



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA
INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARILUZE PEIXOTO CRUZ

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE *Mimosa hostilis* BENTH

Salvador - BA
2013

MARILUZE PEIXOTO CRUZ

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE *Mimosa hostilis* BENTH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Co-Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda

Salvador - BA
2013

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Cruz, Mariluze Peixoto .

Isolamento e identificação de compostos bioativos de *mimosa hostilis* Benth / Mariluze Peixoto Cruz. - 2013.
204 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

Co - orientador: Prof^a. Dr^a. Regiane Yatsuda

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Produtos naturais. 2. Leguminosa. 3. Flavonoides. 4. Antioxidantes. 5. Antimicrobianos. 6. *Mimosa hostilis*. I. David, Jorge Maurício. II. Yatsuda, Regiane. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 583.321

CDU - 547.9

MARILUZE PEIXOTO CRUZ

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DE *Mimosa hostilis* BENTH**

Tese apresentada à Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Química, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química Orgânica.

Defesa em 13 de junho de 2013

Banca examinadora

Jorge Mauricio David – Orientador _____
Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Universidade Federal da Bahia

Regiane Yatsuda – Co-Orientador _____
Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Federal da Bahia

Juceni Pereira de Lima David _____
Doutora em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Universidade Federal da Bahia

Cecília Maria Alves de Oliveira _____
Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Federal de Goiás

Mary Ann Foglio _____
Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Estadual de Campinas

Valéria Belli Riatto _____
Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas
Universidade Federal da Bahia

Aos pequenos
Elias, Felipe, Pedro, Elisa, Eduardo e Laura
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que opera milagres a cada segundo em minha vida e a quem não canso de agradecer.

Aos meus pais **Eliziário** e **Marilene**, que amo de forma incondicional e estão sempre ao meu lado me apoiando, amando, aceitando, ensinando.

A minha irmã **Marlizia**, que é minha metade, meu exemplo, meu espelho, minha cúmplice, minha amiga, minha mãe, que está sempre disposta a me ajudar, ouvir e colocar no colo em todos os momentos.

A meus quase filhos **Elias** e **Elisa** por serem luz em minha vida.

A **Franco**, por estar do meu lado e ser dono dos melhores sonhos.

A dinda **Nuy**, tia **Darcy**, **Silvano** e **Ruama** por me acolherem e proporcionar momentos incríveis.

A minha família de Camaçari **Grande**, **Nina**, **Ítala**, **Gueu**, **Felipe**, **Pedro**, **Jan**, **Ivete**, **Ione**, **vó Ana**, **Saadia** e **Naama** por me apoiarem e tornarem mais leve essa caminhada.

Aos amigos do “projeto de plantas” **Andressa**, **Aparecido**, **Cássia**, **Geysa**, **Gladistone**, **Keila**, **Márcio**, **Manu**, **Maurício**, **Maiana**, **Monique**, **Naira**, **Rafael**, **Saboia**, e especialmente a **Érika**, **Joseline** e **Kelle** pelo empenho, amizade, responsabilidade e compromisso demonstrados.

Aos amigos do “110” e agregados **Bel**, **Bruno**, **Carla**, **Darlan**, **Eliezer**, **Flávio**, **Hugo**, **Igor**, **Jéferson**, **José Cândido**, **Klauber**, **Larissa Loira**, **Marcelo**, **Patrícia**, **Ramine** e **Raul**, principalmente **Clayton** e **Larissa Morena** pelo apoio e troca de experiências.

Aos meus amigos **Anderson**, **Daniela**, **Kalynna**, **Lucas**, **Maise**, **Pollyanna**, **Regiane**, **Robson**, por dividir alegrias, angustias, cachaças, conquistas, lamentações, tristezas, não necessariamente nessa ordem.

Ao meu orientador, professor **Jorge Mauricio David**, pela imensa paciência, pela confiança em me aceitar como orientada e pelos valiosos ensinamentos.

À minha Co-orientadora **Regiane**, minha irmã, com quem divido gabinete, orientações, projetos, a vida, por tudo inclusive os ensinamentos em atividade biológica apresentado nesta tese.

Aos pesquisadores **Avaldo de Oliveira S. Filho**, **Humberto M. Spindola**, **Juliana T. Clemente-Napimoga**, **Marcelo H. Napimoga** e **Pedro Luiz Rosalen**, pela colaboração na identificação da planta e nos testes antimicrobiano, antinociceptivo e anti-inflamatório.

Agradeço aos órgãos de fomento, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq-UNIVERSAL 014/2008; 014/2010), **Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia** (FAPESB/PPSUS 0008/2009) e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pelo financiamento nos projetos envolvidos.

Agradeço também as Instituições que colaboraram para o desenvolvimento da tese como a **Universidade Estadual de Campinas, Universidade de Uberaba e Instituto Chico Mendes.**

Aos professores da UFBA e agregados **Amélia, Anderson, Andrea, Angélica, Braga, Bruno, Cassiara, Cau, Dica, Elenir, Francine, Gil, Laíse, Luciano, Maise, Marco, Raquel, Robson, Sávio, Telma, Tiana e Vanessa,** pela amizade e apoio.

Ao mateiro **Antônio Correia Freire,** pela indispensável ajuda durante as coletas e pelo amor a natureza.

A técnica **Conceição** pela ajuda com materiais essenciais para a pesquisa e a quem eu conto sempre com ajuda, conselhos e admiro a cada dia mais.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada.

“O estudo,
a busca da verdade e da beleza
são domínios em que nos é consentido
sermos crianças por toda a vida.”
Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mimosa hostilis* Benth que é usada para o tratamento de tosse e cicatrização de feridas. O gênero *Mimosa*, pertencente a família Leguminosae e subfamília Mimosaceae (Mimosoideae) que possui cerca de 500 espécies fontes de metabólitos especiais, tais como, alcaloides, compostos fenólicos, terpenoides, saponinas, carotenoides e principalmente flavonoides. Os extratos etanólicos da casca, folhas e galhos de *M. hostilis*, conhecido popularmente como jurema-preta, coletado na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, situado na região de semiárido da Bahia foi analisado por CG-EM onde foram identificados principalmente carboidratos, ácidos graxos, compostos fenólicos e terpenos. Da fração diclorometânica das folhas foram isolados o 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila (FDF1) e ácido 4-hidroxibenzóico (FDF2) e os flavonoides 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1), 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2), 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3), 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4), 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (M5), 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6), 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (M7) e 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (M8), identificados por análises espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , UV e por EM, que apresentaram atividade inibitória de AChE para tratamento da doença de Alzheimer. Os extratos etanólicos apresentaram atividade antioxidante similares aos obtidos pelos controles BHT e α -tocoferol, analisado pelo ensaio do radical DPPH, com destaque para o extrato da casca que possui maior teor de fenólicos totais analisado pelo método de Folin-Ciocalteu. Os extratos também foram avaliados pelo teste do β -caroteno/ácido linoleico, apresentando-se como bons sequestradores de radicais livres, assim como os controles, sendo classificados como bons bloqueadores de reações oxidativas. O extratos etanólicos de cascas e folhas foram testados quanto a CIM e CBM e apresentaram forte ação inibitória para os microrganismos *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o extrato da casca apresentou ainda atividade para *Escherichia coli* ATCC 25922 e o extrato das folhas para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sendo algumas atividades bactericida. Para estreptococos do grupo mutans, foi também realizado o teste de CIMA para testar a atividade antiplaca apresentando forte inibição, com destaque para o extrato das folhas, que foi usado para avaliar a inibição da formação do biofilme dental de *S. mutans* UA159, havendo redução da viabilidade das bactérias e do peso seco do biofilme com o tratamento tópico do extrato quando comparado ao controle clorexidina. O extrato da casca também foi avaliado *in vivo* quanto à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória através dos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, e teste da pressão crescente na pata, a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e avaliação da permeabilidade vascular por azul de Evans, detecção de citocinas por imunofluorescência, ensaio da atividade de mieloperoxidase e análise de expressão proteica mesentérica por *Western Blot*, apresentando inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e inibição do recrutamento de neutrófilos. A fim de encontrar o composto responsável pela ação anti-inflamatória de *M. hostilis* foi sintetizada a isossacuranetina e comparada à ação da sacuranetina isolada que apresentou melhor atividade, embora ainda não seja possível associá-la a atividade do extrato.

Palavras-chave: *Mimosa hostilis*, flavonoides, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

ABSTRACT

This paper describes the phytochemical study and the evaluation of antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antinociceptive activities of the extract and isolates of *Mimosa hostilis* Benth which is a medicinal plant used to treat cough and wound healing. The genus *Mimosa*, belongs to the Leguminosae family and the Mimosaceae (Mimosoideae) subfamily which has about 500 species, sources of special metabolites, such as alkaloids, phenolic compounds, terpenoids, saponins, carotenoids and, mainly flavonoids. The ethanolic extracts of the bark, leaves and branches of *M. hostilis*, popularly known as Jurema-preta, collected in the National Forest Contendas do Sincorá, located in the semiarid region of Bahia were analyzed by GC-MS. These analyses permitted to identify the presence of carbohydrates as the major compounds besides fatty acids, phenolics and terpenes. From dichlorometanic fraction of leaves, it was isolated the ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (FDF1) and 4-hydroxybenzoic acid (FDF2) and flavonoids 5,4'-dihydroxy-7-metoxiflavanona (M1), 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (M2), 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (M3), 5,4'-dihydroxy-7,8-dimethoxy (M4) , 5,7,4'-trihydroxy-3-methoxyflavone (M5), 5,7,4'-trihydroxy-6-metoxiflavanonol (M6), 5,6-dihydroxy-7,4'- dimetoxiflavanonol (M7) and 5-hydroxy-7,8,4'-trimetoxiflavanonol (M8). These compounds were identified by ¹H and ¹³C NMR spectroscopic analysis, UV and MS, 5-hydroxy-7,8,4'-trimetoxiflavanonol (M8) showed inhibitory activity of AChE for treatment of Alzheimer's disease. The ethanolic extracts showed antioxidant activity similar to those obtained by the controls BHT and α -tocopherol, results obtained by DPPH assay with emphasis on the extract of the bark, which has a higher total phenolic content analyzed by Folin-Ciocalteu methodology. The extracts were also evaluated by testing β -carotene/ linoleic acid system presenting themselves as good sequestrants of free radicals, as well as controls and were classified as good blockers of oxidative reactions. The ethanolic extracts of bark and leaves were tested for MIC and MBC and showed strong inhibitory activity for microorganisms *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and the extract from the bark showed activity for *Escherichia coli* ATCC 25922 and leaf extract to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 also presenting some bactericidal activity. To mutans streptococci , was also performed the CIMA test to evaluate the antiplaque activity, showing strong inhibition, especially observed by the leaf extract, which was used to evaluate the inhibition of biofilm formation of *S. mutans* UA159 and decreased viability of bacteria and biofilm dry weight compared to chlorhexidine control by the topical treatment of the extract. The extract of bark were also evaluated *in vivo* for the anti-inflammatory and antinociceptive activity by the writhing test induced by acetic acid, hypernociception induced by intraplantar injection of formalin, and testing the increasing pressure on the paw, the determination of neutrophils migration into the peritoneal cavity and evaluation of vascular permeability by Evans blue, Cytokine detection by immunofluorescence assay, myeloperoxidase activity and mesenteric protein expression analysis by Western blot, showing activity probably by inhibition of proinflammatory cytokine and inhibition of neutrophils migration. In order to find the compound responsible for the anti-inflammatory activity of *M. hostilis*, isosacuranetin was synthesized and compared to the action of the isolated sacuranetin that showed better activity, although it is not possible to associate it with the activity of the extract.

Keywords: *Mimosa hostilis*, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-inflammatory and antinociceptive activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Floresta Nacional Contendas do Sincorá..... 23

CAPÍTULO 1: FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO *Mimosa* (LEGUMINOSEAE)

Figura 1. Estruturas gerais de algumas classes de flavonoides..... 28

Figura 2. Rota biossintética dos flavonoides 29

CAPÍTULO 2: ESTUDO QUÍMICO DE *Mimosa hostilis* BENTH POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS (CG-EM)

Figura 1. Árvore de *Mimosa hostilis* Benth..... 50

Figura 2. Folhas e inflorescência de *Mimosa hostilis*..... 51

Figura 3. Substâncias encontradas em *Mimosa hostilis*..... 52

Figura 4. Equação da reação de silição de grupos hidroxilas..... 57

Figura 5. Cromatogramas de íons totais dos extratos etanólico das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis*..... 58

Figura 6. Cromatogramas de íons totais da fração hexânica das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis*..... 63

Figura 7. Cromatogramas de íons totais da fração em diclorometano das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis* 64

Figura 8. Cromatogramas de íons totais da fração em acetato de etila das folhas (A) e cascas (B) de *Mimosa hostilis*..... 66

Figura 9. Cromatogramas de íons totais das subfrações FHF1 (A), FHF2 (B) e FHF3 (C) das folhas de *Mimosa hostilis*..... 68

Figura 10. Rearranjo de McLafferty característico de éster etílico..... 69

Figura 11. Fragmentações do derivado siliado do ácido hexadecanóico..... 70

Figura 12. Cromatograma de íons totais da subfração FDF1 das folhas de *Mimosa hostilis*..... 70

Figura 13. Espectro de massas do derivado siliado do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila..... 71

Figura 14. Fragmentação do derivado siliado do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila..... 72

Figura 15. Cromatograma de íons totais da subfração FDF2 das folhas de *Mimosa hostilis*..... 73

Figura 16. Espectro de massas do derivado siliado do ácido 4-hidroxibenzóico..... 73

Figura 17. Fragmentação do derivado siliado do ácido 4-hidroxibenzóico..... 74

CAPÍTULO 3: FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Mimosa hostilis* BENTH

Figura 1. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico de *M. hostilis*..... 82

Figura 2. Espectro de RMN ¹³C de **M1** [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]..... 85

Figura 3. Espectro de RMN ¹H de **M1** [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]..... 86

Figura 4. Espectros no UV de **M1** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento..... 87

Figura 5. Cromatograma de íons totais (A) e espectro de massas (B) obtido em CG-EM após derivatização de **M1**..... 88

Figura 6. Fragmento do íon de *m/z* 238 originado da clivagem do anel C pela reação retro Diels-Alder..... 89

Figura 7. Espectro de RMN ¹ H de M2 [300 MHz, DMSO-d ⁶ , δ (ppm)].....	90
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C de M2 [75 MHz, DMSO-d ⁶ , δ (ppm)].....	91
Figura 9. Espectro de DEPT 135° de M2 [75 MHz, DMSO-d ⁶ , δ (ppm)].....	92
Figura 10. Espectros no UV de M2 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	92
Figura 11. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M2	93
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H de M3 [300 MHz, DMSO-d ⁶ , δ (ppm)].....	95
Figura 13. Espectro de RMN ¹³ C de M3 [75 MHz, DMSO-d ⁶ , δ (ppm)].....	95
Figura 14. Espectros no UV de M3 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	96
Figura 15. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M3	96
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H de M4 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	99
Figura 17. Espectro de RMN ¹³ C de M4 [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	100
Figura 18. Espectros no UV de M4 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	100
Figura 19. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M4	100
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H de M5 [300 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)].....	102
Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C de M5 [75 MHz, CD ₃ OD, δ (ppm)].....	103
Figura 22. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M5	103
Figura 23. Espectro de RMN ¹ H de M6 [300 MHz, CO(CD ₃) ₂ , δ (ppm)].....	106
Figura 24. Espectro de RMN ¹³ C de M6 [75 MHz, CO(CD ₃) ₂ , δ (ppm)].....	106
Figura 25. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M6	107
Figura 26. Espectros no UV de M6 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	107
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H de M7 [300 MHz, CO(CD ₃) ₂ , δ (ppm)].....	109
Figura 28. Cromatograma de íons totais (A) e espectro de massas (B) obtido em CG-EM após derivatização de M7	110
Figura 29. Espectros no UV de M7 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	110
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H de M8 [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	112
Figura 31. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de M8	113
Figura 32. Espectros no UV de M8 registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.....	113
Figura 33. Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman.....	115

CAPÍTULO 4: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Mimosa hostilis* BENTH

Figura 1. Teor de Fenólicos totais dos extratos etanólicos da cascas, galhos e folhas de <i>Mimosa hostilis</i> obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu.....	128
--	------------

CAPÍTULO 6: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE *M. hostilis* BENTH

Figura 1. Efeito da casca de <i>M. hostilis</i> no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com diferentes doses do extrato (50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.).....	165
Figura 2. Efeitos do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos pré-tratados por administração subcutânea de morfina (1 mg/Kg), extrato da planta (50, 100 e 200 mg/Kg) ou veículo (etanol 10%, v/v).....	166

Figura 3. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> induzido por formalina 1,5% no edema de pata de camundongos pré-tratados por administração de indometacina (10 mg/Kg em 10 ml/Kg, s.c.) ou extrato (50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.).....	167
Figura 4. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> na inibição da nocicepção mecânica.....	168
Figura 5. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> (50, 100 e 200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 µg/cavidade) induzir peritonite.....	169
Figura 6. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	171
Figura 7. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> sobre as citocinas TNF- α (A) e IL-1 β (B) na produção de exsudato peritoneal determinadas por ELISA.....	171
Figura 8. Efeito sobre a nocicepção inflamatória associada à capacidade do extrato etanólico da casca de <i>Mimosa hostilis</i> em inibir a migração de neutrófilos para o tecido plantar induzida pela Cg, avaliada pela dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	172
Figura 9. Efeito do extrato etanólico da casca de <i>M. hostilis</i> na indução da expressão de ICAM-1 no mesentério dos camundongos e na densidade óptica do <i>Western Blot</i> para ICAM-1 normalizado com a expressão de α -tubulina.....	173
Figura 10. Efeito do extrato da casca de <i>M. hostilis</i> no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com as frações H-hexano, D-diclorometano, A-acetato de etila e B-butanol (100 mg/Kg, s.c.).....	175
Figura 11. Efeito das frações em H-hexano da casca de <i>Mimosa hostilis</i> (200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir peritonite.....	175

CAPÍTULO 7: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ISOSSACURANETINA

Figura 1. Esqueleto da flavanona.....	183
Figura 2. Estrutura da Isossacuranetina e sacuranetina.....	185
Figura 3. Rota utilizada para a síntese de flavanonas.....	189
Figura 4. Espectro na região do Infravermelho da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona.....	190
Figura 5. Espectro na região do Infravermelho de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona.....	191
Figura 6. Espectro na região do Infravermelho da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona.....	192
Figura 7. Estrutura do enol formado da carbonila α,β -insaturação.....	192
Figura 8. Espectro na região do Infravermelho da Isossacuranetina.....	193
Figura 9. Cromatograma de íons totais da isossacuranetina após derivatização	194
Figura 10. Espectro de massas da isossacuranetina após derivatização.....	194
Figura 11. Espectro de massas da sacuranetina após derivatização.....	194
Figura 12. Fragmentos dos íons de m/z 296 e 238 originados da clivagem do anel C da isossacuranetina e sacuranetina pela reação retro Diels-Alder.....	195
Figura 13. Efeito da sacuranetina no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com diferentes doses (12,5 25, 50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.).....	196

Figura 14. Efeito da sacuranetina e isossacuranetina no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com 200 mg/Kg, s.c...	196
Figura 15. Efeito de sacuranetina e isossacuranetina (200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 µg/cavidade) induzir peritonite.....	197

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO *Mimosa* (LEGUMINOSAE)

Tabela 1. Ocorrência dos flavonoides bioproduzidos por espécies do gênero <i>Mimosa</i> ...	30
Tabela 2. Flavanonas encontradas em espécies do gênero <i>Mimosa</i>	34
Tabela 3. Flavonas encontradas em espécies do gênero <i>Mimosa</i>	36
Tabela 4. Flavonóis encontradas em espécies do gênero <i>Mimosa</i>	38

CAPÍTULO 2: ESTUDO QUÍMICO DE *Mimosa hostilis* BENTH POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS (CG-EM)

Tabela 1. Massas das frações obtidas a partir do extrato etanólico de <i>Mimosa hostilis</i>	55
Tabela 2. Constituintes químicos (% área relativa) identificados nos extratos etanólico de folhas, cascas e galhos de <i>M. hostilis</i>	59
Tabela 3. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração hexânica de folhas, cascas e galhos de <i>M. hostilis</i>	61
Tabela 4. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração em diclorometano de folhas, cascas e galhos de <i>M. hostilis</i>	65
Tabela 5. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração em acetato de etila de folhas, cascas e galhos de <i>M. hostilis</i>	67
Tabela 6. Constituintes químicos (% área relativa) identificados nas subfrações FHF1, FHF2 e FHF3 das folhas de <i>M. hostilis</i>	69

CAPÍTULO 3: FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Mimosa hostilis* BENTH

Tabela 1. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona obtidos experimentalmente e (M3) e dados da literatura (sorbifolina).....	97
Tabela 2. Dados de RMN ¹³ C de M5, 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona e 5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavonol.....	104
Tabela 3. Dados de RMN ¹ H M6 e de 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol.....	108
Tabela 4. Dados de RMN ¹ H M7 e de 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol.....	111
Tabela 5. Dados de RMN ¹ H M8, de 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol e de 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavonol.....	114
Tabela 6. Porcentual de inibição da AChE (%I) pela ação de fisostigmina e flavonoides isolados de <i>M. hostilis</i>	115

CAPÍTULO 4: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Mimosa hostilis* BENTH

Tabela 1. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da cascas, folhas e galhos de <i>Mimosa hostilis</i>	130
Tabela 2. Concentração capaz de inibir 50% de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da cascas, folhas e galhos de <i>Mimosa hostilis</i>	131
Tabela 3. Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico dos extratos etanólicos da cascas, galhos e folhas de <i>Mimosa hostilis</i>	132
Tabela 4. Fatores cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico pelos extratos etanólicos de <i>Mimosa hostilis</i>	133

CAPÍTULO 5: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *M. hostilis* BENTH

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e folha de <i>Mimosa hostilis</i> pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	146
Tabela 2. Atividade antimicrobiana das frações em hexano-H, diclorometano-D, acetato de etila-A e butanol-B de cascas e folhas de <i>Mimosa hostilis</i> pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	147
Tabela 3. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e folha e suas frações de hexano, diclorometano e acetato de etila de <i>Mimosa hostilis</i> pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência Celular (CIMA).....	149
Tabela 4. Análise bioquímica quanto à viabilidade bacteriana (ufc/mL), biomassa (determinação do peso seco), polissacarídeos solúveis, solúveis em álcalis e insolúveis do biofilme formado sobre discos de hidroxiapatita tratado com extrato das folhas de <i>M. hostilis</i>	150

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

%AA	porcentagem de atividade antioxidante
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
Ac ₂ O	Anidrido acético
ANOVA	Análise de variância
ATCI	iodeto de acetiltiocolina
BF ₃ OEt ₂	solução etérea de trifluoreto de boro
BHA	Butilhidroxianisol
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	butilidroxitolueno
BSTFA	<i>N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CE ₅₀	concentração eficiente em 50%
CG	Cromatografia Gasosa
Cg	Carragenina
CI ₅₀	concentração inibitória para decrescer em 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMA	Concentração Inibitória Mínima de Aderência
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless Enhancement Polarization Transfer</i> intensificação da distorção por transferência de polarização
DMSO-d ⁶	Dimetilsulfóxido deuterado
D.P.	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] - reagente de Ellman
EAG	equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i> – ensaio imuno-enzimático em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EPS	Polissacarídeos extracelulares
F1	Eficiência da atividade antioxidante no sistema da co-oxidação do β-caroteno /ácido linoleico entre 20 e 60 minutos
F2	Eficiência da atividade antioxidante no sistema da co-oxidação do β-caroteno /ácido linoleico entre 80 e 120 minutos
FHF	Fração Hexânico de Folhas
FLONA	Floresta Nacional Contendas do Sincorá
FT	Fenólicos totais
GP	galato de propila

5-HETE	ácido 5-hidroxiieicosatetraenóico
Hex	hexano
HMPA	hexametilfosforamida
HOAc	Ácido acético
HUESBVC	Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia <i>campus</i> Vitória da Conquista
IAPS	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IV	Espectroscopia de Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
LMW	<i>low molecular weight</i>
LO	Longitudinal
MeOH	metanol
MHz	Megahertz
MPO	Mieloperoxidase
NaEDTA	Etileno diamino tetra acetato de sódio
NaOAc	acetato de sódio
NaOMe	metóxido de sódio
NI	Não identificado
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PG	Prostaglandinas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s.c.	Subcutânea
Sephadex	Separation Pharmacia Dextran
SNC	Sistema Nervoso Central
TBHQ	<i>tert</i> -butilhidroxiquinona
THBP	Tri-hidroxibutilfenona
TMCS	trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilano
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
t _R	Tempo de retenção
ufc	Unidade Formadora de Colônia
UTM	Universal Transverso de Mercator
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
VH	Veículo

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO	21
CAPÍTULO 1: FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO <i>Mimosa</i> (LEGUMINOSEAE)	25
INTRODUÇÃO	26
FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO <i>MIMOSA</i>	29
CATEQUINAS.....	33
CHALCONAS.....	33
FLAVANONAS.....	34
FLAVONAS.....	35
FLAVONÓIS E DERIVADOS.....	37
FLAVONOLIGNANAS.....	40
TANINOS.....	40
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 2: ESTUDO QUÍMICO DE <i>Mimosa hostilis</i> BENTH POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS (CG-EM)	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAIS E MÉTODOS	53
PROCEDIMENTOS GERAIS.....	53
MATERIAL VEGETAL.....	54
PREPARO DOS EXTRATOS.....	54
PREPARO DAS FRAÇÕES.....	54
ANÁLISE DAS FRAÇÕES EM HEXANO E DICLOROMETANO DAS FOLHAS.....	55
IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM <i>M. hostilis</i> POR CG-EM..	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CG-EM.....	57
ANÁLISE DAS FRAÇÕES POR CG-EM.....	61
ANÁLISE DAS SUBFRAÇÕES EM HEXANO DAS FOLHAS.....	67
ANÁLISE DAS SUBFRAÇÕES EM DICLOROMETANO DAS FOLHAS.....	70
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CAPÍTULO 3: FLAVONOIDES ISOLADOS DE <i>Mimosa hostilis</i> BENTH	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAIS E MÉTODOS	80
AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE INIBIÇÃO DA AChE.....	83
RESULTADOS E DISCUSSÃO	83

IDENTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES.....	83
Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1).....	84
Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2).....	89
Identificação de 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3)	94
Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4)	98
Identificação de 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (M5)	101
Identificação de 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6)	105
Identificação de 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (M7)	108
Identificação de 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (M8)	111
AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE INIBIÇÃO DA AChE.....	114
CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
CAPÍTULO 4: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Mimosa hostilis</i> BENTH.....	121
INTRODUÇÃO.....	122
MATERIAIS E MÉTODOS.....	124
DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	125
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	125
Atividade sequestrante do radical DPPH.....	125
Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	127
Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoleico.....	127
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	128
CONCLUSÃO.....	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
CAPÍTULO 5: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE <i>M. hostilis</i> BENTH.....	139
INTRODUÇÃO.....	140
MATERIAIS E MÉTODOS.....	143
ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	143
Microrganismos.....	143
Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	143
Concentração Bactericida Mínima (CBM)	144
ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPLACA E ANTICÁRIE.....	144
Inibição da Aderência Celular de <i>Streptococos</i> do grupo <i>mutans</i> e <i>sobrinus</i> à superfície.....	144
Análise dos extratos sobre os Biofilmes.....	144
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	145
CONCLUSÃO.....	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
CAPÍTULO 6: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE <i>M. hostilis</i> BENTH.....	156
INTRODUÇÃO.....	157
MATERIAIS E MÉTODOS.....	158
COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	158
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA.....	158
Animais.....	158
Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	159

Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina.....	159
Teste de pressão crescente na pata.....	160
Avaliação da migração de neutrófilos.....	161
Deteção de citocinas por imunofluorescência.....	161
Ensaio da atividade de Mieloperoxidase.....	161
Análise de expressão protéica mesentérica por <i>Western Blot</i>.....	162
Avaliação da permeabilidade vascular.....	163
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	163
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	163
CONCLUSÃO.....	176
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
ANEXO 1.....	181
CAPÍTULO 7: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA DE ISOSSACURANETINA.....	182
INTRODUÇÃO.....	183
MATERIAIS E MÉTODOS.....	185
SÍNTESE DE ISOSSACURANETINA.....	185
Etapa 1 – Síntese do derivado da acetofenona.....	185
Etapa 2 – Síntese do derivado 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona.....	186
Etapa 3 – Síntese do derivado da chalcona.....	187
Etapa 4 – Reação de desproteção da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona e formação de isossacuranetina.....	187
ISOLAMENTO DE SACURANETINA.....	188
IDENTIFICAÇÃO DE ISOSSACURANETINA E SACURANETINA.....	188
ENSAIO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO.....	188
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	189
CONCLUSÃO.....	198
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	198
CONCLUSÃO GERAL.....	203

INTRODUÇÃO

Estudos arqueológicos através da análise de pólen e outros materiais demonstraram que os homens das cavernas já utilizavam plantas com fins medicinais. No Egito antigo, os papiros registraram o uso de cerca de quinhentas plantas medicinais que continuam sendo usadas até hoje (BARATA, 2006).

Os produtos naturais têm sido uma maravilhosa fonte de inspiração para a concepção e desenvolvimento de novos fármacos. Uma inspeção de aprovações da droga revela que aproximadamente 64% de todas as drogas consideradas tinha um produto natural, envolvido no seu desenvolvimento. Esta fonte inclui produtos naturais não modificados, derivados de produtos naturais e fármacos que foram projetados por ser inspirado por um produto natural (VALLI *et al.*, 2013).

A diversidade química única de metabólitos secundários é uma das razões para o crescente interesse científico por produtos naturais (VALLI *et al.*, 2013). Para se ter ideia da importância da fitoterapia como forma de terapia medicinal, o comércio mundial de fitoterápicos movimenta mais de 20 bilhões de dólares por ano e apresenta perspectivas de crescimento. As preparações fitofarmacêuticas são muito populares em países com forte tradição no uso de ervas, como a Alemanha, a França e a Suíça. Na Alemanha, onde se consome metade dos extratos vegetais comercializados em todo o continente europeu, as plantas medicinais são utilizadas pela população para o tratamento de resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%), úlcera estomacal (36%), nervosismo (21%), bronquite (15%), entre outros (CALIXTO, 2000). No ano de 2000, o setor de fitoterápicos faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa (PAULA e D'AVOLA FILHO, 2006). O Brasil, com a maior diversidade genética vegetal do mundo, conta com mais de 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350 e 500 mil, e a formação étnica da população fazem da Fitoterapia uma prática bastante antiga no país (DE LIMA e FARIAS, 2003).

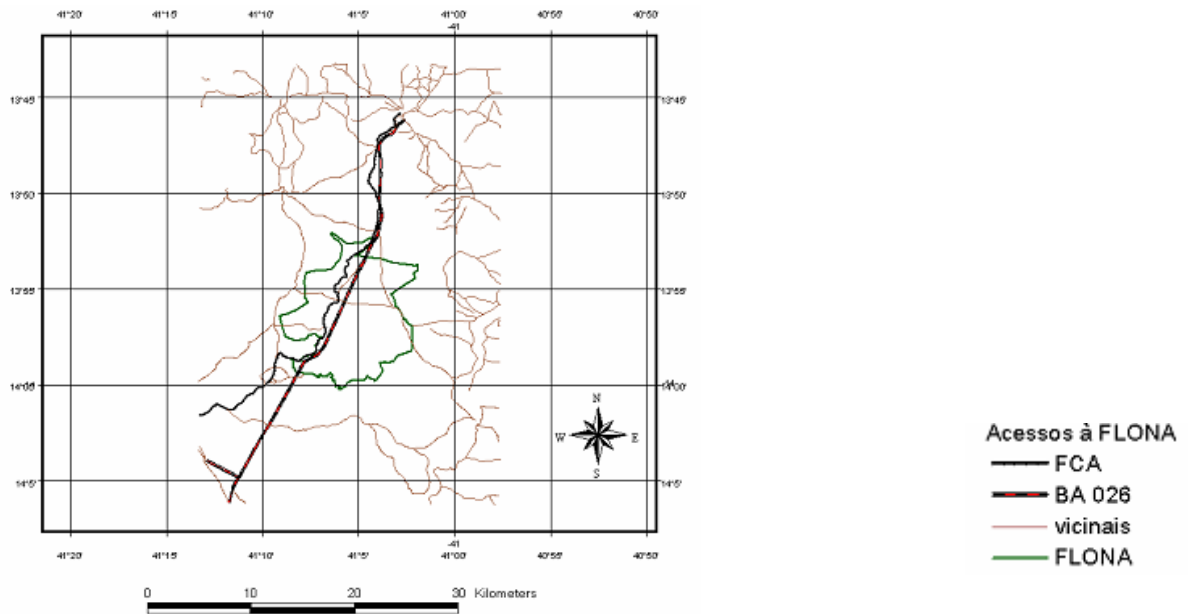
Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos especiais, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Desta forma, torna-se necessário uma interação mais ampla entre

químicos e farmacólogos para a análise de extratos, no qual se obtêm extratos semipuros, frações e finalmente os compostos puros (YUNES e CALIXTO, 2001).

De maneira indireta, a cultura de plantas medicinais desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (LÓPEZ, 2006).

Há uma carência muito grande de levantamentos etnobotânicos e de potencial extrativista. O estudo de Souza e Felfili (2006) mostra que grande parte da flora tem sido amplamente explorada pelo conhecimento popular e, nos últimos anos, vem crescendo o aproveitamento de forma sistematizada através de associações comunitárias, produzindo medicamentos, tais como, pomadas, xaropes, soluções tópicas cicatrizantes e fungicidas, soluções e comprimidos para o tratamento de vermes, entre outros. O espécime estudado nesse trabalho foi coletado na área da Floresta Nacional Contendas do Sincorá – BA (FLONA), onde são escassos os trabalhos com plantas para fins medicinais.

A FLONA (Figura 1) foi criada por decreto presidencial de 21 de setembro de 1999. É uma unidade de conservação de uso sustentável – uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e que tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas (IBAMA, 2006). Está sediada na Rodovia BA 026 - Sussuarana – Contendas do Sincorá (Km 22) e distante à 132 Km de Vitória da Conquista. A cobertura vegetal de 11.034,34 ha encontra-se em uma região de depressão com pequenas ondulações de relevo, entre 300 e 400 m de altitude, o que contribui para a pouca umidade que a atinge durante o ano todo, à exceção de curto período no verão, somado a elevadas temperaturas típicas do clima tropical. Trata-se de região de transição por estar localizada entre as grandes elevações da Chapada Diamantina, a caatinga do sertão baiano e regiões de Mata Atlântica. Caracterizada pela vegetação de caatinga, podendo ser encontrado outros biomas, dependendo da direção que se queira seguir (IBAMA, 2006).



Fonte: IBAMA 2006

Figura 1. Floresta Nacional Contendas do Sincorá

No intuito de colaborar com o conhecimento científico das plantas do FLONA usadas para fins medicinais foi escolhida a espécie *Mimosa hostilis* Benth, conhecida popularmente como jurema-preta, jurema ou maconha-brava, usada no tratamento de úlcera, bronquite, flatulência, erisipela e como alucinógeno em cerimônias religiosas (OHSAKI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006). Neste trabalho foram realizados testes antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antinociceptivos e anticolinesterásicos com o objetivo de

verificar algumas atividades biológicas, além de estudos químicos para isolar e identificar os principais constituintes do metabolismo especial presente nesta planta.

BARATA, L. E. S. Fitoterápicos – Alternativa para o Brasil. www.herbario.com.br, acesso em nov. 2006. p 172-176. Auxiliar de farmácia. Qualificação Profissional – apostila, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agentes). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

DE LIMA, T. C.; FARIAS, M. R. **Fitoterapia - Natural mas com cuidado...** Florianópolis: Agecom, 2003 (artigo de divulgação - Papo sobre Ciência).

IBAMA. **Plano de Manejo Floresta Nacional Contendas do Sincorá**. Volume 1, 2006.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, p. 19-27, 2006.

OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H. e FUKUYAMA, Y. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1728-1729, 2006.

PAULA, E. C. e D'AVOLA FILHO, G. Auxiliar de farmácia. **Qualificação Profissional - apostila**. 2006.

RODRIGUES, E.; MENDES, F. R. e NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to Central Nervous System disturbances: A bibliographical approach. **Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents**, v. 6, p. 211-244, 2006.

SOUZA, D. C. e FELFILI, M. J. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraiso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 135-142, 2006.

VALLI, M.; SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D. e BOLZANI, V.S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 439-444, 2013.

YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p

CAPÍTULO 1

FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO *Mimosa* (LEGUMINOSEAE)

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Mimosa* possuem uma grande diversidade morfológica e podem ser encontradas como árvores, arbustos, trepadeiras ou ervas (SILVA e SALES, 2008). Pertencentes à ordem das Fabales, família Leguminosae e subfamília Mimosaceae (Mimosoideae) (NEILSON, 1992). *Mimosa* é o quinto gênero mais importante dessa família, com cerca de 500 espécies, 225 táxons infra específicos, perfazendo um total de 704 táxons, distribuídos, sobretudo no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e Uruguai (SILVA e SECCO, 2000).

As informações anatômicas sobre o gênero *Mimosa* ainda são muito escassas. A constatação de uma ampla variação anatômica, sem um traço comum de união entre as espécies examinadas, levou a definição do gênero como "estruturalmente heterogêneo" (MACCARI e MARCHIORI, 1994). Essa complexidade, resultante da grande diversidade morfológica, certamente, relacionada à ampla distribuição geográfica e aos diferentes tipos de habitat em que ocorre, além do seu elevado número de táxons, leva esse gênero a apresentar muitos erros taxonômicos a serem resolvidos (SILVA e SALES, 2008).

Muitas plantas desse gênero são utilizadas na reabilitação de solos degradados devido sua agressividade e capacidade de se desenvolver em condições adversas (SANTOS e GROSS, 2008; GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2008). Algumas espécies tem sua madeira usada como estaca, lenha e fabricação de carvão de alto valor energético, construção e marcenaria, plantas forrageiras para bovinos e caprinos (SOUZA *et al.*, 2008). Dos estudos etnofarmacológicos realizados, as espécies *Mimosa pudica*, *M. tenuiflora*, *M. caesalpinifolia*, *M. rubicaulis*, *M. verrucosa*, *M. arenosa*, *M. hostilis*, *M. opthalmocentra*, *M. scabrella*, *M. acutistipula*, *M. camporum*, *M. hirsutissima*, *M. candollei* e *M. pigra* foram citadas pela população de vários países como plantas usadas para fins religiosos e farmacológicos que atuam em diferentes sistemas: 1. Respiratório para o tratamento de tuberculose, asma, bronquite, tosse e como expectorante, 2. Digestório para dispepsia, gastrite, úlcera, flatulência, diarreia, disenteria e como ante emético, 3. Renal para a desintegração de pedras nos rins e completa excreção pela urina e como diurético, 4. Nervoso para o tratamento de neurastenia, insônia, dor de cabeça, enxaqueca, fadiga e como sedativo e narcótico, 5. Circulatório para hemorragia, hemorroidas, hipertensão, 6. Reprodutor para cólica menstrual, sífilis, fortalecimento do útero. Além disso tem efeito no tecido epitelial externo, sendo usado

em ferimento, injúria traumática, erisipela, queimadura na pele, furúnculo, psoríase, hematoma. São ainda usados no tratamento odontológico, cólera, varíola, icterícia, febre, antirreumático, inflamação e infecções em geral (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008, 2009; BARBOSA-FILHO, 1997; BUM *et al.*, 2004; CAMARGO, KAISER e COSTA, 2007; DESMARCHELIER *et al.*, 1999; DOMINGUEZ *et al.*, 1989; GENEST *et al.*, 2008; IGNACIMUTHU, AYYANAR e SANKARASIVARAMAN, 2008; JIANG *et al.*, 1991; KOKANE *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 1990; OHSAKI *et al.*, 2006; RIVERA-ARCE *et al.*, 2007; RODRIGUES, MENDES e NEGRI, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008; ROSADO-VALLADO *et al.*, 2000; SHARMA, ASHOKE e DOLUI, 2001; SOUZA *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2007).

Espécies do gênero *Mimosa* são fontes de metabólitos especiais, tais como, alcaloides, compostos fenólicos, terpenoides, saponinas, carotenoides e principalmente flavonoides (NUNES *et al.*, 2008). Algumas substâncias isoladas e identificadas já foram testadas farmacologicamente com atividades comprovadas em testes preliminares como cicatrizante (KOKANE *et al.*, 2009), antioxidante (CRUZ *et al.*, 2009; DAVID *et al.*, 2007; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; GENEST *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2008), antimicrobiano (COSTA e PEREIRA, 2007; GENEST *et al.*, 2008; HUSSAIN *et al.*, 1979; ROSADO-VALLADO *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2008), inseticida (CAVALCANTE, MOREIRA e VASCONCELOS, 2006), anticonvulsivante (BUM *et al.*, 2004), antiespasmolítica (SOUZA *et al.*, 2008), alucinógenos (BATISTA e ALMEIDA, 1997; BATISTA *et al.*, 1999), o que explicaria o uso popular. O extrato bruto ou frações testadas podem contar com o efeito sinérgico de suas substâncias, o que faz com que algumas atividades sejam potencializadas em relação à substância pura.

Estruturalmente, os flavonoides constituem substâncias aromáticas com quinze átomos de carbono (C₁₅) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis C₆-C₃-C₆ (AGRAWAL, 1989). Os flavonoides podem ser agrupados em grandes classes com base em suas características gerais estruturais como chalconas, auronas, flavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas apresentados na Figura 1 (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

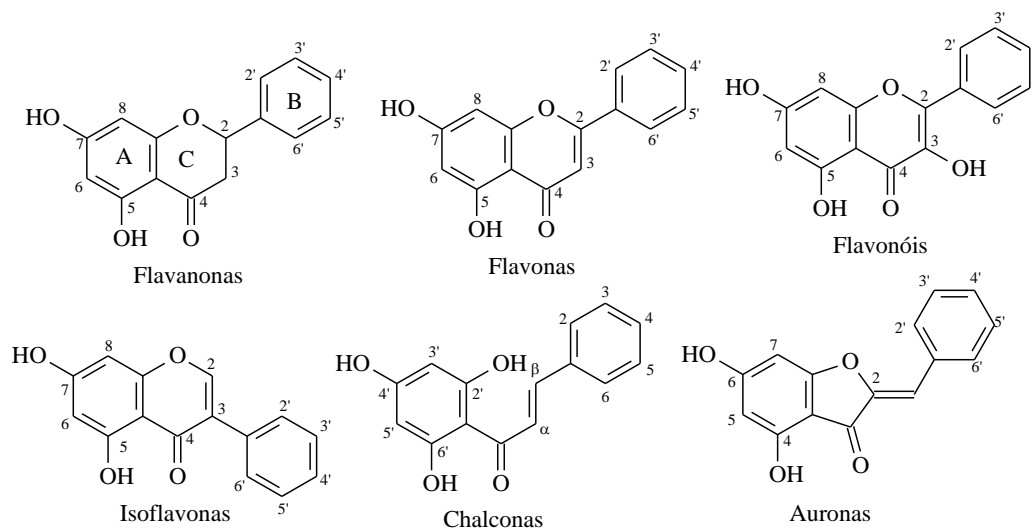


Figura 1. Estruturas gerais de algumas classes de flavonoides

Os flavonoides são produtos de origem biossintética mista, biossintetizados através da via do ácido chiquímico que origina o ácido cinâmico e seus derivados com nove átomos de carbono (C_6C_3), e também a via do acetato que origina o floriglucionol com seis átomos de carbono. A condensação entre eles gera uma chalcona com 15 átomos de carbono, que é considerada o precursor inicial de toda a classe dos flavonoides como observado na Figura 2 (DEWICK, 2002). Estes flavonoides podem ocorrer na forma livre ou estar associados a outras moléculas, como os flavonoides glicosilados.

Ocorrem universalmente em plantas comestíveis e medicinais e apresentam uma grande variedade de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, anticâncer, antiviral e antibacteriano, bem como, um efeito cito protetor direto sobre coronárias e sistemas vasculares, o pâncreas e o fígado. Como seria de esperar em plantas biologicamente ativas, o grupo de substâncias mais frequentes isolados e identificados a partir de espécies do gênero *Mimosa* foram os flavonoides e flavonoides glicosídeos (MENG *et al.*, 2009).

Os flavonoides descritos no gênero *Mimosa* são em sua maioria, também encontrados em outras plantas da família Leguminosae e despertam interesse farmacêutico ou possuem um alto valor comercial (ANDERSEN e MARKHAM, 2005).

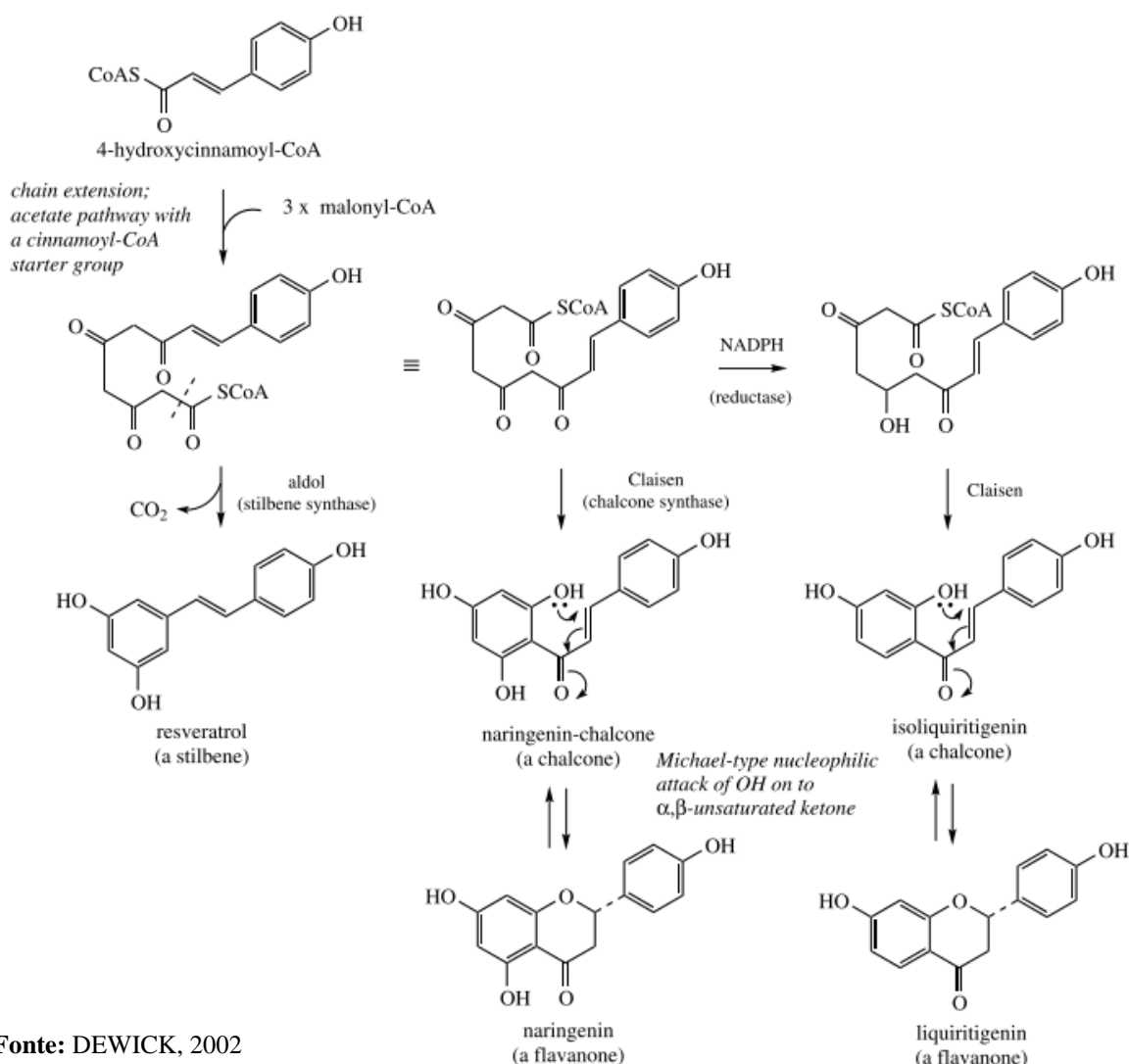


Figura 1. Rota biossintética dos flavonoides

FLAVONOIDES PRESENTES NO GÊNERO *MIMOSA*

Os flavonoides identificados até então em espécies do gênero *Mimosa*, apresentam-se na forma livre ou glicosilada. A Tabela 1 apresenta os 83 flavonoides identificados, classificados como catequina, chalconas, flavanonas, flavolignananas, flavonas e flavonóis. A ordem crescente de numeração das estruturas que aparecem no texto (primeira coluna) segue a ordem de oxidação, na segunda coluna, além do nome científico também está apresentado o nome trivial entre parênteses e na terceira coluna as espécies do gênero *Mimosa* em que foram isolados.

Tabela 1. Ocorrência dos flavonoides bioproduzidos por espécies do gênero *Mimosa*.

	Flavonoides	Espécies	Referências
1	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7,2',5'-tetrahidroxiflavan-3-ol (pinocebrina)	<i>M. pudica</i>	58
2	4',6'-di-hidroxi-4-metoxichalcona	<i>M. hostilis</i>	44
3	4',6',4-tri-hidroxichalcona (isoliquiritigenina)	<i>M. hostilis</i>	44
4	3',6',4-tri-hidroxichalcona	<i>M. hostilis</i>	44
5	2',6'-di-hidroxi-4',4-dimetoxichalcona	<i>M. hostilis</i>	44
6	2',4'-di-hidroxi-3',4-dimetoxichalcona (kukulkanins A)	<i>M. tenuiflora</i>	22
7	2',4',4- tri-hidroxi-3'-metoxichalcona (kukulkanins B)	<i>M. tenuiflora</i>	22
8	5,7-di-hidroxi-flavanona	<i>M. paraibana</i>	43
9	6-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavanona	<i>M. hostilis</i>	55
10	5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona (isossacuranetina)	<i>M. hostilis</i>	55
11	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (sacuranetina)	<i>M. hostilis</i> <i>M. tenuiflora</i>	55 42
12	5,7,4'-tri-hidroxi-flavanona (naringenina)	<i>M. hostilis</i>	44
13	5,7-di-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavanona (6-metoxi-4'- <i>O</i> -metilnaringenina)	<i>M. tenuiflora</i>	12
14	5,2',4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavanona (artocarpanona)	<i>M. hostilis</i>	44
15	5,3',4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavanona	<i>M. tenuiflora</i>	42
16	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavanona (6-metoxinaringenina)	<i>M. tenuiflora</i>	12
17	5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina)	<i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	60 60
18	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (genkwanina)	<i>M. hostilis</i> <i>M. tenuiflora</i>	44 42
19	5,7,4'-tri-hidroxi-flavona (apigenina)	<i>M. hostilis</i> <i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	44 60 60
20	5,8,4'-tri-hidroxi-flavona	<i>M. hostilis</i>	44
21	5,4'-di-hidroxi-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicopiranosilflavona (apigenina-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo)	<i>M. pudica</i>	33
22	5-hidroxi-4'-metoxi-3- <i>O</i> -rutinosilflavona (acacetina-7-rutinosídeo)	<i>M. quadrivalvis</i> <i>M. pudica</i>	60 60
23	2'-hidroxi-7,4',5'-trimetoxiflavona (diplotrina C)	<i>M. diplotricha</i>	32
24	7,4'-di-hidroxi-5,3'-dimetoxiflavona (5,3'-di- <i>O</i> -metilluteolina)	<i>M. diplotricha</i>	32
25	5,4'-di-hidroxi-6,7-dimetoxiflavona	<i>M. tenuiflora</i>	42
26	5,7,4'-tri-hidroxi-8-metoxiflavona	<i>M. hostilis</i>	44
27	5,7,4'-tri-hidroxi-6- <i>C</i> -glicopiranosilflavona (isovitexina)	<i>M. pudica</i>	61
28	5,7,4'-tri-hidroxi-8- <i>C</i> -glicopiranosilflavona (vitexina)	<i>M. pudica</i>	61
29	5,7,4'-tri-hidroxi-6- β - <i>D</i> -ramnopiranosilflavona (isovitexina- <i>O</i> -2''-ramnopiranosídeo)	<i>M. xanthocentra</i>	14
30	5,7,4'-tri-hidroxi-8- β - <i>D</i> -ramnopiranosilflavona (vitexina-2''- <i>O</i> -ramnopiranosídeo)	<i>M. xanthocentra</i>	15
31	5,3',4'-tri-hidroxi-7- <i>O</i> -α- <i>L</i> -arabinofuranosilflavona (luteolina-7-arabinosídeo)	<i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	60 60
32	5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (luteolina)	<i>M. diplotricha</i> <i>M. pigra</i>	32 56
33	5,2'-di-hidroxi-7,4',5'-trimetoxiflavona (hernancorizina)	<i>M. diplotricha</i>	32
34	5,4'-di-hidroxi-6,7,3'-trimetoxiflavona	<i>M. tenuiflora</i>	42
35	6,7,3',4'-tetra-hidroxil-8- <i>C</i> -[α- <i>L</i> -raminopiranosil-(1→2)]-β- <i>D</i> -glicopiranosilflavona	<i>M. pudica</i>	59

Tabela 1. Continuação.

36	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-6-C-[β -D-apiose-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glicopiranosilflavona	<i>M. pudica</i>	61
37	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-8-C-[β -D-apiose-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glicopiranosilflavona	<i>M. pudica.</i>	59
38	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-8-C- β -D-glicopiranosilflavona (orientina)	<i>M. pudica</i>	33
39	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-6-C- β -D-glicopiranosilflavona (isorientina)	<i>M. pudica</i>	33
40	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-6-C-[α -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glicopiranosilflavona (2''-O-raminosilorientina)	<i>M. pudica</i>	60
41	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-8-C-[α -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)] β -D-glicopiranosilflavona (2''-O-raminosilisoorientina)	<i>M. pudica</i>	60
42	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-6-C-[α -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-fucopiranosilflavona (4''-OH-maisina)	<i>M. pudica</i>	33
43	5,7,3',4'- tetra-hidroxi-6-C-[α -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)]-deoxixilohexos-4-ulosilflavona (cassiaoccidentalina B)	<i>M. pudica</i>	33
44	5,4'- di-hidroxi-6,3',5'-trimetoxi-7-O-[α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-O- β -D-glicopiranosilflavona	<i>M. rubicaulis</i>	57
45	5,4'-di-hidroxi-3-di-O- α -L-ramnopiranosilflavona (canferol-3,7-diraminosídeo)	<i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	60 60
46	5,7,4'-tri-hidroxiflavonol (canferol)	<i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	60 60
47	6,7,4'-trimetoxiflavonol	<i>M. invis</i>	1
48	5,7,4'-tri-hidroxi-3-O-rutinosilflavona (nicotiflorina)	<i>M. pudica</i> <i>M. quadrivalvis</i>	60 60
49	5,7,4'-tri-hidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavona (canferol-3-raminosídeo)	<i>M. artemisiana</i> <i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	39 60 60
50	5,7,4'-tri-hidroxi-3- O- β -D-xilopiranosilflavona (luteolina-3-O-xilopiranosilflavona)	<i>M. pudica</i> <i>M. quadrivalvis</i>	60 60
51	5,7,4'- tri-hidroxi-3-O-(2''-cinamil)- β -(1 \rightarrow 2)-D-glicopiranosil- α -D-glicopiranosilflavona (canferol-3-O-cinamilsoforosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
52	5,7,3',4'-tetra-hidroxiflavonol (quercetina)	<i>M. diplotricha</i> <i>M. invis</i>	32 1
53	5,4'-di-hidroxi-3,7,3'-trimetoxiflavona (pachipodol)	<i>M. tenuiflora</i>	42
54	5,7-di-hidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona (santina)	<i>M. tenuiflora</i>	42
55	5,4'-di-hidroxi-6,7-dimetoxiflavonol (eupaletina)	<i>M. artemisiana</i>	40
56	7,3',4'-tri-hidroxi-3,8-dimetoxiflavona	<i>M. pudica</i> <i>M. diplotricha</i>	30 32
57	5,7,4'-tri-hidroxi-3,6-dimetoxiflavona	<i>M. tenuiflora</i>	12
58	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (6-metoxiccanferol)	<i>M. tenuiflora</i>	12
59	5,3',4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavonol(7-O-metilquercetina)	<i>M. pudica</i> <i>M. quadrivalvis</i> <i>M. pigra</i> <i>M. invis</i>	60 60 60 60
60	3'-hidroxi-3,7,8,4'-tetrametoxiflavona (diplotrina A)	<i>M. diplotricha</i>	32
61	5,3',4'-tri-hidroxi-7-O- α -L-ramnopiranosilflavonol (quercetina-7-raminosídeo)	<i>M. pudica</i> <i>M. quadrivalvis</i>	60 60

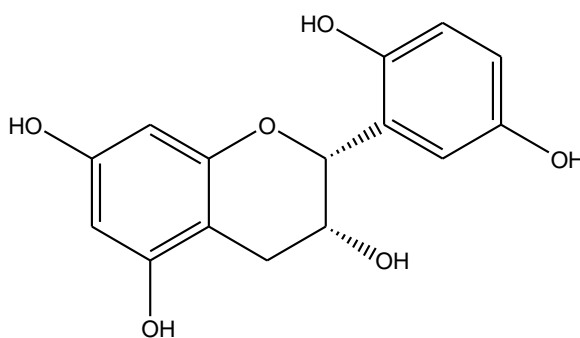
Tabela 1. Continuação.

