



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



LAURO JOSÉ CAIRES DA SILVA JÚNIOR

**Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico de
constituintes de *Erythroxylum affine* A. St.-Hil. e *Erythroxylum
macrocalyx* Mart. (Erythroxylaceae)**

JEQUIÉ-BA
MARÇO / 2017

LAURO JOSÉ CAIRES DA SILVA JÚNIOR

**Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico de
constituintes de *Erythroxylum affine* A. St.-Hil. e *Erythroxylum
macrocalyx* Mart. (Erythroxylaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

JEQUIÉ-BA
MARÇO / 2017

S581 Silva Júnior, Lauro José Caires da.

Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico de constituintes de *Erythroxyllum affine* A. St.-Hill e *Erythroxyllum macrocalyx* Mart. (Erythroxyllaceae) / Lauro José Caires da Silva Júnior.– Jequié.- Ba, 2017.
141f.; il.; 30cm

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula)

1. *Erythroxyllum* - Estudo químico 2.Alcaloides 3.Fitoquímicos 4.Flavonoides
I.Paula, Vanderlúcia Fonseca de II.Queiroz, Raphael Ferreira III.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia VI.Título.

CDD - 547.9

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006
Programa de Pós-Graduação em Química

**Lauro José Caires da Silva Júnior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **16/03/2017**.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula (UFMG, Belo Horizonte, 1999)
(Orientadora)

Profa. Dra. Suzimone de Jesus Correia (UFBA, Salvador, 2005)

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves (UFBA, Salvador-BA, 2012)

AGRADECIMENTOS

Deixo expressos meus agradecimentos:

A Deus por tudo que me foi concedido;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB pela minha formação acadêmica e pelo apoio e incentivo à pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de minha bolsa de Mestrado;

Ao Laboratório de Produtos Naturais da UESB por disponibilizar toda infraestrutura necessária para realização do estudo fitoquímico deste trabalho;

Ao Professor Dr. Raphael Ferreira Queiroz (UESB) pela coorientação a este trabalho e ao seu laboratório, e também suas orientandas (Gleiza, Michele e Danielba) pela realização dos ensaios de atividade antibacteriana e antioxidante;

Ao Laboratório de Cromatografia da UESB, especialmente ao professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira e Professora Dra. Rosane Moura Aguiar, por viabilizar as análises por CG-EM e Infravermelho das amostras;

À Universidade Federal de Visosa (UFV) e ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela realização das análises de Ressonância Magnética nuclear e/ou Espectrometria de Massas das amostras;

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, CPqGM-Fiocruz pelos testes de atividade antiproliferativa;

Ao professor Dr. Clayton Queiroz Alves (UEFS) e seu aluno Diego, pela parceria na realização dos ensaios de atividade anticolinesterásica.

*Ao **Herbário da UESB (HUESB)**, especialmente à professora **Dra. Guadalupe Edilma Licona de Macedo** por viabilizar a realização das coletas e identificação das plantas estudadas;*

*À professora **Dra. Suzimone de Jesus Correia (UESB)**, pelas contribuições a minha formação acadêmica e por aceitar compor a banca avaliadora desta dissertação*

*Aos colegas e ex-colegas laboratório, especialmente **Léia Alexandre**, pela parceria no projeto de pesquisa que originou este trabalho, e **Camila Santos** pelo auxílio na realização dos espectros no IQ da UNESP.*

*Agradecimentos especiais à minha orientadora, professora **Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula**, pelo apoio e contribuição ao longo de toda a minha formação acadêmica (graduação e mestrado) e pela confiança e oportunidade que me foi concedida.*

*Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver
naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra.*

O professor, assim, não morre jamais...

Rubem Alves

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição de espécies de <i>Erythroxylum</i> catalogadas ao redor mundo.....	5
Figura 1.2. Estrutura do núcleo bicíclico dos alcaloides tropânicos	8
Figura 1.3. Rota Biosintética para produção de alcaloides tropânicos.....	8
Figura 1.4. Estrutura de alguns alcaloides tropânicos conhecidos.....	9
Figura 1.5. Estrutura do núcleo estrutural dos flavonoides e de alguns compostos desta classe que são comumente encontrados em espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	10
Figura 1.6. Mecanismos de ação antioxidante de Flavonoides.....	11
Figura 1.7. Exsicatas das plantas <i>E. affine</i> (A) e <i>E. Macrocalyx</i> (B) depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Jequié.....	14
Figura 1.8. Triagem das frações do extrato EEM com reagente de Dragendorff (CCD eluída com AcOEt/MeOH 1:1) (H=hexânica, AE = acetato de etila, E = etanólica, M=metanólica). As manchas alaranjadas indicam a presença de alcaloides nas frações.....	16
Figura 1.9. Esquema do procedimento para obtenção da fração total de alcaloides.....	17
Figura 1.10. Reação ácido-base entre um alcaloide tropânico qualquer e o HCl	17
Figura 1.11. Esquema de fracionamentos do Extrato Etanólico dos Galhos de <i>E. macrocalyx</i> para isolamento dos constituintes químicos	19
Figura 1.12. Esquema de fracionamentos do Extrato Etanólico dos Galhos de <i>E. affine</i> para isolamento dos constituintes químicos.....	20
Figura 1.13. Substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de <i>E. macrocalyx</i>	22
Figura 1.14. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, em CDCl ₃) da substância LEM1: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol.....	24
Figura 1.15. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, em CDCl ₃) da substância LEM1: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol.....	25
Figura 1.16. Expansões do mapa de contornos COSY (600 MHz, em CDCl ₃) da substância LEM1 e as principais correlações observadas na estrutura do composto.....	26
Figura 1.17. Expansões do mapa de contornos HMBC (600 MHz; 150 MHz em CDCl ₃) da substância LEM1 e as principais correlações observadas na estrutura do composto.....	27
Figura 1.18. Espectros NOESY-1D (em CDCl ₃) da substância LEM1. Irradiação em 4,17 ppm (A); Irradiação em 2,64 ppm (B); Irradiação em 1,79 ppm (C)	28
Figura 1.19. Correlações observadas nos espectros de NOESY-1D para o composto LEM1 apresentadas em sua estrutura tridimensional.....	28
Figura 1.20. Formula estrutural da substância LEM1 (7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol)..	29
Figura 1.21. Espectros de massas obtidos por ESI (A) e por IE (B). Principais fragmentações do composto LEM1(C)	30
Figura 1.22. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, em CDCl ₃) da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol.....	32
Figura 1.23. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, em CDCl ₃) da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol.....	33
Figura 1.24. Expansões do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl ₃) da substância LEM2 e as principais correlações observadas na estrutura do composto 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol ..	34
Figura 1.25. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM2 e (B) principais mecanismos de fragmentação para o composto 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol	35
Figura 1.26. Análise por cristalografia de raios-X da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol.....	35
Figura 1.27. Formula estrutural da substância LEM2 (6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol)	36

Figura 1.28. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CD_3OD) da substância LEM3: 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol	38
Figura 1.29. Expansão do mapa de contornos HSQC (300 MHz, 75 MHz; CD_3OD) da substância LEM3	39
Figura 1.30. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CD_3OD) da substância LEM3: 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol	40
Figura 1.31. Fórmula estrutural da substância LEM3 (3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol)	41
Figura 1.32. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM3 e (B) seus principais mecanismos de fragmentação	42
Figura 1.33. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM4: 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol	43
Figura 1.34. Expansão do mapa de contornos HSQC (300 MHz, 75 MHz; CDCl_3) da substância LEM4	44
Figura 1.35. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM4: 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol	45
Figura 1.36. Fórmula estrutural da substância LEM4 (3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol)	46
Figura 1.37. Expansões do mapa de contornos HMBC (300 MHz; 75 MHz em CDCl_3) da substância LEM4 e as principais correlações observadas na estrutura do composto 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol	47
Figura 1.38. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM4 e (B) principais mecanismos de fragmentação	48
Figura 1.39. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM5: 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	49
Figura 1.40. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM5: 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	51
Figura 1.41. Expansão do mapa de contornos HMBC (300 MHz; 75 MHz, CDCl_3) da substância LEM5, destacando as correlações mais importantes para confirmação da estrutura do composto 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	52
Figura 1.42. Expansão mapa de contornos NOESY (300 MHz, CDCl_3) da substância LEM5 destacando as correlações mais importantes para confirmação da estrutura do composto 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	52
Figura 1.43. Fórmula estrutural da substância LEM5 [6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano]	53
Figura 1.44. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM5 e (B) seus principais mecanismos de fragmentação	54
Figura 1.45. Espectro por reflectância total atenuada (ATR: “ <i>Attenuated Total Reflectance</i> ”) na região do Infravermelho da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	55
Figura 1.46. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	56
Figura 1.47. Fórmula estrutural do flavonoide ombuina	57
Figura 1.48. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	58
Figura 1.49. Formula estrutural da substância LEM6 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo) ...	59
Figura 1.50. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM6 e (B) os principais fragmentos propostos para a estrutura do composto ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	60
Figura 1.51. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM7 (lupeol)	61
Figura 1.52. Formula estrutural da substância LEM7 (lupeol)	61

Figura 1.53. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM7: lupeol.....	62
Figura 1.54. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM7: lupeol.....	63
Figura 1.55. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM8 (taraxerol).....	64
Figura 1.56. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM8: taraxerol..	65
Figura 1.57. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM8: taraxerol...	66
Figura 1.58. Fórmula estrutural da substância LEM8 (taraxerol).....	67
Figura 1.59. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM9 (lupenona)	68
Figura 1.60. Fórmula estrutural da substância LEM9 (lupenona)	68
Figura 1.61. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM9: lupenona	69
Figura 1.62. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM9: lupenona ..	70
Figura 1.63. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6) da substância LEM10: α -D-glicopirranose	72
Figura 1.64. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEM10: α -D-glicopirranose.....	72
Figura 1.65. Fórmula estrutural da substância LEM10 (α -D-glicopirranose).....	72
Figura 1.66. Substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de <i>E. affine</i>	73
Figura 1.67. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEA1: friedelina.....	74
Figura 1.68. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEA1: friedelina .	75
Figura 1.69. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEA1: friedelina ..	76
Figura 1.70. Formula estrutural da substância LEA1 (friedelina)	77
Figura 1.71. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEA2: friedelan-3 β -ol	78
Figura 1.72. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) da substância LEA2: friedelan-3 β -ol.....	79
Figura 1.73. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) da substância LEA2: friedelan-3 β -ol	80
Figura 1.74. Formula estrutural da substância LEA2 (friedelan-3 β -ol)	81
Figura 1.75. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-D_6) da substância LEA3 e substância LEM6 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo).....	82
Figura 1.76. Formula estrutural da substância LEA3 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo)....	82
Figura 1.77. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEA4: ombuina-3-rutinosídeo	84
Figura 1.78. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEA4: ombuina-3-rutinosídeo.....	85
Figura 1.79. Fórmula estrutural da substância LEA4 (ombuina-3-rutinosídeo).....	86
Figura 2.1. Núcleo estrutural de algumas classes de substâncias utilizadas como antibióticos.....	91
Figura 2.2. Processo de redução do oxigênio para formação de água no meio biológico.....	92
Figura 2.3. Mecanismo de ação de algumas micromoléculas antioxidantes.....	95
Figura 2.4. Fórmula estrutural de anticancerígenos derivados de vegetais.....	100
Figura 2.5. Hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima acetilcolinesterase.....	101
Figura 2.6. Fármacos inibidores da AChE.....	102
Figura 2.7. Halos de inibição do crescimento das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> frente os extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	110
Figura 2.8. A) Imagem representativa dos resultados dos testes de avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e (B) concentração bactericida mínima (CBM) dos alcaloides tropânicos avaliados.....	112
Figura 2.9. Reação colorimétrica por redução enzimática do reagente resazurina.....	112
Figura 2.10. Reação de oxirredução simplificada envolvendo íons molibdênio (VI) e um composto fenólico.....	113

Figura 2.11. Reação entre o radical DPPH [•] e um composto com propriedade antirradicalar (AOH)..	114
Figura 2.12. Curvas de sequestro do radical DPPH [•] pelos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	115
Figura 2.13. Estrutura do flavonoide LEA3.....	116
Figura 2.14. Preparo do ABTS radicalar e sua reação com um composto antioxidante (AOH)	117
Figura 2.15. Curvas de sequestro do radical ABTS ^{•+} pelos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	118
Figura 2.16. Curvas de sequestro do radical ABTS ^{•+} pela substância LEA3.....	119
Figura 2.17. Fórmula estrutural da isoquercitrina.....	120
Figura 2.18. Reação colorimétrica para verificação da atividade da acetilcolinesterase.....	122
Figura 2.19. Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	123
Figura 2.20. Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos compostos isolados do extrato etanólico dos galhos de <i>E. affine</i>	124
Figura 2.21. Alguns flavonoides com potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Rendimento dos extratos dos galhos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	15
Tabela 1.2. Rendimento das frações originadas dos extratos etanólicos brutos das plantas estudadas	15
Tabela 1.3. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C 1D e 2D para o composto LEM1. (CDCl_3 ; 600 e 150 MHz)	29
Tabela 1.4. Comparação dos deslocamentos dos sinais de hidrogênios (ppm) do composto LEM2 (CDCl_3 , 300 MHz) com os que são descritos na literatura para o 6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol. Destaque para os sinais que mais se diferenciam	36
Tabela 1.5. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 ; 300 e 75 MHz) e COSY para o composto LEM2	37
Tabela 1.6. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM3 (CD_3OD , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Al-Said <i>et al.</i> (1986) para o 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol.....	41
Tabela 1.7. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM4 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Griffin <i>et al.</i> (1978) para o alcaloide 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol	46
Tabela 1.8. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM5 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Oliveira <i>et al.</i> (2011) para o 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	53
Tabela 1.9. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM6 (DMSO-D_6 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por González-Guevara <i>et al.</i> (2006) para o ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	59
Tabela 1.10. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM7 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) para o lupeol.....	64
Tabela 1.11. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM8 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) e Koay <i>et al.</i> , (2013) para o taraxerol.....	67
Tabela 1.12. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM9 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Nasser <i>et al.</i> (2013) para a lupenona.....	71
Tabela 1.13. Dados de RMN de ^{13}C da substância (75 MHz) comparados com os dados descritos por Bagno <i>et al.</i> (2007) para a α -D-glicopiranosose	72
Tabela 1.14. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEA1 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) para a friedelina	77
Tabela 1.15. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEA2 (75 MHz) comparados com os dados descritos na literatura para o friedelan-3 β -ol e friedelan-3 α -ol	81
Tabela 1.16. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEA4 (DMSO-D_6 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por González-Guevara <i>et al.</i> (2006) para o ombuina-3-rutinosídeo.....	86
Tabela 2.1. Resultados obtidos nos ensaios antibacterianos por CIM e CBM dos alcaloides isolados de <i>E. macrocalyx</i> frente as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	111
Tabela 2.2. Concentração de fenólicos totais nos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	113
Tabela 2.3. Valores de CE_{50} calculados para as curvas de sequestro do radical DPPH' pelos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	115
Tabela 2.4. Valores de CE_{50} calculados para as curvas de sequestro do radical ABTS ⁺⁺ pelos extratos de <i>E. affine</i> e <i>E. macrocalyx</i>	118
Tabela 2.5. Valores de CI_{50} e o respectivo intervalo de confiança (95% de confiança) atividade citotóxica dos compostos isolados em linhagens de células tumorais e não tumorais.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ax	Axial
BzO	Benzoiloxi
C+	Controle positivo
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CE ₅₀	Concentração Eficiente média
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CI ₅₀	Concentração Inibitória média
COSY	Espectroscopia de Correlação ¹ H- ¹ H (do inglês: “ <i>¹H-¹H Correlation Spectroscopy</i> ”)
<i>Dd</i>	duplo duplete
<i>Dl</i>	duplete largo
DMSO-D ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês: <i>Electrospray ionization</i>)
eq	Equatorial
EEA	Extrato Etanólico de <i>Erythroxylum affine</i>
EEM	Extrato Etanólico de <i>Erythroxylum macrocalyx</i>
FTA	Fração Total de Alcaloides
HCT116	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HDmBzO	4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
HL60	Linhagem celular de leucemia promielocítica humana
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (do inglês: “ <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> ”)
HSQC	Correlação Heteronuclear Quântica Simples (do inglês: “ <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> ”)
IE	Impacto de elétrons
IV	Infravermelho
K562	Linhagem celular de leucemia mielocítica crônica humana
<i>m</i>	Multiplete
MEA	Extrato Metanólico de <i>Erythroxylum affine</i>
MEM	Extrato Metanólico de <i>Erythroxylum macrocalyx</i>

MCF-7	Linhagem celular de carcinoma de mama humano
MRC5	Linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano
mult.	Multiplicidade
NOESY	Espectroscopia do Efeito Nuclear de Overhouse (do Inglês: <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
NT	Não testado
PMBC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>tap</i>	Tripleto aparente
<i>tl</i>	Tripleto largo

Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico de constituintes de *Erythroxylum affine* A. St.-Hil. e *Erythroxylum macrocalyx* Mart. (Erythroxylaceae)

Autor: Lauro José Caires da Silva Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

RESUMO: Em dois capítulos, este trabalho apresenta o estudo químico e avaliação de atividades farmacológicas de extratos dos galhos de *Erythroxylum affine* e *Erythroxylum macrocalyx*, da família Erythroxylaceae. No capítulo 1 são apresentados o isolamento e a identificação de 13 substâncias. Do extrato etanólico de *E. macrocalyx* foi obtido um novo alcaloide tropânico, 7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol (LEM1), além de outros compostos conhecidos: quatro alcaloides tropânicos [6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol (LEM2), 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol (LEM3), 3 α -benzoiloxi-tropano-6 β ,7 β -diol (LEM4), 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano (LEM5)]; três triterpenos [lupeol (LEM7), taraxerol (LEM8) e lupenona (LEM9)]; um flavonol glicosilado [ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (LEM6)]; e o monossacarídeo α -D-glicopirranose (LEM10). Do extrato etanólico de *E. affine* foram isolados dois triterpenos friedelanos [friedelina (LEA1) e friedelan-3 β -ol (LEA2)] e dois flavonóis glicosilados [ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (LEA3) e ombuina-3-rutinosídeo (LEA4)]. Os compostos foram isolados utilizando métodos clássicos de separação e identificados utilizando-se métodos espectrométricos de análise (RMN de ^1H e de ^{13}C , IV, CG-EM) e cristalografia de raios-X. No capítulo 2 são descritos os resultados dos ensaios farmacológicos *in vitro*, para avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante, antiproliferativa e anticolinesterásica de extratos e/ou substâncias puras. A atividade antibacteriana foi avaliada por difusão em disco e pelo método de microdiluição em placa, contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O extrato etanólico de *E. affine* foi o que apresentou maior potencial antibacteriano, com halos de inibição de 4–7 mm. A atividade antioxidante foi avaliada por métodos espectrofotométricos de sequestro dos radicais DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$. Todos os extratos apresentaram bom potencial antioxidante em ambos os testes, destacando-se novamente o extrato etanólico de *E. affine* (CE $_{50}$ 2,92 $\mu\text{g/mL}$ frente ao DPPH $^{\bullet}$), que apresentou CE $_{50}$ similar ao controle positivo (trolox). O flavonol ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo, isolado de ambas espécies, apresentou algum potencial antioxidante no ensaio com cátion radical ABTS $^{+\bullet}$ (CE $_{50}$ = 56,15 $\mu\text{g/mL}$). O teor de fenólicos dos extratos, determinado pelo método com o reagente Folin-Ciocalteu, variou de 196–360 mg EAG (equiv. de ácido gálico)/100 g de extrato. A atividade antiproliferativa das substâncias LEM3, LEM4, LEM5 e LEM6 foi testada sobre três linhagens de células cancerígenas, (HepG2, HL60 e K562) e também sobre linfoblastos normais, enquanto que as substâncias LEM2 e LEA4, foram testadas sobre HepG2, HL60 e outros dois tipos de células tumorais (HCT116 e MCF-7) além de fibroblasto de pulmão humano (MRC5). A citotoxicidade foi determinada pelo método de Alamar Blue $^{\text{®}}$. O alcaloide LEM5 foi o único que apresentou atividade citotóxica expressiva contra HepG2 (CI $_{50}$ = 3,66 $\mu\text{g/mL}$). A atividade anticolinesterásica foi avaliada pelo ensaio espectrofotométrico usando o reagente DTNB. A maioria dos extratos atuaram como potentes inibidores da AChE (inibição de 44–83%), e dentre as substâncias isoladas, o flavonoide ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo foi o mais ativo (47,72% de inibição). Esses ensaios, inéditos para os extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*, e para grande parte das substâncias testadas, enriquece esse estudo e contribui para valorização da flora brasileira.

Palavras-chave: *Erythroxylum*, 7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, atividade antiproliferativa, atividade anticolinesterásica.

Chemical study and evaluation of pharmacological potential of constituents from *Erythroxylum affine* A. St.-Hil. and *Erythroxylum macrocalyx* Mart. (Erythroxylaceae)

Author: Lauro José Caires da Silva Júnior

Advisor: Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula

Co-Advisor: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

ABSTRACT: In two chapters, this work presents the phytochemical study and evaluation of the pharmacological activities of extracts of the branches from *Erythroxylum affine* and *Erythroxylum macrocalyx*, of the Erythroxylaceae family. Chapter 1 presents the isolation and identification of thirteen substances. A new tropane alkaloid (LEM1), 7 β -acethoxy-6 β -benzoyloxytropan-3 α -ol, was obtained from the ethanolic extract of *E. macrocalyx*, besides other known compounds: four tropane alkaloids [6 β ,7 β -dibenzoyloxytropan-3 α -ol (LEM2), 3 α -phenylacetytropane-6 β ,7 β -diol (LEM3), 3 α -benzoyloxytropane-6 β ,7 β -diol (LEM4), 6 β -benzoyloxy-3 α -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyloxy)tropane (LEM5)], three triterpenes [lupeol (LEM7), taraxerol (LEM8) and lupenone (LEM9)], one flavonol glycoside [ombuin-3-rutinoside-5-glucoside (LEM6)], and the monosaccharide α -D-glucopyranose (LEM10). From the ethanolic extract of *E. affine*, two friedelan triterpenes [friedelin (LEA1) and friedelan-3 β -ol (LEA2)] and two flavonol glycosides [ombuin-3-rutinoside-5-glycoside (LEA3) and ombuin-3-rutinoside (LEA4)] were isolated. The compounds were obtained using classical separation methods and identified using spectrometric methods of analysis (^1H and ^{13}C NMR, IR, GC-MS) and X-ray crystallography. Chapter 2 describes *in vitro* assays for evaluation of antibacterial, antioxidant, antiproliferative and anticholinesterase activities for extracts and/or pure substances. Antibacterial activity was evaluated by disk diffusion and by the microdilution method against strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The ethanolic extract of *E. affine* presented the highest antibacterial potential, with inhibition halos in the range of 4–7 mm. The antioxidant activity was tested by spectrophotometric methods of capture of DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$ radicals. All extracts presented good potential in these tests, especially the ethanolic extract of *E. affine* (EC $_{50}$ 2.92 $\mu\text{g/mL}$, for DPPH $^{\bullet}$), which presented EC $_{50}$ similar to the positive control (trolox). The flavonol ombuin-3-rutinoside-5-glycoside, isolated from both species, showed some antioxidant potential in the assay with ABTS $^{+\bullet}$ radical cation (EC $_{50}$ =56.15 $\mu\text{g/mL}$). The phenolic content of the extracts, determined by the method with Folin-Ciocalteu reagent, ranged from 196–360 mg GAE (gallic acid equiv.) / 100 g of extract. The antiproliferative activity of the substances LEM3, LEM4, LEM5 and LEM6 was tested on three cancer cell lines, (HepG2, HL60 and K562) and on normal lymphoblasts, while the substances LEM2 and LEA4 were tested on HepG2, HL60 and two other tumor cell types (HCT116 and MCF-7), as well on human lung fibroblast (MRC5). The cytotoxicity was determined by the Alamar Blue $^{\text{®}}$ method. The tropane alkaloid LEM5 was the only one that presented expressive cytotoxic activity, against HepG2 cells (IC $_{50}$ = 3.66 $\mu\text{g/mL}$). The anticholinesterase activity was evaluated by the spectrophotometric assay with the DTNB reagent. Most of the extracts acted as potent inhibitors of AChE (44–83% inhibition). Among the isolated substances, the flavonol ombuin-3-rutinoside-5-glycoside was the most active (47.72% inhibition). These assays, unprecedented for the extracts of *E. affine* and *E. macrocalyx*, and for most of the tested substances, enriches this study and contributes to the valorization of the Brazilian flora.

Keywords: *Erythroxylum*, 7 β -acethoxy-6 β -benzoyloxytropan-3 α -ol, antibacterial activity, antioxidant activity, antiproliferative activity, anticholinesterase activity.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DOS GALHOS DE <i>Erythroxylum affine</i> E <i>Erythroxylum macrocalyx</i>	4
1.1 INTRODUÇÃO	4
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA PARA O ESTUDO FITOQUÍMICO	5
1.2.1 A família Erythroxylaceae	5
1.2.2 O gênero <i>Erythroxylum</i> P. Browne.....	5
1.2.3 <i>Erythroxylum affine</i> A.St.-Hil. e <i>Erythroxylum macrocalyx</i> Mart.	6
1.2.4 Alcaloides Tropânicos	7
1.2.5 Flavonoides	10
1.3 OBJETIVOS	12
1.3.1 Objetivo Geral	12
1.3.2 Objetivos específicos	12
1.4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	13
1.4.1 Materiais e reagentes utilizados nas técnicas fitoquímicas de isolamento	13
1.4.2 Equipamentos espectrométricos utilizados	13
1.5 METODOLOGIA	14
1.5.1 Coleta e Identificação do material Vegetal	14
1.5.2 Preparo dos Extratos e fracionamento	14
1.5.3 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Erythroxylum macrocalyx</i>	16
1.5.4 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Erythroxylum affine</i>	18
1.5.5 Análise das Substâncias isoladas	21
1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
1.6.1 Substâncias Isoladas de <i>E. macrocalyx</i>	21
1.6.1.1 Determinação estrutural da substância LEM1: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxi-tropan-3α- ol	23
1.6.1.2 Identificação da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol	31
1.6.1.3 Identificação da substância LEM3: 3α-fenilacetoxitropano-6β,7β-diol.....	37
1.6.1.4 Identificação da substância LEM4: 3α-benzoiloxitropano-6β,7β-diol.....	42
1.6.1.5 Identificação da substância LEM5: 6β-benzoiloxi-3α-(4-hidroxi-3,5- dimetoxibenzoiloxi)tropano.....	48
1.6.1.6 Identificação da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo	55
1.6.1.7 Identificação da substância LEM7: lupeol	61

1.6.1.8 Identificação da substância LEM8: taraxerol	64
1.6.1.9 Identificação da substância LEM9: lupenona.....	68
1.6.1.10 Identificação da substância LEM10: α -D-glicopiranosose	71
1.6.2 Substâncias Isoladas de <i>E. affine</i>	73
1.6.2.1 Identificação da substância LEA1: friedelina.....	74
1.6.2.2 Identificação da substância LEA2: friedelan-3 β -ol	78
1.6.2.3 Identificação da substância LEA3: ombuina-3-rutinosideo-5-glicosideo	82
1.6.2.4 Identificação da substância LEA4: ombuina-3-rutinosideo	83
1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTUDO FITOQUÍMICO	87
CAPÍTULO 2: ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Erythroxyllum affine</i> e <i>Erythroxyllum macrocalyx</i>	89
2.1 INTRODUÇÃO	89
2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONCEITOS PRÉVIOS.....	89
2.2.1 Bactérias.....	89
2.2.2 Agentes antimicrobianos.....	90
2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	91
2.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: CONCEITOS PRÉVIOS	92
2.3.1 Radicais livres	92
2.3.2 Estresse oxidativo e os danos ao corpo humano.....	93
2.3.3 Atividade antioxidante e os Inibidores radicalares	94
2.3.4 Suplementação antioxidante.....	96
2.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA: CONCEITOS PRÉVIOS	97
2.4.1 Neoplasias	97
2.4.2 Tratamento do câncer	98
2.4.3 Anticancerígenos de origem vegetal.....	99
2.5 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA: CONCEITOS PRÉVIOS	100
2.5.1 Acetilcolinesterase: função	100
2.5.2 Doença de Alzheimer e a teoria colinérgica.....	101
2.5.3 Inibidores da acetilcolinesterase.....	102
2.6 OBJETIVOS	103
2.6.1 Objetivo Geral	103
2.6.2 Objetivos Específicos	103
2.7 MATERIAIS E MÉTODOS	104

2.7.1 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios antibacterianos	104
2.7.2 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios da atividade antioxidante e quantificação de fenólicos.....	104
2.7.3 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para determinação da atividade antiproliferativa.....	105
2.7.4 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase	105
2.8 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	106
2.8.1 Atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco	106
2.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	106
2.8.3 Quantificação de fenólicos totais.....	107
2.8.4 Atividade sequestradora do radical DPPH [•]	107
2.8.5 Atividade sequestradora do radical ABTS ^{•+}	108
2.8.6 Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	108
2.8.7 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	108
2.8.8 Análises Estatísticas	109
2.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
2.9.1 Atividade antibacteriana	110
2.9.2 Concentração de fenólicos totais	112
2.9.3 Reação com o radical DPPH [•]	114
2.9.4 Reação com o radical ABTS ^{•+}	117
2.9.5 Atividade antiproliferativa	120
2.9.6 Atividade anticolinesterásica.....	122
2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE AS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	126
II CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	128
III REFERÊNCIAS.....	130

I. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por substâncias naturais que possam ser utilizadas em benefício do homem é o que guia grande parte das pesquisas em Produtos Naturais. Cada vez mais se tem investido na descoberta de princípios ativos mais eficientes no tratamento de doenças que afligem o ser humano. As plantas medicinais são uma importante fonte para obtenção de tais substâncias, e contribuem efetivamente no desenvolvimento de novos produtos com fins terapêuticos (FOGLIO et al., 2006; PIZZIOLLO et al., 2011).

As propriedades farmacológicas de diversas plantas medicinais provêm de substâncias denominadas de metabólitos secundários (ou especiais), que são produzidas pelo metabolismo da planta e apresentam funções ecológicas diversas como reprodução, crescimento e defesa contra predadores ou outros agentes externos danosos à sua sobrevivência (DEWICK, 2009).

O Brasil é considerado como um dos maiores centros de biodiversidade do planeta e contém em seu território uma imensa variedade de plantas endêmicas com grande potencial a ser cientificamente explorado (FORZZA et al., 2010; PINTO et al., 2002). Um grande destaque desta biodiversidade está na região nordeste do país, que mesmo com clima predominantemente semiárido, é lar de diversos tipos de vegetação como a caatinga, as florestas estacionais, os campos rupestres e o cerrado (QUEIROZ, 2006).

Apesar da impressionante variedade de plantas da região do semiárido, que contradiz a falsa ideia de ser uma região inóspita de vegetação homogênea, muitas de suas espécies ainda não foram devidamente estudadas, e poderiam contribuir de forma efetiva em alguns setores econômicos, como alimentício ou no campo dos medicamentos (LUCENA, 2010).

Uma das famílias de plantas com propriedades medicinais largamente encontrada no semiárido nordestino é a família Erythroxylaceae (SANTOS et al., 2008). Desta família, apenas espécies do gênero *Erythroxylum* já foram identificadas na região, muitas das quais apresentam propriedades medicinais e são utilizadas no tratamento de várias enfermidades (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005).

Estudos realizados com espécies do gênero *Erythroxylum* revelaram uma grande variedade de compostos, com destaque para os alcaloides tropânicos, que são de grande interesse medicinal por desempenharem funções biológicas diversas (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005; JIRSCHITZKA et al., 2013).

Uma consulta realizada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB revelou a existência de pelo menos seis espécies de *Erythroxylum* na Fazenda Brejo Novo, localizada no município de Jequié no estado da Bahia. Das plantas encontradas, as espécies *E. affine* A. St.-Hil. e *E. macrocalyx* Mart. foram selecionadas para este trabalho, por não haver qualquer estudo químico descrito na literatura para as mesmas, o que torna maior a possibilidade de descoberta de novos compostos.

Além da caracterização química e descoberta de novas substâncias, o estudo realizado também teve como objetivo a avaliação da atividade antioxidante, buscando compostos que atuem no combate à radicais livres danosos aos sistema biológico, atividade antibacteriana, visando encontrar substâncias que componham formulações de antibióticos mais eficientes no combate às infecções bacterianas, atividade antiproliferativa, buscando compostos que possam contribuir no tratamento quimioterápico à neoplasias malignas, e atividade anticolinesterásica, buscando encontrar compostos que possam ser empregados no desenvolvimentos de fármacos que amenizem os danos neurológicos causados pelo excesso de atividade da enzima acetilcolinesterase.

Este trabalho surge a partir de um projeto que visa realização de estudos de plantas do semiárido nordestino, mais especificamente do estado da Bahia, na busca de novas substâncias com propriedades farmacológicas de interesse científico. Com isto, objetiva-se contribuir com a valorização da flora local, além de fornecer material científico e conhecimento que possa ser empregado no desenvolvimento de medicamentos que atendam às necessidades de saúde e bem estar da população.



Capítulo 1

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DOS GALHOS DE *Erythroxylum affine* E *Erythroxylum macrocalyx*

1.1 INTRODUÇÃO

Os compostos de origem natural apresentam importante papel no processo de desenvolvimento de um novo fármaco (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Para se ter uma ideia, pelo menos 119 substâncias derivadas de produtos naturais já foram consideradas como drogas importantes e foram utilizados em um ou mais países do mundo, das quais 74% foram descobertas em estudos fitoquímicos de espécies utilizadas na medicina tradicional (FARNSWORTH et al., 1985).

Contudo, até que um composto natural possa ser empregado no desenvolvimento de algum medicamento, um longo percurso com colaboração pluridisciplinar deve ser seguido, desenvolvendo-se etapas de isolamento e identificação do princípio ativo, identificação do alvo biológico, determinação da dose-resposta *in vitro*, estudo das relações entre a estrutura química e a atividade desempenhada, avaliação toxicológica ao organismo vivo e possivelmente modificações estruturais visando otimizar a atuação da molécula (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Neste longo processo, o estudo fitoquímico é uma das etapas iniciais, onde são realizados e otimizados os processos de purificação e determinação estrutural do composto. É uma etapa extremamente importante para o desenvolvimento futuro de um medicamento, uma vez que o princípio ativo utilizado deve ser fielmente conhecido, tendo sua estrutura caracterizada com alto nível de confiança.

Este capítulo apresenta os procedimentos fitoquímicos empregados nos extratos dos galhos de duas espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. affine* e *E. macrocalyx*) para isolamento e identificação estrutural de seus constituintes fixos. Todas as substâncias foram isoladas a partir do uso de técnicas clássicas de purificação de compostos orgânicos e as estruturas dos compostos foram elucidadas com base nas análises de seus espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C , bem como por espectrometria de massas, infravermelho e cristalografia de raios-X.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA PARA O ESTUDO FITOQUÍMICO

1.2.1 A família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae Kunth possui aproximadamente 250 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008), distribuídas nos gêneros *Erythroxylum* P. Browne, *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonça (COSTA-LIMA et al., 2014). É composta caracteristicamente por árvores, arbustos ou subarbustos e apresenta maior distribuição na região pantropical (SOUZA & LORENZI, 2008).

Nesta família, o grande destaque está no gênero *Erythroxylum*, que abrange um total de 230 de suas espécies, o que equivale a cerca de 92% do total (PLOWMAN & HENSOLD, 2004). Os demais gêneros possuem um menor número de espécies e apresentam distribuição confinada ao continente africano (COSTA-LIMA et al., 2014).

1.2.2 O gênero *Erythroxylum* P. Browne

O gênero *Erythroxylum* está amplamente distribuído na região pantropical do planeta, sendo mais comumente encontrado na América Latina, na África, sudeste da Ásia e Austrália (Figura 1.1) (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005). O Brasil é um país de grande destaque para este gênero, contendo 127 espécies catalogadas, das quais 83 são endêmicas (LOIOLA & COSTA-LIMA, 2015^a).

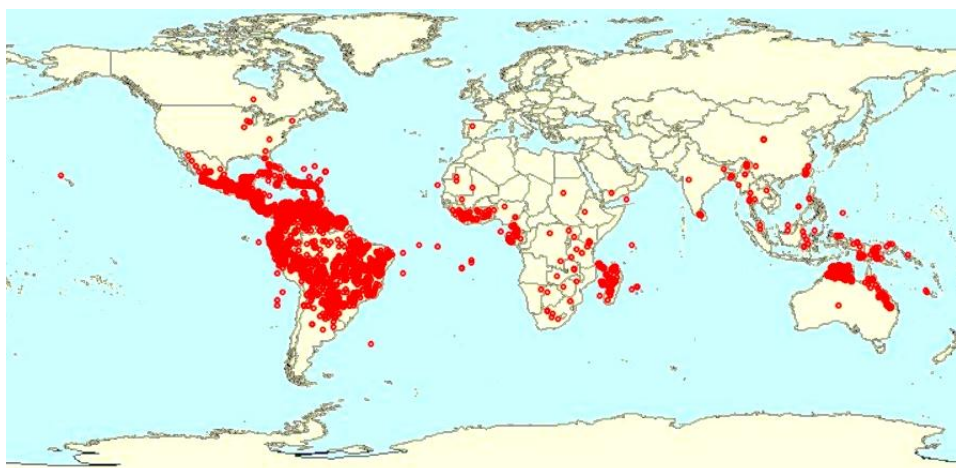


Figura 1.1. Distribuição de espécies de *Erythroxylum* catalogadas ao redor mundo

(FONTE: mapa gerado *online* através do site <http://www.discoverlife.org/mp/20m>)

Este gênero possui muitas plantas empregadas na medicina popular, principalmente como estimulantes, anestésicos, anti-inflamatório, cicatrizantes e no tratamento de problemas estomacais (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005). Se tornou bastante conhecido devido as propriedades biológicas das folhas da espécie *E. coca*, de onde se pode extrair o alcaloide tropânico cocaína (LOIOLA et al., 2007).

Outro representante deste gênero, bastante popular no Brasil, é a espécie *E. vacciniifolium*, comumente conhecida como “catuaba” e utilizada pelos populares como afrodisíaco ou tônico natural (ZANOLARI et al., 2003).

Uma revisão realizada por González-García e colaboradores (2005) sobre as atividades biológicas cientificamente verificadas para espécies de *Erythroxylum*, mostra resultados positivos para vários ensaios, destacando-se as atividades antimicrobiana, antiviral, analgésica e principalmente a ação no Sistema Nervoso Central (SNC).

A constituição química deste gênero desperta interesse científico, principalmente devido à presença dos alcaloides tropânicos, que são encontrados em várias de suas espécies (OLIVEIRA et al., 2010). Muitos destes alcaloides apresentam importantes atividades farmacológicas, incluindo atividades anticolinérgica, antiemética, parasimpaticolíticas, anestésica e estimulante do SNC (LOUNASMAA, 1988). Além dos alcaloides, substâncias pertencentes às classes dos flavonoides e terpenos também podem ser facilmente encontradas em suas espécies (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005).

Embora o gênero *Erythroxylum* apresente grande potencial para estudo fitoquímico e farmacológico, muitas de suas espécies ainda não foram submetidas a este tipo de investigação. Oliveira (2012) aponta um levantamento indicando que de todas as 230 espécies catalogadas do gênero *Erythroxylum*, apenas 61 haviam sido estudadas do ponto de vista químico (NAPRALERT *apud* OLIVEIRA, 2012). Desta forma, o investimento em estudos destas espécies se caracteriza como algo relevante e promissor, podendo fornecer resultados inéditos no campo dos compostos bioativos.

1.2.3 *Erythroxylum affine* A.St.-Hil. e *Erythroxylum macrocalyx* Mart.

As espécies *E. affine* e *E. macrocalyx* são dois exemplos de plantas do gênero *Erythroxylum*, endêmicas da flora brasileira, para as quais não existe qualquer estudo químico ou biológico publicado na literatura.

E. affine é popularmente conhecida como “batinga roxa” (no nordeste brasileiro) e pode ser encontrada nas regiões do Nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco e Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro) do Brasil. Esta planta se apresenta comumente como árvore ou arbusto e se distribui principalmente nas regiões do bioma Mata Atlântica (LOIOLA & COSTA-LIMA, 2015^b).

E. macrocalyx apresenta uma distribuição geográfica mais diversificada, sendo encontrada em regiões de bioma Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado. Ressalta-se que não foi encontrado um nome popular para esta espécie, que já foi localizada nos estados da Bahia, Sergipe e Minas Gerais (LOIOLA & COSTA-LIMA, 2015^c).

Os extratos das folhas dessas duas plantas foram submetidos a um estudo inicial em nosso grupo de pesquisa para verificar seu potencial farmacológico e perfil fitoquímico. Esse estudo permitiu verificar uma significativa inibição da atividade da acetilcolinesterase e da α -amilase, *in vitro*, a presença de compostos fenólicos em ambas espécies e, também, de um conteúdo significativo de alcaloides tropânicos no extrato de *E. macrocalyx*, o que sugeriu se tratem de plantas promissoras para investigação fitoquímica (ALVES, 2016).

1.2.4 Alcaloides tropânicos

Os alcaloides tropânicos são exímios representantes do metabolismo secundário (especial) de plantas do gênero *Erythroxylum*, sendo considerados um de seus marcadores quimiotaxonômicos. Um levantamento publicado no ano de 2010 revelou que já foram identificados 186 alcaloides tropânicos em 35 espécies deste gênero, o que representa grande parte das plantas já estudadas (OLIVEIRA et al., 2010).

Os alcaloides tropânicos não são encontrados corriqueiramente na natureza, e além da família Erythroxylaceae, eles são comuns apenas em espécies da família Convolvulaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, Solanaceae e, ocasionalmente, em Brassicaceae, Euphorbiaceae e Oleaceae (OLIVEIRA et al., 2010).

Estruturalmente, os alcaloides tropânicos são caracterizados pelo núcleo tropânico bicíclico *N*-metil-8-azobicyclo[3.2.1]octano (Figura 1.2) (EICH, 2008). A rota biossintética seguida para produção destes compostos parte da putrescina, que se origina da descarboxilação do aminoácido L-ornitina. Ao ser formada, a putrescina sofre metilação por ação de uma *N*-metiltransferase e segue por etapas que levam à formação do cátion *N*-metil-

Δ^1 -pirrolínico. Este cátion sofre ação da acetil-CoA adicionando dois grupos acetato na estrutura. O intermediário formado segue então etapas de oxidação, hidrólise, adição intramolecular e descarboxilação, para levar à formação da tropinona que, a depender da enzima que atue, pode ser reduzida a tropina ou pseudotropina (Figura 1.3) (DEWICK, 2009).

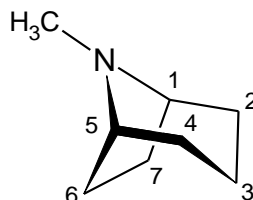


Figura 1.2. Estrutura do núcleo bicíclico dos alcaloides tropânicos

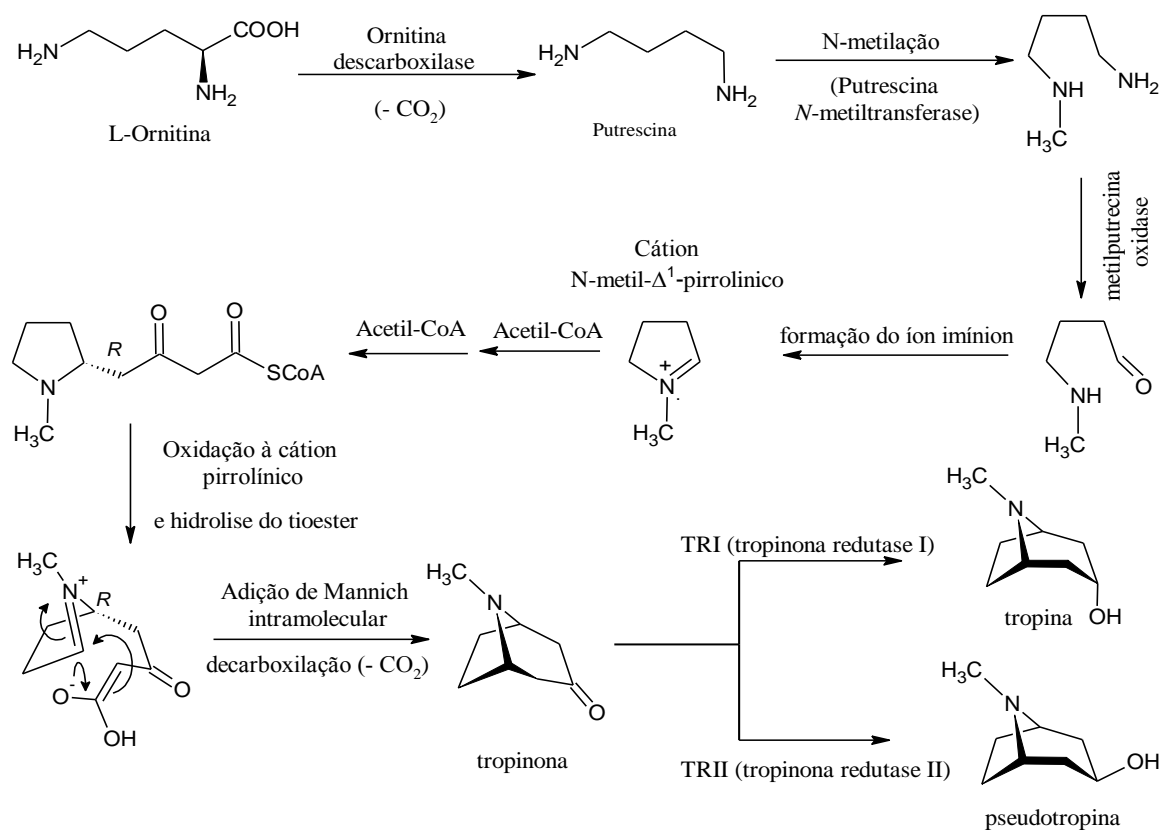


Figura 1.3. Rota Biosintética para produção de alcaloides tropânicos (Baseado em: DEWICK, 2009)

A biossíntese desta classe de substâncias foi bastante estudada para a família Solanaceae, portanto, as enzimas envolvidas nas rotas metabólicas apenas foram confirmadas para suas espécies. Entretanto, espera-se que as rotas seguidas para a produção desses alcaloides em espécies de Erythroxylaceae, bem como as enzimas envolvidas nesse processo, sejam similares e apresentem funções homólogas àquelas da família Solanaceae (JIRSCHITZKA et al., 2013; JIRSCHITZKA et al., 2012).

Os primeiros relatos de isolamento de um alcaloide tropânico partem de estudos das raízes e folhas de *Atropa belladonna* (Solanaceae), em 1833, que resultou na identificação do alcaloide atropina. Mais tarde, descobriu-se que a atropina obtida era composta de uma mistura racêmica dos isômeros (–) e (+)-hiosciamina (Figura 1.4) (EICH, 2008).

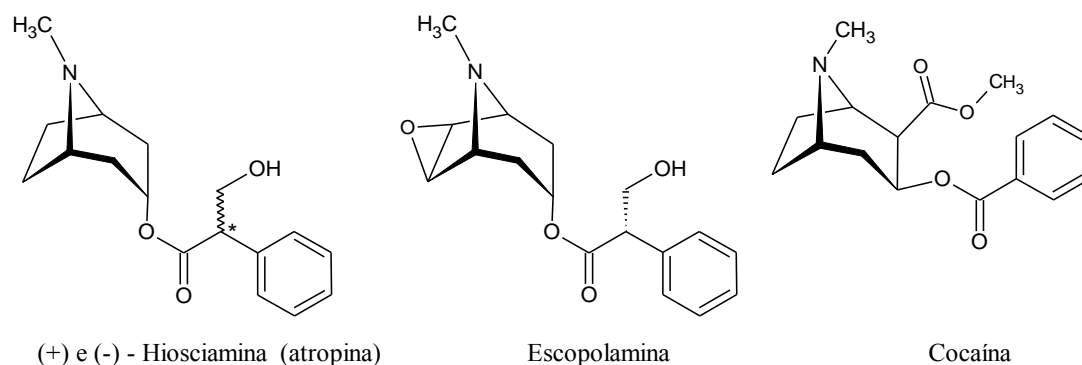


Figura 1.4. Estrutura de alguns alcaloides tropânicos conhecidos

Na idade média, plantas contendo alcaloides tropânicos eram utilizadas para produção de unguentos com os quais mulheres (conhecidas como “bruxas”) untavam seus corpos para adquirir o suposto poder de falar com pessoas ausentes, ver objetos inexistentes e até mesmo voar. Estas propriedades alucinógenas foram, mais tarde, atribuídas à presença dos alcaloides escopolamina e atropina nas plantas utilizadas. Além disso, alguns desses alcaloides são extremamente tóxicos e seu consumo pode levar a amnésia, perda de sentido da realidade e a um profundo sono (MARTINEZ et. al, 2009).

Dentre os alcaloides tropânicos conhecidos, a cocaína (Figura 1.4), tornou-se um dos mais estudados e mais discutidos na literatura científica (BIONDICH & JOSLIN, 2016). Esse composto foi primeiramente isolado das folhas da *E. coca.*, no entanto, estudos já detectaram a presença dessa substância em 23 espécies de *Erythroxylum* (EICH, 2008; BIERI et al., 2006). A propriedade anestésica da cocaína despertou grande interesse medicinal, no entanto, a sua ação psicoativa foi o que gerou notoriedade para a substância, que passou a ser utilizada para fins recreativos (PETERSEN, 1997).

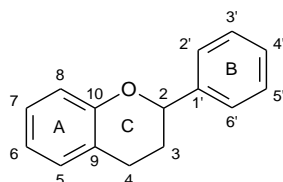
Ainda que muitos destes alcaloides tenham um histórico toxicológico direcionado aos seus efeitos alucinógenos e estimulantes, muitos desses compostos apresentam muitas outras importantes atividades farmacológicas, como a ação anestésica da cocaína, justificando assim o interesse para suas aplicações no campo medicinal.

1.2.5 Flavonoides

Os flavonoides compreendem outra importante classe de metabólitos que são amplamente encontrados em plantas do gênero *Erythroxylum*. Levantamentos mostram que esta classe de metabólitos especiais representa cerca de 19,8% das substâncias isoladas destas plantas, ficando atrás apenas dos alcaloides (54,7%), que são principais representantes da constituição química deste gênero, e dos terpenos (23,3%), que são comuns à maioria dos extratos de plantas (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2005).

Os flavonoides são produzidos pelas plantas com diversas finalidades, como para proteger seus tecidos contra raios UV-B, auxiliar na defesa contra fungos patogênicos, promover colorações às flores e assim atrair polinizadores, além de estarem envolvidos em processos metabólicos de crescimento do organismo (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Quimicamente os flavonoides são caracterizados por um núcleo estrutural composto por quinze átomos de carbonos e um oxigênio, os quais se organizam em três anéis, C₆-C₃-C₆ ou anéis A-C-B (PIETTA, 2000). No gênero *Erythroxylum*, a maior parte dos flavonoides descritos é derivada do kaempferol, quercetina ou ombuina (7,4'-dimetilquercetina) (Figura 1.5), que ocorrem comumente nas formas glicosiladas, como 3-O-monoglicosídeos ou 3-O-diglicosídeos, em diferentes combinações de açúcares (BOHM et al., 1988).



Núcleo estrutural dos flavonoides

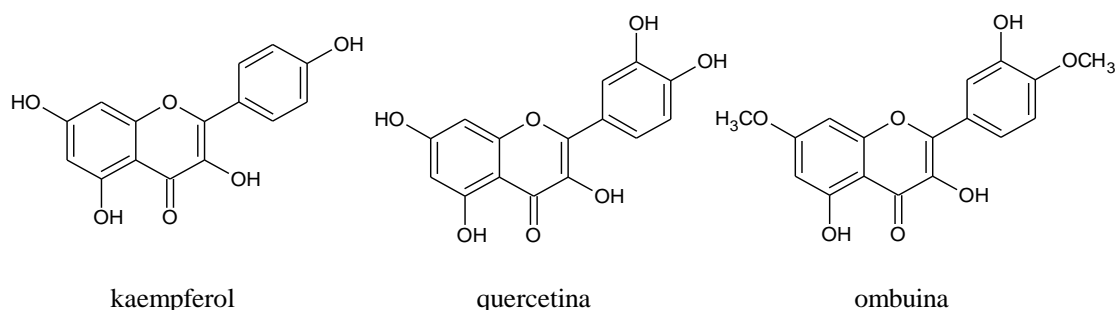


Figura 1.5. Estrutura do núcleo estrutural dos flavonoides e de alguns compostos desta classe que são comumente encontrados em espécies do gênero *Erythroxylum*

Dentre as propriedades biológicas atribuídas para os flavonoides, a atividade antioxidante, sem dúvida, merece destaque, uma vez que já foi bem descrita para vários destes compostos (KUMAR & PANDEY, 2013). A justificativa para esta atividade se baseia principalmente em suas estruturas química conjugada e muitas vezes ricas em hidroxilas fenólicas, que lhes proporcionam grande potencial doador de elétrons. Devido a essas propriedades, os flavonoides são capazes de estabilizar radicais livres ou complexar metais que estão envolvidos no processo oxidativo *in vivo* (Figura 1.6) (MACHADO et al., 2008; PIETTA, 2000).

