coleguismo), e a nossa Pós-Doc – Danielle Ferreira Dias por toda a seriedade e ajuda neste trabalho, que foram de extrema importância para sua realização e conclusão; Aos alunos de Iniciação Científica mais próximos: Isael Aparecido Rosa, Maísa Castelli, Francieli Ribeiro Pires, Matheus de Freitas Silva, Matheus Siqueira, Marcela Campelo, Mariana Máximo Riquiel, Marcella Soares Moreira e Kelly Ribeiro. E a todos os outros que participaram direta e indiretamente desta jornada.

***Agradeço todo o carinho*** de nossa querida Glorinha, que nos acompanhou com seu maravilhoso cafezinho todos os dias e todo o zelo com o laboratório e conosco.

***Agradeço toda a atenção*** dada pela Dra Giovanna Cássia de Freitas para a obtenção dos espectros de RMN e Massas, o que possibilitou o fechamento deste trabalho.

***No Laboratório de Farmacognosia***, Professor Dr. Marcelo Aparecido Silva, Professor Dr. Geraldo Alves da Silva e Sílvia Helena Martelli Dias, por sempre mostrarem total disponibilidade em auxiliar todos os processos que necessitei realizar.

***No Laboratório de Fisiologia***, Professor Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pelos testes farmacológicos realizados e por sua participação na banca examinadora da qualificação, que auxiliou a consolidação deste trabalho, com críticas e sugestões.

***Ao pessoal da “Burocracia”*** na Secretaria da Pós-Graduação da Unifal-MG, especialmente para Thiago e Fabiana, sempre nos ajudando com todas as dúvidas com os documentos e afins.

***Ao pessoal do laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos*** pela acolhida, especialmente para Professora Dra. Andreia Pereira Matos por demonstrar tanto carinho e dedicação ao seu trabalho e por ensinar tão bem.

***Ao Professor*** Dr. Marcelo Polo, pela prontidão e total disponibilidade para a identificação da espécie trabalhada.

***Àqueles que temos longe***, que sempre sentem com nossa falta, já acostumados aos nossos “não posso estar com vocês por enquanto”, e que tenho certeza de entenderem que é um período necessário na busca do crescimento pessoal e profissional.

***Agradeço minha família***, não somente em palavras, claro, pois palavras não iriam demonstrar toda a importância, entretanto, posso dizer obrigado por sempre centrar meus pensamentos na simplicidade, o que posso exemplificar claramente com uma música que representa tudo o que sinto pelos ensinamentos: “Simple Man” (Lynyrd Skynyrd):

“[...]Take your time, don't live too fast  
Troubles will come and they will pass[...]”  
“And be a simple kind of man  
Be something you love and understand  
Baby, be a simple kind of man  
Won't you do this for me, son?  
If you can?”

“Forget your lust for the rich man's gold  
All that you need is in your soul  
And you can do this if you try  
All that I want for you my son?  
Is to be satisfied”

“Boy, don't you worry, you'll find yourself  
Follow you heart and nothing else  
And you can do this if you try  
All I want for you my son  
Is to be satisfied [...]”\* *Tradução*

***Fiquei muito feliz com todo do deslumbramento*** de meus avós Virgílio Baldim e Geni Mendes Baldim, quando conheceram o LFQM. Via em seus olhos simples e emocionados, todo o valor que colocam em seu neto, por estar traçando seus passos na vida. E a importância que isso representa pra mim é infinita e vale como grande impulso para prosseguir. São essas energias entre os seres humanos que devem ser compartilhadas sem medidas.

***Para todos*** aqueles que auxiliaram ou acompanharam direta ou indiretamente este trabalho, meu muito obrigado.

***Tradução:*** [...] *Leve seu tempo... Não viva tão rápido, dificuldades virão e passarão. E seja um tipo simples de homem. Seja algo que você ame e entenda. Seja um tipo simples de homem. Você não quer fazer isso por mim filho, Se você puder? Esqueça seu desejo pelo ouro do homem rico. Tudo aquilo que você precisa está em sua alma, e você pode fazer isto se você tentar. Tudo aquilo que eu quero para você meu filho, é estar satisfeito. Menino, não se preocupe... Você se achará. Siga seu coração e nada mais. E você pode fazer isto se você tentar. Tudo o que eu quero para você meu filho, é estar satisfeito. [...]*

## RESUMO

As plantas têm fornecido ao homem conforto e matéria-prima em todas as suas necessidades em termos que abrangem desde moradia, vestuário, alimentos, aromas e fragrâncias e medicamentos, que são de imensurável importância para a humanidade em seu estado atual. Dentre as mais de 500 espécies do gênero *Caesalpinia* spp., cerca de 30 espécies, apenas, foram estudadas quanto sua potencialidade bio-farmacológica. *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, objeto do estudo a ser sistematizado neste trabalho foi testada quando as propriedades farmacológicas de seus constituintes. Na literatura existem relatos escassos sobre informações de sua utilização tradicional onde uma exceção é dada aos estudos preliminares a fim de conhecer a ação moluscicida dos extratos de diversas plantas, e dentre elas a *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. Para o estudo fitoquímico de seus constituintes, os extratos brutos etanólicos (E.B.E.) do caule, flores, folhas e frutos, foram obtidos por maceração em etanol P.A., concentrados e posteriormente particionados em hexano, acetato de etila e EtOH/H<sub>2</sub>O (hidroalcoólica), sendo posteriormente testados quanto sua atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante. Os testes farmacológicos mostraram que os E.B.Es. apresentaram atividade significativa contra a inflamação induzida por carragenina, com redução de edema de 53,81% na quarta hora do teste para a dose de 100mg/Kg para o caule e de 43,69% para as flores na dose de 100mg/Kg na terceira hora do teste, enquanto o padrão indometacina (10mg/Kg) apresentou reduções de 75,49% e 82,73% de inibição, respectivamente para as horas 3 e 4, do experimento. Os resultados do teste da Formalina para a atividade analgésica dos E.B.Es. mostram que há atividade nas duas fases de análise (neurogênica [1] e inflamatória [2]). No teste Von Frey, analisando a intensidade de hipernocicepção induzida por carragenina, os extratos se mostraram significativos como agentes antinociceptivos. Os valores dos limiares de retirada de pata próximos ao padrão morfina obtidos para as flores apresentou o melhor resultado na dose de 300mg/Kg na primeira hora, com um delta de  $1,21 \pm 0,35$  e na terceira hora, um delta de  $1,38 \pm 0,47$ , enquanto que o fármaco referência apresentou valores de  $0,617 \pm 0,25$  e  $0,66 \pm 0,21$ , respectivamente para a primeira e terceira horas de análise. A atividade antioxidante da partição acetato das

flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foi maior que o padrão Butil-hidróxitolueno (BHT) e equivalente ao padrão Ácido Ascórbico (AA), próxima a 100% de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>. O resultado do teste fenólicos totais mostrou que a espécie é rica em polifenólicos, apresentado valores de 28,62%, 32,07%, 39,18%, 30,63%, respectivamente, para os E.B.Es. do caule, folhas, flores e frutos. Um biflavonoide isolado da fração acetato de etila do caule teve sua estrutura determinada como inédita na literatura pesquisada até o momento. Onde foram utilizadas técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além das correlações bidimensionais COSY, HSQC e HMBC e também Infravermelho. No gênero *Caesalpinia*, apenas uma espécie apresentou a ocorrência desta classe de compostos raríssima, os biflavonoides, sendo ela a *Caesalpinia pyramidalis*. O presente trabalho contribuiu para o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Caesalpinia* e o conhecimento sobre a espécie trabalhada com suas atividades farmacológicas testadas.

Palavras chave: *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. Anti-inflamatórios. Antioxidantes. Analgésicos. Biflavonoide.

## ABSTRACT

Plants have provided comfort to the man and raw materials in all their needs in terms ranging from housing, clothing, foods, flavors and fragrances and chemicals that are of immeasurable importance for humanity in its current state. Among the more than 500 species of the genus *Caesalpinia* spp., 30 species only were studied for their potential bio-pharmacological. *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, object of study to be systematic in this work, will be tested about the pharmacological properties of its constituents, providing important information of the species. In literature there are few reports on information from its traditional use. An exception is given to preliminary studies about the molluscicide activity of extracts from various plants, and among them *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. For the phytochemical study of its constituents, the crude ethanol extracts (CEE) of the stem, flowers, leaves and fruits were obtained by extraction in ethanol PA, concentrated and subsequently fractionated into hexane, ethyl acetate and EtOH/H<sub>2</sub>O (hydro-alcoholic) and then tested for its anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities. Pharmacological tests showed that the CEE. has significant activity against carrageenan-induced inflammation, reducing the paw edema at 53.81% in the fourth hour of the test for a dose of 100mg/kg (stem) and 43.69% (flowers) at a dose of 100mg/kg in third hour of testing, while the standard indomethacin (10mg/Kg) showed reductions of 75.49% and 82.73% inhibition, respectively, for the hours 3 and 4 of the experiment. The test results of Formalin for analgesic activity of the CEE. show that there is activity in the two phases of analysis (neurogenic [1] and inflammation [2]). In Von Frey test, analyzing the intensity of hypernociception induced by carrageenan, the extracts were significant as antinociceptive agents. Values of paw withdrawal threshold close to the standard morphine were obtained, where the CEE of the flowers showed the best result at a dose of 300 mg/kg in the first hour, with a delta of  $1.21\pm 0.35$  and third hours, a delta of  $1.38\pm 0.47$ , while the reference drug showed values of  $0.617\pm 0.25$  and  $0.66\pm 0.21$ , respectively, for the first and third hours of analysis. The antioxidant activity of ethylic acetate partition of the flowers of *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* was higher the standard

Butylatedhydroxytoluene and equivalent to the Ascorbic Acid, close to 100% inhibition of DPPH<sup>•</sup> radical. The results of Total Phenolics Test showed that the phenolic species is rich in polyphenols, presented values of 28.62%, 32.07%, 39.18%, 30.63%, respectively, for the CEE. stem, leaves, flowers and fruits. A biflavonoide isolated from the ethyl acetate fraction of the stem of *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* and its structure was determined to be unprecedented in the literature so far. For the structural determination was performed techniques of NMR were used hydrogen and carbon, in addition to the two-dimensional correlations COSY, HSQC, HMBC and also the technique of mass spectrometry. In the genus *Caesalpinia*, only one species showed the occurrence of this rare class of compounds, the biflavonoids, she being the *Caesalpinia pyramidalis*. This work contributed to the knowledge of the genus *Caesalpinia* chemotaxonomic and knowledge about the species worked with their pharmacological activities tested.

Keywords: *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. Analgesics. Antiinflammatory. Antioxidants. Biflavonoid.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Substâncias que se tornaram clássicas pela sua utilização nos últimos quarenta anos, provenientes de Produtos Naturais..... 25
- FIGURA 2 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia* com potencial antimicrobiano. .... 32
- FIGURA 3 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia* com potencial anti-inflamatório. .... 34
- FIGURA 4 - Esquerda - Sibipiruna em fase de floração; Direita - Cachos de flores; Abaixo – Frutos de Sibipiruna. .... 49
- FIGURA 5 - Ocorrência natural da espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no Brasil (Fonte: Embrapa Florestas). .... 51
- FIGURA 6 - Esquema de obtenção das partições a)Hexano; b)Acetato e c)Hidro-Alcoólica dos extratos brutos etanólicos dos constituintes botânicos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*..... 58
- FIGURA 7 - Fluxograma demonstrando (1) as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac), com os solventes adotados e suas proporções; (2) o agrupamento das frações por meio de análise em cromatografia em camada delgada; ressaltando a origem do composto isolado. .... 64
- FIGURA 8 - Fluxograma demonstrando (1) as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac 4-8), com os solventes adotados e suas proporções; (2) o agrupamento das frações por meio de análise em cromatografia em camada delgada; ressaltando a origem do composto isolado..... 66
- FIGURA 9 - Fluxograma demonstrando a obtenção da substância A proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac 4-8:17-24) em Sephadex. .... 67
- FIGURA 10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1, 500MHz, MeOD. .... 69
- FIGURA 11 - Ampliação da região de aromáticos do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 1, 500MHz, MeOD. .... 70

FIGURA 12 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ 6,0ppm - $\delta$ 6,3ppm) da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	71
FIGURA 13 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ 5,0ppm - $\delta$ 3,0ppm) da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	72
FIGURA 14 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1, proveniente da fração acetato de etila do caule de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> , 125MHz, MeOD. ....	73
FIGURA 15 - Ampliação do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ , 125MHz, MeOD. ....	74
FIGURA 16 - Ampliação para o espectro de RMN $^{13}\text{C}$ , 125MHz, MeOD. ....	75
FIGURA 17 - Espectro de correlações de $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY90 da substância 1, MeOD, 500MHz .....	76
FIGURA 18 - Ampliação da região das sinais das correlações entre os hidrogênios aromáticos no espectro COSY da substância 1, MeOD, 500MHz .....	77
FIGURA 19 - Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos $\delta$ 6,3ppm- $\delta$ 6,0ppm no espectro $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY90 da substância 1 500MHz, MeOD. ..	78
FIGURA 20 - Ampliação da região dos sinais dos H2'' e dos H3'' da substância 1 no experimento de $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY90. ....	79
FIGURA 21 - Espectro de correlações $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	80
FIGURA 22 - Ampliação da região de sinais dos H aromáticos dos anéis <i>p</i> -substituídos da substância 1 do espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, 500mHz, MeOD. ....	81
FIGURA 23 - Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos dos anéis <i>p</i> -substituídos no do espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC da substância 1, 500mHz, MeOD. ....	82
FIGURA 24 - Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel A e A' da substância 1 no experimento de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, 500mHz, MeOD. ....	83
FIGURA 25 - Ampliação da região dos sinais das correlações entre os Carbonos 2'' e 3''' no experimento de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	84
FIGURA 26 - Espectro de correlações $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	85
FIGURA 27 - Ampliação do espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD. ....	86

FIGURA 28 - Ampliação do espectro de $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD. .....	87
FIGURA 29 - Ampliação do espectro de $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD. .....	88
FIGURA 30 - Ampliação do espectro de $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD. .....	89
FIGURA 31 - Ampliação do espectro de $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD HMBC.....	90
FIGURA 32 - Estrutura Química da substância 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona, isolada do caule de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> . ....	91
FIGURA 33 - Espectro de IV obtido em IR-Shimadzu Prestig-21 e manipulado em IR-Solution para a substância 1. Gráfico mostrado em Transmitância ( $\gamma$ ) e Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). ....	92
FIGURA 34 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH $^\bullet$ das partições do Caule de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no teste de antioxidante.....	100
FIGURA 35 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH $^\bullet$ das partições das Flores de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no teste de atividade sequestrante de radicais DPPH... ..	100
FIGURA 36 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH $^\bullet$ das partições das Folhas de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no teste antioxidante.....	101
FIGURA 37 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH $^\bullet$ das partições dos Frutos de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no teste antioxidante.....	101
FIGURA 38 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica do Caule de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> , nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pelo teste do poder redutor .....	103
FIGURA 39 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Flores <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> , nas	

- concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.  
 ..... 103
- FIGURA 40 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* , nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor. .... 104
- FIGURA 41 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* , nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor. .... 104
- FIGURA 42 - Curva de calibração obtida após a plotagem dos dados de absorbância das soluções padrões de ácido gálico nas respectivas concentrações para a obtenção do coeficiente de relação. .... 107
- FIGURA 43 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto do Caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nocicepção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2 em mg/Kg. Os valores dentro dos intervalos de confiança \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 em relação ao veículo, foram considerados estatisticamente significativos. 116
- FIGURA 44 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto das Flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nocicepção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2. Os valores dentro dos intervalos de confiança \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados estatisticamente significativos... 117
- FIGURA 45 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nocicepção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2. Os valores dentro dos intervalos de confiança \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados estatisticamente significativos... 118
- FIGURA 46 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.  
 ..... 119
- FIGURA 47 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das Flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata

induzido por carragenina em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. .... 121

FIGURA 48 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. .... 122

FIGURA 49 - Intensidade de hipernocicepção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. .... 124

FIGURA 50 - Intensidade de hipernocicepção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. .... 125

FIGURA 51 - Intensidade de hipernocicepção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle. .... 126

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Detalhamento do processo de maceração e da obtenção do extrato bruto dos constituintes de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	57
TABELA 2 - Codificação para os constituintes botânicos de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	59
TABELA 3 - Rendimento para extratos brutos de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	60
TABELA 4 - Rendimento para partições obtidas das partições de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	60
TABELA 5 - Principais correlações observadas no experimento de COSY90 $^1\text{Hx}^1\text{H}$ para a substância 1.....	76
TABELA 6 - Relações encontradas para carbono e hidrogênio da substância 1 (13-23-SPD) .....	91
TABELA 7 - Valores de absorvância obtidos através da leitura em 517nm da avaliação sequestrante de radicais DPPH $^\bullet$ dos extratos de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> e dos padrões AA e BHT, adotando-se desvio padrão aproximado com duas casas decimais. ....	99
TABELA 8 - Concentração inibitória média (CI $_{50}$ ) das partições de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> pelo teste antioxidante por DPPH $^\bullet$ , obtidos por regressão linear, com os respectivos desvios padrões. ....	102
TABELA 9 - Porcentagem de aumento de absorvância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Folhas de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> , nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ pelo teste do poder redutor.....	105
TABELA 10 - Resultado de Absorvância em 750nm para as soluções formadoras da curva de calibração do ácido gálico, nas concentrações de 0 até 200 $\mu\text{g/mL}$ . ....	106
TABELA 11 - Absorvância resultante em 750nm para o teste FENÓLICOS TOTAIS para as partições dos constituintes de <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	108

TABELA 12 - Porcentagem de compostos fenólicos para os constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* em suas respectivas partições. Resultado apresentado em Equivalentes de Ácido Gálico..... 109

## ÍNDICE DE ABREVIÇÕES

Abreviação	Significado
*	p>0,05
**	p>0,01
***	p>0,001
µg/mL	Microgramas por Mililitro
µg/pata	Microgramas por pata
µHg	Micrômetros de Mercúrio
µL	Microlitros
µM	Micromolar
AA	Ácido Ascórbico
ACh	Acetilcolina
Agm	Asystasia gangeticum
AINES	Anti-Inflamatório Não Esteroidal
APG	The Angiosperm Phylogeny Group
ASP	Sociedade Americana de Farmacognosia
ASRL	Atividade Sequestrante de Radicais Livres
BHA	Butil-Hidróxianisol
BHT	Butil-Hidróxitolueno
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulose
COSY <sup>1</sup> H X <sup>1</sup> H	Correlation Spectroscopy
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cpa	Caesalpinia pulcherrima
<i>d</i>	Dupleto
DAP	Diâmetro a altura do peito
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH <sup>•</sup>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E.B.E.	Extrato Bruto Etanólico
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
ECFAc	Extrato do Caule Fração Acetato
ECFET	Extrato do Caule Fração Hidroetanólica
ECFHex	Extrato do Caule Fração Hexânica
EFLFAc	Extrato das Flores Fração Acetato
EFLFET	Extrato das Flores Fração Hidroetanólica
EFLFHex	Extrato das Flores Fração Hexânica
EFOFAc	Extrato das Folhas Fração Acetato
EFOFET	Extrato dos Frutos Fração Hidroetanólica
EFOFHex	Extrato das Folhas Fração Hexânica
EFTFAc	Extrato dos Frutos Fração Acetato
EFTFET	Extrato dos Frutos Fração Hidroetanólica
EFTFHex	Extrato dos Frutos Fração Hexânica
Eh	Euphorbia Hirta
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EtOH	Etanol
EtOH/H <sub>2</sub> O	Solução Etanol/Água

FT	Fenólicos Totais
HMBC <sup>13</sup> C X <sup>1</sup> H	Heteronuclear Shift Correlations via Multiple Bond. Connectivities
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória Média
IL-6	Interleucina-6
<i>in vitro</i>	Fora de Sistemas vivos
iNOS	Óxido Nítrico Síntase
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
<i>m</i>	Multiplicidade
MeOD	Metanol Deuterado
mg/disco	Miligramas por Disco
mg/kg	Miligramas por Quilo
mg/mL	Miligramas por Mililitro
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros Quardados
mRNA	RNA Mensageiro
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
nm	Namômetros (10 <sup>-9</sup> m)
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PG	Prostaglandinas
PGE-2	Prostaglandina-E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
p-valor (p)	Nível descritivo
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P
Substância 1	5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TX	Tromboxano
UV254nm	Ultravioleta no λ=254nm
UV365nm	Ultravioleta no λ=365nm
UV-vis	Ultravioleta-Visível
v.o.	Via oral
v/v	Proporção Volume/Volume
δ	Deslocamento químico
Δ (Von Frey)	Limiar de Retirada da Pata
λ	Comprimento de Onda

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: .....</b>	<b>29</b>
2.1 O GÊNERO <i>Caesalpinia</i> : .....	29
2.2 PERFIL MOLECULAR E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO <i>Caesalpinia</i> : ....	30
2.2.1 O POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO GÊNERO <i>Caesalpinia</i> : .....	30
2.2.2 O POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO GÊNERO <i>Caesalpinia</i> :.....	33
2.2.3 O POTENCIAL ANALGÉSICO DO GÊNERO <i>Caesalpinia</i> : .....	35
2.2.4 DEMAIS ATIVIDADES BIO-FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Caesalpinia</i> :.....	36
2.2 ANTIOXIDANTES NATURAIS:.....	37
2.3 ANTIMICROBIANOS: .....	39
2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS:.....	41
2.5 ANALGÉSICOS: .....	45
2.6 A ESPÉCIE: .....	48
2.6.1 TAXONOMIA E NOMENCLATURA: .....	48
2.6.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA: .....	49
2.6.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA E EVENTOS FENOLÓGICOS: .....	50
2.6.4 OCORRÊNCIA NATURAL:.....	51
<b>3 JUSTIFICATIVA: .....</b>	<b>52</b>
<b>4 OBJETIVOS:.....</b>	<b>54</b>
<b>5 MÉTODOS FITOQUÍMICOS EMPREGADOS:.....</b>	<b>55</b>
5.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL: .....	55
5.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO: .....	55
5.1.2 SECAGEM: .....	55
5.1.3 TRITURAÇÃO: .....	56
5.1.4 PESAGEM:.....	56
5.1.5 MACERAÇÃO: .....	56
5.1.6 PARTICIONAMENTO: .....	57
5.1.6.1 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, ACETATO ETÍLICA E HIDRO-ALCOÓLICA (PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO): .....	57
5.1.7 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO: .....	59

5.2 MASSA DE MATERIAL VEGETAL TRABALHADO E RENDIMENTO DE PARTIÇÕES:.....	60
5.2.1 RENDIMENTO PARA EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS:.....	60
5.2.2 RENDIMENTO PARA PARTIÇÕES:.....	60
5.3 CROMATOGRAFIA:.....	61
5.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC):.....	61
5.3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD): .....	61
5.3.3 SOLVENTES PARA ELUIÇÃO: .....	61
5.3.4 REVELADORES: .....	62
<b>6 ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA 1: .....</b>	<b>63</b>
6.1 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophodoires</i> (CECFAC): .....	63
6.2 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE – FRAÇÃO 4 A 8 DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophodoires</i> (CECFAC 4-8): .....	65
6.3 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE – FRAÇÃO 4 A 8 – SUBFRAÇÃO 17 A 24 DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophodoires</i> (CECFAC 4-8:17-24):.....	67
6.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1:.....	68
6.4.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS:.....	68
6.4.1 ANÁLISE DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMOSTRA 1 OBTIDA DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> :.....	69
6.4.2 ANÁLISE DE RMN DE CARBONO (RMN <sup>13</sup> C) DA SUBSTÂNCIA 1 OBTIDA DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> :.....	73
6.4.3 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H X <sup>1</sup> H COSY90 DA SUBSTÂNCIA 1:.....	76
6.4.4 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H X <sup>13</sup> C HSQC DA SUBSTÂNCIA 1 DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> :.....	80
6.4.5 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO <sup>1</sup> H X <sup>13</sup> C HMBC DA SUBSTÂNCIA 1 DO CAULE DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> :.....	85
6.5 TABELA DE CORRELAÇÕES PARA A SUBSTÂNCIA 1 DO CAULE DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> :.....	91
6.6 EXPERIMENTO DE INFRAVERMELHO PARA A FRAÇÃO 13-23 OBTIDA ATRAVÉS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX, PROVENIENTE DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> : .....	92
6.7 DISCUSSÃO.....	94
<b>7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS DOS CONSTITUÍNTES DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>:.....</b>	<b>95</b>
7.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: .....	95

7.1.1	TESTE DPPH*:	95
7.1.2	TESTE REDUTOR:	97
7.2	DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS:	98
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	99
7.3.1	QUANTO AO TESTE DPPH*:	99
7.3.1.1	DETERMINAÇÃO DO CI <sub>50</sub> (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA) :	102
7.3.2	QUANTO AO TESTE DO PODER REDUTOR:	102
7.3.3	QUANTO AO TESTE FENÓLICOS TOTAIS:	106
7.3.3.1	ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO:	106
<b>8</b>	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>:</b>	<b>110</b>
8.1	MICROORGANISMOS:	110
8.2	AValiação DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA:	110
8.3	AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA:	111
8.4	INTERPRETAÇÃO:	111
8.5	RESULTADOS:	112
<b>9</b>	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS DE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i>:</b>	<b>113</b>
9.1	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:	113
9.2	TESTE DA FORMALINA:	113
9.3	TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA:	114
9.4	TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO:	114
9.5	RESULTADOS:	115
9.5.1	TESTE DA FORMALINA:	115
9.5.2	TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA:	119
9.5.3	TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO:	123
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES:</b>	<b>127</b>
	<b>REFERÊNCIAS:</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca contínua pela compreensão das leis naturais e o desafio de ultrapassar barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, encaminharam o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (BOLZANI, *et al.*, 2006).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a fonte primordial de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Além disso, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem utilizado dos produtos naturais para o tratamento de suas enfermidades. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), dados de 2007, de 65% a 80% da população mundial (estimada em 7 bilhões de pessoas) não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (SIMÕES, *et al.*, 2007).

Com o surgimento de diversas técnicas para o auxílio no conhecimento e aplicação, desde a atividade farmacológica e a elucidação estrutural, as plantas medicinais se tornaram importantes fontes de novos medicamentos, o que vem sendo confirmado nos últimos anos através de pesquisas científicas, especialmente nas áreas de química e farmacologia (YUNES, *et al.*, 2001).

O interesse pela natureza como uma fonte potencial de agentes quimioterápicos é contínua. Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os medicamentos em uso clínico no mundo. As plantas superiores contribuem com cerca de 30% do total destes medicamentos. Durante os últimos quarenta anos, pelo menos uma dúzia de potentes medicamentos, derivados de plantas, foi descoberta, seguem alguns exemplos:

- *Dioscorea* spp: Diosgenina – Esteroides contraceptivos e todos seus derivados;
- Espécies de *Rauwolfia*: Reserpina e outros alcaloides anti-hipertensivos;
- *Pilocarpus* spp: Pilocarpina – Tratamento de glaucoma;
- *Digitalis* spp. Agentes cardiotônicos;
- *Catharanthus roseus*. Poderosos agentes antileucêmicos (Vimblastina e Vincristina);
- *Taxus brevifolia*. Taxol, um poderoso anticancerígeno.

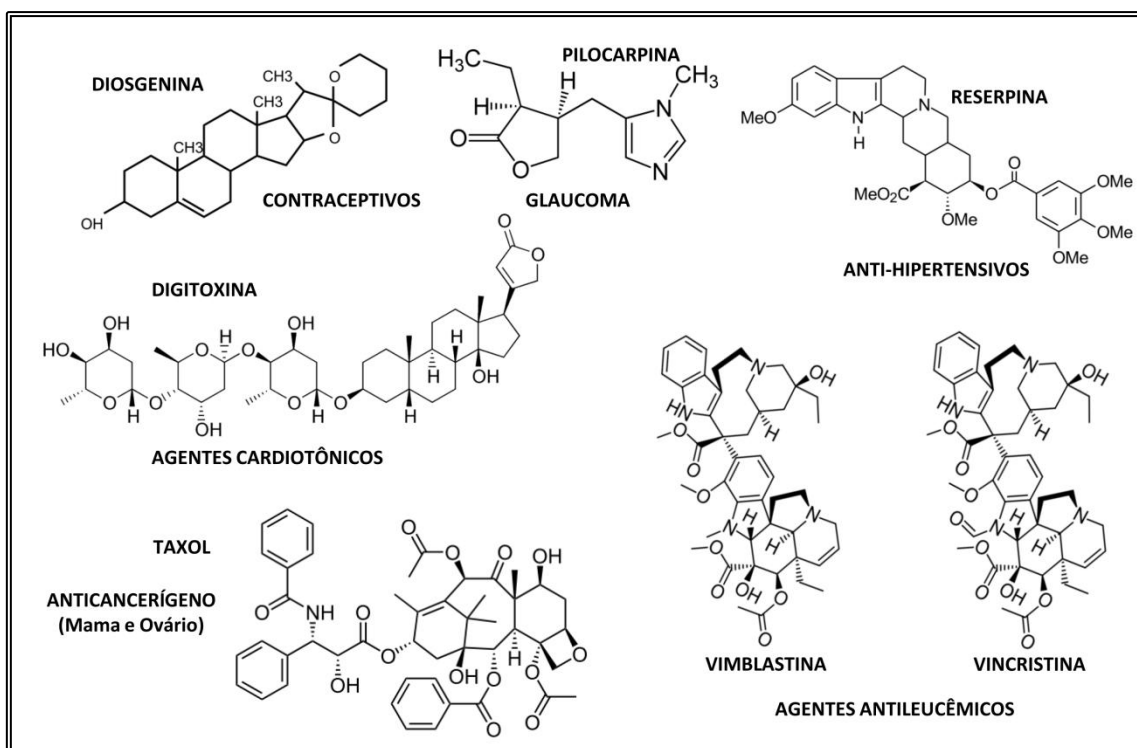


FIGURA 1 - Substâncias que se tornaram clássicas pela sua utilização nos últimos quarenta anos, provenientes de Produtos Naturais.

A busca de novas substâncias, atualmente, tomou uma rota um pouco diferente, onde a ciência da etnobotânica e etnofarmacognosia estão sendo usadas como guia para conduzir o Químico para fontes de diferentes classes de compostos. É neste contexto que a flora dos trópicos, em virtude de sua diversidade, tem um papel importante para fornecer novos esqueletos químicos com atividades biológicas que sejam passíveis de aplicação à grande parte da população. Dando origem a medicamentos, oriundos de métodos sintéticos inspirados ou não em substâncias naturais e/ou fontes totalmente extraídas do reino vegetal, que atuam nos mais diversos tipos de enfermidades que abordam a humanidade (GURIB-FAKIM, 2006).

Na procura de compostos que sejam eficazes, quer pela sua estrutura ou pelo modo de atuação, as fontes de substâncias provenientes do reino vegetal, foram e sempre serão um alicerce fundamental para a busca de novos componentes químicos, para benefícios à saúde da sociedade. Além do fato de que o estudo químico e farmacológico de plantas é uma estratégia economicamente viável para indústrias farmacêuticas. Onde há também o embasamento na informação popular, que faz o uso das plantas com fins terapêuticos, e que na maioria das vezes, exerce um papel essencial para induzir a pesquisa de prováveis agentes biologicamente ativos (GURIB-FAKIM, 2006).

A ciência em que estas vertentes se baseiam é a química dos produtos naturais, e está inserida de maneira multidisciplinar em diversas áreas do conhecimento. Sua abrangência é vasta apresentando atuação para o bem estar do ser humano na alimentação; como inseticida; perfumaria; matéria-prima para produtos de síntese; sua atuação farmacológica contra inflamação (anti-inflamatórios); contra a dor (analgésico); contra doenças que acometem populações carentes, como malária, leishmaniose; contra AIDS, câncer, Alzheimer, dentre diversas outras; a utilização dos produtos naturais na medicina tradicional demonstra sua importância e instiga no homem a razão, para validar os métodos utilizados, trazendo maior confiança e segurança no uso desta vasta enciclopédia natural de substâncias bioativas e os infinitos papéis existentes para os produtos naturais.

Estas descobertas, onde medicamentos são provenientes de plantas, envolvem diversos campos de estudo e vários métodos de análise. O processo tipicamente começa com o trabalho a identificação da planta de interesse. Onde os químicos de produtos naturais (Fitoquímicos), a fim de conhecer a atuação farmacológica das plantas estudadas preparam os extratos destas e os submetem aos ensaios relevantes de triagem biológica e farmacológica, seguido do processo de isolamento e caracterização de compostos biologicamente ativos. O que se apresenta de acordo com a definição de farmacognosia dada pela Sociedade Americana de Farmacognosia (American Society of Pharmacognosy), sendo “o estudo de propriedades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas de medicamentos, fármacos ou potenciais fármacos de origem natural, assim como a pesquisa por novos medicamentos de fontes naturais” (BALUNAS, *et al.* 2005).

A partir das plantas medicinais podem ser obtidos medicamentos fitoterápicos (complexidade de compostos) e fitofármacos (compostos isolados), os quais são formulados a partir de pesquisas científicas, que duram anos, envolvendo diversos testes, para serem introduzidos no mercado. No entanto, o sucesso de um trabalho científico depende inicialmente da seleção adequada de uma planta, que pode ser feita pela observação, assim como dito, do uso popular, do conteúdo químico (quimiotaxonomia), toxicidade, seleção ao acaso ou a combinação de muitos critérios (RATES, 2000).

Além do fato de poder encontrar cura ou tratamento para diversas enfermidades, a pesquisa em plantas medicinais também pode ter sua razão em diversas vertentes: conhecer a potencialidade medicinal da diversidade vegetal nativa; a elucidação de base racional para a utilização medicinal de algumas espécies; no desenvolvimento de fitoterápicos que tenham baixo custo e atividade satisfatória; na descoberta de protótipos para drogas; dentre outras aplicações. Atualmente, inúmeras atuações farmacológicas de plantas medicinais e suas substâncias são conhecidas, o que é relatado em dissertações, artigos em medicamentos sendo produzidos, mostrando que as plantas são fontes potenciais de substâncias bioativas com estrutura diferenciada e mecanismo de ação inovador (ELISABETSKY, 1991).

No contexto apresentado acima, o Brasil se encaixa como o retentor da maior biodiversidade mundial, que compreende mais de 50.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta). Em função disso e, sobretudo pela grande tradição do uso das plantas medicinais pela medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas vem sendo intensamente explorado pelos pesquisadores brasileiros e, mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (YUNES & CALIXTO, 2001).

Até a presente data, o Brasil conta com apenas um medicamento oriundo exclusivamente da biodiversidade brasileira. O Acheflan (Aché), desenvolvido em conjunto com a indústria farmacêutica Aché e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tem como princípio ativo o  $\alpha$ -humuleno, presente no óleo essencial de *Cordia verbenacea* (popularmente conhecida como erva baleeira), que após cerca de sete anos de trabalho em pesquisa e nos testes pré-clínicos e clínicos, possibilitou a inclusão do medicamento no

mercado (PASSOS, *et al.* 2007). Este exemplo, em meio às intensas pesquisas realizadas no país, incentiva a continuidade para novos estudos e a possibilidade de obtenção de novas formulações e medicamentos a partir de produtos naturais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

### 2.1 O GÊNERO *Caesalpinia*:

O gênero *Caesalpinia* L. é um gênero de plantas fabáceas, pertencente à subfamília *Caesalpinioideae*. As espécies deste gênero são plantas lenhosas que ocorrem em zonas tropicais e subtropicais. O nome do gênero é uma homenagem ao botânico do século XVI Andrea Cesalpino.