62	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O- α -L-arabinofuranosilflavona (avicularina)	<i>M. xanthocentra</i>	15
		<i>M. pudica</i>	33
		<i>M. diplotricha</i>	32
		<i>M. invis</i>	1
63	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O- β -D-xilopiranosilflavona (reinoutrina)	<i>M. xanthocentra</i>	15
		<i>M. pudica</i>	60
		<i>M. quadrivalvis</i>	60
		<i>M. diplotricha</i>	32
64	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosilflavona (isoquercetrina)	<i>M. pudica</i>	33
		<i>M. pigra</i>	56
65	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O- β -D-galactopiranosilflavona (hiperina, hiperosídeo)	<i>M. pudica</i>	33
66	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavona (quercetrina)	<i>M. artemisiana</i>	40
		<i>M. pigra</i>	60
		<i>M. invis</i>	60,1
		<i>M. pudica</i>	33
67	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O-rutinosilflavona (rutina)	<i>M. pigra</i>	60
		<i>M. invis</i>	60
68	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O-(4''-acetil)- α -L-arabinopiranosilflavona (quercetina-3-O-acetilarabinopinosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
69	5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-O-(6''-acetil)- β -D-galactopiranosilflavona (quercetina-3-O-acetilgalactopiranosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
70	5,3',4'-tri-hidroxi-3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilflavona (quercetina-3,7-diraminosídeo)	<i>M. pigra</i>	60
		<i>M. invis</i>	60
71	5,7,3',4',5'-pentahidroxi-3-O-rutinosilflavona (miricetina)	<i>M. pudica</i>	33
72	2'-hidroxi-3,7,8,4',5'-pentametoxiflavona	<i>M. diplotricha</i>	32
73	2',5'-di-hidroxi-3,7,8,4'-tetrametoxiflavona (diplotrina B)	<i>M. diplotricha</i>	32
74	5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavona (miricetrina)	<i>M. artemisiana</i>	40
75	5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O- α -L-arabinofuranosilflavona (miricetina-3-O-arabinofuranosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
		<i>M. diplotricha</i>	32
76	5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O- β -D-xilopiranosilflavona (miricetina-3-O-xilopiranosídeo)	<i>M. diplotricha</i>	32
77	5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O- β -D-glicopiranosilflavona (miricetina-3-O-glicopiranosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
78	5,7,3',4',5'-penta-hidroxi-3-O-(4''-acetil)- β -D-xilopiranosilflavona (miricetina-3-O-acetilxilosídeo)	<i>M. pigra</i>	56
79	4-hidroxi-3,10,11-trimetoxiisocromeno-[4,3-b]-cromen-7(5H)-ona (diplotasina)	<i>M. diplotricha</i>	32
80	Flavonolignana (hidnocarpin)	<i>M. artemisiana</i>	39
81	Flavonolignana (O-metildnocarpin)	<i>M. artemisiana</i>	39
82	Flavonolignana (5''-metoxiidnocarpin)	<i>M. artemisiana</i>	40
		<i>M. diplotricha</i>	32
83	Flavonolignana	<i>M. artemisiana</i>	40

CATEQUINAS

São chamados de catequinas ou flavanois os flavonoides que não possuem o grupo cetona no carbono 4. Esses compostos não são bem descritos, apesar de possuírem uma distribuição em plantas quase tão grande quanto os flavonoides que possuem o grupo ceto. A razão para isto é a dificuldade de detecção desses compostos, especialmente quando presentes em pequena quantidade, e problemas associados com suas propriedades químicas (AGRAWAL, 1989).

A química desses compostos está intimamente ligada a das proantocianidinas devido ao suposto papel das flavanas e flavan-3-óis como unidades terminais de cadeia nucleofílica na biossíntese dos mesmos (ANDERSEN e MARKHAM, 2005). A catequina 1 foi isolado de folhas de *M. pudica* (YUAN, JIA e LU, 2006).

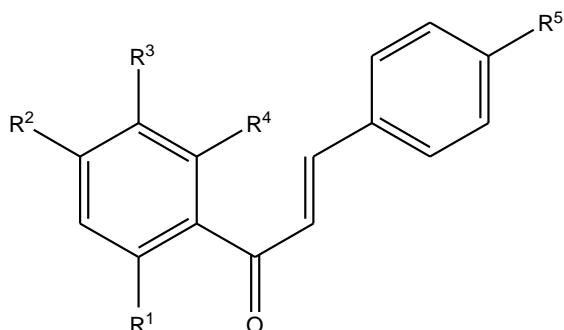


1

CHALCONAS

O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma classe do grupo dos flavonoides com compostos possuindo como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila. São compostos precursores da via de biossíntese dos flavonoides. Normalmente apresentam coloração amarela que passa a vermelha em meio alcalino, tendo um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais (AGRAWAL, 1989).

As chalconas 2, 3, 4 e 5 foram isoladas de folhas e galhos de *M. hostilis* (OHSAKI *et al.*, 2006) e as chalconas 6 e 7 foram isoladas de cascas de *M. tenuiflora* (DOMINGUEZ *et al.*, 1989).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
2	OH	OH	H	H	OCH ₃
3	OH	OH	H	H	OH
4	OH	H	OH	H	OH
5	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
6	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
7	H	OH	OCH ₃	OH	OH

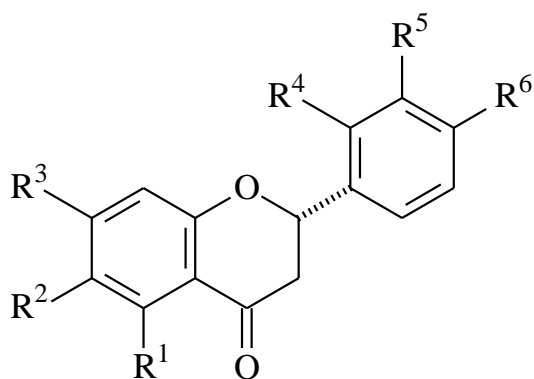
FLAVANONAS

Flavanonas (também chamadas di-hidroflavonas) não possuem a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 no anel C do esqueleto de flavonoides, que está presente em flavonas e flavonóis. Duas formas estereoisoméricas de cada estrutura de flavanona são possíveis, uma vez que C-2 é um centro de assimetria. A grande maioria das flavanonas isolados de plantas são levóginas (-) ou (2*S*)-flavanonas, porque a reação enzimática que catalisa a conversão de chalconas para flavanonas é estereoespecífica (ANDERSEN e MARKHAM, 2005).

As flavanonas (8-16) foram encontradas em *M. paraibana*, *M. hostilis* e *M. tenuiflora*, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Flavanonas encontradas em espécies do gênero *Mimosa*

Flavanona	Parte da planta	Espécie	Referência
8	parte aérea	<i>M. paraibana</i>	NUNES <i>et al.</i> , 2008
9, 10, 11, 12 e 14	folhas e galhos	<i>M. hostilis</i>	OHSAKI <i>et al.</i> , 2006
11 e 15	partes aéreas	<i>M. tenuiflora</i>	NUNES <i>et al.</i> , 2009
13 e 16	folhas	<i>M. tenuiflora</i>	BAUTISTA <i>et al.</i> , 2011



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
8	OH	H	OH	H	H	H
9	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃
10	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
11	OH	H	OCH ₃	H	H	OH
12	OH	H	OH	H	H	OH
13	OH	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃
14	OH	H	OCH ₃	OH	H	OH
15	OH	H	OCH ₃	H	OH	OH
16	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH

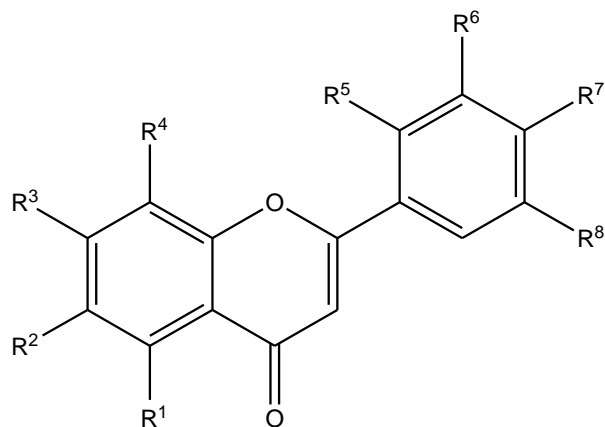
FLAVONAS

As flavonas são flavonoides muito abundantes em plantas e despertam um grande interesse científico devido às propriedades farmacológicas presentes nessas substâncias. Flavonas são 2,3-desidro derivados das flavanonas, ou seja, há uma ligação dupla característica entre o C-2 e o C-3. (AGRAWAL, 1989). Flavonas *O*-glicosilados compõem uma das maiores classes de flavonoides com mais de 2000 estruturas conhecidas. O número de combinações possíveis é enorme devido à variedade estrutural, ou seja, o padrão de hidroxilação e metoxilação da aglicona, o número e a natureza dos açúcares e sua posição de fixação, através de grupos de hidroxila para a aglicona. As moléculas de açúcares também podem ser ligadas através de uma ligação C-C (ANDERSEN e MARKHAM, 2005).

As flavonas (17-44) encontradas nas espécies *M. pigra*, *M. invisia*, *M. quadrivalvis*, *M. diplotricha*, *M. hostilis*, *M. tenuiflora*, *M. xanthocentra*, *M. pudica* e *M. rubicaulis* estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Flavonas encontradas em espécies do gênero *Mimosa*

Flavonas	Parte da planta	Espécie	Referência
17, 19 e 31	folhas	<i>M. invisá</i>	YUSUF <i>et al.</i> , 2003
17, 19, 31 e 32	folhas	<i>M. pigra</i>	SULAIMAN <i>et al.</i> , 2006; YUSUF <i>et al.</i> , 2003
18, 19, 20 e 26	folhas e galhos	<i>M. hostilis</i>	OHSAKI <i>et al.</i> , 2006
18, 25 e 34	partes aéreas	<i>M. tenuiflora</i>	NUNES <i>et al.</i> , 2009
21, 22, 27, 28, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43	parte aérea	<i>M. pudica</i>	LOBSTEIN <i>et al.</i> , 2002; YUSUF <i>et al.</i> , 2003, ZHANG <i>et al.</i> , 2011
22	folhas	<i>M. quadrivalvis</i>	YUSUF <i>et al.</i> , 2003
23, 24, 32 e 33	raízes	<i>M. diplotricha</i>	LIN, CHIOU e CHENG, 2011 CAMARGO <i>et al.</i> , 2009;
29 e 30	folhas	<i>M. xanthocentra</i>	CAMARGO, KAISER e COSTA, 2007
44	raiz	<i>M. rubicaulis</i>	YADAVA e AGRAWAL, 1998



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
17	OH	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H
18	OH	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H
19	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
20	OH	H	H	OH	H	H	OH	H
21	OH	H	OGli	H	H	H	OH	H
22	OH	H	ORut	H	H	H	OCH ₃	H
23	H	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
24	OCH ₃	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	H
25	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OH	H
26	OH	H	OH	OCH ₃	H	H	OH	H
27	OH	Gli	OH	H	H	H	OH	H
28	OH	H	OH	Gli	H	H	OH	H
29	OH	Ram-Gli	OH	H	H	H	OH	H
30	OH	H	OH	Ram-Gli	H	H	OH	H
31	OH	H	O Ara	H	H	OH	OH	H
32	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
33	OH	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
34	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H
35	H	OH	OH	Ram-Gli	H	OH	OH	H
36	OH	Api-Gli	OH	H	H	OH	OH	H
37	OH	H	OH	Api-Gli	H	OH	OH	H
38	OH	H	OH	Gli	H	OH	OH	H
39	OH	Gli	OH	H	H	OH	OH	H
40	OH	H	OH	Ram-Gli	H	OH	OH	H
41	OH	Ram-Gli	OH	H	H	OH	OH	H
42	OH	Ram-Fuco	OH	H	H	OH	OH	H
43	OH	Ram-Deo	OH	H	H	OH	OH	H
44	OH	OCH ₃	O Ara-Gli	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

FLAVONÓIS E DERIVADOS

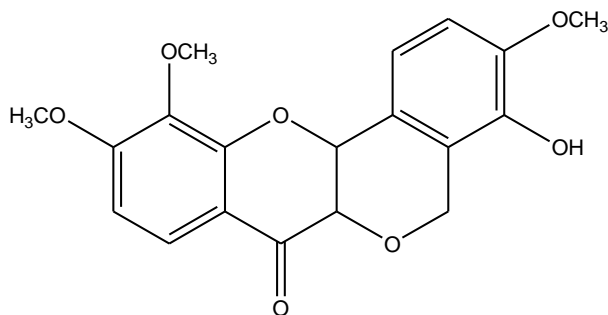
Os flavonóis são bastante semelhantes as flavonas em ocorrência, propriedades químicas e farmacológicas. Os flavonóis são 3-hidroxi derivados de flavonas, onde a presença

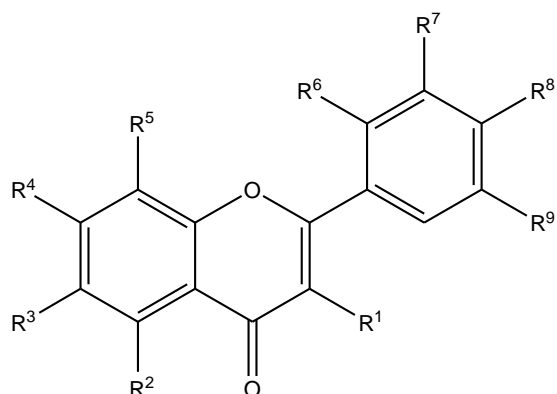
da hidroxila no C-3 é a única diferença entre os dois grupos de substâncias. Os derivados possuem variações na posição C-3 (AGRAWAL, 1989).

No gênero *Mimosa*, os flavonóis (45-79) foram encontradas nas espécies *M. pudica*, *M. quadrivalvis*, *M. pigra*, *M. invis*a, *M. artemisiana*, *M. tenuiflora*, *M. xanthocentra* e *M. diplotricha* e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Flavonóis encontradas em espécies do gênero *Mimosa*

Flavanona	Parte da planta	Espécie	Referência
45, 46, 49, 59, 66, 67 e 70	folhas	<i>M. pigra</i>	SULAIMAN <i>et al.</i> , 2006
51, 64, 68, 69, 75, 77 e 78			YUSUF <i>et al.</i> , 2003
45, 46, 49, 59, 66, 67 e 70	folhas	<i>M. invis</i> a	YUSUF <i>et al.</i> , 2003
47, 52, 62 e 66	parte aérea		AGUIAR <i>et al.</i> , 2012
48, 50, 56, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66 e 71	folhas	<i>M. pudica</i>	YUSUF <i>et al.</i> , 2003 KIRK <i>et al.</i> , 2003; LOBSTEIN <i>et al.</i> , 2002
48, 50, 59, 61 e 63	folhas	<i>M. quadrivalvis</i>	YUSUF <i>et al.</i> , 2003
49, 55, 66 e 74	folhas	<i>M. artemisiana</i>	NASCIMENTO, BRAZ-FILHO e CARVALHO, 2009; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2012
52, 56, 60, 62, 63, 72, 73, 75, 76 e 79	raízes	<i>M. diplotricha</i>	LIN, CHIOU e CHENG, 2011
53 e 54	partes aéreas	<i>M. tenuiflora</i>	NUNES <i>et al.</i> , 2009
57 e 58	flores		BAUTISTA <i>et al.</i> , 2011
62 e 63	partes aéreas	<i>M. xanthocentra</i>	CAMARGO <i>et al.</i> , 2009



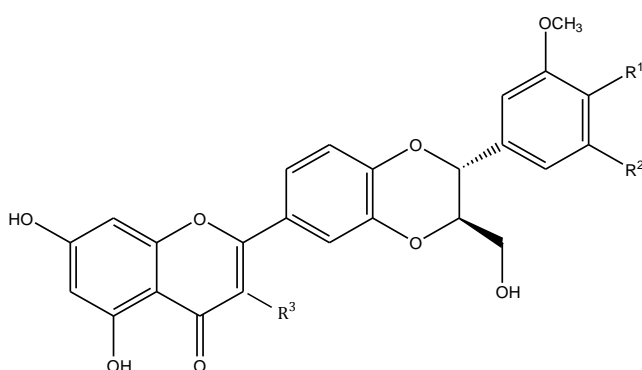


	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵	R⁶	R⁷	R⁸	R⁹
45	ORam	OH	H	ORam	H	H	H	OH	H
46	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
47	OXil	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
48	ORut	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
49	ORam	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
50	OH	H	OH	OH	H	H	H	OH	H
51	OSof-Cinamil	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
52	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
53	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H
54	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃	H
55	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OH	H
56	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H	OH	OH	H
57	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	OH	H
58	OH	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	OH	H
59	OH	OH	H	OCH ₃	H	H	OH	OH	H
60	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH
61	OH	OH	H	ORam	H	H	OH	OH	H
62	OAra	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
63	OXil	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
64	OGli	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
65	OGal	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
66	ORam	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
67	ORut	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
68	OAra-acetil	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
69	OGla-acetil	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H
70	ORam	OH	H	ORam	H	H	OH	OH	H
71	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
72	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
73	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
74	ORam	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
75	OAra	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
76	OXil	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
77	OGli	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH
78	OXil-acetil	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH

FLAVONOLIGNANAS

Uma interessante combinação das estruturas de flavonoide e lignana são encontradas em um grupo de compostos chamado flavonolignanas. Eles surgem por processos oxidativos de acoplamento entre um flavonoide e um fenilpropanoide, geralmente o álcool coniferílico. Podem também ser classificadas como heterolignoides (DEWICK, 2002).

As flavonolignanas 80, 81, 82 e 83 foram isoladas das folhas de *M. artemisiana* (NASCIMENTO, BRAZ-FILHO e CARVALHO, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2012). Nas raízes de *M. diplotricha* também foi isolada a flavonolignana 82 (LIN, CHIOU e CHENG, 2011).



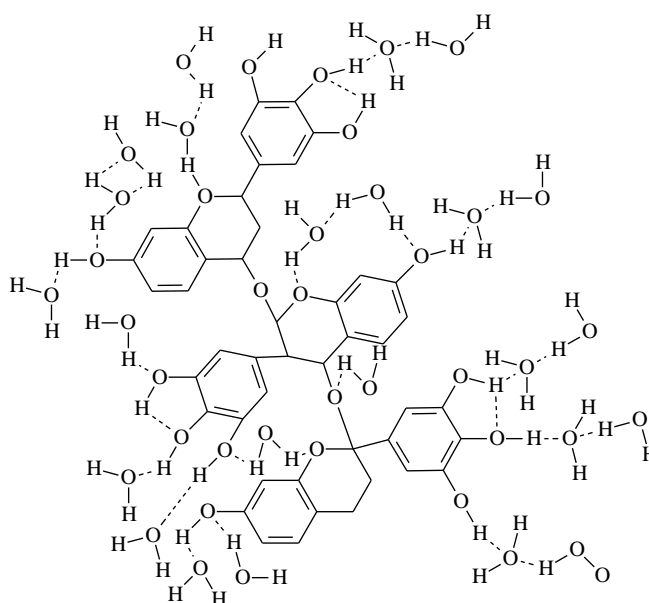
	R ¹	R ²	R ³
80	OH	H	H
81	OCH ₃	H	H
82	OH	OCH ₃	H
83	OCH ₃	H	OH

TANINOS

A palavra tanino é um termo técnico que não constitui uma expressão química específica, pertencendo ao grupo de compostos poli-hidroxifenólicos diferentes, que se encontram misturados, constituídos por polifenóis simples, carboidratos, aminoácidos e gomas hidroxidolodais (SILVA, 1999).

Os taninos hidrolisáveis são poliésteres da glicose com ácidos gálicos ou elágicos e são classificados, dependendo do ácido formado de sua hidrólise, em taninos gálicos ou taninos elágicos (PAES *et al.*, 2006). Taninos condensados (84) são constituídos por unidades de flavonoides, com diferentes graus de condensação. Os taninos condensados que possuem ligações C-C são mais dificilmente rompidas (SILVA, 1999).

Os taninos vegetais, conhecidos por taninos naturais, podem ser encontrados em várias partes do vegetal, como madeira (cerne), cascas, frutos e sementes em árvores de grande e pequeno porte. Esses compostos são muito utilizados no curtimento de peles, nas indústrias de petróleo, como agente dispersante para controlar a viscosidade de argilas na perfuração de poços, produção de plásticos, anticorrosivos, colas, floculantes, tintas e adesivos. São também empregados no tratamento de água de abastecimento e residuárias, e são associados a redução de matéria orgânica, proteínas e fibras, o que pode influenciar nos valores nutricionais de forragens (PAES *et al.*, 2006; SILVA, 1999).



84

Estudos realizados revelaram a presença de taninos condensados nas espécies *M. hostilis*, *M. caesalpinifolia* (GUIMARÃES-BEELEN *et al.*, 2006) e *M. tenuiflora* (ARAÚJO *et al.*, 2008; RIVERA-ARCE *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

Dentre os 83 flavonoides isolados em espécies do gênero *Mimosa*, descritos na literatura, existem em 1 catequina, 6 chalconas, 9 flavanonas, 11 flavonas, 17 flavonas glicosiladas, 15 flavonóis, 20 flavonóis glicosilados, 4 flavolignanais além dos taninos condensados. As substâncias mais frequentes em espécies do gênero *Mimosa* são os flavonóis quercetrina, reinoutrina, 7-*O*-metilquercetina e avicularina.

Os flavonoides são substâncias com atividade biológica comprovada como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana (LIN, CHIOU e CHENG, 2011; AGUIAR *et al.*, 2012), e como estão presentes em espécies do gênero *Mimosa* poderia justificar o uso popular dessas espécies como plantas medicinais. Porém, a indicação dessas e de outras espécies deve ser sempre avaliado, devido a efeitos adversos que podem estar presentes. Assim, por exemplo: a atividade citotóxica de *M. paraibana*, comprovada através do teste de letalidade contra *Artemia salina* Leach (NUNES *et al.*, 2008); as malformações ósseas (efeito teratogênico) causadas pela ingestão de *M. tenuiflora* testadas em ratos (MEDEIROS *et al.*, 2008); o efeito hiperglicêmico do extrato de folhas de *M. pudica* (AMALRAJ e IGNACIMUTHU, 2002), merecendo uma avaliação cuidadosa antes da indicação para o seu uso pela população.

REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, R. M.; ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; REZENDE, L. C.; LIMA, L. S.; DAVID, J. P. e QUEIRÓZ, L. P. Antioxidant activities of isolated compounds from stems of *Mimosa invisa* Mart. ex Colla. **Química Nova**, v. 35, p. 567-570, 2012.
2. AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. e BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
3. AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
4. ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G. e SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
5. AMALRAJ, T. e IGNACIMUTHU, S. Hyperglycemic effect of leaves of *Mimosa pudica* Linn. **Fitoterapia**, v. 73, p. 351-352, 2002.
6. ANDERSEN, Ø. M. e MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Taylor & Francis Group, 2005. 1197 p.

7. ARAÚJO, B. Q.; FORTES, A. C.; LOPES, J. S.; SANTANA, L. C. L. R.; RICARDO, N. M. P. S.; CITO, A. M. G. L. Constituintes voláteis e pectina de frutos de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32.,2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.
8. ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C. e ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.72–80, 2008.
9. BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, v. 13, p. 85-102, 1997.
10. BATISTA, L. M. e ALMEIDA, R. N. Central Effects of the Constituents of *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 16, p. 83-86, 1997.
11. BATISTA, L. M.; ALMEIDA, R. N.; DA-CUNHA, E. V. L; DA-SILVA, M. S. e BARBOSA-FILHO, J. M. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 50–53, 1999.
12. BAUTISTA, E.; CALZADA, F.; ORTEGA, A. e YÉPEZ-MULIA, L. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 55, p. 251-253, 2011.
13. BUM, E. N.; DAWACK, D. L.; SCHMUTZ, M.; RAKOTONIRINA, A.; RAKOTONIRINA, S. V.; PORTET, C.; JEKER, A.; OLPE, H. -R. e HERRLING,P. Anticonvulsant activity of *Mimosa pudica* decoction. **Fitoterapia**, v. 75, p. 309–314, 2004.
14. CAMARGO, L. M. M.; KAISER, C. R. e COSTA, S. S. Rotâmeros de isovitexina-O-2''-ramnopiranosídeo: o primeiro flavonóide isolado de *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2007. 1 CD-ROM.
15. CAMARGO, L. M. M.; KAISER, C. R.; ROMANOS, M. T. V. e COSTA, S. S. Uma flavona anti-herpética e outros flavonóides em *Mimosa xanthocentra*, uma planta consumida por cervídeos no Pantanal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32.,2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.
16. CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C. e VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 9-14, 2006.

17. COSTA, M. R. M. e PEREIRA, M. S. V. Efeito antimicrobiano in vitro do extrato da *Mimosa tenuiflora* Willd. Poir. (Jurema Preta) sobre microrganismos do biofilme dental. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 15. 2007, Areia e João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2007. 1 CD-ROM.
18. CRUZ, M. P.; SOUZA, E. P.; SILVA, N. R. A.; DUARTE, J. C.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; FILHO, A. O. S.; NAPIMOGA, M. H.; NAPIMOGA, J. T. C.; MARQUES, L. M. e YATSUDA, R. Avaliação do potencial antioxidante in vitro de plantas do semi-árido da Bahia selecionados por levantamento etnofarmacológico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.
19. DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P. e GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.
20. DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “caatinga” region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.
21. DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. Second Edition: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 507 p.
22. DOMINGUEZ, X. A.; GARCIA, S. G; WILLIAMS, H. J.; ORTIZ, C.; SCOTT, A. I. e REIBENSPIES, J. H. Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 864-867, 1989.
23. DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVENSE, M. I. e LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.
24. GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; PAULINO, G. M. e FRANCO, A. A. Atributos químicos e microbianos de solos sob diferentes coberturas vegetais no norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1521-1530, 2008.
25. GENEST, S.; KERR, C.; ANKIT, S.; RAHMAN, M. M.; SAIF-E-NASER, G. M. M.; NIGAM, P.; NAHAR, L. e SARKER, S. D. Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, p. 38-43, 2008.

26. GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R.; ARAÚJO FILHO, J.; OLIVEIRA, S. G. Characterization of condensed tannins from native legumes of the Brazilian northeastern semi-arid. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 522-528, 2006.
27. HUSSAIN, N.; MODAN, M. H.; SHABBIR, S. G. e ZAIDI, S. A. H. Antimicrobial principles in *Mimosa hamata*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 525-527, 1979.
28. IGNACIMUTHU, S.; AYYANAR, M. e SANKARASIVARAMAN, K. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Paliyar tribals in Theni district of Tamil Nadu, India. **Fitoterapia**, v. 79, p. 562–568, 2008.
29. JIANG, Y.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; TEULON, J. e GUECHOT, C. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1247-1253, 1991.
30. KIRK, L. F.; MØLLER, M. V.; CHRISTENSEN, J.; STÆRK, D.; EKPE, P.; JAROSZEWSKI, J. W. A 5-deoxyflavonol derivative in *Mimosa pudica*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 103–105, 2003.
31. KOKANE, D. D.; MORE, R. Y.; KALE, M. B.; NEHETE, M. N.; MEHENDALE, P. C.; GADGOLI, C. H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p. 311-315, 2009.
32. LIN, L.; CHIOU, C. e CHENG, J. 5-Deoxyflavones with Cytotoxic Activity from *Mimosa diplotricha*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2001–2004, 2011.
33. LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; UM, B. H.; STEINMETZ, M.; DECLERCQ, L. e ANTON, R. 4''-Hydroxymaysin and cassiaoccidentalin B, two unusual C-glycosylflavones from *Mimosa pudica* (Mimosaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 375–377, 2002.
34. MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. e THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970. 354 p.
35. MACCARI, A. e MARCHIORI, J. N. C. Estudo anatômico do xilema secundário de *Mimosa sparsa* Benth. **Ciência Florestal**, v. 4, p. 145-155, 1994.
36. MEDEIROS, R. M. T.; DE FIGUEIREDO, A. P. M.; BENÍCIO, T. M. A.; DANTAS, F. P. M. e RIET-CORREA, F. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicon**, v. 51, p. 316–319, 2008.

37. MENG, Q.; NIU, Y.; NIU, X.; ROUBIN, R. H. e HANRAHAN, J. R. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of the genus *Caragana* used in Traditional Chinese Medicine, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 350-368, 2009.
38. MORAES, E. H. F.; ALVARENGA, M. A.; FERREIRA, Z. M. G. S. e AKISUE, G. As bases nitrogenadas de *Mimosa scabrella* Benth. **Química Nova**, v.13, p. 308-309, 1990.
39. NASCIMENTO, I. A.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G. Constituintes químicos de *Mimosa artemisiana* (Heringer e Paula). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32.,2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.
40. NASCIMENTO, I. A.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; MATHIAS, L. e FONSECA, F. A. Flavonoides e outros compostos isolados de *Mimosa artemisiana* Heringer E Paula). **Química Nova**, v. 35, p. 2159-2164, 2012.
41. NEILSON, I. C. **Flora Malesiana**: Mimosaceae (Leguminosae-Mimosoideae). Rijksherbarium: Leiden. 1992. 126 p.
42. NUNES, X. P.; LIRA, D. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, D. A.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. Flavonas e Flavanonas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32.,2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.
43. NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M. e AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.
44. OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H. e FUKUYAMA, Y. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1728-1729, 2006.
45. PAES, J. B.; MARINHO, I. V.; LIMA, R. A.; LIMA, C. R. e AZEVEDO, T. K. B. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro no curtimento de peles. **Ciência Florestal**, v. 16, p. 453-462, 2006.
46. RIVERA-ARCE, E.; GATTUSO, M.; ALVARADO R.; ZÁRATE, E.; AGÜERO, J.; FERIA, I. e LOZOYA, X. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 400-408, 2007.

47. RODRIGUES, E.; MENDES, F. R. e NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to Central Nervous System disturbances: A bibliographical approach. **Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents**, v. 6, p. 211-244, 2006.
48. RODRIGUES, E.; TABACH, R.; GALDURÓZ, J. C. F. e NEGRI, G. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three brazilian cultures - indians, afro-brazilians, and river-dwellers. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 549-595, 2008.
49. ROSADO-VALLADO, M.; BRITO-LOEZA, W.; MENA-REJON, G. J.; QUINTERO-MARMOL, E. e FLORES-GUIDO, J. S. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 71, p. 570-573, 2000.
50. SANTOS, H. R. M e GROSS, E. Diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbiotes dos nódulos de *Mimosa arenosa* e *M. ophthalmocentra*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: SBG, 2008. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2008/23224.pdf>. Acesso em: 09 de maio de 2012
51. SHARMA, H. K.; ASHOKE, L. C. e DOLUI, K. Traditional medicinal plants in Mizoram, India. **Fitoterapia**, v. 72, p. 146-161, 2001.
52. SILVA, A. S. L. e SECCO, R. S. *Mimosa dasilvae*, uma nova Mimosaceae da Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, v. 30, p. 449-452, 2000.
53. SILVA, J. S. e SALES, M. F. O gênero *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco. **Rodriguésia**, v. 59, p. 435-448, 2008.
54. SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto**. 1999. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 1999.
55. SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M. e AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a Review of its Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 937-947, 2008.
56. SULAIMAN, S. F.; HASHIM, R.; CHONG, A.; SHU C. e LEE, T. J. Isolation and characterization of flavonoids from *Mimosa Pigra*. **Project Report**. USM, 2006.

57. YADAVA, R. N. e AGRAWAL, P. K. A new flavonoid glycoside: 5,7,4'-trihydroxy-6,3'5'-trimethoxy-flavone 7-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside from the roots of *Mimosa rubicaulis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 1, p. 15-19, 1998.
58. YUAN, K.; JIA, A.; LU, J. Isolation and structure identification of phenol chemical constituents from *Mimosa pudica*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 31, p. 1029-1030, 2006.
59. YUAN, K.; LU J. L.; JIA, A. e ZHU, J. X. Two new C-glycosylflavones from *Mimosa pudica*. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 1231–1234, 2007.
60. YUSUF, U. K.; ABDULLAH, N.; BAKAR, B.; ITAM, K.; ABDULLAH, F. e SUKARI, M. A. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 443–445, 2003.
61. ZHANG, J.; YUAN, K.; ZHOU, W.; ZHOU, J. e YANG, P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. **Pharmacognosy magazine**, v. 25, p. 35-39, 2011.

CAPÍTULO 2

ESTUDO QUÍMICO DE *Mimosa hostilis* BENTH POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS (CG-EM)

INTRODUÇÃO

A espécie *Mimosa hostilis* (Mart.) Benth, também identificada como as sinónimas *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. e *Acacia hostilis* Benth., conhecida popularmente como jurema-preta, calumbi e jurema (KEW, 2010) é uma árvore de 5 a 7 m de altura (Figura 1), de porte arbustivo, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante. Apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa. Ela tem folhas compostas, alternas, bipinadas com folíolos muito diminutos que caem e se refazem continuamente, cobrindo o solo com um tênue manto que logo se decompõe, formando ligeiras camadas de húmus (TIGRE, 1976).



Fonte: COSTA, 2011.

Figura 1. Árvore de *Mimosa hostilis* Benth

As flores da jurema preta são alvas e dispostas em espigas complexas (Figura 2). Apresenta inflorescências subterminais, isoladas e pedúnculo delgado, verde bem claro, glabro, com algumas verrugas esparsas (CORRÊA, 1969).

O fruto de *M. hostilis* é uma vagem pequena, ligeiramente espiralada e articulada, de tegumento muito fino e quebradiço quando maduro. A propagação da jurema preta é efetuada através de sementes com elevado poder germinativo (TIGRE, 1976).



Fonte: A: autor desconhecido, B: COSTA, 2011

Figura 2. Folhas e inflorescência de *Mimosa hostilis*.

A *M. hostilis* é uma leguminosa que compõe a dieta de bovinos na caatinga durante o período de seca e, por esse motivo, tem sido considerada uma planta forrageira importante (BRAGA, 1989; GOMES, 1977; TIGRE, 1976). As cascas apresentam propriedades sedativas, narcóticas e são empregadas para curtir couros. O caule é fornecedor de madeira para estacas (raramente brota depois de enterrada), lenha e carvão de excelente qualidade (BRAGA, 1989). Vasconcelos *et al.* (1987) confirmam que essa leguminosa poderia servir para o reflorestamento de áreas pobres, mineralizadas e erodidas das regiões áridas e semiáridas do Nordeste do Brasil. Eles constataram a ocorrência da jurema preta em solos de diferentes localidades do Ceará, associada ou não à infecção das raízes por fungos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. Silva *et al.* (1991) citaram que a jurema preta é uma das responsáveis pela proteção dos solos contra a erosão, pelo seu enriquecimento, pelo retardo do processo de assoreamento das barragens e por melhorias na qualidade do ar da região onde são encontradas.

Farmacologicamente a casca da raiz da jurema preta é tradicionalmente usada pelos índios da etnia Xucuru Kariri em conjunto com a jurema branca (*Mimosa verrucosa*) para fins medicinais e religiosos, pois possui maior parte dos alcaloides psicoativos. A casca da árvore também é usada para fins medicinais (OHSAKI *et al.*, 2006).

Em virtude da escassez de literatura e com base nas referências consultadas, pode-se dizer que não há constatação da existência de pragas e doenças que ataquem a jurema preta (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Mimosa hostilis ocorre em larga escala na caatinga, estando disseminada nos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Há fortes indícios de que a jurema preta apresenta dominância na sucessão florística da caatinga. Segundo Tigre (1976), essa espécie é altamente resistente e tolerante a qualquer meio.

Em estudos fitoquímicos anteriores, além dos flavonoides listados no Capítulo 1, foram também encontrados em *M. hostilis* os diterpenos *ent*-(13*S*)-8(17)-labden-15-ol [1], (13*R*)-labdan-8,15-diol [2] (FUKUYAMA *et al.*, 1999), mimosasideos A [3], B [4], C [5] e 8(17)-labden-15-ol-3'-*O*-acetil- α -*L*-raminosídeo [6] (OHSAKI *et al.*, 2006), além do alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina [7] (PACHTER *et al.*, 1959) mostrados na Figura 3.

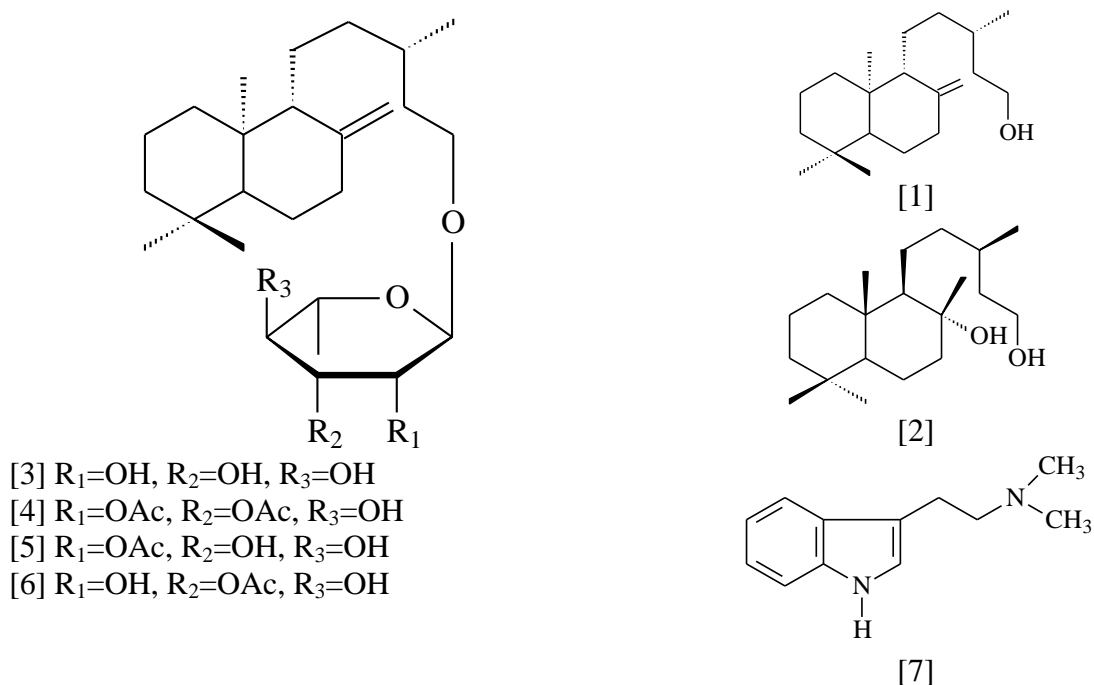


Figura 3. Substâncias encontradas em *Mimosa hostilis*

Com o objetivo de conhecer um pouco mais a composição química de *M. hostilis*, os extratos e frações de folhas, galhos e cascas foram analisados usando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Massas (CG-EM) para se obter o perfil químico das amostras e identificar substâncias presentes nas mesmas.

MATERIAIS E MÉTODOS

PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes empregados no preparo dos extratos e frações e nas eluições das Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Cromatografia em Coluna (CC) foram acetato de etila, acetona, butanol, clorofórmio, diclorometano, etanol, hexano e metanol de grau analítico das marcas Fmaia[®], Qhemis[®], Quimex[®], Synth[®] e Vetec[®]. Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório da marca IK[®]RV 10.

Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm, ambas de procedência da Acros Organics[®]. Também foram realizadas filtrações em gel Sephadex LH 20 da marca Pharmacia[®]. Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas 20x20 de gel de sílica 60 F₂₅₄ da Merck (0,25 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência UV254). As placas de CCDC foram reveladas com luz UV λ 254 e 365 nm (Spectroline – Model CM-10, Fluorescence Analysis Cabinet) ou/e vapores de iodo.

As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μ m) e hélio como gás de arraste.

MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Contendas do Sinocrá, Bahia, na área de preservação da FLONA com sede na Rodovia BA 026, que liga Sussuarana a Contendas do Sinocrá, Km 22. Localizada a 142°, LO: 271635, UTM: 8459917, em área do semiárido, com vegetação de caatinga. Para a coleta da planta, foi concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a Autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie coletada foi fotografada, catalogada, e depositada (Nº HUESBVC 4907, 4980 e 4993) no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. MSc. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsiccatas foram preparadas seguindo as orientações de Mori *et al.*, (1989) e a identificação taxonômica feita por comparação no herbário e através de literatura.

PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados separadamente a partir da casca do caule (301g), folhas (200g) e galhos (420g) da planta seca a temperatura ambiente e moída, por maceração em erlenmeyer com etanol suficiente para cobrir o material vegetal, agitando esporadicamente. Após filtração, os extratos foram concentrados em pressão reduzida até eliminação do etanol, fornecendo os extratos etanólicos de cascas (49,7g), folhas (41,2g) e galhos (31,9g). Esse procedimento foi repetido no mínimo três vezes para se obter os extratos etanólicos que foram usados nos testes biológicos e análise fitoquímica.

PREPARO DAS FRAÇÕES

Os extratos foram solubilizados em uma mistura etanol/água e particionados com solvente de polaridade crescente dando origem as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As massas obtidas a partir do extrato etanólico de *M. hostilis* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Massas das frações obtidas a partir do extrato etanólico de *Mimosa hostilis*

Frações	Cascas (32g)	Folhas (37g)	Galhos (20g)
Hexano	0,78g	11,30g	0,90g
Diclorometano	0,76g	7,85g	1,10g
Acetato de etila	15,10g	2,48g	3,18g
Butanol	8,78g	4,32g	3,69g

ANÁLISE DAS FRAÇÕES EM HEXANO E DICLOROMETANO DAS FOLHAS

A fração em hexano das folhas - FHF (9,3 g) foi submetida a fracionamento em CC utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e como eluente misturas de Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade finalizando com metanol. Após remoção do solvente à vácuo e análise por CCDC, foram reunidas 12 frações.

A fração 6 (618,5 mg), que foi eluída em Hex:AcOEt (4:1), foi submetida a novo fracionamento em gel de sílica. O eluente usado foi a mistura de Hex:DCM iniciando numa proporção 9:1 com gradiente crescente de polaridade. Das 14 subfrações obtidas foram encontradas duas substâncias puras denominadas **FHF1** (134,9 mg) e **FHF2** (34,5 mg) que se apresentaram como óleos amarelados.

A fração 7 (1,77 g), que foi eluída em Hex:AcOEt (7:3), foi submetida a fracionamento em gel de sílica usando como eluente a mistura de Hex:AcOEt iniciando numa proporção 9:1 com gradiente crescente de polaridade, finalizando com metanol. Das 12 subfrações obtidas foi separada a fração **FHF3** (130,8 mg) um óleo amarelo.

A fração em diclorometano das folhas (18,8 g) foi submetida a fracionamento em CC utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como eluente misturas de CHCl₃:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Após remoção do solvente em pressão reduzida e análise por CCDC, foram reunidas 18 frações.

A fração 13 (1,52 g), que foi eluída com CHCl₃:AcOEt (1:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20, usando metanol como eluente obtendo, 9 subfrações.

A subfração 13.4, 18,1 mg de substância sólida, apresentou-se pura quando analisada por CCDC e foi denominada **FDF1**.

A subfração 13.6, foi eluída com metanol, e submetida à CC em gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm (*Flash*) e eluída em sistema CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade, obtendo 15 subfrações. A subfração 13.6.13, eluída com CHCl₃:MeOH (1:1), apresentou-se como substância sólida denominada **FDF2** (29,8 mg).

IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES EM *M. hostilis* POR CG-EM

Os extratos, as frações e subfrações citadas em destaque foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM)

Antes de serem analisados por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas a derivatização por sililação. Para esta reação foram pesados 3 mg da amostra em *vial*, onde foram diluídos em 60 µL de piridina. A esta solução foram adicionados 100 µL da mistura reacional de *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 µL da mistura foi injetado no CG-EM (SJÖSTRÖM e ALÉN, 1999).

Foi utilizado CG-EM (QP2010SE -GC2010 Plus) da marca Shimadzu® usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura empregada no injetor, detector e interface do sistema CG-EM foram 290 °C. A temperatura inicial da análise foi de 80 °C por 5 min, aumentando de a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos (SILVESTRE *et al.*, 2001; FREIRE *et al.*, 2002). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de análises de extratos serem feitas frequentemente com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas (CLAE-EM) uma vez que os compostos naturais são normalmente moléculas polares e termicamente lábeis, as análises em CG-EM são usadas a fim de identificar um maior número de compostos por se obter maiores informações estruturais, usando particularmente precisas medições de massas de ionização por impacto de elétrons e de ionização química combinada com derivatização da amostra. A desvantagem dessa técnica é a baixa resolução no cromatograma (KITSON, LARSEN e McEWEN, 1996).

A derivatização dos componentes do extrato foi necessária para aumentar a volatilidade e estabilidade dos mesmos, já que degradações térmicas podem ocorrer durante a cromatografia, onde a temperatura varia entre 80 e 290 °C (GOTILIEB, 1968). A derivatização conveniente usada foi a metodologia para obtenção de derivados de trimetilsilil, cuja reação é comumente chamada de sililação. A adição do grupo trimetilsilil (TMS) ao grupo funcional polar do composto confere estabilidade térmica e química, além de maior volatilidade. A formação do éter trimetilsilil é uma técnica muito comum para o preparo de derivados de álcoois, esteróis, álcoois terpênicos como também uma larga variedade de outros compostos como ácidos, aminas, tióis entre outros (BARROS, 2003). Os derivados de trimetilsilil são formados como mostrado de forma simplificada na Figura 4.

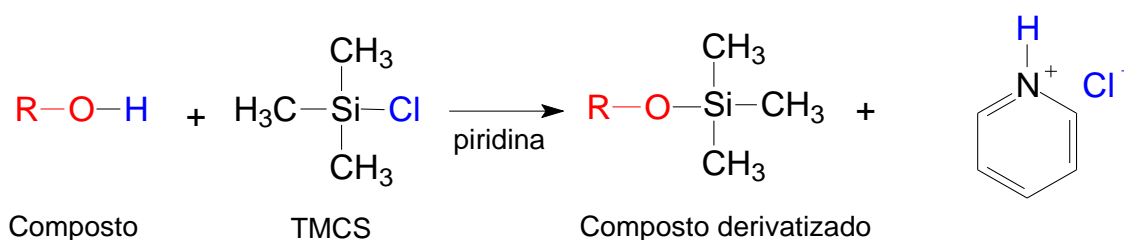


Figura 4. Equação da reação de sililação de grupos hidroxilas

ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CG-EM

A Figura 5 ilustra os cromatogramas dos extratos etanólico das folhas (Figura 5a), cascas (Figura 5b) e galhos (Figura 5c) de *M. hostilis* após derivatização. As substâncias identificadas estão descritas na Tabela 2.

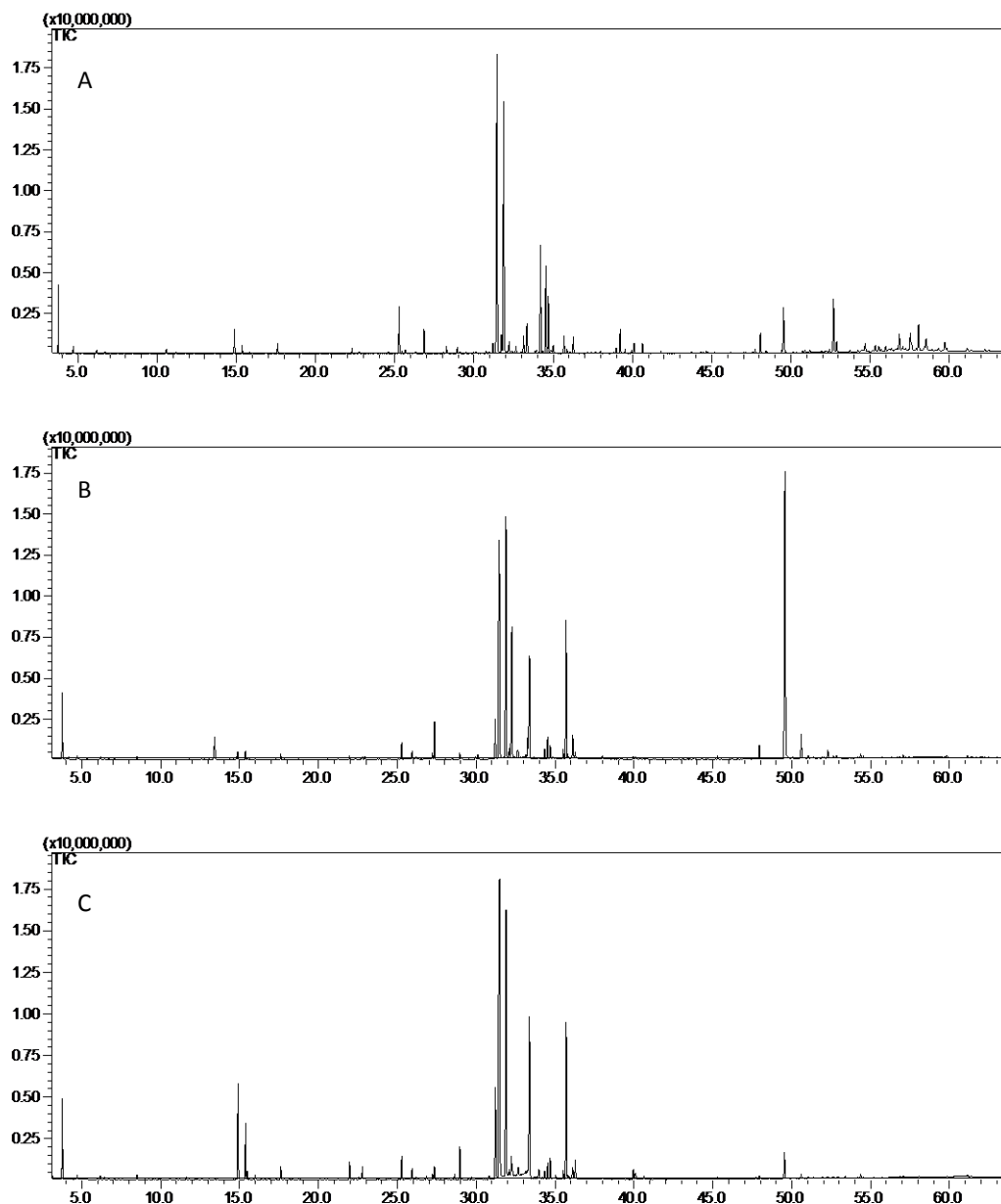


Figura 5. Cromatogramas de íons totais dos extratos etanólico das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis*.

Os compostos derivatizados foram identificados de acordo com as fragmentações propostas a partir dos espectros de massas obtidos, em comparação com espectros existentes no banco de dados do aparelho, apresentando similaridade acima de 90%, com dados descritos na literatura e também com injeção de amostras padrões. A quantificação foi realizada apenas pelo percentual relativo a área de cada amostra.

Tabela 2. Constituintes químicos (% área relativa) identificados nos extratos etanólico de folhas, cascas e galhos de *M. hostilis*.

t_R	Identificação	[M ⁺]	Fórmula	Folhas	Cascas	Galhos
7,93	3-hidroxi-butanoato de etila	204	C ₉ H ₂₀ O ₃ Si	0,03	-	-
9,98	ácido 3-hidroxi-propanóico	234	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	-	-	0,05
10,57	ácido 3-hidroxi-butanóico	248	C ₁₀ H ₂₄ O ₃ Si ₂	0,23	-	0,08
11,19	ácido 4-acetoxi-butanóico	218	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	0,11	-	-
12,21	ácido propanodióico	248	C ₉ H ₂₀ O ₄ Si ₂	0,00	0,02	0,03
12,78	2-metoxifenol	196	C ₁₀ H ₁₆ O ₂ Si	-	0,03	-
13,41	ácido benzóico	194	C ₁₀ H ₁₄ O ₂ Si	0,02	-	-
13,62	ácido 4-etoxi-4-oxi-butanóico	218	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	0,05	-	-
14,35	2-hidroxi-etilamina	277	C ₁₁ H ₃₁ NOSi ₃	-	0,03	-
15,24	ácido fenilacético	208	C ₁₁ H ₁₆ O ₂ Si	0,02	-	-
15,84	ácido 3-hidroxi-hexanóico	276	C ₁₂ H ₂₈ O ₃ Si ₂	0,08	-	0,02
15,98	ácido butanodióico	262	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂	0,04	0,06	0,23
16,84	ácido 2,3-di-hidroxi-propanóico	322	C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si ₃	-	0,02	0,05
21,96	ácido 2-hidroxi-butanodióico / malico	350	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃	-	0,21	0,89
22,30	2-hidroxi-benzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,27	0,13	0,09
25,66	ácido 4-hidroxi-benzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,23	-	0,02
29,52	ácido 3-metoxi-4-hidroxi-benzóico	312	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	-	0,04	0,07
29,97	ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	-	0,19	-
30,33	ácido nonanodióico / azeláico	332	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂	-	0,00	0,01
31,06	ácido 3,4-di-hidroxi-benzóico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	0,07	0,02	0,04
34,20	3,4,5-tri-hidroxi-benzoato de etila	414	C ₁₈ H ₃₄ O ₅ Si ₃	6,53	0,03	0,11
34,68	ácido 3,4,5-tri-hidroxi-benzóico	458	C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄	3,33	0,83	1,19
35,00	hexadecanoato de etila	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0,52	0,09	0,27
36,26	ácido hexadecanóico	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	1,05	0,41	1,01
38,50	ácido heptadecanóico	342	C ₂₀ H ₄₂ O ₂ Si	-	-	0,03
38,83	(Z,Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila	308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	0,07	0,05	0,07
38,96	(Z)-octadec-9-enoato de etila	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	-	-	0,07
38,98	(Z,Z,Z)-octadeca-9,12,15-trienoato de etila	306	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	0,32	-	-
39,53	octadecanoato de etila	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₃	0,21	-	-
39,95	ácido (Z,Z)-octadeca-9,12-dienóico	352	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	0,23	0,21	0,56
40,07	ácido (Z)-octadec-9-enóico	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	-	0,11	0,27
40,11	ácido (Z,Z,Z)-octadeca-9,12,15-trienóico	350	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si	0,70	0,04	0,21
40,22	ácido (E)-octadec-9-enóico	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	-	-	0,03
40,64	ácido octadecanóico	356	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	0,59	0,05	0,17
43,72	eicosanoato de etila	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	0,11	-	-
44,68	ácido eicosanóico	384	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si	0,12	-	0,03
47,59	tricosanoato de etila	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	0,08	-	-
47,73	hexadecanoato de 2,3-di-hidroxi-propila	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	0,19	0,03	0,08
48,47	ácido docosanóico	412	C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si	0,16	0,07	0,03
50,74	(Z)-octadec-9-enoato de 2,3-di-hidroxi-propila	500	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂	0,15	0,04	-
51,18	octadecanoato de 2,3-di-hidroxi-propila	502	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂	0,18	0,02	-
51,93	ácido tetracosanóico	440	C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si	0,07	0,10	0,08
52,69	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona	430	C ₂₂ H ₃₀ O ₅ Si ₂	3,51	-	-

<i>Continuação</i>						
52,89	4',5,7-Tri-hidroxiflavanona	488	C ₂₄ H ₃₆ O ₅ Si ₃	0,76	0,01	0,12
55,17	ácido hexacosanóico	468	C ₂₉ H ₆₀ O ₂ Si	0,10	0,03	-
56,85	5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol	488	C ₂₄ H ₃₂ O ₇ Si ₂	1,38	0,04	0,08
57,07	alfa-tocoferol	502	C ₃₂ H ₅₈ O ₂ Si	0,44	0,17	0,12
57,54	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol	604	C ₂₈ H ₄₄ O ₇ Si ₄	1,44	-	-
58,06	5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol	546	C ₂₆ H ₃₈ O ₇ Si ₃	2,07	-	-
59,19	Campesterol	472	C ₃₁ H ₅₆ OSi	-	0,07	0,06
59,85	Estigmasterol	484	C ₃₂ H ₅₆ OSi	0,19	0,13	0,09
61,14	beta-sitosterol	486	C ₃₂ H ₅₈ OSi	0,30	0,12	0,12
61,37	beta-amirina	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	0,12	-	-
62,25	alfa-amirina	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	0,19	-	-
62,50	lup-20(29)-en-3-ol acetato	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	0,13	-	-
Identificados				26,39	3,38	6,37
Carboidratos				62,28	86,12	86,00
Não identificados				11,33	10,49	7,63

t_R = Tempo de retenção

Observa-se na Figura 5, que os compostos principais nos extratos etanólico das partes estudadas estão presentes na mesma região, com tempo de retenção (t_R) entre 30 e 40 min. Esses compostos que totalizam cerca de 62% de substâncias presentes nas folhas e 86% nas cascas e galhos e, foram identificados como sendo carboidratos, normalmente presentes em extratos hidrofílicos. Cada carboidrato, quando submetido à sililação, origina aproximadamente quatro picos correspondentes a isômeros diferentes quando submetidos a análise por cromatografia gasosa, o que dificulta a sua identificação (GULLICHSEN e PAULAPURO, 2000). Com isso os carboidratos foram identificados de uma forma geral, de acordo com seu padrão de fragmentação que apresenta picos característicos em *m/z* 191, 204.

