

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
EXTRATOS DE *Goupia glabra* AUBLET (CUPIÚBA)

PRISCILLA DE AZEVEDO OLIVEIRA

MANAUS
2010

PRISCILLA DE AZEVEDO OLIVEIRA

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central map of the state of Amazonas, surrounded by a green laurel wreath. Above the wreath are three pink flowers, and below it is a yellow star. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a circle around the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written around the bottom.

ESTUDO FITOQUIMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
EXTRATOS DE *Goupia glabra* AUBLET (CUPIÚBA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS
2010

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

- O48e Oliveira, Priscilla de Azevedo
Estudo fitoquímico e atividades biológicas de extratos de *Goupia glabra* Aublet (Cupiúba) / Priscilla de Azevedo Oliveira. - Manaus, AM : UFAM, 2010.
142 f. : il. color. ; 30 cm
- Inclui referências.
Dissertação (Mestre em Química). Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior.
1. Bioquímica 3. Química vegetal I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Título

CDU (2007): 582.754:547.1(043.3)

PRISCILLA DE AZEVEDO OLIVEIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
EXTRATOS DE *Goupia glabra* AUBLET (CUPIÚBA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Aprovada em 02 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliveira, Membro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Saraiva Nunomura, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dedico esse trabalho a meu avô
Francisco Renato Nobre, que
sempre me considerou uma vencedora.
Saudades eternas.

Gratidão Eterna

*Sei o que fez
Sei do que fizeste
Mesmo com tantos ais
Por tudo que me destes*

*Faz porque gosta de mim
Porque de ti sou parte
Quanto não ao invés de sim
Reprovando as minhas artes*

*Lembro-me quando criança
Das grandes dificuldades
Da falta de tempo que tinhas
Das grandes necessidades*

*Saías de casa bem cedo
Munido de dignidade
Levando a marmitta enrolada
Recheada de honestidade*

*Fiel aos seus compromissos
Levou-nos à universidade
Sentia-se todo orgulhoso
Por ter os filhos formado*

*Hoje sou o que sou
Porque você me ensinou
Outro não escolheria
Pois certamente eu não o amaria
(Pai desconhecido)*

Pai e mãe amo vocês, serei eternamente grata a tudo que fizeram por mim. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, que me deu forças para concretizar esse sonho.
- À minha mãe **Maria Benedita**, meu pai **Francisco Terso**, minha avó **Maria do Carmo** e meu irmão **Rafaell** pelo amor, carinho, incentivo e por sempre estarem presentes em minha vida.
- Ao meu marido **Allan Delon** pelo amor e por estar comigo nos momentos bons e nas adversidades.
- Ao meu orientador **Valdir Florêncio da Veiga Junior** pela confiança em mim, no meu trabalho e pelo incentivo constante à pesquisa científica.
- Aos amigos: **André, Paula, Pri Moraes, Roosevelt e Vanessa**, pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades.
- Agradeço aos meus queridos amigos que têm um lugar especial no meu coração: **Igor, Joelma, Klenicy e Lidiam** por me encorajarem sempre e confiarem em mim e no meu trabalho.
- À todos meus colegas de laboratório pela ajuda nas horas necessárias.
- Aos colegas e amigos: **Erika, Iandara, Karlinha, Milena, Neidimara, Orlando, Rafael e Thamires**, que já saíram do laboratório, mas continuam no meu coração.
- Aos colegas do laboratório B8: **Júnior, Héctor e Dominique** por me ajudarem quando precisei e pelas visitas constantes.
- Aos Profs. Drs. **Manoel Odorico de Moraes** e **Cláudia de Oliveira Pessoa**, responsáveis pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pela realização dos ensaios de atividade citotóxica em células tumorais.
- Ao Prof. Dr. **Celso Vataru Nakamura**, responsável pelo Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, pela realização dos ensaios de atividade antimicrobiana.

- Às professoras **Maria Lúcia Belém** e **Maria da Paz** pelas importantes observações e correções durante o Exame de qualificação.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.
- À todos os professores do corpo docente do Programa de Pós-graduação em Química por não medirem esforços em repassar seus conhecimentos aos alunos, dando ferramentas valiosas para minha formação profissional.
- À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre a começar...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo...

Fazer da queda um passo de dança...

Do medo uma escada...

Do sonho uma ponte...

Da procura um encontro...

E assim terá valido a pena.

(Fernando Sabino)

RESUMO

A espécie *Goupia glabra* Aublet (Goupiaceae), denominada popularmente como cupiúba, é utilizada na medicina popular contra diversas doenças. Suas cascas são utilizadas como analgésico dentário, como vermífugo, no tratamento de malária, catapora e eczema. As folhas são utilizadas contra sífilis, doenças oculares, enxaqueca, varíola e como cicatrizante. O presente trabalho teve como objetivo quantificar compostos fenólicos e avaliar as atividades antioxidante, inibidora de acetilcolinesterase, toxicidade em *Artemia salina*, antitumoral e antimicrobiana de extratos de folhas, galhos finos e galhos grossos de cupiúba. O material seco foi triturado e submetido à extração em aparelho de Soxhlet com solventes de polaridade crescente (Hexano, AcOEt e MeOH). A prospecção fitoquímica foi realizada para diferentes classes de metabólitos, sendo observados resultados positivos para esteróis em todos os extratos, triterpenóides e algumas classes de flavonóides nos extratos obtidos em acetato de etila e metanol. O fracionamento do extrato em hexano de folhas (EHF) resultou no isolamento de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol. Do extrato em AcOEt de folhas (EAF) foi isolado o catecol, um fenol simples de distribuição restrita na natureza. O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG). A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade seqüestrante do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), utilizando quercetina como padrão externo, expressos como valores de Concentração eficiente (CE₅₀). Foi observada uma correlação positiva entre os fenólicos totais e a CE₅₀, ou seja, quanto maior a quantidade de fenólicos, menor a CE₅₀. O extrato em AcOEt das folhas (EAF) foi o que apresentou maior potencial antioxidante [CE₅₀=9,76 $\pm$ 0,42 μ g/mL (cubeta) e CE₅₀= 19,87 $\pm$ 0,31 μ g/mL (microplaca)]. A toxicidade dos extratos foi verificada através de bioensaios com microcrustáceo *A. salina* e expressa em % de mortalidade das larvas. A análise qualitativa da atividade anticolinesterase foi realizada de acordo com o método de Ellman (modificado), com resultados negativos para inibição da enzima acetilcolinesterase. A atividade antitumoral foi avaliada contra quatro linhagens de células (leucemia, mama, cólon e glioblastoma) utilizando método de análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazonium (MTT) em azul de formazam segundo o método de Mossman. Os melhores resultados foram observados para os extratos obtidos em AcOEt, principalmente para células HCT-8 (cólon) que variaram de 58,35 a 77,12%. O extrato obtido em AcOEt dos galhos grossos (EAGg) apresentou valor de CI₅₀ = 13,73 μ g/mL para a linhagem HL-60 (leucemia). Esse extrato foi fracionado e a fração EAGg5 apresentou percentual de inibição de crescimento celular de 85,37 e 101,37% para as linhagens SF-295 (glioblastoma) e MDAMB-435 (mama), respectivamente. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da concentração inibitória mínima (MIC) que foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo Müeller-Hinton para bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e em meio líquido Sabouraud para fungos (*Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Todos os extratos demonstraram algum grau de atividade bacteriana e fungicida, com destaque para os extratos obtidos em AcOEt que apresentaram inibição moderada de crescimento microbiano. Para avaliar o efeito dos extratos no crescimento dos protozoários foi realizado estudo *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O extrato EAGg mostrou atividade antiproliferativa, tanto contra *L. amazonensis* quanto para *T. cruzi*, com valores de IC₅₀ de 86 e 40 μ g/mL, respectivamente. A significativa atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana observada nos extratos de cupiúba destaca seu elevado potencial para a obtenção de produtos biotecnológicos.

Palavras chave: *G. glabra*, Goupiaceae, atividades biológicas, catecol

ABSTRACT

The species *Goupia glabra* Aublet (Goupiaceae), popularly known as cupiúba is used in popular medicine against several diseases. Their barks are used as dental analgesic, as a vermifuge, to treat malaria, chickenpox and eczema. The leaves are used against syphilis, ocular disorders, migraine, smallpox and as healing. This study aimed to quantify the phenolic compounds and evaluate the antioxidant, inhibiting acetylcholinesterase, brine shrimp toxicity, antitumor and antimicrobial activities of extracts of leaves, thin and thick branches of cupiúba. The dry material was crushed and subjected to Soxhlet extraction using solvents in increasing order of polarity (hexane, ethyl acetate and methanol). The phytochemical screening was performed for different classes of metabolites, observed positive results for sterols in all extracts and terpenoids and some classes of flavonoids in the extracts obtained in ethyl acetate and methanol. The fractionation of the hexane extract of leaves (EHF) resulted in the isolation of a mixture composed by β -sitosterol and stigmasterol. From ethyl acetate extract of leaves (EAF) was isolated catechol, a simple phenol with restricted distribution in nature. The total phenolic content of extracts was determined using the Folin-Ciocalteu and the result was expressed as gallic acid equivalents (GAE). The antioxidant activity was assessed by the ability of capturing the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), using quercetin as external standard, expressed as value of the effective concentration (EC₅₀). We observed a positive correlation between total phenolics and EC₅₀, ie as greater the amount of phenolics smaller is the EC₅₀. The ethyl acetate extract of the leaves (EAF) presented the highest antioxidant potential [EC₅₀ = 9.76 ± 0.42 µg/mL (quartz cuvette) and EC₅₀ = 19.87 ± 0.31 µg/mL (microplate)]. The toxicity of the extracts was verified by bioassays with microcrustacea *A. salina* and expressed in percentual mortality of nauplius. Qualitative analysis of anticholinesterase activity was performed according to the method of Ellman (modified), presenting negative results. The antitumor activity was evaluated against four cell lines (leukemia, breast, colon and glioblastoma) using colorimetric analysis method based on conversion of salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazonium bromide (MTT) into blue formazam by the method of Mossman. The best results were observed for the ethyl acetate extracts, especially for cells HCT-8 (colon) that ranged from 58.35 to 77.12%. The ethyl acetate extract obtained from thick branches (EAGg) showed values of IC₅₀ = 13.73 µg/mL for strain HL-60 (leukemia). This extract was fractionated and the fraction EAGg5 showed the percentage of cell growth inhibition of 85.37 and 101.37% for the lines SF-295 (glioblastoma) and MDAMB-435 (breast), respectively. The antimicrobial activity was conducted using the minimum inhibitory concentration (MIC) that was determined by microdilution in Mueller-Hinton broth for bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and in liquid Sabouraud for fungi (*Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*). All extracts showed some degree of bacterial and fungicidal activity, especially the ethyl acetate extracts which showed moderate inhibition of microbial growth. The effect of extracts on growth of protozoa in vitro study was evaluated with promastigotes of *Leishmania amazonensis* and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. EAGg extract showed antiproliferative activity against both *L. amazonensis* and *T. cruzi*, with IC₅₀ values of 86 and 40 µg/mL, respectively. The significant antioxidant, antitumor and antimicrobial activities observed in the extracts of cupiúba detaches its high potential for obtaining of biotechnological products.

Keywords: *G. glabra*, Goupiaceae, biological activities, catechol

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ESQUEMAS	xix
LISTA DE GRÁFICOS	xx
LISTA DE ESPECTROS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. GERAL	6
2.2. ESPECÍFICOS	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1. A FAMÍLIA GOUPIACEAE E O GÊNERO <i>Goupia</i>	8
3.2 A ESPÉCIE <i>Goupia glabra</i> AUBLET	8
3.2.1. Aspectos botânicos	8
3.2.2. Distribuição geográfica	11
3.2.3. Etnobotânica	11
3.2.4. Química e Atividade biológica	12
3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS	14
3.3.1 Doenças relacionadas ao estresse oxidativo	16
3.4. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	18
3.4.1. Biossíntese	19
3.5. ESTERÓIDES	22
3.5.1. Biossíntese	23
3.6. DOENÇAS INFECCIOSAS	27
3.7. DOENÇAS PARASITÁRIAS	27
3.7.1. Leishmaniose	28
3.7.2. Doença de Chagas	29
3.8. CÂNCER	30
3.8.1. PRODUTOS NATURAIS ANTINEOPLÁSICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	34

4.1.1. Reagentes e testes de identificação	34
4.2. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS	35
4.2.1. Espectrometria de absorção no infravermelho	35
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	35
4.3. PONTO DE FUSÃO	35
4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO	36
4.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS	36
4.6. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	37
4.6.1. Fenólicos e taninos	37
4.6.2. Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	37
4.6.3. Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	38
4.6.4. Flavanóis, flavanonas, flavononóis e xantonas	38
4.6.5. Esteróides e triterpenos	39
4.6.6. Alcalóides	39
4.7. ENSAIO DE LETALIDADE SOBRE <i>Artemia salina</i> LEACH	40
4.7.1. Procedimento	40
4.8. DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	41
4.8.1. Ensaio qualitativo	41
4.8.2. Quantificação de fenólicos totais	42
4.8.2.1. Procedimento	43
4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
4.9.1. Ensaio qualitativo	44
4.9.2. Ensaio quantitativo utilizando cubeta de quartzo	45
4.9.2.1. Amostras	46
4.9.2.2. Controle e branco da amostra	46
4.9.2.3. Procedimento	46
4.9.3. Ensaio quantitativo utilizando microplaca	48
4.10. ATIVIDADE INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE	49
4.11. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS	50
4.11.2. Procedimento	50
4.11.2.1. Varredura inicial	50
4.11.2.2. Determinação da CI_{50}	52
4.12. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA	53

4.12.1. Procedimento para atividade contra bactérias	54
4.12.2. Procedimento para atividade contra fungos leveduriformes	55
4.13. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	55
4.13.1. Metodologia para <i>Leishmania amazonensis</i>	56
4.13.2. Metodologia para <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. EXTRATOS	58
5.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	59
5.3. ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE <i>Artemia Salina</i> LEACH	60
5.4. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	61
5.5. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	65
5.5.1. Correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e a CE ₅₀	66
5.6. ATIVIDADE INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE	69
5.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS	70
5.8. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA	74
5.8.1. Atividade antibacteriana	74
5.8.2. Atividade antifúngica	75
5.9. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	77
5.10. RESUMO DAS ATIVIDADES OBSERVADAS	78
5.11. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	81
5.11.1. Extrato de folhas obtido em Hexano (EHF)	81
5.11.1.1 Identificação de EHF5H7/2-4-2D	84
5.11.2. Extrato de folhas obtido em Acetato de etila (EAF)	95
5.11.2.1. Identificação de EAF4F3	98
5.11.3. Extrato de galhos grossos obtido em Acetato de etila (EAGg)	107
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Tora (a) e casca (b) de <i>Goupia glabra</i>	9
FIGURA 2. Folhas frescas (a), folha seca (b) e flores (c) de <i>Goupia glabra</i>	9
FIGURA 3. Aspectos morfológicos de <i>Goupia glabra</i>	10
FIGURA 4. Distribuição geográfica de <i>Goupia glabra</i>	11
FIGURA 5. Derivados de tropolona isolados de folhas de <i>Goupia glabra</i>	12
FIGURA 6. Compostos isolados de folhas de <i>Goupia glabra</i>	13
FIGURA 7. Estruturas de: (1) Ácido elágico, (2) Ácido ascórbico, (3) Rutina e (4) Quercetina	15
FIGURA 8. Exemplo de padrão de oxigenação típicos das vias metabólicas	20
FIGURA 9. Exemplo da biossíntese de fenólicos oriundos da via do acetato	20
FIGURA 10. Formação do ácido chiquímico	21
FIGURA 11. Estruturas do cicloartenol e lanasterol	22
FIGURA 12. Estruturas de β -sitosterol, estigmasterol e campesterol	23
FIGURA 13. Estruturas do isopreno e das duas unidades precursoras dos terpenóides (DMPP e IPP)	23
FIGURA 14. Esquema de formação das unidades precursoras dos terpenóides.	24
FIGURA 15. Estrutura do esqualeno (precursora dos triterpenos)	25
FIGURA 16. Conformações do epóxido de esqualeno	26
FIGURA 17. Formação do cicloartenol (plantas)	26
FIGURA 18. Estruturas de vimblastina, vincristina, etoposida, teniposida e taxol	32
FIGURA 19. Separação do material vegetal de <i>Goupia glabra</i> em folhas, galhos finos e galhos grossos	36
FIGURA 20. Reação do ácido gálico com molibdênio, presente no reagente de Folin Ciocalteau	42
FIGURA 21. Perda da coloração púrpura do radical DPPH [•]	44
FIGURA 22. Reação química do radical DPPH [•] formando DPPH-H	44
FIGURA 23. Redução do MTT por enzimas mitocondriais	52
FIGURA 24. Exemplo de uma leitura de experimento de MIC, após o período de incubação	54
FIGURA 25. Avaliação preliminar da atividade antioxidante em CCD. a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl ₃ ; c) após borrifar solução de DPPH	61

FIGURA 26. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em Hexano eluídos em Hex/AcOEt (8:2). a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl ₃ ; c) após borrifar solução de DPPH	63
FIGURA 27. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em AcOEt eluídos em Hex/CHCl ₃ /AcOEt (5:2:5). a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl ₃ ; c) após borrifar solução de DPPH	63
FIGURA 28. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em MeOH eluídos em CHCl ₃ /Metanol (7:3). a) após borrifar solução de FeCl ₃ ; b) após borrifar solução de DPPH	64
FIGURA 29. CCD das frações EHF5H7/2-4-2D e EHF5H7/2-4-2E, eluída em: Hex/CHCl ₃ /Acetona e revelada com sulfato cérico/ácido sulfúrico	82
FIGURA 30. Estruturas de β-sitosterol, estigmasterol e campesterol	86
FIGURA 31. Estrutura do catecol	101
FIGURA 32. CCD dos extratos de média polaridade (AcOEt). Presença de catecol evidenciada. [Eluente: Hex/CHCl ₃ /AcOEt (5:2:5); Revelador: solução de FeCl ₃]	104
FIGURA 33. Provável rota biossintética de catecol	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Nomes populares de <i>Goupia glabra</i>	11
TABELA 2. Descrição das possíveis características observadas no teste de fenólicos e taninos	37
TABELA 3. Colorações indicativas da presença de antocianinas, antocianidinas, e flavonóides	38
TABELA 4. Colorações indicativas da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	38
TABELA 5. Colorações indicativas da presença de esteróides e triterpenóides	39
TABELA 6. Extratos de <i>Goupia glabra</i>	58
TABELA 7. Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos de cupiúba	59
TABELA 8. Mortalidade (%) de larvas de <i>A. salina</i> (500 µg de extrato por mL) dos extratos de cupiúba	60
TABELA 9. Resultado do ensaio qualitativo de compostos fenólicos e atividade antioxidante	65
TABELA 10. Resultado da quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante	66
TABELA 11. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/ml	70
TABELA 12. Atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas, realizado pelo Teste do MTT, após 72 horas de incubação. A tabela apresenta os valores de CI ₅₀ em µg/mL e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%)	71
TABELA 13. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das frações de EAGg em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL. Valores são média ± DPM (Desvio padrão da média)	72
TABELA 14. Atividade antibacteriostática e antibactericida de extratos de <i>Goupia glabra</i>	74
TABELA 15. Atividade antifungiosstática e antifungicida de extratos de <i>Goupia glabra</i>	75
TABELA 16. Atividade antiparasitária de extratos de <i>Goupia glabra</i>	77
TABELA 17. Atividades observadas para os extratos de <i>G. glabra</i>	79
TABELA 18. Resultados experimentais de RMN de ¹ H (δ em ppm, CDCl ₃ , 500MHz) para os esteróides β-sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura	

(FACUNDO <i>et al.</i> , 2008).	87
TABELA 19. Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 , 125MHz) para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990).	91
TABELA 20. Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 , 125MHz) para o campesterol comparados com a literatura (WRIGHT <i>et al.</i> , 1978).	92
TABELA 21. Comparação entre os sinais observados para catecol e dados encontrados na literatura (JEONG <i>et al.</i> , 2009)	101

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Procedimento para ensaio qualitativo de compostos fenólicos	41
ESQUEMA 2 - Procedimento de quantificação de compostos fenólicos	43
ESQUEMA 3 - Procedimento para ensaio qualitativo da atividade antioxidante	45
ESQUEMA 4 - Procedimento para ensaio quantitativo da atividade antioxidante em cubeta	46
ESQUEMA 5 - Procedimento para preparo do controle, amostra (padrão ou extrato) e branco da amostra	47
ESQUEMA 6 - Procedimento para ensaio quantitativo da atividade antioxidante em microplaca	48
ESQUEMA 7 - Procedimento para ensaio qualitativo da atividade inibidora de acetilcolinesterase	49
ESQUEMA 8 - Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT	51
ESQUEMA 9 – Fracionamento do extrato em hexano de folhas (EHF)	83
ESQUEMA 10 – Fracionamento do extrato em AcOEt de folhas (EAF)	96
ESQUEMA 11 . Fracionamento da fração EAF4G	97
ESQUEMA 12 – Fracionamento do extrato em AcOEt dos galhos grossos (EAGg)	107

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** Mortalidade (%) de larvas de *A. salina* (500 µg de extrato por mL) dos extratos de cupiúba 60
- GRÁFICO 2.** Correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (cubeta) dos extratos de cupiúba 67
- GRÁFICO 3.** Correlação entre a quantidade compostos fenólicos e a atividade antioxidante (microplaca) de todos os extratos de cupiúba 67
- GRÁFICO 4.** Correlação positiva entre a quantidade compostos fenólicos e a atividade antioxidante (microplaca) dos extratos de cupiúba, com exceção do extrato EMGg 68

LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO 1. Espectro de IV de EHF5H7/2-4-2D	85
ESPECTRO 2. RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 500MHz) de EHF5H7/2-4-2D	88
ESPECTRO 3. RMN ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 e 125MHz) de EHF5H7/2-4-2D	89
ESPECTRO 4. RMN ^{13}C (DEPT, δ em ppm, CDCl_3 e 125MHz) de EHF5H7/2-4-2D	90
ESPECTRO 5. Espectro de IV de EAF4F3	98
ESPECTRO 6. Espectro de RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 500MHz) de EAF4F3	99
ESPECTRO 7. Espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 e 125MHz) de EAF4F3	100
ESPECTRO 8. Expansão de HSQC de EAF4F3	102
ESPECTRO 9. Expansão de HMBC de EAF4F3	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl₃	Clorofórmio
CL₅₀	Concentração letal para o crescimento de 50%
CE₅₀	Concentração do extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAf	Extrato em acetato de etila das folhas
EAGf	Extrato em acetato de etila dos galhos finos
EAGg	Extrato em acetato de etila dos galhos grossos
EHF	Extrato em hexano das folhas
EHGf	Extrato em hexano dos galhos finos
EHGg	Extrato em hexano dos galhos grossos
EMF1	Extrato em metanol das folhas (1)
EMF2	Extrato em metanol das folhas (2)
EMGf	Extrato em metanol dos galhos finos
EMGg	Extrato em metanol dos galhos grossos
EtOH	Etanol
FeCl₃	Cloreto férrico
HCT-8	Linhagem tumoral de cólon-humano
Hex	Hexano
HL-60	Linhagem tumoral de leucemia-humano
CI₅₀	Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas
MDA-MB435	Linhagem tumoral de mama-humano
MeOH	Metanol
MH	Müller-Hinton
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima

CFM	Concentração fungicida mínima
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
SF-295	Linhagem tumoral de glioblastoma-humano
SOD	Superóxido dismutase
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro



1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior país em número de espécies endêmicas. Abriga cerca de 60.000 espécies vegetais, o que corresponde a cerca de 20% de toda flora mundial e não menos de 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas. Toda essa biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (GARCIA, 1995; BARREIRO, 2009).

O uso de plantas como medicamentos pela humanidade é muito antigo. A busca por alívio e cura de doenças talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento continuam completamente dependentes da medicina caseira utilizando vegetais para as necessidades primárias de saúde. Estima-se que aproximadamente 74% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos através de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular (BRAZ-FILHO, 2010).

Apesar do aumento de estudos na área de produtos naturais, estima-se que apenas de 5-15% das cerca de 250.000 espécies de plantas existentes no planeta foram investigadas (BRAZ-FILHO, 2010). Apenas 8% das espécies brasileiras foram estudadas em busca de compostos bioativos, sendo que 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES *et al.*, 1999).

Mais especificamente, as plantas de origem amazônica despertam grande interesse por parte da comunidade científica com relação à sua utilização para fins medicinais, o que exige o conhecimento das características das drogas delas originadas, incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade (SIMÕES *et al.*, 1999).

Uma das estratégias mais comuns para a investigação de plantas medicinais é a abordagem etnofarmacológica que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Esse tipo de seleção de espécies vegetais constitui um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, que não pode ser ignorado ou desprezado (KOEHN *et al.*, 2005; BRAZ-FILHO, 2010).

A comparação de resultados obtidos através da coleta de plantas ao acaso ou quimiotaxonomicamente orientadas, com aqueles obtidos baseados no uso em medicina popular, demonstrou que o conhecimento tradicional é indicativo de espécies que acumulam compostos bioativos (SIMÕES *et al.*, 1999).

A busca por medicamentos para a cura das doenças endêmicas parasitárias, também chamadas “doenças negligenciadas”, tais como: malária, doença de Chagas, esquistossomose e leishmanioses, é de extrema importância (FUNARI & FERRO, 2005). Principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, onde a incidência dessas doenças é elevada, o repertório de fármacos utilizados é limitado e inadequado e a indústria farmacêutica pouco se interessa para o desenvolvimento de novas drogas com essa finalidade, pois não há perspectiva de retorno financeiro suficiente (DIAS *et al.*, 2009). Das 1300 novas drogas introduzidas no mercado entre 1975 e 1999, apenas 13 tiveram aplicação em doenças tropicais (PINK *et al.*, 2005).

As plantas têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças parasitárias e a fitoterapia tem recebido atenção considerável na busca de substâncias alternativas com atividade antiparasitária (TEMPONE *et al.*, 2005; KVIST *et al.*, 2006; BRAGA, *et al.*, 2007)

A relevância das pesquisas com produtos naturais, a fim de fornecer alternativas terapêuticas mais eficientes e seguras, proporciona a descoberta de novos fármacos e o estudo

de plantas que apresentem substâncias que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo, torna-se de grande importância para patologias nas quais as espécies reativas do oxigênio (ERO's) são fatores determinantes. O estresse oxidativo tem sido relacionado a um grande número de doenças degenerativas, inflamatórias, neurológicas, oculares, pulmonares, doenças do coração, câncer e no processo de envelhecimento (BARREIROS *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; VELLOSA *et al.*, 2007).

Algumas classes de compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, atuam tanto como antioxidantes (seqüestrando radicais livres) como também no combate a microorganismos, o que tem tornado importante o estudo em conjunto das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de frações e extratos de plantas (CABRAL *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 2009).



2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas de extratos de *Goupia glabra* Aublet.

2.2. ESPECÍFICOS

- Descrever a composição química de extratos bioativos de *Goupia glabra* Aublet por meio de métodos espectrométricos e espectroscópicos (IV, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais).
- Realizar análises pelos métodos colorimétricos de quantificação de fenólicos totais e atividade seqüestradora do radical DPPH para verificação de atividade antioxidante dos extratos da espécie selecionada.
- Realizar testes de inibição de acetilcolinesterase dos extratos de *G. glabra*.
- Realizar testes biológicos *in vitro* com extratos e/ou frações, visando a avaliação da letalidade em *Artemia salina*.
- Realizar testes farmacológicos *in vitro* com extratos e/ou frações, visando a avaliação da atividade citotóxica contra quatro linhagens de células tumorais (mama, cólon, sistema nervoso central e leucemia).
- Realizar testes farmacológicos *in vitro* com extratos e/ou frações, visando a avaliação da atividade antimicrobiana contra quatro bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), três fungos (*Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) e dois protozoários (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*).



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A FAMÍLIA GOUPIACEAE E O GÊNERO *Goupia*

A família Goupiaceae Miers possui apenas o gênero *Goupia* (MIERS, 1860). Este gênero possui três espécies: *Goupia glabra* Aublet, *G. cinerascens* Poepp. ex Baill e *G. guatemalenses* Lundel (LACOSTE & ALEXANDRE, 1991).

Anteriormente, o gênero *Goupia* era incluído na família Celastraceae, embora fosse bem diferente dos demais gêneros dessa família (LACOSTE & ALEXANDRE, 1991). Após estudos filogenéticos e morfológicos, o gênero foi excluído por ser atípico a essa família. Os novos dados revelaram que *Goupia* é mais estreitamente relacionado com as famílias Corynocarpaceae e Linaceae (SIMMONS *et al.*, 2001). Em um estudo fitoquímico preliminar, observou-se que os derivados isolados de *Goupia glabra* (ácidos vanílico e cinâmico, 4-hidroxibenzaldeído, blumenol A e esqualeno) são diferentes dos metabólitos comumente isolados de Celastraceae (terpenos, flavonóides e taninos), o que corrobora com a exclusão de *Goupia* dessa família (MESA-SIVERIO *et al.*, 2003; BRINKER *et al.*, 2007; MARIOT & BARBIERI, 2007).

3.2. A ESPÉCIE *Goupia glabra* AUBLET

3.2.1. Aspectos Botânicos

A espécie *G. glabra* foi descrita pela primeira vez em 1775, por Aublet, e possui as sinonímias: *Glossopetalum glabrum* Gmel., *Goupia paraensis* Huber e *G. tomentosa* Aubl., sendo a última sinonímia correspondente à sua forma jovem (LACOSTE & ALEXANDRE, 1991; SMIDERLE & SCHWENGBER, 2005).

As árvores desta espécie possuem grande porte, tronco retilíneo e cilíndrico, podendo alcançar até 130 cm de diâmetro; a base é reta e a casca fina e acinzentada (FIGURA 1). A madeira é pesada, com cerne de coloração castanho-amarelada ou bege-clara passando a castanho-avermelhada. Sua altura varia de 10 à 40 m e possui copa piramidal. A árvore é

indicada para arborização e reflorestamentos, pois apresenta rápido crescimento e tolerância à luz direta (SMIDERLE & SCHWENGBER, 2005; SILVA, 2006).

A madeira possui resistência mecânica média e boa maleabilidade, sendo fácil de trabalhar e polir. Apresenta moderada resistência a fungos, aos cupins e ao apodrecimento, sendo muito utilizada na indústria madeireira (FIGURA 1). O cheiro desagradável da madeira lembra o cheiro de cupim e deu origem ao nome popular: “cupiúba” (SILVA, 2006).

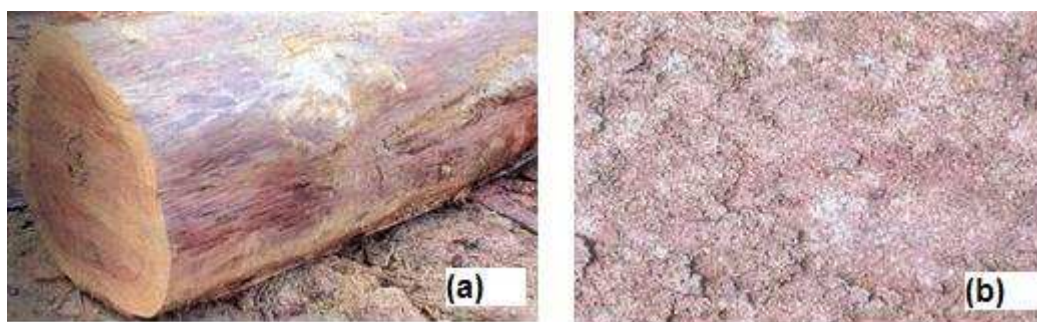


FIGURA 1. Tora (a) e casca (b) de *Goupia glabra*
FONTE: www.inpa.gov.br/madeiras/tipos_madeira/images.php?Id=21

As folhas são simples e brilhantes, coriáceas, ovaladas com pecíolos dispostos alternadamente (FIGURA 2a), medindo de 5 a 13 cm de comprimento e 1,5 a 4 cm de largura, sendo facilmente reconhecíveis no chão, ao redor da árvore, por adquirirem a coloração negra, em consequência de processo natural de oxidação (FIGURA 2b) (SILVA, 2006).

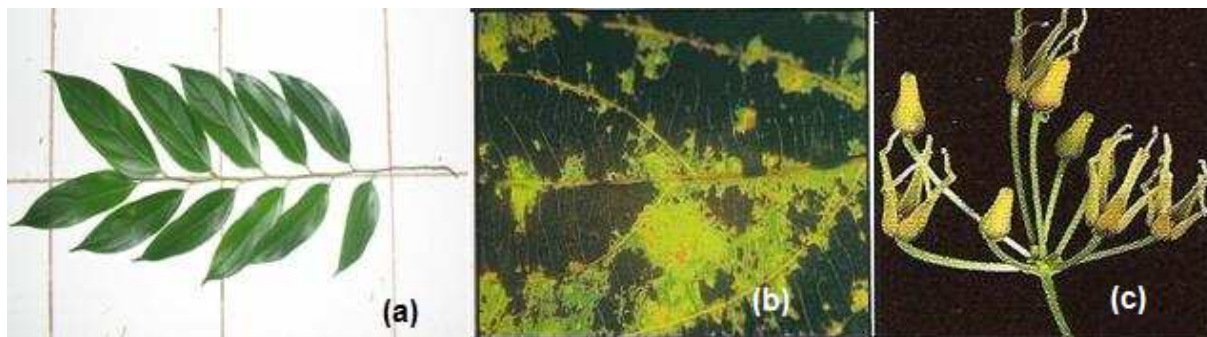


FIGURA 2. Folhas frescas (a), folha seca (b) e flores (c) de *Goupia glabra*
FONTE: ^aOLIVEIRA, P.A.; ^bSILVA, 2006; ^cRIBEIRO, 1999.

As flores são hermafroditas, muito pequenas e dispostas em inflorescências do tipo umbrelas (FIGURA 2c). O fruto é tipo uma baga glabrosa que mede 1-7 mm de diâmetro,

apresenta uma coloração inicial verde, tornando-se amarela, vermelha e finalmente preta. As sementes, em número de 1 a 5 por fruto, são amarelo escuras, albuminosas, oleaginosas, medem cerca de 1,5 mm de comprimento e 1 mm de largura. Os ramos e folhas novas são completamente cobertos de pêlos (FIGURA 3), tornando-se glabros somente mais tarde, o que deu origem ao nome científico (SMIDERLE & SCHWENGBER, 2005).