O gênero *Caesalpinia* (Caesalpinaceae) consiste em uma fonte inesgotável de metabólitos bioativos apesar de ser ainda pouco investigada quimicamente e farmacologicamente. Este gênero conta com mais de 500 espécies distribuídas mundialmente muitas das quais endêmicas como, por exemplo, o pau-brasil (*C. echinata*) existente apenas no território brasileiro e que participou efetivamente do processo histórico do país. Além desta, *C. pulcherrima*, nativa da América Central com exemplares em vários lugares do mundo, apresenta ação abortiva e emenagoga e é amplamente utilizada na medicina popular. Outras espécies, tais como *C. sappan* e *C. bonduc*, vem sendo utilizadas para o tratamento da inflamação e aumento da circulação sanguínea apresentando também propriedades antimalárica, anti-helmíntica, no tratamento de icterícia e como digestiva (PINTO, *et al.*, 1995; SRINIVAS, *et al.*, 2003; NAGUMO, *et al.*, 2009).

Estudos químicos deste gênero levaram ao isolamento de várias classes de compostos isoladas, dentre as quais se destacam flavonoides, diterpenos, esteroides entre outros. Do ponto de vista farmacológico, estas espécies apresentam atividades antiúlcero-gênica, anticâncer, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antirreumática dentre outras, comprovando informações oriundas de dados etnofarmacológicos (UNDENIGWE, *et al.*, 2007).

## 2.2 PERFIL MOLECULAR E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO *Caesalpinia*:

### 2.2.1 O POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO GÊNERO *Caesalpinia*:

Diversas espécies do gênero apresentam atividade antimicrobiana. Um homoisoflavonoide, (3E)-2,3-diidro-6,7-dimetoxi-3[(3-hidroxi-4-metoxifenil) metileno]-4H-1-benzopiran-4-ona (**1**), isolado das partes aéreas de *C. pulcherrima*, se destacou pela maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum*, na concentração de 100 µg/mL, enquanto que na concentração de 30 µg/mL foi fracamente ativo (DAS, *et al.*, 2009). A isobonducelina (**2**), isolada de *C. pulcherrima* mostrou atividade expressiva contra *B. subtilis* e *C. violaceum* (SRINIVAS, *et al.*, 2003). O extrato metanólico bruto das sementes de *C. bonducella* apresentou eficácia para inibição de crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, cujo potencial mostrou-se similar ao padrão (canamicina). Após isolamento, foram obtidos os derivados ativos que foram identificados como os triterpenóides α-amirina (**3**), β-amirina (**4**), acetato de lupeol (**5**) e lupeol (**6**) (SAEED, *et al.*, 2001). *C. benthamina* forneceu alguns diterpenos da classe cassano, deoxicaesaldekarina C (**7**), benthaminina 1 (**8**), benthaminina 2 (**9**), todos com atividade antibacteriana. Esses estudos mostraram que o composto **8** apresentou maior atividade  $IC_{50} = 47,0 \mu M$  contra *S. aureus* e *Micrococcus flavus*.

*C. paraguayensis* também possui representantes testados quanto ao potencial antibacteriano. Dos compostos relatados desta espécie apenas o composto ácido oleanólico (**10**) apresentou atividade contra *B. subtilis* e *S. aureus* (espécies sensível e resistente à meticilina) com  $IC_{50} = 8,8$  e  $64 \mu g/mL$ , respectivamente (WOLDEMICHAEL, *et al.*, 2003). Outros compostos de *C. pulcherrima*, tais como os furano-diterpenos conhecidos como isovouacapanóis A-D (**11 – 14**), também apresentaram atividade antimicrobiana frente a várias espécies de micro-organismos (RAGASA, *et al.*, 2002).

O extrato metanólico do caule de *C. sappan* foi testado no efeito de crescimento de cinco micro-organismos intestinais, sendo o constituinte ativo a 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (**15**), o qual produziu forte inibição em 5 e 2 mg/disco e inibição moderada em 1,0, 0,5 e 0,25 mg/disco no teste com *Clostridium perfringens*. Este composto revelou ainda fraca inibição

contra a proliferação de *Lactobacillus casei* em 5,0 e 2,0 mg/disco. Em comparação, 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona (**16**) apresenta moderada inibição contra *C. perfringens* em 5,0 e 2,0 mg/disco enquanto que a 1,4-naftoquinona (**17**) em 5,0 mg/disco inibiu significativamente o crescimento de todas as bactérias testadas. Por outro lado, a 1,2-naftoquinona (**18 – Figura 1**) mostrou inibição contra todas as bactérias testadas em 1,0 mg/disco. Desta forma, pode-se inferir que as substâncias obtidas do caule de *C. sappan* podem ser útil como um agente preventivo contra doenças causadas por *C. perfringens* (LEE, *et al.*, 2007).

Em estudos comparativos da atividade antimicrobiana dos frutos de *C. pulcherrima* (Cpa), das folhas de *Euphorbia hirta* (Eh) e das flores de *Asystasia gangeticum* (Agm), a atividade de *C. pulcherrima* foi maior que as demais (os resultados apresentados abaixo seguem a abreviação do nome da planta seguido do valor de IC<sub>50</sub> em mg/mL), contra *Proteus vulgaris* - Cpa-0,175; Eh-0,200; Agm-0,273; *Bacillus subtilis*, - Cpa-0,257; Eh-0,296; Agm-0,320; *Staphylococcus aureus* - Cpa-0,166; Eh-0,216; Agm-0,230. *Streptococcus faecalis* - Cpa-0,221; Eh-0,241; Agm-0,283; *Candida albicans* - Cpa-0,211; Eh-0,275; Agm-0,262; *Aspergillus niger* - Cpa-0,215; Eh-0,304; Agm-0,317; *Rhizopus oligosporus* - Cpa-0,215; Eh-0,304; Agm-0,317 (SUDHAKAR, *et al.*, 2006).

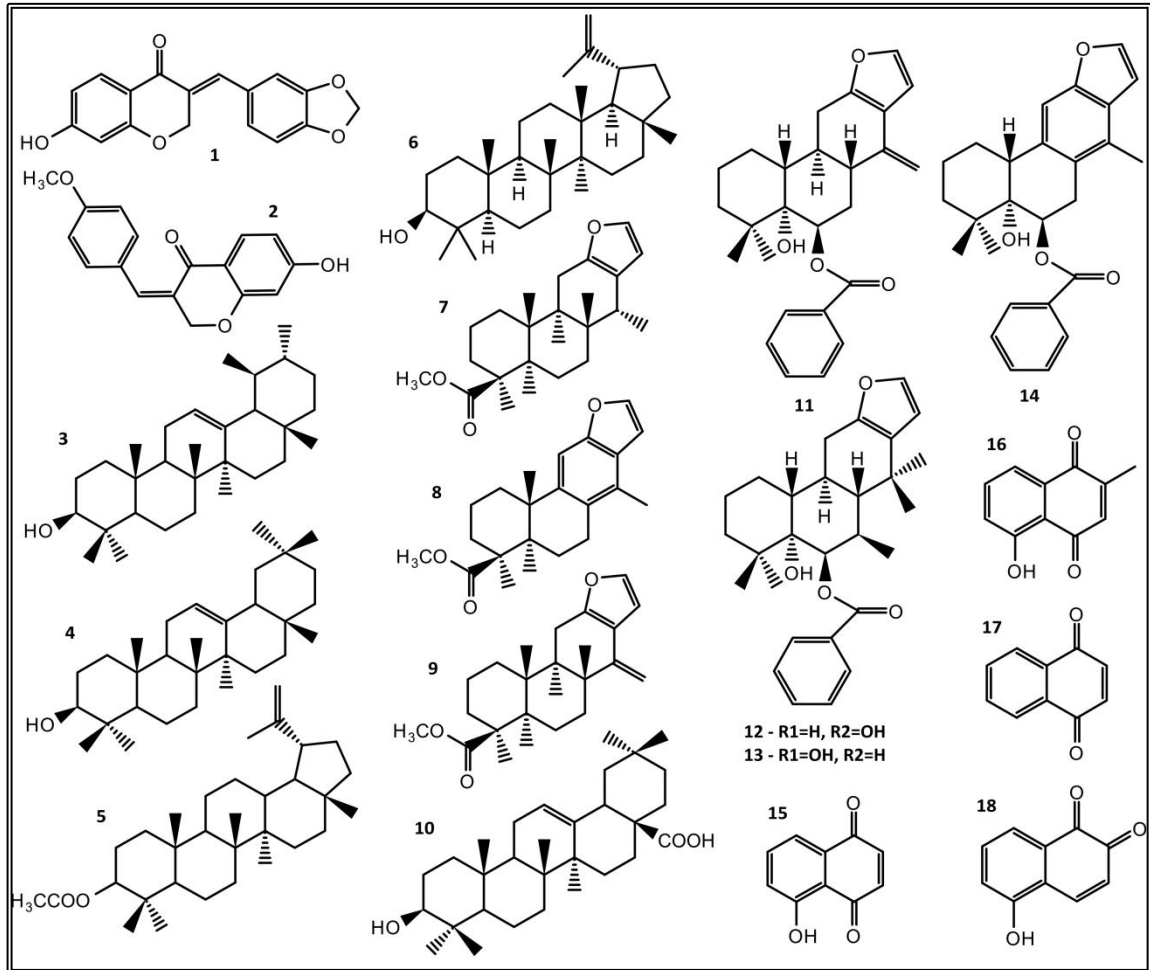


FIGURA 2 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia* com potencial antimicrobiano.

### 2.2.2 O POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO GÊNERO *Caesalpinia*:

Dentre as espécies do gênero que têm, relatadas na literatura, atividade anti-inflamatória, estão presentes *C. sappan* (NAGUMO, *et al.*, 2009; LEE, *et al.*, 2007; LEE, *et al.*, 2010; CHOI, *et al.*, 2007; HONG, *et al.*, 2002; JUN, *et al.*, 2008); *C. ferrea* (CARVALHO, *et al.*, 1996; NAKAMURA, *et al.*, 2002; SAMPAIO, *et al.*, 2009; MENEZES, *et al.*, 2007); *C. bonduc* (UDENIGWE, *et al.*, 2007); *C. minax* (HU, *et al.*, 2006); *C. bonducella* (SHUKLA, *et al.*, 2010; ARCHANA, *et al.*, 2005; DEVI, *et al.*, 2008); *C. mimosoides* (YODSAOUE, *et al.*, 2010); *C. digyna* (SRINIVASAN, *et al.*, 2007).

O óleo das sementes de *C. bonducella* exibiu atividade anti-inflamatória no teste de edema de pata. Em concentrações de 400 mg/kg, nas horas três e quatro do experimento, a atividade anti-inflamatória do óleo das sementes apresentou valores equivalentes ao padrão fenilbutazona, cuja dose administrada foi de 100mg/kg (SHUKLA, *et al.*, 2010). O ensaio anti-inflamatório dos extratos das raízes de *C. mimosoides* levou ao isolamento de vários compostos da classe dos diterpenos. A atividade anti-inflamatória de todos os compostos foi avaliada quanto à atividade inibitória de lipopolissacarídeo (LPS) induzindo produção de óxido nítrico (NO) na linhagem de células RAW264.7. Os resultados mostraram que o composto chamado de Mimosol D (**19**), foi o mais ativo e apresenta uma potente atividade inibitória para ambos os testes com IC<sub>50</sub> de 3μM para inflamação e 6,5 μM para inibição da produção de TNF-α (YODSAOUE, *et al.*, 2010).

Sete compostos isolados do extrato metanólico de *C. sappan* inibiram mediadores químicos da inflamação *in vitro* usando linhagem de célula J774.1, dentre os quais brasilina (**20**), sappanchalcona (**21**) e protosappaninas A - E (**22 – 26 – Figura 2**). Tais compostos foram avaliados quanto aos seus efeitos na inibição de óxido nítrico e prostaglandina E2 (PGE2), produção e efeitos supressores em TNF-α, interleucina-6 (IL-6), ciclooxigenase-2 (COX-2), e a expressão de mRNA induzida por óxido nítrico sintase (iNOS). O composto **23** inibe a produção de óxido nítrico e não inibe a PGE2. Ao contrário, **21**, **25** e **26** inibem ambos (iNOS e PGE2), a produção e a supressão de TNF-α, IL-6, COX-2 e a expressão de iNOS e mRNA (NAGUMO, *et al.*, 2009).

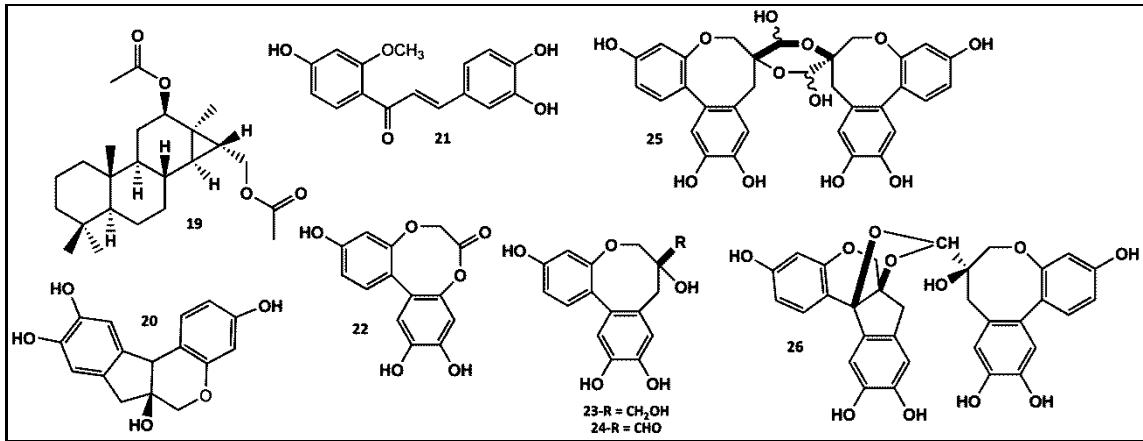


FIGURA 3 - Substâncias isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia* com potencial anti-inflamatório.

### **2.2.3 O POTENCIAL ANALGÉSICO DO GÊNERO *Caesalpinia*:**

Espécies como *C. sappan*, *C. ferrea* e *C. bonducella* demonstram efeitos relacionados à analgesia. No teste de contorções induzido pelo ácido acético, os extratos do caule de *C. sappan* inibiram significativamente o número de contorções em concentrações de 200 e 400 mg/kg. O extrato etanólico da planta inibiu 69,71% e 73,33% respectivamente, sendo o mais ativo. Seguido da fração éter de petróleo, 53,16% e 55,16% e da fração acetato de etila com 62,47 e 68,84%. A aspirina (50 mg/kg) diminuiu as contorções em 75,22% em comparação com o grupo controle (HEMALATHA, *et al.*, 2007). O extrato dos frutos de *C. ferrea* tratados com o mesmo modelo de teste apresentaram resultados de 51% e 88% na redução das contrações abdominais respectivamente para 10 e 20 mg/kg, onde o padrão indometacina (20 mg/kg) apresentou redução em 92% das contrações, enquanto que o óleo das sementes de *C. bonducella* apresentou inibição de 48,6% em 400 mg/kg e o padrão aspirina em 100 mg/kg apresentou inibição de 66,5% nas contorções (CARVALHO, *et al.*, 1996; SHUKLA, *et al.*, 2010). O extrato do núcleo das sementes de *C. bonducella* apresentou atividade analgésica no modelo citado, uma vez que em 300 mg/kg houve inibição de 65,65%, enquanto que o padrão (aspirina) mostrou 67,59% de inibição (ARCHANA, *et al.*, 2005). Outros estudos com *C. bonducella* revelaram que a atividade analgésica do extrato das flores pode atribuída pela presença de flavonoides (DEVI, *et al.*, 2008).

#### **2.2.4 DEMAIS ATIVIDADES BIO-FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO *Caesalpinia*:**

Do ponto de vista farmacológico, espécies do gênero *Caesalpinia* apresentam, além do seu potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e analgésico, são encontrados relatos de atividade adaptogênica, onde os extratos das sementes de *Caesalpinia bonduc* Roxb. (Caesalpinaceae) foram testados no modelo de estresse frio e o modelo de nado forçado, o tegumento da semente e seu núcleo mostraram atividade anti-estresse significativa quando administrada oralmente em uma dose de 300mg/kg (KANNUR, *et al.*, 2006); atividade anti-helmíntica, onde um estudo realizado demonstrou que as sementes de *Caesalpinia crista* (L.) (Fabaceae) apresentaram atividade contra *Haemonchus contortus* maduros e seus ovos no ensaio de motilidade adulta e teste de eclosão de larvas, respectivamente; atividade antipirética, onde o extrato de flores de *Caesalpinia bonducella* foi administrado oralmente (30, 100 e 300 mg/kg) e reduziu a piroxia em camundongos adultos (DEVI, *et al.*, 2008). Outro estudo mostra que o óleo das sementes de *Caesalpinia bonducella* apresenta atividade antipirética ao ser comparada com o padrão paracetamol no teste de piroxia induzido por levedura de cerveja em ratos (SHUKLA, *et al.*, 2010); é relatado também a atividade imunossupressora, onde estudos demonstram efeitos da brasileína em linfócitos de camundongos com coração transplantado (DU, *et al.*, 2006); além destas contribuições citadas, existem muitas outras, evidenciando a importância bio-farmacológica do gênero *Caesalpinia*.

## 2.2 ANTIOXIDANTES NATURAIS:

A oxidação é essencial para muitos organismos vivos, para a produção de energia e para processos biológicos, por exemplo. Entretanto, o papel dos radicais de oxigênio implica em diversas doenças, incluindo câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, envelhecimento, dentre outras (ARIF, *et al.*, 2009).

Radicais livres são espécies produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (BAE, *et al.*, 1999).

Os antioxidantes são substâncias vitais que possuem a função de proteger o organismo de danos causados pelo estresse induzido por radicais (ZHANG, *et al.*, 2008). Para tanto, há um aumento no interesse em antioxidantes naturais, isto é, compostos fenólicos, presentes em plantas medicinais e da própria dieta, que ajudam a prevenir tais danos (RAO, *et al.*, 2008).

Compostos naturais, como os polifenóis, possuem estrutura química ideal para sequestrar radicais livres, e muitos destes compostos têm-se mostrado mais efetivos antioxidantes *in vitro* que tocoferol e ácido ascórbico. As propriedades antioxidantes dos polifenóis surgem de sua alta reatividade e de agirem como doadores de elétrons, capacidade de estabilizar espécies deficientes em elétrons (radicais livres) por deslocalizar o elétron desemparelhado, e de sua capacidade de quelatar íons de metais de transição (PAWAR, 2009).

O corpo humano possui múltiplos mecanismos antioxidantes especialmente sistemas enzimáticos e não enzimáticos que protegem as células contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). Entretanto, a defesa natural pode não ser suficiente para vários outros mecanismos de oxidação. Portanto, certa quantidade de antioxidante adquirida exógenamente é constantemente requerida para a manutenção do nível adequado de antioxidantes para o equilíbrio entre estas espécies e ERO. Muitos antioxidantes sintéticos, tais como, 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) e Butil-hidroxi Tolueno (BHT) são eficazes

e muito utilizados apenas em processos industriais por possuírem alguns efeitos colaterais tóxicos para a saúde humana (MURUGANANTHAM, *et al.*, 2010).

Entretanto, compostos especialmente de fontes naturais que são capazes de proteger o organismo contra ERO podem ter aplicação potencial na prevenção e/ou ocorrência de algumas doenças (SHUKLA, *et al.*, 2009).

### 2.3 ANTIMICROBIANOS:

Os microrganismos são os menores seres vivos existentes, encontrando-se em uma vasta diversidade de ambientes e desempenhando importantes papéis na natureza. Este grupo caracteriza-se por ser completamente heterogêneo, tendo com única característica comum o pequeno tamanho dos organismos.

Acredita-se que cerca de metade da biomassa do planeta seja constituída pelos microrganismos, sendo os 50% restantes distribuídos entre plantas (35%) e animais (15%).

Em termos de habitat, os microrganismos são encontrados em quase todos os ambientes, tanto na superfície, como no mar e subsolo. Em ambientes de elevadas temperaturas, em regiões polares, com temperaturas inferiores a  $-10^{\circ}\text{C}$ ; em ambientes extremamente ácidos ( $\text{pH}=1$ ) ou básicos ( $\text{pH}=13$ ). Alguns sobrevivem em ambientes extremamente pobres em nutrientes, assemelhando-se à água destilada. Em termos metabólicos, temos também os mais variados tipos, desde aqueles com vias metabólicas semelhantes à de eucariotos superiores, até outros que são capazes de produzir ácido sulfúrico, ou aqueles capazes de degradar compostos pouco usuais como cânfora, herbicidas, petróleo, etc.

Uma vez que os microrganismos precederam o homem em bilhões de anos, há evolução mútua. Portanto, é comum a associação homem-microrganismo em complexidade, com os microrganismos habitando nosso organismo, em locais tais como a pele, intestino, cavidade oral, nariz, ouvidos e trato urinário. Embora a maioria destes microrganismos não seja danosa, compondo a denominada “microbiota normal”, algumas vezes estes podem originar uma série de doenças, com maior ou menor gravidade. Nesta classe de organismos estão aqueles denominados patogênicos e potencialmente patogênicos (TORTORA, 2005; TORSVLK, 2002).

Embora a minoria dos micro-organismos seja patogênica, milhares de pessoas morreram em epidemias devastadoras, cujas causas eram desconhecidas. Até o descobrimento de agentes antibióticos. Os antibióticos desenvolveram-se extraordinariamente desde o reconhecimento das propriedades antibacterianas da

penicilina-G, em 1932. Esta classe terapêutica representou significativo avanço na medicina e deveu-se a Alexander Fleming que, em 1928, detectou a inibição do crescimento de placas de cultura semeadas com colônias de estafilococos contaminadas com fungos, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium chrysogenum* (BOLZANI, *et al.*, 2006).

Com o grande número de pesquisas e substâncias aprovadas para uso humano com fim antibiótico, nota-se que nas últimas décadas o aumento no uso irracional de antimicrobianos é gritante, o que acarreta o surgimento de cepas de micro-organismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para descoberta de novos agentes antibióticos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL, *et al.*, 2002; SOUZA, *et al.*, 2003). Os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos naturais disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais e, esta porcentagem pode chegar a aproximadamente 70% (PHILLIPSON, 2000; YUNES E CALIXTO, 2001).

O número de antibióticos aprovados do ano de 1983 até o ano de 2007 vem diminuindo, os novos antibióticos do mercado são uma variação estrutural de seus originais, o que releva ainda mais a busca por novos agentes com capacidade antimicrobiana (DEMAIN, 2009).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que uma triagem fitoquímica promova o descobrimento de compostos que sejam ativos e possuam a capacidade de se tornarem novos antibióticos (AHMAD & BEG, 2001).

## 2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS:

A inflamação é uma resposta do organismo ao agente lesivo. Consiste na resposta orgânica mais precoce diante da lesão tissular ou infecção (KUMMER & COELHO, 2002). É um processo fisiológico que envolve a ação conjunta entre o sistema imunológico e o tecido lesado (TILLEY, *et al.*, 2001), e está associada a uma ação de defesa do organismo, tornando-se prejudicial quando inapropriadamente desenvolvida. Na maioria das vezes, quando os efeitos inflamatórios são evidenciados, são caracterizados como indesejáveis, pois causam desconforto e são desagradáveis, entretanto se apresentam essencialmente benéficos. A resposta inflamatória é um mecanismo que provoca alterações do sistema vascular, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo assim uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual. No entanto, a inflamação pode também produzir efeitos indesejáveis, tais como, efeitos incapacitantes da artrite reumatoide (ROCHA, 2006).

Embora os sinais de inflamação tenham sido descritos em papiros egípcios datados de 3000 a.C., somente no ano 30 d.C. Celsus descreveu os quatro sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, dor e edema (VANE E BOTTING, 1998).

O processo inflamatório pode ser iniciado por diversos motivos, tais como, agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo e traumas químicos, mecânicos ou térmicos. Caracteriza-se morfológicamente pela saída de fluidos e de células do sangue para o interstício (PEREIRA E BOGLIOLO, 1996), e macroscopicamente pode ser acompanhado por eritema e edema (CAMPBELL E HALUSHKA, 1996). A resposta imediata à lesão tissular implica em uma alteração vascular, aumentando o fluxo sanguíneo local e a permeabilidade microvascular, seguido por extravasamento de leucócitos e proteínas plasmáticas para o interstício e posterior migração leucocitária para o tecido (DI VAIO E FREITAS, 2001).

O processo inflamatório é complexo, com fases distintas: uma aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular, uma subaguda, caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocíticas, e uma fase proliferativa crônica, com degeneração tecidual e fibrose. Os “sinais clássicos” e as fases do processo são o resultado da ação de diversas substâncias, estando presentes aquelas derivadas da cascata do ácido araquidônico entre os principais mediadores da inflamação.

Os medicamentos anti-inflamatórios constituem um grupo heterogêneo de compostos que, na maioria dos casos, não estão relacionados quimicamente por suas estruturas químicas (embora a maioria deles seja de ácidos orgânicos), porém compartilham de algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Existem duas classes de compostos classificados como anti-inflamatórios, que são os esteroidais (corticosteroides) e os não esteroidais (AINEs), onde os primeiros apresentam o núcleo básico ciclopentanoperidrofenantreno característico e, os últimos, compreendem maior diversidade estrutural com atividades biológicas semelhantes.

Os corticosteroides são substâncias endógenas classificadas quimicamente como esteroides, e são produzidos no córtex da glândula adrenal, que são duas pequenas glândulas dispostas acima dos rins. A porção externa da glândula adrenal, o córtex adrenal, é essencial para a vida. Sua origem embriológica é completamente diferente daquela da medula adrenal. O córtex adrenal produz vários hormônios potentes, todos derivados esteroides.

Os hormônios esteroides são agrupados em 3 classes gerais, cada uma com funções características:

- Os glicocorticoides, que atuam primariamente no metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídios.
- Os mineralocorticoides, que atuam primariamente no transporte de eletrólitos e na distribuição de água nos tecidos.
- Os andrógenos ou estrógenos, que atuam primariamente sobre as características sexuais secundárias em seus órgãos alvos específicos.

Os anti-inflamatórios esteroidais apresentam relevantes efeitos adversos devido à ação comum aos esteroides. Já os recentes moduladores ou anti-citocinas (anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF- $\alpha$ .) são muito caros e a via de administração é subcutânea, e contínua, o que diminui a adesão ao tratamento (CALIXTO, *et al.*, 2004).

Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e

com efeitos adversos reduzidos, ou que ao menos possam auxiliar no entendimento de mecanismos de ação (PAULA, 2010).

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, também conhecidos como AINEs são um grupo heterogêneo de substâncias, que, diferentemente dos corticoides, não estão relacionados estruturalmente, entretanto, mostram efeitos terapêuticos comuns, como atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória. O fato primordial para serem tão diferentes e classificados em um mesmo grupo é porque atuam na biossíntese das prostaglandinas, agindo diretamente na inibição de enzimas da via cicloxigenase, mas não na via lipoxigenase.

Como um exemplo mundialmente conhecido e consagrado, a aspirina é o protótipo dos AINES. Com cerca de cem anos de existência, é o fármaco mais usado além de ser referência. Entretanto, cerca de 20% dos pacientes mostram intolerância à aspirina, levando a busca de novos agentes anti-inflamatórios que apresentem menos efeitos colaterais e maior eficácia, (HARVEY, *et al.*, 2000). Nesta perspectiva os produtos naturais são promissores para tal finalidade, uma vez que a própria aspirina foi descoberta através do composto ativo extraído das espécies vegetais como a Ulmária (*Spiraeaulmaria*), Salgueiro (*Salixalba*) e Murta (*Myrtus L.*), sendo a salicilina, em que sua atividade farmacológica era conhecida há milhares de anos a.C., onde escrituras de civilizações antigas indicam o uso de cascas de salgueiro na Mesopotâmia e folhas de murta no Egito como medicamentos (MYERS, 2007).

De forma geral, a atividade anti-inflamatória dos AINES tem mecanismo similar ao da aspirina, sendo mediada principalmente pela inibição da síntese das PGs. Em graus variáveis, todos os AINES são analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos; todos inibem a agregação plaquetária. Todos são também irritantes gástricos, embora componentes desse grupo tendam a causar menor irritação gástrica que a aspirina (NORTHEY, 1999).

Relacionando o processo inflamatório e a utilização de plantas medicinais, são generalizadas a utilização e aceitação destes pelo fato de inúmeros representantes do reino vegetal exibirem propriedades químicas auxiliares no tratamento das doenças inflamatórias (MARTINS, *et al.*, 2000).

Das várias aplicações terapêuticas dos vegetais, muitos apresentam atividade anti-inflamatória, sendo largamente utilizados na medicina popular e por isso, há necessidade de pesquisas e estudos para comprovar tanto essas atividades, quanto um possível quadro tóxico, em ensaios biológicos (SILVA, 1978).

## 2.5 ANALGÉSICOS:

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (em inglês, IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial, ou descrita em tais termos de lesão (IASP, 2009), como por exemplo, na cefaleia e na dor pélvica crônica, onde parece ocorrer sem lesão tissular detectável pelos métodos diagnósticos disponíveis na prática clínica atual, favorecendo a hipótese de que pode haver alterações neurofuncionais restritas ao âmbito biomolecular, cuja interação é pouco conhecida entre neuromediadores, neurotransmissores e transdutores de sinais, em uma rede de bilhões de sinapses, dificultando a compreensão da etiologia da dor (ROCHA, *et al.*, 2007).

Por outro lado, o trauma e a estimulação do sistema nervoso periférico ou central também podem alterar as respostas imunes. Como consequência, observa-se a ativação de peptídios e receptores, com posterior transdução do sinal para o meio intracelular. Neste contexto, o avanço no conhecimento da neuroanatomia das vias de condução, da neurofarmacologia e da fisiopatologia da dor facilita o desenvolvimento de pesquisas visando novas modalidades de tratamento. Assim, a analgesia efetiva para as síndromes dolorosas ainda é um grande desafio (ROCHA, *et al.*, 2007).

Há um sistema específico de dor, o qual transfere informações sobre a lesão tecidual para o cérebro. A informação nociceptiva é traduzida em sinais eletrofisiológicos que são transmitidos por aparatos perceptivos. Esta transmissão é mediada por diversos mecanismos, incluindo sensibilização periférica (primária) e central (secundária) (FARQUHAR-SMITH, 2007).

O estímulo doloroso é propagado através das fibras aferentes primárias C ou A $\delta$  onde se encontram os nociceptores que são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados. Isso facilita a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algioênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina (ACh), histamina, bradicinina, leucotrieno (LT), substância P (SP), fator de ativação de plaquetas (PAF), radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas

(PGs), tromboxanos (TX), interleucinas (ILs) e o fator de crescimento do nervo (NGF) (KRAYCHETE, *et al.*, 2006).

O desenvolvimento científico atual é rápido, ocasionando o aperfeiçoamento de métodos utilizados e a criação de novos métodos. Existem vários métodos para a medida de dor e seu alívio em animais de laboratório. A maioria dos testes realizados se baseia na indução da dor através de estímulo doloroso que resulta em uma resposta mensurável quantitativamente, com valores diretamente proporcionais à intensidade da dor, que com a introdução de substância é diminuída (analgésico) ou aumentada (algogênico ou hiperalgésico). O método químico mais utilizado é o teste da formalina e de contorções (LAPA, *et al.*, 2008).

Os animais submetidos a um estímulo nociceptivo são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Por isso, utiliza-se o termo resposta nociceptiva. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica (PERAZZO, *et al.*, 2007).

Para avaliação farmacológica usam-se drogas como morfina e/ou analgésicos e/ou anti-inflamatórios não-esteroidais – AINES como controle, assim como as doses do extrato de plantas testadas devem ser administradas de 30 minutos à 1 hora antes do estímulo nociceptivo, quando por via oral ou intraperitoneal, respectivamente (PERAZZO, *et al.*, 2007).

Existem diversos testes para avaliar a nocicepção em animais. O teste da formalina é utilizado para avaliar a atividade analgésica de substâncias por meio da injeção intraplantar de formalina na pata traseira de camundongos e ratos (HUNSKAAR & HOLE, 1987). É um modelo bifásico, sendo que a primeira fase, que se desenvolve até 5 minutos após a injeção da formalina, tem um caráter neurogênico e é sensível a analgésicos opioides. A segunda fase inicia-se 15 a 20 min após a injeção de formalina e atinge valores máximos 30 a 45 min após, é de origem inflamatória e sensível a analgésicos não-esteroidais (TJOLSEN, *et al.*, 1992). O índice de nocicepção é avaliado pelo tempo que o animal permanece lambendo, mordendo ou sacudindo a pata injetada.

A utilização de testes preliminares não possibilita a elucidação do mecanismo definitivo do extrato de plantas ou de uma substância testada, porém, a vantagem é que representam um passo importante para caracterização farmacológica de novas drogas capazes de interagir com mediadores da dor e/ou da inflamação (PERAZZO, *et al.*, 2007).

## 2.6 A ESPÉCIE:

### 2.6.1 TAXONOMIA E NOMENCLATURA:

De acordo com o sistema de classificação baseado no The Angiosperm Phylogeny Group (APG) II (2003), a posição taxonômica de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Figura 4) obedece à seguinte hierarquia:

- Divisão: Angiospermae
- Clado: Eurosídeas I
- Ordem: Fabales [em Cronquist (1981), é classificada em Rosales]
- Família: Fabaceae [em Cronquist (1981), é classificada em Leguminosae]
- Subfamília: Caesalpinioideae
- Gênero: *Caesalpinia*
- Espécie: *Caesalpinia pluviosa* DC. var. *peltophoroides* (Benth.) G. P. Lewis
- Publicação: in Martius, Flora Brasiliensis 15 (2):72. 1870.
- Sinonímia botânica: *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

A espécie apresenta nomes vulgares aplicados por Unidades da Federação: na Bahia, mucitaiba-verdadeira; em Minas Gerais, coração-de-negro, falso-pau-brasil e sibipiruna; na Paraíba, coração-de-negro; em Pernambuco, maria-preta, e em São Paulo, pau-brasil-do-amarelo.

Etimologia: o nome genérico *Caesalpinia* é atribuído por Linnaeus, uma homenagem ao célebre médico e botânico italiano Andrea Caesalpinio (1519-1603).

Em tupi-guarani, o termo çapo-piruna (sibipiruna) significa “raiz de casca preta” (Embrapa Florestas).