Cerca de 10% da área total das substâncias presentes nos extratos etanólicos analisados não foram identificados por não apresentarem padrão de fragmentação conhecido e nem possuírem fragmentações suficientes para serem comparadas com a literatura.

Dentre os compostos identificados, encontram-se ácidos graxos, aromáticos, flavonoides e esteroides, todos descritos na tabela 2. Observa-se ainda nesta tabela que o extrato etanólico da casca tem um perfil cromatográfico muito semelhante com o do extrato dos galhos que trata-se da mistura de casca e cerne da planta.

Em estudo realizado com farinhas de sementes de sete espécies do gênero *Mimosa* (Leguminosae, Mimosoideae), mostrou que a substância predominante foi o ácido graxo

saturado ácido hexadecanóico (ácido palmítico), com exceção das espécies *M. pigra*, que apresentou o ácido graxo insaturado *Z*-octadec-9,12-dienóico (ácido linoleico) e *M. acutistipula*, cujo ácido graxo mais abundante foi o *Z*-octadec-9-enóico (ácido oleico) (GADELHA, 1995).

ANÁLISE DAS FRAÇÕES POR CG-EM

Na figura 6 podem ser observados os cromatogramas referente a análise da fração em hexano das folhas (6a), cascas (6b) e galhos (6c) de *M. hostilis*, e na Tabela 3 a identificação dos compostos presentes.

Tabela 3. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração hexânica de folhas, cascas e galhos de *M. hostilis*.

t_R	Identificação	$[M^+]$	Fórmula	Folhas	Cascas	Galhos
6,01	1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclo-hexeno	136	$C_{10}H_{16}$	0,03	-	-
7,31	ácido hexanóico	188	$C_9H_{20}O_2Si$	0,11	-	-
10,17	álcool benzílico	180	$C_{10}H_{16}OSi$	0,06	-	-
10,59	ácido 3-hidroxibutanóico	248	$C_{10}H_{24}O_3Si_2$	0,07	-	-
11,20	ácido 4-acetoxibutanóico	218	$C_9H_{18}O_4Si$	0,05	-	-
13,43	ácido benzóico	194	$C_{10}H_{14}O_2Si$	0,05	0,02	0,08
14,95	2-feniletilamina	193	$C_{11}H_{19}NSi$	0,06	-	-
22,31	ácido 2-hidroxibenzóico	282	$C_{13}H_{22}O_3Si_2$	0,11	0,07	0,29
26,29	ácido decanóico	272	$C_{15}H_{32}O_2Si$	0,07	0,29	0,25
31,50	ácido tetradecanóico	300	$C_{17}H_{36}O_2Si$	0,11	0,33	0,26
33,94	ácido pentadecanóico	314	$C_{18}H_{38}O_2Si$	0,07	0,22	0,23
34,18	3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila	414	$C_{18}H_{34}O_5Si_3$	0,40	-	0,06
34,68	ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico	458	$C_{19}H_{38}O_5Si_4$	0,41	0,18	0,11
34,86	hexadec-9-enoato de etila	282	$C_{18}H_{34}O_2$	0,04	-	-
35,00	hexadecanoate de etila	284	$C_{18}H_{36}O_2$	0,96	1,73	3,04
36,27	ácido hexadecanóico	328	$C_{19}H_{40}O_2Si$	6,04	11,67	12,27
37,33	heptadecanoato de etila	298	$C_{19}H_{38}O_2$	-	0,15	-
37,47	hexatrienoato de metila	264	$C_{17}H_{28}O_2$	-	0,09	0,11
37,96	ácido (<i>Z</i>)-heptadec-10-enóico	340	$C_{20}H_{40}O_2Si$	-	0,09	0,10
38,50	ácido heptadecanóico	342	$C_{20}H_{42}O_2Si$	0,17	0,49	0,48
38,75	Octadecanol	342	$C_{21}H_{46}OSi$	0,05	0,02	-
38,83	(<i>Z,Z</i>)-octadeca-9,12-dienoato de etila	308	$C_{20}H_{36}O_2$	0,24	1,02	1,18
38,99	(<i>Z</i>)-octadec-9-enoato de etila	310	$C_{20}H_{38}O_2$	0,92	1,19	1,82
39,11	(<i>Z,Z,Z</i>)-octadeca-9,12,15-trienoato de etila	306	$C_{20}H_{34}O_2$	-	-	0,09
39,54	octadecanoato de etila	312	$C_{20}H_{40}O_3$	0,55	0,50	0,74

<i>Continuação</i>						
39,96	ácido (Z,Z)-octadeca-9,12-dienóico	352	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	1,75	7,54	6,49
40,09	ácido (Z)-octadec-9-enóico	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	-	8,70	8,53
40,12	ácido (Z,Z,Z)-octadeca-9,12,15-trienóico	350	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si	6,49	-	-
40,22	ácido (E)-octadec-9-enóico	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	0,16	0,56	0,43
40,65	ácido octadecanóico	356	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	4,91	2,17	2,90
42,70	ácido nonadecanóico	370	C ₂₂ H ₄₆ O ₂ Si	0,07	0,09	0,08
42,91	Eicosanol	370	C ₂₃ H ₅₀ OSi	0,12	0,17	0,18
43,72	eicosanoato de etila	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	0,13	0,13	0,25
44,23	ácido 12-hidroxiocetadec-9-enóico	442	C ₂₄ H ₅₀ O ₃ Si ₂	-	0,06	-
44,47	Henicosanol	384	C ₂₄ H ₅₂ OSi	0,19	-	0,07
44,68	ácido eicosanóico	384	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si	1,48	0,65	0,83
46,58	ácido heneicosanóico	398	C ₂₄ H ₅₀ O ₂ Si	0,06	0,18	0,25
47,14	hexadecanoato de 1,2-di-hidroxietila	460	C ₂₄ H ₅₂ O ₄ Si ₂	0,05	0,10	0,15
47,74	hexadecanoato de 2,3-di-hidroxiopropila	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	0,88	1,19	1,78
48,43	ácido docosanóico	412	C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si	1,83	1,65	1,39
50,21	ácido tricosanóico	426	C ₂₆ H ₅₄ O ₂ Si	0,05	0,35	0,44
50,35	Tetracosanol	426	C ₂₇ H ₅₈ OSi	-	0,15	0,24
50,61	octadecanoato de 1,2-di-hidroxietila	502	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂	0,08	-	-
50,73	(Z)-octadec-9-enoato de 2,3-di-hidroxiopropila	500	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂	0,57	1,92	1,99
51,93	ácido tetracosanóico	440	C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si	0,84	4,50	3,14
52,80	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona	430	C ₂₂ H ₃₀ O ₅ Si ₂	-	0,25	0,30
55,19	ácido hexacosanóico	468	C ₂₉ H ₆₀ O ₂ Si	0,26	2,56	1,97
56,77	ácido heptacosanóico	482	C ₃₀ H ₆₂ O ₂ Si	-	0,12	-
56,84	5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol	488	C ₂₄ H ₃₂ O ₇ Si ₂	1,40	2,13	3,69
56,96	5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona	458	C ₂₃ H ₃₀ O ₆ Si ₂	-	0,12	-
57,07	alfa-tocoferol	502	C ₃₂ H ₅₈ O ₂ Si	3,32	6,23	1,80
57,58	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol	604	C ₂₈ H ₄₄ O ₇ Si ₄	0,82	0,62	0,60
57,81	nonacosanoato de etila	466	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	-	0,58	0,52
58,81	5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona	516	C ₂₅ H ₃₆ O ₆ Si ₃	-	0,63	0,27
59,21	Campesterol	472	C ₃₁ H ₅₆ OSi	0,84	3,95	1,95
59,86	Estigmasterol	484	C ₃₂ H ₅₆ OSi	1,82	6,83	4,50
60,74	Triacontanol	510	C ₃₃ H ₇₀ OSi	-	-	0,35
61,14	beta-sitosterol	486	C ₃₂ H ₅₈ OSi	2,66	6,26	4,21
61,38	beta-amirina	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	1,22	0,17	-
62,26	alfa-amirina	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	1,91	-	0,37
62,50	acetato de lup-20(29)-en-3-ol	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	1,38	1,30	1,79
62,66	Cicloartenol	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	-	0,45	-
63,11	ácido tricontanóico	524	C ₃₃ H ₆₈ O ₂ Si	-	0,89	0,77
64,25	24-metileno acetato β-9,19-Ciclolanostan-3-ol	482	C ₃₃ H ₅₄ O ₂	-	0,26	-
69,86	ácido docotriacontanóico	552	C ₃₅ H ₇₂ O ₂ Si	-	0,42	-
Identificados				45,87	81,92	73,32
Carboidratos				2,91	2,91	7,60
Hidrocarbonetos				4,47	1,42	1,92
Esteroides				4,47	1,42	1,92
Não identificados				42,28	12,35	15,24

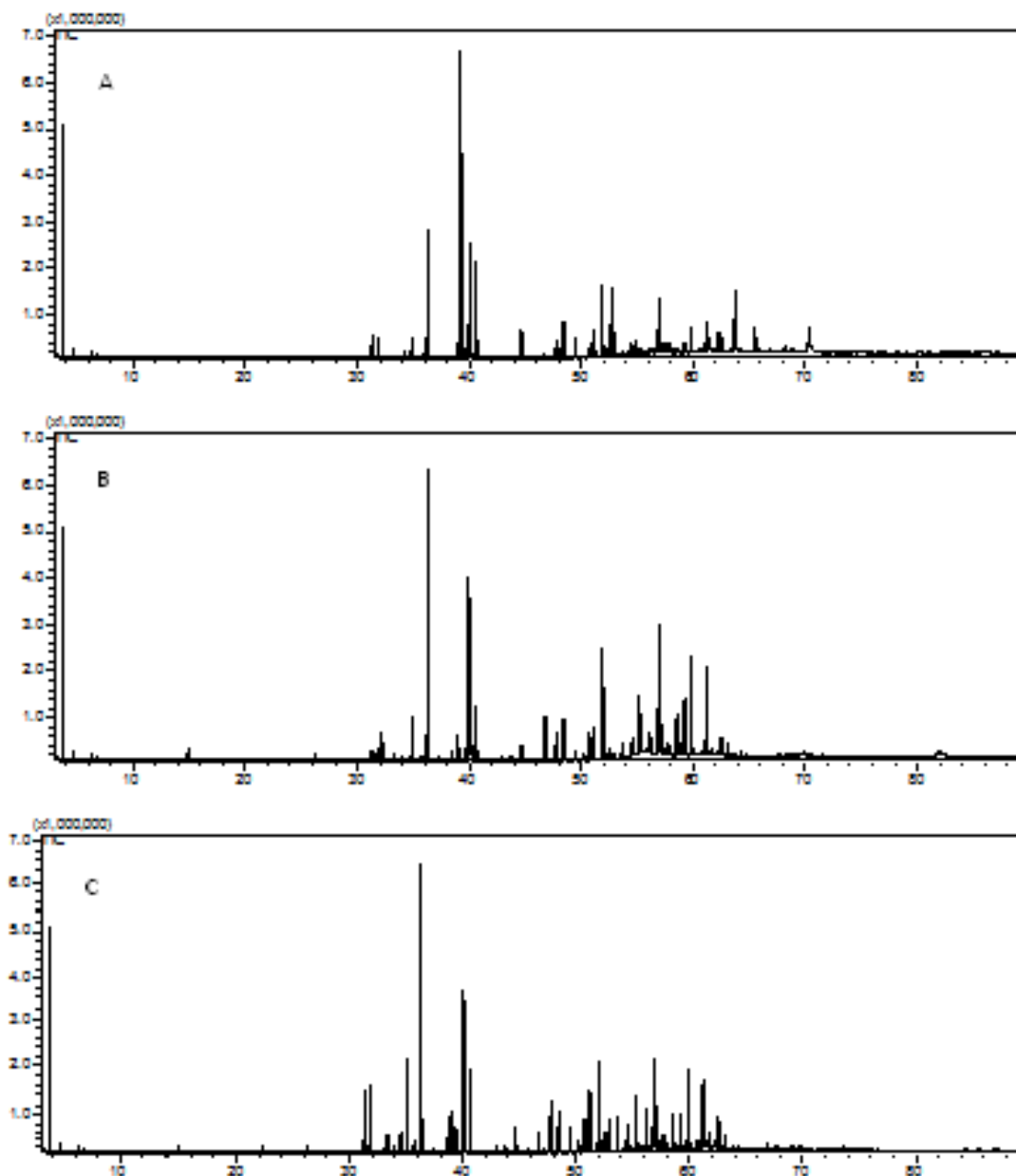


Figura 6. Cromatogramas de íons totais da fração hexânica das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis*.

Como a fração hexânica apresenta um caráter lipofílico, um percentual maior do extrato foi identificado nas cascas e galhos, que continuou apresentando um perfil cromatográfico semelhante. Cerca de 50% da fração em hexano das folhas não foi identificado, mas os prováveis metabólitos especiais presentes nessa fração sejam esteroides, terpenos e acetofenonas, difíceis de serem identificados apenas por espectrometria de massas (CEHCINEL FILHO E YUNES, 1998).

A figura 7 apresenta os cromatogramas obtidos nas análise por CG-EM da fração em diclorometano das folhas (6a), cascas (6b) e galhos (6c) de *M. hostilis*. A identificação das substâncias encontra-se na Tabela 4.

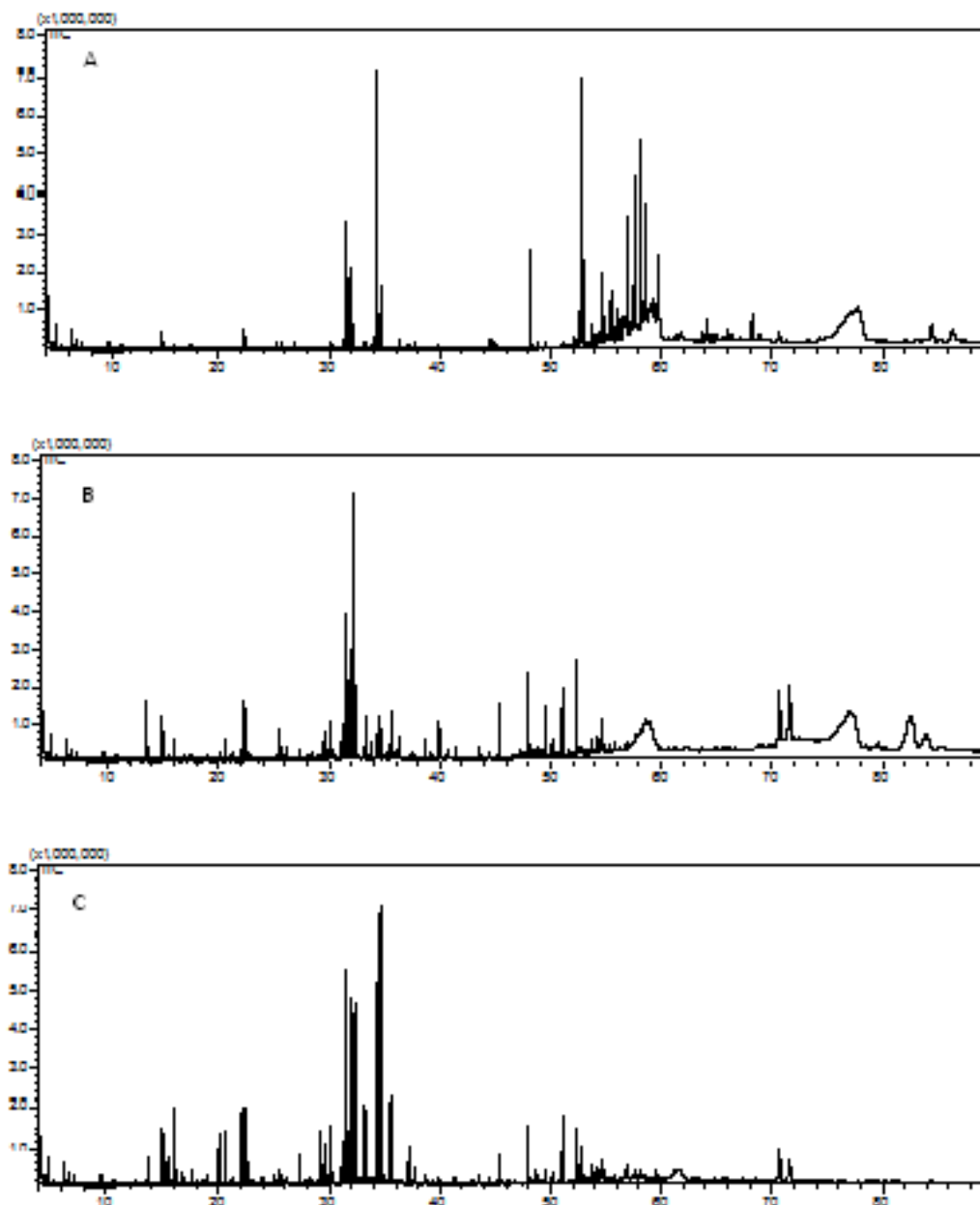


Figura 7. Cromatogramas de íons totais da fração em diclorometano das folhas (A), cascas (B) e galhos (C) de *Mimosa hostilis*.

Observando a figura 7, nota-se que o perfil cromatográfico das folhas difere ainda mais do perfil cromatográfico de casca e galhos, porém as substâncias identificadas são semelhantes aquelas identificadas no extrato etanólico e na fração em hexano.

Tabela 4. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração em diclorometano de folhas, cascas e galhos de *M. hostilis*.

t_R	Identificação	[M ⁺]	Fórmula	Folhas	Cascas	Galhos
9,96	1,3-di-hidroxi-3-metilbutano	248	C ₁₁ H ₂₈ O ₂ Si ₂	-	-	0,05
10,03	ácido 3-hidroxiopropanoico	234	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	-	-	0,25
10,20	álcool benzílico	180	C ₁₀ H ₁₆ OSi	0,08	-	-
10,61	ácido 3-hidroxiбутаноico	248	C ₁₀ H ₂₄ O ₃ Si ₂	0,27	0,16	0,12
11,13	ácido 5-metoxipentanoico / valérico	204	C ₉ H ₂₀ O ₃ Si	-	-	0,03
11,22	ácido 4-acetoxibutanoico	218	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	0,22	-	-
12,82	2-metoxifenol	196	C ₁₀ H ₁₆ O ₂ Si	-	-	0,07
13,46	ácido benzoico	194	C ₁₀ H ₁₄ O ₂ Si	-	-	0,14
13,64	ácido 4-etoxi-4-oxibutanóico/succinato de etila	218	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	-	0,53	0,65
14,97	2-feniletilamina	193	C ₁₁ H ₁₉ NSi	0,15	-	-
15,28	ácido fenilacético	208	C ₁₁ H ₁₆ O ₂ Si	-	-	0,05
15,79	3-hidroxiбутан-2-ona	160	C ₇ H ₁₆ O ₂ Si	-	-	0,08
15,87	ácido 3-hidroxiexanóico	276	C ₁₂ H ₂₈ O ₃ Si ₂	0,11	-	-
16,91	ácido 2-cetoexanoico	202	C ₉ H ₁₈ O ₃ Si	-	0,12	0,23
17,25	(Z) ácido 4-hidroxi-pent-3-enoico	260	C ₁₁ H ₂₄ O ₃ Si ₂	-	-	0,04
18,25	3-hidroxiifenol	254	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	-	-	0,04
18,86	4-hidroxiifenol	254	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	-	-	0,27
19,99	álcool <i>o</i> -hidroxibenzílico	268	C ₁₃ H ₂₄ O ₂ Si ₂	-	-	0,90
22,33	ácido 2-hidroxi-benzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,57	2,37	2,14
22,94	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeido	224	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ Si	-	0,17	-
25,67	ácido 4-hidroxi-benzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,22	0,55	0,32
27,73	ácido octanodioico	318	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si ₂	-	-	0,09
27,92	2,5-di-hidroxi-benzoato de metila	312	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	-	0,17	-
28,06	4-etanoil-2-metoxifenol	312	C ₁₅ H ₂₈ O ₃ Si ₂	-	-	0,09
28,50	2,4-di-hidroxi-benzoato de metila	312	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	-	0,32	0,08
29,53	ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	312	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂	-	1,10	1,05
29,66	4-etanoil-2-hidroxiifenol	370	C ₁₇ H ₃₄ O ₃ Si ₃	-	-	0,13
29,77	ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzenoacético	326	C ₁₅ H ₂₆ O ₄ Si ₂	-	0,20	0,07
30,00	ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	-	-	1,66
30,34	ácido nonanodioico/ azelaico	332	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂	0,14	0,35	0,32
31,02	ácido 2,4-di-hidroxi-benzoico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	-	0,86	0,58
31,08	ácido 3,4-di-hidroxi-benzoico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	-	0,72	0,27
33,05	ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico	342	C ₁₅ H ₂₆ O ₅ Si ₂	-	0,42	0,36
33,86	ácido <i>p</i> -cumarico	308	C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Si ₂	0,12	0,65	0,19
34,22	3,4,5-tri-hidroxi-benzoato de etila	414	C ₁₈ H ₃₄ O ₅ Si ₃	9,80	1,03	7,39
34,70	ácido 3,4,5-tri-hidroxi-benzoico	458	C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄	1,95	1,29	1,98
36,29	ácido hexadecanoico	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	0,26	0,86	0,07
40,12	ácido (Z,Z,Z)-octadeca-9,12,15-trienoico	350	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si	-	0,46	-
40,66	ácido octadecanoico	356	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	-	0,22	-
47,75	hexadecanoato de 2,3-di-hidroxi-propila	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	-	0,06	0,04
52,78	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona	430	C ₂₂ H ₃₀ O ₅ Si ₂	12,43	-	1,33
52,93	4',5,7-Tri-hidroxi-flavanona	488	C ₂₄ H ₃₆ O ₅ Si ₃	2,90	-	0,21
55,21	ácido hexacosanoico	468	C ₂₉ H ₆₀ O ₂ Si	-	-	0,04

Continuação						
56,86	5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol	488	$C_{24}H_{32}O_7Si_2$	-	-	0,44
56,90	5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona	458	$C_{23}H_{30}O_6Si_2$	4,89	0,26	-
57,06	5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona	428	$C_{22}H_{28}O_5Si_2$	0,14	-	-
57,56	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol	604	$C_{28}H_{44}O_7Si_4$	-	-	0,13
58,09	5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol	546	$C_{26}H_{38}O_7Si_3$	-	-	0,43
58,84	5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona	516	$C_{25}H_{36}O_6Si_3$	5,58	-	-
Identificados				39,83	12,88	22,33
Carboidratos				11,07	35,94	45,90
Ácidos				0,16	0,39	0,32
Não identificados				48,94	50,80	31,45

t_R = Tempo de retenção

Os cromatogramas obtidos das frações em acetato de etila (Figura 8), por se tratarem de compostos mais hidrofílicos, não apresentaram muitos picos, sendo identificados os ácidos graxos e alguns compostos aromáticos (Tabela 5). Como a fração dos galhos apresentou um perfil semelhante a fração da casca, o mesmo não foi analisado.

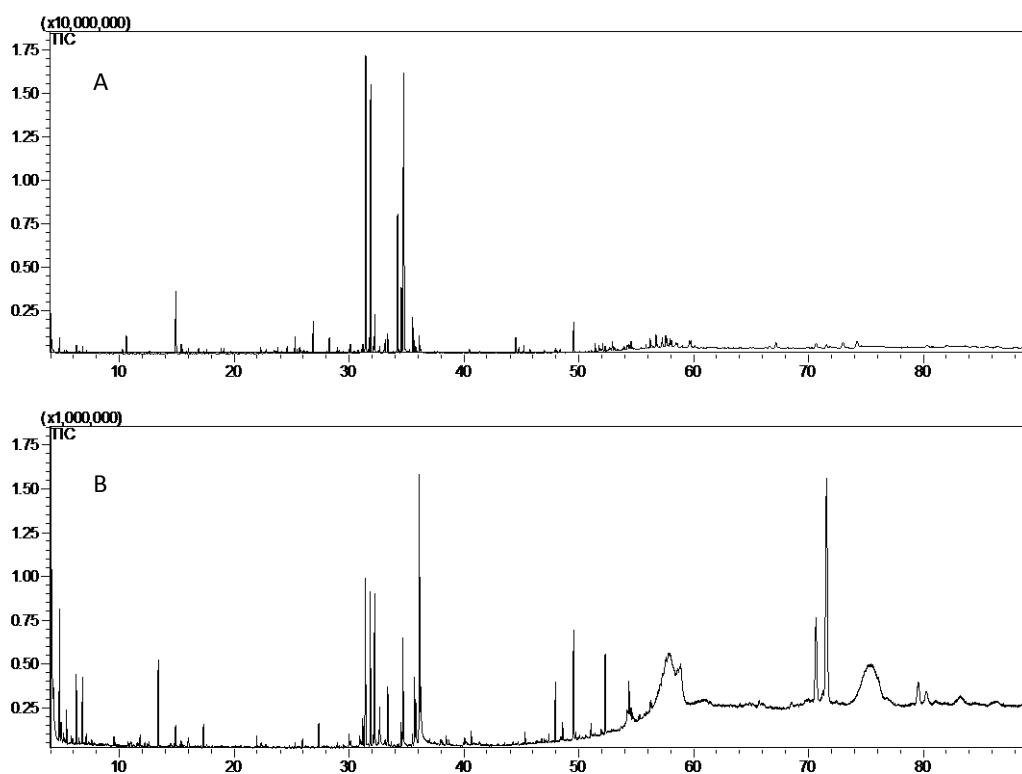


Figura 8. Cromatogramas de íons totais da fração em acetato de etila das folhas (A) e cascas (B) de *Mimosa hostilis*.

Tabela 5. Constituintes químicos (% área relativa) identificados na fração em acetato de etila de folhas, cascas e galhos de *M. hostilis*.

t_R	Identificação	[M ⁺]	Fórmula	Folhas	Cascas
7,11	ácido 2-hidroxiopropanóico	234	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,13	-
9,94	1,3-di-hidroxi-3-metilbutano	248	C ₁₁ H ₂₈ O ₂ Si ₂	0,06	-
10,01	ácido 3-hidroxiopropanóico	234	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,07	-
10,60	ácido 3-hidroxiбутанóico	248	C ₁₀ H ₂₄ O ₃ Si ₂	0,77	-
14,97	2-feniletilamina	193	C ₁₁ H ₁₉ NSi	0,22	-
15,53	butan-1,2,3-triol	322	C ₁₃ H ₃₄ O ₃ Si ₃	0,22	-
15,86	ácido 3-hidroxiexanóico	276	C ₁₂ H ₂₈ O ₃ Si ₂	0,09	-
15,99	ácido butanodióico	262	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂	0,29	-
22,32	ácido 2-hidroxibenzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,31	-
25,67	ácido 4-hidroxibenzóico	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	0,26	-
29,99	ácido 2,4-di-hidroxibenzóico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	0,17	-
31,07	ácido 3,4-di-hidroxibenzóico	370	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	0,17	-
34,21	3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila	414	C ₁₈ H ₃₄ O ₅ Si ₃	7,15	-
34,78	ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico	458	C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄	24,95	4,45
36,28	ácido hexadecanoico	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	0,15	2,74
52,91	4',5,7-Tri-hidroxi-flavanona	488	C ₂₄ H ₃₆ O ₅ Si ₃	0,53	-
Identificados				35,53	7,19
Carboidratos				51,26	27,49
Não identificados				13,20	65,31

t_R = Tempo de retenção

As frações em butanol não foram analisadas devido ao seu caráter hidrofílico.

ANÁLISE DAS SUBFRAÇÕES EM HEXANO DAS FOLHAS

As subfrações FHF1, FHF2 e FHF3, analisadas por CCDC apresentaram um composto majoritário com uma cauda, característico de composto graxo. Essas subfrações foram derivatizadas separadamente e submetidas a análise por CG-EM. Os cromatogramas (Figura 9) registraram os principais compostos presentes.

O composto majoritário nas três subfrações foi identificado como o éster hexadecanoato de etila, com íon molecular m/z 284. Foram identificados outros compostos, principalmente ésteres e ácidos graxos. Outros picos presentes não foram identificados. Esses compostos podem ser observados na Tabela 6.

O pico m/z 88 dos espectros de massas é referencial da presença dos ésteres etílicos de ácidos graxos. Esse pico, mais característico, é devido ao rearranjo de McLafferty (Figura 10)

com quebra da ligação β em relação ao grupo C=O. Assim, o éster de etila de um ácido alifático não-ramificado no carbono α tem esse pico intenso (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007).

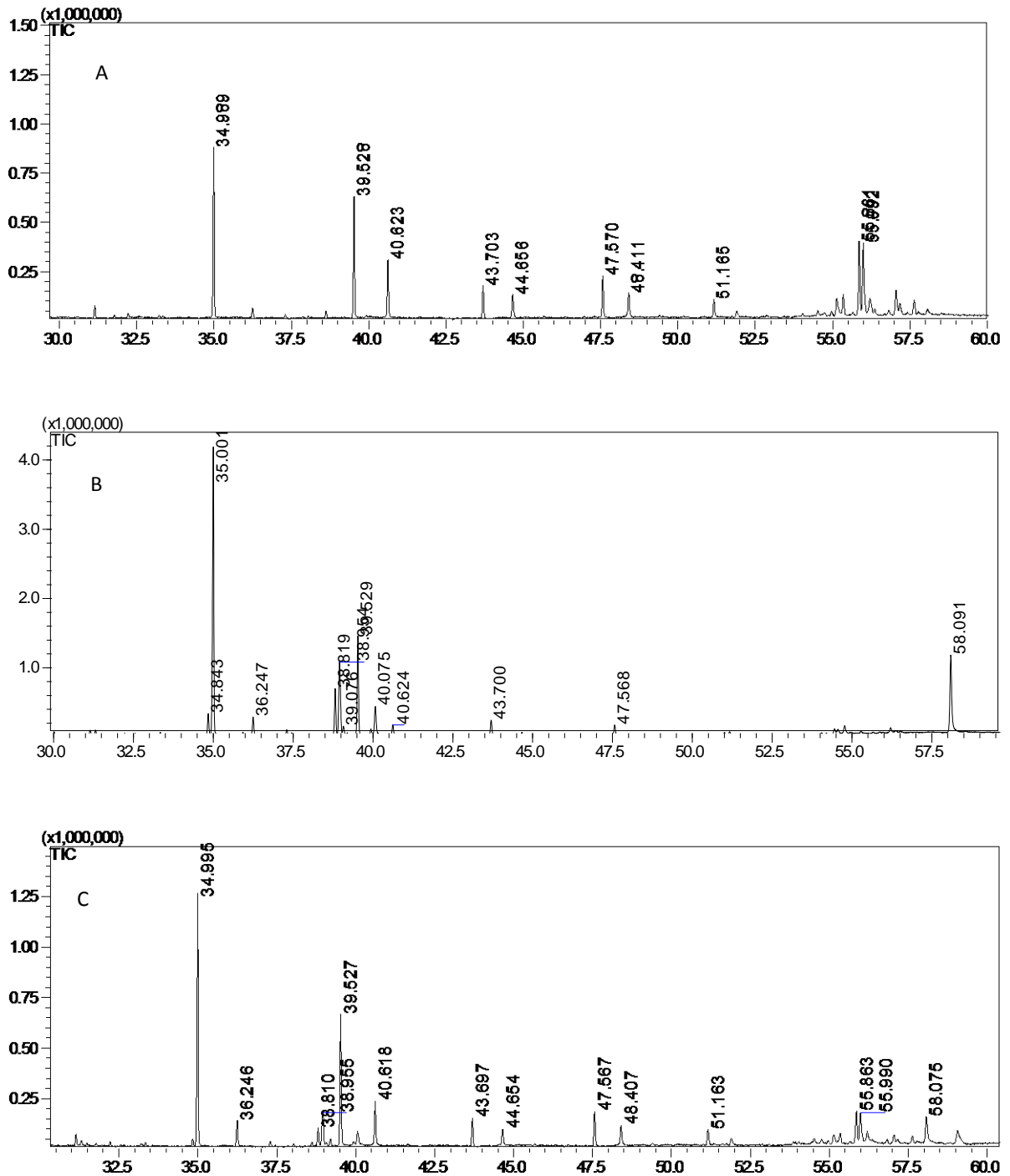


Figura 9. Cromatogramas de íons totais das subfrações FHF1 (A), FHF2 (B) e FHF3 (C) das folhas de *Mimosa hostilis*

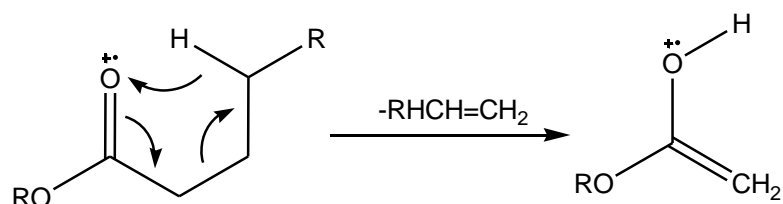


Figura 10. Rearranjo de McLafferty característico de éster etílico.

Tabela 6. Constituintes químicos (% área relativa) identificados nas subfrações FHF1, FHF2 e FHF3 das folhas de *M. hostilis*.

t_R	% área relativa			$[M]^+$	Principais fragmentos	Identificação
	FHF1	FHF2	FHF3			
34.84	-	2,88	-	282(<1)	43(100), 41(99), 55 (88,5), 96(58), 194(23), 236(15)	hexadeca-9-enoato de etila
34.99	24,03	36,87	31,83	284(<1)	88(100), 43(57), 101(50), 41(46)	hexadecanoato de etila
36.25	-	2,53	3,67	328(2)	73(100), 75(84), 117(65), 129(29), 145(14), 313(25)	ácido hexadecanóico
38.82	-	6,15	2,13	308(2)	67(100), 81(92), 41(70), 55(66)	octadeca-9,12-dienoato de etila
38.95	-	12,32	6,02	306(4)	67(100), 81(91), 55(66), 41(55)	octadeca-9,12,15-trienoato de etila
39.08	-	1,07	-	310(4)	55(100), 69(68), 41(62), 83(62)	octadeca-9-enoato de etila
39.53	18,23	13,78	17,53	312(<1)	88(100), 43(63), 101(53), 41(44)	octadecanoato de etila
40.08	-	4,53	-	-	43(100), 68(54), 95(52), 81(52), 41(51)	NI
40.62	9,54	1,44	6,18	356(2)	73(100), 117(82), 75(69), 43(60), 341(45)	ácido octadecanoico
43.70	5,76	2,19	3,93	340(<1)	88(100), 43(73), 101(56), 41(46)	eicosanoato de etila
44.66	4,05	-	2,36	384(2)	73(100), 117(81), 43(69), 75(66), 369(44)	ácido eicosanoico
47.57	6,55	1,54	5,04	368(10)	88(100), 43(78), 101(59), 57(47), 41(43)	docosanoato de etila
48.41	4,78	-	2,94	412(2)	73(100), 117(84), 43(72), 75(65), 395(45)	ácido docosanoico
51.16	-	-	2,23	396(2)	88(100), 43(88), 101 (61), 57(58)	tetracosanoato de etila
55.86	13,22	-	5,63	408(10)	218(100), 189(59), 55(54), 93(54), 107(48)	NI
55.99	13,83	-	5,27	408(10)	218(100), 55(38), 93(35), 119(31), 107(31)	NI
58.09	-	14,69	5,23	382(<1)	43(100), 57(63), 97(58), 83(55)	acetato de tricosila

t_R = Tempo de retenção

NI = composto não identificado

Os ácidos graxos saturados foram identificados através da observação dos picos correspondentes aos íons apresentados no espectro de massas. Os fragmentos do ácido hexadecanoico são os característicos para os ácidos graxos sililados, que são o íon molecular $[M]^+$ pouco intenso (m/z 328), o íon $[M-CH_3]^+$ mais intenso (m/z 313), os íons $[TMSOOCCH_3]^+$ e $[TMSOOC]^+$ muito intensos (m/z 132 e 117 respectivamente) e o íon $[(CH_3)_3Si]^+$ referente ao pico base m/z 73 (Figura 11).

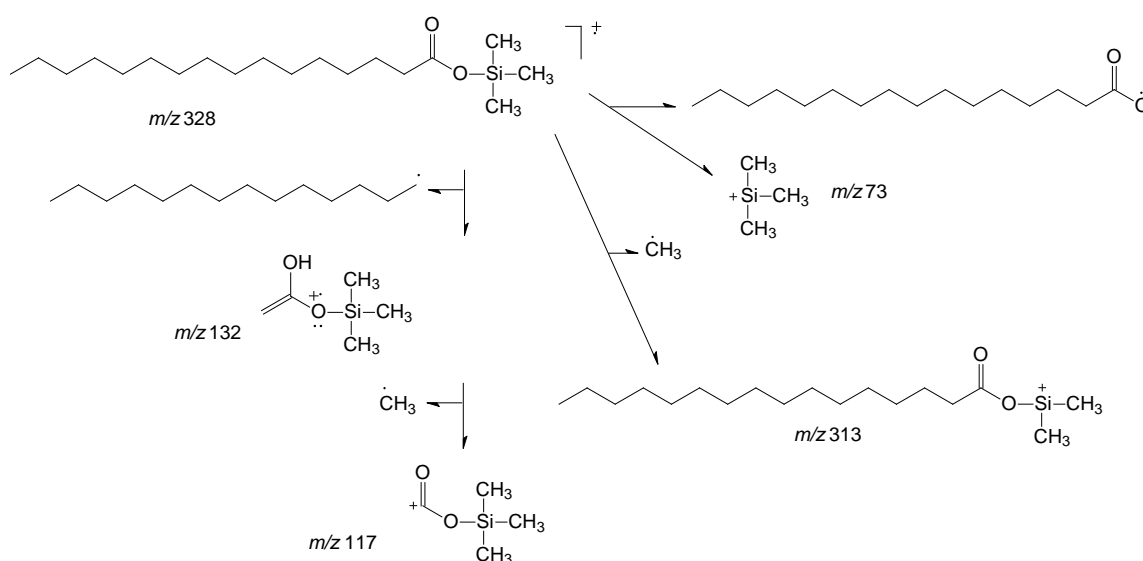


Figura 11. Fragmentações do derivado sililado do ácido hexadecanoico

ANÁLISE DAS SUBFRAÇÕES EM DICLOROMETANO DAS FOLHAS

A substância denominada **FD1** teve sua pureza já determinada por CCDC comprovada com a cromatografia gasosa após derivatização mostrado na Figura 12.

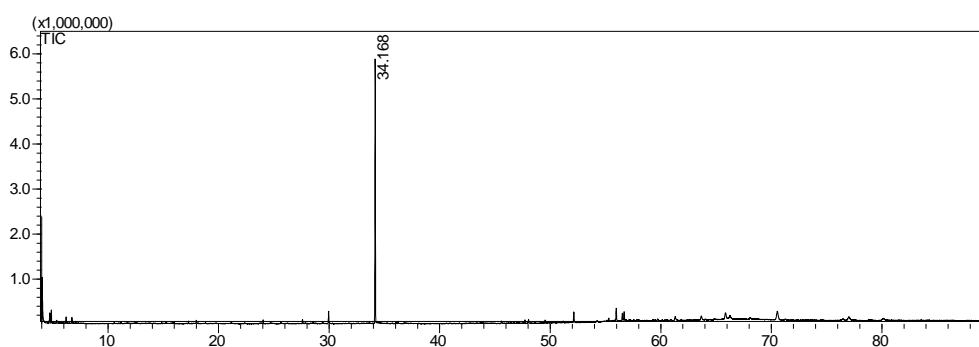


Figura 12. Cromatograma de íons totais da subfração FDF1 das folhas de *Mimosa hostilis*

O espectro de massas obtido (Figura 13) apresentou os principais fragmentos em m/z 414 $[M]^+$, com intensidade de 46%, 281 $[M-OCH_2CH_3-TMS-CH_3]^+$ que é o pico base e 73 $[(CH_3)_3Si]^+$, também muito intenso (63%). O íon de m/z 281 é produto de um rearranjo que envolve a formação de um anel de cinco membros. O anel de cinco membros, contendo dois átomos de carbono e de oxigênio e um de silício, é comum em aromáticos hidroxilados e derivatizados por silição (BUDZIKIEWICZ, DJERASSI e WILLIAMS, 1967; KRAUSS *et al.*, 1985). A substância foi identificada como **3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila** e a fragmentação pode ser observada na Figura 14.

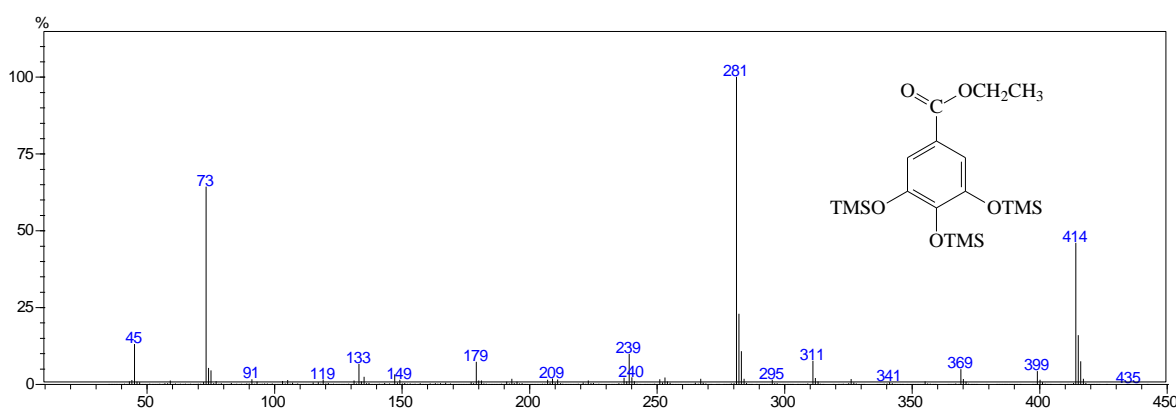


Figura 13. Espectro de massas do derivado siliado do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila.

Já existem relatos da identificação do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila em espécies do gênero *Mimosa*, mas não na espécie *M. hostilis*. Partes aéreas de *M. paraibana* maceradas exaustivamente com etanol (EtOH) a 95 % e submetida a extração líquido/líquido com solventes de polaridade crescente forneceu na fase clorofórmica após CC a substância 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila (NUNES *et al.*, 2008). Do extrato alcoólico da parte aérea de *M. hamata*, foram isolados o 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila (HUSSAIN *et al.*, 1979). Uma vez que o extrato foi obtido em etanol e, ésteres etílicos, não são comuns em plantas, sugere-se que esta substância seja um derivado do ácido gálico obtido durante o processo de extração tanto em *M. hostilis* quanto em *M. paraibana* e *M. hamata*.

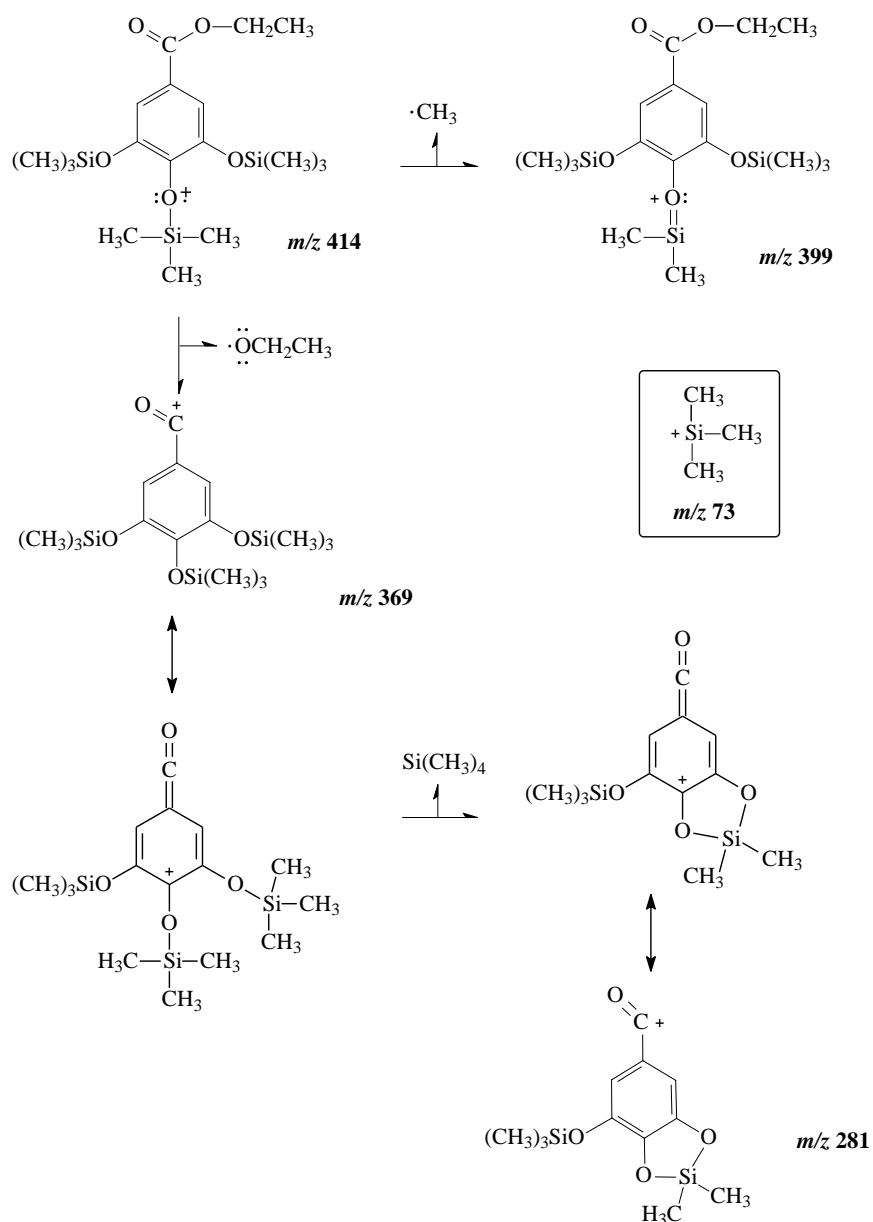


Figura 14. Fragmentação do derivado sililado do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila

A substância pura **FDF2**, após sililação, foi analisada por CG-EM e o cromatograma pode ser visualizado na Figura 15.

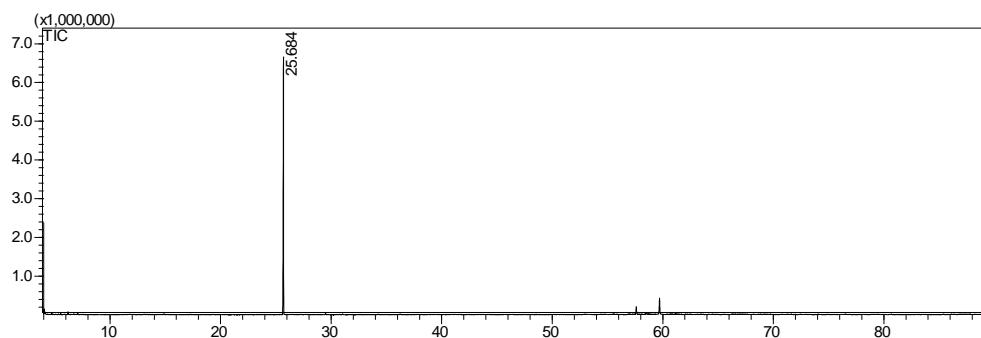


Figura 15. Cromatograma de íons totais da subfração FDF2 das folhas de *Mimosa hostilis*

O espectro de massas obtido (Figura 16) apresentou os principais íons em m/z 282 $[M]^+$, com intensidade de 23%, m/z 267 $[M-CH_3]^+$, como o pico base e em m/z 223 (84%) que é originário da perda de uma molécula de CO_2 a partir do íon $[M-CH_3]^+$, bem como m/z 193 $[M-OTMS]^+$ também intenso (48%) e m/z 73 $[(CH_3)_3Si]^+$ com 89% de intensidade. A substância foi identificada como **ácido 4-hidroxibenzoico** e as principais fragmentações obtidas no espectro de massas pode ser observado na Figura 17.

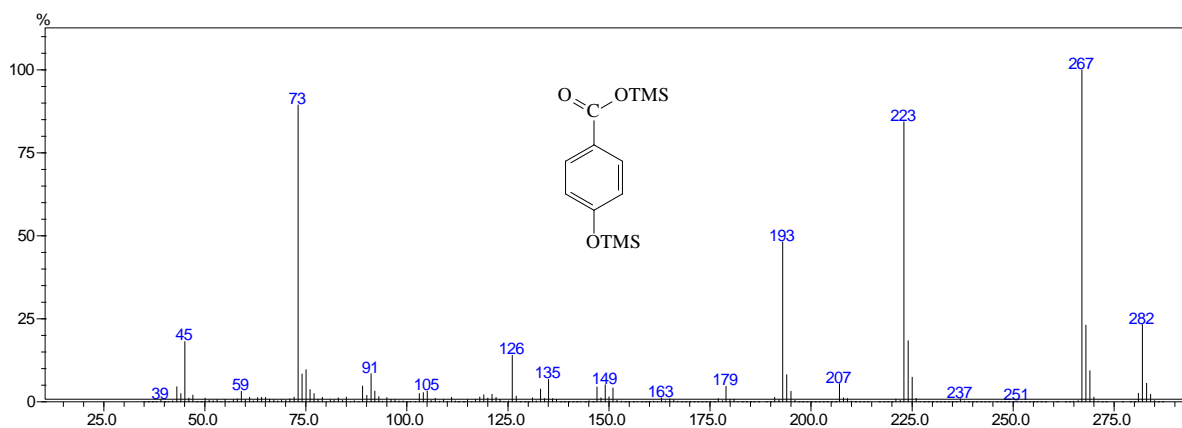


Figura 16. Espectro de massas do derivado sililado do ácido 4-hidroxibenzoico.

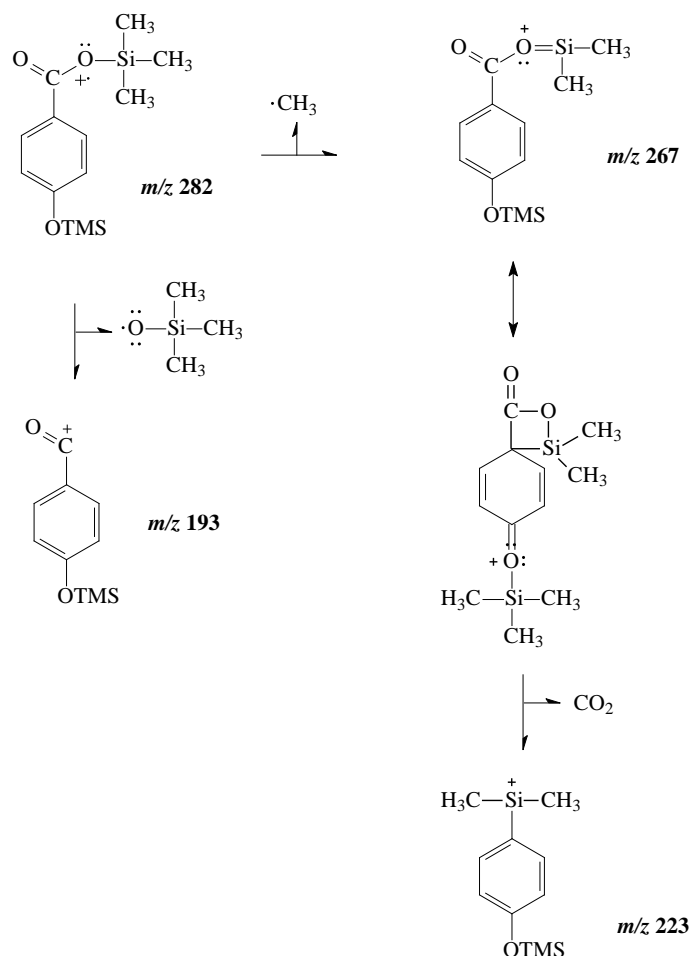


Figura 17. Fragmentação do derivado sililado do ácido 4-hidroxi benzóico

Compostos fenólicos naturais pertencem a uma classe de substâncias que podem possuir desde estruturas simples às mais complexas, e que possuem um ou mais anéis aromáticos no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (CARVALHO *et al*, 2004). A degradação alcalina ou clivagem de flavonoides e outros fenóis complexos produzem fenóis simples e ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos são comumente encontrados em Angiospermas e podem estar presentes na forma livre ou associada como glicosídeos simples (HARBONE, 1998).

CONCLUSÃO

Com a análise por CG-EM pode-se observar que o perfil cromatográfico das folhas difere um pouco da casca e galhos que apresentam uma similaridade da composição química. As substâncias identificadas nos extratos e frações são compostas principalmente por carboidratos, ácidos graxos e compostos aromáticos apresentando também esteroides, flavonoides e triterpenos.

As subfrações obtidas da fração em hexano das folhas de *M. hostilis* mostrou-se rica em material graxo tendo como constituinte majoritário o hexadecanoato de etila.

As subfrações obtidas da fração em diclorometano das folhas de *M. hostilis* levou a identificação de dois compostos fenólicos puros, o 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila, já identificada no gênero *Mimosa* e o ácido 4-hidroxibenzoico que apesar de não possuir relato na literatura para o gênero *Mimosa* trata-se de um composto fenólico comumente encontrado em plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, C. S. R. F. **Compostos orgânicos de baixo peso molecular de Eucalyptus globulus: comportamento durante o cozimento kraft da madeira e branqueamento da pasta celulósica**. 2003. 222 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química. Universidade de Aveiro. Aveiro.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente no Ceará**. Natal: Coleção Mossoroense, UFRN, v. CCCXV, 4ª ed., p. 311- 312, 1989.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D. H.; **Mass spectrometry of organic compounds**. Holden-Day, London, 1967.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G. e SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: C.M.O. SIMÕES *et al* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21, p. 99-105, 1998.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 4, 1969. p. 582-583.

COSTA, A. Jurema – *Mimosa hostilis*. **Natureza bela**, 15 de maio de 2011. Disponível em: <http://www.belezadacaatinga.blogspot.com>. Acesso em dezembro de 2011.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C. Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. **Holzforschung**. v. 56, p. 143-49, 2002.

FUKUYAMA, Y.; YOKOYAMA, R.; OHSAKI, A.; TKAHASHI, H. e MINAMI, H. Na example of the co-ocurrence of enantiomeric labdane-type diterpenes in the leaves of *Mimosa hostilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 454-455, 1999.

GADELHA, A.C.A. **Estudo quimiotaxonômico de constituintes de sementes de representantes do taxon *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae) pertencentes a três diferentes secções**. Fortaleza: UFC, 1995. 107p. Dissertação Mestrado

GOMES, R.P. **Forragens Fartas na Seca**. 4^a ed. São Paulo: Técnica Ltda. 1977.

GOTILIEB, O. R. **Introdução á espectrometria de massas das substâncias orgânicas**. Rio de Janeiro, 1968. 175 p.

GULLICHSEN, J.; PAULAPURO, H. Papermaking science and technology. Editor, Book 3: **Forest products chemistry**. Helsinki: Fapet Oy, 2000. 350 p.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Third Edition. Thomson Science, 1998.

HUSSAIN, N.; MODAN, M. H.; SHABBIR, S. G. e ZAIDI, S. A. H. Antimicrobial principles in *Mimosa hamata*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 525-527, 1979.

KEW, Royal Botanic Gardens. Plantinfo NE Brazil ANN4. www.kew.org. Acesso em dezembro de 2012.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S. e McEWEN, C. N. **Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide**. Academic Press- USA. 1996. 369 p.

KRAUSS, D.; MAINX, H. G.; TAUSCHER, B.; BISCHOF, P.; Fragmentation of trimethylsilyl derivatives of 2-Alkoxyphenols: a Further Violation of the “Even-Electron Role”. **Organic Mass Spectrometry**, v. 20, p. 614-617, 1985.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. CEPLAC, Ilhéus, 1989.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M. e AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H. e FUKUYAMA, Y. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1728-1729, 2006.

OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O. e MEDEIROS, J. T. N. Estudo das Condições de Cultivo da Algaroba e Jurema Preta e Determinação do Poder Calorífico. **Revista De Ciência & Tecnologia**, p. 93-104, 1999.

PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E. e RIBEIRO, O. Indole Alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 1285-1287, 1959.

SILVA, E.D.R. da; SILVA, F. de A.A. da & MIRAPALHETA, F. Determinação do poder calorífico da jurema preta. *Anais. Natal: Congresso de Engenharia Mecânica do Nordeste* (CEM-NNE/91), Departamento de Engenharia Mecânica/ UFRN, p. 72-77, 1991.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. e KIEMLE, J. D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SILVESTRE, Armando J. D.; FREIRE, Carmen S. R.; PASCOAL NETO, Carlos. Eucalyptus globulus wood extractives: composition and fate during pulping and bleaching. **7th Brazilian Symposium, On the chemistry of lignins and other wood components**, p. 69-76, 2001.