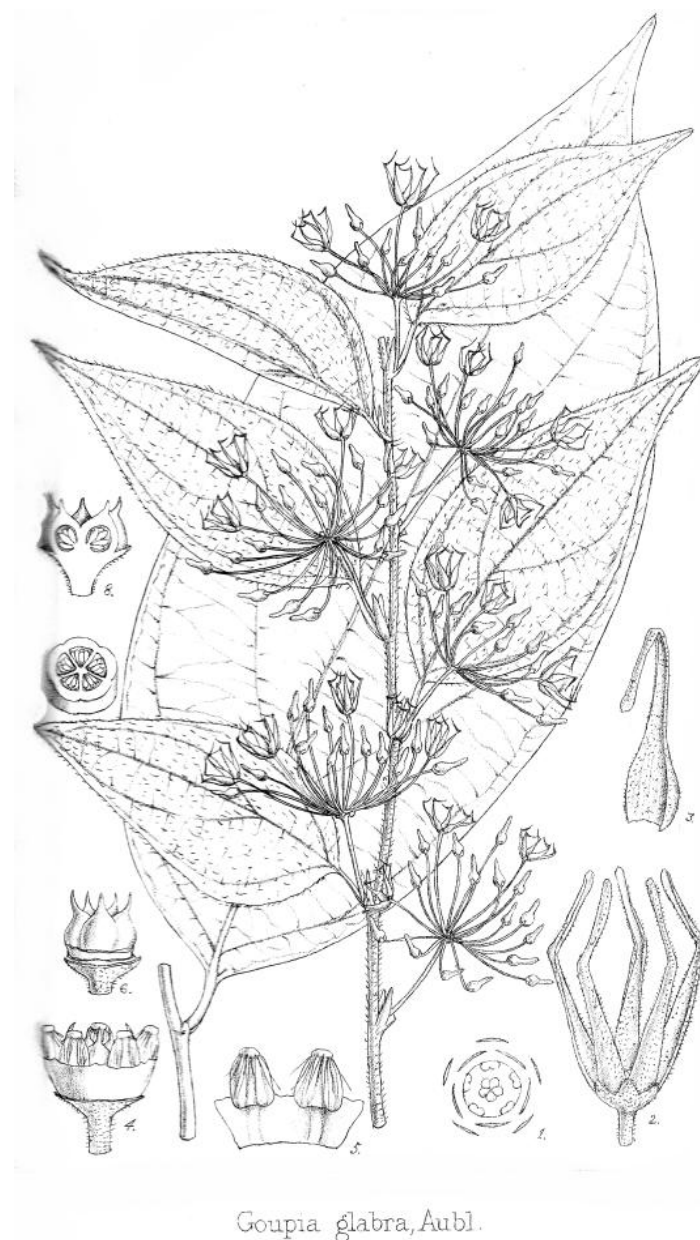


FIGURA 3. Aspectos morfológicos de *Goupia glabra*
FONTE: www.plantsystematics.org/imgs/ws1/r/goupiaceae_goupia_glabra_21040.html

3.2.2. Distribuição geográfica

A espécie ocorre na região amazônica, abrangendo o Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Peru e Panamá. No Brasil, foi encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Rondônia (FIGURA 4) (SMIDERLE & SCHWENGBER, 2005; SILVA, 2006).



FIGURA 4. Distribuição geográfica de *Goupia glabra*
FONTE: www.gbif.org

3.2.3. Etnobotânica

Essa espécie é conhecida por vários nomes populares de acordo com a região que é encontrada (TABELA 1).

TABELA 1. Nomes populares de *Goupia glabra*

País*	Nomes populares*
Brasil	cupiúba, cupiúba-rosa, cupiúva, cutiúba, cachaceiro, louro-bobó, peniqueiro, peroba-do-norte
Colômbia	saino, sapino
Guianas	cabacalli, copie, cupi, couepi, goupí, koepi, koepie
Peru	capricórnia, muena rifarillo
Suriname	kopi
Venezuela	pilon

*RIBEIRO, 1999; MESA-SIVERIO, 2003; SMIDERLE & SCHWENGBER, 2005; SILVA, 2006

A casca da árvore é popularmente utilizada como analgésico dentário (LACOSTE & ALEXANDRE, 1991; RIBEIRO, 1999; SILVA, 2006), como vermífugo e no tratamento de malária, catapora e eczema (DEFILIPPS *et al.*, 2004).

As folhas são utilizadas para o tratamento de sífilis e enxaqueca (DEFILIPPS *et al.*, 2004). O sumo das folhas jovens é utilizado externamente para tratar cegueira, causada pela catarata e no tratamento de varíola, também podendo ser utilizada como um cicatrizante quando aplicada na pele (LOPEZ *et al.*, 2001).

Na região da Amazônia Peruana, a planta também é utilizada pelos habitantes locais no tratamento de doenças oculares (MESA-SIVERIO *et al.*, 2003).

3.2.4. Química e Atividade biológica

Em um trabalho realizado por Mesa-Siverio e colaboradores (2003), foram isolados dois derivados de tropolona denominados de Goupiolona A e Goupiolona B (FIGURA 5) de um extrato em etanol de folhas de *G. glabra*.

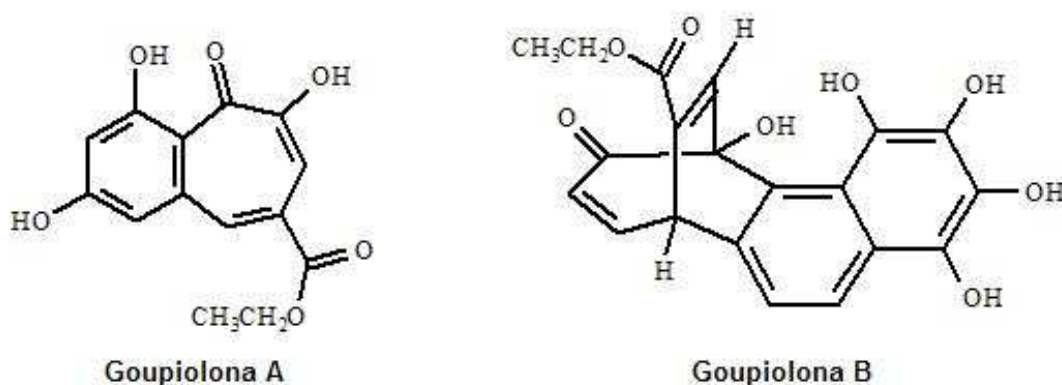


FIGURA 5. Derivados de tropolona isolados de folhas de *Goupia glabra*

Essas duas substâncias se comportam como genotoxinas, ou seja, induzem a letalidade de células, produzindo lesões de DNA genômico, o que sugere que essas moléculas têm potencial para serem utilizadas como drogas anti-câncer (MESA-SIVERIO *et al.*, 2003).

Tropolonas e benzotropolonas são compostos aromáticos freqüentemente isolados de fungos e, raramente, isolados de plantas superiores. Algumas substâncias que contêm um núcleo tropolona exibem atividade antimalárica (REN *et al.*, 2001), antitumoral (YAMATO *et al.*, 1992), e existem vários relatos em artigos que descrevem a preparação de derivados de tropolona e suas correspondentes avaliações biológicas (YAMATO *et al.*, 1992; TAMBURLIN-THUMIN *et al.*, 2001).

No estudo fitoquímico realizado por Mesa-Siverio e colaboradores (2003) também foram isoladas substâncias já conhecidos como o esqualeno, 4-hidroxibenzaldeído, ácido cinâmico, ácido vanílico, clorofila b, e blumenol A (FIGURA 6).

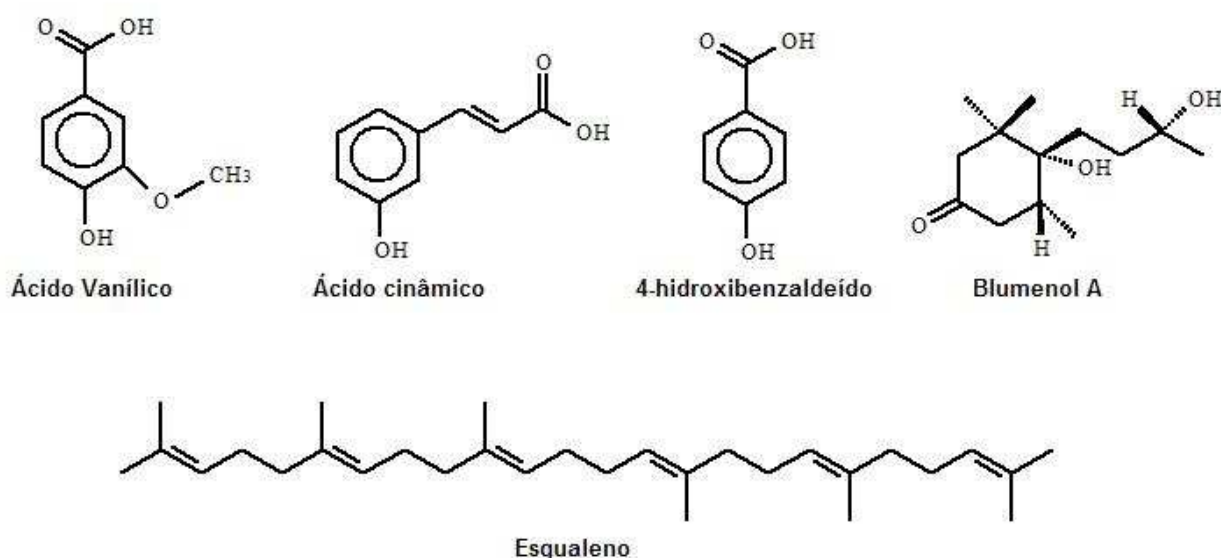


FIGURA 6. Compostos isolados de folhas de *Goupia glabra*

Esse estudo apóia a mudança de gênero para *Goupia*, como relatado por Simmons e colaboradores (2001), pois o perfil dos metabólitos de *G. glabra* não se relaciona com os compostos habituais presentes na família Celastraceae que são terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e principalmente triterpenos), flavonóides e taninos (BRINKER *et al.*, 2007; MARIOT & BARBIERI, 2007).

3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS

A oxidação é parte fundamental da vida anaeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio), respectivamente. Espécies reativas incluem não só os radicais ($O^{2\bullet-}$, $\bullet OH$, $NO\bullet$), mas também intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 , $ONOO^-$) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano (1O_2 , O_3 , Fe, Cu). O excesso de radicais livres no organismo é combatido em parte por macro e micromoléculas de origem endógena ou obtidas diretamente da dieta, que são denominadas antioxidantes (BARREIROS *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Os dois principais meios de defesa antioxidante do organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. A proteção antioxidante enzimática baseia-se quase que exclusivamente na decomposição de ânion superóxido ($O^{2\bullet-}$) pela superóxido dismutase (SOD) ou dismutação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas enzimas catalase e peroxidase. A proteção antioxidante não-enzimática é feita por micromoléculas, dentre as quais as mais utilizadas são: os tocoferóis, como a vitamina E; o ácido ascórbico (vitamina C); polifenóis e carotenóides, como o β -caroteno (pró-vitamina A) (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001; BARREIROS *et al.*, 2006).

Em artigo recente, De Oliveira e colaboradores (2009), apresentam ampla revisão bibliográfica da capacidade antioxidante de produtos de origem vegetal, como frutas, sementes, cereais, óleos e plantas aromáticas.

Entre os principais antioxidantes derivados de plantas destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides como rutina e quercetina, derivados do ácido cinâmico e outros compostos polifenólicos, como o ácido elágico (FIGURA 7) (GIL *et al.*, 2005).

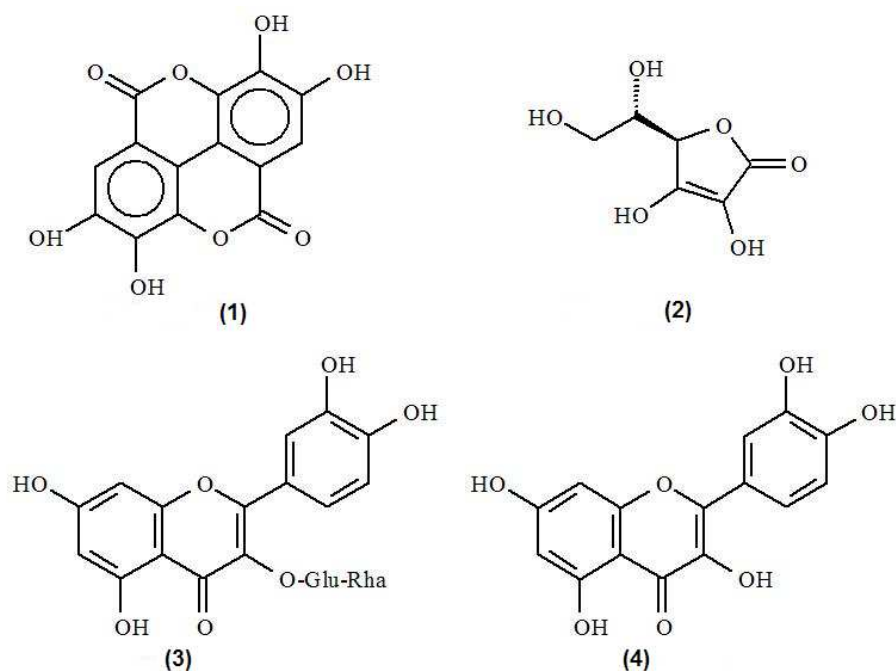


FIGURA 7. Estruturas de: (1) Ácido elágico, (2) Ácido ascórbico, (3) Rutina e (4) Quercetina

O ácido ascórbico (Vitamina C) é amplamente utilizado como antioxidante, nutracêutico e cosmecêutico. Atualmente, é muito estudado no tratamento do câncer, pois acredita-se que estimule o sistema imune, iniba a formação de nitrosaminas e bloqueie a ativação metabólica de carcinógenos (GIL *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2007)

A rutina é comercializada no setor farmacêutico, com função antioxidante ou anti-radical livre, no fortalecimento de vasos capilares, contra varizes, trombose e celulite (PAYE *et al.*, 2001; GIL *et al.*, 2005).

O ácido elágico é utilizado na indústria farmacêutica como ingrediente ativo em preparações para clareamento de pele (PAYE *et al.*, 2001).

A quercetina tem efeitos na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e insuficiência renal e hepática. É o principal flavonóide presente na dieta humana e seu consumo diário estimado varia entre 50 e 500 mg, o que representa 95% do total de flavonóides ingeridos (BEHLING *et al.*, 2004).

3.3.1. Doenças relacionadas ao estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de ERO e ERN excedem significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos à biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a à morte por apoptose ou necrose (BARBOSA *et al.*, 2006). O estresse oxidativo pode ocorrer em várias situações patológicas ou ambientais que aumentem a produção de ERO e ERN e em consequência do consumo inadequado de antioxidantes derivados da dieta (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo agudo, bem como estresse oxidativo crônico, têm sido relacionados a um grande número de doenças degenerativas, como aterosclerose, diabetes, injúria isquêmica, doenças inflamatórias (artrite reumatóide, colite ulcerativa e pancreatite), câncer, AIDS, doenças neurológicas (doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer), hipertensão, doenças oculares (degeneração macular relacionada ao envelhecimento e catarata), doenças pulmonares (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica), doenças do coração e no processo de envelhecimento, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém, por diversas razões, o sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível. Primeiramente, porque possui

capacidade reduzida de regeneração celular, já que os neurônios de um indivíduo adulto são células pós-mitóticas, ou seja, não se replicam mais. A morte de neurônios induzida por toxinas ou pelo processo normal de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao sistema nervoso. Em segundo lugar, porque o consumo de oxigênio pelo cérebro é muito elevado, o que o torna mais propenso a danos causados por espécies oxidantes. Em humanos, o cérebro é responsável por cerca de 20% do consumo total de O_2 , demanda necessária para sustentar o elevado consumo de ATP pelos neurônios, para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores (BARBOSA *et al.*, 2006).

3.4. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

Os compostos fenólicos possuem várias propriedades farmacológicas como: antialérgica, antiinflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, antitrombótica, antioxidante, cardioprotetora e efeitos vasodilatadores (BALASUNDRAM *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2006). Os polifenóis têm capacidade comprovada de doar hidrogênios e quelar íons metálicos como o ferro e cobre, inibindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SOARES, 2002).

São os principais antioxidantes encontrados nas plantas, e se enquadram em diversas categorias como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. No Brasil e recentemente na região Amazônica, o interesse em antioxidantes polifenólicos derivados de plantas tem aumentado notavelmente na última década, devido ao seu elevado poder de remoção de radicais livres associados com várias doenças (SILVA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante relacionada aos polifenóis deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, que permite a neutralização ou seqüestro de radicais livres e/ou quelação de metais de transição, e é influenciada pelo número e posição dos grupos hidroxila, assim como pelas posições de glicosilação. A ressonância do anel aromático presente nestes compostos é a principal responsável pela formação de intermediários estáveis após processo de redução dos radicais livres, bloqueando reações em cadeia (BARREIROS *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

Os fenólicos são as substâncias antioxidantes mais abundantes da dieta, podendo atingir um consumo diário de 1 g, o que é muito maior que o consumo de todos os outros fitoquímicos classificados como antioxidantes. Apesar disso, pouco se conhece sobre suas biodisponibilidades, e sua eficácia *in vivo* ainda precisa ser avaliada (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Recentes estudos têm revelado uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos presentes em plantas (PIZZOLATTI *et al.*, 2007; ASMAWI *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2009).

3.4.2. Biossíntese

Estruturalmente, substâncias fenólicas possuem pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel benzênico. São amplamente encontrados na natureza e metabolizados tanto pela via do acetato quanto pela via do ácido chiquímico (SOLOMONS & FRYHLE, 2002; DEWICK, 2002).

Os compostos fenólicos produzidos pela via do acetato são: antraquinonas, antranóis, tetraciclinas, fenóis simples e canabinóides. Os compostos fenólicos produzidos pela via do ácido chiquímico são: ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, lignanas e ligninas. Também existem compostos fenólicos da via mista acetato/chiquimato como: flavonóides e estilbenos (DEWICK, 2002).

Os metabólitos aromáticos da via do ácido chiquímico podem ser facilmente reconhecidos pela distribuição em carbonos consecutivos das funções oxigenadas do anel aromático. Esse padrão de oxigenação difere do padrão dos derivados da via do acetato, os quais têm as funções oxigenadas em átomos de carbono alternados (FIGURA 8) (LOBO & LOURENÇO, 2007).

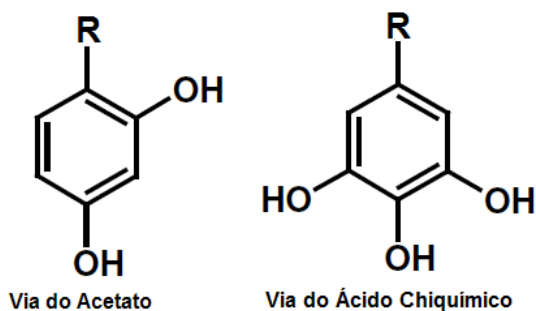


FIGURA 8. Exemplo de padrão de oxigenação típicos das vias metabólicas.

Na formação de compostos fenólicos pela via do acetato (FIGURA 9), o bloco constituinte fundamental é o ácido acético sob a forma de acetil-CoA (acetil coenzima A) que é o iniciador direto de todo o processo, mas o aumento subsequente da cadeia realiza-se através de um derivado, o Malonil-CoA, numa reação análoga à condensação de Claisen. Em seguida, ocorre a ciclização através de uma reação tipo aldol, uma desidratação e a aromatização (LOBO & LOURENÇO, 2007).

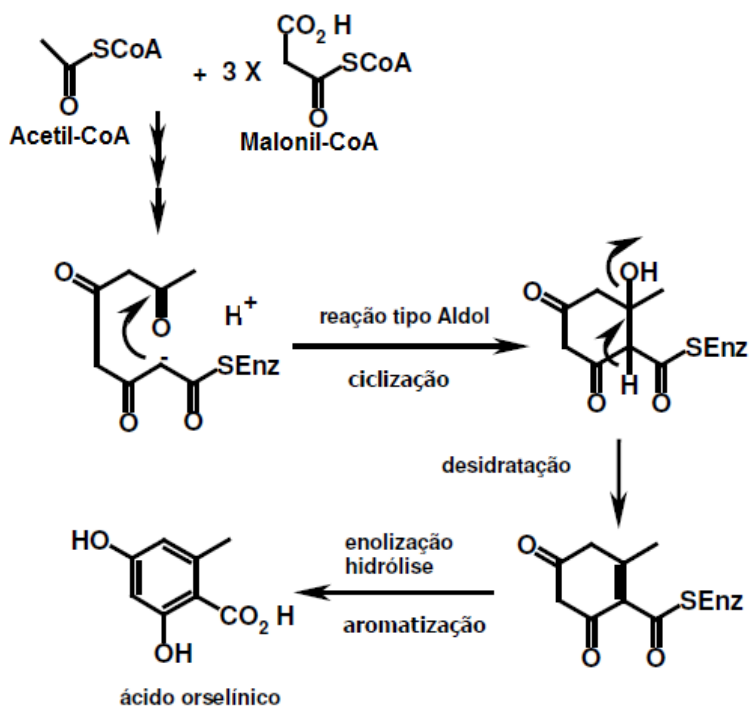


FIGURA 9. Exemplo de biossíntese de fenólicos oriundos da via do acetato.

O esquema biossintético para a formação do ácido chiquímico (FIGURA 10) envolve a adição de uma molécula de fosfoenol piruvato (PEP) a um açúcar, a eritrose-4-fosfato, para originar um derivado ácido com 7 carbonos, o desoxi-arabino-heptulose-6-fosfato. Essa reação é uma reação tipo aldol, seguida de uma eliminação do grupo fosfato e adição à carbonila para originar o ácido 3-desidroquinico. Em seguida forma-se o ácido 3-desidrochiquímico através da eliminação *syn* de uma molécula de água. Para garantir a eliminação estereoespecífica de um dos prótons quirais há o envolvimento de uma enzima. Finalmente a redução da carbonila a álcool, através de NADPH, produz o ácido chiquímico (LOBO & LOURENÇO, 2007).

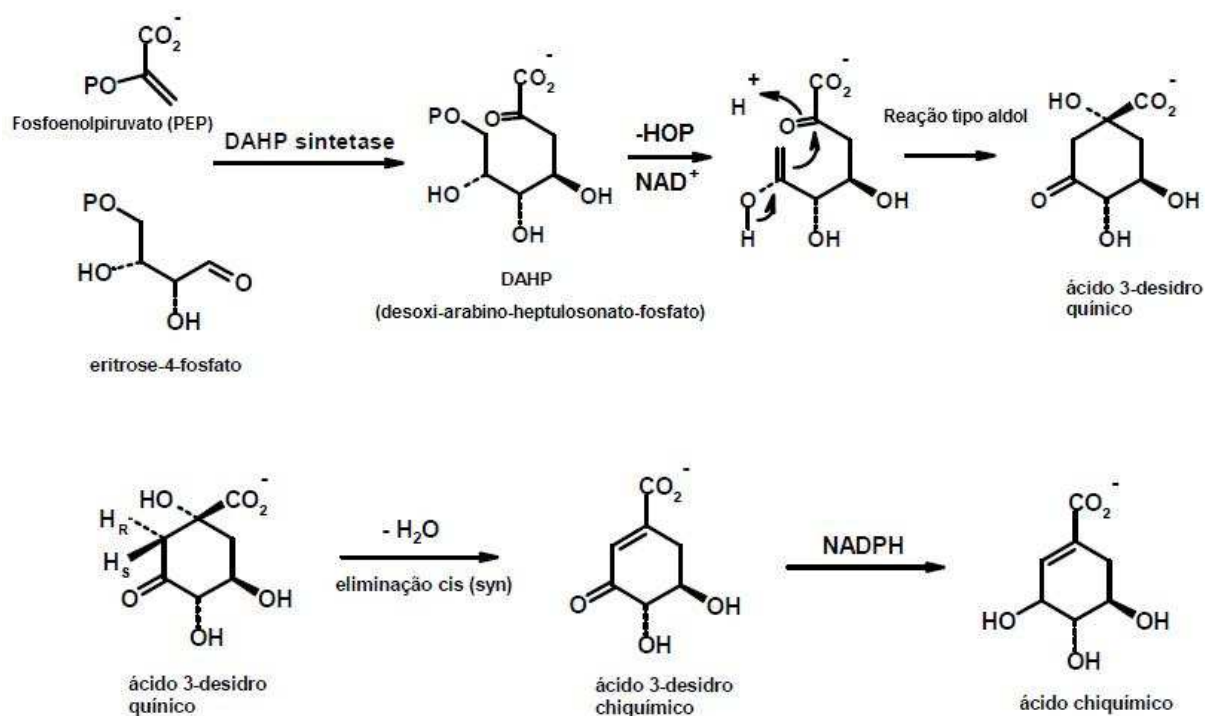


FIGURA 10. Formação do ácido chiquímico. Fonte: Dewick, 2002

3.5. ESTERÓIDES

Os esteróides são triterpenóides modificados contendo o sistema de anéis tetracíclico do lanosterol (fungos) ou cicloartenol (plantas) (FIGURA 11), mas sem os grupos metílicos em C-4 e em C-14. Estudos recentes descrevem que os fitoesteróis são capazes de reduzir as taxas de colesterol no plasma humano (KRITCHEVSKY & CHEN, 2005).

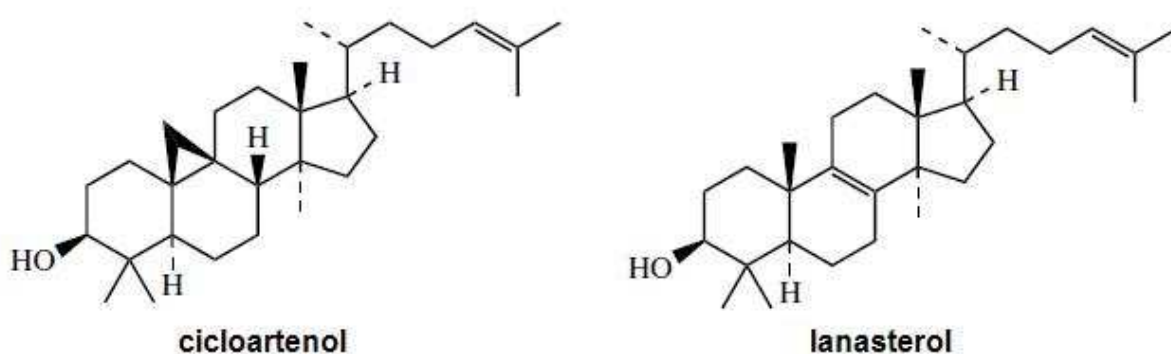


FIGURA 11. Estruturas do cicloartenol e lanasterol

Os principais esteróis em plantas, fungos e algas são caracterizados por apresentar substituintes extras, com um ou dois carbonos, no carbono 24. Os esteróis de plantas campesterol e sitosterol apresentam, respectivamente, uma metila e uma etila em C-24 na estrutura análoga ao colesterol. Já o estigmasterol contém uma insaturação adicional na cadeia lateral, entre os carbonos C-22 e C-23 (*trans*) (DEWICK, 2002).

Sitosterol, estigmasterol e campesterol (FIGURA 12) encontram-se na maioria das vezes em mistura e por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes são de difícil separação. Esses três esteróides são comumente observados em óleos de sementes, frutas e vegetais (CORTEZ *et al.*, 1998; ABIDI, 2001).

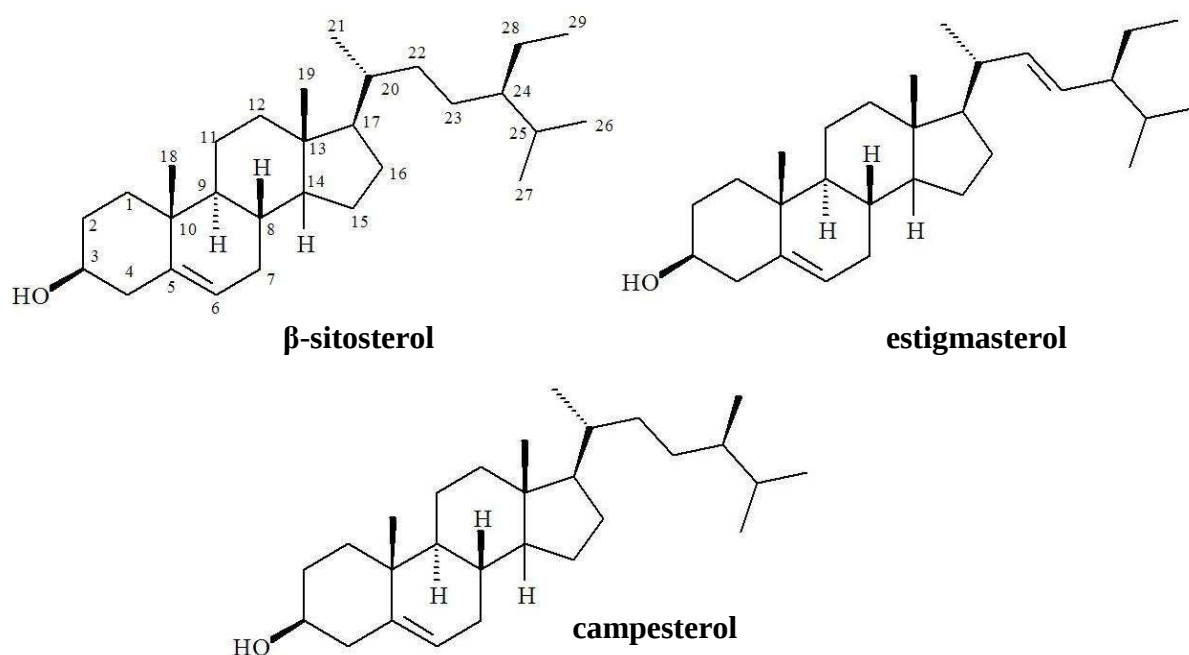


FIGURA 12. Estruturas de β -sitosterol, stigmasterol e campesterol

3.5.1 Biossíntese

A unidade básica dos terpenóides é o isopreno (C_5). No entanto ele não está envolvido na biossíntese destes compostos. Essas unidades C_5 são formadas a partir do difosfato de 3-3'-dimetilalila (DMAPP) e o difosfato de 3-isopentenila (IPP) (FIGURA 13). Existem duas vias metabólicas biossintéticas possíveis para a formação do DMAPP e do IPP: a via do mevalonato (MVA) e a via do fosfato de deoxixilulose (DXP) (DEWICK, 2002).

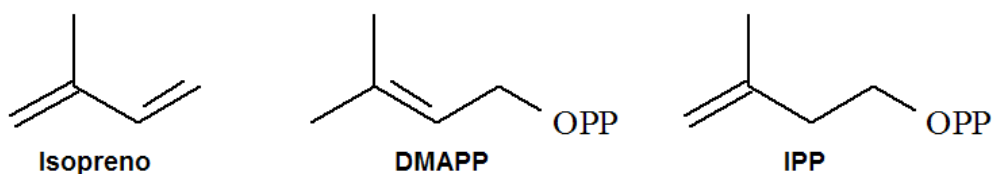


FIGURA 13. Estruturas do isopreno e das unidades precursoras dos terpenóides (DMAPP e IPP)

A condensação cauda-cabeça entre as unidades DMAPP e IPP, catalisada pela enzima prenil-transferase, forma a cadeia de difosfato de geranila (GPP), precursora dos

monoterpenos. A condensação dessa cadeia em C_{10} com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeia de difosfato de farnesila (C_{15}), difosfato de geranylgeranila (C_{20}) e difosfato de geranilfarnesila (C_{25}), precursoras de sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos, respectivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de difosfato de farnesila, e a de duas cadeias de difosfato de geranylgeranila, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e dos tetraterpenos, respectivamente (FIGURA 14) (DEWICK, 2002; LOBO & LOURENÇO, 2007).

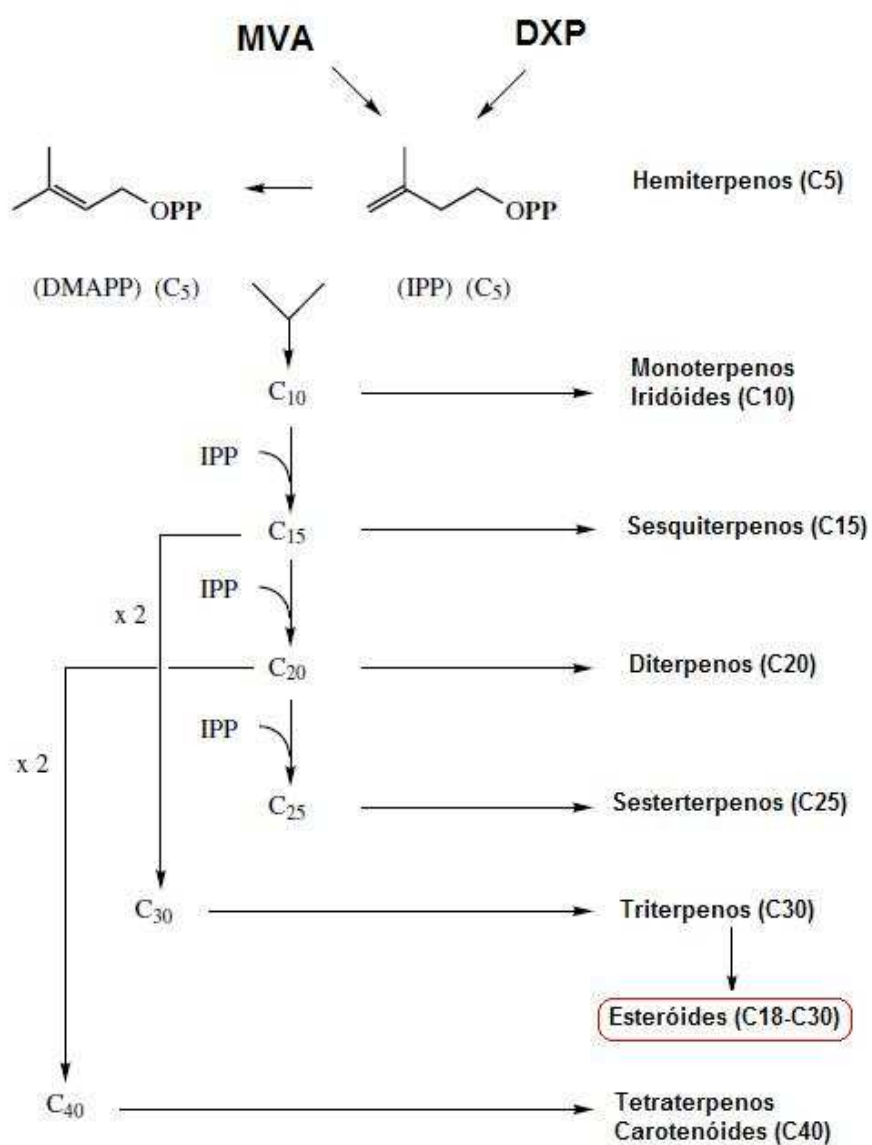


FIGURA 14. Esquema de formação das unidades precursoras dos terpenóides.

A biossíntese de fitoesteróides em células de plantas demonstra que as unidades isoprênicas são fornecidas exclusivamente da via do MVA que está localizada no citoplasma. Por outro lado, nos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos são predominantemente biossintetizados pela via do DXP, descoberta recentemente, localizado no plastídeo (LOBO & LOURENÇO, 2007; KONGDUANG *et al.*, 2008).

A cadeia precursora dos triterpenos é o esqualeno (FIGURA 15). Sua cadeia de 30 carbonos é formada a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de difosfato de farnesila (FPP) e envolve a enzima esqualeno sintase. Um intermediário desse processo é o difosfato de pré-esqualeno. (LOBO & LOURENÇO, 2007).