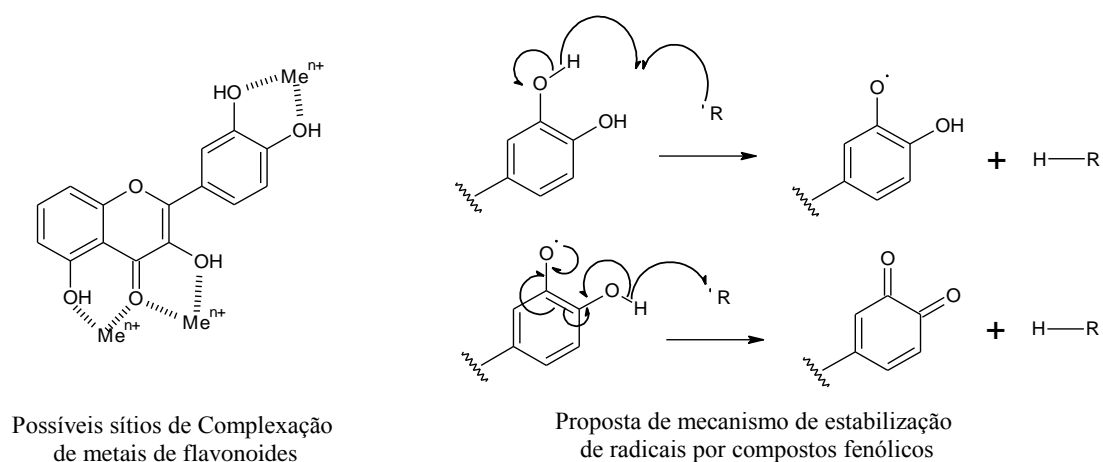


Figura 1.6. Mecanismos de ação antioxidante de Flavonoides

FONTE: Adaptado de Pietta (2000)

Além do poder antioxidante, várias outras atividades biológicas já foram comprovadamente atribuídas aos flavonoides, com destaque para atividades antibacteriana, anti-inflamatória, hepatoprotetora, anticancerígena e antiviral. Contudo, a baixa solubilidade em água de alguns flavonoides, principalmente aqueles não glicosilados, representa um desafio para aplicação medicinal desses compostos sendo, em alguns casos, necessário o uso de semissíntese para aumentar a solubilidade no meio biológico (KUMAR & PANDEY, 2013). Nesse cenário, os flavonoides glicosilados saem em vantagem, uma vez que muitos deles apresentam uma polaridade bastante elevada que lhes confere maior solubilidade em meio aquoso.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico dos galhos de *Erythroxylum affine* e *Erythroxylum macrocalyx* para isolamento e identificação de seus constituintes fixos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Extrair e isolar, por meio de técnicas clássicas de laboratório de química orgânica (cromatografia em coluna, recristalização, extração líquido-líquido e cromatografia em camada delgada preparativa), os constituintes químicos presentes nos extratos dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx*;
- Identificar os constituintes isolados utilizando métodos espectrométricos de identificação de compostos orgânicos (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV, e CG-EM);
- Caracterizar o perfil fitoquímico dos extratos estudados por meio dos constituintes químicos isolados;
- Contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico de espécies de plantas do gênero *Erythroxylum* endêmicas da flora brasileira.

1.4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

1.4.1 Materiais e reagentes utilizados nas técnicas fitoquímicas de isolamento

Os processos de separação por cromatografia em coluna (CC) foram realizados utilizando-se sílica gel 60 (0,063–0,200 mm) da Vetec. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas contendo uma camada de sílica gel 60 G-F254 da Vetec, ativadas em estufa a 100 °C por 2 h. Os solventes utilizados para o preparo dos extratos, separações por CC, e análise por CCD foram todos de grau analítico das marcas Vetec, Synth, Cromoline e Química Moderna. As placas de CCD foram reveladas tanto por irradiação de luz UV, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, quanto por sublimação de iodo ou por ação de um *spray* com o reagente de Dragendorff [solução ácida de Subnitrato de Bismuto com iodeto de potássio (ALICE et al., 1995)]. A eliminação dos solventes dos extratos e das frações obtidas no seu fracionamento foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Fisaton. As temperaturas de fusão (T_f) foram determinadas em um aparelho modelo MQAPF-302 da Microquímica. As plantas foram secas em estufa com circulação de ar da Tecnal, modelo TE-394/2.

1.4.2 Equipamentos espectrométricos utilizados

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C a 300 MHz e 75 MHz foram obtidos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em um aparelho Varian Mercury 300. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C a 600 MHz e 150 MHz foram obtidos na Universidade Estadual Paulista (UNESP) em aparelho Bruker Avance III 600. As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho da Shimadzu modelo QP2010 SE. As condições de análise por CG-EM foram: temperaturas do injetor e da interface, 290 °C, temp. inicial da coluna 100 °C, durante 1 min, sendo aumentada 5 °C/min, até atingir 285 °C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 mL/min. Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em aparelho da Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, pelo método da reflectância atenuada, submetendo 1,0 mg do cristal pulverizado ao feixe de radiação do aparelho. Dados cristalográficos de raio-X foram obtidos em difratômetro da marca Siemens, na Université Laval – Canadá.

1.5 METODOLOGIA

1.5.1 Coleta e Identificação do material Vegetal

Os materiais vegetais submetidos a este estudo foram coletados na Fazenda Brejo Novo, situada a 9 km da cidade de Jequié-BA em 04 de abril de 2015. As exsicatas das plantas *E. affine* e *E. macrocalyx* (Figura 1.7) foram depositadas no Herbário da UESB com os códigos HUESB9934 e HUESB11125, respectivamente. A identificação dos indivíduos coletados foi realizada pela especialista no gênero *Erythroxylum* Dr.^a Maria Iracema Bezerra Loiola (Universidade Federal do Ceará - UFCE)



Figura 1.7. Exsicatas das plantas *E. affine* (A) e *E. Macrocalyx* (B) depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Jequié

1.5.2 Preparo dos Extratos e fracionamento

As partes aéreas das plantas coletadas foram secas em estufa com circulação de ar, a uma temperatura aproximada de 40 °C. Após secagem, os galhos, separados das folhas, foram triturados e submetidos à extração por maceração em temperatura ambiente com etanol, seguido por outra extração com metanol, a fim de verificar se haveria diferença significativa nos resultados dos ensaios biológicos obtidos para os

dois extratos. Cada solvente ficou em contato com o material vegetal por três períodos de 48 de extração e, ao final de cada período, o extrato era filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida. A Tabela 1.1 apresenta uma descrição das quantidades de galhos utilizadas e o rendimento em massa de cada extrato.

Tabela 1.1. Rendimento dos extratos dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

Extrato	Código	Massa de galho (g)	Massa de extrato (g)
Etanólico de <i>E. affine</i>	EEA	236,30	9,40
Metanólico de <i>E. affine</i>	MEA	236,30	10,60
Etanólico de <i>E. macrocalyx</i>	EEM	347,00	22,57
Metanólico de <i>E. macrocalyx</i>	MEM	347,00	13,05

Todos os extratos etanólicos foram submetidos à uma coluna filtrante para obtenção das frações de estudo. Neste procedimento, os extratos foram adsorvidos em sílica gel 60 e, posteriormente, fracionados em coluna a partir da percolação dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol, selecionados a partir de uma análise preliminar por CCD. A Tabela 1.2 descreve as massas de extrato utilizadas e o rendimento em massa das frações geradas após este primeiro fracionamento.

Tabela 1.2. Rendimento das frações originadas dos extratos etanólicos brutos das plantas estudadas

Extrato (massa utilizada*)	Fração	Código**	Massa (g)
EEA (8,80 g)	Hexânica	HGEA	0,86
	Diclorometânica	DGEA	0,50
	Acetato de Etila	AEGEA	0,27
	Metanólica	MGEA	6,75
EEM (21,00g)	Hexânica	HGEM	1,63
	Acetato de Etila	AEGEM	1,70
	Etanólica	EGEM	16,50
	Metanólica	MGEM	0,96

* Não foi utilizada a massa total dos extratos indicada na Tabela 1.1, pois parte desta foi separada para os ensaios farmacológicos

** primeira letra indica o solvente, segunda letra indica a parte da planta (Galhos), terceira e quarta letra são referentes à espécie da planta

Os extratos metanólicos não foram submetidos a este fracionamento pois o perfil químico destes na análise por CCD aparentou ser rico em substâncias muito polares que possivelmente não iriam se separar efetivamente em uma coluna de sílica.

1.5.3 Isolamento dos constituintes químicos de *Erythroxylum macrocalyx*

As frações obtidas do extrato etanólico de *E. macrocalyx* foram submetidas à uma triagem com reagente de Dragendorff para verificar qualitativamente a presença de alcaloides. Apenas a fração etanólica e a fração metanólica apresentaram resultado positivo neste teste (Figura 1.8).



Figura 1.8. Triagem das frações do extrato EEM com reagente de Dragendorff (CCD eluída com AcOEt/MeOH 1:1) (H=hexânica, AE = acetato de etila, E = etanólica, M=metanólica). As manchas alaranjadas indicam a presença de alcaloides nas frações

A partir desse resultado, e levando-se em consideração que a fração etanólica foi a que apresentou maior massa no fracionamento, esta foi submetida ao procedimento para obtenção da fração total de alcaloides (FTA) seguindo a metodologia descrita por Quintans-Júnior e colaboradores (2004) com modificações. Nesta metodologia, a fração etanólica foi solubilizada em uma mistura de etanol:água (8:2), e posteriormente acidificada com uma solução de HCl (1%) até pH 2,0. Após acidificar, a mistura foi extraída 3 vezes com diclorometano, e depois basificada com solução de NH_4OH (5%) até pH=10. Em seguida, a solução foi submetida à uma extração com os solventes diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 1.9).

No procedimento realizado, verificou-se que as frações diclorometânica 2, acetato de etila e butanólica aparentaram um perfil químico semelhante em análise por CCD, sendo por isto agrupadas na denominada fração total de alcaloides (FTA).

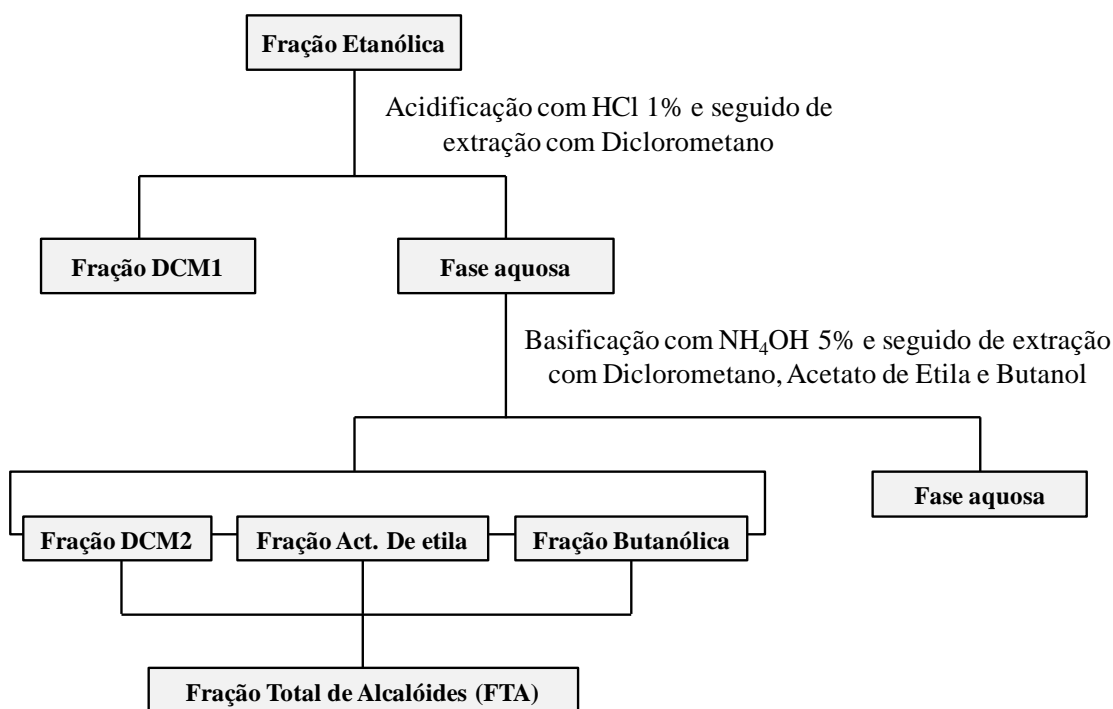


Figura 1.9. Esquema do procedimento para obtenção da fração total de alcalóides

Esta metodologia é baseada na propriedade básica dos alcalóides que em meio ácido serão convertidos no sal correspondente (Figura 1.10). Este sal migrará para a fase aquosa na extração, e após ser basificado, será desprotonado retornando para a fase orgânica, a depender de sua polaridade.

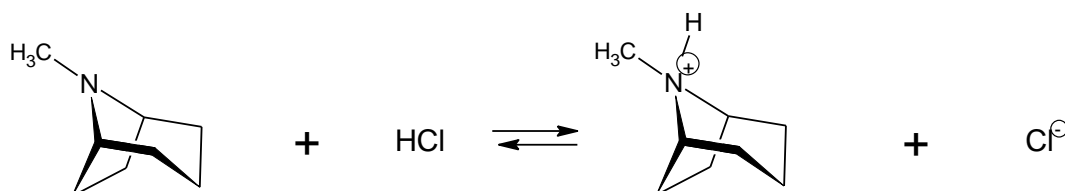


Figura 1.10. Reação ácido-base entre um alcaloide tropanico qualquer e o HCl

A FTA foi fracionada em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com CHCl₃/MeOH 1:1 (isocrática) dando origem a 5 subfrações (FTA1–FTA5), tendo os alcalóides se concentrado na fração FTA3. Esta subfração foi refracionada em coluna de sílica gel com uma mistura de CHCl₃/MeOH (em gradiente crescente de polaridade a partir da proporção de 8:2), gerando 5 frações (FTA3.1 – FTA3.5). A fração FTA3.1 foi submetida a uma separação em coluna de sílica gel com CHCl₃/MeOH 9:1 (isocrática) originando 5 grupos de frações (FTA3.1.1- FTA 3.1.5), sendo o composto **LEM 2** (133 mg) obtido da fração FTA3.1.3. O composto **LEM 1** (2 mg) foi obtido após purificação da fração FTA3.1.4, em coluna de sílica gel, eluída com AcOEt/MeOH 8:2 (isocrática).

A fração FTA3.2 foi purificada em coluna de sílica gel, eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3 (isocrática), levando ao isolamento do composto **LEM 3** (154 mg). A fração FTA3.4 foi submetida a uma purificação em coluna de sílica gel, eluída com AcOEt/MeOH 1:1, levando ao isolamento do composto **LEM10**.

Da fração metanólica (MGEM), foi obtido um precipitado de coloração castanha pouco solúvel em metanol. Este precipitado foi filtrado, e submetido a uma lavagem com metanol, resultando no isolamento do composto **LEM 6** (60 mg). A parte solúvel da fração metanólica foi purificada em coluna de sílica, eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3 (isocrática), levando ao isolamento dos compostos **LEM 4** (13 mg) e **LEM 5** (7 mg).

A fração hexânica (HGEM) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com mistura de Hexano/ AcOEt 9:1 (em gradiente crescente de polaridade a partir de 9:1), obtendo-se 7 frações (HGEM1-HGEM7) após o agrupamento. A fração HGEM3 foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel eluída com CH_2Cl_2 , obtendo-se 7 frações (HGEM3.1 – HGEM3.7). As frações HGEM 3.4 e 3.5 foram agrupadas (26 mg) apresentando uma mistura de dois constituintes que foram separados de acordo com suas diferenças de solubilidade em hexano, levando ao isolamento do composto **LEM 7** (15 mg, solúvel em hexano) e composto **LEM 8** (11 mg, pouco solúvel em hexano). A fração HGEM1 foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com Hexano/ AcOEt 9,5:0,5 (isocrática), levando ao isolamento do composto **LEM 9** (5 mg). A Figura 1.11 apresenta um esquema resumido dos processos de isolamento empregados nas frações hexânica, acetato de etila, etanólica e metanólica, obtidas do extrato etanólico de *E. macrocalyx*.

1.5.4 Isolamento dos constituintes químicos de *Erythroxylum affine*

Após análise das frações obtidas do extrato etanólico bruto dos galhos de *E. affine*, verificou-se similaridade no perfil químico das frações hexânica e diclorometânica, sendo estas agrupadas e submetidas à um fracionamento em coluna cromatográfica, eluída com uma mistura de Hexano/ AcOEt 9:1, em gradiente crescente de polaridade. Este fracionamento deu origem à 7 frações (HGEA1-HGEA7) após agrupamento, sendo os compostos **LEA1** (16 mg) e **LEA2** (16 mg) obtidos de processos de recristalização em hexano das frações HGEA5 e HGEA6, respectivamente.

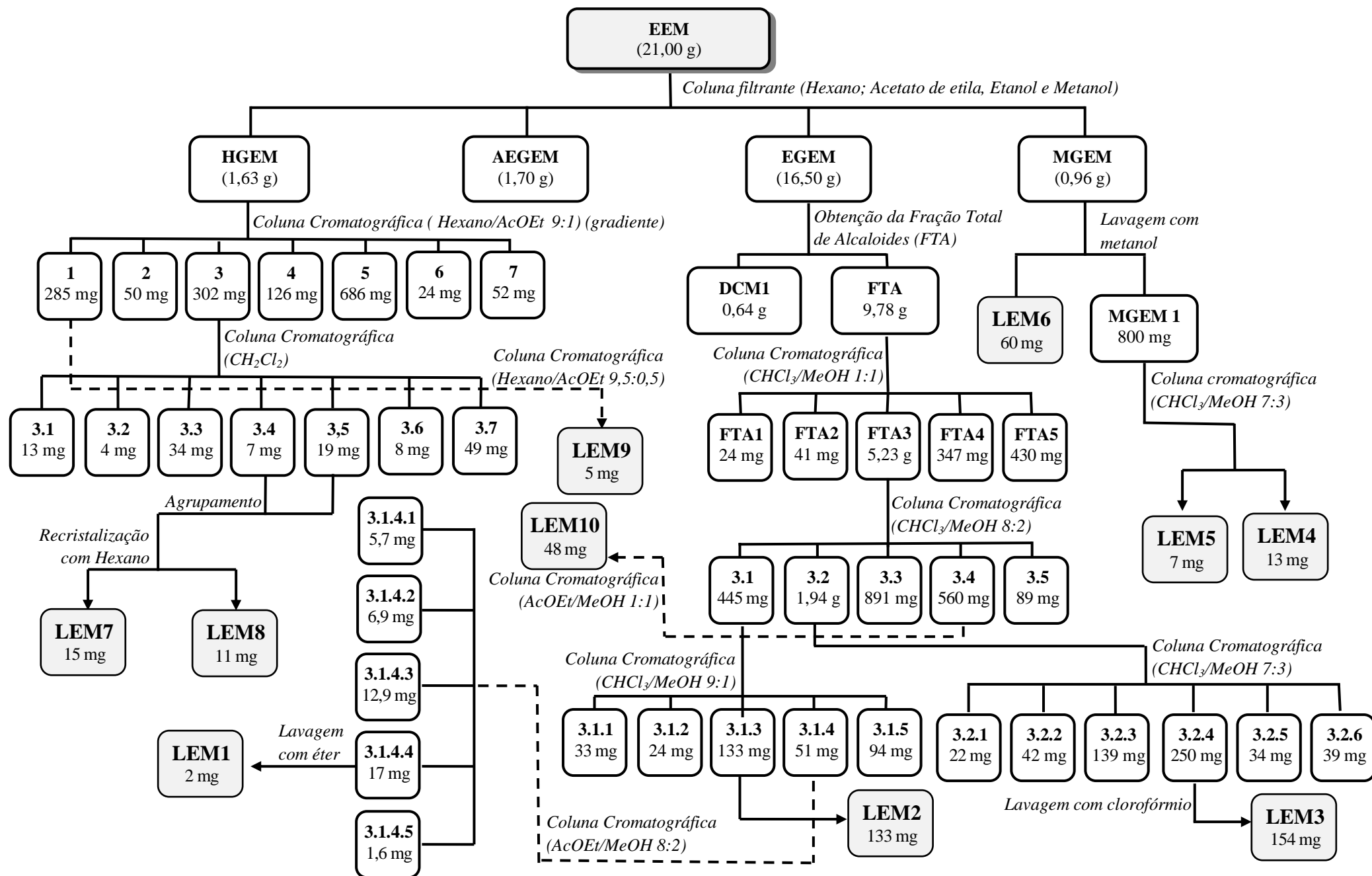


Figura 1.11. Esquema de fracionamentos do Extrato Etanólico dos Galhos de *E. macrocalyx* para isolamento dos constituintes químicos

A fração metanólica foi fracionada em coluna de sílica gel (AcOEt/MeOH 6:4) originando três frações após agrupamento (MGEA1–MGEA3). A fração MGEA2, que apresentou menor complexidade de constituintes químicos nas análises por CCD, foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel (CHCl₃/MeOH 6:4) dando origem à cinco frações (MGEA2.1–MGEA2.5), sendo os compostos **LEA3** (144 mg) e **LEA4** (40 mg) obtidos em processos de purificação a partir da eliminação das impurezas solúveis em clorofórmio das frações MGEA2.5 e MGEA2.4 respectivamente. A Figura 1.12 mostra a sequência de fracionamentos do extrato etanólico de *E. affine*.

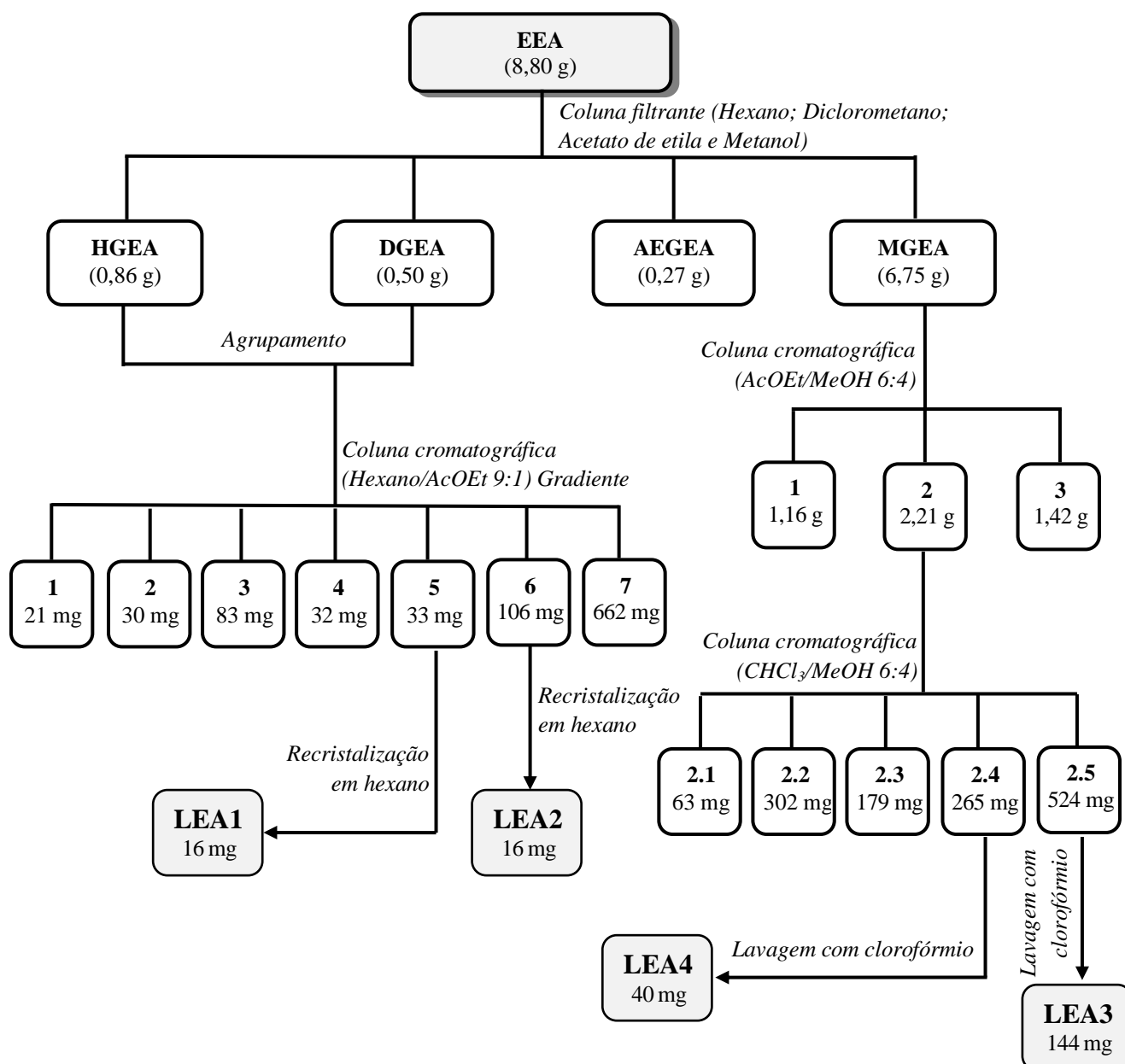


Figura 1.12. Esquema de fracionamentos do Extrato Etanólico dos Galhos de *E. affine* para isolamento dos constituintes químicos

1.5.5 Análise das Substâncias isoladas

Após serem purificadas, todas as substâncias foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia na região do Infravermelho, Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM) e determinação da temperatura de fusão, além de análise por cristalografia de raios-X (para LEM2) a fim de elucidar a estrutura orgânica destes compostos.

1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.6.1 Substâncias Isoladas de *E. macrocalyx*

O estudo fitoquímico do extrato etanólico dos galhos de *E. macrocalyx* levou ao isolamento e identificação de um novo alcaloide tropânico (LEM1) além de outras nove substâncias conhecidas, sendo 4 alcaloides tropânicos (LEM2–LEM5), três triterpenos pentacíclicos (LEM7–LEM9), um flavonol glicosilado (LEM6) e um monossacarídeo (LEM10). A estrutura e o nome destes compostos são apresentados na Figura 1.13, enquanto que a elucidação ou determinação estrutural são descritas nas páginas subsequentes.

Substâncias isoladas de <i>Erythroxylum macrocalyx</i>		
Classe: alcaloides tropânicos		
Código: LEM1	Código: LEM2	Código: LEM3
Nome do composto: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol	Nome do composto: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol	Nome do composto: 3α-fenilacetoxitropano-6β,7β-diol
Código: LEM4	Código: LEM5	
Nome do composto: 3α-benzoiloxitropano-6β,7β-diol	Nome do composto: 6β-benzoiloxi-3α-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	
Classe: Flavonol glicosilado		Classe: monossacarídeo
Código: LEM6		Código: LEM10
Nome do composto: Ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo		Nome do composto: α-D-Glicopirranose
Classe: Triterpenos		
Código: LEM7	Código: LEM8	Código: LEM9
Nome do composto: Lupeol	Nome do composto: Taraxerol	Nome do composto: Lupenona

Figura 1.13. Substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de *E. macrocalyx*

1.6.1.1 Determinação estrutural da substância LEM1: 7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxi-tropan-3 α -ol

A substância LEM1 (2 mg) foi isolada na forma de um óleo viscoso amarelado solúvel em clorofórmio. A análise de seu espectro de RMN de ^1H (Figura 1.14) indicou se tratar de um alcaloide tropânico 3,6,7-*O*-trissubstituído (RIBEIRO et al., 2013). Os sinais que permitiram esta determinação foram os hidrogênios do anel tropânico H-1 (δ 3,26, *sl*), H-5 (δ 3,36, *sl*), H-2 e H-4 axiais (δ 2,18, *m* e δ 2,25, *m*), H-2 e H-4 equatoriais (δ 1,76, *d*, $J=16,4$ Hz e δ 1,78, *d*, $J=16,4$ Hz), H-3 (δ 4,14, *tap*, $J=4,7$ Hz), e dos hidrogênios H-6 (δ 5,97, *d*, $J=6,4$ Hz) e H-7 (δ 5,86, *d*, $J=6,4$ Hz) acoplados entre si. A presença do grupo benzoiloxi na estrutura foi determinada pelos sinais característicos dos hidrogênios de um anel aromático monossubstituído H-2' e 6' (δ 8,02, *dd*, $J=8,3$; 1,3 Hz), H-3' e 5' (δ 7,43, *t*, $J=7,8$ Hz) e H-4' (δ 7,56, *tt*, $J=7,4$; 1,3 Hz). A presença do grupo acetoxi foi definida pelo singlete característico em $\delta=1,95$. A ausência de outros sinais para o terceiro substituinte na estrutura do anel tropânico, indicou a possível presença de uma hidroxila para ocupar esta posição.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.15) apresentou 13 sinais atribuídos a 17 carbonos da estrutura do composto. Destes sinais, cinco (δ 128,5; 129,7; 130,2; 133,2; 166,2) foram atribuídos aos carbonos do grupo benzoiloxi (7 carbonos), o sinal em δ 170,5, referente a uma carbonila e o sinal em δ 21,1, referente a uma metila, evidenciaram a presença de um grupo acetoxi. Um sinal (δ 38,0) referente ao grupo $\text{CH}_3\text{-N}$ e cinco sinais (δ 32,9; 64,1; 65,1; 77,5; 78,0) referentes a sete carbonos, caracterizaram o anel tropânico, sendo que os sinais dos carbonos 1 e 5 e, também, os sinais dos carbonos 2 e 4 apareceram sobrepostos. A atribuição destes sinais foi embasada nas análises de espectros bidimensionais do composto, bem como na comparação com os dados descritos na literatura para um alcaloide tropânico com alguns grupos substituintes similares, isolado por Ribeiro e colaboradores (2013).

O mapa de contornos COSY (Figura 1.16) obtido para este composto confirmou a substituição do anel tropânico nas posições 3, 6 e 7. Isto é verificado pelo acoplamento entre os hidrogênios H-1 e H-5, com os hidrogênios axiais e equatoriais localizados nos carbonos 2 e 4. Não foi verificado acoplamento entre H-6 e H-5 e nem entre H-7 e H-1, indicando que H-6 e H-7, deveriam estar em posição alfa no anel, formado ângulos próximos a 90° com os hidrogênios vizinhos H-5 e H-1, resultando em uma constante de acoplamento com valor baixo que impediu o desdobramento do sinal. Outro acoplamento importante foi verificado entre o hidrogênio H-3 com os hidrogênios axiais H-2 e H-4, confirmando sua posição na estrutura.

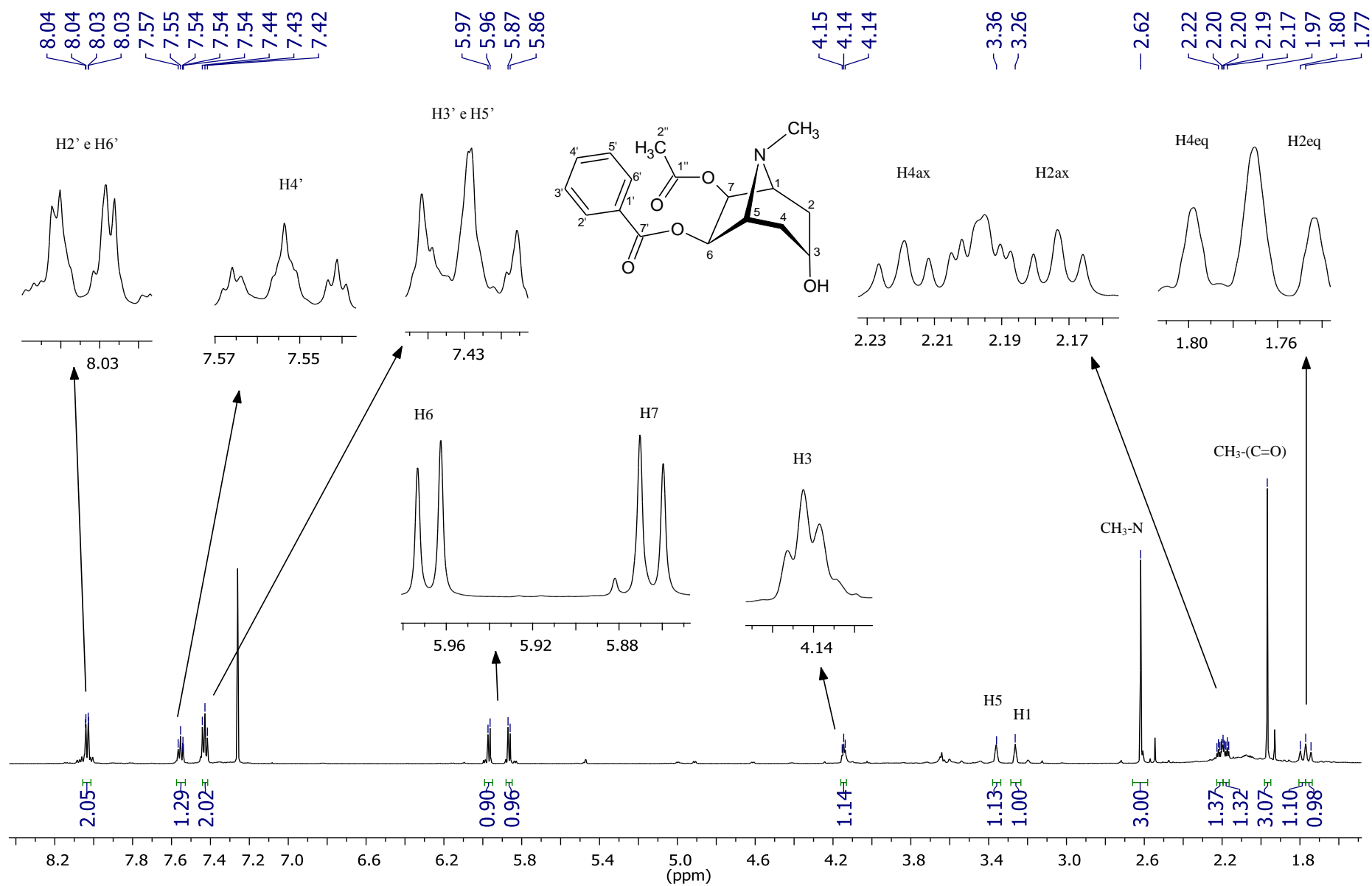


Figura 1.14. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, em CDCl₃) da substância LEM1: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol

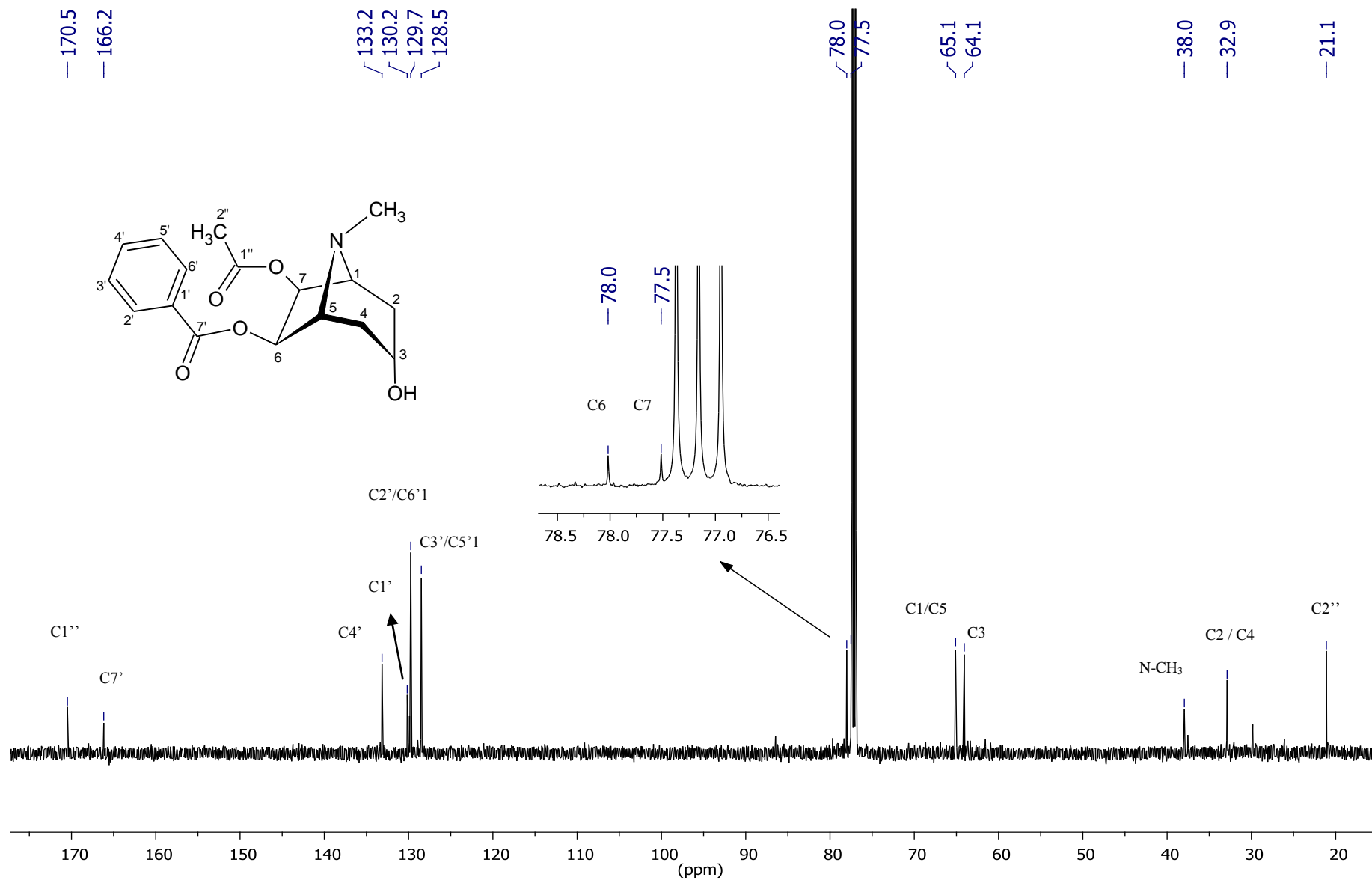


Figura 1.15. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância LEM1: 7β-acetoxi-6β-benzoiloxitropan-3α-ol

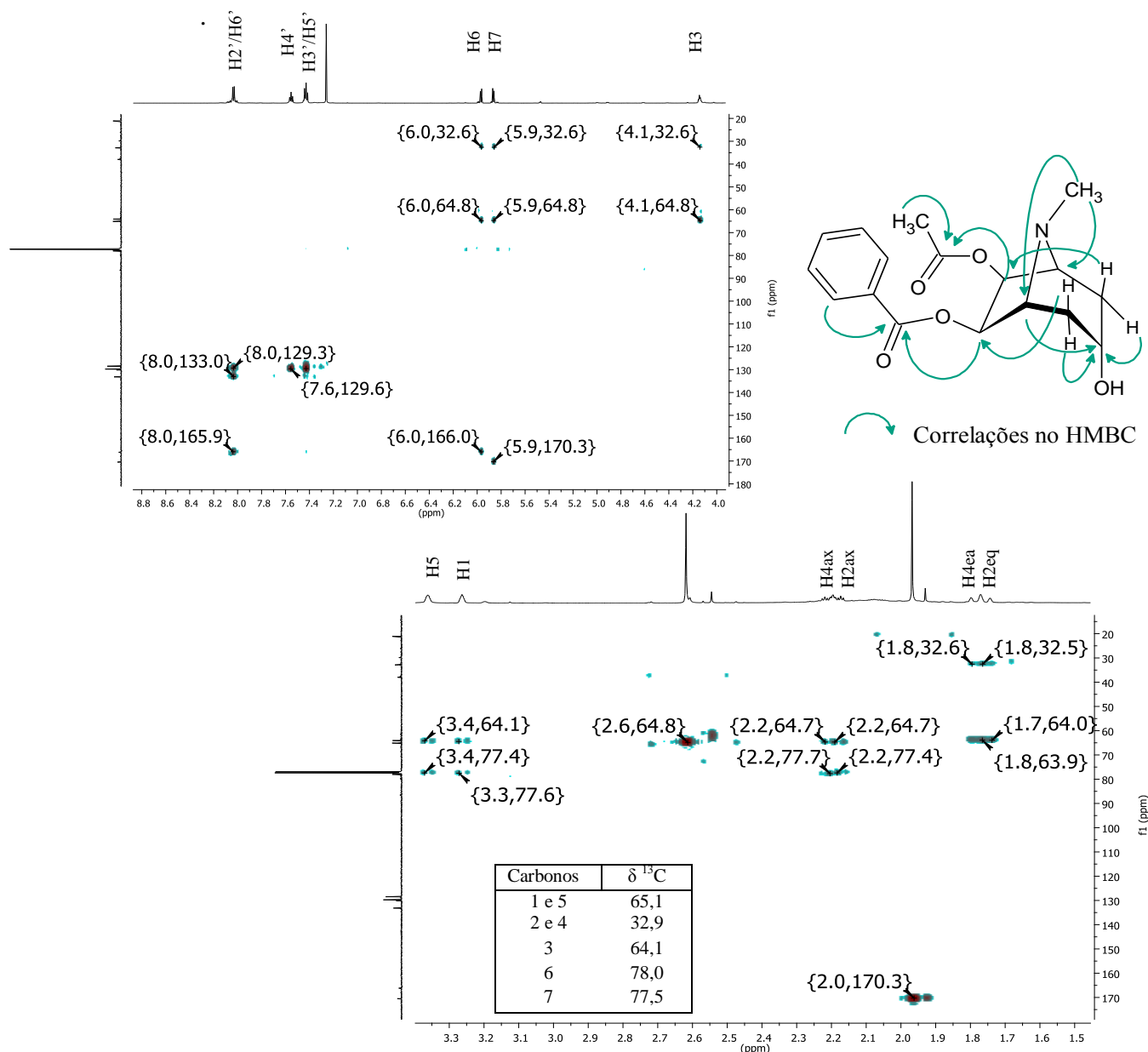


Figura 1.17. Expansões do mapa de contornos HMBC (600 MHz; 150 MHz em CDCl_3) da substância LEM1 e as principais correlações observadas na estrutura do composto

A orientação espacial da hidroxila foi determinada pela análise do NOESY 1D (Figura 1.18). Nos espectros foi verificado nOe entre H-3 com os hidrogênios axiais H-2 e H-4, indicando que este hidrogênio deveria estar em posição beta no anel tropânico, e conseqüentemente, a hidroxila em posição alfa (Figura 1.19). Outro fator que confirma esta estereoquímica é a falta de correlação entre H-3 com H-6 e H-7, que seria esperado no espectro caso este hidrogênio estivesse em posição alfa. Também foi verificado um nOe entre os hidrogênios do grupo $\text{CH}_3\text{-N}$ com os hidrogênios axiais e equatoriais dos carbonos 2 e 4, indicando que este grupo deveria estar voltado para a posição da molécula onde estão localizados estes hidrogênios.

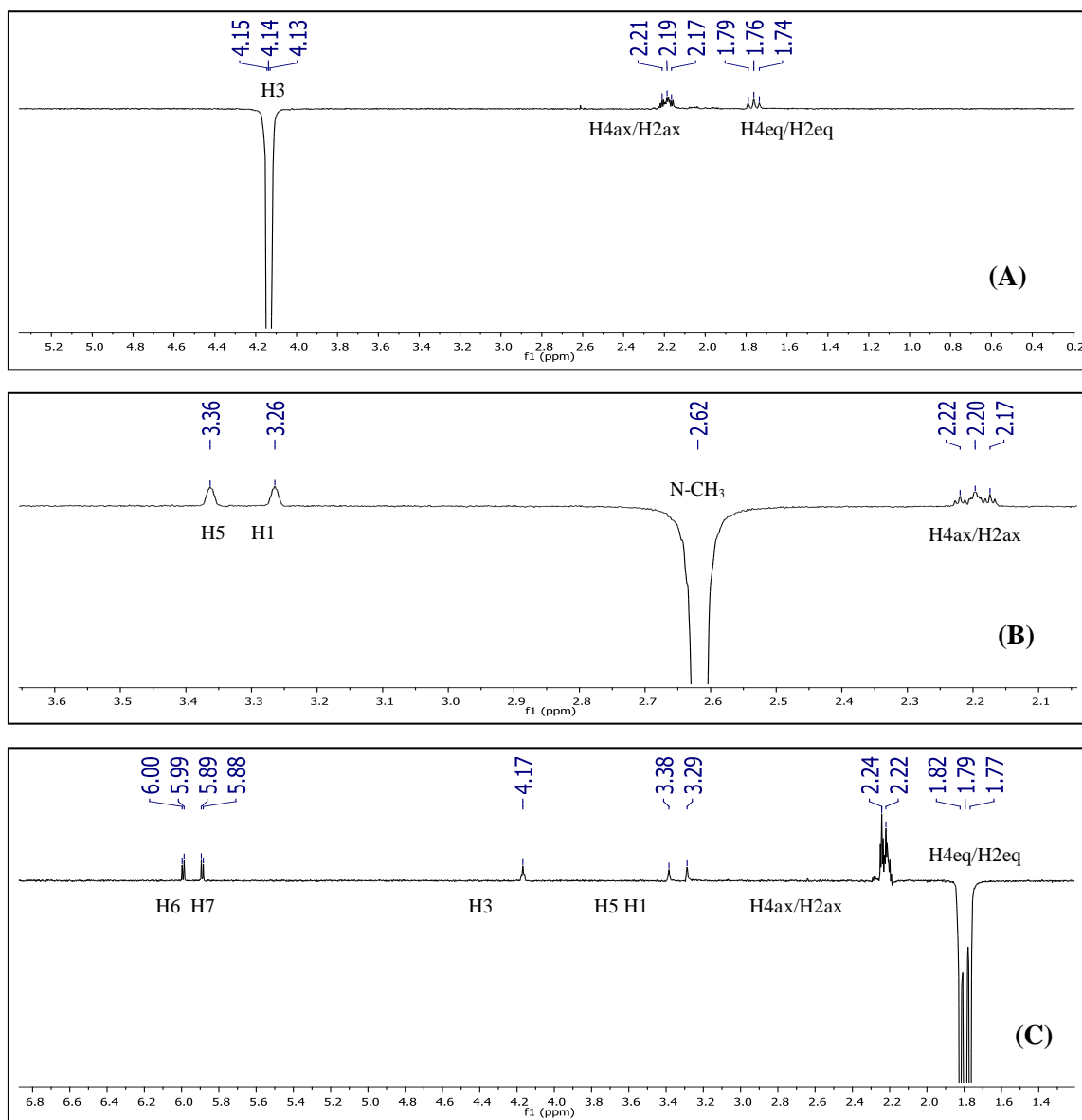


Figura 1.18. Espectros NOESY-1D (em CDCl_3) da substância LEM1. Irradiação em 4,17 ppm (A); Irradiação em 2,64 ppm (B); Irradiação em 1,79 ppm (C)

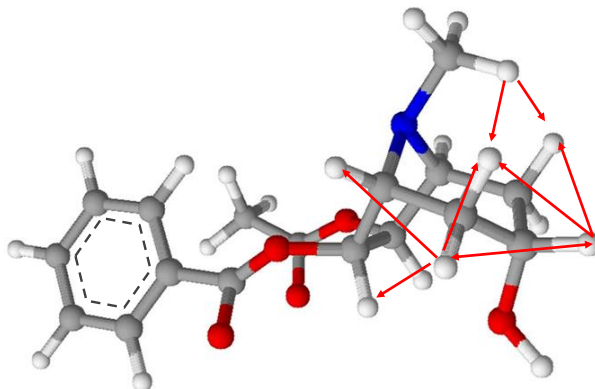


Figura 1.19. Correlações observadas nos espectros de NOESY-1D para o composto LEM1 apresentadas em sua estrutura tridimensional

Com base em toda a análise espectroscópica, cujos principais dados estão descritos na Tabela 1.3, foi confirmado que o composto LEM1 seria, portanto, o 7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol (Figura 1.20), um novo alcaloide tropânico ainda não relatado na literatura. As análises dos espectros de massas por *electrospray* (ESI) e por impacto de elétrons (IE) (Figura 1.21) confirmaram a fórmula molecular C₁₇H₂₁NO₅ atribuída para o composto ($m/z = 319$, por IE; $[M+H]^+ = 320,1494$, por ESI), e os principais picos verificados no espectro estão de acordo com fragmentações sofridas por esta estrutura.

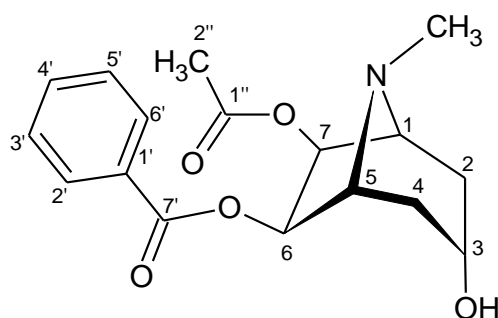


Figura 1.20. Fórmula estrutura da substância LEM1 (7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol)

Tabela 1.3. Dados de RMN de ¹H e de ¹³C 1D e 2D para o composto LEM1. (CDCl₃; 600 e 150 MHz)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi. J/Hz)	NOESY-1D	¹ H, ¹³ C - HMBC	¹ H, ¹ H-COSY
1	65,1	3,26 (<i>sl</i>)		C-3; C7	Hax-(C2); Heq-(C2)
2eq	32,9	1,76 (<i>dl</i> , J = 16,4 Hz)	H-(C3); Hax-(C2); H-(C1); H-(C7)	C-3	Hax-(C2); H-(C1)
4eq	32,9	1,78 (<i>dl</i> , J = 16,4 Hz)	H-(C3); Hax-(C4); H-(C5); H-(C6)	C-3	Hax-(C4); H-(C5)
2ax	32,9	2,18 (<i>m</i>)		C-1; C-7	Heq-(C2); H-(C1); H-(C3)
4ax	32,9	2,21 (<i>m</i>)		C-5; C-C6	Heq-(C4); H-(C5); H-C(3)
3	64,1	4,14 (<i>tap</i> , J=4,7 Hz)	Hax-(C2 e C4); Heq-(C2 e C4)	C-2 e C-4; C-1 e C-5	Hax-(C2); Hax-(C4)
5	65,1	3,36 (<i>sl</i>)		C-3	Hax-(C4); Heq-(C4)
6	78,0	5,97 (<i>d</i> , J = 6,4 Hz)		C-4; C-5; C-7'	H-(C7)
7	77,5	5,86 (<i>d</i> , J = 6,4 Hz)		C-2; C-1; C1''	H-(C6)
1'	130,2	---			---
2' e 6'	129,7	8,03 (<i>dd</i> , J = 8,3; 1,3 Hz)		C-7'; C-4'; C-2' e C-6'	H-(C3' e C6')
3' e 5'	128,5	7,43 (<i>t</i> , J = 7,8 Hz)		C-2' e C-6'	H-(C2' e C6'); H-(C4')
4'	133,2	7,55 (<i>tt</i> , J = 7,4; 1,3 Hz)		C-2' e C-6'	H-(C3' e C6')
7'	166,2	---		---	---
1''	170,5	--		---	---
2''	21,1	1,97 (<i>s</i>)		C-1''	---
N-CH ₃	38,0	2,62 (<i>s</i>)	Hax-(C2 e C4); H- C(1); H-(C5); H- (C2' e 6'); H-(C2'')	C-1 e C-5	---
O-H	---	---	---	---	---

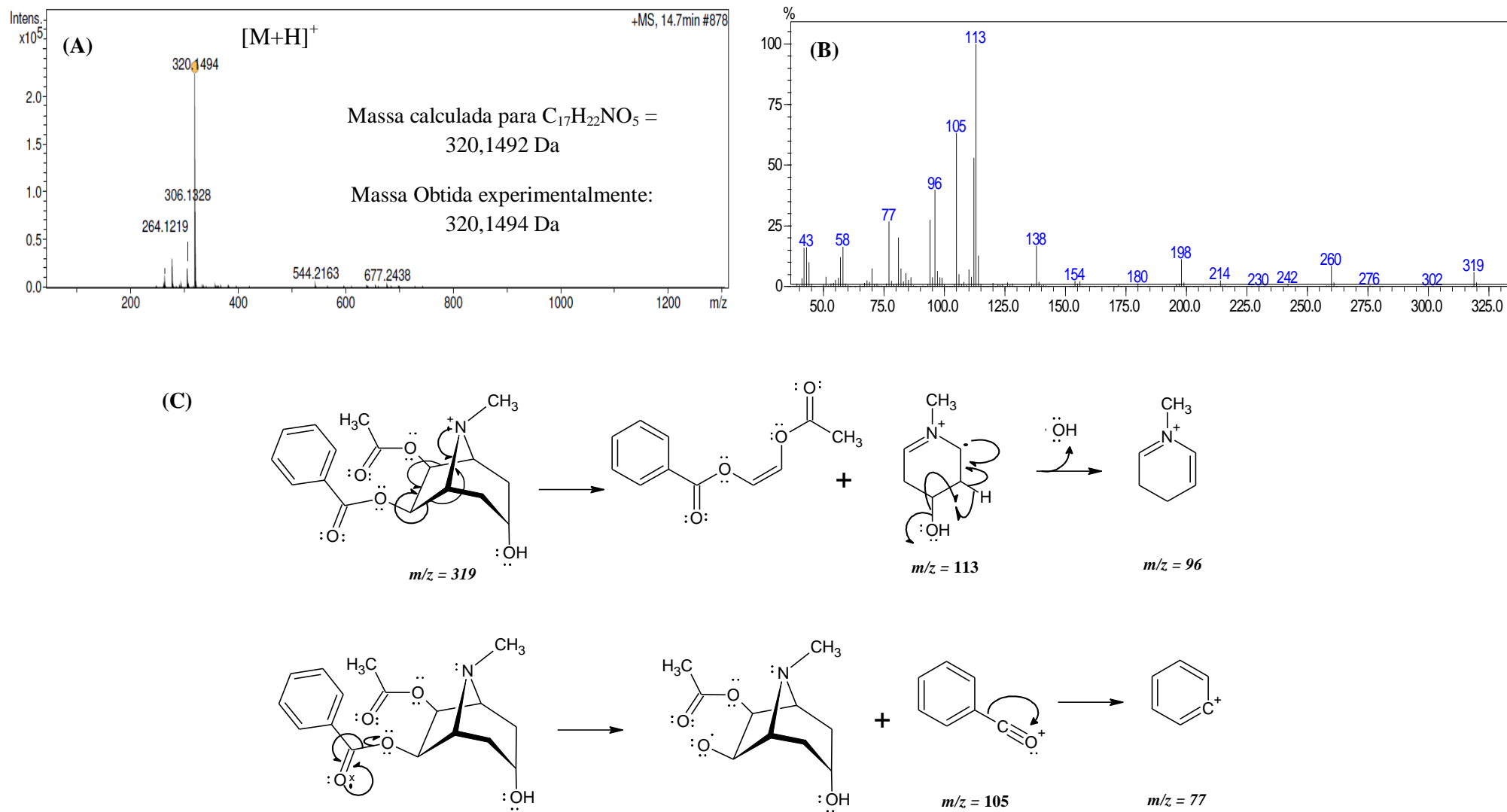


Figura 1.21. Espectros de massas obtidos por ESI (A) e por IE (B). Principais fragmentações do composto LEM1(C)

1.6.1.2 Identificação da substância LEM2: 6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol

A substância LEM2 (133 mg) foi isolada da fração FTA3.1.3 na forma de cristais incolores, solúveis em clorofórmio. A sua temperatura de fusão variou de 170-171 °C, indicando um alto grau de pureza. A análise do composto por CCD revelada com reagente de Dragendorff apresentou resultado positivo, indicando se tratar de um alcaloide.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.22), semelhante ao da amostra LEM1, apresentou sinais característicos de um alcaloide tropânico 3,6,7-*O*-trissubstituído [H-2ax e H-4ax (δ 2,21, *dt*, $J=14,3$; 3,5 Hz), H-2eq e H-4eq (δ 1,94, *d*, $J=14,3$ Hz), H-3 (4,17, *tap*, $J=4,2$ Hz), H-1 e H-5 (3,45, *sl*) e H-6 e H-7 (δ 6,12, *s*)]. Não foi observado nesse espectro desdobramento ou diferença de deslocamento entre os sinais de H-6 e H-7, e nem entre os sinais dos hidrogênios H-1 e H-5, indicando assim, uma simetria no anel tropânico. Esta proposta de simetria foi reforçada pela total sobreposição de sinais de dois grupos benzoiloxi verificada no espectro [sinais δ 7,89 (*d*, $J=7,2$ Hz 4H); δ 7,27 (*t*, $J=7,5$ Hz, 4H); δ 7,47 (*t*, $J=7,5$ Hz, 2H)], indicando portanto que estes dois grupos deveriam estar nas posições 6 e 7 do anel tropânico, gerando uma estrutura simétrica. O terceiro substituinte do anel tropânico foi identificado como sendo o grupo -OH pelo singlete largo em δ 2,24 parcialmente sobreposto pelos sinais dos hidrogênios H-2ax e H-4ax.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.23) apresentou apenas 10 sinais referentes aos 22 átomos de carbono da estrutura, corroborando com a proposta de simetria atribuída para a molécula. Destes sinais, cinco (δ 128,17; 129,61; 129,93; 132,85; 165,84) foram atribuídos aos 14 carbonos dos dois grupos benzoiloxi, quatro sinais (δ 35,18; 66,07; 63,89; 78,56) foram atribuídos aos sete carbonos do anel tropânico simétrico, e o sinal δ 40,07, foi atribuído ao grupo $\text{CH}_3\text{-N}$.