SJÖSTRÖM, J.; ALÉN, R. **Analytical methods in wood chemistry pulping, and papermaking**. Ed. Springer, 1999. 316 p.

TIGRE, C. B. Estudos de silvicultura especializada do Nordeste. **Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais II**. Mossoró: Coleção Mossoroense, v. XLI, 1976.

VASCONCELOS, I.; MENDES FILHO, P.F. & ALMEIDA, R.T. Competição entre 19 estirpes de *Rhizobium sp.* em simbiose com jurema preta, *Mimosa acustitipula* Benth. **Revista. Ciência Agrônômica**, v. 2, p. 7-75, 1987.

CAPÍTULO 3

FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Mimosa hostilis* BENTH

INTRODUÇÃO

Os flavonoides despertam interesse farmacêutico ou possuem um alto valor comercial são na sua maioria encontrados em plantas (ANDERSEN e MARKHAM, 2005). Nas plantas, os flavonoides estão envolvidos no transporte de elétrons durante a fotossíntese, servem como antioxidantes combatendo os efeitos oxidantes dos raios ultravioleta e agem contra doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, atuando também contra insetos predadores (GRAF *et al.*, 2005).

A doença de Alzheimer é uma doença que causa desordem neurológica progressiva e degenerativa, que é principalmente caracterizada por perturbações da memória e comportamento e que afeta principalmente os idosos (DOHI, TERASAKI e MAKINO, 2009; INGGANINAN *et al.*, 2003). É estimada em 50-60% dos casos em pessoas com mais de 65 anos de idade e dados epidemiológicos indicam um aumento considerável na prevalência da doença nas próximas duas décadas (JOHNSON, DAVIS e BOSANQUET, 2000; FRANCIS *et al.*, 1999). Embora a etiologia da doença ainda seja desconhecida, sua ocorrência neuropatológica associada com a perda de memória é consistente com a deficiência colinérgica devido à degeneração ou atrofia de neurônios (ROLLINGER *et al.*, 2004). Uma das abordagens mais promissoras para o tratamento desta doença é aumentar o nível de acetilcolina no cérebro utilizando inibidores de acetilcolinesterase (AChE), que é uma enzima-substrato específico que degrada o neurotransmissor acetilcolina na sinapse nervosa (FAN *et al.*, 2008).

Inibidores de AChE como a fisostigmina ou a tacrina são conhecidos por terem limitações para uso clínico devido à sua curta semi vida e/ou inconvenientes efeitos secundários (SUNG *et al.*, 2002) Por isso, há um grande interesse em encontrar um melhor inibidor de AChE para dar mais rápida penetração no SNC, maior duração de ação e toxicidade.

O interesse pelo estudo químico de *M. hostilis* aumentou com o resultado de um estudo etnofarmacológico realizado na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá, onde a espécie foi coletada, no qual a população relatava o seu uso como anti-inflamatório, cicatrizante e para curar a tosse (DUARTE *et al.*, 2008), além dos relatos anteriores do uso da mesma como planta medicinal (OHSAKI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006). Assim, o objetivo foi isolar, identificar flavonoides da fração diclorometânica das folhas de *M. hostilis*

e testar a atividade de inibição da enzima anticolinesterase com fins a obtenção de novos protótipos de fármacos para tratamento da doença de Alzheimer.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nos processos de análise e separação por CCDC e CC foram realizados como descrito no Capítulo 2. A placa usada na Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foi preparada usando água destilada e gel de sílica 60 (0,25 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência UV254).

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C foram registrados em espectrômetro da Varian, modelo GEMINI 2000 operando a 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), e Varian Inova 500 operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C) utilizando-se CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, DMSO-d^6 e CD_3OD como solventes deuterados com grau de pureza superior a 99,8%, das marcas Aldrich[®]. Os sinais dos espectros foram registrados com base nos sinais do solvente empregado em relação ao TMS.

Para a obtenção do espectro de massas, as substâncias puras foram derivatizadas e analisadas usando a metodologia descrita no Capítulo 2.

Os flavonoides foram isolados da fração em diclorometano das folhas de *M. hostilis* coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A metodologia de coleta, identificação, preparo dos extratos e frações foram descritas no Capítulo 2.

A fração em diclorometano das folhas (18,8 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica (CC) utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 e como eluente misturas de CHCl_3 :MeOH em gradiente crescente de polaridade. Após remoção do solvente a vácuo e análise por cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC), foram reunidas 17 frações.

A fração 6 (663 mg), obtida a partir de CHCl_3 :AcOEt (4:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20, usando uma mistura de DCM/MeOH (1:1) como eluente, obtendo 5 subfrações. A subfração 6.4 (162,3 mg) foi denominada **M1**.

Nas frações de 6 a 10 ocorreu a formação de precipitado amarelo, que foi separado por filtração, em metanol, e o precipitado (21 mg) solúvel em piridina foi denominado **M2**.

A fração 7 (277 mg), obtida a partir de CHCl_3 :AcOEt (4:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20 e como eluente foi usado a mistura DCM:MeOH na proporção de 1:1. Foram reunidas 8 subfrações e a fração 7.4 (190 mg), obtida a partir de Hex:AcOEt (7:3), foi submetida a CC em sílica gel 60 com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e usando como eluente inicialmente a mistura de Hex:AcOEt na proporção de 4:1 aumentando a polaridade gradativamente e depois da eluição em AcOEt puro foi eluído com MeOH. Foram agrupado 12 frações e a subfração 7.4.4 (18 mg), obtida a partir de Hex:AcOEt (4:1), pura quando analisada por CCDC, foi denominado **M4**.

A subfração 10 (198 mg), obtida a partir de CHCl_3 :AcOEt (1:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20 usando MeOH, levando a 4 frações. A fração 10.3 (40 mg) foi submetida a CC em gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm (*Flash*), usando como eluente DCM, aumentando a polaridade gradativamente com metanol, levando ao agrupamento de 8 frações. A subfração 10.3.2 (5 mg), obtida em DCM, foi denominadas **M8**.

Com a fração 12 (1,51 g), obtida a partir de CHCl_3 :AcOEt (1:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20 e usando a mistura DCM:MeOH (1:1) como eluente. Foram reunidas 12 frações. A subfração 12.5 (751 mg) foi filtrada em Sephadex LH 20 usando MeOH como eluente, originando 6 frações. Na fração 12.5.4 formou-se um sólido que foi purificado em filtração com Sephadex LH 20 usando a mistura de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$:MeOH (1:1). Esse sólido purificado foi denominado **M6**.

Da subfração 12.6 (381 mg) foi realizada CC em sílica gel 60 iniciando a coluna com DCM aumentando a polaridade gradativamente com MeOH. Foram reunidas 8 frações, e da subfração 12.6.3 (338 mg), obtida a partir de DCM:MeOH (4:1), foi realizada permeação em gel de Sephadex LH 20 usando a mistura de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$:MeOH (1:1), sendo agrupados 8 frações. A subfração 12.6.3.2 (10 mg) foi denominada **M7**.

A fração 13 (1,52 g), obtida a partir de CHCl_3 :AcOEt (1:1), foi submetida a permeação em gel de Sephadex LH 20 usando MeOH como solvente e a subfração 13.6 foi submetida a nova permeação em gel usando MeOH, fornecendo 45,2 mg do sólido denominado **M3**.

O que restou da subfração 13.6, e a 13.7 foram reagrupadas em 13a (923 mg) e submetida a CC *Flash* usando DCM como eluente, levando a 15 subfrações. Com a subfração 13a.11 obtida em DCM:MeOH (1:1), foi realizada uma CCDP usando como eluente a mistura DCM:MeOH (92:7) para a purificação de 10 mg de **M5**.

O esquema de separação e isolamentos dos flavonoides pode ser visualizado na Figura 1.

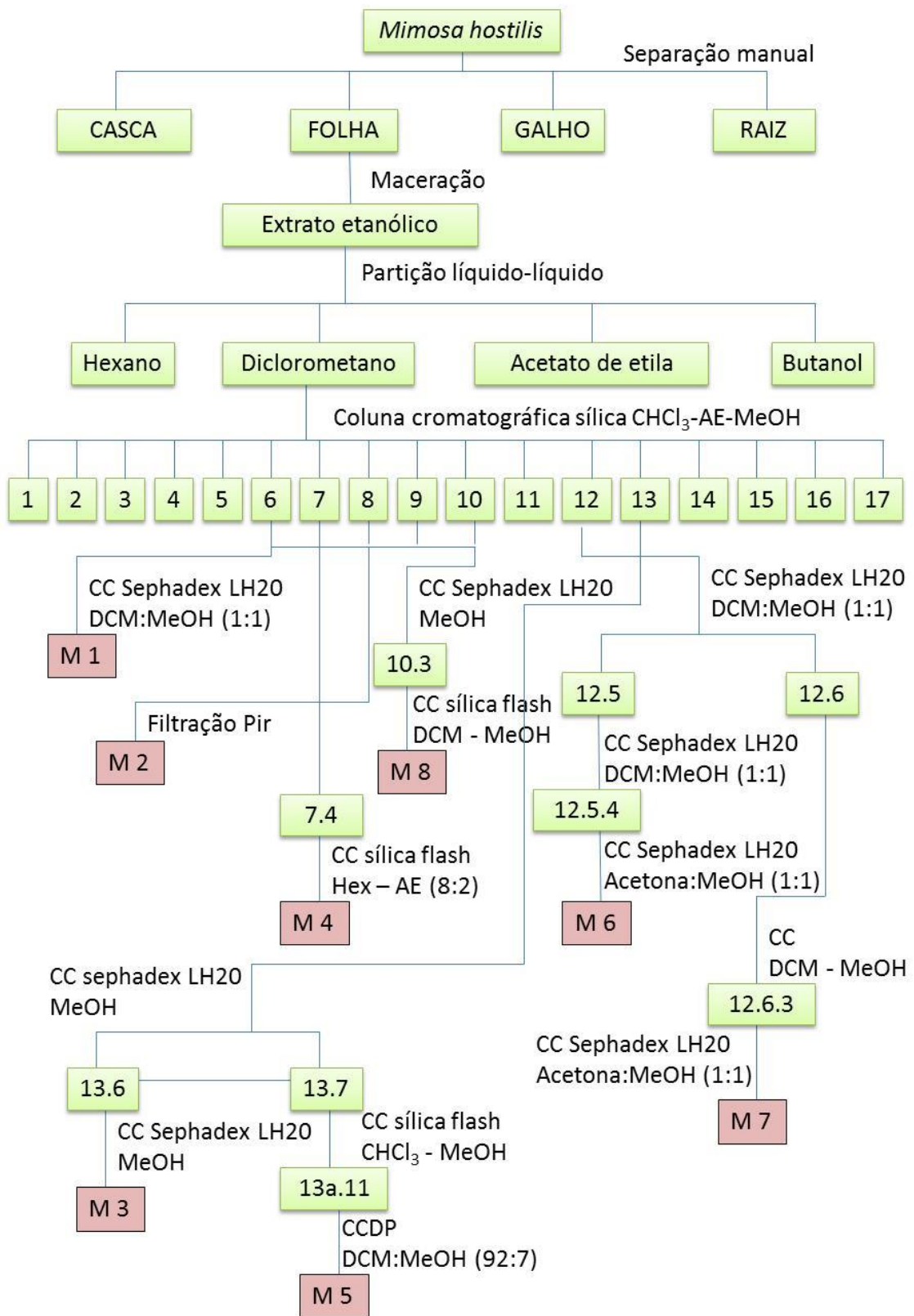


Figura 1. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico de *M. hostilis*.

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE INIBIÇÃO DA AChE

As substâncias isoladas e identificadas foram submetidas à avaliação de inibição da enzima acetilcolinesterase por ensaio quantitativo com metodologia adaptada do teste de Ellman (TREVISAN e MACEDO, 2003).

Para a reação enzimática foram colocados em cada poço da microplacas 25 µL de iodeto de acetiltiocolina - ATCI (15 mM), 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] - DTNB (3 mM) também conhecido como reagente de Ellman, 50 µL de tampão fosfato, pH 7,5 com 0.1% de soro de albumina bovina e 25 µL da amostra a ser testada na concentração final de 500 µmol.L⁻¹, dissolvida em etanol e foi realizada a Leitura I em espectrofotômetro a 405 nm. Posteriormente foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase - AChE (0.22 U/mL) que permaneceu em temperatura ambiente por 10 min e a absorbância foi novamente registrada a 405 nm (Leitura II). A atividade foi calculada após 20min de reação.

O percentual de inibição foi obtido através da equação a seguir:

$$\% I = \frac{(AChE - AChI) \times 100}{AChE}$$

Onde, AChI atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência do inibidor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

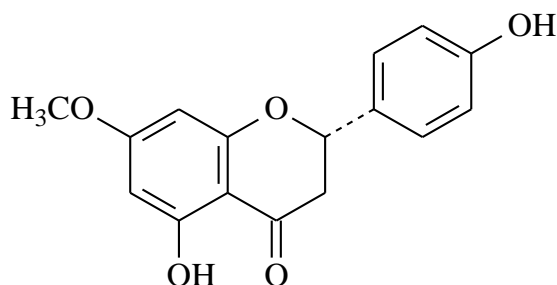
IDENTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES

As substâncias **M1** a **M8** foram identificadas como flavonoides a partir da análise dos dados espectrais obtidos por RMN. No espectro de RMN de ¹H de flavonoides, os sinais obtidos geralmente ocorrem na região entre 0-9 ppm, sendo que muitos aparecem em grupos de sinais bem separados e, dependendo de determinado deslocamento químico observado é possível identificar a subclasse do flavonoide (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

Os valores de RMN de ¹³C de flavonoides indicam que as diferentes classes de flavonoides podem ser claramente diferenciadas principalmente pelo valor dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel C, que são bem distintos. Para flavanonas, por exemplo, o sinal do C-2 é registrado entre δ 75-80 ppm enquanto para flavonas δ 160-165 ppm e

flavonóis δ 145-150 ppm. O valor do deslocamento químico do C-3 também difere bastante entre as classes, sendo que para flavanonas ocorre entre δ 42-45, flavonas δ 103-112 e flavonóis δ 136-139 ppm. O C-4, da carbonila, apresenta menor diferença entre as classes, mas ainda assim uma diferença significativa, dependendo da estrutura e conjugação, sendo registrada em flavanonas entre δ 189-196, para flavonas δ 176-184 e flavonóis 172-177 ppm (HARBONE e MABRY, 1982).

Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1)



M1

5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona: Sólido amarelo; IV ν_{\max} (cm^{-1}) (KBr): 3480,70; 3418,01; 1637,64 e 1619,31. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 12,03 (s ; OH); 7,34 (d ; 8,5; H-2',6'); 6,90 (d ; 8,5; H-3',5'); 6,08 (d ; 2,2; H-6); 6,05 (d ; 2,2; H-8); 5,36 (dd ; 3,0 e 13,0; H-2); 3,81 (s , CH_3O -7); 3,10 (dd ; 13,0 e 17,0; H-3b); 2,80 (dd ; 3,0 e 17,0; H-3a). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 79,2 (C-2), 43,3 (C-3), 196,3 (C-4), 164,3 (C-5), 95,3 (C-6), 168,2 (C-7), 94,5 (C-8), 163,1 (C-9), 103,3 (C-10), 130,4 (C-1'), 128,2 (C-2',6'), 115,9 (C-3',5'), 156,4 (C-4'), 55,9 (OCH_3 -7),

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C de **M1**, foram observados os sinais de C-2, C-3 e C-4 em δ 79,2, 43,3 e 196,3, respectivamente (Figura 2) que são característicos de flavanona por não possuem a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 no anel C do esqueleto de flavonoide, que está presente em flavonas e flavonóis.

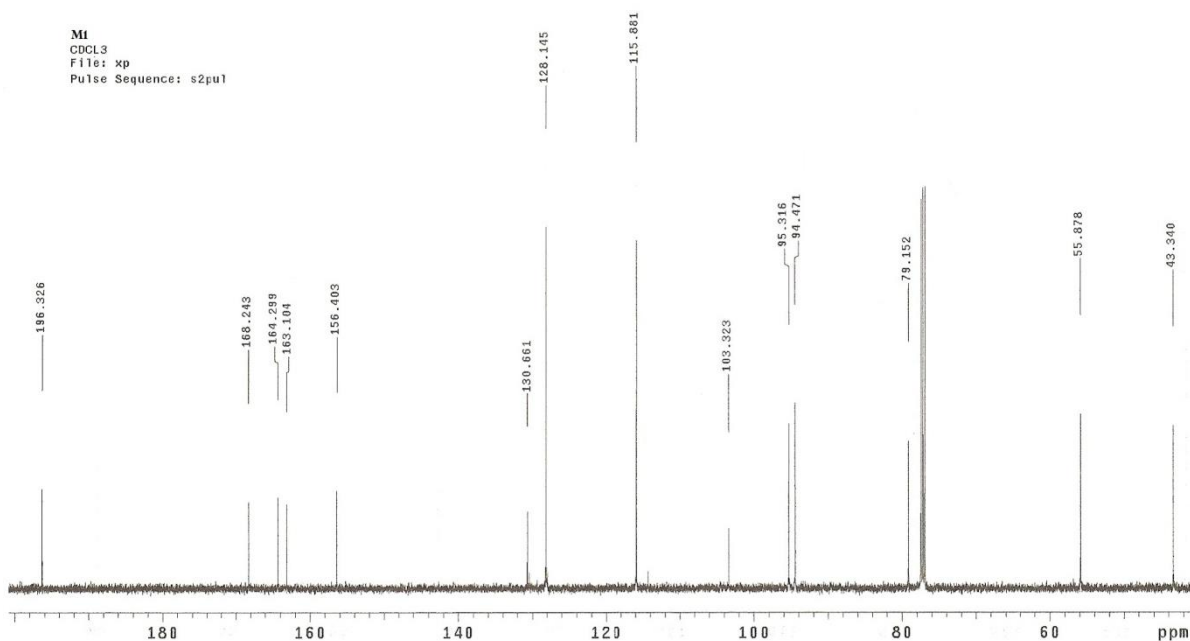


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C de **M1** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

Na análise de RMN de ^1H , o sinal para o H-2 de flavanonas aparece como um duplo duplete ($J_{\text{cis}} \cong 5$ Hz, $J_{\text{trans}} \cong 11$ Hz) a δ 5,36 como resultado do acoplamento entre H-2 e os dois hidrogênios H-3. Os hidrogênios em H-3a, que são diastereotópicos, apresentam constante de acoplamento com $J \cong 17$ Hz geminal com H-3b e essa interação spin-spin da origem a duas sobreposições de duplo duplete a δ 2,80 (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Esses sinais δ 5,36 (dd, $J = 3$ e 13 Hz, H-2), 2,80 (dd, $J = 3$ e 17 Hz, H-3a) e 3,10 (dd, $J = 13$ e 17 Hz, H-3b), presentes no espectro de **M1** (Figura 3) confirmam ser uma flavanona.

Para definir qual o padrão de substituição da flavanona foi observado outros sinais no espectro de RMN de ^1H . Os sinais presentes na região entre δ 6,0-7,5 são sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007). O padrão de substituição de cada anel aromático foi determinado a partir da multiplicidade de sinais e das constantes de acoplamentos observadas. Em anéis aromáticos, os acoplamentos normalmente se estendem para além dos átomos de carbono adjacente. As interações são tipicamente observadas entre os hidrogênios em *orto* ($J = 7$ -10 Hz), *meta* ($J = 1$ -3 Hz) e *para* ($J = 0$ -1 Hz), apesar desta última não ser geralmente observada devido ao baixo valor de acoplamento (PAVIA *et al*, 2009).

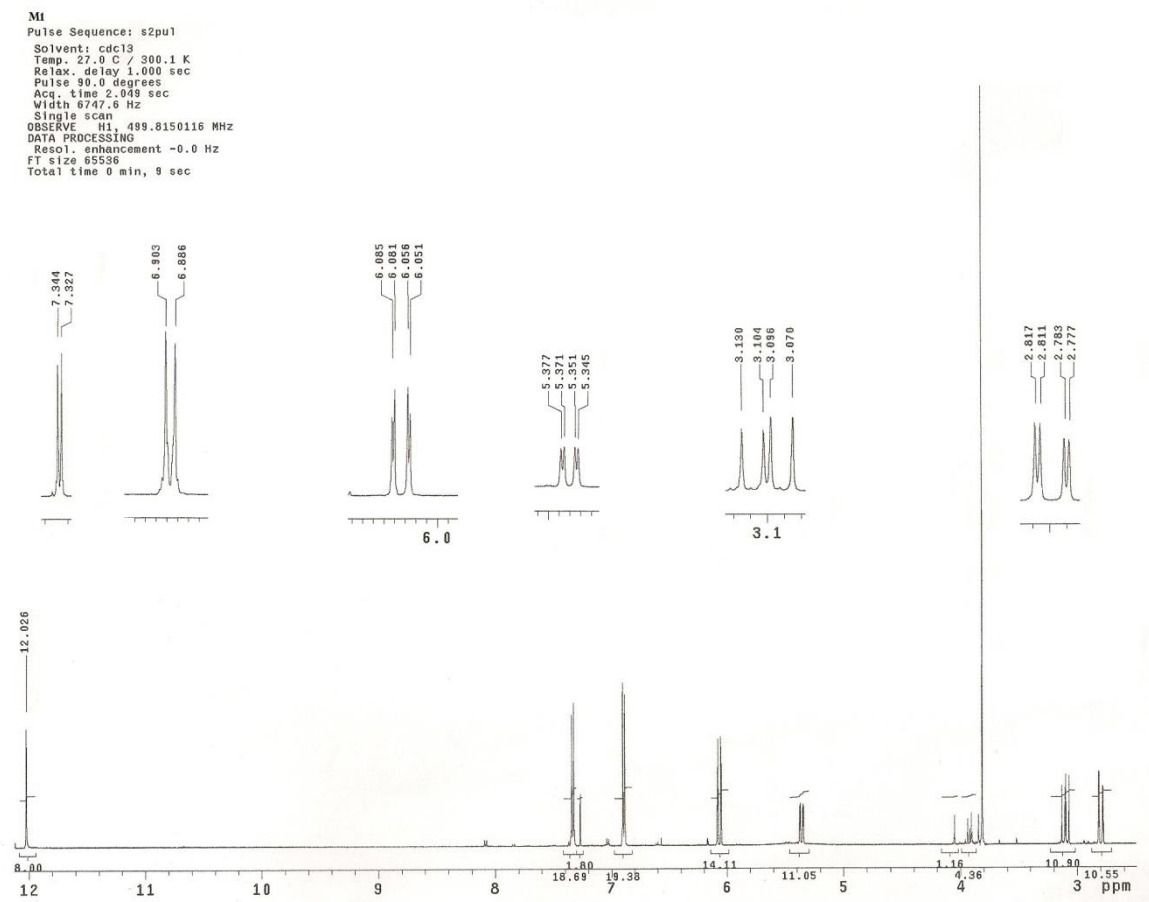


Figura 3. Espectro de RMN ^1H de **M1** [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

A presença no anel A de sinais em δ 6,05 e 6,08 acoplado entre si, com $J = 2,2$ Hz, sugere ser um anel tetrassubstituído e a presença de dois H em posição *meta*. Os sinais em δ 6,90 e 7,34 com acoplamento de $J = 8,5$ Hz são característicos de H na posição *orto*, ainda apresentou integral para dois H em cada sinal, indicando que o anel B está monossubstituído. Os singletos em δ 3,81 e 12,03 são característicos de grupos metoxila e hidroxila quelada, respectivamente.

Os dados acima descritos permitiram identificar o esqueleto da flavanona. Para a identificação completa de **M1** foi necessário determinar a posição das hidroxilas e metoxila. Um grupamento carbonila na posição *orto* desloca a absorção da hidroxila do fenol para a faixa aproximada de δ 10-12 ppm, devido a formação de ligação de hidrogênio intramolecular (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007). Assim, o sinal em δ 12,03 (1H; s) é indicativo da presença de grupo OH em C-5.

A identificação dos substituintes nos C-7 e C-4' foi baseada em dados observados por espectroscopia no UV com adição de reagentes de deslocamento, que é uma técnica muito útil

para auxiliar na identificação do padrão de substituição de flavonoides. O espectro no UV de **M1** (Figura 4) foi determinado em metanol, e observou-se dois máximos de absorção 286 (Banda II, primariamente atribuída à absorção do anel A) e 341 nm (Banda I, atribuída ao anel B). A adição de reagentes de deslocamento como cloreto de alumínio (AlCl_3), acetato de sódio (NaOAc) ou metóxido de sódio (NaOMe) a uma solução metanólica do flavonoide produz deslocamentos nos máximos de absorção no UV, os quais são diagnósticos para grupos hidroxila não substituídos específicos (AGRAWAL, 1989).

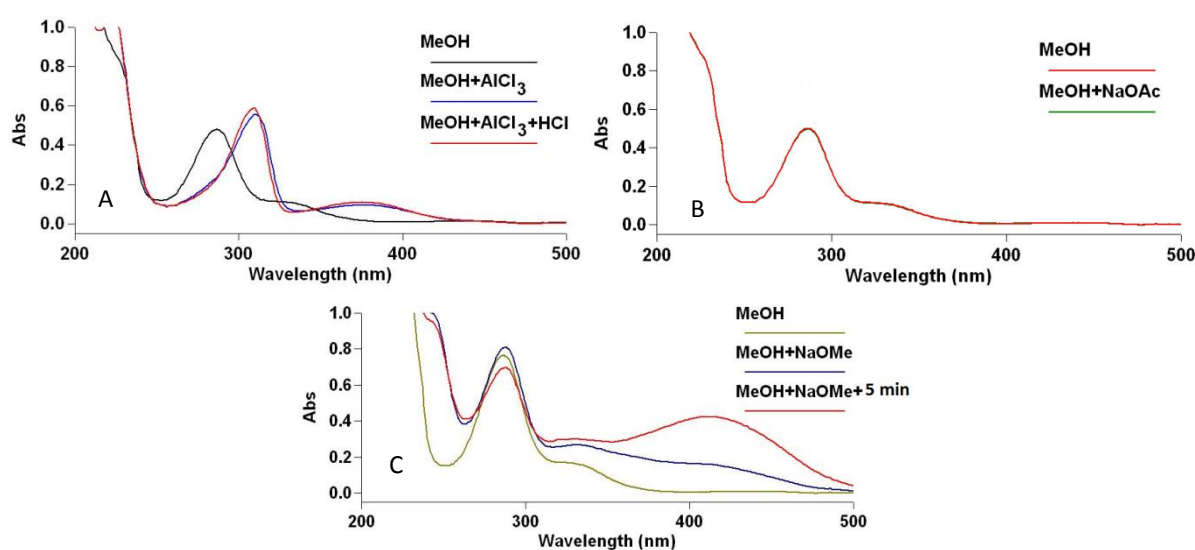


Figura 4. Espectros no UV de **M1** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.

O reagente de deslocamento AlCl_3 detecta a presença de OH nas posições 3 ou 5 por formar complexos estáveis entre as OH do grupo carbonílico (C-4) e o reagente, provocando um deslocamento batocrômico que não havendo regeneração ao espectro em MeOH, sob adição de ácido clorídrico, como pode ser observado na Figura 4a, dos espectros de UV da substância **M1**, confirmando a presença de uma OH na posição 5.

O NaOAc é uma base fraca (comparando com o NaOMe), e ioniza somente as OH mais ácidas presentes nas posições 3,7 e 4'. A ionização de 7-OH afeta a banda II e a ionização de 3 e/ou 4'-OH afeta a banda I. Essa reação é útil para detectar hidroxila em C-7, apresentando deslocamento batocrômico da banda II de 5-20 nm e a presença de 4'-OH mostra deslocamento da banda I. Não foi observado nenhum deslocamento no espectro quando adicionado o NaOAc , não havendo conclusão (Figura 4b).

A adição de NaOMe foi feita com o intuito de confirmar a presença de OH na posição 4'. O NaOMe é uma base forte e ioniza todos os OH, portanto a adição e observação do espectro UV mostra deslocamento batocrômico em todas as bandas. Deslocamento de 40-65 nm na banda I, sem decréscimo na intensidade é indicativo da presença de 4'-OH, como pode ser observado na Figura 4c um deslocamento batocrômico na banda I, confirmando a presença de OH na posição 4' de **M1**.

Além da análise por UV, a espectrometria de massas também foi muito útil, corroborando com a identificação inequívoca de **M1**. A amostra foi então derivatizada por sililação e injetada em CG-EM com obtenção do cromatograma (Figura 5a) e espectro de massas (Figura 5b).

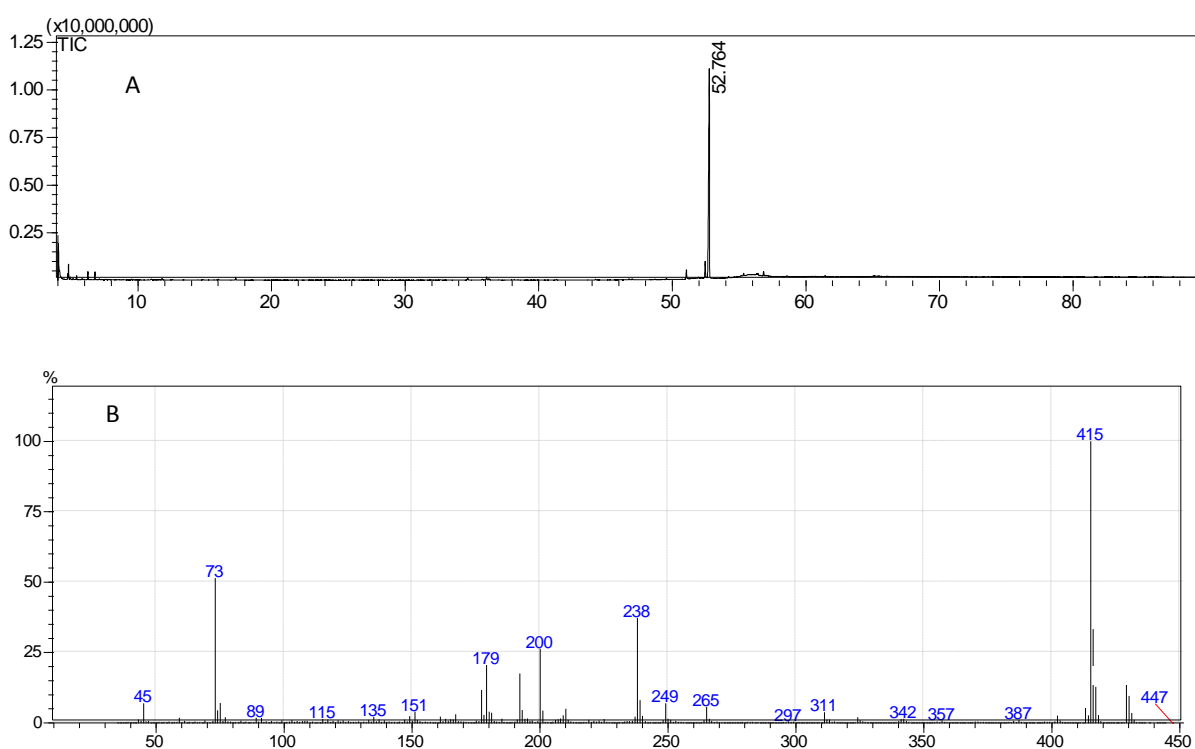


Figura 5. Cromatograma de íons totais (A) e espectro de massas (B) obtido em CG-EM após derivatização de **M1**.

O cromatograma confirmou a pureza da amostra e o EM obtido no modo impacto de elétrons, apresentou além do pico do íon molecular em m/z 430 (10), os fragmentos principais em m/z 415 referente a perda de metila como pico base; m/z 73 (51) referente ao $[(CH_3)_3Si]^+$, e m/z 238 referente a perda de fragmento radicalar de massa 192.

O íon de m/z 238 é referente ao fragmento do anel A (Figura 6), originado da clivagem do anel C pela reação retro Diels-Alder (SILVA, CARVALHO e BRAZ-FILHO, 2009). Esse

fragmento foi essencial para corroborar com a proposta da presença do grupo metoxila na posição C-7.

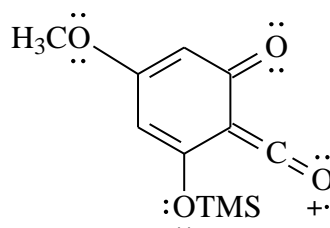
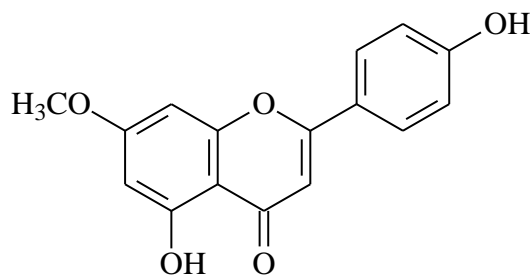


Figura 6. Fragmento do íon de m/z 238 originado da clivagem do anel C pela reação retro Diels-Alder.

Dessa forma, com as análises de RMN de ^1H e ^{13}C , UV com ajuda de reagentes de deslocamento e EM, a substância **M1** foi identificada como 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona, também conhecida como sacuranetina.

A 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (sacuranetina) havia sido isolada anteriormente em folhas e galhos de *M. hostilis* (OHSAKI *et al.*, 2006) e em outras plantas do gênero *Mimosa* como nas partes aéreas de *M. tenuiflora* (NUNES *et al.*, 2009). Em ensaios antifúngicos usando os microrganismos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* apresentou atividade semelhante aos controles positivos *nystatin* e *miconazol* (REIGADA *et al.* 2007).

Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2)



M2

5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d^6$) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 12,95 (*s*; OH); 7,94 (*d*; 8,8; H-2',6'); 6,92 (*d*; 8,8; H-3',5'); 6,82 (*s*; H-3); 6,73 (*d*; 2,4; H-8); 6,35 (*d*; 2,4; H-6); 3,85 (*s*, $\text{CH}_3\text{O-7}$). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d^6$) δ_{C} : 164,0 (C-2), 103,0 (C-3), 181,9 (C-4), 157,2 (C-5), 97,9 (C-6), 165,1 (C-7), 92,6 (C-8), 161,2 (C-9), 104,7 (C-10), 121,0 (C-1'), 128,5 (C-2',6'), 116,0 (C-3',5'), 161,3 (C-4'), 56,0 ($\text{OCH}_3\text{-7}$),

A substância **M2** foi isolada como um sólido cristalino amarelo e o espectro de RMN de ^1H (Figura 7) apresentou dois dubletos em δ 6,35 e 6,73 ($J = 2,4$ Hz), característico de flavonoide com padrão de substituição comum 5,7-di-oxi, em que o dubleto H-6 aparece consideravelmente em campo mais alto que o sinal referente a H-8, como sugere a literatura. Os dubletos em δ 6,92 e 7,94 ($J = 8,8$ Hz) são indicativos da presença de anel B 1,4-dissubstituído, o que sugere um nível de oxigenação. Os dubletos observados para H-3' e H-5' absorvem em campo mais alto que H-2' e H-6', devido a presença da oxigenação em C-4'. O singlete presente em δ 6,82 é característico de H-3 de flavonas, que aparece nessa região entre δ 6-7, que usualmente se sobrepõe aos sinais produzidos pelos hidrogênios do anel A (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). O sinal em δ 3,85 de hidrogênio de OCH_3 e δ 12,95 de OH confirma a presença de grupos substituintes na flavona nas posições 5,7 e 4'.

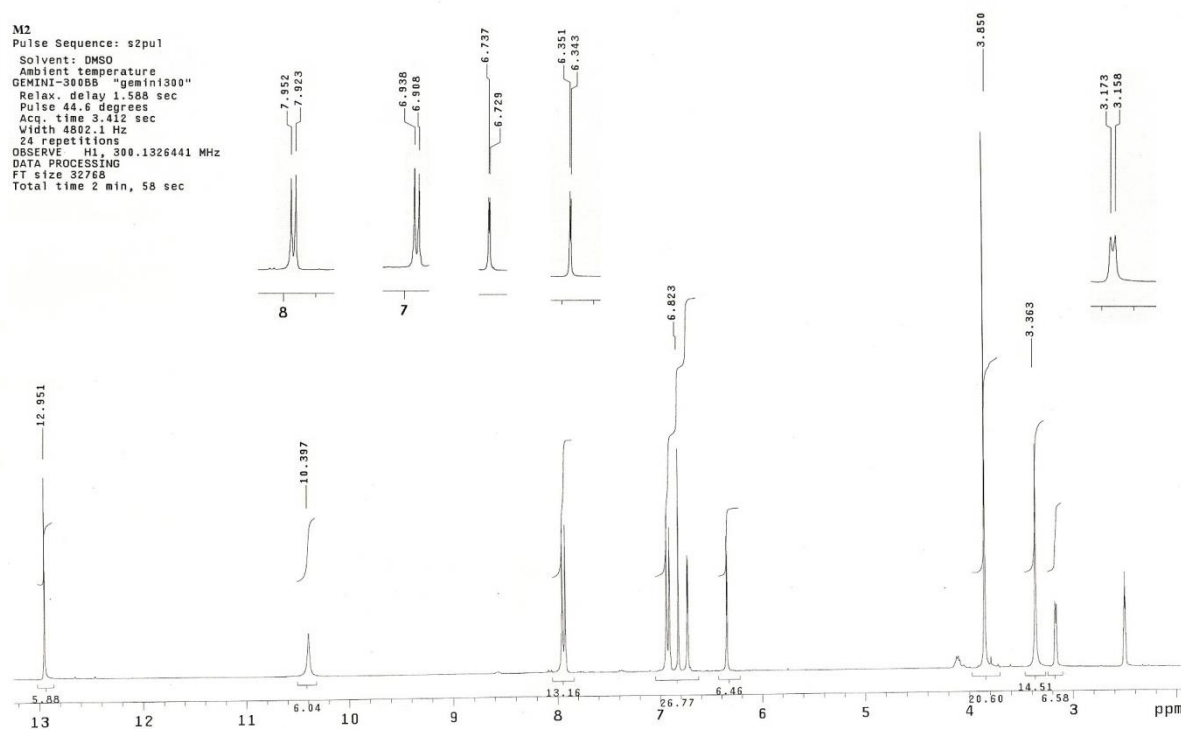


Figura 7. Espectro de RMN ^1H de **M2** [300 MHz, $\text{DMSO-}d^6$, δ (ppm)]

Os sinais originados pelo deslocamento das três unidades de carbono central, anel C, confirmam o esqueleto de flavona pelos sinais no espectro de RMN de ^{13}C de C-2 em δ 164 C-3 em δ 103, e C-4 em δ 181,9 e demais sinais de carbono observado na Figura 8, no espectro de **M2**.

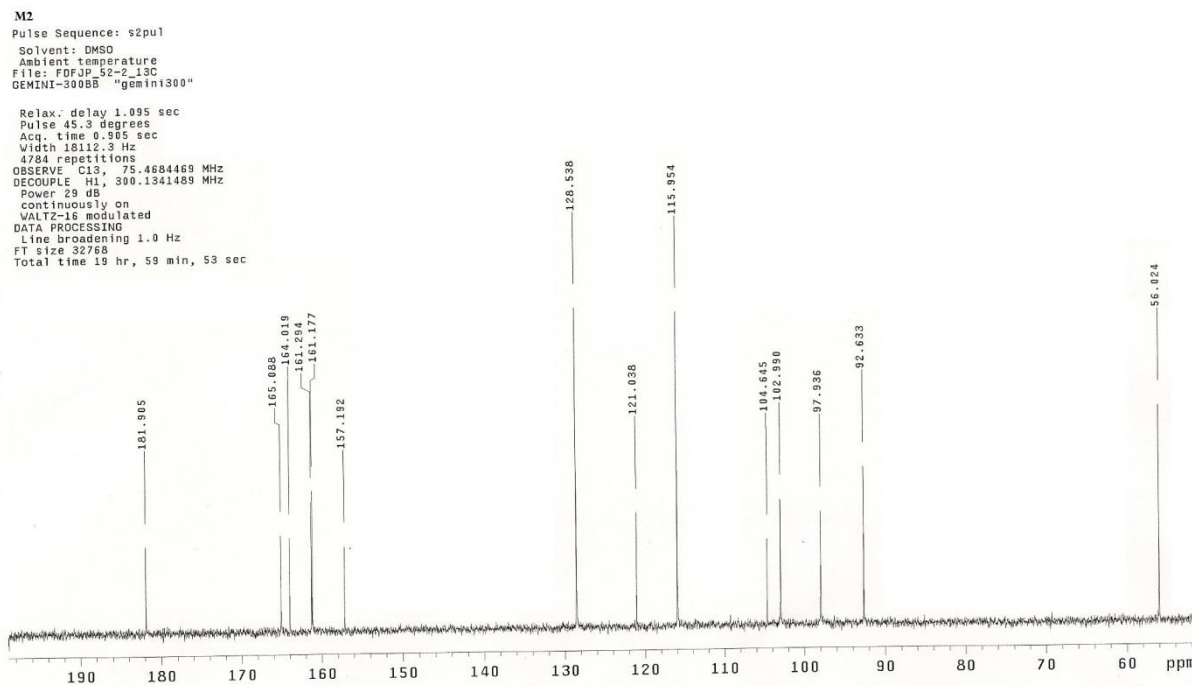


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C de **M2** [75 MHz, DMSO- d^6 , δ (ppm)]

O espectro DEPT 135 de **M2** (Figura 9) indica presença de um grupo CH_3 (δ 56,02) e grupos CH (δ 128,54; 115,95; 102,98; 97,94 e 92,63), sugerindo que a estrutura da flavona **M2** possui 2 substituintes OH e 1 grupo OCH_3 .

Apesar de determinar a estrutura da flavona em **M2** ainda não foi suficiente pelos dados de RMN de ^1H e ^{13}C determinar as posições dos substituintes oxigenados (OH e OCH_3), de modo que foi necessária a análise por UV.

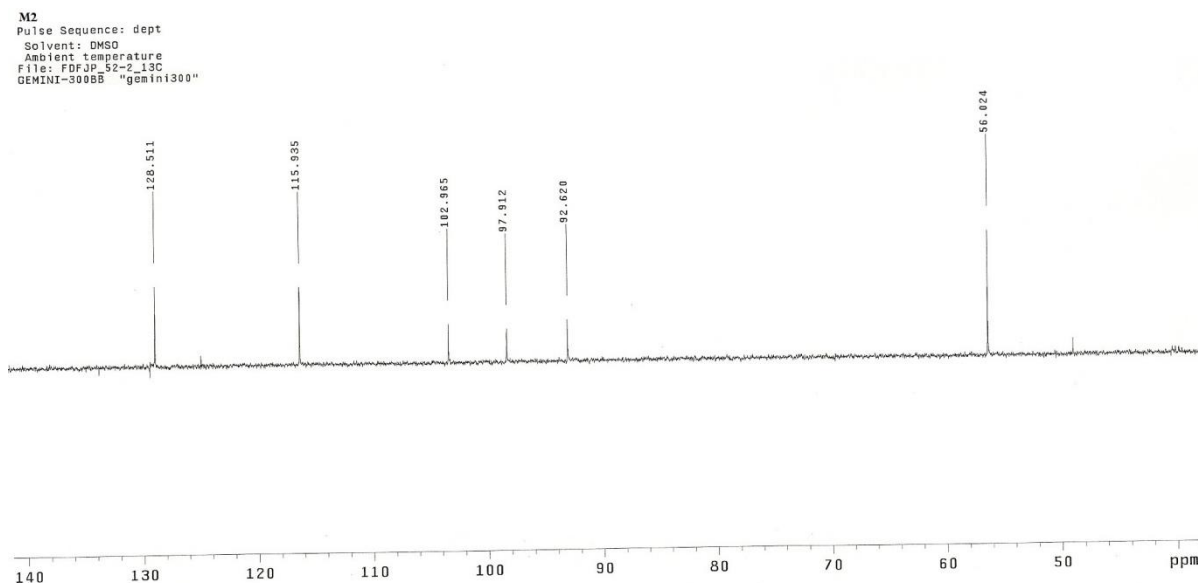


Figura 9. Espectro de DEPT 135° de **M2** [75 MHz, DMSO-d⁶, δ (ppm)]

O espectro no UV de **M2** foi registrado em metanol, e observou-se dois máximos de absorção 268 (Banda II, primariamente atribuída à absorção do anel A) e 330 nm (Banda I, atribuída ao anel B). O reagente de deslocamento AlCl₃ provocou um deslocamento batocrômico que não foi regenerado com adição de HCl sugerindo a formação do complexo estável entre as OH de C-5 e o grupo carbonílico (C-4) como pode ser observado na Figura 10a.

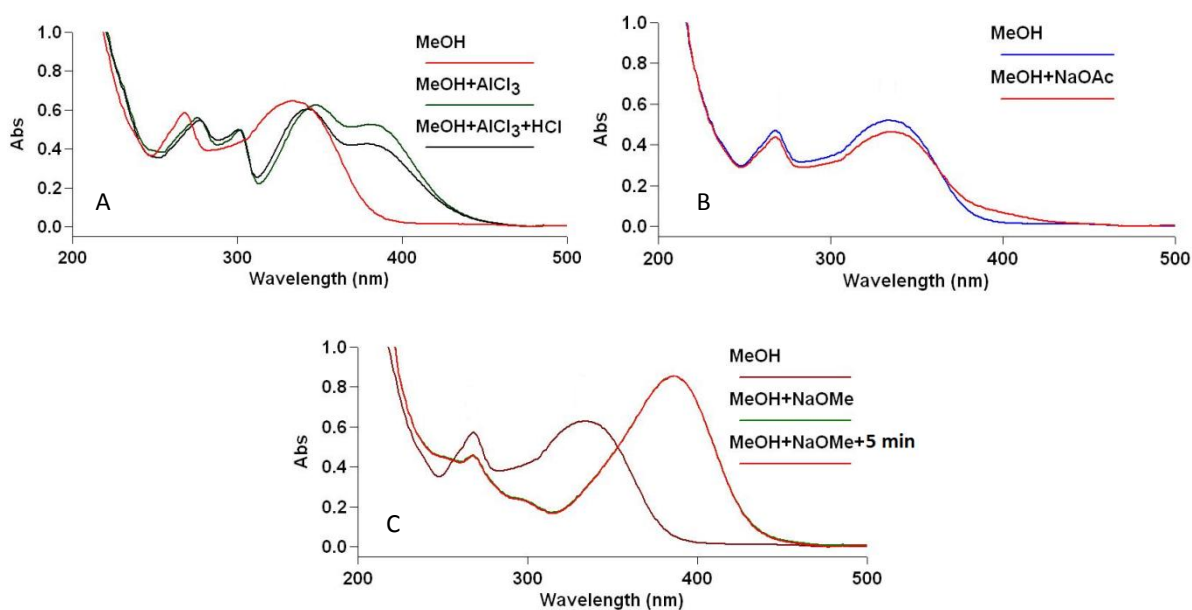


Figura 10. Espectros no UV de **M2** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento

O NaOAc, útil para detectar hidroxila em C-7, apresentando deslocamento batocrômico da banda II de 5-20 nm e a presença de 4'-OH mostra deslocamento da banda I, como pode ser evidenciado a detecção de OH na posição 4' por um discreto deslocamento batocrômico na banda I da Figura 10b. A adição de NaOMe confirmou a presença de OH na posição 4' com deslocamento batocrômico de 40-65 nm na banda I, sem decréscimo na intensidade (Figura 10c).

Análise por CG-EM forneceu o espectro de massas de **M2** após sililação (Figura 11), que apresentou poucas fragmentações. O principal fragmento em m/z 413 $[M-15]^+$, que é o pico base sugere ser o pico do íon molecular 430 $[M]^+$, que não aparece no espectro, tendo a fórmula molecular de $C_{22}H_{28}O_5Si_2$.

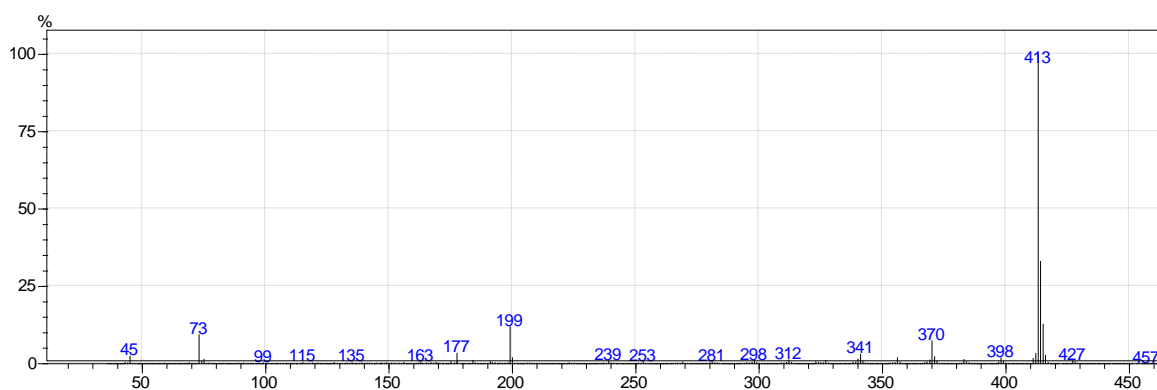
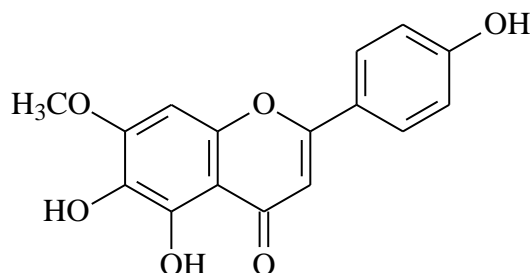


Figura 11. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M2**.

Com a análise de RMN de 1H , ^{13}C , DEPT, UV com ajuda de reagentes de deslocamento e EM, a substância **M2** foi identificada como 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona, conhecida também como genkwanina.

A flavona 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona foi isolada anteriormente em folhas e galhos de *M. hostilis* (OHSAKI *et al.*, 2006) e nas partes aéreas de *M. tenuiflora* (NUNES *et al.*, 2009). A atividade antimicrobiana contra *Bacillus lentus* e *Staphylococcus aureus* foi detectada com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 100 $\mu g/mL$ (COTTIGLIA *et al.*, 2001).

Identificação de 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3)



M3

5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d^6$) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 13,07 (s; OH); 7,91 (d; 8,6; H-2',6'); 6,92 (d; 8,6; H-3',5'); 6,76 (s; H-3); 6,58 (s; H-8); 3,75 (s, $\text{CH}_3\text{O-7}$). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d^6$) δ_{C} : 165,0 (C-2), 103,0 (C-3), 183,0 (C-4), 153,3 (C-5), 132,1 (C-6), 153,3 (C-7), 95,2 (C-8), 158,0 (C-9), 104,8 (C-10), 122,1 (C-1'), 129,3 (C-2',6'), 116,9 (C-3',5'), 161,7 (C-4'), 61,0 (OCH_3 -7),

A substância **M3** foi identificada por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, UV e EM. No espectro de RMN ^1H (Figura 12) foram observados seis sinais: um singlete em δ 3,75 referente a hidrogênios do grupo metoxila, um sinal em δ 13,07 referente a OH quelado, dois dupletos, integrando para 2H cada, em δ 6,92 e 7,91 (H-3'/H-5' e H-2'/H-6'), típico do anel B 1,4-dissubstituído de flavonoides. Os singletos em δ 6,58 e 6,76 foram atribuídos aos H-8 e H-3.

Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C de C-2 em δ 165,0, C-3 em δ 103,0 e C-4 em δ 183,0 sugeriu que a substância **M3** também tratava-se de uma flavona. Os demais sinais de carbono podem ser observados na Figura 13.

No espectro no UV de **M3**, registrado em metanol, pode-se observar dois máximos de absorção em 274 (Banda II, primariamente atribuída à absorção do anel A) e 334 nm (Banda I, atribuída ao anel B). O reagente de deslocamento AlCl_3 provocou um deslocamento batocrômico que não foi regenerado com adição de HCl sugerindo a formação do complexo estável entre OH de C-5 e o grupo carbonílico (Figura 14a).

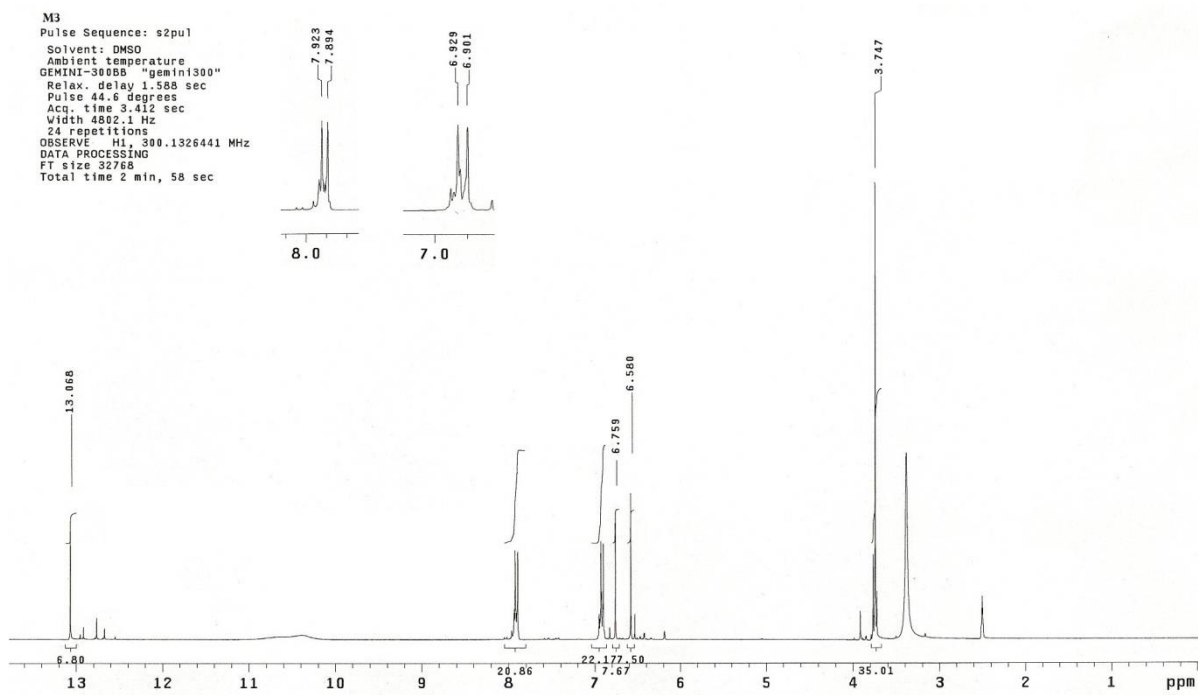


Figura 12. Espectro de RMN ^1H de **M3** [300 MHz, DMSO- d^6 , δ (ppm)]

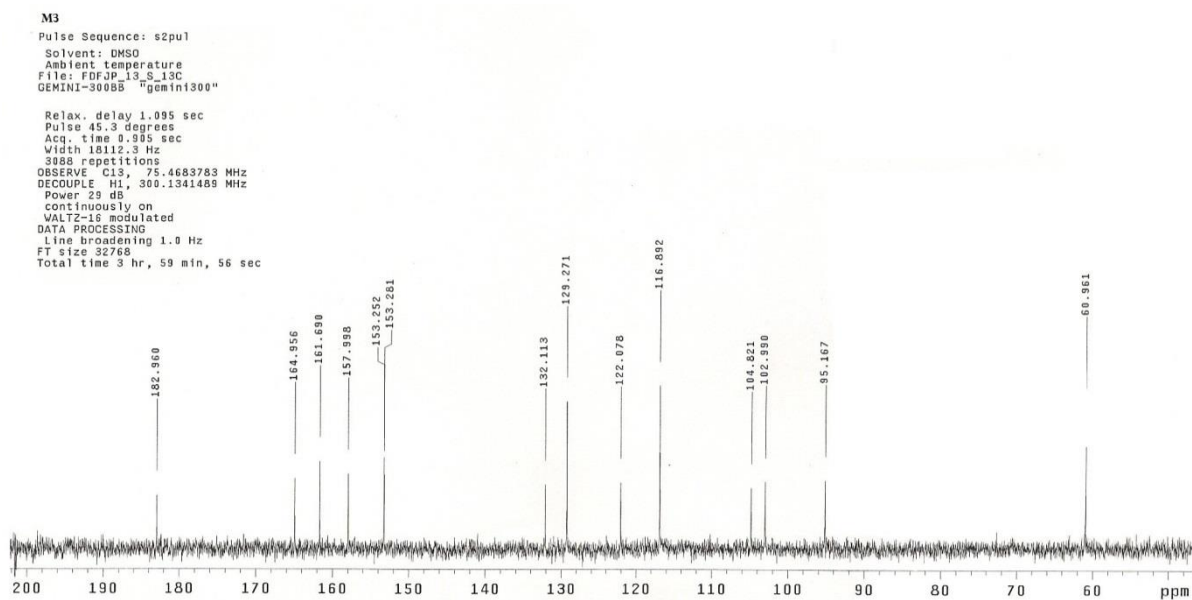


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C de **M3** [75 MHz, DMSO- d^6 , δ (ppm)]

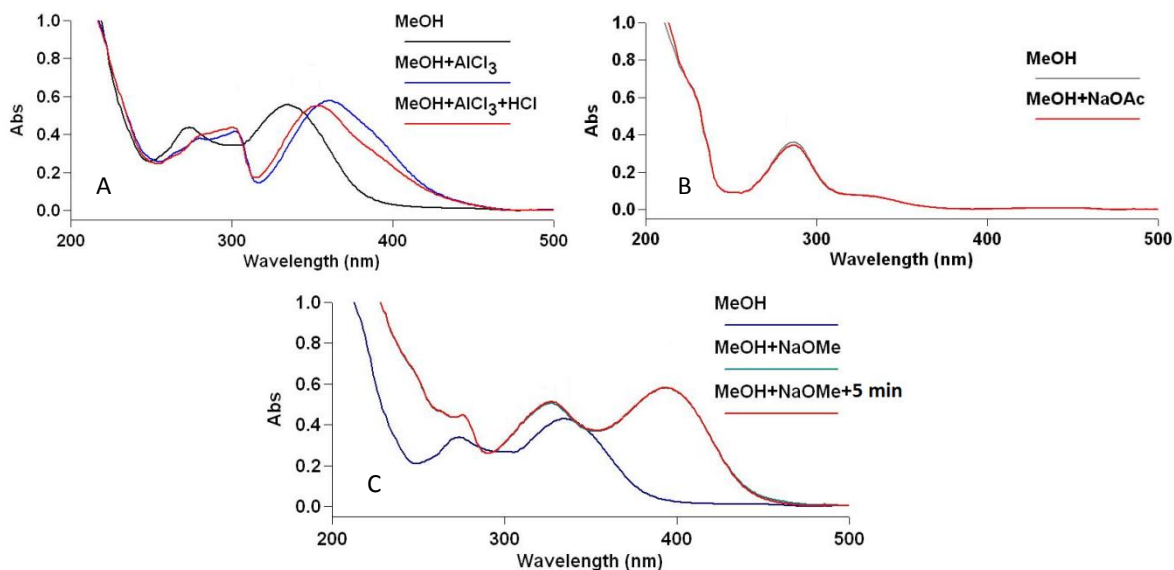


Figura 14. Espectros no UV de **M3** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento

O NaOAc, não apresentou nenhum deslocamento batocrômico expressivo (Figura 14b), indicando ausência de OH em C-7. A adição de NaOMe confirmou a presença de OH na posição 4' (Figura 14c). Com a análise por UV e reagente de deslocamento foi possível determinar que **M3** possui grupos OH em C-5 e C-4' e um grupo metoxila em C-7.

