

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DOIS  
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Lisandra de Abreu Nery

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UFRJ

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DOIS  
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Lisandra de Abreu Nery

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gilda Guimarães  
Leitão

Rio de Janeiro  
Agosto de 2008

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DOIS  
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA**

Lisandra de Abreu Nery

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gilda Guimarães Leitão

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, CCS, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

\_\_\_\_\_  
Presidente, Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

Rio de Janeiro

Agosto de 2008

**Nery, Lisandra de Abreu.**

Prospecção de metabólitos secundários em dois fragmentos de Mata Atlântica/  
Lisandra de Abreu Nery. – Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 2008.

xxiii, 115f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Gilda Guimarães Leitão

Tese (doutorado) – UFRJ/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-  
graduação em Química de Produtos Naturais, 2008.

Referências Bibliográficas: f. 94-114.

1. Bioprospeção. 2. Mata Atlântica. 3. Atividade Antioxidante. 4. Atividade Larvicida. 5. Atividade Antibacteriana. 6. Atividade Antituberculose. 7. Atividade Antitumoral. 8. Cromatografia Contracorrente. I. Nery, Lisandra de Abreu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais. III. Título.

## RESUMO

### PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM DOIS FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA

**Lisandra de Abreu Nery**

**Orientadora: Gilda Guimarães Leitão**

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Este trabalho relata o estudo de prospecção de atividades biológicas de metabólitos secundários de espécies vegetais oriundas de dois fragmentos de Mata Atlântica, Mata Boa Vista (RJ) e Mata Bela Fama (MG). Extratos de trinta e sete espécies vegetais obtidos por exaustiva extração a frio foram testados para atividades larvicida, antioxidante, antituberculose, antibacteriana e antitumoral. Cerca de 70% destes extratos apresentaram algum tipo de atividade. A partição líquido-líquido em diclorometano do extrato etanólico de folhas de *Cabrlea canjerana* forneceu, após fracionamento cromatográfico por técnica de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) os triterpenos damarânicos: ácido eiqulerianico (**CC01**) e eiqulerianato de metila (**CC07**). A partição líquido-líquido em acetato de etila do extrato etanólico de folhas de *Mabea fistulifera* forneceu, após fracionamento cromatográfico por cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) associada à técnica de separação em coluna de gel de Sephadex LH-20, o ácido

gálico (**MF1**). O extrato etanólico bruto de *Cabranea canjerana* demonstrou atividade larvicida frente larvas de *Aedes aegypti*. O extrato etanólico de *Mabea fistulifera* apresentou atividade antioxidante significativa, quando testado pelo método do DPPH. O estudo biodirigido realizado nas partições mostrou atividade superior ao do extrato bruto para partição em acetato de etila e seu fracionamento posterior revelou que a atividade antioxidante está relacionada à presença da substância majoritária, o ácido gálico (**MF1**). Dos extratos avaliados para verificação da atividade antibacteriana seis foram capazes de inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294: *Psychotria vellosiana*, *Peschiera affinis*, *Pouteria filipes*, *Plathymenia foliolosa*, *Cabranea canjerana* e *Cedrela fissilis*. Apenas quatro extratos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155: *Cabranea canjerana*, *Plathymenia foliolosa*, *Psychotria vellosiana* e *Pouteria filipes*. A atividade antibacteriana mais pronunciada foi demonstrada pelo extrato de *Mabea fistulifera* contra *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Dos extratos que produziram boa inibição da atividade enzimática da Pdr5p destacam-se *Virola oleifera*, *Bathysa australis* e *Mabea fistulifera* com valores de EC<sub>50</sub> de 22,8 µg/mL, 35,3 µg/mL e 42,5 µg/mL respectivamente. Até onde sabemos, a substância **MF1** (ácido gálico) está sendo citada pela primeira vez na espécie. A substância **CC07** (eichlerianato de metila) está sendo citada pela primeira vez na literatura.

Palavras-chave: bioprospecção, metabólitos secundários, atividade farmacológica, cromatografia contracorrente, triterpenos damarânicos, ácido gálico.

Rio de Janeiro

Agosto de 2008.

## ***ABSTRACT***

### **PROSPECTING OF SECONDARY METABOLITES TO TWO FRAGMENTS OF THE ATLANTIC FOREST**

**Lisandra de Abreu Nery**

**Orientadora: Gilda Guimarães Leitão**

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência.

The present investigation reports the study of prospecting of secondary metabolites of plants from two fragments of the Atlantic Forest, Mata Boa Vista (RJ) and Bela Fama (MG). Thirty-seven plant extracts obtained by exhaustive extraction were tested for larvicidal, antioxidant, antituberculosis, antibacterial and antitumoral activities. About 70% of these extracts showed some type of activity. The dichloromethane fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cabralea canjerana*, after fractionation by high speed countercurrent chromatography (HSCCC) afforded the dammarane triterpenoids eichlerianic acid (**CC01**) and eichlerianic acid methyl ester (**CC07**). The ethyl acetate extract from leaves of *Mabea fistulifera*, after fractionation by high speed countercurrent chromatography (HSCCC) and purification by Sephadex LH-20 provided gallic acid (**MF1**). The crude ethanol extract of *Cabralea canjerana* showed larvicidal activity. The ethanolic extract of *Mabea fistulifera* showed significant antioxidant activity when tested by the method of DPPH. The bioguided study on this extract and its fractions showed the ethyl acetate fraction as the most antioxidant. Its purification showed that the antioxidant activity is related to the presence of gallic acid (**MF1**). Six extracts were able to inhibit bacterial growth of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294:



*Psychotria vellosiana*, *Peschiera affinis*, *Pouteria filipes*, *Plathymenia foliolosa*, *Cabralea canjerana* and *Cedrela fissilis*. Only four extracts were able to inhibit bacterial growth of *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155: *Cabralea canjerana*, *Plathymenia foliolosa*, *Psychotria vellosiana* and *Pouteria filipes*. *Bathysa australis* stands out as one of the plants that showed good inhibition Pdr5p enzyme activity, *Mabea fistulifera* and *Virola oleifera*, (EC<sub>50</sub> of 22.8 µg/mL), (35.3 µg/mL) and (42.5 µg/mL) respectively. To our knowledge, the substance **MF1** (gallic acid) is being cited for the first time in this plant species. The substance **CC07** (eichlerianic acid methyl ester) is being cited for the first time in literature.

Key-words: bioprospecting, secondary metabolites, pharmacological activity, countercurrent chromatography, dammarane triterpenoids, gallic acid.

Rio de Janeiro

Agosto de 2008.

Agradeço ao Senhor Deus que  
deu-me mais do que eu esperava ter e  
que transformou-me em mais do que eu esperava ser.

Ao meu querido e amado pai, Thomaz Gervázio de Abreu, meu eterno herói  
que me ensinou a lutar e acreditar em meus ideais.

*In Memoriam*

Dedico esta obra a minha mãe,  
Theodora Ferreira de Abreu, pelo seu sorriso que até hoje me acolhe,  
aos seus braços que me acariciam e me curam e seu olhar que conforta, sem pedir  
nada.

Agradeço ao meu companheiro de todas as horas, Washington Nery, por partilhar comigo todo o processo de produção da tese, pelo carinho, paciência, confiança que tem depositado em mim. Agradeço a minha filha, Sofia Nery, melhor presente que já recebi, por ter impulsionado a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Este trabalho deve muito a algumas pessoas e instituições, por diferentes razões, e eu gostaria de agradecer especialmente.
- ◆ A Capes pela concessão da bolsa.
- ◆ A professora Dra. Gilda Guimarães Leitão por oferecer orientação e direção a este trabalho e pela paciência e profissionalismo na qual conduziu todas as mudanças de trajetória que ocorreram durante o desenvolvimento deste trabalho.
- ◆ A todos os professores do NPPN que foram de fundamental importância a minha formação.
- ◆ Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida, em especial a professora Dra. Áurea Echevarria que para mim simboliza um modelo de ideal e equilíbrio entre o profissionalismo e humanismo.
- ◆ A professora Dra. Leda Mathias pela difícil e árdua tarefa de lapidação das minhas idéias no mestrado (UENF).
- ◆ Ao professor Raimundo Braz-Filho, pela determinação estrutural das substâncias e, mais que um professor, por se um amigo que me traz cada vez mais experiência e amadurecimento.
- ◆ A Professora Dra. Maria Cleunice Bezerra de Souza do Nascimento pela dedicação, carinho, ajuda e torcida pelo meu sucesso.
- ◆ Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, que me ofereceu, ainda durante o exame de qualificação, muitas sugestões, exemplos e críticas fundamentais à reelaboração e aprimoramento da abordagem que eu vinha fazendo do tema proposto.
- ◆ Ao Prof. Dr. Alcides José Monteiro da Silva pela grande, inestimável e valiosa ajuda na elucidação estrutural, pela amizade e incentivo constantes.
- ◆ A amiga Dra. Gracilene Schmourlo pela amizade e incentivo nas horas mais difíceis e por excelentes sugestões que me devolviam o estímulo sempre que necessário.
- ◆ As amigas de trabalho Abeu-Colégio Patrícia Senna, Jaqueline da Rocha, Karen dos Santos Ferreira e Roseane S. Lopes pela paciência e espírito de solidariedade.
- ◆ Ao amigo Cleber Barreto pela colaboração na realização dos espectros de RMN.

- ◆ Aos colegas do meu grupo de trabalho Pierre André de Souza, Thiago B. Brum e em especial a amiga Fernanda das Neves Costa por partilharmos bons momentos de convivência e companheirismo.
- ◆ As diretoras do CIEP 399 Jean Baptiste Debret, Rita de Cássia da Silva, Dulcineia Teixeira da Silva de Sousa e Fabiana Conceição Caldeira Rodrigues por terem acreditado em meu trabalho, meu muito obrigada.
- ◆ As coordenadoras do CIEP 399 Jean Baptista Debret, Denise Silva Martins e Gleice Santos da Costa pelo incessante apoio.
- ◆ Aos colegas do CIEP 399 Jean Baptista Debret, Jaqueline Bin Grove (matemática), Sandra Regina do Nascimento (educação física), Antônio Claudio (Biologia), Adeilson da Silva Ribeiro (Literatura), Elizete de Andrade Bassani Silva (Biologia) e a todos os demais colegas professores e funcionários pela boa convivência ao longo destes quase três anos de trabalho.
- ◆ Ao técnico Francisco de Assis Vieira dos Santos (Central Analítica-NPPN) pela realização dos espectros de RMN.
- ◆ A minha irmã Leny Ferreira de Abreu Faria, por estar sempre disponível em ajudar, cuidando da Sofia nos fins de semana para que pudesse me dedicar à elaboração da tese. Esta ajuda foi fundamental.
- ◆ A minha irmã Leila Ferreira de Abreu Victor, por me acolher em sua casa no primeiro ano da tese e por ter me dado suporte mesmo estando à distância.
- ◆ Aos meus irmãos Leandro César Ferreira de Abreu e Luiz Cláudio de Abreu pelo apoio durante todos os anos e em todos os momentos.
- ◆ A minha família, por todo apoio, carinho, amor e por suportar pacientemente minha distante vida familiar durante estes seis longos anos.
- ◆ Obrigada Deus por que além daquilo que é esperado para um futuro doutor, como escrever e publicar artigos, principalmente, e finalizar a tese satisfatoriamente, existem outras coisas importantes a citar: atividades de cuidado pessoal como cuidar da aparência, tentar manter o peso, cultivar amor, amizades, cuidar da casa, cozinhar pros amigos e cuidar do marido e da filha. Das quais eu consegui me manter em dia com ajuda, é claro, da super secretária Maria de Fátima e da Creche Centro Educacional Bruna Tomé.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Atividade Antioxidante
AcOEt	Acetato de etila
APT	Attached Proton Test
° C	Grau Celsius
CCC	Cromatografia contracorrente
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COSY	COrrrelation SpectroscopY
<i>s</i>	simpleto
<i>sl</i>	simpleto largo
<i>t</i>	triplete
<i>m</i>	multiplete
Hz	Hertz
mg	miligrama
mL	mililitro
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Me	metila
MeO	metoxila
p.	Página
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence



HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spec.
IV	Infravermelho
$\delta$	Deslocamento químico em partes por milhão
$J$	Constante de acoplamento medida em Hz
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
BuOH	Butanol
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
P-gp	glicoproteína P
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
DMSO	Dimetilsulfóxido
CMI	Concentração mínima inibitória
Pdr5p	Pleiotropic Drug Resistance
FS	Fase superior
FI	Fase inferior
V <sub>m</sub>	Volume da fase móvel
$K$	Coefficiente de partição
S <sub>F</sub>	Fração de retenção de fase estacionária

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>CC01</b> (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	71
<b>Espectro 2</b>	Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>CC01</b> (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	72
<b>Espectro 3</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>CC01</b> (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	73
<b>Espectro 4</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT de <b>CC01</b> (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	74
<b>Espectro 5</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>CC07</b> (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	80
<b>Espectro 6</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>CC07</b> (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	81
<b>Espectro 7</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT de <b>CC07</b> (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	82
<b>Espectro 8</b>	Espectro de HSQC de <b>CC07</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	83
<b>Espectro 9</b>	Espectro de RMN 2D HSQC de <b>CC07</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	84
<b>Espectro 10</b>	Espectro de CG-EM de <b>CC01</b> ou <b>CC07</b> referente ao pico 2.	86
<b>Espectro 11</b>	Espectro de CG-EM de <b>CC01</b> ou <b>CC07</b> referente ao pico 3.	87
<b>Espectro 12</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>MF1</b> (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	89
<b>Espectro 13</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>MF1</b> (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	90
<b>Espectro 14</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT de <b>MF1</b> (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	91

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** Estruturas de flavonóides com conhecida atividade antioxidante 12
- Esquema 2** Obtenção das partições das 5 espécies de plantas que apresentaram 34  
atividade biológica.
- Esquema 3** Reunião das frações da cromatografia contracorrente da partição em 39  
acetato de *Mabea fistulifera* em sistema isocrático hexano-acetato de etila-butanol-  
água 0,4:0,4:0,6:1,0 (v/v/v/v)
- Esquema 4** Separação cromatográfica em contracorrente da partição em acetato de 41  
etila de *Mabea fistulifera* em gradiente crescente de polaridade de butanol  
[hexano/acetato de etila/butanol/metanol/água  
1,0:0,5:(0,5;0,8;1,0;1,5;2,0):0,5:1,0].
- Esquema 5** Separação cromatográfica em coluna de Sephadex LH-20 para 41  
obtenção de **MF1**.
- Esquema 6** Reunião das frações do 1° ao 4° fracionamento por cromatografia 44  
contracorrente da partição em diclorometano de *Cabrlea canjerana* em sistema  
isocrático hexano/acetato de etila/metanol/água 1,0:1,5:2,5:1,0 (v/v/v/v).
- Esquema 7** Fracionamento por cromatografia contracorrente da partição em 45  
diclorometano de *Cabrlea canjerana*.
- Esquema 8** Principais fragmentos de massas da substância **CC07**. 79

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Formas de vida dos mosquitos.	4
<b>Figura 2</b> Reação entre o DPPH e a amostra de interesse.	13
<b>Figura 3</b> Fórmula para obtenção do coeficiente de partição.	20
<b>Figura 4</b> Flavanonas isoladas de <i>Mabea fistulifera</i> .	24
<b>Figura 5</b> Substâncias isoladas de <i>Virola oleifera</i>	27
<b>Figura 6</b> Variação de gradiente de butanol (BuOH) no sistema de solvente hexano/acetato de etila/butanol/metanol/água (1,0:0,5:x:0,5:1,0).	40
<b>Figura 7</b> CCDA das frações da coluna em Sephadex LH-20	42
<b>Figura 8</b> CCDA referente às 4 CCC da partição em diclorometano de <i>Cabranea canjerana</i> (CCPD). A=1ª separação (1,0 g); B=2ª separação (1,0 g); C=3ª separação (1,5 g); D=4ª separação (1,5 g).	43
<b>Figura 9</b> Percentagem de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> nas concentrações de 10, 100 e 200 ppm de extrato de <i>Cabranea canjerana</i> .	50
<b>Figura 10</b> Efeito produzido por 200 µg/mL das partições obtidas do extrato etanólico (EE) de <i>Virola oleifera</i> , <i>Mabea fistulifera</i> e <i>Bathysa australis</i> .	52
<b>Figura 11</b> Paeonol isolado de <i>Bathysa meridionalis</i> .	54
<b>Figura 12</b> Valores de EC <sub>50</sub> do extrato e das partições de <i>Mabea fistulifera</i> .	58
<b>Figura 13</b> Valor de EC <sub>50</sub> do ácido gálico de <i>Mabea fistulifera</i> .	59
<b>Figura 14</b> Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.	60
<b>Figura 15</b> Cromatograma de <b>CC07</b> obtido por CG-EM.	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Plantas com atividade inseticida.	7
<b>Tabela 2</b> Espécies selecionadas para estudo nas Matas Bela Fama (RJ) e Boa Vista (MG).	31
<b>Tabela 3</b> Parâmetros utilizados nas cromatografias contracorrente para obtenção de CC01 e CC07.	47
<b>Tabela 4</b> Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> expostas a extratos etanólicos de plantas em concentração de 100 ppm.	48
<b>Tabela 5</b> Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> expostos a extratos etanólicos das três plantas mais ativas nas concentrações: 10, 100 e 200 ppm.	49
<b>Tabela 6</b> Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de <i>Aedes aegypti</i> expostos às partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de <i>Cabraea canjerana</i> a concentração de 100 ppm.	50
<b>Tabela 7</b> $T_R$ dos picos dos cromatogramas das partições em acetato de etila de <i>Virola oleifera</i> , <i>Mabea fistulifera</i> e <i>Bathysa australis</i> com espectros de UV (detector de fotodiodo) que pode ser associado cromóforos conhecidos de produtos naturais retirados da literatura.	53
<b>Tabela 8</b> Valores de $EC_{50}$ dos extratos mais ativos.	56
<b>Tabela 9</b> Comparação de valores de $EC_{50}$ do extrato de <i>Mabea fistulifera</i> , suas partições e o ácido gálico isolado da partição em acetato de etila.	59
<b>Tabela 10</b> Atividade antibacteriana dos extratos.	63
<b>Tabela 11</b> Halo de inibição do extrato etanólico (recoletado) e frações de <i>Mabea fistulifera</i> (10 mg).	64

<b>Tabela 12</b> Parâmetros de inibição dos extratos frente cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	65
<b>Tabela 13</b> Parâmetros de inibição dos extratos frente cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	66
<b>Tabela 14</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>CC01</b> comparados com dados de literatura (Roux <i>et al.</i> , 1998).	68
<b>Tabela 15</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>CC01</b> comparados com dados de literatura (Roux <i>et al.</i> , 1998).	69
<b>Tabela 16</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>CC07</b> comparados com dados de literatura (Mohamad <i>et al.</i> , 1999).	76
<b>Tabela 17</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para <b>CC07</b> comparados com dados de literatura (Mohamad <i>et al.</i> , 1999).	77
<b>Tabela 18</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para <b>MF1</b> .	88

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	A MATA ATLÂNTICA.....	1
1.2	A IMPORTÂNCIA DOS VEGETAIS PARA A VIDA HUMANA.....	3
1.3	PLANTAS E A AÇÃO LARVICIDA.....	4
1.4	PLANTAS E A AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	10
1.5	PLANTAS E A AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	14
1.6	PLANTAS E AÇÃO ANTITUMORAL.....	17
1.7	CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE.....	19
<b>2</b>	<b>PRINCIPAIS ASPECTOS DAS ESPÉCIES SELECIONADAS.....</b>	<b>21</b>
2.1	<i>Cabralea canjerana</i> .....	21
2.2	<i>Bathysa australis</i> .....	22
2.3	<i>Mabea fistulifera</i> .....	23
2.4	<i>Virola oleifera</i> .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
5.1	COLETA E PREPARO DO MATERIAL.....	31
5.2	PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS.....	32
5.3	PREPARO DAS PARTIÇÕES.....	33
<b>6</b>	<b>ENSAIOS BIOLÓGICOS/FARMACOLÓGICOS.....</b>	<b>35</b>
6.1	ENSAIO LARVICIDA.....	35
6.2	ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	35
6.3	ENSAIO ANTIOXIDANTE.....	36
6.4	ENSAIO ANTITUBERCULOSE.....	37
6.5	MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA Pdr5p DE LEVEDURAS.....	38
<b>7</b>	<b>SEPARAÇÕES POR CCC.....</b>	<b>38</b>
7.1	ESTUDO DA PARTIÇÃO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Mabea fistulifera</i> ..	39

7.1.1	FRACIONAMENTO POR CCC ISOCRÁTICO.....	39
7.1.2	FRACIONAMENTO POR CCC COM GRADIENTE.....	40
7.2	ESTUDO DA PARTIÇÃO EM DICLOROMETANO DE <i>Cabrlea canjerana</i>	42
<b>8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
8.1	BIOENSAIO LARVICIDA.....	48
8.2	BIOENSAIO SOBRE A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Pdr5p DE LEVEDURAS.....	51
8.3	BIOENSAIO ANTIOXIDANTE.....	55
8.4	BIOENSAIO ANTIBACTERIANO.....	60
8.5	BIOENSAIO ANTITUBERCULOSE.....	65
<b>9</b>	<b>ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....</b>	<b>67</b>
9.1	TRITERPENO DAMARÂNICO CC01.....	67
9.2	TRITERPENO DAMARÂNICO CC07.....	75
9.3	ÁCIDO 3,4,5-BENZÓICO MF1.....	88
<b>10</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
<b>12</b>	<b>ANEXO</b>	<b>115</b>
12.1	ANEXO 1 - ARTIGO: <i>Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity</i> .....	115



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A MATA ATLÂNTICA

Reconhecida por sua excepcional biodiversidade, com cerca de 50.000 espécies vegetais e *habitat* de um elevado número de plantas endêmicas, a Mata Atlântica desempenha um papel importante no equilíbrio global dos ecossistemas (Biavatti *et al.*, 2007).

A biodiversidade fornece aos ecossistemas uma estrutura de apoio essencial aos seres vivos, incluindo as faunas silvestres, aquáticas e flora, contribuindo para a provisão de necessidades humanas básicas, tais como moradia, alimentos e medicamentos (Biavatti *et al.*, 2007).

A importância da biodiversidade brasileira passou a ser compreendida a partir do desenvolvimento da biotecnologia, quando se começou a observar que quanto mais diversidade de vida um país possui, uma gama maior de produtos podem ser desenvolvidos e industrializados, principalmente os farmacológicos.