A análise do mapa de contornos COSY obtido para o composto LEM2 (Figura 1.24) permitiu confirmar a posição do hidrogênio H-3 que acopla apenas com os hidrogênios axiais e equatoriais localizados nas posições 2 e 4, os quais, por sua vez, apresentaram acoplamento com H-1 e H-5. Não foi verificado no COSY acoplamento significativo entre H-6/H-7, com H-1/H-5, confirmando assim que os grupos benzoiloxi estariam em posição exo do anel tropânico, uma vez que nesta conformação, as ligações de H-6 e H-7 formam ângulos próximos à 90° com H-5 e H-1.

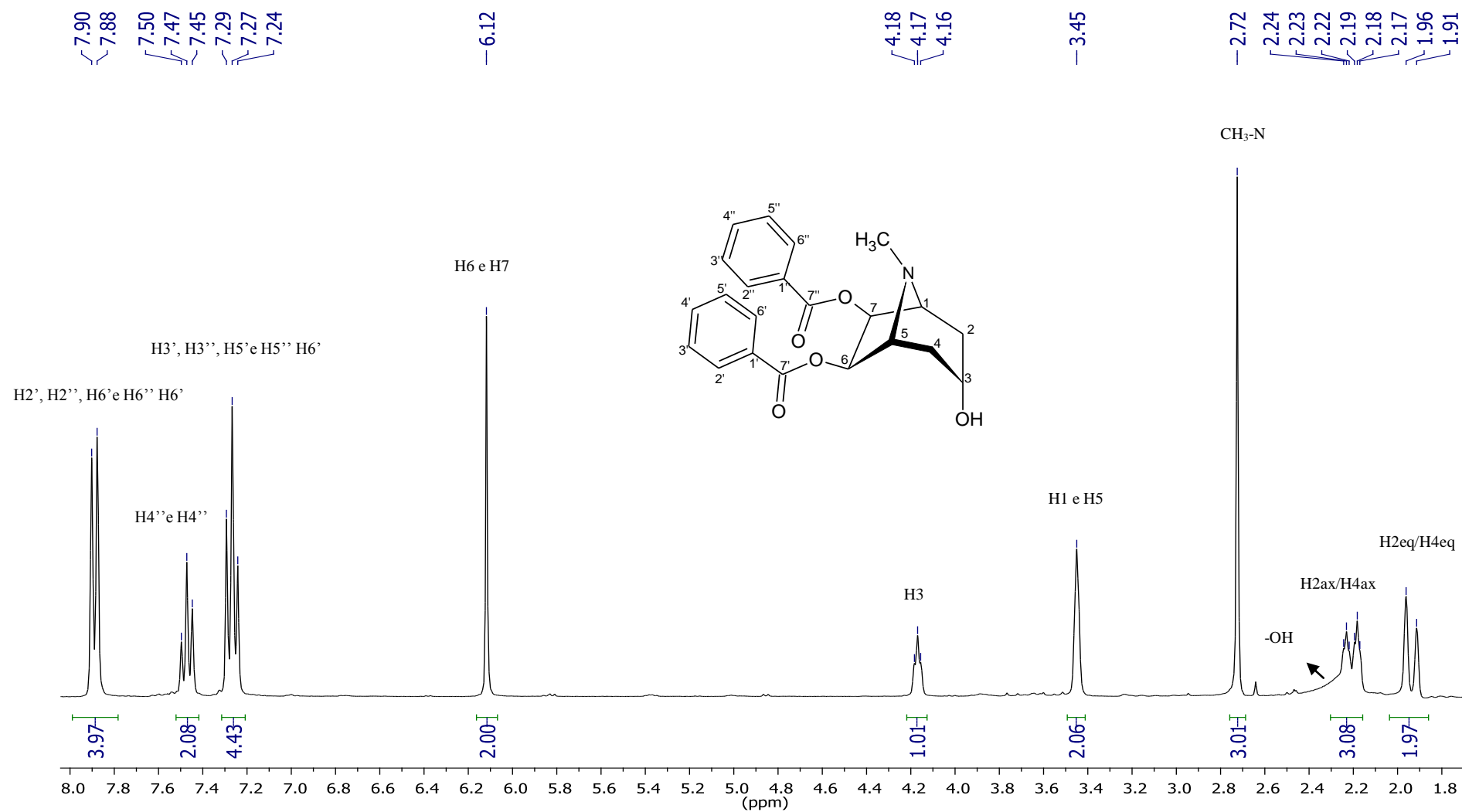


Figura 1.22. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, em CDCl₃) da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol

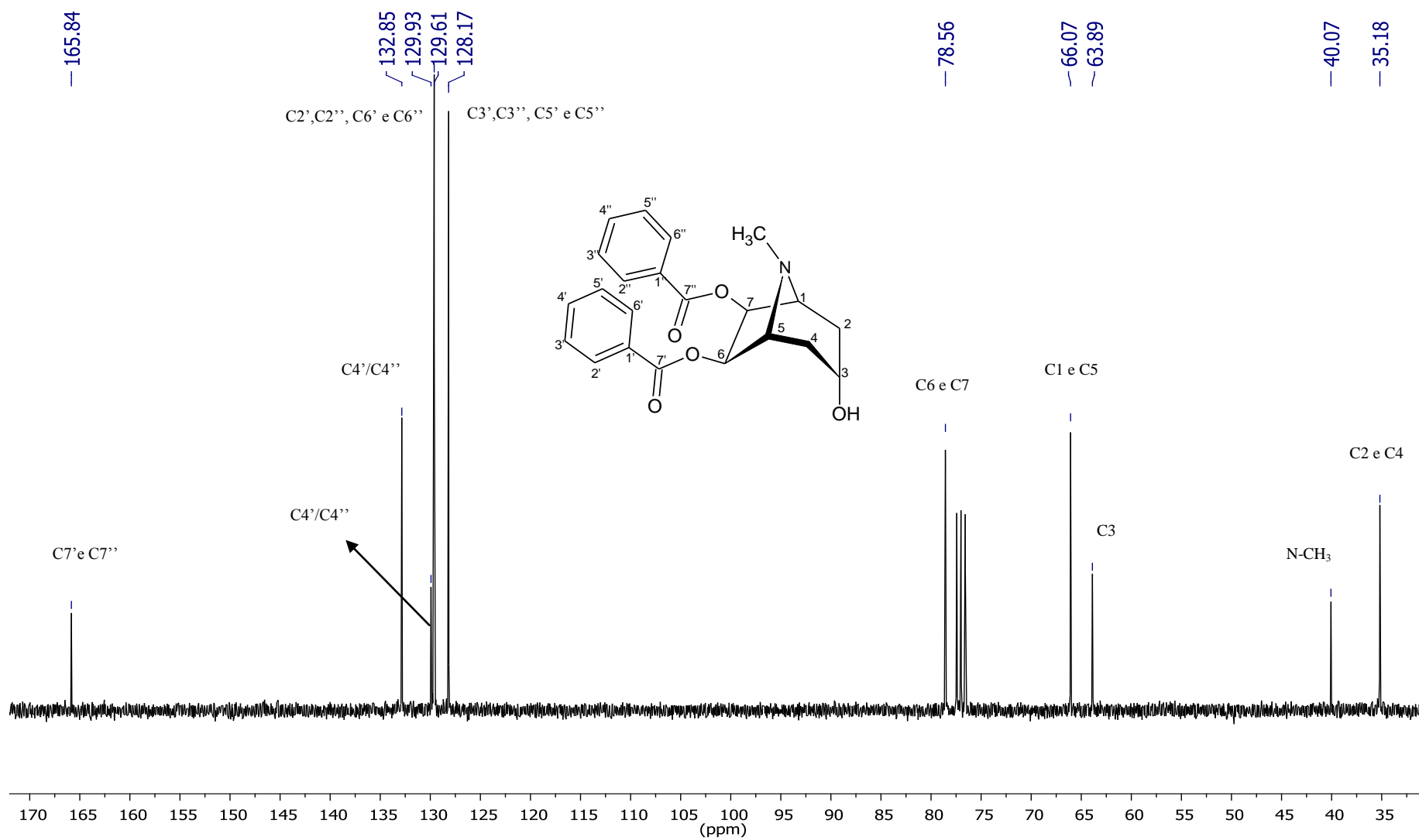


Figura 1.23. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM2: 6β,7β-dibenzoiloxitropan-3α-ol

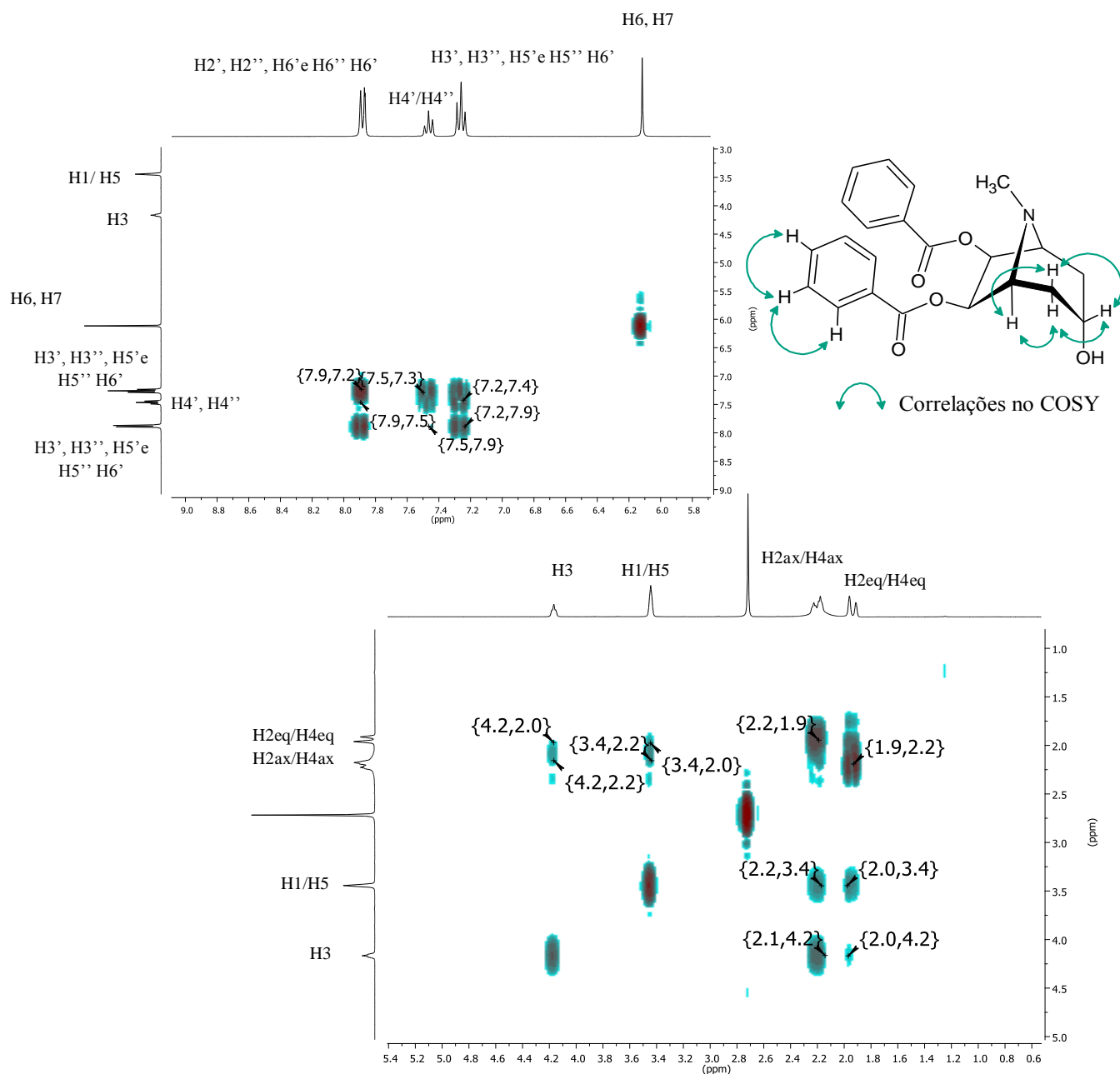


Figura 1.24. Expansões do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl_3) da substância LEM2 e as principais correlações observadas na estrutura do composto $6\beta, 7\beta$ -dibenzoiloxitropan- 3α -ol

A análise por espectrometria de massas (IE) apresentou um pico do íon molecular com valor de $m/z = 381$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ estabelecida para o composto LEM2. Os principais fragmentos observados no espectro (Figura 1.25) também estão de acordo com a proposta de estrutura desta substância.

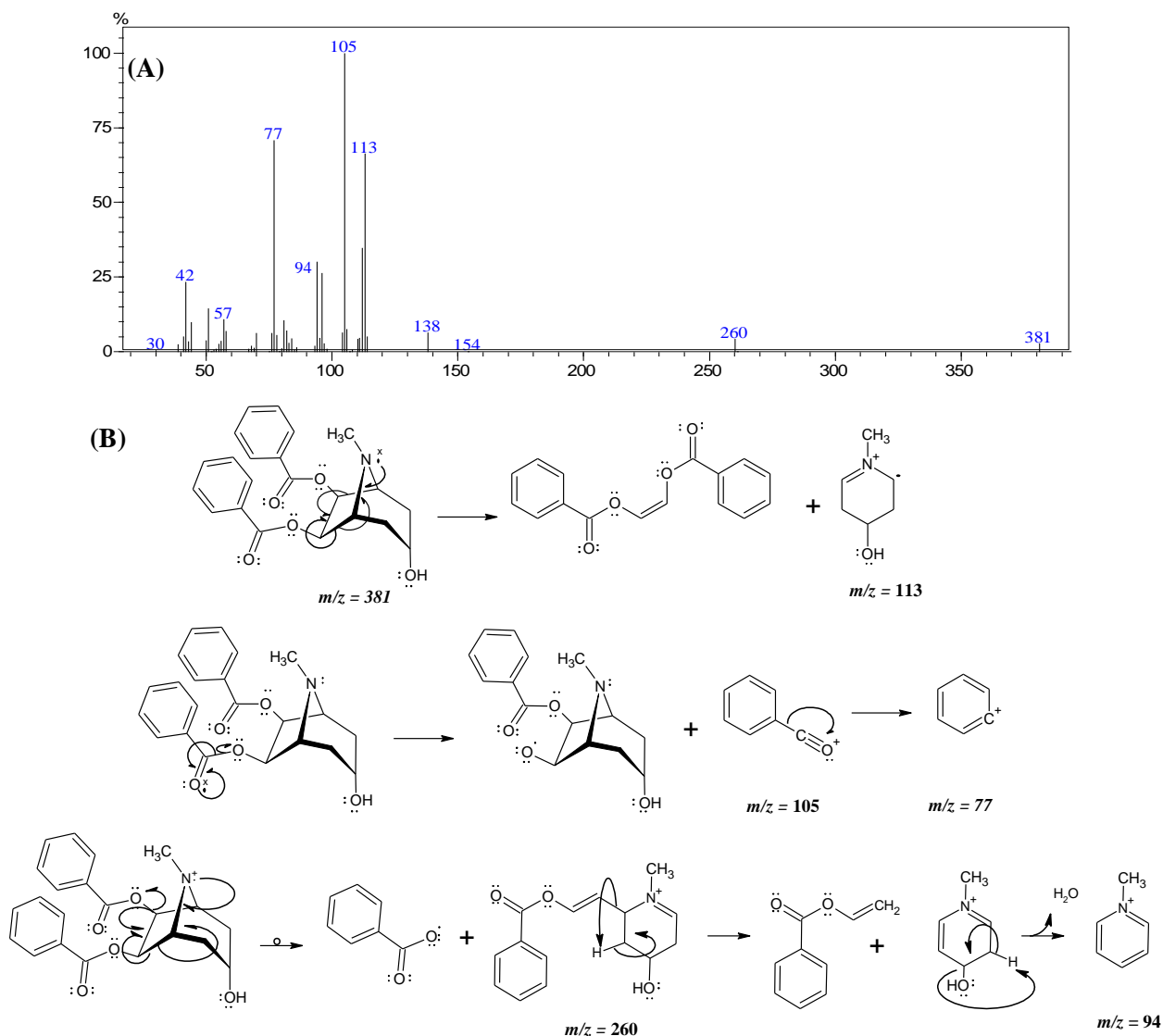


Figura 1.25. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM2 e (B) principais mecanismos de fragmentação para o composto $6\beta,7\beta$ -dibenzoiloxitropan-3 α -ol

A cristalografia de raios-X foi utilizada para determinar, de forma inequívoca, o arranjo espacial dos grupos substituintes no anel tropânico do composto LEM2 (Figura 1.26).

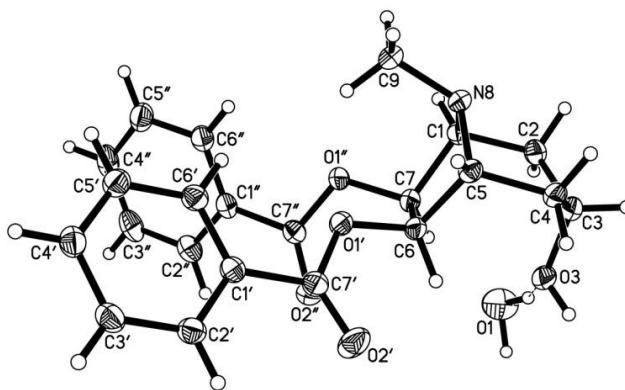


Figura 1.26. Análise por cristalografia de raios-X da substância LEM2: $6\beta,7\beta$ -dibenzoiloxitropan-3 α -ol

Com base nesta análise é possível afirmar com segurança que o composto se trata do alcaloide 6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol (Figura 1.27).

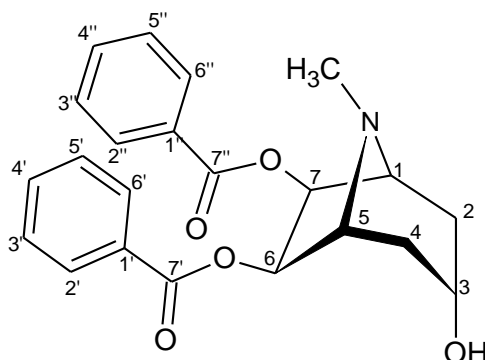


Figura 1.27. Fórmula estrutural da substância LEM2 (6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol)

Este composto foi relatado pela primeira vez na literatura em 2016, em um estudo das folhas de *E. subsessile* (CRUZ et al., 2016), contudo alguns dos dados de RMN de ^1H apresentados pelos autores se diferenciaram significativamente dos que foram obtidos em nosso estudo (Tabela 1.4). Foi verificado que os sinais de hidrogênios do anel tropanico, principalmente dos hidrogênios H-1 e H-5 e do grupo $\text{CH}_3\text{-N}$, que são hidrogênios próximos ao nitrogênio, apresentam deslocamento químico acima do que normalmente é obtido para estes alcaloides.

Tabela 1.4. Comparação dos deslocamentos dos sinais de hidrogênios (ppm) do composto LEM2 (CDCl_3 , 300 MHz) com os que são descritos na literatura para o 6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol. Destaque para os sinais que mais se diferenciam

Posição/Grupo	LEM2	6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano ¹
1 e 5	3,45	4,39
2eq e 4eq	1,94	2,39
2ax e 4ax	2,21	2,49
3	4,17	4,17
6 e 7	6,12	6,44
2', 2'', 6' e 6''	7,89	7,85
3', 3'', 5' e 5''	7,27	7,34
4' e 4''	7,47	7,57
-OH	2,24	---
N-CH ₃	2,72	3,34

¹ isolado de *Erythroxylum subsessile* (CRUZ et al., 2016)

Analisando a metodologia empregada na separação deste composto no estudo de *E. subsessile*, (“cromatografia contra-corrente em refinamento de zonas de pH”) verifica-se que a purificação foi realizada utilizando-se HCl como eluente cromatográfico, que por certo protonou este alcaloide e, conseqüentemente, ele foi isolado na forma do sal correspondente. Esta hipótese pode ser confirmada quando se compara os dados de RMN

de ^1H do anel tropânico do alcaloide 6 β ,7 β -dibenzoyloxytropan-3 α -ol (na forma do hidrocloreto) isolado de *E. subsessile* com os que são apresentados por Oliveira e colaboradores (2011) para o hidrocloreto do alcaloide 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano, que também apresenta valores de deslocamento químicos relativamente altos (quase 1 ppm mais altos) para os hidrogênios H-1, H-5 e CH₃-N, quando comparados a alcaloides tropânicos desprotonados. Desta forma, além da confirmação estrutural por cristalografia de Raio-X inédita para o composto LEM2, este trabalho apresenta pela primeira vez dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tabela 1.5) para este composto desprotonado.

Tabela 1.5. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl₃; 300 e 75 MHz) e COSY para o composto LEM2

Posição/Grupo	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi. J/Hz)	$^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$
1 e 5	66,07	3,45 (<i>sl</i>)	Heq-C(2 e 4) / Hax-C(2 e 4)
2eq e 4eq	35,18	1,94 (<i>dl</i> , $J=14,3$ Hz)	Hax-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(3)
2ax e 4ax	35,18	2,21 (<i>dt</i> , $J=14,3$ e $3,5$ Hz)	Heq-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(3)
3	63,89	4,17 (<i>tl</i> , $J=4,2$ Hz)	Heq-C(2 e 4) / Hax-C(2 e 4)
6 e 7	78,56	6,12 (<i>s</i>)	---
1' e 1''	129,93	---	---
2', 2'', 6' e 6''	129,61	7,89 (<i>d</i> , $J=7,2$ Hz)	H-C(3', 3'', 5' e 5'')
3', 3'', 5' e 5''	128,17	7,27 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	H-C(2', 2'', 6' e 6'') / H-C(4' e 4'')
4' e 4''	132,85	7,47 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	H-C(3', 3'', 5' e 5'')
7' e 7''	165,84	---	---
N-CH ₃	40,07	2,72 (<i>s</i>)	---
O-H	---	2,24 (<i>sl</i>)	---

1.6.1.3 Identificação da substância LEM3: 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol

A substância LEM3 (154 mg) foi isolada da fração FTA3.2.4 na forma de cristais amarelados com temperatura de fusão na faixa de 119–123 °C. A análise por CCD também apresentou resultado positivo quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando se tratar de um alcaloide.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.28) obtido para esta amostra apresentou um padrão de sinais de alcaloide tropânico simétrico similar ao que foi apresentado pelo composto LEM2, indicando um mesmo padrão de substituição (3,6,7-*O*-trissubstituído simétrico). Estes sinais correspondem aos hidrogênios H-2ax/H-4ax (δ 2,24, *dt*), H-2eq/H-4eq (δ 1,68, *d*, $J=16,0$ Hz), H-3 (4,91, *tap*, $J=5,4$ Hz), H-1/H-5 (3,27, *sl*), e, H-6/H-7 (δ 4,19, *s*). Os sinais em δ 7,29 (*m*, 5H) e δ 3,62 (*s*, 2H) permitiram identificar que um dos substituintes do anel tropânico se tratava do grupo fenilacetoxi, comum em estruturas de alcaloides tropânicos (OLIVEIRA et al., 2010).

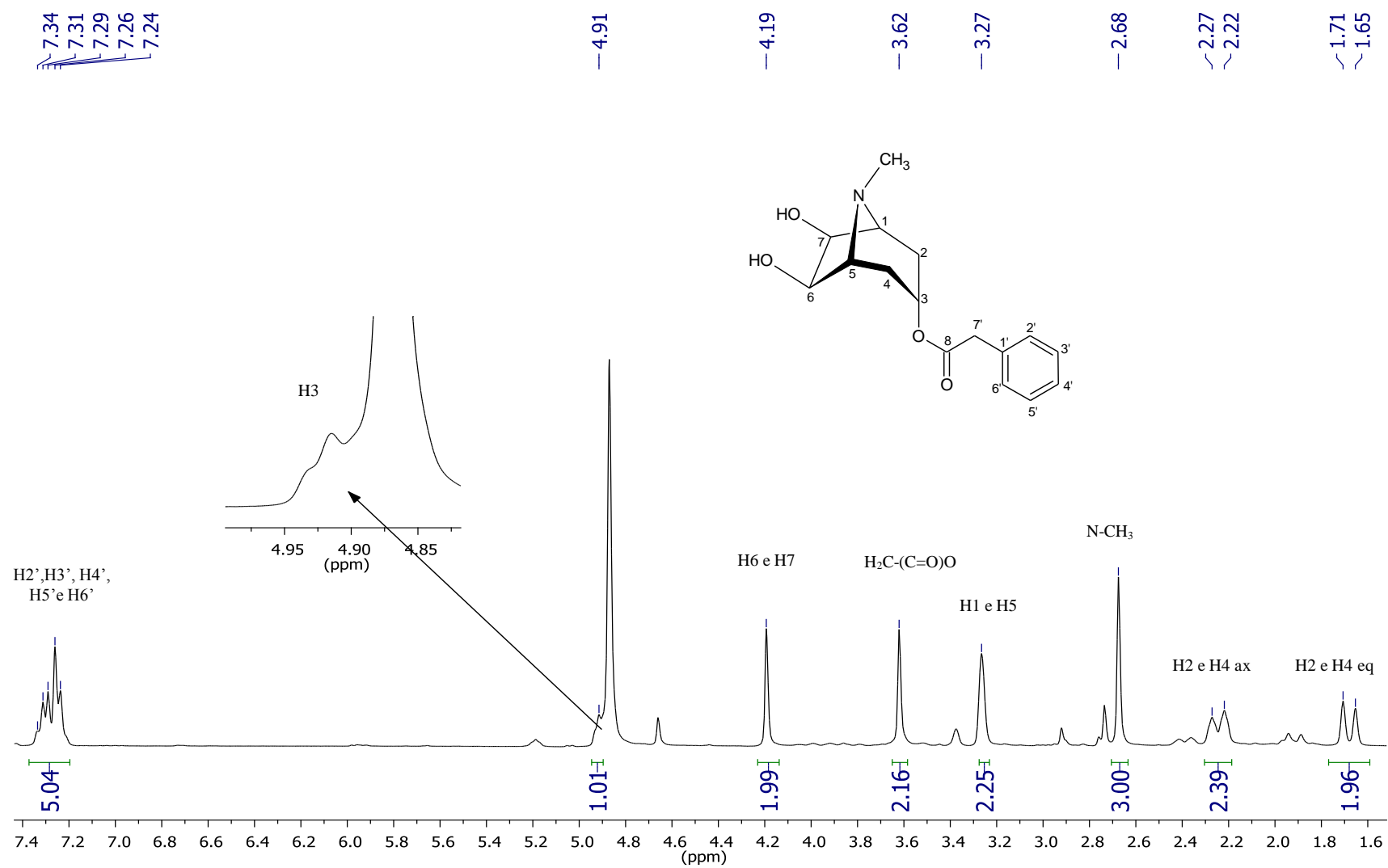


Figura 1.28. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CD_3OD) da substância LEM3: 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol

A ausência de qualquer outro sinal referente aos dois outros grupos substituintes do anel, em conjunto com o valor de deslocamento químico dos sinais de C6-H/C7-H, permitiu concluir que os outros dois grupos substituintes seriam, portanto, duas hidroxilas. As hidroxilas propostas deveriam estar em orientação *exo*, devido ao padrão de multiplicidade dos hidrogênios desta posição.

O mapa de contornos HSQC (Figura 1.29) auxiliou a estabelecer a correta correlação destes sinais de hidrogênio com os sinais do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.30), o qual apresentou 11 sinais referentes aos 16 carbonos da estrutura sugerida para o composto. Seis desses sinais (δ 171,81; 135,33; 130,35; 129,75; 128,32; 42,56) foram atribuídos aos oito carbonos do grupo fenilacetoxi, quatro sinais (δ 30,21; 67,17; 69,11; 74,22) atribuídos aos carbonos do anel tropânico, e o sinal em δ 37,67 foi atribuído ao grupo N-CH₃.

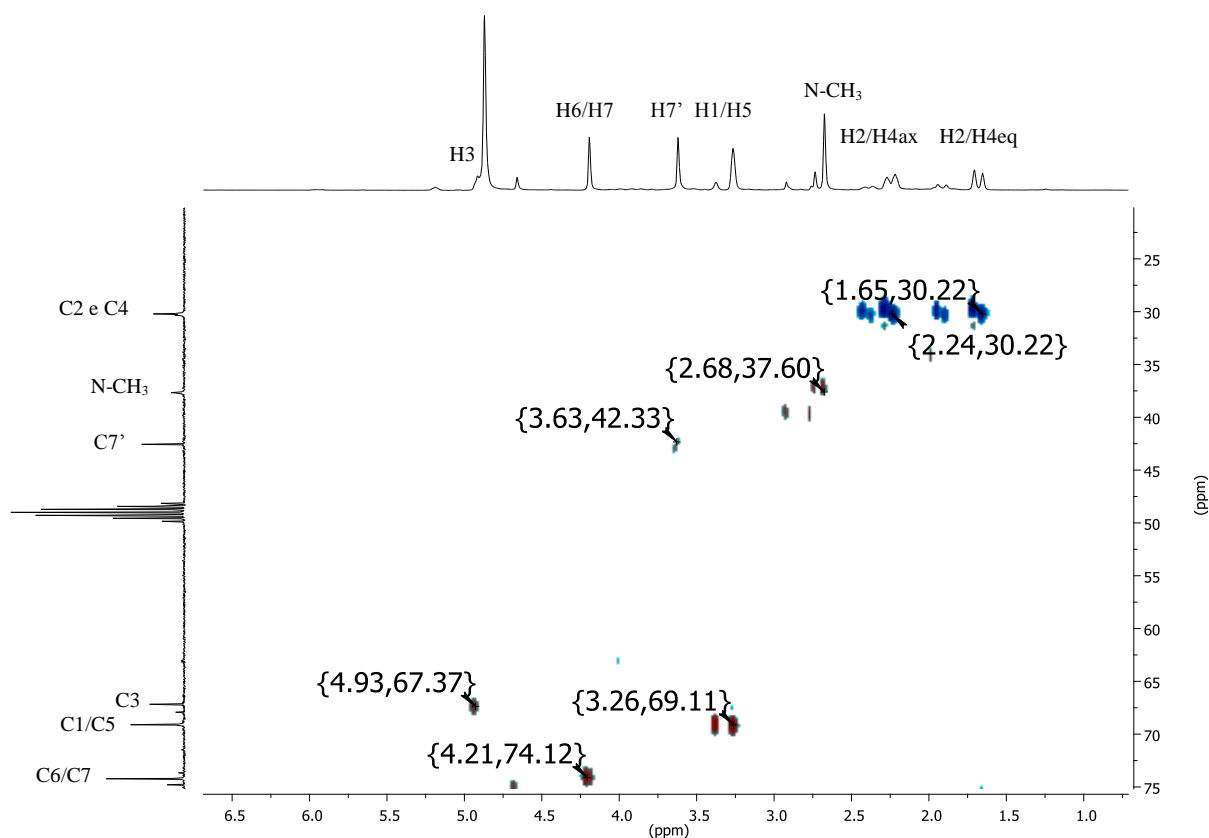


Figura 1.29. Expansão do mapa de contornos HSQC (300 MHz, 75 MHz; CD₃OD) da substância LEM3

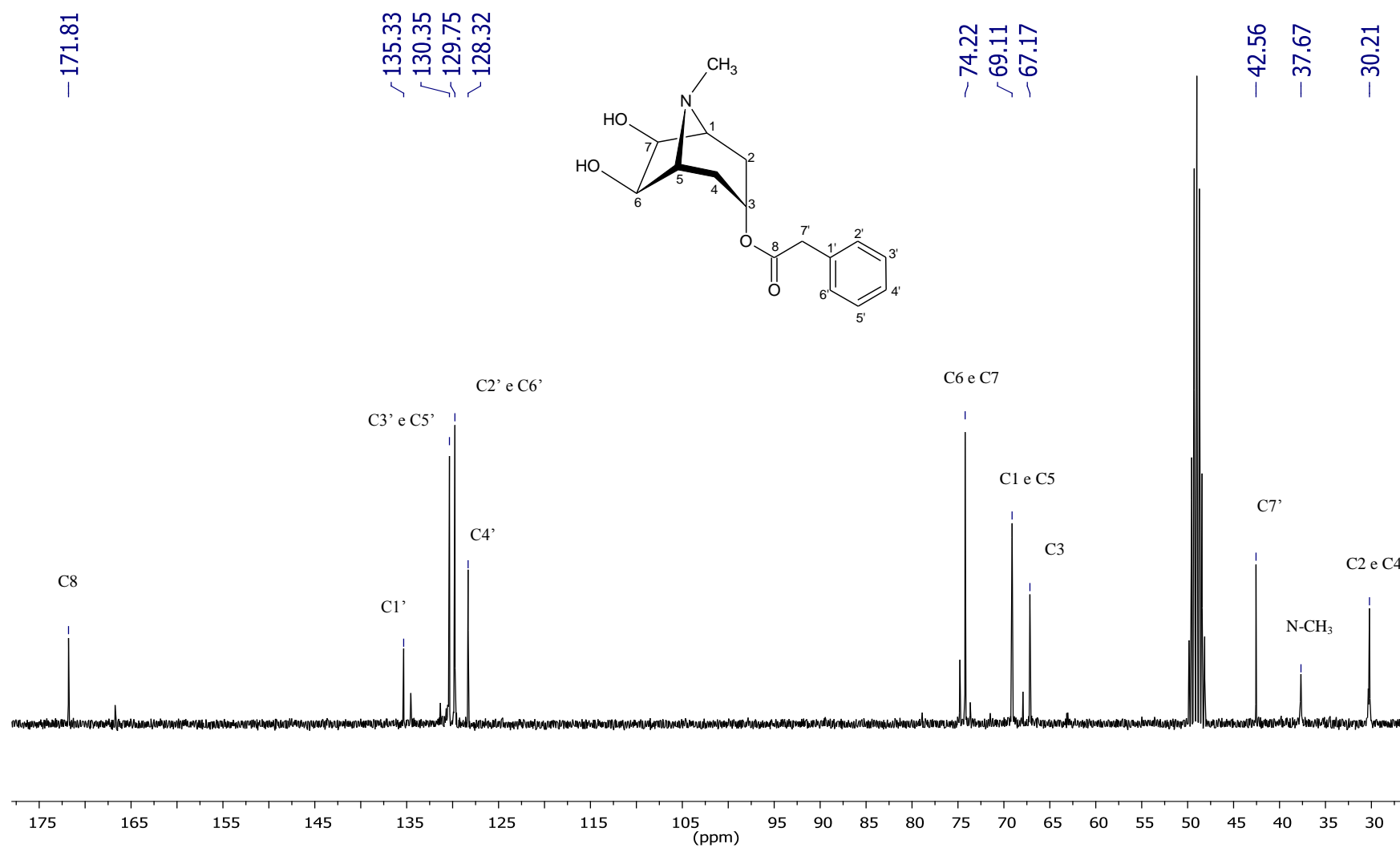


Figura 1.30. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CD_3OD) da substância LEM3: 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol

Com base na análise dos resultados obtidos estabeleceu-se a proposta de estrutura apresentada na Figura 1.31 para a substância LEM3. Ao comparar os dados de RMN obtidos para este composto com os que são descritos na literatura para o alcaloide 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol (Tabela 1.6) verifica-se grande similaridade nos valores de deslocamentos químicos, confirmando assim a proposta de estrutura estabelecida.

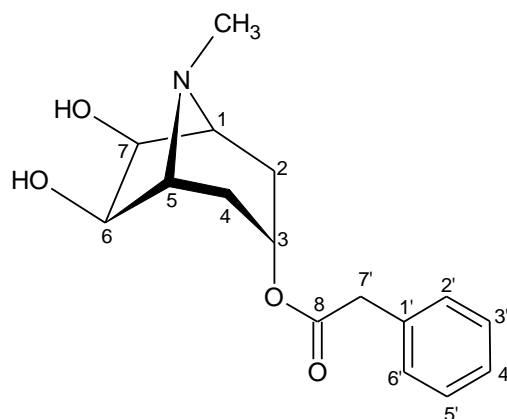


Figura 1.31. Fórmula estrutural da substância LEM3 (3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol)

Tabela 1.6. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM3 (CD_3OD , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Al-Said *et al.* (1986) para o 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol

Posição/Grupo	LEM3		3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol*
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)
1 e 5	69,11	3,27 (s)	3,28 (s)
2eq e 4eq	30,21	1,68 (d, J=16 Hz)	1,65 (m)
2ax e 4ax	30,21	2,24 (m)	2,3 (m)
3	67,17	4,91 (tap, J = 5,4)	5,01 (t, J = 4,9 Hz)
6 e 7	74,22	4,19 (s)	4,1 (s)
1'	135,33	---	---
2' e 6'	129,75	7,24–7,34 (m)	7,24–7,43 (m)
3' e 5'	130,35		
4'	128,32		
7'	42,56	3,62 (s)	3,62 (s)
8	171,81	---	---
N-CH ₃	37,36	2,68 (s)	2,65 (s)

*Apenas foram encontrados dados de RMN de ^1H para este composto

O espectro de massas (IE) obtido para o composto LEM3 (Figura 1.32) apresentou o pico do íon molecular com valor $m/z = 291$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ estabelecida para este composto. O pico base apresentado no espectro também está de acordo com a fragmentação da estrutura do alcaloide 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol, confirmando a estrutura.

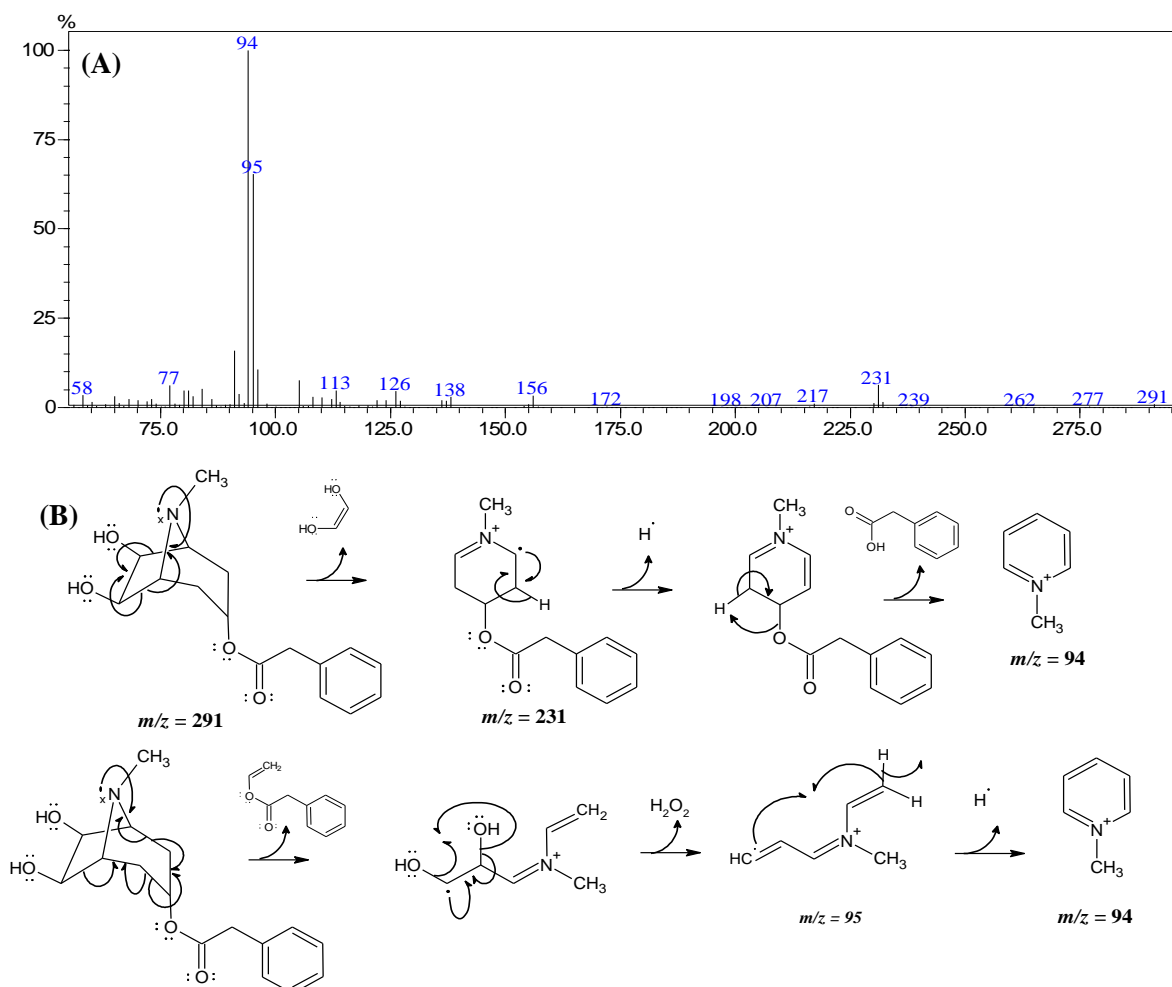


Figura 1.32. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM3 e (B) seus principais mecanismos de fragmentação

1.6.1.4 Identificação da substância LEM4: 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol

A substância LEM4 (13 mg) foi isolada da fração metanólica dos galhos de *E. macrocalyx* na forma de cristais castanhos, solúveis em clorofórmio, com temperatura de fusão na faixa de 116–122 °C. A análise por CCD, usando o reagente de Dragendorff, apresentou resultado positivo, indicando se tratar de um alcaloide.

No espectro de RMN de ^1H obtido para este composto (Figura 1.33) novamente foi verificada a presença de sinais [H-2ax/H-4ax (δ 2,29, *dt*, $J=15,8$; 5,1 Hz), H-2eq/H-4eq (δ 1,66, *d*, $J=15,8$ Hz), H-3 (5,25, *tap*, $J=4,6$ Hz), H-1/H-5 (3,11, *sl*) e H-6/H-7 (δ 4,56, *s*)] correspondentes a um alcaloide tropanico substituído nas posições 3, 6 e 7. Assim como nos espectros das substâncias LEM2 e LEM3, foi verificado um padrão de multiplicidade dos sinais H-1/H-5 (singleto) e H-6/H-7 (singleto) condizentes com a estrutura de um anel tropanico simétrico.

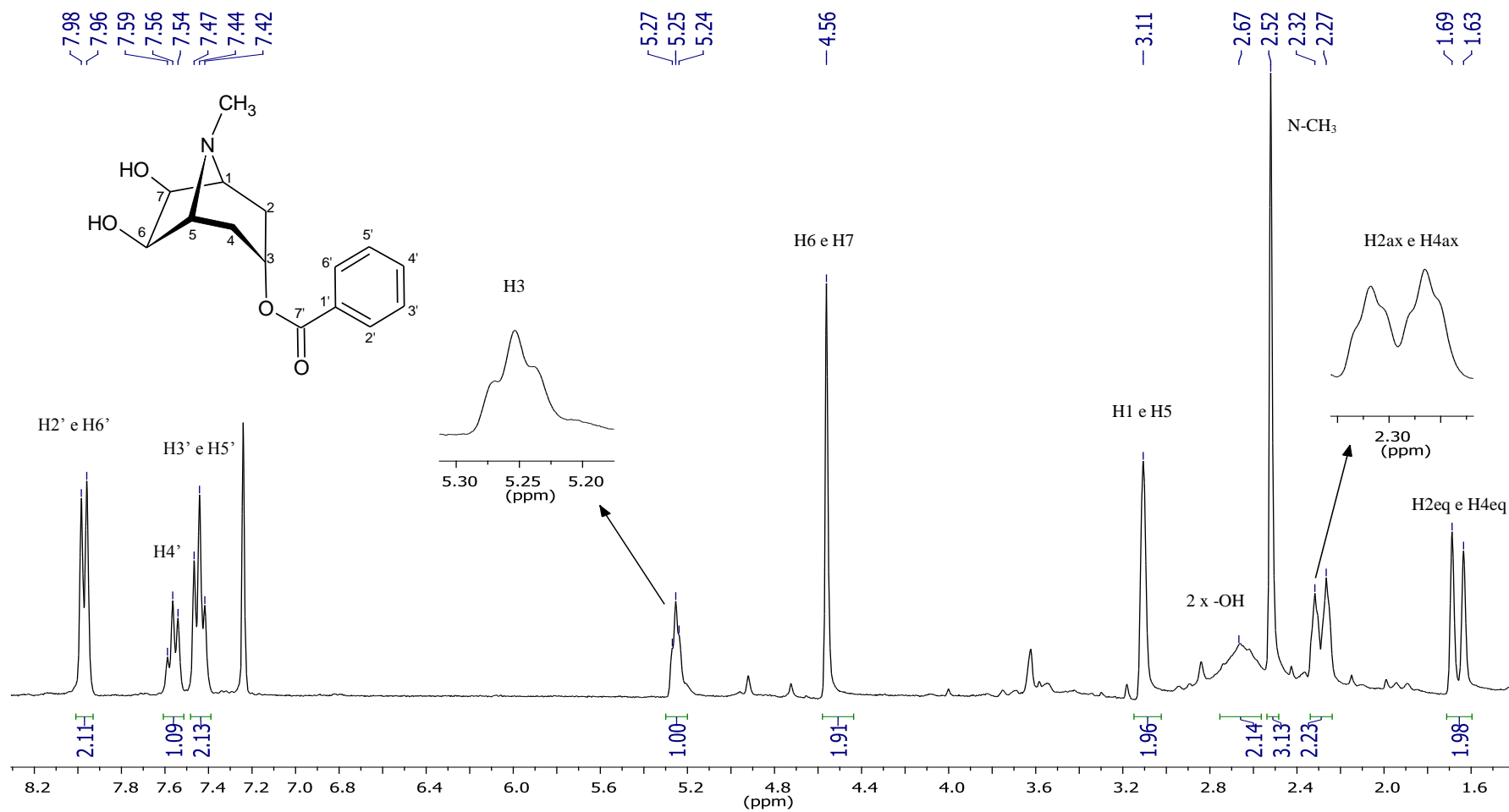


Figura 1.33. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM4: 3 α -benzoyloxitropano-6 β ,7 β -diol

O grupo benzoiloxi foi identificado como um dos substituintes do anel tropânico a partir dos sinais de seu anel aromático monossustituído com multiplicidade e deslocamento químico característicos [δ 7,97 (*d*, $J=7,5$ Hz 2H); δ 7,56 (*t*, $J=7,5$ Hz 1H); δ 7,44 (*t*, $J=7,5$ Hz 2H)]. O singlete largo em δ 2,69, integrando para dois hidrogênios, evidenciou a presença de duas hidroxilas na estrutura do composto que, pela simetria da molécula e multiplicidade dos sinais de H-6 e H-7, deveria estar nas posições 6 e 7 do anel tropânico em orientação *exo*, assim como foi descrito para o composto LEM3. A orientação espacial β do hidrogênio H-3 foi determinada pela multiplicidade e constante de acoplamento de seu sinal (*tap*, $J = 4,6$ Hz), similar aos valores obtidos para o hidrogênio H β -3 na substância LEM2 (*tap*, $J = 4,2$ Hz). A correlação direta entre todos esses sinais de hidrogênio com os carbonos da estrutura do composto foi feita a partir dados de HSQC (Figura 1.34).

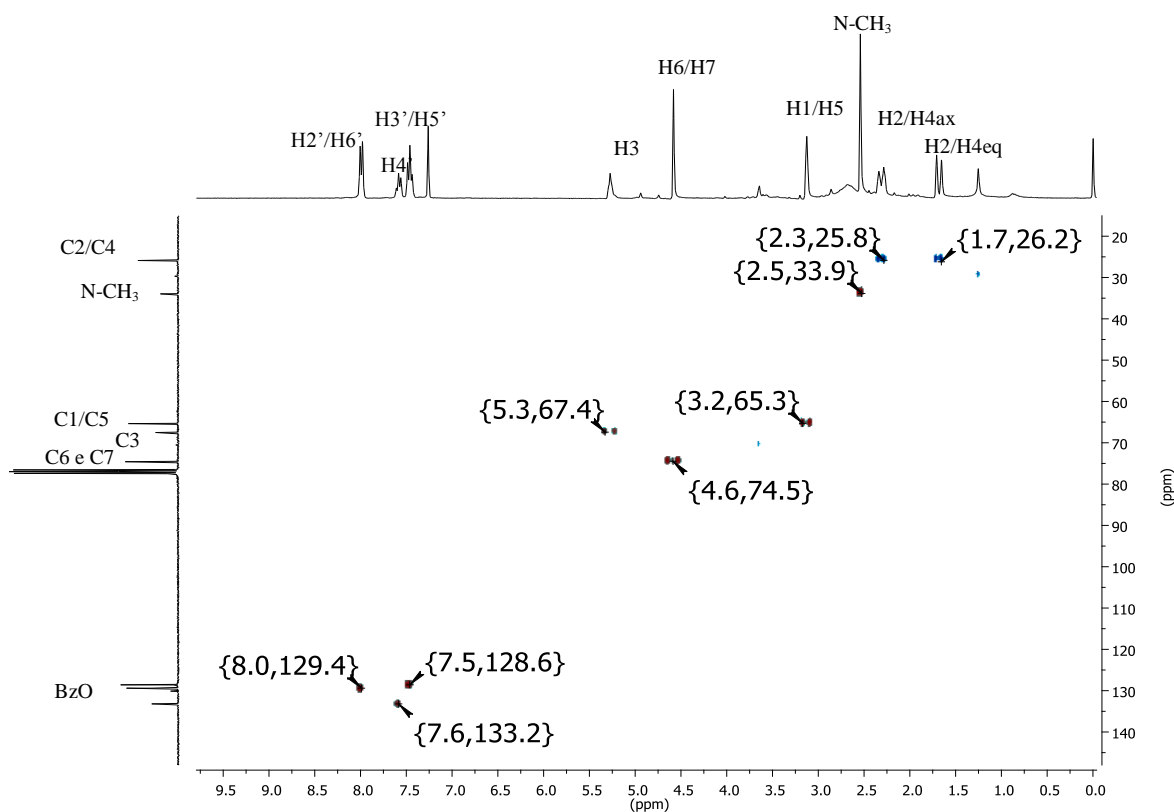


Figura 1.34. Expansão do mapa de contornos HSQC (300 MHz, 75 MHz; CDCl_3) da substância LEM4

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.35) apresentou 10 sinais atribuídos a 15 carbonos da estrutura da substância. Destes sinais, cinco (δ 165,57; 133,20; 130,13; 129,40; 128,59) foram atribuídos aos carbonos do grupo benzoiloxi e quatro sinais (δ 74,58; 67,52; 65,36; 25,89) foram atribuídos aos carbonos do anel tropânico, cujas sobreposições dos sinais C1/C5, C2/C4, e C6/C7 confirmaram a simetria da molécula. O sinal em δ 33,96 foi atribuído ao grupo $\text{CH}_3\text{-N}$.