O espectro de massas obtido por CG-EM após silição de **M3** (Figura 15), apresentou como fragmentações o pico base em m/z 501 referente a $[M-CH_3]^+$ e o pico do íon molecular 516 $[M]^+$, indicando a fórmula molecular de $C_{25}H_{36}O_6Si_3$.

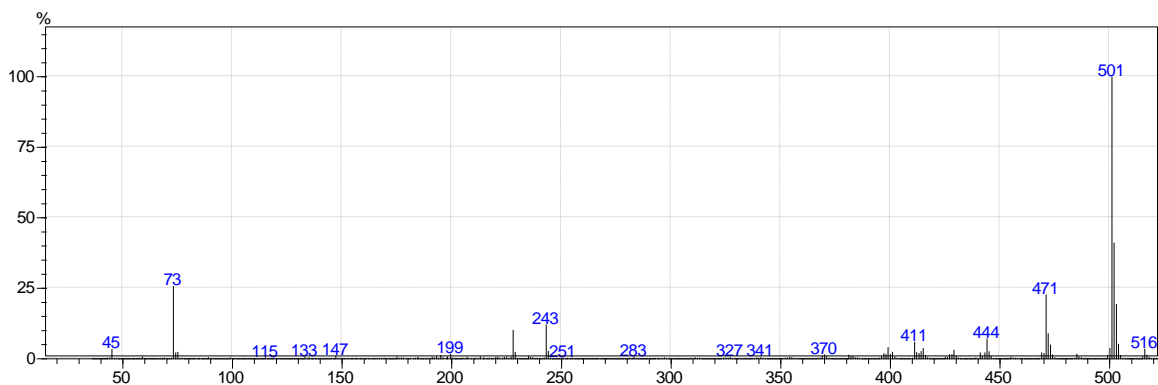


Figura 15. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M3**.

Com a análise de RMN de ^1H , ^{13}C , UV com ajuda de reagentes de deslocamento e EM, a substância **M3** foi identificada como 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona, também conhecida como sorbifolina.

Com o intuito de esclarecer dúvidas em relação a posição da hidroxila na posição C-6 ou C-8, os dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram comparados com dados da literatura para o isômero sorbifolina (EL-HAWIET *et al*, 2010) como pode ser observado na Tabela 1 para uma identificação inequívoca.

Em ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica contra bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-negativa *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*, o sorbifolina demonstrou atividade fraca com CIM de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *E. coli* e *C. Albicans* (EL-HAWIET *et al*, 2010). Também foi realizado em estudos anteriores o estudo da sorbifolina quanto a atividade antioxidante e inibidor da enzima mieloperoxidase (MPO), revelando ser um composto com potencial ação anti-inflamatória (FERNANDES *et al*, 2008). Esse é o primeiro relato do isolamento de 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (sorbifolina) em plantas do gênero *Mimosa*, embora a mesma já tenha sido isolada em outras plantas da família Leguminosae como *Pterogyne nitens* (FERNANDES *et al.*, 2008), *Astragalus annularis* e *A. trimestris* (EL-HAWIET *et al.*, 2010)

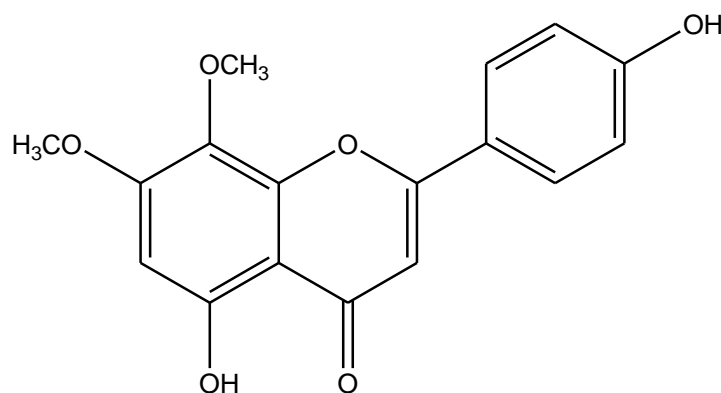
Tabela 1. Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona obtidos experimentalmente e (**M3**) e dados da literatura (sorbifolina)

Posição	M3*		Sorbifolina**	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	165,0	-	164,9
3	6,76 (s)	103,0	6.53 (s)	103,6
4	-	183,0	-	182,8
5	-	153,3	-	153,2
6	-	132,1	-	131,4
7	-	153,3	-	157,4
8	6,58 (s)	95,2	6.58 (s)	93,9
9	-	158,0	-	152,6
10	-	104,8	-	104,3
1'	-	122,1	-	121,8
2' e 6'	7,91 (d, $J = 8,6$ Hz)	129,3	7.85 (d, $J = 7.2$ Hz)	128,0
3' e 5'	6,92 (d, $J = 8,6$ Hz)	116,9	6.92 (d, $J = 7.2$ Hz)	115,6
4'	-	161,7	-	161,3
OMe	3,75 (s)	61,0	3.86 (3H, s)	59,51
OH	13,07 (s)	-	-	-

* 300MHz, DMSO- d_6

**400MHz, DMSO- d_6

Identificação de 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4)



M4

5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 7,85 (d ; 8,7; H-2',6'); 7,02 (d ; 8,7; H-3',5'); 6,59 (s ; H-3); 6,60 (s ; H-6); 4,05 (s , CH_3O -8). 3,90 (s , CH_3O -7). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 103,6 (C-3), 130,9 (C-6), 93,4 (C-8), 128,1 (C-2',6'), 114,5 (C-3',5'), 75,7 (OCH_3 -8), 55,5 (OCH_3 -7),

O espectro de RMN ^1H da substância **M4** (Figura 16) apresentou dois dupletos em δ 7,85 e 7,02 ($J = 8,7$ Hz), referentes à presença de um anel aromático *para*-dissubstituído (anel B), sugerindo a natureza flavonoídica deste composto. Os singletos em δ 4,05 e 3,90 (3H, cada) indicaram a presença de duas metoxilas, sendo que o primeiro é característico de grupos metoxílicos *orto*-dissubstituído. O sinal em δ 6,60 (s) foi atribuído ao H-6 (anel A) por estar em uma frequência um pouco mais baixa do que geralmente ocorre para o sinal de H-8. O singlete em δ 6,59 (s) foi atribuído H-3 (anel C).

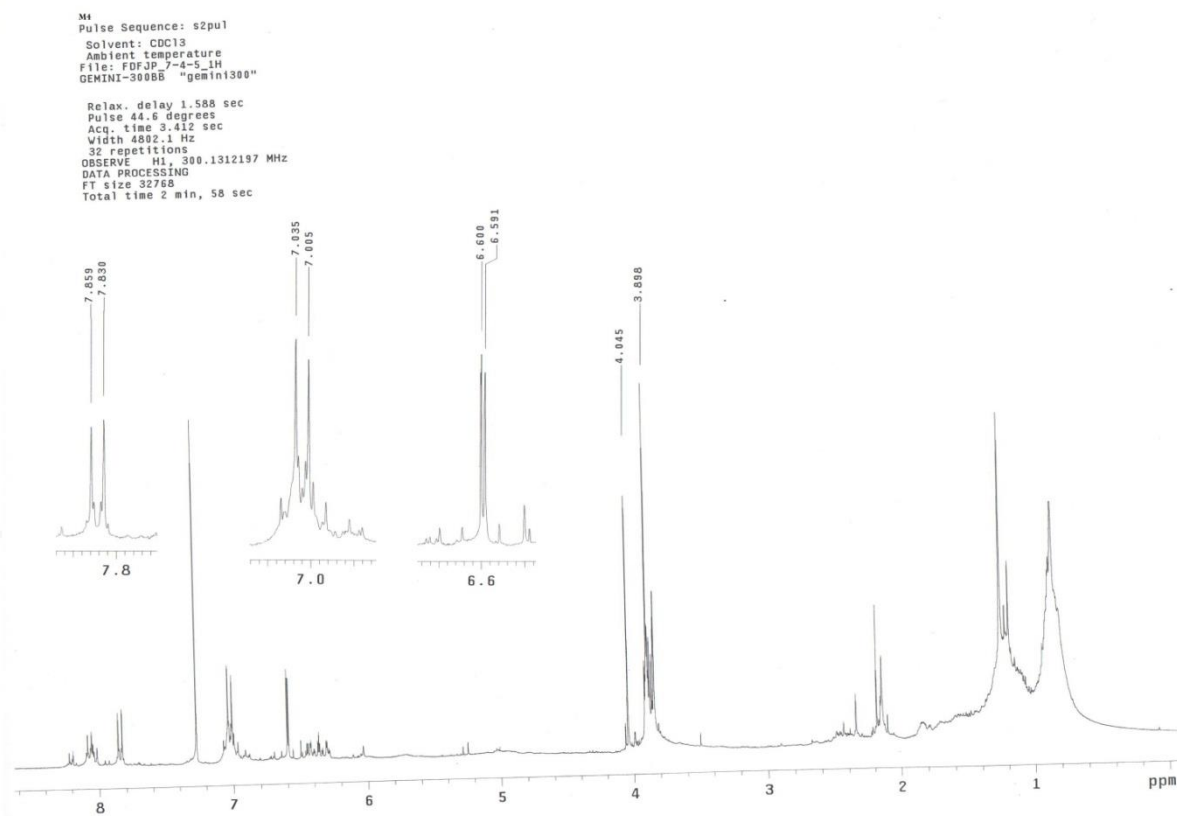


Figura 16. Espectro de RMN ^1H de **M4** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17) não apresentou todos os sinais, provavelmente pelo tempo insuficiente de aquisição do espectro, mas ainda assim, foi possível observar os sinais referentes a 2 carbonos (δ 128,1 de C-2',6' e δ 114,5 de C-3',5') do anel B.

O espectro de UV, registrado em metanol apresentou λ_{max} em 271 e 328 nm e com reagente de deslocamento AlCl_3/HCl (Figura 18a) e NaOMe (Figura 18b) houve deslocamento dessas bandas confirmando a presença das hidroxilas nas posições 5 e 4'.

Por meio da análise desses dados chegou-se a identificação de **M4** como a flavona a 5,4'-di-hidroxi-7,8-diimetoxiflavona, a qual foi confirmada pelo pico base observado no espectro de massas (Figura 19) em $m/z = 443$ ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$). Esse fragmento sugere a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Si}_2$ (massa de 458), referente a 5,4'-di-hidroxi-7,8-diimetoxiflavona após sililação.

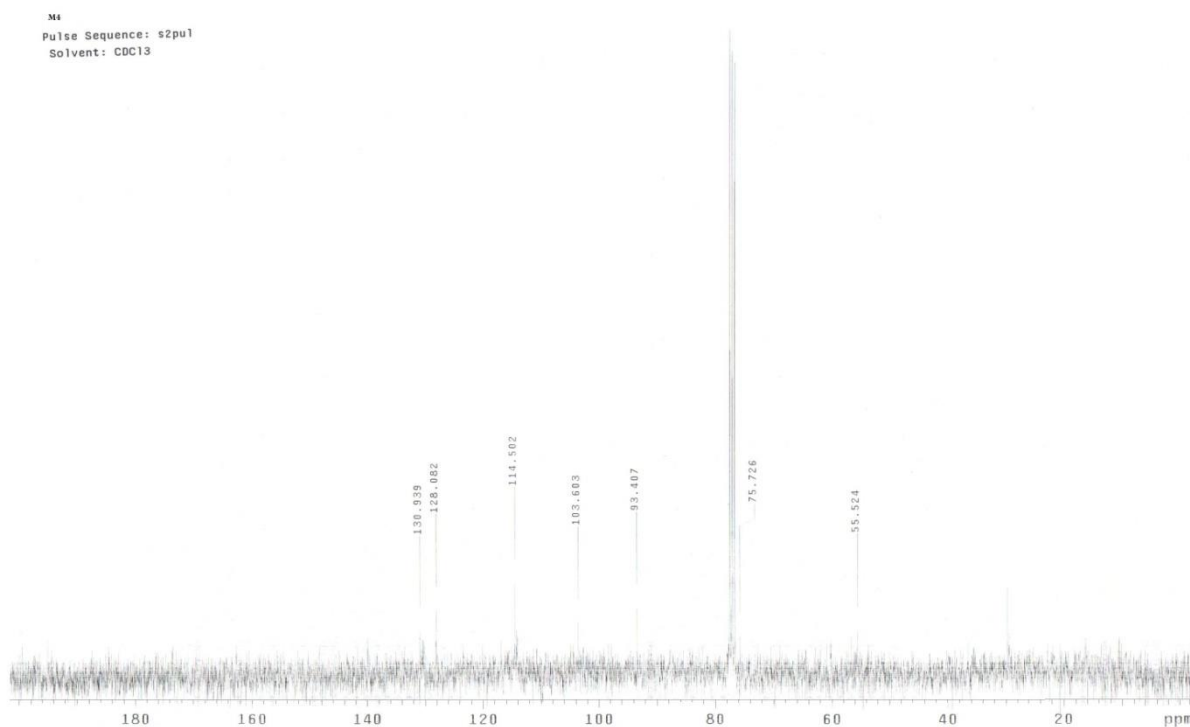


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C de **M4** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

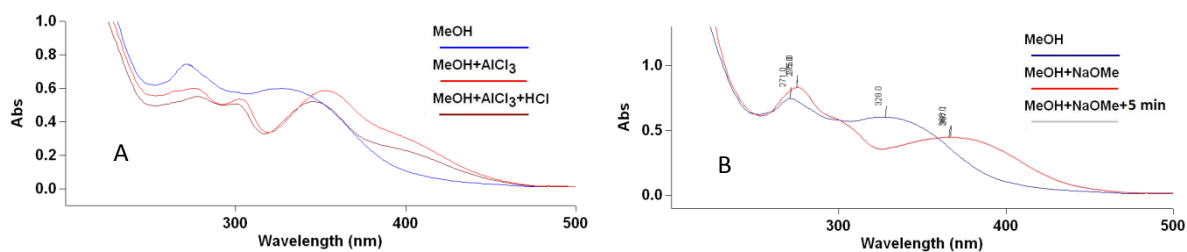


Figura 18. Espectros no UV de **M4** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento

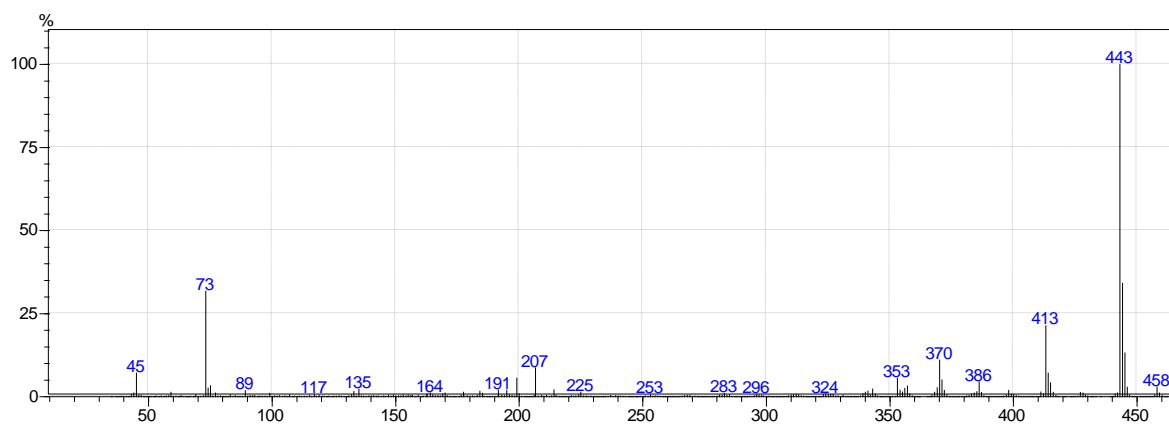
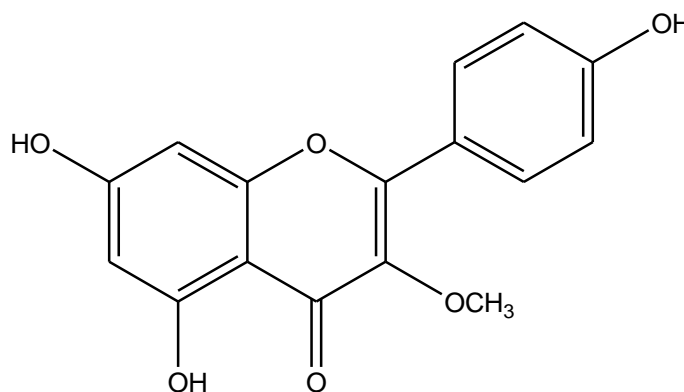


Figura 19. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M4**.

A flavona 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (**M4**) foi isolada e identificada pela primeira vez em plantas do gênero *Mimosa*. Apesar da flavona com a posição 8 substituída ser menos comum, existem relatos de outras flavonas hidroxiladas ou metoxiladas nesta posição na espécie *M. hostilis* como a 5,8,4'-tri-hidroxi-flavona e 5,7,4'-tri-hidroxi-8-metoxiflavonas (OHSAKI *et al.*, 2006) além das flavonas vitexina presente em *M. pudica* (YUSUF *et al.*, 2003) e vitexina-2''-*O*-ramnopiranosídeo em *M. xantocentra* (CAMARGO, KAISER e COSTA, 2007) entre outras.

Identificação de 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (**M5**)



M5

5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 7,95 (d ; 8,7; H-2',6'); 6,89 (d ; 8,7; H-3',5'); 6,21 (d ; 1,5; H-8); 6,05 (d ; 1,5; H-6); 3,73 (s , CH_3O -3). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 157,1 (C-2), 138,9 (C-3), 179,1 (C-4), 162,6 (C-5), 102,3 (C-6), 173,6 (C-7), 96,5 (C-8), 159,0 (C-9), 103,7 (C-10), 122,4 (C-1'), 131,2 (C-2',6'), 116,8 (C-3',5'), 162,3 (C-4'), 60,5 (OCH_3 -3),

O espectro de RMN ^1H da substância **M5** (Figura 20) apresentou dois dupletos em δ 7,95 e 6,89 ($J = 8,7$ Hz), referentes à presença de um anel B aromático *para*-dissubstituído. O singleto em δ 3,73 (3H) sugeriu a presença de uma metoxila ligada a C_{sp}^2 . Os dubletos registrados em δ 6,05 e 6,21 ($J = 1,5$ Hz), referentes a acoplamento *meta* sugeriram ser dos H

nas posições 6 e 8 (anel A) sendo um anel aromático tetrassubstituído. Estes dados são indicativos da natureza flavonídica deste composto.

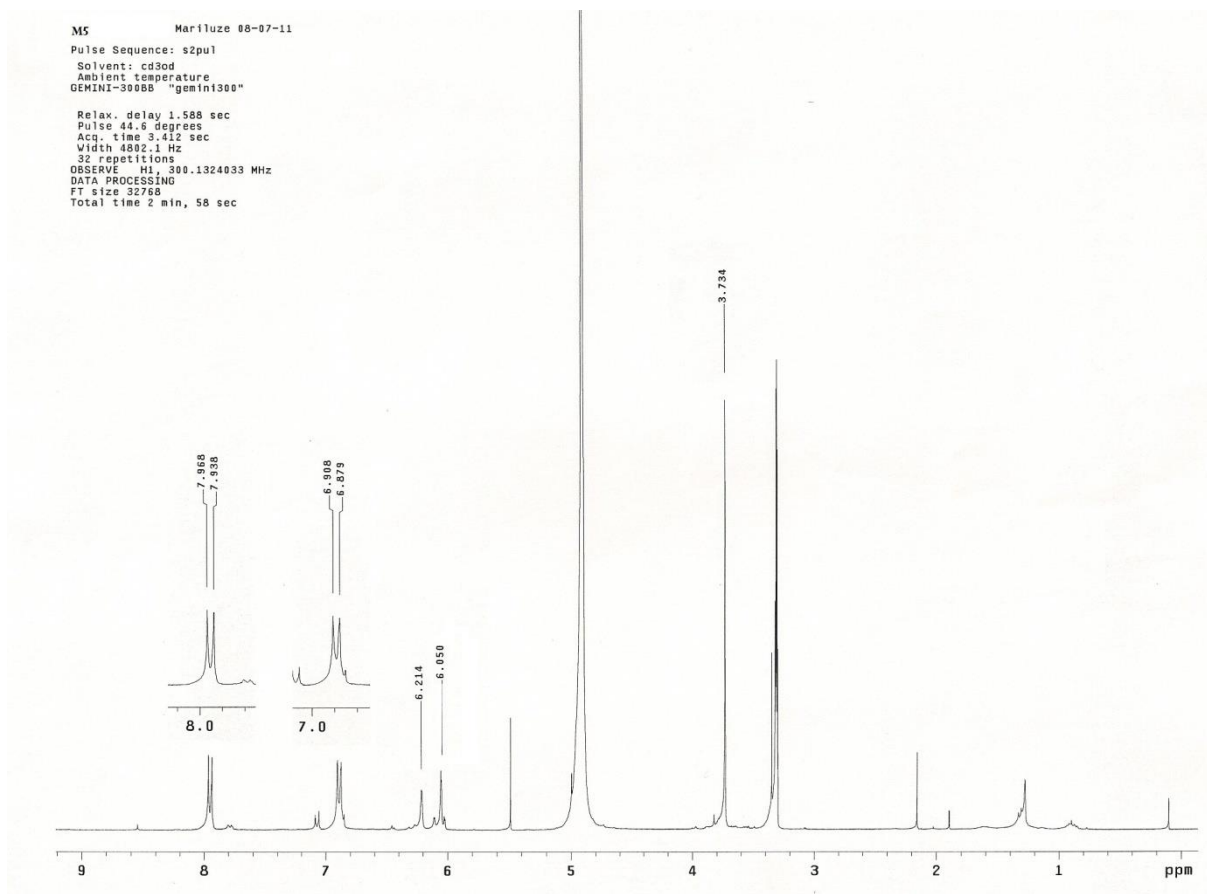


Figura 20. Espectro de RMN ^1H de **M5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) apresentou os sinais do anel C em δ 157,1 (C-2), 138,9 (C-3) e 179,1 (C-4), referentes a um flavonol, tendo o C-3 ligado a um grupo oxigenado (hidroxila ou metoxila). Os sinais referentes a dois carbonos em δ 131,2 (C-2',6') e 116,8 (C-3',5') além de 122,4 (C-1') e 162,3 (C-4') confirmaram que o anel B é dissustituído. Os sinais em δ 162,6 (C-5) e 173,6 (C-7) indicaram que estes carbonos estão ligados a grupos oxigenados (hidroxila ou metoxila).

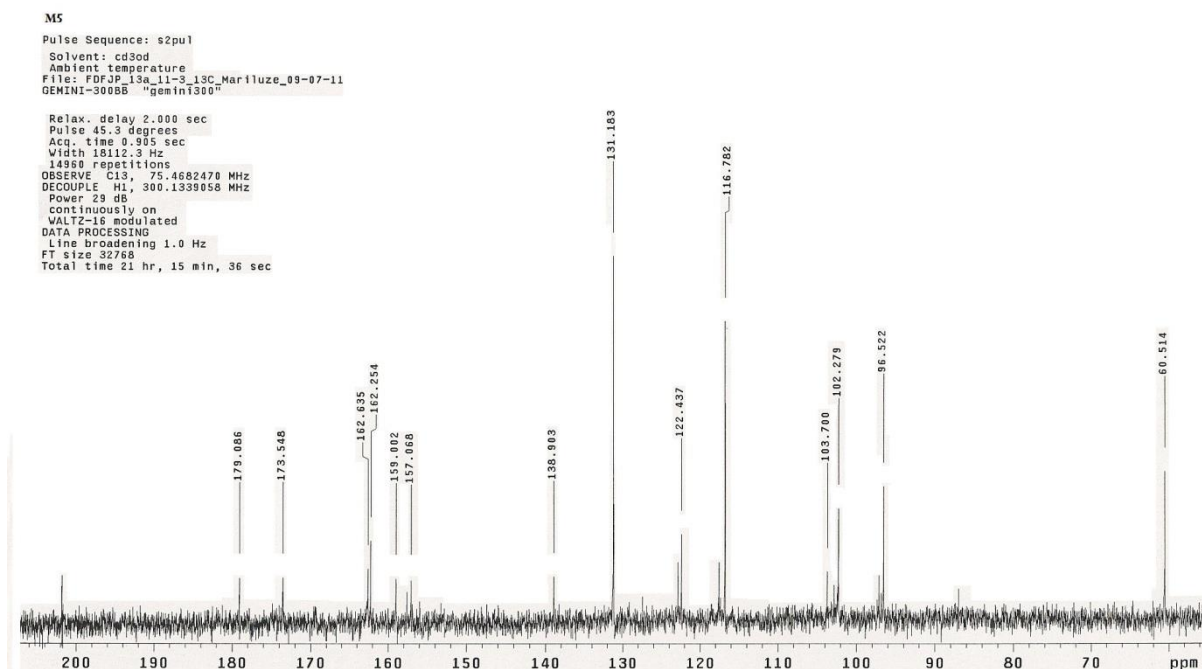


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C de **M5** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

Analisando o espectro de massas (Figura 22) obtido por CG-EM após derivatização da substância **M5**, observou-se o pico do íon molecular em $m/z = 516$ (M^+), e o pico base em 501 ($\text{M}^+ - 15$), sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Si}_3$, referente a um flavonoide com três hidroxilas e um grupo metoxila.

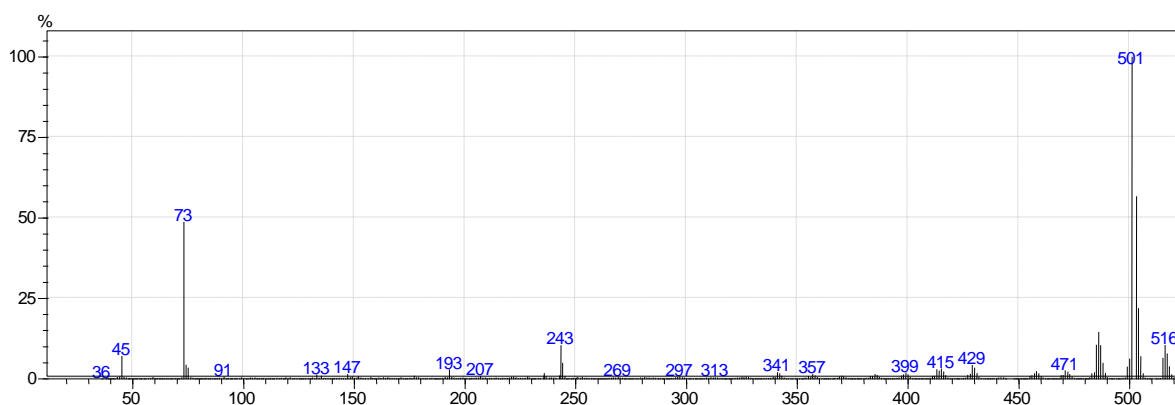


Figura 22. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M5**.

A posição da metoxila foi definida por comparação com os dados da referência (Tabela 2), onde foi observado que no espectro de RMN ^{13}C do 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona, que o valor da metoxila na posição C-3 em torno de δ 60 ocorre porque os carbonos vizinhos (C-2 e C-4) estão substituídos (GAO *et al.*, 2012), diferente do que ocorre quando a metoxila

esta na posição 4' e possui carbonos vizinhos hidrogenados (C-3' e C-5') como no 5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavonol (LEE *et al*, 2008) que possui o sinal da metoxila em torno de δ 55.

Portanto, através das análises e comparação com a literatura, a substância **M5** foi definida como 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona, também conhecido como isokaempferideo (CSAPI *et al*, 2010), kaempferol 3-metil éter (PARK *et al*, 2011) ou 3-O-metilkaempferol (GAO *et al*, 2012).

O isokaempferideo foi isolado e identificado pela primeira vez em plantas do gênero *Mimosa* embora já tenha sido identificada em outras espécies da família Leguminosae como *Caragana leucophloea* (GAO *et al*, 2012).

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C de **M5**, 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona e 5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavonol.

Posição	M5*	5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona**	5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavonol***
2	157,1	155,6	146,3
3	138,9	137,6	136,1
4	179,1	177,9	176,1
5	162,6	161,2	160,8
6	102,3	98,5	98,3
7	173,6	164,1	164,1
8	96,5	93,7	93,6
9	159,0	156,3	156,3
10	103,7	104,2	103,7
1'	122,4	120,5	123,3
2' e 6'	131,2	130,1	129,4
3' e 5'	116,8	115,6	114,1
4'	162,3	160,1	160,6
4-OMe	60,5	59,7	55,4

* CD₃OD, 75 MHz

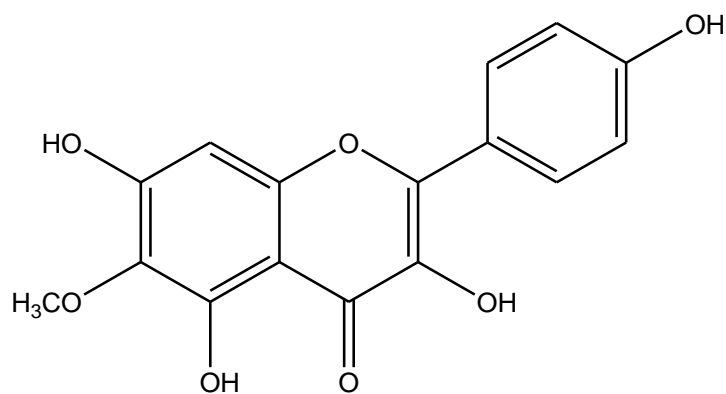
** DMSO-d₆, 125 MHz (GAO *et al*, 2012)

*** DMSO-d₆, 100 MHz (LEE *et al*, 2008)

Atividades biológicas descritas na literatura para esta substância incluem a avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) como antioxidante. O isokaempferideo apresentou percentual de 47,9 % na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (AL-DABBAS *et al*, 2011). Essa substância também apresenta boa atividade *in vitro* para as células tumorais humanas A549 (não-pequenas do pulmão de células de adenocarcinoma), SK-OV-3 (células de cancro do ovário), SK-MEL-2 (melanoma), e HCT15 (células de câncer de cólon) com concentração inibitória de 11,37, 5,74, 7,19 e 9,06 μM , respectivamente, usando o bioensaio sulforrodamina B - SRB (PARK *et al*, 2011). Em termos de atividade antimicrobiana, apresentou boa atividade, com CIM variando de 12,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para os

microrganismos *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Bacillus subtilis* (GAO *et al.*, 2012).

Identificação de 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6)



M6

5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 12,35 (s; OH); 8,17 (d; 8,7; H-2',6'); 7,03 (d; 8,7; H-3',5'); 6,62 (s; H-8); 3,88 (s, CH_3O -6). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ_{C} : 94,5 (C-8), 130,5 (C-2',6'), 116,3 (C-3',5'), 60,7 (OCH_3 -3).

O espectro de RMN ^1H da substância **M6** (Figura 23) apresentou poucos sinais, sendo os sinais do anel B. Os dois dupletos em δ 8,17 e 7,03 ($J = 8,7$ Hz), referentes à presença de um anel aromático *para*-dissubstituído. Além destes sinais, o singlete em δ 3,88 (3H) indicou a presença de uma metoxila e o singlete em 12,35 é indicativo da presença de hidroxila quelada. O sinal em δ 6,62 (s) foi atribuído ao H-8 (anel A).

Os dados obtidos do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) foram determinantes na identificação da classe do presente flavonoide. Os sinais referentes a 2 carbonos (δ 130,5 de C-2'/C-6' e δ 116,3 de C-3'/C-5') do anel B, confirmaram a presença de anel aromático *para*-substituído. Além desses registros o sinal de uma metoxila, cujo deslocamento (δ 60,7) é característico de metoxila ligada a carbono aromático *orto*-dissubstituído; além de um sinal de CH aromático em δ 94,5 referente ao C-8.

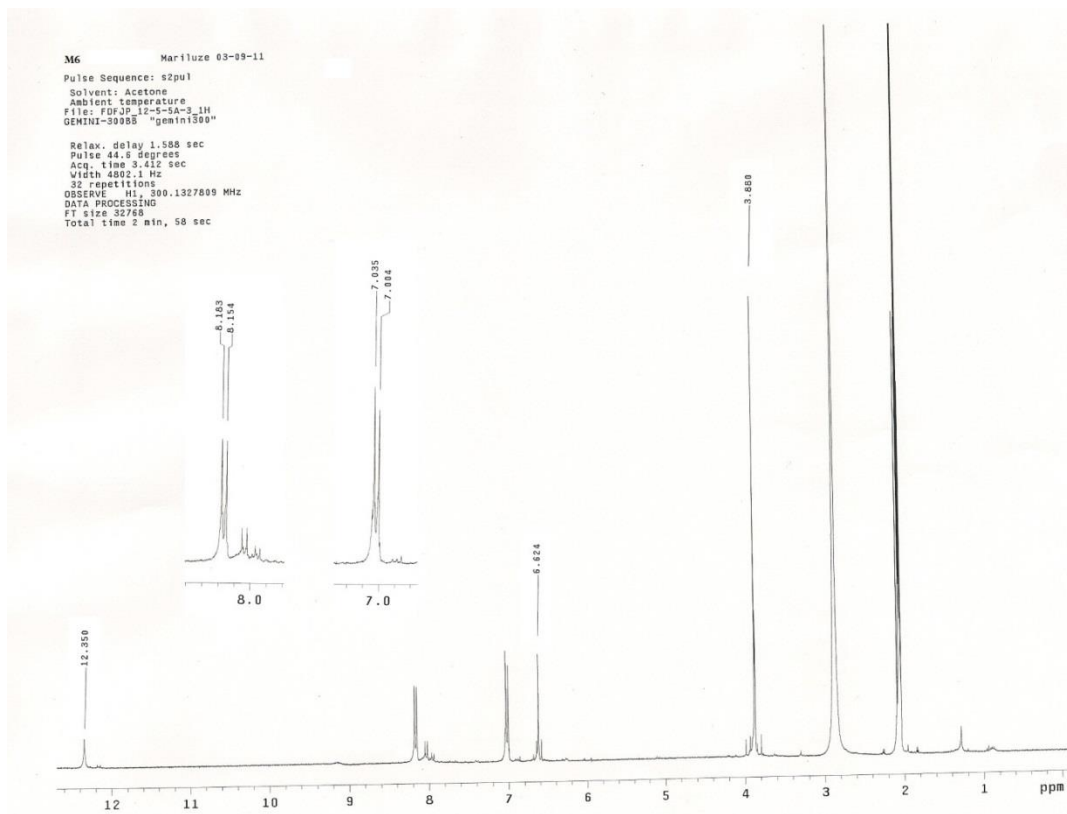


Figura 23. Espectro de RMN ^1H de **M6** [300 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$, δ (ppm)]

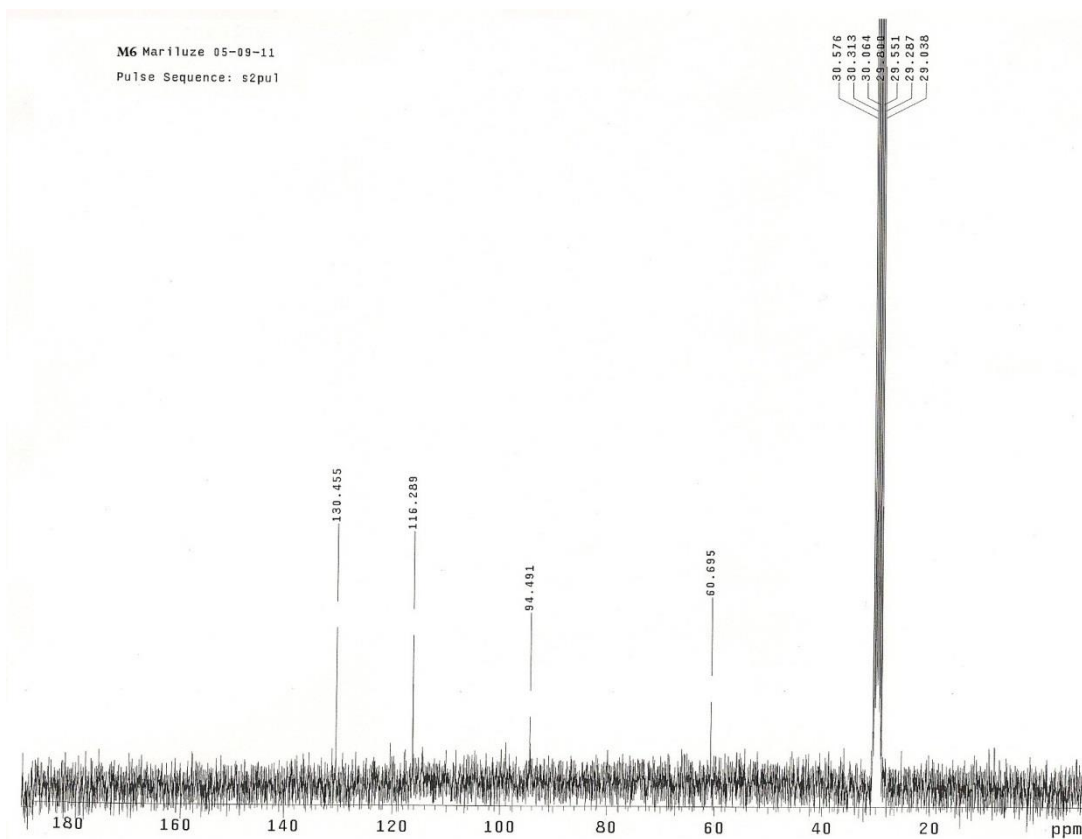


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C de **M6** [75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$, δ (ppm)]

A análise por CG-EM, após derivatização da substância **M6**, apresentou no espectro de massas (Figura 25) o pico base em $m/z = 589$ ($M^+ - 15$). Esse fragmento sugere a fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_7Si_4$ (m/z 604), referente a um flavonoide com quatro hidroxilas.

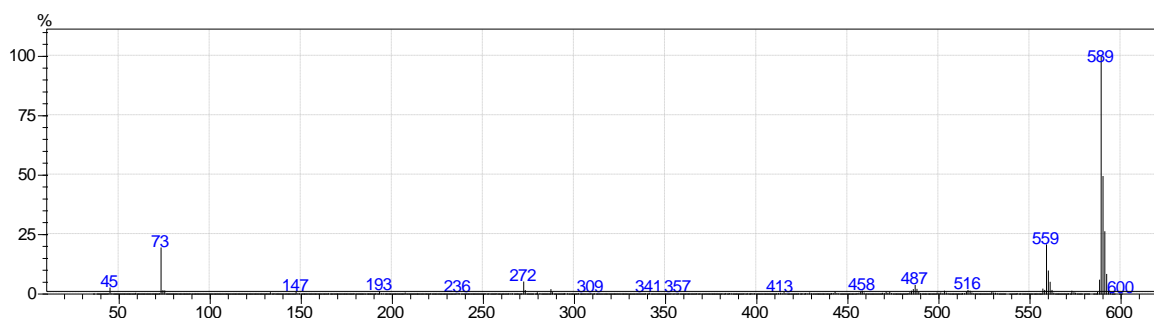


Figura 25. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M6**.

A análise por UV confirmou a presença da hidroxila nas posições 3, 5,7 e 4' com o deslocamento do espectro em metanol, usando reagentes de deslocamento como $AlCl_3/HCl$ (Figura 26a), $NaOAc$ (Figura 26b) e $NaOMe$ (Figura 26c).

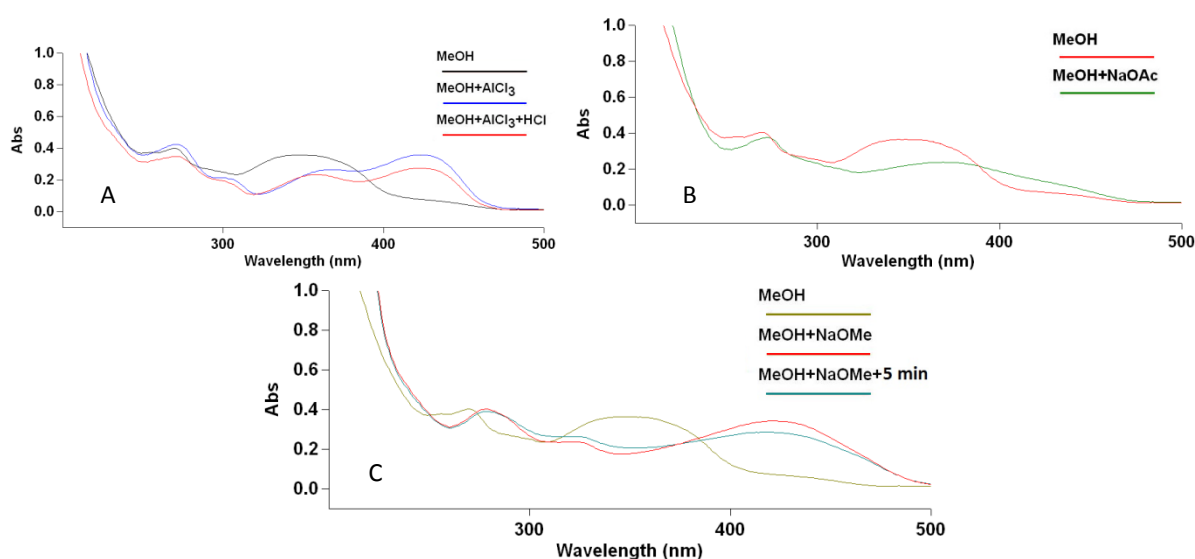


Figura 26. Espectros no UV de **M6** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.

Por meio da análise dos dados de EM, UV, RMN ^{13}C , 1H e comparação deste último com a literatura (ALARCÓN *et al*, 2009), que pode ser observado na Tabela 3, chegou-se a

identificação de **M6** como o flavonol 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol também conhecido como 6-metoxikaempferol.

Tabela 3. Dados de RMN ^1H **M6** e de 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol.

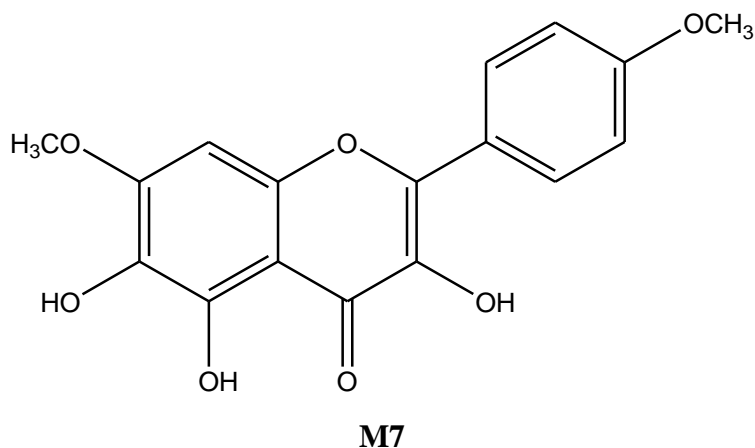
Posição	M6 *	5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol**
8	6,62 (1H, s)	6,64 (1H, s)
2' e 6'	8,17 (d, $J = 8,7$ Hz)	8,17 (d, $J = 9,0$)
3' e 5'	7,03 (d, $J = 9,0$ Hz)	7,04 (d, $J = 9,0$)
OMe	3,88 (3H, s)	3,89 (3H, s)
OH	12,35 (1H, s)	12,38 (1H, s)

* 300MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$

**400MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$

O 6-metoxikaempferol já foi isolado anteriormente por BAUTISTA *et al.*, (2011) na espécie *M. tenuiflora*, apresentando atividade moderada para os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*.

Identificação de 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (**M7**)



5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 13,06 (s; OH); 8,09 (d; 8,7; H-2',6'); 7,07 (d; 8,7; H-3',5'); 6,63 (s; H-8); 3,93 (s, $\text{CH}_3\text{O-4}$); 3,92 (s, $\text{CH}_3\text{O-6}$).

O espectro de RMN ^1H da substância **M7** (Figura 27) apresentou sinais em δ 8,09 e 7,07 ($J = 8,7$ Hz) indicativos da presença de anel B aromático *para*-substituído. Apresentou também sinais em δ 13,06 referente a OH quelada, os singletos em δ 3,93 e δ 3,92 sugerindo a presença de duas metoxilas e δ 6,63 (s) atribuído ao H-8, o que definiu o padrão de substituição do flavonol. Além desses sinais, também são observados outros sinais pertencente a alguma impureza na amostra.

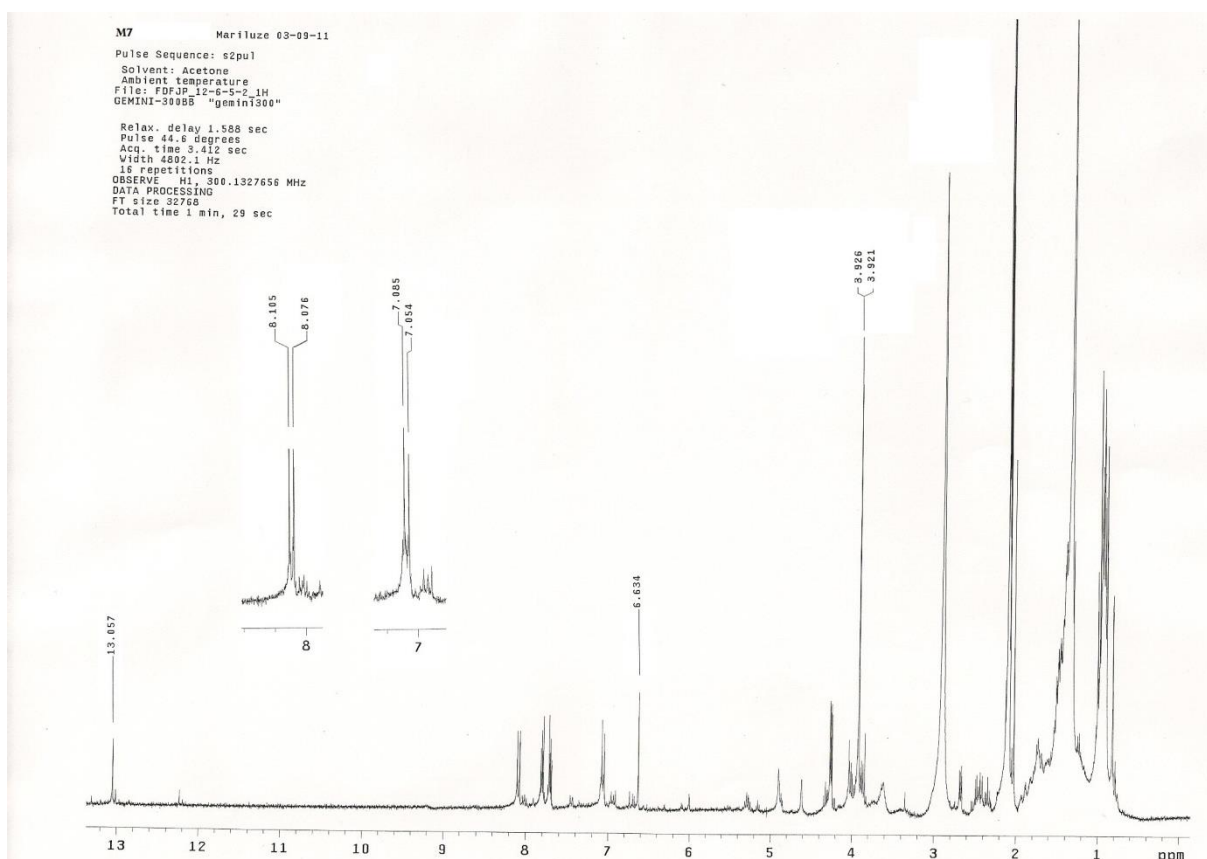


Figura 27. Espectro de RMN ^1H de **M7** [300 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$, δ (ppm)]

Em análise por CG-EM, o cromatograma (Figura 28a) confirmou a presença de duas substâncias, que por espectrometria de massas o pico com tempo de retenção em 46,755 foi identificada como fitalato, impureza comumente encontrada quando se trabalha com produtos naturais. O espectro de massas do flavonoide (Figura 28b) apresentou o pico base em m/z 531 ($\text{M}^+ - 15$), e o pico do íon molecular em 546 (M^+), sugerindo a fórmula molecular da substância sililada $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{Si}_3$, com a presença de três hidroxilas.

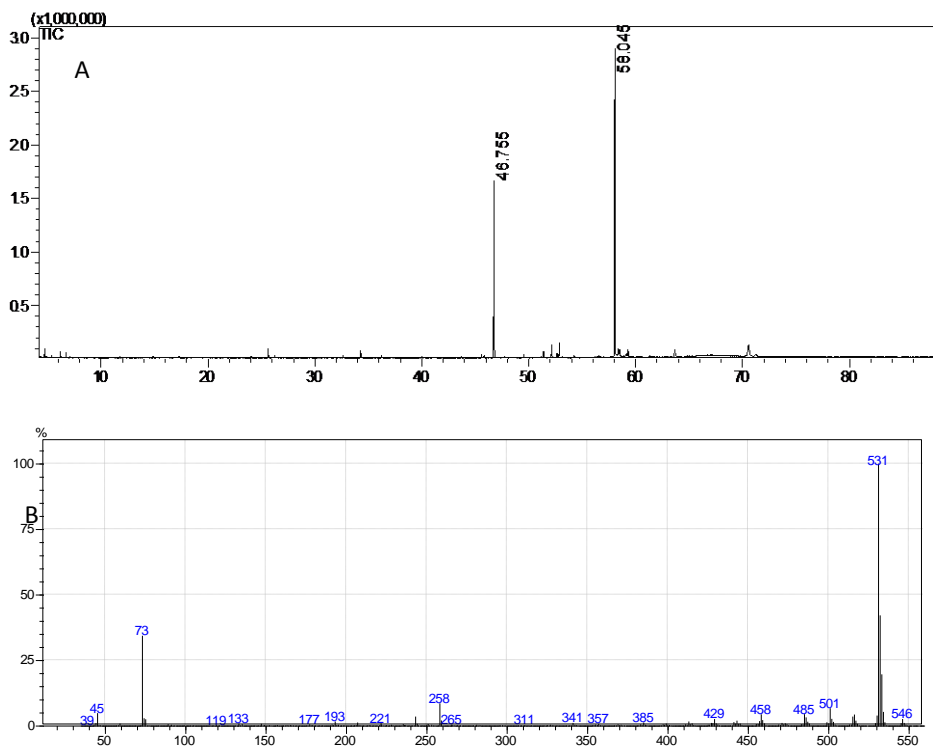


Figura 28. Cromatograma de íons totais (A) e espectro de massas (B) obtido em CG-EM após derivatização de **M7**

Com a análise por UV com AlCl_3/HCl (Figura 29a) o deslocamento no espectro sugeriu a presença da hidroxila nas posições 3 e 5. Usando o reagente NaOAc (Figura 29b) não houve deslocamento na Banda II, referente ao anel A, que sugeriu a ausência de OH na posição 7, concluindo que um dos grupos metoxílicos encontrava-se ligado neste carbono.

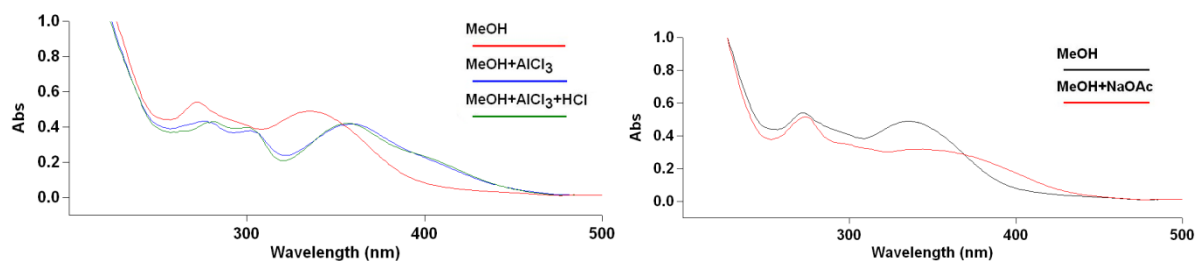


Figura 29. Espectros no UV de **M7** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.

Por meio da análise dos dados de CG-EM, UV, RMN ^1H e comparação com a literatura (MARUYAMA *et al*, 2009), que pode ser observado na Tabela 4, chegou-se a identificação de **M7** como flavonol 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol também conhecido como betuletol.

Tabela 4. Dados de RMN ^1H **M7** e de 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol.

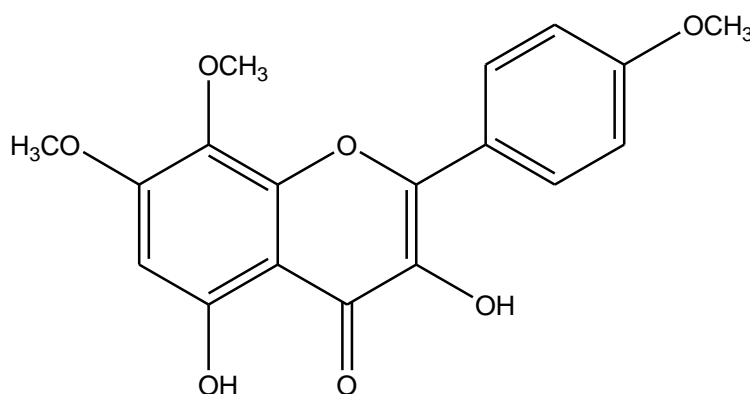
Posição	M7 *	5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol **
8	6,63 (1H, s)	6,57 (1H, s)
2' e 6'	8,09 (d, $J = 8,7$ Hz)	8,14 (d, $J = 8,9$ Hz)
3' e 5'	7,07 (d, $J = 8,7$ Hz)	7,11 (d, $J = 8,9$ Hz)
4-OMe	3,93 (3H, s)	3,85 (3H, s)
6-OMe	3,92 (3H, s)	3,77 (3H, s)
OH	13,06 (1H, s)	12,52 (1H, s)

* 300MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$

**300MHz, DMSO-d^6

O betuletol foi identificado pela primeira vez em espécies do gênero *Mimosa*. Em estudo realizado com o betuletol isolado de própolis verde, com o objetivo de testar sua capacidade no tratamento de hipertensão, apresentou um significativo decréscimo da pressão sanguíneas em ratos (MARUYAMA *et al*, 2009).

Identificação de 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (**M8**)



[**M8**]

5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol: Sólido amarelo. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult.; J em Hz; H) 8,08 (d ; 9,0; H-2',6'); 7,03 (d ; 9,0; H-3',5'); 6,56 (s ; H-6); 4,05 (s , CH_3O -8); 3,90 (s , CH_3O -7); 3,86 (s , CH_3O -4').