Estima-se que cerca de 45% do produto interno bruto brasileiro seja derivado da utilização de recursos da biodiversidade, incluindo produtos da agroindústria, setor florestal e pesca (Bentes-Gama, 2002). Entretanto, esta biodiversidade está sob um enorme nível de estresse provocado pela falta de ordenamento das ações antrópicas: aumentos demográficos da sociedade, operações agrícolas, práticas extrativistas, erosão e desmatamentos, somados a biopirataria acabam por minar a capacidade dos sistemas naturais da terra de fornecer os produtos e serviços essenciais de que dependem as comunidades humanas.

Este uso desenfreado dos recursos naturais torna a Mata Atlântica um dos biomas mais ameaçado do Brasil (Myers *et al.*, 2000).

Providencialmente, as pessoas estão lentamente tomando consciência da importância da floresta e da necessidade de conservá-la.

Neste contexto a bioprospecção, conceito estabelecido pela comunidade científica, permite o conhecimento e novas possibilidades de uso comercial da biodiversidade a partir da descoberta de novos organismos vivos que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos (Enríquez, 2005).

Novas realidades legislativas e comerciais levam a um novo enfoque na busca de produtos naturais bioativos por parte das grandes companhias farmacêuticas. Esse fato se deve a aplicação de tecnologias baseadas na genômica, onde o enfoque passa a ser macromolecular (peptídeos, proteínas, etc) ao invés de micromolecular (substâncias naturais ou sintéticas) estimulado pelos valores agregados a medicamentos ligados a doenças de origem genética como Alzheimer, câncer, artrite entre outros, causando desestímulo a prática da bioprospecção. Por outro lado, a bioprospecção é importante em países em desenvolvimento e com grande potencial em termos de biodiversidade como o Brasil, pois as micromoléculas são atualmente a alternativa ainda mais utilizada no tratamento de doenças tropicais e de fundo inflamatório (Pinto *et al*, 2002).

Pelo exposto, torna-se evidente a necessidade de se explorar os produtos naturais oriundos da grande biodiversidade brasileira, como fonte de inspiração para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos, que permitam o controle de doenças tropicais sejam elas de origem bacterianas ou viróticas.

## 1.2 A IMPORTÂNCIA DOS VEGETAIS PARA A VIDA HUMANA

O emprego dos vegetais como medicamento se confunde com a história humana. O hábito de recorrer às virtudes curativas de certas plantas foi uma das primeiras manifestações do esforço de compreender e utilizar a natureza. Com a evolução da ciência, intensificaram-se os estudos das plantas medicinais, relacionando a composição química destas com os seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular (Estanislau *et al.*, 2001).

Muitos poderes são atribuídos às plantas aromáticas, e estas têm sido usadas ao longo da história na busca pela felicidade, saúde, na medicina, religião, magia e cosmética. Nas civilizações primitivas, queimavam-se madeiras e óleos perfumados para a comunicação com os deuses ou o exorcismo de demônios. Os egípcios também usavam plantas e óleos aromáticos para embalsamar os mortos, demonstrando, assim, um conhecimento sofisticado de suas propriedades antissépticas (Estanislau *et al.*, 2001).

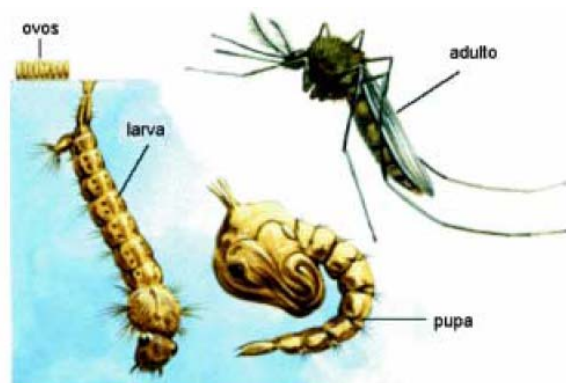
O estudo dos metabólitos secundários (produtos naturais) produzidos pelas plantas tem recebido nos últimos anos uma expressiva importância no processo de descoberta de medicamentos, sejam como produtos totalmente de origem natural, ou produtos derivados de produtos naturais ou produtos sintéticos baseados em modelo de produtos naturais (Shu, 1998).

Este fato é confirmado, através de dados que mostram que entre outros, dos medicamentos autorizados entre 1983 e 1994, 61% dos 31 medicamentos anticancerígenos são produtos naturais ou derivados ou são modelos sintéticos baseados na estrutura de produtos naturais. Isto prova que os produtos naturais vêm interferindo cada vez mais na obtenção de novos medicamentos (Cragg *et al.*, 1997).

O crescente conhecimento dos vários sistemas biológicos, níveis fisiológicos, ecológicos e de comportamento, associado às melhorias instrumentais e aos estudos fitoquímicos-farmacológicos, vem de encontro à necessidade cada vez mais aparente da busca de substâncias biologicamente ativas. O potencial farmacológico e ecológico que as plantas apresentam são de grande importância na busca racional de substâncias biologicamente ativas, seja sobre sua forma direta, modificada ou como protótipo.

### 1.3 PLANTAS E A AÇÃO LARVICIDA

Os mosquitos pertencentes à família Culicidae são vetores conhecidos por causar vários patógenos. O ciclo biológico desses insetos pertencentes à família Culicidae compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios de larvas, pupa e adulto (**Figura 1**) (Capurro, *et al.*, 2001).



**Figura 1** Formas de vida dos mosquitos (Capurro, *et al.*, 2001).

Das doenças causadas pelo mosquito *Aedes aegypti* (febre amarela e dengue), a dengue é hoje o maior desafio para a saúde pública, sendo considerada a mais importante arbovirose (virose transmitida por artrópodos) que afeta os seres humanos constituindo-se, portanto, num sério problema a saúde pública mundial, em especial

aos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, o principal transmissor.

O número de casos de dengue e dengue hemorrágica tem apresentado um crescimento nos últimos anos. Menos de 30 mil casos foram relatados no mundo entre 1956 e 1980, porém esse número aumentou para 137 mil entre 1981 e 1985 e mais de 267 mil casos entre 1986 e 1990 (Guerrant & Blackwood, 1999). Somente no Brasil foram notificados 314.225 e 227.363 casos de dengue, em 1998 e 2000, respectivamente (Capurro *et al*, 2001).

Após cerca de 60 anos sem que nenhum caso de dengue fosse notificado no Estado do Rio de Janeiro, em 1986 a doença ressurge, configurando uma epidemia que notificou cerca de 90 mil casos no biênio 1986/87, todos do sorotipo 1. Nos anos 1990 e 1991 houve um recrudescimento da epidemia, com 62.660 casos. Nos anos 90/91 um novo elemento era adicionado à epidemia: passaram a ser registrado, também, casos de dengue do sorotipo 2, a “dengue hemorrágica” (Oliveira e Valla, 2001).

Uma terceira epidemia de dengue foi reconhecida no Estado do Rio de Janeiro em 2008, causada pelos vírus tipo 2 (principalmente) e 3. Segundo dados da Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil, em 2008, até 9 julho, foram registrados 209.310 casos de dengue (17.213 em janeiro, 24.433 em fevereiro, 76.372 em março, 74.816 em abril, 15.212 em maio, 1.263 em junho e 1 em julho). Foram confirmados 152 óbitos, 129 ainda estão sendo investigados, dos quais 38% ocorreram em crianças com até 15 anos de idade <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dengue/den-Rio2008.html>.

Nas áreas endêmicas, programas de prevenção, combate e controle dessas enfermidades estão comprometidos devido ao desenvolvimento de resistências a múltiplas drogas pelas formas parasitas, de resistência a inseticidas por parte dos insetos vetores, como também a interrupção dos programas de controle do vetor devido aos custos crescentes (Carlson *et al.*, 1995).

O aumento da dengue hoje está relacionado ao número cada vez maior de lugares produzidos pela sociedade que funcionam como verdadeiro reservatório do *Aedes aegypti* e à resistência dos mosquitos aos atuais inseticidas comerciais.

Apesar da febre amarela estar razoavelmente sob controle com o uso da vacina, nenhuma vacina está disponível para a dengue. A experiência tem mostrado que a única maneira de diminuir a incidência desta doença é a erradicação do *A. aegypti*.

A experiência mostrou que os aerossóis usados na erradicação dos mosquitos não são eficazes já que os mosquitos adultos altamente domesticados fogem para lugares escondidos como armários. Sendo assim a única maneira bem sucedida de reduzir densidades do mosquito a um nível onde epidemias de dengue ou febre amarela não ocorram é atacando o mosquito no estágio ainda de larva.

Embora saibamos que os inseticidas químicos comumente utilizados no controle do *A. aegypti* (*Malathion*, *Abate* e outros) são de baixíssima toxidez para o homem, peixes e animais domésticos (pois são usados em ultra-baixo-volume, UBV, cerca de 300 mL/ha ou menos), a rotineira aplicação desses produtos em áreas urbanas, na tentativa de erradicar a dengue, tem provocado um crescente aumento na resistência por parte dos vetores.

Segundo Braussalis e colaboradores (1999) as plantas existentes no mundo já teriam sido extintas se não tivessem defesa contra insetos. Os metabólitos secundários constituem uma parte importante na defesa contra insetos.

Diversos estudos têm apontado produtos naturais como uma alternativa para o desenvolvimento de substâncias com atividade inseticida. A diversidade da flora brasileira representa um importante potencial para a produção desses metabólitos secundários, o que tem levado pesquisadores à busca de novos compostos com atividade inseticida, oriundos de extratos vegetais.

Há apenas alguns poucos registros na literatura de plantas que apresentam atividade inseticida contra larvas de mosquitos *A. aegypti*. Tais plantas estão mostradas na **Tabela 1**.

**Tabela 1** Plantas com atividade inseticida.

Família, Nome botânico	Extrato	Referência
<b>ACANTHACEAE</b>		
<i>Justicia pectoralis</i>	Acetato de etila	Chariandy, <i>et al.</i> , 1999
<i>Justicia pectoralis</i>	Éter de petróleo	Chariandy, <i>et al.</i> , 1999
<b>ANACARDIACEAE</b>		
<i>Anacardium occidentale</i>	Óleo essencial	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<i>Spondias mombin</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>ANNONACEAE</b>		
<i>Annona glabra</i>	Etanólico	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<i>Annona muricata</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<i>Marsdenia altissima</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>APIACEAE</b>		
<i>Pimpinella anisum</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005

<b>ARISTOLOCHACEAE</b>		
<i>A. triangularis</i>	Metanólico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<i>A. triangularis</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<b>ASTERACEAE</b>		
<i>Ageratum conyzoides</i>	Óleo essencial	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<i>Fernandao adenophylla</i>	acetônico	Jantan, <i>et al.</i> , 1999
<b>BURSERACEAE</b>		
<i>Bauhinia cheilantha</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>CAESALPINIACEAE</b>		
<i>Caesalpinia echinata</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>COMPOSITAE</b>		
<i>B. coridifolia</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<i>Eupatorium hecatanthum</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<i>Pterocaulon polystachium</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<i>Xanthium spinosum</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<b>CONVOLVULACEAE</b>		
<i>Operculina macrocarpa</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>CURPRESSACEAE</b>		
<i>Calocedrus formosana</i>	Óleo essencial	Cheng, <i>et al.</i> , 2003
<i>Juniperus macropoda</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005
<b>FABACEAE</b>		
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Óleo essencial	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<b>GRAMINEAE</b>		
<i>Cymbopogon nardus</i>	acetônico	Jantan, <i>et al.</i> , 1999
<b>LABIATAE</b>		
<i>Minthostachys setosa</i>	Metanólico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005
<i>Ocimum basilicum</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005