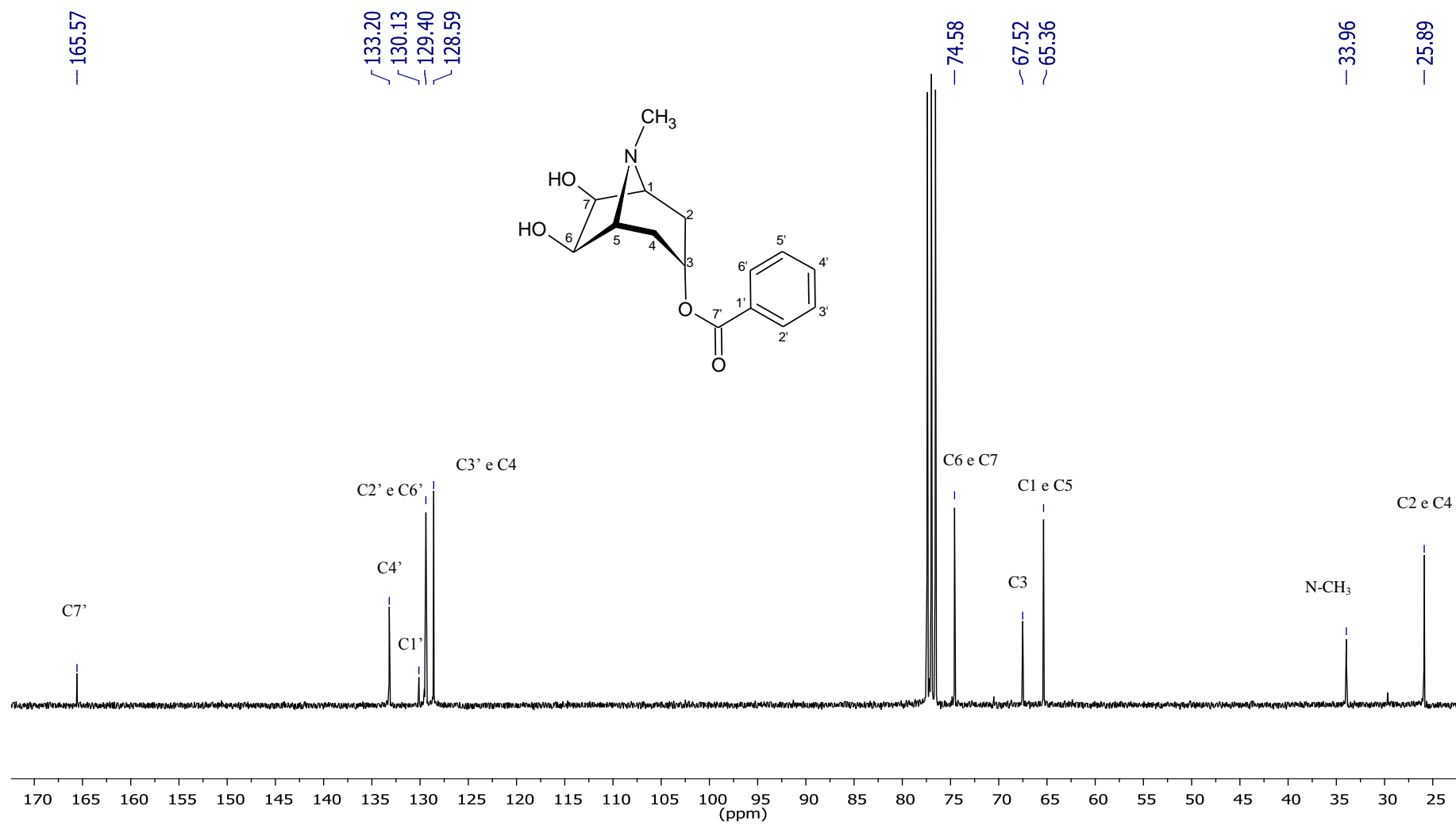


Figura 1.35. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM4: 3- α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol

A partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi definido que o composto LEM4 se tratava do alcaloide 3α -benzoiloxitropano- $6\beta,7\beta$ -diol (Figura 1.36), um alcaloide tropânico que foi primeiramente isolado das raízes de *E. australe* (GRIFFIN, 1978).

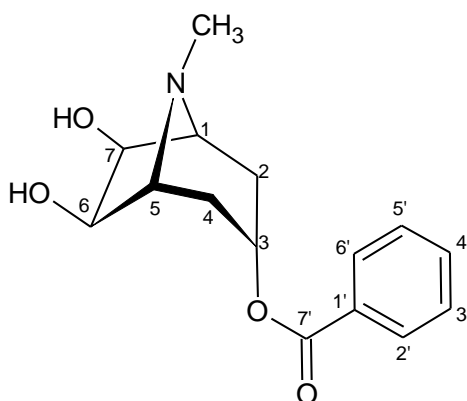


Figura 1.36. Fórmula estrutural da substância LEM4 (3α -benzoiloxitropano- $6\beta,7\beta$ -diol).

Ao comparar os sinais do composto LEM4 com os descritos por Griffin e colaboradores (1978) para este alcaloide (Tabela 1.7), verifica-se proximidade nos valores de deslocamento químico, confirmando a proposta estabelecida de estrutura.

Tabela 1.7. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM4 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Griffin *et al.* (1978) para o alcaloide 3α -benzoiloxitropano- $6\beta,7\beta$ -diol

Posição/Grupo	LEM4		3α -benzoiloxitropano- $6\beta,7\beta$ -diol*
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)
1 e 5	65,36	3,11 (sl)	3,1 (s)
2eq e 4eq	25,89	1,66 (d, J = 15,8 Hz)	1,5 – 2,4 (m)
2ax e 4ax	25,89	2,29 (dt, J = 15,8 e 5,1 Hz)	
3	67,52	5,25 (tl, J = 4,6 Hz)	5,25 (t, J = 6 Hz)
6 e 7	74,58	4,56 (s)	4,55 (s)
1'	130,13		
2' e 6'	129,40	7,97 (d, J = 7,5)	8,0 (m)
3' e 5'	128,59	7,44 (t, J = 7,5 Hz)	7,5 (m)
4'	133,20	7,56 (t, J = 7,5)	
7'	165,57		
N-CH ₃	33,96	2,52 (s)	2,52 (s)
2 x -OH	---	2,67 (sl)	3,95 (s)

* Apenas foram encontrados dados de RMN de ^1H para este composto

O mapa de contornos HMBC (Figura 1.37) auxiliou na confirmação da estrutura, no qual as correlações mais importantes verificadas foram para o hidrogênio H-3 que correlaciona tanto com a carbonila do grupo benzoiloxi quanto com os carbonos C2/C4 e C1/C5.

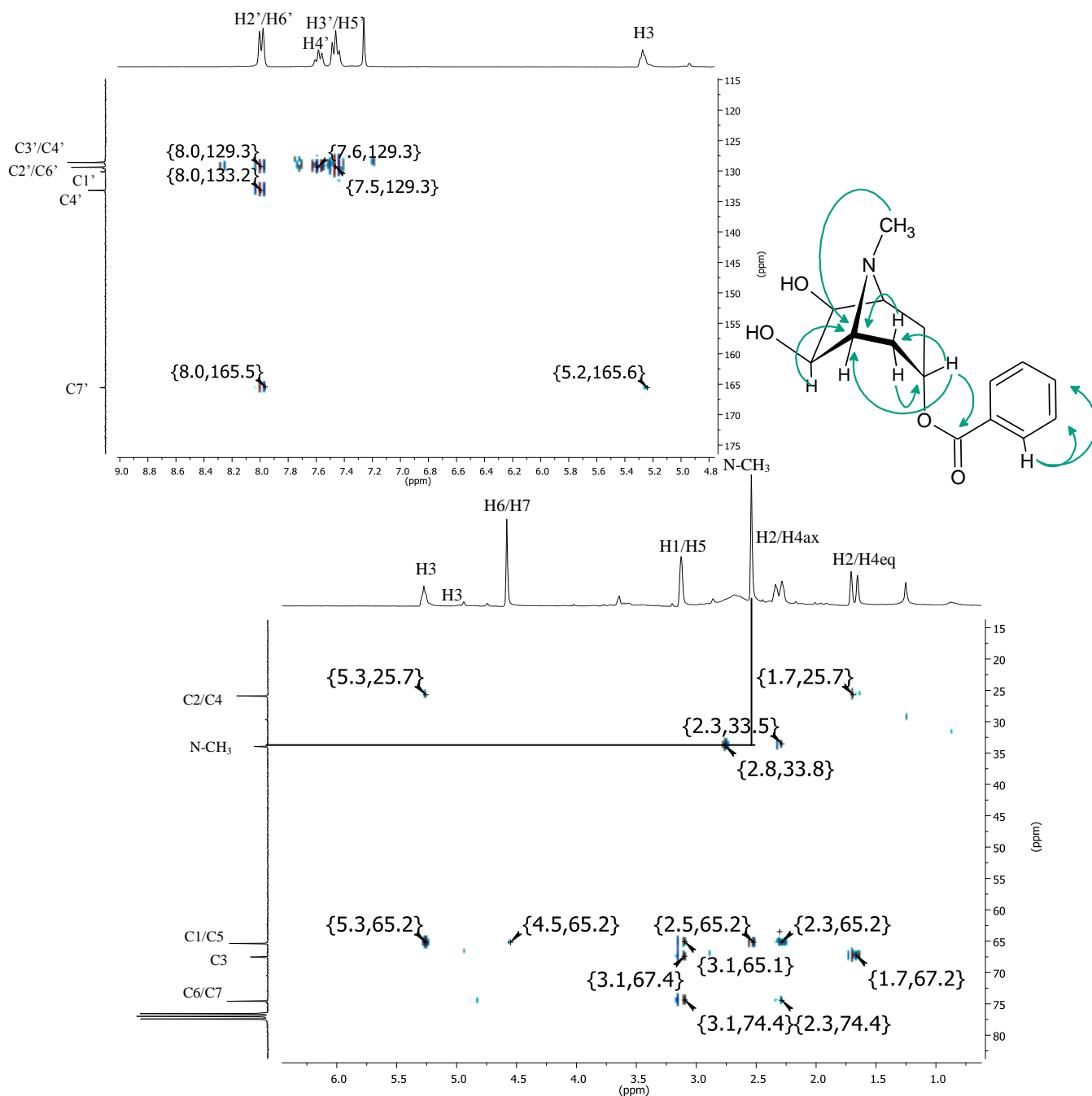


Figura 1.37. Expansões do mapa de contornos HMBC (300 MHz; 75 MHz em CDCl_3) da substância LEM4 e as principais correlações observadas na estrutura do composto 3 α -benziloxitropano-6 β ,7 β -diol

O espectro de massas da substância LEM4 (Figura 1.38) apresentou um pico do íon molecular com valor de $m/z = 277$, condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ do alcaloide 3 α -benziloxitropano-6 β ,7 β -diol. Os principais fragmentos verificados também estão de acordo com mecanismos de fragmentação propostos a partir desta estrutura.

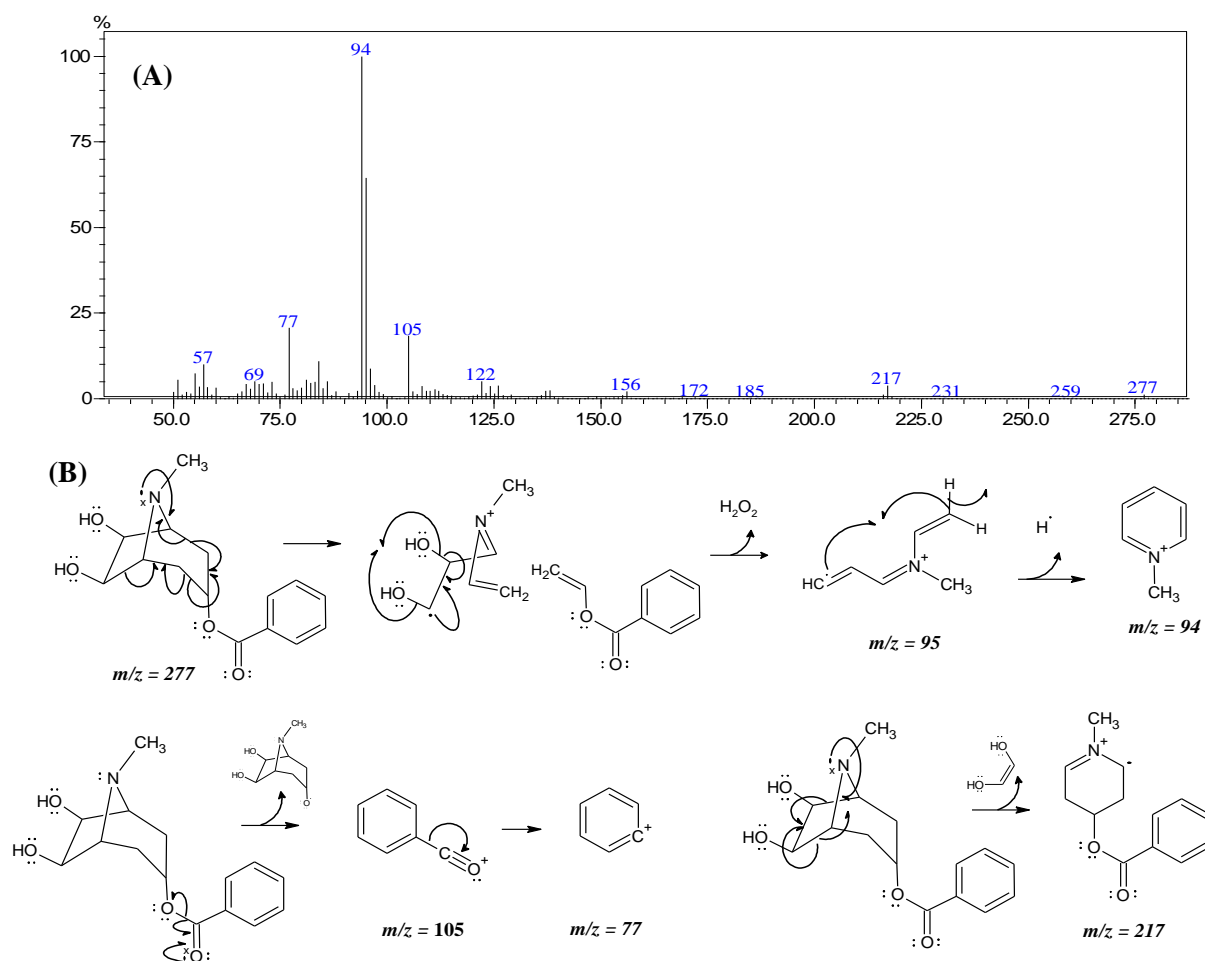


Figura 1.38. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM4 e (B) principais mecanismos de fragmentação

1.6.1.5 Identificação da substância LEM5: 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

A substância LEM5 (7,0 mg) foi isolada da fração metanólica do extrato de *E. macrocalyx* na forma de cristais incolores, solúveis em clorofórmio. O composto apresentou temperatura de fusão na faixa de 178–182 °C, cujo pequeno intervalo indicou um alto grau de pureza da mesma.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.39) obtido para LEM5 apresentou sinais em δ 3,43 (*m*, 1H), δ 3,41 (*m*, 1H), condizentes com os hidrogênios H1 e H5 de alcaloides tropanicos. Os sinais em δ 5,33 (*t*, $J = 4,8$ Hz, 1H) e δ 5,92 (*dd*, $J = 7,5; 2,9$ Hz, 1H) indicaram a presença de apenas dois substituintes ligados ao anel tropanico. As constantes de acoplamento e o padrão de multiplicidade destes sinais são bastante característicos de H-3 β e H-6 α , respectivamente, em alcaloides tropanicos 3 α ,6 β -substituídos (OLIVEIRA et al., 2011).

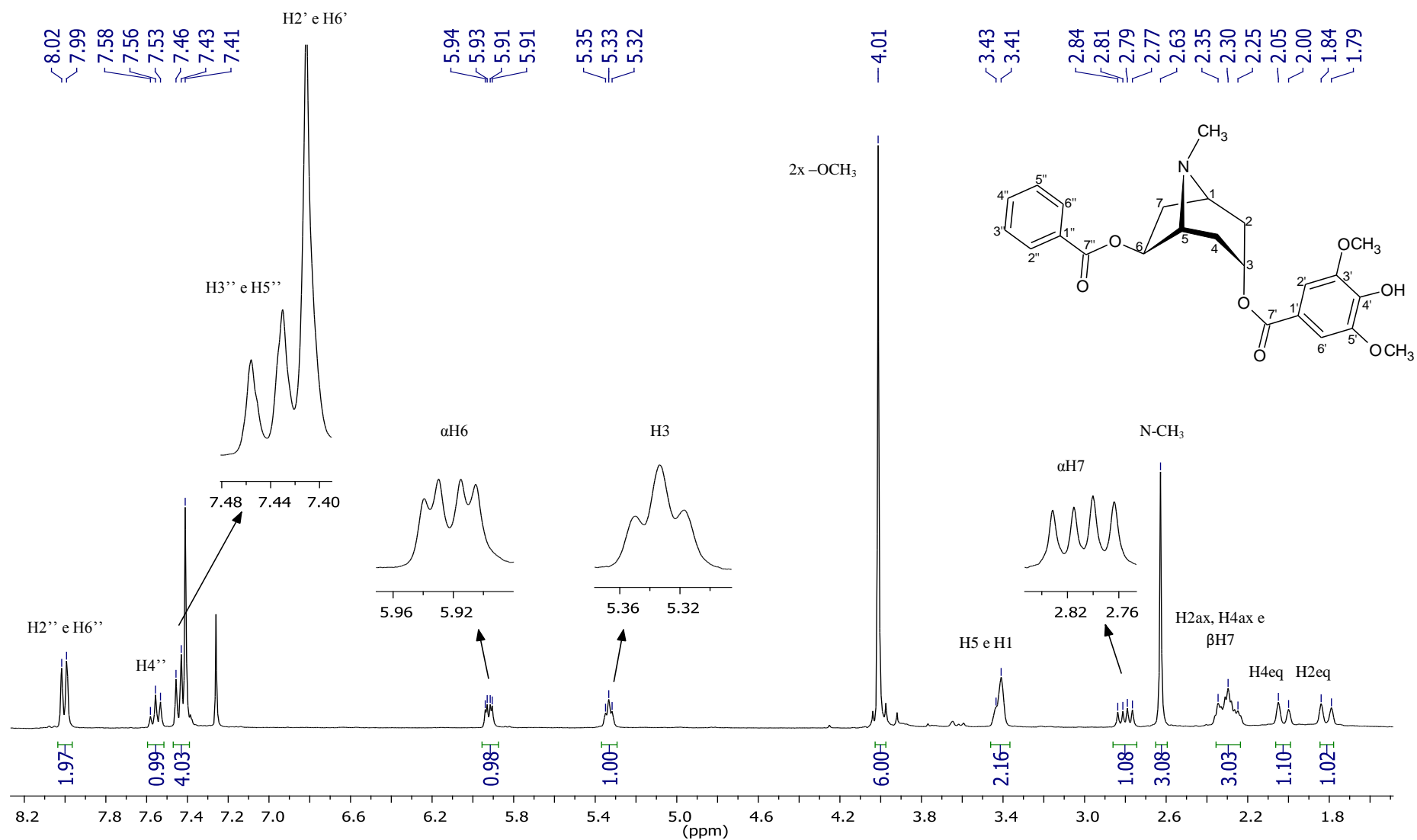


Figura 1.39. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM5: 6 β -benzoyloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

Os dois dupletos em δ 1,81 (*d*, $J = 15,0$ Hz, 1H) e δ 2,02 (*d*, $J = 15,0$ Hz, 1H) foram atribuídos a H-2eq e H-4eq, respectivamente, enquanto que o sinal em δ 2,80 (*dd*, $J = 14,1; 7,5$ Hz, 1H) foi atribuído a H-7 α que acopla com H-7 β e H-6 α e não acopla com H-1, devido ao ângulo diedro entre eles (PAVIA, 2001). A sobreposição de sinais do multipletto na região de δ 2,25–2,35 (3H) é condizente com os hidrogênios H-2ax e H-4ax e, também com o hidrogênio H-7 β .

Um dos substituintes do anel tropânico foi identificado como sendo o grupo benzoiloxi, devido aos sinais característicos de hidrogênios em anel aromáticos monossustituído [δ 8,00 (*d*, $J = 7,1$ Hz, 2H); δ 7,56 (*t*, $J = 7,4$ Hz, 1H); δ 7,43 (*t* parcialmente sobreposto, $J = 7,5$ Hz, 2H,)], enquanto que o segundo substituinte foi identificado como o grupo 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi (HDmBzO) a partir dos dois singletos em δ 4,01 (*s*, 6H) e δ 7,41 (*s*, 2H).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.40) apresentou sinais de carbono compatíveis com a presença dos grupos benzoiloxi (δ 166,00; 132,90; 130,25; 129,44; 128,31) e HDmBzO (δ 165,45; 146,83; 139,36; 121,20; 106,43; 56,48), confirmados pela comparação com a literatura (OLIVEIRA et al., 2011). Também foram verificados sete sinais (δ 79,79; 67,35; 65,64; 59,99; 36,75; 34,57; 33,25) correspondentes a todos os carbonos do anel tropânico dissustituído, além do sinal em δ 40,08, atribuído ao grupo N-CH₃.

No mapa de contornos HMBC (Figura 1.41) as correlações mais importantes verificadas foram entre H-3 (δ 5,33) e o carbono carbonílico do grupo HDmBzO (δ 165,45); e, também, entre H-6 (δ 5,92) e o carbono carbonílico do grupo benzoiloxi, indicando assim a posição destes dois grupos no anel tropânico. Já no mapa de contornos NOESY (Figura 1.42), as correlações mais importantes foram verificadas entre H-6 com H-4eq e H-7 α , e entre H-3 com H-2ax/H-4ax, confirmando assim as configurações α e β para estes dois hidrogênios, respectivamente.

Com base na análise espectroscópica realizada, foi proposto que a substância LEM5 se tratava do alcaloide 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi) tropano (Figura 1.43), uma substância que, até o momento, apenas havia sido isolada do caule *E. caatingae* (OLIVEIRA et al., 2011), sendo este, portanto, o segundo relato desta substância como produto natural.

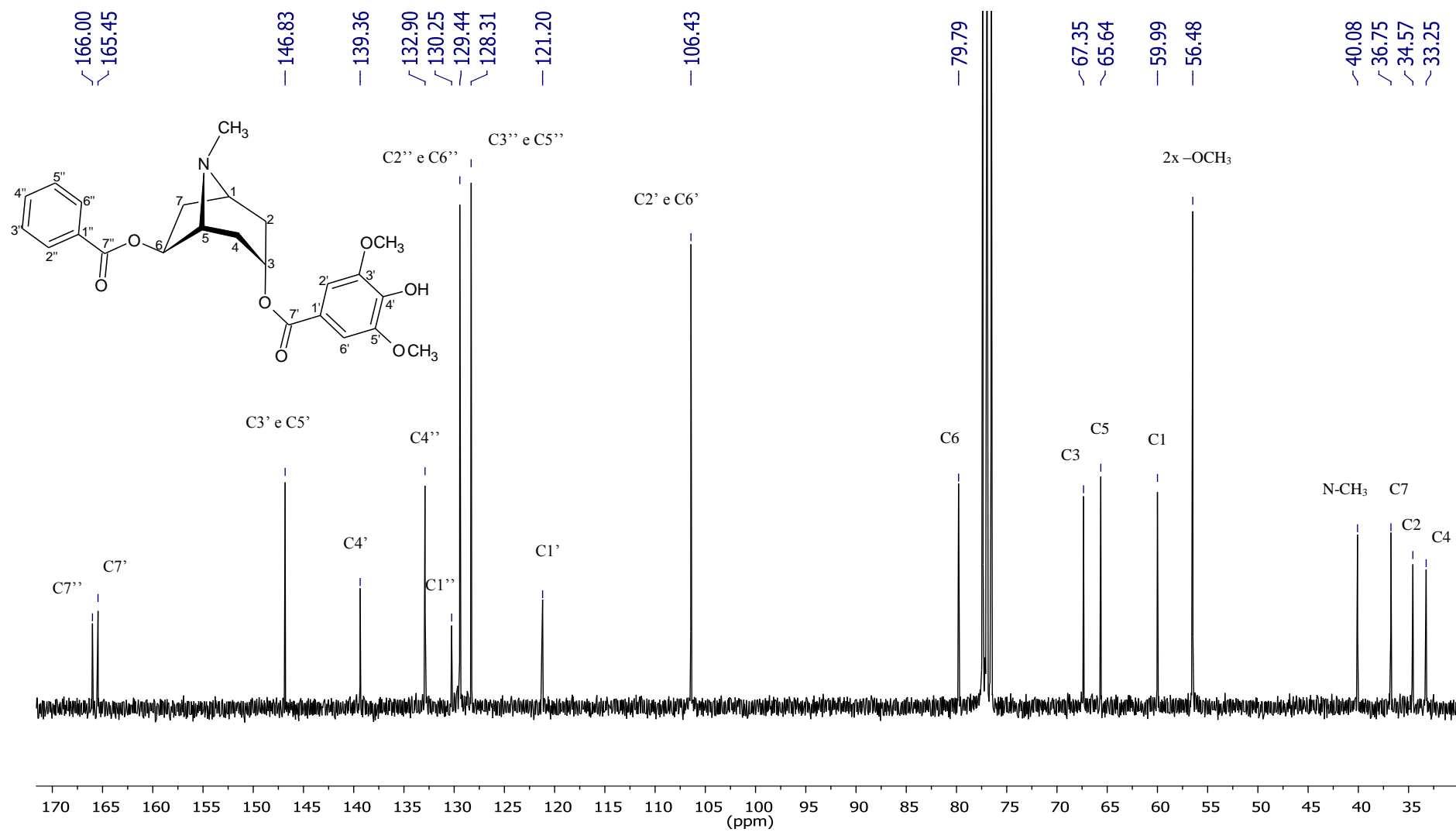


Figura 1.40. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, em CDCl₃) da substância LEM5: 6β-benzoiloxi-3α-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

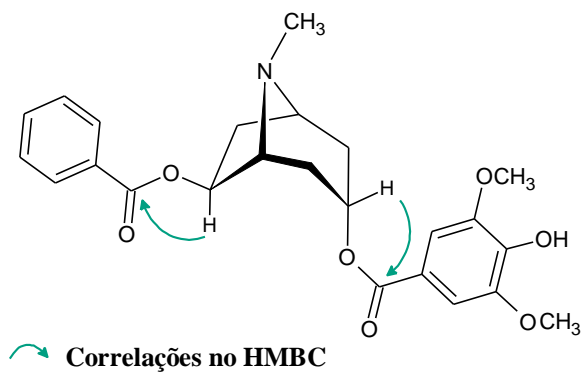
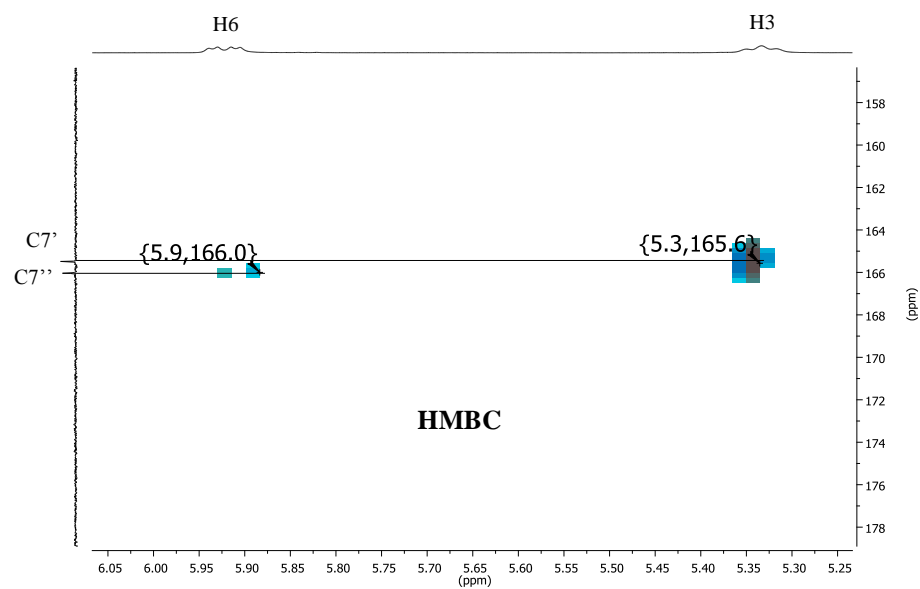


Figura 1.41. Expansão do mapa de contornos HMBC (300 MHz; 75 MHz, CDCl_3) da substância LEM5, destacando as correlações mais importantes para confirmação da estrutura do composto 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

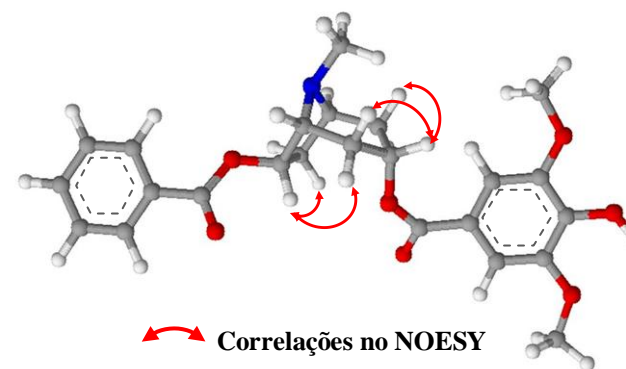
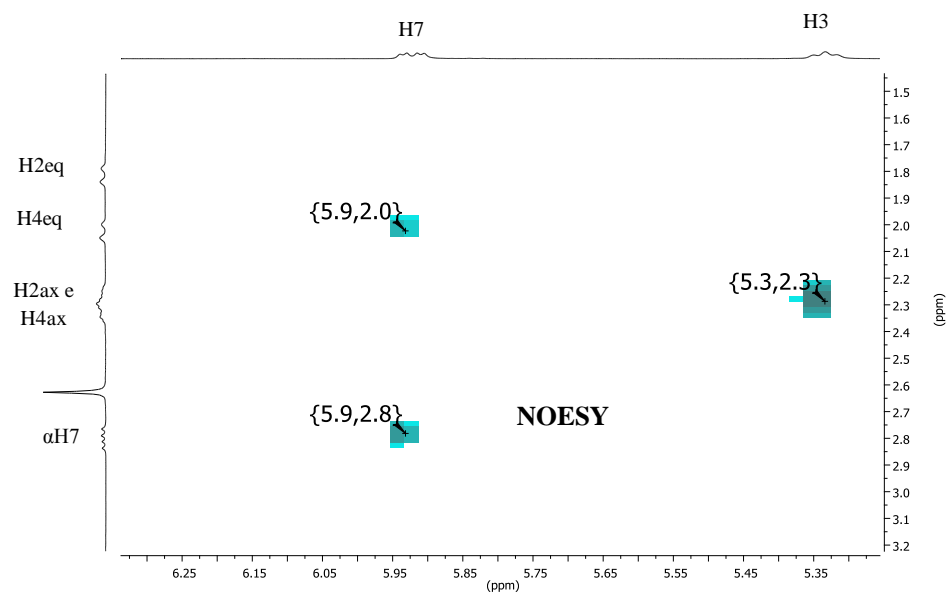


Figura 1.42. Expansão mapa de contornos NOESY (300 MHz, CDCl_3) da substância LEM5 destacando as correlações mais importantes para confirmação da estrutura do composto 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

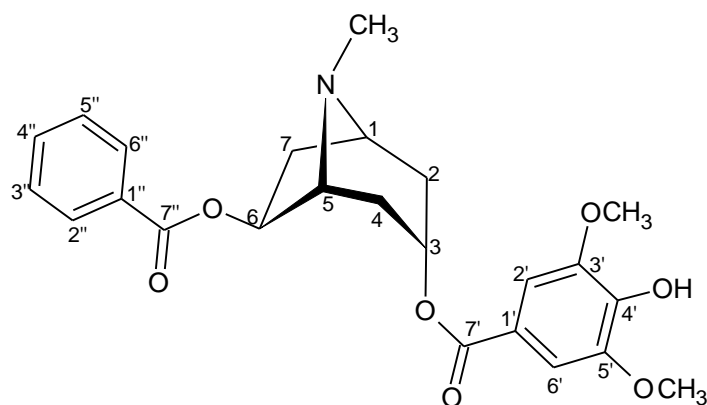


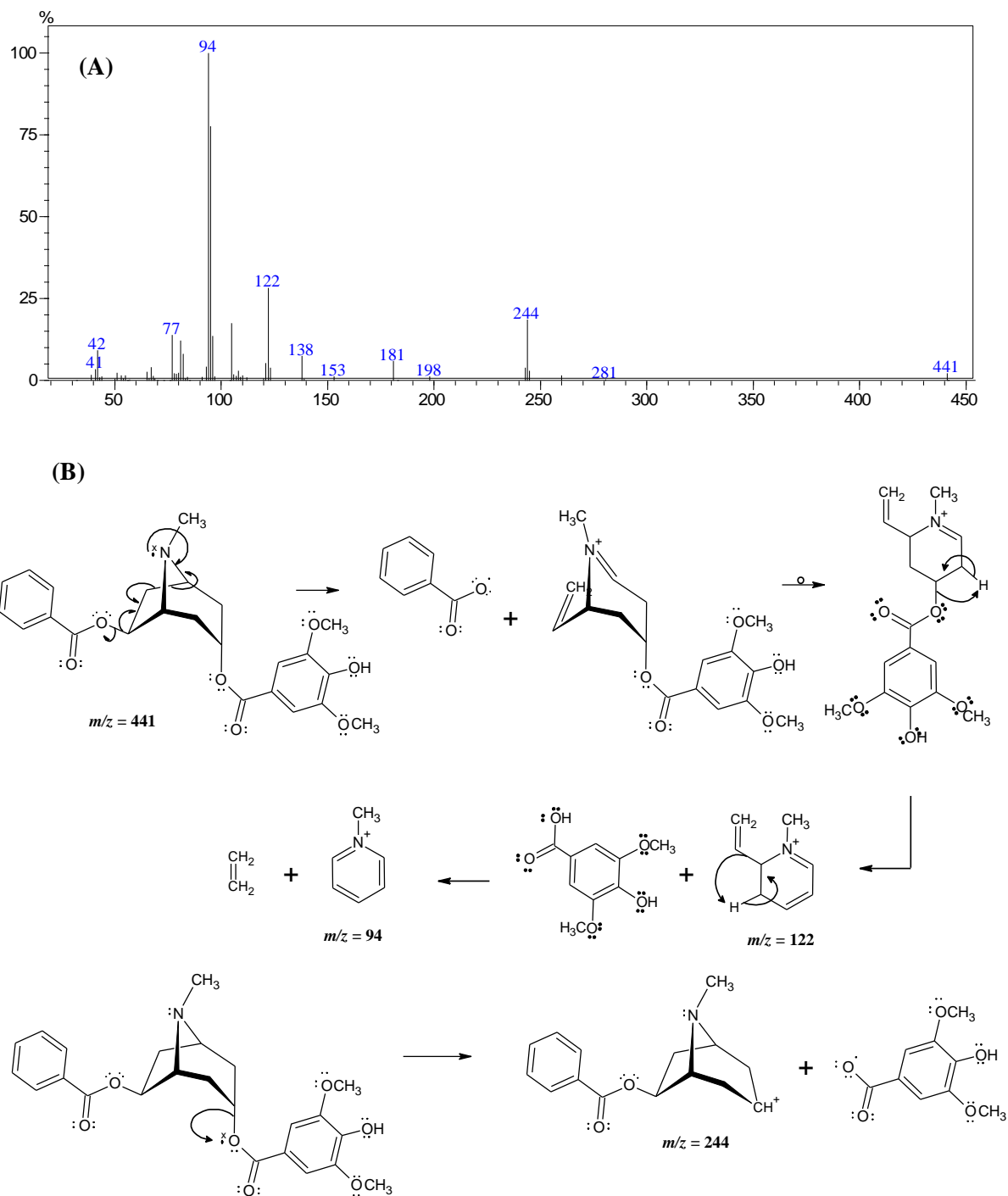
Figura 1.43. Fórmula estrutural da substância LEM5 [6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano]

Ao comparar os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM5 com os que são descritos na literatura para o alcaloide 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano (Tabela 1.8) verifica-se grande similaridade dos sinais, sendo portanto, mais uma confirmação da sua estrutura.

Tabela 1.8. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM5 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Oliveira *et al.* (2011) para o 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano

Posição/ Grupo	LEM 5		6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi., J/Hz)
1	59,99	3,41 (m)	60,12	3,45 (m)
2eq	34,57	1,81 (dl, J = 15,0)	34,59	1,82 (dl, J = 15,0)
2ax	34,57	2,30 (m)	34,59	2,29 (m)
3	67,35	5,33 (tl, J = 4,8)	67,28	5,34 (tl, J = 5)
4eq	33,25	2,02 (d, J = 15,0)	33,25	2,03 (dl, J = 15,0)
4ax	33,25	2,35 (m)	33,25	2,37 (m)
5	65,64	3,43 (m)	65,74	3,43 (m)
6 α	79,79	5,92 (dd, J = 7,5; 2,9)	79,69	5,93 (dd, J = 7,5; 3,0)
β 7	36,75	2,30 (m)	36,73	2,33 (m)
α 7	36,75	2,80 (dd, J = 14,1, 7,5)	36,73	2,82 (dd J = 14,0; 7,5)
1'	121,20	---	121,15	---
2'	106,43	7,41 (s)	106,55	7,32 (s)
3'	146,83	---	146,97	---
4'	139,36	---	139,60	---
5'	146,83	---	146,97	---
6'	106,43	7,41 (s)	106,55	7,32 (s)
7'	165,45	---	165,46	---
1''	130,25	---	130,28	---
2''	129,44	8,00 (d, J = 7,1)	129,46	8,01 (dd, J = 7,5; 1,0)
3''	128,31	7,43 (t, J = 7,5)	128,34	7,43 (t, J = 7,5)
4''	132,90	7,56 (t, J = 7,4)	132,92	7,55 (t, J = 7,5)
5''	128,31	7,43 (t, J = 7,5)	128,34	7,43 (t, J = 7,5)
6''	129,44	8,00 (d, J = 7,1)	129,46	8,01 (dd, J = 7,5; 1,0)
7''	166,00	---	166,00	---
2x -OCH ₃	56,48	4,01 (s)	56,50	4,00 (s)
N-CH ₃	40,08	2,63 (s)	40,07	2,46 (s)

Por fim, o espectro de massas da substância LEM5 (Figura 1.44) apresentou o pico do íon molecular ($m/z = 441$), condizente com a fórmula $C_{24}H_{27}NO_7$ deste composto. Os demais picos observados também estão de acordo com mecanismos de fragmentação propostos para esse alcaloide.



1.6.1.6 Identificação da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

A substância LEM6 (60 mg) foi isolada da fração metanólica dos galhos de *E. macrocalyx*, na forma de um precipitado amorfo de coloração castanha, solúvel em dimetilsulfóxido. A temperatura de fusão apresentada pelo composto foi na faixa de 193–196 °C. O seu espectro de transmitância na região do infravermelho (Figura 1.45) apresentou uma banda larga na região de 3570–3200 cm^{-1} característica de estiramento de ligações O-H e um grupo de bandas na região de 1615–1450 cm^{-1} , condizentes com estiramento C=C de anéis aromáticos (COATES, 2000). O espectro também apresentou um grupo de várias bandas intensas na região de 1000–1060 cm^{-1} com um padrão bastante característico de substâncias orgânicas ricas em ligações C-O, comum de ser verificado em compostos glicosídicos.

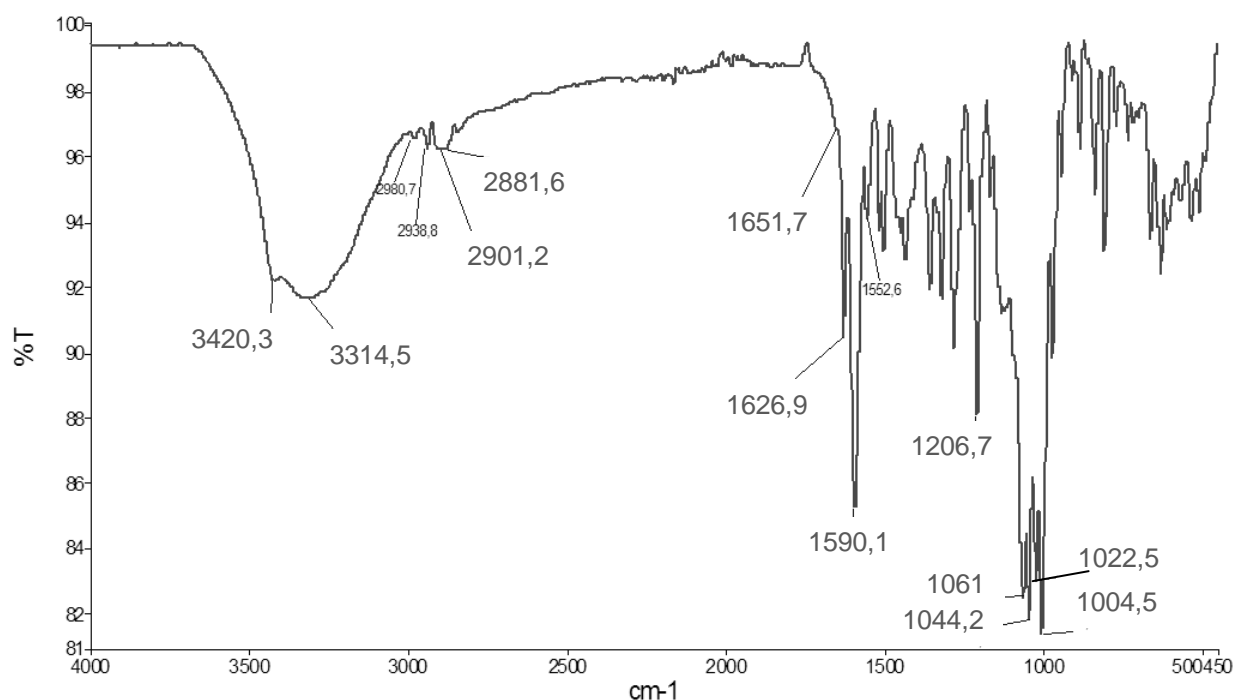


Figura 1.45. Espectro por reflectância total atenuada (ATR: “Attenuated Total Reflectance”) na região do Infravermelho da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.46) indicou a presença de pelo menos dois grupos glicosídicos na estrutura do composto a partir dos sinais em δ 5,25 (d , $J = 6,6$ Hz), δ 4,84 (d , $J = 7,3$ Hz), característicos de hidrogênio em carbonos anoméricos. O sinal em δ 0,98 (d , $J = 5,7$ Hz, 3H) indicou que um dos açúcares se tratava da ramnose, sendo este sinal correspondente ao grupo metila deste carboidrato (BRUYN et al., 1976).

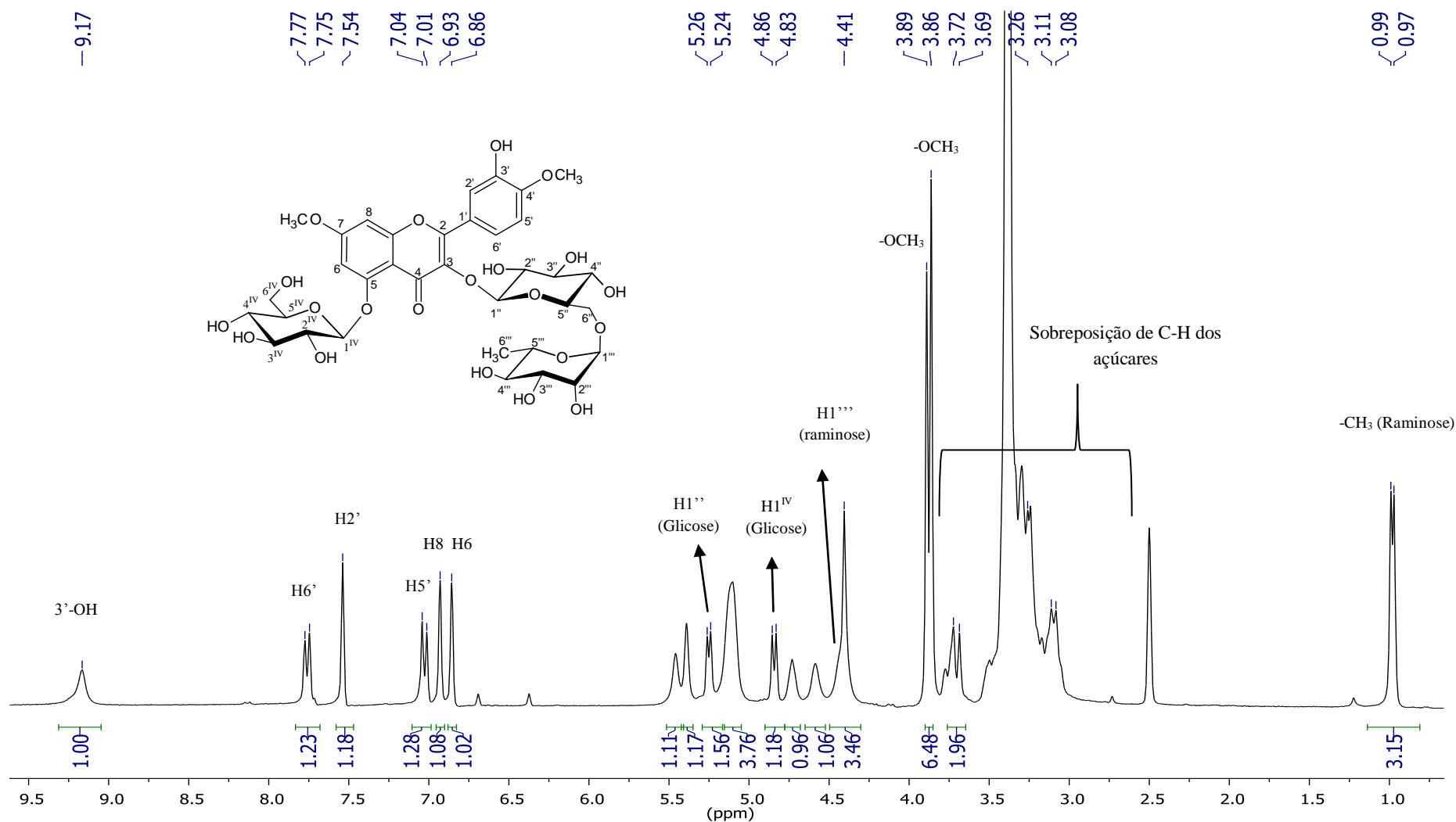


Figura 1.46. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

O espectro também apresentou sinais de hidrogênios condizentes com o núcleo estrutural do flavonoide ombuina (SWAMINATHAN et al., 2014) (Figura 1.47). Estes foram os sinais em δ 6,86 (*sl*) e δ 6,93 (*sl*) dos hidrogênios H-8 e H-6 do anel aromático A; os sinais em δ 7,76 (*d*, $J = 8,6$ Hz) e δ 7,03 (*d*, $J = 8,6$ Hz) correspondentes aos hidrogênios H-6' e H-5' acoplados em orto no anel B, o sinal em δ 7,54 (*sl*) correspondente a H-2', os dois singletos em δ 3,86 e δ 3,89, correspondente às metoxilas das posições 7 e 4' e o singlete largo em δ 9,17, condizente com a hidroxila fenólica não quelada da posição 3'. A resolução do espectro obtido não foi suficiente para permitir visualização do desdobramento dos sinais com constante de acoplamento *meta*, gerando sinais com aparência de singlete largo. A ausência de sinais para a hidroxila fenólica da posição 5 e para a hidroxila enólica da posição 3 indicaram que estas seriam as possíveis posições às quais estariam ligados os grupos glicosídicos.

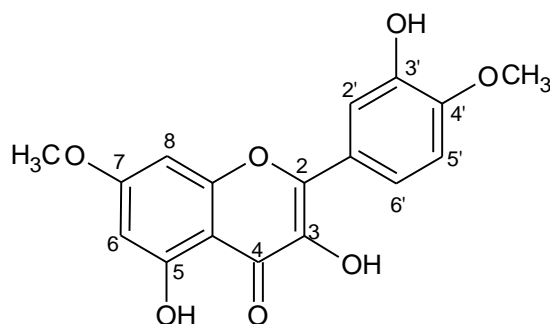


Figura 1.47. Fórmula estrutural do flavonoide ombuina

Os sinais de carbonos anoméricos em δ 100,81; 101,43 e 102,46 no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.48) revelaram a presença de não apenas dois, mas sim três unidades de sacarídeos ligados à estrutura no flavonoide ombuina. O número de sinais na região de 60–78 ppm (δ 77,69; 76,49; 75,83; 75,71; 74,12; 73,58; 71,87; 70,63; 70,40; 69,93; 69,82; 68,29; 66,86; 60,94; 17,81) confirmou esta hipótese. A presença do açúcar ramnose foi confirmada pelo sinal característico de sua metila em δ 17,81. O sinal em δ 66,86 é característico de carbono metilênico de uma unidade de glicose ligada a outro açúcar (ligação glicosídica 1 \rightarrow 6), enquanto que o sinal em δ 60,94 é característico deste mesmo tipo de carbono sem estar envolvido em ligação glicosídica (AGRAWAL, 1992; CHENG & NEISS, 2012). Os demais sinais verificados no espectro são condizentes com os carbonos do núcleo estrutural do flavonoide ombuina [δ 157,66 (C2); 136,01 (C3); 173,18 (C=O); 158,34 (C5); 103,68 (C6); 163,76 (C7); 95,73 (C8); 154,69 (C9); 108,94 (C10); 122,44 (C1'); 115,73 (C2'); 145,85 (C3'); 149,95 (C4'); 111,32 (C5'); 121,50 (C6'); 56,16 (OCH₃); 55,67 (OCH₃)].

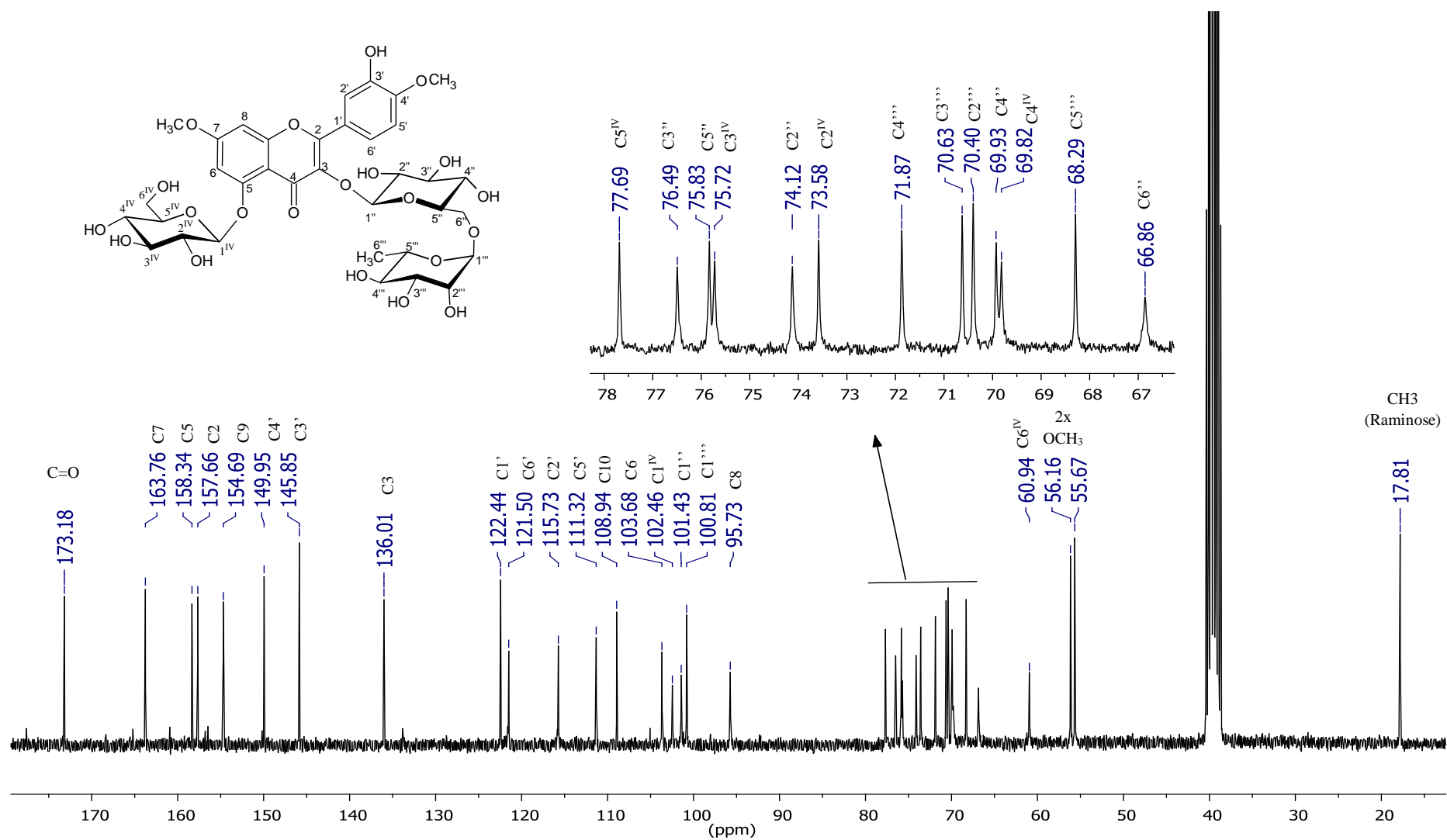


Figura 1.48. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em DMSO- D_6) da substância LEM6: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

Considerando as informações obtidas nos espectros de RMN, foi feita uma busca na literatura sobre flavonoides glicosilados com núcleo “ombuínico” contendo duas unidades de glicose e uma raminose, e verificou-se que os dados de RMN do flavonoide ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (Figura 1.49), já isolado de outras plantas do gênero *Erythroxylum* (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2014), apresentou grande similaridade com os que foram obtidos para a substância LEM6 (Tabela 1.9) sendo esta informação bastante segura para confirmação da estrutura do composto.