O espectro de RMN de ^1H de **M8** (Figura 30) foi analisada e apresentou dois dupletos em δ 7,03 e 8,08 ($J = 9,0$ Hz), referentes à presença do anel B *para*-dissubstituído. Os singletos em δ 4,05, 3,90 e 3,86 (3H, cada) indicaram a presença de três metoxilas. A metoxila registrada em δ 4,05 é indicativo que a mesma encontra-se *orto*-dissubstituída. O sinal em δ 6,56 (s) foi atribuído ao H-6 (anel A) por estar em campo um pouco mais baixo do que geralmente ocorre para o sinal de H-8.

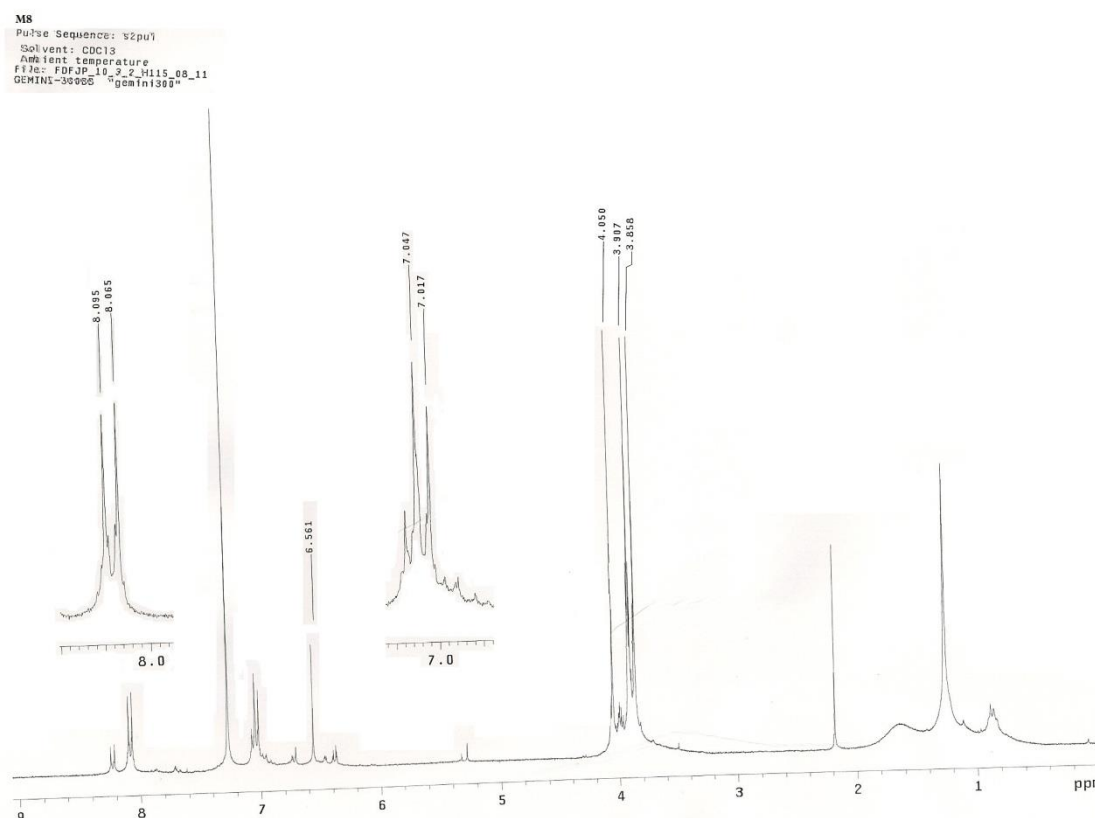


Figura 30. Espectro de RMN ^1H de **M8** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

O espectro de massas obtido por CG-EM após derivatização (Figura 31), apresentou o pico do íon molecular $[\text{M}^+]$ em m/z 488 e como pico base o fragmento 473 $[\text{M}^+-15]$, sugerindo ser um flavonoide com duas hidroxilas sililadas e três metoxilas, com fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{Si}_2$.

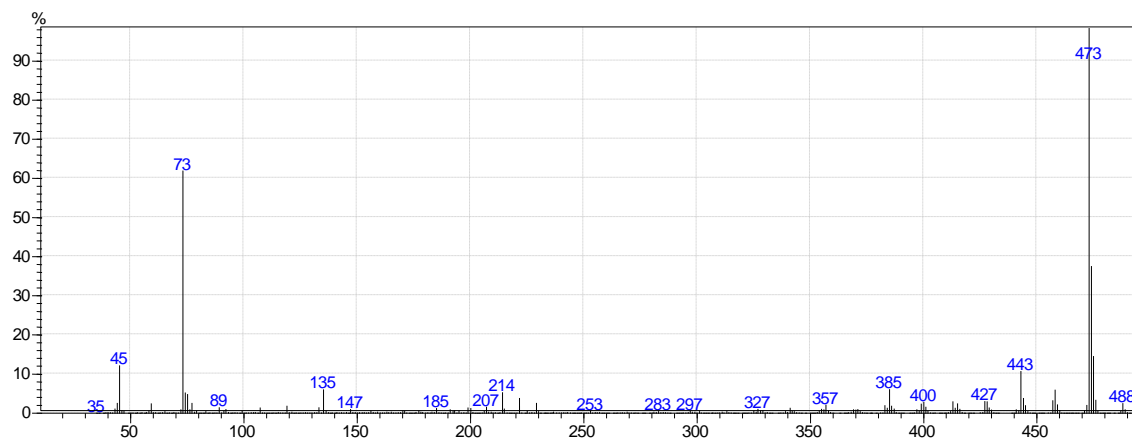


Figura 31. Espectro de massas obtido em CG-EM após derivatização de **M8**

Com análise por UV, foi possível confirmar a presença das hidroxilas nas posições 3 e 5
Figura 32.

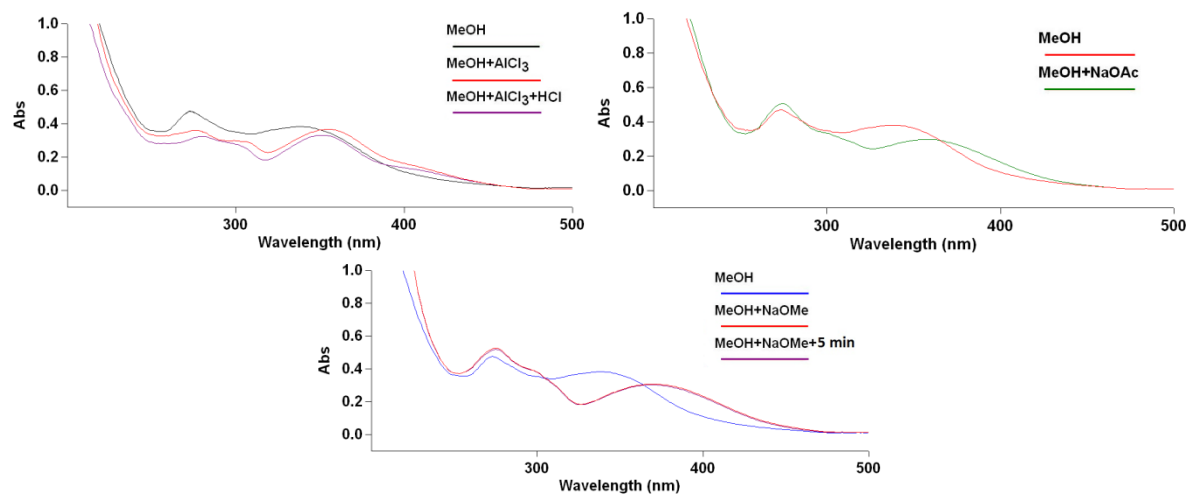


Figura 32. Espectros no UV de **M8** registrados em metanol e adição de reagentes de deslocamento.

O esqueleto do flavonol foi confirmado com dados da literatura apresentado na Tabela 5 (HORIE *et al*, 1988; WEI *et al*, 2004) como o 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol.

Tabela 5. Dados de RMN ^1H **M8**, de 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol e de 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavonol.

Posição	M8*	5-hidroxi-7,8,4'- trimetoxiflavonol**	5-hidroxi-6,7,4'- trimetoxiflavonol***
6	6,56 (1H, s)	6,50 (1H, s)	6,78 (1H, s)
2' e 6'	8,08 (d, $J = 9,0$ Hz)	8,10 (d, $J = 8,5$ Hz)	8,54 (dd, $J = 7,2; 2,0$ Hz)
3' e 5'	7,03 (d, $J = 9,0$ Hz)	7,07 (d, $J = 8,5$ Hz)	7,18 (dd, $J = 7,2; 2,0$ Hz)
OMe	3,86 (3H, s)	3,80 (3H, s)	3,75 (3H, s)
OMe	3,90 (3H, s)	3,82 (3H, s)	3,87 (3H, s)
OMe	4,05 (1H, s)	3,87 (3H, s)	3,99 (3H, s)
OH	12,16		

* 300MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$

** 60 MHz, DMSO-d^6

***400MHz, piridina

O 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol, também conhecido como tambulina nunca foi descrito anteriormente em espécies do gênero *Mimosa*, essa substância é mais comum em plantas da família Asteraceae como *Helianthus annuus* (MACÍAS *et al.*, 1997) e *Rudbeckia bicolor* (JAUHARI *et al.*, 1979) Em teste de atividade alelopática, o tambulin não mostrou qualquer efeito contra germinação e comprimento radical de espécies de tomate e cevada, mas inibiu o crescimento de ramos de tomate e cevada (MACÍAS *et al.*, 1997).

AValiação QUANTITATIVA DE INIBIÇÃO DA AChE

As plantas do gênero *Mimosa*: *M. pudica* (INGKANINAN *et al.*, 2003) e *M. acustila* (TREVISAN e MACEDO, 2003) apresentaram atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer despertando o interesse em avaliar os flavonoides isolados de *M. hostilis*, sabendo que esta classe também apresenta essa atividade (FAN *et al.*, 2008; SAWASDEE *et al.*, 2009).

A avaliação quantitativa de inibição da AChE, consiste em um método fotométrico de detecção da ação inibidora dessa enzima. Um análogo do substrato natural acetilcolina a acetiltiocolina é usada como substrato e a atividade enzimática é avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetiltiocolina a acetato e tiocolina, este último após reagir com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (reagente de Ellman) produz o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato cuja formação pode ser medida a 405 nm em espectrofotômetro (Figura 33).

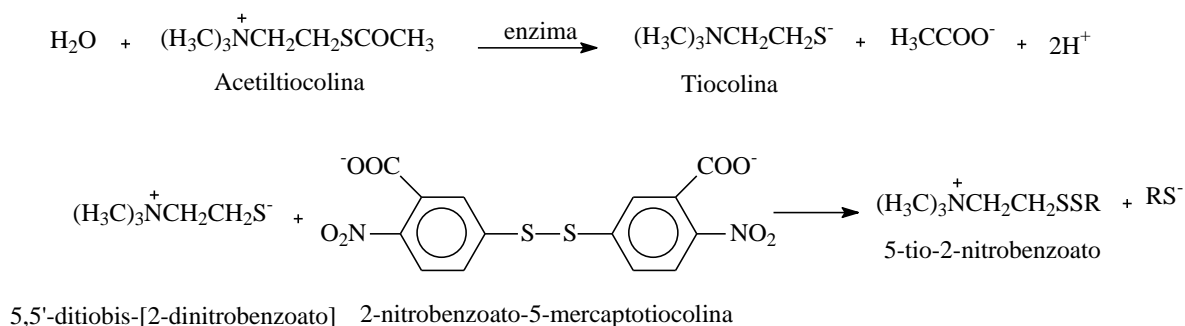


Figura 33. Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman.

Os resultados das avaliações quantitativa dos flavonoides isolados foram comparados com a fisostigmina, uma das primeiras substâncias testadas como inibidor reversível da AChE, com melhora leve em paciente com doença de Alzheimer porém, de uso restrito devido aos efeitos colaterais (PETRONILHO, PINTO e VILLAR, 2011). Os valores percentuais obtidos para os flavonoides isolados de *M. hostilis* podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6. Porcentual de inibição da AChE (%I) pela ação de fisostigmina e flavonoides isolados de *M. hostilis*

Substâncias	%I ± DP
fisostigmina	94,83±0,36 ^a
5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1)	24,09±0,28 ^{bd}
5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2)	26,46±1,11 ^b
5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3)	9,34±2,43 ^c
5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4)	27,63±2,99 ^b
5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (M5)	16,99±2,57 ^{cd}
5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6)	13,62±1,03 ^{cf}
5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (M7)	9,53±1,26 ^c
5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (M8)	18,30±2,34 ^{df}

^a Valores representados como média ± DP (n=3) da porcentagem de inibição da AChE das triplicatas realizadas. Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significante comparando os valores de fisostigmina, p < 0,05 (ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Todos os flavonoides testados a 500 µmol.L⁻¹ apresentaram alguma atividade inibitória da AChE, porém nenhum apresentou atividade tão boa quanto o controle fisostigmina. Foram realizados também testes em concentrações mais baixa, onde foi observado que a atividade diminuía em função da concentração, e como não havia quantidade

suficiente dos flavonoides puros, não foram realizados os testes em concentrações mais altas para encontrar a concentração inibitória de 50% da AChE. Observa-se ainda que os flavonoides de maiores atividades foram M4, M2 e M1 e de menores atividades foram M3, M7, M6 e M5.

CONCLUSÃO

Dentre os oito flavonoides isolados e identificados em *M. hostilis*, a flavanona 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1), a flavona 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2) e o flavonol 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6) já tinham sido anteriormente isolados de espécies do gênero *Mimosa*. Os outros cinco flavonoides 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3), 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4) e os flavonóis 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (M5), 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (M7) e 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (M8) foram isolados pela primeira vez no gênero *Mimosa*, em folhas de *M. hostilis* e identificados por análises espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , UV, EM e comparação com dados da literatura. Os flavonoides apresentaram atividade inibitória da AChE sendo que M4, M2 e M1 com cerca de 26% de inibição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.

ALARCÓN, R.; OCAMPOS, S.; PACCIARONI, A.; COLLOCA, C. e SOSA, V. Constituents of *Gutierrezia mandonii* (Asteraceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 683–685, 2009.

AL-DABBAS, M. M.; AL-ISMAIL, K.; ABU-TALEB, R.; HASHIMOTO, F.; RABAH, I. O.; KITAHARA, K.; FUJITA, K. E SUGANUMA, T. Chemistry and antiproliferative activities of 3-methoxyflavones isolated from *Varthemia iphionoides*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, p. 17-20, 2011.

ANDERSEN, Ø. M. e MARKHAM, K. R. **Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications**. Includes bibliographical references and index. 2005. 1197 p.

- BAUTISTA, E.; CALZADA, F.; ORTEGA, A. e YÉPEZ-MULIA, L. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 55, p. 251-253, 2011.
- CAMARGO, L. M. M.; KAISER, C. R. e COSTA, S. S. Rotâmeros de isovitexina-O-2''-ramnopiranosídeo: o primeiro flavonóide isolado de *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBQ, 2007. 1 CD-ROM.
- COTTIGLIA, F.; LOY, G.; GARAU, D.; FLORIS, C.; CASU, M.; POMPEI, R. e BONSIGNORE, L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. **Phytomedicine**, v. 8, p. 302-305, 2001.
- CSAPI, B.; HAJDÚ, Z.; ZUPKÓ, I.; BERÉNYI, Á.; FORGO, P.; SZABÓ, P. e HOHMANN, J. Bioactivity-guided Isolation of Antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1664–1669, 2010.
- DOHI, S.; TERASAKI, M. e MAKINO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4313–4318, 2009.
- DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; FILHO, A. M. P.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. **Anais ...** São Paulo, 2008. p. 248. 1 CD-ROM.
- EL-HAWIET, A. M.; TOAIMA, S. M.; ASAAD, A. M.; RADWAN, M. M. e EL-SEBAKH, N. A. Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 860-865, 2010.
- FAN, P.; HAY, A.; MARSTON, A. e HOSTETTMANN, K. Acetylcholinesterase-Inhibitory Activity of Linarin from *Buddlejadavidii*, Structure-Activity Relationships of Related Flavonoids, and Chemical Investigation of *Buddleja nitida*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 596–601, 2008.
- FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M. and WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.
- FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M. e SILVA, D. H. S. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, p. 723-726, 2008.

- GAO, H.; LUO, C.; WANG, L.; WANG, J.; ZHENG, B.; PENG, Y. e ZHOU, L. Preparative separation of 3-O-methylkaempferol from *Caragana leucophloea* by high-speed counter-current chromatography and its antimicrobial activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 2081-2087, 2012.
- GRAF, B. A., MILBURY, P. E., BLUMBERG, J. B., **Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence**, Journal of Medicinal Food, v. 8, p. 281–290, 2005.
- HARBONE, J. B e MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982. 744 p.
- HORIE, T.; TSUKAYAMA, M.; KAWAMURA, Y. e YAMAMOTO, S. 3,5-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavones and revised structures for some natural flavones. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1491-1495, 1988.
- INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T. e THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 261–264, 2003.
- JAUHARI, P. K.; SHARMA, S. C.; TANDON, J. S. and DHAR, M. M. A new flavonol glycoside from *rudbeckia bicolor*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 359-360, 1979.
- JOHNSON, N.; DAVIS, T. e BOSANQUET, N. The epidemic of Alzheimer's disease; how can we manage the costs? **Pharmacoeconomics**, v. 18, p. 215-223, 2000.
- LEE, E.; MOON, B.; PARK, Y.; HONG, S.; LEE, S.; LEE, Y. e LIM, Y. Effects of Hydroxy and Methoxy Substituents on NMR Data in Flavonols. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 29, p. 507-510, 2008.
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. e THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970. 354 p.
- MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; VARELA, R. M. e CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v. 45, p. 683-687, 1997.
- MARUYAMA, H.; SUMITOU, Y.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y. e HARA, H. Antihypertensive Effects of Flavonoids Isolated from Brazilian Green Propolis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1244-1250, 2009.

MOREIRA, A. V. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba* L.)**. São Paulo, 1999. Dissertação - (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Departamento de Nutrição, Universidade de São Paulo.

NUNES, X. P.; LIRA, D. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, D. A.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. Flavonas e Flavanonas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.

OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H. e FUKUYAMA, Y. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1728-1729, 2006.

PARK, C. H.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; LEE, S. Y.; CHOI, S. U.; LEE, J. H. e LEE, K. R. Phenolic Constituents of *Acorus gramineus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, p. 1289-1296, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. E VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4th Edition, Cengage Learning: Belmont, 2009.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C. e VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p. 3-14, 2011.

REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M. J.; PORTO, A. L. M. e LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1054–1058, 2007.

RODRIGUES, E.; MENDES, F. R. e NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to Central Nervous System disturbances: A bibliographical approach. **Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents**, v. 6, p. 211-244, 2006.

ROLLINGER, J. M.; HORNICK, A.; LANGER, T.; STUPPNER, H. E PRAST, H. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6248-6254, 2004.

SAWASDEE, P.; SABPHON, C.; SITTHIWONGWANIT, D. and KOKPOL, U. Anticholinesterase Activity of 7-Methoxyflavones Isolated from *Kaempferia parviflora*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1792–1794, 2009.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. e BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, p. 1119-1128, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. e KIEMLE, J. D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SUNG, S. H.; KANG, S. Y, LEE, K. Y.; PARK, M. J.; KIM, J. H.; PARK, J. H.; KIM, Y. C.; KIM, J. e KIM, Y. C. (+)- α -Viniferin, a Stilbene Trimer from *Caragana chamlague*, Inhibits Acetylcholinesterase. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 125-127, 2002.

TREVISAN, M. T. S. e MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.

WEI, X.; HUANG, H.; WU, P.; CAO, H. e YE, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1091–1096, 2004.

YUSUF, U. K.; ABDULLAH, N.; BAKAR, B.; ITAM, K.; ABDULLAH, F. e SUKARI, M. A. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 443–445, 2003.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Mimosa hostilis* BENTH

INTRODUÇÃO

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato (BENZIE, 1996).

O termo oxidação de uma substância era comumente definido como a incorporação de oxigênio em sua estrutura. Atualmente, pode ser mais precisamente definido como sendo a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons. Oxidação, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso pode ser considerado como redução (ALVES *et al.*, 2010).

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímico-fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer danos profundos em tecidos e patologias, manifestadas como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; HALLIWELL *et al.*, 1992). Além disso, os antioxidantes têm sido associados com a redução do risco de doenças crônicas, como por exemplo, diabetes, doença de Alzheimer e de Parkinson (KRINSKY, 1994).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e polifenóis. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA *et al.*, 2007).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados para esta finalidade são antioxidantes sintéticos como o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), *terc*-butilidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxitilfenona (THBP) e galato de propila (GP). Estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos (SOUSA *et al.*, 2007), como o aumento da formação de H₂O₂ nos microssomos, levando a alterações nas funções

hepáticas (ROSSING, KAHL e HILDEBRANDT, 1985). Estudos em animais evidenciaram que a exposição aguda e prolongada a antioxidantes sintéticos levou ao desenvolvimento de tumores de fígado, pâncreas e glândulas (HIROSE *et al.*, 1986), carcinogênese no estômago de ratos (ITO *et al.*, 1983) e adenomas e carcinomas em células hepáticas (WÜRTZEN e OLSEN, 1986). Considerando que o uso desses antioxidantes não é muito recomendado, a partir dos anos 80, deu-se início às pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos (BROINIZ *et al.*, 2007).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila).

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (HUANG *et al.*, 2005).

Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico, o método de radicais livres está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH (cor violeta) quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

O reino vegetal também constitui uma importante fonte de produtos naturais que possuem efeito antioxidante, e diferem amplamente em suas estruturas químicas e propriedades biológicas. As plantas podem conter grande variedade de moléculas sequestrantes de radicais livres, como compostos fenólicos. Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*

(HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Dentre os compostos fenólicos, se destacam os flavonoides, por possuírem alta reatividade com polímeros biológicos e capacidade de sequestrar radicais livres (ARGÔLO *et al.*, 2004).

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, no entanto, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu encontra-se entre as mais utilizadas (SOUSA *et al.*, 2007). O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (NACZK e SHAHIDI, 2004; IKAWA *et al.*, 2003).

A espécie *Mimosa hostilis* Benth, coletada na FLONA apresentou em seu extrato etanólico e frações alguns compostos fenólicos identificados por análise em CG-EM apresentado no Capítulo 2 e também flavonoides isolados como apresentado no Capítulo 3 que são classes conhecida por apresentarem atividade antioxidante, o que despertou o interesse em estudar os extratos etanólico da casca, folhas e galhos de *M. hostilis*, no intuito de quantificar os fenólicos totais e verificar a atividade antioxidante *in vitro* desses extratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas, cascas e galhos de *M. hostilis* foram coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A metodologia de coleta, identificação e preparo dos extratos etanólicos foram descritas no Capítulo 2.

Para determinação do teor de fenólicos totais foram usados reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio da marca Sigma. Foram utilizados para os teste antioxidantes padrões de α -tocoferol (Sigma) e BHT (Sigma) na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos foram diluído em etanol (Vetec)

As leituras de absorbâncias nos testes de DPPH e β -caroteno/ácido linoleico foram medidas em espectrofotômetro Bel Photonics SP 2000 UV em cubetas de poliestireno. As

leituras de UV realizadas em microplaca Tissue Culture Plates 96 well - BIOFIL no teste de DPPH em microdiluição foram obtidos em Espectrofotômetro de microplacas (BioTek).

DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras de extrato etanólico da casca, folhas e galhos de *M. hostilis* foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com algumas modificações (SOUSA *et al.*, 2007). Os extratos etanólicos foram dissolvidos em metanol para se obter concentrações de 50 a 150 µg/mL. Uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 5 mL de água destilada por 1 min. Passado este tempo 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. O volume da solução foi completado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm utilizando-se cubetas de quartzo, tendo como branco a água destilada e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 150 µg/mL) e expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extrato). A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi obtida em $\lambda = 760$ nm e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9996$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da capacidade sequestrante a ser determinada pelo método DPPH baseou-se no princípio de que o DPPH, sendo um radical livre estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula neutra, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela (MENSOR *et al.*, 2001).

A mistura reacional foi constituída pela adição de 500 µL dos padrões ou extratos de cascas, folhas ou galhos de *M. hostilis*, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, 3 mL de

etanol e 300 µL da solução de radical DPPH em etanol 0,5 mM e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi monitorada em espectrofotômetro UV-Vis (luz ultravioleta e visível) a 517 nm, no tempo inicial e em intervalos de 15 min durante 105 minutos. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume de etanol. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume do respectivo extrato. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade anti-radical (%AA) foi determinada segundo a equação demonstrada por Mensor *et al.* (2001).

$$\%AA = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

onde Abs: absorbância lida em 517 nm após o tempo (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 min) de reação.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI₅₀), também chamada de concentração eficiente (CE₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

Para a realização do teste com os extratos de cascas, folhas e galhos de *M. hostilis* para obter a CI₅₀, a atividade antioxidante foi determinada em microdiluição, adicionando-se em cada cavidade da microplaca 250 µL da solução de DPPH (40 µg/mL) e 50 µL de etanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções padrões (ácido gálico e quercetina) e as amostras a serem testadas (extrato ou flavonoide) nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 min de reação em espectrofotômetro de microplaca em $\lambda = 620$ nm e com incubação em ausência de luz a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). As análises foram realizadas em triplicatas. O %AA foi determinado usando a mesma fórmula descrita anteriormente e a CI₅₀ foi determinada usando o programa Microsoft Office Excel 2007, a partir de uma curva logarítmica cujo coeficiente de correlação (R^2) foi maior ou igual a 0,9, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) e na ordenada %AA.

Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico, foi realizada de acordo com o método de Emmons *et al.* (1999), com algumas modificações.

Foi preparado uma solução de β -caroteno 0,1 g/L em clorofórmio. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 3 mL e foi adicionado 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de *Tween* 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido foi redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoleico foram misturadas com 50 μ L dos extratos da casca, folhas ou galhos de *M. hostilis*, nas concentrações de 500 e 1000 μ g/mL, e incubadas em banho-maria a 50°C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro UV-Vis a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para a amostra controle utilizou-se solvente no lugar do extrato da planta. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 20 e 120 minutos usando a equação descrita por Emmons *et al.* (1999):

$$AA = (DR_C - DR_S)/DR_C \times 100$$

onde DR_C representa a taxa de degradação da amostra controle ($=\ln(a/b)/t$); DR_S a taxa de degradação da amostra contendo a substância teste ($=\ln(a/b)/t$); a absorvância inicial no tempo 0 e b a absorvância final de reação em 470 nm e t o tempo final de reação (20, 40, 60, 80, 100 e 120 min). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Estudo cinético da atividade antioxidante no sistema da co-oxidação do β -caroteno /ácido linoleico

A eficiência da atividade antioxidante dos extratos foi estimada a partir da relação entre a tangente das curvas cinéticas do extrato e do controle (sem adição de antioxidante), em dois intervalos da curva, entre 20 e 60 minutos (F1) e entre 80 e 120 minutos (F2), conforme expressão abaixo, segundo metodologia descrita por Moreira (1999) e descrito por Yanishlieva e Marinova (1995).

$$F1 = \frac{\text{tangente do extrato}_{(20-60)}}{\text{tangente do controle}_{(20-60)}}$$

$$F2 = \frac{\text{tangente do extrato}_{(80-120)}}{\text{tangente do controle}_{(80-120)}}$$

Na primeira parte da curva (entre 20 e 60 minutos após o início da reação) foi medida a eficiência do antioxidante de bloquear a reação em cadeia através da interação com os radicais peróxido. Os valores obtidos foram denominados fator 1 (F1). Na segunda parte da curva (entre 80 e 120 minutos após o início da reação) foi medida a possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo. Os valores encontrados foram denominados de fator 2 (F2). Os resultados obtidos referentes à F1 e F2 podem apresentar valores maiores ou menores que 1. Se o resultado for superior a 1, então o antioxidante passa a exercer um efeito contrário, ou seja, pró-oxidante, contribuindo para as reações oxidativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato bruto, estão apresentados na Figura 1.

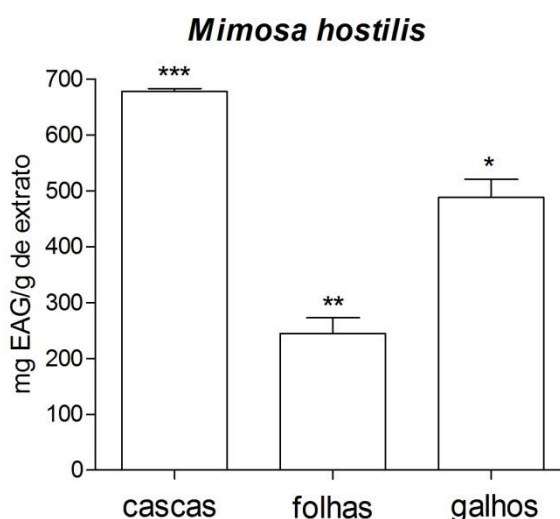


Figura 1. Teor de Fenólicos totais dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *Mimosa hostilis* obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. As análises foram feitas em triplicata. Para análise estatística foi utilizado ANOVA (um fator) seguido do teste Bonferroni, nível de significância 5%. *Apresentou diferença estatística comparado aos demais grupos ($p < 0,05$)

Os extratos avaliados apresentaram altos teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies de *Mimosa* descritos na literatura como as folhas de *M. tenuiflora* (BARROSO *et al.*, 2009) e *M. caesalpiniaefolia* (MONÇÃO *et al.*, 2011), com teores de FT de 155,7 e 308,6 mg EAG/g do extrato, respectivamente. Observando estatisticamente, o menor teor de FT foi determinado no extrato etanólico das folhas de *M. hostilis* (272,33±6,13 mg EAG/g do extrato), sendo que o extrato etanólico dos galhos apresentou teor intermediário (455,50±7,78) e o maior teor no extrato da casca (678,00±9,17) ($p < 0,05$), provavelmente devido a grande quantidade de taninos presente nas cascas descrito anteriormente (GUIMARÃES-BEELEN *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são conhecidos por possuírem alto potencial de atividade antioxidante, que se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN *et al.*, 2005)

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, com menores efeitos adversos, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA *et al.*, 2007). Além de alimentos já conhecidos que possuem antioxidantes, como frutas e verduras, vem se acentuando a procura de espécies vegetais que possuem esta atividade (ESTEVAM, 2006).

Dentre as metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, sendo o radical livre DPPH um dos mais utilizados. O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda 517 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intenso. À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes doadores de hidrogênio presentes na solução teste, seu elétron torna-se emparelhado, a absorvidade desaparece e observa-se mudança da coloração da solução original para amarelo, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert-Beer, podendo ser medida espectrometricamente. Também permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, ou seja, independe da polaridade do substrato, pois a lipofilicidade e

hidrofilicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH (ANDRADE *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2009; CARPES *et al.*, 2008).

Foram escolhidos como controle, o antioxidante sintético BHT e o antioxidante natural α -tocoferol, pois essas substâncias reagem de forma particular com o DPPH, implicando em uma cinética diferenciada. O BHT reage lentamente e o α -tocoferol possui cinética intermediária, com reações entre 5 e 30 min (CARPES *et al.*, 2008). As amostras foram usadas em concentrações altas (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) comparado aos padrões (90 $\mu\text{g/mL}$), pois o objetivo principal deste teste inicial era avaliar se havia ou não a atividade antioxidante nos extratos brutos.

Os extratos de cascas e galhos nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ e folhas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ não diferenciam na atividade antioxidante entre si ($p > 0,05$) e foram similares à atividade do α -tocoferol ($p > 0,05$) e superior ao padrão BHT. Apenas o extrato das folhas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença significativa tendo atividade antioxidante superior aos padrões e demais extratos testados (Tabela 1). Todos os extratos testados apresentaram cinética rápida atingindo praticamente o máximo de consumo do DPPH no primeiro minuto de forma semelhante ao α -tocoferol.

Tabela 1. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da casca, folhas e galhos de *Mimosa hostilis*.

<i>Mimosa hostilis</i>				
Concentração	500 $\mu\text{g/mL}$		1000 $\mu\text{g/mL}$	
Tempo	15 min	105 min	15 min	105 min
Cascas	90,52 \pm 0,96% ^b	90,72 \pm 1,08% ^b	91,07 \pm 0,88% ^b	90,84 \pm 0,90% ^b
Folhas	90,62 \pm 1,26% ^b	90,97 \pm 1,48% ^b	94,48 \pm 1,00% ^c	94,52 \pm 1,27% ^c
Galhos	90,39 \pm 0,69% ^b	89,15 \pm 1,26% ^b	91,10 \pm 2,17% ^b	91,93 \pm 1,75% ^b
Padrões				
Concentração 90 $\mu\text{g/ml}$				
Tempo	15 min		105 min	
BHT	45.37 \pm 2.63 % ^a		85.82 \pm 0.75 % ^a	
α -tocoferol	91.07 \pm 0.68 % ^b		90.78 \pm 0.17 % ^b	

^a Valores representados como média \pm DP (n=3) da porcentagem de sequestro do radical livre DPPH das triplicatas realizadas. Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores de BHT, α -tocoferol e extratos brutos etanólicos em um dos períodos (15 ou 105 minutos), $p < 0,05$ (análise de variância de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni).

O resultado do teste realizado em microplaca pra calcular o CI_{50} , usando baixas concentrações, pode ser observado na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre a atividade antioxidante dos extratos da casca, galhos e os padrões de quercetina e ácido gálico usados, indicando que os extratos possuem bons agentes antioxidantes, podendo ser justificado pelo alto teor de fenólicos totais em relação ao extrato de folhas que apresentou a menor atividade neste teste.

Tabela 2. Concentração capaz de inibir 50% de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da casca, folhas e galhos de *Mimosa hostilis*.

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Cascas	26,64 \pm 1,64 ^a
Galhos	38,79 \pm 7,14 ^a
Folhas	192,08 \pm 26,63 ^b
Quercetina	45,70 \pm 1,61 ^a
Ácido gálico	24,92 \pm 0,57 ^a

^a Valores representados como média \pm DP (n=3) da concentração capaz de inibir 50% do DPPH das triplicatas realizadas. Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores de quercetina e ácido gálico), $p < 0,05$ (ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni). CI_{50} =Concentração inibitória; DP=Desvio padrão

No entanto, esses resultados se alteraram quando houve um aumento (aproximadamente de 5 a 10 vezes) da concentração testada, sendo o extrato das folhas a melhor atividade antioxidante. Possivelmente, o aumento da concentração total do extrato levou ao aumento da concentração de outros compostos que possuem atividade antioxidante e não foram quantificados no teste de fenólicos por pertencerem a outras classes.

Quando se analisa a relação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, percebe-se muitas vezes que a literatura é contraditória. Muitos autores encontraram uma correlação positiva entre os compostos fenólicos e/ou flavonoides e o potencial antioxidante de uma grande variedade de produtos alimentícios, enquanto outros relataram uma correlação muito fraca entre atividade antioxidante e compostos fenólicos (CARPES *et al.*, 2008).

Os extratos etanólicos da casca, galho e folha de *M. hostilis* também foram avaliados em relação à capacidade antioxidante de interferir na oxidação do β -caroteno provocado pelo ácido linoleico. Optar por diferentes testes para a avaliação da atividade antioxidante é importante para a obtenção de resposta mais precisa sobre a interação dos compostos presentes na amostra com os diferentes radicais gerados durante a reação (ROBARDS *et al.*,

1999). Se compostos polares forem testados apenas pelo método do β -caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos (CARPES *et al.*, 2008).

Os extratos foram usados nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os padrões foram utilizados na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos no tempo inicial (20 min) e no final do experimento (120 min) podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos etanólicos da casca, folha e galho de *Mimosa hostilis*.

<i>Mimosa hostilis</i> Benth				
Concentração	500 $\mu\text{g/mL}$		1000 $\mu\text{g/mL}$	
Tempo	20 min	120 min	20 min	120 min
Casca	85,85 \pm 2,04% ^{ad}	76,66 \pm 4,14% ^{ce}	93,45 \pm 2,25% ^c	86,47 \pm 2,57% ^{be}
Folha	81,15 \pm 3,74% ^{bd}	67,12 \pm 1,27% ^d	91,68 \pm 0,18% ^{ac}	91,43 \pm 2,28% ^{ab}
Galho	92,50 \pm 2,96% ^{ac}	71,24 \pm 4,05% ^{cd}	94,44 \pm 3,57% ^c	80,80 \pm 4,03% ^e
Padrões				
Concentração 90 $\mu\text{g/ml}$				
Tempo	20 min		120 min	
BHT	91,39 \pm 0.01 % ^{ac}		98,76 \pm 0.01 % ^a	
α -tocoferol	75,33 \pm 0.09 % ^b		87,83 \pm 0.05 % ^{be}	

^a Os valores são representados como média \pm D.P. de triplicatas. Valores seguidos pela mesma letra não compartilhou diferenças significativas em $p < 0,05$ (análise de variância de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni).

O extrato das folhas em concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi o extrato que manteve a melhor coloração do β -caroteno e conseqüentemente, apresentou a melhor atividade antioxidante, semelhante ao padrão de BHT ($p < 0,05$), o controle com a melhor atividade antioxidante para esse teste.

Observou-se com os resultados que todos os extratos testados apresentaram uma diminuição da atividade antioxidante, ao contrário do observado com os padrões. Esse comportamento ocorreu durante todo o tempo do experimento e para melhor entender o mecanismo de ação das substâncias presentes nos extratos de cascas, folhas e galhos de *M. hostilis*, foram construídas curvas cinéticas da inibição da oxidação no sistema modelo da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico no tempo 20, 40 60, 80, 100 e 120 minutos. Os fatores cinéticos Fator F1 (estabilização) e o Fator F2 (proteção) apresentados na Tabela 4 foram calculados a partir das tangentes obtidas com base na curva cinética.

Tabela 4. Fatores cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico pelos extratos etanólicos de *Mimosa hostilis*.

<i>Mimosa hostilis</i>		
Amostras	F1	F2
BHT 90 $\mu\text{g/mL}$	0,05 \pm 0,03	0,27 \pm 0,07
α-tocoferol 90 $\mu\text{g/mL}$	0,25 \pm 0,12	1,67 \pm 0,54
casca 500 $\mu\text{g/mL}$	0,59 \pm 0,07	2,67 \pm 0,58
casca 1000 $\mu\text{g/mL}$	0,45 \pm 0,09	1,89 \pm 1,02
folhas 500 $\mu\text{g/mL}$	0,75 \pm 0,10	1,92 \pm 2,48
folhas 1000 $\mu\text{g/mL}$	0,19 \pm 0,11	1,89 \pm 0,69
galhos 500 $\mu\text{g/mL}$	0,78 \pm 0,19	7,22 \pm 1,39
galhos 1000 $\mu\text{g/mL}$	0,47 \pm 0,10	2,56 \pm 0,77

F1 < 1, indica que os antioxidantes são capazes de inibir os radicais livres durante o período de indução; F2 < 1, indica que os antioxidantes podem regenerar o radical antioxidante formado; e F1 e F2 \geq 1 indicam atividade pró-oxidante.

Segundo Yanishlieva e Marinova (1995), o F1 representa a efetividade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia, ocasionadas pelos radicais livres na etapa de iniciação da oxidação; e o F2 representa a possibilidade do antioxidante de participar de reações em uma etapa mais adiantada do processo da reação de oxidação, como a decomposição de hidroperóxidos e estabilização de compostos formados ao longo do processo de oxidação. Quanto menor o valor de F1, mais eficientes são as substâncias da amostra em retardar ou inibir o processo oxidativo. O valor de F2 tende a ser maior que o do F1, porém para o desempenho do antioxidante ser satisfatório este valor não deve ser superior a 1.

A partir da análise dos fatores F1 e F2, observa-se um comportamento cinético antioxidante relevante para os três extratos etanólicos, em ambas concentrações testadas (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), significando que os compostos antioxidantes presentes nesses extratos são bons sequestradores de radicais livres, assim como os controles BHT e α -tocoferol. Assim, através da cinética verifica-se que os compostos ali presentes, por demonstrarem valores de F1 < 1, possuem a capacidade de bloquear o início da reação de oxidação, sendo classificados como sendo do tipo I, ou seja, bons bloqueadores de reações oxidativas (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Para a fase de propagação, verificada pelos valores de F2, todos os extratos testados não demonstraram eficiência antioxidante, atingindo valores superiores a 1.

A atividade antioxidante determinada pelo teste de sequestro do radical DPPH difere da atividade determinada pelo método de descoloração do β -caroteno quanto ao mecanismo de

ação antioxidante avaliado. Além disso, estas diferenças podem estar relacionadas com o fato de que em sistemas lipofílicos as taxas de reações de sequestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos entre as fases aquosa e lipídica e, desta forma, reduzir a disponibilidade dos compostos polares para reação com o radical não polar do ácido linoleico (RICE-EVANS, NICHOLAS e PAGANGA, 1996).

Outras espécies do gênero *Mimosa* como *M. paraibana* (NUNES *et al.*, 2008), *M. pudica*, *M. rubicaulis* (GENEST *et al.*, 2008) e *M. ophtalmocentra* (DAVID *et al.*, 2007) também foram relatadas por apresentarem atividade antioxidante isso se deve provavelmente a presença de compostos fenólicos e taninos.

CONCLUSÃO

A espécie *M. hostilis* pode ser considerada uma promissora fonte de agentes antioxidantes, devido ao elevado teor de compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante. Mais estudos são necessários a fim de esclarecer quais são as substâncias responsáveis pelos efeitos antioxidantes e qual o mecanismo de ação dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V. e AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. e KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 231-235, 2007.

ARGÔLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 229-233, 2004.

BARROSO, N. D.; MACHADO, L. K. A.; CAVALCANTE, L. B.; DIAS, P. M. D.; SILVA, D. P.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M. Teor de antocianinas, fenóis totais e potencial antioxidante de plantas do nordeste brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

QUÍMICA, 49, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: CBQ, 2009.
<http://www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/7/7-393-5862.htm>

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 902-908, 2007.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M. e ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M. e MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, p. 1660-1664, 2008.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P. e GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215–218, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 446-452, 2006.

EMMONS, R. B.; DUNCAN, D.; ESTES, P. A.; KIEFEL, P.; MOSHER, J. T.; SONNENFELD, M.; WARD, M. P.; DUNCAN, I.; CREWS, S. T. The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. **Development**, v. 126, p. 3937-3945, 1999.

ESTEVAM, C. S. **Estudo fitoquímica biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 198f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2006.

GENEST, S.; KERR, C.; ANKIT, S.; RAHMAN, M. M.; SAIF-E-NASER, G. M. M.; NIGAM, P.; NAHAR, L. e SARKER, S. D. Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, p. 38-43, 2008.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R.; ARAÚJO FILHO, J.; OLIVEIRA, S. G. Characterization of condensed tannins from native legumes of the brazilian northeastern semi-arid. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 522-528, 2006.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R. e BEELEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 910-917, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. e CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: were are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; INOVE, K. e ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer letters**, v. 30, p. 169-174, 1986.

HUANG, D.; OU, B. e PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A. e SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, p. 343-352, 1983.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

MENSOR L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 27-30, 2001.

MONÇÃO, N. B. N.; ARAÚJO, B. Q.; LOPES JÚNIOR, C. A.; LOPES, J. A. D. e CITÓ, A. M. G. L. Composição química, fenóis totais, flavonóides totais e atividade antioxidante de frutos de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34, 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBQ, 2011. <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T1314-2.pdf>

MOREIRA, A. V. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba* L.)**. São Paulo, 1999. Dissertação - (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Departamento de Nutrição, Universidade de São Paulo.

NACZK, M. e SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M. e AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod ed., 1968. 254 p.

RICE-EVANS, C. A.; NICHOLAS, J. M. e PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P. e GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROSSING, D.; KAHL, R. e HILDEBRANDT, A. G. Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. **Toxicology**, v. 34, p. 67-77, 1985.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S. e CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

WÜRTZEN, G.; OLSEN, P. Chronic study on BHT in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 1121-1125, 1986.

YANISHILIEVA, N. V. I.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, p. 377-382, 1995.

CAPÍTULO 5

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *M. hostilis* BENTH

INTRODUÇÃO

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3000 anos atrás, quando os médicos chineses usavam bolores para tratar tumores inflamatórios e feridas infeccionadas. O valor dos bolores possivelmente se devia à ação de antibióticos produzidos pelos fungos neles presentes, desconhecidos naquela época. As causas de doenças provocadas por microrganismos só começaram a ser descobertas a partir de 1878, graças aos trabalhos de Pasteur e Koch, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades do homem e de outros animais (TAVARES, 1996).

A época áurea da terapia antimicrobiana iniciou-se em 1941. Desde então inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos fármacos. Daí a grande importância da pesquisa por novas substâncias com poder bactericida ou bacteriostático (FALCÃO *et al.*, 2002).

Uma das medidas utilizadas na batalha contra a resistência bacteriana é a modificação dos antibióticos em uso; no entanto, pouco sucesso tem sido obtido. Por esses motivos, a descoberta de novas moléculas, de fonte natural, com atividade antimicrobiana é assunto de máxima urgência. A diversidade de moléculas encontradas em plantas faz das mesmas promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos. Substância antimicrobiana de origem vegetal não é um fato recente, mas teve um impulso significativo na década de 30 (TAVARES, 1996).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos. Apesar da rica biodiversidade, até 2006 somente estavam disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Além disso, a maioria dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

As bactérias usadas no experimento foram as Gram positivas *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (endocardite e septicemia), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (infecções urinárias, endocardite), que possuem membrana plasmática compostas por aproximadamente 90% de peptidoglicanos e as Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 (diarreias) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (infecções hospitalares), principais patógenos responsáveis por doenças de grande prevalência no Brasil. (TRABULSI *et al.*, 1999).

A bactéria *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal, tornando-se patogênico em localizações extra intestinal ou mesmo intestinal, podendo causar infecções urinárias, meningites, septicemia e outros tipos de infecções (SARTORI, 2005). A outra bactéria Gram negativa testada *Pseudomonas aeruginosa* habita solo, água e vegetais, podendo ser normalmente encontrada também na pele, fezes e garganta. Este microrganismo causa infecções tipicamente oportunistas, em queimaduras e processos cirúrgicos como cateterização levando a infecção urinária, e intubação, levando a infecção pulmonar, podendo resultar em bacteremias severas. (SARTORI, 2005).

A bactéria Gram positiva *Enterococcus faecalis* é um importante patógeno que habita o trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos, sendo especialmente responsável pelas infecções nosocomiais. O que torna *E. faecalis* um risco, é a capacidade desta bactéria de sobreviver sob qualquer condição, incluindo alterações de temperatura e ambiente. Sempre que a maioria das bactérias não pode sobreviver em um ambiente alcalino ou ácido, ela é capaz de adaptar-se e prosperar (AARESTRUP *et al.*, 1996; MURRAY, 1990; SCHABERG, CULVER e GAYNES, 1991).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que se apresenta na forma de cocos Gram positivos. Está presente no ar e na pele, mucosa, trato respiratório e gastrointestinal (HERCEG e PETERSON, 1990; JAY, 1994). Geralmente está envolvida em infecções piogênicas humanas tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele (foliculites, furunculose, impetigo, pústulas ou abscessos cutâneos) ou em regiões mais profundas (osteomielites, bacteremias, endocardite, pneumonia e toxinfecções alimentares) (SARTORI, 2005).

No campo da Odontologia existe uma busca por substâncias com atividade antimicrobiana biocompatíveis, especialmente, dentre aquelas que entrarão em contato direto

com os tecidos, entre eles o tecido pulpar e o periapica. O biofilme dental, conhecido anteriormente como placa bacteriana, é considerado o fator de maior importância dentro da etiologia das doenças bucais, como cáries, gengivites e periodontites, tendo uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente. A formação do biofilme dental ocorre através de um processo ordenado e dinâmico onde há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes. A aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental. Inúmeras substâncias químicas, destacando-se as de origem vegetal, vêm sendo pesquisadas, com o objetivo de inibir a formação e a progressão do biofilme dental (ALVES *et al.*, 2008).

O *Streptococcus mutans* tem sido considerado como um agente microbiano importante na patogênese de cárie dentária e são comumente encontrados na placa dental humana, embora outros microrganismos acidogênicos também podem estar envolvidos, como por exemplo, o *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces viscosus* (MURATA *et al.*, 2008). A capacidade dos *Streptococcus mutans* a aderir e acumular sobre a superfície do dente, através da síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, juntamente com as suas propriedades e acidogênicas são fatores de virulência principais envolvidos no desenvolvimento da placa dental patogênico relacionado a cárie (YATSUDA *et al.*, 2005).

Devido à atividade metabólica especial, os vegetais superiores como a *Mimosa hostilis* são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (GOTLIEB, 1981). Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem terpenoides, óleos essenciais, alcaloides, lectinas, polipeptídios, fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis, flavonoides, taninos e cumarinas (GONÇALVES *et al.*, 2005).

Os capítulos 1, 2 e 3 mostram que a espécie *Mimosa hostilis* apresenta em sua composição principalmente flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos e terpenoides o que levou a realização do estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos etanólicos da casca e folhas e suas respectivas frações de *M. hostilis*, incluindo a capacidade de inibir a aderência de patógenos e de formar biofilmes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cascas e folhas de *M. hostilis* foram coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A metodologia de coleta, identificação, preparo dos extratos e frações foram descritas no Capítulo 2.

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As análises de CIM foram realizadas por microdiluição. As suspensões bacterianas foram inoculadas em proporção 1:1000 do meio BHI (*Brain Heart Infusion*), de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Após a homogeneização, foi colocado um volume de 190 μ L do inóculo e 10 μ L dos extratos brutos e frações obtidas de *M. hostilis*, com as concentrações finais variando entre 31,25 a 1000 μ g/mL, com diluição seriada em razão 2. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa em condições pré-estabelecidas para cada microrganismo. A CIM foi considerada a menor faixa de concentração dos extratos que inibiu completamente o crescimento bacteriológico visível, sendo confirmada a inibição com o corante resazurina (YATSUDA *et al.*, 2005). A resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resorufin, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida (ROLÓN *et al.*, 2006).

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BHI ágar. Uma alíquota de 20 µL das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas BHI ágar. A CBM foi a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar (YATSUDA *et al.*, 2005).

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIPLACA E ANTICÁRIE

Inibição da Aderência Celular de Estreptococos do grupo *mutans* e *sobrinus* à superfície

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) celular de estreptococos do grupo *mutans* foi realizada em microdiluição em placas de cultura de células de 96 poços. As suspensões bacterianas de *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715 foram inoculados em proporção 1:1000 do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^8$ ufc/mL, com adição de 1% de sacarose. Após a homogeneização, foi colocado um volume de 190 µL do inóculo e 10 µL dos extratos de *M. hostilis*, com as concentrações finais variando entre 3,90 a 1000 µg/mL, com diluição seriada de razão 2, em concentrações sub-CIM. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de CO₂, 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi feita a lavagem das placas para remoção das células não aderidas e coradas com cristal de violeta 0,1%. A leitura foi feita visualmente, considerando a concentração inibitória da aderência celular desses microrganismos, a menor concentração dos extratos em que não houve aderência revelada pelo corante (CURRAN *et al.* 1998; KOO *et al.*, 2002; YATSUDA *et al.*, 2005).

Análise dos extratos sobre os Biofilmes.

Biofilmes de *S. mutans* UA 159 foram cultivados em *low molecular weight* (LMW) na presença de 1% de sacarose. Os biofilmes foram formados por 5 dias sobre discos de hidroxiapatita havendo trocas diárias por novo meio de cultura, sendo os biofilmes expostos

ao tratamento (1 min) duas vezes ao dia (11 am e 4 pm) até o 4º dia. O tratamento foi realizado com: 1) extrato das folhas 6,25 mg/mL, 2) etanol 10% (v/v) – controle negativo. Após o segundo tratamento, os biofilmes foram mantidos intactos por 18 h a 37° C e 5% CO₂. Este procedimento experimental foi conduzido no 2º, 3º e 4º dia, sendo os biofilmes removidos no 5º dia para as análises bioquímicas. Os biofilmes foram analisados quanto à viabilidade bacteriana (ufc/mL), biomassa (determinação do peso seco), polissacarídeos solúveis em água, solúveis em álcalis e insolúveis (BELLI, BUCKLEY e MARQUIS, 1995; KOO *et al.*, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A necessidade de encontrar novas drogas eficazes no combate microbiano tem aumentado a cada dia e estimulado a busca de novos compostos naturais com atividades biológicas. A espécie *M. hostilis* foi escolhida por ser bem adaptada e por isso abundante na região do semiárido da Bahia e ser usada como planta medicinal pela população local, além de apresentar compostos com atividade antimicrobiana (DUARTE *et al.*, 2008).

Os extratos brutos da casca e folhas, e as frações desses extratos preparados com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *M. hostilis* foram analisados por meio dos ensaios quantitativos para avaliar a menor concentração que consegue inibir o crescimento bacteriano (CIM) e provocar danos irreversíveis a bactéria (CBM). Estes métodos podem ser usados tanto para amostras hidrossolúveis como lipossolúveis (RIOS *et al.*, 1988).

Como não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, é aceita a classificação para materiais vegetais, principalmente extratos, com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL (ALIGIANIS *et al.*, 2001; DUARTE, 2006).

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *M. hostilis* foi avaliada *in vitro* contra os principais patógenos que acometem humanos. Os resultados da CIM e CBM encontrados nos extratos etanólico obtidos da casca e das folhas de *M. hostilis* estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico da casca e folha de *Mimosa hostilis* pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

MICROORGANISMO	TESTE	Cascas	Folhas
<i>S. mutans</i> UA159	CIM*	125	31,25
	CBM*	500	62,5
<i>S. mutans</i> Ingbritt 1600	CIM*	250	125
	CBM*	#	250
<i>S. sobrinus</i> 6715	CIM*	#	#
	CBM*	#	#
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIM*	250	62,5
	CBM*	500	#
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM*	#	#
	CBM*	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM*	1000	#
	CBM*	#	#
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	CIM*	#	500
	CBM*	#	#

*Os testes foram realizados em três triplicatas. Valores expressos em µg/mL.

as amostras não apresentaram atividades nas concentrações testadas

O extrato etanólico da casca de *M. hostilis* apresentou forte inibição antimicrobiana para as bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600 e *S. aureus* ATCC 25923 e inibição moderada para *E. coli* ATCC25922. A atividade bactericida foi observada apenas para *S. mutans* UA159 e *S. aureus*. As mesmas bactérias foram usadas para testar a atividade do extrato etanólico das folhas de *M. hostilis* com forte inibição para as cepas de *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 10145. Para as duas cepas de *S. mutans* testadas os extrato das folhas apresentou atividade bactericida.

Como houve uma ação inibitória forte para a maioria das bactérias testadas, não apresentando atividades nas concentrações testadas apenas para as cepas de *S. sobrinus* e *E. faecalis*, foi realizado testes de CIM e CBM com as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de folhas e cascas de *M. hostilis* com o objetivo de verificar quais grupos de substâncias apresentam melhor atividade. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana das frações em hexano-H, diclorometano-D, acetato de etila-A e butanol-B de cascas e folhas de *Mimosa hostilis* pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

MICRORGANISMO	TESTE	FRAÇÕES DA CASCA				FRAÇÕES DAS FOLHAS			
		H	D	A	B	H	D	A	B
<i>S. mutans</i> UA159	CIM*	1000	31,25	62,5	62,5	125	31,25	125	250
	CBM*	#	125	500	#	#	31,25	250	#
<i>S. mutans</i> Ingbritt 1600	CIM*	1000	500	62,5	#	500	31,25	#	#
	CBM*	1000	1000	250	#	500	250	#	#
<i>S. sobrinus</i> 6715	CIM*	#	#	#	#	#	31,25	1000	500
	CBM*	#	#	#	#	#	500	#	#
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIM*	31,25	125	125	#	250	62,5	250	#
	CBM*	1000	250	250	#	#	500	1000	#
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM*	#	#	#	#	#	500	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#	#	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM*	#	#	62,5	#	#	#	250	#
	CBM*	#	#	1000	#	#	#	1000	#
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	CIM*	1000	#	62,5	#	#	500	500	#
	CBM*	#	#	1000	#	#	#	#	#

*Os testes foram realizados em três triplicatas. Valores expressos em µg/mL.

as amostras não apresentaram atividades nas concentrações testadas

Dos testes realizados com os extratos etanólicos da casca e folhas de *M. hostilis*, apenas o extrato da casca apresentou inibição moderada de 1000 µg/mL nas concentrações testadas para *E. Coli*. No entanto, a fração em acetato de etila, tanto da casca quanto das folhas apresentou forte inibição do crescimento bacteriano e ainda apresentou atividade bactericida. Isso ocorre, provavelmente devido à presença de algumas substâncias polares como flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998), em maior concentração nesta fração, que a torna ativa. A análise desta fração por CG-EM identificou alguns compostos fenólicos como os ácidos 2-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzóico, 2,4-di-hidroxibenzóico, 3,4-di-hidroxibenzóico, 3,4,5-tri-hidroxibenzóico e 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila mas por ser uma fração polar não foi possível identificar todas as substâncias presentes e responsáveis pela atividade bacteriana. Já foram relatados na literatura outras espécies do gênero *Mimosa* que apresentaram atividade frente a *E. coli* como por exemplo *M. tenuiflora* (SOUZA *et al*, 2008), *M. pigra* (ROSADO-VALLADO *et al*, 2000), *M. hamata* (HUSSAIN *et al*, 1979), *M. pudica* (GENEST *et al*, 2008). A espécie *M. rubicaulis* foi testada, mas que não apresentou atividade (GENEST *et al*, 2008).