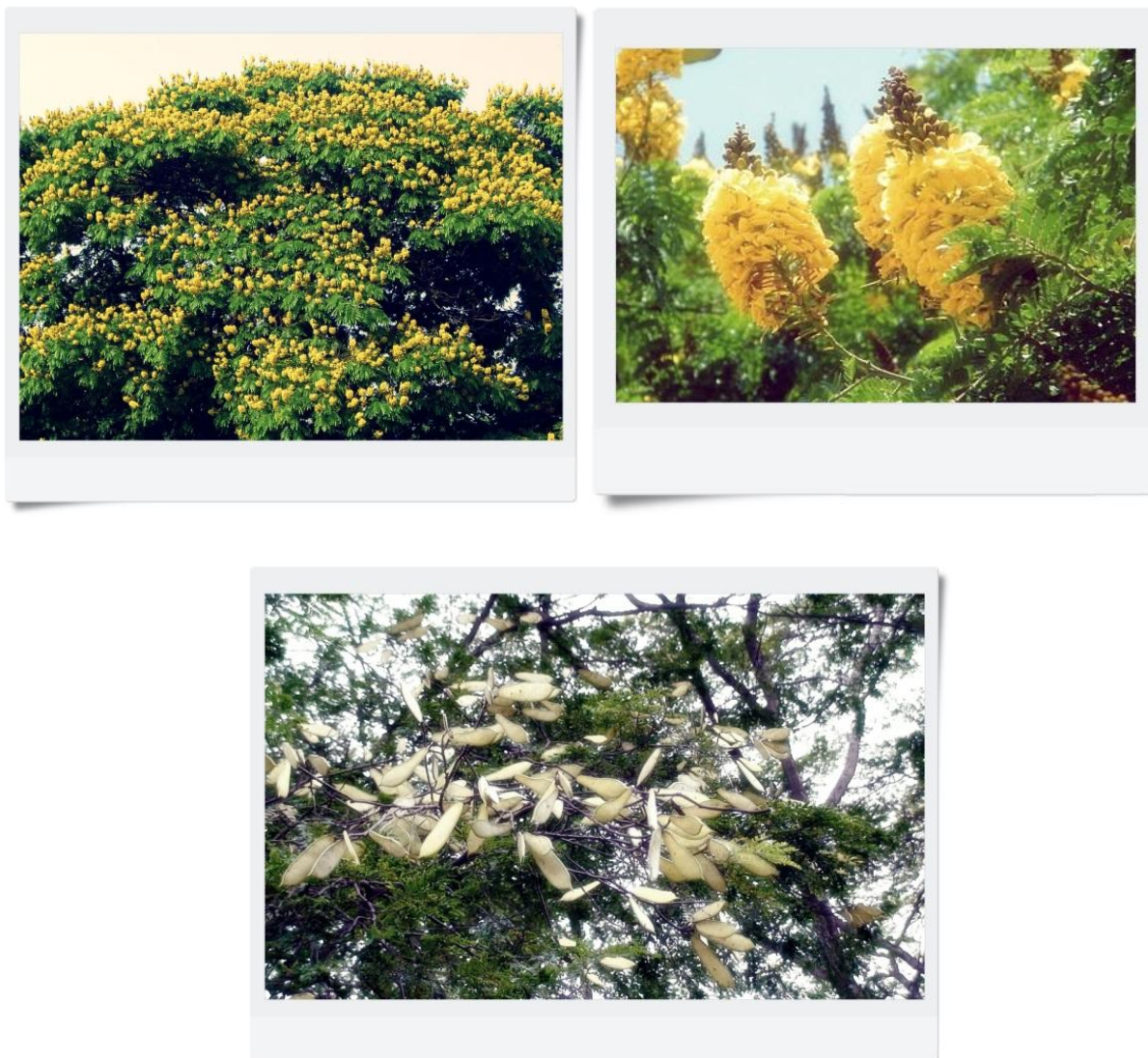


FIGURA 4 - Esquerda - Sibipiruna em fase de floração; Direita - Cachos de flores; Abaixo – Frutos de Sibipiruna.

### **2.6.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA:**

Forma biológica: árvore perenifólia. As árvores maiores atingem dimensões próximas a 28m de altura e 50cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30m do solo), na idade adulta.

Tronco: é mais ou menos reto. O fuste mede até 7 m de comprimento.

Ramificação: é cimosa ou dicotômica. A copa é arredondada, moderadamente ampla, de até 6 m de diâmetro com um verde colorido muito vistoso. Na época da brotação, sua folhagem é vermelho-bronzeada.

Casca: mede até 5mm de espessura. A casca externa ou ritidoma é áspera, cinzenta, fissurada e com marcas horizontais, resultantes das lenticelas. A casca interna é amarelo-clara.

Folhas: são bipinadas, imparipinadas, alternas, sem estípulas, com 8 a 9 pares de pinas e uma solitária, no ápice; o pecíolo mede de 2 cm a 10 cm de comprimento; cada pina com 11 a 13 pares de folíolos alternos, pequenos, falciformes ou rômnicos, quase glabros, com a base assimétrica.

Inflorescências: reunidas em inflorescências eretas, voltadas para o alto, em ráceros densos, terminais, cônicos, articuladas acima do meio do pedicelo longo, conferindo-lhe um aspecto de singular beleza.

Flores: são hermafroditas, abundantes e amarelas.

Fruto: é um legume lenhoso, plano, duro, deiscente, oblíquo, oblongo-lanceolado ou falcado, comprimido, seco liso, coriáceo, bivalvo com as valvas torcidas após a abertura, com deiscência explosiva, medindo de 7,6cm a 12,0cm de comprimento por 2,7cm a 3,1cm de largura, com um sulco em cada sutura e uma a cinco sementes.

Semente: é comprimida, irregularmente circular, transversa, ovato-obovada ou orbicular a subglobosa, com testa dura e muito rígida, clara, grossa ou sem albúmen, provida de um bico no hilo e marginada (como no pau-brasil – *Caesalpinia echinata*) (EMBRAPA FLORESTAS).

### **2.6.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA E EVENTOS FENOLÓGICOS:**

Sistema sexual: *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* é uma espécie hermafrodita, tendo como polinizadores essencialmente, diversas espécies de abelhas.

Floração: de agosto a setembro, no Distrito Federal; de agosto a novembro, em Minas Gerais; de agosto a janeiro, no Estado de São Paulo; de setembro a novembro, no Paraná; de setembro a dezembro, no Estado do Rio de Janeiro, e de dezembro a janeiro, em Pernambuco.

Frutificação: os frutos amadurecem de abril a julho, em Pernambuco de abril a agosto, no Estado de São Paulo; de abril a outubro, no Estado do Rio de Janeiro; de junho a outubro, em Minas Gerais; em julho, no Distrito Federal; e de outubro a novembro, no Rio Grande do Sul (Embrapa Florestas).

#### 2.6.4 OCORRÊNCIA NATURAL:

Latitudes: de 4º 15' S, no Ceará a 22º 55' S, no Estado do Rio de Janeiro.

Variação altitudinal: 50m, na Bahia, até 1.000m de altitude, em Pernambuco.

Distribuição geográfica: *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* ocorre de forma natural no Brasil, nas seguintes Unidades da Federação: Alagoas; Bahia; Ceará; Espírito Santo; Mato Grosso; Minas Gerais; Paraíba; Pernambuco; Piauí; Rio de Janeiro (Embrapa Florestas).



FIGURA 5 - Ocorrência natural da espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no Brasil (Fonte: Embrapa Florestas).

### 3 JUSTIFICATIVA:

Dentre as várias espécies de plantas empregadas na medicina, seja tradicional ou científica, o gênero *Caesalpinia* spp. que contem mais de 500 espécies (Trópicos, acesso em 12/2011), tem importantes funções, relatadas na literatura por pesquisas ao redor do mundo.

O gênero *Caesalpinia* tem, até a data presente, cerca de 30 espécies estudadas, o que é precário devido à quantidade de espécies catalogadas e as atividades demonstradas pelas espécies que já foram sistematizadas com dados de pesquisas ao redor do mundo.

Dentre os vários representantes do gênero, a *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, escolhida para o estudo a ser sistematizado neste trabalho, será testada quando as propriedades farmacológicas de seus constituintes químicos (substâncias isoladas) e extratos (matriz orgânica), proporcionando importantes informações sobre a espécie.

Na literatura existem relatos escassos sobre informações de sua utilização tradicional, e não há relatos quando se trata de dados científicos em bases de pesquisa sobre estudos de suas atividades farmacológicas. Onde apenas uma exceção é dada aos estudos preliminares a fim de conhecer a ação moluscicida dos extratos de diversas plantas, e dentre elas a *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (MENDES, *et al.*, 1984).

O trabalho realizado conta com a não degradação ou extinção dos exemplares da espécie, uma vez que todas as partes trabalhadas da planta são naturalmente renováveis, tais como folhas, flores e frutos além da casca do caule. Ao final da coleta, os exemplares da espécie que forneceram material vegetal não são depredados e/ou danificados.

O conhecimento das atividades farmacológicas abordadas na literatura, associadas aos representantes do gênero, e o estudo químico de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, tem como justificativa principal a contribuição para a busca de moléculas detentoras de ação medicinal e aplicabilidade, podendo fornecer resultados importantes para o uso e descoberta de substâncias promissoras para tornarem-se fármacos. O que é de imensurável importância, pois a busca pode resultar em medicamentos mais eficazes, com

menos efeitos indesejáveis. Além da vertente básica de tentar erradicar enfermidades que acercam a humanidade.

Outro fato importante, como já citado, é que na literatura especializada, não há relatos sobre a atividade anti-inflamatória, antioxidante, analgésica ou antimicrobiana dos constituintes da espécie e, tão pouco, compostos isolados.

#### 4 OBJETIVOS:

A proposta do trabalho realizado permeou o estudo fitoquímico dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, e a aplicação em testes a fim de consolidar o conhecimento do gênero e da espécie, contribuindo para o conhecimento das atividades apresentadas no gênero *Caesalpinia* e seu estudo quimiotaxonômico.

Os procedimentos organizados, que compõem os objetivos, são listados abaixo:

1. Obter extratos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* coletadas no *campus* da Unifal-MG;
2. Isolar e identificar estruturas moleculares dos constituintes químicos bioativos presentes nos extratos da planta em estudo, através de métodos cromatográficos e espectroscópicos usuais (RMN, IV, EM);
3. Avaliar o potencial da atividade anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e antioxidante dos extratos e substâncias isoladas da planta estudada;

## 5 MÉTODOS FITOQUÍMICOS EMPREGADOS:

### 5.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL:

O preparo do material vegetal proveniente do Caule, Folhas, Flores e Frutos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, seguiram algumas etapas adotadas para a obtenção do extrato bruto e suas respectivas partições, que possibilitaram a sistematização do trabalho.

#### 5.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO:

No campus universitário da Universidade Federal de Alfenas, na cidade de Alfenas – MG existem diversos exemplares da espécie. O material vegetal de todas as partes trabalhadas da planta foi coletado em novembro de 2009 e armazenado para secagem; Com coletas subsequentes nos anos de 2010 e 2011.

As coordenadas geográficas do campus onde o material vegetal de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foi coletado são: Latitude: 21° 25' 45" Sul e Longitude: 45° 56' 50" Oeste. A identificação botânica foi realizada na Universidade Federal de Alfenas pelo Professor Dr. Marcelo Polo (Instituto de Ciências da Natureza). E a espécie foi catalogada numa exsicata sob o número **UALF-1634** e depositada no herbário Universidade Federal de Alfenas.

#### 5.1.2 SECAGEM:

O material vegetal de folhas e flores, após coleta, foi distribuído uniformemente em bandejas de alumínio da própria estufa. Após o acondicionamento do material vegetal, foi submetido ao processo de secagem para a retirada de água, o que possibilita um maior tempo de armazenamento, por evitar a proliferação de microrganismos que possam

degradar os constituintes existentes, corroborando ao erro de posterior análise. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar por 72 horas em temperatura padrão de 45°C;

#### *5.1.3 TRITURAÇÃO:*

Com o intuito do preparo do material vegetal para a retirada de seus constituintes químicos, realizou-se a trituração para que uma maior superfície de contato fosse criada para o arraste eficaz pelo solvente adotado. Para a trituração foi utilizado moinho de facas onde o maior tamanho de partículas foi de 3mm, de acordo com as especificações da peneira utilizada.

#### *5.1.4 PESAGEM:*

A fim de conhecer o rendimento de extrato a partir da massa de material vegetal, toda massa utilizada foi pesada para o posterior cálculo do rendimento;

#### *5.1.5 MACERAÇÃO:*

A maceração é, dentre outros, um procedimento utilizado para retirar os constituintes químicos existentes em plantas para estudos fitoquímicos. A técnica adotada faz utilização de EtOH para a solubilização das substâncias presentes. O EtOH possui vasta afinidade e consegue arrastar inúmeras classes de compostos, formando solução. Foram realizadas quatro macerações, adotadas como padrão, para os constituintes. A solução constituintes/etanol foi concentrada em rota-evaporador, originando o extrato bruto etanólico (E.B.E.) de Caule, Flores, Folhas e Frutos. O processo detalhado está descrito na tabela 1:

TABELA 1 - Detalhamento do processo de maceração e da obtenção do extrato bruto dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*

Maceração de	Massa Bruta (g)	Vol. Etanol (mL)	Início	Fim
<b>Caule</b>	3000	4350	01/08/2011	06/08/2011
<b>Flores</b>	4692,3	10830	01/03/2010	07/04/2010
<b>Folhas</b>	3184,1	7500	01/03/2010	29/03/2010
<b>Frutos</b>	1285	1900	29/03/2010	08/04/2010

#### 5.1.6 PARTICIONAMENTO:

Tem como função iniciar o trabalho de isolamento dos constituintes químicos e avaliar atividades farmacológicas para os extratos e de suas partições de forma preliminar. O particionamento é importante para separar substâncias de mesma polaridade que os solventes utilizados. Para trabalhar com os extratos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* todos foram particionados. Os solventes adotados foram Hexano, Acetato de Etila e Etanol, como procedimento padrão.

##### 5.1.6.1 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, ACETATO ETÍLICA E HIDRO-ALCOÓLICA (PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO):

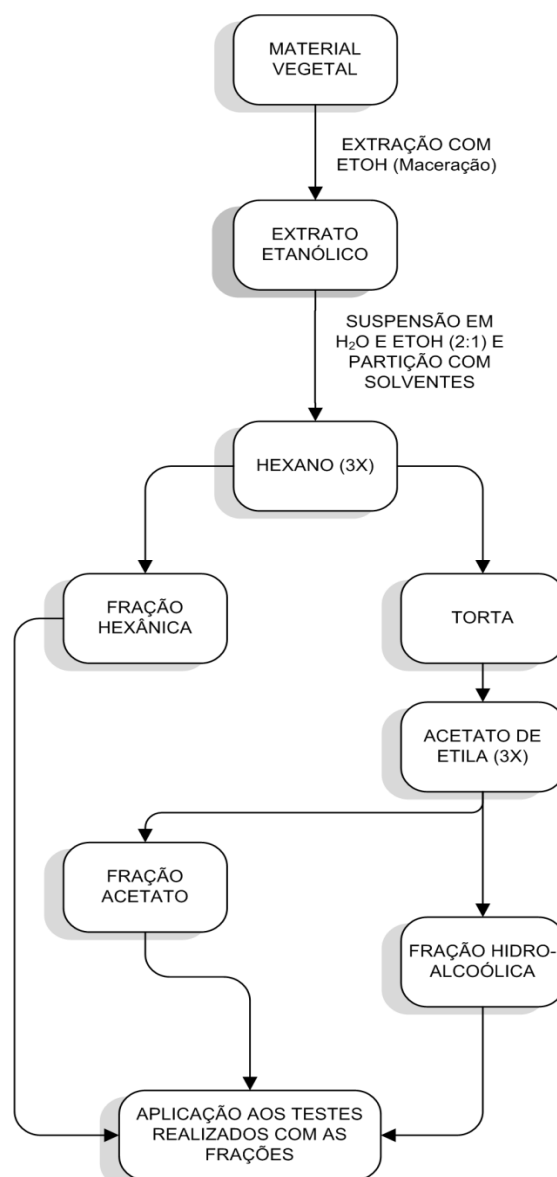
Para a realização da partição líquido-líquido, o extrato bruto etanólico dos constituintes botânicos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foi suspenso em solução EtOH/H<sub>2</sub>O (1:2) e transferido para um funil de separação com capacidade adequada para a realização da técnica. Após a suspensão do extrato em EtOH/H<sub>2</sub>O foram adicionados:

- a) Hexano (3X), para a retirada de compostos apolares, característicos dessa fase;
- b) Acetato de Etila (3X), para a retirada de compostos que possuam polaridade intermediária;
- c) Concentração da torta remanescente (EtOH/H<sub>2</sub>O), onde compostos de elevada polaridade estarão presentes.

O método de particionamento (partição líquido-líquido) é adotado para facilitar o isolamento dos constituintes químicos de extratos de plantas, arrastando-os de acordo com sua afinidade ao solvente trabalhado. A Figura 6 mostra o esquema adotado para o particionamento.

Os volumes padrões de solventes utilizados foram de EtOH:H<sub>2</sub>O (250:500mL), Hexano (400mL) e Acetato de Etila (400mL), em cada uma das 3 repetições, visando o esgotamento das substâncias presentes na fase, que apresentem afinidade ao sistema de partição. Estes valores correspondem a uma partição realizada com 100g de material vegetal. Para maiores valores ou menores valores, o volume aplicado foi proporcional.

Cada extrato bruto proporcionou três partições que foram codificadas como mostrado na Tabela 2:



**FIGURA 6 - Esquema de obtenção das partições a)Hexano; b)Acetato e c)Hidro-Alcoólica dos extratos brutos etanólicos dos constituintes botânicos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.**

TABELA 2 - Codificação para os constituintes botânicos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.

	FRAÇÃO	CÓDIGO	SIGNIFICADO DOS CÓDIGOS
<b>CAULE</b>	HEXANO	ECFHex	EXTRATO DO CAULE – F. HEXÂNICA
	ACETATO	ECFAc	EXTRATO DO CAULE – F. ACETATO
	HIDROALCOÓLICA	ECFET	EXTRATO DO CAULE – F. HIDROALCOÓLICA
<b>FLORES</b>	HEXANO	EFLFHex	EXTRATO DAS FLORES – F. HEXÂNICA
	ACETATO	EFLFAc	EXTRATO DAS FLORES – F. ACETATO
	HIDROALCOÓLICA	EFLFET	EXTRATO DAS FLORES – F. HIDROALCOÓLICA
<b>FOLHAS</b>	HEXANO	EFOFHex	EXTRATO DAS FOLHAS – F. HEXÂNICA
	ACETATO	EFOFAc	EXTRATO DAS FOLHAS – F. ACETATO
	HIDROALCOÓLICA	EFOFET	EXTRATO DAS FOLHAS – F. HIDROALCOÓLICA
<b>FRUTOS</b>	HEXANO	EFTFHex	EXTRATO DOS FRUTOS – F. HEXÂNICA
	ACETATO	EFTFAc	EXTRATO DOS FRUTOS – F. ACETATO
	HIDROALCOÓLICA	EFTFET	EXTRATO DOS FRUTOS – F. HIDROALCOÓLICA

### 5.1.7 PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO:

A liofilização é largamente aplicada ao tratamento de extratos de plantas. É um processo que retira a água do produto congelado, seja extrato ou substância, por sublimação. Como a maioria dos extratos de plantas possui substâncias que podem ser degradadas ou convertidas pela ação de temperatura elevada, a retirada de solventes e água em processos que são dependentes diretos de temperatura não é apropriado, uma vez que a análise de constituintes químicos pode ser prejudicada, por não se ter conhecimento das propriedades físicas e químicas dos compostos presentes na matriz vegetal. Para a obtenção das partições oriundas dos extratos brutos, o processo de liofilização foi realizado no liofilizador L101 da Liotop durante 72h a uma temperatura média de  $-50^{\circ}\text{C}$  e a uma pressão média de  $340\mu\text{Hg}$ .

## 5.2 MASSA DE MATERIAL VEGETAL TRABALHADO E RENDIMENTO DE PARTIÇÕES:

Os constituintes botânicos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, coletados no campus da Universidade Federal de Alfenas, foram submetidos à maceração em EtOH. As massas referentes aos extratos brutos etanólico obtidos de caule, flores, folhas e frutos estão representados nas tabelas abaixo:

### 5.2.1 RENDIMENTO PARA EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS:

TABELA 3 - Rendimento para extratos brutos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*

CONSTITUINTE	MATERIAL VEGETAL (kg)	E.B.E (g)	RENDIMENTO (%)
CAULE	3,0	100	3,33
FLORES	4,7	251,59	5,35
FOLHAS	3,2	149,1	4,65
FRUTOS	1,3	27,7	2,13

### 5.2.2 RENDIMENTO PARA PARTIÇÕES:

TABELA 4 - Rendimento para partições obtidas das partições de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*

CONSTITUINTE	E.B.E.	PARTIÇÕES (g)	RENDIMENTO (%)
CAULE	13,1g		
HEXÂNICA		2,8	21,4
ACETATO		2,2	16,8
HIDRO ALCOÓLICA		8,1	61,8
FLORES	105g		
HEXÂNICA		45,6	43,4
ACETATO		23,2	22,1
HIDROALCOÓLICA		36,2	34,5
FOLHAS	65,6g		
HEXÂNICA		17	25,9
ACETATO		20,7	31,6
HIDRO ALCOÓLICA		27,9	42,5
FRUTOS	15,6g		
HEXÂNICA		2,9	18,6
ACETATO		8,6	55,1
HIDRO ALCOÓLICA		4,1	26,3

### **5.3 CROMATOGRAFIA:**

#### **5.3.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC):**

Utilizou-se sílica Gel 60 - 70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 3m) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 3m) ASTM da Macherey-Nagel. As especificações da coluna seguem na realização dos experimentos, sendo diferentes para cada caso.

Utilizou-se Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich para a purificação dos compostos isolados.

#### **5.3.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD):**

Para a realização de CCD, foram utilizadas placas de vidro com 0,25 mm de sílica gel 60 G Merck, com indicador de fluorescência UV-254. O Agrupamento das frações obtidas foi realizado de acordo com o padrão de eluição de cada fração recolhida no procedimento de cromatografia em coluna, após a utilização de reveladores específicos.

#### **5.3.3 SOLVENTES PARA ELUIÇÃO:**

Para a eluição, tanto em cromatografia em coluna, quanto em cromatografia em camada delgada, com sílica, foram utilizados os solventes Hexano (puro), Hexano/Acetato de Etila (mistura), Acetato de Etila (puro), Acetato de Etila/Metanol (mistura). As proporções de cada coluna são explícitas em cada experimento separadamente.

Para a eluição em Sephadex, utilizou-se apenas Metanol em todos os casos.

**5.3.4 REVELADORES:**

Como reveladores foram utilizados luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  ou  $365$  nm); Vanilina sulfúrica: solução 1:1 (v/v) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido sulfúrico a 3% (v/v) em água destilada, borrifada na superfície da placa cromatográfica após a eluição e submetida a aquecimento.

## 6 ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA 1:

Uma fração com massa de 8 gramas da partição acetato de etila do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (ECFAc), devidamente liofilizada, foi submetida ao processo de cromatografia em coluna para a separação dos seus constituintes. O procedimento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analisada em câmara de UV de  $\lambda = 254$  e 365nm para o agrupamento das frações obtidas. Todas as frações foram concentradas em evaporador rotativo com pressão reduzida e temperatura de 50°C. As especificações de cada processo estão detalhadas abaixo.

### 6.1 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophodoires* (CECFAC):

#### Especificações da Coluna e Dados Gerais:

- Massa de Amostra: 8g
- Sílica Gel: 135,5g
- Diâmetro da Coluna: 11,5cm
- Altura de Sílica: 27cm
- Início: Hexano 100%
- Frações: 250mL

#### Estratégia Adotada:

- Solventes e proporções:
- Hexano 100%
- Hexano/Acetato – 1:1
- Acetato 100%
- Acetato/Metanol – 9,5:0,5
- Metanol 100%

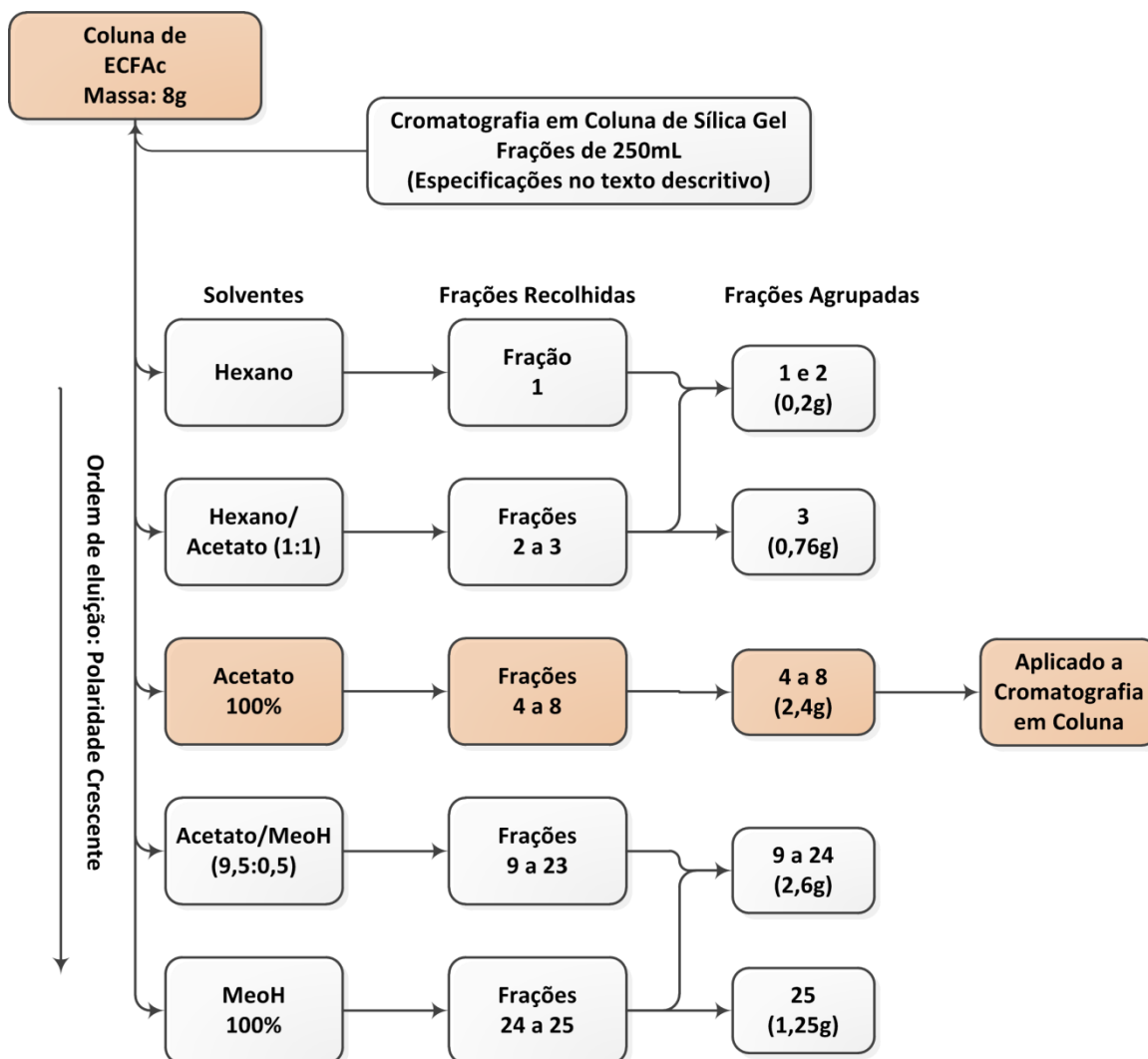


FIGURA 7 - Fluxograma demonstrando (1) as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac), com os solventes adotados e suas proporções; (2) o agrupamento das frações por meio de análise em cromatografia em camada delgada; ressaltando a origem do composto isolado.

## **6.2 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE – FRAÇÃO 4 A 8 DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophodoires* (CECFac 4-8):**

A partir da massa de 2,4g obtida da coluna anterior, foi feita uma nova coluna para a separação dos constituintes dessa fração. Uma vez que se mostraram mais concentrados em relação aos outros quando analisados em cromatografia em camada delgada com os reveladores adotados.

### **Especificações da Coluna e Dados Gerais:**

- Massa de Amostra: 2,4g
- Sílica Gel: 80,1g
- Diâmetro da Coluna: 9,5cm
- Altura de Sílica: 26cm
- Início: Hexano/Acetato (1:1)
- Frações: 50mL

### **Estratégia Adotada:**

- Solventes e proporções:
- Hexano 100%
- Hexano/Acetato – 1:1
- Acetato 100%
- Acetato/Metanol – 9,5:0,5
- Metanol 100%

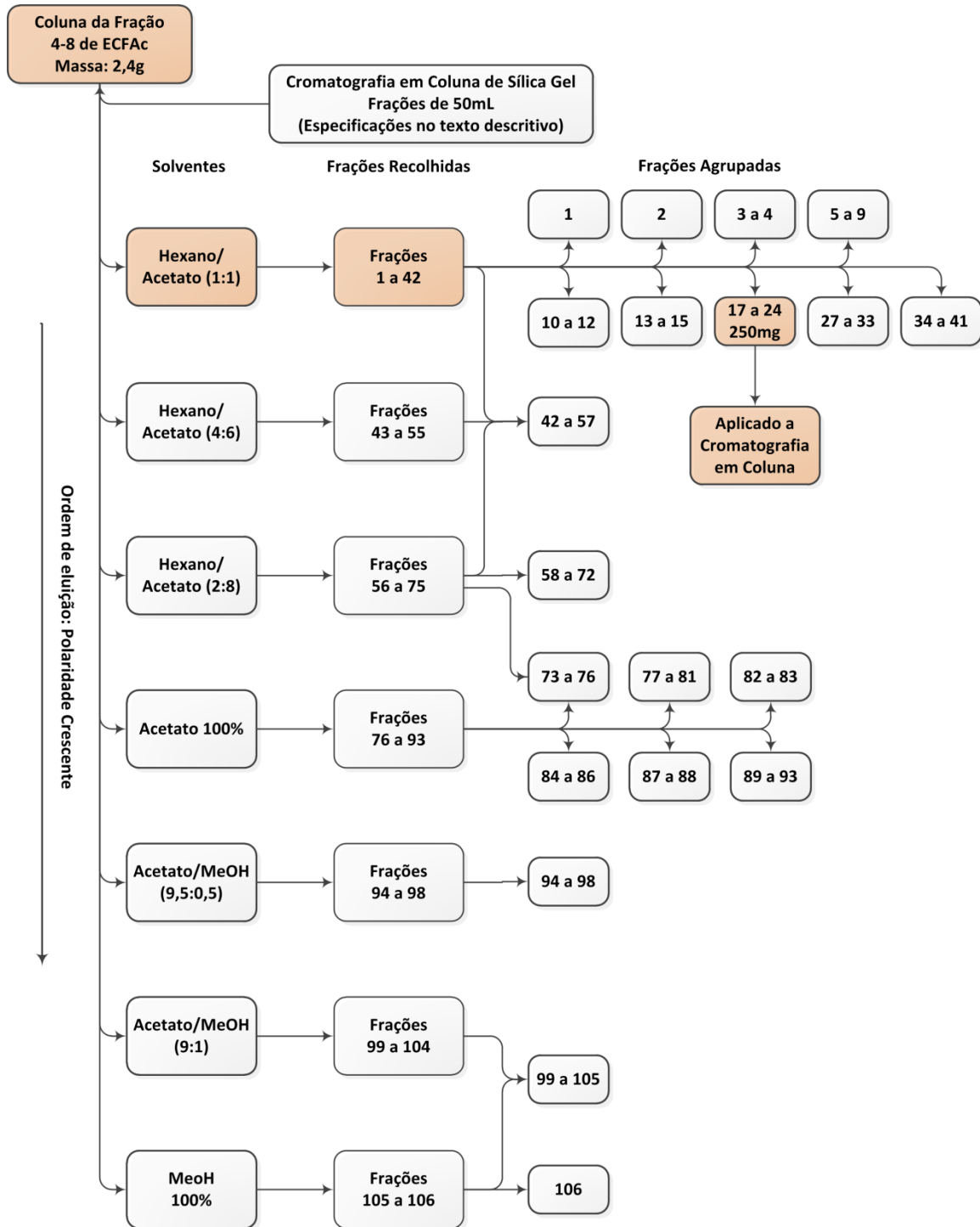


FIGURA 8 - Fluxograma demonstrando (1) as etapas do processo de cromatografia em coluna para a fração acetato proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac 4-8), com os solventes adotados e suas proporções; (2) o agrupamento das frações por meio de análise em cromatografia em camada delgada; ressaltando a origem do composto isolado.

### 6.3 COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE – FRAÇÃO 4 A 8 – SUBFRAÇÃO 17 A 24 DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophodoires* (CECFac 4-8:17-24):

Para a purificação dos constituintes isolados da fração anterior, a massa de 250mg da fração CECFac 4-8:17-24 foi submetida ao processo de cromatografia em coluna em Sephadex, uma vez que a separação pela linha elutropica não se mostrou eficaz.

#### Especificações da Coluna e Dados Gerais:

- Massa de Amostra: 250mg
- Sephadex: 100g
- Diâmetro da Coluna: 9,5cm
- Altura de Sephadex: 32cm
- Solvente: Metanol
- Frações: 12mL

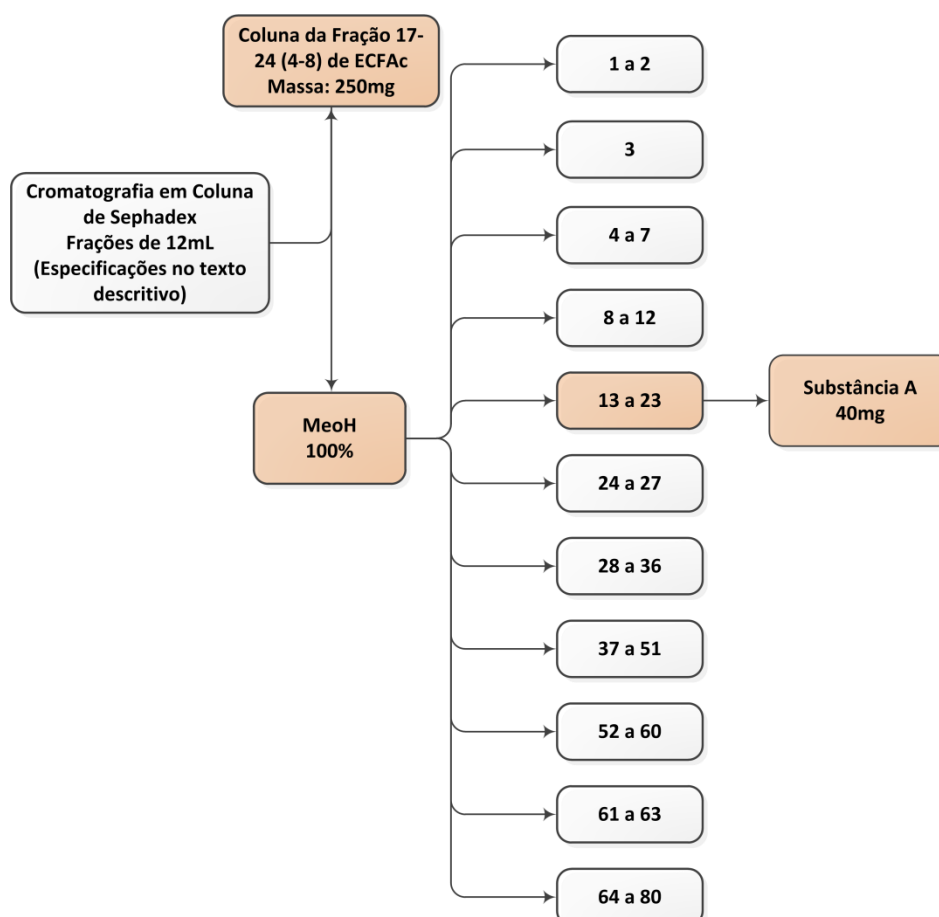


FIGURA 9 - Fluxograma demonstrando a obtenção da substância A proveniente do extrato bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (CECFac 4-8:17-24) em Sephadex.