<b>LAURACEAE</b>		
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Óleo essencial	Cheng, <i>et al.</i> , 2003
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005
<b>LEGUMINOSAE</b>		
<i>Myroxylum balsamum</i>	Hexânico	Simas, <i>et al.</i> , 2004
<b>LILIACEAE</b>		
<i>Aloe Vera</i>	acetônico	Jantan, <i>et al.</i> , 1999
<b>MELIACEAE</b>		
<i>Azadirachta indica</i>	acetônico	Jantan, <i>et al.</i> , 1999
<i>Carapa guianensis</i>	Óleo essencial	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<b>MENISPERACEAE</b>		
<i>Abuta grandifolia (Mart.) Sandwith</i>	Diclorometânico	Ciccia, <i>et al.</i> , 2000
<b>MIRTICACEAE</b>		
<i>Eugenia uniflora</i>	Etanólico	Luna, <i>et al.</i> , 2005
<b>POACEAE</b>		
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Óleo essencial	Mendonça, <i>et al.</i> , 2005
<b>RUTACEAE</b>		
<i>Melicope subunifoliolata</i>	Metanólico	Ho, <i>et al.</i> , 2003
<b>SIMARUBACEAE</b>		
<i>Eurycoma longifolia</i>	acetônico	Jantan, <i>et al.</i> , 1999
<b>TAXODIACEAE</b>		
<i>Cryptomeria japonica</i>	Óleo essencial	Cheng, <i>et al.</i> , 2003
<b>ZINGIBERACEAE</b>		
<i>Zingiber officinale</i>	Óleo essencial	Prajapati, <i>et al.</i> , 2005

Nesse sentido, desenvolver ensaios, isolar, caracterizar e finalmente sintetizar substâncias de interesse no controle de insetos torna-se um desafio constante.

#### 1.4 PLANTAS E A AÇÃO ANTIOXIDANTE

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado ocupando a última camada eletrônica de um átomo (Young & Woodside, 2001). O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o radical peroxila ( $ROO^\bullet$ ) são exemplos de radicais livres.

Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos.

Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, porém, são igualmente reativos quanto os radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) e incluem o cátion nitrosônio ( $NO^+$ ), o ânion nitroxila ( $NO^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Pietta, 2000).

Os radicais livres são encontrados em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio.

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de radicais livres que causam danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo as funções vitais (Dröge, 2002), em

diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo (Barja de Quiroga, 1992, Goldfarb, 1993), vascular (Fenster *et al*, 2002) e cerebral (Halliwell, 1994). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (Niess *et al*, 1999).

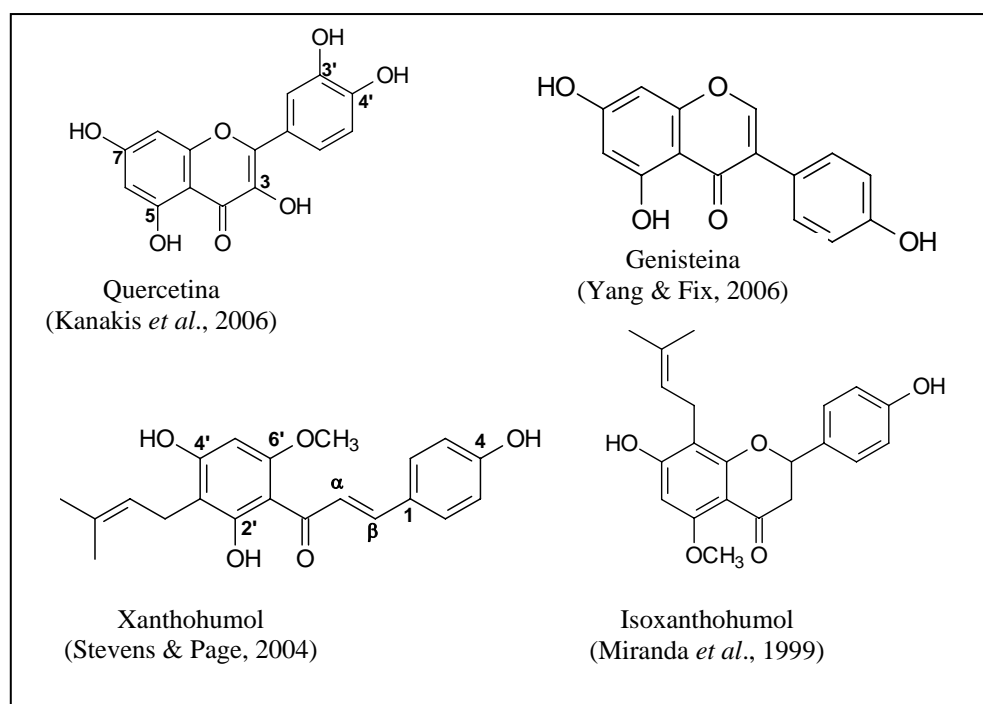
Evidências recentes sugerem que os danos causados pelos radicais livres em plantas são muito menos deletério uma vez que estas ao longo da evolução desenvolveram defesas antioxidantes (DA) (Ng *et al*, 2000).

Tal como nos animais as plantas estão sujeitas a vários tipos de estresse. Além do estresse antropogênico, as plantas são expostas também aos vários estresses naturais como, a seca, a temperatura extrema e o ataque por insetos e por microorganismos. Embora os mecanismos detalhados da ação sejam desconhecidos, diversos pesquisadores acreditam que a maior parte deste estresse nas plantas está associado à formação de espécies reativas do oxigênio.

Nos últimos anos, há um consenso geral de que a dieta tem um papel preponderante no desenvolvimento de doenças, tais como o câncer, doenças coronarianas, arteriosclerose, obesidade, diabetes *mellitus*, hipertensão, catarata crônica e doenças neurodegenerativas tais como: Mal de Parkinson, Mal de Alzheimer e perda de memória (Halvorsen *et al*, 2002; Auddy *et al*, 2003). Este consenso sugere que dietas ricas em frutas e vegetais reduzem significativamente os riscos de desenvolvimento dessas doenças (Argolo, *et al.*, 2004).

Uma compreensão completa da rota etiológica que conduz a doenças crônicas inclui a identificação das substâncias protetoras nas plantas e os mecanismos utilizados por elas para protegê-las do desenvolvimento dessas doenças.

Estudos recentes sugerem que os antioxidantes vegetais estão relacionados a substâncias fenólicas sendo, portanto de origem muito variada. Não há dúvidas de que os flavonóides constituem o grupo mais representativo encontrado, com elevada diversidade estrutural. A capacidade dos flavonóides atuarem como antioxidantes depende de sua estrutura molecular. A presença de grupos hidroxila é o principal fator que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides (Mensor *et al.*, 2001). A quercetina (um flavonol presente em vegetais, cascas de frutas e em cebolas), o xanthohumol (uma chalcona encontrada em cervejas), o isoxanthohumol (uma flavanona encontrada na cerveja) e a genisteína (uma isoflavona encontrada na soja) são exemplos de flavonóides que atuam como antioxidantes. Destes, a quercetina é o flavonol mais abundante e também o mais potente antioxidante devido a sua alta capacidade em seqüestrar radicais livres (**Esquema 1**).

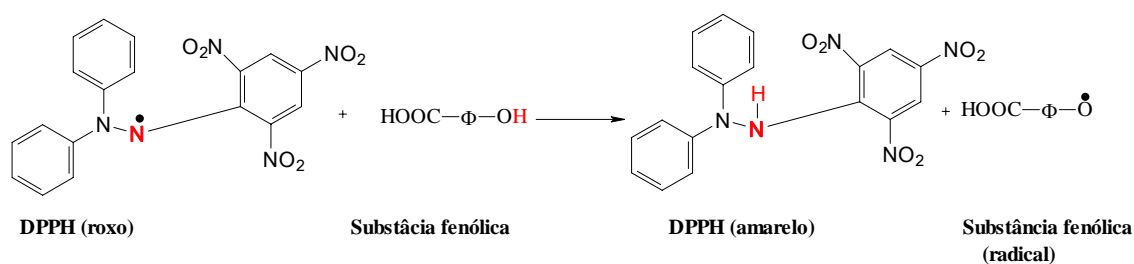


**Esquema 1** Estruturas de flavonóides com conhecida atividade antioxidante

Entretanto, estudos mais aprofundados revelaram a presença de classes adicionais de substâncias ativas, incluindo terpenóides (Lu & Foo, 2001), taninos condensados (Mensor *et al.*, 2001), cumarinas e saponinas (Manach *et al.*, 1999; Chen & Hon, 1997; Rice-Evans *et al.*, 1996).

A literatura mostra que o uso de antioxidantes sintéticos tem trazido pontos negativos para a saúde e algumas restrições têm sido observadas para sua utilização. Sendo assim, a busca de antioxidantes naturais tem sido incrementada (Koleva *et al.*, 2002).

Um método muito comum para se medir a atividade antioxidante em vegetais é o método de DPPH (1,1-difenil-1-picril-hidrazila) que detecta o sequestro de radicais livres, ou seja, a capacidade de redução do radical livre por parte de uma determinada substância ou substrato, e é independente da polaridade do substrato (Koleva *et al.*, 2002). O DPPH é um radical estável com máximo de absorção em 517 nm. Devido à facilidade e conveniência, esta reação tem amplo uso na avaliação da atividade antioxidante (**Figura 2**).



**Figura 2** Reação entre o DPPH e a amostra de interesse.

A investigação de extratos, frações e substâncias que possam funcionar como possíveis antioxidantes é um dos enfoques deste trabalho.

## 1.5 PLANTAS E A AÇÃO ANTIMICROBIANA

A introdução da penicilina há 50 anos foi uma das descobertas mais extraordinárias da microbiologia. Contudo, as bactérias resistentes emergiram e espalharam-se em todo o mundo devido ao crescimento genético notável dos microorganismos bem como a mobilidade da população do mundo. As drogas novas e mais caras apareceram logo em seguida. O problema da resistência às drogas antimicrobianas tornou-se particularmente um incômodo. Os problemas são em geral de natureza econômico-social (Kunin, 1993).

O número de antibióticos resistentes aumentou substancialmente nos anos recentes o que representa um problema terapêutico crescente (Guillemot, 1999; Hugo e Russell, 1995; Jones, 1998; Fish *et al.*, 1995; Austin *et al.*, 1999). As maneiras por que as bactérias superam a ação da droga são muitas e variadas, variando da impermeabilidade intrínseca à resistência adquirida (Williams e Sefton, 1999; Green e Wald, 1996; Rice, 1999).

Dentre as mais importantes bactérias causadoras de doenças destacam-se: *Pseudomonas aeruginosa* e *Echerichia coli* (Gram-negativas); e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (Gram-positivas) e *Mycobacterium tuberculosis*.

*Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno humano predominantemente oportunista (Bodey *et al.*, 1983; Rosenstein e Hall, 1980) é das bactérias Gram-negativa a mais comum encontrada em infecções nosocomiais. É responsável por 16% de casos de pneumonia nosocomial (Wiblin, 1997), 12% de infecções urinárias adquiridas em hospitais (Pollack *et al.*, 1995), 8% de infecções cirúrgicas em ferida (Kluytmans, 1997) e 10% de infecções da corrente sanguínea (Gordon *et al.*, 1998).

Este microrganismo é notório devido a sua resistência aos antibióticos e é, conseqüentemente, um patógeno particularmente perigoso e temido.