A *P. aeruginosa* que é naturalmente resistente aos antimicrobianos betalactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol e clotrimoxazol (SIQUEIRA, 2002) e apresentou sensibilidade às frações em hexano e acetato de etila da casca de *M. hostilis* tendo forte inibição em acetato de

etila e ainda apresentando efeito bactericida. As folhas não apresentaram efeito bactericida, porém, apresentaram forte inibição pra o extrato etanólico e as frações em diclorometano e acetato de etila. Outras espécies do gênero *Mimosa* como *M. tenuiflora* (SOUZA *et al*, 2008), *M. pigra* (ROSADO-VALLADO *et al*, 2000), *M. pudica* e *M. rubicaulis* (GENEST *et al*, 2008) foram testadas anteriormente e destas, apenas *M. rubicaulis* não apresentou atividade.

O extrato e frações da casca de *M. hostilis* não apresentou nenhum efeito nas concentrações testadas frente a *E faecalis* e apenas a fração em diclorometano das folhas apresentou forte inibição bacteriostática na concentração de 500 µg/mL. Em estudos anteriores com plantas do gênero *Mimosa*, o extrato metanólico dos galhos de *M. rubicaulis* pelo método de difusão de Agar, apresentou inibição moderada com CIM de 1 mg/mL (KHAN *et al.*, 2011).

S. aureus se mostrou sensível aos extratos e frações da casca e folha de *M. hostilis*, apenas a fração em butanol não mostrou nenhuma atividade nas concentrações testadas. As cascas e a fração em diclorometano e acetato de etila apresentaram efeito bacteriostático e bactericida.

Observa-se que o extrato da casca de *M. hostilis* apresentou atividade antimicrobiana de forma seletiva, ou seja, atividade inibitória somente para os microrganismos *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aeruginosa*, sendo que o extrato ou frações das folhas foram capazes de inibir o crescimento de todas as cepas testadas. Essa atividade antimicrobiana diferente entre as partes testadas indica uma distribuição diferente dos compostos bioativos nas mesmas, o que é comum ocorrerem em plantas, assim como existem diferenças entre as composições químicas das plantas, em decorrência dos locais e épocas do ano da coleta das espécies vegetais.

As bactérias do grupo *mutans*, envolvidas na formação e desenvolvimento de cárie dentária, apresentaram sensibilidade aos extratos e frações de *M. hostilis*. Para a bactéria *S. sobrinus* apenas as frações polares das folhas apresentaram atividade, enquanto a mesma apresentou resistência aos extratos brutos e frações da casca, *S. mutans* Ingbritt foi sensível aos extratos e frações testadas, sendo que apenas o extrato etanólico e as frações apolares em hexano e diclorometano apresentaram atividade frente *S. mutans* Ingbritt 1600. Foi observado que para a bactéria *Streptococcus mutans* UA159 todos os extratos e frações testados apresentaram atividade antimicrobiana, com resultados bastante consideráveis, o que direcionou o estudo antimicrobiano a busca de atividade antiplaca e anticárie.

Assim, uma das estratégias para prevenir a formação e desenvolvimento de cárie dentária é controlar o crescimento e a adesão dessas bactérias, a formação da placa dental, por isso, além dos testes de CIM e CBM com as bactérias do grupo *mutans*, foi também realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) de *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sobrinus* 6715 (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e folha e suas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila de *Mimosa hostilis* pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência Celular (CIMA).

	<i>Streptococcus mutans</i> UA159		<i>Streptococcus sobrinus</i> 6715	
	CIM*	CIMA*	CIM*	CIMA*
Cascas de <i>M. hostilis</i>				
Extrato em etanol	125	#	#	#
Fração em hexano	1000	62,5	#	#
Fração em diclorometano	31,25	1000	#	#
Fração em acetato de etila	62,5	#	#	#
Folhas de <i>M. hostilis</i>				
Extrato em etanol	31,25	15,62	#	#
Fração em hexano	125	31,25	#	#
Fração em diclorometano	31,25	250	31,25	1000
Fração em acetato de etila	125	31,25	1000	#

*Os testes foram realizados em três triplicatas. Valores expressos em µg/mL.

as amostras não apresentaram atividades nas concentrações testadas

As frações em hexano e diclorometano das folhas apresentaram inibição de aderência. As cascas não apresentaram atividade para *S. sobrinus* 6715. Extratos da casca e folhas apresentaram atividade de CIMA para *S. mutans* UA159. Uma possível explicação da ação dos extratos vegetais está no fato de que vários fatores estão associados ao processo de adesão das bactérias às superfícies dentais, dentre estes, a interação de proteínas, adesinas, lectinas e interações hidrofóbica (PEREIRA *et al.*, 2006). Desta forma, a interferência com a adesão bacteriana nas superfícies dos dentes pode ser um caminho para se obter o controle do biofilme dental, e conseqüentemente prevenir a instalação de patologias orais, sendo esta uma indicação para a utilização de produtos naturais. Como os extratos etanólicos da casca e folha inibiram a aderência de *S. mutans* UA159, foi testado se havia atividade também sobre o biofilme formado, ainda como estratégia para testar a *M. hostilis* como anticárie.

O biofilme dental tem sido definido como um depósito não calcificado, constituído de microrganismos, células epiteliais descamadas, detritos alimentares e macromoléculas sintetizadas por bactérias proliferantes, que se aderem à película adquirida ou diretamente sobre a superfície do dente (LINDHE, 1992). Se o biofilme dental é mantido nas superfícies

dos dentes e exposto à carboidratos (principalmente sacarose) com frequência na dieta, *S. mutans* como membro da comunidade do biofilme, continuará a sintetizar polissacarídeos e a metabolizar os açúcares em ácidos orgânicos. As elevadas quantidades de polissacarídeos extracelulares (EPS) aumentam a estabilidade e a integridade estrutural do biofilme, e fornece proteção às bactérias contra influências hostis de agentes antimicrobianos e outras agressões ambientais (PAES LEME *et al.*, 2006). Portanto, o uso de agentes antimicrobianos para controlar a colonização e o acúmulo de bactérias cariogênicas na superfície do dente é uma abordagem lógica para evitar esta doença oral comum.

Foi avaliada a capacidade do extrato das folhas de *M. hostilis* na inibição da formação em discos de hidroxiapatita do biofilme dental de *S. mutans* UA159, pois apresentou atividade antimicrobiana e inibição da aderência celular. A concentração testada equivale a 100 vezes a CBM obtida, sendo de 6250 µg/ml.

Houve redução da viabilidade das bactérias (ufc/biofilme) e do peso seco do biofilme com o tratamento tópico pelo extrato quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), redução de forma estatisticamente semelhante à clorexidina ($p > 0,05$). Não foi observada alteração estatística da quantidade de glucano solúvel em álcali e insolúvel para os biofilmes tratados com o extrato apesar de ser observado que houve redução da quantidade desses polissacarídeos, mas não suficiente para diferir do controle ($p > 0,05$). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise bioquímica quanto à viabilidade bacteriana (ufc/mL), biomassa (determinação do peso seco), polissacarídeos solúveis, solúveis em álcalis e insolúveis do biofilme formado sobre discos de hidroxiapatita tratado com extrato das folhas de *M. hostilis*.

	Peso seco (mg) biofilme	u.f.c. ($\times 10^9$)/biofilme	Glucano solúvel em álcali µg/biofilme	Glucano solúvel µg/biofilme	Glucano insolúvel mg/biofilme
Veículo	2,88 ± 0,92 ^a	5,67 ± 1,59 ^a	96,27 ± 19,73 ^a	139,75 ± 40,01 ^{ab}	1,57 ± 0,64 ^a
Clorexidina 0,12%	1,88 ± 0,14 ^a	4,25 ± 0,34 ^b	88,83 ± 2,00 ^a	121,43 ± 36,77 ^a	1,52 ± 0,48 ^a
<i>M. hostilis</i> folhas	1,67 ± 0,88 ^b	3,30 ± 0,86 ^b	84,81 ± 0,30 ^a	73,58 ± 30,32 ^b	1,54 ± 0,80 ^a

Valores na mesma coluna seguidos de letras iguais são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Análise estatística realizada por ANOVA seguido do teste Bonferroni ($n=6$).

O controle do biofilme dental pode ocorrer através da ação de agentes antimicrobianos naturais, nos estágios iniciais e reversíveis de formação do biofilme dental, em que ocorre a aderência bacteriana à película adquirida, prevenindo-se a instalação de patologias orais

(TEIXEIRA *et al.*, 2010). No segundo estágio de desenvolvimento do biofilme, pode ser prevenida a síntese de glucanos insolúveis, inibindo-se a atividade da GTF, que ocorre via dependente de sacarose (KOO *et al.*, 2006).

O extrato etanólico da folha de *M. hostilis* não apresentou diminuição significativa da quantidade de polissacarídeos formados, e apresentou diminuição no peso seco e na viabilidade bacteriana sugerindo que esse extrato inibe a formação do biofilme dental no primeiro estágio. Esse resultado está de acordo com o obtido na determinação da CIMA.

M. hostilis, devido os resultados de aderência e do biofilme pode ser considerada um promissor agente antiplaca e anticárie, e mais estudos devem ser realizados usando maiores concentrações do extrato e das frações para obter melhores resultados.

Os extratos e frações de *M. hostilis* usados como agentes antimicrobianos podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas das células (SINGH e SHUKLA, 1984), por isso, mais testes devem ser realizados para entender o mecanismo de ação para as diferentes bactérias.

CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que os extratos da casca e folha apresentaram alguma atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. aureus* ATCC 25923, a casca ainda apresentou atividade para *E. coli* ATCC 25922 e folhas para *P. aeruginosa* ATCC 10145, podendo ser realizado mais testes para assegurar o uso dessas plantas como antimicrobianos.

O ensaio realizado pela determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência mostrou potencial principalmente das folhas de *M. hostilis* na inibição do crescimento e aderência da bactéria causadora da cárie, *S. mutans* UA159, não sendo tão eficiente para *S. sobrinus*, mesmo esta também sendo uma bactéria cariogênica. Como ainda não se dispõe de uma substância ideal para o controle químico do biofilme dental e como, com exceção do flúor, os efeitos profiláticos dos agentes relacionados à prevenção da cárie dentária ainda são escassos, os resultados obtidos deste estudo são promissores devido à capacidade dos extratos

de *M. hostilis* exercerem influência inibitória seletiva na aderência de *S. mutans* UA159, sendo necessário desenvolver mais estudos para elucidar o mecanismo de ação sobre os fatores de virulência desse microrganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; AHRENS, P.; MADSEN, M.; PALLESEN, L. V.; POULSEN, R. L. e WESTH, H. Glycopeptide Susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates of Animal and Human Origin and PCR Identification of Genes within the VanA Cluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1938–1940, 1996.

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

ALVES, P. M.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; QUEIROZ, L. M. G. Atividade antimicrobiana e antiaderente “in vitro” do extrato de *Rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. **Arquivos em Odontologia**, v. 44, p. 53-58, 2008.

BELLI, W. A.; BUCKLEY, D. H. e MARQUIS, R. E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p.785–791, 1995.

CECHINEL FILHO, V. E YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CURRAN, T. M.; MA, Y.; RUTHERFORD, G. C.; MARQUIS, R. E. Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1078-1085, 1998.

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; FILHO, A. M. P.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. **Anais ...** São Paulo, 2008. p. 248. 1 CD-ROM.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**. 2006.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 21, p. 43-49, 2002.

GENEST, S.; KERR, C.; ANKIT, S.; RAHMAN, M. M.; SAIF-E-NASER, G. M. M.; NIGAM, P.; NAHAR, L. e SARKER, S. D. Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, p. 38-43, 2008.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.353-358, 2005.

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, p. 22-29, 1981.

HERCEG, R. J.; PERTERSON, L. R. Normal flora in health and disease. In: Mandell, Douglas, Bennilt, editors. **Principles and pratce of infectious disease**. 3 ed. New York: Churchill Livingstone, p. 6-14, 1990.

HUSSAIN, N.; MODAN, M. H.; SHABBIR, S. G. e ZAIDI, S. A. H. Antimicrobial principles in *Mimosa hamata*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 525-527, 1979.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los alimentos**. Zagarosa: Acribia, 1994. 804 p.

KHAN, A. M.; QURESHI, R. A.; GILLANI, S. A. E ULLAH, F. Antimicrobial activity of selected medicinal plants of Margalla Hills, Islamabad, Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 4665-4670, 2011.

KOO, H.; HAYACIBARA, M. F.; SCHOBEL, B. D.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K.; VACCA-SMITH, A. M. e BOWEN, W. H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p.782-789, 2003.

KOO, H.; GUZMAN, P. N.; SCHOBEL, B. D.; SMITH, A. V. V. e BOWEN, W. H. Influence of Cranberry Juice on Glucan-Mediated Processes Involved in *Streptococcus mutans* Biofilm Development. **Caries Research**, v. 40, p. 20-27, 2006.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.

LINDHE, J. **Tratado de periodontologia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992.

MURATA, R. M.; ALMEIDA, L. S. B.; YATSUDA, R.; SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; ROSALEN, P. L. e KOO, H. Inhibitory effects of 7-epiclusianone on glucan synthesis, acidogenicity and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters**, v. 282, p. 174-181, 2008.

- MURRAY, B. E. The life and times of the enterococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 46–65, 1990.
- PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G. e CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 878–887, 2006.
- PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente “in vitro” do extrato da *Punica granatum Linn.* Sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 88-93, 2006.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.
- ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A. e GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research Germany**, v. 99, p. 103-107, 2006.
- ROSADO-VALLADO, M.; BRITO-LOEZA, W.; MENA-REJON, G. J.; QUINTERO-MARMOL, E. e FLORES-GUIDO, J. S. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 71, p. 570-573, 2000.
- SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de estratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).** 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2005.
- SCHABERG, D. R.; CULVER, D. H. e GAYNES, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 72–76, 1991.
- SINGH, K.V. e SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.
- SIQUEIRA, F. S. A. Mecanismos de resistência a Beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, v. 24, p. 275-278, 2002.
- SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M. e AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a Review of its Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 937-947, 2008.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.** Editora Atheneu. São Paulo, 1996.
- TEIXEIRA, K. I. R.; BUENO, A. C.; CORTÉS, M. E. Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie. **Química Nova na Escola**, v. 32, p. 145-150, 2010.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; e CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia** 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDERB, V. L. G.; MELOB, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 83-189, 2005.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE *M. hostilis* BENTH

INTRODUÇÃO

Inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Esta resposta se manifesta pela presença de rubor (eritema) dor e perda de função do tecido ou órgão afetado. A instalação de um processo inflamatório pode ser identificada pelo aumento do fluxo sanguíneo local, da permeabilidade vascular causado pela retração de células endoteliais, extravasamento de macromoléculas plasmáticas acompanhada de água levando a formação do edema (LAPA *et al.*, 2007).

A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), cininas (bradicininas), prostanoídes (prostaglandinas), citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF) e substância P (KIM *et al.*, 2007). Dependendo da via metabólica do sistema enzimático, o ácido araquidônico é convertido em uma variedade de metabólitos altamente ativos. Pela via da ciclooxigenase resulta na formação das prostaglandinas estáveis, PGE₂, PGD₂, PGF₂ (como também prostaciclina PGI₂) e tromboxana B₂, via endoperóxido cíclico instável intermediário, PGG₂ e PGH₂. Pela via da 5-lipoxigenase produz leucotrieno B₄ e leucotrienos sulfopeptídicos, LTC₄, LTD₄, LTE₄ e também ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico (5-HETE). Estes metabólitos desempenham importantes papéis na inflamação, e estão associados com a vasodilatação, com o aumento da permeabilidade capilar, a dor e a quimiotaxia (CARVALHO, 2004).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como uma experiência desagradável, de natureza sensorial, cognitiva e emocional, associada ao dano tissular real ou potencial (LAPA *et al.*, 2007). De acordo com a origem, a dor pode ser classificada como fisiológica, resultado do reconhecimento de um estímulo nocivo, que pode ser por calor, frio, pressão ou patológica, transformação de um estímulo não lesivo em um estímulo lesivo, desencadeando sensibilidade dolorosa (alodínia), resposta exagerada aos estímulos nocivos (hiperalgesia) e aumento da área de hipersensibilidade (hiperalgesia secundária) (ALMEIDA *et al.*, 2006).

É aconselhável não usar o termo dor quando o sujeito experimental não pode definir verbalmente a resposta álgica. Assim, neste contexto, torna-se preferível a utilização do termo

resposta nociceptiva, que engloba as respostas comportamentais e neurofisiológica da dor, dissociando-as do caráter cognitivo-afetivo da resposta (LAPA *et al.*, 2007).

Na região do semiárido da Bahia, um bioma exclusivamente brasileiro, existem várias plantas medicinais que são empregadas pela população local, dentre elas, *Mimosa hostilis* Benth é utilizada pela população do distrito de Palmeira, Contendas Sincorá - Bahia, no tratamento da tosse e também na cicatrização de feridas (DUARTE *et al.*, 2008). Até o momento, não foi encontrado na literatura estudos que avaliaram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *M. hostilis*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória por meio da realização de diferentes testes.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas de *M. hostilis* foram coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A metodologia de coleta, identificação e preparo dos extratos e frações foram descritas no Capítulo 2.

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos *Balb-C* machos, pesando entre 20-30 g. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde onde permaneceram no ciclo claro-escuro 12 horas (luzes acessas das 6 às 18 horas), a temperatura de 23 ± 2 °C e a umidade relativa de 50 ± 2 %. Os animais ficaram em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa e foi permitido livre acesso a comida (Labina®, Purina) e água filtrada. Os camundongos foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório, pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos

utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

Os testes com os animais foram realizado no Instituto Multidisciplinar em Saúde, sob orientação da Prof^a Dr. Regiane Yatsuda, co-orientadora deste trabalho. A utilização dos animais nos testes que envolvem a avaliação da atividade antinociceptiva e da atividade anti-inflamatória foi aprovado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba - MG, ofício CEEA 173/2009 (Anexo 1).

Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster *et al.* (1959) e Vacher *et al.* (1964). Os camundongos em jejum de 12 horas, foram tratados por via subcutânea (s.c.) com extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/Kg) 30 minutos antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% (10 mL/Kg). Os animais do controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (i.p.). Os camundongos foram colocados em caixas separadas e depois da administração do ácido acético, o número de contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção.

Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O comportamento de nocicepção induzido por formalina foi avaliado como descrito anteriormente (TJÖLSEN *et al.*, 1992).

Foram utilizados grupos de 6 camundongos (*Balb-C*) submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados com extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/Kg, s.c.), veículo (10% etanol, v/v, s.c.), indometacina (10 mg/Kg, s.c.) ou morfina (5 mg/Kg respeitando 10 ml/Kg, s.c.). Após 30 minutos, foi administrado 20 µL de solução de formalina

1,5% (folmaldeído) via intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata posterior direita dos animais. Os camundongos foram observados individualmente durante 30 min após a injeção de formalina e o comportamento da nocicepção foi determinado pelo número de mordidas, lambidas e flinches (elevações/sacudidas) da pata. Os primeiros cinco minutos determinam resposta à dor de origem neurogênica; dos 15-30 minutos, determinam resposta à dor de origem inflamatória.

Neste teste, também foi medido o edema formado na pata direita. As patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que recebeu formalina foi subtraída do peso da pata que não recebeu injeção, a fim de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos como g.

Teste de pressão crescente na pata

Para a realização deste teste, foi utilizado o *Von Frey* filamentos, um método para determinar nocicepção mecânica por meio eletrônico usado primeiramente em humanos e posteriormente em ratos. O limiar de nocicepção mecânica foi medido em uma sala silenciosa, onde os camundongos foram colocados em caixas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) cujo assoalho é uma rede de malha constituída de arame não maleável, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Foi aplicado, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produziu uma resposta caracterizada como sacudida (flinches) da pata estimulada. A pressão foi aplicada com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de *Von Frey*, Insight Equipamentos[®], Brasil). O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios de cada animal. A força máxima aplicada foi de 50g. Os camundongos foram pré-tratados com extrato etanólico da casca (100 mg/Kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v, s.c.) e depois de 30 min, foi injetado o estímulo algico (Cg, 100 µg/pata, i.pl.). Após três horas o teste *Von Frey* foi repetido. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação (após a administração da Cg) (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Avaliação da migração de neutrófilos

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, o extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/Kg) foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório (Carragenina (Cg), 500 µg/200 µg por 20 g camundongo). Os camundongos foram sacrificados 4 h após injeção de Cg e as células da região peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade com 3 mL de tampão fosfato (PBS) contendo EDTA 1 mM (NUNES et al., 2009). O volume coletado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial (100 células no total) foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga (PRESVAC[®] CT12, Curitiba, Brasil), os quais foram corados por corante Panótico (Laborclin, Brasil) e as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). O veículo do extrato (etanol 10%, v/v) foi utilizado como controle. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por cavidade.

Deteção de citocinas por imunofluorescência

Foi administrado nos camundongos extrato etanólico da casca (100 mg/Kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v), após 30 min do estímulo Cg (500 µg/cavidade, i.p.), o exsudato peritoneal foi coletado para a quantificação das citocinas. Os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-10 e (IL)-1 β foram determinados através do ensaio de imunofluorescência (ELISA), utilizando protocolos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems[®], Minneapolis, EUA) para ambos os experimentos. Os resultados são expressos em pg/mL.

Ensaio da atividade de Mieloperoxidase

A extensão do acúmulo de neutrófilos na pata foi medido por ensaio de atividade da mieloperoxidase (NUNES et al., 2009). Após o teste de *Von Frey*, o tecido da pata foi retirado

e homogeneizado em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 1,015 M NaEDTA), seguido por centrifugação a 3000 × g por 15 min. O precipitado (*pellet*) foi submetido a lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2%) e após 30 segundos, adição de igual volume de uma solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após nova centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 0,05 M de tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%. Depois disso, o tecido foi congelado em nitrogênio líquido por três vezes e centrifugado a 10.192 × g por 15 min e re-homogeneizado. A atividade da mieloperoxidase no sedimento ressuspenso foi determinada pela variação de densidade óptica a 450 nm usando luminol (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram calculados através da comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido da pata com uma curva padrão de números de neutrófilos (pureza > 95%).

Análise de expressão protéica mesentérica por *Western Blot*

Os animais pré-tratados com o extrato etanólico da casca (100 mg/Kg) e desafiados com Cg (i.p.), foram sacrificados após 4 horas e o mesentério coletado para análise de expressão protéica da ICAM-1. A quantificação protéica foi realizada pelo método de microBCA. Resumidamente, a amostra foi homogeneizada em 400µl de tampão (1% Triton X-100, 1M NaF, 100mM NaPPi, 1M Na₃VO₄, 1mg/ml aprotinina, 1mg/ml leupeptina, 1mg/ml flúor fenilmetilsulfonil), e centrifugado a 4°C por 20 minutos a 13000 rpm. Quantidades iguais de proteínas foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS 10%, seguido de transferência para a membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado (5%) em TBS-T (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 500mM NaCl, 0.1% Tween 20), *overnight* a 4°C. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo *mouse* anti-ICAM-1 por 2h a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada e incubada com anticorpo goat *anti-mouse* IgG conjugado com peroxidase em temperatura ambiente por 1 h. A membrana foi então lavada e aplicada solução reveladora ECL (Pierce) e as imagens capturadas utilizando filmes radiográficos (Kodak) observando a presença de uma banda com peso molecular de 85-110 kDa representando a banda da ICAM-1.

Avaliação da permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular foi analisada em camundongos (*Balb-C*) através da quantificação do extravasamento do azul de *Evans* - substância com alta ligação a albumina sérica. Após a administração de 50 μ L do Azul de Evans (50 mg/Kg em PBS 10x) pela via plexo ocular, foi administrado o extrato etanólico da casca (100 mg/kg, s.c.) e posterior administração intraperitoneal de PBS (tampão salino-fosfato) ou estímulo álgico (Cg, i.p., 500 μ g/200 μ L por 20 g peso camundongo). Os animais foram sacrificados após 4 horas da injeção de Cg e o lavado peritoneal foi realizado com 3 mL PBS acrescido de EDTA, e a quantidade de Azul de *Evans* extravasado foi medida com o auxílio do espectrofotômetro a 620 nm, após realizar leitura de curva padrão do mesmo. O veículo do extrato (etanol 10%, v/v) foi utilizado como controle (THURSTON *et al.*, 2000).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos inicialmente a uma análise exploratória para determinação do melhor teste estatístico, sendo em seguida aplicado o teste mais conveniente para cada análise do presente trabalho. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (n=6), e foi realizado comparação estatística entre os grupos usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações ou pelo teste *post hoc* de Dunnett, usando o programa GraphPad Prism[®] versão 5.00. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos, aguda e crônica, divisão essa baseada na duração e características patológicas da reação inflamatória. A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido ou exsudato rico em proteínas (de fase aguda) com formação de edema, migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. O processo inflamatório compreende eventos vasculares e

celulares que ocorrem simultaneamente durante o curso evolutivo (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Entre os modelos de nocicepção utilizados, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes (IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001). Neste modelo, a administração de um agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados em camundongos e ratos, que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001).

A avaliação de nocicepção visceral através do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético foi realizado com doses de 50, 100 e 200 mg/Kg do extrato etanólico da casca de *M. hostilis* e as concentrações de 100 e 200 mg/Kg apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de episódios de contorção em comparação ao grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v) (Figura 1).

Neste teste, o ácido acético provoca dor inflamatória através da indução da permeabilidade capilar e liberação de ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase e da biossíntese de prostaglandina que promovem um aumento dos níveis de PGE₂ e PGF₂ (mediadores essenciais da inflamação), substância P, bradicinina, e algumas citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-8), que desempenham um importante papel no mecanismo que envolve, em parte, receptores nociceptivos peritoneais (DERAEDT *et al.*, 1980; FRANZOTTI *et al.*, 2000). A inibição destas contorções nos animais tratados com o extrato da casca de *M. hostilis* sugere que substâncias anti-inflamatórias podem estar envolvidas na atividade analgésica ao nível periférico e que o extrato pode atuar, evitando a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas através da inibição da enzima ciclooxigenase e/ou inibir a síntese e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias, ou ainda por ação direta sobre os receptores peritoneais (NEMIROVSKY *et al.*, 2001).

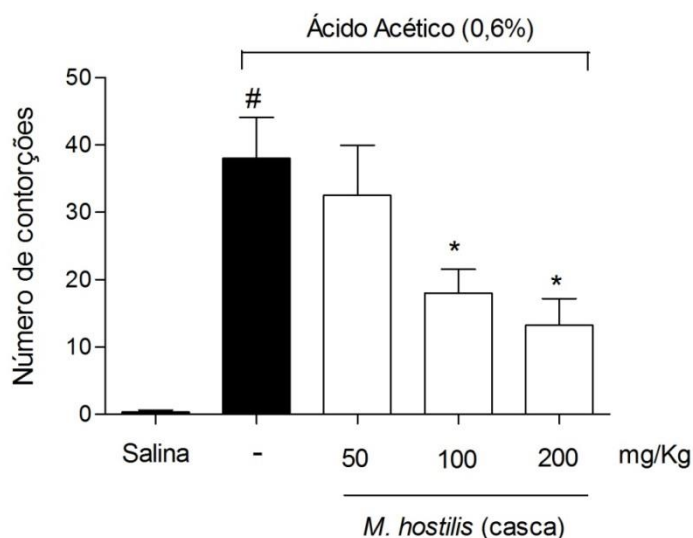


Figura 1. Efeito da casca de *M. hostilis* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com diferentes doses do extrato (50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.). Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção em camundongos ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo (-) e tratados com o extrato, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Para investigar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico da casca de *M. hostilis*, foi utilizado o ensaio de formalina, que avalia esse efeito em duas fases distintas que podem indicar diferentes tipos de dor. A fase inicial (nociceptiva) é um resultado direto da estimulação de nociceptores e reflete a dor mediada no sistema nervoso central, a dor de origem neurogênica é causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C. A segunda fase (dor inflamatória) é causada por inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia mediada pelo sistema nervoso periférico, o que faz o método útil não só para avaliar o efeito analgésico, mas também para elucidar o mecanismo de dor e analgesia (OLIVEIRA *et al*, 2011; TJØSEN *et al.*, 1992).

No teste da formalina, a administração do extrato etanólico da casca (s.c.) nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg, 30 min antes da formalina, não conseguiu inibir a nocicepção da fase neurogênica (primeiros 5 minutos) induzida pela formalina na pata do animal (Figura 2). A elevação da pata na fase inflamatória (15 a 30 minutos) foi inibida significativamente com as três doses testadas do extrato etanólico da casca em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$), sendo que, em 200 mg/Kg de forma semelhante ao grupo morfina ($p > 0,05$) (Figura 2).

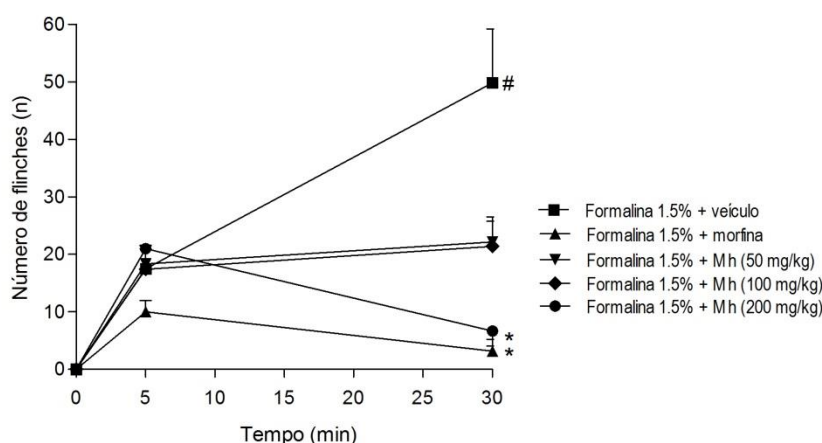


Figura 2. Efeitos do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos pré-tratados por administração subcutânea de morfina (1 mg/Kg), extrato da planta (50, 100 e 200 mg/Kg) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$) do número de elevações, sacudidas e lambidas da pata injetada por um período de 30 min. A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, quando comparado o grupo dos camundongos tratados com morfina ao grupo de camundongos tratados com o extrato. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. Mh = Extrato etanólico da casca de *M. hostilis*.

Vários trabalhos têm demonstrado que a administração intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento dos níveis espinhais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, PGE₂, óxido nítrico e cininas (LAPA, 2006). Considerando-se a propriedade de inibição da casca de *M. hostilis*, na segunda fase do teste de formalina, pode-se sugerir que a sua atividade antinociceptiva é devido, pelo menos em parte, a uma ação anti-inflamatória envolvendo os mediadores químicos histamina e a serotonina (5-HT), prostaglandinas e bradicinina (SHIBATA *et al.*, 1989).

Assim, para avaliar inicialmente a possível atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da casca, foi realizada uma das técnicas mais comumente utilizadas para estimar a atividade de fármacos anti-inflamatórios, baseada na habilidade de inibir o edema produzido na pata traseira de rato por injeção de um agente flogístico. Os materiais flogísticos mais frequentemente utilizados são carragenina, formalina, dextrano, albumina de ovo e lêvedo de cerveja (LE BARS *et al.*, 2001).

O tratamento com o extrato etanólico da casca de *M. hostilis* (50, 100 e 200 mg/Kg), além de diminuir a nocicepção causada pela formalina, também diminuiu significativamente a formação de edema, induzido por injeção de formalina (300 μ g/pata) na pata do camundongo quando comparado com grupo veículo ($p < 0,05$), apresentando uma atividade

antiedematogênica semelhante ao grupo tratado com indometacina ($p > 0,05$) que é um anti-inflamatório não esteroidal que inibe a produção de prostaglandinas (Figura 3).

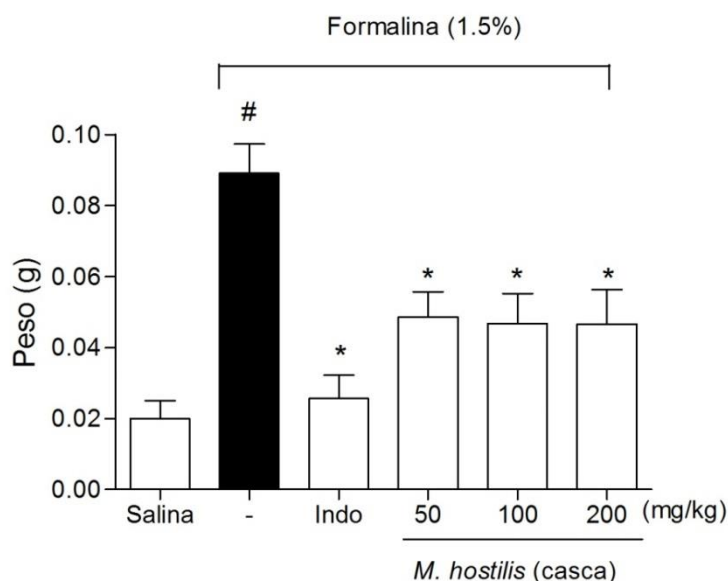


Figura 3. Efeito do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* induzido por formalina 1,5% no edema de pata de camundongos pré-tratados por administração de indometacina (10 mg/Kg em 10 ml/Kg, s.c.) ou extrato (50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$) do volume (mL) de edema da pata injetada após 30 min (s.c.). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo veículo (-). # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Um sinal precoce da inflamação aguda é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas (plasma) dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e PAF no sítio inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Deste modo, algumas substâncias presentes no extrato da casca de *M. hostilis* talvez podem causar a redução do edema para o antagonismo do receptor B_2 ou por interferir na liberação de bradicinina, impedindo a sua ação edematogênica e nociceptiva, ao mesmo tempo que também podem estar atuando sobre a síntese e liberação ou ação da 5-HT e histamina, que funciona através de uma ação sinérgica e são necessários para induzir um comportamento na segunda fase do teste da formalina (PARADA *et al.*, 2001).

Para avaliar a sensibilidade tecidual através de estímulo mecânico, foi realizado o teste de pressão crescente na pata, conhecido como método *Von Frey* eletrônico, que consiste em

um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g) (MOLLER, JOHANSSON e BERGE, 1998).

Os resultados de inibição da nociceção inflamatória induzida por Cg realizada por meio do teste de *Von Frey* (hiperalgesia mecânica) descritos na Figura 4, reforçam o potencial da planta e a necessidade de submeter os extratos a outros testes para avaliação da ação anti-inflamatória.

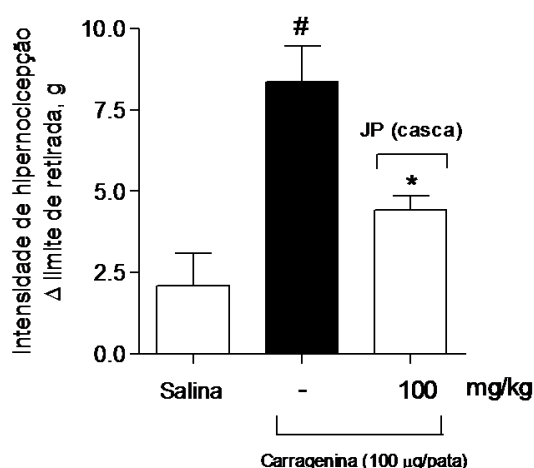


Figura 4. Efeito do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* na inibição da nociceção mecânica. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo veículo (-). # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nociceção (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001).

Para verificar a relação entre as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatória foram realizados outros teste que avaliam as propriedades anti-inflamatórias como o teste de inibição da migração de neutrófilos induzida pela Cg para a cavidade peritoneal. A peritonite é um modelo que provoca na cavidade peritoneal reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamações ou doença neoplásica. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o sítio inflamado, resultando na ativação de células inflamatórias, causando aumento no número de células no espaço peritoneal. Esse modelo é

considerado por muitos pesquisadores como o mais completo, uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO *et al.*, 1997). Além disso, este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, sob ação de agentes quimiotáticos, principalmente leucotrienos e interleucinas liberados por células residentes, sendo sensível à ação de anti-inflamatórios esteroidais (VINEGAR, TRUAX e SELOH, 1973; HIGGS *et al.*, 1980; MIKAMI e MIYASAKA, 1983; BROOKS e DAY, 1991; WAGNER e ROTH, 2000). Os testes realizados com a administração de carragenina provocam uma formação inicial de bradicinina, a qual induz uma liberação subsequente de cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), provocando a liberação de PGs e aminas simpáticas (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA, LORENZETTI e POOLE, 1993).

O pré-tratamento com extrato etanólico da casca de *M. hostilis* nas concentrações 100 e 200 mg/Kg (s.c.) diminuiu a migração de neutrófilos nos camundongos ($p < 0,05$), induzida pela injeção intraperitoneal de Cg (500 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$), determinada 4 h depois (Figura 5).

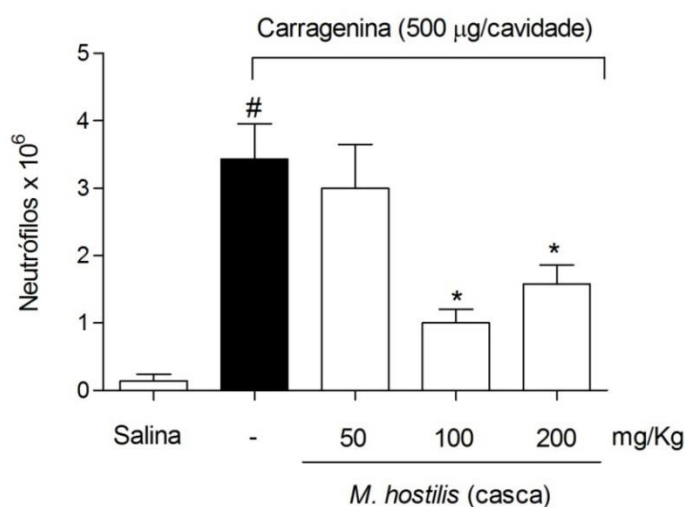


Figura 5. Efeito do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* (50, 100 e 200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) induzir peritonite. Cada valor representa a média \pm D.P. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). * $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Os neutrófilos são importantes tipos de leucócitos participando na defesa do organismo e a sua migração a partir de vasos sanguíneos no tecido é um processo crucial na resposta do hospedeiro contra infecções de microrganismos (MALECH e GALLIN, 1987). Apesar de

terem um papel protetor na inflamação, danos no tecido são uma consequência prejudicial da migração de neutrófilos intensa como observado em doenças inflamatórias (JONES *et al.* 1991). O processo de migração leucocitária é dependente da produção e da liberação de mediadores quimiotáticos, como os produtos da lipoxigenase e quimiocinas, sendo constituído por eventos como a marginalização e rolamento de leucócitos, a sua aderência e o processo de transmigração em direção à região lesionada. O extrato da casca pode reduzir a migração de leucócitos por impedir a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou bloquear alguma fase da migração dos leucócitos (MULLER, 2002). Apesar de alguns estudos relatarem que a migração dos leucócitos não estaria diretamente relacionada aos produtos da ciclooxigenase (HIGGS *et al.*, 1980; BROOKS e DAY *et al.*, 1991), este processo pode ser inibido por diversos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), indicando que vários mecanismos podem estar envolvidos no seu controle, incluindo a produção reduzida de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MENEZES *et al.*, 2005).

As citocinas são vitais para a organização da migração de leucócitos para os tecidos feridos, sendo um processo sequencial e coordenado que requer citocinas/quimiocinas, selectinas, integrinas e intercélulas de adesão molecular (ICAMs) (NAPIMOGA *et al.*, 2007). O $\text{TNF-}\alpha$ é considerado uma citocina pró-inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) (SOMMER e KRESS, 2004). A IL-1 β e o $\text{TNF-}\alpha$ são produzidos e liberados durante a inflamação periférica e também, nas mesmas condições, são liberados por células presentes no SNC (LAPA, 2006). Para limitar as consequências deletérias da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β), sua liberação é acompanhada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13. Essas citocinas anti-inflamatórias modulam eventos imunes e inflamatórios, inibindo a produção e ação das citocinas pró-inflamatórias (VERRI JÚNIOR *et al.*, 2006).

A concentração dos mediadores pró-inflamatórios $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β no líquido peritoneal dos camundongos inoculados com Cg não foi afetada nos animais tratados com o extrato etanólico da casca de *M. hostilis* a 100 mg/Kg (Figura 6a) e houve uma diminuição significativa na concentração de IL-10 na mesma concentração (Figura 6b).

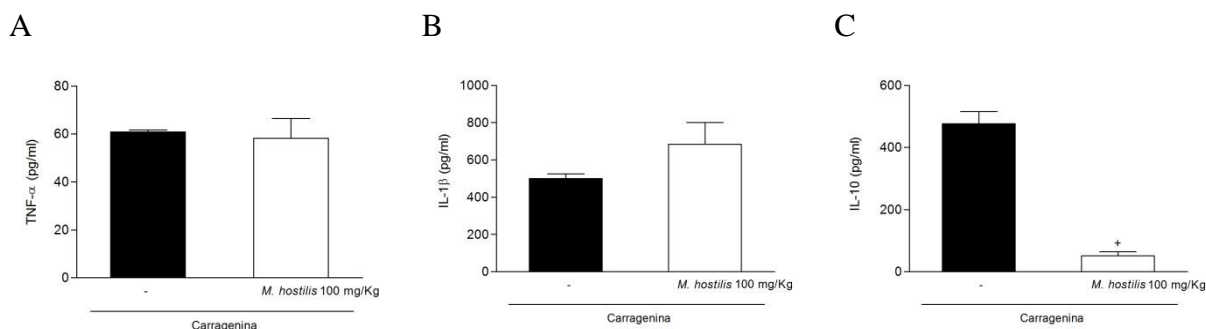


Figura 6. Efeito do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* sobre as citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) na produção de exsudato peritoneal determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). * $p < 0,05$ quando comparado com grupo controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

A atividade da mieloperoxidase é um marcador indireto de leucócitos ativados e está relacionado com a migração celular e exsudação, juntamente com o óxido nítrico (FRÖDE e MEDEIROS, 2001). A MPO é uma enzima presente principalmente nos neutrófilos, portanto, o aumento na atividade da MPO é um indicativo indireto da presença de um maior número de neutrófilos no tecido inflamado. Baseado na dosagem da atividade de MPO, não houve redução da quantidade de MPO produzida quando o animal foi tratado com o extrato etanólico da casca de *M. hostilis* na concentração de 100 mg/Kg em relação ao controle ($p > 0,05$), e conseqüentemente, não houve inibição da migração de neutrófilos para o tecido plantar induzida pela Cg (Figura 7).

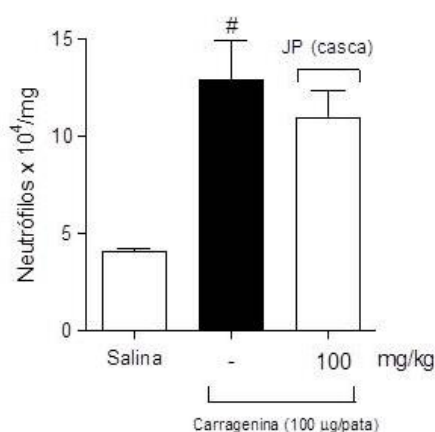


Figura 7. Efeito sobre a nocicepção inflamatória associada à capacidade do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* em inibir a migração de neutrófilos para o tecido plantar induzida pela Cg, avaliada pela dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo ($n = 6$). (-) Veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. JP = Jurema Preta (*M. hostilis*)

Outro teste realizado para tentar elucidar o mecanismo de ação do extrato da casca de *M. hostilis* foi avaliar a expressão da molécula de adesão endotelial intercelular-1 (ICAM-1) no mesentério dos camundongos através da técnica *Western blot*. Na concentração de 100 mg/Kg houve diminuição da expressão de ICAM-1 no mesentério comparado ao grupo carragenina ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 8. A ICAM-1 tem um papel intravascular bem definido na regulação do recrutamento de neutrófilos nos locais de inflamação. A associação de ICAM-1 e a integrina CD18 permite a firme adesão de neutrófilos na parede dos vasos sanguíneos, um pré-requisito para a migração transendotelial eficiente (PHILLIPSON *et al.*, 2006). Assim, a atividade anti-inflamatória de *M. hostilis* pode estar relacionada com a redução da migração de neutrófilos devido a supressão da expressão de ICAM-1.

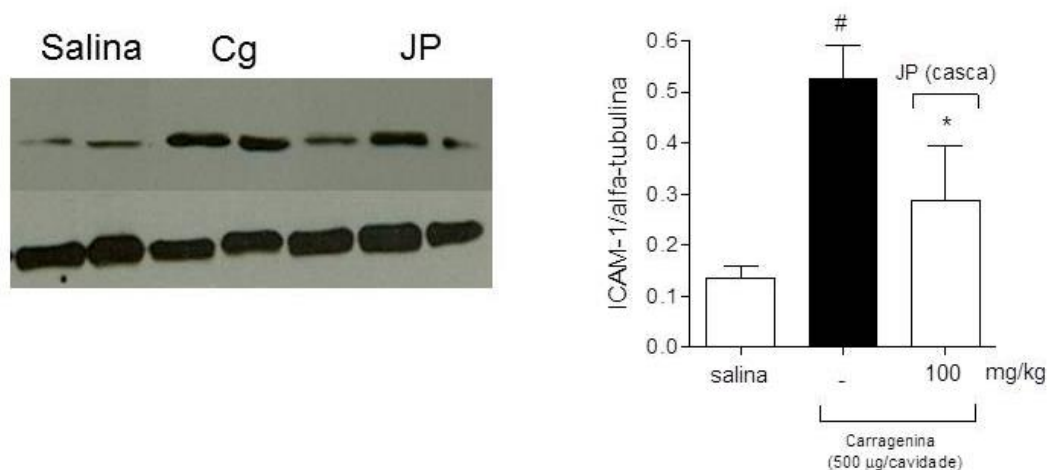


Figura 8. Efeito do extrato etanólico da casca de *M. hostilis* na indução da expressão de ICAM-1 no mesentério dos camundongos e na densidade óptica do *Western blot* para ICAM-1 normalizado com a expressão de α -tubulina. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$). (-) Veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. JP = Jurema Preta (*M. hostilis*)

Avaliando outros fatores relacionados à resposta anti-inflamatória, foi analisado também o extravasamento vascular usando o corante azul de *Evans*, que forma um complexo estável com as proteínas plasmáticas. Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (ALLER *et al.*, 2007; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Quando é injetado na circulação sanguínea em baixas concentrações, combina-se preferencialmente à albumina. Mediadores químicos da inflamação e injúrias com

lesão vascular direta aumentam o fluxo transcapilar que incrementam os níveis de acúmulo do complexo corante-albumina nos tecidos. A quantidade de albumina que flui normalmente para os tecidos não é significativa, mas o extravasamento é importante em vigência do aumento da permeabilidade capilar (BERNAUER, 1980).

A Figura 9 mostra que o pré-tratamento (30 min, s.c.) com o extrato etanólico da casca de *M. hostilis* na dose testada (100 mg/Kg), mostrou uma pequena redução na permeabilidade vascular, porém não foi suficiente para diferenciar estatisticamente do controle ($p > 0,05$). A diminuição da permeabilidade vascular induzida por carragenina sugere uma inibição da liberação, na fase inicial da inflamação aguda (1/2-1 h) da bradicinina, histamina e serotonina e da liberação de prostaglandinas em uma fase posterior da inflamação aguda (3-4 h) pelas células locais (DI ROSA, GIROUD e WILLOUGHBY, 1971; MORRIS, 2003).

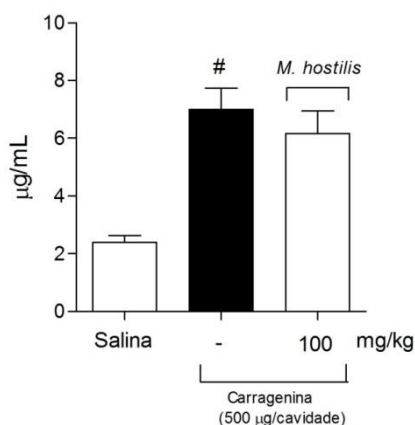


Figura 9. Efeito do extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis* na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$) da concentração de corante azul de Evans. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo etanol.

Diante dos resultados obtidos, o extrato etanólico da casca por inibir a produção de citocina pró-inflamatória, influencia na redução do fluxo de neutrófilos ao local inflamatório e com os processos relacionados com a migração, como hipernocicepção mecânica. Além disso, a possível inibição da produção de prostaglandinas, não verificada diretamente neste estudo, em especial $PGE_{2\alpha}$ e $PGF_{2\alpha}$, pode explicar a atividade do extrato semelhante à atividade dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Para isso, o extrato também pode estar agindo indiretamente, por bloqueio da cascata de citocinas, que culmina com a liberação de PG, ou diretamente através da inibição da enzima ciclooxigenase, assim como a indometacina, podendo esta ação ser a chave da atividade anti-inflamatória de *M. hostilis*. Além disso, as

prostaglandinas são mediadores da atividade nociceptiva das citocinas IL-1 β , IL-6, sendo que a inibição da síntese das prostaglandinas pode bloquear a hiperalgesia provocada por estas citocinas (CUNHA *et al.*, 1992). Assim, a provável ação do extrato da casca de *M. hostilis* é a redução dos níveis de prostaglandinas.

Na tentativa de encontrar o grupo de substâncias responsáveis pela atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da casca de *M. hostilis* foram realizados os testes de contorção induzido por ácido acético e de migração de neutrófilos com as frações obtidas após partição em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As principais classes de compostos de origem vegetal de grande diversidade química que atuam no processo inflamatório são ácidos carboxílicos, fenólicos, fenóis simples, flavonoides, taninos, derivados de fenilpropanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos e alcaloides que tem demonstrado atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre distintos mediadores deste processo (CARVALHO, 2004), o que aumentou o interesse em estudar a espécie *M. hostilis*, pois a mesma possui ácidos graxos, flavonoides e esteroides que podem estar relacionados com a atividade anti-inflamatória.

No teste realizado na dose de 100 mg/Kg com as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, apenas as frações em diclorometano e butanol reduziram significativamente as contorções provocadas nos camundongos por ácido acético 0,6 % em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 10).

As frações da casca de *M. hostilis* em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg também foram testadas para avaliar a migração de neutrófilos (dados não apresentados). No entanto, não apresentaram diferença significativa comparando com o veículo ($p > 0,05$). Apenas a fração em hexano, na concentração de 200 mg/Kg apresentou diferença comparando com o veículo ($p < 0,05$). (Figura 11).

Como os resultados apresentaram diferença no perfil de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória entre as partições, pois a fração em hexano apresentou redução da migração de neutrófilos e as frações em diclorometano e butanol apresentaram inibição da contorção abdominal, outros testes serão necessários, como os realizados anteriormente, para elucidar o mecanismo de ação e determinar os compostos ativos.

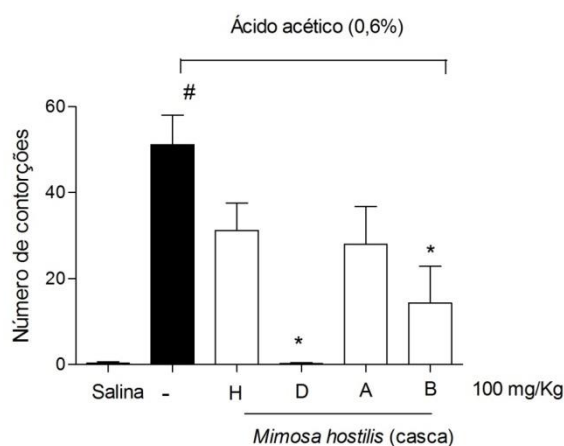


Figura 10. Efeito do extrato da casca de *M. hostilis* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com as frações H-hexano, D-diclorometano, A-acetato de etila e B-butanol (100 mg/Kg, s.c.). Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção em camundongos ($n = 6$). (-) Veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo e tratados com o extrato, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

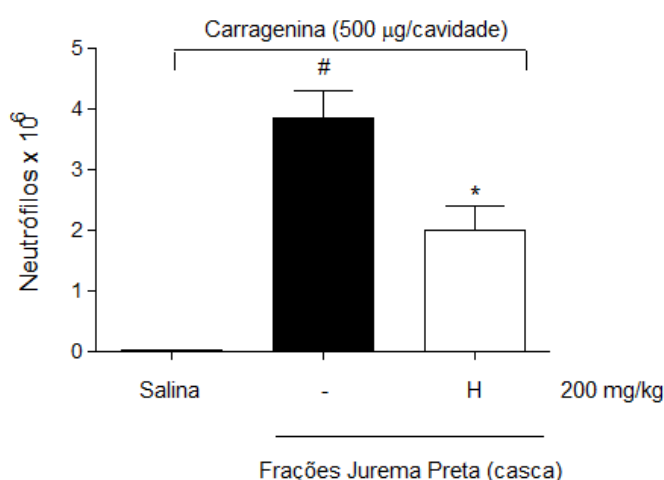


Figura 11. Efeito das frações em H-hexano da casca de *Mimosa hostilis* (200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Cg (500 μ g/cavidade) induzir peritonite. Cada valor representa a média \pm D.P. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo veículo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. H = hexano

Outras espécies do gênero *Mimosa* tiveram atividade anti-inflamatória estudada, como exemplo o extrato da casca de *M. tenuiflora* que apresentaram excelentes propriedades terapêuticas no tratamento de feridas na pele e varizes atribuídas a presença de saponinas e taninos (RIVERA-ARCE *et al.*, 2007), capacidade de imunomodulação e de proliferação

celular em ensaios biológicos *in vitro* (ANTON *et al.*, 1993; ZIPPEL, DETERS e HENSEL, 2009). O extrato metanólico da raiz de *M. pudica* apresentou boa atividade de cicatrização da ferida, provavelmente devido à presença de componentes fenólicos (KOKANE *et al.*, 2009).

Este efeito sobre a regeneração do tecido pode estar relacionado com a atividade anti-inflamatória, uma vez que estudos têm mostrado que a modulação da resposta inflamatória pode reduzir a migração de células inflamatórias para o local da lesão e promover a regeneração do tecido com cicatriz reduzida (MARTIN *et al.*, 2003; REDD *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o extrato etanólico da casca de *Mimosa hostilis*, nativa da região do semiárido brasileiro (caatinga), possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Outros estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nestas atividades e os compostos bioativos, apoiando o uso popular dessa planta medicinal pela população local.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F. e ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202-209, 2007.

ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S. e RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, p. 107-118, 2006.

ANTON, R.; JIANG, Y.; WENIGER, B.; BECK, J. P. e RIVIER, L. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 153-157, 1993.

BERNAUER, W. Effects of glucocorticosteroids in rats with acute myocardial infarction. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie**, v. 244, p. 86-99, 1980.

BROOKS, P. M. e DAY, R. O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – differences and similarities. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 1716-1725, 1991.

CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêutica**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. 480 p.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B. e FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660-664, 1992.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F. e FLAHAUT, M.. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P. e WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; FILHO, A. M. P.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. **Anais ...** São Paulo, 2008. p. 248. 1 CD-ROM.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. e POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V.; RODRIGUES, H. M.; MOURÃO, R. H.; ANDRADE, M. R. e ANTONIOLLI, A. R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273-277, 2000.

HIGGS, G. A.; EAKINS, K. E.; MUGRIDGE, K. G.; MONCADA, S. e VANE, J. R. The effects on non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. **European Journal Pharmacology**, v. 66, p. 81-86, 1980.

IKEDA, Y.; UENO A.; NARABA, H. e OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JONES, A. K.; AL-JANABI, M. A.; SOLANKI, K.; SOBNACK, R.; GREENWOOD, A.; DOYLE, D. V.; BRITTON, K. E. e HUSKISSON, E.C. In vivo leukocyte migration in arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 34, p. 270-275, 1991.

KIM, Y.; SO, H. S.; YOUN, M. J.; KIM, H. J.; WOO, W. H.; SHIN, S. H.; LEE, I.; MOON, B. S.; CHO, K. H.; PARK, R. Anti-inflammatory effect of sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 32-39, 2007.

KOKANE, D. D.; MORE, R. Y.; KALE, M. B.; NEHETE, M. N.; MEHENDALE, P. C.; GADGOLI, C. H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 311-315, 2009.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A. e LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo. UNIFESP/EPM, 2007. 144p

LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 119f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba. 2006.

LE BARS, D.; GOZARIU, M. e CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

MALECH, H. L. e GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 687–694, 1987.

MARTIN, P.; D'SOUZA, D.; MARTIN, J.; GROSE, R.; COOPER, L.; MAKI, R. e MCKERCHER, S. R. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. **Current Biology**, v. 13, p. 1122-1128, 2003.

MENEZES, G. B.; REIS, W. G.; SANTOS, J. M.; DUARTE, I. D. e FRANCISCHI, J. N. Inhibition of prostaglandin F (2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. **Inflammation**, v. 29, p. 163-169, 2005.

MIKAMI, T. e MIYASAKA, K. Effects of several antiinflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenininduced pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 95, p. 1-12, 1983.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, p. 41-47, 1998.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 521-533, 2002.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 824-835, 2007.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V. e JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, p. 197-203, 2001.

NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609-616, 2009.

OLIVEIRA, C. M.; NONATO, F. R.; LIMA, F. O.; COUTO, R. D.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B. P. e VILLARREAL, C. F. Antinociceptive Properties of Bergenin. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2062–2068, 2011.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q. e FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, p. 937-944, 2001.

PHILLIPSON, M.; HEIT, B.; COLARUSSO, P.; LIU, L.; BALLANTYNE, C. M. e KUBES, P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 2569–2575, 2006.

REDD, M. J.; COOPER, L.; WOOD, W.; STRAMER, B. e MARTIN, P. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, p. 777–784, 2004.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V.; SOUZA, M. H.; OLIVEIRA, S. H.; COSTA, C. H.; CUNHA, F. Q. e FERREIRA, H. S. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 112, p. 27-35, 1997.

RIVERA-ARCE, E.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZATE, S.; AGÜERO, J.; FERIA-ROMERO, I. A.; CRUZ-GUZMÁN, A. e LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 523-528, 2007.

SHERWOOD, E.R. e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H. e INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184-187, 2004.

THURSTON, G.; RUDGE, J. S.; IOFFE, E.; ZHOU, H.; ROSS, L.; CROLL, S. D.; GLAZER, N.; HOLASH, J.; MCDONALD, D. M.; YANCOPOULOS, G. D. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, p. 460-463, 2000.

TJÖLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 11, p. 51-58, 1964.

VERRI JÚNIOR., W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F. e SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, p. 711-714, 1973.

WAGNER, J. G. e ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 349-374, 2000.

YUNES, R. A. e CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

ZIPPEL, J.; DETERS, A. e HENSEL, A.. Arabinogalactans from Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 391-396, 2009.

ANEXO 1

Certificado de aprovação para utilização dos animais nos testes que envolvem a avaliação da atividade antinociceptiva e da atividade antiinflamatória emitido pelo Comitê De Ética em Experimentação Animal UNIUBE, ofício CEEA 173/2009.

**UNIUBE**
Educação e Responsabilidade Social

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-173/2009

Uberaba, 21 de dezembro de 2009

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 0107/2009 relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade biológica de compostos isolados de plantas medicinais do semi-árido da Bahia**" que tem como responsável **Prof^a Regiane Yatsuda**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 0107/2009 related to the project entitled "**Evaluation of biological activit of compounds isolated from medicinal plants of the semi-arid of Bahia**", under the supervision of **Prof^a Regiane Yatsuda**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.704/09.

Atenciosamente,



Prof.ª Joely F. Figueiredo Bittar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE

CAPÍTULO 7

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ISOSSACURANETINA

INTRODUÇÃO

Os flavonoides são uma importante classe de compostos fenólicos amplamente distribuídos em uma variedade de plantas comestíveis com propriedades benéficas relacionadas com a saúde, que incluem anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, efeitos sobre a fragilidade capilar, inibição da agregação de plaquetas humanas e atividade anticâncer (ASZTEMBORSKA, MISKIEWICZ e SYBILSKA, 2003).

Entre a grande família dos flavonoides, flavanonas apresentam uma característica estrutural única devido a quiralidade. Flavanonas existem em duas formas enantioméricas, devido ao centro estereogênico na posição C-2 (Figura 1) (KNOW, PAIK e JUNG, 2008). Não há informações detalhadas sobre a relevância da configuração absoluta do centro estereogênico relacionados com propriedades biológicas dessas substâncias. Podem sofrer abertura do anel, sob condições básicas formando as chalconas correspondentes que são instáveis e têm a forte tendência para rapidamente reciclar em ambiente neutro ou de pH mais elevado. É importante notar que a isomerização de chalcona a flavanona leva a racemização de flavanonas opticamente ativas (WISTUBA *et al.*, 2006).

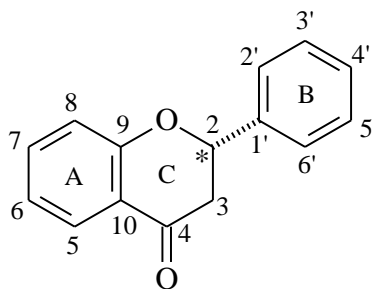


Figura 1. Esqueleto da flavanona

As flavanonas (2-fenilcroman-4-onas) são principalmente encontrados em plantas da família Leguminosae, Compositae e Moraceae e possuem atividades farmacológicas tais como antioxidante, antibacteriano e inibição de hormônio dependente na proliferação das células cancerosas (LEE e JUNG, 2005).

Isossacuranetina (5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona) é um flavonoide da classe das flavanona também conhecido como ponciretin (KIM *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2007a). O C-2 que atua como centro quiral pode ocorrer em qualquer das configurações *S* ou *R*, sendo a configuração 2*S* predominante na natureza (GAFFIELD, 1970; VEGA-VILLA *et al.*, 2008). Essa substância foi isolada anteriormente no gênero *Mimosa*, em folhas e galhos de *Mimosa hostilis* (OHSAKI *et al.*, 2006) e também foi identificado como um importante componente de própolis (SHIMIZU *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2007; DE SOUSA *et al.*, 2007) e própolis verde (SIMÕES *et al.*, 2004), além de *Baccharis dracunculifolia* (MISSIMA *et al.*, 2007), *Terminalia fagifolia* (GARCEZ *et al.*, 2006), *Chromolaena odorata* (SUKSAMRARN *et al.*, 2004), *Eupatorium odoratum* (METWALLY e EKEJIUBA, 1981), *Citrus sinensis* (VANAMALA *et al.*, 2006), *Poncirus trifoliata* (KIM, BAE e HAN, 1999), *Piper mollicomum*, *P. lhotzkyanum* e *Piper marginatum* (KWON, PAIK e JUNG, 2008; REIGADA *et al.*, 2007).

A atividade biológica de isossacuranetina foi previamente descrita por apresentar propriedades antimicobacteriana moderada contra *Mycobacterium tuberculosis* (SUKSAMRARN *et al.*, 2004), antifúngico frente a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (REIGADA *et al.*, 2007; LAGO *et al.*, 2007), antioxidante (FINOTTI e DI MAJO, 2003; SIMÕES *et al.*, 2004), antibacteriano frente a *Helicobacter pylori* (KIM, BAE e HAN, 1999), neuroprotetora associada com os efeitos deletérios da produção aumentada de repetição CUG expandido contendo RNA (FURUYA *et al.*, 2005), citotóxica causada por expansões repetidas de CTG com capacidade para modular as vias apoptóticas (KIM, BAE e HAN, 1999) anticâncer com base na sua capacidade de induzir ou inibir a actividade de HIF-1 (HATTORI *et al.*, 2011), antianafilático com potente capacidade de inibir a ativação e desgranulação de mastócitos (PARK, PARK e KIM, 2005) e antialérgica (VEGA-VILLA *et al.*, 2008).

Nesse trabalho foi realizada a síntese de 5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona (isossacuranetina) e avaliada a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória através de ensaios de contorção abdominal induzido por ácido acético e contagem da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzido por carragenina e o seus resultados foram comparados com os obtidos pelo isômero 5,4'-di-hidroxi-7'-metoxiflavanona (Sacuranetina), isolado da fração em diclorometano das folhas de *M. hostilis* (Figura 2).

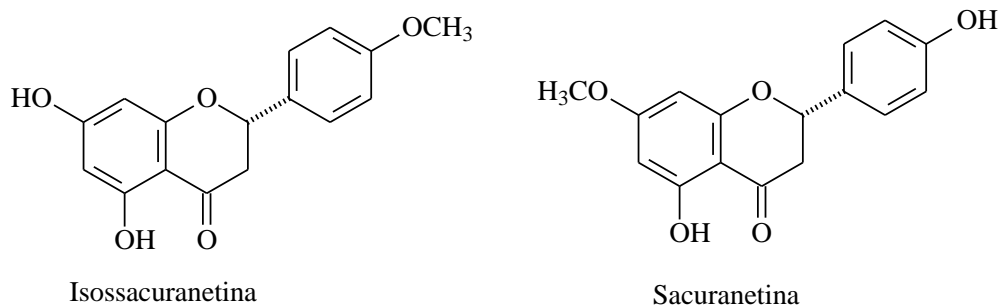


Figura 2. Estrutura da Isossacuranetina e sacuranetina.

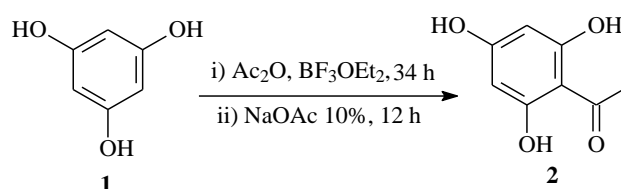
A sacuranetina foi a substância obtida em maior quantidade nas folhas de *M. hostilis*, e inicialmente foi identificada de forma equivocada como isossacuranetina, sendo depois identificada corretamente através de análise de EM. Devido a esse equívoco, foi realizada a síntese do isômero isossacuranetina que foi avaliado e comparado com a sacuranetina quanto à atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

MATERIAIS E MÉTODOS

SÍNTESE DE ISOSSACURANETINA

A síntese da isossacuranetina foi realizada em quatro etapas, seguindo a metodologia descrita por HONOHAN *et al* (1976).

Etapa 1 – Síntese do derivado da acetofenona

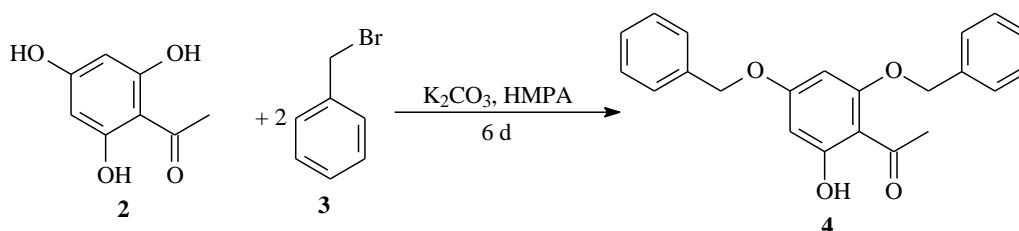


Uma solução de floroglucinol (**1**), Merck[®], 2,5 g, 198 mmol, e Ac₂O (anidrido acético), Merck[®], 19 mL, 199,5 mmol, em solução etérea de BF₃OEt₂ (trifluoreto de boro), QUELL[®], 7,5 mL, foram agitados a temperatura ambiente por 34 h. A essa mistura foi adicionado a

solução de NaOAc (acetato de sódio) 10%, Química Moderna[®], 7 mL, e deixado em repouso durante a noite.

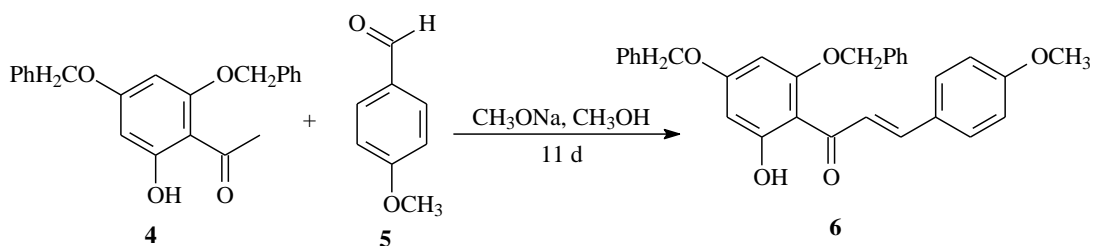
O precipitado formado foi filtrado, lavado com água e seco para obtenção de 2,4 g (96% de rendimento) do sólido amarelo 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona (**2**) (WEI e YU, 2008). Após confirmação do produto formado por RMN ¹H, ¹³C e IV, esse procedimento foi repetido para se obter uma maior massa de 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona (**2**).

Etapa 2 – Síntese do derivado 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona



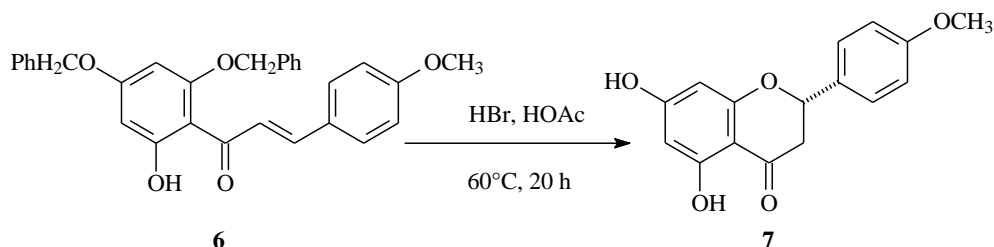
A partir de uma solução contendo 504 mg do 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona (**2**) dissolvida em 4 mL de HMPA (hexametilfosforamida), Sigma-Aldrich[®], seca foi adicionado K₂CO₃ (carbonato de potássio, 828 mg, 6 mmol) e brometo de benzila (**3**), 1,026 g, 800 μL, 6 mmol, Aldrich[®]. A mistura foi submetida a agitação magnética durante 6 dias, então, a mistura reacional foi vertida em 20 mL de água e extraída com éter (1 x 10 mL, 4 x 5 mL). A fase orgânica extraída foi lavada com água destilada (3 x 5 mL), seguida de solução de KOH (hidróxido de potássio) 5% (3 x 5 mL), água destilada novamente (3 x 5 mL) e solução salina saturada (2 x 5 mL) e, posteriormente foi seca com MgSO₄ (sulfato de magnésio) e evaporada para formar 428 mg (84,9% de rendimento) de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona (**4**), um óleo amarelo pálido (HONOHAN *et al.*, 1976). O produto formado foi identificado por dados obtidos no IV. Esse procedimento foi repetido para se obter uma maior massa de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona (**4**).

Etapa 3 – Síntese do derivado da chalcona



Aproximadamente 96 mg (0,28 mmol) de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona (4) foram dissolvidas em 10 mL de metanol, em um balão de fundo redondo, onde foi adicionado anisaldeído (5) (60 μL , 68 mg, 1,46 mmol, Merck®). A mistura foi levemente aquecida para se obter uma solução homogênea. Após resfriamento, foi adicionado metóxido de sódio (162 mg, 0,5 mL, 8,97 mmol) e a mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 11 dias. A suspensão amarela foi transferida para um funil de separação contendo 30 mL de água e 50 mL de acetato de etila quente ($\sim 50^\circ\text{C}$). As fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 15 mL) e solução salina (1 x 30 mL) e, posteriormente seca sobre MgSO_4 e evaporada para se obter 124,2 mg de 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona (6) (93% de rendimento) como um sólido amarelo (HONOHAN *et al.*, 1976). Após confirmação por dados obtidos no IV, esse procedimento foi repetido para se obter uma maior massa da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona (6).

Etapa 4 – Reação de desproteção da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona e formação de isossacuranetina



Para a obtenção da flavanona isossacuranetina (7), 90 mg da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona (6) foram dissolvidos em 8 mL de ácido acético sob aquecimento (90°C) e após resfriamento a 60°C , 0,4 mL de HBr aquoso (48%, Vetec®) foi adicionado tornando a solução vermelha, que foi agitada e mantida a 60°C , durante 20 horas. A mistura foi vertida em 50 mL de água destilada e, em seguida, extraída com acetato de etila (1 x 30

mL). A solução aquosa foi lavada com água destilada (2 x 30 mL) e bicarbonato de sódio 5% (2 x 30 mL), água destilada (1 x 30 mL) e solução salina (1 x 30 mL). Após secagem sobre $MgSO_4$, o solvente foi evaporado para obtenção do cristal que foi dissolvido em acetato de etila e submetido a fracionamento em coluna cromatográfica usando como fase estacionária sílica gel 60 e fase móvel diclorometano, aumentando a polaridade gradativamente com acetato de etila (HONOHAN *et al.*, 1976). Desta forma foram obtidos 54,34 mg de isossacuranetina (60,4%), que foi identificada através da análise de dados no IV e CG-EM, esse procedimento foi repetido para se obter uma maior massa da isossacuranetina (7). Desta forma a isossacuranetina foi obtida a partir de 4 etapas com um rendimento geral de 7,9%.

ISOLAMENTO DE SACURANETINA

Sacuranetina foi isolado da fração em diclorometano das folhas de *Mimosa hostilis* como descrito no Capítulo 3.

IDENTIFICAÇÃO DE ISOSSACURANETINA E SACURANETINA

Os espectros no infravermelho foram obtidos em Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, modelo IRAffinity-1, da Shimadzu. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr, e quando oleosas, como filmes em placa de NaCl.

Os espectros de RMN de 1H , de ^{13}C e EM foram obtidos como descrito no Capítulo 3.

ENSAIO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO

O teste antinociceptivo de contorção abdominal em camundongos induzido por ácido acético e o anti-inflamatório de quantificação da migração de neutrófilos para a cavidade abdominal induzido por carragenina foram realizados como descrito no Capítulo 6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A isossacuranetina é uma flavanona que foi isolada anteriormente na espécie *Mimosa hostilis* junto com seu isômero sacuranetina (Figura 1) (OHSAKI *et al.*, 2006). Essa última foi também isolado nesse trabalho (Capítulo 3) e em outra espécie do gênero, *M. tenuiflora* (NUNES *et al.*, 2009).

Como as duas substâncias são muito semelhantes, possuem propriedades espectroscópicas similares como UV, RMN ^1H e ^{13}C (KIM *et al.*, 2007b) o que levou inicialmente a uma identificação equivocada da sacuranetina isolada de *M. hostilis*. Além disso, a isossacuranetina já havia sido identificada em outros estudos desta mesma espécie. Com o objetivo inicial de se obter uma maior massa para um estudo anti-inflamatório mais completo, foi realizada a síntese da isossacuranetina.

A rota mais amplamente utilizada para a síntese de flavanonas é através da ciclização de 2'-hidroxichalconas que são preparados a partir da condensação aldólica de 2'-hidroxiacetofenonas e benzaldeídos utilizando vários reagentes como mostrado na Figura 3 (LEE e JUNG, 2005).

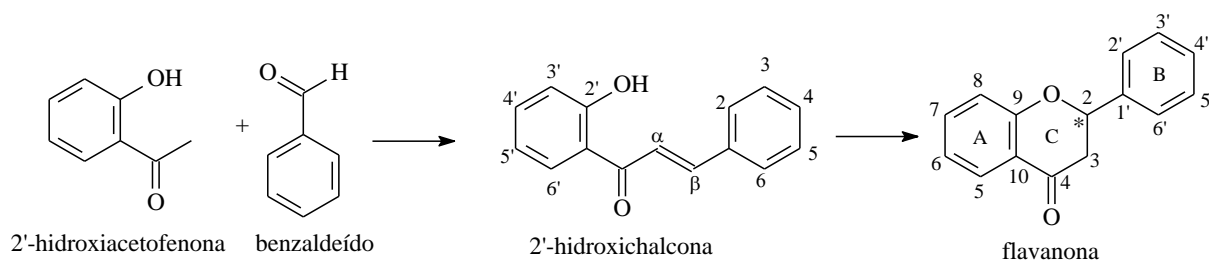


Figura 3. Rota utilizada para a síntese de flavanonas.

A estratégia geral da síntese usada envolveu a condensação aldólica de uma forma protegida de floroacetofenona (2,4,6-tri-hidroxiacetofenona) com anisaldeído (4-metoxibenzaldeído). A chalcona produzida (2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona) foi desprotegida e ciclizada a flavanona isossacuranetina na etapa final, o que proporciona melhor rendimento (HONOHAN *et al.*, 1976; URGANONKAR *et al.*, 2005).

A **etapa 1** para a formação da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona foi realizada com a acilação de Friedel-Crafts do floroglucinol (WEI e YU, 2008) com rendimento de 96%. A estrutura da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona foi confirmada através da análise dos dados de RMN ^1H . Os

singletos em δ 2,60 (3 H) e 5,79 (3 H) são conclusivos para a identificação do derivado. Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C em δ 32,7, 95,6, 103, 165,9, 166,3 e 204,6, corroboram com os dados anteriores. Também foi feito o espectro de IV da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona (Figura 4) onde foi observado as bandas característica da cetona ($\text{C}=\text{O}$) em $\bar{\nu}$ 1634 cm^{-1} e do estiramento das hidroxilas fenólicas em $\bar{\nu}$ 3126 cm^{-1} .

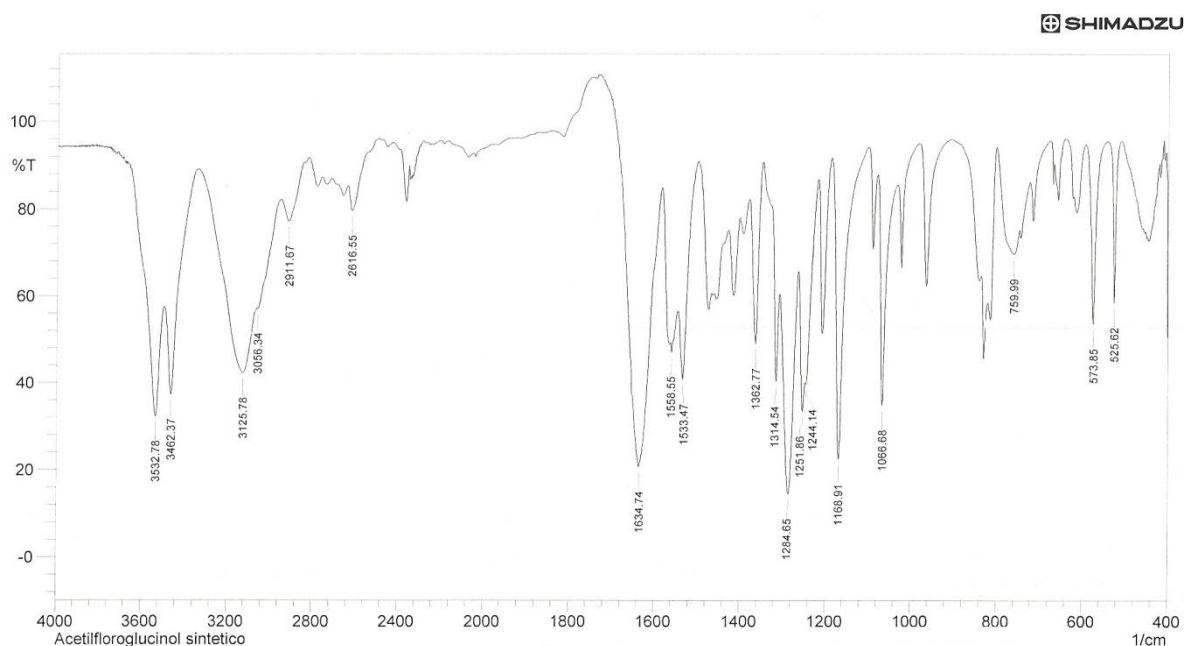


Figura 4. Espectro na região do Infravermelho da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona

Na **etapa 2**, a 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona foi seletivamente protegida com brometo de benzila usando carbonato de potássio em hexametilfosforamida à temperatura ambiente. A conversão de dois dos grupos hidroxila para éteres benzílicos é necessária para que haja um rendimento significativamente mais elevado na condensação aldólica (HONOHAN *et al.*, 1976; URGAONKAR *et al.*, 2005). A dibenzilação foi facilmente realizada e foi obtido 84,9% de rendimento do produto protegido de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona. O produto formado foi confirmado pelo desaparecimento das bandas de OH livre em $\bar{\nu}$ 3126 cm^{-1} (Figura 5).

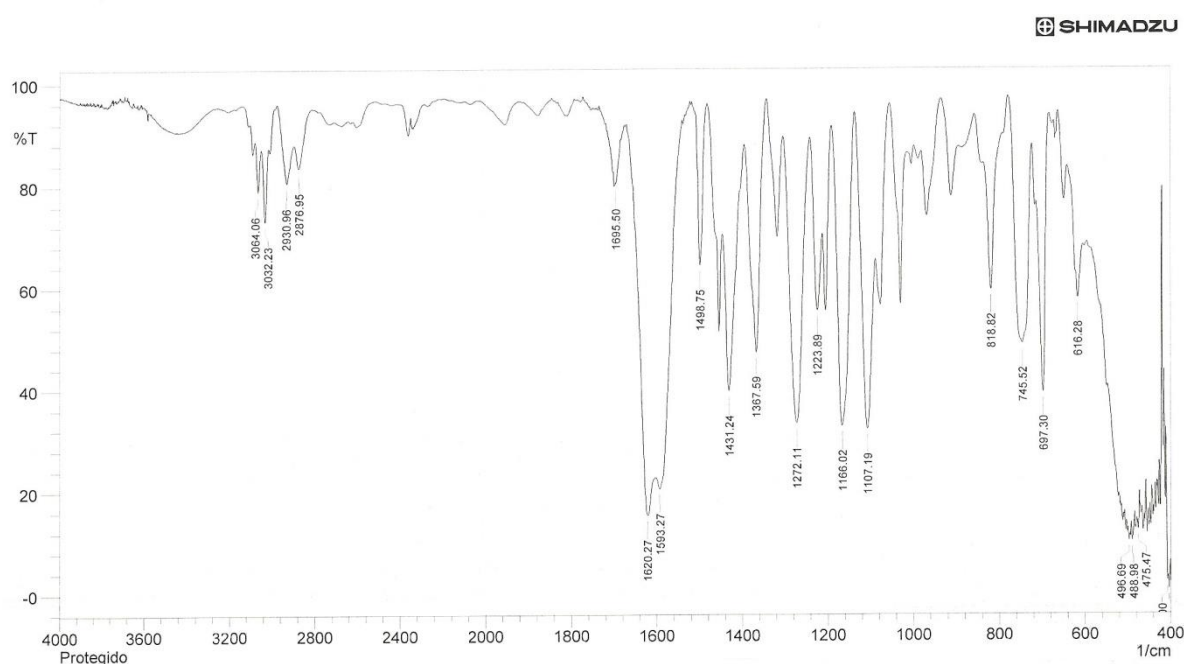


Figura 5. Espectro na região do Infravermelho de 4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona

A condensação aldólica da 2,4,6-tri-hidroxiacetofenona protegida (4,6-dibenziloxi-2-hidroxiacetofenona) com 4-metoxibenzaldeído ocorreu na **etapa 3** e produziu a 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona com 93,2% de rendimento na presença de metóxido de sódio em metanol. A purificação foi realizada por recristalização do sólido com éter em temperatura de ebulição (HONOHAN *et al.*, 1976). A síntese de 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona foi confirmada pelos dados observados no espectro no IV onde pode ser verificada a diminuição da frequência referente ao estiramento de C=O da cetona para $\bar{\nu}$ 1616 cm^{-1} (Figura 6), devido a introdução na molécula de uma α,β -insaturação considerando que na ligação de valência da enona formada tem caráter de ligação simples e por isso mais fraca (Figura 7), o que reduz a frequência de vibração de estiramento em cerca de 10 cm^{-1} (FIELD, STERNHELL e KALMAN, 2007).

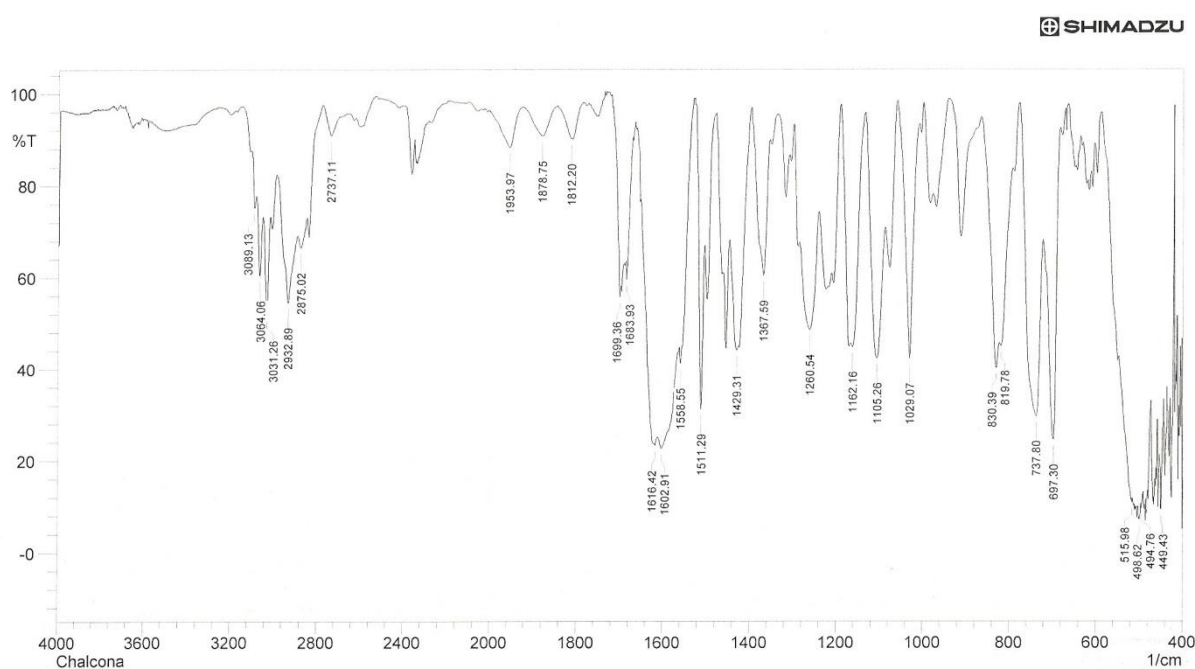


Figura 6. Espectro na região do Infravermelho da 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona

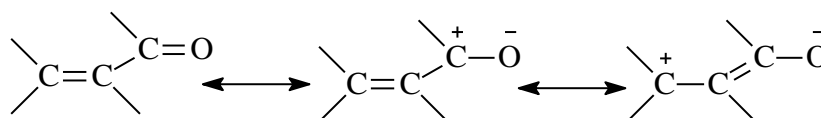


Figura 7. Estrutura do enol formado da carbonila α,β -insaturação

A **etapa 4** foi a etapa final onde ocorreu a desbenzilação de 2',4'-dibenziloxi-6'-hidroxi-4-metoxichalcona com concomitante ciclização e formação da flavanona isossacuranetina em solução aquosa de HBr (48%) em ácido acético a 60 °C (HONOHAN *et al.*, 1976).

A ciclização de 2'-hidroxichalconas a flavanonas é um modelo simples da adição de um nucleófilo de oxigênio a um alqueno, e consiste de um passo fundamental na biossíntese dos flavonoides. A reação produz o núcleo cromano característico de muitos flavonoides, e são, entre outras, responsáveis pela aparência colorida de muitas flores, o gosto amargo da toranja, a cor de vinho tinto e proteção antimicrobiana de plantas. Em plantas e também em fungos, bolores e bactérias a reação é catalisada pela enzima isomerase de chalcona que gera 2*S*-flavanonas com surpreendente seletividade enantiomérica estimada em $S/R = 100'000$ ($ee =$

99,998%) (DITTMER, RAABE e HINTERMANN, 2007), como a síntese foi realizada sem nenhum direcionamento enantiomérico, o produto formado foi uma mistura racêmica dos isômeros *R* e *S*.

Isossacuranetina foi obtido como um sólido amarelo cristalino após purificação em coluna cromatográfica em gel de sílica. O rendimento geral foi de 7,9% e a isossacuranetina foi identificada por IV, onde foi possível observar as bandas de OH em $\bar{\nu}$ 3481 indicando que houve a desbenzilação e, a banda de estiramento de C=O em 1638 cm^{-1} indicando que houve a ciclização (Figura 8).

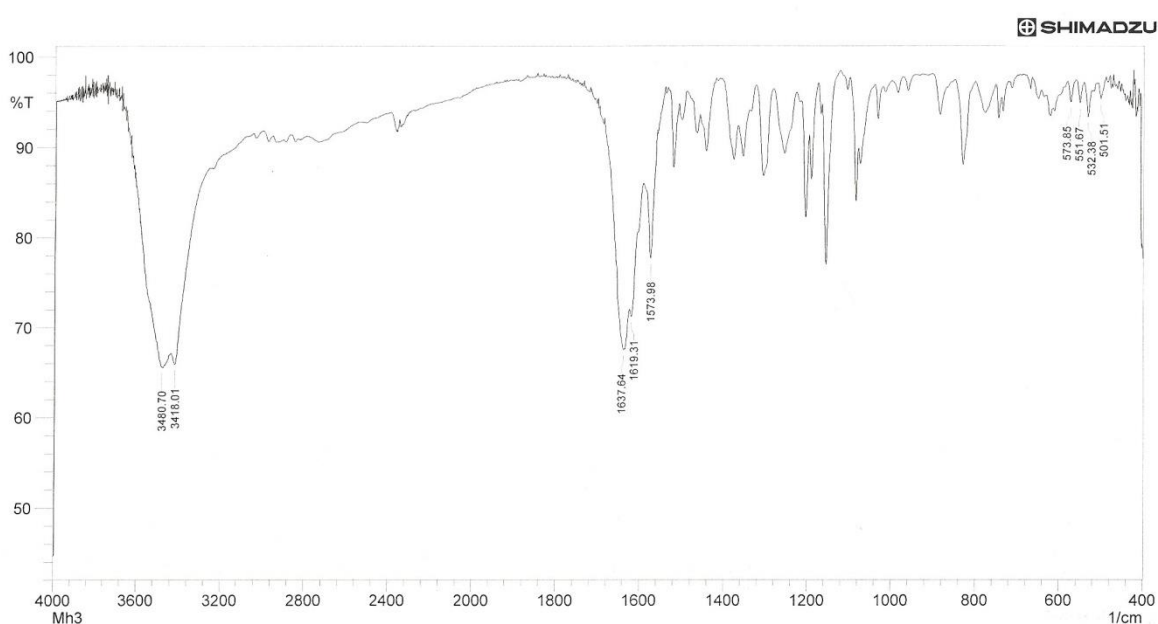


Figura 8. Espectro na região do Infravermelho da Isossacuranetina

A análise feita em CG-EM permitiu verificar a pureza do composto através do cromatograma obtido após derivatização (Figura 9) e a identificação correta da estrutura através do espectro de massas (Figura 10), que apresentou os principais fragmentos em m/z 415 $[M-15]^+$, que é o pico base; 73 $[(CH_3)_3Si]^+$, com intensidade de 63%, os dois picos indicando que o composto foi sililado, confirmando a presença de OH; 296 $[M-134]^+$ com intensidade em 29%. O pico do íon molecular 430 $[M]^+$, tem intensidade inferior a 10%.

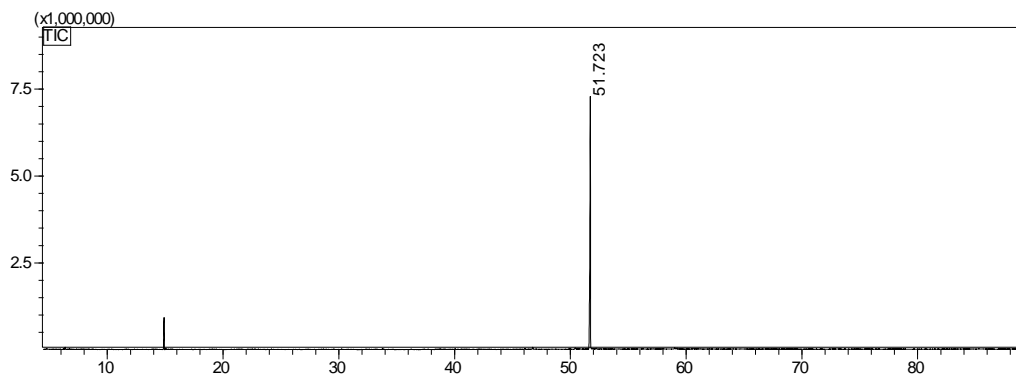


Figura 9. Cromatograma de íons totais da isossacuranetina após derivatização.

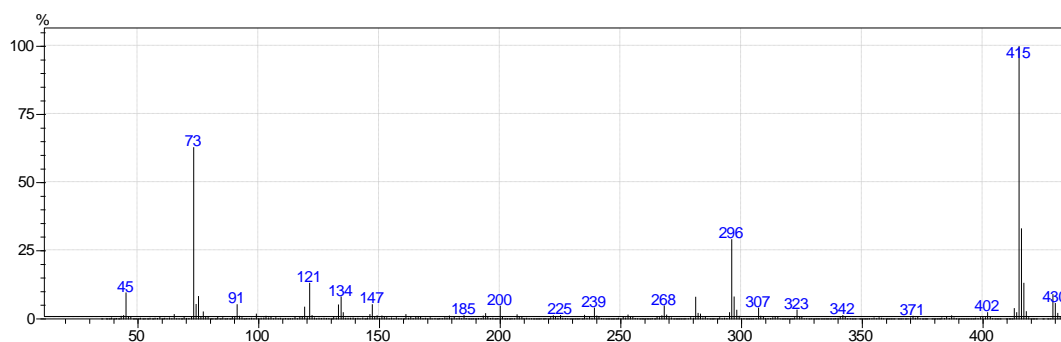


Figura 10. Espectro de massas da isossacuranetina após derivatização.

Essa análise por EM foi essencial para observar o equívoco da identificação da substância isolada de *M. hostilis*. Ao comparar os espectros do produto formado (Figura 10) e da substância isolada (Figura 11) observou-se tratar-se de substâncias de mesma massa molecular (m/z 430), porém com padrão de fragmentação diferente.

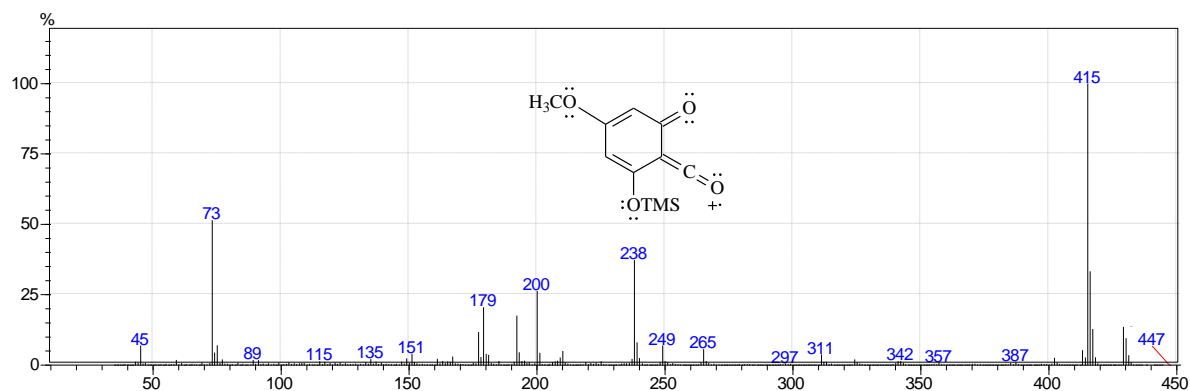


Figura 11. Espectro de massas da sacuranetina após derivatização.

O fragmento em íon de m/z 296 em isossacuranetina e 238 em sacuranetina refere-se ao fragmento do anel A (Figura 12), originado da clivagem do anel C pela reação retro Diels-Alder (SILVA, CARVALHO e BRAZ-FILHO, 2009) e permite confirmar que em isossacuranetina o anel A só possui grupos hidroxilas, e por isso, esse fragmento também permite diferenciar por EM a isossacuranetina da sacuranetina.

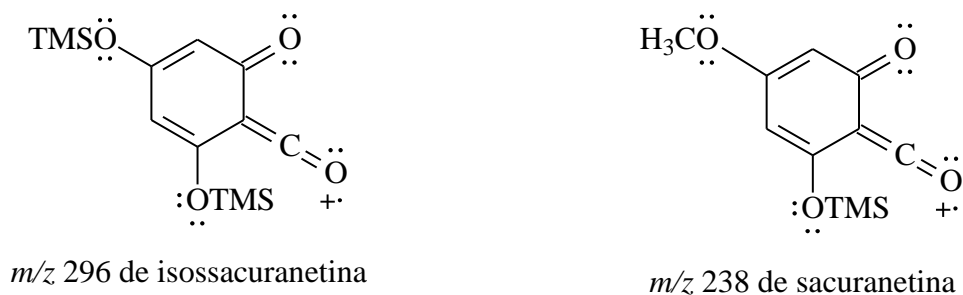


Figura 12. Fragmentos dos íons de m/z 296 e 238 originados da clivagem do anel C da isossacuranetina e sacuranetina pela reação retro Diels-Alder.

Esse fragmento foi essencial para a confirmação da metoxila na posição C-4' de isossacuranetina e também para a identificação da sacuranetina, que possui a metoxila em C-7. Após determinação exata das estruturas de Sacuranetina e Isossacuranetina (Figura 2) foi realizado com as substâncias puras os testes para avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório das mesmas.

Inicialmente, foi realizado com a sacuranetina o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, um típico modelo de triagem para avaliar a dor de origem inflamatória (IKEDA *et al.*, 2001), nas doses de 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg para avaliar a melhor concentração para ser usada nos demais testes. A concentração de 200 mg/Kg apresentou redução significativa ($p < 0,05$) do número de episódios de contorção em comparação ao grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v). (Figura 13).

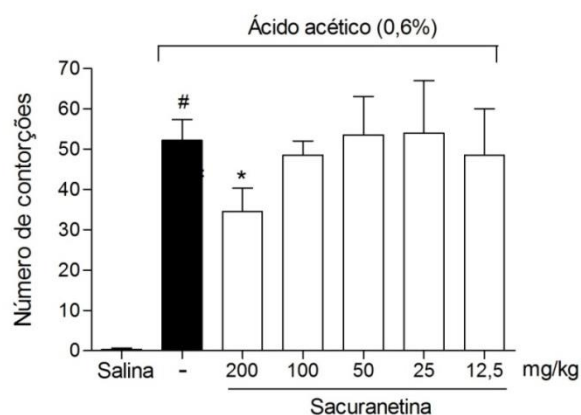


Figura 13. Efeito da sacuranetina no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com diferentes doses (12,5 25, 50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.). Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção em camundongos ($n = 6$). (-) veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo e tratados com o sacuranetina, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Quando comparado na concentração de 200 mg/Kg a sacuranetina, isolada da fase em diclorometano das folhas de *Mimosa hostilis*, apresentou melhor resultado ($p < 0,05$) que a isossacuranetina sintetizada que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) mas também apresentou uma redução sensível do número de contorção em comparação ao grupo tratado com o veículo (Figura 14).

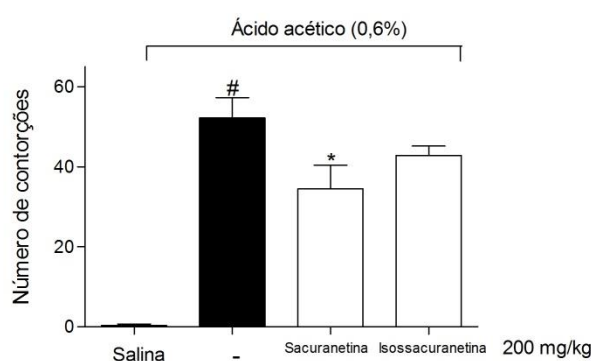


Figura 14. Efeito da sacuranetina e isossacuranetina no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos pré-tratados com 200 mg/Kg, s.c. Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção em camundongos ($n = 6$). (-) veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo e tratados com sacuranetina e isossacuranetina, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Como o teste de contorção induzido por ácido acético provoca dor inflamatória através da indução da permeabilidade capilar e liberação de ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase e da biossíntese de prostaglandinas (DERAEDT *et al.*, 1980; FRANZOTTI *et al.*, 2000, NEMIROVSKY. *et al.*, 2001), sugere-se que a sacuranetina pode estar envolvida na atividade analgésica ao nível periférico evitando a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas através da inibição da enzima ciclooxigenase e/ou inibir a síntese e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias, ou ainda por ação direta sobre os receptores peritoneais.

Para avaliar o efeito anti-inflamatório de sacuranetina e isossacuranetina foi realizado o testes de inibição da migração de neutrófilos induzida pela Cg para a cavidade peritoneal. Este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, sob ação de agentes quimiotáticos sensíveis à ação de anti-inflamatórios (VINEGAR, TRUAX e SELOH, 1973).

O pré-tratamento das substâncias puras a 200 mg/Kg (s.c.) diminuiu a migração de neutrófilos nos camundongos induzida pela injeção intraperitoneal de Cg (500 µg/cavidade) após 4h, mas apenas a sacuranetina apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao veículo (Figura 15).

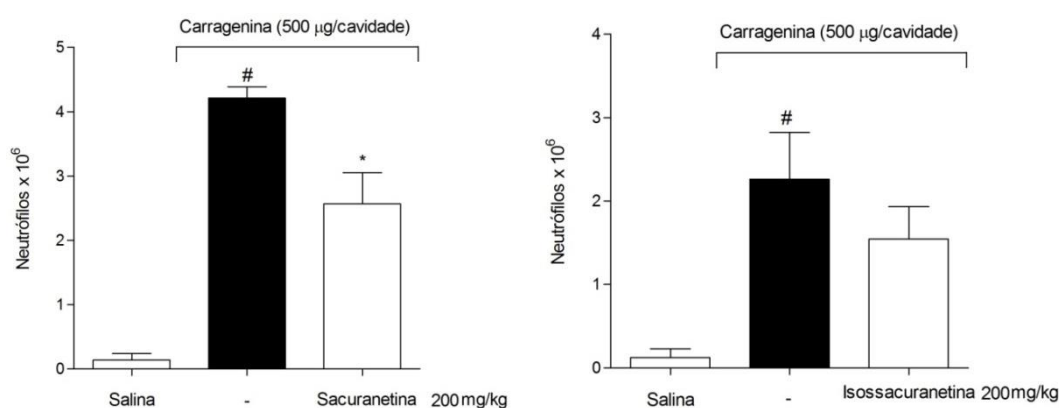


Figura 15. Efeito de sacuranetina e isossacuranetina (200 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 µg/cavidade) induzir peritonite. Cada valor representa a média ± D.P. (-) veículo (etanol, 10% v/v). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

O processo de migração leucocitária é dependente da produção e da liberação de mediadores quimiotáticos, como os produtos da lipoxigenase e quimiocinas, sendo constituído por eventos como a marginalização e rolamento de leucócitos, a sua aderência e o processo de transmigração em direção à região lesionada. Esse teste reforça a ação da sacuranetina por impedir a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou bloquear alguma fase da migração dos leucócitos (MULLER, 2002).

A sacuranetina isolada das folhas de *M. hostilis* e também presente nas cascas, apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, o que pode também ser um dos compostos responsáveis pelo efeito presente no extrato bruto, uma vez que o extrato apresentou atividade em melhor concentração, provavelmente por existir mais substâncias ativas no extrato ou a mesma estiver com o efeito potencializado, provavelmente devido ao efeito de sinergismo que pode ocorrer entre as diferentes substâncias presentes no extrato.

A isossacuranetina sintetizada apresentou atividade menor, porém é importante lembrar que o produto sintetizado trata-se da mistura racêmica, enquanto que a sacuranetina possui estereoquímica *S*, por ser um composto natural biossintetizado na presença de enzimas enantioméricas.

CONCLUSÃO

A isossacuranetina (5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona) foi sintetizada, mas é necessário pesquisar uma estratégia de síntese mais rápida e com melhor rendimento para tornar a síntese viável. A substância sacuranetina (5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona) isolada da fração em diclorometano das folhas de *Mimosa hostilis* apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória melhor do que a isossacuranetina. Outros estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nestas atividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASZTEMBORSKA, M.; MISKIEWICZ, M. e SYBILSKA, D. Separation of some chiral flavanones by micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2527-2531, 2003.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F. e FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DE SOUSA, J. P.; BUENO, P. C.; GREGÓRIO, L. E., DA SILVA FILHO, A. A.; FURTADO, N. A.; DE SOUSA, M. L. e BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2656-2665, 2007.

DITTMER, C.; RAABE, G. e HINTERMANN, L. Asymmetric Cyclization of 2-hydroxychalcones to Flavanones: Catalysis by Chiral Brønsted Acids and Bases. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 5886–5898, 2007.

FIELDS, L. D.; STERNHELL, S. e KALMAN, J. R. **Organic Structures from Spectra**. 4. Ed, John Wiley and sons LTD. 2007. 453 p.

FINOTTI, E. e DI MAJO, D. Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. **Nahrung/Food**, v. 47, p. 186–187, 2003.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V.; RODRIGUES, H. M.; MOURÃO, R. H.; ANDRADE, M. R. e ANTONIOLLI, A. R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273-277, 2000.

FURUYA, H.; SHINNOH, N.; OHYAGI, Y.; IKEZOE, K.; KIKUCHI, H.; OSOEGAWA, M.; FUKUMAKI, Y.; NAKABEPPU, Y.; HAYASHI, T. e KIRA, J. Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformant. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 503–516, 2005.

GAFFIELD, W. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. Determination of aglycone chirality in flavanone glycosides. **Tetrahedron**, v. 26, p 4093-4108, 1970.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA, A. L. B. D.; ALVES, M. M.; MATOS, M. F. C. e SCALIANTE, A. M. Bioactive Flavonoids and Triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1223-1228, 2006.

HATTORI, H.; OKUDA, K.; MURASE, T.; SHIGETSURA, Y.; NARISE, K.; SEMENZA, G. L. e NAGASAWA, H. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5392–5401, 2011.

HONOHAN, T.; HALE, R. L.; BROWN, J. P. e WINGARD JR., R. E. Synthesis and Metabolic Fate of Hesperetin-3-14C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 906-911, 1976.

IKEDA, Y.; UENO A.; NARABA, H. e OH-ISHI. Involvement of vaniloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

KIM, D.; JUNG, E.; SOHNG, I.; HAN, J.; KIM, T. e HAN, M. J. Intestinal Bacterial Metabolism of Flavonoids and its Relation to Some Biological Activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, p. 17-23, 1998.

KIM, D.; BAE, E. e HAN, M. J. Anti-*Helicobacter pylori* activity of the metabolites of poncicrin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 422-424, 1999.

KIM, J.; HAN, A.; PARK, E.; KIM, J.; CHO, W.; LEE, J.; SEO, E. e LEE, K. Inhibition of LPS-Induced iNOS, COX-2 and Cytokines Expression by Poncicrin through the NF- κ B Inactivation in RAW 264.7 Macrophage Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 2345-2351, 2007a.

KIM, J.; PARK, K.; LEE, C. e CHONG, Y. Synthesis of a Complete Series of O-Methyl Analogues of Naringenin and Apigenin. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 28, p. 2527-2530, 2007.

KWON, C.; PAIK, S. R. e JUNG, S. Enantiomeric separation of some flavanones using shinorhizobial linear octasaccharides in CE. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4284-4290, 2008.

LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; REIGADA, J. B.; SOARES, M. G.; ROESLER, B. P. E KATO, M. J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 1222-1224, 2007.

LEE, J. I. e JUNG, M. G. A New Route for the Synthesis of Flavanones from 2-Methoxybenzoic Acids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, p. 2044-2046, 2005.

METWALLY, A. M. e EKEJIUBA, E. C. Methoxylated flavonols and flavanones from *Eupatorium odoratum*. **Planta Médica**, v. 42, p. 403-405, 1981.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A. A.; NUNES, G. A.; BUENO, P. C.; DE SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K. e SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 463-468, 2007.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 521-533, 2002.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V. e JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, n. 1, p. 197-203, 2001.

NUNES, X. P.; LIRA, D. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, D. A.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. Flavonas e Flavanonas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.

OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H. e FUKUYAMA, Y. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 1728-1729, 2006.

PARK, S. H.; PARK, E. K. e KIM, D. H. Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from *Citrus unshiu* and *Poncirus trifoliata*. **Planta Médica**, v. 71, p. 24-27, 2005.

REIGADA, J. B.; TCACENCO, C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M. J.; PORTO, A. L. M. e LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (*RS*)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 1054-1058, 2007.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y. e KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. e BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, p. 1119-1128, 2009.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K. e LUCISANO-VALIMA, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59–65, 2004.

SUKSAMRARN, A.; CHOTIPONG, A.; SUAVANSRI, T.; BOONGIRD, S.; TIRNSUKSAI, P.; VIMUTTIPONG, S. e CHUAYNUGUL, A. Antimycobacterial Activity and Cytotoxicity of Flavonoids from the Flowers of *Chromolaena odorata*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 507-511, 2004.

TAVARES, D. C.; LIRA, W. M.; SANTINI, C. B.; TAKAHASHI, C. S. e BASTOS, J. K. Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. **Planta Médica**, v. 73, p. 1531-1536, 2007.

URGAONKAR, S.; LA PIERRE, H. S.; MEIR, I.; LUND, H.; CHAUDHURI, D. R. e SHAW, J. T. Synthesis of Antimicrobial Natural Products Targeting FtsZ:(±)-Dichamanetin and (±)-2'''-Hydroxy-5''-benzylisouvarinol-B. **Organic Letters**, v. 7, p. 5609-5612, 2005.

VANAMALA, J.; REDDIVARI, L.; YOO, K. S.; PIKE, L. M. e PATIL, B. S.. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of Orange and grapefruit juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 157-166, 2006.

VEGA-VILLA, K. R.; REMSBERG, C. M.; PODELNYK, K. L. e DAVIES, N. M. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of isosakuranetin in rat urine. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 142-147, 2008.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F. e SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, p. 711-714, 1973.

WEI, G. e YU, B. Isoflavone Glycosides: Synthesis and Evaluation as α -Glucosidase Inhibitors. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3156-3163, 2008.

WISTUBA, D.; TRAPP, O.; GEL-MORETO, N.; GALENSA, R. E SCHURIG, V. Stereoisomeric Separation of Flavanones and Flavanone-7-O-glycosides by Capillary Electrophoresis and Determination of Interconversion Barriers. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3424-3433, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

A espécime de *Mimosa hostilis* coletada na FLONA, região de semiárido da Bahia, apresentou na composição química dos extratos etanólicos da casca, galho e folha principalmente carboidratos, ácidos graxos, compostos fenólicos e terpenos, sendo que as cascas e galhos apresentam grande similaridade química. A fração em diclorometano da folha foi usada para as análises fitoquímicas de onde foram isolados e identificados 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de etila (FDF1), ácido 4-hidroxibenzóico (FDF2), 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona (M1), 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (M2), 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (M3), 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona (M4), 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona (M5), 5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavonol (M6), 5,6-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol (M7) e 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol (M8) que apresentaram atividade inibitória de AChE para tratamento da doença de Alzheimer. Os demais extratos (cascas e galhos) ainda são promissores para a continuidade deste trabalho, podendo ser isolado substâncias responsáveis pelas atividades biológicas presentes.

Os extratos etanólicos de cascas, galhos e folhas de *M. hostilis*, conhecida popularmente como jurema preta, apresentaram atividade antioxidante como bons sequestradores de radicais livres, sendo classificados como bons bloqueadores de reações oxidativas testados pelos métodos de DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico. Essa atividade foi relacionada com o teor de Fenólicos totais analisados pelo método de Folin-Ciocalteu. Outros testes para avaliar a ação antioxidante também podem ser realizados incluindo testes *in vivo*.

O extratos etanólicos de cascas e folhas foram testados quanto a CIM e CBM. O extrato dos galhos não foram testados devido a similaridades química determinada por CG-EM com o extrato da casca. Os extratos apresentaram forte ação inibitória para os microrganismos *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 podendo ser realizado mais testes para assegurar o uso dessas plantas como potencial antimicrobiano. Além do potencial uso desta planta para inibir o crescimento e aderência de uma importante bactéria causadora da cárie, *S. mutans* UA159 observado pela determinação de CIMA e análise de controle químico do biofilme dental, sendo necessário desenvolver mais estudos para elucidar o mecanismo de ação sobre os fatores de virulência desse microrganismo.

O extrato da casca foi também avaliado *in vivo* quanto a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória através dos ensaios de contorção abdominal induzidas por ácido acético, hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, teste da pressão crescente na pata, determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, avaliação da permeabilidade vascular por azul de Evans, detecção de citocinas por imunofluorescência, ensaio da atividade de mieloperoxidase e análise de expressão protéica mesentérica por *Western Blot* apresentando atividade provavelmente por inibição da produção de citocina pró-inflamatória. Essa atividade comprovada justifica o uso popular no tratamento de tosse e cicatrização de feridas, sendo necessário testar a toxicidades desta espécie para garantir o uso popular.

A substância encontrada em maior quantidade na fração em diclorometano das folhas, estudada quimicamente, foi a flavanona sacuranetina. No entanto, a mesma havia sido identificada equivocadamente como isossacuranetina, que foi sintetizada. Foi então feito o teste de contorção abdominal induzidas por ácido acético e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina para comparar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das duas substâncias e a ação da sacuranetina isolada apresentou melhor atividade do que a sintetizada, porém ainda não foi possível associá-la a atividade no extrato.

Este trabalho foi de fundamental importância por ter como base uma espécie vegetal adaptada a vegetação de caatinga no semiárido baiano e usado pela população local para fins medicinais. Além disso, combina informações de estudos químicos e farmacológicos com uma clara interdisciplinaridade entre as diferentes áreas de conhecimento (química, bioquímica, farmacologia, botânica, microbiologia, fisiologia, odontologia, etc.), uma vez que uma das razões que impedem o desenvolvimento efetivo da indústria fitofarmacêutica e a pesquisa no Brasil é a ausência dessa real integração e complementação.