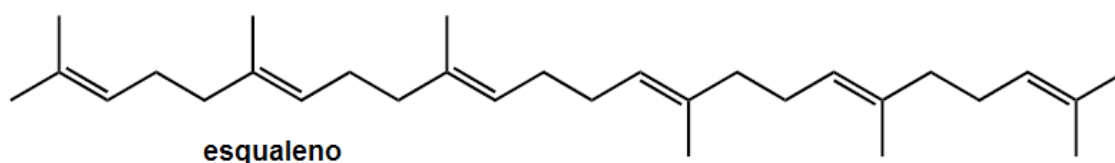


FIGURA 15. Estrutura do esqualeno (precursor dos triterpenos)

A ciclização do esqualeno ocorre a partir do intermediário 2,3-epóxido de esqualeno, um produto de oxidação enzimática que requer uma flavoproteína e NADPH que pode assumir diferentes conformações como por exemplo: cadeira-cadeira-cadeira-barco e cadeira-barco-cadeira-barco (FIGURA 16) (LOBO & LOURENÇO, 2007).

A clivagem do epóxido, na conformação cadeira-barco-cadeira-barco, por protonação dá origem a uma ciclização concertada para formar os cátions protosteril. Uma sequência de deslocamentos de Wagner-Meerwein de hidretos e grupos metila origina uma série de triterpenos tetracíclicos como o cicloartenol (plantas) (FIGURA 17) e lanasterol (animais) (DEWICK, 2002).

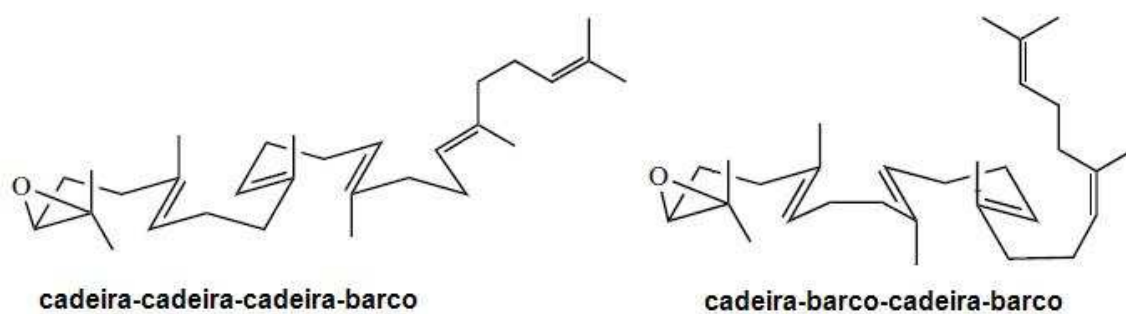


FIGURA 16. Conformações do epóxido de esqualeno

O cicloartenol é o precursor dos fitoesteróides. Apesar de existirem esteróides isolados de plantas que contêm o anel ciclopropano, na maioria dos casos dá-se a clivagem deste anel que gera um grupo metila, como é o caso do β -sitosterol e do estigmasterol (amplamente encontrados no reino vegetal) (CORTEZ *et al.*, 1998; ABIDI, 2001).

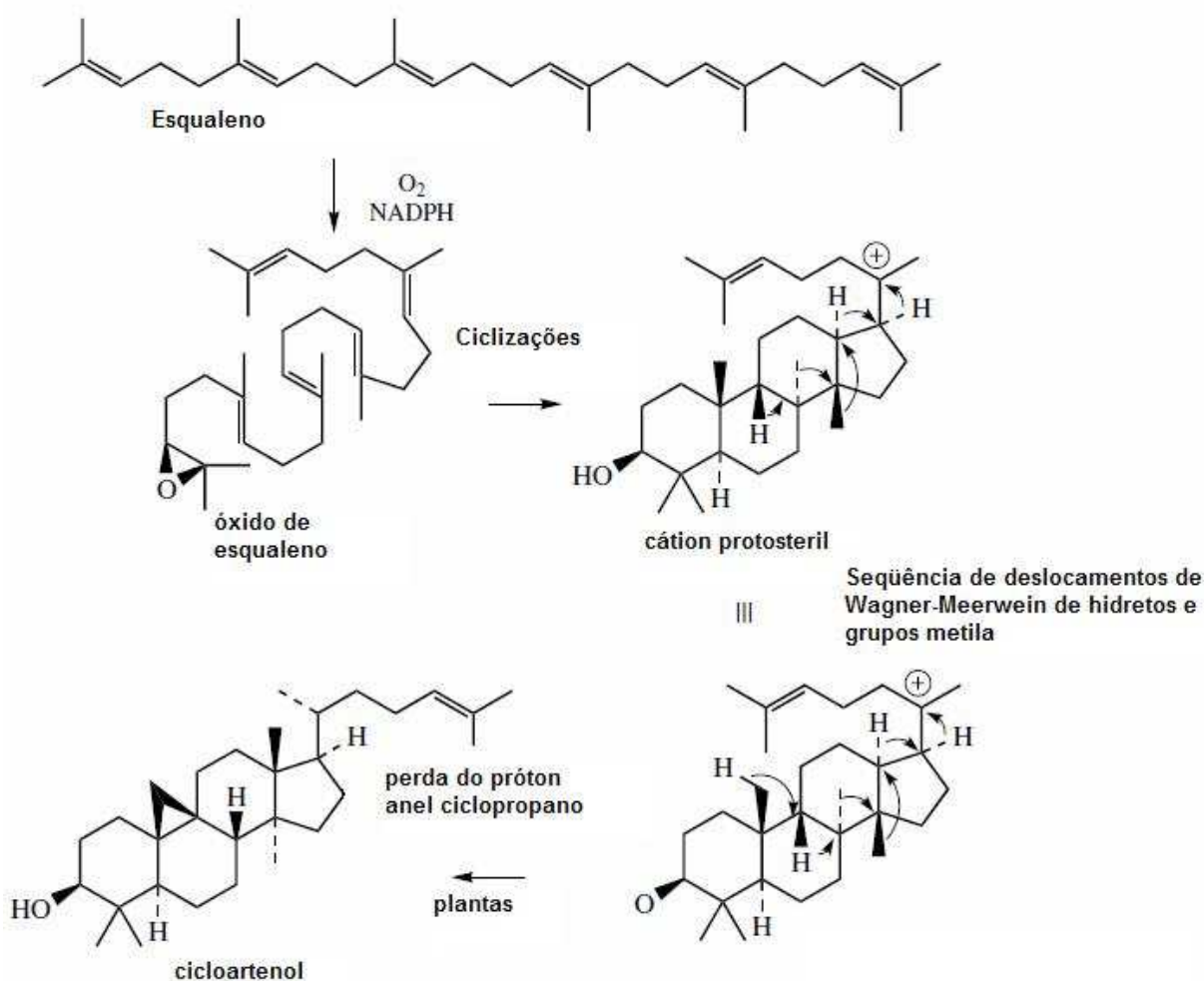


FIGURA 17. Formação do cicloartenol (plantas). Fonte: Dewick, 2002

3.6. DOENÇAS INFECCIOSAS

Doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade no mundo. A descoberta de novas substâncias com atividades antibacteriana e antifúngica constitui uma necessidade urgente devido a vários fatores tais como: o aumento da incidência de novas e reemergentes enfermidades infecciosas; altas taxas de resistência desenvolvida pelos microorganismos aos antibióticos usados clinicamente; o decréscimo constante observado no número de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*); a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (ANTUNES, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Atualmente, há apenas cerca de três antibióticos em estudos pré-clínicos Fase I, sendo que estas substâncias são de amplo espectro para microorganismos Gram positivo ou para infecções no trato respiratório. Para bactérias Gram negativo, o cenário é ainda mais alarmante, pois não há nenhum composto com novo mecanismo de ação em ensaios pré-clínicos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Nos últimos 10 anos os pesquisadores têm voltado atenção especial para fontes naturais ainda pouco exploradas. Nesse contexto, as plantas podem contribuir na descoberta de novos fármacos, pois é possível que produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos às plantas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

3.7. DOENÇAS PARASITÁRIAS

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta. Elas representam uma crescente ameaça nacional e continuam sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico. A malária,

doença de Chagas, leishmaniose e esquistossomose, também conhecidas como “doenças tropicais” são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países em desenvolvimento (DIAS *et al.*, 2009).

Para essas doenças não existem vacinas disponíveis e os fármacos são o centro de controle. Contudo, o repertório de fármacos disponíveis é limitado e inadequado, e ocorre o surgimento de resistência, efeitos colaterais e longo período de tratamento. Nesse panorama, a prevenção, controle e tratamento dessas doenças representam um grande desafio mundial (CALDERON *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2009).

A falta de uma quimioterapia eficaz para a doença de Chagas e Leishmanioses, solicita uma investigação ampla de compostos ativos, e dentre eles, os produtos naturais estão sendo investigados com sucesso. Substâncias derivadas de plantas continuam a fornecer estruturas fundamentais e agentes terapêuticos para o tratamento de doenças causadas por protozoários (TEMPONE *et al.*, 2005).

3.7.1. Leishmaniose

A Leishmaniose compreende duas formas principais: Cutânea, que causa lesões na pele, e Visceral, que afeta os órgãos internos do corpo, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. A forma visceral é a forma mais grave, podendo causar morte se não for tratada (BRAGA *et al.*, 2007; CALDERON *et al.*, 2009).

Cerca 350 milhões pessoas em aproximadamente 90 países do mundo estão expostas a essa doença e entre 1,5 e 2 milhões de pessoas são infectadas por ano. No continente americano, a leishmaniose ocorre no norte do México até o norte da Argentina, menos no Chile, Uruguai e Canadá (CALDERON *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde, apenas três países apresentam 90% dos casos da doença no globo: Bolívia, Brasil e

Peru. Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil estão concentrados 73% dos casos de leishmaniose cutânea.

Antimoniais pentavalentes têm sido recomendados para o tratamento de leishmaniose a mais de 50 anos. São conhecidos como drogas de primeira linha. Infelizmente o tratamento com essas drogas provoca reações adversas e resistência ao parasita. Pentamidina e Anfotericina B são usadas como segunda escolha no tratamento da doença e são chamadas drogas de segunda linha. Todavia, o uso dessas drogas é limitado devido a sua toxicidade, administração com supervisão e efeitos colaterais (BRAGA *et al.* 2007).

3.7.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. Esta doença, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, causando aproximadamente 50.000 mortes e 300.000 novos casos por ano (DIAS *et al.*, 2009).

A transmissão da doença ocorre, principalmente, pelo vetor (80-90%), mas a transfusão de sangue (5-20%) e as rotas congênitas (0,5-0,8%) representam um elevado risco para a população (TEMPONE *et al.*, 2005). Apesar dos avanços na compreensão da biologia do *T. cruzi*, os únicos medicamentos disponíveis contra este organismo são: nifurtimox e benzonidazol, que foram desenvolvidos por volta do início da década de 1970. Estes compostos demonstraram resultados promissores na fase aguda da doença de Chagas (50-70% de eficácia), e benzonidazol recentemente também tem demonstrado ser eficaz no início de infecções crônicas, mas de eficácia limitada contra a doença já estabelecida na fase crônica (<20% de eficácia). Os efeitos colaterais mais comuns de nifurtimox são perda de peso, sonolência, náuseas, vômitos e cólicas intestinais. No caso do benzonidazol, os efeitos

colaterais podem ser agrupados de três formas: (i) manifestações de hipersensibilidade, como erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; e (iii) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (CROFT *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2009).

3.8. CÂNCER

Pode-se considerar o câncer como uma doença genética causada pela aquisição sequencial de mutações em genes implicados na proliferação e morte celular. O dano causado ao DNA pode resultar de processos endógenos como erros na duplicação do DNA e instabilidade química em certas bases do DNA ou de interações com agentes exógenos como radiação ionizante e ultravioleta, agentes químicos e biológicos como os vírus (LÓPEZ-LAZARO apud BEHLING *et al.*, 2004).

É uma síndrome que envolve em geral, as etapas de iniciação, promoção e progressão. Diversos trabalhos têm visado o estabelecimento da associação entre a ingestão e os níveis séricos de certos nutrientes e o risco de câncer (BEHLING *et al.*, 2004).

Cirurgia e radioterapia são recomendados para o tratamento de tumores localizados, enquanto que a quimioterapia é utilizada para as células cancerígenas espalhadas pelo corpo. Os fármacos antineoplásicos não poupam as células normais de sua ação devastadora, assim, diversos efeitos tóxicos podem acometer os pacientes que fazem uso destes medicamentos (LÓPEZ-LAZARO apud BEHLING *et al.*, 2004).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos é o uso de antioxidantes. Há evidências de que essas substâncias podem ser utilizadas junto à quimioterapia por auxiliar na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (DRISKO *et al.*, apud BEHLING *et al.*, 2004).

3.8.1 Produtos naturais antineoplásicos

Os fármacos usados na terapia clínica do câncer oriundos de produtos naturais são agentes antineoplásicos importantes e eficientes (ALMEIDA *et al.*, 2005). Dos novos fármacos descobertos para o tratamento de câncer e doenças infecciosas, 60 e 75% respectivamente são oriundos de fontes naturais (GULLO *et al.*, 2006).

Dentre as classes de substâncias naturais já testadas com pronunciada atividade anti-câncer, podemos citar os terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, taninos, estilbenos, curcuminóides, polissacarídeos (CAI *et al.*, 2004).

Dentre alguns produtos naturais citotóxicos, usados clinicamente no tratamento de neoplasias, têm-se: i) **vimblastina** e **vincristina**, alcalóides extraídos de *Catharanthus roseus*; ii) **taxol** (Paclitaxel®), éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), utilizado no tratamento de câncer de mama e ovário; iii) podofilotoxinas (ou epipodofilotoxinas), tendo-se como exemplos principais a **etoposida** (VP-16) e **teniposida** (VM-26), derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) (FIGURA 18) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

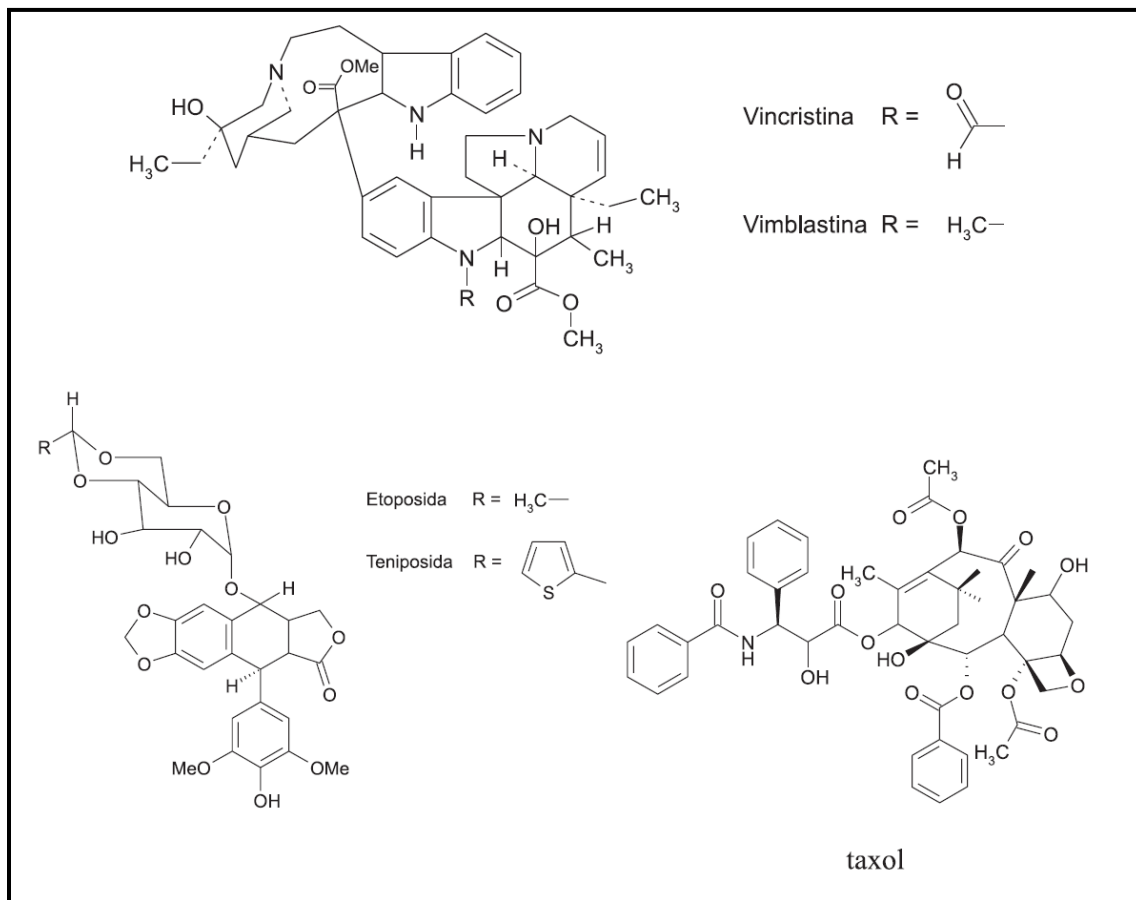


FIGURA 18. Estruturas de vimblastina, vincristina, etoposida, teniposida e taxol



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos utilizados foram: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) realizada com uso de cromatoplasmas da Sorbent Technologies, com indicador de fluorescência F₂₅₄, 200 µm de espessura e Cromatografia em coluna aberta (CC) utilizando sílica-gel da Silicycle: gel de sílica 60 – 200 µm (70 – 230 mesh). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra a serem cromatografadas. Os solventes orgânicos utilizados foram grau P.A. A detecção das substâncias foi feita por irradiação com lâmpada de UV (365 e 254 nm) SOLAB Científica e posterior revelação química.

4.1.1. Reagentes e testes de identificação

- **Sulfato cérico/ácido sulfúrico.** (MATOS, 2001). Solução de 1% de sulfato cérico (IV) em ácido sulfúrico a 10 %. As cromatoplasmas foram então borrifadas e aquecidas por alguns minutos (revelador universal).
- **Vanilina sulfúrica** (MATOS, 2001). Solução (A): 10 % de ácido sulfúrico em etanol (EtOH). Solução (B): 1% de vanilina em EtOH. A cromatoplasma foi então borrifada com uma mistura da solução A e B na proporção 1:1 e aquecido por alguns minutos. Manchas de coloração lilás são características de esteróides ou triterpenos.
- **DPPH[•]** (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). Solução a 0,3 mM/L do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) em metanol (MeOH). As cromatoplasmas foram imersas por 10 s na solução e observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativa de possível atividade antioxidante.
- **Cloreto Férrico (FeCl₃)** (SIMÕES *et al.*, 1999). Solução a 1% de FeCl₃ em EtOH. As cromatoplasmas foram borrifadas com a solução e observadas até o aparecimento de

manchas azuis sob fundo de coloração amarela (laranja), indicativa de substâncias fenólicas.

4.2. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

4.2.1. Espectrometria de absorção no Infravermelho:

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em aparelho FT-IR Spectrometer Perkin Elmer modelo Spectrum 2000 da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. As análises foram feitas utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio (KBr). Os máximos de frequência ($\lambda_{\text{máx}}$) das absorções estão expressos em centímetros recíprocos (cm^{-1}).

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear:

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H – 500 MHz) e carbono (RMN ^{13}C , ^1H desacoplado – 125 MHz), DEPT, gHSQC e gHMBC foram registrados utilizando espectrômetro Varian modelo INOVA 500 de 11,7 T, pertencente ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). O solvente utilizado para as análises foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), os deslocamentos químicos (δ) expressos em unidades ppm em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplete duplo), e m (multiplete).

4.3. PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão foi determinado em aparelho eletrônico da marca Mettler Toledo FP

4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados folhas e galhos para extração dos constituintes fixos. A coleta foi realizada na Fazenda Experimental da UFAM em julho de 2006. A exsicata encontra-se depositada no herbário do INPA sob nº 224595.

O material botânico foi separado em folhas, galhos finos e galhos grossos. (FIGURA 19). As folhas foram limpas e secas à sombra por dois dias em sala com ar-condicionado. Em seguida, todo o material (folhas e galhos) foi seco em estufa por dois dias em temperatura média de 60 °C. O material foi triturado e pulverizado em moinho de facas.



FIGURA 19. Separação do material vegetal de *Goupia glabra* em folhas, galhos finos e galhos grossos

4.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

As folhas, galhos finos e galhos grossos de cupiúba foram submetidos separadamente à extração em aparelho Soxhlet (até esgotamento) com os solventes: hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A concentração dos extratos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

4.6. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica foi realizada segundo método relatado por MATOS (2001) para a determinação da presença das seguintes classes de substâncias: fenólicos, taninos, antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, catequinas, flavonóides, flavanonas, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas, alcalóides, esteróides e triterpenóides.

4.6.1. Fenólicos e taninos

Foram transferidos 3 mL dos extratos dissolvidos a três tubos de ensaio e em seguida, foram adicionadas em cada um deles 3 gotas de uma solução alcoólica de FeCl_3 . Após agitação dos mesmos, a mudança de coloração e/ou formação de precipitado foram comparados com o teste em branco (tubo contendo apenas água e a solução alcoólica de FeCl_3) e com as cores descritas na TABELA 2.

Características observadas	Prováveis classes de substâncias
Coloração entre o azul e o vermelho	Indicativo de substâncias fenólicas
Precipitado azul escuro	Indicativo de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis)
Precipitado verde escuro	Indicativo de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos)

TABELA 2. Descrição das possíveis características observadas no teste de fenólicos e taninos

4.6.2. Antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Foram transferidos 3 mL de cada extrato dissolvido a três tubos de ensaio. Os extratos presentes nos primeiros tubos tiveram o pH corrigido a 3, os presentes nos segundos tubos tiveram o pH elevado a 8,5 e os presentes nos terceiros tubos elevado a pH 11. A mudança de coloração ocorrida nos tubos citados foi comparada com a descrição da TABELA 3.

Metabólitos	Cor em meio		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
antocianidinas e antocianinas	vermelho	lilás	azul-púrpura
flavonas, flavonóis e xantonas	–	–	amarelo
chalconas e auronas	vermelho	–	vermelho-púrpura
flavononóis	–	–	vermelho-laranja

TABELA 3. Colorações indicativas da presença de antocianinas, antocianidinas, e flavonóides

4.6.3. Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Em dois outros tubos de ensaio foram transferidos 4 mL de cada extrato dissolvido. Nos primeiros tubos foram adicionadas gotas de HCl até pH 1 a 3 e nos segundos gotas de NaOH até pH 11. Após aquecimento dos mesmos durante 2 a 3 minutos, as mudanças ocorridas foram comparadas com a TABELA 4.

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
leucoantocianidinas	vermelha	–
Catequinas (taninos catéquicos)	pardo-vermelha	–
flavanonas	–	vermelho-laranja

TABELA 4. Colorações indicativas da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

4.6.4. Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Em tubos de ensaio contendo 4 mL de cada extrato dissolvido foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado (podendo também ser utilizado magnésio em fita) e 0,5 mL de HCl concentrado. Após término da reação, o aparecimento ou intensificação da cor vermelha indicou a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou em forma de heterosídios.

4.6.5. Esteróides e triterpenóides

Cada extrato bruto foi dissolvido em 1 a 2 mL de clorofórmio. Em seguida cada solução foi filtrada para um tubo de ensaio seco com auxílio de um funil contendo algodão e alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. A esses novos tubos foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado tendo o cuidado de se agitar suavemente os tubos entre as duas operações e depois da adição do ácido. Em seguida as colorações formadas foram comparadas com a descrição da TABELA 5.

Colorações observadas	Prováveis classes de substâncias
Azul evanescente seguida de verde permanente	Indicativo de esteróides livres
Parda até vermelha	Indicativo de triterpenos pentacíclicos livres

TABELA 5. Colorações indicativas da presença de esteróides e triterpenóides

4.6.6. Alcalóides

O pH dos extratos foi corrigido para 11 utilizando NH_4OH . Em seguida, cada solução obtida foi submetida a uma extração líquido-líquido utilizando três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma mistura éter-clorofórmio 3:1. As fases éter-clorofórmio obtidas foram tratadas com Na_2SO_4 anidro para eliminação de água e misturadas com 3 pequenas porções sucessivas de HCl diluído para extração das bases orgânicas existentes. As soluções aquosas ácidas obtidas foram distribuídas em 3 tubos de ensaio, e a cada tubo foram adicionadas, respectivamente, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides: Hager, Mayer e Dragendorff. A presença de alcalóides caracteriza-se pela formação de um precipitado floculoso e pesado em pelo menos 2 tubos dos 3 utilizados.

4.7. ENSAIO DE LETALIDADE SOBRE *Artemia Salina* LEACH

O ensaio de letalidade através do uso de *A. salina* é um método simples, rápido e de baixo custo para o biomonitoramento de extratos de plantas e é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar no estudo de substâncias com potencial atividade biológica (SIQUEIRA *et al.*, 2001). Esse ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Meyer e colaboradores (1982).

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade desse bioensaio favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica (MCLAUGHLIN apud SIQUEIRA *et al.*, 1998).

4.7.1. Procedimento

Para determinar a letalidade dos extratos de cupiúba foi realizado um bioensaio em *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982). Testou-se as soluções dos extratos na concentração de 500 µg/mL diluídas em DMSO (triplicata) a fim de se verificar a percentagem de mortalidade das larvas.

Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* foram incubados em solução salina (37 g de sal em um litro de água do Milli-Q) em uma concentração de 10 mg de cistos/100 mL de solução, sob iluminação artificial a 28 °C. Após 24 horas, as larvas no primeiro estágio larval (náuplio) foram transferidas para outro aquário que continha solução salina, e mantidas em nova incubação por mais 24 horas sob iluminação artificial a 28 °C. Após essa incubação, obteve-se apenas estágios de metanáuplios do microcrustáceo (cultura pura).

Primeiramente foram adicionados 4,5 mL da solução salina nos frascos e posteriormente adicionados cerca de 10 larvas por frasco, pescadas com auxílio de pipeta de Pasteur, em um volume de 0,5 mL.

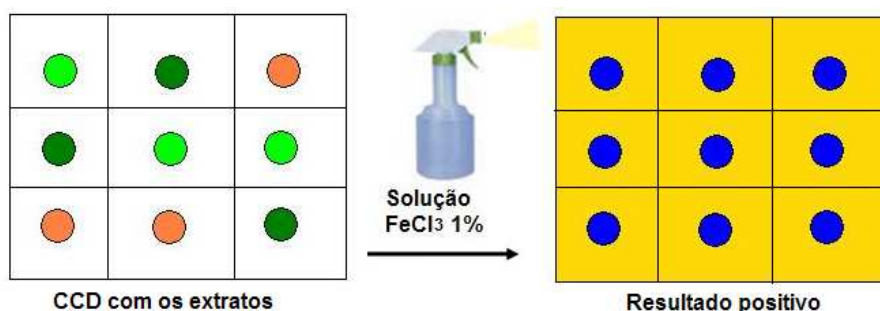
A partir dos extratos obtidos, as soluções foram testadas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em DMSO (triplicata), transferidas para os frascos com as 10 larvas cada um, em um volume final de 5 mL de solução salina. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 28 °C, após 24 horas os microcrustáceos imóveis e/ou depositados no fundo dos frascos são considerados como mortos.

Esse primeiro teste foi realizado a fim de se verificar a percentagem de mortalidade na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

4.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

4.8.1. Ensaio qualitativo

Os extratos foram analisados em placas de CCD, aplicados na placa com auxílio de um capilar que, após secagem, foram borrifadas com uma solução a 1 % de FeCl_3 em etanol. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas azuis sob fundo de coloração amarela (laranja), indicativa da presença de substâncias fenólicas (ESQUEMA 1).



ESQUEMA 1. Procedimento para ensaio qualitativo de substâncias fenólicas

Para os extratos que apresentaram resultado positivo foi realizado o mesmo procedimento, com a diferença de que antes de serem borrifadas com a solução de FeCl_3 , as placas foram desenvolvidas em sistemas de eluição específicos: Hex/AcOEt (8:2) para os

extratos obtidos em hexano; em Hex/CHCl₃/AcOEt (5:2:5) para os extratos obtidos em AcOEt; e em CHCl₃/MeOH (7:3) para os extratos obtidos em MeOH. Esses eluentes foram determinados previamente para cada extrato, sendo escolhido o sistema de eluição que apresentou a melhor separação das manchas na placa de CCD para cada extrato.

4.8.2. Quantificação de Fenólicos totais

A quantificação colorimétrica de fenólicos foi realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (SOUSA *et al.*, 2007).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI), formando um complexo de cor amarela (NaMoO₄.2H₂O). Em presença de certos agentes redutores, como os fenólicos, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis [(PMoW₁₁O₄)⁴⁻], com média de estado de oxidação dos metais entre 5 (V) e 6 (VI). Dessa forma, esse reagente mede a capacidade redutora das amostras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (FIGURA 20) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

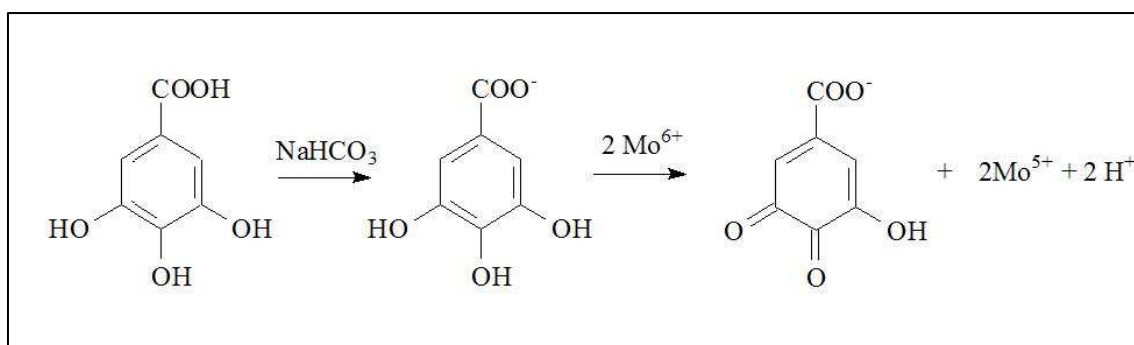
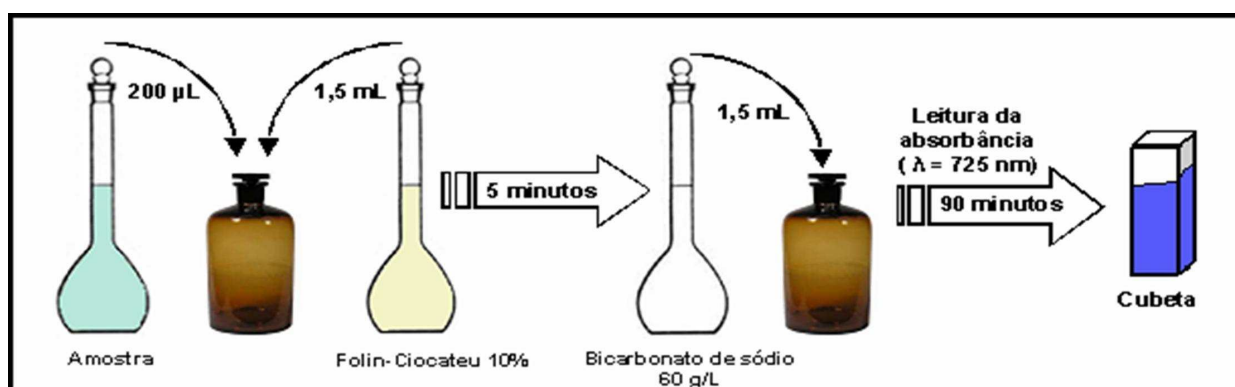


FIGURA 20. Reação do ácido gálico com molibdênio, presente no reagente de Folin-Ciocalteu

4.8.2.1. Procedimento

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras dos extratos da espécie estudada foi feita por meio de colorimetria na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (VELIOGLU *et al.*, 1998) com modificações.

Soluções do extrato (200 μ L) na concentração de 1 mg/mL foram colocadas em um frasco âmbar e foi adicionado 1500 μ L de solução 10% de reagente Folin-Ciocalteu e misturados vigorosamente. Após 5 min, 1500 μ L de solução 60g/L de NaHCO_3 foi adicionado à mistura e ficou em repouso no escuro por 1,5 h. A absorbância foi medida a 725 nm. (ESQUEMA 2).



ESQUEMA 2. Procedimento de quantificação de substâncias fenólicas

O mesmo procedimento foi repetido para todas as soluções do padrão ácido gálico (0,03125 a 0,25 mg/mL) e (0,025 a 0,4 mg/mL).

O teor de fenólicos totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída utilizando ácido gálico como padrão e referência e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (EAG). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas. Um dos mais utilizados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (SOUSA *et al.*, 2007). O radical DPPH[•] possui coloração púrpura (FIGURA 21), que absorve em um comprimento de onda de 517 nm. Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH-H) (FIGURA 22) de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

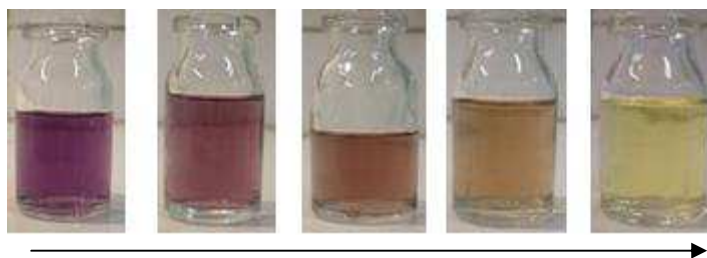


FIGURA 21. Perda da coloração púrpura do radical DPPH[•]

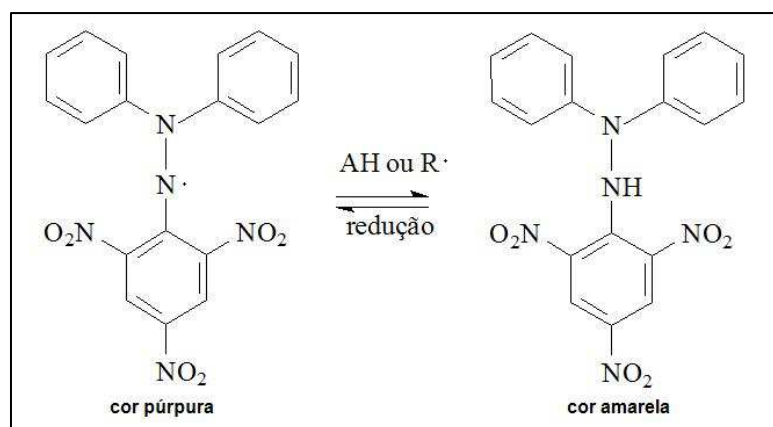
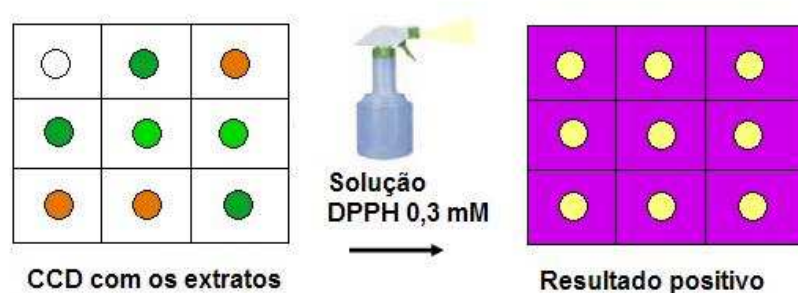


FIGURA 22. Reação química do radical DPPH[•] formando DPPH-H

4.9.1. Ensaio qualitativo

Os extratos foram analisados em placas de CCD, aplicados na placa com auxílio de um capilar que, após secagem, foram borrifadas com uma solução a 0,3 mM/L do radical

DPPH[•] em MeOH (MONTENEGRO *et al.*, 2006; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativa de possível atividade antioxidante (ESQUEMA 3).