## 6.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1:

A fração 13-23-SPD, proveniente da fração acetado de etila do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* após ser tratada com Sephadex forneceu um sólido amarelo escuro (40 mg e cerca de 0,5% de rendimento) aparentemente pura em cromatografia em camada delgada, a qual foi submetida aos experimentos espectroscópicos para a elucidação estrutural.

### 6.4.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS:

A substância 1 (fração 13-23-SPD) apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em solventes orgânicos polares como Acetato de Etila e Metanol. Apresentou ponto de fusão em cerca 227°C (experimento realizado com um aparelho PFM II AAKER). Próximo a 250°C, pode-se perceber uma mudança brusca de cor da amostra, o que, após resfriamento, permaneceu da mesma forma, não retornando a aparência inicial, podendo inferir que esta é sua temperatura de decomposição.

Para determinar a estrutura química da substância presente na fração trabalhada, foram utilizadas as técnicas de Infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC.

### 6.4.1 ANÁLISE DO ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA AMOSTRA 1 OBTIDA DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:

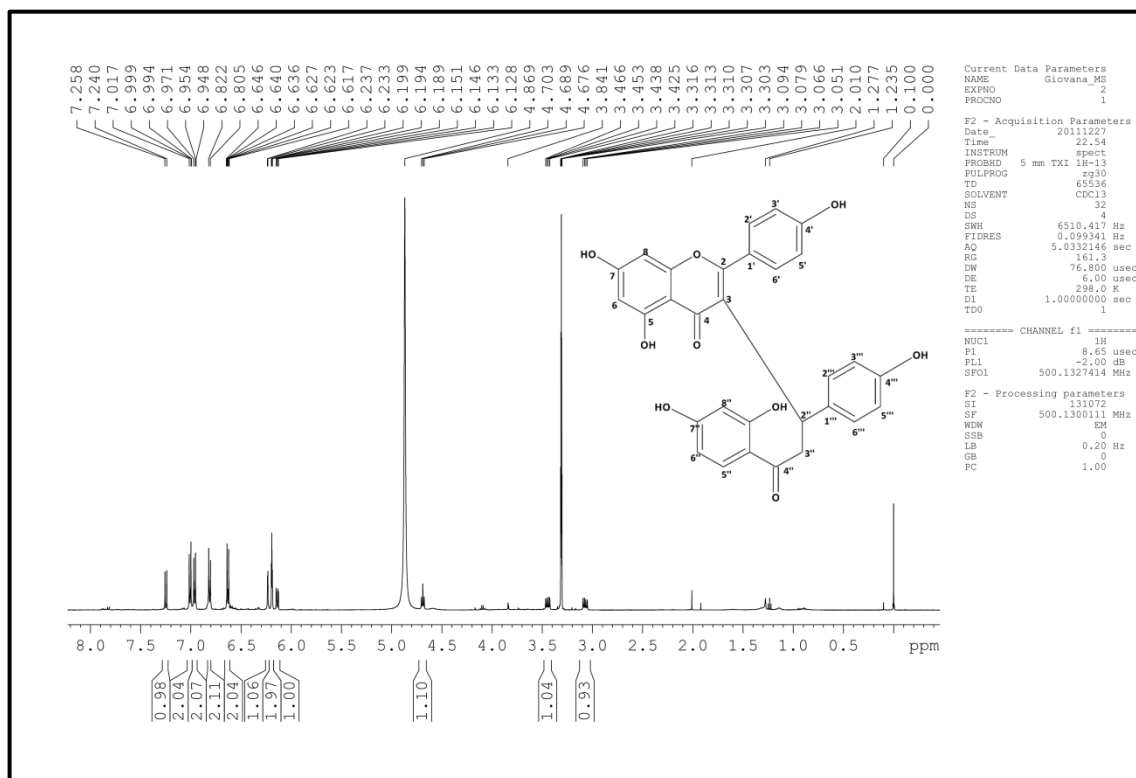


FIGURA 10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1, 500MHz, MeOD.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 1 (Fração 13-23-SPD), obtido em MeOD, observou-se sinais compatíveis com um flavonoide (Figura 10).

Na região entre  $\delta$  6ppm e  $\delta$  8ppm - região de aromáticos – foram observados sinais que indicaram a presença de anéis *p*-substituídos. As integrais dos sinais (2 hidrogênios com multiplicidade duplete), assim como as suas constantes de acoplamento (Tabela 5) indicaram a presença de dois anéis aromáticos na estrutura. As constantes de acoplamento observadas foram  $J = 8,7$  Hz para os hidrogênios em  $\delta$  6,822ppm e  $\delta$  7,017ppm; e de  $J=8,5$  Hz para os sinais de hidrogênio em  $\delta$  6,646ppm e  $\delta$  6,954ppm. As constantes de acoplamento sugeriram um padrão de substituição dos hidrogênios na posição *orto*. Os sinais de hidrogênio são atribuídos na figura 18. As correlações destes hidrogênios foram confirmadas através do experimento de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 (Correlation Spectroscopy). As ampliações do espectro são mostradas e discutidas nas Figuras 11, 12 e 13, adiante.

### 6.4.1.1 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA 1:

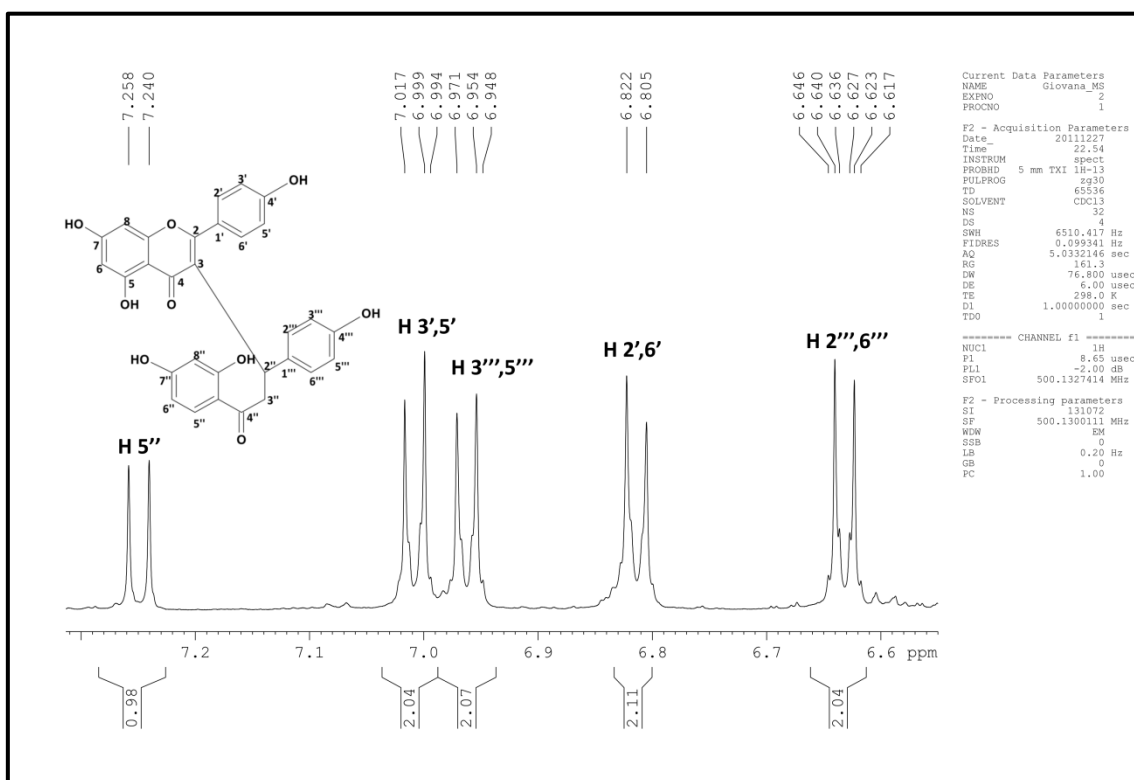
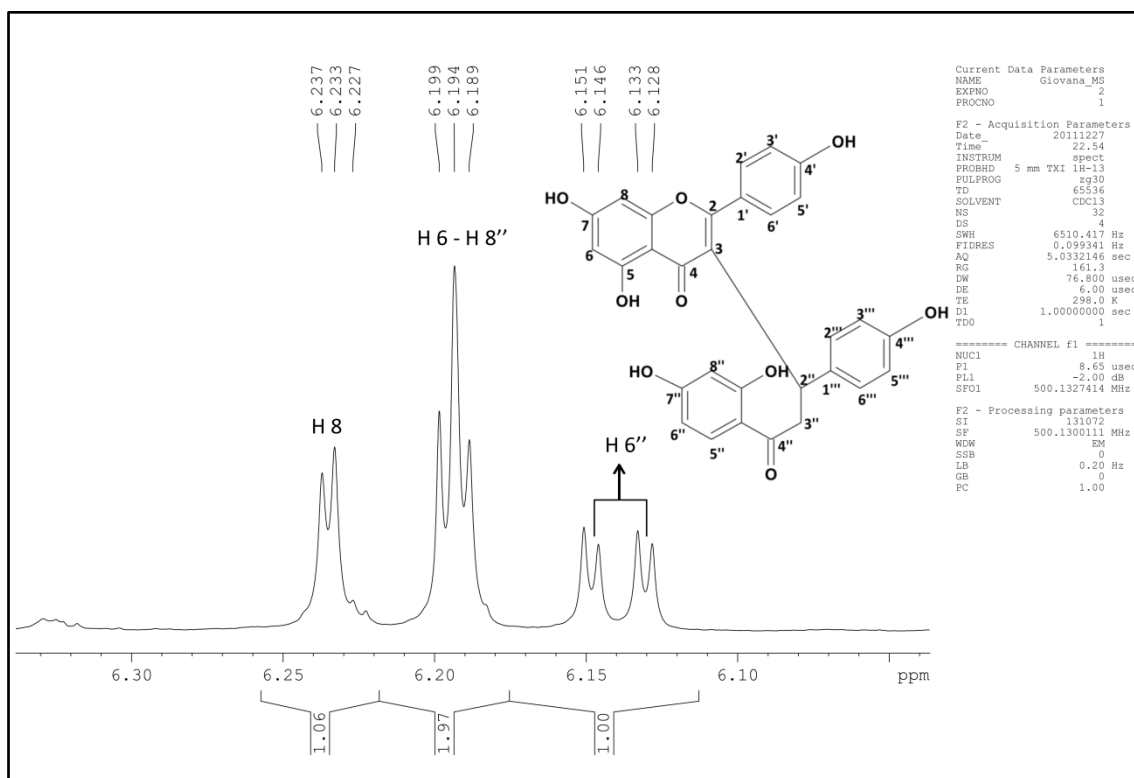


FIGURA 11 - Ampliação da região de aromáticos do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância 1, 500MHz, MeOD.

Através da análise da região de aromáticos (Figura 11) apresentada como sinais de dupletos em  $\delta$  7,017ppm e  $\delta$  6,822ppm foi possível definir os hidrogênios H3',5' e H2',6' ( $d$ ;  $J=8,7$  Hz) respectivamente. As correlações entre esses hidrogênios foram confirmadas através dos espectros de COSY e também através de correlações a longa distância entre <sup>13</sup>C x <sup>1</sup>H apresentados nos espectro de HMBC discutidos a partir da página 85.

**6.4.1.2 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  COMPREENDIDA ENTRE  $\delta$  6,0ppm E  $\delta$  6,3ppm DA AMOSTRA 1:**



**FIGURA 12 - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  6,0ppm -  $\delta$  6,3ppm) da substância 1, 500MHz, MeOD.**

Na região entre  $\delta$  6,0ppm e  $\delta$  6,3ppm (Figura 12) observou-se através da integração presença de quatro hidrogênios. Esses hidrogênios foram identificados como os H6'' em  $\delta$  6,151ppm (*dd*;  $J=9$  e 2,5 Hz); H8 em  $\delta$  6,237ppm (*d*;  $J=2,5$  Hz). O sinal em  $\delta$  6,194 ppm, integrado para dois hidrogênios foram relacionados aos H6 (*d*;  $J=2,5$  Hz) e H8'' (*d*;  $J=2,5$  Hz).

### 6.4.1.3 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO COMPREENDIDA ENTRE $\delta$ 5,0ppm E $\delta$ 3,0ppm DO ESPCTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ . DA SUBSTÂNCIA 1:

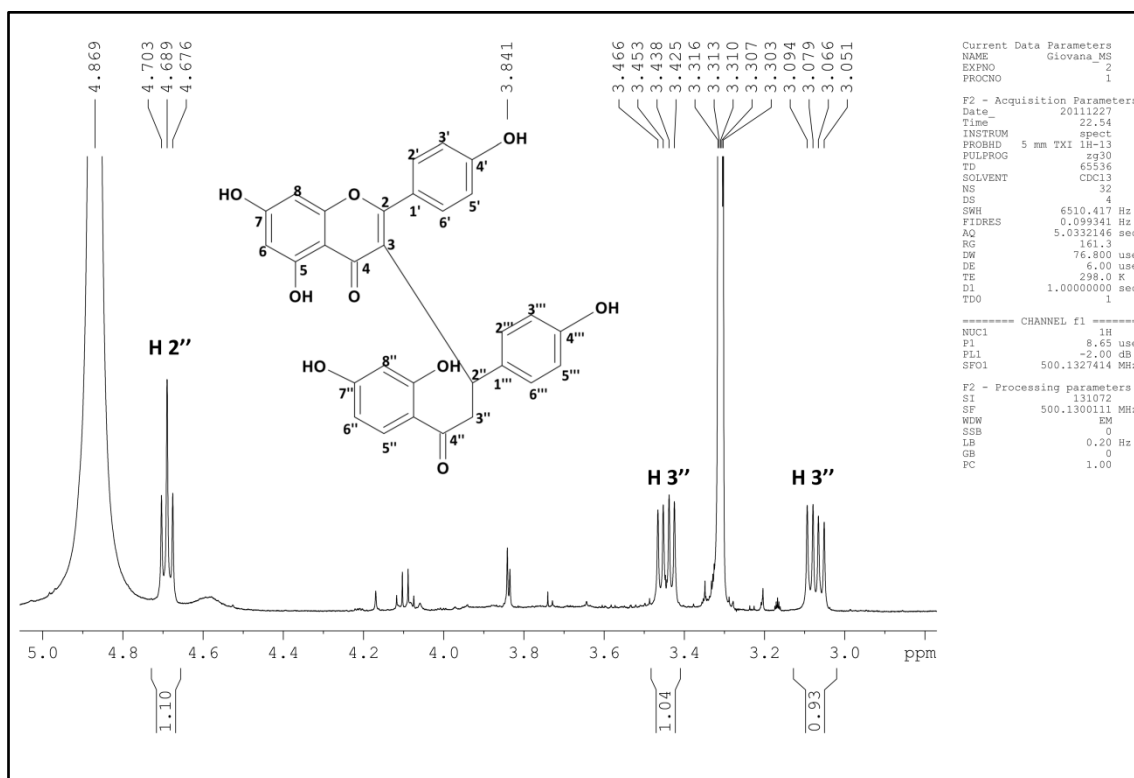
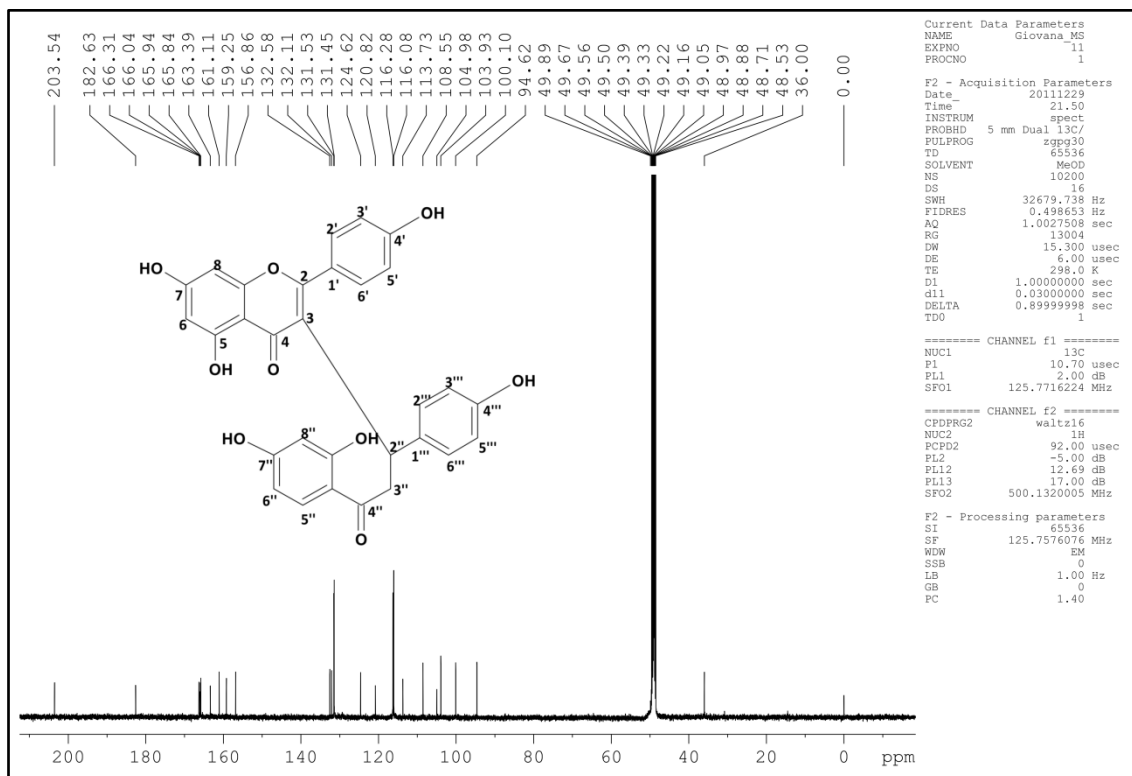


FIGURA 13 - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  5,0ppm -  $\delta$  3,0ppm) da substância 1, 500MHz, MeOD.

A ampliação mostrada (Figura 13) contém, além dos sinais do solvente, três hidrogênios, que foram relacionados, pelas suas multiplicidades aos H<sub>2</sub>'' (*dd*;  $\delta$  4,689ppm) e H<sub>3</sub>'' (dois sinais compreendidos entre H<sub>3a</sub>''  $\delta$  3,466ppm (*dd*;  $J=14,0$  e  $6,5$  Hz) e H<sub>3b</sub>''  $\delta$  3,094ppm (*dd*;  $J=14,0$  e  $7,5$  Hz) se apresentando como dois duplos dupletos).

**6.4.2 ANÁLISE DE RMN DE CARBONO (RMN <sup>13</sup>C) DA SUBSTÂNCIA 1 OBTIDA DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**



**FIGURA 14 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 1, proveniente da fração acetato de etila do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, 125MHz, MeOD.**

A análise do espectro de Carbono da fração 13-23-SPD permitiu definir os sinais referentes aos carbonos carbonílicos (C=O), através do deslocamento químico entre  $\delta$  210ppm e  $\delta$  180ppm, os carbonos oxigenados aromáticos (C-O) compreendidos entre  $\delta$  180ppm e  $\delta$  150ppm (Figura 15), os carbonos aromáticos presentes entre  $\delta$  140ppm e  $\delta$  90ppm além de carbonos com deslocamentos químicos entre  $\delta$  50ppm e  $\delta$  20ppm referentes aos carbonos C2'' e C3'' (Figura 16).

**6.4.2.1 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ENTRE  $\delta$  205ppm -  $\delta$  150ppm, RELACIONADA AOS CARBONOS CARBONÍLICOS (C=O) E OXIGENADOS AROMÁTICOS (C-O):**

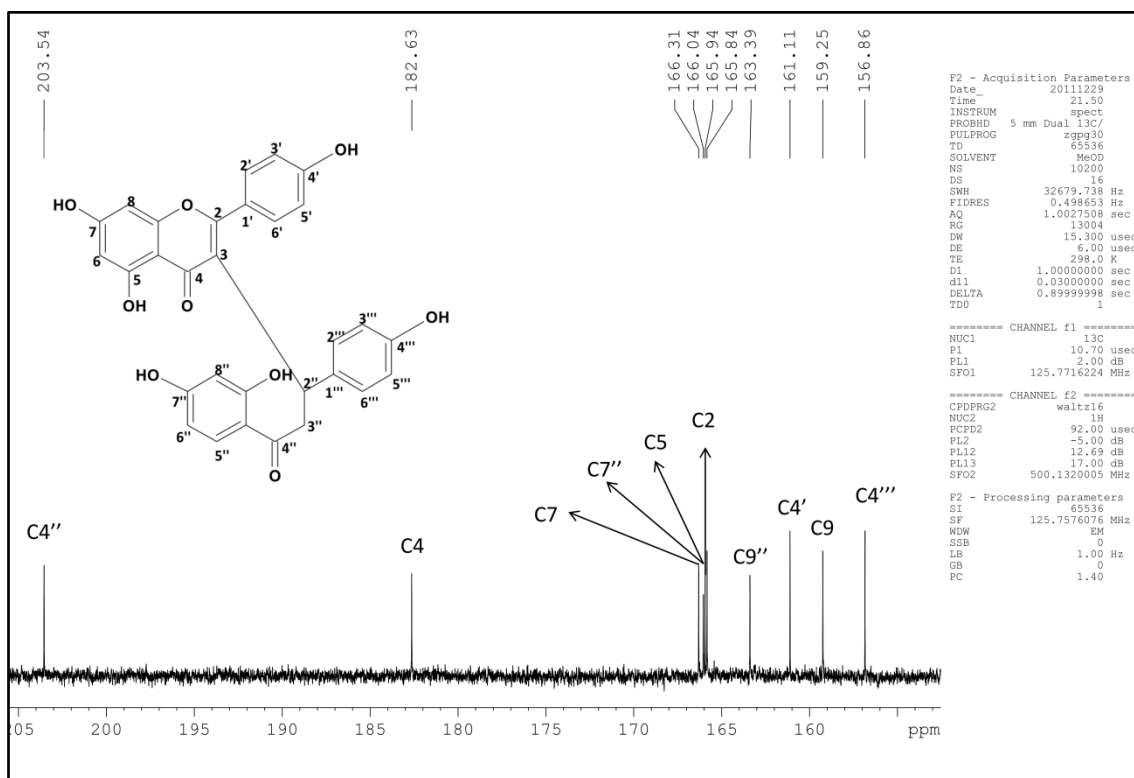


FIGURA 15 - Ampliação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , 125MHz, MeOD.

Os deslocamentos químicos característicos das carbonilas, nas regiões mais desblindadas do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 15), foram confirmadas através de análise dos espectros de HMBC. O carbono C4'' foi atribuído ao sinal no deslocamento químico  $\delta$  203,5ppm e o carbono C4 ao sinal com deslocamento químico em  $\delta$  182,3ppm. Os carbonos oxigenados C7; C7''; C5; C2; C9''; C4'; C9'; C4''' foram relacionados às suas vizinhanças também através da análise dos espectros de HMBC, que são discutidos a partir da página 85.

**6.4.2 AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C DA SUBSTÂNCIA 1. REGIÃO ENTRE  $\delta$  135ppm -  $\delta$  20ppm RELACIONADA AOS CARBONOS AROMÁTICOS E CADEIA ALQUÍLICA:**

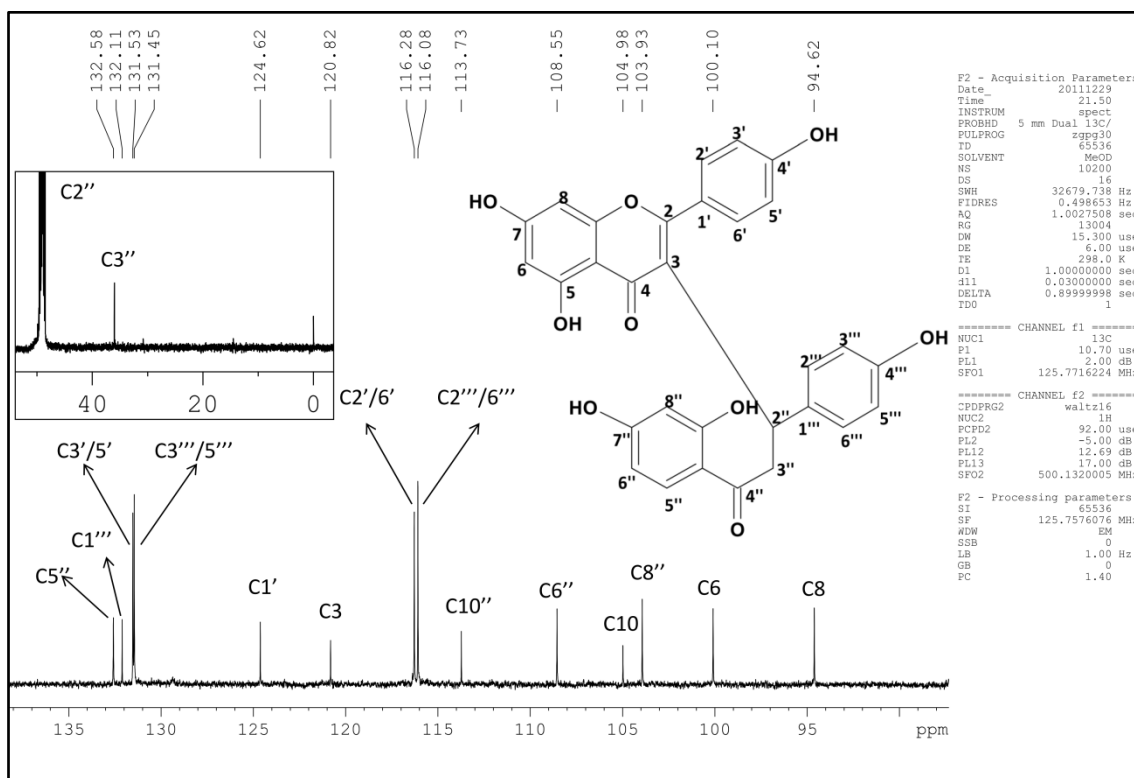


FIGURA 16 - Ampliação para o espectro de RMN <sup>13</sup>C, 125MHz, MeOD.

A análise do espectro de <sup>13</sup>C da substância 1 na área dos aromáticos (Figura 16) evidencia quatro sinais que coalesceram. Estes sinais foram definidos como os carbonos aromáticos C3' e C5' ( $\delta$  131,5); C2' e C6' ( $\delta$  116,2); C3''' e C5''' ( $\delta$  131,4) e; C2''' e C6''' ( $\delta$  116,1). A atribuição inequívoca se deu através da análise das correlações entre os <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C observadas nos espectros de HSQC e HMBC apresentados a partir da página 80.

### 6.4.3 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY90 DA SUBSTÂNCIA 1:

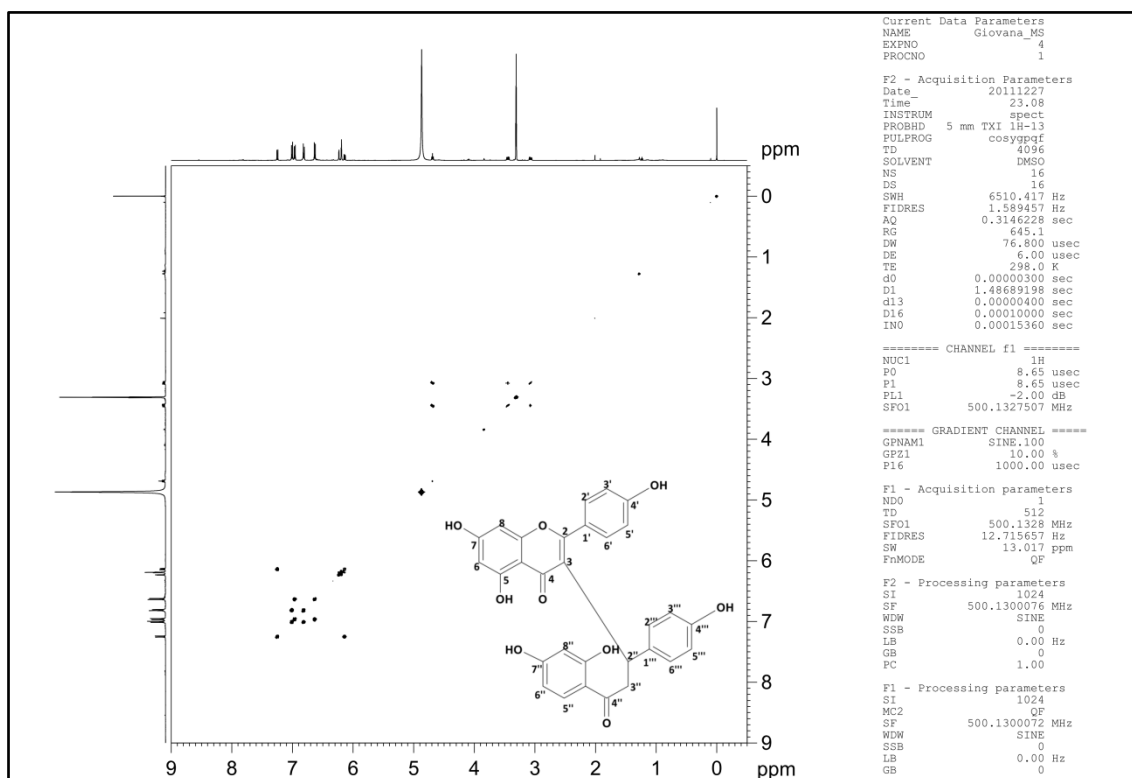


FIGURA 17 - Espectro de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 da substância 1, MeOD, 500MHz

Através da análise do espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 (Correlation Spectroscopy) (Figura 17) foi possível definir a posição dos hidrogênios aromáticos através de seus acoplamentos; o padrão de substituição do anel A e A'; assim como o acoplamento H2'' e os dois H3'', puderam ser confirmados.

TABELA 5 - Principais correlações observadas no experimento de COSY90  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  para a substância 1.

H	$\delta$ ppm	$m ; J(\text{Hz})$	H	$\delta$ ppm	$m ; J(\text{Hz})$
6	6,194	$d;2,5$	8	6,237	$d;2,5$
2'	6,822	$d;8,7$	3'	7,017	$d;8,7$
5'	7,017	$d;8,7$	6'	6,822	$d;8,7$
5''	7,258	$d;9,0$	6''	6,151	$dd;9,0;2,5$
6''	6,151	$dd;9;2,5$	8''	6,194	$d;2,5$
2''	4,689	$dd;7,5$	3a''	3,466	$dd;7,5$
2''	4,689	$dd;6,5$	3b''	3,094	$dd;6,5$
3a''	3,466	$dd;14$	3b''	3,094	$dd;14$
2'''	6,646	$d;8,5$	3'''	6,954	$d;8,5$
5'''	6,954	$d;8,5$	6'''	6,646	$d;8,5$

### 6.4.3.1 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS NO $^1\text{H}\text{X}^1\text{H}$ COSY90 PARA A SUBSTÂNCIA 1:

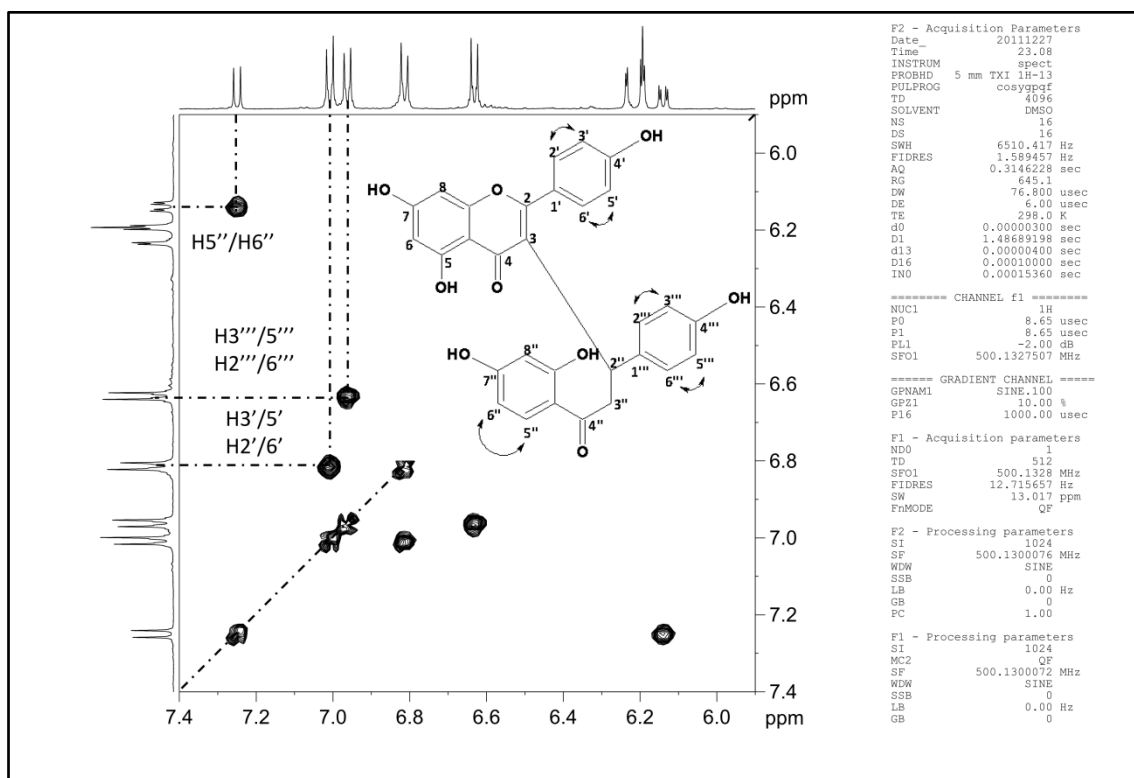
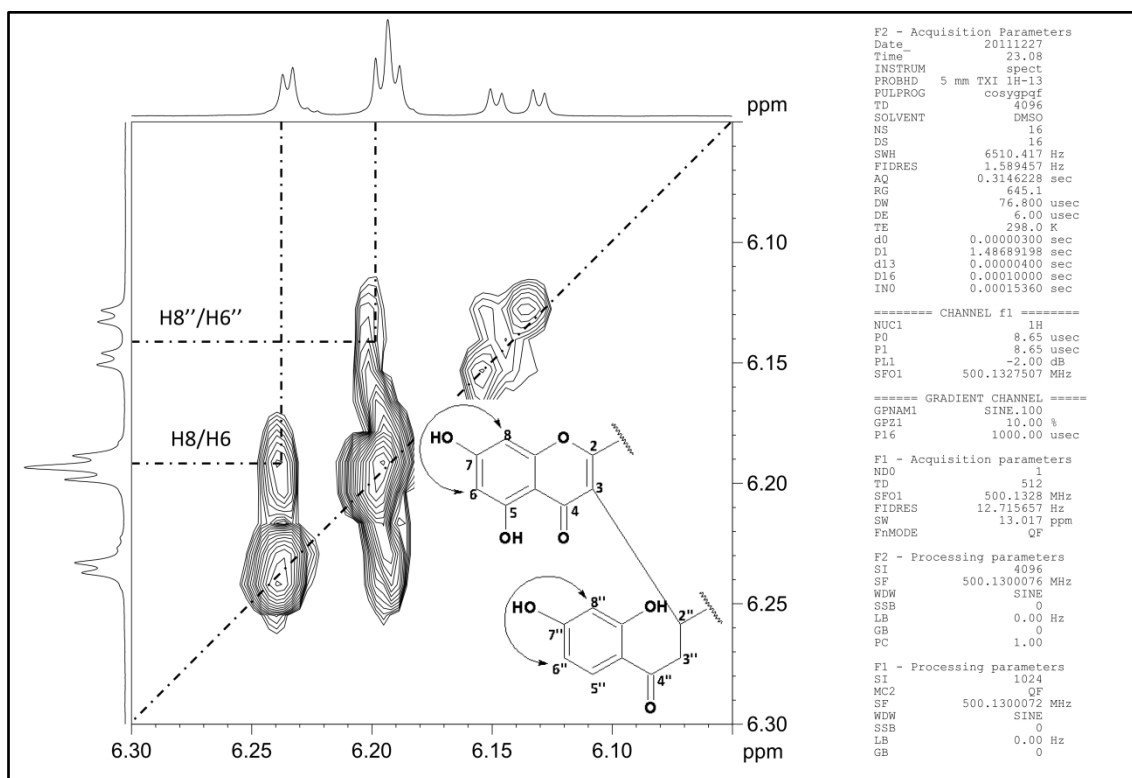


FIGURA 18 - Ampliação da região das sinais das correlações entre os hidrogênios aromáticos no espectro COSY da substância 1, MeOD, 500MHz

As correlações apresentadas entre os hidrogênios aromáticos  $\text{H}3'/5'$  ( $\delta$  7,017ppm) com os  $\text{H}2'/6'$  ( $\delta$  6,822ppm), permitiu defini-los como adjacentes. Foi possível observar também as correlações entre  $\text{H}3'''/5'''$  ( $\delta$  6,954ppm) com os  $\text{H}2'''/6'''$  ( $\delta$  6,646ppm) no mesmo anel. Observou-se o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos  $\text{H}5''$  ( $\delta$  7,258ppm) e  $\text{H}6''$  ( $\delta$  6,151ppm), presentes no anel A', com constante de acoplamento *orto* ( $J=9$  Hz) (Figura 18).