As infecções causadas por *Escherichia coli* são as principais causas de doenças bacterianas causadas por alimentos, por isso, a propagação destes microrganismos é um tópico importante na indústria de alimento (Detzel *et al.*, 2006).

*Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos infecciosos mais persistentes (Darwish *et al.*, 2002), sendo dentre as espécies de estafilococos, a mais relacionada a infecções em animais e humanos, bem como a doenças de origem alimentar (Gandra *et al.*, 2005). As infecções hospitalares e a síndrome do choque tóxico estão na lista das infecções causadas por *S. aureus* que mais incomodam.

Das infecções causadas por *Streptococcus pyogenes* incluem-se: faringite estreptocócica, escarlatina, sinusite, otite, pneumonia entre outras. Desde meados de 1980, *S. pyogenes* juntamente com *S. aureus*, tem chamado a atenção devido a uma complicação conhecida como síndrome do choque tóxico estreptocócico.

A tuberculose é uma doença contagiosa causada pela bactéria, *Mycobacterium tuberculosis*, com alto índice de mortalidade mundial. Estatísticas indicam que 3 milhões de pessoas no mundo morrem anualmente de complicações da tuberculose e são estimados cerca de 8 milhões de novos casos a cada ano, 95% destes casos ocorrem em países em desenvolvimento. Drogas como isoniazida e rifampicina têm sido historicamente bem sucedidas no tratamento de infecções tuberculósicas. Recentemente, no entanto, problemas com o prolongado e complicado regime de quimioterapia atual usada no tratamento da doença, em conjunto com o advento da epidemia de AIDS e o aumento da mobilidade das

populações humanas, tem conduzido a um surgimento no número de drogas multi-resistentes a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, contribuindo significativamente para o ressurgimento da doença (Karalı *et al.*, 2007). O tratamento da tuberculose resistente a múltiplas drogas requer o uso por 18 meses de 3 ou mais drogas que tem sido prescritas previamente. Além do mais nem todos os pacientes tratados são curados.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, quase 65% da população mundial usa plantas medicinais na conservação da saúde, 15% das aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta tem sido estudadas fitoquimicamente e 6% tem sido investigadas por diversas atividades biológicas. Aquelas com atividade antimicrobiana são procuradas por inúmeros pesquisadores para que suas substâncias ativas possam ser isoladas e caracterizadas (Molina-Salinas, *et al.*, 2006).

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos (Pereira *et al.*, 2004).

Durante as últimas décadas, houve uma resurgência no interesse de plantas como fontes medicinais e de novas substâncias para o uso na elucidação de fenômenos fisiológicos/bioquímicos (Williamson *et al.*, 1996). Os agentes antimicrobianos das plantas são bastante abundantes. Em muitos casos, as investigações da metodologia moderna confirmam as indicações populares usadas nas mais variadas infecções (Kinghorn, 1987). As estruturas químicas dos agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores são atribuídas em geral aos



metabólitos secundários (Aburjai *et al*, 2001). Sabe-se bem que os produtos naturais isolados de plantas superiores usados como antimicrobianos possuem um espectro limitado. Entretanto, seu potencial é de fácil síntese e os análogos sintéticos podem possuir seu potencial terapêutico realçado.

Um grande número de doenças do homem é provocado por infecções bacterianas. A crescente evolução de casos de infecções hospitalares constitui um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, onde uma minoria de hospitais possui comissões ativas de controle de infecção. A ocorrência de cepas hospitalares cada vez mais resistentes está relacionada ao uso freqüente e inadequado de antimicrobianos. A descoberta de novas substâncias com atividades antibacterianas constituem uma necessidade urgente devido a fatores tais como o aumento da incidência de novas e reemergentes enfermidades infecciosas, juntamente com a resistência desenvolvida pelos microrganismos aos antibióticos usados clinicamente (Mallavarapu, 2001).

O estudo para a viabilização de novas drogas que possam ser usadas no combate a essas cepas vem motivando a pesquisa de substâncias de origem natural, através de testes preliminares simples e rápidos.

## 1.6 PLANTAS E AÇÃO ANTITUMORAL

Uma revisão recente aponta que cerca de aproximadamente 60% dos agentes antitumorais e antiinfecciosos que estão comercialmente disponíveis, ou na última etapa de testes clínicos hoje são produtos de origem natural. Historicamente a maioria das drogas baseadas em produtos naturais incluindo ciclosporina, paclitaxel,

e derivados de camptotecina foram primeiro descobertos por ensaios tradicionais em células-bases *in vitro*. Com o advento da pesquisa de genoma e da biologia molecular utilizados como ferramentas para bioensaios, alvos anti-infecciosos e antitumorais têm sido, uma eficaz área de pesquisa no programa de investigação de produtos naturais (Rangel *et al*, 2008).

O fenômeno da resistência a múltiplas drogas consiste na resistência de várias drogas não relacionadas estruturalmente e funcionalmente. O membro mais estudado da família é a glicoproteína P (P-gp), codificada como gene ABCB1 que é responsável pela resistência pelas drogas a célula do câncer.

Transportadores ABC homólogos podem ser encontrados em organismos, tais como o fungo *Cândida glabrata* (Cdr1p e Pdh1p) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Pdr5p). A Pdr5p e a P-gp são homólogos funcionais, logo, compartilham um grande número de substratos inibidores, o que torna a Pdr5p um ótimo modelo para estudos na busca de inibidores para a P-gp.

Diversos grupos estão atualmente buscando na flora possíveis agentes inibidores de transportadores ABC. Além disso, estão sendo testados os efeitos de substâncias como flavonóides, diterpenos, polimetoxiflavanos, entre outras, sobre células cancerígenas.

Com base no fato de que existem diversas classes de substâncias produzidas pelos vegetais, estas se tornam uma fonte inesgotável de novas substâncias com efeitos sobre sistemas biológicos ainda a serem descobertos, podendo esses inibidores de origem natural ser utilizados na tentativa da elucidação dos mecanismos de inibição dessas proteínas, bem como na terapia anticâncer, promovendo a reversão do fenótipo de resistência das células que expressam esses

transportadores. Desta forma, produtos naturais podem ser fonte de novos moduladores para esta classe de transportadores (Rangel, 2005).

### 1.7 CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE

Para uma separação adequada de produtos naturais, várias técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas, a fim de otimizar e potencializar estas separações (Cragg *et al.*, 1997). Apesar de a maioria das separações serem realizadas em suportes sólidos, a técnica de Cromatografia Contracorrente (CCC) tem recebido um grande destaque, por representar um tipo de cromatografia de partição líquido-líquido que não necessita de suporte sólido, mas requer duas fases de solventes imiscíveis. Isto pode ser traduzido em menor perda de substâncias, além de evitar problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes, assim como permitir a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificações, a recuperação total da mesma e, também, um baixo consumo de solventes. Esta forma de cromatografia é baseada na partição de solutos entre duas fases líquidas imiscíveis e as substâncias são separadas de acordo com coeficientes de distribuição  $K_D$ , expresso como a razão entre as concentrações na fase estacionária e na fase móvel. A CCC é particularmente usada em escala preparativa (mg a g), e o tempo requerido para uma separação é de algumas horas (Silva, *et al.*, 2007).

Sendo uma técnica que se baseia na partição de um soluto entre dois solventes imiscíveis a CCC tem na escolha do sistema de solvente a etapa mais importante da separação de substâncias, que pode ser realizada através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), partição líquido-líquido ou consulta de listas de

solventes otimizados para classes específicas de produtos naturais. Pequenas quantidades de amostra são dissolvidas em um tubo de ensaio contendo o sistema de solvente a ser testado. Após agitação e decantação, alíquotas iguais de cada fase (FS) e (FI) são aplicadas em placas cromatográficas de gel de sílica e eluídas em um sistema de solvente adequado, em proporções iguais. Comparando-se as proporções em cada fase analisada, fase superior (FS) e fase inferior (FI), determina-se o coeficiente de partição  $K$  (Figura 3). As combinações de solventes mais eficazes são aquelas em que as substâncias alvo possuem coeficientes de partição próximos de 1 (Conway, 1990).

$$K = \frac{[\text{S}] \text{ fase estacionária}}{[\text{S}] \text{ fase móvel}}$$

**Figura 3** Fórmula para obtenção do coeficiente de partição.

A técnica de cromatografia contracorrente mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC). A instrumentação da HSCCC é composta por uma bobina de tubo de teflon enrolado de forma espiral, que realiza um movimento planetário em torno de um eixo central. Nesta técnica, a fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga e a fase móvel pode ser bombeada em alta velocidade permitindo, assim, menor tempo de análise (Leite *et al.*, 2005).

No campo de produtos naturais e ervas chinesas tem-se trabalhado na aplicação de separações dos componentes bioativos de *Ginkgo biloba* L., *Taxus chinensis*, *Polygonum multiflorum*, *Coptis chinensis* Franch, *Pueraria lobata*, *Sophora flavescens* Ait., *Salvia miltiorrhiza* Bunge, entre outros (Zhang, T. 2002).

Neste sentido a CCC tem uma importância significativa para o desenvolvimento de novas abordagens em produtos naturais, no sentido de reduzir as morosas medidas para isolar constituintes ativos. Devido à ausência de uma fase sólida estacionária, CCC não tem adsorção irreversível e, por conseguinte, prevê menor perda no fracionamento. No extrato vegetal bruto este fracionamento é particularmente valioso porque elimina as chances da "perda" da atividade durante o fracionamento. O que é benéfico, pois permite pesquisadores uma abordagem da questão do efeito sinérgico entre as substâncias para explicar a atividade biológica em plantas (Case *et al*, 2007).

## 2 PRINCIPAIS ASPECTOS DAS ESPÉCIES SELECIONADAS

### 2.1 *Cabranea canjerana*

A família Meliaceae, pertencente à ordem Rutales, é constituída por 51 gêneros de plantas lenhosas com aproximadamente 1400 espécies. Ocorre largamente na Floresta densa da encosta Atlântica, mesmo em altitudes elevadas. No Brasil são encontrados seis gêneros: *Carapa*, *Trichilia*, *Guarea*, *Cabranea*, *Swietenia* e *Cedrela*, sendo os três últimos gêneros exclusivos do continente americano. No Brasil, sua maior concentração está nos estados do Sul (Pennington and Styles, 1975; Barth *et al.*, 1998).

Segundo a classificação mais recente proposta por Pennington e Styles (1975), a família Meliaceae subdivide-se em quatro subfamílias: Swietenioideae, Melioideae, Quivisianthoideae, Cuparonianthoideae.

*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. pertence a subfamília Melioideae e tribo Guareeae, está descrita como uma árvore de médio porte tendo aproximadamente 20-30 m de altura. Distribuída principalmente nos estados de Minas Gerais e do Mato Grosso do Sul até Rio Grande do Sul, tem ocorrência nas matas pluviais da encosta Atlântica. A madeira é indicada para a construção de estruturas de móveis, obras de esculturas, construção civil dentre outros.

A espécie *Cabralea canjerana* é conhecida popularmente como: canjarana, canjerana, canjarana-de-prego, canharana, cedro-canjerana, pau-de-santo, caierana, canjarana-do-litoral, cajá-espúrio. Apresenta como sinonímia: *Trichilia cabjerana*, *Cabralea glaberrima*, *Cabralea cangera*, *Cabralea gaudichaudii*, *Cabralea multijuga*, *Cabralea oblongifolia*, *Cabralea coriacea* (Lorenzi, 1992).