ESQUEMA 3. Procedimento para ensaio qualitativo da atividade antioxidante

Para os extratos que apresentaram resultado positivo foi realizado o mesmo procedimento, com a diferença de que antes de serem borrifadas com a solução de DPPH[•], as placas foram desenvolvidas com os seguintes eluentes: Hex/AcOEt (8:2) para os extratos em hexano; em Hex/CHCl₃/AcOEt (8:1:2) para os extratos em AcOEt; e em CHCl₃/MeOH (7:3) para os extratos em MeOH.

4.9.2. Ensaio quantitativo utilizando cubeta de quartzo

A determinação da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Mensor e colaboradores (2001), com algumas modificações, monitorando o consumo do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) pelas amostras através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. É um ensaio rápido e fácil para avaliar a presença de substâncias antioxidantes na amostra.

As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis Spectronic BioMate 3, tendo como controle positivo quercetina comercial.

4.9.2.1. Amostras

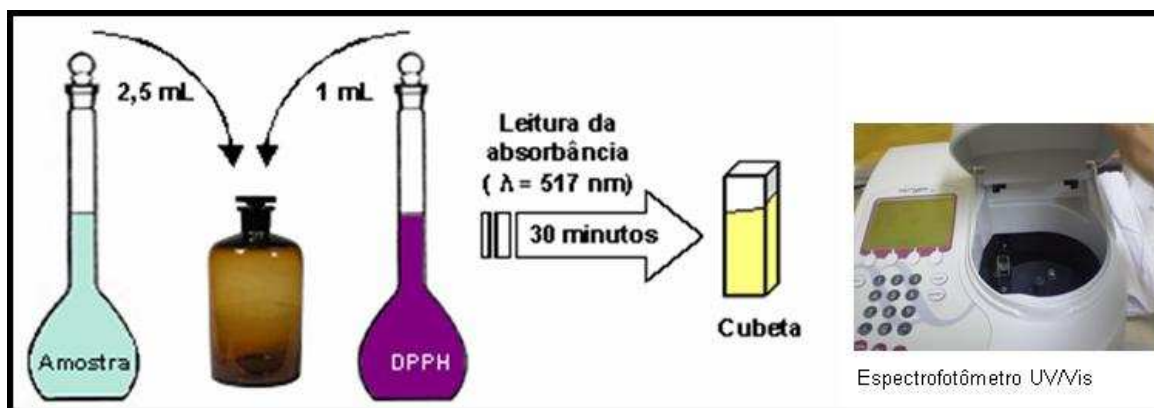
Soluções dos extratos (1000 $\mu\text{g/mL}$) e do controle positivo (quercetina) em MeOH foram previamente preparadas e posteriormente diluídas nas concentrações 250, 125, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos e 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 $\mu\text{g/mL}$ para o padrão.

4.9.2.2. Controle e branco da amostra

O controle foi preparado com 2,5 mL de MeOH e 1 mL da solução de DPPH $\cdot$. O branco foi preparado na maior concentração do extrato. Adiciona-se 2,5 mL de extrato e 1 mL de MeOH. O branco do padrão também foi realizado com 2,5 mL da solução do padrão na maior concentração e 1 mL de MeOH.

4.9.2.3. Procedimento

Um volume de 2,5 mL de solução de quercetina ou de extrato em diferentes concentrações foi adicionado a 1,0 mL de solução de DPPH $\cdot$ na concentração de 0,3 mM/L e misturados vigorosamente. A leitura da absorbância da mistura reacional (quercetina + DPPH $\cdot$) foi realizada a 517 nm após 30 minutos (ESQUEMA 4).



ESQUEMA 4. Procedimento para ensaio quantitativo da atividade antioxidante em cubeta

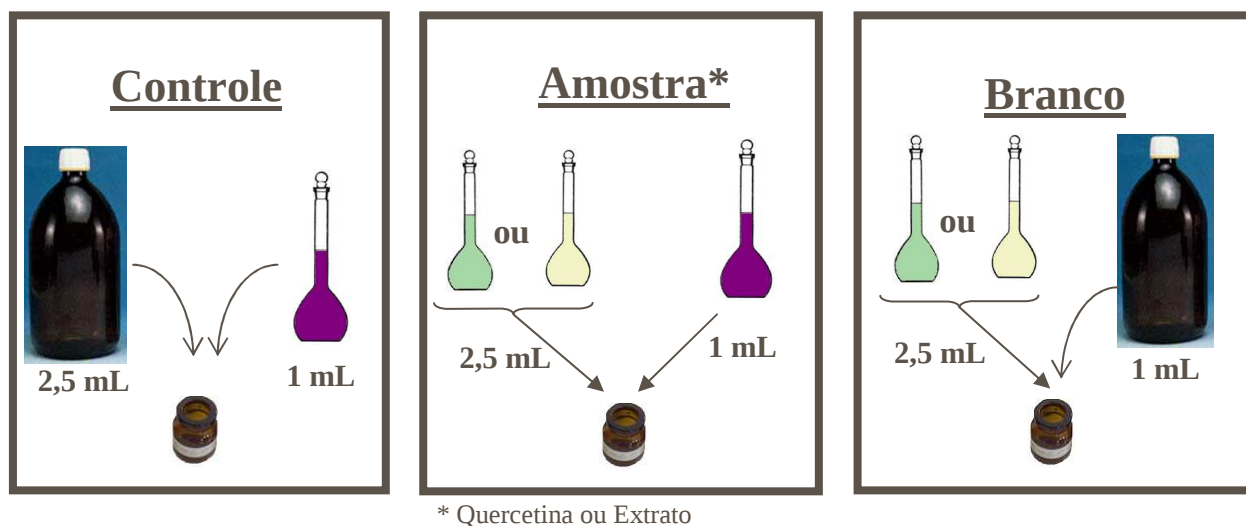
A partir dos valores obtidos foi construída a curva de calibração. As medidas foram feitas em cubeta de quartzo com percurso óptico de 1 cm.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem da atividade antioxidante (%AA), determinada pela seguinte Equação:

$$\% AA = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right\}$$

onde $Abs_{controle}$ é a média da absorbância da solução metanólica de DPPH[•] e $Abs_{amostra}$ é a absorbância de cada triplicata da mistura reacional (DPPH[•] + amostra) e Abs_{branco} é a média da absorbância da solução da amostra em MeOH. (ESQUEMA 5).



ESQUEMA 5. Procedimento para preparo do controle, amostra (padrão ou extrato) e branco da amostra

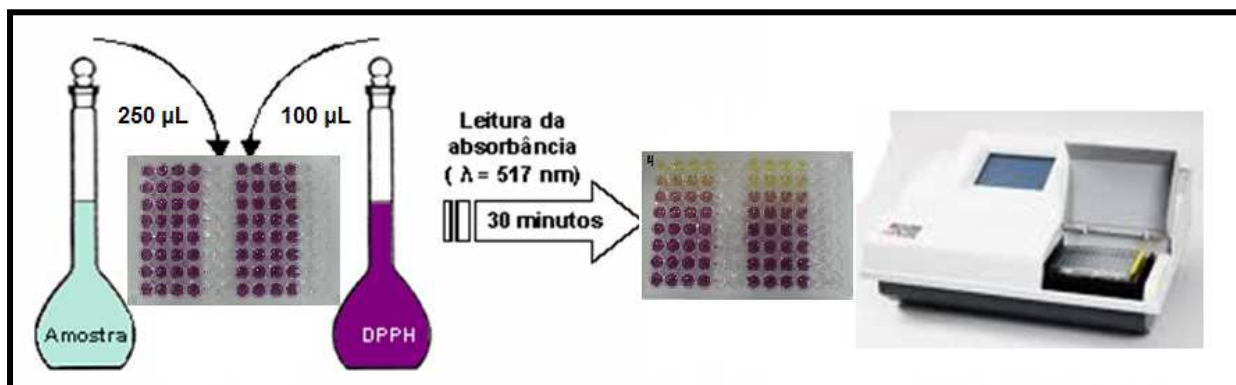
A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50% é denominada concentração eficiente

(CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de $DPPH^{\bullet}$ por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

A CE_{50} foi determinada por interpolação da curva de calibração, da atividade antioxidante (%AA) contra a concentração da amostra.

4.9.3. Ensaio quantitativo utilizando microplaca

A determinação da atividade antioxidante utilizando microplaca de 96 poços é semelhante a que utiliza cubeta de quartzo. As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Bio-Rad, modelo 3550 UV, tendo como controle positivo quercetina.



ESQUEMA 6. Procedimento para ensaio quantitativo da atividade antioxidante em microplaca

Um volume de 250 µL de solução de quercetina em diferentes concentrações foi adicionado a 100 µL de solução de $DPPH^{\bullet}$ na concentração de 0,3 mM/L em microplaca de 96 poços. A leitura da absorbância da mistura reacional (quercetina + $DPPH^{\bullet}$) foi realizada a 517 nm após 30 minutos (ESQUEMA 6).

A partir dos valores obtidos foi construída a curva de calibração. O mesmo procedimento foi realizado para os extratos de cupiúba. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata. O tratamento dos dados obtidos e a determinação da CE_{50} são realizados da mesma forma que o procedimento que utiliza cubeta de quartzo.

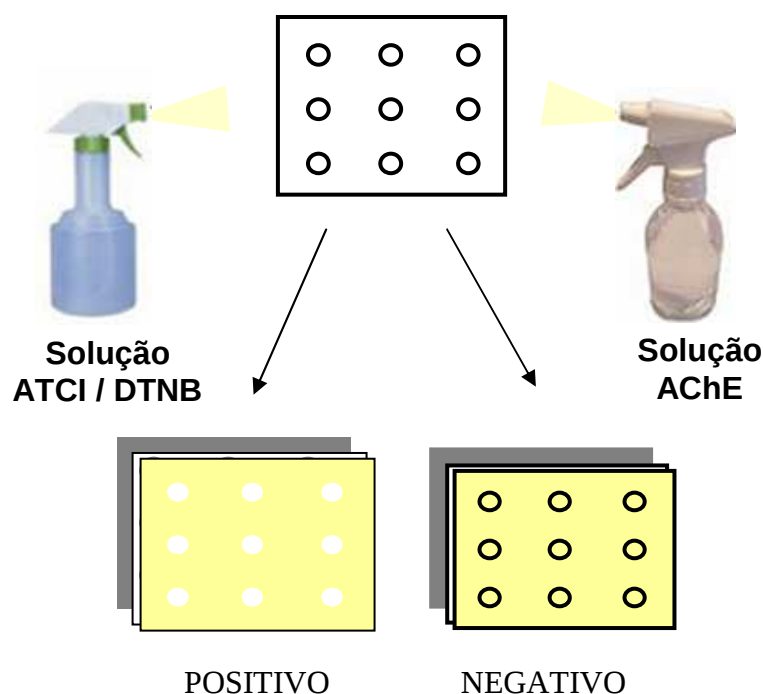
4.10. ATIVIDADE INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE

A avaliação qualitativa da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase foi efetuada de acordo com o ensaio enzimático descrito por Ellman (1961) e modificado por Rhee e colaboradores (2001).

Foram preparadas soluções dos extratos na concentração de 5 mg/mL e aplicados (10 μ L) em cromatoplacas (gel de sílica, Merck). Após eliminação do solvente, as cromatoplacas foram borrifadas com solução aquosa 5 mM de iodeto de acetilcolina e com o reagente de Ellman.

Após secagem, as cromatoplacas foram borrifadas com a solução contendo a enzima acetilcolinesterase (3U/mL em solução 50 mM do tampão Tris-HCl pH=8, contendo 0,1% de albumina sérica bovina).

Foi utilizado eserina (fisostigmina) como padrão. A inibição da atividade enzimática é sugerida pelo surgimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo amarelo (ESQUEMA 7).



ESQUEMA 7. Procedimento para Ensaio qualitativo da atividade inibidora de acetilcolinesterase

4.11. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), através do convênio entre UFAM / LOE UFC, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. Manoel Odorico de Moraes e Cláudia de Oliveira Pessoa.

Esses testes tiveram o objetivo de verificar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos com três linhagens de células tumorais, parte de uma varredura para determinação do potencial antitumoral das amostras.

4.11.1. Procedimento

4.11.1.1. Varredura inicial

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) (MOSSMAN, 1983).

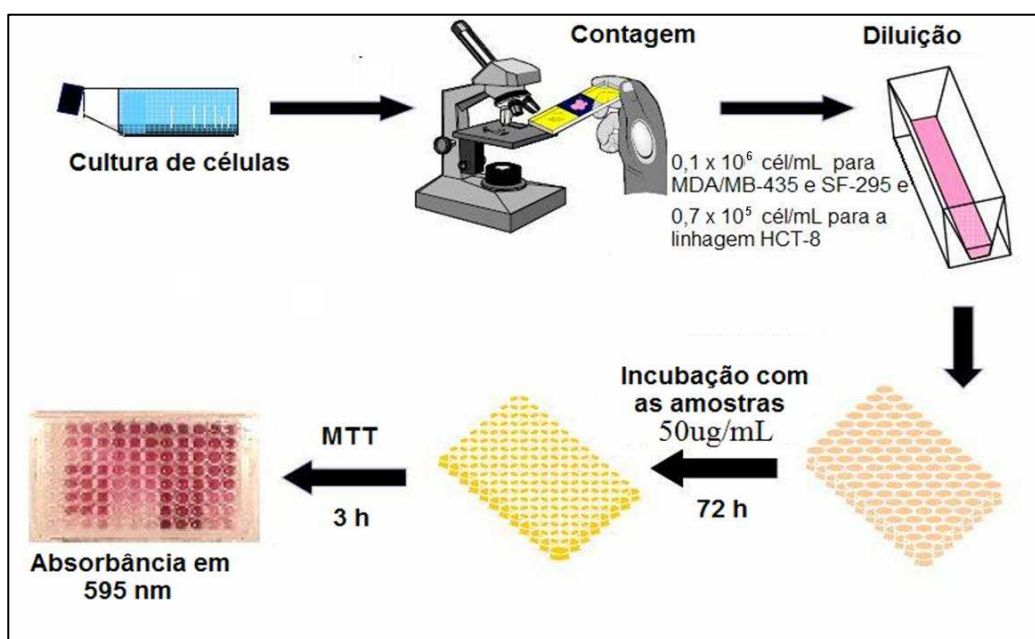
As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Os extratos foram dissolvidos em DMSO puro estéril e testados na concentração final de 50 µg/mL e as frações na concentração de 25 µg/mL.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA-MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. Em seguida foram adicionadas as amostras dos extratos e frações na concentração final de 50 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram

incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm (ESQUEMA 8).

Os experimentos foram analisados segundo a média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. A doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.



ESQUEMA 8. Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de triagem do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (INC), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990).

É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mossman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) de coloração amarela em azul de formazan (de coloração azul/roxo), a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (FIGURA 23).

O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

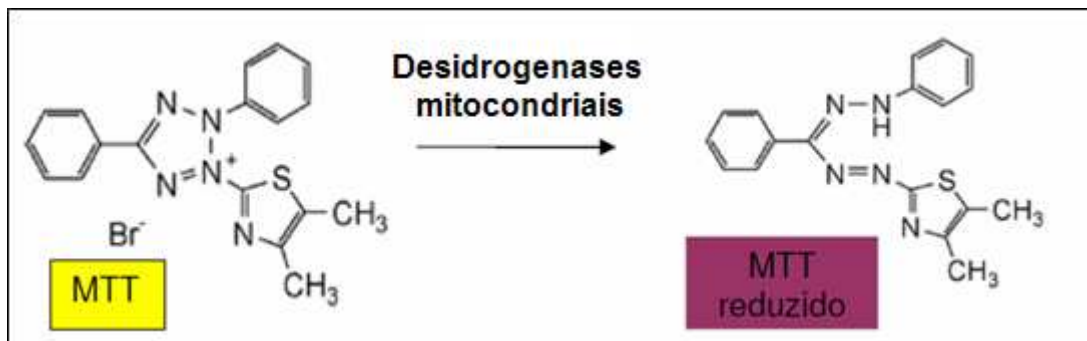


FIGURA 23. Redução do MTT por enzimas mitocondriais

4.11.1.2 Determinação da CI_{50}

As linhagens tumorais utilizadas, HL-60 (leucemia – humana), MDA-MB435 (mama - humana), HCT-8 (cólon - humana) e SF-295 (glioblastoma - humana), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

O extrato foi dissolvido e diluído com DMSO estéril na concentração estoque de 10 mg/mL.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295, $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8 e $0,3 \times 10^6$ cél/mL para a linhagem HL-60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

O cálculo da CI_{50} (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular) foi realizado a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism* (versão 4). Os extratos foram analisados a partir de dois experimentos realizados em triplicata. A doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

4.12. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

Esses ensaios foram realizados no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá – PR, através do convênio entre UFAM /UEM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Para avaliar o potencial antimicrobiano de extratos vegetais, existem diversas técnicas de varredura, desde as mais simples até os mais sofisticados. Os dois métodos mais utilizados são o de difusão em ágar e de diluição em caldo. O método de difusão em ágar pode ser realizado através de disco ou de poço, e é geralmente utilizado para microorganismos de crescimento rápido e para alguns de crescimento fastidioso. O método de diluição em caldo é utilizado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microorganismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ALVES *et al.*, 2008).

A técnica de microdiluição é uma adaptação da macrodiluição, e é denominada assim porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo e pode ser considerada a melhor opção para determinar a atividade antimicrobiana (ALVES *et al.*, 2008).

4.12.1. Procedimento para atividade contra bactérias

A determinação da atividade antibacteriana dos extratos de *G. glabra* foi realizada pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para as seguintes espécies de bactérias: 2 Gram positivo (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e 2 Gram negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (CLSI, 2005a).

As bactérias foram previamente cultivadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido Müller-Hinton (MH) por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, a cultura bacteriana foi diluída em solução salina 0,9% para atingir a equivalência de $1,5 \times 10^8$ células/mL, segundo a escala de McFarland, e então uma nova diluição de 1:10 foi feita em meio de cultura. Desta última diluição bacteriana, 5 µL foram colocados em cada poço da placa de 96 poços, já contendo 100 µL de meio de cultura MH juntamente com diferentes concentrações do extrato (concentração máxima de 1000 µg/mL).

A placa foi então incubada por 24 h a 37°C. Os poços onde o extrato inibiu o crescimento bacteriano (CIM) foram plaqueados em meio sólido ágar MH para determinação de atividade bactericida ou bacteriostática após mais 24 h de incubação. A presença de colônias indica uma concentração bacteriostática (CIM – concentração inibitória mínima) e a ausência de colônias indica uma concentração bactericida (CBM – concentração bactericida mínima) (FIGURA 24).

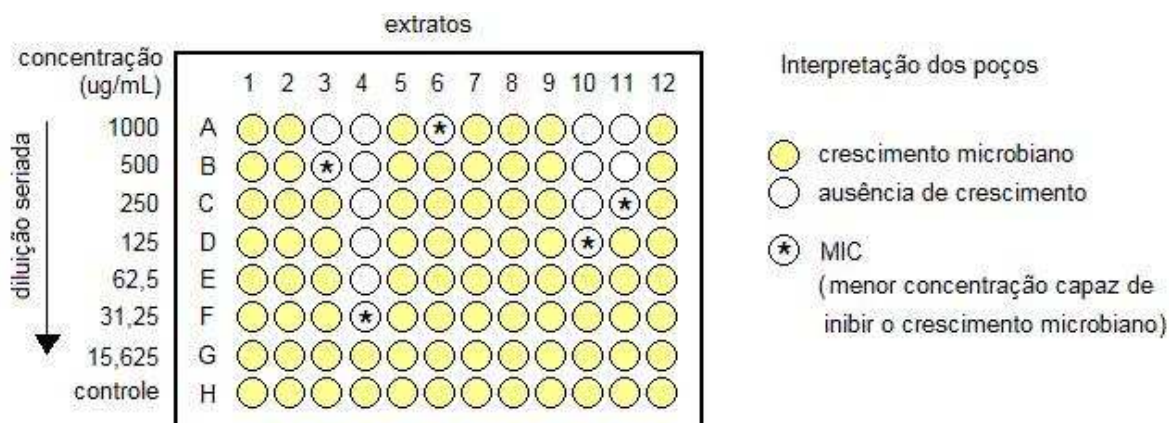


FIGURA 24. Exemplo de uma leitura de experimento de CIM, após o período de incubação

4.12.2 Procedimento para atividade contra fungos leveduriformes

A metodologia para análise da atividade antifúngica é semelhante à metodologia para análise da atividade antibacteriana, com algumas diferenças e foi realizada para as seguintes espécies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (CLSI, 2005b).

As leveduras foram previamente cultivadas em tudo de ensaio contendo meio de cultura líquido Sabouraud por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, a cultura foi diluída em solução salina 0,9% para atingir a equivalência de $1,5 \times 10^8$ células/mL, segundo a escala de McFarland, e então uma nova diluição de 1:100 foi feita em meio de cultura. Desta última diluição, 5 µL foram colocados em cada poço da placa de 96 poços, já contendo 100 µL de meio de cultura juntamente com diferentes concentrações da droga a ser testada (concentração máxima de 1000 µg/mL).

A placa foi então incubada por 48 h a 37°C. Os poços onde o extrato inibiu o crescimento das leveduras (CIM) foram plaqueados em meio sólido ágar Sabouraud para determinação de atividade fungicida ou fungistática após mais 48 h de incubação. A presença de colônias indica uma concentração fungistática (CIM – concentração inibitória mínima) e a ausência de colônias indica uma concentração fungicida (CFM – concentração fungicida mínima).

4.13 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Esses ensaios foram realizados no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá – PR, através do convênio entre UFAM /UEM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

4.13.1.1. Metodologia para *Leishmania amazonensis*

Formas promastigotas foram previamente cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultura Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 48 h a 25°C.

Após esse período, em uma placa de 24 poços, foi feita a inoculação de 1×10^6 parasitas/mL em cada poço, juntamente com meio de cultura e 10% de SFB, adicionado a várias concentrações do extrato, sendo 1 mL o volume final de cada poço.

A placa foi incubada por 72 h a 25°C. Ao final do período foi realizada a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, e a concentração que inibiu o crescimento do parasita em 50% foi determinada (CI_{50}) (BUCKNER apud DIAS *et al.*, 2009).

Ensaio de citotoxicidade com formas promastigotas são indicadores úteis para fracionamento biomonitorado de produtos vegetais (CROFT *et al.*, 2006)

4.13.2.1. Metodologia para *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas foram previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 96 h a 28°C.

Após esse período, em uma placa de 24 poços, foi feita a inoculação de 1×10^6 parasitas/mL em cada poço, juntamente com meio de cultura e 10% de SFB, adicionado a várias concentrações do extrato, sendo 1 mL o volume final de cada poço.

A placa foi incubada por 96 h a 28°C. Ao final do período foi realizada a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, e a concentração que inibiu o crescimento do parasita em 50% foi determinada (CI_{50}) (BUCKNER apud DIAS *et al.*, 2009).



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXTRATOS

O material vegetal coletado foi separado em folhas (522,0 g), galhos finos (289,0 g) e galhos grossos (115,6 g) para obtenção dos extratos orgânicos (10 extratos), codificados conforme a parte da planta e o solvente utilizado, de acordo com a TABELA 6.

TABELA 6. Extratos de *Goupia glabra*

Parte da planta	Solvente	Extratos	Massa (g)	Rendimento (%)
FOLHAS (522,0 g)	Hexano	EHF	6,35 g	1,22
	AcOEt	EAF	29,25 g	5,60
	MeOH	EMF1	18,40 g	3,52
	MeOH	EMF2	23,45 g	4,49
GALHOS FINOS (289,0 g)	Hexano	EHGf	1,84 g	0,64
	AcOEt	EAGf	10,03 g	3,47
	MeOH	EMGf	20,85 g	7,21
GALHOS GROSSOS (115,6 g)	Hexano	EHGg	3,09 g	2,67
	AcOEt	EAGg	0,66 g	0,57
	MeOH	EMGg	4,52 g	3,91

Para obtenção dos extratos, as folhas foram divididas em duas partes e colocadas em cartuchos de papel de filtro. Na 2ª extração com MeOH a cor do material extraído era diferente em relação à 1ª extração e por esse motivo o material foi separado em dois extratos: EMF1 e EMF2.

Analisando os rendimentos para os extratos obtidos em hexano, nota-se que as substâncias apolares encontram-se em maior concentração nos galhos grossos, seguido das folhas, e em menor concentração nos galhos finos. Em contraste com as substâncias de média polaridade (extraídas em AcOEt) que estão em menor concentração nos galhos grossos, seguido dos galhos finos. As folhas apresentaram maior percentual de substâncias de média polaridade. As substâncias de alta polaridade (extraídas em MeOH) se encontram em maior concentração em todas as três partes da planta.

O extrato que apresentou melhor rendimento foi o obtido em MeOH dos galhos finos (EMGf), seguido do extrato obtido em AcOEt das folhas (EAF).

5.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Na TABELA 7 são apresentados os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos analisados de acordo com os ensaios descritos por Matos (2001). Foram observados resultados positivos para esteróis e triterpenóides em todos os extratos e fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas nos extratos obtidos em AcOEt e MeOH.

Estes são ensaios preliminares e que indicam a possibilidade ou não de se encontrar determinadas classes de metabólitos nessas espécies, sendo necessários estudos químicos posteriores para melhor compreensão das mesmas.

TABELA 7. Resultado da prospecção fitoquímica dos extratos de cupiúba

CLASSES DE SUBSTÂNCIAS	EXTRATOS									
	EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
alcalóides	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
antocianinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
antocianidinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
catequinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
esteróides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fenóis	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+
flavanonas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
flavonas	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+
flavonóis	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+
flavononóis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
flavonóides	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
leucoantocianidinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
taninos	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
xantonas	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+

5.3. ENSAIO DE LETALIDADE SOBRE *Artemia Salina* LEACH

O ensaio de letalidade foi expresso em percentual de mortalidade das larvas de *A. salina* e os resultados estão dispostos na TABELA 8. Os extratos são considerados tóxicos quando apresentam percentual de mortalidade de larvas superior a 50%.

TABELA 8. Mortalidade (%) de larvas de *A. salina* (500 µg de extrato por mL) dos extratos de cupiúba

ENSAIO CITOTÓXICO	EXTRATOS									
	EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
Mortalidade de larvas (%)	20,0	2,5	12,5	5,0	10,0	25,0	22,5	17,5	17,5	20,0

Conforme o resultado observado na TABELA 3, nenhum dos extratos de cupiúba apresentou toxicidade frente às larvas de *A. salina*. O maior percentual de mortalidade foi observado para o extrato em AcOEt de galhos finos (EAGf, 25 %).

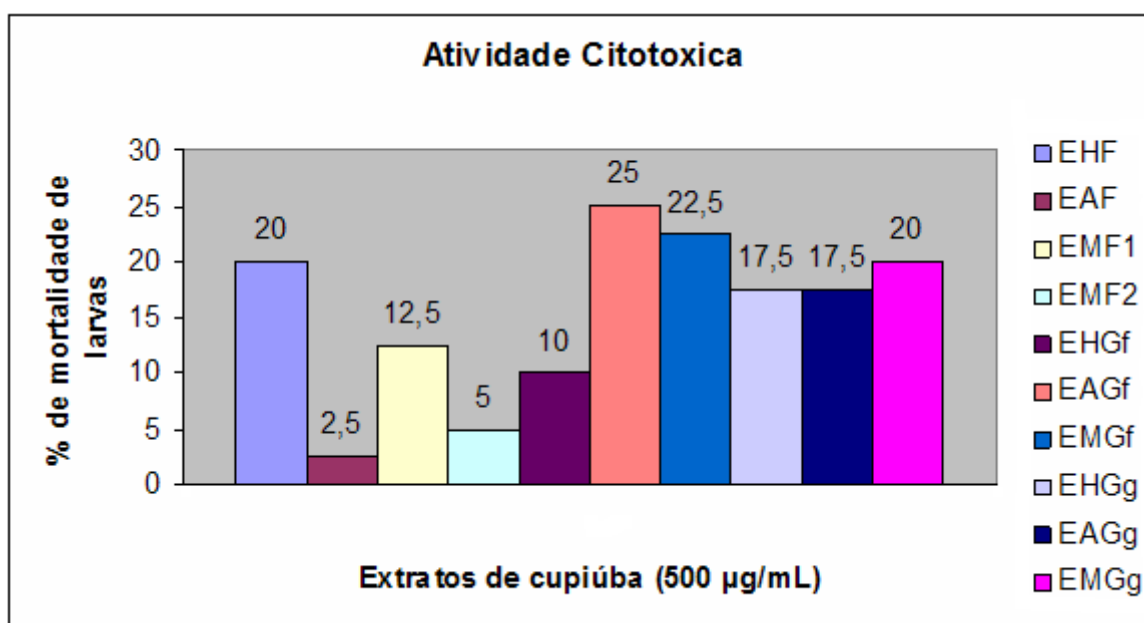


GRÁFICO 1. Mortalidade (%) de larvas de *A. salina* (500 µg de extrato por mL) dos extratos de cupiúba

5.4. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação qualitativa dos extratos por CCD em gel de sílica utilizando solução de DPPH em MeOH sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante, devido à presença de manchas amarelas sob fundo púrpura resultantes da redução do radical DPPH.

A presença de compostos fenólicos também foi sugerida, pois na avaliação qualitativa dos extratos, realizada por CCD em gel de sílica, utilizando solução de FeCl_3 em EtOH, foi verificada a presença de manchas azuis sob fundo amarelo/laranja.

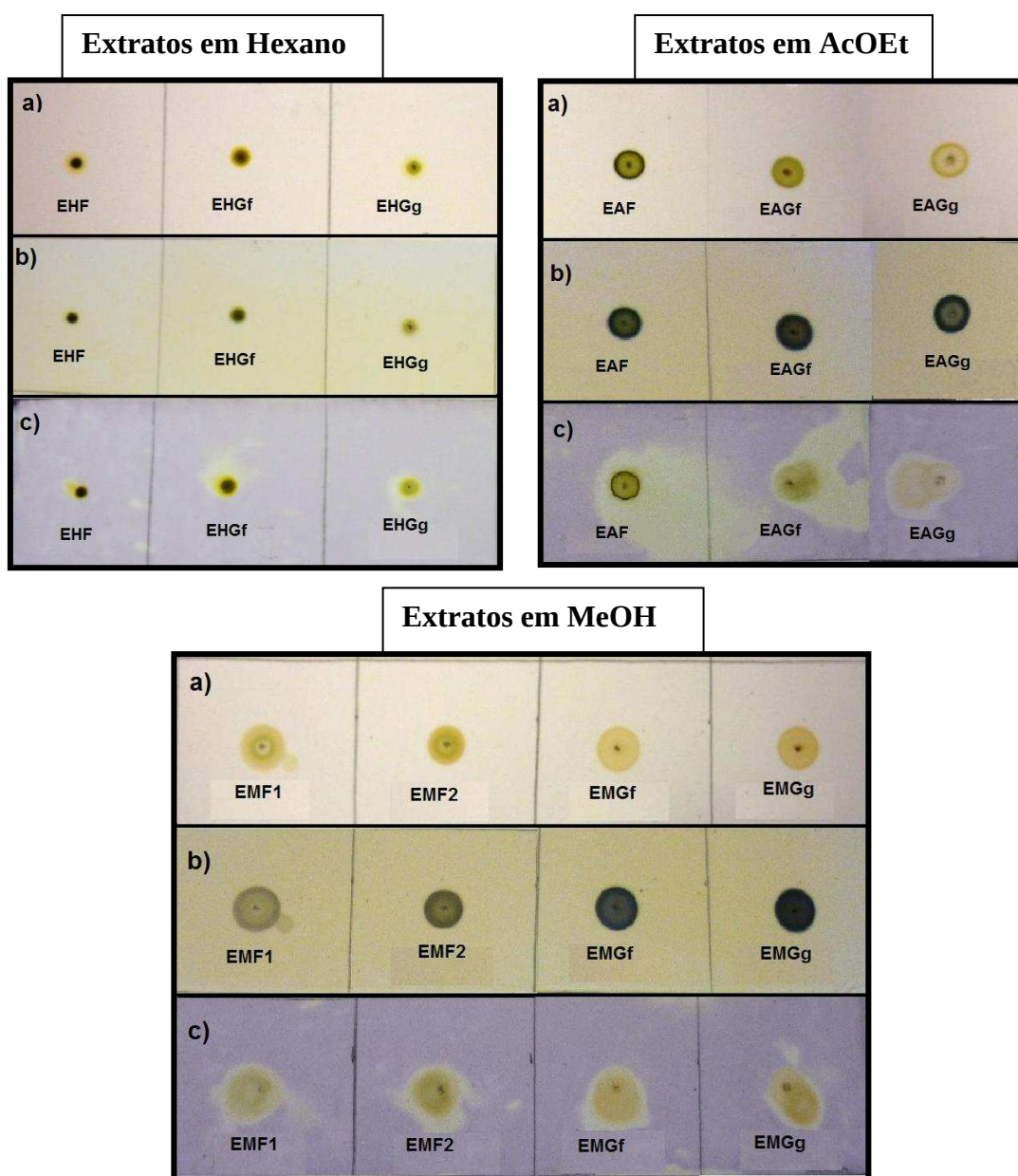


FIGURA 25. Avaliação preliminar da atividade antioxidante em CCD. a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl_3 ; c) após borrifar solução de DPPH

No ensaio com FeCl_3 (FIGURA 25b) os extratos obtidos em AcOEt e MeOH apresentaram uma mancha com forte intensidade de coloração azul, com exceção dos extratos em MeOH das folhas (EMF1 e EMF2) que apresentaram uma mancha azul bem mais fraca em comparação com os demais extratos, o que sugere que folhas e galhos possuem características químicas diferentes e que as substâncias fenólicas estão presente em maior concentração nos galhos.

Para o ensaio com DPPH (FIGURA 25c), os extratos obtidos em AcOEt e MeOH mostraram manchas com forte intensidade de coloração amarela, enquanto que os extratos obtidos em Hexano apresentaram fraca intensidade, exceto o extrato em hexano das folhas (EHF) que não apresentou nenhuma mancha amarela. As intensidades variadas para os diversos extratos sugerem que eles possuem diferentes características químicas e que os componentes mais polares presentes em extratos obtidos em AcOEt e MeOH contribuíram para o aumento da atividade.

Para os extratos que apresentaram resultado positivo foi realizado o mesmo procedimento, com a diferença de que antes de serem borrifadas com a solução de DPPH ou FeCl_3 , as placas foram desenvolvidas com os seguintes eluentes: Hex/AcOEt (8:2) para os extratos em hexano; em Hex/ CHCl_3 /AcOEt (5:2:5) para os extratos em AcOEt; e em CHCl_3 /MeOH (7:3) para os extratos em MeOH.