**6.4.3.2 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS EM  $\delta$  6,0ppm E  $\delta$ 6,3ppm NO  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 PARA A SUBSTÂNCIA 1:**



**FIGURA 19 - Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos  $\delta$  6,3ppm-  $\delta$  6,0ppm no espectro  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 da substância 1 500MHz, MeOD.**

No sinal de H6'' (*dd*;  $\delta$  6,151ppm), observou-se uma constante menor de  $J=2,5$  Hz, que foi também encontrada para o H8'' em  $\delta$  6,194ppm justificando a substituição em *meta*. Observou-se também o acoplamento em *meta* do H6 (*d*;  $\delta$  6,194ppm) com o H8 (*d*;  $\delta$  6,237ppm) com  $J=2,5$  Hz. A figura 19 mostra o acoplamento entre estes hidrogênios (Figura 19).

### 6.4.3.3 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS 2'' E 3'' E SEUS ACOPLAMENTOS NO ESPECTRO DE $^1\text{H}\text{X}^1\text{H}$ COSY90:

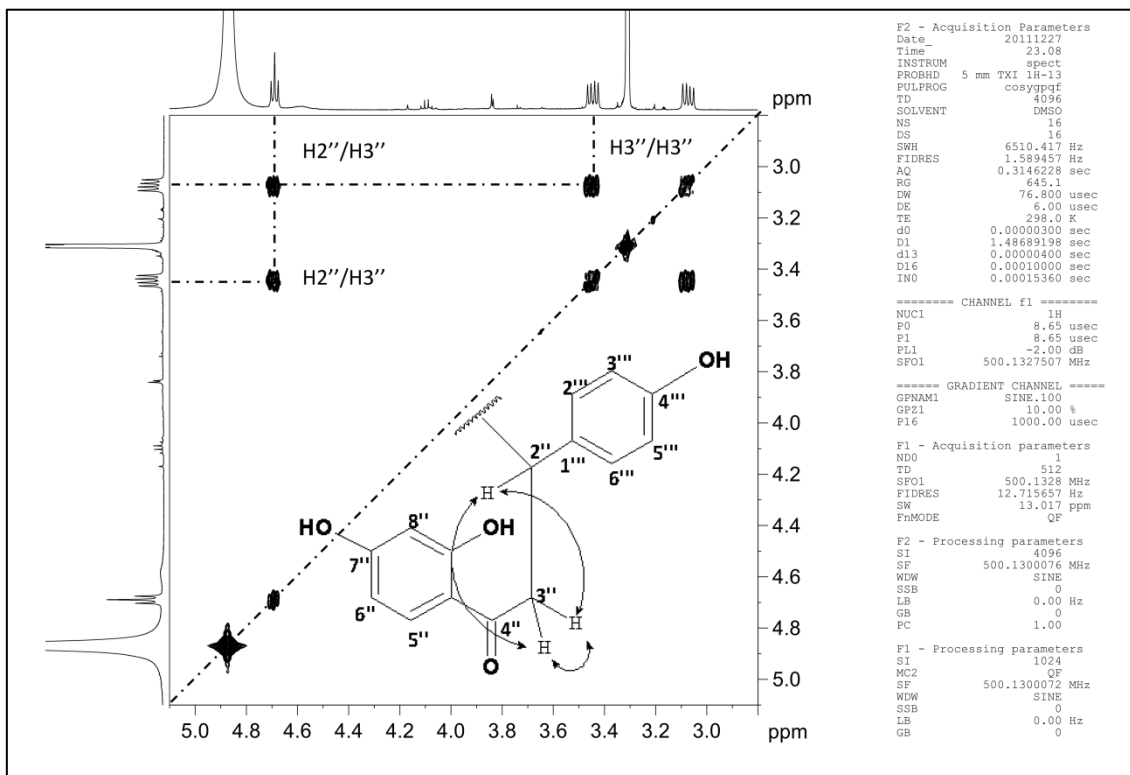


FIGURA 20 - Ampliação da região dos sinais dos H2'' e dos H3'' da substância 1 no experimento de  $^1\text{H}\text{X}^1\text{H}$  COSY90.

Nesta ampliação, os hidrogênios H2'' em  $\delta$  4,689ppm ( $dd$ ;  $J=7,5$ ; 6,5Hz) e H3<sub>a</sub>'' e H3<sub>b</sub>'' . Estas correlações confirmam a vizinhança entre os hidrogênios. O acoplamento dos H3'' se dá, além de com H2'' ( $dd$ ;  $J=6,5$ ; 7,5 Hz), e um com o outro, sendo estas correlações observadas entre H3<sub>a</sub>''  $\delta$  3,466ppm ( $dd$ ;  $J=14,0$ ; 6,5 Hz) e H3<sub>b</sub>''  $\delta$  3,094ppm ( $dd$ ;  $J=14,0$ ; 7,5 Hz). As integrais para os sinais de H3'' correspondem a dois hidrogênios (Figura 20).

#### 6.4.4 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC DA SUBSTÂNCIA 1 DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:

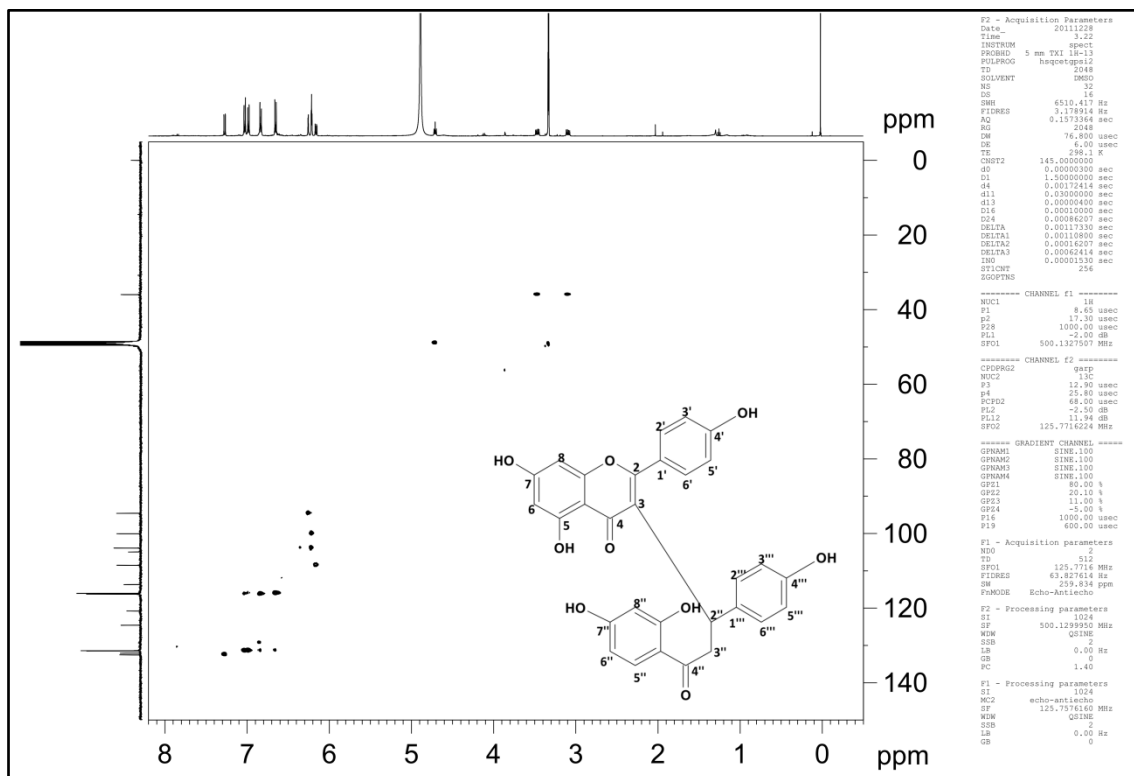
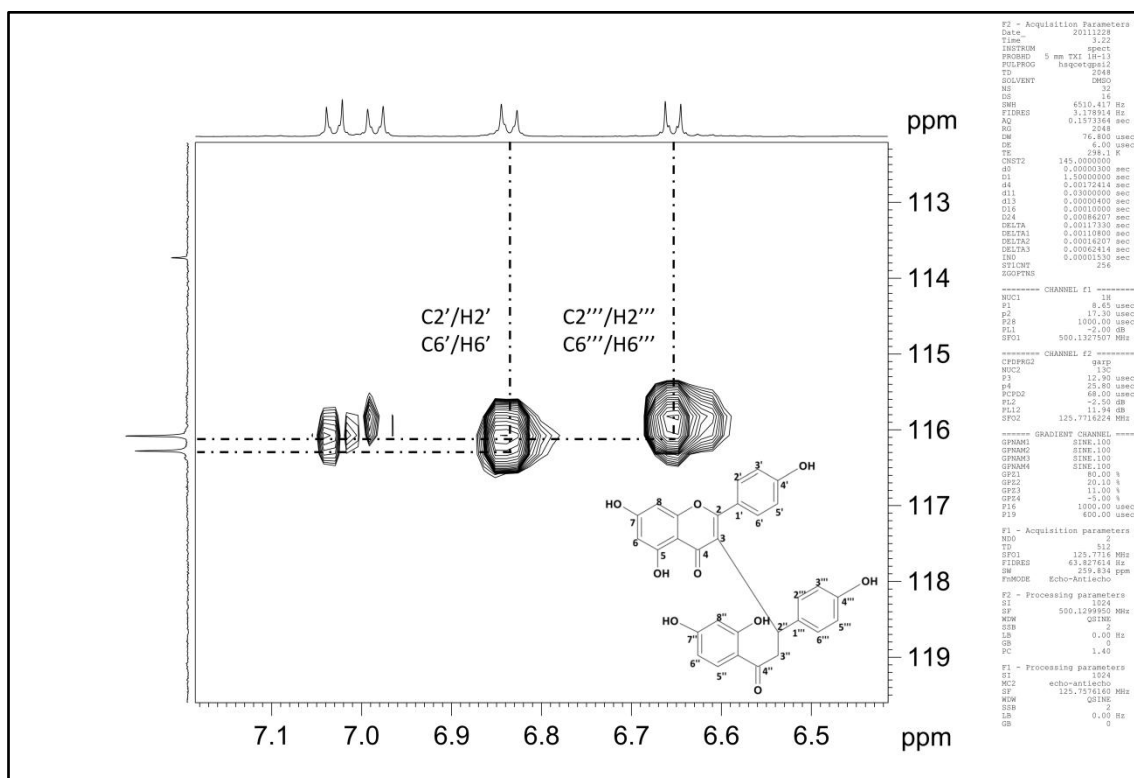


FIGURA 21 - Espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC da substância 1, 500MHz, MeOD.

A análise do espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), permitiu confirmar os hidrogênios e seus respectivos carbonos. Com a relação dos espectros de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90, foi possível confirmar os deslocamentos químicos para os carbonos diretamente ligados aos hidrogênios H5'' ( $\delta$  7,258ppm –  $d - J=9$  Hz); H6'' ( $\delta$  6,151ppm –  $dd - J=9;2,5$  Hz) e H8'' (6,194ppm –  $d - J=2,5$  Hz). Além de auxiliar a confirmação da localização dos hidrogênios H6 ( $\delta$  6,194ppm –  $d - J=2,5$  Hz) e H8 ( $\delta$  6,237 –  $d - J=2,5$  Hz) (Figura 21).

**6.4.4.1 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS C2'; C6'; C2''' E C6''' DOS ANÉIS *p*-SUBSTITUÍDOS NO EXPERIMENTO DE  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  HSQC DA SUBSTÂNCIA 1:**

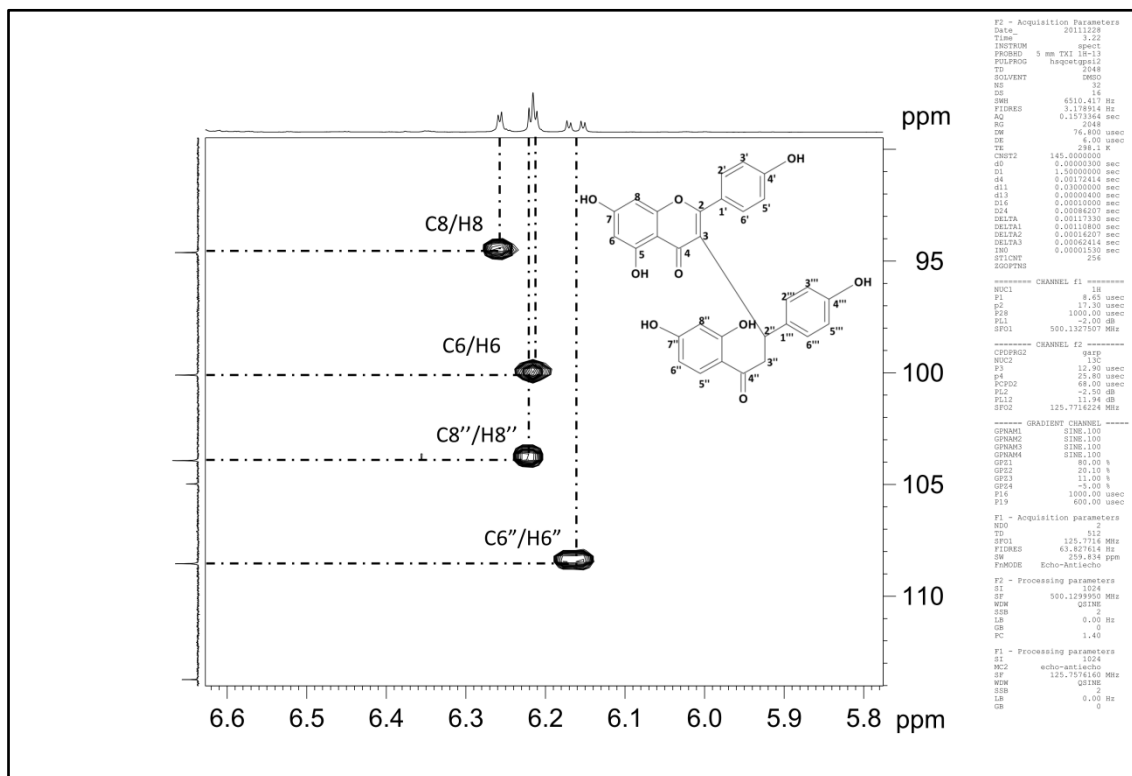


**FIGURA 22 - Ampliação da região de sinais dos H aromáticos dos anéis *p*-substituídos da substância 1 do espectro de  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  HSQC, 500MHz, MeOD.**

Através da análise do espectro de  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  HSQC, foi possível constatar a ocorrência de sinais que indicaram a conectividade entre os C2' e C6' ( $\delta$  116,3ppm) e os H2' e H6' (6,822ppm –  $d - J=8,7$  Hz); os C2''' e C6''' ( $\delta$  116,1ppm) e os H2''' e H6''' (6,646ppm –  $d - J=8,5$  Hz) também foram relacionados (Figura 22).



**6.4.4.3 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS C6; C8; C6'' E C8'' DOS ANÉIS SUBSTITUÍDOS A E A' NO EXPERIMENTO DE  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC DA SUBSTÂNCIA 1:**



**FIGURA 24 - Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios aromáticos do anel A e A' da substância 1 no experimento de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC, 500MHz, MeOD.**

Através da análise do espectro de HSQC apresentado na figura 24, percebe-se a correlação entre os carbonos C8 ( $\delta$  94,6ppm) com o sinal de hidrogênio aromático ( $\delta$  6,237ppm –  $d - J=2,5$  Hz), H8. Em  $\delta$  100,1 ppm o C6 está relacionado ao H6 ( $\delta$  6,194 –  $d - J=2,5$  Hz – coalescência). São relacionados também o sinal do C8'' ( $\delta$  103,9ppm) com o hidrogênio em ( $\delta$  6,194 –  $d - J=2,5$  Hz – coalescência), chamado de H8. E, finalmente, o acoplamento do sinal do C6'' em  $\delta$  108,5ppm com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,151ppm ( $dd$ ;  $J=2,5$  Hz). Estes dados confirmam as atribuições já observadas no espectro de COSY na figura 19, página 78.

#### 6.4.4.4 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS C2'' E C3'' DO ESPECTRO DE $^1\text{HX}^{13}\text{C}$ HSQC DA SUBSTÂNCIA 1:

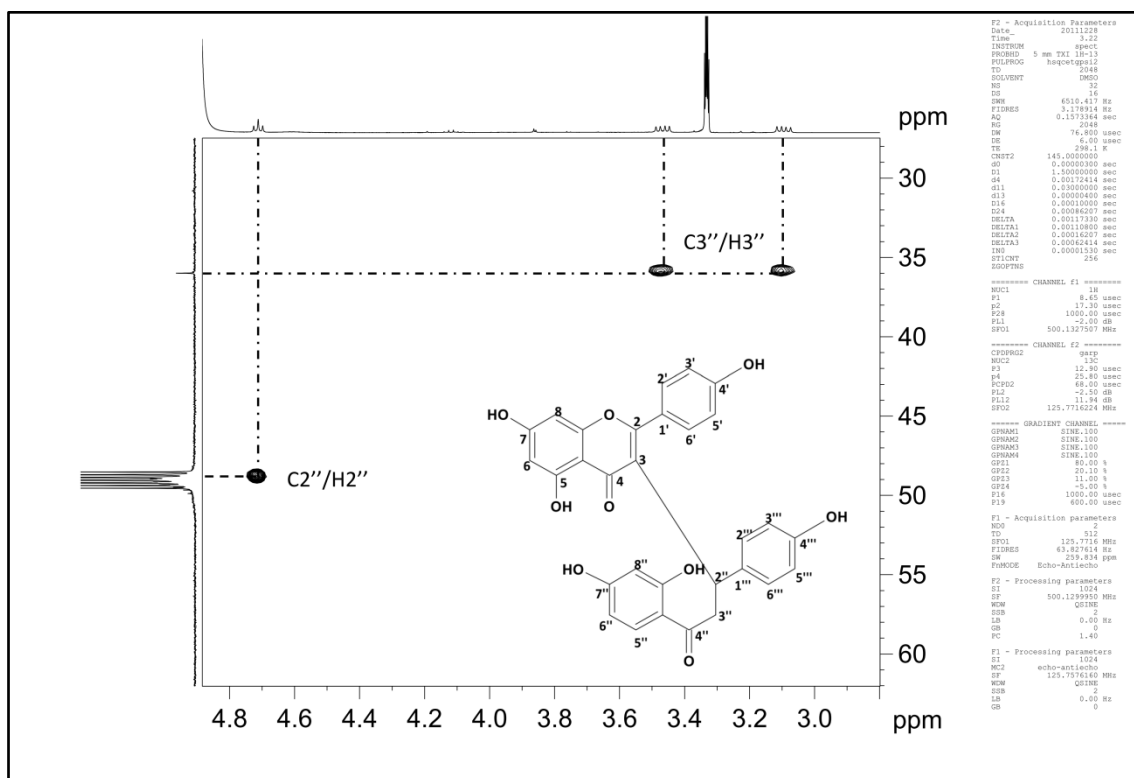
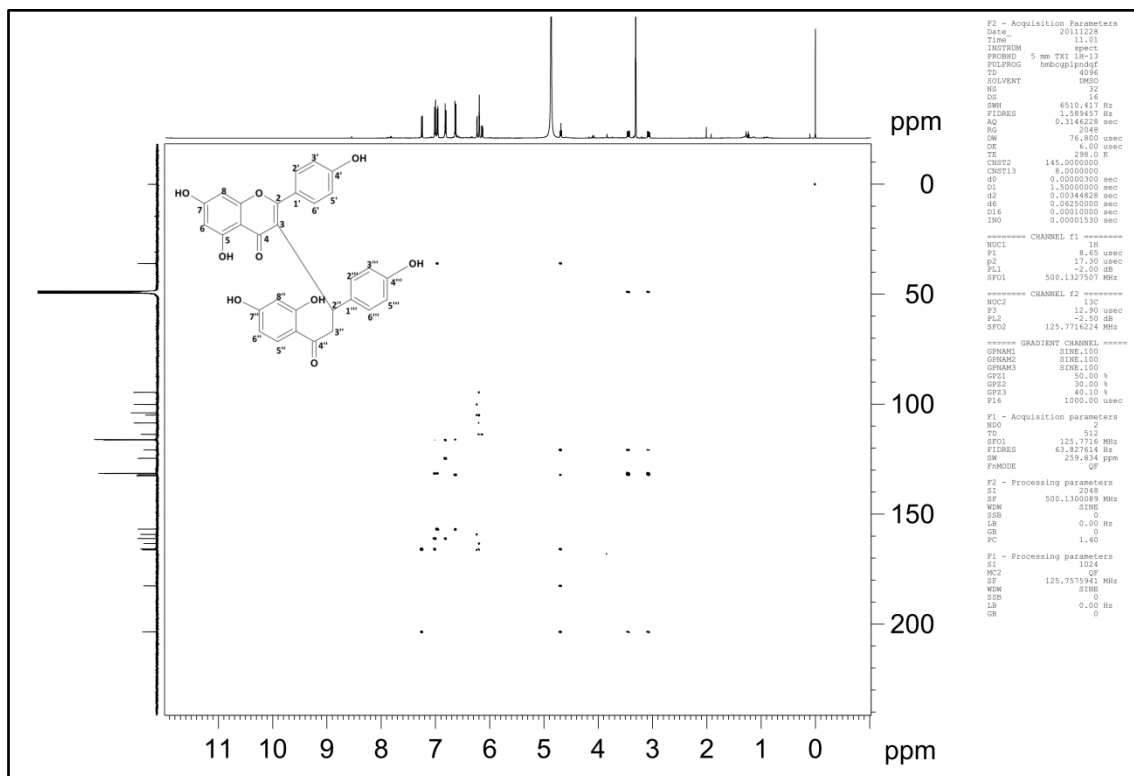


FIGURA 25 - Ampliação da região dos sinais das correlações entre os Carbonos 2'' e 3'' no experimento de  $^1\text{HX}^{13}\text{C}$  HSQC da substância 1, 500MHz, MeOD.

Através da análise do espectro de  $^1\text{HX}^{13}\text{C}$  HSQC apresentado na figura 25, pode-se confirmar o deslocamento químico dos carbonos C2'' e C3'', uma vez que as correlações de seus hidrogênios já foram determinadas. Assim, C2'' tem  $\delta$  49,2ppm, ligado ao H2'' em  $\delta$  4,689ppm ( $dd$ ;  $J=7,5$ ; 6,5 Hz) e que C3'' tem  $\delta$  36,0ppm ligado diretamente aos H3a'' em  $\delta$  3,466ppm ( $dd$ ;  $J=14,0$ ; 6,5 Hz) e H3b'' em  $\delta$  3,094ppm ( $dd$ ;  $J=14,0$ ; 7,5 Hz). Os acoplamentos mostrados são confirmadas no experimento de  $^1\text{HX}^1\text{H}$  COSY90 na figura 20, página 79.

**6.4.5 EXPERIMENTO DE CORRELAÇÃO  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC DA SUBSTÂNCIA 1 DO CAULE DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**



**FIGURA 26 - Espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD.**

A análise do espectro de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HMBC (Heteronuclear Shift Correlations via Multiple Bond. Connectivities), a partir das confirmações realizadas com os experimentos de  $^1\text{H}$  RMN;  $^{13}\text{C}$  RMN;  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY90 e  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC foi possível confirmar a localização dos carbonos oxigenados dos anéis A, B, A' e B', bem como a posição no espectro de carbonos quaternários, confirmando a proposta de elucidação para a substância 1.

### 6.4.5.1 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS H2'' E 3'' COM SUAS CORRELAÇÕES NO EXPERIMENTO DE $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC:

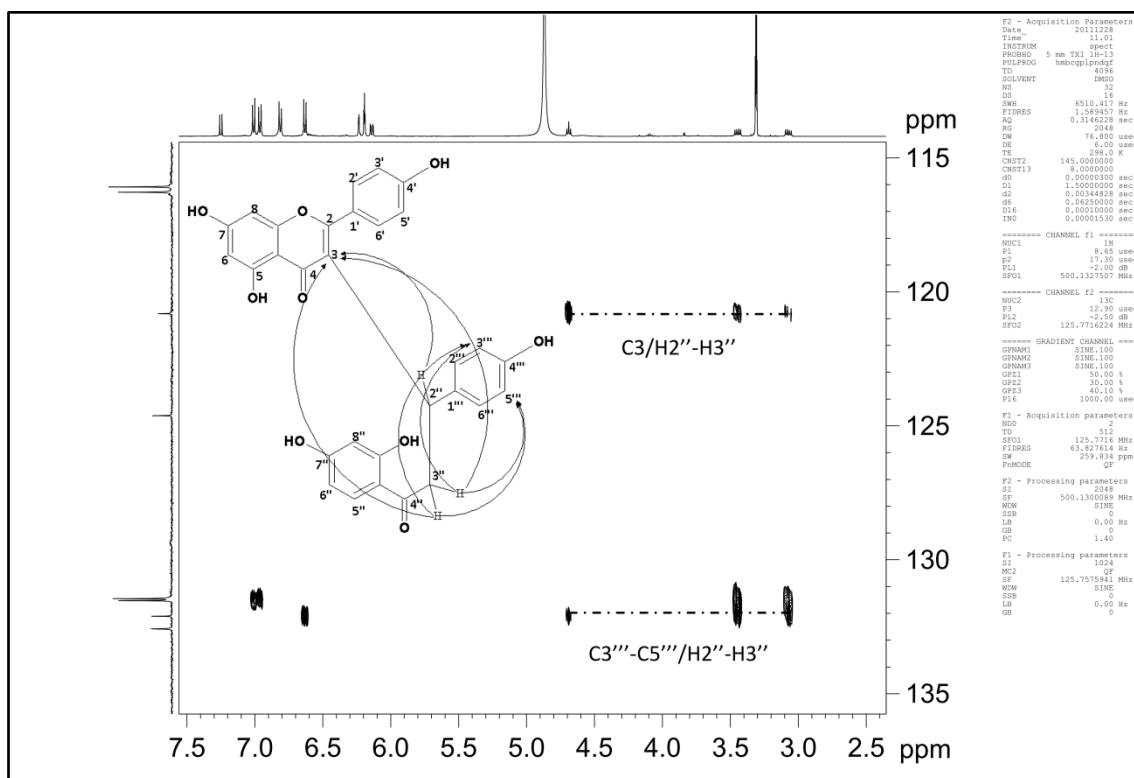


FIGURA 27 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD.

A análise da ampliação do espectro de  $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1 possibilitou confirmar qual o anel aromático estava ligado próximo aos H2'' e H3''. As correlações observadas são mostradas na figura 27. Os carbonos aromáticos C3''' e C5''' ( $\delta$  131,4ppm) apresentaram correlação com os H3'' ( $\delta$  3,466ppm e 3,094ppm – duplo duplete). Notou-se também, o acoplamento dos H3'' ( $\delta$  3,466ppm e 3,094ppm - duplo duplete) e do H2'' ( $\delta$  4,689ppm – duplo duplete) com o C3 com deslocamento químico  $\delta$  120,9ppm, na região de aromáticos.

### 6.4.5.2 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS H2'' E 3'' COM SUAS CORRELAÇÕES COM AS CARBONILAS NO EXPERIMENTO DE $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ HMBC:

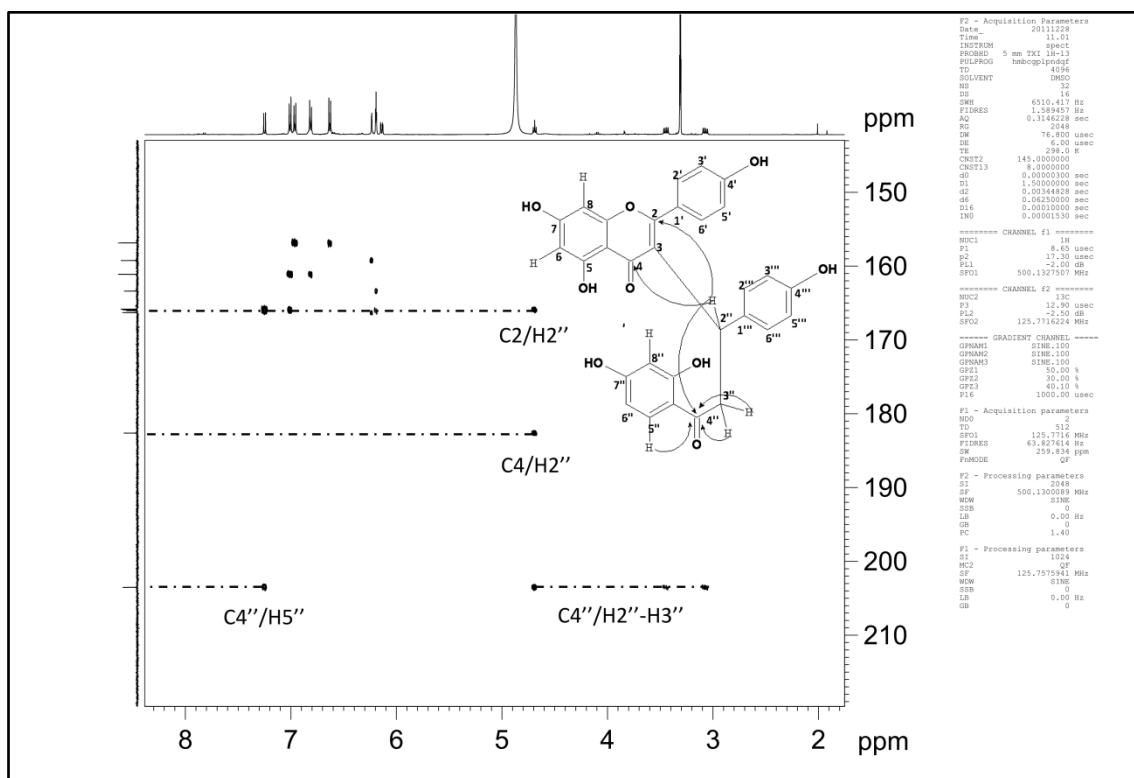


FIGURA 28 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD.

Uma proposta de uma chalcona como subunidade molecular é apresentada, para o biflavonoide, pelo fato de que o H2'' em  $\delta$  4,689ppm ( $dd$ ;  $J=7,5$ ; 6,5 Hz) apresentar correlações tanto com a carbonila, C4'' ( $\delta$  203,5ppm) quanto com a carbonila C4 ( $\delta$  182,6ppm) (Figura 28). O H2'' também apresentou, nesta ampliação correlação com o carbono quaternário C2 ( $\delta$  165,8ppm). A descoberta do sinal deste carbono possibilitou a confirmação do anel aromático B com suas correlações apresentadas na figura 31.

### 6.4.5.3 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DOS ANÉIS A E A':

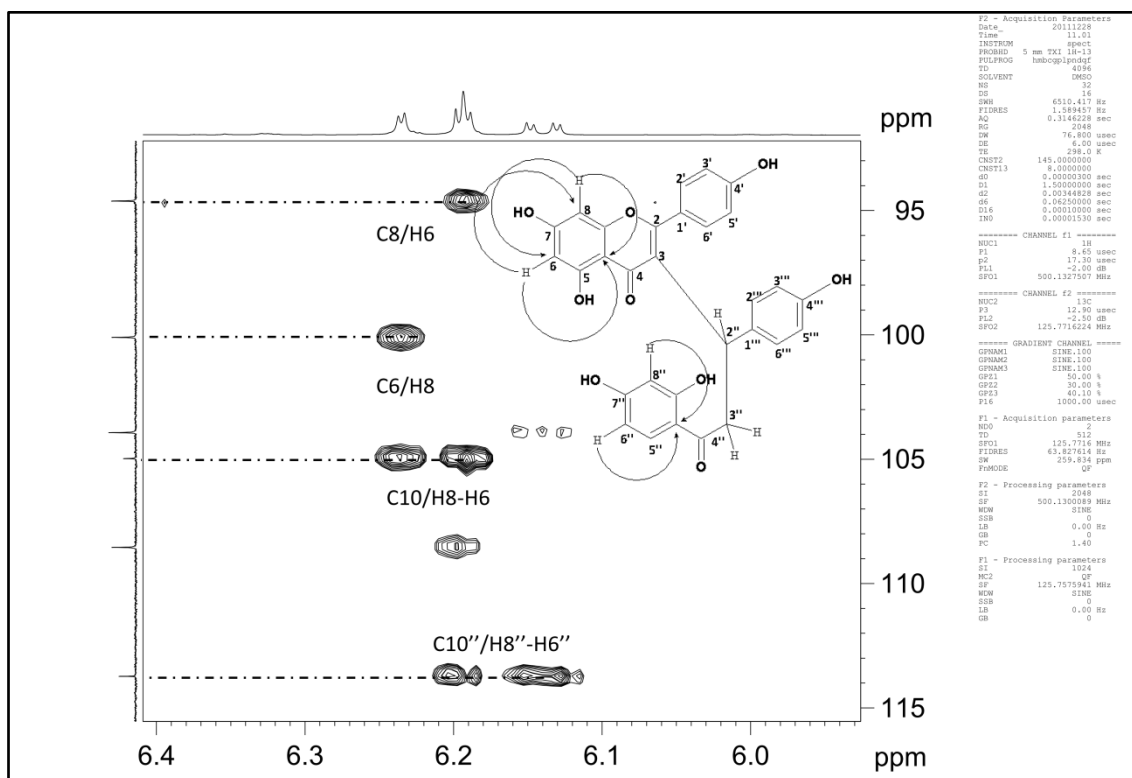


FIGURA 29 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD.