Estudos fitoquímicos realizados com *Cabralea canjerana* descrevem a espécie como fonte de triterpenos da série damarano (Braga *et al.*, 2006).

## 2.2 *Bathysa australis*

A família Rubiaceae inclui aproximadamente 637 gêneros e cerca de 10.700 espécies que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo, porém as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá. A distribuição das espécies de *Bathysa*, no Brasil, restringe-se quase apenas a Mata Atlântica estando, portanto, em sua maioria ameaçadas de extinção pelo impacto que esse ecossistema vem sofrendo pela ação antrópica.

O gênero *Bathysa* engloba cerca de 15 espécies, de árvores, arvoretas ou arbustos ocorrentes no Panamá, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Brasil. No Brasil ocorrem 7 espécies, todas exclusivas da Mata Atlântica

das regiões Sudeste e Sul: *B. mendonçaei*, *B. gymnocarpa*, *B. sylvestrae*, *B. australis*, *B. stipulata*, *B. nicholsonii* e *B. cuspidata*.

No Brasil são encontradas no Distrito Federal e nos Estados do Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, quase que exclusivamente no domínio da Mata Atlântica. O Estado do Rio de Janeiro é o único onde ocorrem todas as espécies e o que possui o maior número de coletas.

Arvoretas, às vezes árvores ou arbustos com até 8 m, *Bathysa australis*, floresce de setembro a março, frutificando de setembro a agosto. Leoni (1995) constatou que na medicina popular brasileira a mucilagem de *B. australis* é empregada como cicatrizante (Germano-Filho, 1999).

Os indivíduos dessa espécie têm cascas amargas, tônicas e febrífugas, pelo que fazem parte das chamadas “falsas quinas”. No Rio de Janeiro é conhecida como quina-do-mato (Germano-Filho, 1999).

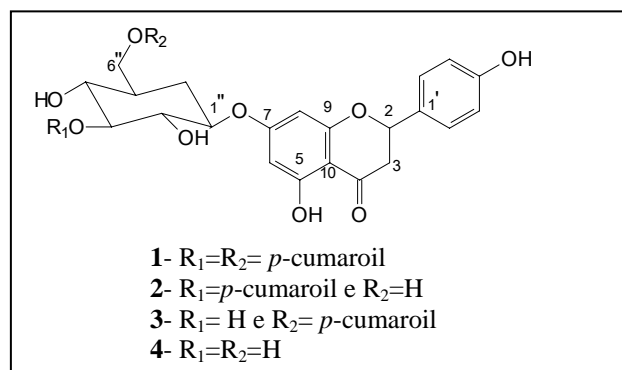
### 2.3 *Mabea fistulifera*

O gênero neotropical *Mabea* contém cerca de 50 espécies (Goulart *et al.*, 2005), entre os quais, *Mabea fistulifera* Mart. é uma Euphorbiaceae arbórea, com altura variando de 5 m a 14 m, típica de vegetação secundária de terrenos arenosos, principalmente em áreas de transição para o Cerrado. Tem sido registrada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Lorenzi, 2000), sendo comum na Região Noroeste do estado de São Paulo. Ocorre principalmente em locais com ação antrópica acentuada, geralmente agregadas em bordas de matas. Sua floração

ocorre de janeiro a abril, atingindo o pico em abril que corresponde ao início da estação seca na região (Daud and Feres, 2005). A maturação dos frutos ocorre a partir de setembro, prolongando-se até outubro. Por ocorrer durante o período de escassez de alimento, muitos animais utilizam seu pólen e néctar, produzidos em abundância, como fonte alternativa de alimento (Daud and Feres, 2005).

A espécie *Mabea fistulifera* é conhecida como Mamoninha-do-mato, canudeiro, canudo-de-cachimbo, mamoneira-do-mato, mamona-do-mato, raiz de tiu. Apresenta como sinonímia: *Mabea ferruginea* Benth. Sua madeira presta-se apenas para obras internas leves, confecção de embalagens leves, brinquedos etc. A árvore é elegante e própria para arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas (Lorenzi, 2002).

Trabalhos anteriores mostraram que o extrato etanólico das frutas desta planta apresentou uma significativa letalidade para larvas de artêmia. Relatos em estudos fitoquímicos anterior com *M. fistulifera*, descrevem o isolamento das flavanonas: (1) naringenina 7-*O*-β- (3'',6''-di-*p*-cumaroil) glicosídeo, (2) naringenina 7-*O*-β- (3''-*p*-cumaroil) glicosídeo, (3) naringenina 7-*O*-β- (6''-*p*-cumaroil) glicosídeo e (4) naringenina 7-*O*-β- glicosídeo juntamente com éster etílico do ácido gálico (Coqueiro *et al.*, 2007) (**Figura 4**).



**Figura 4** Flavanonas isoladas de *Mabea fistulifera* (Coqueiro *et al.*, 2007).



Algumas espécies de *Mabea* têm uso medicinal; nas Guianas *M. piriri* e *M. taquari* são usadas como adstringentes e febrífugas e *M. pulcherrima*, como tônica.

#### 2.4 *Virola oleifera*

*Virola oleifera* pertence à família Myristicaceae, a qual pertence à ordem Magnoliales, uma das maiores entre as Angiospermae (Joly, 1998). Segundo Willis (1973) e Romoff e Yoshida (1997), a família da Myristicaceae é composta por 18 gêneros e abrange em torno de 300 espécies. Entre as espécies encontradas no continente americano, são conhecidas em torno de 60 espécies de *Virola*, 30 de *Iryanthera*, 11 de *Compsonaura*, 9 *Dialyanthera* e 1 espécie de *Osteophloeum* (Romoff e Yoshida, 1997). O gênero *Virola* é freqüente no Brasil apresentando em torno de 45 a 60 espécies (Schultes, 1979).

As plantas desta família são todas lenhosas, arbóreas, raramente arbustivas, com folhas inteiras. O seu tamanho é muito variável, as de maior comprimento (50 cm ou mais), ocorrem muito comumente em *Virola decorticans* e *V. multinervia* (Rodrigues, 1980). Fruto em geral seco ou às vezes maior ou menos carnosos, abrindo-se por duas valvas, semente grande (Jolly, 1998).

*Virola oleifera*, conhecida popularmente como bocuva, bicuiba, candeia de caboclo, ucúba-branca, entre outros, apresenta uma altura que varia de 20 a 30 metros e tronco de 50 a 90 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples de 12 a 24 cm de comprimento. Ocorre na mata pluvial Atlântica e distribui-se do sul da Bahia e Minas Gerais até o nordeste do Rio Grande do Sul. Nestas regiões ocorre nas encostas dos morros, e mais raramente na planície litorânea, sem preferência de solo

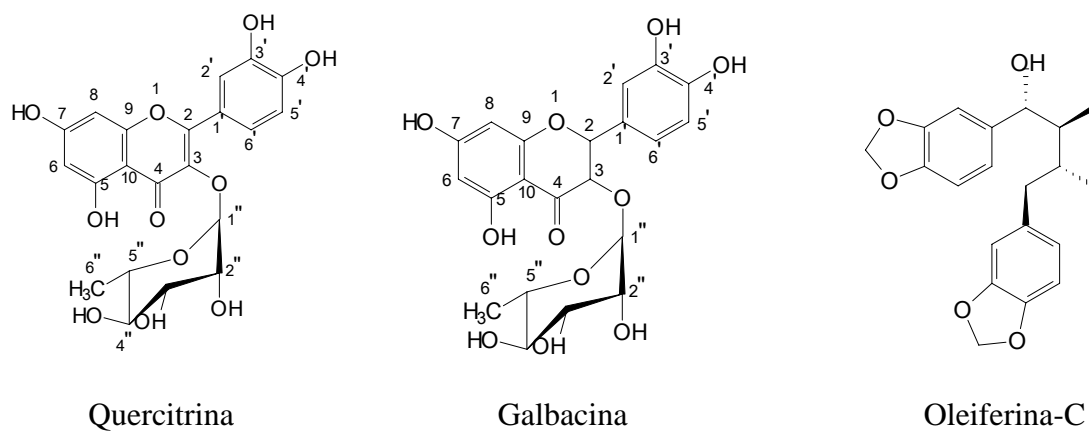
(Ferri, 1993). É uma planta de característica exclusiva de floresta pluvial Atlântica. Floresce principalmente durante os meses de janeiro a maio e a maturação das suas sementes inicia-se no final de julho, prolongando-se até o final de novembro (Lorenzi, 1998).

Desde o descobrimento do Brasil, já se valorizavam algumas espécies de *Virola* como planta útil da flora brasileira, sendo as mais utilizadas a *V. surinamensis* e *V. sebifera*, pela produção do comercialmente conhecido “sebo de ucuuba”, gordura proveniente das sementes destas espécies, de emprego tecnológico importante, ainda hoje, na produção de velas e sabão (Rodrigues, 1980).

A madeira da ucuúba é largamente utilizada na fabricação de compensados, e, como consequência do processo industrial, permite o uso de resíduos na confecção de papéis de boa qualidade (Rodrigues, 1980).

*Virola oleifera*, tem sido utilizada na medicina tradicional para o tratamento de doenças do trato respiratório, reumatismo e asma, bem como úlceras gástricas ou duodenal (Fernandes *et al.*, 1994). O gênero *Virola* é conhecido por ser uma fonte abundante de lignanas e neolignans (Fernandes *et al.*, 1997). Uma lignana, oleiferina-C e dois flavonóides glicosilados, astilbina e quercitrina, anteriormente isoladas das folhas de *Virola oleifera*, exibiram uma boa atividade analgésica (Kuroshima *et al.*, 2001) (**Figura 5**).

Quatro lignanas (lignan-7-ol, galbacina, eupomatenóide-8 e (+) aristolignina), também foram isoladas a partir de folhas de *V. oleifera*, como componentes da partição em diclorometano do extrato etanólico (Fernandes *et al.*, 1993).



**Figura 5** Substâncias isoladas de *Viola oleifera* (Kuroshima *et al.*, 2001).

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo a prospecção dos metabólitos especiais de plantas pertencentes a dois fragmentos de Mata Atlântica (Mata Bela Fama, MG e Mata Boa Vista, RJ) no sentido de inserir espécies da flora brasileira em lista de plantas com potencial na inibição da atividade enzimática (Pdr5p) de leveduras, atividade larvicida, atividade antibacteriana, atividade antituberculose e atividade antioxidante, através de estudo biodirigido.

No isolamento e purificação das substâncias isoladas utilizou-se principalmente a Cromatografia Contracorrente e técnicas cromatografias clássicas.

A identificação dos componentes foi realizada por meio de análise de espectros utilizando diversas técnicas espectroscópicas tais como espectrometria de massas, análises de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizando técnicas uni e bidimensionais quando possível.

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

- ◆ Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizaram-se cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, RP-18 F<sub>254</sub> e Celulose (MERCK).
- ◆ Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau P. A.
- ◆ As cromatoplasmas foram reveladas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 366 nm e/ou borrifação com revelador cromogênico (vanilina sulfúrica 2%).
- ◆ A concentração dos extratos e frações de coluna cromatográfica foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Fisatom 802.
- ◆ Os critérios de pureza adotados foram à observação de uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCD), variando-se a fase móvel e reveladores.
- ◆ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C e Gemini-200, operando a uma frequência de 200 MHz para <sup>1</sup>H e 50 MHz para <sup>13</sup>C utilizando como solvente: metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO), clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) utilizando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS).
- ◆ Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz).