Nos extratos em Hexano (FIGURA 26) não foram observadas manchas azuis para o ensaio de fenóis (FIGURA 26b), embora os extratos tenham apresentado manchas amarelas no ensaio com DPPH (FIGURA 26c), principalmente nos extratos de galhos finos (Gf) e galhos grossos (Gg), sugerindo que a atividade antioxidante frente ao radical DPPH deve-se a compostos de natureza não-fenólica.

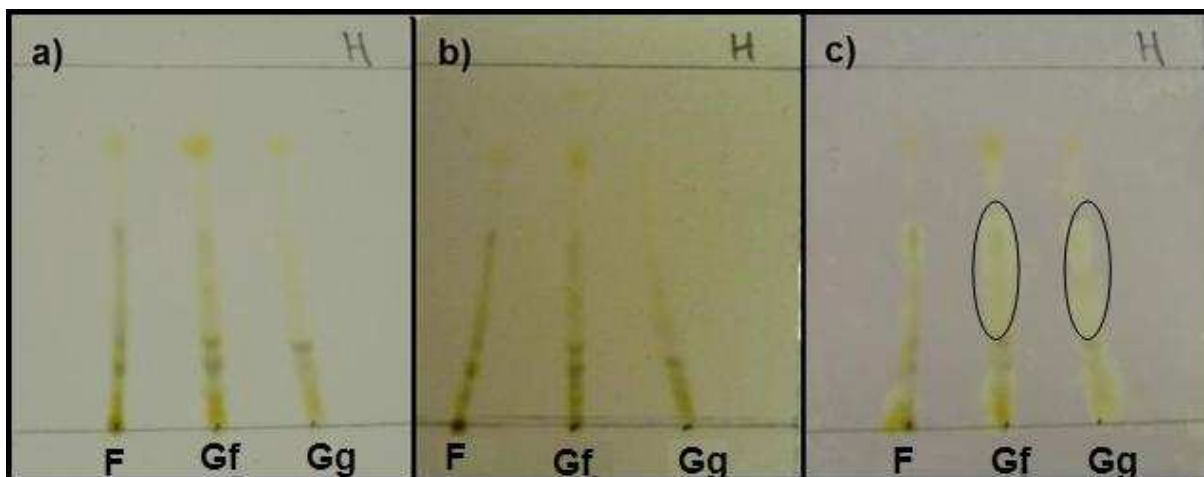


FIGURA 26. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em Hexano eluídos em Hex/AcOEt (8:2). a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl_3 ; c) após borrifar solução de DPPH

Nos extratos em AcOEt (FIGURA 27) foram observadas manchas azuis para o ensaio de fenóis (FIGURA 27b), principalmente no extrato de galhos finos (Gf). Para o ensaio com DPPH (FIGURA 27c), os extratos apresentaram manchas amarelas principalmente no extrato de galhos grossos (Gg) que mostrou mais uma mancha. A atividade antioxidante frente ao radical DPPH deve-se à compostos de natureza fenólica e não-fenólica.

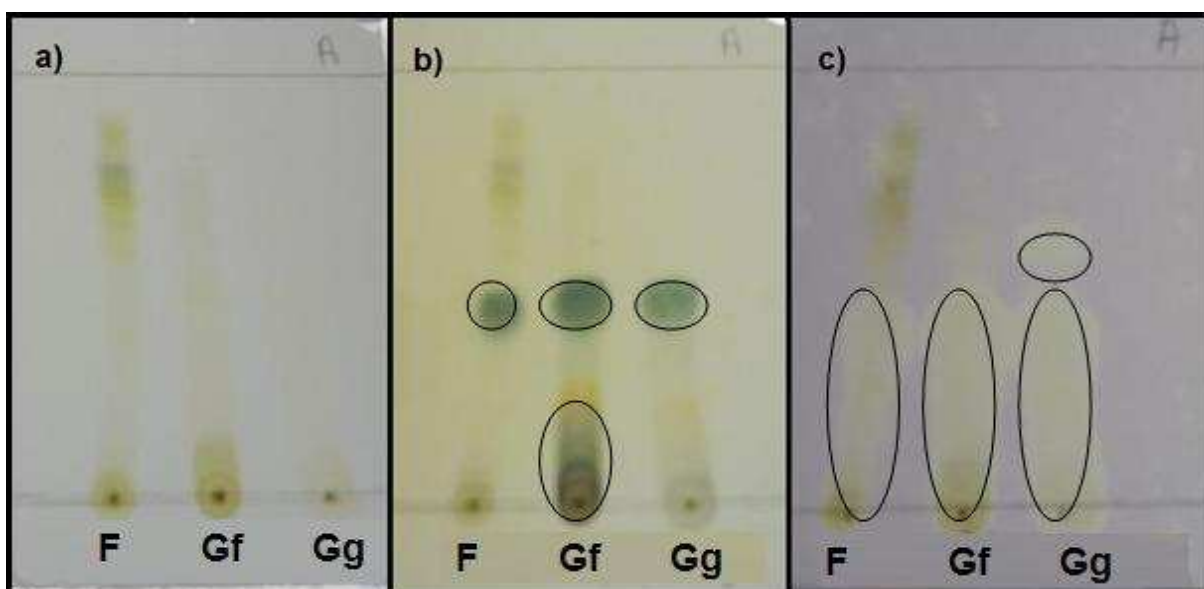


FIGURA 27. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em AcOEt eluídos em Hex/ CHCl_3 /AcOEt (5:2:5). a) antes do teste; b) após borrifar solução de FeCl_3 ; c) após borrifar solução de DPPH

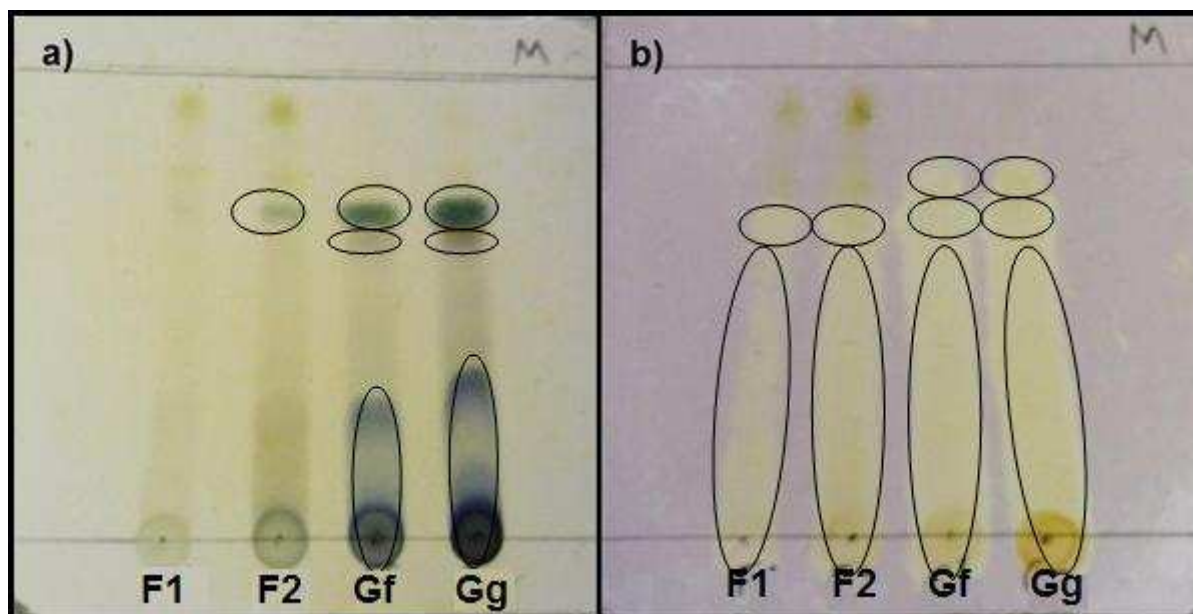


FIGURA 28. Avaliação antioxidante qualitativa dos extratos em MeOH eluídos em CHCl_3 /Metanol (7:3). a) após borrifar solução de FeCl_3 ; b) após borrifar solução de DPPH

Nos extratos em MeOH (FIGURA 28) foram observadas manchas azuis para o ensaio de fenóis (FIGURA 28a), principalmente nos extrato de galhos finos (Gf) e galhos grossos (Gg), evidenciando uma maior concentração de compostos fenólicos nesses extratos.

Para o ensaio com DPPH (FIGURA 28b), os extratos apresentaram fortes manchas amarelas em todos os extratos, principalmente nos extratos de galhos finos (Gf) e galhos grossos (Gg) onde foi observado mais uma mancha. A atividade antioxidante frente ao radical DPPH deve-se à compostos de natureza fenólica e não-fenólica.

Como observado na TABELA 9, os extratos obtidos em AcOEt e MeOH apresentaram resultado positivo para substâncias fenólicas e atividade seqüestradora do radical DPPH. Apenas os extratos de galhos finos e galhos grossos obtidos em hexano (EHGf e EHGg, respectivamente) demonstraram atividade antioxidante frente ao DPPH e não foi evidenciada, para esses extratos, a presença de fenólicos.

TABELA 9. Resultado do ensaio qualitativo de compostos fenólicos e atividade antioxidante

ENSAIO QUALITATIVO	EXTRATOS									
	EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
FENÓIS	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+
Atividade antioxidante (DPPH)	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5.5. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A partir dos resultados observados na avaliação qualitativa foram realizados os ensaios quantitativos de atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato bruto, estão apresentados na TABELA 10.

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos também estão dispostos na TABELA 10 e foram expressos em Concentração eficiente (CE_{50}), que é a concentração do extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH para uma amostra, menor será a CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante.

O padrão utilizado para a determinação da atividade antioxidante foi a quercetina que apresentou $CE_{50} = 3,27 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ no ensaio realizado em cubeta e $CE_{50} = 4,17 \pm 0,127 \mu\text{g/mL}$, no ensaio realizado em microplaca.

TABELA 10. Resultado da quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

ENSAIO QUANTITATIVO	EXTRATOS									
	EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
Fenois Totais ± DP (mg de EAG/g)	ND	242,86 ±15,60	144,36 ± 3,25	98,33 ± 3,78	ND	181,43 ± 9,66	214,6 ±3,14	ND	196,33 ± 6,57	137,33 ± 7,77
CE₅₀ ± DP (µg/mL) (em cubeta)	ND	9,76 ± 0,42	69,39 ± 2,26	84,68 ± 0,36	ND	21,00 ± 0,36	21,30 ± 0,54	ND	ND	ND
CE₅₀ ± DP (µg/mL) (em microplaca)	ND	19,87 ± 0,31	72,03 ± 1,87	85,95 ± 2,35	ND	35,08 ± 0,26	29,74 ±0,35	ND	27,68 ±0,02	30,17 ±1,20

ND (não determinado), DP (desvio padrão), EAG (equivalente de ácido gálico), CE₅₀ (Concentração eficiente)

O extrato que apresentou o melhor resultado para a quantificação de fenóis e atividade antioxidante foi o EAF (Extrato em AcOEt das folhas) com $242,86 \pm 15,60$ mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato seco e $CE_{50} = 9,76 \pm 0,42$ µg/mL (cubeta) e $CE_{50} = 19,87 \pm 0,31$ µg/mL (microplaca).

Esse extrato (EAF) foi fracionado e uma das substâncias ativas foi isolada e codificada como EAF4F3 (pp. 95-106). A atividade antioxidante de EAF4F3 foi avaliada em microplaca e apresentou $CE_{50} = 1,25 \pm 0,019$ µg/mL, ou seja, essa substância apresenta maior atividade antioxidante que o padrão utilizado (quercetina, $CE_{50} = 4,17 \pm 0,127$ µg/mL).

Os ensaios não foram realizados para os extratos obtidos em Hexano, pois os mesmos não solubilizaram em MeOH que é o solvente utilizado no teste.

5.5.1. Correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e a CE_{50}

Foi observada uma correlação positiva (90%) entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, avaliada em cubeta, dos extratos de *G. glabra* (GRÁFICO 2), no entanto o extrato EAGf não segue esse comportamento, o que sugere que

exista algum constituinte que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres nesse extrato.

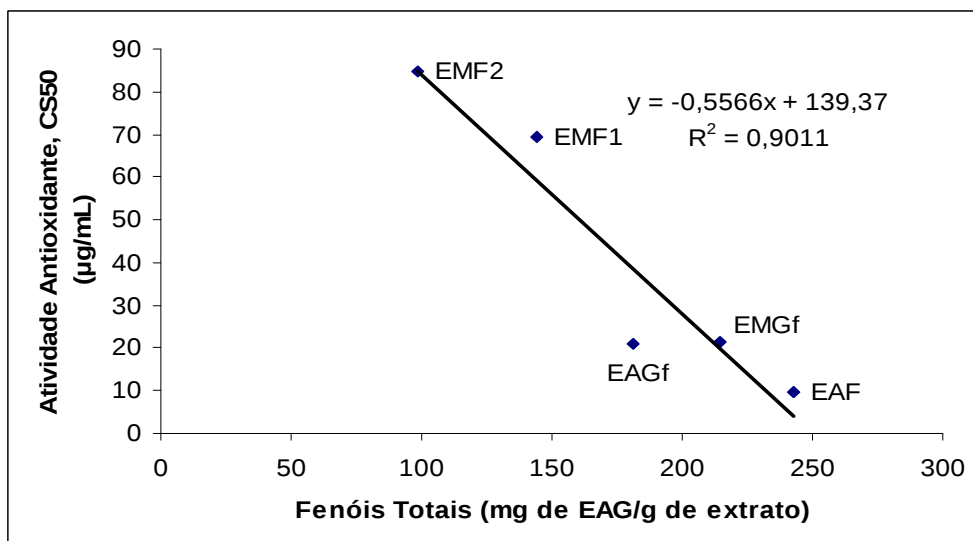


GRÁFICO 2. Correlação positiva entre a quantidade compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de cupiúba

Para a atividade antioxidante avaliada em microplaca não foi observada uma boa correlação ($R^2 = 0,6627$) entre os fenólicos totais e a CE_{50} (GRÁFICO 3).

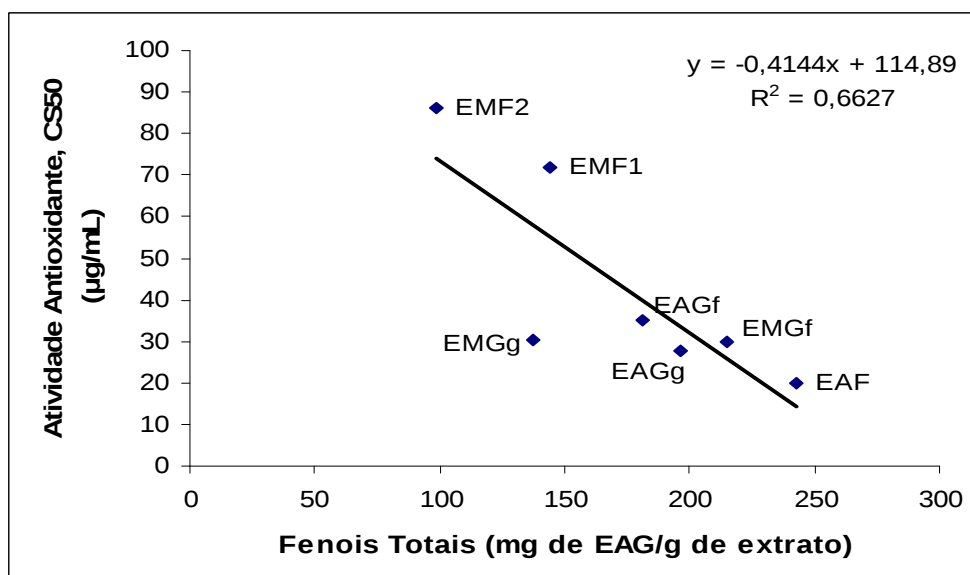


GRÁFICO 3. Correlação entre a quantidade compostos fenólicos e a atividade antioxidante (microplaca) de todos os extratos de cupiúba

Observa-se no GRÁFICO 4, onde o extrato em MeOH dos galhos grossos (EMGg) não foi incluído, uma boa correlação (91%) entre a atividade antioxidante avaliada em microplaca e os fenóis totais dos demais extratos de cupiúba.

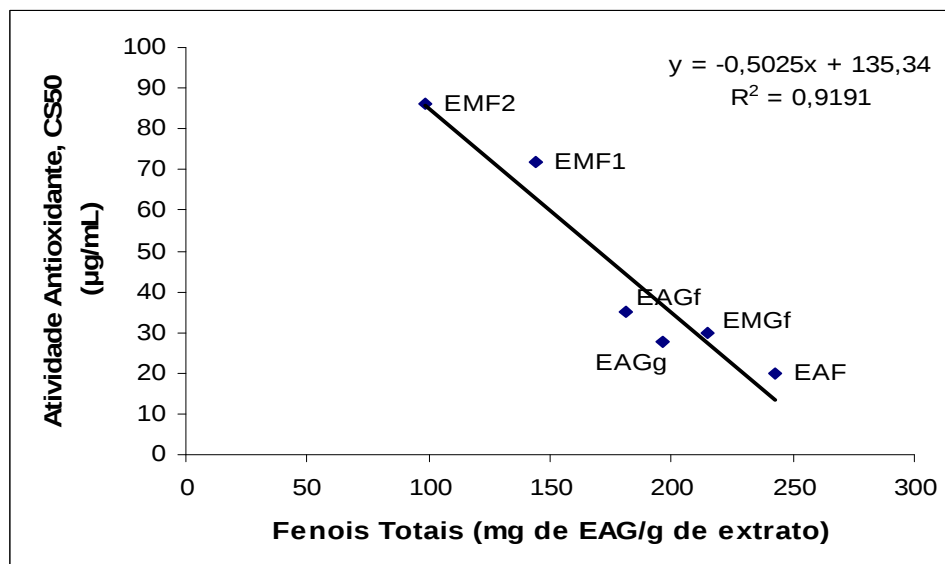


GRÁFICO 4. Correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (microplaca) dos extratos de cupiúba, com exceção do extrato EMGg

Essa observação sugere que exista algum constituinte que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação seqüestradora de radicais livres no extrato em MeOH dos galhos grossos (EMGg).

A partir dos resultados observados é possível sugerir que os compostos fenólicos presentes nos extratos de *G. glabra* são os principais responsáveis pela atividade antioxidante apresentada. Em estudos recentes, uma correlação positiva entre esses parâmetros também foi verificada (PIZZOLATTI *et al.*, 2007; ASMAWI *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2009).

Essa atividade pode ser atribuída à presença dos derivados de tropolona (Goupiolona A e Goupiolona B), 4-hidroxibenzaldeído, ácido cinâmico e ácido vanílico, isolados de folhas de *G. glabra* em estudo anterior (MESA-SIVERIO *et al.*, 2003), já que essas substâncias apresentam grupos fenólicos em sua estrutura (pp. 12-13).

5.6. ATIVIDADE INIBIDORA DE ACETILCOLINESTERASE

Na avaliação qualitativa da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase em CCD, na qual a inibição da atividade enzimática é sugerida pelo surgimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo amarelo, não foram observados resultados positivos para nenhum dos extratos de *G. glabra*.

O padrão utilizado nesse ensaio é a fisostigmina, um alcalóide isolado de *Physostigma venenosum* (Leguminosae/Fabaceae). Essa substância é um inibidor de colinesterases, que previne a destruição da acetilcolina, aumentando a atividade colinérgica. Drogas com esse potencial são utilizadas no tratamento da doença de Alzheimer (DA), que é caracterizada pela diminuição no funcionamento do sistema colinérgico central. O uso de inibidores de acetilcolinesterase pode resultar no aumento significativo na memória dos pacientes. Análogos de fisostigmina são utilizados atualmente no tratamento dessa doença e apresentam maior tempo de ação e são menos tóxicos que a fisostigmina (DEWICK, 2002).

A procura por novos inibidores de acetilcolinesterase é de grande interesse, pois somente as substâncias tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina foram aprovadas pelo FDA para o tratamento da DA (INGKANINAN *et al.*, 2003). Galantamina é o medicamento considerado mais efetivo no tratamento dessa doença, pois é seletivo, reversível, apresenta maior tempo de ação, e tem menos limitações (RHEE *et al.*, 2001).

Como observado acima, os principais inibidores de acetilcolinesterase conhecidos são alcalóides. Sendo assim, o resultado negativo para essa atividade, observado para os extratos *G. glabra*, talvez seja devido a ausência dessa classe de metabólitos nesses extratos, evidenciada na prospecção fitoquímica (p. 59).

5.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS

O resultado, em percentagem, da inibição das linhagens tumorais utilizadas MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) por extratos de cupiúba está disposto na TABELA 11.

TABELA 11. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL

LINHAGENS	EXTRATOS									
	EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
SF-295 (glioblastoma)	0,59 (PA)	12,61 (PA)	5,84 (PA)	6,89 (PA)	5,38 (PA)	16,22 (PA)	2,69 (PA)	42,73 (PA)	67,31 (MO)	3,87 (PA)
HCT-8 (cólon)	SA	58,35 (MO)	SA	SA	SA	68,02 (MO)	SA	39,30 (PA)	77,12 (MA)	SA
MDAMB-435 (mama)	SA	23,75 (PA)	SA	SA	14,26 (PA)	17,80 (PA)	SA	42,35 (PA)	30,10 (PA)	SA

0 %: SEM ATIVIDADE (SA); 1 – 50 %: POUCA ATIVIDADE (PA); 51 – 75 %: MODERADA ATIVIDADE (MO); 76 – 100 %: MUITA ATIVIDADE (MA)

Para avaliar o potencial citotóxico dos extratos testados, uma escala de intensidade foi utilizada. Amostras sem atividade (SA, inibição de crescimento celular igual a 0%), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50 %), com moderada atividade (MO, inibição de crescimento celular variando de 51 a 75 %) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento celular variando de 75 a 100 %).

Nos extratos obtidos em AcOEt: das folhas (EAF – 58,35%) e dos galhos finos (EAGf – 68,02%) foram observadas inibições de crescimento para a linhagem HCT-8 (cólon). No extrato em AcOEt dos g. grossos (EAGg) observou-se maior atividade para células de cólon HCT-8 (77,12%) do que para as células do sistema nervoso SF-295 (67,31%). O extrato que

apresentou maior atividade para células de mama MDA-MB435 (42,35%) foi o extrato em hexano dos g. grossos (EHGg).

Os melhores resultados foram observados para os extratos obtidos em AcOEt [EAF (folhas), EAGf (g. finos) e EAGg (g. grossos)], principalmente para células de cólon (HCT-8) que variaram de 58,35 a 77,12%.

Dos extratos avaliados, apenas o extrato em AcOEt dos galhos grossos (EAGg) apresentou potencial citotóxico (maior que 75 %) em pelo menos uma das três linhagens tumorais empregadas na avaliação. Para esse extrato foi determinada a CI_{50} , ou seja, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular.

O potencial citotóxico do EAGg foi avaliado para as mesmas linhagens de células tumorais MDA-MB435, HCT-8 e SF-295 (mama, cólon e sistema nervoso) e mais a linhagem HL-60 (leucemia – humano) e o resultado está disposto na TABELA 12.

O extrato EAGg apresentou valor de $CI_{50} = 13,73 \mu\text{g/mL}$, com intervalo de confiança entre 11,66 e 16,16 $\mu\text{g/mL}$, para a linhagem HL-60 (leucemia), o que representa que este extrato possui potencial citotóxico, visto que, segundo critérios estabelecidos pelo *Nacional Cancer Institute* (NCI, USA), o valor limite de CI_{50} para extratos com atividade citotóxica promissora é de 30 $\mu\text{g/mL}$ (BURIOL *et al.*, 2009).

TABELA 12. Atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas, realizado pelo Teste do MTT, após 72 horas de incubação. A tabela apresenta os valores de CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%)

Amostra	HL-60 (leucemia)	MDAMB-435 (mama)	SF-295 (glioblastoma)	HCT-8 (cólon)
EAGg	13,73 11,66 – 16,16	> 50	32,39 25,39 – 41,34	34,35 23,34 – 50,57
Dox	0,02 0,01-0,02	0,47 0,34-0,65	0,16 0,13-0,23	0,04 0,03-0,05

Esse extrato (EAGg) foi fracionado em coluna de sílica gel fornecendo 13 frações. As frações 3 e 4 foram reunidas (p.107). O potencial citotóxico das frações 3 a 13 foi avaliado para as linhagens de células tumorais MDA-MB435, HCT-8 e SF-295 (mama, cólon e sistema nervoso) e o resultado está disposto na TABELA 13. As frações 1 e 2 não foram incluídas, pois não havia quantidade suficiente para análise.

TABELA 13. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das frações de EAGg em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL. Valores são média ± DPM (Desvio padrão da média)

LINHAGENS	Frações de EAGg									
	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13
SF-295	13,86	85,37	40,63	71,89	65,17	67,77	64,06	64,52	53,92	3,44
(glioblastoma)	±5,24	±14,15	±5,89	±0,85	±2,23	±1,70	±2,75	±11,53	±8,58	±4,52
HCT-8	17,89	68,71	58,97	73,07	81,54	80,02	73,63	66,56	59,16	10,82
(cólon)	±0,62	±2,54	±7,18	±3,38	±1,24	±2,03	±7,01	±0,28	±14,80	±3,50
MDAMB-435	19,66	101,37	23,29	31,48	32,98	73,45	64,91	38,70	19,57	3,65
(mama)	± 3,26	±0,60	±2,96	±8,03	±27,05	±6,76	±3,38	±1,21	±6,76	±1,15

0 %: SEM ATIVIDADE (SA); 1 – 50 %: POUCA ATIVIDADE (PA); 51 – 75 %: MODERADA ATIVIDADE (MO); 76 – 100 %: MUITA ATIVIDADE (MA)

Os melhores resultados foram observados na fração 5 (EAGg5) que apresentou inibições de crescimento de 85,27% e 101,37% para as linhagens SF-295 e MDAMB-435, respectivamente, o que representa um elevado potencial citotóxico.

Para a linhagem HCT-8 as frações 8 (81,54%) e 9 (80,02%) apresentaram potencial citotóxico elevado.

Atividades moderadas foram observadas: na linhagem SF-295 para as frações 7 até 12, com resultados variando de 53,92 até 71,89%; na linhagem HCT-8 para as frações 5 até 12, com resultados variando de 58,97 até 73,63%; e na linhagem MDAMB-435 apenas para as frações 9 (73,45%) e 10 (64,91%).

Os extratos obtidos em AcOEt foram os que apresentaram melhor atividade citotóxica e para esses extratos foram observadas grandes quantidades de substâncias fenólicas (p. 67), as quais podem ser atribuídas a atividade verificada, como já observado em estudos anteriores para essa classe de metabólitos (DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2006). Essa atividade pode estar relacionada com a atividade antioxidante (WONG *et al.*, 2006).

A atividade citotóxica em células tumorais observada para os extratos de *G. glabra* também pode ser atribuída a presença das substâncias fenólicas isoladas anteriormente de folhas de *G. glabra*, Goupiolona A e Goupiolona B, pois essas substâncias se comportam como genotoxinas e, dessa forma, possuem potencial como drogas anti-câncer (MESA-SIVERIO *et al.*, 2003).

Cerca de 60% dos fármacos utilizados no tratamento do câncer são de origem vegetal (GULLO *et al.*, 2006). Visto a importância de produtos naturais na busca por fármacos antineoplásicos, o isolamento e identificação dos princípios ativos presentes no extrato EAGg é relevante.

5.8. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

A atividade antimicrobiana foi classificada de acordo com os valores de CIM, considerando como: forte inibição – CIM $\leq$ 100 $\mu\text{g/mL}$; inibição moderada – CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, fraca inibição - CIM entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$; e inativo – CIM acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS *et al.*, 2008).

5.8.1. Atividade antibacteriana

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana, expressos em $\mu\text{g/mL}$, estão disposto na TABELA 14.

TABELA 14. Atividade antibacteriostática e antibactericida de extratos de *Goupia glabra*

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Extratos	CIM/CBM	CIM/CBM	CIM/CBM	CIM/CBM
EAF	>500	>500	250/500	>500
EMF1	>500	>500	>500	>500
EMF2	>500	>500	>500	>500
EAGf	>500	>500	>500	>500
EMGf	>500	>500	>500	>500
EAGg	>500	>500	>500	>500
EMGg	>500	>500	>500	>500

CIM ($\mu\text{g/mL}$): concentração inibitória mínima, CBM ($\mu\text{g/mL}$): concentração bactericida mínima, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.

A concentração inibitória mínima (CIM) é a concentração bacteriostática, ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. A concentração bactericida mínima (CBM) é a concentração letal, ou seja, é a menor concentração capaz de inibir o crescimento e matar todas as bactérias.

Os extratos foram testados na concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$

Todos os extratos demonstraram algum grau de atividade bacteriana.

O extrato em AcOEt das folhas (EAF) foi o que apresentou a melhor atividade contra a bactéria *S. aureus*, com CIM e CBM de 250 e 500 µg/mL, respectivamente, representando uma inibição moderada.

Essa atividade pode ser atribuída às substâncias fenólicas, presentes em maior quantidade nesse extrato (p. 67), pois já foi observado, em estudos anteriores, que substâncias dessa classe de metabólitos apresentam atividade antimicrobiana (BALASUNDRAM *et al.*, 2005; KOCAÇALIŞKAN *et al.*, 2006; ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2009), como, por exemplo, flavonóides e taninos (PERES *et al.*, 2009).

Os demais extratos apresentaram atividades semelhantes contra as bactérias testadas (CIM e CBM >500 µg/mL), o que representa uma fraca inibição.

5.8.2 Atividade antifúngica

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica, expressos em µg/mL, estão dispostos na TABELA 15.

TABELA 15. Atividade antifungistática e antifungicida de extratos de *Goupia glabra*

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Extratos	CIM/CFM	CIM/CFM	CIM/CFM
EAF	500	>500	250
EMF1	500	>500	500
EMF2	250/500	>500	500
EAGf	500	>500	250
EMGf	500	>500	500
EAGg	250	>500	500
EMGg	500	>500	500

CIM (µg/mL): concentração inibitória mínima, CFM (µg/mL): concentração fungicida mínima. *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

A concentração inibitória mínima (CIM) é a concentração fungistática, ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. A concentração fungicida

mínima (CFM) é a concentração letal, ou seja, é a menor concentração capaz de inibir o crescimento e matar todos os fungos.

Os extratos foram testados na concentração máxima de 1000 µg/mL.

Todos os extratos demonstraram algum grau de atividade antifúngica. O fungo menos suscetível aos extratos foi a espécie *C. albicans* (CIM e CFM >500 µg/mL), o que representa uma inibição fraca.

Para a espécie *C. parapsilosis* os extratos em AcOEt das folhas (EAF) e dos galhos finos (EAGf) apresentaram inibição moderada, com CIM e CFM de 250 µg/mL.

Para a espécie *C. tropicalis*, o extrato em AcOEt dos galhos grossos (EAGg) apresentou atividade moderada, com CIM e CFM de 250 µg/mL, seguido do extrato em MeOH das folhas (EMF2) com CIM e CFM de 250 e 500 µg/mL, respectivamente.

De forma geral, os extratos apresentaram atividade antifúngica moderada para as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, e atividade fraca para a espécie *C. albicans*.

Com exceção do EMF2, os extratos que apresentaram melhor atividade foram os obtidos em AcOEt (EAF, EAGf e EAGg). Esses extratos apresentaram grandes quantidades de substâncias fenólicas (p. 67), as quais podem ser atribuídas a atividade verificada, como já observado em estudos anteriores para essa classe de metabólitos (BALASUNDRAM *et al.*, KOCAÇALIŞKAN *et al.*, 2006). Substâncias fenólicas presentes em óleos essenciais, como o eugenol e o carvacrol, apresentam atividade antifúngica e bactericida (HARRIS, 2002; HIDALGO & DE LA ROSA, 2009).

Um fracionamento monitorado por bioensaio se faz necessário a fim de isolar e identificar os princípios ativos presentes nos extratos de *G. glabra*, visto que a busca por novas alternativas para o tratamento de doenças infecciosas é uma necessidade urgente no cenário mundial e que cerca de 75% dos fármacos utilizados no tratamento dessas doenças são de origem vegetal (GULLO *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

5.9. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Os resultados da avaliação da atividade antiparasitária, apresentados como CI_{50} , contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania amazonensis*, estão dispostos na TABELA 16.

Os extratos foram testados na concentração máxima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 16. Atividade antiparasitária de extratos de *Goupia glabra*

	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
Extratos	CI_{50}	CI_{50}
EAF	>100	>100
EMF1	>100	>100
EMF2	>100	>100
EAGf	>100	50
EMGf	74	>100
EAGg	40	86
EMGg	>100	>100

CI_{50} : concentração (em $\mu\text{g/mL}$) que inibe o crescimento de 50% dos parasitas em relação ao controle

Os melhores resultados são observados para os extratos em AcOEt dos galhos finos (EAGf) e galhos grossos (EAGg) e em MeOH dos galhos finos (EMGf).

O EAGg apresentou atividade forte para ambos os parasitas com melhor resultado para *T. cruzi* ($CI_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$) em comparação com *L. amazonensis* ($CI_{50} = 86 \mu\text{g/mL}$).

Os extratos EAGf e EMGf apresentaram atividade forte e seletiva para os parasitas *L. amazonensis* ($CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$) e *T. cruzi* ($CI_{50} = 74 \mu\text{g/mL}$), respectivamente.

Esses resultados demonstram atividade antiparasitária significativa para extratos, em comparação com resultados observados para substâncias isoladas de plantas. Para formas epimastigotas de *T. cruzi*, por exemplo: uma piranocromona apresentou $CI_{50} = 11 \mu\text{g/mL}$ (atividade forte) e um protolimonóide apresentou $CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$ (atividade moderada). Para formas promastigotas de *L. amazonensis*, por exemplo: um limonóide e um alcalóide,

apresentaram inibição de 45,6% e 42,5%, respectivamente, na concentração 320 µg/mL, valores considerados como moderados (MOREIRA *et al.*, 2009).

Atualmente, diversos alcalóides e outras moléculas isoladas têm demonstrado atividade antiparasitária contra *Leishmania* sp com destaque para os metabólitos isolados de plantas da família Annonaceae, como os alcalóides: berberina, anonaina, liriodenina, dentre outros (CALDERON *et al.*, 2009).

De acordo com a prospeção fitoquímica, não foram observados resultados positivos para alcalóides nos extratos de *G. glabra*, o que sugere que outras classes de metabólitos são responsáveis pela atividade antiparasitária observada.

Estudos futuros com frações e substâncias isoladas são necessários para compreender e utilizar os princípios antiprotozoários presentes nos extratos de *G. glabra*, pois derivados de plantas continuam a fornecer estruturas fundamentais e agentes terapêuticos para o tratamento de doenças causadas por protozoários (TEMPONE *et al.*, 2005).

5.10. RESUMO DAS ATIVIDADES OBSERVADAS

Na TABELA 17, estão dispostos de forma resumida, as atividades observadas para os extratos de *G. glabra*.

Pode-se notar dessa forma que os extratos que apresentaram atividades biológicas mais promissoras foram EAF, EAGf e EAGg (obtidos em AcOEt).