As correlações observadas nesta ampliação (Figura 29) confirmaram as posições dos hidrogênios coalescentes H6 e H8'' em  $\delta$  6,194ppm ( $d$ ;  $J=2,5$  Hz – coalescência), assim como as correlações entre os carbonos quaternários C10 ( $\delta$  104,98ppm), pelos H6 em  $\delta$  6,194ppm ( $d$ ;  $J=2,5$  Hz) e H8 em  $\delta$  6,237ppm ( $d$ ;  $J = 2,5$  Hz); e do C10'' ( $\delta$  113,7ppm pelos H6'' em  $\delta$  6,151 ( $dd$ ;  $J = 9,0$ ; 2,5 Hz) e 8'' em  $\delta$  6,194ppm ( $d$ ;  $J=2,5$  Hz). Notou-se também o acoplamento onde o C6 ( $\delta$  108,5ppm) foi correlacionado ao H8 e o C8 ( $\delta$  94,6ppm) foi relacionado ao H6.

#### 6.4.5.4 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS E OS CARBONOS OXIGENADOS DO ANEL A E A':

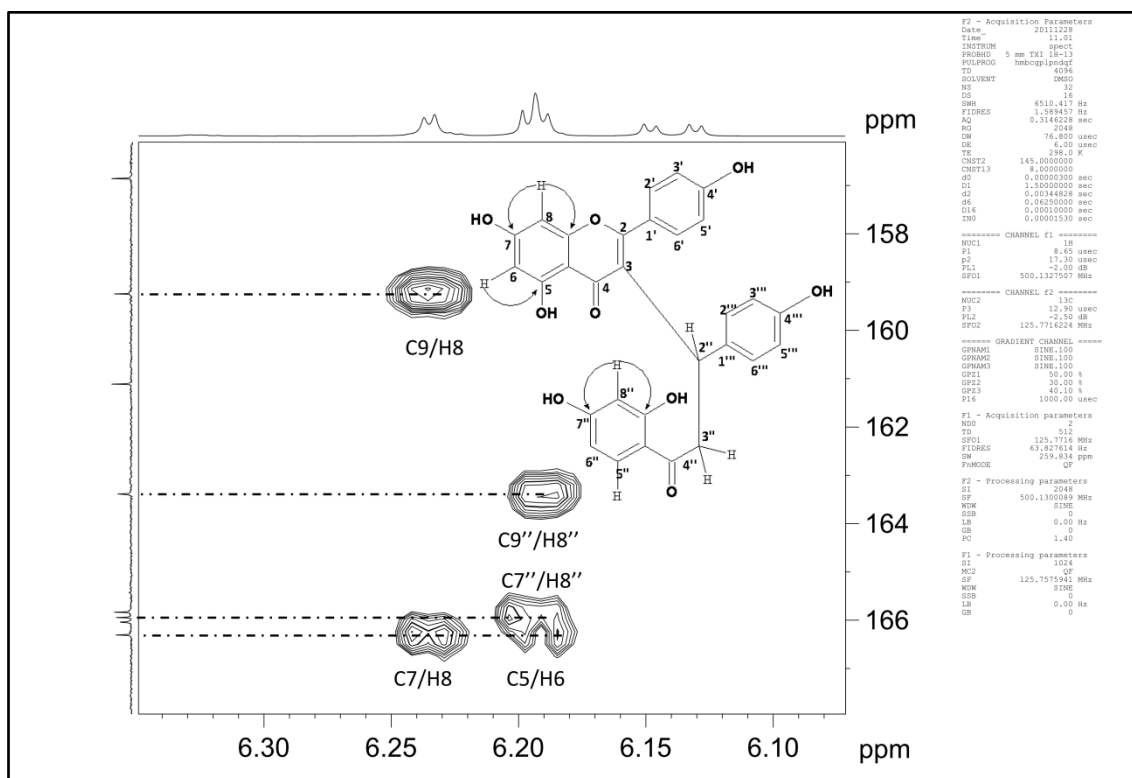


FIGURA 30 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMQC da substância 1, 500MHz, MeOD.

Através da análise da ampliação (Figura 30), confirmou-se a estrutura dos dois anéis A e A' a partir da correlação dos hidrogênios vizinhos aos carbonos oxigenados aromáticos. O espectro mostra que o H8 em  $\delta$  6,237ppm ( $d$ ;  $J = 2,5\text{Hz}$ ) no anel A se acopla com os C7 ( $\delta$  166,31ppm) e C9 ( $\delta$  159,25ppm), e que o H6 em  $\delta$  6,194ppm ( $d$ ;  $J=2,5$  Hz) do anel A se acopla com o C5 ( $\delta$  165,9ppm). Enquanto que o H8'' em  $\delta$  6,194ppm ( $d$ ;  $J=2,5$  Hz – coalescência) do anel A' se acopla com os C7'' ( $\delta$  163,0ppm) e C9''( $\delta$  163,3ppm). Confirmando a proposta levantada na interpretação do espectro de  $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY90.

### 6.4.5.5 AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS SINAIS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS E OS CARBONOS OXIGENADOS 4' E 4''' E 7'':

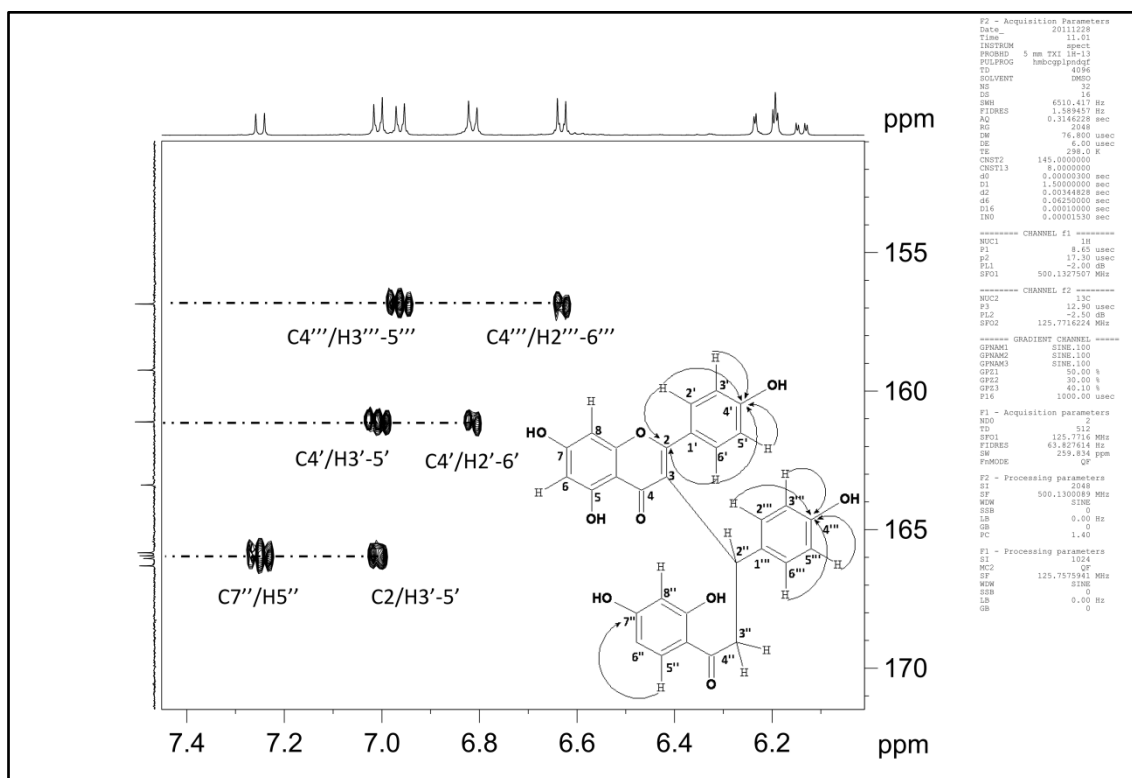


FIGURA 31 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  HMBC da substância 1, 500MHz, MeOD HMBC.

A análise da figura 31, a ampliação do espectro de  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  HMBC para a região dos anéis aromáticos *p*-substituídos, confirma as correlações de H2'/H6' em  $\delta$  6,822ppm ( $d$ ;  $-J=8,7$  Hz) com C2 ( $\delta$  165,8ppm) e com o carbono oxigenado aromático C4 ( $\delta$  182,6ppm); e o acoplamento de H3'/H5' em  $\delta$  7,017ppm ( $d$ ;  $J=8,7$  Hz) com C2 ( $\delta$  165,8ppm) no anel B. O acoplamento de H2'''/H6''' em  $\delta$  6,646ppm ( $d$ ;  $J=8,5$  Hz) e de H3'''/5''' em  $\delta$  6,954ppm ( $d$ ;  $J=8,5$  Hz) com o carbono oxigenado aromático 4''' ( $\delta$  156,86ppm) é notado. Nesta ampliação do espectro, consegue-se confirmar também o acoplamento do H5'' em  $\delta$  7,258ppm ( $d$ ;  $J=9$  Hz) com o carbono oxigenado aromático C7'' ( $\delta$  163,00ppm).

**6.5 TABELA DE CORRELAÇÕES PARA A SUBSTÂNCIA 1 DO CAULE DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**

TABELA 6 - Relações encontradas para carbono e hidrogênio da substância 1 (13-23-SPD)

Carbono	$\delta$ (ppm)	H ( $\delta$ ppm)	Multip.	J (Hz)	Acoplamento com
2	165,8	--	--	--	H2''
3	120,9	--	--	--	H2''/H3''
4	182,6	--	--	--	H2''
5	165,9	--	--	--	H6
6	100,10	6,194	<i>d</i>	2,5	H8
7	166,31	--	--	--	H8
8	94,6	6,237	<i>d</i>	2,5	H6
9	159,25	--	--	--	H8
10	104,98	--	--	--	H8
1'	124,6	--	--	--	--
2';6'	116,3	6,822	<i>d</i>	8,7	--
3';5'	131,5	7,017	<i>d</i>	8,7	--
4'	161,1	--	--	--	H3'/H5'
2''	49,2	4,689	<i>dd</i>	7,5; 6,5	H3''
3 <sub>a</sub> ''	36,0	3,466	<i>dd</i>	14,0; 6,5	H3b''/H2''
3 <sub>b</sub> ''	36,0	3,094	<i>dd</i>	14,0; 7,5	H3a''/H2''
4''	203,5	--	--	--	H2''/H3''
5''	132,1	7,258	<i>d</i>	9,0	H6''
6''	108,5	6,151	<i>dd</i>	9,0; 2,5	H5''/H8''
7''	163,0	--	--	--	H8''
8''	103,9	6,194	<i>d</i>	2,5	H6''
9''	163,3	--	--	--	H8''
10''	113,7	--	--	--	H5
1'''	132,11	--	--	--	H2''/H2'''
2''' ;6'''	116,1	6,646	<i>d</i>	8,5	--
3''' ;5'''	131,4	6,954	<i>d</i>	8,5	--
4'''	156,86	--	--	--	H3'''/H5'''

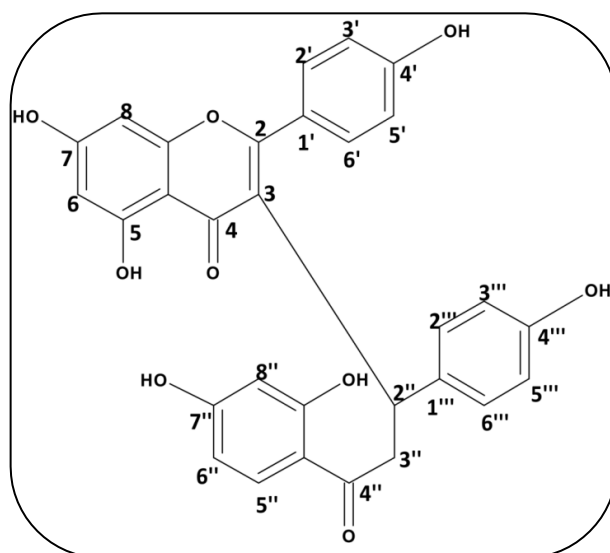


FIGURA 32 - Estrutura Química da substância 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona, isolada do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.

**6.6 EXPERIMENTO DE INFRAVERMELHO PARA A FRAÇÃO 13-23 OBTIDA ATRAVÉS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX, PROVENIENTE DA FRAÇÃO ACETATO DO CAULE DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**

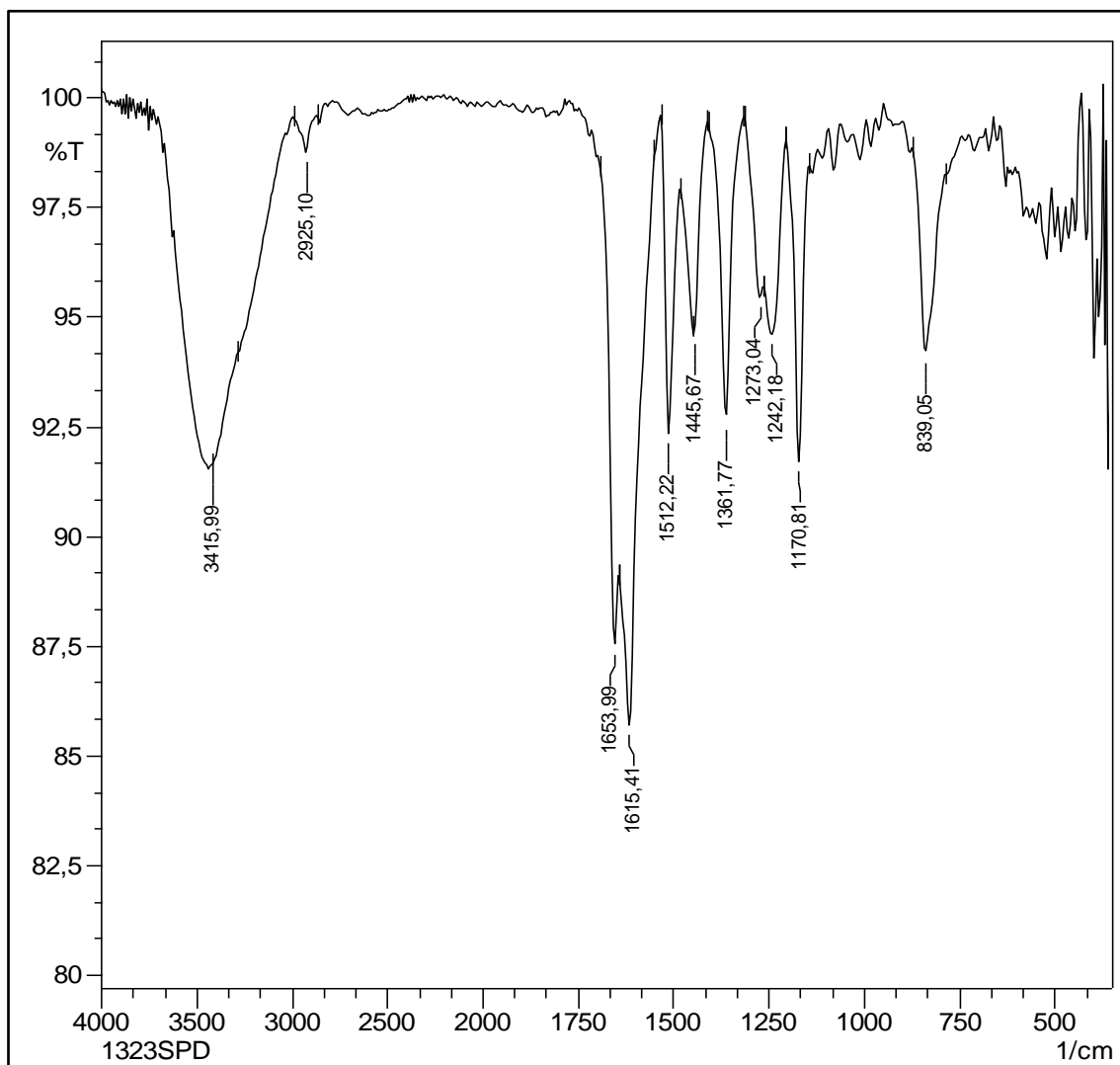


FIGURA 33 - Espectro de IV obtido em IR-Shimadzu Prestig-21 e manipulado em IR-Solution para a substância 1. Gráfico mostrado em Transmitância (y) e Número de Onda (cm<sup>-1</sup>).

O espectro de absorção no Infravermelho para a substância 1 (Figura 32) mostrou uma forte absorção na região de  $3600\text{cm}^{-1}$  até  $3000\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação O-H (hidroxila), pela sua banda forte e larga nesta região. Pode-se observar bandas na região de  $3000\text{cm}^{-1}$  a  $2900\text{cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento de ligações C-H de anel aromático sendo carbono sp<sup>2</sup>. Notou-se bandas no espectro em  $1653\text{cm}^{-1}$  e  $1615,41\text{cm}^{-1}$  referente à deformação axial de C=O que é influenciada pela ressonância pois desloca os

valores para uma menor frequência. Uma vez que o estiramento de cetonas (C=O) em flavonoides tem sua faixa de absorção entre  $1670\text{cm}^{-1}$  e  $1625\text{cm}^{-1}$ , onde a posição da banda varia em função do grupo substituinte. A deformação axial de C=C de anel aromático foi notada em  $1512,22\text{cm}^{-1}$ . Em  $1445,67\text{cm}^{-1}$  foi notada a banda de deformação angular de  $\text{CH}_2$ , do anel C3 da flavanona, adjacente à carbonila. Bandas de deformação axial de C-O foram encontradas em  $1273,04\text{cm}^{-1}$  e  $1242,18\text{cm}^{-1}$ . Em  $839,05\text{cm}^{-1}$  uma banda característica de deformação angular fora do plano de C-H do anel aromático foi observada.

## 6.7 DISCUSSÃO

Após a análise das técnicas e a determinação estrutural, pôde-se confirmar a estrutura química do biflavonoide isolado da fração acetato do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* como 5,7-dihidróxi-2-(4-hidróxifenil)-3-(3-(2,4-dihidróxifenil)-1-(4-hidróxifenil)-3-oxopropil)-4H-cromen-4-ona.

A presença de compostos fenólicos e terpenoides é comum ao gênero *Caesalpinia*, entretanto, a presença de biflavonoides foi identificada anteriormente apenas na espécie *Caesalpinia pyramidalis* (BAHIA, *et al.* 2010). Este trabalho relata pela primeira vez a ocorrência de biflavonoides em *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. Portanto, estas duas espécies são, até o momento, as únicas a apresentarem em sua composição química estruturas de biflavonoides, consideradas raras.

Estes resultados contribuem com elevada importância para o estudo da quimiotaxonomia do gênero *Caesalpinia*.

## **7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS DOS CONSTITUÍNTES DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**

### **7.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:**

Para avaliar o poder antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, foram realizados os testes Antioxidante por DPPH<sup>•</sup>, Redutor de Fe<sup>+3</sup> para Fe<sup>+2</sup> e Fenólicos Totais para mensurar, respectivamente a atividade sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup>, o poder redutor e quantificar os compostos fenólicos existentes em cada constituinte da planta.

#### **7.1.1 TESTE DPPH<sup>•</sup>:**

O teste antioxidante por DPPH<sup>•</sup> é utilizado para demonstrar a atividade sequestrante de radicais livres (ASRL) através da estabilização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Quando este radical é neutralizado por um agente antioxidante, sua absorbância natural em  $\lambda=517\text{nm}$  sofre decréscimo em função do aumento da ASRL da amostra, podendo se transformar em uma solução violeta-claro a amarela, indicando a estabilização total do radical. A quantidade de DPPH<sup>•</sup> removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorbância da solução do radical, é proporcional à atividade sequestrante (scavenging) da amostra, sendo possível, portanto, assumir que o consumo de DPPH<sup>•</sup> é equivalente à capacidade antioxidante pelas substâncias presentes na amostra (ESPIN, *et al.*, 2000).

**Metodologia para o teste DPPH<sup>•</sup> e preparação das amostras:** O teste foi realizado segundo a metodologia de Yen (2005), com algumas modificações. A faixa de concentração média adotada abrange 12,5ppm até 100ppm. Para evitar degradação do radical DPPH<sup>•</sup>, o teste foi realizado em tubos de ensaio envoltos por papel alumínio, tampados e devidamente etiquetados com os códigos das partições e as concentrações trabalhadas. As amostras foram preparadas a partir de cinco miligramas solubilizadas em 50mL de EtOH,

gerando uma solução mãe de 100ppm para cada partição. Diluições foram realizadas para obter concentrações de 50ppm, 25ppm e 12,5ppm. Em seguida, foram pipetados 4mL de cada uma das soluções padrões aos tubos de ensaio e 1mL da solução 0,5mmol/L de DPPH<sup>•</sup>, em triplicatas, aguardando-se trinta minutos para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517nm. Após a leitura, os dados foram tratados matematicamente, onde a média da absorbância foi tratada com a fórmula, resultando na porcentagem de neutralização de radicais livres.

**Preparação do (2,2-difenil-1-picril hidrazil) DPPH<sup>•</sup>:** O DPPH<sup>•</sup> é um radical fotossensível, portanto, foi preparado em béquer isolado tendo seu volume acertado em balão volumétrico na concentração de 0,5mmol/L. Uma solução de 100mL foi preparada para a realização do teste, onde a massa de 20mg de DPPH<sup>•</sup> foi utilizada.

**Preparação dos padrões antioxidantes adotados para o teste:** Os padrões para comparação da atividade antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foram Ácido Ascórbico (AA) e Butil-Hidróxi Tolueno (BHT), preparados com 5mg de cada, gerando a solução mãe em EtOH de 100ppm, também diluídas para produzir soluções de 50, 25 e 12,5ppm.

**Cálculo da atividade antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:** A equação utilizada para o cálculo da atividade antioxidante foi:

$$\% \text{ Atividade A. oxidante} = \frac{\text{Absorância (Branco)} - \text{Absorbância (Amostra)}}{\text{Absorbância (Branco)}} * 100$$

Mostrando os resultados em % de atividade antioxidante, comparada aos padrões adotados e ao branco, que foi preparado em triplicata com todos os componentes menos as amostras das partições e padrões.

### 7.1.2 TESTE REDUTOR:

A avaliação do poder redutor das partições de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foi realizada de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen, 2005, com algumas modificações. O teste demonstra o poder redutor das amostras, por aumento da absorvância em 700nm. Quanto maior a absorvância neste comprimento de onda, maior o poder redutor da partição, o que é observado pela coloração azulada mais intensa pela redução do íon ferricianeto ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferrocianeto ( $\text{Fe}^{+2}$ ) que, na presença do íon férrico (proveniente do  $\text{FeCl}_3$ ), forma o azul da Prússia (SANTOS, *et al.* 2007).

**Preparação das amostras para o teste:** As soluções das partições Hexano, Acetato de Etila e Hidroalcoólica foram preparadas na mesma faixa de concentração adotada para o DPPH<sup>•</sup>, pesando-se 5mg de amostra, solubilizados em 50mL de EtOH, produzindo uma solução mãe de 100ppm, sendo diluída para a formação das demais, assim como para os padrões AA e BHT.

**Metodologia para o teste REDUTOR:** O teste redutor também foi realizado em triplicatas para a leitura em espectrofotômetro. O comprimento de onda para a leitura dos resultados do teste foi 700nm. Soluções padrões de Ácido Tricloroacético (10%); Cloreto Férrico (0,1%); Ferricianeto de Potássio (1%) e Solução Tampão Fosfato Ácido de Sódio (0,2M – pH 6,6 – corrigido com Ácido Fosfórico), foram preparadas para a realização do teste redutor, que consistiu nas etapas Quente e Fria. Para a etapa Quente do teste, seguiram-se os seguintes passos: a) ao tubo de ensaio devidamente etiquetado quanto a partição e a concentração, adicionou-se 2mL da amostra; 2,5mL da solução tampão; 2,5mL da solução de Ferricianeto de Potássio; b) o sistema foi aquecido durante trinta minutos a 50°C; c) Adicionou-se 2,5mL de ácido tricloroacético e o sistema foi mantido em agitação por dez minutos. Para a etapa Fria: a) adicionou-se ao tubo de ensaio devidamente etiquetado ao extrato e à concentração, 2,5mL da solução Quente e 2,5mL de água destilada; b) adicionou-se 0,1mL da solução  $\text{FeCl}_3$  (0,1%); c) leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=700\text{nm}$ . O mesmo

procedimento citado foi realizado para os padrões AA e BHT. O branco foi preparado com todos os reagentes menos as amostras e os padrões antioxidantes adotados.

**Poder redutor de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:** O poder redutor das partes aéreas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pode ser observado pela comparação no gráfico em cada concentração pela absorvância apresentada por cada amostra, comparada ao padrão, onde um valor de absorvância maior, mostra um maior poder redutor (Resultados expressos em porcentagem de aumento da absorvância).

## 7.2 DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS:

O teste adotado para Fenólicos Totais consiste na redução do Molibdênio e Tungstênio do reagente Folin-Ciocalteu com números de oxidação +6 para +5, quantificando em equivalentes de ácido gálico, a concentração total de compostos fenólicos nos extratos trabalhados. Os ácidos do reagente Folin-Ciocalteu apresentam coloração amarela, passando a absorver no comprimento de onda de  $\lambda=750\text{nm}$ , apresentado uma coloração azulada quando reduzidos. Quanto maior a absorvância neste comprimento de onda, maior a concentração de compostos fenólicos capazes de reduzir os metais.

**Metodologia para o teste Fenólicos Totais:** Segundo a metodologia adotada, descrita por SOUZA, *et al.* (2007), com algumas modificações, seguiu-se os seguintes passos: a) 7,5mg da amostra foi solubilizado em MeOH, tendo seu volume acertado para 50mL, produzindo uma solução mãe de 0,15mg/mL; b) a uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  da solução mãe foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de Folin-Ciocalteu e 6mL de água; c) após 1 minuto, adiciona-se 2mL da solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; d) após 30 segundos, ajusta-se o volume da solução para 10mL; e) A solução deve permanecer em repouso por 2 horas tendo sua leitura realizada em  $\lambda=750\text{nm}$ . Foram utilizadas cubetas de acrílico.

**Curva de Calibração do Ácido Gálico:** A curva de calibração foi elaborada com 12 pontos de 0 até 200µg/mL, em triplicatas, tendo como resultado um coeficiente de relação de  $R^2=0,9978$ . A equação da curva de calibração foi  $A = 0,002C + 0,0218$ , onde A é a absorbância e C, a concentração de ácido gálico (Figura 41).

### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

#### 7.3.1 QUANTO AO TESTE DPPH<sup>•</sup>:

As partições acetato de caule, flores, folhas e frutos, são significativamente ativas comparadas aos padrões AA e BHT, destacando-se perante as demais, apresentando os menores valores de absorbância em 517nm, indicando uma maior neutralização do radical DPPH<sup>•</sup>, como visto na tabela abaixo:

TABELA 7 - Valores de absorbância obtidos através da leitura em 517nm da avaliação sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup> dos extratos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* e dos padrões AA e BHT, adotando-se desvio padrão aproximado com duas casas decimais.

Extratos	Partição	Absorbância em 517nm			
		12,5ppm	25ppm	50ppm	100ppm
Caule	Hexânica b	0,814±0,07	0,671±0,03	0,620±0,01	0,526±0,02
	Acetato de etila a	0,127±0,01	0,049±0,00	0,045±0,00	0,039±0,00
	Hidroetanólica a	0,313±0,02	0,170±0,02	0,049±0,01	0,046±0,00
Flores	Hexânica b	0,632±0,01	0,571±0,00	0,459±0,02	0,203±0,01
	Acetato de etila a	0,037±0,01	0,028±0,00	0,027±0,00	0,026±0,00
	Hidroetanólica a	0,497±0,01	0,304±0,01	0,064±0,02	0,024±0,00
Folhas	Hexânica c	0,811±0,02	0,671±0,02	0,434±0,01	0,115±0,00
	Acetato de etila a	0,063±0,00	0,057±0,00	0,049±0,00	0,044±0,00
	Hidroetanólica a	0,521±0,02	0,181±0,02	0,057±0,00	0,053±0,00
Frutos	Hexânica c	0,822±0,00	0,735±0,01	0,561±0,02	0,328±0,02
	Acetato de etila a	0,083±0,00	0,053±0,00	0,043±0,00	0,039±0,00
	Hidroetanólica a	0,701±0,01	0,505±0,01	0,233±0,02	0,040±0,00
Padrões	AA a	0,044±0,01	0,039±0,00	0,038±0,00	0,037±0,01
	BHT b	0,890±0,00	0,723±0,05	0,643±0,02	0,303±0,00

\*Mesmas letras indicam que os valores não diferem entre si pelo Teste de Skott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

Os resultados apresentados nos gráficos a seguir são interpretados de acordo com a porcentagem de inibição de radicais DPPH<sup>•</sup> em solução:

## CAULE:

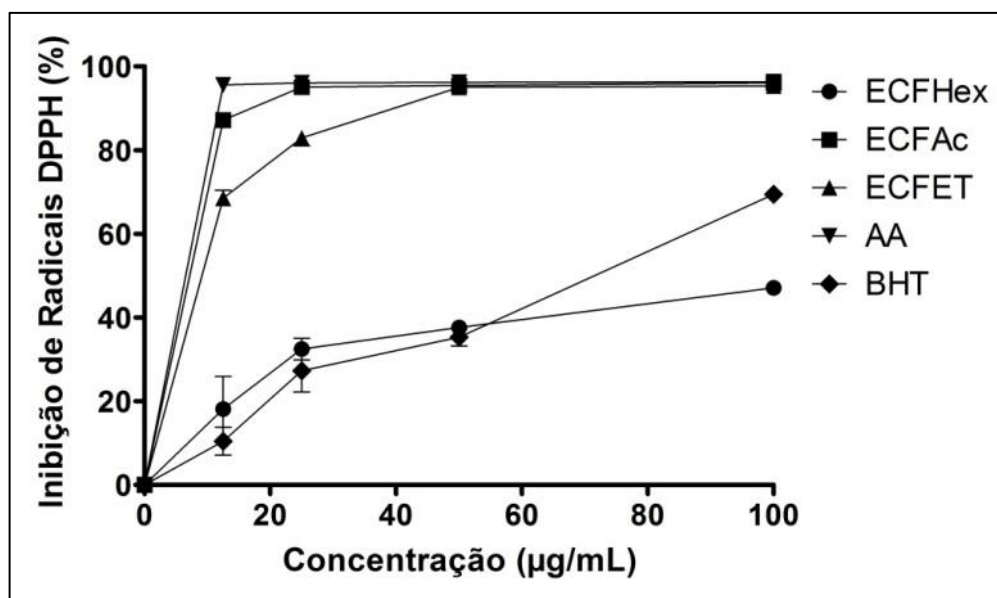


FIGURA 34 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH\* das partições do Caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/ml no teste de antioxidante.

## FLORES:

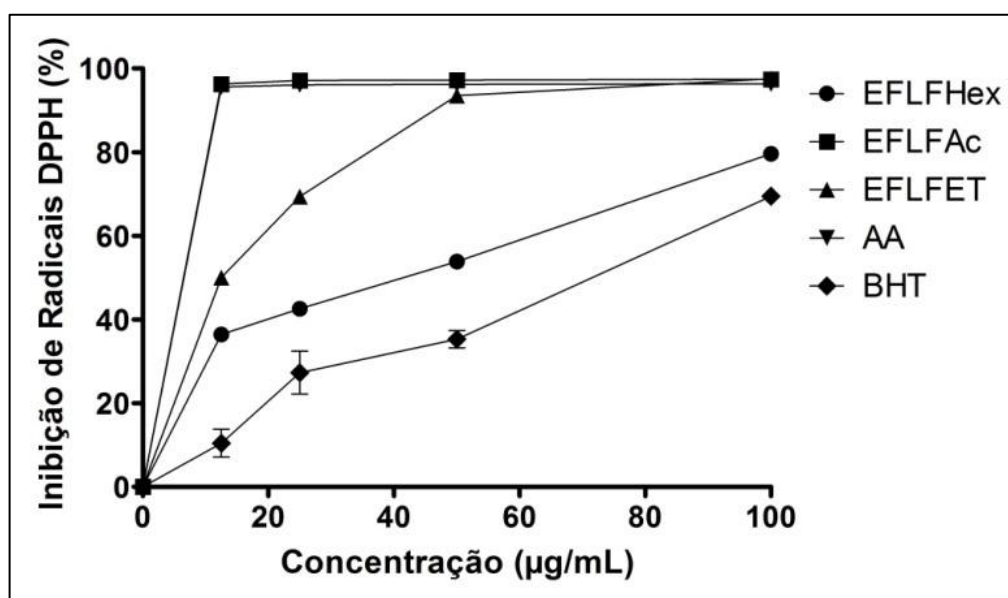


FIGURA 35 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH\* das partições das Flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/ml no teste de atividade sequestrante de radicais DPPH.

## FOLHAS:

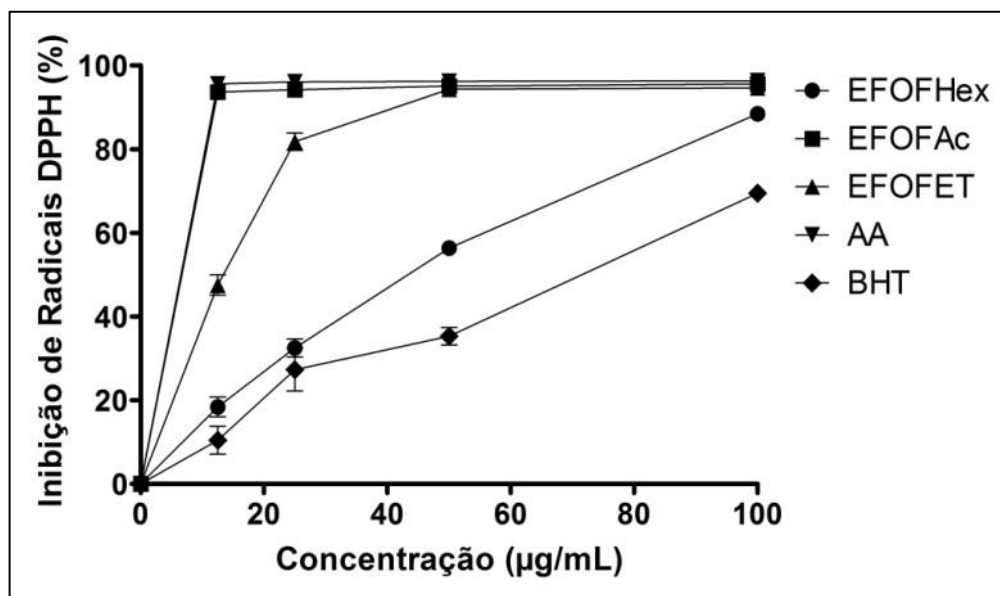


FIGURA 36 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH<sup>•</sup> das partições das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/ml no teste antioxidante.