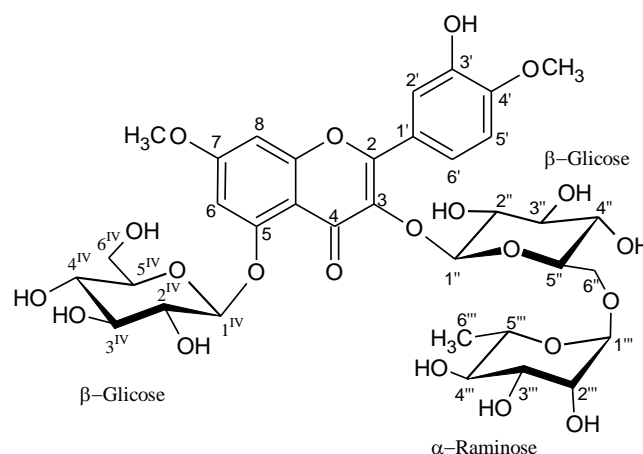


Figura 1.49. Fórmula estrutural da substância LEM6 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo)

Tabela 1.9. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM6 (DMSO- D_6 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por González-Guevara et al. (2006) para o ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

Posição/ Grupo	LEM6 $\delta^{13}\text{C}$	ombuina-3-rutinosídeo-5- glicosídeo	Posição/ Grupo	LEM6 $\delta^{13}\text{C}$	ombuina-3-rutinosídeo- 5-glicosídeo
2	157,66	157,41	2''	74,12	73,94
3	136,01	135,85	3''	76,49	76,38
5	158,34	158,15	4''	69,93	69,83
6	103,68	103,61	5''	75,83	75,68
7	163,76	163,52	6''	66,86	66,68
8	95,73	95,59	1'''	100,81	100,55
9	154,69	154,41	2'''	70,40	70,18
10	108,94	108,82	3'''	70,63	70,47
1'	122,44	122,35	4'''	71,87	71,74
2'	115,73	115,63	5'''	68,29	68,02
3'	145,85	145,68	6'''	17,81	17,50
4'	149,95	149,75	1 ^{IV}	102,46	102,32
5'	111,32	111,25	2 ^{IV}	73,58	73,39
6'	121,50	121,22	3 ^{IV}	75,72	75,59
C=O	173,18	172,94	4 ^{IV}	69,82	69,71
OCH ₃	56,16	55,88	5 ^{IV}	77,69	77,47
OCH ₃	55,67	55,51	6 ^{IV}	60,94	60,80
1''	101,43	101,29			

O espectro de massas desta substância (Figura 1.50) foi obtido por um procedimento de impacto eletrônico (70 eV), não sendo detectado o pico correspondente ao valor da massa da molécula ($m/z = 800$). Este fato é comum de ocorrer em estruturas cujo íon molecular tenha pouco tempo de vida (geralmente em casos onde a fragmentação gere uma estrutura muito estável). Nestes casos, o íon molecular se fragmenta imediatamente ao ser formado, em mecanismos favorecidos pela alta energia adquirida pela molécula no processo de ionização (PAVIA et al., 2001). No caso da substância LEM6, o principal fragmento gerado ($m/z = 330$) corresponde à parte aglicona + 2H do composto, gerada pela perda dos dois grupamentos glicosídicos da molécula.

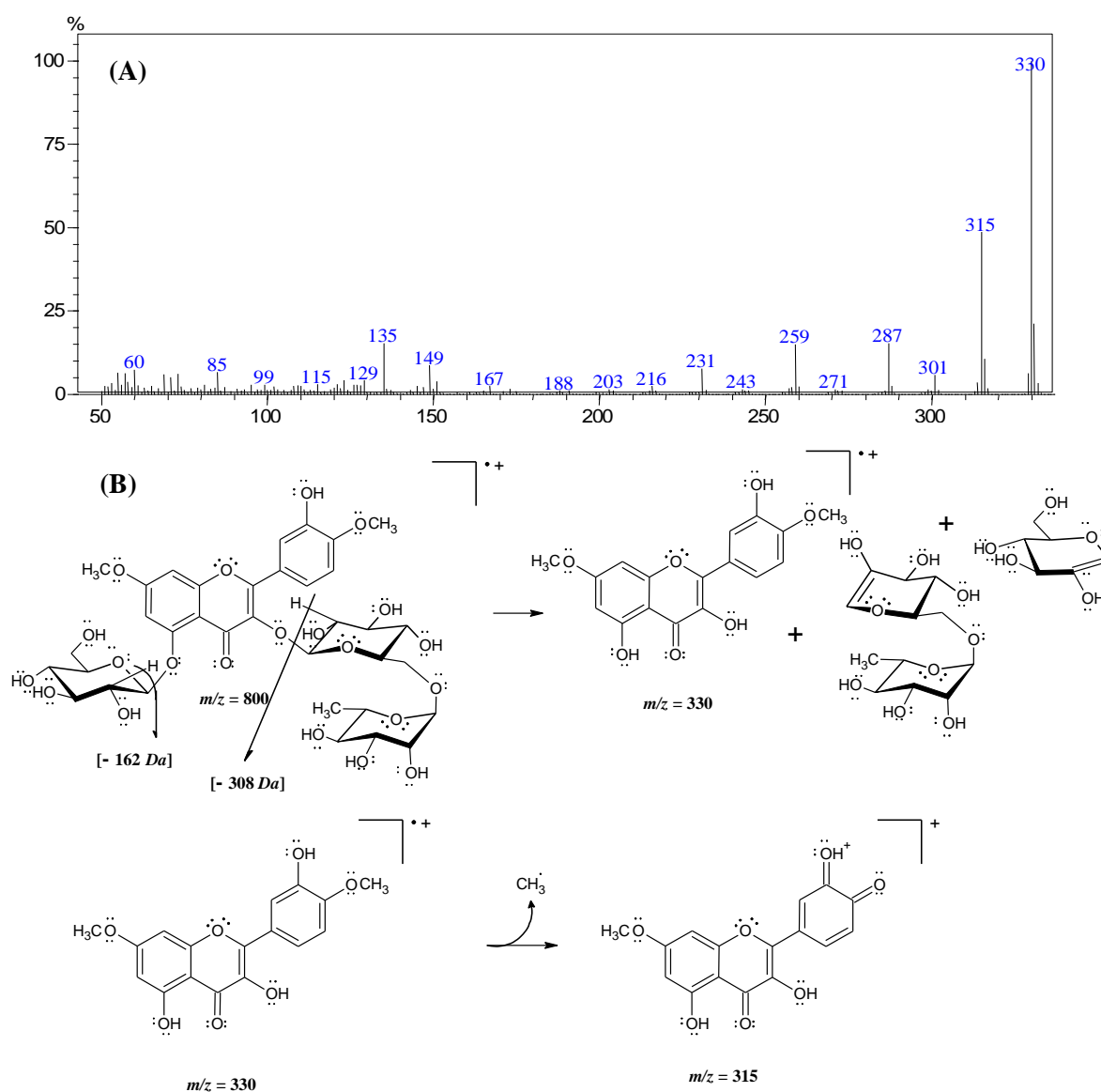


Figura 1.50. (A) Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM6 e (B) os principais fragmentos propostos para a estrutura do composto ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

1.6.1.7 Identificação da substância LEM7: lupeol

A substância LEM7 (15 mg) foi isolada na forma de um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio. A temperatura de fusão da amostra se apresentou na faixa de 182–184 °C. O seu espectro de massas (Figura 1.51) apresentou um pico do íon molecular com valor $m/z=426$ condizente com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e o padrão de fragmentação apresentou compatibilidade com o do triterpeno lupeol (Figura 1.52).

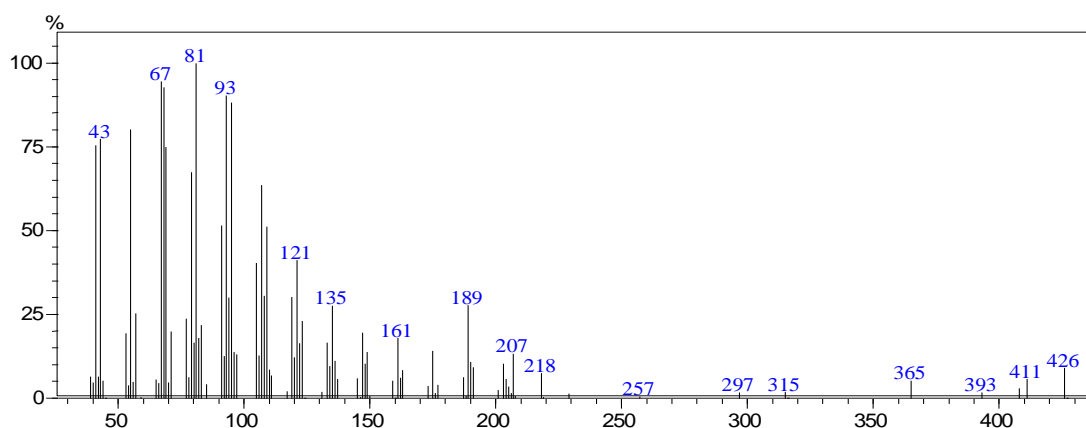


Figura 1.51. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM7 (lupeol)

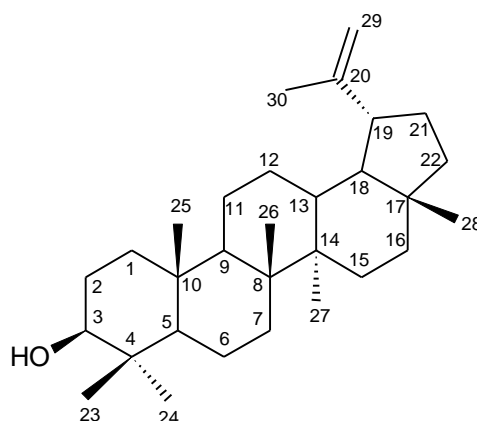


Figura 1.52. Fórmula estrutural da substância LEM7 (lupeol)

O espectro de RMN de 1H (Figura 1.53) de LEM7 apresentou vários multipletos sobrepostos na região abaixo de 1,8 ppm, juntamente com sete singletos (δ 1,68; 1,03; 0,96; 0,94; 0,82; 0,78; 0,76), correspondentes à metilas ligadas a carbonos não hidrogenados. Os dois sinais em δ 4,68 (*sl*, 1H) e δ 4,56 (*sl*, 1H) em conjunto com o sinal de um grupo metila em δ 1,68, indicaram a presença do grupo isopropenil ($CH_3-C=CH_2$) característico de triterpenos lupânicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.54) apresentou os 30 sinais de carbonos de um triterpeno simples. A comparação do deslocamento químico desses sinais com os descritos na literatura (Tabela 1.10) permitiu identificação desta substância como o lupeol.

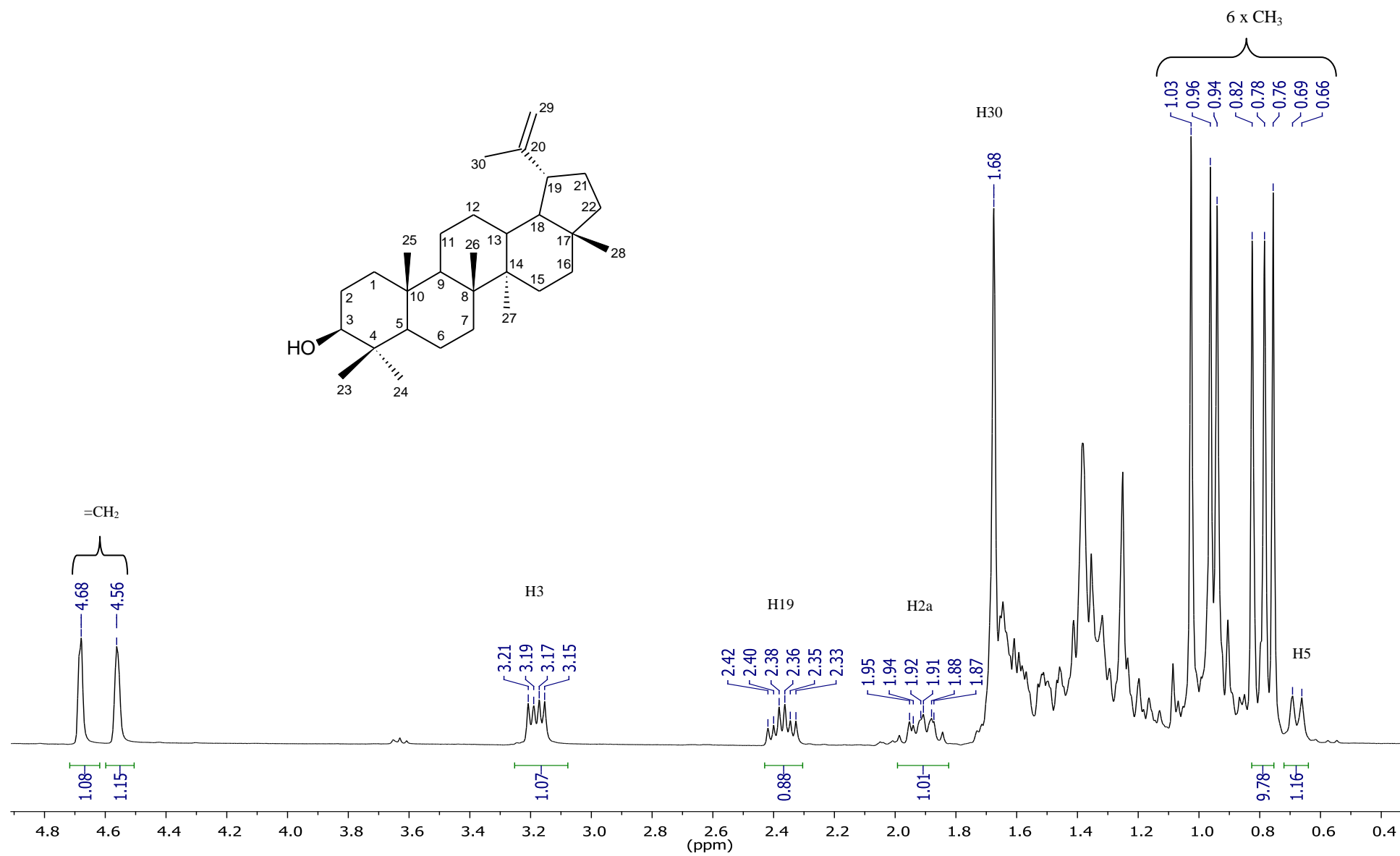


Figura 1.53. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM7: lupeol

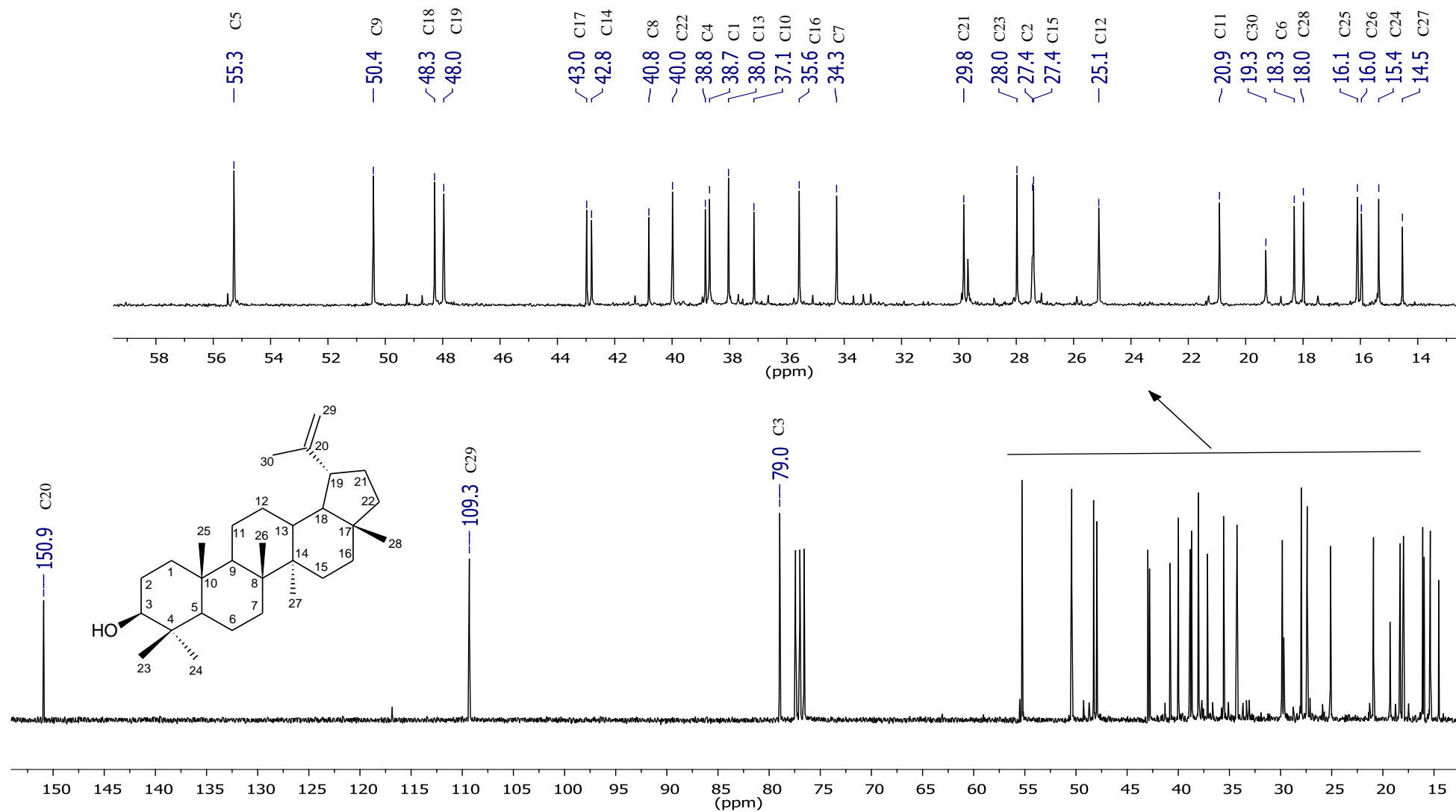


Figura 1.54. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM7: lupeol

Tabela 1.10. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM7 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) para o lupeol

Carbono	LEM7	Lupeol	Carbono	LEM7	Lupeol
1	38,7	38,7	16	35,6	35,5
2	27,4	27,4	17	43,0	43,0
3	79,0	78,9	18	48,3	48,2
4	38,8	38,8	19	48,0	47,9
5	55,3	55,3	20	150,9	150,9
6	18,3	18,3	21	29,8	29,8
7	34,3	34,2	22	40,0	40,0
8	40,8	40,8	23	28,0	28,0
9	50,4	50,4	24	15,4	15,4
10	37,1	37,1	25	16,1	16,1
11	20,9	20,9	26	16,0	15,9
12	25,1	25,1	27	14,5	14,5
13	38,0	38,0	28	18,0	18,0
14	42,8	42,8	29	109,3	109,3
15	27,4	27,4	30	19,3	19,3

1.6.1.8 Identificação da substância LEM8: taraxerol

A substância LEM8 (11 mg) foi isolada na forma de cristais incolores com temperatura de fusão na faixa de 276–279 °C, similar à faixa descrita na literatura (276–278°C) (KOAY et al., 2013). O espectro de massas obtido para este composto (Figura 1.55) apresentou o pico do íon molecular $m/z=426$, condizente com a fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

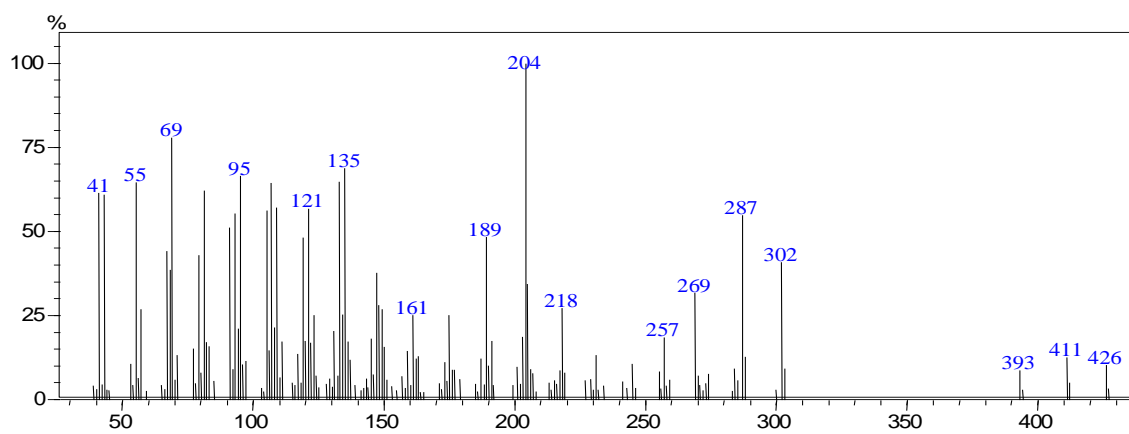


Figura 1.55. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM8 (taraxerol)

O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.56) apresentou uma sobreposição de sinais na região abaixo de 1,8 ppm, compatível com sinais de hidrogênios de estruturas terpênicas. Foi verificado no espectro um sinal em δ 5,53 (*dd*, $J = 8,1, 3,0$ Hz, 1H) correspondente à um hidrogênio olefínico, um sinal em δ 3,20 (*m*, 1H) correspondente a um hidrogênio oximetínico, e sete singletos [δ 1,09; 0,98; 0,95; 0,93; 0,91 ($2\times\text{CH}_3$); 0,82; 0,80] correspondentes a oito metilas ligadas a carbonos não hydrogenados. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.57) apresentou sinais correspondentes a 30 átomos de carbonos, em meio a alguns sinais de impureza da amostra.

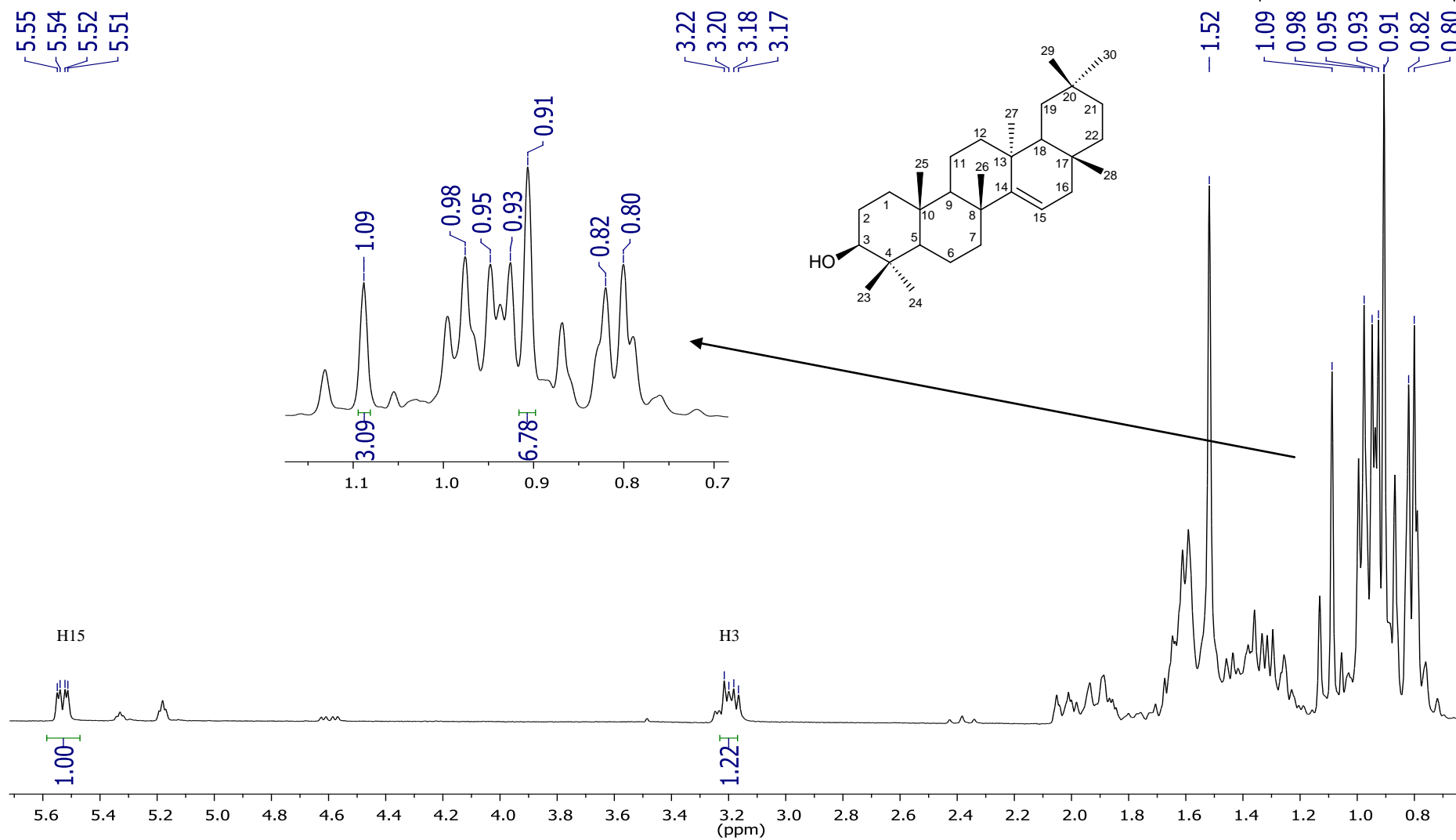
8 x CH₃

Figura 1.56. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, em CDCl₃) da substância LEM8: taraxerol

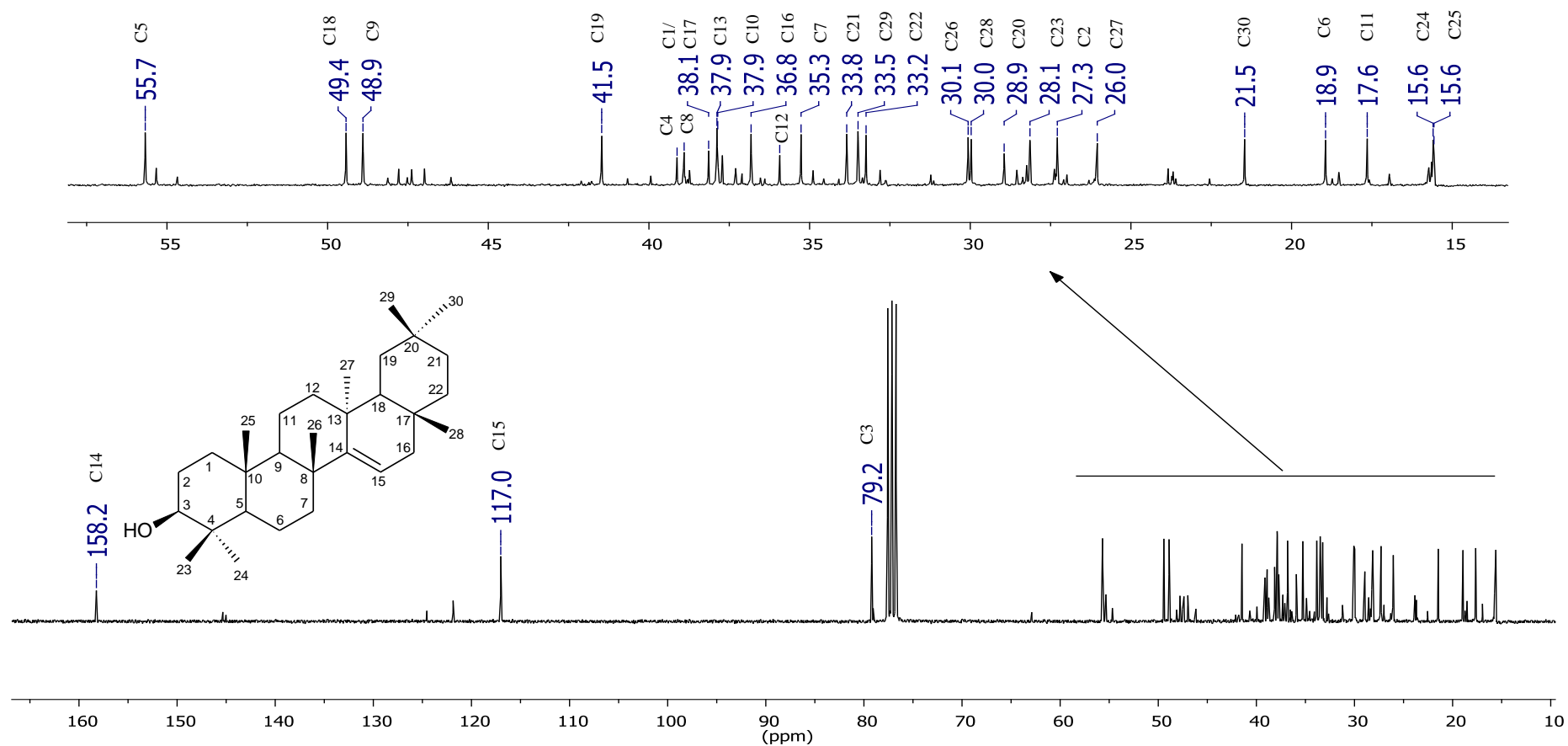


Figura 1.57. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM8: taraxerol

A comparação dos dados de RMN obtidos com os descritos na literatura para o triterpeno taraxerol (Figura 1.58) (Tabela 1.11) confirmou a estrutura do composto.

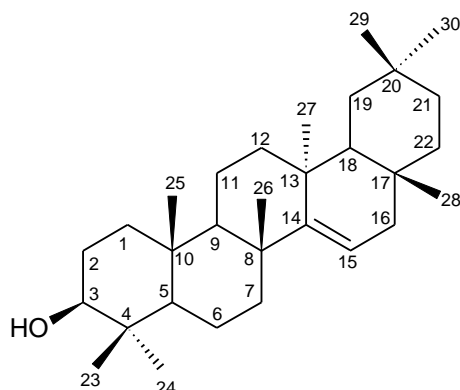


Figura 1.58. Fórmula estrutural da substância LEM8 (taraxerol)

Tabela 1.11. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEM8 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) e Koay et al., (2013) para o taraxerol

RMN de ^{13}C					
Carbono	LEM8	Taraxerol*	Carbono	LEM8	Taraxerol
1	38,1	38,1	16	36,8	36,9
2	27,3	27,3	17	38,1	38,1
3	79,2	79,2	18	49,4	49,4
4	39,1	39,1	19	41,5	41,4
5	55,7	55,7	20	28,9	29,0
6	18,9	19,0	21	33,8	33,9
7	35,3	35,3	22	33,2	33,2
8	38,9	38,9	23	28,1	28,1
9	48,9	48,9	24	15,6	15,6
10	37,9	37,9	25	15,6	15,6
11	17,6	17,7	26	30,1	30,1
12	35,9	35,9	27	26,0	26,0
13	37,9	37,9	28	30,0	30,1
14	158,2	158,1	29	33,5	33,5
15	117,0	117,0	30	21,5	21,5

RMN de ^1H		
Grupo	LEM8	Taraxerol**
25 (CH_3)	0,80 (<i>s</i>)	0,80 (<i>s</i>)
28 (CH_3)	0,82 (<i>s</i>)	0,82 (<i>s</i>)
26 e 30 (2x CH_3)	0,91 (<i>s</i>)	0,91 (<i>s</i>)
24 (CH_3)	0,93 (<i>s</i>)	0,92 (<i>s</i>)
29 (CH_3)	0,95 (<i>s</i>)	0,95 (<i>s</i>)
23 (CH_3)	0,98 (<i>s</i>)	0,97 (<i>s</i>)
27 (CH_3)	1,09 (<i>s</i>)	1,10 (<i>s</i>)
3 (HO-CH)	3,20 (<i>m</i>)	3,20 (<i>m</i>)
15 (C=CH)	5,53 (<i>dd</i> , $J = 8,1; 3,0$ Hz)	5,53 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 3,4$ Hz)

* Mahato e Kundu (1994); **Koay et al., (2013)

1.6.1.9 Identificação da substância LEM9: lupenona

A substância LEM9 (5 mg) foi isolada na forma de um óleo amarelado, solúvel em clorofórmio. O espectro de massas (Figura 1.59) obtido para esta substância apresentou o pico do íon molecular $m/z=424$, condizente com a fórmula $C_{30}H_{48}O$ e o padrão de fragmentação apresentou compatibilidade com o espectro da lupenona (Figura 1.60).

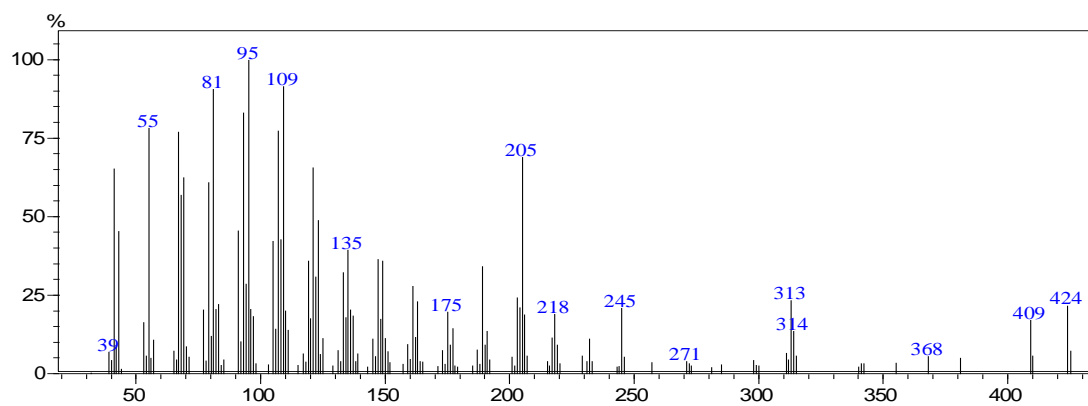


Figura 1.59. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEM9 (lupenona)

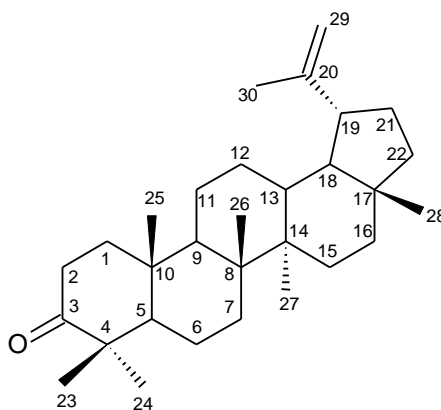


Figura 1.60. Fórmula estrutural da substância LEM9 (lupenona)

O espectro de RMN de 1H (Figura 1.61) apresentou sinais referentes a sete metilas ligadas a carbonos não hidrogenados [δ 0,79 (*s*); 0,93 (*s*); 0,95 (*s*); 1,02 (*s*); 1,07 (*s*; 2x CH_3); 1,68 (*s*)], em conjunto com dois singletos largos em δ 4,57 (*sl*, 1H) e δ 4,69 (*sl*, 1H) referentes aos hidrogênios geminais do grupo isopropenil, característico de triterpenos com esqueleto lupânico. Não foi verificado no espectro sinal na região de δ 3,20, referente a algum hidrogênio oximetínico ligado ao carbono C-3.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.62) apresentou sinais correspondentes aos 30 carbonos de um triterpeno simples. O sinal em δ 218,5 confirmou a carbonila cetônica presente na proposta de estrutura apresentada na Figura 1.60.

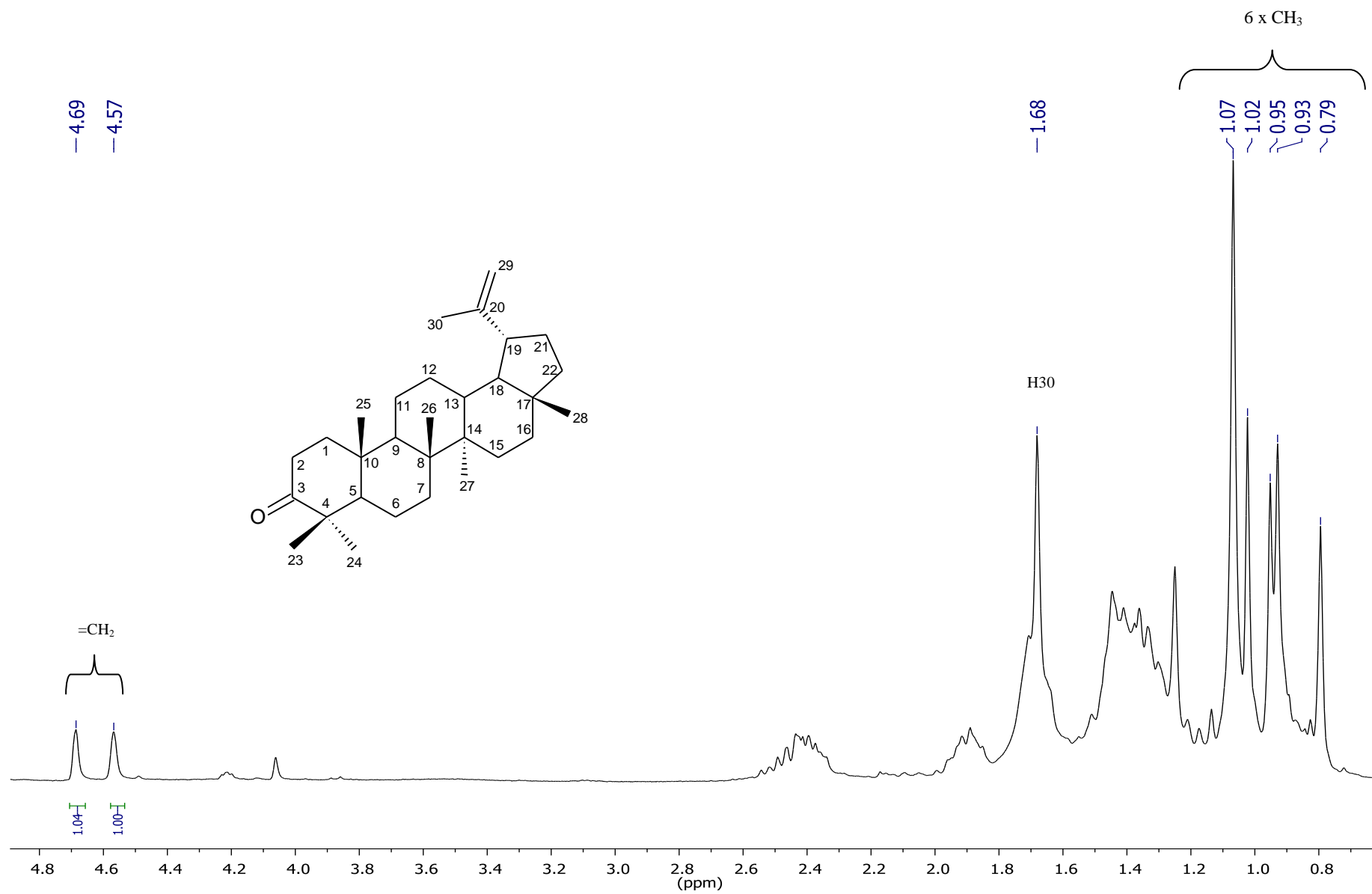


Figura 1.61. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEM9: lupenona

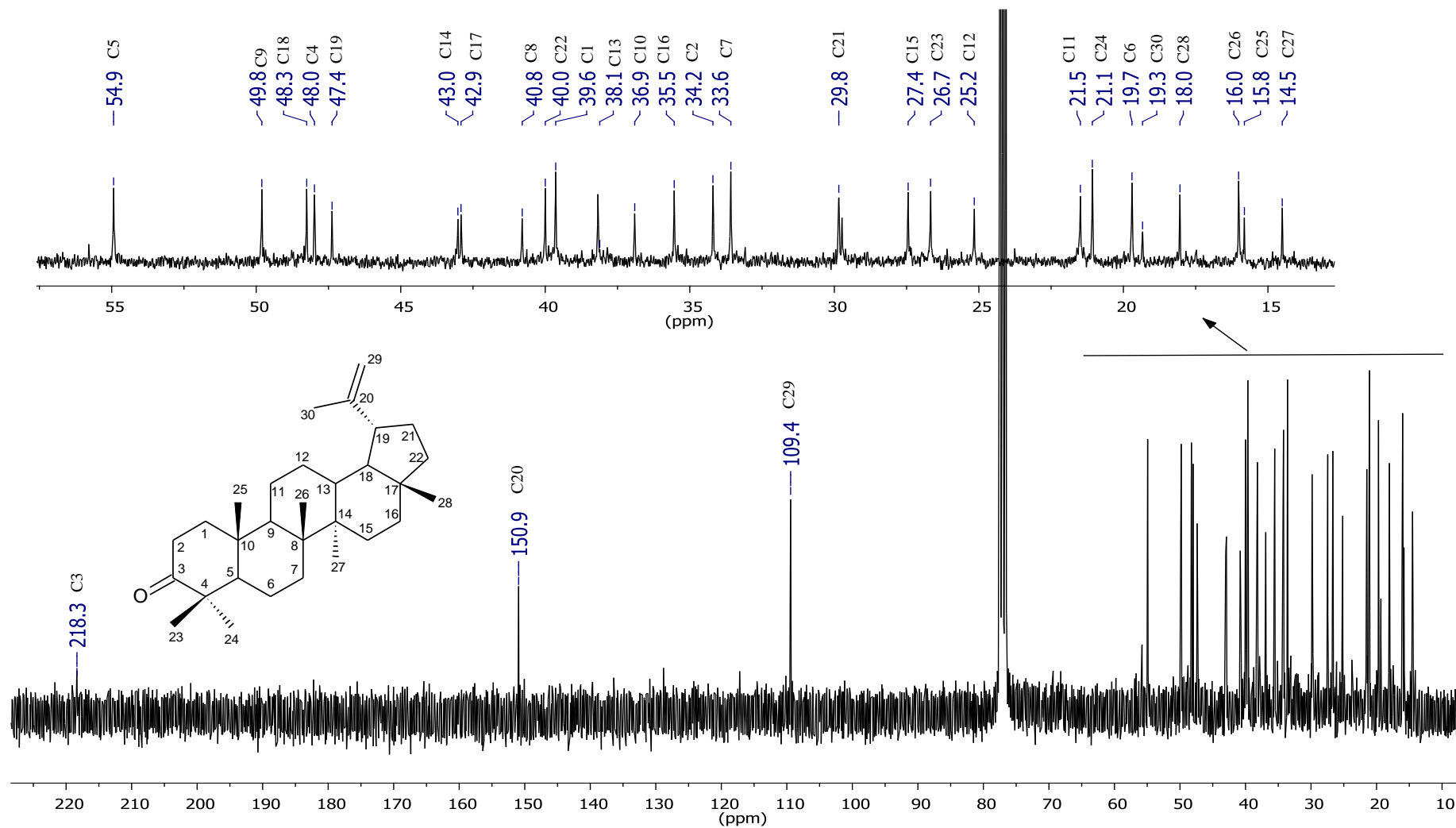


Figura 1.62. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEM9: lupenona

A comparação dos sinais de RMN de ^{13}C com dados da literatura (Tabela 1.12) permitiu confirmar a estrutura do composto como sendo a lupenona.

Tabela 1.12. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEM9 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Nasser et al. (2013) para a lupenona

Carbono	LEM9	Lupenona	Carbono	LEM9	Lupenona
1	39,6	39,6	16	35,5	35,6
2	34,2	34,2	17	42,9	43,0
3	218,3	217,8	18	48,3	48,3
4	48,0	48,0	19	47,4	48,0
5	54,9	55,0	20	150,9	151,0
6	19,7	19,7	21	29,8	29,9
7	33,6	33,6	22	40,0	40,0
8	40,8	40,9	23	26,7	26,7
9	49,8	49,8	24	21,1	21,0
10	36,9	36,9	25	15,8	15,8
11	21,5	21,5	26	16,0	16,0
12	25,2	25,2	27	14,5	14,5
13	38,1	38,2	28	18,0	18,0
14	43,0	43,0	29	109,4	109,4
15	27,4	27,5	30	19,3	19,3

1.6.1.10 Identificação da substância LEM10: α -D-glicopiranosose

A substância LEM10 (48 mg) foi isolada na forma de cristais incolores solúveis em DMSO. O seu espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.63) apresentou apenas seis sinais com valores de deslocamento químico característico de um monossacarídeo. O sinal do carbono anomérico foi gerado em δ 92,21 indicando uma configuração alfa da hidroxila, enquanto que o sinal em δ 61,14 é característico do grupo $\text{CH}_2\text{-OH}$ da glicose sem estar envolvido em ligação glicosídica (BUBB, 2003). O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.64) apresentou o aglomerado de sinais dos hidrogênios oximetínicos e oximetilênico de açúcares na região de 3,00–3,60 ppm. O sinal de hidrogênio do carbono anomérico foi gerado em δ 4,88 (*t*, $J = 3,6$ Hz), cuja multiplicidade (triplete) é justificada pelo acoplamento tanto com o H-2, quanto com a hidroxila OH-1, que não está envolvida em ligação glicosídica. O valor de J deste último sinal, dentro da faixa de 2–4 Hz, indica um acoplamento axial-equatorial com o H-2, confirmando a configuração alfa da hidroxila (AGRAWAL, 1992; BUBB, 2003). O sinal mais desblindado, em δ 6,23 (*d*, $J=4,5$ Hz, 1H) corresponde à hidroxila OH-1, enquanto que o triplete em δ 4,44 (*t*, $J=5,8$ Hz, 1H) é referente à hidroxila da posição 6. Todos os valores de deslocamento e multiplicidade dos sinais de hidrogênio estão de acordo com o descrito na literatura para o monossacarídeo α -D-glicopiranosose (PIGMAN & ISBELL, 1968) (Figura 1.65). A comparação dos sinais de carbono com os descritos na literatura para esta substância (Tabela 1.13) permitiu confirmar a identidade do composto.

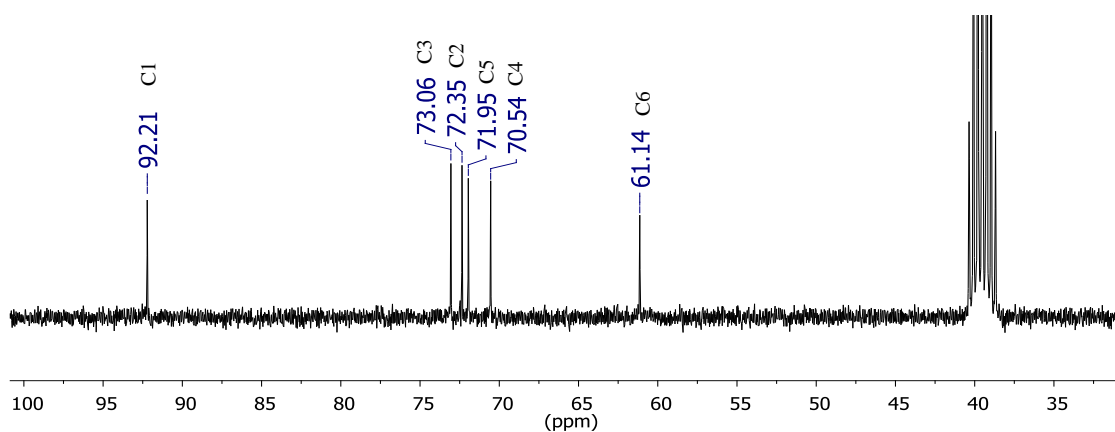


Figura 1.63. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6) da substância LEM10: α -D-glicopirranose

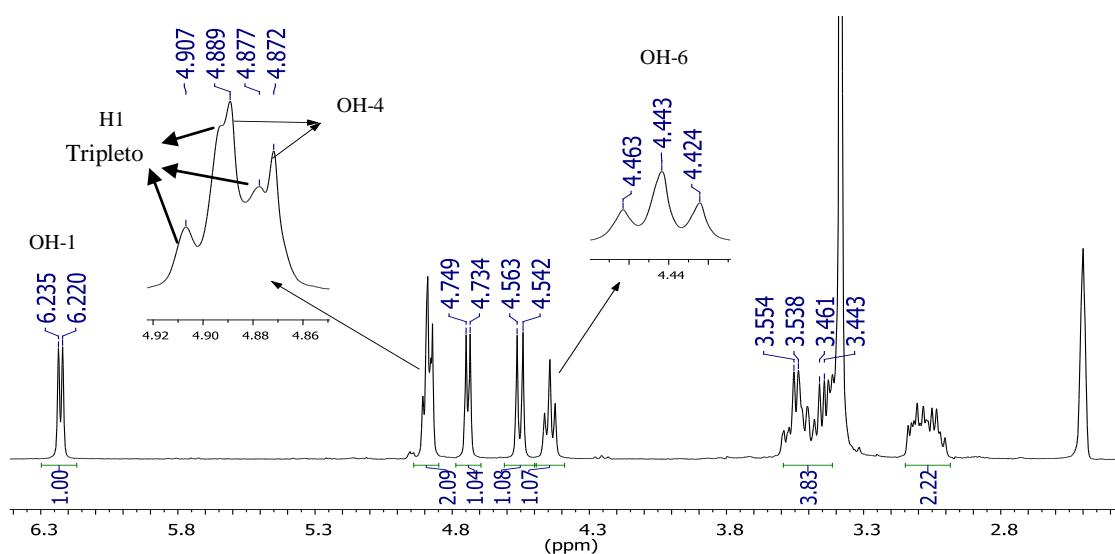


Figura 1.64. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-D_6) da substância LEM10: α -D-glicopirranose. [Sinais atribuídos com base em Pigman e Isbell (1968)]

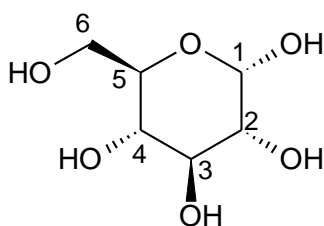


Figura 1.65. Fórmula estrutural da substância LEM10 (α -D-glicopirranose)

Tabela 1.13. Dados de RMN de ^{13}C da substância (75 MHz) comparados com os dados descritos por Bagno et al. (2007) para a α -D-glicopirranose

Carbono	LEM10 (DMSO-D_6)	α -D-glicopirranose (D_2O)
1	92,21	92,48
2	72,35	71,87
3	73,06	73,15
4	70,54	70,04
5	71,95	71,82
6	61,14	60,99

1.6.2 Substâncias Isoladas de *E. affine*

O estudo fitoquímico do extrato etanólico dos galhos de *E. affine* levou ao isolamento e identificação de quatro substâncias, sendo dois triterpenos pentacíclicos pertencentes à classe dos friedelanos (LEA1 e LEA2) e dois flavonoides glicosidados derivados da ombuina (LEA3 e LEA4). O composto LEA3 é idêntico ao composto LEM6 isolado da *E. macrocalyx*. A estrutura e o nome destes compostos são apresentados na Figura 1.66, enquanto que as elucidações estruturais são descritas nas páginas subsequentes.

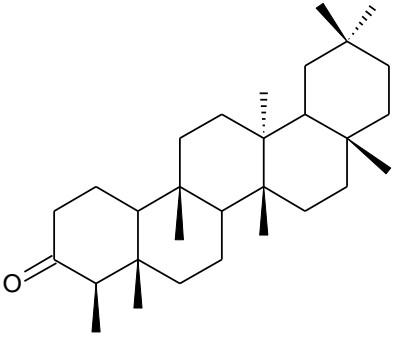
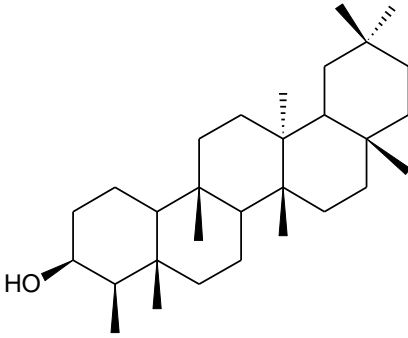
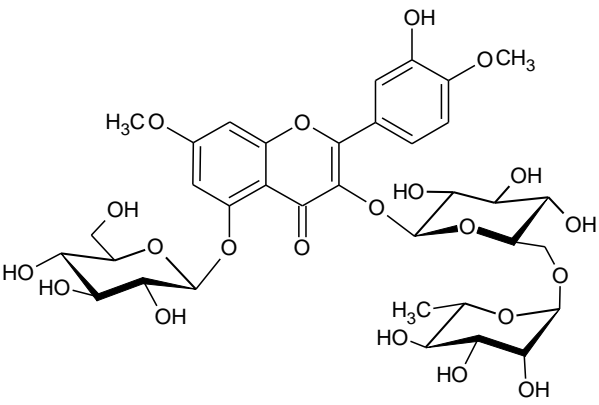
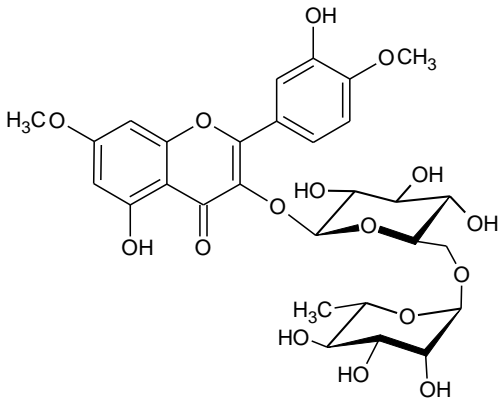
Substâncias isoladas de <i>Erythroxylum affine</i>	
Classe: Triterpenos	
	
Código: LEA1	Código: LEA2
Nome do composto: friedelina	Nome do composto: friedelan-3β-ol
Classe: flavonoides glicosidados	
	
Código: LEA3	Código: LEA4
Nome do composto: ombuin-3-rutinosideo-5-glicosideo	Nome do composto: ombuin-3-rutinosideo

Figura 1.66. Substâncias isoladas do extrato etanólico dos galhos de *E. affine*

1.6.2.1 Identificação da substância LEA1: friedelina

A substância LEA1 (16 mg) foi isolada na forma de cristais incolores com temperatura de fusão na faixa de 255–256 °C, cujo pequeno intervalo indicou alto grau de pureza da amostra. O espectro de massas obtido (Figura 1.67) apresentou o pico do íon molecular (valor $m/z = 426$) condizente com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$.