- ◆ As análises feitas pela técnica de cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram obtidas em aparelho CG/EM modelo QP 5000, SHIMADZU (NPPN/UFRJ); coluna HP 5%; Injetor 278°C; interface 250°C, Temperatura da coluna 60°C a 290°C.
- ◆ Todas as separações foram realizadas em aparelho de cromatografia contracorrente (P. C. Inc. Potomac, MD, USA) equipado com coluna do tipo *multi-layer* equilibrada com um contra-peso. A bomba utilizada foi Rainin Dynamax modelo SD-200 (Greifensee, Suíça). Foi usado um coletor de frações Rainin Dynamax modelo FC-1. O volume da coluna foi de 80 mL. Todas as separações foram realizadas a 850 rpm, foram coletadas frações de 4 mL em uma velocidade de fluxo de 2 mL/min.
- ◆ A análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Lachrom (Merch, Darmstadt, Germany) equipado com uma interface D7000, bomba L-7100. A detecção feita nos comprimentos de onda de 240 a 260 nm (modelo detector L-7450A).

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL

As plantas selecionadas foram coletadas e identificadas em levantamento fitossociológico realizado em projeto anterior. Estas espécies encontram-se marcadas no campo e são de fácil localização para coleta. A identificação taxonômica foi feita pelo Dr. Sebastião J. da Silva Neto do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras representativas das espécies coletadas foram depositadas no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Foram selecionadas 13 espécies na Mata Bela Fama no município de Santana do Deserto, MG e 24 espécies na Mata Boa Vista no município de Comendador Levy Gasparian, RJ (**Tabela 2**).

**Tabela 2** Espécies selecionadas para estudo nas Matas Bela Fama (MG) e Boa Vista (RJ).

<b>Espécie</b>	<b>Família</b>	<b>Nº de registro do herbário</b>
<i>Malouetia arborea</i> (Vell.) Miers	Apocynaceae	RFA-31774
<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill	Euphorbiaceae	
<i>Croton floribundus</i> Spreng	Euphorbiaceae	
<i>Mabea fistulifera</i> Mart.	Euphorbiaceae	RFA-31778
<i>Pera heteranthera</i> (Schrunk) I. M. Johnst.	Euphorbiaceae	RFA-31777
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Meliaceae	
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Meliaceae	RFA-31788
<i>Siparuna arianae</i> V. Pereira	Siparunaceae	
<i>Siparuna reginae</i> (Tul.)	Siparunaceae	
<i>Sorocea bonplandii</i> (Baill.) W. C. Burger	Moraceae	RFA-32512
<i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Sm.	Myristicaceae	RFA-31794
<i>Bathysa australis</i> (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f.	Rubiaceae	RFA-31798
<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	Rubiaceae	RFA-31799
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott ex Spreng.	Anacardiaceae	RFA-31773

<i>Peschiera affinis</i> (Müll. Arg.) Miers	Apocynaceae	
<i>Sparattosperma leucanthum</i> (Vell.) K. Schum.	Bignoniaceae	RFA-31775
<i>Pera leandri</i> Baill.	Euphorbiaceae	
<i>Carpotroche brasiliensis</i> (Raddi) A. Gray	Flacourtiaceae	RFA-31779
<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze	Lecythidaceae	RFA-31787
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J. F. Macbr.	Fabaceae	RFA-31786
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	Fabaceae	RFA-31782
<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	Nyctaginaceae	RFA-31795
<i>Guettarda viburnoides</i> Cham. & Schlttdl.	Rubiaceae	
<i>Simira glaziovii</i> (K. Schum.) Steyerem.	Rubiaceae	RFA-31797
<i>Pouteria filipes</i> Eyma	Sapotaceae	RFA-31801
<i>Senefildera multiflora</i> Mart.	Euphorbiaceae	
<i>Luehea grandiflora</i> Mart. & Zucc.	Tiliaceae	
<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber	Moraceae	RFA-31792
<i>Simira sampaioana</i> (Standl.) Steyerem.	Rubiaceae	RFA-31796
<i>Melanoxylon brauna</i> Schott	Fabaceae	RFA-31783
<i>Cesearia sylvestris</i> Sw.	Flacourtiaceae	RFA-31780
<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J. F. Macbr	Fabaceae	RFA-31781
<i>Bombacopsis stenopetala</i> (Casar.) A. Robyns	Bombacaceae	RFA-31776
<i>Ficus gomelleria</i> Kunth & Bouché	Moraceae	RFA-31793
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Fabaceae	RFA-31785
<i>Plathymenia foliolosa</i> Benth.	Fabaceae	RFA-31784
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Rutaceae	RFA-31800

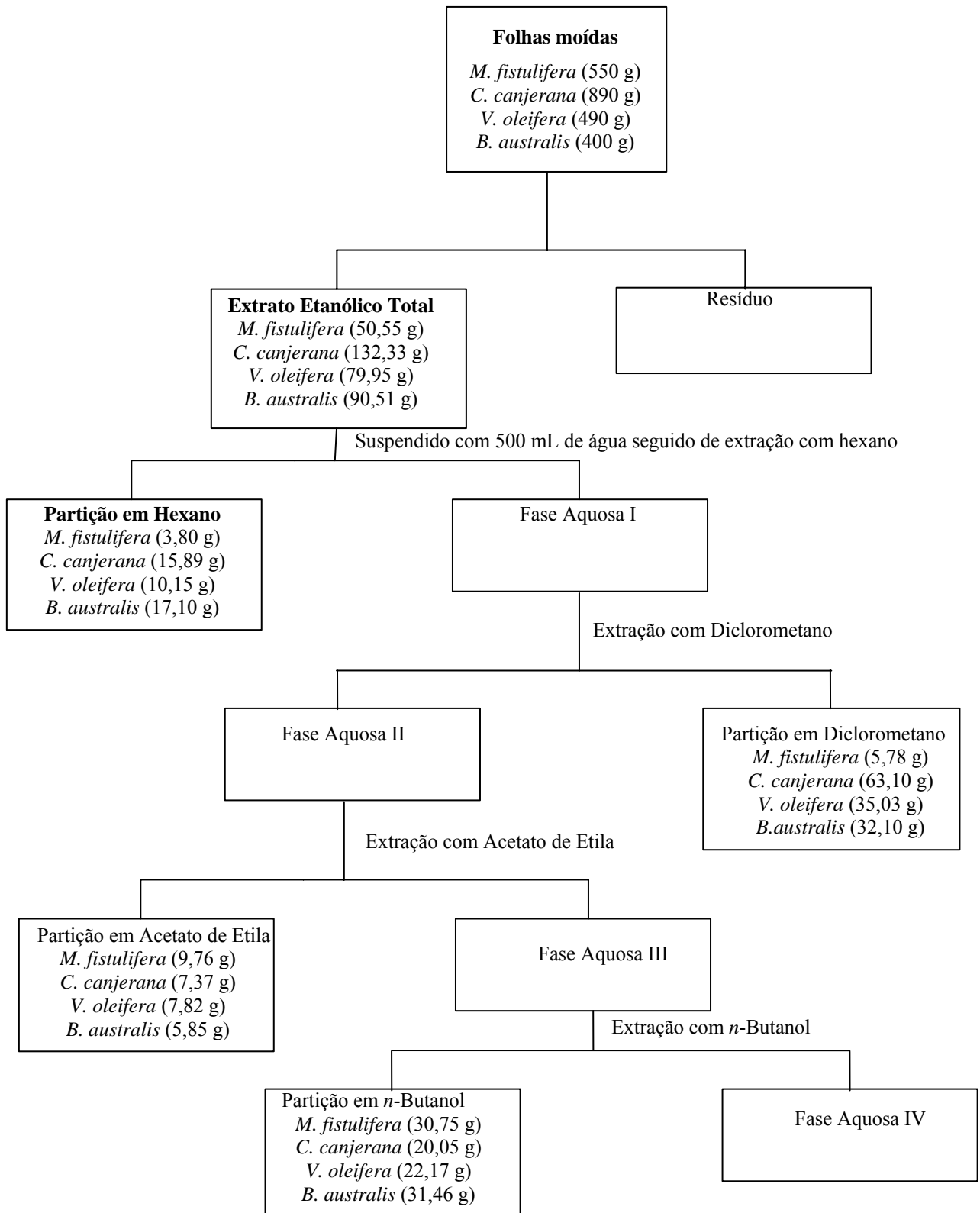
## 5.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

Uma pequena quantidade das folhas das plantas (20g de cada), após secagem e moagem, foi submetida à extração dos componentes fixos a frio (maceração), com etanol 96° GL. Em seguida, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório. Os extratos secos foram enviados para análise das atividades biológicas.



### 5.3 PREPARO DAS PARTIÇÕES

Em virtude dos resultados dos testes realizados com os extratos etanólicos das plantas, as folhas dos espécimes mais promissoras foram coletadas, submetidas ao mesmo processo de secagem e moagem descrito anteriormente. Seus extratos etanólicos foram preparados. Após secos e pesados, estes foram ressuspensos em água e repartidos em solventes orgânicos imiscíveis em gradiente crescente de polaridade fornecendo as partições em Hexano (Hex), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). Das plantas listadas na **Tabela 2**, foram preparados extratos etanólicos de: *Mabea fistulifera* (550 g), *Cabrlea canjerana* (890 g), *Virola oleifera* (490 g), *Bathysa australis* (400 g), *Psychotria vellosiana* (240 g), *Anadenanthera colubrina* (2600 g) e *Piptadenia gonoacantha* (820 g). Das plantas: *M. fistulifera*, *C. canjerana*, *V. oleifera* e *B. australis* foram preparadas partições líquido-líquido de acordo com o **Esquema 2**.



**Esquema 2** Obtenção das partições das 5 espécies de plantas que apresentaram atividade biológica.

## 6 ENSAIOS BIOLÓGICOS/FARMACOLÓGICO

### 6.1 ENSAIO LARVICIDA

Estes testes foram realizados no Laboratório do Prof. Alfredo Martins Oliveira Filho (NPPN/UFRJ).

Larvas de terceiro estágio do mosquito *A. aegypti* foram expostas a uma solução aquosa contendo 100 ppm dos extratos das 37 espécies de plantas selecionadas. O teste foi realizado em duplicata, adicionando-se 2 mL da solução contendo 25 mg de cada extrato e das partições nos recipientes teste contendo 200 mL de água. Após 30 minutos foram acrescentados 48 ml de água contendo 25 larvas de terceiro estágio. Os testes realizados com larvas de *A. aegypti* avaliadas no presente estudo são originárias da colônia do laboratório de biologia do NPPN – UFRJ, Jardim América/RJ. O controle foi realizado nas mesmas condições anteriores, contendo apenas 2 mL do solvente utilizado (metanol). As percentagens de mortalidade foram calculadas 24 horas após o início do experimento.

### 6.2 ENSAIO ANTIMICROBIANO

Neste trabalho, cepas de bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422) e *Streptococcus pyogenes* (75194) foram expostas aos extratos. As cepas utilizadas foram estocadas sob forma congelada. A pureza das culturas foi verificada por semeadura em placa de Petri contendo meio Triptose Agar Sangue seguido de incubação durante a noite a 36°C. Em seguida as colônias de bactérias foram ressuspensas em salina fisiológica estéril de modo a obter padrão de turbidez de 0,5

na escala McFarland. O meio Agar Mueller-Hinton (45 ml) foi colocado em placas (15 cm de diâmetro) e discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro já impregnados com os extratos a serem testados foram depositados. As placas foram invertidas, incubadas a 36°C por 24 horas e o diâmetro dos halos de inibição foram medidos. O Cloranfenicol foi utilizado como padrão de comparação, cujos diâmetros dos halos correspondem a: 25 mm para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 24 mm para *Escherichia coli* (ATCC 25922), 12 mm para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15422) e 39 mm para *Streptococcus pyogenes* (75194) (Bauer and Kirby, 1966). O teste foi realizado inicialmente com 50 mg de extrato e apenas os que apresentaram halo de inibição com 50 mg foram submetidos a testes com 10 mg.