## FRUTOS:

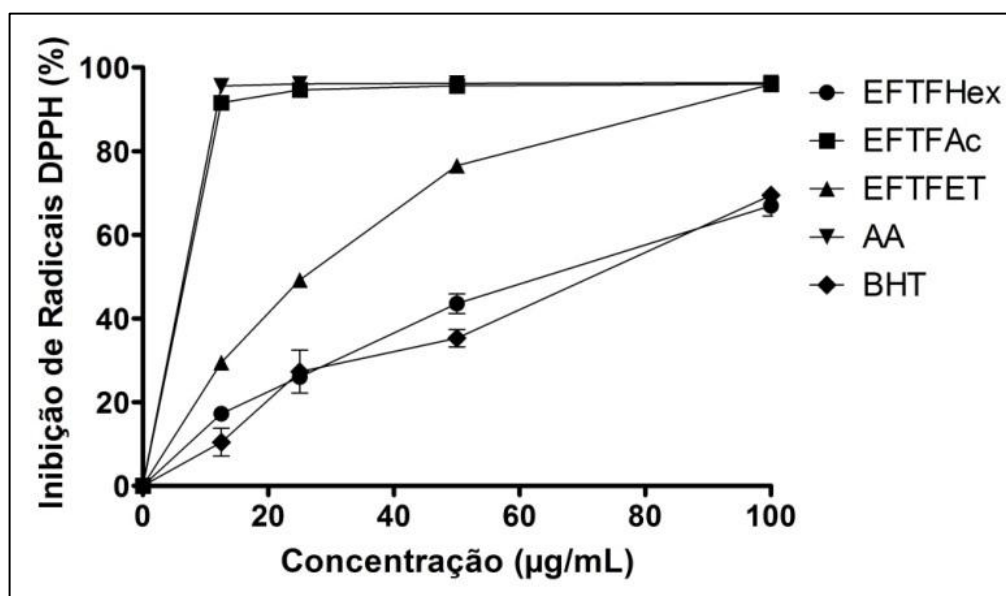


FIGURA 37 - Porcentagem de inibição de radicais DPPH<sup>•</sup> das partições dos Frutos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/ml no teste antioxidante.

Cabe destacar a partição acetato das flores, que apresentou maior ASRL que o padrão BHT em todas as concentrações e maior ASRL que o próprio padrão AA em todas as concentrações, com exceção de 12,5ppm e também resultou em um  $Cl_{50}$  menor que o padrão adotado, demonstrando sua potencialidade como sequestrante de radicais livres.

### 7.3.1.1 DETERMINAÇÃO DO $CI_{50}$ (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA) :

Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos pela regressão linear dos dados de cada fração, admitindo os valores oriundos da equação de reta para cada caso, onde o eixo “y” representa a atividade (%) e o eixo “x” representa a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os valores de  $IC_{50}$  obtidos são demonstrados na Tabela 8:

TABELA 8 - Concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) das partições de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste antioxidante por DPPH<sup>o</sup>, obtidos por regressão linear, com os respectivos desvios padrões.

Extrato	Partição	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
CAULE	ECFHex	103,48 $\pm$ 3,00
	ECFAC	4,49 $\pm$ 0,08
	ECFET	32,61 $\pm$ 11,36
FLORES	EFLFHex	40,56 $\pm$ 1,14
	EFLFAC	2,45 $\pm$ 0,10
	EFLFET	13,77 $\pm$ 6,89
FOLHAS	EFOFHex	48,21 $\pm$ 1,62
	EFOFAC	4,36 $\pm$ 2,27
	EFOFET	10,24 $\pm$ 0,21
FRUTOS	EFTFHex	67,47 $\pm$ 2,57
	EFTAC	5,55 $\pm$ 0,07
	EFTFET	29,14 $\pm$ 0,31
PADRÕES		
AA		3,99 $\pm$ 0,10
BHT		69,51 $\pm$ 1,47

### 7.3.2 QUANTO AO TESTE DO PODER REDUTOR:

O indicativo para quantificar a atividade das partições é dado pelo aumento da absorbância em 700nm, resultando em uma coloração azulada (complexo azul da Prússia), sendo mais intensa quanto mais eficaz se apresentar a amostra.

Assim como o DPPH<sup>o</sup>, as partições acetato de caule, flores, folhas e frutos, proporcionaram melhores resultados. O padrão ácido ascórbico foi melhor que todas as amostras em todas as concentrações, e as partições acetato mostraram resultados próximos ao padrão BHT, como pode ser observado nos resultados mostrados abaixo:

## CAULE:

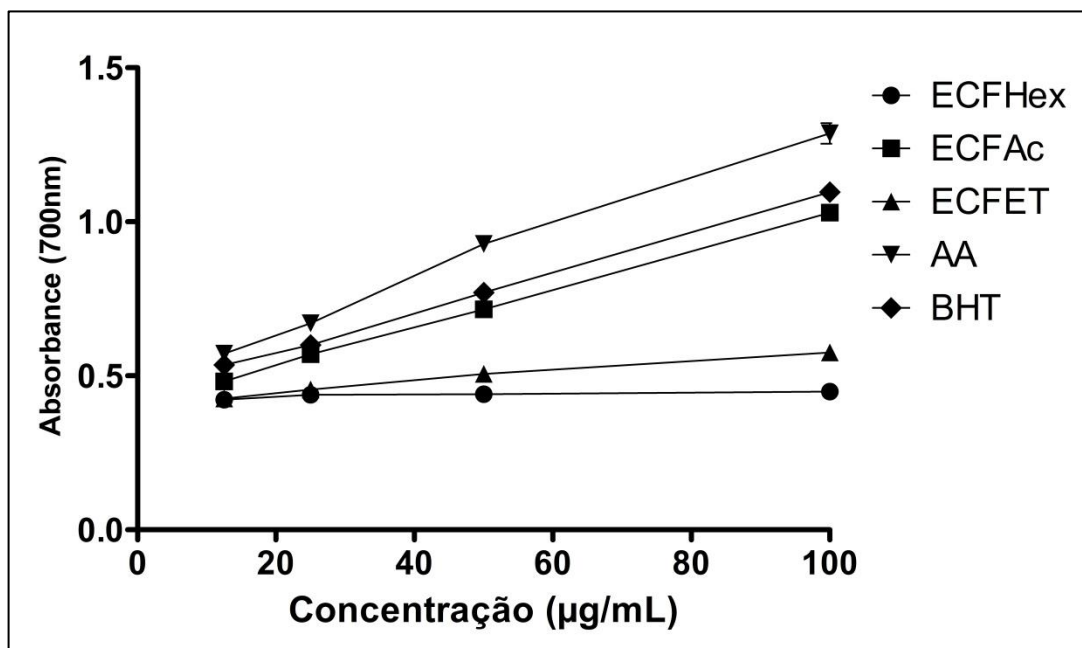


FIGURA 38 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica do Caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.

## FLORES:

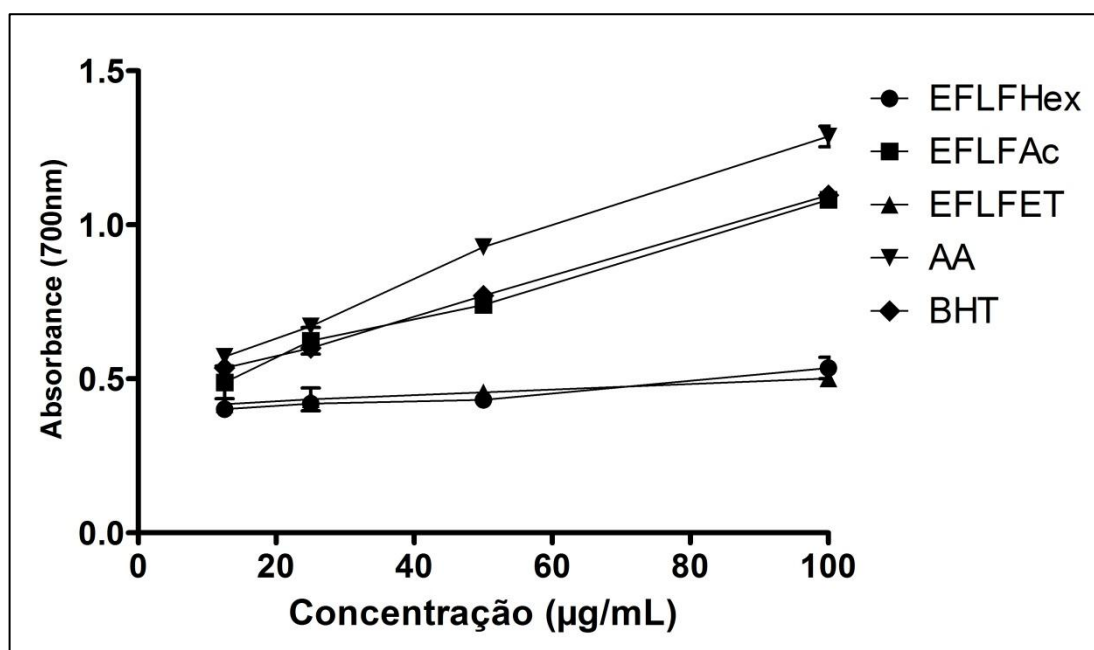


FIGURA 39 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Flores *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.

## FOLHAS:

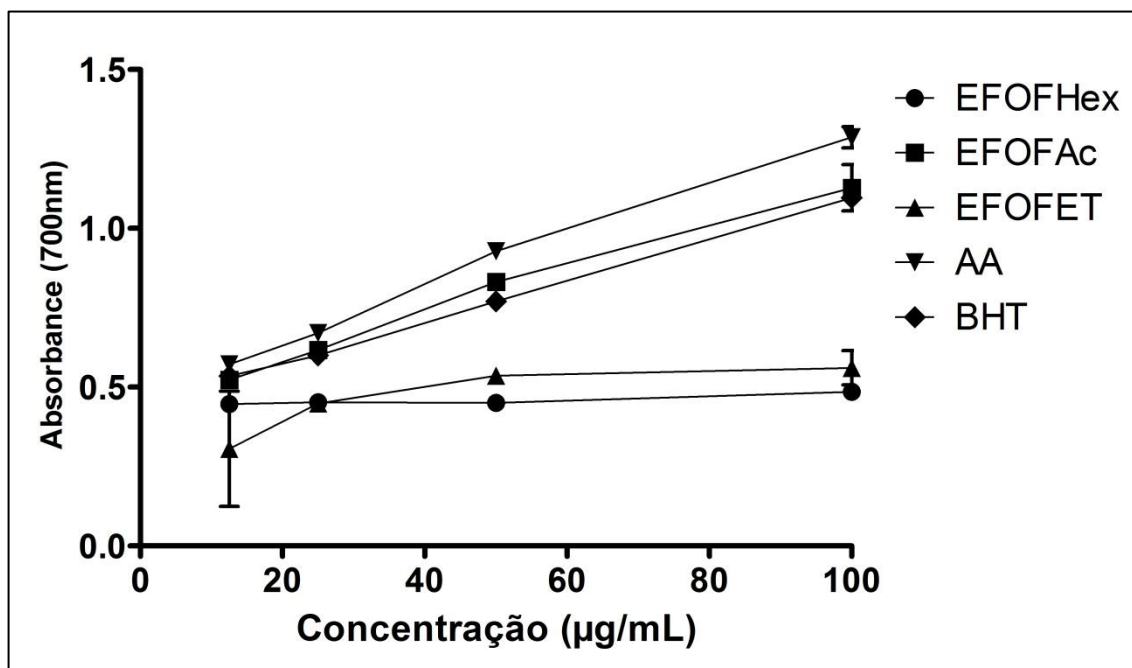


FIGURA 40 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.

## FRUTOS:

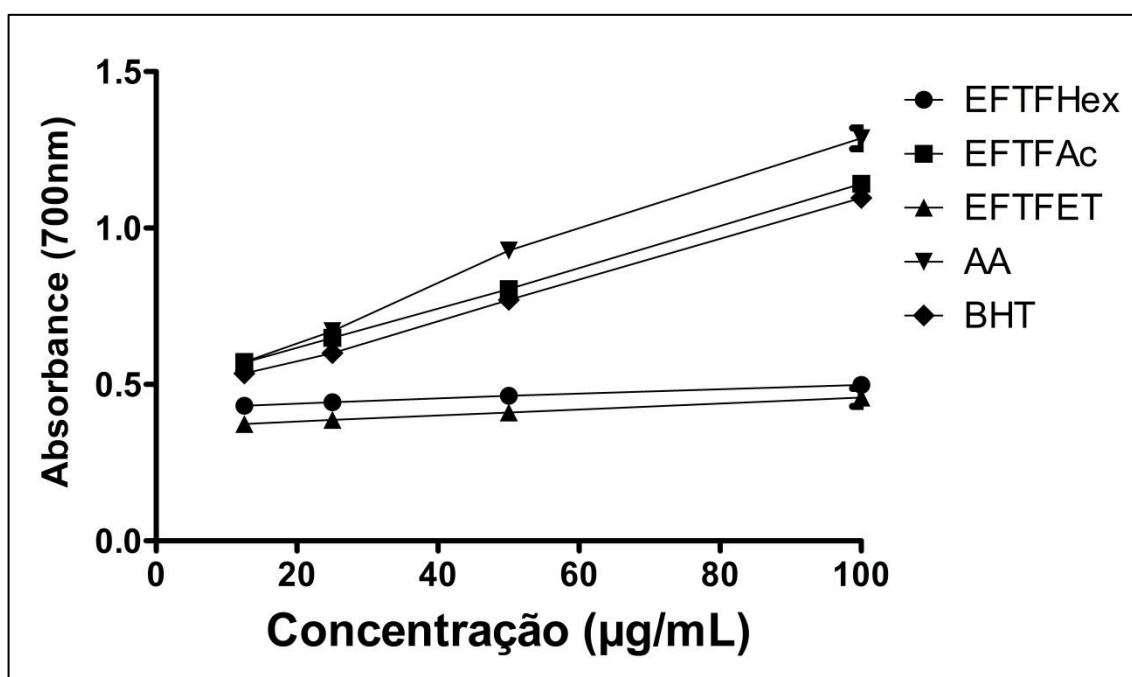


FIGURA 41 - Absorbância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etílica e Hidroalcoólica das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.

Os resultados obtidos pelo teste redutor foram tratados, segundo SANTOS, *et al.*, 2007, oferecendo resultados que demonstram a atividade redutora das partições em porcentagem de aumento na absorvância em 700nm em relação ao branco (Tabela 9).

TABELA 9 - Porcentagem de aumento de absorvância em 700nm para as partições Hexânica, Aceto Etilica e Hidroalcoólica das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL pelo teste do poder redutor.

	Extratos	(% ) Aumento de absorvância			
		Partição	12,5ppm	25ppm	50ppm
Caule	Hexânica a	38,27±3,29	35,75±1,08	38,47±2,34	39,59±1,84
	Acetato de etila a	43,83±0,93	52,47±1,86	62,17±0,79	73,70±0,63
	Hidroetanólica a	36,46±2,27	40,53±1,45	46,46±0,83	53,01±0,49
Flores	Hexânica a	34,36±3,25	34,66±2,45	36,31±2,25	49,26±3,41
	Acetato de etila a	44,10±6,49	56,44±2,96	63,42±0,31	74,96±0,57
	Hidroetanólica a	35,13±2,48	37,29±5,14	40,65±2,56	46,00±1,87
Folhas	Hexânica a	39,33±2,52	40,20±0,33	39,97±0,87	44,23±1,92
	Acetato de etila a	48,19±1,22	56,09±1,07	67,42±1,09	75,93±1,60
	Hidroetanólica a	33,22±3,25	39,60±1,53	49,47±1,54	51,43±4,95
Frutos	Hexânica a	37,29±0,95	40,14±1,53	40,67±2,29	45,67±1,10
	Acetato de etila a	52,47±1,13	58,27±0,55	66,36±0,81	76,27±0,23
	Hidroetanólica a	27,61±1,47	29,98±1,37	34,02±2,63	40,79±3,82
	AA a	52,66±1,32	59,66±0,26	70,84±0,45	78,95±0,55
	BHT a	49,47±0,20	54,86±0,43	64,88±0,14	75,30±0,62

Assim como no teste DPPH<sup>•</sup>, as frações acetato das partições obtidas do extrato bruto apresentaram maior atividade redutora, onde o maior destaque é dado para a fração acetato dos frutos. Podendo inferir que a maior atividade é análoga a compostos existentes nos frutos para proteger as sementes de qualquer tipo de estresse, que podem causar a morte celular, inviabilizando o desenvolvimento natural das sementes. Esse tipo de estresse pode ser proveniente da ação de poluentes, herbicidas e metais, que em concentrações excessivas causam alterações metabólicas e fisiológicas irreversíveis, induzindo a planta à produção de compostos que possam interagir com estes agentes externos neutralizando a ação prejudicial (BERNAL, *et al.*, 2007). O padrão AA foi mais eficaz que as partições em todas as concentrações adotadas, entretanto, o poder redutor das partições acetato podem ser comparadas à atividade do padrão AA, enquanto que quando comparadas ao BHT, o poder redutor foi maior para a fração acetato dos frutos em todas as concentrações; o poder redutor das folhas foi maior nas três maiores concentrações; o poder redutor das flores foi maior apenas em 25ppm; e o poder redutor do caule foi maior em apenas em 100ppm.

### 7.3.3 QUANTO AO TESTE FENÓLICOS TOTAIS:

#### 7.3.3.1 ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO:

O teste se baseia na interpolação dos resultados de leitura em UV-vis, obtidos experimentalmente das amostras a serem quantificadas com a curva de calibração padrão do ácido gálico, adquirida experimentalmente, que fornece a equação da reta para o cálculo (Tabela 10):

TABELA 10 - Resultado de Absorbância em 750nm para as soluções formadoras da curva de calibração do ácido gálico, nas concentrações de 0 até 200µg/mL.

(CONC. ug/mL)	RESULTADO (absorbância)			MÉDIA
0	0,03	0,029	0,03	0,029
10	0,041	0,041	0,041	0,041
20	0,062	0,061	0,062	0,061
40	0,097	0,097	0,097	0,097
60	0,141	0,152	0,16	0,151
80	0,18	0,175	0,185	0,180
100	0,215	0,214	0,215	0,214
120	0,262	0,259	0,261	0,261
140	0,318	0,31	0,317	0,315
160	0,329	0,333	0,353	0,338
180	0,377	0,387	0,407	0,390
200	0,43	0,43	0,43	0,43

Para a construção da curva de calibração, que fornecerá os dados da equação de reta para possibilitar o cálculo de equivalentes de ácido gálico, os resultados foram apresentados na sua média, onde  $R^2$  experimental foi de 0,9978 (Figura 42):

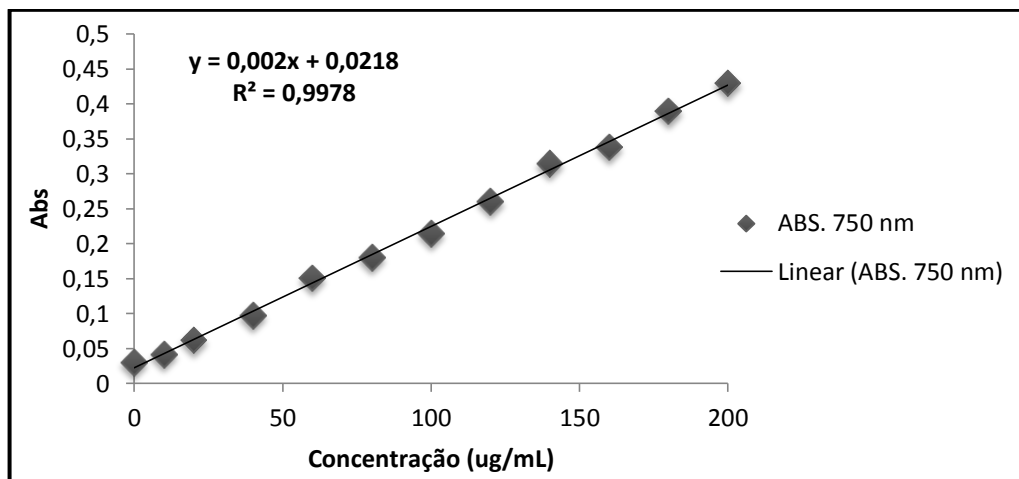


FIGURA 42 - Curva de calibração obtida após a plotagem dos dados de absorvância das soluções padrões de ácido gálico nas respectivas concentrações para a obtenção do coeficiente de relação.

Com a equação de reta (Figura 42)  $A=0,002C + 0,0218$ , onde A = absorvância em  $\lambda = 750\text{nm}$  e C = a concentração relativa de equivalentes de ácido gálico/g (coeficiente de relação  $R^2=0,9978$ ) referente ao padrão, pode-se inferir sobre a concentração de compostos fenólicos presente nas amostras.

TABELA 11 - Absorbância resultante em 750nm para o teste FENÓLICOS TOTAIS para as partições dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*

Partição	1	2	3	MÉDIA	RESULT.	EAG/g	%
<b>Caule</b>							
Hexano	0,108	0,108	0,107	0,1077(±0,0006)	42,93	286222,2	<b>28,62</b>
Acetato	0,17	0,171	0,179	0,1733(±0,0049)	75,76	505111,1	<b>50,51</b>
H.Alcoólica	0,122	0,12	0,121	0,1210(±0,001)	49,6	330666,7	<b>33,07</b>
<b>Flores</b>							
Hexano	0,082	0,079	0,081	0,0807(±0,0015)	29,43	196222,2	<b>19,62</b>
Acetato	0,164	0,168	0,166	0,1660(±0,002)	72,1	480666,7	<b>48,07</b>
H.Alcoólica	0,1	0,096	0,0102	0,0687(±0,0507)	23,46	156444,4	<b>15,64</b>
<b>Folhas</b>							
Hexano	0,113	0,102	0,102	0,1057(±0,0063)	41,93	279555,6	<b>27,96</b>
Acetato	0,179	0,177	0,176	0,1773(±0,0015)	77,76	518444,4	<b>51,84</b>
H.Alcoólica	0,134	0,131	0,131	0,1320(±0,0017)	55,1	367333,3	<b>36,73</b>
<b>Frutos</b>							
Hexano	0,094	0,092	0,091	0,0923(±0,0015)	35,26	235111,1	<b>23,51</b>
Acetato	0,167	0,165	0,167	0,1663(±0,0012)	72,26	481777,8	<b>48,18</b>
H.Alcoólica	0,112	0,109	0,109	0,1100(±0,0017)	44,1	294000	<b>29,40</b>
<b>E.B.E.</b>							
Caule	0,109	0,107	0,107	0,1077(±0,0012)	42,93	286222,2	<b>28,62</b>
Flores	0,12	0,117	0,117	0,1180(±0,0017)	48,1	320666,7	<b>32,07</b>
Folhas	0,14	0,139	0,139	0,1393(±0,0006)	58,76	391777,8	<b>39,18</b>
Frutos	0,114	0,114	0,114	0,1140(±0,0000)	46,1	307333,3	<b>30,73</b>

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama são apresentados na Tabela 12. *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* é rica em compostos fenólicos, mostrando concentrações significativas, assim como descrito para outras representantes da família (ZAMBLÉ, *et al.*, 2008; JUN, *et al.*, 2008).

Concentração expressiva foi relatada principalmente no extrato bruto das folhas, com destaque para as frações acetato de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:

TABELA 12 - Porcentagem de compostos fenólicos para os constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* em suas respectivas partições. Resultado apresentado em Equivalentes de Ácido Gálico.

Extrato		
	Partição	%
	ECFHex	28,62±0,19
CAULE	ECFAc	50,51±1,64
	ECFET	33,06±0,33
	EFLFHex	19,62±0,51
FLORES	EFLFAc	48,07±0,67
	EFLFET	25,84±1,02
	EFOFHex	27,95±2,12
FOLHAS	EFOFAc	51,84±0,51
	EFOFET	36,73±0,58
	EFTFHex	23,51±0,51
FRUTOS	EFTAac	48,18±0,38
	EFTFET	29,40±0,58
EXTRATOS BRUTOS DE	CAULE	28,62±0,38
	FLORES	32,07±0,58
	FOLHAS	39,18±0,19
	FRUTOS	30,73±0,00

Os resultados para as flores, evidenciando elevada ASRL e a menor concentração de compostos fenólicos, levam a inferir de maneira preliminar, que compostos polifenólicos com características adequadas para a atividade antioxidante, como por exemplo, o grupo catecol, estejam presentes e sejam responsáveis pela melhor neutralização do radical DPPH\*.

Todos os extratos avaliados apresentaram altos teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies do gênero, descritos na literatura (SHUKA, *et al.*, 2009). Quando comparado aos níveis de compostos fenólicos encontrados em clássicos antioxidantes naturais, as uvas *Vitis vinífera*, *C. peltophoroides* apresentou maior concentração desta classe de compostos quando comparada com o trabalho realizado por SANTOS, *et al.* 2011.

Sabendo que substâncias naturais podem ser responsáveis pela proteção contra os riscos de muitos processos patológicos envolvidos com processos oxidativo no organismo, os resultados acima descritos estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.

## **8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**

A atividade antimicrobiana dos E.B.E. do caule, flores, folhas e frutos, juntamente com suas partições hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica, foi avaliada pela técnica de difusão em Agar conforme documento M44A2 (CLSI, 2009) e M7A6 (CLSI, 2003) para fungos e bactérias respectivamente; foram utilizados o meio Agar Mueller Hinton para as bactérias e Agar Mueller Hinton + 2% de glicose para as leveduras. Os meios de cultura foram preparados e adicionados em placas de Petri de 150 mm de diâmetro, até que uma espessura de 4 mm de camada de Agar seja obtida. Os extratos e partições, sob avaliação, foram preparadas em DMSO e avaliadas na concentração de 100 µg/mL.

### **8.1 MICRORGANISMOS:**

Leveduras do gênero *Candida*: *Candida albicans* ATCC 09548, *Candida krusei* ATCC 6258. Bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922. As amostras de bactérias serão mantidas em agar BHI e os fungos, em Agar Sabouraud, a 8°C, até o momento de realização dos testes (CLSI, 2003; 2009).

### **8.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA:**

O teste de sensibilidade com leveduras foi realizado através da técnica de difusão em Agar com modificações. Para a realização do teste, as leveduras foram repicadas em Agar Sabouraud e mantidas a 35°C por 24h.

A suspensão será preparada através do inóculo das colônias de leveduras em 5mL de salina estéril e padronizada de acordo com a escala 1 de Mac Farland. O inóculo será

espalhado sobre a superfície do meio de cultura Agar Mueller Hinton suplementado com 2% de glicose. Após, as placas serão incubadas por 15min a 35°C.

Volumes correspondentes a 5µL dos derivados, a 100µg/mL, serão analisados. O antifúngico anfotericina B (2µg/mL), solução salina e o solvente DMSO serão utilizados como controle positivo e solução salina (0,85%) como controle negativo dos testes. Após, as placas serão incubadas a 35°C e a leitura será realizada após 24h e 48h. Os ensaios serão realizados em duplicata. (CLSI, 2003; 2009)

### **8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA:**

O teste de sensibilidade com bactérias será realizado através da técnica de difusão em Agar com modificações. Para a realização do teste, as bactérias serão repicadas em Agar BHI e mantidas a 37°C por 24h.

A suspensão será preparada através da inoculação das colônias bacterianas em 5mL de salina estéril (0,85%) e padronizada de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland. 3mL do inóculo serão espalhados sobre o meio de cultura em placa de Petri.

Volumes correspondentes a 5µL dos derivados, a 100µg/mL, serão avaliados. O antibiótico cloranfenicol (0,5µg/mL), solução salina e o solvente DMSO serão utilizados como controle. Os ensaios serão realizados em duplicata.

### **8.4 INTERPRETAÇÃO:**

Avaliação dos halos de inibição de crescimento microbiano na presença dos extratos brutos e das frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica do caule, flores, folhas e frutos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.

## 8.5 RESULTADOS:

Não houve inibição de crescimento microbiano na presença dos E.B.E. dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* e nem de suas partições. Significando que as substâncias presentes no extrato bruto etanólico e nas partições não atuam como agentes antimicrobianos em se tratando das espécies testadas.

## **9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*:**

Para a determinação da atividade farmacológica dos extratos de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* foram realizados os seguintes testes e suas metodologias:

### **9.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:**

Para a realização dos testes farmacológicos foram utilizados ratos machos adultos Wistar pesando de 200-250g e camundongos machos Swiss pesando de 25-35g obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Foram mantidos em temperatura controlada de 23°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) com acesso a água e alimento *ad libitum* e mantidos a luz controlada em um ciclo de 12:12h luz-escuro sendo as luzes ligadas às 06:00. Os animais se adaptaram ao alojamento com antecedência mínima de uma semana antes do início dos testes. Foram agrupados ao acaso para os testes, permanecendo em jejum por 12 horas antecedentes ao experimento a ser executado. Todos os experimentos foram conduzidos em acordo com a Declaração de Helsinki para o bem-estar animal e com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas.

### **9.2 TESTE DA FORMALINA:**

O método utilizado será baseado no descrito por Santos e Calixto, 1997. Onde é aplicada subcutaneamente 20 $\mu\text{L}$  de solução de formaldeído a 10% na região plantar da pata traseira direita dos camundongos (n=8 camundongos). É observado o tempo que os animais gastam lambendo a pata que recebeu a solução de formalina durante 5 minutos iniciais após a aplicação e por mais 10 minutos, após 20 minutos iniciais da aplicação do estímulo nociceptivo. Serão administrados aos animais os extratos nas doses 30, 100 e 300mg/Kg, veículo (CMC - 10mL/Kg) e indometacina 5mg/Kg via oral (v.o) 1 hora antes da aplicação da formalina e, morfina (10mg/Kg), via intraperitoneal, 30 minutos antes da formalina.

Com base no padrão de respostas é possível estabelecer dois períodos de resposta: primeira fase – chamada neurogênica – durante os primeiros 5min, e segunda fase – inflamatória – durante os próximos 15-30 min. após a injeção.

### **9.3 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA:**

Para a realização do teste de edema de pata induzido por carragenina, grupos de 8 ratos serão tratados com indometacina 10mg/Kg (v.o), veículo 10mg/Kg (v.o), os extratos nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg (v.o). Transcorrido 60 minutos da administração, será induzido o edema pela injeção de carragenina (1000µg/pata) como agente inflamatório no volume de 0,1mL, a qual será aplicada na região plantar de uma das patas posteriores dos ratos, e na outra pata será injetado volume idêntico de solução salina, como controle. Cada pata do animal será imersa até a região tíbio-társica com o uso de um pletismômetro e o edema será expresso como o aumento no volume da pata injetada, comparando os volumes antes, e depois da administração da carragenina em uma, duas, três e quatro horas. (HENRIQUEZ, 1987).

### **9.4 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO:**

A hiperalgesia mecânica é avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos, denominado de teste Von Frey eletrônico. O método consiste no uso de um anesthesiômetro eletrônico, o qual possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1g e o mesmo é calibrado para registrar força máxima de 150g, mantendo a precisão de 0,1g até a força de 80g. O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento, para adaptação ao ambiente, onde os animais foram tocados de 2 a 3 vezes. Espelhos posicionados 25cm abaixo das caixas de

experimentação facilitam a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produza uma resposta de retirada e "sacudida" da pata estimulada. Os estímulos são repetidos até seis vezes, em geral até que o animal apresente três medidas similares com uma nítida resposta de "sacudida" após a retirada da pata. A intensidade da hiperalgesia é quantificada como a variação na força (D de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média dos três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (zero hora ou estado basal) da média de três valores em gramas (força) após a administração de estímulos hiperalgésicos.

A hipernocicepção será induzida pela injeção intraplantar de carragenina 100ug/pata e os efeitos antinociceptivo dos extratos a serem testados pelos filamentos de Von Frey serão registrados para cada animal num total de 6 animais por medida. No ensaio a intensidade do estímulo é automaticamente registrada quando o animal retira a pata da ponta do transdutor. O estímulo da pata é repetido até a obtenção de duas medidas similares.

Após uma hora do tratamento com os extratos, ocorreu a aplicação de carragenina (s.c.) na concentração citada e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal depois de uma e três horas da aplicação da carragenina. O padrão morfina (i.p.) foi aplicado a uma concentração de 1mg/Kg, 30 minutos antes do experimento (CUNHA, *et al.*, 2004).

## **9.5 RESULTADOS:**

### **9.5.1 TESTE DA FORMALINA:**

A injeção subcutânea de formalina gera o aparecimento de uma gama de respostas motoras estereotipadas, o que, por meio da sua quantificação, possibilita a avaliação da intensidade de nocicepção. A resposta nociceptiva à formalina ocorre de maneira bifásica: há um curto período inicial (fase I, com duração de 5 a 10min); posteriormente, após um curto período de remissão de comportamentos, inicia-se a fase II, que consiste em um período mais longo ( $20 \pm 40$ min). Em geral, a resposta inicial é atribuída à ativação direta de nociceptores, enquanto a fase II está associada à liberação de mediadores endógenos locais,

que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares seguido da ativação de nociceptores (SOUZA, *et al.*, 2008). As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sensibilidade a drogas analgésicas. Assim, atribui-se a primeira fase um caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opioides e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é, geralmente, caracterizada como dor de origem inflamatória, sensível aos analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais (LAPA, *et al.*, 2008).

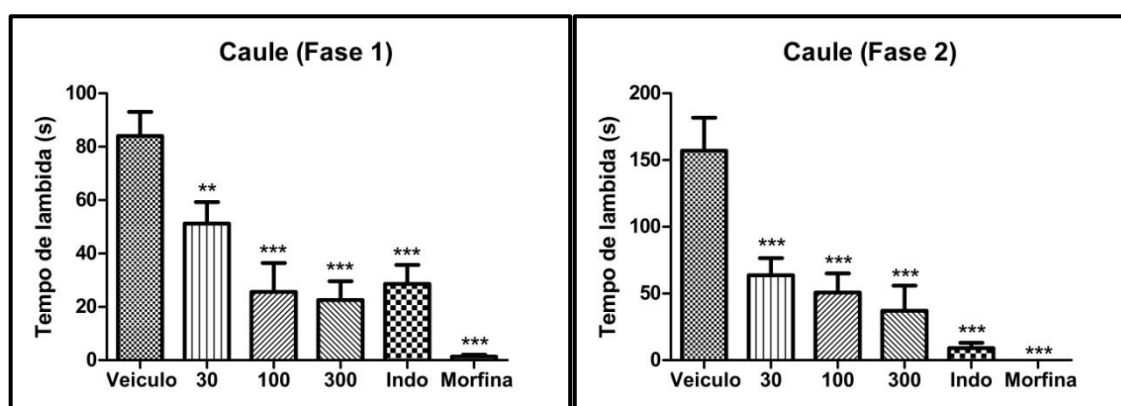


FIGURA 43 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto do Caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nocicepção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2 em mg/Kg. Os valores dentro dos intervalos de confiança \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao veiculo, foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados obtidos no teste da formalina para o extrato bruto etanólico do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, demonstrados na Figura 43 evidenciam que o E.B.E. foi estatisticamente ativo em todas as concentrações adotadas comparado ao veiculo na fase 1 ( $p < 0,01$  para 30mg/Kg e  $p < 0,001$  para 100 e 300mg/Kg), com destaque para as doses de 100 e 300mg/Kg, com valores médios menores que o padrão indometacina em 5mg/Kg; e na fase 2, para todas as concentrações adotadas ( $p < 0,001$  para 30, 100 e 300mg/Kg). O efeito antinociceptivo elevado na fase neurogênica (1) e inflamatória (2) induzida pela formalina mostra que o E.B.E. do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, possui substâncias que contêm atividade analgésica.