As atividades foram atribuídas, de forma geral, às substâncias fenólicas presentes em grande quantidade nesses extratos.

TABELA 17. Atividades observadas para os extratos de *G. glabra*

ENSAIOS		Unidade	EXTRATOS									
			EHF	EAF	EMF1	EMF2	EHGf	EAGf	EMGf	EHGg	EAGg	EMGg
Antioxidante	Cubeta	CE ₅₀ (µg/mL)	ND	9,76	69,39	84,68	ND	21,00	21,30	ND	ND	ND
	Microplaca	CE ₅₀ (µg/mL)	ND	19,87	72,03	85,95	ND	35,08	29,74	ND	27,68	30,17
Fenólicos totais	Folin-Ciocalteu	mg de EAG/g	ND	242,86	144,36	98,33	ND	181,43	214,60	ND	196,33	137,33
Letalidade	<i>A. salina</i>	%	20,0	2,5	12,5	5,0	10,0	25,0	22,5	17,5	17,5	20,0
Citotoxicidade em células tumorais	SF-295	%	0,59	12,61	5,84	6,89	5,38	16,22	2,69	42,73	67,31	3,87
	HCT-8	%	–	58,35	–	–	–	68,02	–	39,30	77,12	–
	MDA-MB435	%	–	23,75	–	–	14,26	17,80	–	42,35	30,10	–
Antibacteriana	<i>P. aeruginosa</i>	CIM/CBM (µg/mL)	ND	>500	>500	>500	ND	>500	>500	ND	>500	>500
	<i>E. coli</i>		ND	>500	>500	>500	ND	>500	>500	ND	>500	>500
	<i>S. aureus</i>		ND	250/500	>500	>500	ND	>500	>500	ND	>500	>500
	<i>B. subtilis</i>		ND	>500	>500	>500	ND	>500	>500	ND	>500	>500
Antifúngica	<i>C. tropicalis</i>	CIM/CFM (µg/mL)	ND	500	500	250/500	ND	500	500	ND	250	500
	<i>C. albicans</i>		ND	>500	>500	>500	ND	>500	>500	ND	>500	>500
	<i>C. parapsilosis</i>		ND	250	500	500	ND	250	500	ND	500	500
Antiparasitária	<i>T. cruzi</i>	CI ₅₀	ND	>100	>100	>100	ND	>100	74	ND	40	>100
	<i>L. amazonensis</i>	(µg/mL)	ND	>100	>100	>100	ND	50	>100	ND	86	>100

LEGENDA:

EHF= extrato em hexano de folhas; **EAF**= extrato em AcOEt de folhas; **EMF1**= extrato em MeOH de folhas 1; **EMF2**= extrato em MeOH de folhas 2;

EHGf= extrato em hexano de galhos finos; **EAGf**= extrato em AcOEt de galhos finos; **EMGf**= extrato em MeOH dos galhos finos;

EHGg= extrato em hexano de galhos grossos; **EAGg**= extrato em AcOEt de galhos grossos; **EMGg**= extrato em MeOH dos galhos grossos.

(-) inativo; ND= não determinado; **CE₅₀**= Concentração do extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. **EAG**= equivalente de ácido gálico; **CIM**= concentração inibitória mínima; **CBM**= concentração bactericida mínima; **CFM**= concentração fungicida mínima; **CI₅₀**= concentração que inibe 50% do crescimento do parasita

SF-295 (glioblastoma - humano), HCT-8 (cólon - humano), MDA-MB435 (mama - humano),
Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,
Candida tropicalis, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*

Antioxidante – (forte) - menor que 20 µg/mL; (moderada) - entre 20 e 50 µg/mL; (fraca) - entre 50 e 100 µg/mL

Fenólicos totais – (forte) - maior que 200 mg/g; (moderada) - entre 100 e 200 mg/g; (fraca) - entre 100 e 50 mg/g

Letalidade – (moderada) - maior que 50%; (fraca) - entre 50 e 25 %; (inativo) - menor que 25%

Citotoxicidade em células tumorais – (forte) entre 100 e 75%; (moderada) entre 75 e 51%; (fraca) entre 1 e 50 %; (inativo) 0%

Antibacteriana – (forte) ≤ 100 µg/mL; (moderada) entre 100 e 500 µg/mL; (fraca) entre 500 e 1000 µg/mL;

Antifúngica – (forte) ≤ 100 µg/mL; (moderada) entre 100 e 500 µg/mL; (fraca) entre 500 e 1000 µg/mL;

Antiparasitária – (forte) ≤ 100 µg/mL; (fraca) maior que 100 µg/mL

5.11. FRACIONAMENTOS DE EXTRATOS E FRAÇÕES

5.11.1. Extrato de folhas obtido em Hexano (EHF)

O extrato de folhas obtido em hexano (EHF) (4,998 g) foi submetido ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica (4 cm) em gel de sílica (70-230 mesh) eluída em Hexano e Acetato de etila em gradiente de eluição, sendo recolhidas 9 frações (250 mL). As frações foram analisadas por CCD e codificadas numericamente de EHF1 a EHF9 (ESQUEMA 9).

A fração EHF5 (1,087 g) foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2 cm) eluída em Hexano, Clorofórmio e Acetona em gradiente de eluição. Recolheu-se um total de 11 frações que foram analisadas por CCD e codificadas por letra de EHF5A a EHF5K.

A fração EHF5H (569,9 mg) apresentou-se na forma de um sólido cristalino e foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,0 cm) com Hexano, Clorofórmio e Acetona em misturas de polaridade crescente, recolhendo-se 14 frações que foram analisadas por CCD e codificadas numericamente de EHF5H1 a EHF5H14.

As frações EHF5H6, EHF5H7 e EHF5H8 apresentaram-se sob a forma cristalina e foram reunidas, codificadas como EHF5H7 (348,8 mg) que foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,0 cm), utilizando carvão vegetal ativado para remover a clorofila presente. O eluente utilizado foi Clorofórmio e Acetona na proporção de 1:1 recolhendo-se 3 frações que foram analisadas por CCD e codificadas como EHF5H7/1, EHF5H7/2 e EHF5H7/3.

A fração EHF5H7/2 (270,5 mg) apresentou-se na forma de cristais e foi re-cromatografada nas mesmas condições da coluna anterior para remoção de clorofila. Foram recolhidas 4 frações que foram analisadas por CCD e codificadas como EHF5H7/2-1 a EHF5H7/2-4.

A fração EHF5H7/2-4 (120,0 mg) apresentou-se na forma de cristais e foi re-cromatografada nas mesmas condições da coluna anterior para remoção de clorofila. Foram

recolhidas 4 frações que foram analisadas por CCD e codificadas como EHF5H7/2-4-1 a EHF5H7/2-4-4.

As frações EHF5H7/2-4-2 e EHF5H7/2-4-3 apresentaram-se na forma de cristais e foram reunidas, codificadas como EHF5H7/2-4-2 e re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,0 cm) com Hexano, Clorofórmio e Acetona em misturas de polaridade crescente. Foram recolhidas 21 frações que foram analisadas por CCD reunidas em 8 frações e codificadas como EHF5H7/2-4-2A a EHF5H7/2-4-2H.

A fração EHF5H7/2-4-2D (33,8 mg) e EHF5H7/2-4-2E (21,9 mg) apresentavam-se como um sólido branco cristalino sob a forma de agulhas. Após o processo de isolamento através de colunas cromatográficas e análise por CCD, verificou se tratar da mesma substância, e ambas apresentavam uma única mancha (FIGURA 29). Essa fração foi enviada para análise de IV, RMN de H^1 , C^{13} e DEPT.

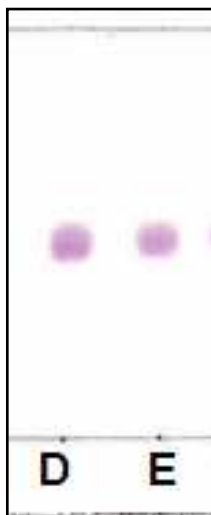
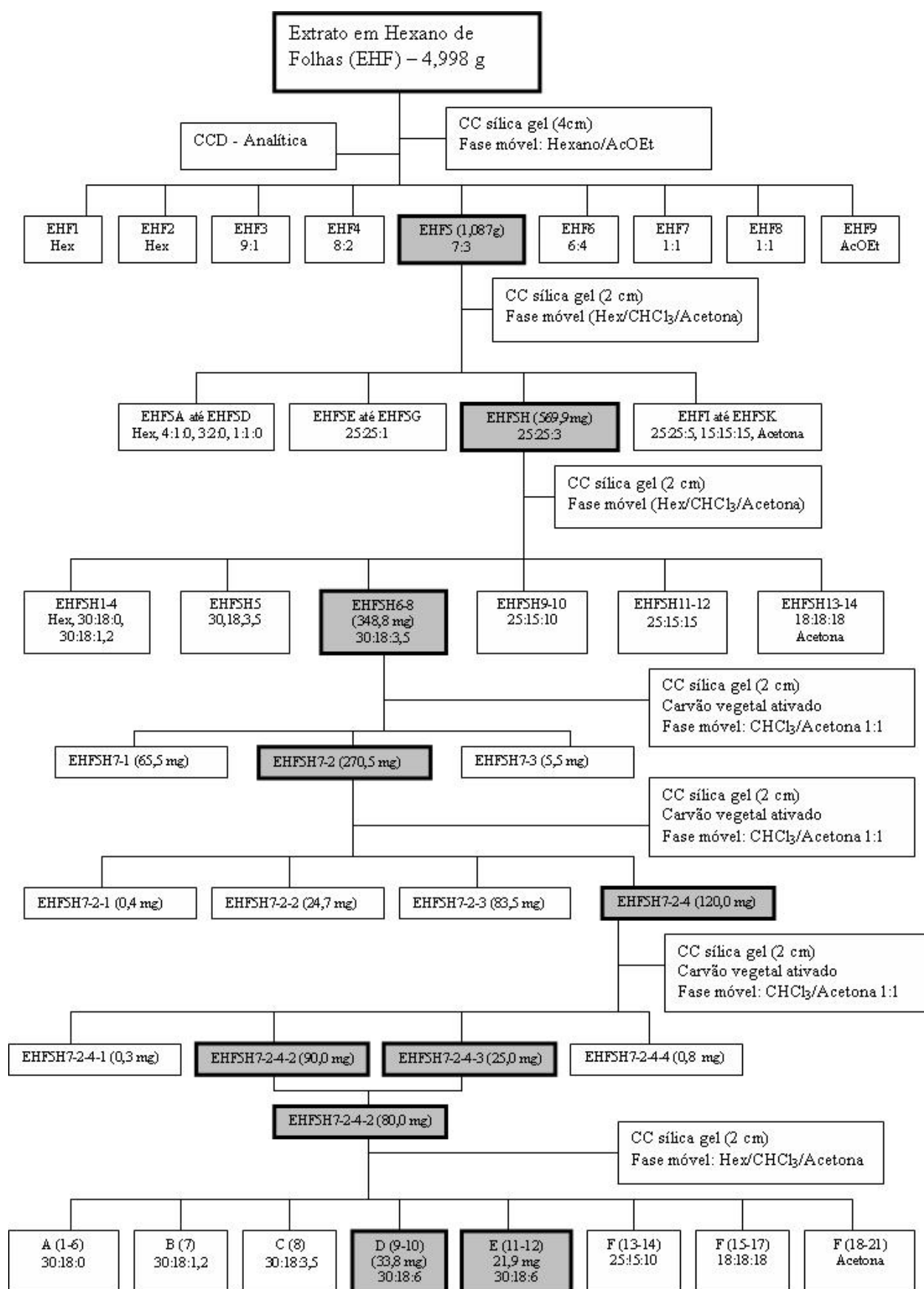


FIGURA 29. CCD das frações EHF5H7/2-4-2D e EHF5H7/2-4-2E, eluída em: Hex/ $CHCl_3$ /Acetona (5:3:2) e revelada com sulfato cérico/ácido sulfúrico



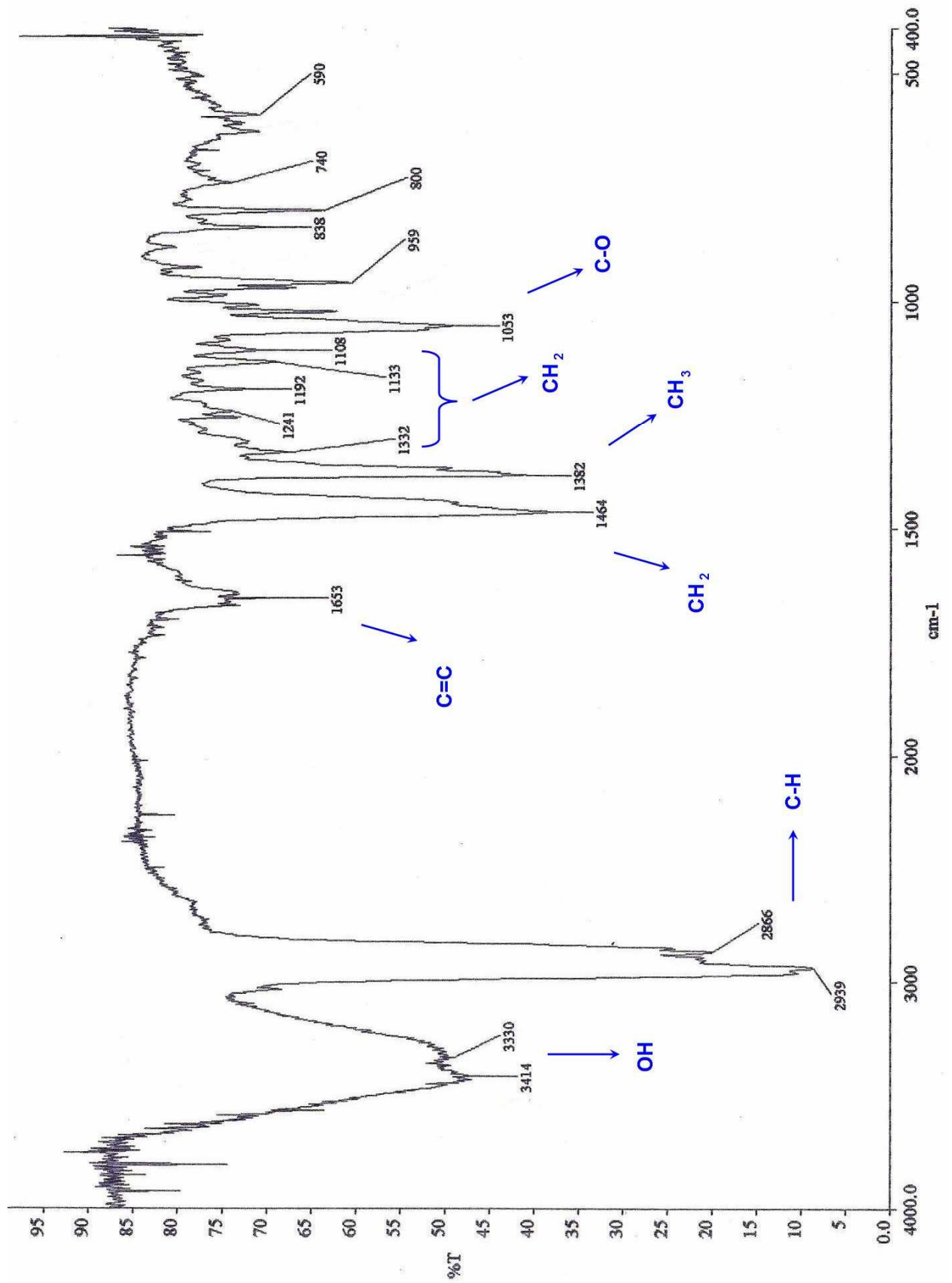
ESQUEMA 9. Fracionamento do Extrato em Hexano de Folhas (EHF)

5.11.1.1. Identificação de EHF5H7/2-4-2D

A substância codificada como EHF5H7/2-4-2D (33,8 mg), foi isolada na forma de um sólido branco cristalino. Para tal identificação, realizou-se experimentos de ponto de fusão (PF), IV e RMN de ^1H e ^{13}C e comparou-se com dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990; GOULART *et al.*, 2003; FACUNDO *et al.*, 2008).

A substância EHF5H7/2-4-2D apresentou PF igual a 136,2 °C. A CCD eluída em Hex/ CHCl_3 /Acetona 5:3:2 mostrou, após revelação com vanilina sulfúrica, uma mancha ($R_f = 0,48$) de coloração lilás característica de triterpenos ou esteróides (MATOS, 2001).

Analizando o espectro de absorção na região do IV (obtidos em pastilha de KBr) observou-se um perfil de absorção característico da família dos fitoesteróis. As seguintes bandas de absorção foram verificadas: uma banda larga em 3414-3330 cm^{-1} atribuída à deformação axial de O-H e sobreposição de várias bandas na região de 2840-3000 cm^{-1} devido à deformação axial de C-H de sistema saturado; em 1653 cm^{-1} uma banda atribuída à deformação axial de C=C; em 1464 cm^{-1} uma banda de deformação angular simétrica no plano de grupo metileno (CH_2); em 1382 cm^{-1} observa-se uma banda de deformação angular das ligações C-H do grupamento metila (CH_3); as absorções entre 1350 e 1150 cm^{-1} são atribuídas à deformação angular simétrica e assimétrica fora do plano do metileno (CH_2); em 1053 cm^{-1} uma absorção de deformação axial de C-O de álcool secundário com anel alicíclico de cinco ou seis átomos.



ESPECTRO 1. Espectro de IV de EHF5H7/2-4-2D

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT foram comparados com os dados já existentes na literatura (TABELA 13 e 14) e essa análise inicial indicou se tratar de uma mistura complexa de compostos com características de esteróides. (KOJIMA *et al.*, 1990; GOULART *et al.*, 2003; FACUNDO *et al.*, 2008). A partir dos dados obtidos foi possível perceber que a mistura isolada continha os esteróides: β -sitosterol e estigmasterol, e possivelmente, campesterol (FIGURA 30).

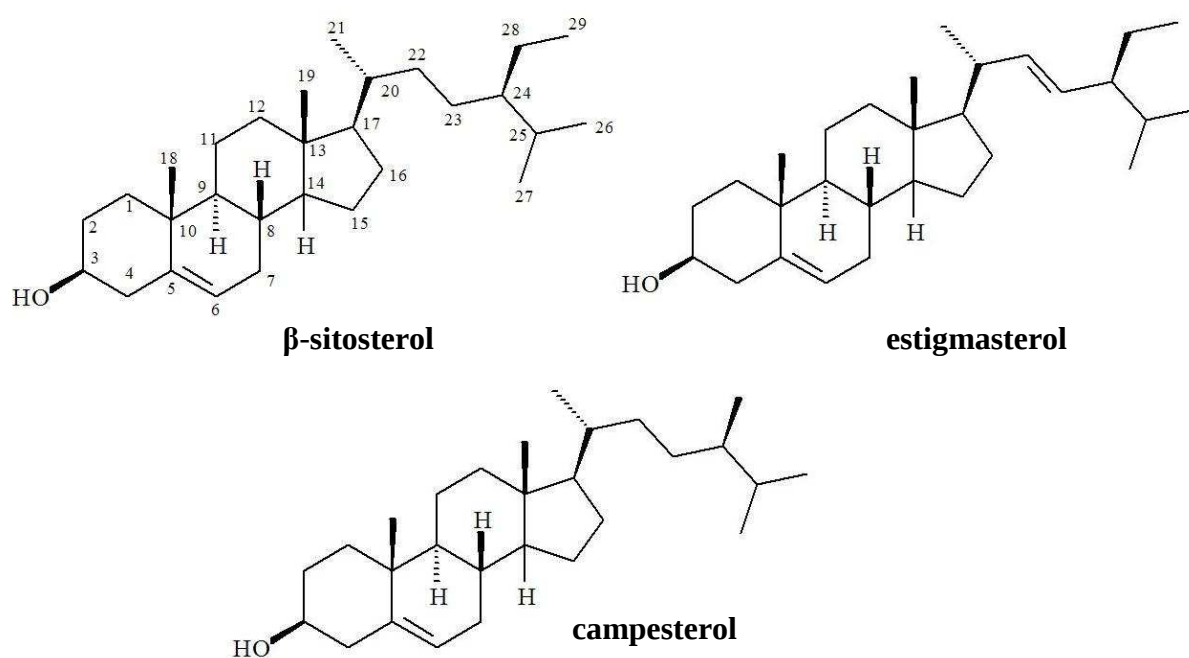
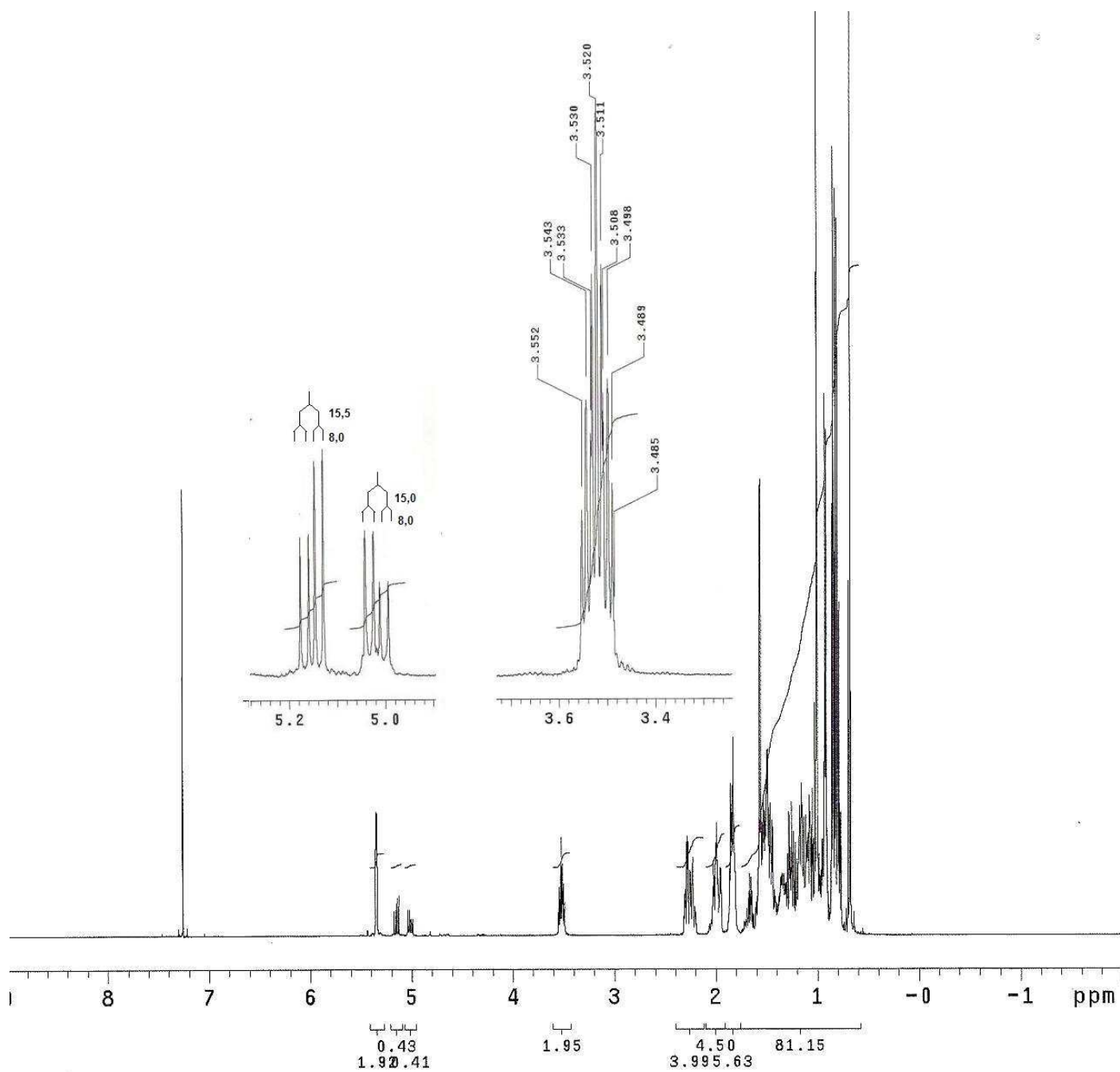


FIGURA 30. Estruturas de β -sitosterol, estigmasterol e campesterol

Os sinais observados para o RMN de ^1H (ESPECTRO 2; TABELA 18) foram: um singlete em δ 0,68 referente ao grupo metílico C18; vários sinais entre δ 0,7-1,0 de grupos metílicos; vários sinais entre δ 1,0-2,3 de grupos metilênicos; multiplete em δ 3,552-3,485, atribuído ao próton H-3 (característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico); dois duplos dubletos em δ 5,017 ($J=15,0$ e $J=8$ Hz) e 5,153 ($J=15,5$ e $J=8$ Hz) atribuídos aos prótons H-22 e H-23 do estigmasterol; dubleto largo em δ 5,349, atribuído ao próton olefínico (H-6) do β -sitosterol e do estigmasterol, com constante de acoplamento (J) igual a 5,0 Hz.

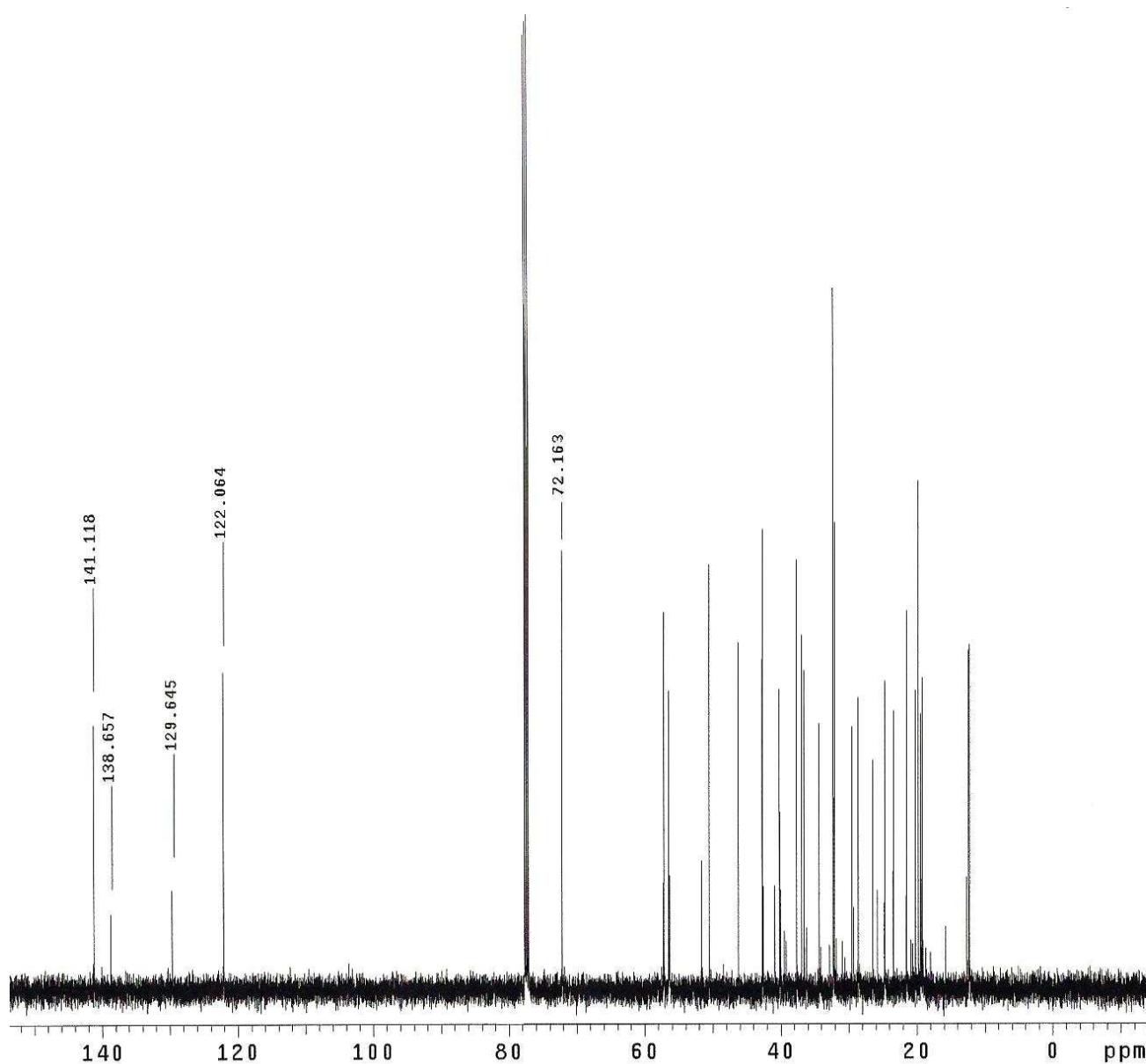
TABELA 18. Resultados experimentais de RMN de ^1H (δ em ppm, CDCl_3 , 500MHz) para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (FACUNDO *et al.*, 2008).

H	β -sitosterol (δ) ^{exp}	β -sitosterol (δ) ^{lit}	Estigmasterol (δ) ^{exp}	Estigmasterol (δ) ^{lit}
3	3,518 (m)	3,51 (m)	3,518 (m)	3,51 (m)
6	5,349 (d)	5,36 (d)	5,349 (d)	5,12 (d)
18	0,680 (s)	0,68 (s)	0,698 (s)	0,69 (s)
19	1,007 (s)	1,02 (s)	1,014 (s)	1,02 (s)
21	0,92 (s)	0,93 (s)	1,02 (s)	1,03 (s)
22	-	-	4,993-5,041 (dd)	5,22-4,95 (m)
23	-	-	5,129-5,177 (dd)	5,22-4,95 (m)
26	0,830 (s)	0,83 (s)	0,860 (s)	0,86 (s)
27	0,806 (s)	0,80 (s)	0,820 (s)	0,81 (s)

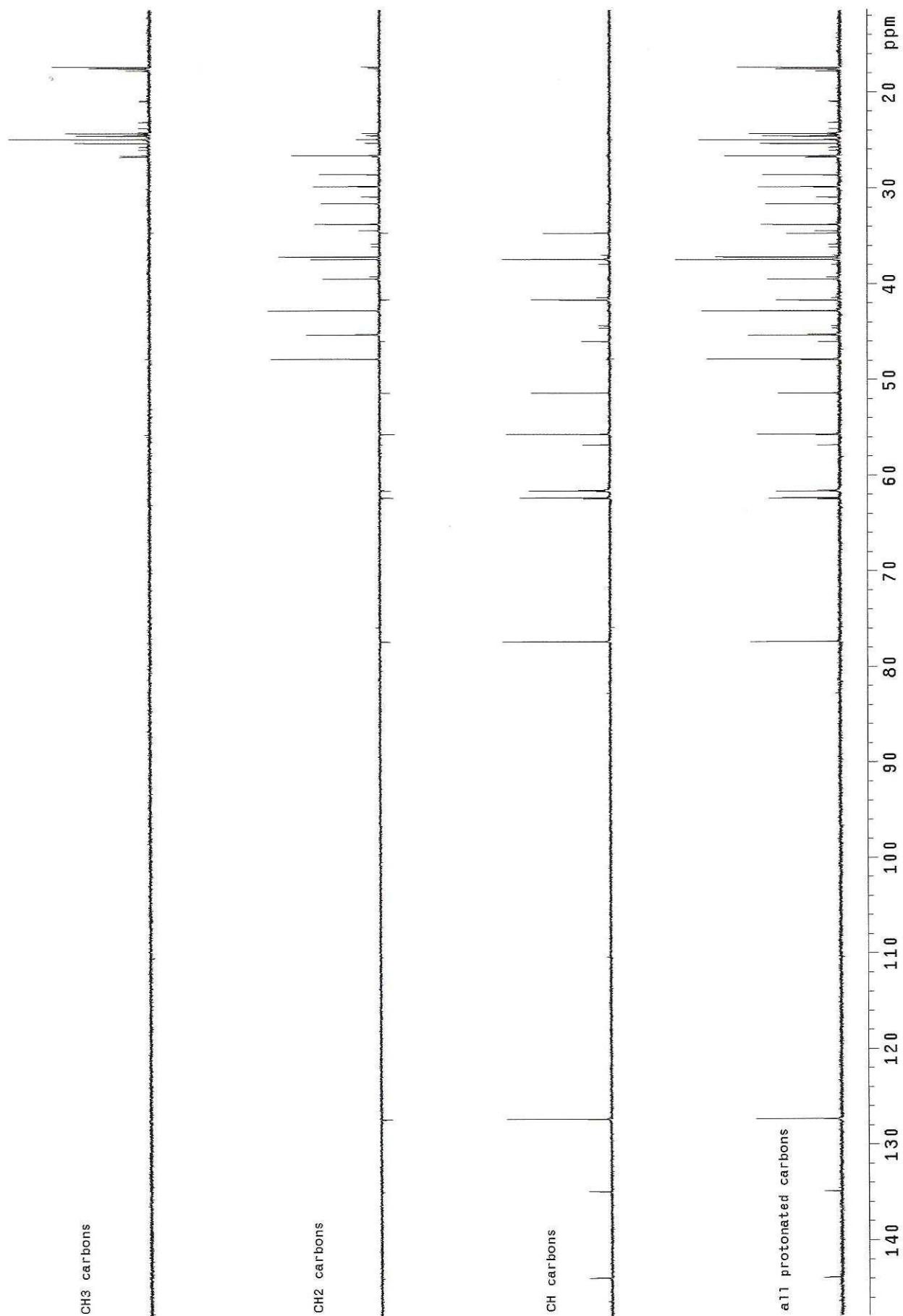


ESPECTRO 2. RMN ^1H (δ em ppm, CDCl_3 e 500MHz) de EHF5H7/2-4-2D

O espectro de RMN de ^{13}C (ESPECTRO 3, TABELA 19) apresentou: um sinal em δ 72,163, atribuído a um grupo carbinólico metílico; quatro sinais de carbono com valores de deslocamento característicos de carbonos sp^2 , que são: δ 138,657 e 129,645 da ligação dupla entre os carbonos 22 e 23 do estigmasterol (de menor intensidade) e δ 122,064 e 141,118, referentes à ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 (de maior intensidade) de ambos esteróides.



ESPECTRO 3. RMN ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 e 125MHz) de EHF5H7/2-4-2D



ESPECTRO 4. RMN ^{13}C (DEPT, δ em ppm, CDCl_3 e 125MHz) de EHF5H7/2-4-2D

TABELA 19. Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 , 125MHz) para os esteróides β -sitosterol e estigmasterol comparados com a literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).