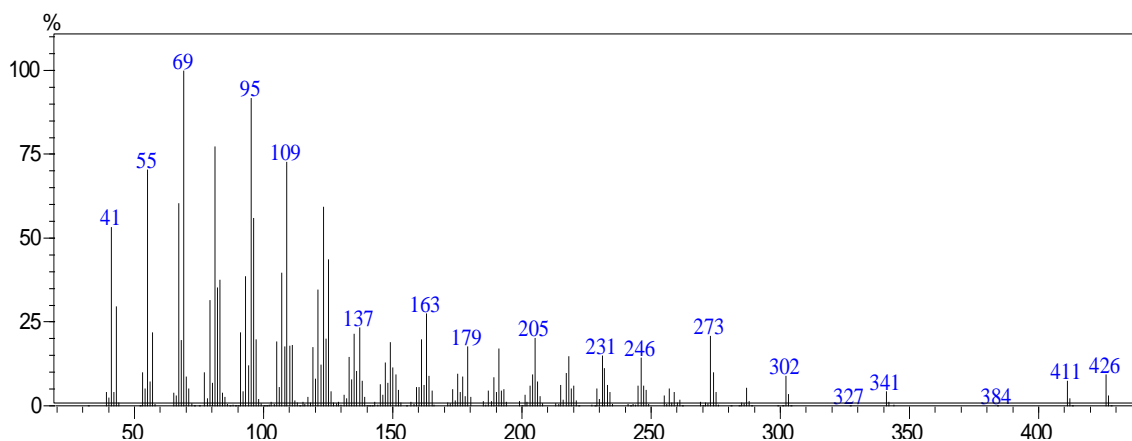


Figura 1.67. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEA1: friedelina

O espectro de RMN de 1H (Figura 1.68) apresentou uma sobreposição de sinais na região abaixo de 1,8 ppm, característico de estruturas terpênicas. Foram verificados seis singletos [δ 1,17 (3H); 1,04 (3H); 1,00 (6H), 0,94 (3H); 0,86 (3H); 0,72 (3H)], correspondentes a sete grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados, além de um duplete parcialmente sobreposto em δ 0,87 (*d*, $J = 6,1$ Hz; 3H), condizente com a metila da posição 23 de triterpenos da classe dos friedelanos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.69) apresentou trinta sinais de carbonos, atribuídos a uma estrutura triterpênica simples. Foi verificado um sinal em δ 6,8 característico da metila na posição 23 dos friedelanos, e um sinal em δ 213,3 atribuído a uma carbonila cetônica que comumente ocorre na posição 3.

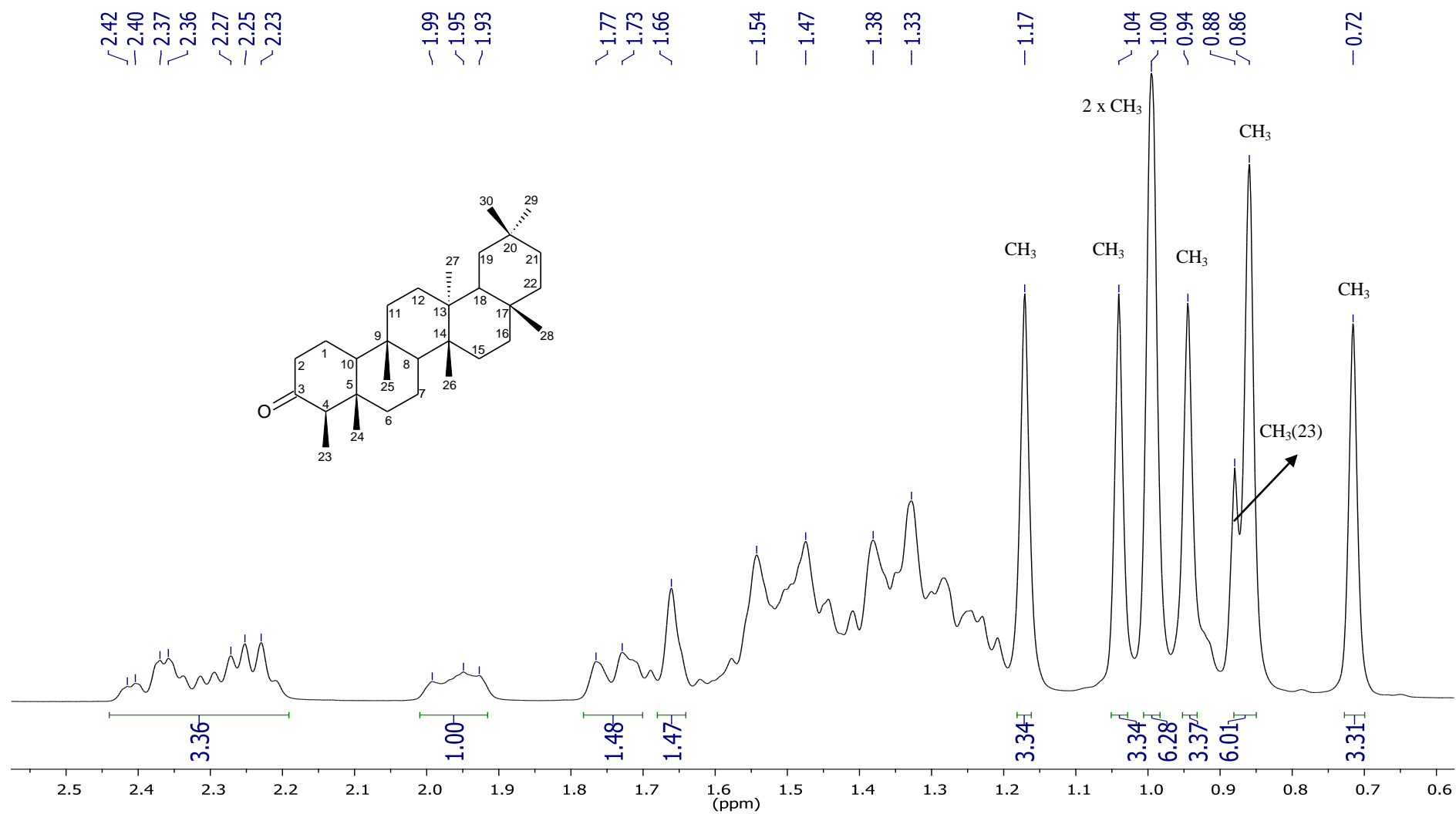


Figura 1.68. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância LEA1: friedelina

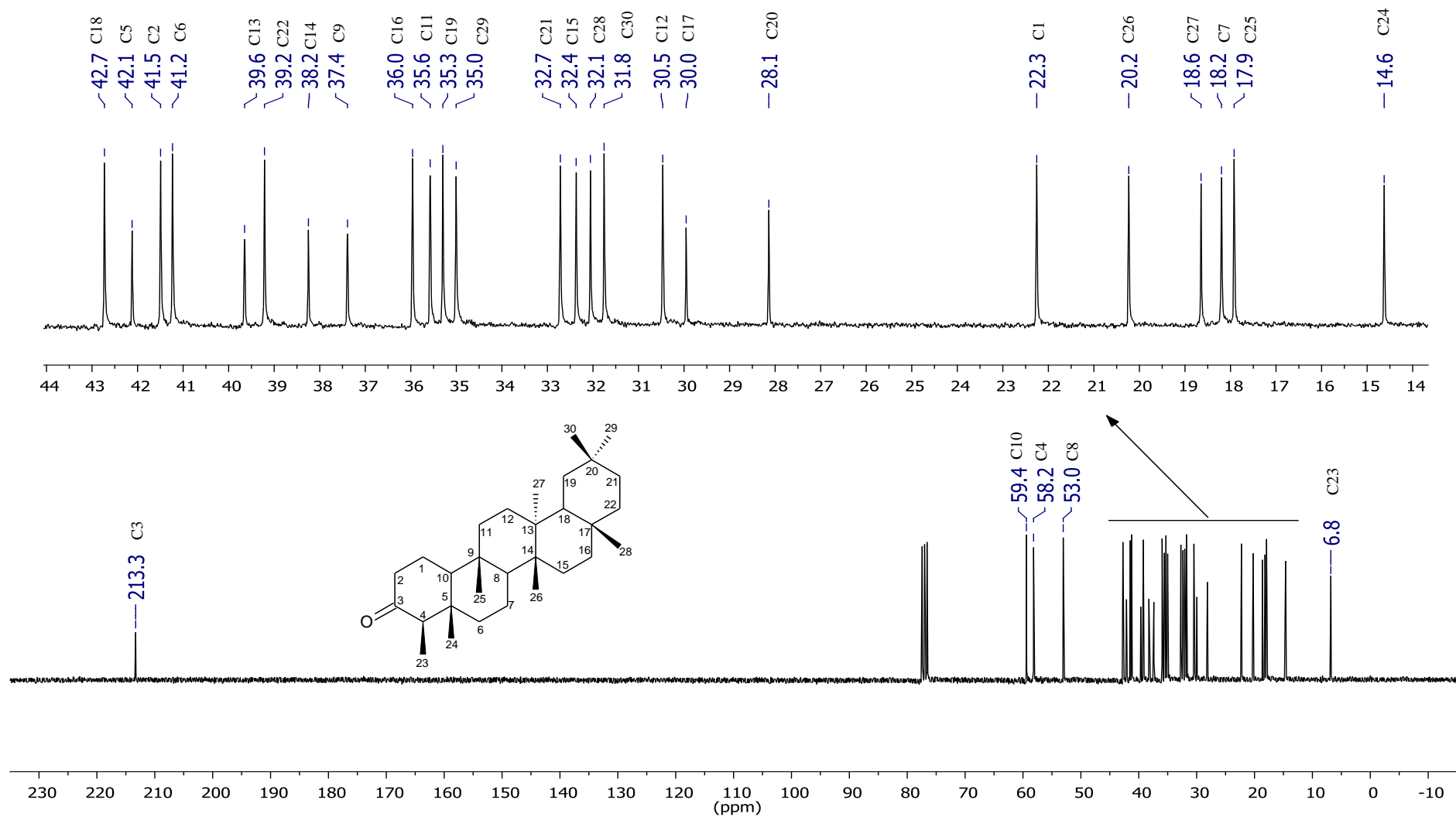


Figura 1.69. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância LEA1: friedelina

A comparação dos sinais de carbono com os descritos na literatura para triterpenos friedelanos com carbonila cetônica (Tabela 1.14), permitiu identificar o composto como sendo a friedelina (Figura 1.70).

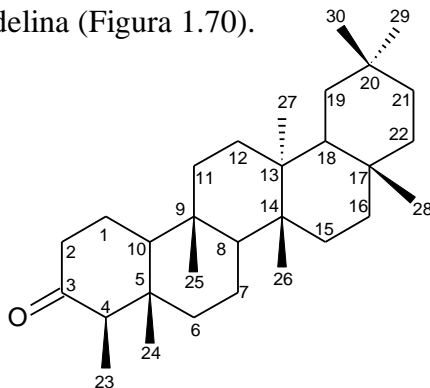


Figura 1.70. Fórmula estrutural da substância LEA1 (friedelina)

Tabela 1.14. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEA1 (CDCl_3 , 75 MHz) comparados com os dados descritos por Mahato e Kundu (1994) para a friedelina

Carbono	LEA1	friedelina	Carbono	LEA1	friedelina
1	22,3	22,3	16	36,0	36,0
2	41,5	41,5	17	30,0	30,0
3	213,3	213,2	18	42,7	42,8
4	58,2	58,2	19	35,3	35,3
5	42,1	42,1	20	28,1	28,1
6	41,2	41,3	21	32,7	32,7
7	18,2	18,2	22	39,2	39,2
8	53,0	53,1	23	6,8	6,8
9	37,4	37,4	24	14,6	14,6
10	59,4	59,4	25	17,9	17,9
11	35,6	35,6	26	20,2	20,2
12	30,5	30,5	27	18,6	18,6
13	39,6	39,7	28	32,1	32,1
14	38,2	38,3	29	35,0	35,0
15	32,4	32,4	30	31,8	31,8

1.6.2.2 Identificação da substância LEA2: friedelan-3 β -ol

A substância LEA2 (16 mg) foi isolada na forma de um sólido cristalino com temperatura de fusão na faixa de 278–279 °C, cujo pequeno intervalo indicou alto grau de pureza. O espectro de massas (Figura 1.71) apresentou um pico do íon molecular ($m/z = 428$), condizente com a fórmula $C_{30}H_{52}O$ e um padrão de fragmentação compatível com um friedelanol.

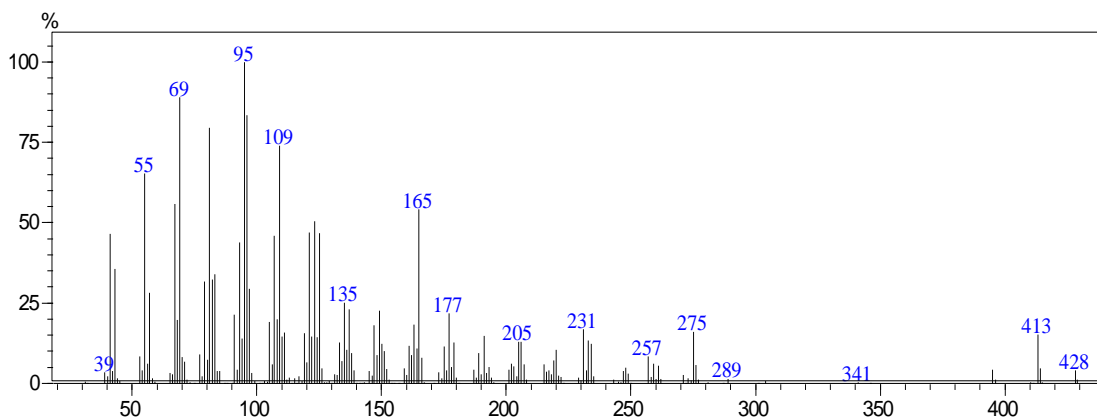


Figura 1.71. Espectro de massas por Impacto eletrônico da substância LEA2: friedelan-3 β -ol

O espectro de RMN de 1H (Figura 1.72) apresentou vários singletos sobrepostos na região de 0,86–1,17 ppm, correspondendo a sete metilas ligados a carbonos não hidrogenados, além de um duplete em δ 0,95 (d , $J = 3,3$ Hz) condizente com a metila na posição 23 dos friedelanos. Também foi verificado um multiplete em δ 3,72, característico de hidrogênios oximetínicos que comumente ocorre na posição 3 dos triterpenos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.73) apresentou sinais correspondentes a trinta carbonos, indicando uma estrutura triterpênica simples. Neste espectro foi verificado um sinal em δ 72,6, característico do grupo C-OH, um sinal em δ 11,5 do carbono C-23 dos friedelanos, e nenhum sinal correspondente à presença de carbonilas ou insaturações.

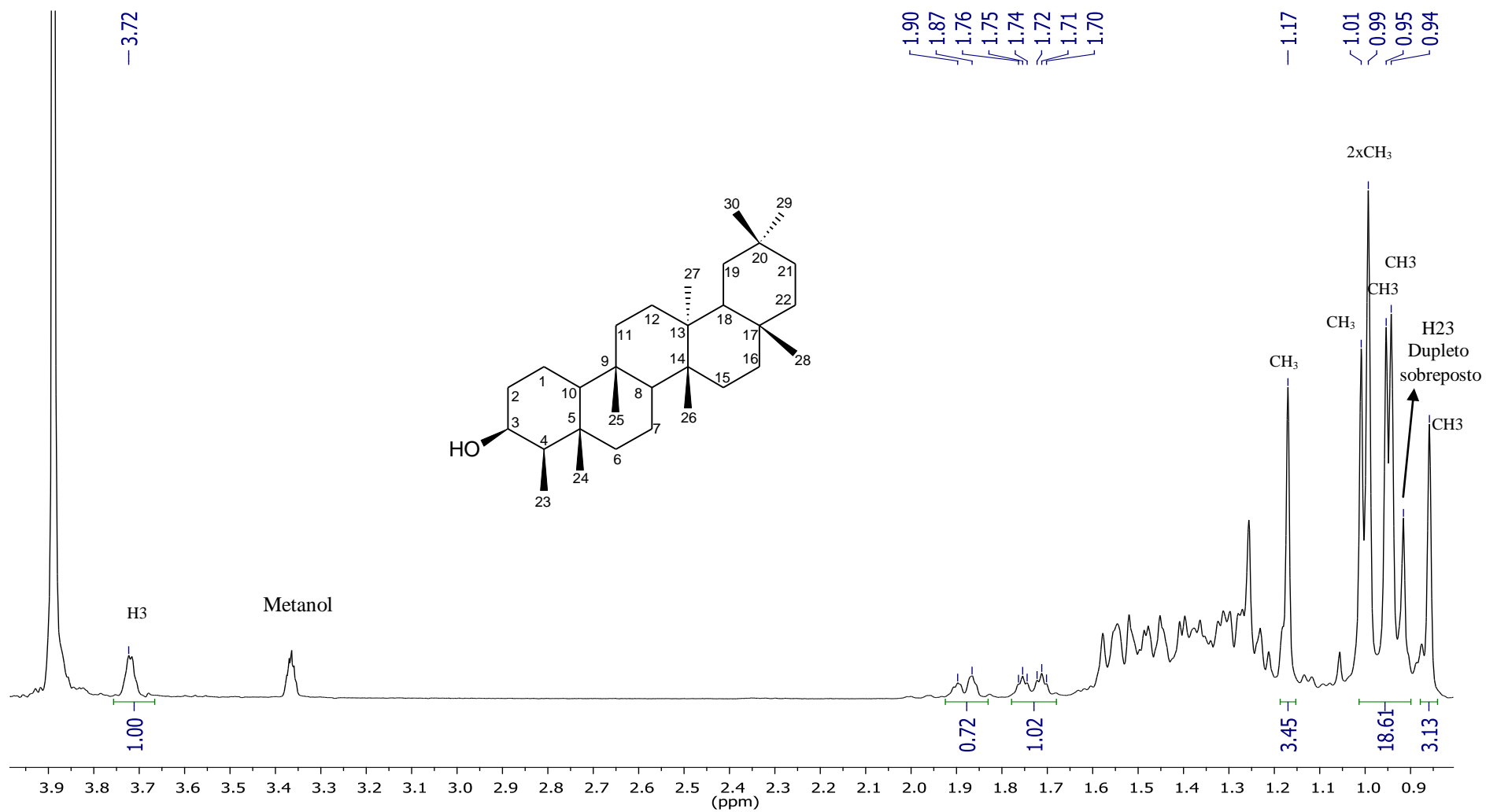


Figura 1.72. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) da substância LEA2: friedelan-3 β -ol

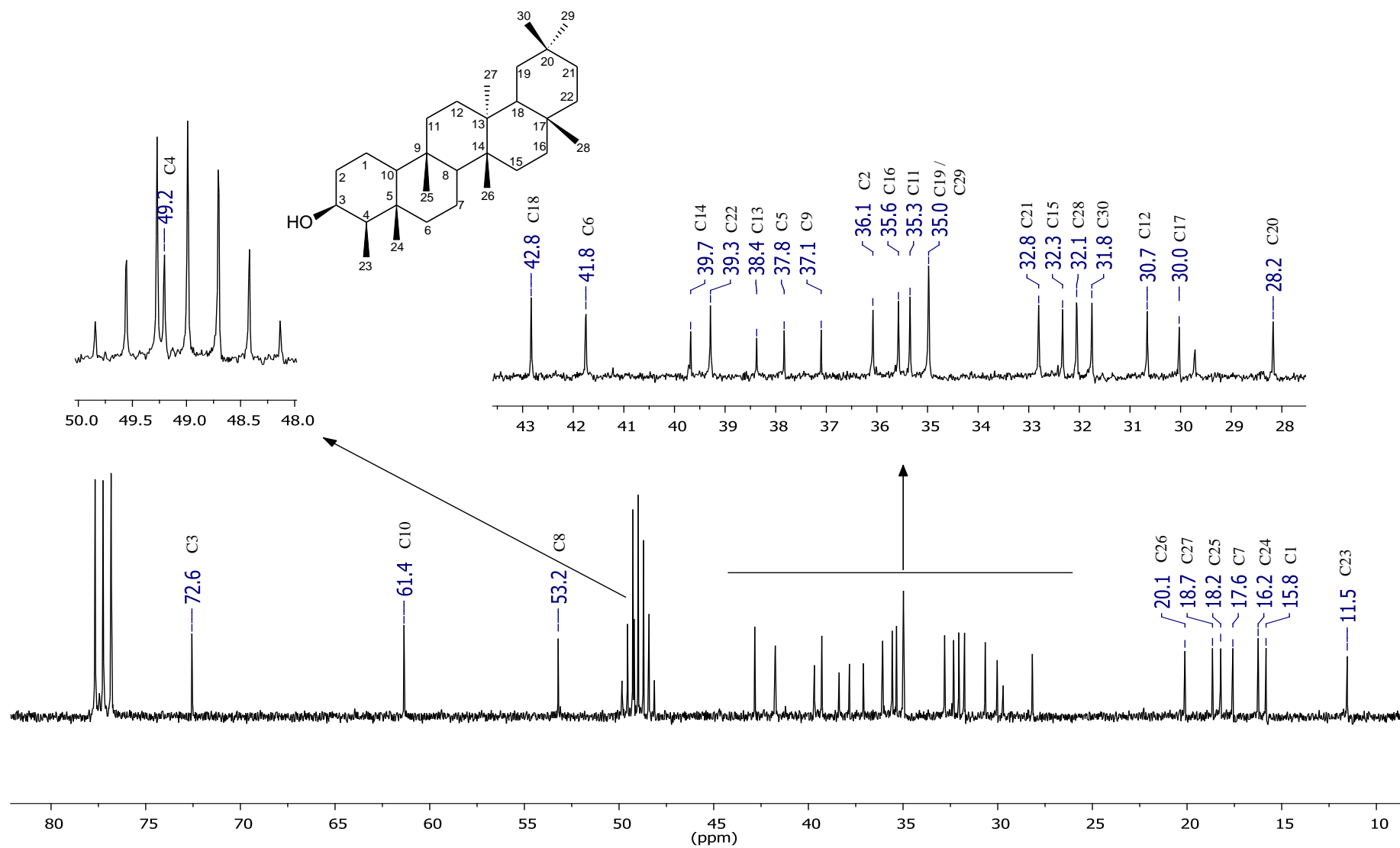


Figura 1.73. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) da substância LEA2: friedelan-3 β -ol

A comparação dos sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C com os descritos na literatura para os dois triterpenos friedelanos (Tabela 1.15) com as características verificadas nos espectros, permitiu identificar o composto como sendo o friedelan-3 β -ol (Figura 1.74).

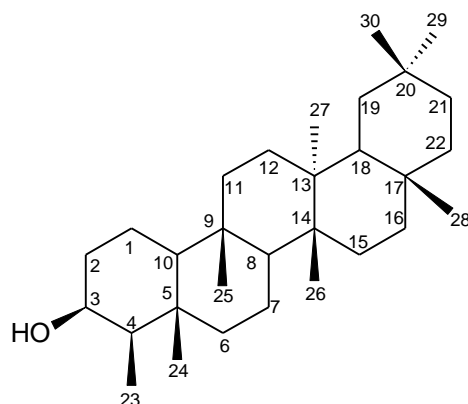


Figura 1.74. Formula estrutural da substância LEA2 (friedelan-3 β -ol)

Tabela 1.15. Dados de RMN de ^{13}C da substância LEA2 (75 MHz) comparados com os dados descritos na literatura para o friedelan-3 β -ol e friedelan-3 α -ol

Carbono	LEA2 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$)	Friedelan-3 β -ol* (CDCl_3)	Friedelan-3 α -ol** (CDCl_3)
1***	15,8	15,8	19,6
2	36,1	36,1	36,7
3	72,6	72,8	72,2
4***	49,2	49,1	53,2
5	37,8	37,8	37,4
6	41,8	41,7	41,4
7	17,6	17,5	17,8
8	53,2	53,2	53,0
9	37,1	37,1	38,7
10	61,4	61,3	60,1
11	35,3	35,3	35,3
12	30,7	30,6	30,6
13	38,4	38,4	39,7
14	39,7	39,7	38,3
15	32,3	32,3	32,8
16	35,6	35,5	36,1
17	30,0	30,0	30,1
18	42,8	42,8	42,9
19	35,0	35,2	36,1
20	28,2	28,2	28,1
21	32,8	32,8	32,4
22	39,3	39,3	39,3
23***	11,5	11,6	9,9
24	16,2	16,4	14,6
25	18,2	18,2	18,1
26	20,1	20,1	20,1
27	18,7	18,6	18,6
28	32,1	32,1	31,8
29	35,0	35,0	32,1
30	31,8	31,8	35,1

*(SOUSA et al., 2012); **(KIEM et al., 2004); *** sinais mais conclusivos para identificação

1.6.2.3 Identificação da substância LEA3: ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo

A substância LEA3 (144 mg) foi isolada na forma de um sólido castanho amorfo solúvel em dimetilsulfóxido. A temperatura de fusão apresentada pelo composto ficou na faixa de 181–183 °C, próxima a que foi obtida para a substância LEM6 isolada da *E. macrocalyx*. A comparação do espectro de RMN de ^1H desta substância, com os obtidos para a substância LEM6 (Figura 1.75) permitiu confirmar que se tratava novamente do flavonoide ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo (Figura 1.76).

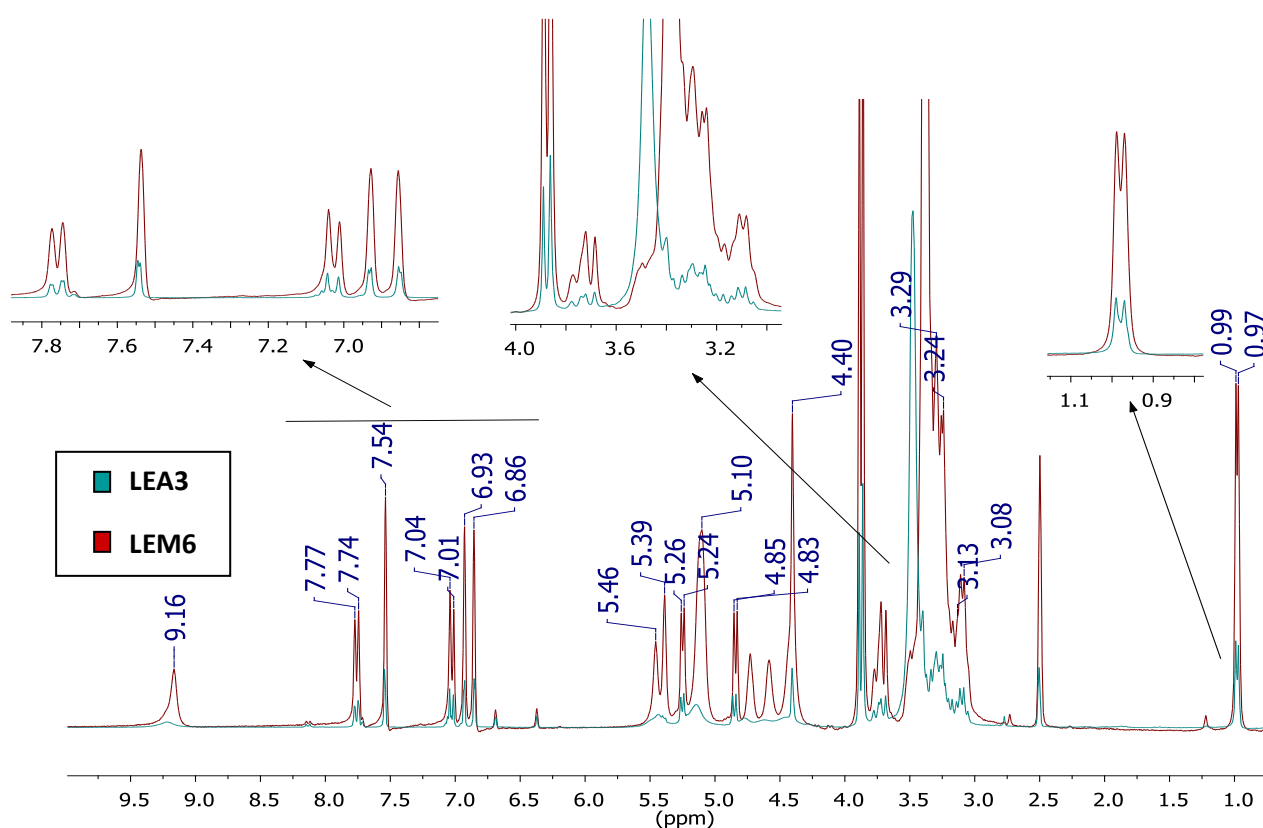


Figura 1.75. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-D_6) da substância LEA3 e substância LEM6 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo)

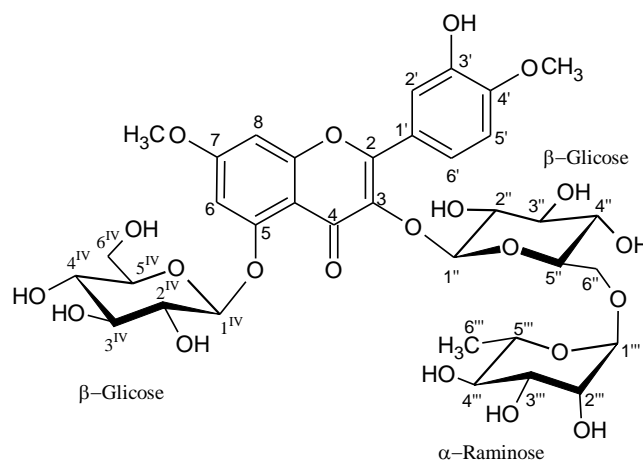


Figura 1.76. Fórmula estrutural da substância LEA3 (ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo)

1.6.2.4 Identificação da substância LEA4: ombuina-3-rutinosídeo

A substância LEA4 (40 mg) foi isolada na forma de um sólido amorfo amarelado com temperatura de fusão na faixa de 164–168 °C. O espectro de RMN de ^1H (Figura 1.77) apresentou sinais condizentes com o núcleo do flavonoide ombuina, {sinais dos hidrogênios H6 e H8 do anel A [δ 6,36 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-6) e δ 6,68 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-8)], sinais dos hidrogênios H2', H5' e H6' do anel B [δ 7,55 (*d*, $J = 1,8$ Hz, H-2'); δ 7,03 (*d*, $J = 8,7$ Hz, H-5') e δ 7,71 (*dd*, $J = 8,7, 1,8$ Hz, H-6)] e o sinal referente às duas metoxilas nas posições 7 e 4' [δ 3,85 (*s*, 6H)]}. Neste espectro também foi possível verificar o sinal correspondente à hidroxila fenólica na posição 3' [δ 9,32 (*s*)] e um sinal em δ 12,52 característico da hidroxila da posição 5 de flavonoides quando se encontra quelada à carbonila do anel C. Esse último sinal permitiu concluir que esse composto era diferente da substância LEA3, pois não possuía um glicosídeo ligado ao oxigênio da posição 5.

A presença de um grupamento glicosídico foi verificada pelos sinais sobrepostos dos hidrogênios oximetínicos dos açúcares na região de 3,02–3,70 ppm, além dos vários sinais na região de 4,37–5,38 ppm, correspondente aos hidrogênios das hidroxilas. O sinal em δ 5,37 (*d*, $J = 7,3$ Hz) é característico do hidrogênio do carbono anomérico da glicose, cuja constante de acoplamento indica uma configuração beta do oxigênio (AGRAWAL, 1992). O açúcar ao qual a glicose está ligada foi identificada como sendo a ramnose pela presença do sinal característico de seu grupo metila em δ 0,95 (*d*, $J = 6,1$ Hz). O sinal do hidrogênio do carbono anomérico da ramnose apresentou um valor de deslocamento químico [δ 4,37 (*sl*, 1H)] que indica uma configuração alfa, assim como é verificado para o grupo α -raminose na estrutura da rutina (δ 4,38) (MOURA et al., 2011).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.78) apresentou dois sinais correspondentes aos carbonos anoméricos dos açúcares (δ 100,95 e δ 100,63). A presença da ramnose foi confirmada pelo sinal característico de sua metila em δ 17,61, enquanto que a glicose foi confirmada pelo sinal do seu grupo oximetilênico em δ 66,71. Na região de 68,08–76,26 ppm foram encontrados os sinais correspondentes aos demais carbonos do dissacarídeo rutinosídeo, e os sinais na região de maior deslocamento químico do espectro são atribuídos aos carbonos do flavonoide ombuina, que forma o núcleo desta substância.

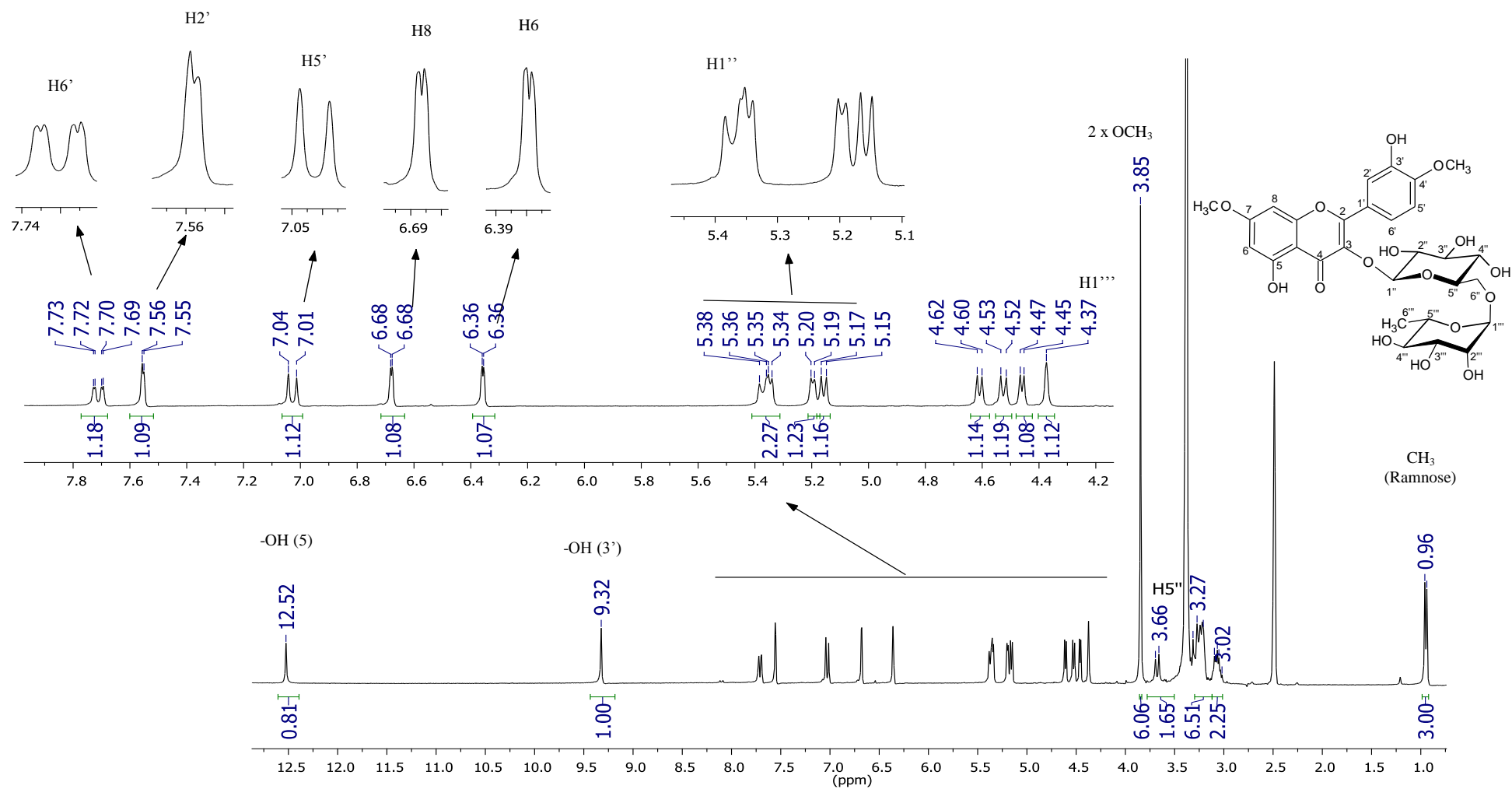


Figura 1.77. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO- D_6) da substância LEA4: ombuina-3-rutinosido

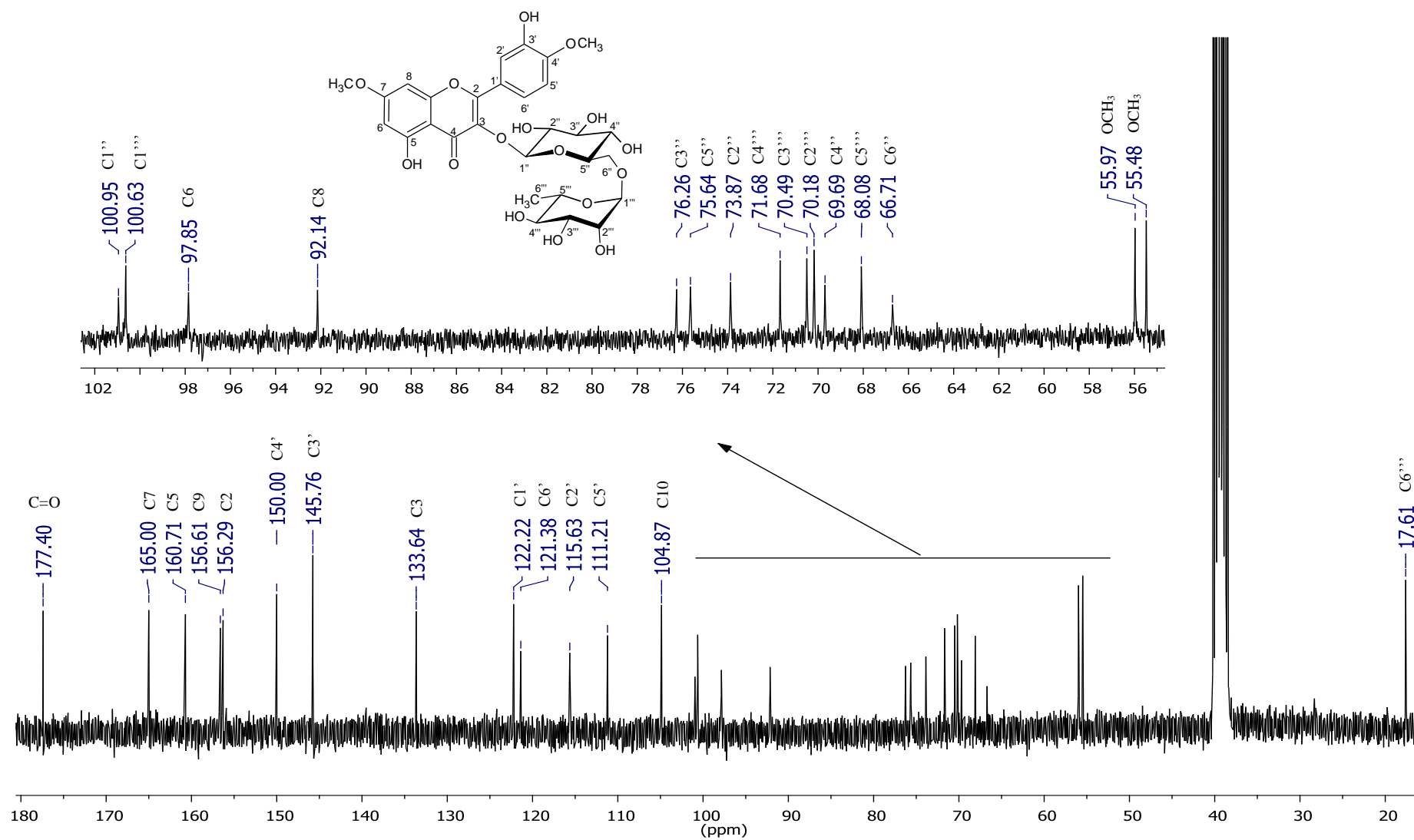


Figura 1.78. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$) da substância LEA4: ombuina-3-rutinosideo

A comparação dos sinais de RMN deste composto com os descritos na literatura para o flavonoide ombuina-3-rutinosídeo (Figura 1.79), permitiu identificar com segurança a estrutura do composto (Tabela 1.16).

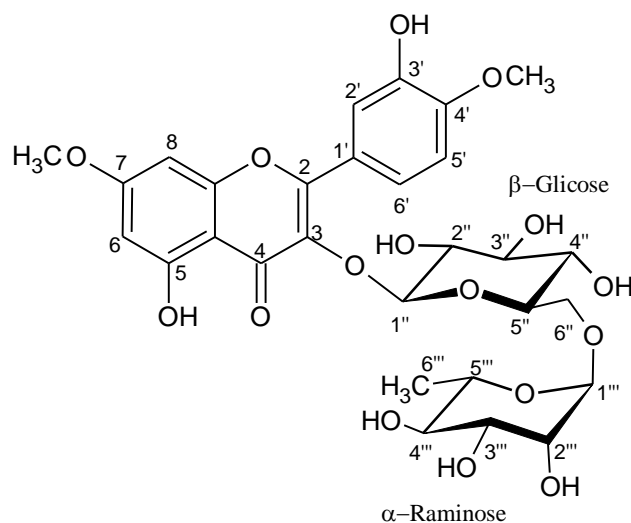


Figura 1.79. Fórmula estrutural da substância LEA4 (ombuina-3-rutinosídeo)

Tabela 1.16. Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância LEA4 (DMSO- D_6 , 300 e 75 MHz) comparados com os dados descritos por González-Guevara et al. (2006) para o ombuina-3-rutinosídeo

Posição/Grupo	LEA4		Ombuin-3-rutinosídeo	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multip., J)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multip., J)
2	156,29		156,26	
3	133,64		135,71	
5	160,71		160,76	
6	97,85	6,36 (d, J = 1,6 Hz)	97,74	6,36 (d, J = 2,2 Hz)
7	165,00		165,00	
8	92,14	6,68 (d, J = 1,6 Hz)	92,10	6,67 (d, J = 2,2 Hz)
9	156,61		156,51	
10	104,87		104,88	
1'	122,22		122,74	
2'	115,63	7,55 (d, J = 1,8 Hz)	115,70	7,55 (d, J = 2,3 Hz)
3'	145,76		145,74	
4'	150,00		150,01	
5'	111,21	7,03 (d, J = 8,7 Hz)	111,28	7,05 (d, J = 8,7 Hz)
6'	121,38	7,71 (dd, J = 8,7; 1,8 Hz)	121,34	7,72 (dd, J = 8,7; 2,3 Hz)
C=O	177,40		177,39	
OCH ₃	55,48	3,85 (s)	55,51	3,87 (s)
OCH ₃	55,97	3,85 (s)	55,87	3,88 (s)
1''	100,95	5,37 (d, J = 7,3 Hz)	101,07	5,39 (d, J = 7,3 Hz)
2''	73,87		73,93	
3''	76,26		76,32	
4''	69,69		69,77	
5''	75,64		75,74	
6''	66,71		66,74	
1'''	100,63	4,37 (sl, 1H)	100,59	4,41 (J = 1Hz)
2'''	70,18		70,21	
3'''	70,49		70,49	
4'''	71,68		71,72	
5'''	68,08		68,04	
6'''	17,61	0,95 (d, J = 6,1 Hz)	17,49	0,99 (d, J = 6,3 Hz)

1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTUDO FITOQUÍMICO

O estudo fitoquímico realizado com os galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* levou ao isolamento de substâncias pertencentes às três principais classes de metabólitos comumente encontradas em espécies deste gênero (alcaloides, flavonoides e terpenos). Foi isolada uma maior variedade de metabólitos de *E. macrocalyx*, sendo possível o isolamento e identificação de dez substâncias diferentes, sendo cinco alcaloides tropânicos, três triterenos, um flavonoide glicosilado, e um monossacarídeo. Um dos alcaloides isolados desta planta, o composto LEM1 (7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol) se trata de uma nova substância, sem qualquer relato de isolamento ou síntese descrito na literatura, despertando assim um grande interesse para estudo biológico, uma vez que se trata de um composto pertencente à uma classe de metabólito com bastante potencial farmacológico. Com exceção dos triterenos e do monossacarídeo, que são substâncias comuns à várias espécies de plantas, grande parte das outras substâncias isoladas apresenta pouco ou nenhum estudo farmacológico, e algumas delas, como os compostos LEM2 (6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol) e LEM5 [6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano] estão tendo seu segundo relato de isolamento neste trabalho. Estes resultados contribuem para a valorização desta espécie, que é endêmica da flora brasileira. Entre os alcaloides, apenas o composto LEM3 (3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol) possui um estudo farmacológico descrito na literatura, o qual verificou que este composto foi inativo em testes de citotoxicidade com várias linhagens de células cancerígenas (SILVA et al., 2001). Enquanto que entre os triterenos, o lupeol é o mais amplamente estudado sendo atribuído a este um bom potencial anti-inflamatório e antimicrobiano (SIDDIQUE & SALEEM, 2011).

Os resultados para o estudo da *E. affine* mostraram que a planta é rica principalmente em flavonoides glicosilados e triterenos. Os flavonoides identificados já haviam sido isolados de outras espécies de *Erythroxylum* (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2014) contudo, trabalhos que testaram atividade farmacológica desses compostos são escassos. Já os triterenos, friedelina e friedelan-3 β -ol são compostos mais comuns de se encontrar em plantas e apresentam alguns estudos descritos na literatura, onde foi investigada sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (NASSER et al., 2013; DUWIEJUA et al., 1999). É importante lembrar que nenhuma das plantas investigadas neste trabalho apresenta qualquer estudo na literatura, portanto, essa é a primeira caracterização química, com isolamento e identificação de substâncias, para a *E. affine* e também para a *E. macrocalyx*.



Capítulo 2

CAPÍTULO 2: ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Erythroxylum affine* e *Erythroxylum macrocalyx*

2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as funções biológicas atribuídas aos compostos naturais, o potencial farmacológico é um dos que mais gera interesse no estudo fitoquímico dos vegetais. Como resultado, já existem no mercado vários extratos padronizados utilizados como fitoterápicos e compostos de origem naturais que são modelos para medicamentos considerados imprescindíveis no tratamento de algumas enfermidades (PINTO et al., 2002; BRANDÃO et al., 2010).

O crescimento na descoberta de compostos naturais com grande poder medicinal fez com que as indústrias e os grandes centros acadêmicos acentuassem suas pesquisas na área, buscando novas substâncias que pudessem ser utilizadas em medicamentos. Esta busca se intensificou nas últimas décadas, especialmente em países como o Brasil, com florestas tropicais que detêm grande parte da biodiversidade mundial (PINTO et al., 2002).

Neste cenário, a avaliação laboratorial *in vitro* do potencial biológico de extratos vegetais representa uma importante etapa no processo de desenvolvimento de um medicamento. Dentre outras coisas, estes testes indicaram se é válido investir no estudo de uma determinada planta ou composto isolado desta.

Este capítulo apresenta o estudo farmacológico dos extratos e alguns dos compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx*. Estes testes representam resultados iniciais do potencial das plantas estudadas como fonte de moléculas com atividade antibacteriana, antioxidante, antiproliferativa e/ou anticolinesterásica, baseando-se na necessidade atual do desenvolvimento de fármacos que desempenhem estas funções.

2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONCEITOS PRÉVIOS

2.2.1 Bactérias

As bactérias representam alguns dos mais simples organismos vivos existentes e provavelmente são as que mais se assemelham às primeiras formas de vida na terra (CURTIS, 1977). Sob condições ideais de temperatura e nutrientes, podem apresentar grande taxa de crescimento (TORTORA et al., 2017), fazendo com que estes micro-organismos se multipliquem rapidamente, causando as infecções.

Muitas doenças graves têm bactérias como agentes etiológicos, podendo-se citar o botulismo (causado por *Clostridium botulinum*), coqueluche (causada por *Bordetella pertussis*), hanseníase (causada por *Mycobacterium leprae*), pneumonia (causada por *Streptococcus pneumoniae*), tétano (causado por *Clostridium tetani*), tuberculose (causada por *Mycobacterium tuberculosis*), entre outras (AMABIS & MARTHO, 2004).

A parede bacteriana é utilizada como um dos parâmetros para subclassificar as bactérias e, a depender da sua composição, organização e permeabilidade, podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-Negativas. As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular recoberta por várias camadas de peptidoglicano (um heteropolissacarídeo ligado à peptídeos), enquanto que as Gram-negativas possuem uma membrana externa sobre uma camada de peptidoglicanos além de outras camadas de diferentes composição química, sendo, por isto, mais complexas (TORTORA et al., 2017; AMABIS & MARTHO, 2004).

O mecanismo de ação de alguns antibióticos tem relação direta com a parede celular das bactérias, e atuam em processos que impedem a formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicanos que formam a parede celular (GUIMARÃES et al., 2010). Por esta razão, é importante, durante os testes farmacológicos *in vitro*, avaliar a ação antibacteriana do composto sobre cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de forma a verificar o poder de ação frente às singularidades estruturais de cada um destes tipos de envelopes celulares.

2.2.2 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas utilizadas para destruir ou inibir o crescimento dos micro-organismos. Podem ser encontrados em diversos produtos comerciais, com aplicações que variam de simples produtos de limpeza (TIMENETSKY, 1990) até fármacos utilizados em pacientes hospitalizados (CARNEIRO et al., 2011).

As substâncias selecionadas para atuarem no tratamento de infecções bacterianas devem apresentar toxicidade seletiva e ter efeito significativo em baixas concentrações, a fim de garantir a atuação específica do antibiótico apenas contra as células bacterianas, sem afetar as células do hospedeiro (NOGUEIRA & MIGUEL, 2009).

Muitas substâncias orgânicas, obtidas de fontes naturais ou de origem sintética, apresentam importantes propriedades antibacterianas sendo muito utilizadas nos tratamentos de pacientes em quadro de infecção. Os compostos utilizados mais comuns para este tipo de tratamento são pertencentes à classe das penicilinas, tetraciclina e cloranfenicol (Figura 2.1) (AUTO et al., 2008).

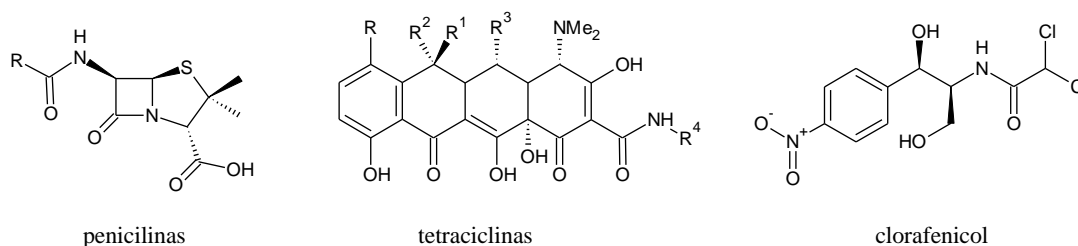


Figura 2.1. Núcleo estrutural de algumas classes de substâncias utilizadas como antibióticos

2.2.3 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva comum de ser encontrada na microbiota normal do corpo humano (BROOKS et al., 2001; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Está amplamente disseminada pela natureza, e desenvolve-se em uma ampla faixa de temperatura, 7° C a 47,8° C (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Esta bactéria é responsável por causar a intoxicação estafilocócica, uma das mais comuns formas de intoxicação alimentar. Neste quadro de infecção, as toxinas expelidas nos alimentos pela *S. aureus* podem provocar ao ser humano uma intensa dor abdominal seguida de vômitos e diarreia. É também a bactéria responsável por causar a síndrome do choque tóxico, uma doença que provoca anemia, lesões do rim, hepáticas e musculares, podendo também aparecer problemas no coração e nos pulmões (MURRAY et al., 2004).

Na área hospitalar, a *S. aureus* é um dos maiores agentes causadores de infecções, e o uso indiscriminado de antibióticos proporcionou o desenvolvimento de um subtipo de *S. aureus* resistente a antibióticos convencionais como a meticiclina (CRUVINEL et al., 2011).

2.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria bacilo Gram-negativa que está frequentemente presente na flora intestinal normal e na pele dos seres humanos. Encontra-se amplamente disseminada na natureza, podendo ser encontrada no solo, na água, nos vegetais e nos animais (BROOKS et al., 2001; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Esta bactéria está presente em quadros de infecções em feridas, queimaduras, vias urinárias ou respiratórias. Os sintomas para infecções por *P. aeruginosa* estão relacionados com o órgão acometido pela infecção, sendo comum casos de necrose tecidual gerada pelas toxinas liberadas pelas bactérias (BROOKS et al., 2001; MURRAY et al., 2004).

A *P. aeruginosa* é naturalmente resistente à muitos antibióticos utilizados contra bactérias Gram-negativas, além de facilmente desenvolver resistência frente aos antibióticos utilizados no transcurso de algumas terapias (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Devido a associação a várias doenças infecciosas, e a frequência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes hospitalizados com resistência a diferentes antibióticos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; CRUVINEL et al., 2011; HIRSCH & TAM, 2010), a busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana sobre estas bactérias torna-se fundamental.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: CONCEITOS PÉRVIOS

2.3.1 Radicais livres

O termo radical livre é atribuído a espécies químicas de elevada reatividade que possuem ao menos um elétron desemparelhado e existem de forma independente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). Estas espécies podem ser liberadas pelo metabolismo celular e, devido a sua alta reatividade, degradam moléculas biológicas importantes causando danos fisiológicos (VASCONCELOS et al., 2014).