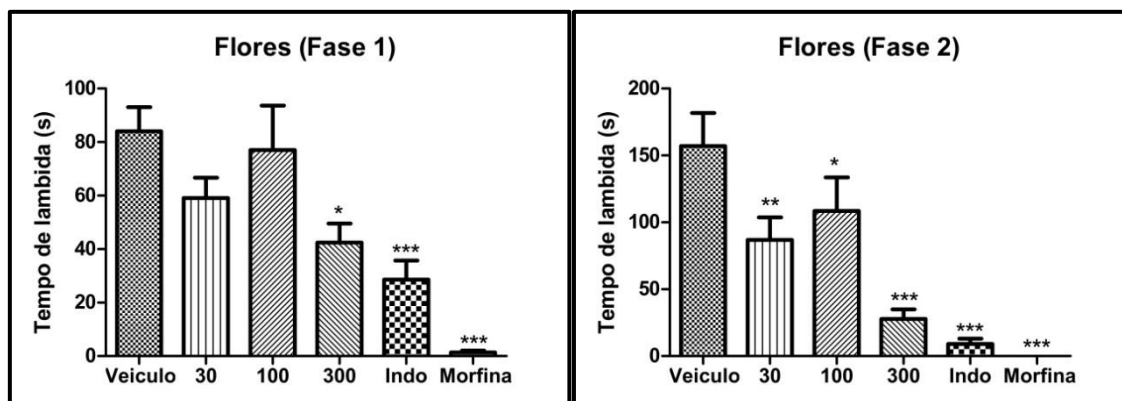


FIGURA 44 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto das Flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nociceção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2. Os valores dentro dos intervalos de confiança \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle positivo foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados obtidos no teste da formalina para o extrato bruto etanólico das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, demonstrados na figura 44, evidenciam que o E.B.E não foi significativamente ativo nas doses de 30mg/Kg e 100mg/Kg na primeira fase, entretanto, foi estatisticamente ativo na dose de 300mg/Kg ( $p < 0,05$ ) e em todas as concentrações na segunda fase, sendo que para 30mg/Kg obteve-se  $p < 0,01$ , para 100mg/Kg, o valor de  $p < 0,05$  e destaque para a dose de 300mg/Kg, com valor de  $p < 0,001$ . O efeito antinociceptivo significativo na fase neurogênica (1) e inflamatória (2) induzida pela formalina mostra que o E.B.E. das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, pode conter substâncias que, quando isoladas, apresentem atividade analgésica.

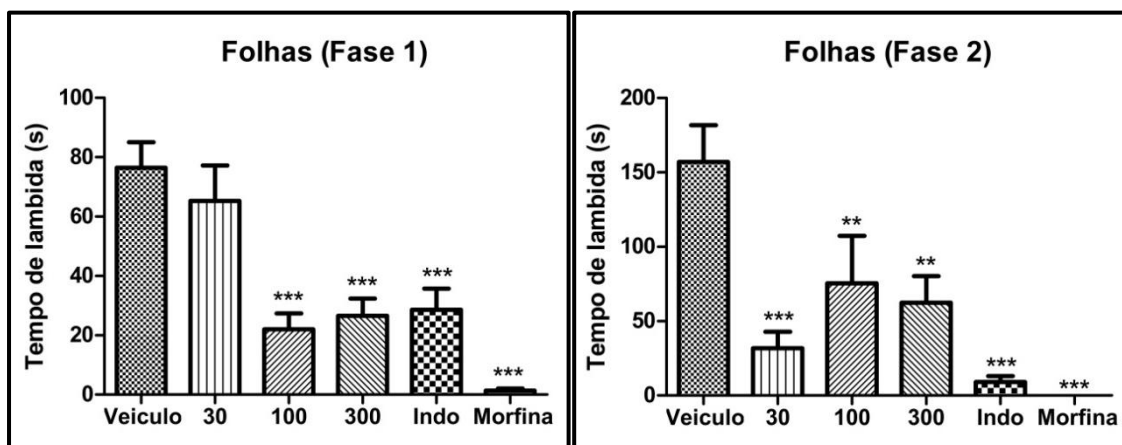


FIGURA 45 - Avaliação da atividade analgésica do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pelo teste de nociceção induzida por formalina em ratos nas fases 1 e 2. Os valores dentro dos intervalos de confiança \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle positivo foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados obtidos no teste da formalina para o E.B.E. das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, demonstrados na Figura 45, mostram que, na primeira fase, o E.B.E. não foi significativamente ativo na dose de 30mg/Kg, entretanto, se apresentou estatisticamente ativo nas doses de 100mg/Kg, 300mg/Kg, ambos com valores de  $p < 0,001$ , onde, na dose de 100mg/Kg o E.B.E. das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* mostrou atividade equivalente ao padrão indometacina. A dose de 30mg/Kg, que não foi ativa na primeira fase, foi mais ativa na segunda fase, mostrando que os compostos existentes no extrato tem atuação na fase inflamatória da dor. O efeito antinociceptivo significativo na fase neurogênica (1) e inflamatória (2) induzida pela formalina mostra que o E.B.E. das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, pode conter substâncias que apresentarão atividade analgésica quando isoladas.

### 9.5.2 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA:

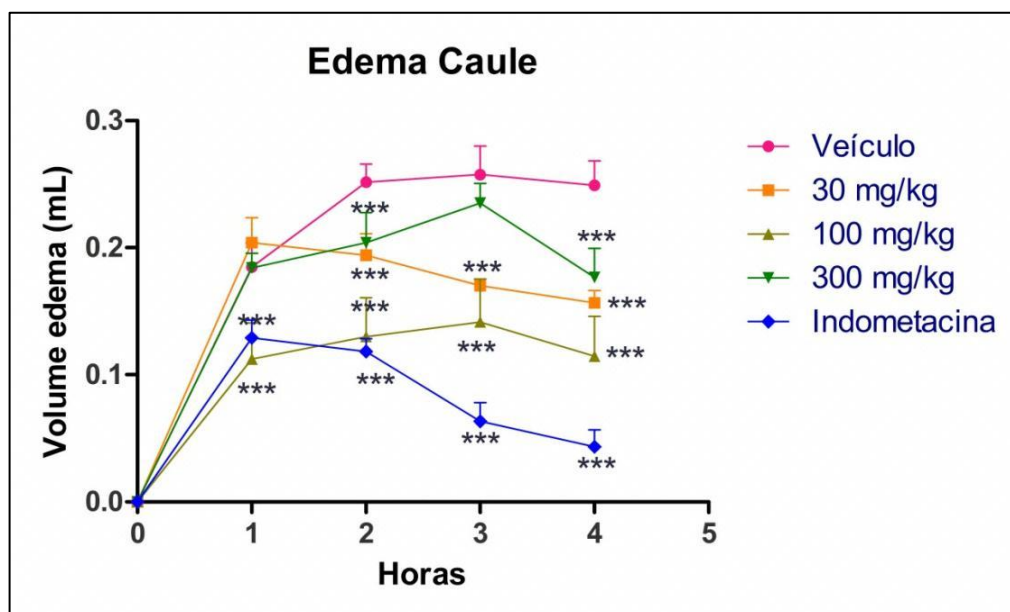


FIGURA 46 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

A variação do volume da pata provocado pelo agente inflamatório nos tempos 1h, 2h, 3h, e 4h foi considerado como o edema resultante na pata do animal pela agressão do agente inflamatório (carragenina 0,1mg/pata no volume de 0,1ml). Esta substância aumenta os níveis de prostaglandinas, como foi demonstrado por NORTHEY, *et al.*, (1999).

A figura 46 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (1%; s.c.) com o E.B.E. do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas doses de 30,100 e 300mg/Kg (v.o.), utilizando indometacina (10mg/Kg v.o.) como controle positivo, que é um AINE padrão para este teste. Os resultados obtidos indicam que o E.B.E. causou, na primeira hora e dose de 100mg/Kg, melhor redução de edema que o padrão indometacina, entretanto, na segunda e terceira horas houve aumento no volume da pata, indicando o aumento do edema, que, novamente decaiu na hora 4. Contudo, os valores de atividade anti-inflamatória do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* se mostraram medianos nos valores estatisticamente ativos com  $p < 0,001$ . A concentração mais efetiva para o tratamento da inflamação mediada por carragenina no presente resultado foi dada em 100mg/Kg, com 39,46% de inibição na primeira hora, 48,41% na segunda hora, 44,75%

na terceira e 53,81% na quarta hora, os resultados apresentaram o intervalo de confiança de  $p < 0,001$ . O padrão indometacina apresentou 30,27%, 53,17%, 75,49% e 82,73% de inibição, respectivamente para as horas 1, 2, 3 e 4, do experimento.

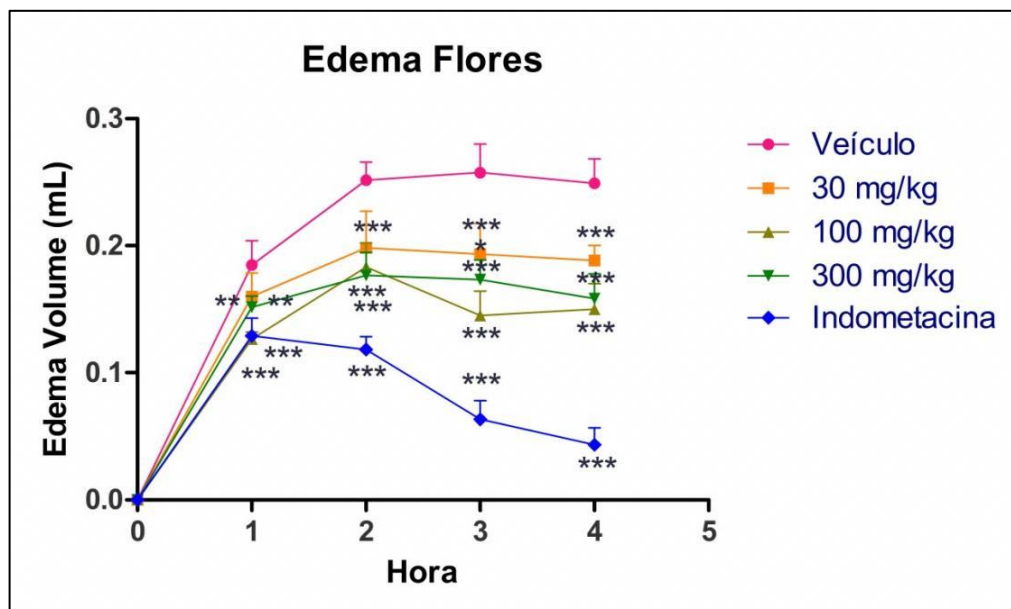


FIGURA 47 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das Flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Na figura 47, os resultados apresentados inferem sobre o teste de edema de pata induzido por carragenina (1%; s.c.) com o E.B.E. das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas doses de 30,100 e 300mg/Kg (v.o.), utilizando indometacina (10mg.Kg<sup>-1</sup>v.o.) como controle positivo, que é um AINE padrão para este teste. Os resultados demonstram que a atividade anti-inflamatória do E.B.E. das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* é de caráter médio, tendo como melhores valores de inibição, a dose de 100mg/Kg, assim como no tratamento da inflamação com o E.B.E. do caule. Os valores de inibição do edema para a dose de 100mg/Kg, nas horas 1, 2, 3 e 4, foram, respectivamente, 31,53%, 27,15%, 43,69% e 39,79%. Enquanto que padrão indometacina apresentou 30,18%, 52,98%, 75,40% e 82,61% de inibição, respectivamente para as horas 1, 2, 3 e 4, do experimento.

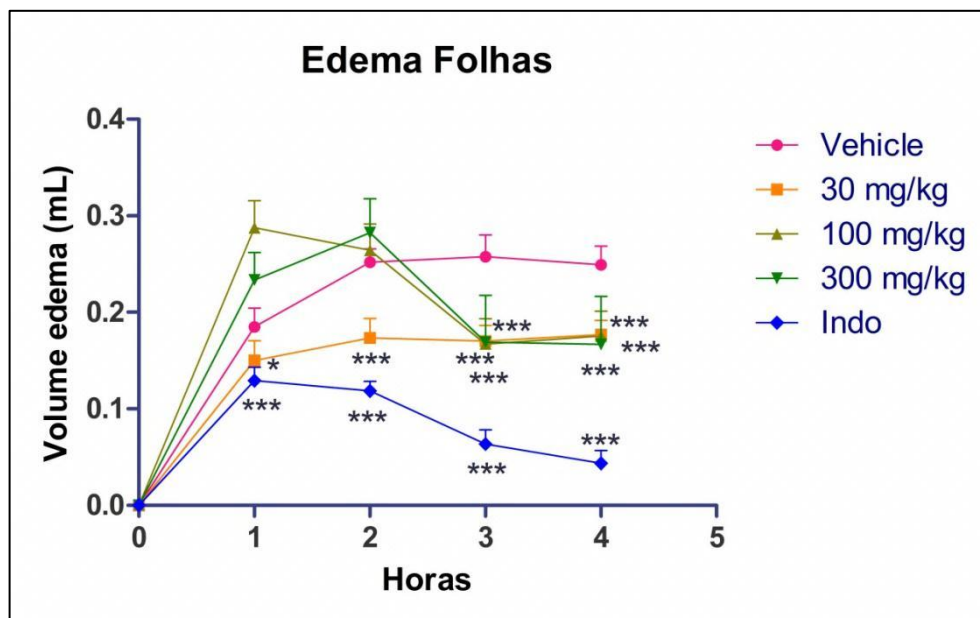


FIGURA 48 - Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das Folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, em ratos, nas quatro primeiras horas experimentais. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

A figura 47 mostra os resultados da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* no modelo de edema de pata induzido por carragenina (1%; s.c.) nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg, utilizando indometacina (10mg.Kg<sup>-1</sup> v.o.) como controle positivo, que é um AINE padrão para este teste. Os resultados demonstram que a atividade anti-inflamatória do E.B.E. das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* é de caráter médio, tendo, na dose de 30mg/Kg, os menores valores de edema nas três primeiras horas. Já as doses de 100 e 300mg/Kg não foram estatisticamente significativas nas primeiras duas horas do teste, apresentando atividade equivalente à de 30mg/Kg na terceira hora. Os valores de inibição do edema mais significativos (em porcentagem) foram 31,13% ( $p < 0,001$ ) para a dose de 30mg/Kg na segunda hora, 33,98%, 35,15% e 34,20%, respectivamente para as doses 30, 100 e 300mg/Kg ( $p < 0,001$ ) na terceira hora do teste. Enquanto que, na quarta hora, os resultados foram próximos a 30% de inibição nas três doses testadas ( $P < 0,001$ ). Os resultados apresentados para o padrão indometacina foram 30,18%, 52,98%, 75,40% e 82,61% de inibição, respectivamente para as horas 1, 2, 3 e 4, do experimento.

### **9.5.3 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO:**

O teste Von Frey eletrônico mede a variação da força crescente aplicada à pata dos ratos, a qual o agente inflamatório foi administrado, no momento exato em que o animal retira a pata, registrando o valor em gramas no instante em que o efeito algésico já não é suportado. Os valores são medidos na hora basal, onde, em condições normais, sem o agente inflamatório, é necessária uma força (em gramas) maior para que o animal realize o movimento de retirada da pata ou “sacudida”. Após a aplicação do agente inflamatório, este valor decai, pois o animal não suporta o mesmo estímulo nociceptivo inicial. A variação é igual às médias das medidas na hora basal (condições normais) menos as médias das medidas após a aplicação do agente inflamatório (carragenina) em uma e três horas de sua aplicação. Quanto maior a variação medida, isto é, quanto menos o animal suportar o estímulo nociceptivo (em gramas), maior será o delta ( $\Delta$ =Limiar de Retirada da Pata) representado no gráfico. Se o extrato testado possuir características antinociceptivas, menor será o delta encontrado em relação à hora basal, indicando que o estímulo nociceptivo não foi tão intensamente percebido como relatado no grupo controle (veículo) (CUNHA, *et al.*, 2004).

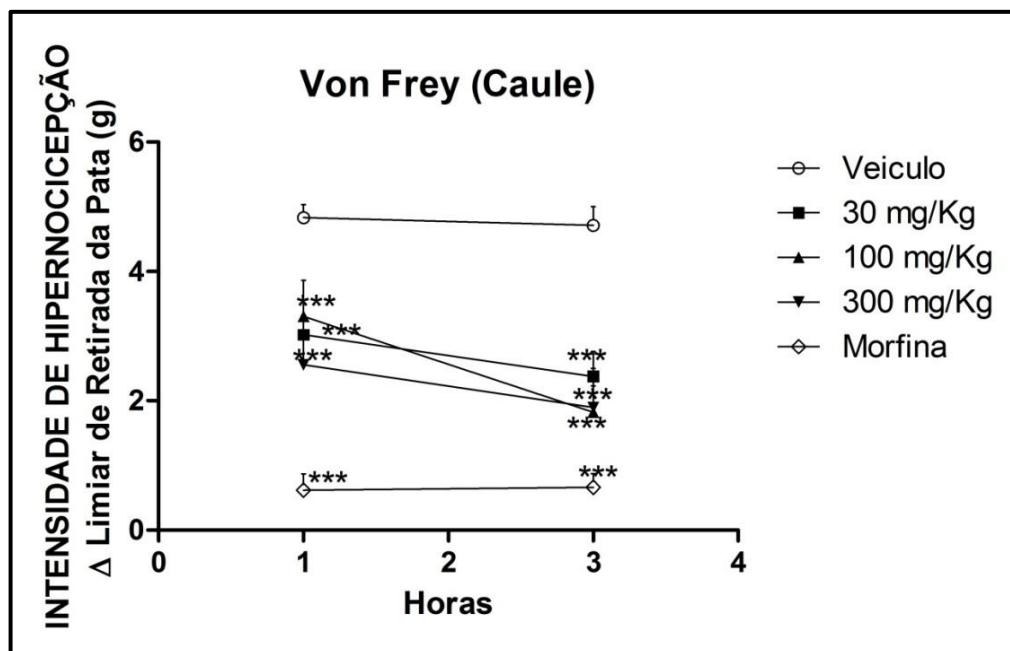


FIGURA 49 - Intensidade de hipernociceção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Os resultados obtidos através do teste Von Frey para o E.B.E. do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* mostram que tanto na primeira hora quanto na terceira hora, todas as concentrações foram estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). As variações dos limiares apresentados foram de caráter médio. Enquanto o veículo apresentou um delta de  $4,87 \pm 0,20$  na primeira hora, as doses de 30, 100 e 300mg/Kg do E.B.E. do caule de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* apresentaram valores de  $3,02 \pm 0,30$ ,  $3,30 \pm 0,55$ ,  $2,55 \pm 0,43$ , respectivamente. Na terceira hora, a dose de 100mg/Kg apresentou a melhor variação dentre as demais, resultando em um limiar de retirada da pata de  $1,82 \pm 0,41$ . O padrão morfina mostrou os melhores resultados com as menores variações do experimento, indicando uma forte atividade antinociceptiva. Para a primeira hora do experimento, sua variação do limiar de retirada da pata foi de  $0,617 \pm 0,025$  e para a terceira hora, o valor registrado foi de  $0,66 \pm 0,21$ .

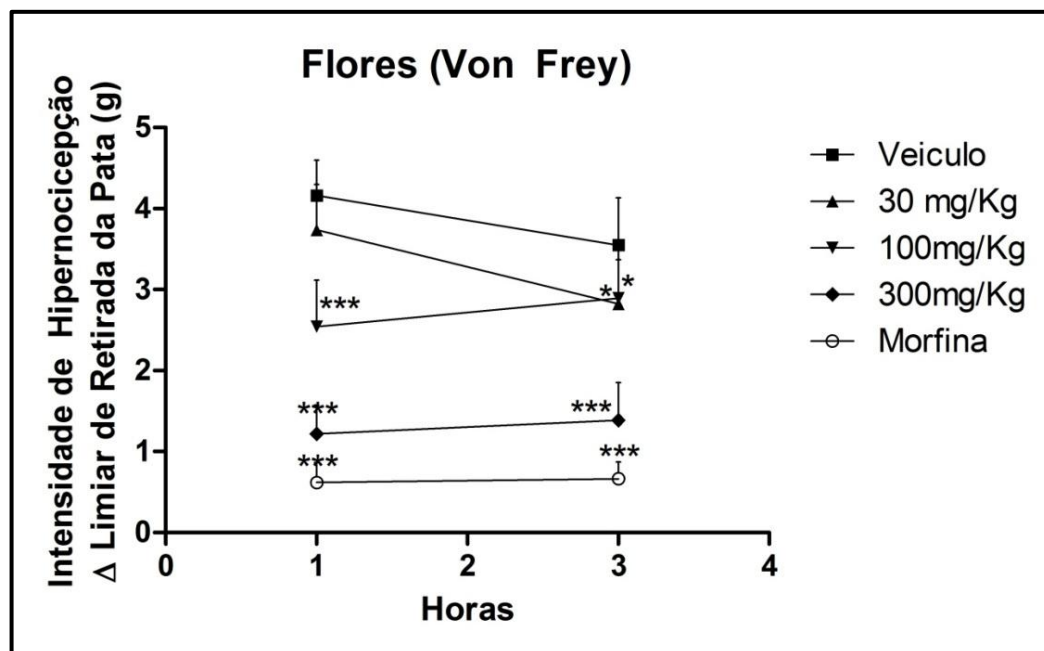


FIGURA 50 - Intensidade de hipernociceção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

O teste de Von Frey eletrônico realizado para o E.B.E. das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* possibilitam visualização da sua atividade antinociceptiva comparada à atividade relatada para um composto padrão, a morfina. Testados nas doses padrões de 30, 100 e 300mg/Kg, o melhor resultado antinociceptivo apresentado foi o da dose de 300mg/Kg, com uma variação do limiar de retirada da pata de  $1,22 \pm 0,35$  para a primeira hora, e uma variação de  $1,38 \pm 0,46$  para a terceira hora, ambos com  $p < 0,001$ ). Enquanto que a substância padrão (morfina) apresentou resultados de  $0,617 \pm 0,25$  para a primeira hora do experimento e, para a terceira hora, o valor registrado foi de  $0,66 \pm 0,21$ . De acordo com os resultados apresentados, o E.B.E das flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* pode conter substâncias que sejam eficazes no tratamento da dor.

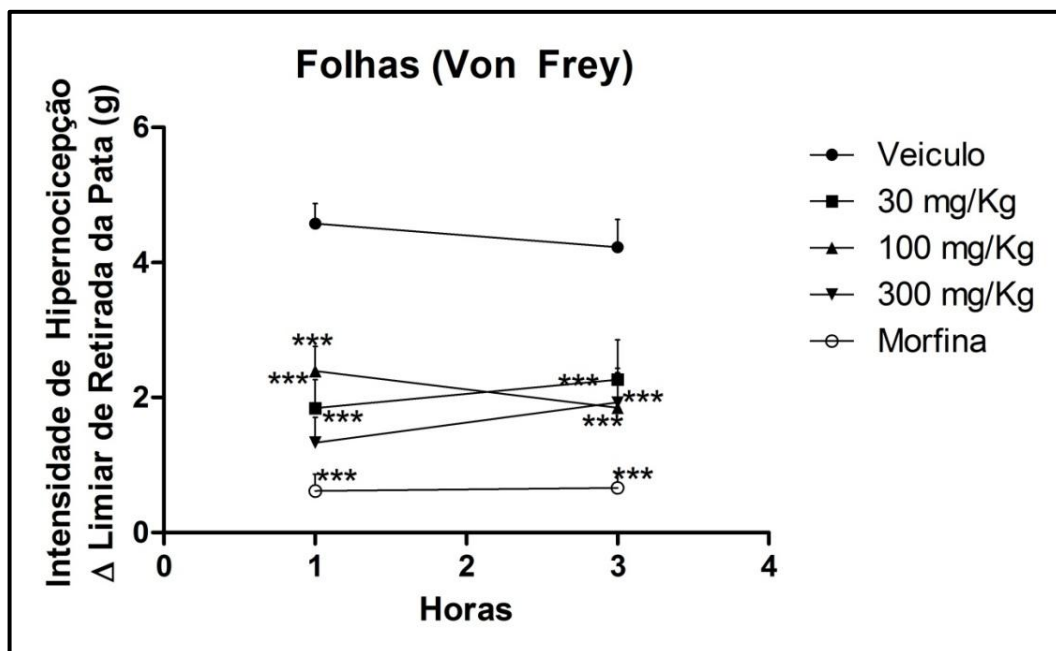


FIGURA 51 - Intensidade de hipernociceção em pata de rato relatada no teste Von Frey eletrônico para o extrato etanólico bruto das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

A quantificação da intensidade de hipernociceção relatada pelo teste de Von Frey eletrônico para o E.B.E. das folhas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* nas doses padrões de 30, 100 e 300mg/Kg, mostra que atividade antinociceptiva é mediana, quando comparada à substância de referência, morfina. Os resultados apresentados para a variação do limiar de retirada da pata para o extrato, na primeira hora foram de  $1,84 \pm 0,42$ ,  $2,39 \pm 0,36$ , e  $1,33 \pm 0,37$ , respectivamente para as doses de 30, 100 e 300mg/Kg. Entretanto, na terceira hora, nenhum valor apresentou maior atividade que o E.B.E. na primeira hora do experimento na dose de 300mg/Kg. Na terceira hora, nota-se que apenas a dose de 100mg/Kg apresentou redução no limiar de retirada da pata, e as demais não foram capazes de reduzir a hipernociceção.

Sabendo que o pico de hipernociceção da carragenina é situado na terceira hora de sua aplicação, espera-se que para uma melhor atuação do agente anti-inflamatório (o extrato aplicado nas doses padrões) ocorra uma diminuição dos sintomas referentes à dor e à inflamação (PERAZZO, *et al.*, 2007).

## 10 CONCLUSÕES:

Não há, na literatura, estudo algum sequer sobre os temas tratados neste trabalho para a espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, trazendo resultados inéditos para esta representante do gênero *Caesalpinia*, mostrando sua potencialidade bio-farmacológica quanto aos testes realizados. O que futuramente poderá vir a ser de utilidade para a sociedade quanto sua ação farmacológica.

O estudo da atividade antioxidante dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* mostrou que principalmente a fração acetato de etila das flores, por apresentar melhor ASRL que o padrão AA, deve ser trabalhada no sentido de isolamento das substâncias existentes na fração e a posterior realização dos testes farmacológicos com as substâncias isoladas.

O resultado apresentado pelo teste antimicrobiano para o extrato bruto e partições do caule, flores, folhas e frutos, não foram ativos, mostrando que os compostos presentes no extrato não são ativos ou se apresentam em concentrações mínimas. Entretanto, os compostos isolados podem ser testados a fim de averiguar sua potencialidade antimicrobiana em relação aos micro-organismos testados.

Os testes farmacológicos realizados (Teste da Formalina, Teste de Edema de Pata e Von Frey Eletrônico) determinaram o perfil farmacológico dos extratos brutos etanólicos quanto suas atividades anti-inflamatórias e analgésicas, mostrando que foram muito significativos, em se tratando de extratos brutos, que são matrizes orgânicas complexas, com muitas substâncias presentes. Portanto, o teste com substâncias isoladas provenientes dos constituintes de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* poderá proporcionar substâncias com perfil anti-inflamatório e analgésico, uma vez que os seus extratos apresentaram atividade.

A classe dos biflavonoides é rara, onde apenas algumas espécies de plantas produzem estas estruturas em suas vias metabólicas. Até o presente momento, com as pesquisas realizadas em bases de dados científicos, a estrutura determinada pelas técnicas de IV e RMN 1D e 2D se apresenta inédita. No gênero *Caesalpinia*, até o presente momento,

há relato na literatura de apenas uma espécie que apresenta um biflavonoide como produto de seu metabolismo, esta espécie é a *Caesalpinia pyramidalis*. Portanto, a espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* conta com uma grande contribuição para a quimiotaxonomia do gênero, colaborando, nesta classe de compostos, com o biflavonoide isolado neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z.; Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74, p. 113-123, 2001.

ARCHANA, P.; TANDAN, S. K.; CHANDRA, S.; Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract. **Phytotherapy Research**. v. 19, p. 176-381, 2005.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; KUMAR, N. In vitro and in vivo antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 123, p. 177–180, 2009.

BAE, G. U.; et al. Hydrogen peroxide activates P70s6k signaling pathway. **Biological Chemistry**. v. 274, p. 32596-32602, 1999.

BAHIA, M. V.; DAVID, J. C.; DAVID, J. M. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1297-1300, 2010.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences** v. 78, p. 431-441, 2005.

BERNAL, M. R.; CASES, R. P., YRUELA, I. Foliar and root Cu supply affect differently Fe- and Zn-uptake and photosynthetic activity in soybean plants. **Environmental and Experimental Botany**. v. 60, p. 145-150, 2007.

BOLZANI, V. S.; VIEGAS, C. J.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**. v. 29, p. 326-337, 2006.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**. v. 70, p. 93-103, 2004.

CAMPBELL, W. B.; HALUSHKA, P. V. Autacoides derivados dos lipídeos. In GOODMAN & GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas Da Terapêutica**. 9. ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 438-49, 1996.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p. 175-178, 1996.

CHOI, B. M. et al. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression on heme oxygenase-1. **BioFactors**. v. 30, p. 149-157, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standard** 6. ed. M7-A6. Wayne, PA, USA: 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. **Approved Guideline**. 2. ed. M44-A2. Wayne, PA, USA: 2009.

CUNHA, T. M. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**. v. 37, p. 391-3999, 2004.

DAS, B. et al. Isolation, synthesis, and bioactivity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 57, p. 1139-1141, 2009.

DEMAIN, A. L. Antibiotics: Natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**. v. 29, p.821-842, 2009.

DEVI, R. A. et al. Analgesic activity of *Caesalpinia bonducella* flower extract. **Pharmacological Biology**. v. 46, p. 668–672, 2008.

DI, V. M. A. V.; FREITAS, A. C. C. Inflamação, tratamento e avanços recentes na terapia de doenças inflamatórias. **Revista de Ciências Biológicas e Saúde**. v.2, p. 37-67, 2001.

DU, L. et al. Brazilein, an important immunosuppressive component from *Caesalpinia sappan* L. **International Immunopharmacology**. v.6, p. 426-432, 2006.

ELISABETSKY E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 32, p. 235-239, 1991.

EMBRAPA FLORESTAS; CARVALHO, P. E. R. **Sibipiruna (*Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*)** Disponível em:

<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CONT000fu1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fu1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html)> Acesso em 15/mar/2010.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p. 648-656, 2000.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 1-93, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**. v. 5, p. 294-300, 2000.

HENRIQUEZ, M. G. M. O. Mouse paw edema: A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**. v. 20, p. 243-249, 1987.

HONG C. H. et al. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, p.153-159, 2002.

HU, L. et al. Cassanediterpene-lactones from the seed of *Caesalpinia minax* Hance. **Chemistry & Biodiversity**. v. 3, p. 1260-1265, 2006.

JABBAR, A. et al. Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 86-91, 2007.

JUN, H. et al. Antioxidant activity in vitro OF three constituents FROM *Caesalpinia sappan* L. **Tsinghua Science and Technology**. v. 13, p. 474-479, 2008.

KANNUR, D. M.; HUKKERI, V. I.; AKKI, K. S. Adaptogênic activity of *Caesalpinia bonduc* seed extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, p. 327–331, 2006.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase-2(COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, p. 498-512, 2002.

LAPA, A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica. **SBPC - Campinas-SP**, 2008.

LEE, H. et al. Antimicrobial activity of 5-hidroxy-1,4-naphtoquinine isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria. **Food Chemistry**. v. 100, p. 1254–1258, 2007.

LEE, Y. M. et al. Isoliquiritigenin 2'-methyl ether induces growth inhibition and apoptosis in oral cancer cells via hemeoxygenase-1. **Toxicol In Vitro**. v. 24, p. 776-782, 2010.

MARTINS, E. R. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MENDES, N. M. B. Ensaio preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista Saúde Pública**. v. 18, n.5, 1984.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**. v. 47, p. 41-47, 2007.

MURUGANANTHAM, N. et al. Screening of *Caesalpinia bonduc* leaves for antipsoriatic activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, p. 897-901, 2010.

MYERS, R. L. Most Important Chemical Compounds. **Greenwood Press**. p. 37-39, 2007.

NAGUMO, S. et al. Anti-inflammatory constituents of Sappan lignum. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 32, p. 941-944, 2009.

NAKAMURA, S. E. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**. v. 177, p. 119-124, 2002.

NORTHEY, A. Distribution and regulation of cyclooxygenase - 2 in carrageenan -induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 128, p. 853-859, 1999.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, p. 323-333, 2007.

PAULA, D. A. C. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. 2010. 32 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2010.

PAWAR, C. R. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of *Caesalpinia pulcherrima* wood. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v. 46, p. 198-200, 2009.

PELZER, E. L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**. v. 53, p. 421-424, 1998.

PERAZZO, F. F. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 320-325, 2007.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. **Inflamações**. In: BRASILEIRO F.; BOGLIOLO G.; Patologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-143, 1996.

PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 515-521, 2008.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**. v. 18, p. 608-615, 1995.

RAGASA, C. Y.; HOFLEÑA, J. G.; RIDEOUT, J. A. New furanoidditerpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Natural Products**. v. 65, p. 1107-1110, 2002.

RAO, V. C. et al. New efficient synthesis and bioactivity of homoisoflavonoids. **ARKIVOC**. p. 285-294, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglosa*, DC)**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) Universidade de Franca, Franca, 2006.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**. v. 72, p. 807-809, 2001.

SAMPAIO, F. C. et al. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal Ethnopharmacology**. v. 124, p. 289-294, 2009.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v. 31, p. 381-389, 1997.

SANTOS, L. P. et al. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. **Food Research International**. v. 44, p. 1414-1418, 2011.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*coffea arabica*). **Quim. Nova**. v. 30, p. 604-610, 2007.

SHUKLA, S. et al. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food & Chemical Toxicology**. v. 48, p. 61-64, 2010.

SHUKLA, S. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food & Chemical Toxicology**. v. 47, p. 1848-1851, 2009.

SILVA, M. R. A brief history of inflammation. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. (Ed). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlang, v. 50, n. 1, p. 6-25, 1978.

SILVERSTEIN R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. John Wiley & Sons, Rio de Janeiro, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 6.ed. Porto Alegre: **UFRGS/UFSC**, p. 291-320, 2007.

SOUZA, A. M. et al. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, p. 371-379, 2008.

SOUZA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**. v. 30, p. 351-355, 2007.

SRINIVAS, K. V. N. S. et al. Flavanoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 789-793, 2003.

SRINIVASAN, R. et al. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal Ethnopharmacology**. v. 113, p. 284–291, 2007.

SUDHAKAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**. v. 77, p. 378-380, 2006.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **Journal of Clinical Investigation**. v. 108, p. 15-23, 2001.

TORSVLK, V.; OVREÂS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>  
Acesso em: 12/Mar/2012

UDENIGWE C. C.; ATA, A.; SAMARASEKERA, R.; Glutathione S-transferase inhibiting chemical constituents of *Caesalpinia bonduc*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 55, p. 442-445, 2007.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**. v. 47, p. 78-87, 1998.

VIEIRA JÚNIOR, G. **Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração alcaloídica do fruto de *Solanun lycocarpum* A. St.-Hil. (Lobeira)**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2004.

WOLDEMICHAEL, G. M. et al. Constituents of antibacterial extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 58, p. 70-75, 2003.

WOO, H; JEONG, R. B; HAWES, C. M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **Review Biotechnology Letters**. v. 27, p. 365–374, 2005.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **LWT – Food and Science Technology**. v.38, p. 193-200, 2005.

YODSAOUE, O. et al. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Phytochemistry**. v. 71, p. 1756–1764, 2010.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 479-499, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. (Editores: Yunes, R.A.; Calixto, J.B.) **Argos Editora Universitária**, Chapecó, SC, p. 46-76, 2001.

ZAMBLÉ, A. et al. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthamiana* roots. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 112–119, 2008.

ZHANG, Z. et al. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Medica**. v.68, p. 49-54, 2002.

ZHANG, Q. et al. Chemical constituents from the stems of *Caesalpinia decapetala*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 6, p. 168-172, 2008.