C	β -sitosterol (δ) ^{exp}	β -sitosterol (δ) ^{lit}	Estigmasterol (δ) ^{exp}	Estigmasterol (δ) ^{lit}
CH ₂ -1	37,618	37,20	37,618	37,2
CH ₂ -2	32,022	31,6	32,022	31,6
CH-3	72,163	71,8	72,163	71,8
CH ₂ -4	42,683	42,3	42,683	42,3
C-5	141,118	140,7	141,118	140,7
CH-6	122,064	121,7	122,064	121,7
CH ₂ -7	32,268	31,9	32,268	31,9
CH ₂ -8	32,268	31,9	32,268	31,9
CH-9	50,502	50,1	50,502	50,1
C-10	36,864	36,6	36,864	36,6
CH ₂ -11	21,435	21,1	21,435	21,1
CH ₂ -12	40,138	39,9	40,042	39,7
C-13	42,661	42,3	42,661	42,2
CH-14	57,130	56,6	57,229	56,6
CH ₂ -15	24,658	24,3	24,716	24,4
CH ₂ -16	28,598	28,8	28,598	28,9
CH-17	56,427	56,0	56, 329	55,9
CH ₃ -18	12,214	11,9	12,400	12,0
CH ₃ -19	19,747	19,4	19,747	19,4
CH-20	36,501	36,1	40,830	40,5
CH ₃ -21	19,135	18,8	21,559	21,2
CH _x -22	34,311	33,9 (CH ₂)	138,657	138,3 (CH)
CH _x -23	26,456	26,6 (CH ₂)	129,645	129,2 (CH)
CH-24	46,206	45,5	51,593	51,2
CH-25	29,528	29,1	32,268	31,9
CH ₃ -26	20,164	19,9	21,559	21,1
CH ₃ -27	19,395	19,0	19,395	19,0
CH ₂ -28	23,434	23,0	25,753	25,4
CH ₃ -29	12,334	12,0	12,591	12,2

Foram observados no espectro de RMN ^{13}C outros sinais (de menor intensidade) que poderiam ser atribuídos à substância campesterol quando comparados com os sinais descritos na literatura (TABELA 20) (WRIGHT *et al.*, 1978).

O β -sitosterol e o campesterol possuem cadeias laterais muito parecidas e os deslocamentos químicos referentes ao carbono da ligação dupla de ambos são idênticos. Dessa forma, a presença de campesterol não pode ser evidenciada apenas por RMN ^1H e ^{13}C , sendo necessário uma análise por CG-EM para confirmar sua presença.

TABELA 20. Resultados experimentais de RMN de ^{13}C (δ em ppm, CDCl_3 , 125MHz) para o campesterol comparados com a literatura (WRIGHT *et al.*, 1978).

C	Campesterol (δ) ^{exp}	Campesterol (δ) ^{lit}
CH ₂ -4	42,577	42,40
CH-9	50,527	50,24
C-13	42,577	42,40
CH-20	36,234	35,96
CH ₃ -22	34,084	33,80
CH-24	39,200	38,92
CH ₃ -26	20,556	20,26
CH ₃ -27	18,603	18,32
CH ₃ -28	15,733	15,44

A relação entre o β -sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**) foi obtida através dos espectros de RMN ^1H . As percentagens aproximadas dos dois constituintes da mistura foram calculadas com base na integração dos sinais correspondentes a H-6 (intensidade relativa: 1,92, **1** + **2**) e H-22 e H-23 (intensidade relativa: 0,84, **2**) (GOULART *et al.*, 2003). A metade de 0,84 ($0,84/2=0,42$) representou um próton da molécula de estigmasterol (**2**). Subtraindo esse valor 0,42 de 1,92 (H-6 de **1** + **2**) obteve-se a intensidade 1,50 correspondente a um próton da molécula de β -sitosterol (**1**). As intensidades relativas 0,42 (1H de **2**) e 1,50 (1H de **1**)

permitiram deduzir que a mistura [1,92 (1 + 2) = 100%] contém 21,875 % de estigmasterol (2) e 78,125 % de β -sitosterol (1).

A presença de maior quantidade de β -sitosterol na mistura pôde ser confirmada também pelo ponto de fusão observado para EHF5H7/2-4-2D (136,2 °C), que foi compatível com o ponto de fusão observado na literatura para essa substância (134-136 °C, DUTRA *et al.*, 1992), em detrimento do ponto de fusão de estigmasterol (170-172 °C, ZUCHINALLI, 2009).

O β -sitosterol apresenta-se, em geral, distribuído em todas as partes das plantas e, quando isolado em mistura com o estigmasterol, está praticamente sempre em maior proporção. Infelizmente a maioria dos trabalhos obtidos da literatura não descrevem análises quantitativas sobre a proporção entre as duas substâncias, nos extratos estudados (GALOTTA & BOAVENTURA, 2005).

Os esteróis são componentes essenciais às membranas das células e podem ser produzidos por animais e plantas. São precursores da biossíntese de diversos hormônios e da vitamina D (DIAS *et al.*, 2009). Os fitoesteróis possuem vários efeitos terapêuticos dentre eles: anticarcinogênicos, antiinflamatórios, antitérmicos, antiulcerosos, liberação de insulina e atividades estrogênicas. São importantes na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (DELPOR *et al.*, 1998; ABIDI, 2001; BRINKER *et al.*, 2007).

Uma investigação realizada com sitosterol e estigmasterol evidencia a ação destes compostos na neutralização de veneno de cobra (GOMES *et al.*, 2007) e, segundo TOMA e colaboradores (2003), o β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, podem ter contribuído para a atividade analgésica apresentada pelo extrato hexânico de *Quassia amara*. Ainda em estudo realizado com o β -sitosterol e estigmasterol, CHANDLER e colaboradores (2006), concluíram que a presença da insaturação no carbono C-22 no estigmasterol conferiu atividade antihipercolesterolêmica mais significativa do que o β -sitosterol. Atividade

antimicrobiana foi observada para a mistura dos três esteróides (50% - β -sitosterol; 21,7% - estigmasterol e 22,8% de campesterol) contra *Staphylococcus aureus* (CORTEZ *et al.*, 1998).

Esses esteróides atuam como repositores da barreira lipídica da pele, minimizando o ressecamento e a desidratação da mesma. Possuem poder de absorver as radiações UVB e UVC. O β -sitosterol é capaz de formar um filme não oclusivo que impede a perda de água transepidermica (PASTORE JR *et al.*, 2005).

Especificamente para o β -sitosterol, há relatos de atividade antimicrobiana (VIRTUOSO *et al.*, 2005); atividade inibitória em várias fases do desenvolvimento de tumores, especialmente na transformação de células pré-neoplásicas em células neoplásicas (crescimento anormal) (GAO *et al.*, 2003); antimutagênico (VILLASEÑOR *et al.*, 2002); efeitos reversíveis antifertilidade, como redução nos níveis de espermatozóides (MALINI & VANITHAKUMARI, 1991); atividade antiinflamatória e antitérmica (DELPORT *et al.*, 1998).

Para o campesterol, foi observado efeito anticarcinogênico e potencial antiangiogênico (CHOI *et al.*, 2007).

Embora os esteróis identificados sejam comuns em plantas, é a primeira vez que estão sendo relatados na família Goupiaceae.

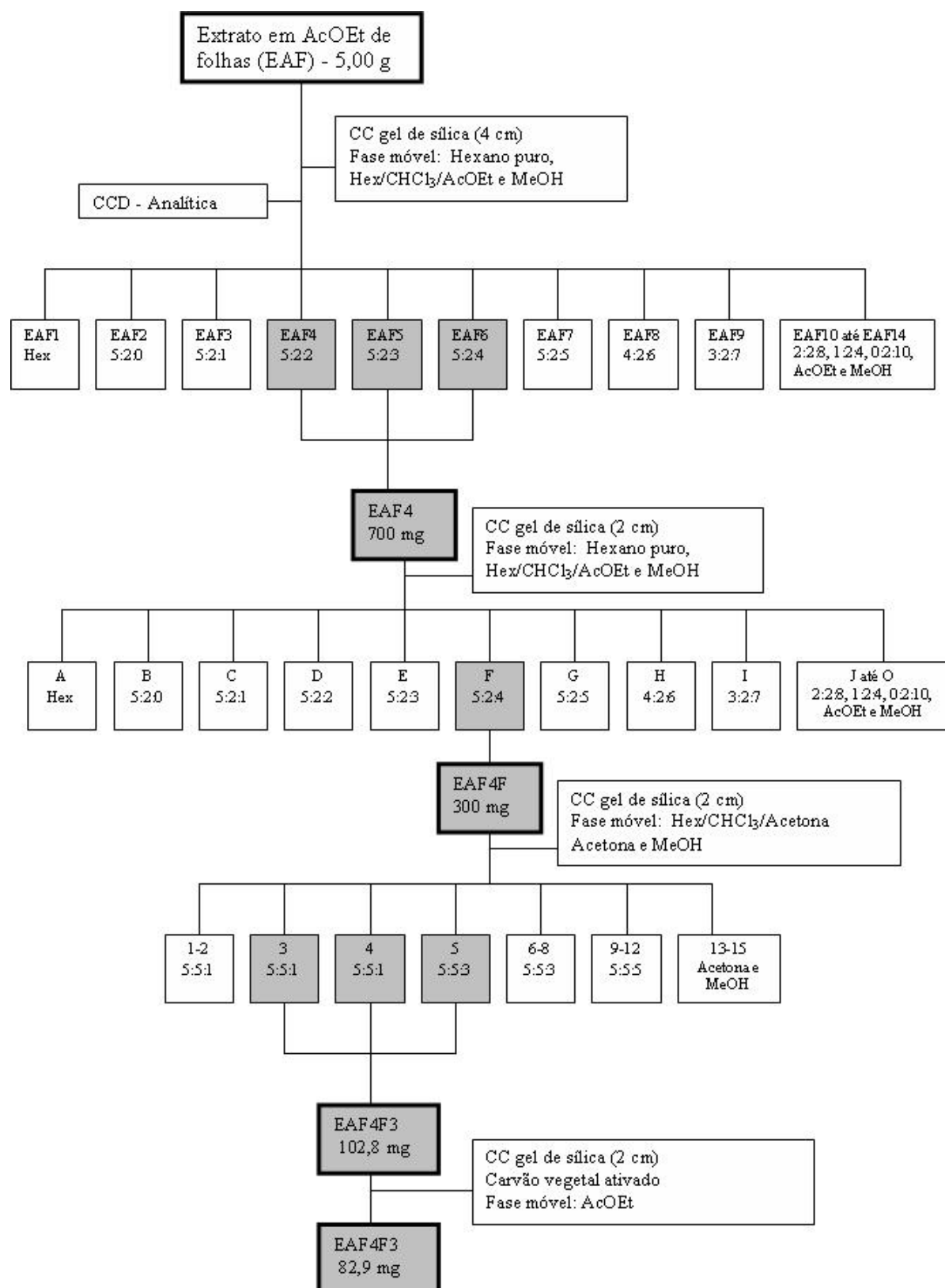
5.11.2. Extrato de folhas obtido em acetato de etila (EAF)

O extrato de folhas obtido em acetato de etila (EAF) (5,00 g) foi submetido ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica (4 cm) em gel de sílica (70-230 mesh) eluída em Hexano, Clorofórmio e Acetato de etila em gradiente de eluição, sendo recolhidas 14 frações (250 mL). As frações foram analisadas por CCD e codificadas numericamente de EAF1 a EAF14 (ESQUEMA 10).

As frações EAF4, EAF5 e EAF6 apresentaram-se sob a forma cristalina e foram reunidas, codificadas como EAF4 (700,0 mg) que foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,0 cm) com Hexano, Clorofórmio e Acetato de etila em misturas de polaridade crescente, recolhendo-se 15 frações que foram analisadas por CCD e codificadas como EAF4A a EAF5O.

As frações EAF4F (325,7 mg), EAF4G (285,9 mg) e EAF4H (33,8 mg) apresentaram-se sob a forma cristalina. A fração EAF4F (300 mg) foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,0 cm) com Hexano, Clorofórmio e Acetona em misturas de polaridade crescente, recolhendo-se 15 frações que foram analisadas por CCD e após reunião em 6 frações foram codificadas como EAF4F1 a EAF4F6.

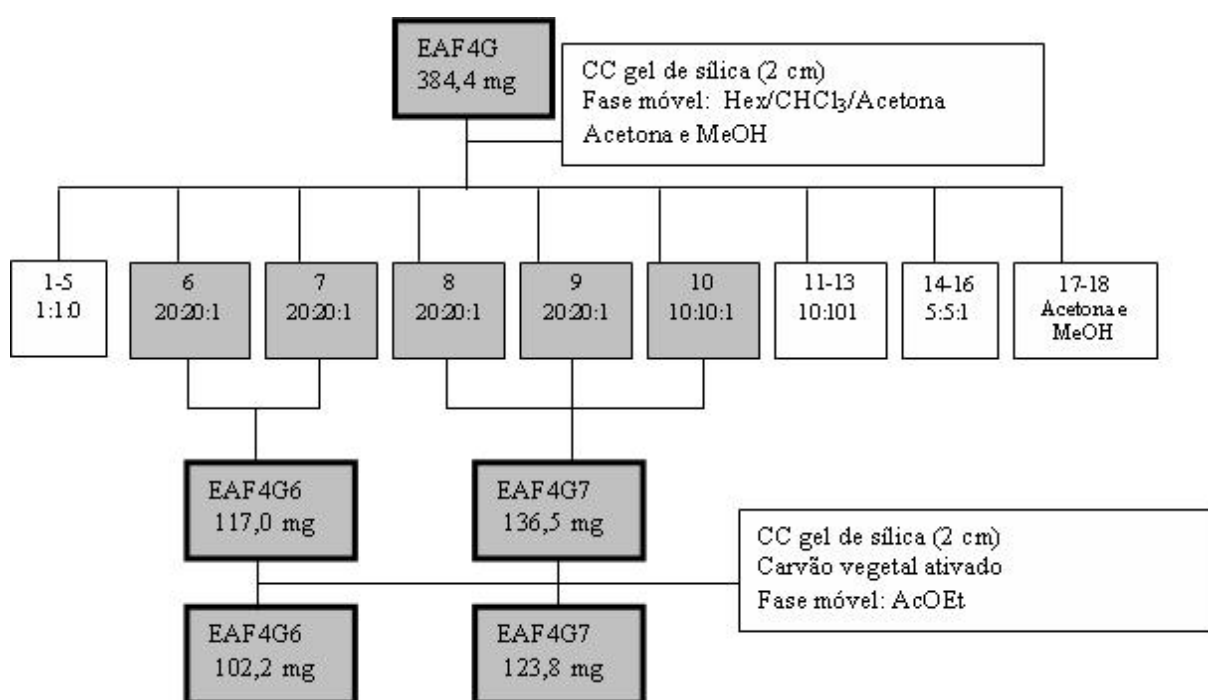
As frações EAF4F3 a EAF4F5 apresentavam-se como cristais transparentes sob a forma de agulhas com impurezas esverdeadas. Essas frações foram reunidas e codificadas apenas como EAF4F3 (102,8 mg) e purificadas em coluna gel de sílica (2,0 cm) com carvão vegetal ativado e eluente Acetato de Etila. Após esse processo e análise por CCD, verificou-se uma única mancha na fração coletada (82,9 mg). Essa fração foi enviada para análise de IV, RMN de H^1 , C^{13} , HMBC e HSQC.



ESQUEMA 10. Fracionamento do Extrato em AcOEt de Folhas (EAF)

As frações EAF4G, EAF4H e EAF4F2 foram reunidas e codificadas apenas como EAF4G (384,4 mg) e re-cromatografada em coluna de gel de sílica (2,0 cm) com Hexano, Clorofórmio e Acetona em misturas de polaridade crescente, recolhendo-se 18 frações que foram analisadas por CCD e após reunião em 15 frações foram codificadas como EAF4G1 a EAF4G15 (ESQUEMA 11).

As frações EAF4G6 (117,0 mg) e EAF4G7 (136,5 mg) apresentavam-se como cristais transparentes sob a forma de agulhas com impurezas esverdeadas. Essas frações foram purificadas em coluna gel de sílica (2,0 cm) com carvão vegetal ativado e eluente Acetato de Etila. Após esse processo e análise por CCD, verificou-se uma única mancha na fração coletada de cada uma: EAF4G6 (102,2 mg) e EAF4G7 (123,8 mg).



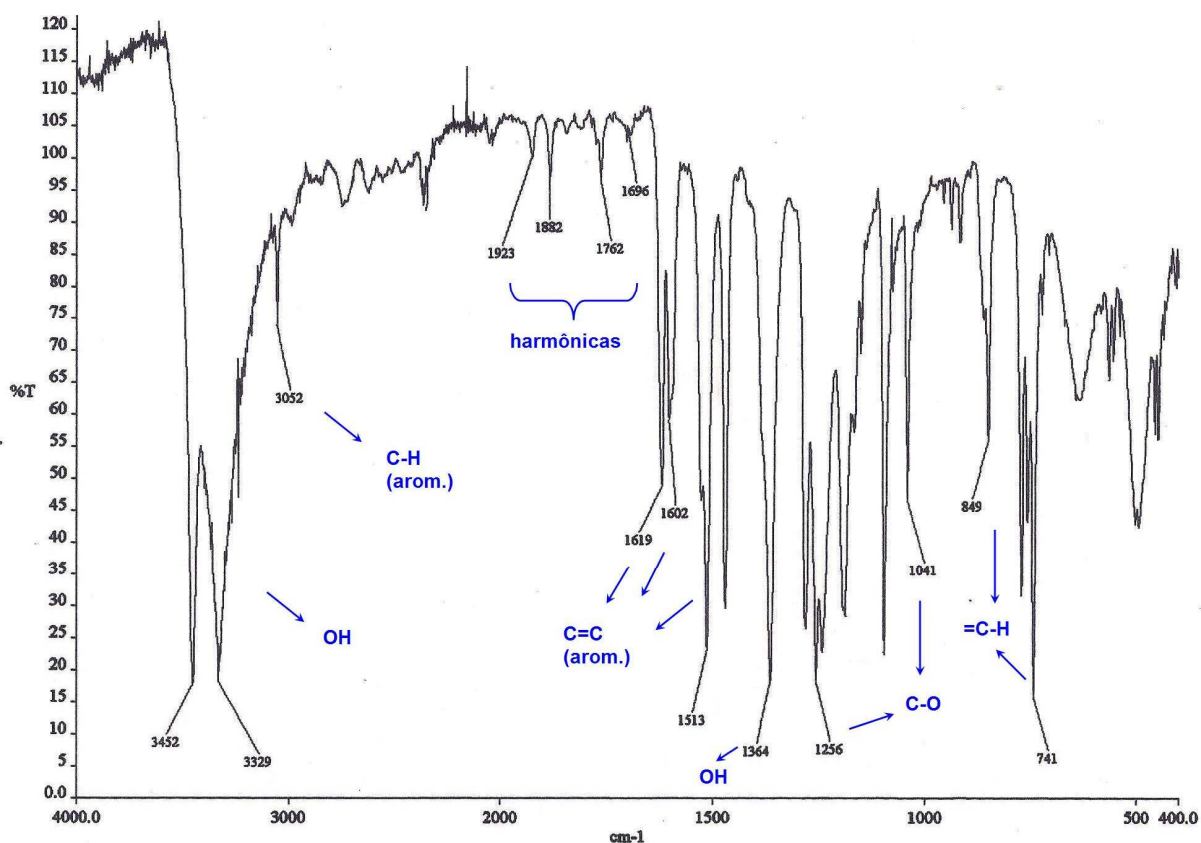
ESQUEMA 11. Fracionamento da fração EAF4G

As frações EAF4G6 e EAF4G7 foram analisadas em CCD e verificou-se por comparação com EAF4F4, que se tratava da mesma substância isolada, totalizando 308,9 mg.

5.11.2.1. Identificação de EAF4F3

A substância codificada como EAF4F3 (82,9 mg), foi isolada na forma de um sólido branco cristalino, com ponto de fusão igual a 98,9 °C. A CCD desta substância (Hex/CHCl₃/AcOEt (5:2:5) mostrou, após revelação com solução de FeCl₃ em etanol, uma mancha de coloração azul ($R_f = 0,44$) característica de compostos fenólicos (MATOS, 2001).

O espectro de absorção na região do infravermelho (ESPECTRO 5) apresentou uma banda larga em 3452-3329 cm⁻¹ atribuída à deformação axial de O-H; em 3052 cm⁻¹ uma banda atribuída à deformação axial de C-H de aromáticos; harmônicas ou bandas de combinação são observadas entre 1923-1696 cm⁻¹; as bandas 1619, 1602 e 1513 cm⁻¹ são características de deformação axial de C=C do anel aromático; em 1364 cm⁻¹ observa-se uma banda de deformação angular fora do plano de O-H; as bandas entre 1256 e 1041 cm⁻¹ são atribuídas a deformação axial de C-O; entre 849 e 741 cm⁻¹ bandas de deformação angular fora do plano de =C-H.

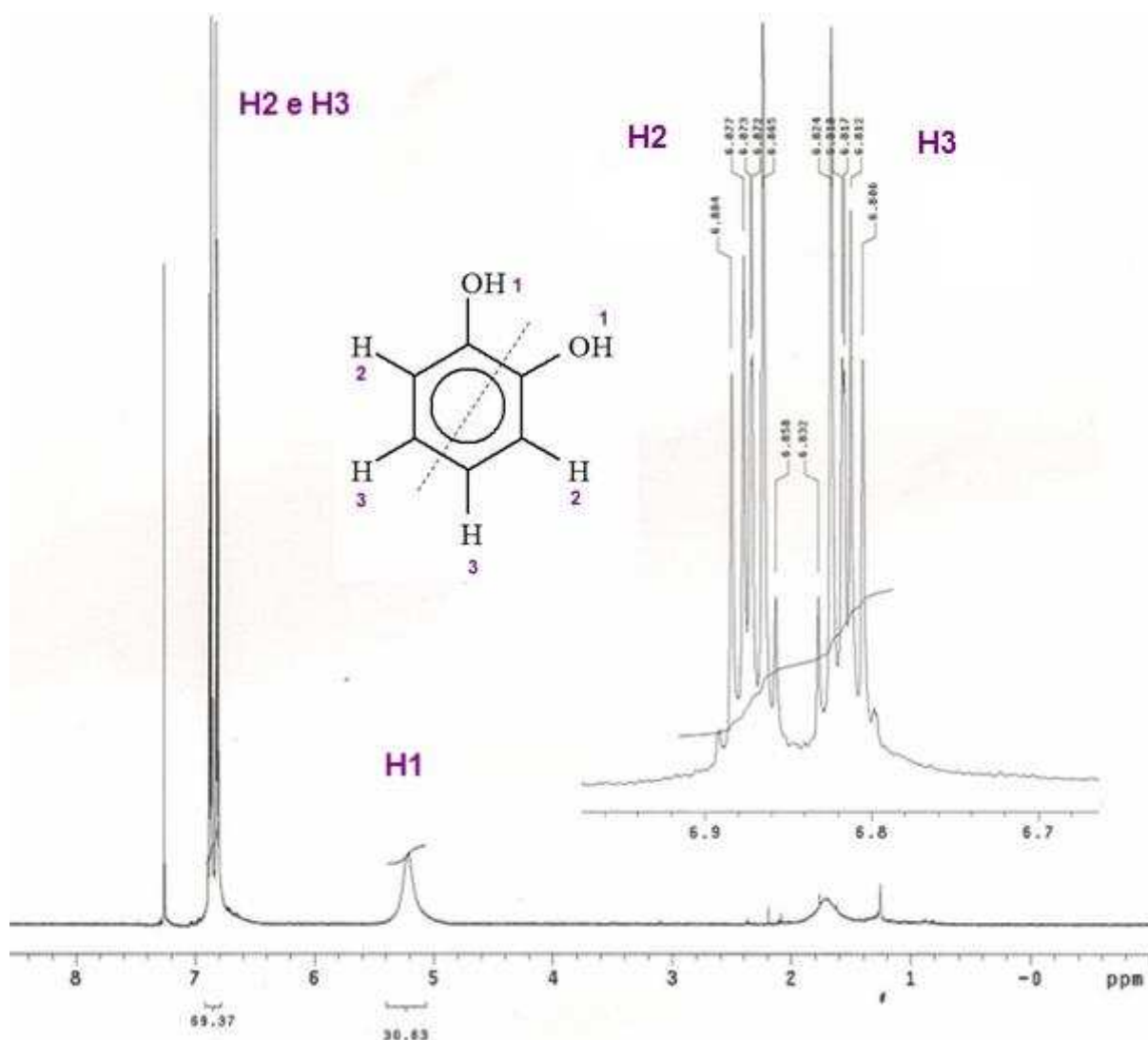


ESPECTRO 5. Espectro de IV de EAF4F3

O RMN de ^1H (ESPECTRO 6) mostrou a presença de dois sinais:

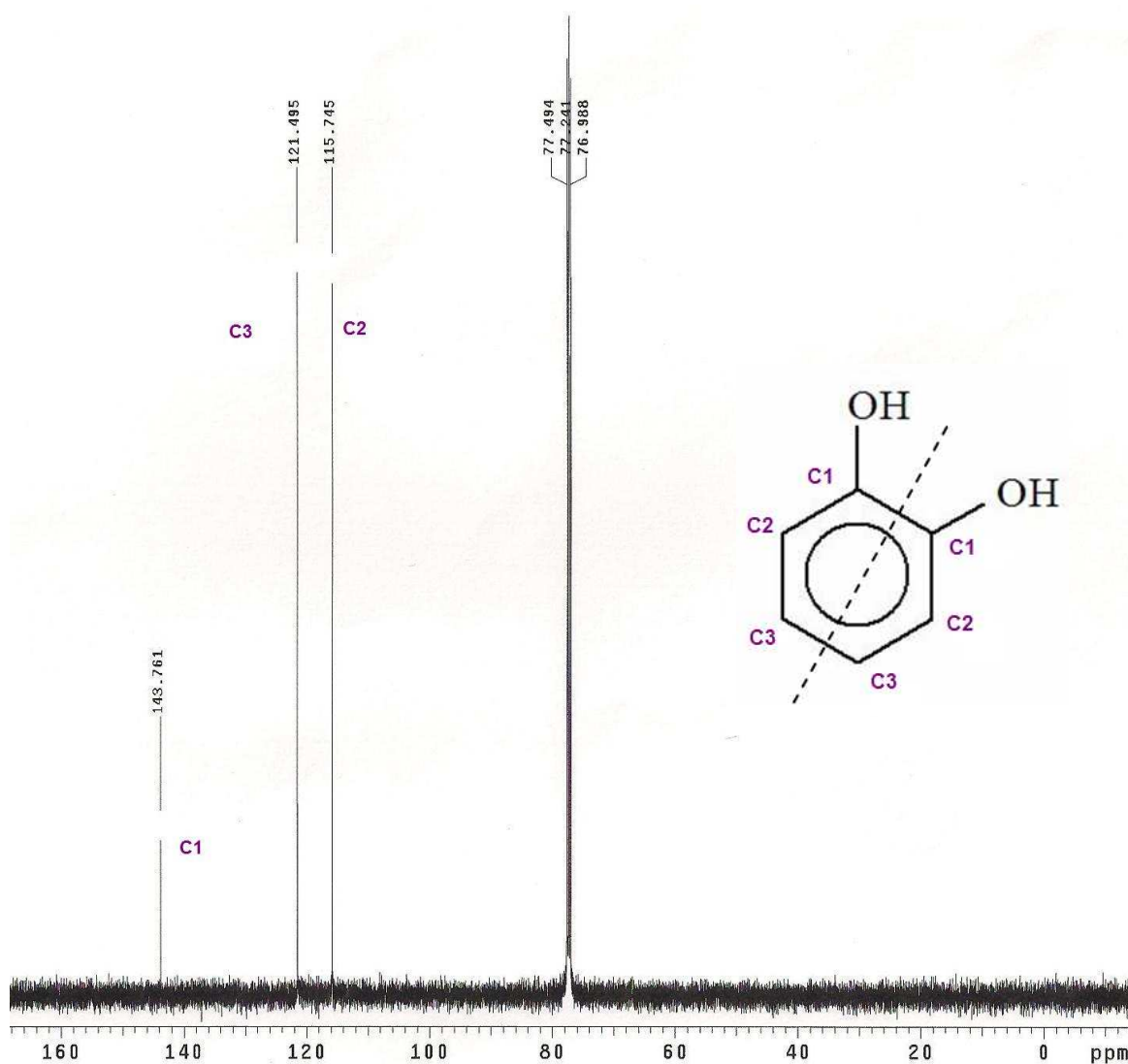
- Dois multipletos em δ 6,80-6,83 e 6,85-6,88 atribuídos a hidrogênios ligados a anel aromático, cuja integração mostrou a presença de 2 hidrogênios.
- Um sinal simples em δ 5,21 com integração para 1 hidrogênio, atribuído a um hidrogênio de hidroxila (OH).

Os sinais observados no RMN de ^1H estão de acordo com o que foi observado no IV, onde verificou-se a presença de: anel aromático, hidroxila, ligação C-O e ligações duplas.



ESPECTRO 6. Espectro de RMN de ^1H de EAF4F3

O RMN de ^{13}C (ESPECTRO 7) mostrou a presença de três sinais: δ 143,76; 121,49 e 115,74. O sinal em δ 143,76 foi atribuído a um carbono de anel aromático ligado a um grupo hidroxila. Os outros sinais foram atribuídos a carbonos de anel aromático.



ESPECTRO 7. Espectro de RMN de ^{13}C de catecol

Conforme os deslocamentos químicos supracitados, unidas com as outras informações de IV, e comparando esses valores com os dados da literatura (JEONG *et al.*, 2009), pode-se sugerir a estrutura do composto isolado como sendo catecol (FIGURA 31, TABELA 21).

Os sinais observados no RMN de ^1H com integração para apenas três hidrogênios juntamente com os três sinais do RMN de ^{13}C deve-se a estrutura do catecol apresentar um eixo de simetria, ou seja, os sinais se sobrepõem.

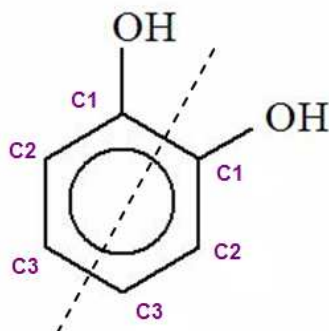


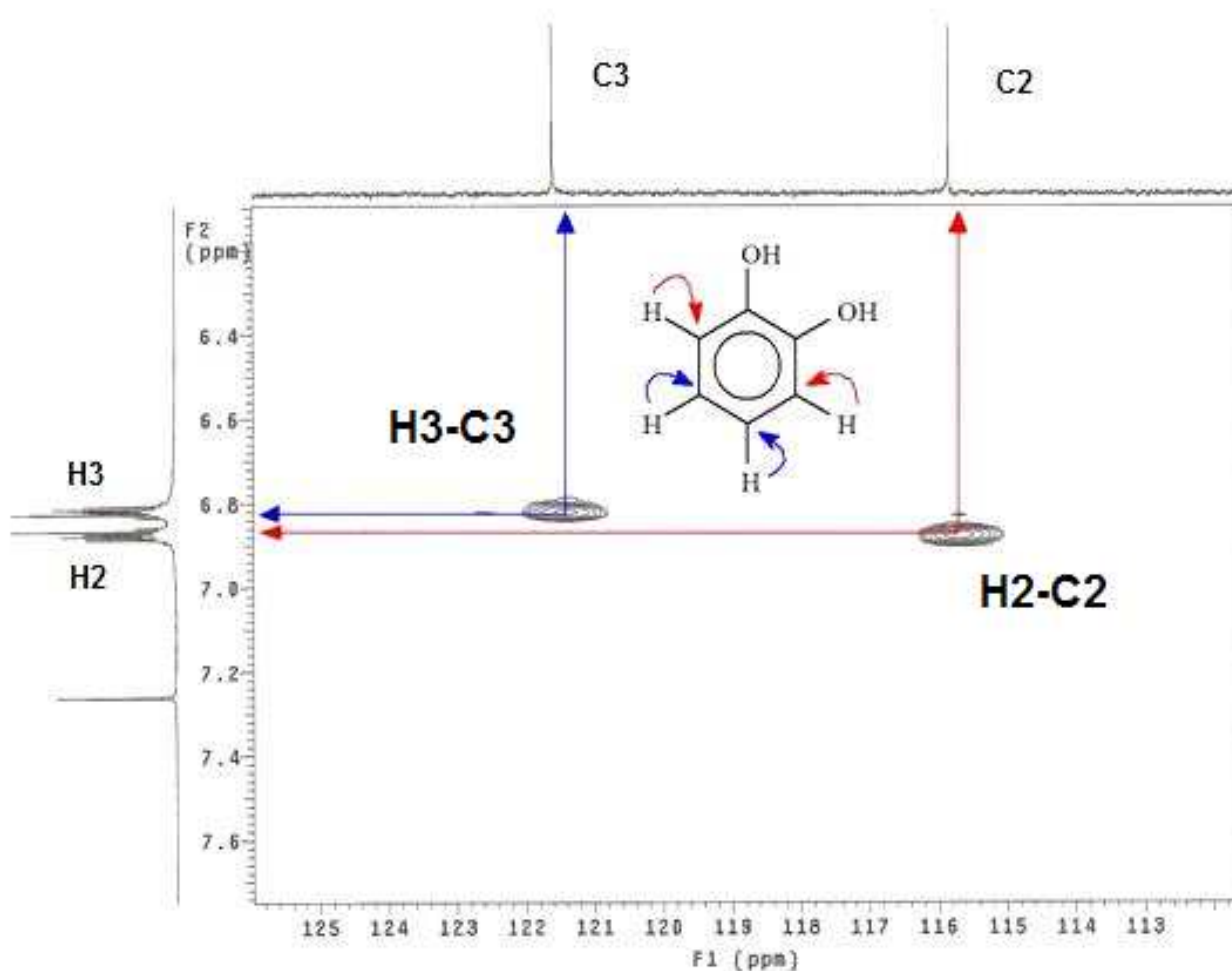
Figura 31. Estrutura do catecol (eixo de simetria)

TABELA 21. Comparação entre os sinais observados para catecol e dados encontrados na literatura (JEONG *et al.*, 2009)

	Dados experimentais	Dados da literatura
RMN ^1H (δ , ppm)	6,80-6,83 (m)	6,79-6,82 (m)
	6,85-6,88 (m)	6,85-6,87 (m)
	5,21 (s)	5,00-5,35 (d)
RMN ^{13}C (δ , ppm)	143,76	143,67
	121,49	121,09
	115,74	115,41
IV (cm^{-1})	3452-3329	3450-3323
	3052	3052
	1923-1696	1923
	1619-1513	1620-1514
	849	849

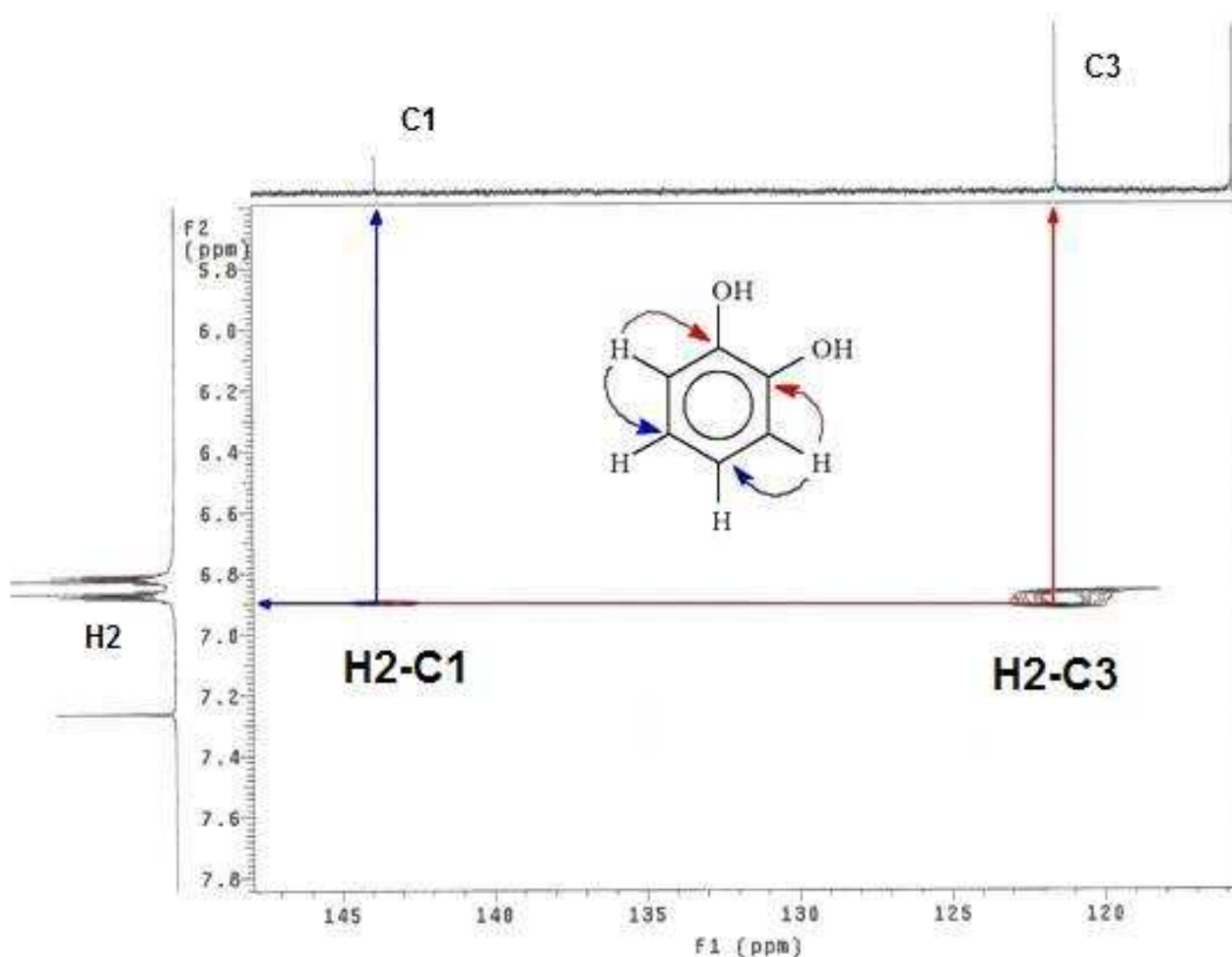
Espectros bidimensionais HSQC (Correlação Heteronuclear) e HMBC (Correlação Heteronuclear de longa distância) também foram realizados.