Algumas destas espécies, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}) e hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), são formadas nas células aeróbias em etapas de reações de oxirredução monoelétrônicas (PYTEL et al, 2005). Os processos de redução do oxigênio nas mitocôndrias para gerar energia e produzir água, representa uma importante sequência de reações que leva à formação destes radicais (Figura 2.2) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

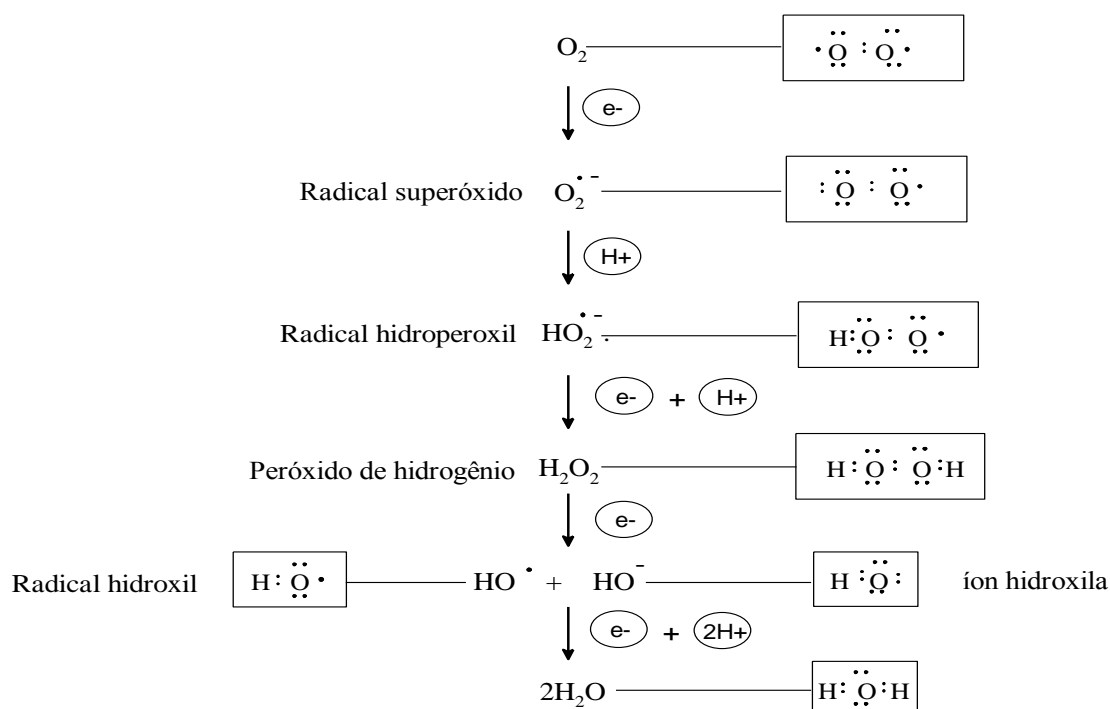
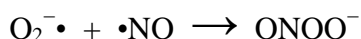


Figura 2.2. Processo de redução do oxigênio para formação de água no meio biológico
 FONTE: esquema adaptado de FERREIRA & MATSUBARA (1997)

Dentre as espécies reativas do metabolismo do oxigênio, o radical hidroxil é considerado como a mais reativa e também a mais danosa à estrutura celular. Está muitas vezes envolvido no processo de peroxidação lipídica das membranas celulares, que faz com que a membrana perca um pouco de sua seletividade de troca iônica, além de ser associado à aceleração do envelhecimento ou desenvolvimento de câncer (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Outros radicais podem ser produzidos em diferentes rotas metabólicas do organismo vivo, como é o caso do radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$). Este radical é gerado a partir da arginina, e apresenta muitas funções benéficas, estando envolvido no relaxamento muscular e proteção de vasos sanguíneos. No entanto, é uma espécie que apresenta grande potencial tóxico, podendo reagir com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gerando o peroxinitrito ($\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$), um isômero do íon nitrato, que ao ser protonado se decompõe rapidamente gerando radicais nitrito e hidroxila que são danosos ao sistema biológico (DUSSE et al., 2003; SILVA et al., 2011).

Equação química 1: Formação e decomposição do peroxinitrito a partir do óxido nítrico (SILVA et al., 2011^a):



Contudo, devido ao pouco tempo de vida destas espécies reativas, dificilmente elas conseguem longos percursos de migração no organismo, atingindo geralmente às biomoléculas que estão próximas ao local em que foram produzidas.

2.3.2 Estresse oxidativo e os danos ao corpo humano

Num quadro normal de funcionamento do organismo vivo todos os radicais formados nos processos metabólicos seriam neutralizados até a formação do produto final, e mesmo aqueles formados em pequeno excesso seriam eliminados rapidamente por outras moléculas do corpo sem causar muitos danos. No entanto, em situações de estresse oxidativo, causado tanto por disfunções do metabolismo ou por fatores ambientais, o organismo irá produzir uma grande quantidade de espécies oxidantes, superior a necessidade biológica e à capacidade antioxidante do organismo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SILVA et al., 2011; SIES, 1991). Este excesso na produção de radicais favorecerá a degradação de biomoléculas importantes, causando danos que

podem levar ao surgimento de patologias (VASCONCELOS et al., 2014). A exemplo, pode-se citar a inativação de algumas enzimas a partir da oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) a ligações de sulfeto (-S-S-), processos de lipoperoxidação que podem ser desencadeados a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, além de modificações em algumas bases nitrogenadas do DNA que podem gerar mutações (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Estudos indicam que estas degradações sofridas por importantes moléculas biológicas podem estar envolvidas no surgimento ou agravamento de doenças pulmonares ou doenças relacionadas ao processo de envelhecimento (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Ribeiro e colaboradores (2005) em uma busca na literatura verificaram a associação do estresse oxidativo à quadros patológicos como aterosclerose, doença de Alzheimer, Mal de Parkinson e câncer. Contudo, ainda há muita precaução em confirmar estas associações (RIBEIRO et al., 2005).

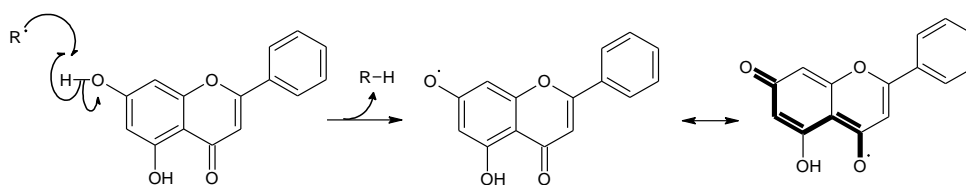
Alguns dos fatores que vem estimulando as pesquisas no campo das espécies reativas do oxigênio e sua influência no metabolismo humano são, sem dúvida, os fortes indícios que os danos oxidativos gerados pelos radicais livres exercem influência na aceleração do envelhecimento. Dentre os dados utilizados para sustentar esta teoria, se destacam a correlação entre a diminuição do poder antioxidante do organismo com o aumento da idade, o aumento da longevidade em animais com o aumento da expressão antioxidante de enzimas, o aumento dos danos causados pelos radicais livres com o aumento da idade, dentre outros (WICKENS, 2001).

2.3.3 Atividade antioxidante e os Inibidores radicalares

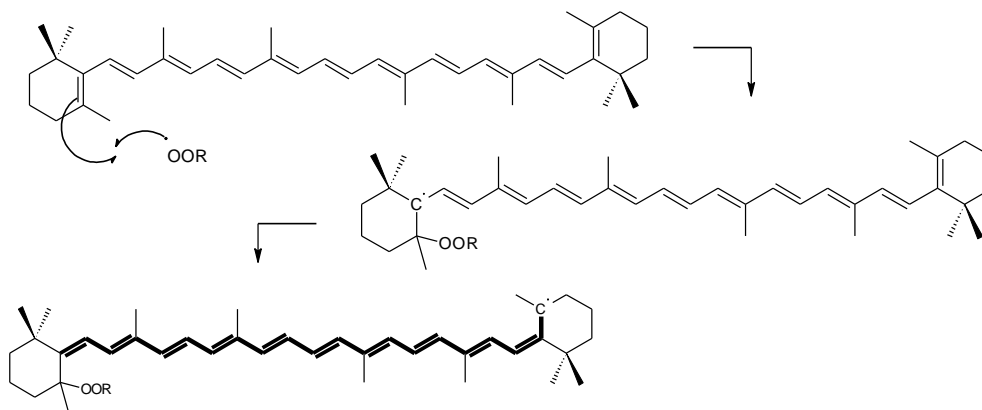
O combate aos agentes oxidantes produzidos no corpo humano é realizado por enzimas ou por micromoléculas, como flavonoides, carotenoides, ácido úrico, ácido ascórbico e tocoferóis (vitamina E) (BARREIROS et al., 2006).

Os principais mecanismos de atuação antioxidante das enzimas giram em torno da eliminação de algumas das espécies reativas do metabolismo do oxigênio ou da reparação dos danos causados por estas. Já as micromoléculas têm sua atuação direcionada à inativação das espécies radicalares, na estabilização de alguns metais que atuam como precursores destas espécies, ou mesmo na captura de alguns produtos gerados nos processos de oxirredução fisiológica (Figura 2.3) (BARREIROS et al., 2006).

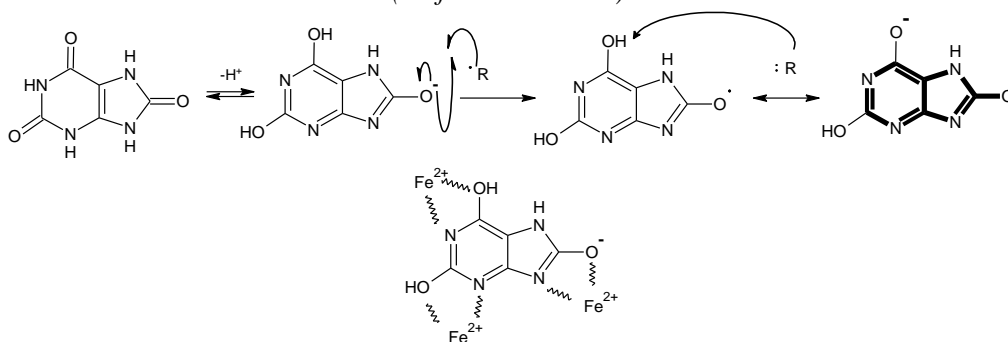
Inativação de um radical livre por uma das hidroxilas fenólica de um flavonoide:



Captura do peróxido pelo sistema de ligações conjugadas do β-caroteno impedindo que ele inicie a cadeia e reações radiculares na membrana celular:



Inativação de um radical livre e complexação de metais pela molécula do ácido úrico (na forma do urato):



Inativação de um radical livre pela molécula do ácido ascórbico (na forma do ascorbato):

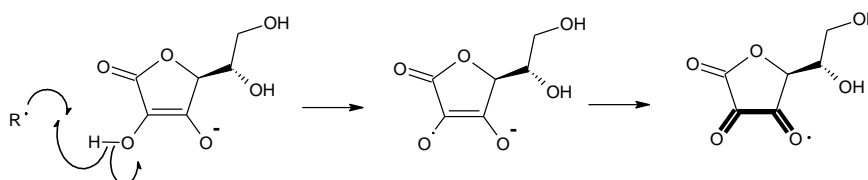


Figura 2.3. Mecanismo de ação de algumas micromoléculas antioxidantes. As linhas escuras representam o percurso do elétron ao longo da cadeia indicando sua estabilização
 FONTE: Mecanismos baseados em: BARREIROS et al., (2006)

Como pode ser visto na Figura 2.3, as estruturas das micromoléculas antioxidantes são favoráveis à estabilização ou captura de radicais, formando espécies radicalares mais estáveis, onde os elétrons desemparelhados são estabilizados em longos percursos de migração na cadeia. Muitas destas estruturas também apresentam capacidade de complexação de metais nos locais próximos à formação de radicais livres, impedindo a proliferação de reações radicalares indesejadas, como na reação de Fenton:

Equação química 2: Reação de Fenton (ALVES et al., 2010):



2.3.4 Suplementação antioxidante

Ainda que o organismo produza por si só, ou adquira por meio de dieta, micro e macromolécula antioxidantes, nem sempre elas serão suficientes para estabilizar uma situação de estresse oxidativo. A partir desta ideia, surge então o interesse na suplementação antioxidante.

Este tipo de suplementação, contudo, ainda não é bem aceito por muitos membros da comunidade médica, que afirmam não haver evidências suficientes para recomendar a administração em altas doses de substâncias, tidas como antioxidantes, ao organismo humano, e que compostos como vitamina C, vitamina E e o β -caroteno, deveriam ser obtidos preferencialmente dos alimentos (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2009).

Entretanto, ainda que haja dúvidas acerca da participação dos radicais livres no desenvolvimento de algumas doenças, é inegável que estas espécies são danosas a biomoléculas do organismo, e que seu controle deve ser realizado. Desta forma, a suplementação antioxidante viria com o objetivo de auxiliar a defesa antioxidante do próprio organismo, uma vez que o corpo humano não produz muitas classes de micromoléculas que são excelentes inibidores de espécies reativas do metabolismo do oxigênio.

O grande problema é que algumas das substâncias que são defendidas para suplementação antioxidante apresentam alguns efeitos indesejados. Por exemplo, alguns compostos fenólicos podem apresentar, em doses mais elevadas e em determinadas condições, efeito pró-oxidante, a vitamina C em doses muito elevadas pode causar problemas gastrointestinais, a vitamina E em doses elevadas pode provocar coagulação do sangue e o β -caroteno, que mesmo não apresentando toxicidade, não é recomendado consumo em doses acima do que é obtida nos alimentos (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2009).

Assim, a busca por novos antioxidantes faz-se necessária, objetivando encontrar compostos que atuem em baixas concentrações, com mínimo de malefícios ao corpo humano, e que apresentem boa adaptação ao organismo vivo, além de amplo efeito antioxidante.

2.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA: CONCEITOS PRÉVIOS

2.4.1 Neoplasias

O processo de replicação celular é um mecanismo de crescimento e multiplicação comum a todos os organismos vivos. Normalmente é um processo bem controlado, e as células normais se desenvolvem e multiplicam até um estágio adequado, sendo controladas por processos biológicos naturais. Algumas células, contudo, podem apresentar anomalias genéticas que lhes permitem escapar dos processos regulatórios, proliferando-se de forma descontrolada. É a este processo que se dá o nome de neoplasia (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2013).

Quando o processo de crescimento descontrolado ocorre de forma restrita a um local, a neoplasia é classificada como benigna, não causando danos letais nem muitos transtornos ao organismo vivo. Entretanto, quando o crescimento ocorre de uma forma muito acelerada, com infiltrações em tecidos vizinhos e vias sanguíneas, além de perda de especialização, ou diferenciação celular, a neoplasia será caracterizada como maligna, ou câncer, podendo gerar perda das funções dos tecidos invadidos e outras graves perturbações ao funcionamento do organismo que podem levá-lo à morte (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2013; INCA, 2012).

O desenvolvimento de células cancerígenas se deve principalmente a alterações genéticas ao longo da vida do indivíduo que modificam o sistema natural de controle celular. Estas mutações podem ser geradas ou favorecidas por alguns fatores ambientais, alimentação, exposição a agentes químicos carcinogênicos, infecções virais e hábito de vida considerado pouco saudável (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2013; INCA, 2012).

Os prognósticos de uma neoplasia maligna irão depender do tipo de câncer e do estágio em que ele foi detectado. Especificamente, neste trabalho a atividade antiproliferativa foi estudada sobre células de cinco tipos de câncer, selecionadas de acordo com a disponibilidade do laboratório onde foram realizados os testes, sendo elas células de carcinoma hepatocelular, leucemia mielocítica, leucemia prómielocítica carcinoma de cólon humano e carcinoma de mama humano.

O carcinoma hepatocelular é um câncer derivado de células do fígado que pode surgir em casos de pessoas infectadas com vírus da hepatite e tem a característica de ser muito agressivo com alto índice de morte se for detectado apenas após o surgimento dos sintomas (GOMES et al., 2013).

O câncer de cólon e reto está entre os dez primeiros tipos de câncer incidentes no Brasil, podendo evoluir sem surgimento de sintomas, o que dificulta o diagnóstico; ocorre principalmente em homens acima de 50 anos e mulheres acima dos 40 anos, e surgindo mais comumente pela ação cumulativa de agentes carcinogênicos sobre a mucosa intestinal (BRASIL, 2003).

O câncer de mama é um dos tipos de câncer que mais causa morte em mulheres no mundo (JEMAL et al., 2011). No Brasil, a maioria dos casos é diagnosticado em mulheres entre 45 e 50 anos; os principais sinais e sintomas são o surgimento de nódulo na mama e/ou axila e dor mamária, e os fatores de risco relacionam-se com idade avançada, história familiar e pessoal, hábitos de vida e influências ambientais (SILVA & RIUL, 2011; INCA, 2002).

As leucemias mieloides são cânceres que se desenvolvem na medula óssea a partir de modificações citogenéticas dos glóbulos brancos (células imunoprotetoras). Se desenvolvem rapidamente e o acúmulo de células leucêmicas na medula faz diminuir a produção de células sanguíneas normais, gerando anemia, infecções (devido a diminuição de glóbulos brancos normais) e sangramentos (LOPES, 2013).

2.4.2 Tratamento do câncer

Ao longo dos anos os métodos de diagnóstico e tratamento do câncer se desenvolveram e se modernizaram consideravelmente, porém isto não fez com que houvesse uma diminuição nos casos de mortalidade por neoplasias no Brasil. Este crescimento no número de casos pode ser justificado por fatores como maior exposição a agentes cancerígenos, prolongamento da expectativa de vida (uma vez que a doença tem a maior incidência em pessoas de faixa etária mais elevada) ou mesmo devido ao aprimoramento dos diagnósticos, que fez com que houvesse maior número de registro de casos (INCA, 2012).

O tratamento de uma pessoa diagnosticada com câncer pode ser realizado principalmente por procedimentos cirúrgicos, para retirada do tumor, tratamento quimioterápico, utilizando-se medicamentos com ação citotóxica sobre as células cancerígenas, ou por radioterapia, utilizando-se radiação (raios-X) para destruir as células tumorais. Geralmente estas técnicas de tratamento são utilizadas em conjunto, e

poucas neoplasias malignas são tratadas apenas com um único método. Infelizmente, não existem tratamentos curativos para todos os tipos de câncer, e em muitos casos o tratamento apenas consegue prolongar a vida útil do paciente (INCA, 2012).

Das formas de tratamento descritas, a quimioterapia antineoplásica merece destaque pois vem se desenvolvendo bastante ao longo das últimas décadas, abrangendo cada vez mais uma maior variedade de cânceres e contribuindo significativamente para o aumento do número de casos de curas (INCA-Quimioterapia, 2016).

Contudo, alguns medicamentos quimioterápicos de ação citotóxica não apresentam atuação muito seletiva, podendo causar algum efeito tóxico a células normais e gerar sintomas indesejáveis. Além disto, alguns compostos apresentam alto custo de obtenção enquanto que outros vêm perdendo atividade frente às células mais resistentes. Por estas razões é que se justificam as pesquisas que busquem novas substâncias citotóxicas, que tenham uma atuação mais ampla e eficaz para suprir a demanda e contornar os pontos negativos nos quimioterápicos utilizados na atualidade (INCA-Quimioterapia, 2016).

2.4.3 Anticancerígenos de origem vegetal

Na corrida para encontrar novos agentes com potencial anticancerígeno, as plantas vêm se destacando consideravelmente. Para se ter uma ideia, cerca de 60% dos fármacos introduzidos nas últimas décadas para o tratamento de neoplasias malignas tem sua origem nos produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Os compostos considerados como anticancerígenos podem ter atuação inibindo a proliferação de células cancerígenas ou impedindo a iniciação do processo carcinogênico. Os antineoplásicos derivados de plantas que são utilizados nos tratamentos atuais geralmente têm mecanismos de interrupção do ciclo de células cancerosas, distinguindo-as das células normais (BRANDÃO et al., 2010).

Dentre os compostos naturais empregados no tratamento do câncer, o taxol, um derivado diterpênico isolado da *Taxus brevifolia* (Teixo), é sem dúvida uma importante referência, uma vez que atua com alta eficiência, baixa toxicidade, e tem amplo espectro de atuação (ZHOU et al., 2010). Outros compostos que também se destacaram neste campo de atuação são os alcaloides vimblastina e vincristina (isolados de *Catharanthus roseus*) (BRANDÃO et al., 2010) (Figura 2.4).

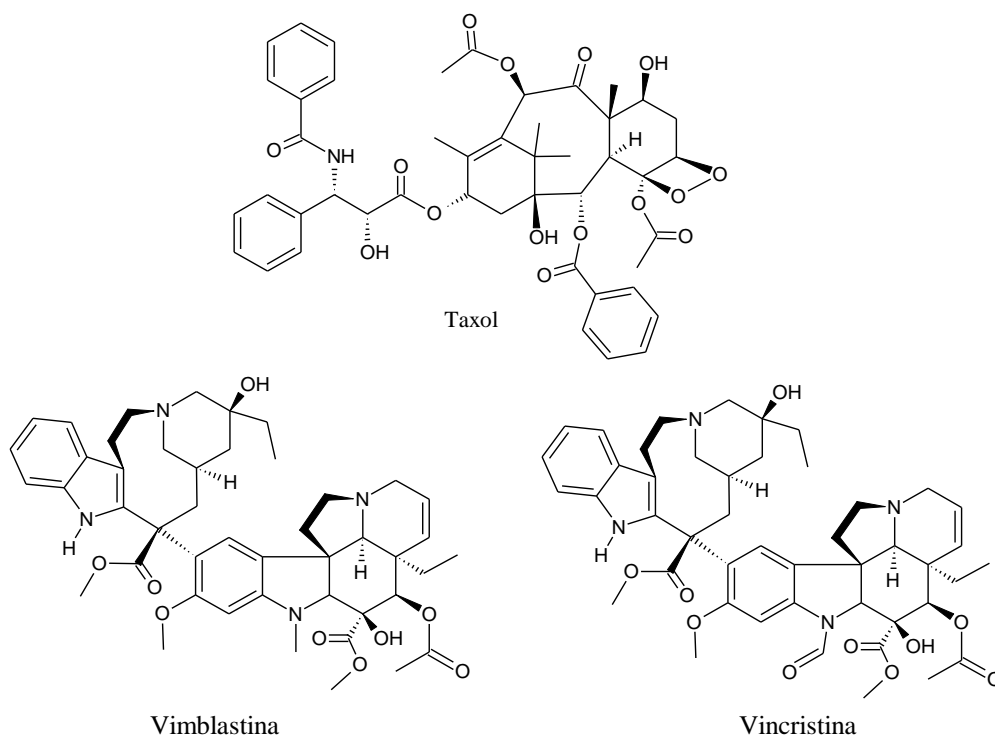


Figura 2.4. Fórmula estrutural de anticancerígenos derivados de vegetais

Todo este grande sucesso atribuído a agentes anticancerígenos de origem natural sobre o tratamento de neoplasias malignas, fez com que cada vez mais crescesse o interesse por novos agentes derivados de plantas com tais propriedades, a fim de suprir as necessidades do quadro de crescimento de casos desta doença.

2.5 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA: CONCEITOS PRÉVIOS

2.5.1 Acetilcolinesterase: função

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios sendo responsável pela transmissão de impulsos nervosos entre estas células. Nestes impulsos, a acetilcolina é liberada de um neurônio para o outro sendo atraída por receptores colinérgicos. A interação entre a acetilcolina e estes receptores dá continuidade à transmissão do impulso, viabilizando a comunicação entre as células nervosas (PETRONILHO et al., 2011).

Após interagir com o receptor, a ACh deve ser rapidamente removida para cessar o impulso nervoso e repolarizar os terminais. A remoção deste neurotransmissor é responsabilidade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que catalisa a hidrólise

da ACh à colina e acetato (Figura 2.5). Após ser formada, a colina é absorvida pelo neurônio onde é reconvertida em ACh para ser utilizada em novos ciclos de transmissões nervosas (BARRETT et al., 2014; PATRICK, 2013).

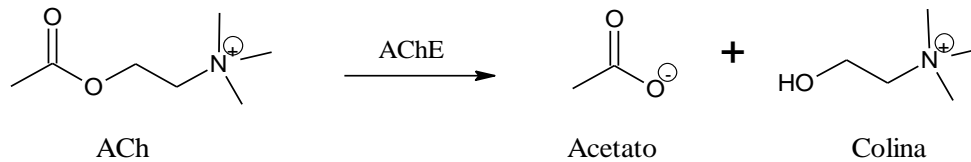


Figura 2.5. Hidrólise da acetilcolina catalisada pela enzima acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase apresenta alta taxa de hidrólise, fazendo com que grande parte da ACh liberada no impulso nervoso seja hidrolisada antes mesmo de alcançar os receptores colinérgicos (AIDOO & WARD, 2006). Contudo a diminuição da concentração deste neurotransmissor nas sinapses nervosas pode gerar perda na intensidade da transmissão colinérgica, processo que está relacionado à neuropatologias como Mal de Alzheimer, uma vez que a ACh desempenha importante papel em processos de aprendizagem e memória (AIDOO & WARD, 2006; ARAÚJO et al., 2016; FRANCIS et al., 1999).

2.5.2 Doença de Alzheimer e a teoria colinérgica

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que leva a progressiva redução da memória e da capacidade cognitiva. A doença não apresenta tratamento definitivo e tem maior incidência em pessoas idosas, acima dos 65 anos (KIHARA & SHIMOHAMA, 2004).

A etiologia da doença não é totalmente definida, contudo uma das teorias bastante discutidas relaciona a diminuição das sinapses colinérgicas com a progressão do quadro patológico. Várias evidências sustentam esta teoria, como por exemplo a comprovação de que há anomalias nos receptores colinérgicos e diminuição na produção da enzima responsável pela síntese do neurotransmissor ACh, no cérebro de pacientes com Alzheimer (FRANCIS et al., 1999; KIHARA & SHIMOHAMA, 2004).

Ainda que não exista uma cura, alguns tratamentos vêm sendo desenvolvidos buscando amenizar os sintomas e a progressão da doença. Um dos tratamentos bastante difundidos consiste no uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase, buscando diminuir a degradação do neurotransmissor ACh e com isso aumentar a intensidade das transmissões colinérgicas (PETRONILHO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016).

2.5.3 Inibidores da acetilcolinesterase

Os fármacos que inibem a enzima AChE são chamados anticolinesterásicos, e atuam em mecanismos que impedem a hidrólise catalítica da ACh por esta enzima, permitindo que um maior número de neurotransmissores permaneçam nas sinapses nervosas (ARAÚJO et al., 2016).

Os mecanismos de inibição geralmente são reversíveis, onde o inibidor se liga ao sítio ativo destinado ao substrato, impedindo a atuação catalítica (ARAÚJO et al., 2016; BARBOSA FILHO et al., 2006). A administração destes inibidores produz uma melhora na cognição afetada pelo déficit nas transmissões colinérgicas (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

Atualmente os inibidores da AChE que são comercializados como fármacos para tratamento da Doença de Alzheimer, são a tacrina, donepezil, rivastigmina e a galantamina (Figura 2.6), sendo esse último um produto natural isolado de várias espécies vegetais da família Amaryllidaceae. Além desses, muitos outros alcaloides obtidos de espécies vegetais de uso na medicina popular têm apresentado atividade (BARBOSA FILHO et al., 2006; VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

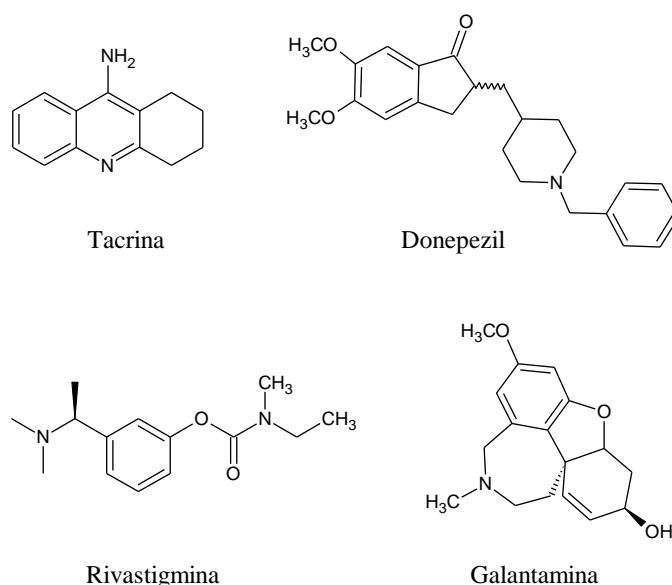


Figura 2.6. Fármacos inibidores da AChE

Contudo, muitas das substâncias utilizadas nos fármacos inibidores da AChE apresenta efeitos colaterais que não permitem um tratamento prolongado, como é o caso da própria tacrina que apresenta hepatotoxicidade (VIEGAS JUNIOR et al., 2004). Desta forma, a busca de novos compostos que atuem de forma eficiente sem efeitos adversos ao organismo humano é necessária.

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades antibacteriana, antioxidante, antiproliferativa e anticolinesterásica de extratos e compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx*.

2.6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano de extratos e compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar o teor de fenólicos totais dos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx* pelo ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar a capacidade dos extratos e compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* de capturar os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+};
- Avaliar a atividade antiproliferativa de compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* sobre linhagens de células cancerígenas e não cancerígenas;
- Avaliar o efeito dos extratos e compostos isolados dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* sobre a atividade da acetilcolinesterase *in vitro*.

2.7 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de atividade antibacteriana e antioxidante foram realizados em parceria com o professor Dr. Raphael Ferreira Queiroz da UESB – Campus de Vitória da Conquista. Os testes de atividade antiproliferativa foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, CPqGM-Fiocruz, sob coordenação do Dr Daniel Bezerra e Dra Milena Botelho. A atividade anticolinesterásica foi determinada em parceria com o professor Dr. Clayton Queiroz Alves da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

2.7.1 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios antibacterianos

A atividade antimicrobiana foi inicialmente testada contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), adquiridas da ATCC. O caldo nutriente utilizado para o crescimento bacteriano foi da Difco Müeller-Hinton Broth. As substâncias tetraciclina e ceftriaxona, de origem comercial, foram utilizadas como controle positivo para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. A estufa utilizada para incubação foi uma estufa incubadora da Quimis, modelo Q315M23. O meio de cultura para o antibiograma foi preparado com Agar Müeller-Hinton. O solvente utilizado para dissolução dos extratos e controle negativo foi o Etanol da marca Vetec. As alíquotas das amostras foram retiradas com micropipetas Digipet. As amostras foram aplicadas em discos de papel estéreis com diâmetro de 6 mm. As placas de Petri utilizadas para crescimento da cultura bacteriana tinham uma proporção de 90 x 15 mm. As placas tipo ELISA de 96 poços foram adquiridas da TPP. A resazurina utilizada no método de microdiluição foi adquirida da Sigma-Aldrich.

2.7.2 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios da atividade antioxidante e quantificação de fenólicos.

Os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) e 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) (ABTS•+) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como o reagente Folin-Ciocalteu, utilizado na quantificação dos compostos fenólicos. Os solventes utilizados foram adquiridos da Synth. O espectrofotômetro utilizado foi da marca Gehaka. A alcalinização das soluções foi realizada com carbonato de sódio adquirido da Merck. O cátion radical do ABTS foi preparado após reação do ABTS com persulfato de potássio adquirido da Sigma-Aldrich. Ácido gálico e trolox foram comprados da Sigma-Aldrich e empregados como controles positivos.

2.7.3 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para determinação da atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa das substâncias isoladas foram testadas sobre cinco linhagens de células cancerígenas [carcinoma hepatocelular humano (HepG2), leucemia mielocítica crônica humana (K562) leucemia promielocítica humana (HL-60), carcinoma de mama humano (MCF-7) e carcinoma de cólon humano (HCT116)] que foram gentilmente cedidas pelo Hospital A. C. Camargo (São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas em *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640; Gibco-BRL) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L do aminoácido L-glutamina e 50 µg/mL do antibiótico gentamicina, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (RODRIGUES et al., 2015). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foram isolados de doadores saudáveis não fumantes por processo de gradiente de densidade com Ficoll-Paque. As PBMCs foram lavadas e resuspendidas para concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, em RPMI 1640, meio suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mmol/L de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina, a 37 °C, com 5% CO₂. A seguir as células foram incubadas com Mitógeno específico para linfócitos T, concanavalina A (10 µg/mL) por 24 h antes dos experimentos, para obtenção de uma cultura de linfoblastos (BERTHOLD, 1981; BROWN & LAWCE, 1997).

O comitê de ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador-BA) aprovou o protocolo experimental seguido (#031019/2013).

2.7.4 Materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase

A atividade anticolinesterásica foi testada com uma solução da enzima acetilcolinesterase 0,5 U/mL (U = quantidade de enzima com velocidade de atuação de 1 µmol/min) da Sigma Aldrich. A enzima foi preparada em uma solução tampão fosfato (20 mM) pH 7,5. O substrato para verificar a atuação da enzima foi o iodeto de acetiltiocolina (15 mM). O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) (3 mM) foi utilizado como reagente colorimétrico para detectar a presença dos produtos da hidrólise enzimática. O ensaio foi feito em placas de 96 poços. As absorbâncias foram monitoradas em leitor de microplacas Multiskan™ GO 3.2. As soluções dos extratos e compostos isolados foram preparadas em etanol PA. O padrão eserina (Sigma-Aldrich) foi utilizado com controle positivo.

2.8 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.8.1 Atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco

A metodologia empregada para avaliação do potencial antibacteriano *in vitro* foi realizada seguindo o princípio da metodologia normatizada por Bauer e colaboradores (1966) seguindo algumas modificações. As bactérias foram expandidas em caldo nutriente BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37 °C por 24 h. Em seguida preparou-se uma suspensão de bactérias em solução salina estéril (0,9%) diluída até uma absorbância de 0,1 em $\lambda=625$ nm. As bactérias foram inoculadas em placa de Petri contendo Ágar Müller-Hinton. Após 10 min, discos de papel impregnados com 1,0 mg dos extratos foram adicionados na placa. A atividade antibacteriana foi determinada, após um período de 24 h de incubação em estufa a 37 °C, pela medida do diâmetro do halo de inibição em milímetros formado ao redor do disco. O solvente etanol (95%) foi utilizado como controle negativo, enquanto que tetraciclina (30 µg/disco) e ceftriaxona (30 µg/disco) foram os controles positivos para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente (BAUER et al., 1966; STEMPLIUK et al., 2006; LABORCLIN, 2011). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As determinações do CIM e CBM foram realizadas apenas com os alcaloides tropânicos isolados de *E. macrocalyx*, cuja massa era suficiente para o ensaio. Para determinação da CIM, as suspensões bacterianas foram diluídas em BHI até 0,1 de absorbância em $\lambda=625$ nm e, novamente 200 vezes, em caldo nutriente. Em seguida, 190 µL desta diluição foram transferidos para microplacas contendo 10 µL das substâncias testadas (2,5 a 100 µg/mL nos poços). As placas foram levadas para incubação a 37 °C por 24 h, e após este período foram adicionados 30 µL do corante resazurina (0,01%). A CIM foi determinada pela menor concentração onde não houve crescimento bacteriano visível, monitorada pela coloração azul do corante, após 60 min. Tetraciclina e ceftriaxona foram utilizados como controle positivo para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente (CABRAL et al., 2009).

Após a pré-incubação da suspensão bacteriana com os compostos por 24 h, 10 μL dessas suspensões, foram semeados em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton. Após incubação por mais 24 h a 37 °C, a CBM foi definida como a concentração onde não houve crescimento bacteriano na região semeada do meio de cultura (CABRAL et al., 2009).

2.8.3 Quantificação de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais dos extratos foi determinada pelo ensaio espectrofotométrico com o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Alíquotas de 125 μL dos extratos a 1 mg/mL, foram misturadas a 125 μL do reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL de água destilada, e 125 μL de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) saturada. Após homogeneização, a mistura reacional foi incubada por 30 min e, em seguida, a absorbância foi medida em $\lambda=750$ nm. O procedimento foi realizado em triplicata para cada extrato.

A quantificação dos fenólicos foi expressa em concentração equivalente de ácido gálico (EAG). Assim, construiu-se uma curva analítica seguindo o mesmo procedimento empregado nos extratos, com soluções de ácido gálico nas concentrações de 5,0 a 25 $\mu\text{g/mL}$. A partir da equação da curva, e dos valores de absorbância apresentados pelas amostras, efetuou-se os cálculos por regressão linear inversa para obter a concentração de fenólicos em EAG por 100 g de amostra.

2.8.4 Atividade sequestradora do radical DPPH[•]

O método do DPPH[•] foi realizado conforme Duarte-Almeida e colaboradores (2006) com algumas modificações. Em tubos de ensaios, uma solução etanólica de DPPH[•] (50 μM) foi incubada com extratos ou substâncias isoladas (1 a 150 $\mu\text{g/mL}$) num volume final de 2 mL. Após homogeneização, os tubos foram incubados sob abrigo de luz a temperatura ambiente por um período de 20 min. Em seguida, a absorbância foi medida em $\lambda=517$ nm. Trolox e ácido gálico foram utilizados como controles positivos. Os resultados foram expressos em valores de CE_{50} (concentração de extrato eficiente em reduzir 50% do radical).

2.8.5 Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

A capacidade das amostras em reagir com o ABTS^{•+}, seguiu o protocolo de Re e colaboradores (1999) e Rufino e colaboradores (2007), com algumas adaptações. O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da mistura de 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (140 mmol/L), e incubadas por 16 h sob proteção de luz. Esta mistura foi diluída em etanol até uma absorbância de 0,7 em 734 nm. Alíquotas de 1700 µL desta solução foram incubadas com os extratos ou substâncias isoladas (1 a 150 µg/mL) num volume final de 2 mL. Após homogeneizar a mistura reacional, esta foi incubada por 6 min à temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância final foi avaliada em $\lambda=734$ nm. Ácido gálico foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos em valores de CE₅₀. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.8.6 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Todas as células testadas foram colocadas em placas de 96 poços, numa concentração aproximada de 7×10^4 células/mL (células aderentes) e 3×10^5 células/mL (células suspensas) em volumes médios de 100 µL. As células foram incubadas com as substâncias isoladas (LEM2, LEM3, LEM4, LEM5, LEM6 e LEA4) em concentrações de 0,39-25 µg/mL por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂ atmosférico. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico, utilizando o corante Alamar Blue (Resazurina) (RODRIGUES et al., 2015; AHMED et al., 1994). As absorbâncias foram determinadas em 570 nm para resorufina e 600 nm para resazurina, no leitor de placas DTX-880, da Beckman Coulter, analisando a variação da coloração azul (do corante) para vermelho (corante na forma reduzida) na presença de células vivas. Doxorrubicina (0,08–5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo.

2.8.7 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi determinada seguindo o método descrito por Ellmann e colaboradores (1961), com modificações. Nas microplacas, 140 µL de tampão fosfato (pH 7,5), 20 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL) e 20 µL dos extratos (1 mg/mL) ou compostos isolados (500 µmol/L) foram incubados por 10 min, a 37 °C. Em seguida, 10 µL de DTNB e 10 µL de iodeto de acetiltiocolina foram adicionados e a

absorbância final foi determinada em leitor de microplacas após um período de 20 min de reação a 37 °C, em um comprimento de onda de 405 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os valores foram expressos como percentual de inibição da atividade da enzima, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição da AChE} = \frac{(\Delta Ab - \Delta Ai)}{\Delta Ab} \times 100, \text{ sendo:}$$

ΔAb = diferença de absorbância do branco nos tempos 0 e 20 minutos

ΔAi = diferença de absorbância do inibidor nos tempos 0 e 20 minutos.

2.8.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas *software* GraphPad Prism 5.0. Os valores de CE₅₀ das curvas de inibição foram determinados por regressão não linear. A diferença significativa entre as médias obtidas no mesmo ensaio foi avaliada pelo teste Tukey (p < 0,05). A correlação entre testes (Fenólicos x DPPH; Fenólicos x ABTS; Fenólicos x Acetilcolinesterásise) foi feita pelo teste de correlação de Pearson (95% de confiança).

2.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.9.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos dos galhos das plantas foi avaliada contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* com o objetivo de verificar a presença de constituintes com potencial antibiótico. O antibiograma por difusão em disco foi selecionado para este trabalho por ser um teste simples, prático, bem padronizado e comum de ser realizado em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica (JORGENSEN & FERRARO, 2009).

Neste estudo foram avaliados os extratos etanólicos e metanólicos dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx*. Os resultados, expressos em diâmetro do halo de inibição, formado ao redor do disco contendo o extrato, são apresentados no gráfico da Figura 2.7.

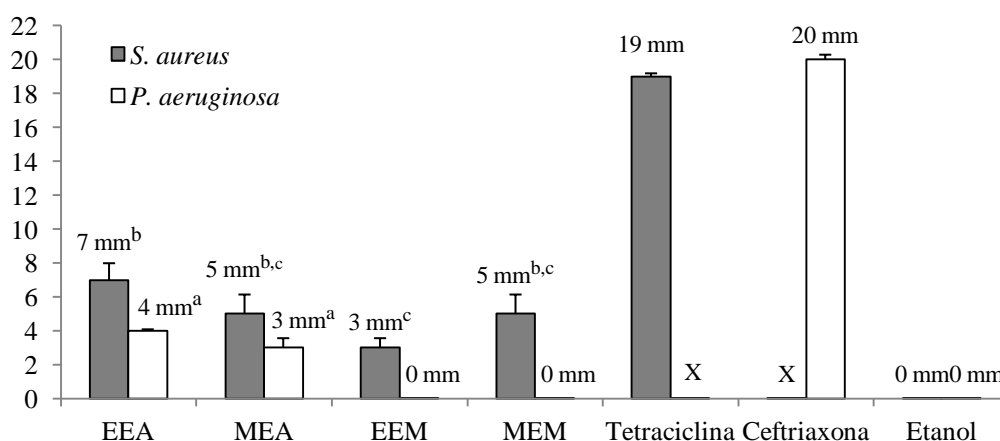


Figura 2.7. Halos de inibição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* frente aos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*. (EEA: Etanólico de *E. affine*; MEA: Metanólico de *E. affine*; EEM: Etanólico de *E. macrocalyx*; MEM: Metanólico de *E. macrocalyx*; X: antibiótico não foi testado para esta bactéria) Teste Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para comparação das médias (letras iguais indicam valores que não se diferenciaram significativamente)

Verifica-se que todos os extratos apresentaram alguma atividade antibacteriana (Figura 2.7), com destaque para os extratos de *E. affine*, que inibiram o crescimento das duas cepas de bactérias testadas, sendo este um indicativo da presença de substâncias antibacterianas de amplo espectro de atuação. Todos os extratos tiveram halos de inibição significativamente menores ($p < 0,05$) que aqueles apresentados pelos controles positivos. Já na comparação entre os extratos, apenas houve diferença significativa nas médias dos halos de inibição do EEA e EEM para a bactéria *S. aureus*, e também entre aqueles extratos que não apresentaram inibição da bactéria *P. aeruginosa* com os que inibiram.

Na literatura existem outros trabalhos publicados que também avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de plantas do gênero *Erythroxylum*. Albuquerque e colaboradores (2014) avaliaram esta atividade para o extrato das folhas de *E. pulchrum*, e os resultados indicaram atividade antibacteriana positiva para dez linhagens de bactérias, e também verificaram maior inibição sobre a bactéria *S. aureus*. Violante e colaboradores (2012) verificaram atividade de extratos e frações de *E. suberosum* e obtiveram maior inibição para a mesma bactéria. De Wet (2011) avaliou atividade antibacteriana de três espécies africanas de *Erythroxylum* (*E. delagoense*, *E. emarginatum* e *E. pictum*) frente a quatro espécies de bactérias, dos quais, os extratos de *E. delagoense* foi o que apresentou maior espectro de atuação, com inibição significativa (CIM < 1 mg/mL) das bactérias *Bacillus subtilis* (Gram-positiva), *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus*.

Sabendo-se do potencial antimicrobiano descrito na literatura para muitos alcaloides (ANISZEWSKI, 2007), decidiu-se avaliar o CIM e CBM de alguns dos alcaloides isolados, com maior rendimento, de *E. macrocalyx*. Os compostos testados (Tabela 2.1) foram o 6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol (LEM2), 3 α -fenilacetoxitropano-6 β ,7 β -diol (LEM 3), 3 α -benzoiloxitropano-6 β ,7 β -diol (LEM4) e 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoiloxi)tropano (LEM5).

Tabela 2.1. Resultados obtidos nos ensaios antibacterianos por CIM e CBM dos alcaloides isolados de *E. macrocalyx* frente as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Substância	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CBM ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
LEM2	>100	>100	>100	>100
LEM3	>100	>100	>100	>100
LEM4	>100	>100	>100	>100
LEM5	>100	>100	>100	>100
Tetraciclina (C+)	3,0	NT	3,0	NT
Ceftriaxona (C+)	NT	3,0	NT	10,0

NT: não testado

Conforme pode ser verificado na Tabela 2.1 e na Figura 2.8, nenhum dos alcaloides testados apresentou CIM e CBM menor ou igual a 100 $\mu\text{g/mL}$. Na Figura 2.9 (A) verifica-se a coloração rosa em todos os poços contendo as bactérias incubadas com as substâncias, o que indica que as bactérias estão metabolicamente viáveis (Figura 2.10). Já na Figura 2.9 (B) confirma-se que não houve morte dos micro-organismos em nenhuma concentração testada, uma vez que houve o crescimento das bactérias na placa contendo ágar.

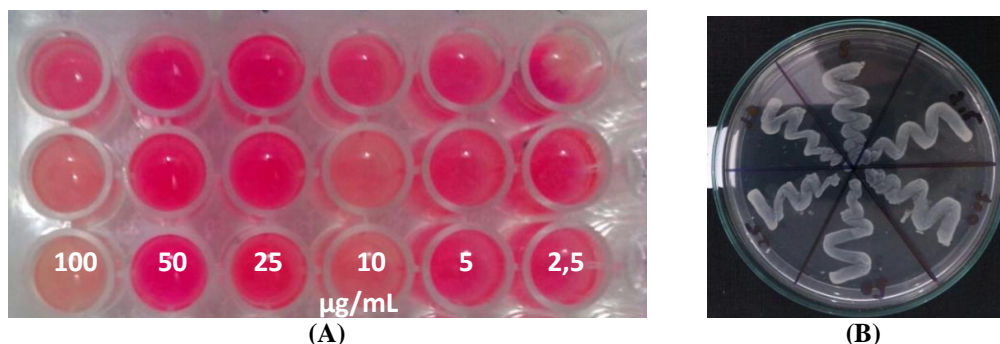


Figura 2.8. (A) Imagem representativa dos resultados dos testes de avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e (B) concentração bactericida mínima (CBM) dos alcaloides tropânicos avaliados

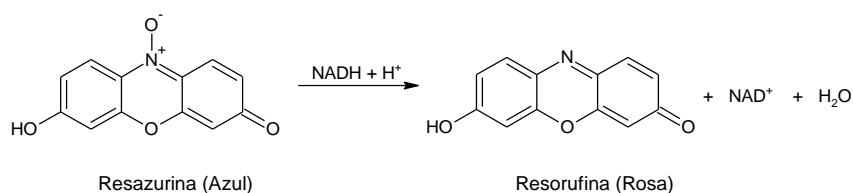


Figura 2.9. Reação colorimétrica por redução enzimática do reagente resazurina

FONTES: Baseado em SILANIKOVE e SHAPIRO (2012)

Os resultados obtidos nestes testes sugerem que os alcaloides isolados não são os responsáveis pela atividade antibacteriana verificada para o extrato de *E. macrocalyx*, uma vez que estas substâncias não tiveram poder de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*, que havia sido moderadamente inibida pelos extratos dessa planta, no teste de difusão em disco. Entretanto, há de se considerar que a metodologia de microdiluição em caldo se diferencia do método de difusão em disco e, portanto, o comportamento dos antibióticos nestes testes pode ser diferenciado. Além disso, algumas substâncias podem apresentar atividade biológica apenas quando em mistura, devido a efeitos sinérgicos (OLIVEIRA, 1986).

Digno de nota é que muitos outros compostos isolados de *E. macrocalyx* não foram testados, como terpenos e flavonoides, que são reconhecidos detentores de atividade antibacteriana (COWAN, 1999). Portanto, a atividade antibacteriana do extrato pode ser devida a esses compostos ou mesmo outros que não foram isolados.

2.9.2 Concentração de fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais foi realizada com intuito de avaliar, antes mesmo do estudo fitoquímico, o perfil dos princípios ativos presentes nos extratos estudados. O ensaio realizado, utilizando o reagente Folin-

Ciocalteu, é baseado em uma reação de oxirredução envolvendo os compostos fenólicos (redutores) e uma mistura de ácidos complexos fosfomolibdico e fosfotungstico (que formam complexos octaédricos contendo os óxidos dos metais coordenados em torno de um centro fosfato). Na reação, o molibdênio e o tungstênio serão reduzidos, levando à formação final de um complexo molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})_4]^-$ de coloração azul que é detectado espectrofotometricamente (SINGLETON et al., 1999; SOUSA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com Singleton e colaboradores (1999), os detalhes sobre a estrutura molecular do complexo final gerado ainda não é totalmente esclarecida, porém o que se sabe é que, o princípio da reação se baseia na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) pela transferência de um elétron dos compostos fenólicos, favorecida pelo meio básico (Figura 2.10). A reação não é específica para compostos fenólicos, e espécies redutoras presente no meio poderão interferir na reação. No entanto, o teste fornece um panorama geral sobre o perfil químico do extrato analisado.

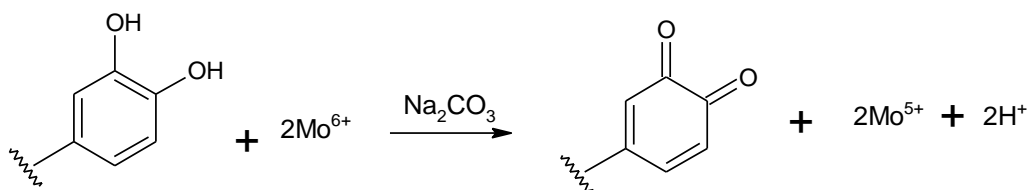


Figura 2.10. Oxirredução simplificada envolvendo íons molibdênio (VI) e um composto fenólico

Os resultados obtidos para concentração de fenólicos nos extratos são apresentados na Tabela 2.2. A equação da curva padrão do ácido gálico $[(y=0,0368x+0,072; (R^2 =0,9926)]$ foi utilizada para determinar a concentração de fenólicos que variou de 196 a 360 mg de EAG (equivalente de ácido gálico) / 100g de extrato.

Tabela 2.2. Concentração de fenólicos totais nos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

Extrato	Concentração de fenólicos mg(EAG)/100g*
EEA	360,59 ± 12,27
MEA	239,26 ± 5,80 ^a
EEM	219,02 ± 22,80 ^a
MEM	196,61 ± 18,31 ^a

* mg equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato. **a:** não se diferenciaram pelo teste Tukey ($p < 0,05$) (EEA: Etanólico de *E. affine*; MEA: Metanólico de *E. affine*; EEM: Etanólico de *E. macrocalyx*; MEM: Metanólico de *E. macrocalyx*)

Conforme pode ser verificado na Tabela 2.2, apenas o extrato metanólico de *E. affine* se diferenciou significativamente ($p < 0,05$) dos demais e apresentou uma maior concentração de fenólicos (360,59 mg(EAG)/100g). Este resultado está de acordo com o estudo fitoquímico (capítulo 1), uma vez que foi isolada maior massa e maior variedade de flavonoides nesse extrato (Figura 1.66). Também foi possível verificar que este extrato apresentou maior poder de redução do reagente Folin-Ciocalteu que o extrato metanólico da mesma planta. Isto pode ter ocorrido, pois o procedimento de extração realizado (onde se extraiu primeiramente com etanol e depois com metanol) fez com que grande parte dos compostos fenólicos livres fossem extraídos pelo primeiro solvente (etanol), enquanto que o metanol extraiu uma maior concentração de metabólitos mais polares, muitos em suas formas glicosiladas. Como os compostos não glicosilados apresentam mais hidroxilas fenólicas livres, o extrato mais concentrado nesses compostos teria, portanto, maior poder de redução, sendo esta uma possível justificativa para os resultados verificados.

A presença de compostos fenólicos nos extratos reforçou a ideia de se avaliar a atividade antioxidante destes, uma vez que esses compostos são reconhecidamente agentes capazes de capturar radicais livres (PIETTA, 2000). Portanto, foi avaliado o efeito desses extratos frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} cujos resultados são apresentados a seguir.

2.9.3 Reação com o radical DPPH[•]

O método do DPPH avalia a habilidade dos extratos em estabilizar o radical DPPH[•] a partir de sua redução (Figura 2.11). Esta reação faz com que haja um decréscimo da coloração roxa característica do DPPH em sua forma radicalar e aumento da coloração amarelada, característica do DPPH na forma reduzida.

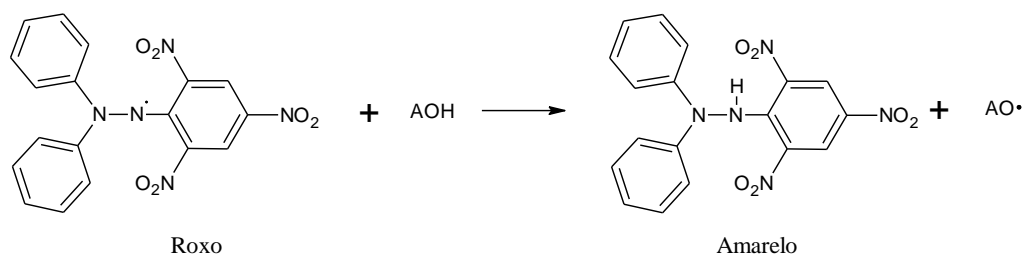


Figura 2.11. Reação entre o radical DPPH[•] e um composto com propriedade antirradicalar (AOH)

FONTE: Adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2014)

O DPPH[•] é uma espécie muito comum de ser utilizada em testes de avaliação de atividade antioxidante *in vitro*, sendo muito difundido em estudos de atividade antirradicalar de compostos puros ou de misturas complexas como extratos brutos de plantas (OLIVEIRA et al., 2014). Mesmo sendo um radical livre, as ligações duplas conjugadas do anel aromático próximo ao átomo que suporta o elétron desemparelhado, permite que este se desloque ao longo de toda a estrutura dispersando-o e estabilizando-o, o que impede que a molécula se dimerize como outros radicais (MOLYNEUX, 2004).

Os resultados obtidos do decréscimo de absorbância das soluções de DPPH[•] em diferentes concentrações dos extratos foram convertidos em percentual de sequestro do radical, considerando a absorbância do controle etanol (300 µL) como indicador da presença de 100% do radical. As curvas de sequestro do DPPH[•] obtidas para os extratos são apresentadas na Figura 2.12.