No espectro de HSQC (ESPECTRO 8) foram observadas correlações entre os sinais dos hidrogênios em δ 6,85-6,88 (H2) com o sinal do carbono em δ 115,74 (C2) e entre os sinais dos hidrogênios em δ 6,80-6,83 (H3) com o sinal do carbono em δ 121,49 (C3).



ESPECTRO 8. Expansão de HSQC de EAF4F3

No espectro de HMBC (ESPECTRO 9) foram observadas correlações entre os sinais dos hidrogênios em δ 6,85-6,88 (H2) com os sinais dos carbonos em δ 143,76 (C1) (J^2) e 121,49 (C3) (J^2).



ESPECTRO 9. Expansão de HMBC de EAF4F3

Esse composto apresentou atividade antioxidante maior ($CE_{50} = 1,25 \pm 0,019 \mu\text{g/mL}$) do que a quercetina ($CE_{50} = 4,17 \pm 0,127 \mu\text{g/m}$) no ensaio com o radical DPPH $\cdot$ (pp. 65-66).

Foi possível identificar a presença de catecol em todos os extratos de média polaridade (AcOEt) através de comparação por CCD (FIGURA 32). Esses extratos foram os que apresentaram maior potencial para as atividades testadas.

A presença de catecol também foi verificada na fração EAGg5. Essa fração apresentou maior potencial antitumoral em relação às demais frações testadas (pp. 70-72).

Embora o catecol não seja uma substância inédita, é a primeira vez que está sendo relatado na família Goupiaceae.

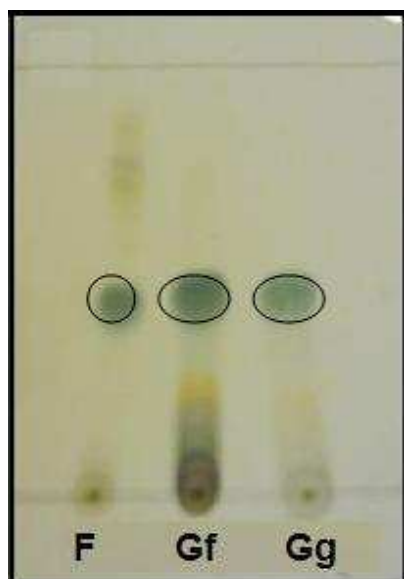


FIGURA 32. CCD dos extratos de média polaridade (AcOEt). Presença de catecol evidenciada. [Eluente: Hex/CHCl₃/AcOEt (5:2:5); Revelador: solução de FeCl₃]

O catecol é um composto fenólico simples que apresenta distribuição restrita na natureza (SOARES, 2002). Foi isolado pela primeira vez em 1839 por H. Reinsch por destilação do catecino (proveniente de *Mimosa catechu*) (ZHENG *et al.*, 2008). Sua fórmula molecular é C₆H₆O₂, apresenta-se sob a forma de um sólido branco com PE de 245,5 °C e PF entre 104-105 °C (CETESB).

Devido ao padrão de oxigenação observado para essa molécula, a rota biossintética ocorre pela via do ácido chiquímico (FIGURA 33).

Pequenas quantidades de catecol ocorrem naturalmente em frutas e legumes, juntamente com a enzima polifenol oxidase (ZHENG *et al.*, 2008), e seus derivados são encontrados especialmente na família Anacardiaceae (OLIVEIRA, 2002). Após a exposição ao ar (como quando uma batata ou maçã é cortada), o catecol incolor oxida à benzoquinona que possui coloração marrom-avermelhada, que é responsável pelo escurecimento de frutas e legumes cortados (ZHENG *et al.*, 2008).

Catecol já foi identificado em espécies como: abacate (*Persea americana*), baunilha (*Vanilla planifolia*), cacau (*Theobroma cacao*), caqui (*Diospyrus kaki*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cebola-de-cabeça (*Allium cepa*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), guaraná

(*Paullinia cupana*), orégano (*Origanum vulgare*), mostarda (*Brassica sp.*), unha-de-gato (*Uncaria guianensis*), dentre outras. (DEFILIPPS *et al.*, 2004; MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2004; JEONG *et al.*, 2009; LIBER HERBARUM MINOR).

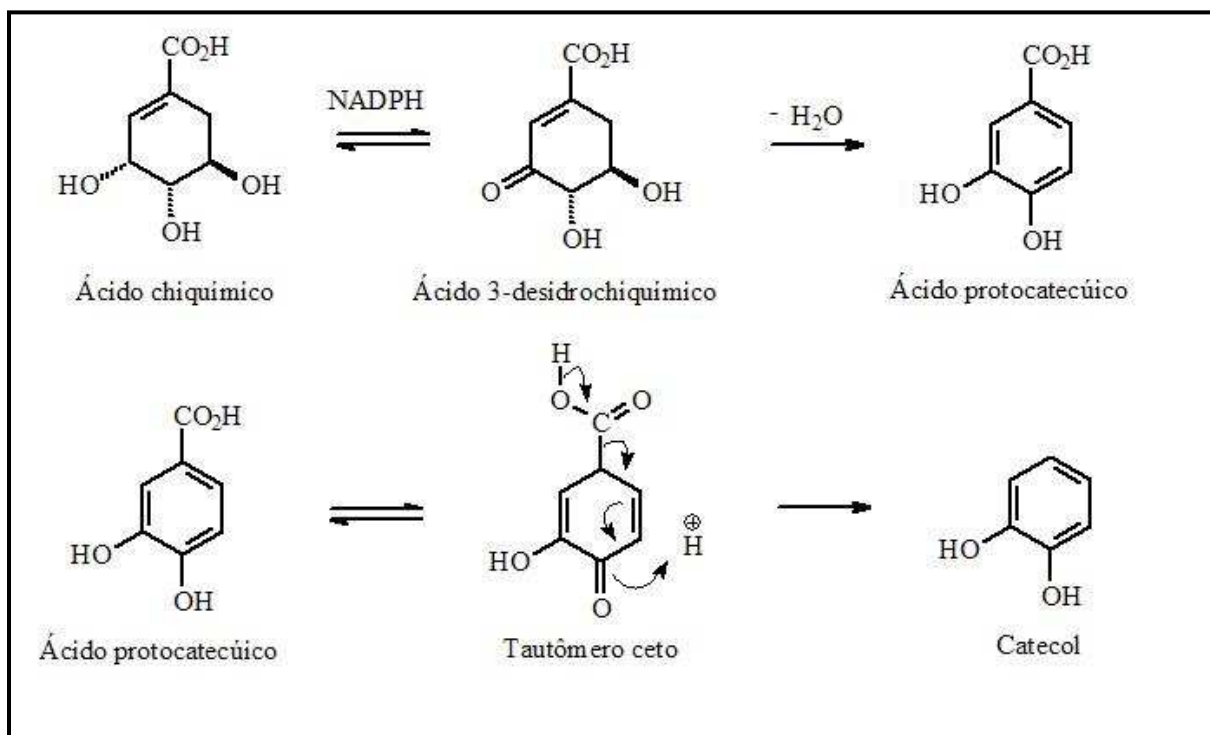


FIGURA 33. Provável rota biossintética de catecol

A estrutura do esqueleto catecol também é encontrada em compostos polifenólicos, como a quercetina e catequinas, que exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor (ZHENG *et al.*, 2008). Flavonóides diidroxilados que possuem o sistema catecol (3',4'-diidroxil) no anel B possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathiona, ácido úrico e bilirrubina (BARREIROS *et al.*, 2006). A presença de sistema catecol no anel B também é um fator estrutural importante para a atividade antiinflamatória dos flavonóides (COUTINHO *et al.*, 2009).

Catecol atua na recuperação de plantas afetadas por pragas ou doenças (BROEK, *et al.*, 2002) e pode promover o enraizamento em espécies vegetais (HACKETT, 1970).

Em estudos realizados com o catecol foram observados resultados positivos para atividades antioxidante (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2004), antiinflamatória e neuroprotetora, (ZHENG *et al.*, 2008), antibacteriana e antifúngica (KOCAÇALIŞKAN *et al.*, 2006; JEONG *et al.*, 2009).

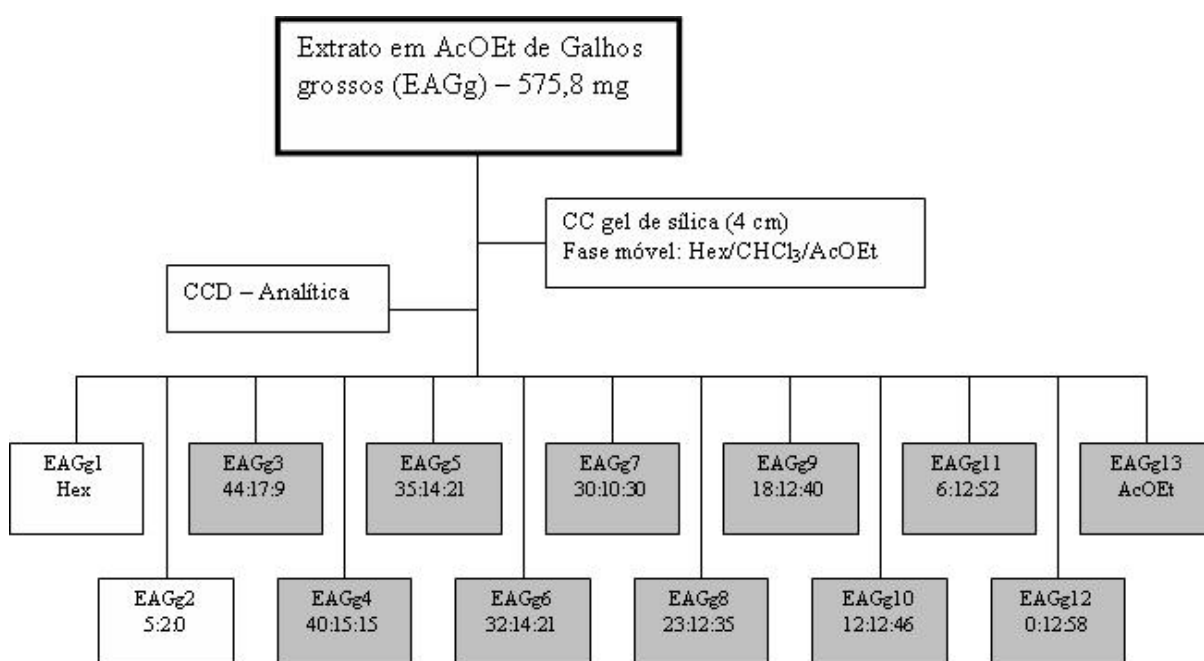
As propriedades antimicrobianas observadas para o catecol e seus derivados contra bactérias nocivas (*Clostridium difficile*, *C. perfringens* e *Escherichia coli*) combinado com quase nenhum efeito adverso sobre bactérias benéficas (*Bifidobacterium breve*, *B. longum* e *Lactobacillus casei*) indica que espécies contendo esse composto podem ter valor farmacológico (JEONG *et al.*, 2009).

As propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras do catecol (inclusive de seus derivados como o 3-metilcatecol, 4-metilcatecol e 4-tertbutilcatecol) cultivados em micloglia e células de neuroblastoma sugerem um potencial terapêutico destes compostos para o tratamento de muitas doenças neurodegenerativas que são associadas com uma excessiva ativação pró-inflamatória da micloglia (ZHENG *et al.*, 2008).

No entanto, é necessário verificar se essa atividade é grande o suficiente para justificar a avaliação destes compostos em aplicações clínicas para determinar se a sua utilização em seres humanos é possível (JEONG *et al.*, 2009). Além disso, o catecol se auto-oxida em pH neutro, e isso o torna altamente instável e provavelmente impróprio como droga potencial. Estudos futuros serão necessários para compreender os mecanismos moleculares precisos das ações antiinflamatórias de catecol *in vitro* e *in vivo* para dar um novo uso terapêutico para o catecol e seus derivados estáveis no tratamento de doenças neurodegenerativas e outras doenças inflamatórias (ZHENG *et al.*, 2008).

5.11.3. Extrato de galhos grossos obtido em acetato de etila (EAGg)

O extrato de galhos grossos obtido em acetato de etila (EAGg) (575,8 mg) foi submetido ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica (3 cm) em gel de sílica (70-230 mesh) eluída em Hexano, Clorofórmio e Acetato de etila em gradiente de eluição, sendo recolhidas 13 frações (70 mL) (ESQUEMA 12). As frações foram analisadas por CCD e codificadas numericamente de EAGg1 a EAGg13. As frações EAGg3 e 4 foram reunidas e codificadas apenas como EAGg3.



ESQUEMA 12. Fracionamento do Extrato em AcOEt de Galhos finos (EAGf)

Cerca de 5 mg das frações EAGg3 até EAGg13 foram enviadas para o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC) para avaliar o potencial citotóxico em células tumorais.

Na fração EAGg5 foi identificada a presença de catecol através de comparação por CCD.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como resultado do estudo fitoquímico e das atividades biológicas realizadas para os 10 extratos (folhas, galhos finos e g. grossos) de *Goupia glabra* pode-se concluir que:

1) Foram isolados e identificados: um composto fenólico simples (catecol) do extrato em AcOEt de folhas (EAF) e uma mistura de esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) do extrato em hexano de folhas (EHF).

2) Através de comparação por CCD foi possível identificar a presença de catecol em todos os extratos de média polaridade (AcOEt). Esses extratos foram os mais ativos para as atividades testadas nesse trabalho.

3) Em relação à atividade antioxidante, o extrato que mais se destacou foi o EAF, apresentando $CE_{50}=9,76 \pm 0,42$ (em cubeta) e $19,87 \pm 0,31$ (em microplaca). Essa atividade pode ser atribuída à maior quantidade de substâncias fenólicas ($242,86 \pm 15,6$ mg/g) observada para esse extrato em relação aos demais. Vale ressaltar que a substância catecol foi isolada desse extrato e apresentou $CE_{50}=1,25 \pm 0,019$ μ g/mL.

4) Para os ensaios de atividade citotóxica em células tumorais, o extrato em AcOEt dos galhos grossos (EAGg) apresentou maior inibição de crescimento (77,12%) para células de cólon-humano (HCT-8) e $CI_{50}=13,73$ μ g/mL para a linhagem HL-60 (leucemia-humano). As frações obtidas desse extrato foram avaliadas e a fração EAGg5 demonstrou inibições de crescimento de 85,27% e 101,37% para células de glioblastoma (SF-295) e mama humano (MDAMB-435), respectivamente. Nessa fração (EAGg5) também foi evidenciada a presença de catecol através de CCD.

5) A avaliação da atividade antimicrobiana evidenciou inibições moderadas para: *Staphylococcus aureus* (EAF); *Candida tropicalis* (EMF2 e EAGg); *C. parapsilosis* (EAF, EAGf); *Tripanossoma cruzi* (EMGf e EAGg) e *Leishmania amazonensis* (EAGf e EAGg).

O estudo fitoquímico biomonitorado por ensaio químico/biológico contribuiu para descoberta da atividade de frações e/ou substância, mostrando ser uma ferramenta muito importante para a descoberta de compostos bioativos.

As substâncias isoladas, apesar de serem conhecidas, estão sendo descritas pela primeira vez na família Goupiaceae, bem como as atividades testadas para os extratos e/ou frações.

A significativa atividade antioxidante, antitumoral e antimicrobiana observada nos extratos de *G. glabra* destaca seu elevado potencial para a obtenção de produtos biotecnológicos a partir desta planta.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI SL (2001): Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J Chromatogr A* 935: 173-201

ALMEIDA VL, LEITÃO A, REINA LCB, MONTANARI CA, DONNICI CL, LOPES MTP (2005): Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* 28(1): 118-129

ALVES EG, VINHOLIS AHC, CASEMIRO LA, FURTADO NAJC, SILVA MLA, CUNHA WR E MARTINS CHG (2008): Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim Nova* 31(6): 1224-1229

ANTUNES RMP, LIMA EO, PEREIRA MSV, CAMARA CA, ARRUDA TA, CATÃO RMR, BARBOSA TP, NUNES XP, DIAS CS, SILVA TMS (2006): Atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Rev Bras de Farmacognosia* 16(4): 517-524

ASMAWI MZ, ROSIDAH, YAM MF, SADIKUN A (2008): Antioxidant potential of *Gynura procumbens*. *Pharm Biol* 46(9): 616-625

BALASUNDRAM N, SUNDRAM K, SAMMAN S (2005): Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99: 191-203

BARBOSA LF, MEDEIROS MHG, AUGUSTO O (2006): Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim Nova* 29(6): 1352-1360

BARREIRO EJ (2009): Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. *Quim Nova* 32(3): 679-688

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP (2006): Extresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29(1): 113-123

BEHLING EB, SENDÃO MC, FRANCESCATO HDC, ANTUNES LMG, BIANCHI MLP (2004): Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim Nutr* 15(3): 285-292

BERRIDGE MV, TAN AS, MCCOY KD, WANG R (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4: 14-19

BRAGA FG, BOLZADA MLM, FABRI RL, MATOS MO, MOREIRA FO, SCIO E, COIMBRA ES (2007): Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacology* 111: 396-402

BRAZ-FILHO, R (2010): Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quim Nova* 33(1): 229-239

BRINKER AM, MA J, LIPSKY PE, RASKIN I (2007): Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). *Phytochemistry* 68: 723-766

BROEK RVD, IACOVINO GD, PARADELA AL, GALLI MA (2002): Controle alternativo de Oídio (*Erysiphe cichoracearum*) em quiabeiro (*Hibiscus esculentum*). *Rev Ecosystema* 37(1,2): 23-26

BURIOL L, FINGER D, SCHMIDT EM, SANTOS JMT, ROSA MR, QUINÁLIA SP, TORRES YR, SANTA HSD, PESSOA C, MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV, FERREIRA PMP, SAWAYA ACHF, EBERLIN MN (2009): Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quím Nova* 32(2): 296-302

CABRAL ISR, OLDONI TLC, PRADO A, BEZERRA RMN, ALENCAR SM, IKEGALI M, ROSALEN PL (2009): Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante de própolis vermelha brasileira. *Quím Nova* 32(6): 1523-1527.

CAI Y, LUO Q, SUN M, CORKE H (2004): Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184

CALDERON LA, SILVA-JARDIM I, ZULIANI JP, SILVA AA, CIANCAGLINI P, SILVA LHP, STÁBELI RG (2009): Amazonian Biodiversity: A view of drug development for leishmaniasis and malaria. *J Braz Chem Soc* 20(6): 1011-1023

CERQUEIRA FM, MEDEIROS MHG, AUGUSTO O (2007): Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím Nova* 30(2): 441-449

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Ficha de informação de produto químico: Catecol. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=CATECOL&cod=

CHANDLER RF, HOOPER SN, ISMAIL HA (2006): Antihypercholesterolemic studies with: β -sitosterol and stigmasterol. *J Phar Sci*, 68(2): 245-247, 2006.

CHOI JM, LEE HJ, KIM KH, AHN KS, SHIM BS, KIM NII, SONG MC, BAEK NI, KIM SH (2007): Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytotherapy Res* 21(10): 954-959

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2005a). Approved standard M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Pennsylvania, 49 p.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2005b). Approved standard M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Pennsylvania, 43 p.

CORTEZ DAG, CORTEZ LER, NAKAMURA TU E NAKAMURA CV (1998): Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). *Acta Scientiarum* 20(2): 243-245.

COUTINHO MAS, MUZITANO MF, COSTA SS (2009): Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev Virtual Quím* 1(3): 241-256

CROFT SL, BARRET MP, URBINA JA (2005): Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(11): 508-512

CROFT SL, SEIFERT K, YARDLEY V (2006): Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 399-410

DEFILIPPS RA, MAINA SL, CREPIN J (2004): *Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)*. Departament of Botany, Natural Museum of Natural History. Smithsonian Institution, Washington, D.C. Disponível em <http://www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal>.

DELPORTE C, BACKHOUSE N, NEGRETE R, SALINAS P, RIVAS P, CASSELS BK, SAN FELICIANO A (1998): Antipyretic, hypothermic and anti-inflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytother Res* 12: 118-122b

DEL POZO-INSFRAN D, PERCIVAL SS, TALCOTT ST (2006): Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenolics in Their Glycoside and Aglycone Forms Induce Apoptosis of HL-60 Leukemia Cells. *J Agric Food Chem* 54: 1222-1229

DEWICK PM (2002): *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2nd ed. England: John Wiley & Sons Ltd.

DE OLIVEIRA CO, VALENTIM IB, GOULART MOF, SILVA CA, BECHARA EJH, TREVISAN MTS (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quím Nova* 32(3) 689-702

DIAS LC, DESSOY MA, SILVA JJN, THIEMANN OH, OLIVA G, ANDRICOPULO AD (2009): Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nova* 32(9): 2444-2457

DUTRA NN, ALVES HM, DE CARVALHO MG, BRAZ-FILHO R (1992): Constituintes químicos de *Simaba Abovata* Spruce. *Quim Nova* 15(1): 10-14.

ELLMAN GL (1961); A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7: 88

FACUNDO VA, POLLLI AR, RODRIGUES RV, MILITÃO JSLT, STABELLI RG, CARDOSO CT (2008): Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amazônica* 38(4): 733-742.

FUNARI CS & FERRO VO (2005): Uso da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev Bras de Farmacognosia* 15(2): 178-182

GALOTTA ALQA & BOAVENTURA MAD (2005): Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). *Quím Nova* 28(4): 610-613

GARCIA ES (1995): Biodiversity, Biotechnology and Health. *Cad Saúde Públ* 11(3): 495-500

GAO H, WU L, KUROYANAGI M, HARADA K, KAWAHARA N, NAKANE T, UMEHARA K, HIRASAWA A, NAKAMURA Y (2003): Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* Koehne and their activities in JB6 mouse epidermal cells. *Chem Pharm Bull* 51: 1318–1321

GIL ES, SERRANO SHP, SOARES LA, REZENDE KR (2005): Atividade antioxidante de extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*Byrsonima orbygniana*). Doseamento de rutina, quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico. *Rev Elet Farm* 2: 85-88

GOMES A, SAHA A, CHATTERJEE I, CHAKRAVARTY AK (2007): Viper and snake venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine* 14(9): 637-643

GOULART MOF, SANT'ANA AEG, DE LIMA RA, CAVALCANTE SH, DE CARVALHO MG, BRAZ FILHO R (1993): Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. *Quim Nova* 16(2): 95

GUIMARÃES DO, MOMESSO LS, PUPO MT (2010): Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova* 33(3): 667-679

GULLO VP, McALPINE J, LAM KS, BAKER D, PETERSEN F (2006): Drug discovery from natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 523-531

HACKETT WP (1970): The influence of auxin, catechol and methanolic tissues extracts on root initiation in aseptically cultured shoot apices of the juvenile and adult forms of *Hedera helix*. *J Amer Soc Hortic Sci* 95(4): 398-402

HARRIS R (2002): Progress with superficial mycoses using essential oils. *The International J Aromatherapy* 12(2): 86-91

HIDALGO ME & DE LA ROSA C (2009): Antioxidant capacity of eugenol derivatives. *Quim Nova* 32(6): 1467-1470

INGKANINAN K, TEMKITTHAWON P, CHUENCHOM K, YUYAEM T, THONGNOI W (2003): Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies *Journal of Ethnopharmacology* 89: 261–264

JEONG EY, JEON JH, LEE CH, LEE HS (2009): Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food Chem* 115: 1006-1010

KOCAÇALIŞKAN I, TALAN I, TERZI I (2006): Antimicrobial activity of catechol and Pyrogallol as Allelochemicals. *Z. Naturforsch* 61c: 639-642

KOEHN FE, CARTER GT (2005): The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev* 4: 206-220

KOJIMA H, SATO N, HATANO A (1990): Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29: 2351-2355

KONGDUANG D, WUNGSINTAWEEKUL J, DE-EKNAMKUL W (2008): Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett* 49: 4067-4072.

KRITCHEVSKY D & CHEN SC (2005): Phytosterols - health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res* 25: 413-428

KVIST LP, CHRISTENSEN SB, RASMUSSEN HB, MEJIA K, GONZALEZ A (2006): Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacology* 106: 390-402

LACOSTE JF & ALEXANDRE DY (1991): Le goupí (*Goupia glabra* Aubl), essence forestière d'avenir em Guyane: analyse bibliographique. *Ann Sci Forestieres* 48: 429-441

LIBER HERBARUM MINOR. Catecol. Disponível em: <http://www.liberherbarum.com/Minor/BZ/In1811.HTM>

LOBO AM & LOURENÇO AM (2007): Biossíntese de produtos naturais. Lisboa: IST Press.

LOPEZ A, HUDSON JB, TOWERS GHN (2001): Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacology* 77: 189-196

MALINI T & VANITHAKUMARI G (1991): Antifertility effects of β -sitosterol in male albino rats. *J Ethnopharmacol* 35: 149-153

MATOS FTA. (2001): Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: UFC

MARIOT MP & BARBIERI RL (2007): Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). *Rev Bras Pl Med* 9(3): 89-99

MENSOR LL, FABIO SM, GILDOR GL, ALEXANDER SR, TEREZA CD, CINTIA SC, SUZANE GL (2001): Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Res* 15:127-130

MESA-SIVERIO D, ESTÉVEZ-BRAUN A, RAVELO ÁG, MURGUIA JR, RODRÍGUEZ-AFONSO A (2003): Novel DNA-Damaging Tropolone Derivatives from *Goupia glabra*. *Eur J Org Chem*: 4243-4247

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAM JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, MCLAUGHLIN JL (1982): Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.

MIERS J (1860). Contributions to Botany, Iconographic and Descriptive, Detailing the Characters of Plants That Are Either New or Imperfectly Described; to Which Are Added Remarks on Their Affinities. Williams and Norgate, London.

MONTENEGRO LHM, OLIVEIRA PES, CONSERVA LM, ROCHA EMM, BRITO AC, ARAÚJO RM, TREVISAN MTS, LEMOS RPL (2006): Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras de Farmacognosia* 16(supl.): 611-617

MOREIRA AVB & MANCINI-FILHO J (2004): Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutrição* 17(4): 411-424

MOREIRA WAS, LIMA MP, FERREIRA AG, FERREIRA ICP, NAKAMURA CV (2009): Chemical constituents from the roots of *Spathelia excelsa* and their antiprotozoal activity. *J Braz Chem Soc* 20(6): 1089-1094

MOSSMAN T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63

OLIVEIRA RB. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir acidentes. Monografia de conclusão de curso apresentada à FFCLRP/USP para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Ribeirão Preto-SP, 2002. Disponível em: <http://www.plantastoxicas.cjb.net>.

PASTORE JR F, DE ARAÚJO VF, PETRY AC, ECHEVERRIA RM, FERNANDES EC, LEITE, FHF. Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia. Brasília, 2005

PAYE M, BAREL AO, MAIBACH HI (2001): Handbook of Cosmetic Science and Technology. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.

PERES MTL, SIMIONATTO ES, HESS SC, BONANI VFL, CANDIDO ACS, CASTELLI C, POPPI NR, HONDA NK, CARDOSO CAL, FACCENDA O (2009): Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel. (Polypodiaceae). *Quim Nova* 32(4): 897-901

PINK R, HUDSON A, MOURIÈS, MARIE-ANNICK, BENDIG M (2005): Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery* 4: 727-740

PIZZOLATTI MG, BRIGHENTE IMC, DIAS M, VERDI LG (2007): Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharm Biol* 45(2): 156-161

REN H, GRADY S, GAMENARA D, HEIZEN H, MOYNA P, CROFT SL, KENDRICK H, YARDLEY V, MOYNAA G. (2001): Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Simple and Novel Potential Antimalarial Compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1851-1854

RHEE IK, MEENT MV, INGGANINAN K, VERPOORTE R (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amarillidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 915: 217-223

RIBEIRO JELS (1999): Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA.

ROJAS-GRAÜ MA, AVENA-BUSTILLOS RJ, FRIEDMAN M, HENIKA PR, MARTIÄN-BELLOSO O, MCHUGH TH (2006): Mechanical, Barrier, and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils. *J Agric Food Chem* 54: 9262-9267

ROVER JÚNIOR L, HÖEHR NF, VELLASCO AP, KUBOTA LT (2001): Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova* 24(1): 112-119

SANTOS AO, UEDA-NAKAMURA T, FILHO BPD, JUNIOR VFV, PINTO AC, NAKAMURA CV (2008): Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(3): 277-281

SILVA CG, HERDEIRO RS, MATHIAS CJ, PANEK AD, SILVEIRA CS, RODRIGUES VP, RENNO MN, FALCAO DQ, CERQUEIRA DM, MINTO ABM, NOGUEIRA FLP, QUARESMA CH, SILVA JFM, MENEZES FS, ELEUTHERIO ECA (2005): Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol Res* 52(3): 229-233

SILVA S (2006). Árvores da Amazônia (Brasil). São Paulo: Empresa das Artes. Editor: Fábio Ávila.

SIMMONS MP, SAVOLAINEN V, CLEVINGER CC, ARCHER RH (2001): Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, rbcL, atpB, and Morphology. *Mol Phylogenetics and Evol* 19(3): 353-366

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (1999). Farmacognosia - da planta ao medicamento. 1.ed., Porto Alegre, UFRS.

SIQUEIRA JM, BOMM MD, PEREIRA NFG, GARCEZ WS, BOAVENTURA MAD (1998): Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quim Nova* 21(5): 557-559

SIQUEIRA JM, ZIMINIANI MG, RESENDE UM, BOAVENTURA MAD (2001): Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia Glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach. *Quim Nova* 24(2): 185-187

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BODESCH H, KENNEY S, BOYD MR (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107-1112

SMIDERLE OJ & SCHWENGBER DR (2005): Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia. Cupiúba, *Goupia glabra* Aulb. Nº 7, 2005. Disponível em <http://www.rsa.ufam.edu.br>. Acesso em 02/07/2006

SOARES, SE (2002): Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 15(1): 71-81

SOLER-RIVAS C, ESPÍN JC, WISHERS HJ (2000): An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem Analysis* 11: 1-9

SOLOMONS, TW & FRYHLE CB (2002): Química Orgânica vol. 2, 7ed. Rio de Janeiro: LTC, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.

SOUSA CMM, SILVA HR, VIEIRA-JR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO MS, CHAVES MH (2007): Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 30(2): 351-355

TAMBURLIN-THUMIN I, CROZET MP, BARRIÈRE J, BARREAU M, RIOU J, LAVELLE F (2001): Synthesis and biological evaluation of O-alkylated tropolones and related α -ketohydroxy derivatives as ribonucleotide reductase inhibitors. *Eur J Med Chem* 36: 561–568

TEMPONE AG, BORBOREMA SET, ANDRADE-JR HF, GUALDA NCA, YOGI A, CARVALHO CS, BACHIEGA D, LUPO FN, BONOTTO SV, FISCHER DCH (2005): Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12: 382-390

TOMA W, GRACIOSO JS, HIRUMA-LIMA CA, ANDRADE FDP, VILEGAS W, SOUZA BRITO ARM (2003): Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. *J Ethnopharmacology* 85: 19-23

VIEGAS JR C, BOLZANI VS, BARREIRO EJ (2006): Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova* 29: 326-337

VILLASEÑOR IM, ANGELADA J, CANLAS AP, ECHEGOYEN D (2002): Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytotherapy Res* 16: 417–421

VIRTUOSO S, DAVET A, DIAS JFG, CUNICO MM, MIGUEL MD, OLIVEIRA AB, MIGUEL OG (2005): Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Rev Bras Farmacognosia* 15(2): 137-142, 2005

VELIOGLU YS, MAZZA G, GAO L, OOMAH BD (1998): Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem* 46: 4113-4117

VELLOSA JCR, BARBOSA VF, OLIVEIRA OMM (2007): Pesquisa de produtos naturais: Plantas e radicais livres. *Rev Elet Farm IV*(2): 119-130

WONG CC, LI HB, CHENG KW, CHEN F (2006): A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* 97: 705–711

WRIGHT JLC, MCINNES AG, SHIMIZY S, SMITH DG, WALTER JA, IDLER D, KHALIL W (1978). Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can J Chemistry* 56(14): 1898-1903

YAMATO M, ANDO J, SAKAKI K, HASHIGAKI K, WATAYA Y, TSUKAGOSHI S, TASHIRO T, TSURUOT T (1992): Synthesis and Antitumor Activity of Tropolone

Derivatives. 7. Bistropolones Containing Connecting Methylene Chains. *J Med Chem* 35: 267-273

ZHENG LT, RYU GM, KWON BM, LEE WH, SUK K (2008): Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 588: 106-113

ZUCHINALLI A. Estudo de propriedades químicas e biológicas da espécie vegetal *Croton urucarana*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Florianópolis-SC, 2008