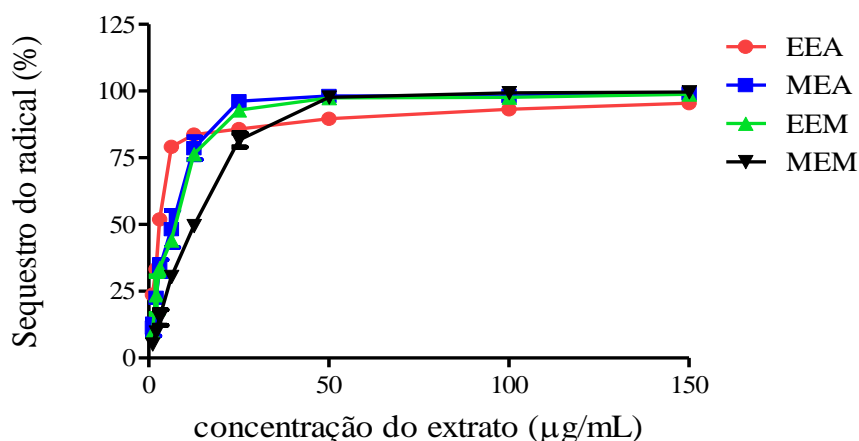


Figura 2.12. Curvas de sequestro do radical DPPH[•] pelos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

A partir destas curvas, foram feitos os cálculos para determinação da CE₅₀ dos extratos analisados. Estes resultados são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Valores de CE₅₀ calculados para as curvas de sequestro do radical DPPH[•] pelos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

Extrato	CE ₅₀ (µg/mL)
EEA	2,92 ± 0,36 ^a
MEA	5,24 ± 0,49 ^b
EEM	5,61 ± 0,54 ^b
MEM	10,71 ± 0,82
Ácido Gálico	0,54 ± 0,10
Trolox	2,56 ± 0,30 ^a

Letras iguais (a ou b): são para aqueles que não se diferenciaram pelo teste Tukey (p<0,05). (EEA: Etanólico de *E. affine*; MEA: Metanólico de *E. affine*; EEM: Etanólico de *E. macrocalyx*; MEM: Metanólico de *E. macrocalyx*)

Verifica-se que o extrato etanólico de *E. affine* foi aquele que apresentou maior potencial de reagir com o DPPH^{*}, cujo CE₅₀ foi similar ao trolox. Em contrapartida, o extrato metanólico de *E. macrocalyx* foi o menos efetivo dentre os extratos analisados.

Não surpreendentemente, os resultados obtidos aqui estão de acordo com o teor fenólicos nas amostras, uma vez que o extrato que apresentou maior concentração de compostos fenólicos foi o que também reagiu mais eficientemente com o DPPH^{*}, apresentando menor CE₅₀. A correlação entre os dois testes, contudo, não foi significativa (correlação de Pearson: $r = -0,7951$; $P=0,2$).

Devido ao grande potencial antioxidante dos extratos etanólicos das duas espécies, decidiu-se verificar se o flavonoide LEA3, obtidos destas plantas, seria o responsável pela atividade. Desta forma, realizou-se uma triagem, para verificar o potencial de captura do DPPH^{*} por essa substância, na máxima concentração da curva de estudo (150 µg/mL). Com esta análise, foi verificado que o flavonoide LEA3 capturou apenas 3% ($3,03 \pm 0,84\%$) do radical, indicando não ser este o composto responsável pela atividade antioxidante atribuída para os extratos pelo método do DPPH^{*}. O flavonoide LEA4 não foi avaliado pois não havia sido identificado no período de realização dos testes.

A princípio, este resultado pode ser considerado incoerente com o que seria esperado para flavonoides, entretanto, deve-se considerar que o flavonoide LEA3 possui poucas hidroxilas fenólicas livres (Figura 2.13). De acordo com Barreiros e colaboradores (2006) o maior potencial redutor dos flavonoides está diretamente relacionado com a maior presença de grupos fenólicos, sendo bastante comum que flavonas que tenham apenas uma hidroxila livre apresentem fraca atividade, podendo ficar abaixo do limite de detecção. Além disto, a presença de grupos glicosídicos muito volumosos também fornece um certo impedimento estérico à estrutura do flavonoide dificultando a aproximação do radical livre.

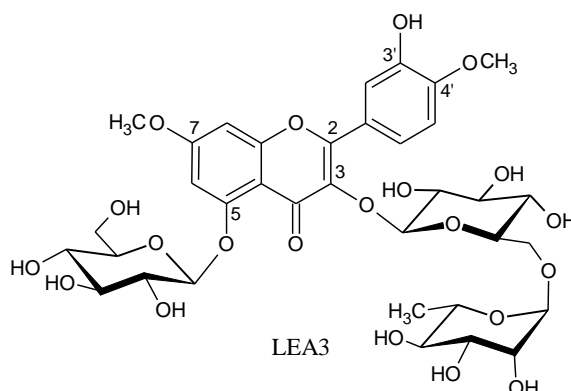


Figura 2.13. Estrutura do flavonoide LEA3

Ainda de acordo com Barreiros e colaboradores (2006), além de polihidroxiados, para que os flavonoides possam desempenhar boa atividade antirradicalar a posição das hidroxilas nas estruturas é bastante importante, uma vez que elas influenciaram na estabilidade do radical flavonoil que é formado. Geralmente verifica-se que flavonoides que possuem hidroxilas fenólicas livres vizinhas tendem a apresentar melhor atividade antioxidante (ver Figura 1.6 no capítulo 1).

2.9.4 Reação com o radical ABTS^{•+}

O método de captura do ABTS^{•+} se assemelha bastante ao descrito para o radical DPPH[•] e consiste em verificar se extratos ou compostos isolados possuem propriedades redutoras, capazes de estabilizar a estrutura do radical, gerando um decréscimo da sua coloração azul esverdeada característica (FLOEGEL et al., 2011). A Figura 2.14 descreve a reação geral em que este teste se baseia.

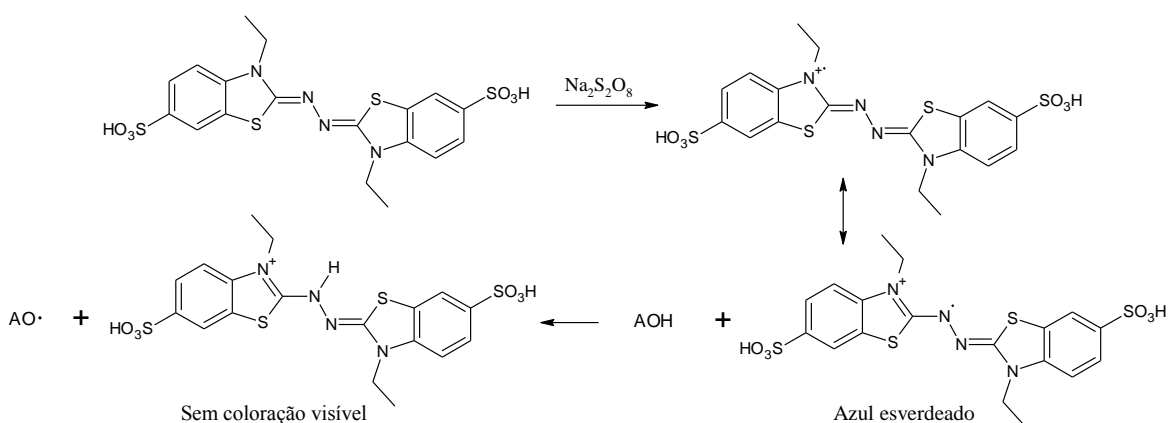


Figura 2.14. Preparo do ABTS^{•+} e sua reação com um composto antioxidante (AOH)

FONTE: Baseado em Oliveira e colaboradores (2014)

Assim como o DPPH[•], a estrutura do ABTS^{•+} torna favorável a sua utilização para realização de testes farmacológicos antioxidantes *in vitro* uma vez que o elétron desemparelhado presente na estrutura possui possibilidades de migração por ressonância monoelétrica, ao longo das conjugações em orbitais *p* não hibridizados da molécula. Contudo, diferente do DPPH[•], esta substância não é obtida comercialmente na forma de cátion radical, sendo necessária sua oxidação a radical a partir de uma reação de 16 horas com uma solução de persulfato.

O teste envolvendo o $ABTS^{++}$ apresenta algumas vantagens sobre o teste com o $DPPH^{\bullet}$. Uma das principais se refere ao fato de que a leitura de absorvância não sofre muita interferência da coloração do extrato, uma vez que o comprimento de onda da leitura é quase fora da região do visível. Outra vantagem é que a reação entre o substrato e o cátion radical ocorre de forma mais rápida, dando ao método uma maior frequência analítica (OLIVEIRA et al., 2014; AO et al., 2009).

Como no teste do $DPPH^{\bullet}$, os resultados obtidos para as curvas de decréscimo de absorvância do $ABTS^{++}$ frente aos extratos foram convertidos em percentual de sequestro do radical (Figura 2.15) considerando a absorvância do controle negativo (etanol, 300 μ L) como 100% da presença do radical.

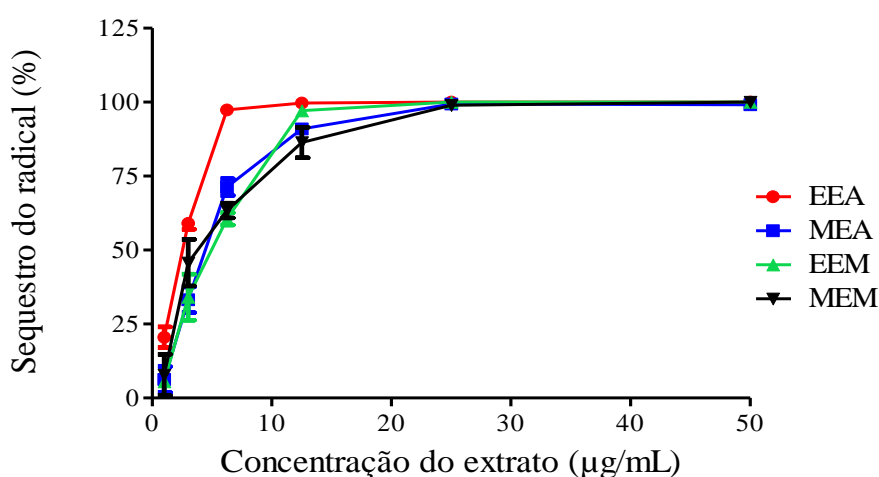


Figura 2.15. Curvas de sequestro do radical $ABTS^{++}$ pelos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

Com base nestas curvas foram determinados, por regressão hiperbólica, os valores de CE_{50} para os extratos analisados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.4. Valores de CE_{50} calculados para as curvas de sequestro do radical $ABTS^{++}$ pelos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*

Extrato	CE_{50} (μ g/mL)
EEA	$3,04 \pm 0,05$
MEA	$4,42 \pm 0,20^a$
EEM	$4,79 \pm 0,43^a$
MEM	$4,35 \pm 0,55^a$
Ácido Gálico	$0,55 \pm 0,01$

a: não se diferenciaram pelo teste Tukey ($p < 0,05$). (EEA: Etanólico de *E. affine*; MEA: Metanólico de *E. affine*; EEM: Etanólico de *E. macrocalyx*; MEM: Metanólico de *E. macrocalyx*)

Verifica-se que, novamente, o extrato etanólico de *E. affine* foi o que apresentou melhor atividade em comparação com os demais. Ainda assim, todos os outros extratos demonstraram um bom potencial de antioxidante ($CE_{50} < 5,00\mu\text{g/mL}$).

Além disso, com exceção do extrato metanólico de *E. macrocalyx*, todos os demais resultados apresentam concordância com o teste de sequestro do DPPH \cdot , para o qual a sequência de extratos mais ativos foi EEA>MEA \approx EEM>MEM. E quando se relaciona o CE_{50} de redução do ABTS $^{++}$ com a concentração de fenólicos, verifica-se uma boa correlação entre os resultados (correlação de Pearson: $r = -0,9292$; $P = 0,07$), superior à que foi observada no ensaio com DPPH \cdot , mas mesmo assim não muito significativa.

Nesse ensaio, o flavonoide LEA3 também foi testado quanto ao potencial de reação com o ABTS $^{++}$. Para isto, foi feita uma triagem com esta substância ($150\mu\text{g/mL}$) para avaliar se seria viável a construção de uma curva de atividade para determinar o valor do CE_{50} . Os resultados demonstraram que LEA3 reduziu o radical em cerca de 83%, ($82,99 \pm 1,89\%$), potencial superior ao que foi obtido no teste de inibição do DPPH \cdot por este composto. Este fato pode estar associado à uma possível maior estabilidade do DPPH \cdot , sugerida pelo fato de que este radical é obtido comercialmente já na forma livre. Contudo, uma análise mais aprofundada a respeito da interação estrutural entre a substância LEA3 e os radicais, bem como o comportamento do composto no meio reacional do ensaio, precisa ser feito para obter conclusões mais precisas.

Considerando-se que o flavonoide reduziu mais de 50% na triagem inicial, decidiu-se determinar o valor de CE_{50} . O resultado obtido para esta análise é apresentado na Figura 2.16.

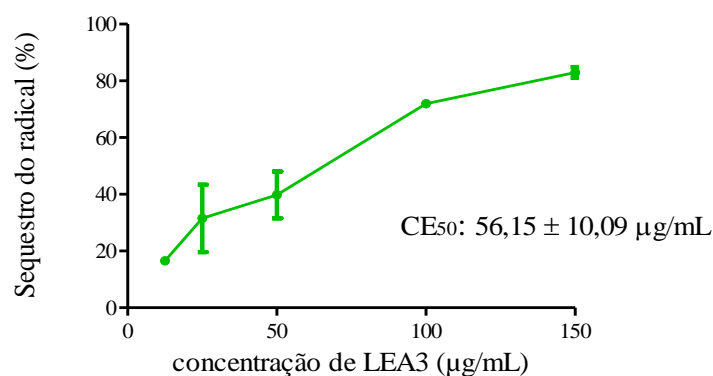


Figura 2.16. Curva de sequestro do radical ABTS $^{++}$ pela substância LEA3

A partir desta análise constatou-se que o composto LEA3 não apresentou um potencial antioxidante tão elevado quanto o que foi determinado para os extratos, contudo, isto já era esperado, considerando os resultados obtidos na triagem inicial.

Comparando com a literatura (YI et al., 2016), o valor de CE_{50} de LEA3 (56,15 $\mu\text{g/mL}$ ou 87,93 $\mu\text{mol/L}$) foi de duas a três vezes maior que aquele descrito por Yi e colaboradores (2016) para o flavonoide glicosilado isoquercitrina (Figura 2.17). Os dois flavonoides pertencem subclasse dos flavonóis e possuem as mesmas posições oxigenadas dos anéis aromáticos (*O*-5, 7, 3' e 4'). Contudo o flavonoide isoquercitrina apresenta maior número de hidroxilas fenólicas livres, bem como, um grupamento glicosídico menos volumoso, características que, como mencionado anteriormente, aumentam o potencial antirradicalar dos flavonoides.

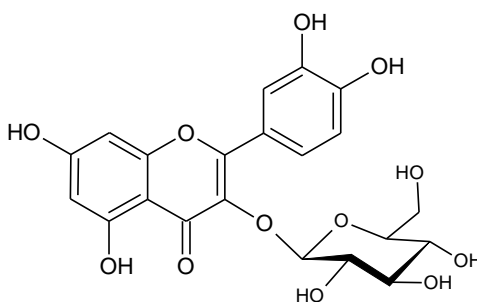


Figura 2.17. Fórmula estrutural da isoquercitrina

Além do maior número de hidroxilas fenólicas, o flavonoide isoquercitrina também apresenta hidroxilas nas posições 7 e 4', que segundo Barreiro e colaboradores (2006), são as principais posições onde ocorre a doação de hidrogênio radicalar em processos de estabilização de radicais livres.

Sendo assim, os resultados obtidos neste teste corroboram com o pressuposto estabelecido na literatura à despeito de o potencial antioxidante de flavonoides depender do número de hidroxilas fenólicas na estrutura do composto, das posições dessas hidroxilas e também da presença de grupos glicosídicos volumosos.

2.9.5 Atividade antiproliferativa

Esse ensaio foi realizado no intuito de observar a toxicidade dos compostos isolados sobre linhagens de células cancerígenas, monitorando a viabilidade celular pelo método do Alamar Blue[®] (resazurina). Como visto anteriormente no método de microdiluição em caldo, este corante, na presença de células vivas, é reduzido à resorufina (Figura 2.9), modificando

sua coloração de azul para uma coloração rósea. O CI_{50} apenas foi determinado para aquelas substâncias que apresentaram inibição na maior concentração testada durante a triagem (25 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.5. Valores de CI_{50} e o respectivo intervalo de confiança (95% de confiança) atividade antiproliferativa dos compostos isolados em linhagens de células tumorais e não tumorais

Composto	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*						
	HepG2	HL60	K562	MCF7	HCT116	Linfoblasto Humano	MRC5
LEM2	> 25	> 25	NT	> 25	> 25	NT	> 25
LEM3	13,72 9,26 – 20,33	20,72 16,03 – 26,79	19,62 9,63 – 39,97	NT	NT	4,22 3,49 – 5,10	NT
LEM4	11,59 8,39 – 17,67	> 25	> 25	NT	NT	> 25	NT
LEM5	3,66 2,63 – 5,10	> 25	> 25	NT	NT	> 25	NT
LEM6	19,38 14,92 – 25,26	> 25	> 25	NT	NT	> 25	NT
LEA4	> 25	> 25	NT	> 25	> 25	NT	> 25
DOX (C+)	0,01 0,01 – 0,02	0,09 0,07 – 0,10	1,73 1,46 – 2,05	0,81 0,58 – 1,11	0,24 0,196 – 0,30	0,70 0,53 – 0,92	2,34 1,67 – 3,26

* valores obtidos por regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.0. HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL60 (leucemia promielocítica humana), K562 (Leucemia mielocítica crônica humana), MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano). Células não tumorais: Linfoblasto Humano (células mononucleares do sangue periférico acionadas com concanavalina A), MRC5 (fibroblasto de pulmão humano). NT: Não testado (devido aos diferentes períodos de realização dos testes). Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo

Dentre os compostos testados, apenas o LEM3 apresentou algum efeito sobre todas as linhagens de células que foi testado, incluindo os linfoblastos normais. Na literatura, este composto já havia sido avaliado quanto à sua citotoxicidade frente a algumas linhagens de células cancerígenas, não apresentando efeito considerável na concentração 20 $\mu\text{g/mL}$ (SILVA et al., 2001).

Os compostos LEM4, LEM5 e LEM6 apresentaram ação citotóxica apenas sobre as células do carcinoma hepatocelular, com destaque para LEM5, que apresentou um CI_{50} menor que 4,00 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerada uma substância promissora para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (SILVA et al., 2016).

Embora outros estudos sejam necessários para desvendar o mecanismo de ação do LEM5, sobre as células de carcinoma hepático, a literatura aponta que alguns alcaloides, atuam como indutores de apoptose celular a partir da inibição da síntese proteica ou intercalação com moléculas de DNA, embora este mecanismo não tenha sido comprovado para alcaloides tropânicos (ROSENKRANZ & WINK, 2007).

Digno de nota é que LEM5 não apenas foi efetivo sobre células tumorais hepáticas como também não apresentou qualquer toxicidade sobre linfoblastos humanos normais, sugerindo uma certa segurança desse composto *in vivo*. Estes resultados torna a substância ainda mais promissora para aplicação futura como fármaco antineoplásico, embora ainda necessite de estudos mecanísticos e com modelos animais para melhor compreensão dos efeitos desse composto.

Mohammed e colaboradores (2016) identificaram a citotoxicidade dos alcaloides tropânicos atropina e escopolamina sobre células MCF-7 (câncer de mama), mas com valores de CI_{50} de 94,4 e 81,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Oliveira e colaboradores (2011), demonstraram que o alcaloide catuabina B inibiu o crescimento de células NCI-H292 (câncer de pulmão), com CI_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, nenhum desses compostos encontrados na literatura apresentou um potencial citotóxico tão promissor quanto o apresentado pelo alcaloide LEM5. Além disso, trata-se do primeiro relato do potencial antiproliferativo dessa substância, e também da LEM2, LEM4, LEM6 e LEA4, que apresentam pouco ou nenhum estudo farmacológico descrito na literatura.

2.9.6 Atividade anticolinesterásica

Os extratos ou compostos isolados foram avaliados quanto à capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Nesse ensaio, o iodeto de acetiltiocolina foi usado como substrato da enzima. Quando não inibida, a acetilcolinesterase catalisa a hidrólise desse substrato à acetato e tiocolina, sendo o último detectado pela reação com DTNB (Reagente de Ellman), que na presença de grupos tióis, reage por substituição (Figura 2.18), formando um produto de coloração amarela (ELLMAN et al., 1961).

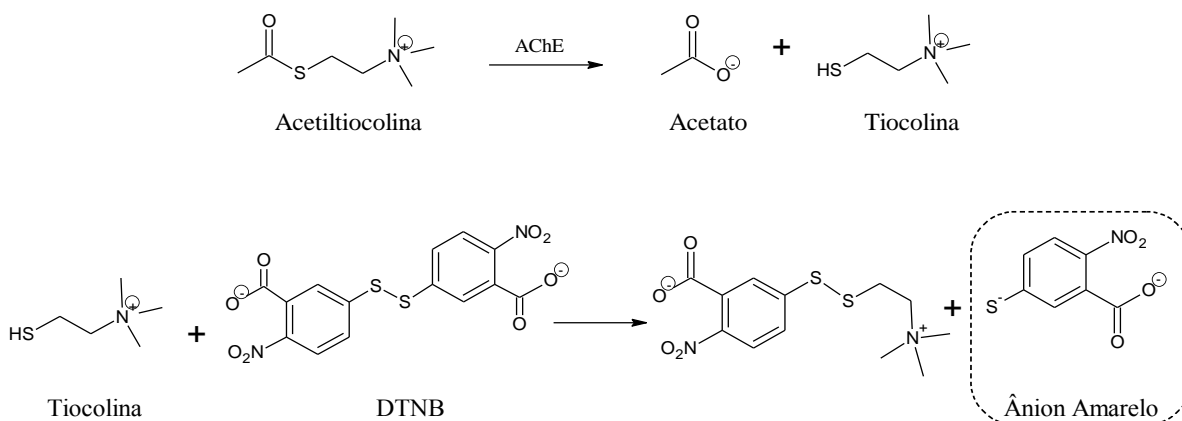


Figura 2.18. Reação colorimétrica para verificação da atividade da acetilcolinesterase

Os resultados obtidos para os extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx* são apresentados na Figura 2.19.

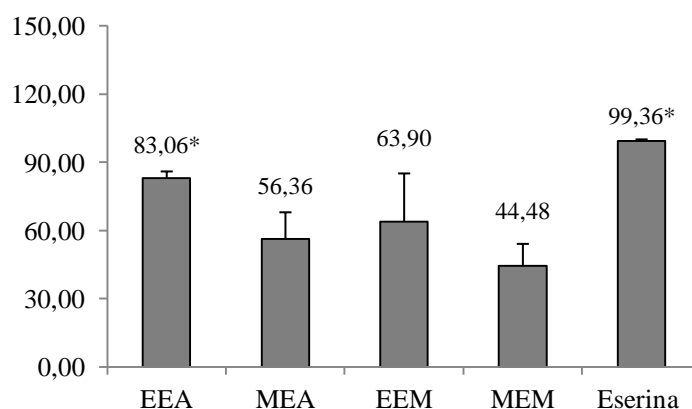


Figura 2.19. Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos de *E. affine* e *E. macrocalyx*. (95% de confiança; n = 3). (EEA: Etanólico de *E. affine*; MEA: Metanólico de *E. affine*; EEM: Etanólico de *E. macrocalyx*; MEM: Metanólico de *E. macrocalyx*). Concentração dos extratos 1 mg/mL. Teste Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para comparação com o controle Eserina (500 μ M). Eserina (* = indica os inibidores que não se diferenciaram significativamente)

Todos os extratos testados apresentaram atividade anticolinesterásica, com percentuais de inibição variando de 44 a 83%. O destaque novamente foi para o extrato etanólico de *E. affine*, que inibiu a enzima em mais de 80%, de maneira similar ao padrão Eserina.

De acordo com Vinutha e colaboradores (2007), no ensaio de inibição da AChE, extratos de planta podem ser classificados como inibidores potentes (> 50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (< 30% de inibição). Sendo assim, todos os extratos foram potentes inibidores e apenas o extrato metanólico de *E. macrocalyx* apresentou potencial moderado.

Neste ensaio novamente verifica-se que os extratos etanólicos apresentam um potencial de atividade maior que os extratos metanólicos da mesma planta, assim como foi verificado nos ensaios de ação antibacteriana e antioxidante. Ao comparar os resultados desse ensaio com o teor de fenólico dos extratos, verifica-se uma correlação entre os resultados (correlação de Pearson: $r = 0,9185$; $P=0,08$), porém, novamente, não é muito significativa. Ainda assim, alguns estudos descritos na literatura verificaram que vários extratos ricos em compostos fenólicos, de fato apresentam potencial de inibir a enzima acetilcolinesterase (ROSEIRO et al., 2012).

Considerando que o extrato etanólico de *E. affine* foi o que apresentou maior potencial anticolinesterásico, as substâncias isoladas desse extrato foram avaliadas. Dentre os compostos testados (Figura 2.20), o flavonoide LEA3 foi o que inibiu mais eficientemente a atividade da enzima (47,72%), enquanto que dentre os terpenos, LEA1 (friedelina) foi o mais ativo (24,5%).

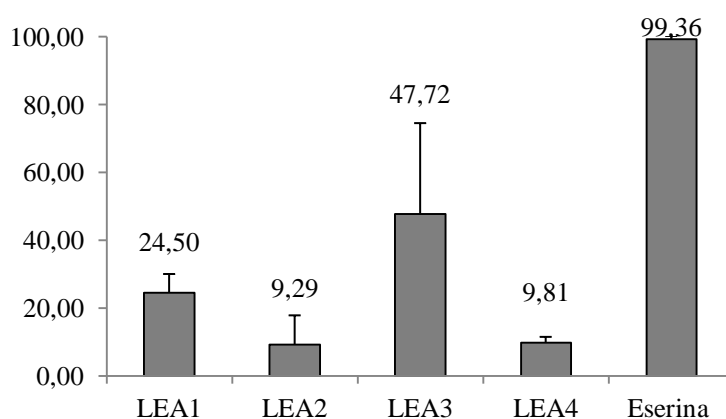


Figura 2.20. Percentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos compostos isolados do Extrato etanólico dos galhos de *E. affine*. (95% de confiança; n = 3). Concentração das amostras: 500 μ M. Comparação das médias em o controle Eserina pelo teste Tukey ($p < 0,05$) (Todos os compostos apresentaram uma inibição significativamente menor que a do controle)

O potencial anticolinesterásico de flavonoides já é reconhecido na literatura (ROSEIRO et al., 2012; JUNG & PARK, 2007), e vários destes compostos já foram indicados como relevantes para inibição da acetilcolinesterase em extratos de plantas medicinais, como por exemplo, tilirosídeo, 3-metoxiquercetina, quercitrina e quercetina (Figura 2.21).

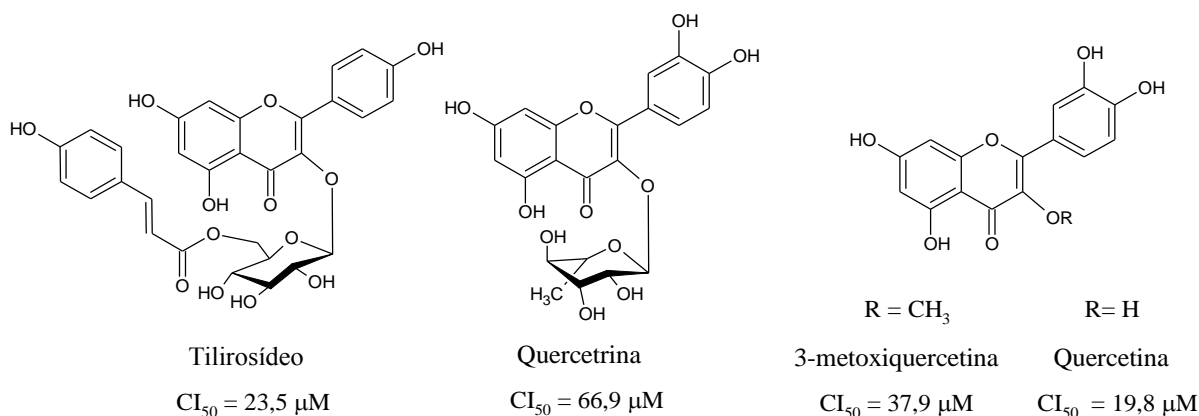


Figura 2.21. Alguns flavonoides com potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase e os respectivos valores de concentração inibitória média

FONTE: Dados obtidos de JUNG & PARK (2007)

Nota-se que a maioria desses flavonoides apresenta um grande número de hidroxilas fenólicas livres, diferente do perfil dos flavonoides LEA3 e LEA4, sendo este um possível fator que explique o mecanismo de ação desses compostos sobre a enzima. Roseiro e colaboradores (2012) discutem esta hipótese e mencionam que os flavonoides aparentemente bloqueiam a entrada do sítio ativo da enzima, estabelecendo ligações de hidrogênio entre suas hidroxilas fenólicas (ou a hidroxila da posição C-3) e alguns resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo (ROSEIRO et al., 2012).

Na literatura há apenas descrição da atividade anticolinesterásica para o composto LEA1 (friedelina), que apresentou um percentual de 34,3% na concentração de 50 mg/mL (117 μ M) (JAMILA et al., 2015). Para os demais compostos, não foi encontrado nenhum trabalho publicado que tenha realizado esta investigação. Este trabalho contribui, portanto, para determinação do perfil farmacológico destes compostos e também atribui um potencial de inibição moderado ao flavonoide ombuina-3-rutinosideo-5-glicosideo, corroborando assim com a ideia de que os produtos naturais são importantes representantes na busca de compostos a serem utilizados no controle enzimático da AChE, e colocando o gênero *Erythroxylum* como promissor para pesquisas nesta área.

2.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE AS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

O estudo do potencial antibacteriano dos extratos dos galhos de *E. affine* e *E. macrocalyx* revelou alguma atividade sobre as bactérias testadas, com destaque para os extratos de *E. affine* que apresentaram atividade inibitória sobre as cepas das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Contudo, não foi possível atribuir esta atividade biológica à algum dos compostos isolados destas plantas, uma vez que nem todos estes foram submetidos aos ensaios, e aqueles selecionados para análise, ou seja, os alcaloides tropânicos, não apresentaram potencial significativo.

Por mais que muitos alcaloides apresentem reconhecidamente potencial antibacteriano (ANISZEWSKI, 2007), na literatura não foi encontrada nenhuma forte atribuição deste tipo de atividade para a subclasse dos alcaloides tropânicos, que apresentam maior destaque no desempenho de atividade anestésica, anticolinérgica e ação sobre o Sistema Nervoso Central (LOUNASMAA, 1988). Desta forma, abre-se o viés de possibilidade de avaliação destas atividades para os compostos isolados, uma vez que estes são alcaloides com pouco ou nenhum estudo farmacológico descrito na literatura. Também seria justificável testar a atividade antibacteriana dos outros compostos isolados neste estudo, para verificar se algum destes é o responsável pelo potencial antibacteriano apresentado pelos extratos.

Com relação à atividade antirradicalar, os resultados obtidos permitiram verificar que os todos os extratos avaliados apresentaram um grande potencial de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, sendo estes resultados promissores no campo de busca de substâncias para comporem formulações de suplementos antioxidantes. Para estes ensaios também não foi possível encontrar o principal composto responsável pela atividade antirradicalar do extrato, entretanto um dos flavonoides isolados, o ombuina-3-rutinosideo-5-glicosideo (LEA3), apresentou uma atividade significativa, reduzindo aproximadamente 83% do radical ABTS^{•+} na máxima concentração testada.

A avaliação da atividade anticolinesterásica revelou que grande parte dos extratos foram classificados como potentes inibidores da enzima AChE, destacando-se novamente o extrato etanólico de *E. affine*, que apresentou inibição similar ao controle positivo eserina. Dentre os compostos isolados, o mais ativo foi o flavonoide LEA3 que inibiu aproximadamente 48% da atividade enzimática.

De modo geral, não se verificou um aumento significativo nas atividades farmacológicas (antibacteriana e antirradicalar) dos extratos de *E. macrocalyx* sobre os extratos de *E. affine*, embora a concentração de alcaloides nos extratos da primeira planta seja consideravelmente maior. O que aconteceu foi justamente o contrário, em todos os testes, o extrato etanólico de *E. affine* foi aquele que apresentou maior atividade, indicando, portanto, que a composição química dos extratos desta planta apresenta um perfil mais condizente com os ensaios farmacológicos realizados, enquanto que a composição química de *E. macrocalyx*, rica em alcaloides tropânicos, possivelmente seja mais recomendada para ensaios em que esta subclasse de substância seja potencialmente mais ativa. Comparando-se os extratos da mesma planta, verifica-se que os extratos etanólicos apresentaram uma atividade superior aos extratos metanólicos, indicando que o etanol é o solvente mais recomendado para extração dos constituintes ativos destas plantas.

Para a atividade antiproliferativa, o estudo realizado permitiu detectar um bom potencial antitumoral da substância LEM5, no controle de células de carcinoma hepatocelular. Estes são apenas resultados iniciais, mas sugerem que se trata de um composto promissor para futuros testes farmacológicos *in vivo*, e com isso verificar seu potencial para desenvolvimento de uma droga anticancerígena. Este é um resultado importante uma vez que se trata de uma substância não muito comum de ser encontrada na natureza, sendo este o segundo relato de isolamento. Além disto, o fato de ter sido obtida de uma espécie endêmica da flora brasileira, comum da região Nordeste, contribui efetivamente para valorização da flora regional.

II CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico dos galhos de *Erythroxylum affine* e *Erythroxylum macrocalyx* levou ao isolamento e identificação de treze diferentes compostos, sendo três substâncias isoladas da *E. affine*, nove substâncias isoladas da *E. macrocalyx*, e um composto comum às duas plantas. O perfil químico dos compostos isolados se mostrou bastante diversificado, especialmente para a *E. macrocalyx*, de onde foram isolados alcaloides tropânicos, flavonoides glicosilados e triterpenos, enquanto que a *E. affine* mostrou ser rica principalmente em flavonoides e terpenos. Dentre os constituintes de *E. macrocalyx*, destaca-se o isolamento de um novo alcaloide tropânico, o 7 β -acetoxi-6 β -benzoiloxitropan-3 α -ol, que ainda não havia sido descrito na literatura. Além deste, grande parte dos compostos isolados não são muito comuns de serem relatados na literatura, especialmente os alcaloides tropânicos isolados, dos quais dois deles, [6 β ,7 β -dibenzoiloxitropan-3 α -ol e 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano], estão sendo relatados pela segunda vez. O isolamento destes metabólitos valoriza ainda mais essas duas plantas, que são endêmicas da flora brasileira, e de ocorrência comum à na região Nordeste do país.

Com relação aos ensaios farmacológicos, o estudo permitiu verificar uma fraca atividade antibacteriana dos extratos analisados (halos de inibição entre 0–7 mm) sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O destaque foi para os extratos de *E. affine*, que inibiram o crescimento das duas bactérias. Não foi verificada atividade antibacteriana significativa para os alcaloides tropânicos testados. Para atividade antirradicalar, foi possível verificar um grande poder de captura dos radicais DPPH \cdot e ABTS $^{+\cdot}$ pelos extratos, que apresentaram um conteúdo fenólico na faixa de 196–360 mg(EAG)/100g de extrato. Dentre os compostos testados, o flavonoide ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo, apresentou uma maior redução do radical ABTS $^{+\cdot}$, com CE₅₀ de 56,15 μ g/mL. Nos ensaios de atividade antiproliferativa, os compostos testados apresentaram maior ação sobre a linhagem de células de carcinoma hepatocelular (HepG2), com maior destaque para o composto 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano, que apresentou um CI₅₀ promissor, abaixo de 4 μ g/mL. Por fim, nos ensaios de atividade anticolinesterásica, a maior parte dos extratos foram potentes inibidores da enzima AChE, em especial o extrato etanólico de *E. affine*, que apresentou potencial de inibição próximo ao controle positivo eserina, enquanto que dentre as substâncias testadas, o flavonoide ombuina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo foi o

mais ativo, apresentando um potencial de inibição próximo à 50%. Todos os resultados dos ensaios farmacológicos são inéditos tanto para os extratos das plantas como para a maioria dos compostos isolados, trazendo mais relevância para este estudo.

Como principais perspectivas para este trabalho tem-se a obtenção de uma maior quantidade do novo composto isolado, para que possam ser realizados testes farmacológicos e lhe atribuir uma função biológica. Além disto, a promissora atividade antiproliferativa apresentada pelo alcaloide 6 β -benzoiloxi-3 α -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)tropano e a sua não-toxicidade a células normais, desperta um grande interesse para realização de testes *in vivo*. Portanto, para estudos futuros, seria interessante obter uma maior concentração deste alcaloide e de alguns análogos por meio de uma rota sintética viável. A presença de mais alcaloides foi verificada em outras frações de *E. macrocalyx*, mas estes não foram purificados e/ou identificados, sendo, portanto, interessante investir no isolamento destes compostos, uma vez que pertencem à uma classe de metabólito farmacologicamente promissora.

III REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P.K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3307-3330, 1992.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211- 224, 1994.

AIDOO, A.Y.; WARD, K. Spatio-temporal concentration of acetylcholine in vertebrate synaptic cleft. **Math. Comput. Model.**, v. 44, p. 952-962, 2006.

AL-SAID, M.S.; EVANS, W.C.; GROUT, R.J. Alkaloids of the Genus *Erythroxylum*. Part 5. *E. hypericifolium* Lam. Root-bark. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, p.957-959, 1986.

ALBUQUERQUE, C.H.; TAVARES, J.F.; OLIVEIRA, S.L.; SILVA, T.S.; GONÇALVES, G.F.; COSTA, V.C.O.; AGRA, M.F.; PESSÔA, H.L.F.; SILVA, M.S. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). **Quim. Nova**, v. 37, p. 663-666, 2014.

ALICE, B.C.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. Metodologia de análise de Plantas. In:_____. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**. Canoas: Editora ULBRA, 1995, p. 11-19.

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

ALVES, L.A. **Estudo fitoquímico e potencial farmacológico das folhas de *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine***. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2016.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. Os seres procarióticos: bactérias e Arqueas. In:_____. **Biologia**. 2 ed. v. 2. São Paulo: Editora Moderna LTDA, 2004, 610 p.

ANISZEWSKI, T. Biological Significance of Alkaloids. In: _____. **Alkaloids – Secrets of life**. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 1 ed. Reino Unido: Elsevier, 2007, p. 141-180.

AO, C.; DEBA, F.; TAKO, M.; TAWATA, S. Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. fil. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 44, p. 349-358, 2009.

ARAÚJO, C.R.M.; SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, p. 1818-1834, 2016.

AUTO, H.F.; CONSTANT, J.M.C.; CONSTANT, A.B.L. **Antibióticos e quimioterápicos**. 5 ed. Maceió: Edufal, 2008, 373 p.

BAGNO, A.; RASTRELLI, F.; SAIELLI, G. Prediction of the ^1H and ^{13}C NMR Spectra of α -D-Glucose in water by DFT Methods and MD Simulations. **J. Org. Chem.**, v.72, p.7373-7381, 2007.

BARBOSA FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 258-285, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARRETT, K.E.; BARMAN, S.M.; BOITANO, S.; BROOKS, H.L. Neurotransmissores e neuromoduladores. In: _____. **Fisiologia Médica de Ganong**. 24 ed. Nova York: AMGH Editora, 2014, p. 136-153.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERTHOLD, F. Isolation of Human Monocytes by Ficoll Density Gradient Centrifugation. **Blut**, v. 43, p. 367-371, 1981.

BIERI, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J-L.; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 439-447, 2006.

BIONDICH, A.S.; JOSLIN, J.D. Coca: The history and medical significance of an ancient andean tradition. **Emerg. Med. Int.**, v. 2016, p. 1-5, 2016.

BOHM, B.A.; LOO, T.; NICHOLLS, K.W.; PLOWMAN, T. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 833-837, 1988.

BORGES-OSÓRIO, M.R.; ROBINSON, W.M. Genética e Câncer. In: _____. **Genética Humana**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, p. 382-430.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Falando sobre câncer do intestino**. Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade

Brasileira de Endoscopia Digestiva, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. - Rio de Janeiro: INCA, 2003, 36 p.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 22. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 524 p.

BROWN, M.G.; LAWCE, H.J. Peripheral blood cytogenetic methods. In: BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. (Eds.). **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, 1997, p.77-171.

BRUYN, A.; ANTEUNIS, M.; GUSSEM, R.; DUTTON, G.G.S. $^1\text{H-N.M.R.}$ study of L-rhamnose, methyl α -L-rhamnopyranoside, and 4-O- β -D-galactopyranosyl-L-rhamnose in deuterium oxide. **Carbohydr. Res.**, v. 47, p. 158-163, 1976.

BUBB, W.A. NMR Spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts Magn. Resonance Part A**, v. 19A, p. 1–19, 2003.

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

CARNEIRO, M.; FERRAZ, T.; BUENO, M.; KOCH, B.E.; FORESTI, C.; LENA, V. F.; MACHADO, J.A.; RAUBER, J.M.; KRUMMENAUER, E.C.; LAZAROTO, D.M. O uso de antimicrobianos em um hospital de ensino: uma breve avaliação. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 57, p. 421-424, 2011.

CHENG, H.N.; NEISS, T.G. Solution NMR Spectroscopy of Food Polysaccharides. **Polymer. Reviews**, v. 52, p. 81-114, 2012.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: MEYERS, R. A. (ed.) **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000, p. 10815–10837

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, p. 47-58, 2010.

COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J.G. Erythroxyllaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, p. 659-671, 2014.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRUVINEL, A.R.; SILVEIRA, A.R.; SOARES, J.S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v. 4, p. 01-11, 2011.

CRUZ, R.A.S.; ALMEIDA, H.; FERNANDES, C.P.; JOSEPH-NATHAN, P.; ROCHA, L.; LEITÃO, G.G. A new tropane alkaloid from the leaves of *Erythroxylum sessile* isolated by pH-zone-refining counter-current chromatography. **J. Sep. Sci.** v. 39, p. 1273-1277, 2016.

CURTIS, H. **Biologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 964p

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DE WET, H. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, p. 11511-11514, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal Nature Products: A biosynthetic approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 539 p.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant Activity of Phenolics Compounds From Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 61, p. 187-192, 2006.

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 343-350, 2003.

DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J.; GRAY, A.; WATERMAN, P.G. The anti-inflammatory corn pounds of *Polygonum bistorta*: Isolation and characterization. **Planta Med.**, v. 65, p. 371-374, 1999.

EICH, E. **Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites**. Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 637p.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V. Jr.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull. World Health Organ.**, v. 63, p. 965-981, 1985.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **J. Food Compost. Anal.**, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v.7, p. 01-08, 2006.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Dossiê Antioxidantes. **Food Ingrid. Bras.**, n. 6, 2009.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A.L.; CARVALHO Jr., A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. Introdução: síntese da diversidade brasileira. In: FORZZA, R. C. (org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, p. 19-42.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GOMES, A.M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Rev. Psiquiatr. RS**, v. 27, p. 197-205, 2005.

GOMES, M.A.; PRIOLLI, D.G.; TRALHÃO, J.G.; BOTELHO, M.F.; Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 59, p. 514-524, 2013.

GONZÁLEZ-GARCÍA, K.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A.; GONZÁLEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Género *Erythroxylum*: Análisis de la información científica. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, p. 284-290, 2005.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J.L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K.L.; PAYO-HILL, A.L., GONZALEZ-LAVAUT, J.A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 34, p. 539-542, 2006.

GRIFFIN, W.J. A phytochemical investigation of *Erythroxylon australe* F. Muell. **Aust. J. Chem.**, v. 31, p. 1161-1165, 1978.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen: boon yet bane – introducing oxygen toxicity and reactive species. In: _____. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2015, p. 1-29.

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert. Rev. Pharmacoecon. Outcomes. Res.**, v. 10, p. 441-451, 2010.

INCA. **Falando sobre câncer de mama**. Coordenação de Prevenção e Vigilância – (Conprev) Rio de Janeiro: MS/INCA, 2002, 66 p.

INCA. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. THULER, L.C.S. (org.). 2 ed. Rio de Janeiro: Inca, 2012, 129 p.

INCA. **Quimioterapia**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 22 Nov. 2016.

JAMILA, N.; YEONG, K.K.; MURUGAIYAH, V.; ATLAS, A.; KHAN, I.; KHAN, N.; KHAN, S.N.; KHAIRUDDEAN, M.; OSMAN, H. Molecular docking studies and in vitro cholinesterase enzyme inhibitory activities of chemical constituents of *Garcinia hombroniana*. **Nat. Prod. Res.**, v. 29, p. 86-90, 2015.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin.**, v. 61, p. 69-90, 2011.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDT, G.W.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J.C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **PNAS**, v. 109, p. 10304–10309, 2012.

JIRSCHITZKA, J.; DOLKE, F.; D'AURIA, J.C. Increasing the pace of new discoveries in tropane alkaloid biosynthesis. **Adv. Bot. Res.**, v. 68, p. 39-72, 2013.

JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, p. 1749-1755, 2009.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Molecules**, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

KIEM, P.V.; MINH, C.V.; HUONG, H.T.; NAM, N.H.; LEE, J.J.; KIM, Y.H. Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 27, p. 1109-1113, 2004.

KIHARA, T.; SHIMOHAMA, S. Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 64, p. 99-105, 2004.

KOAY, Y.C.; WONG, K.C.; OSMAN, H.; ELDEEN, I.; ASMAWI, M.Z. Chemical constituents and biological activities of *Strobilanthes crispus* L. (Supporting Information). **Rec. Nat. Prod.** v. 7, p. 59-64, 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **Scientific World J.**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LABORCLIN. Manual para antibiograma: Difusão em disco (Kirby & Bauer). **LB laborclin**, v. 5, p. 01-29, 2011.

LOIOLA, M.I.B.; AGRA, M.F. BARACHO, G.S. QUEIROZ, R.T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxyllaceae Kunth. **Acta bot. bras.**, v. 21, p. 473-487, 2007.

LOIOLA, M.I.B.; COSTA-LIMA, J.L. 2015^a **Erythroxyllaceae: *Erythroxyllum P.Browne*** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7680>>. Acesso em: 20 Fev. 2017.

LOIOLA, M.I.B.; COSTA-LIMA, J.L. 2015^b. **Erythroxyllaceae: *Erythroxyllum affine* A.St.-Hil.** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7681>>. Acesso em: 21 Nov. 2016.

LOIOLA, M.I.B.; COSTA-LIMA, J.L. 2015^c. **Erythroxyllaceae: *Erythroxyllum macrocalyx* Mart.** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7709>>. Acesso em: 21 Nov. 2016.

LOPES, G.C. (trad.). **Leucemia Mieloide Aguda (LMA): Um guia para pacientes, familiares e amigos.** Leukaemia & Blood Foundation, 2013, 40 p.

LOUNASMAA, M. The Tropane Alkaloids. In: BROSSI, A. (edt.). **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology.** v. 33. Academic Press. Inc, 1988, p. 1-81.

LUCENA, E.M.P. Ecosistemas do Nordeste (semiárido). In: LUCENA, E. M. P. (org.). **Mudanças climáticas e desenvolvimento sustentável.** Fortaleza: Universidade Aberta do Nordeste, 2010, p. 321-352.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, v. 27, p. 33-39, 2008.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1517-1575, 1994.

MARTINEZ, S.T.; ALMEIDA, M.R. PINTO, A.C. Alucinógenos naturais: Um voo da Europa medieval ao Brasil. **Quim. Nova**, v. 32, p. 2501-2507, 2009.

MOHAMMED, M.M.D.; SPITELLER, M.; IBRAHIM, N.A.; MOHAMED, K.M. Cytotoxic activity of new tropinene glycoside isolated from *Solandra grandiflora* Sw. **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, p. 385-391, 2016.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MOURA, A.C.S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Quim. Nova**, v. 34, p. 1136-1140, 2011.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 762 p.

NASSER, A.L.M.; PAVAN, F.R.; BORALLE, N.; ZOCCOLO, G.J.; SANTOS, L.C.; MARCHI, M.R.R.; LEITE, C.Q.F.; VILEGAS, W. Esteróide e Triterpenos de espécies de *Qualea* – Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 34, p. 513-517, 2013.

NOGUEIRA, J.M.R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (orgs.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 1. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009, p. 221-397.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D.S. Interação Medicamentosa: Parte II. **Caderno de Farmácia**, v. 2, p. 97-110, 1986.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G.A.; ECKERT, C.R.; SILVA, T.A.; SOBRAL, E.S.; FÁVERO, O.A.; FERREIRA, M.J.P.; ROMOFF, P.; BAADER, W.J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Quim. Nova**, v. 37, p. 497-503, 2014.

OLIVEIRA, S.L.; SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; SENA-FILHO, J.G.; LUCENA, H.F.S.; ROMERO, M.A.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. **Chem. Biodivers.**, v. 7, p. 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S.L.; TAVARES, J.F.; BRANCO, M.V.S.C.; LUCENA, H.F.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; NASCIMENTO, S.C.; AGUIARB, J.S.; SILVA, T.G.; SIMONE, C.A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; SILVA, M.S. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chem. Biodivers.**, v. 8, p. 155-165, 2011.

OLIVEIRA, S.L. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: Isolamento e determinação estrutural de alcalóides tropânicos, flavonóides e diterpenos**. 2012. 191f. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

PATRICK, G.L. Cholinergics, anticholinergics and anticholinesterases. In: _____. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5 ed. United Kingdom: Oxford University Press. 2013, p. 578-608.

PAVIA, D.L. LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**: A guide for students of organic chemistry. 3ed. Estados Unidos: Thomson Learning, 2001, p. 390-465.

PETERSEN, R.C. Cocaine: An overview. In: Petersen, R.C.; Stillman, R.C. (edts.). **Cocaine: 1977**. NIDA Research Monograph #13. Washington: Government Printing Office, 1977, p. 5-15.

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

PIETTA, P-G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIGMAN, W.; ISBELL, H. Mutarotation of sugars in solution: Part I. History, basic kinetics, and composition of sugar solutions. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 23, p. 11-57, 1968.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIZZIOLO, V.R.; BRASILEIRO, B.G.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, p. 98-109, 2011.

PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, p. 1-53, 2004.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.-L.; COSTA, A. Estudo *in vivo* de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p. 323-328, 2005.

QUEIROZ, L.P. Angiospermas do Semiárido brasileiro. In: QUEIROZ L. P. RAPINI, A. GIULIETTI, A. M. (edts.). **Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do Semi-árido brasileiro**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), 2006, p. 47-52.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DUARTE, J.C.; TABOSA, I.M. Toxicidade aguda e alterações comportamentais induzidas pela fração de alcalóides totais das vagens de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (Leguminosae) em roedores. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23 p. 5-10, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, E.M.O.; LIMA, L.S.; DAVID, J.M.; VALE, A.E.; LOPES, L.M.X.; DAVID, J.P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochem. Lett.**, v. 6, p. 232-235, 2013.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, p. 133-149, 2005.

RODRIGUES, A.C.B.C.; BOMFIM, L.M.; NEVES, S.P.; MENEZES, L.R.A.; DIAS, R.B.; SOARES, M.B.P.; PRATA, A.P.N.; ROCHA, C.A.G.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Med.**, v.81, p. 798-803, 2015.

ROSEIRO, L.B.; RAUTER, A.P.; SERRALHEIRO, M.L.M. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. **Nutrition and Aging**, v. 1, p. 99-111, 2012.

ROSENKRANZ, V.; WINK, M. Induction of apoptosis by alkaloids, non-protein amino acids, and cardiac glycosides in Human Promyelotic HL-60 Cells. **Z. Naturforsch.**, v. 62c, p. 458-466, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D.; Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Embrapa**, comunicado técnico 128, p. 1-4, 2007.

SANTOS, J.P.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. **J. Arid Environ.**, v. 72, p. 652-663, 2008.

SIDDIQUE, H.R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. **Life Sci.**, v. 88, p. 285–293, 2011.

SIES, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. **Am. J. Med.**, v. 91, p. 31-38, 1991.

SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, F. Combined Assay for lactose and galactose by enzymatic reaction. In: PREEDY, V.R (edt.). **Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and Effects**. Grã-Bretanha: Royal Society of Chemistry, 2012, p. 395-404.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova**, v. 34, p. 300-305, 2011.

SILVA, G.L.; CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.-B.; RASOANAIVO, P.; LYNN, S.M.; O'NEILL, M.J.; LEWIS, J.A.; BESTERMAN, J.M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1514-1520, 2001.

SILVA, P.A.; RIUL, S.S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 64, p. 1016-1021, 2011.

SILVA, T.B.C.; COSTA, C.O. D'S.; GALVÃO, A.F.C.; BOMFIM, L.M.; RODRIGUES, A.C.B.C.; MOTA, M.C.S.; DANTAS, A.A.; SANTOS, T.R.; SOARES, M.B.P.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in Northeast Brazil. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 16, p. 1-9, 2016.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 152-178, 1999.

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

SOUSA, G.F.; DUARTE, L.P.; ALCÂNTARA, A.F.C. SILVA, G.D.F.; VIEIRA-FILHO, S.A.; SILVA, R.R.; OLIVEIRA, D.M.; TAKAHASHI, J.A. New Triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. **Molecules**, v. 17, p. 13439-13456, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Ondessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 703 p.

STEMPLIUK, V.A.; SANTOS, A.A.M.; MACHADO, A.M.; FRIGATTO, E.; SANTANA, H.T.; SALLAS, J.; MELHEM, M.S.C.; ELMOR, M.R.; MARTINO, M.D.V. **Tecnologia em serviços de saúde**: Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006.

SWAMINATHAN, M.; CHEE, C.F.; CHIN, S.P.; BUCKLE, M.J.C.; RAHMAN, N.A.; DOUGHTY, S.W.; CHUNG, L.Y. Flavonoids with M₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor Binding Activity. **Molecules**, v. 19, p. 8933-8948, 2014.

TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. **Rev. Saúde Públ.**, v. 24, p. 47-50, 1990.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Tradução: DAIAN, D.S.O.; DORVILLÉ, L.F.M. 12ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 964 p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Belo Horizonte, MG: Atheneu, 2008, 760 p.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.; MACENA, R.H.M.; BASTOS, V.P.D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 16, p. 213-219, 2014.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 359-363, 2007.

VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; BATISTA, A.L.; CHANG, M.R.; POTT, V.J.; GARCEZ, F.R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the Central-Western region of Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, p. 1302-1308, 2012.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respir. Physiol.**, v. 128, p. 379-391, 2001.

YI, J.; WU, J.-G.; WU, Y.-B.; PENG, W. Antioxidant and anti-proliferative activities of flavonoids from *Bidens pilosa* L var *radiata* Sch Bip. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 15, p. 341-348, 2016.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J.-L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; PAULO, M.Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography–UV detection–multiple mass spectrometry and liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectrometry. **J. Chromatogr.**, v. 1020, p. 75-89, 2003.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1707-1717, 2010.