Este trabalho foi realizado em colaboração e sob a orientação do Prof. Lesley C. Benchetrit do Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, CCS/UFRJ.

### 6.3 ENSAIO ANTIOXIDANTE

Os extratos etanólicos brutos das plantas foram solubilizados em etanol e diluídos a concentrações de 250, 125, 50 e 25 µg/mL. 1 mL de solução 0,3 mM de DPPH foi adicionado a 2,5 mL das soluções dos extratos. Após 30 min os valores de absorvâncias foram medidos a 518 nm em espectrofotômetro de UV-Vis e convertidos para porcentagem de atividade antioxidante. O controle foi preparado a partir de 1,0 mL de solução de DPPH a 0,3 mM diluído em 2,5 mL de etanol. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante desses extratos foi comparada ao do extrato comercial padronizado de *Ginkgo biloba* Egb 761 (Tebonin, solução oral de 40 mg).

#### 6.4 ENSAIO ANTITUBERCULOSE

Os ensaios foram realizados utilizando cepas de *M. smegmatis*, cepa mc<sup>2</sup> 155, espécie saprófita de crescimento rápido e altamente resistente à maioria dos antimicrobianos utilizando o método de Kirby-Bauer e cepas de *M. tuberculosis*, cepas H37Rv, utilizando o método da microdiluição com resazurina como indicador de viabilidade celular (Franzblau, 2000; Martin *et al.*, 2003).

Os extratos foram resuspenso em DMSO para a realização dos ensaios com *M. tuberculosis* (H37Rv). A concentração testada inicialmente foi de 100 µg/mL, contudo, para aqueles extratos que foram eficazes contra o *M. tuberculosis* nesta concentração foi determinada ainda à concentração mínima inibitória (CMI). O *M. tuberculosis* foi resuspenso de modo a obter padrão de turbidez de 1,0 na escala de McFarland. Os poços laterais das microplacas foram recheados com água enquanto os demais foram preenchidos com 75 µL do meio 7H9 com OADC, 75 µL dos extratos e finalmente foram adicionados 75 µL da suspensão bacteriana. As microplacas foram incubadas por cinco dias a 37° C. Ao final da incubação foram acrescidos 10 µL de resazurina e incubados outros dois dias a 37° C. Os extratos nos quais o crescimento bacteriano se deu com mudança de coloração de azul para rosa foram considerados ativos.

Estes testes foram realizados pela equipe do Prof. Pedro E. Almeida da Silva do Departamento de Patologia, Laboratório de Micobactérias, FURG, Rio Grande.

## 6.5 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA Pdr5p DE LEVEDURAS (Rangel *et al*, 2008).

Os extratos das 37 espécies selecionadas foram incubados com a enzima, na presença de ATP, durante 60 minutos a 37 °C e posteriormente, a quantidade de Pi liberado foi medida pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subarrow (1951). As frações resultante da partição líquido-líquido das plantas, *V. oleifera*, *B. australis* e *M. fistulifera* (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) após evaporação do solvente sofreram solubilização em 20% dimetilsulfóxido, a atividade ATPásica em Pdr5p foi testada (200 µg/mL).

Estes testes foram realizados por Luciana Pereira Rangel e foram objeto de estudo da sua dissertação de mestrado sob orientação do professor Dr. Antônio Ferreira Pereira do Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

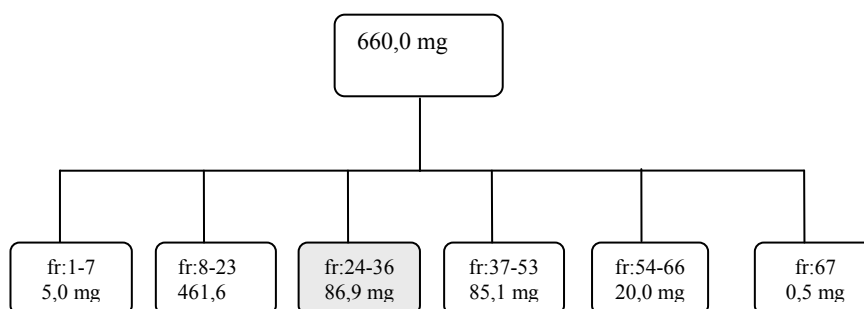
## 7 SEPARAÇÕES POR CCC

Para a escolha do sistema de solvente adequado uma pequena quantidade da amostra foi dissolvida no solvente a ser testado. Após agitação e decantação uma alíquota do sistema bifásico (**FS**) e (**FI**) foi aplicada em placa cromatográfica de gel de sílica em sistema de eluição adequado, visualizadas por luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e reveladas com vanilina sulfúrica 2%, carbonato de sódio, reagente de Folin-Ciocalteau ou tolueno:acetona:ácido fórmico.

7.1 ESTUDO DA PARTIÇÃO EM ACETATO DE ETILA DE *Mabea fistulifera*

## 7.1.1 FRACIONAMENTO POR CCC ISOCRÁTICO

A fase orgânica superior do sistema de solvente hexano-acetato de etila-butanol-água 0,4:0,4:0,6:1,0 (v/v/v/v), usada como fase estacionária, foi bombeada para dentro da coluna (80 mL) na direção cabeça-cauda. Depois de encher a coluna com a fase estacionária, iniciou-se a rotação e a fase móvel (aquosa) foi bombeada até todo excesso da fase estacionária sair da coluna ( $V_m=15$  mL,  $S_F=0,81$ , notado quando apenas a fase móvel extravasa da coluna). A amostra, 660 mg foi dissolvida em 10 mL do sistema de solvente e introduzida no equipamento. Sessenta e sete frações foram coletadas e a rotação foi interrompida no tubo quarenta e sete. As frações oriundas desta separação foram eluídas em CCDA com o sistema de solvente BuOH:AcOEt:H<sub>2</sub>O (4:1:5) ou acetato de etila-metanol:água (25:3:3) e reveladas com carbonato de sódio e reagente de Folin-Ciocalteu. A reunião das frações se deu como mostrado no **Esquema 3**.



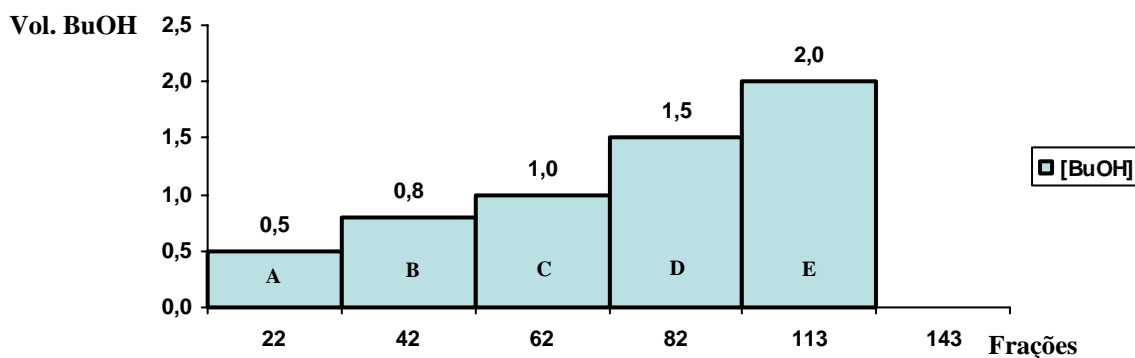
**Esquema 3** Reunião das frações da cromatografia contracorrente da partição em acetato de *Mabea fistulifera* em sistema isocrático hexano-acetato de etila-butanol-água 0,4:0,4:0,6:1,0 (v/v/v/v)

Como não foi possível o isolamento de substâncias a partir deste sistema isocrático optou-se por testar um sistema de solvente em que apenas o butanol

variasse em gradiente crescente de polaridade e que pudessem ser combinados butanol e metanol a fim de obter melhor separação.

### 7.1.2 FRACIONAMENTO POR CCC COM GRADIENTE

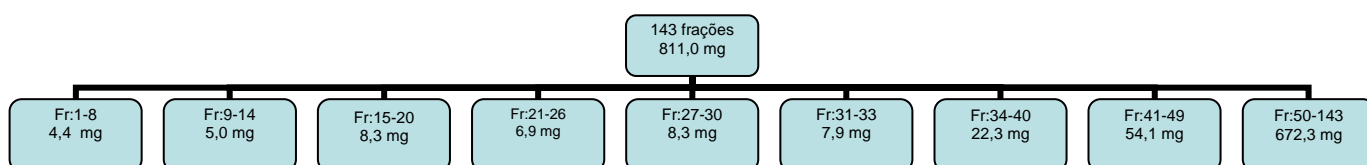
A fase estacionária, inferior (A), do sistema de solvente hexano-acetato de etila-butanol-metanol-água 1,0:0,5:x: 0,5:1,0 (v/v/v/v/v) onde x = [(A) = 0,5: (B) = 0,8: (C) =1,0: (D) =1,5: (E) =2,0] foi bombeada para dentro da coluna no sentido cauda-cabeça. Depois de cheia com a fase estacionária, iniciou-se a rotação e a fase móvel foi bombeada até todo excesso da fase estacionária sair da coluna ( $V_m = 20$  mL,  $S_F = 0,75$ ). Uma nova alíquota de 811 mg da amostra foi dissolvida em 10 mL do sistema de solvente e introduzida no equipamento. Cento e quarenta e três tubos foram coletados e a rotação foi interrompida no tubo cento e treze. A variação de gradiente se deu nos seguintes tubos respectivamente: sistema **A** para tubos de um a vinte e dois; sistema **B** para tubos de vinte e três a quarenta e dois; sistema **C** para tubos de quarenta e três a sessenta e dois; sistema **D** para tubos de sessenta e três a oitenta e dois e sistema **E** para tubos de oitenta e três a cento e treze, conforme **Figura 6**.



**Figura 6** Variação de gradiente de butanol (BuOH) no sistema de solvente hexano/acetato de etila/butanol/metanol/água (1,0:0,5:x:0,5:1,0).

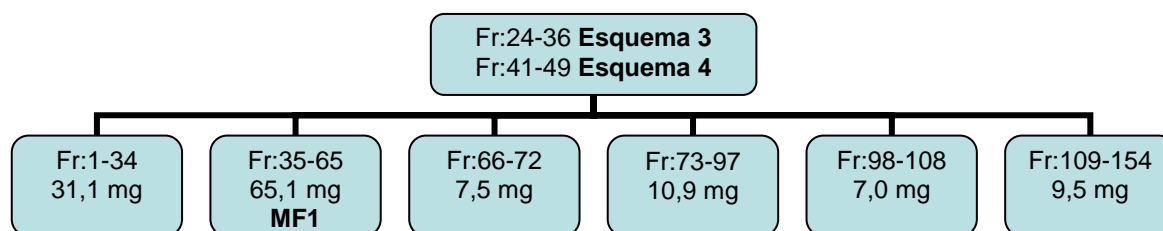


O sistema usado na eluição das substâncias em CCDA foi a mistura acetona: tolueno: ácido fórmico 3:3:1, com pequena variação da quantidade de ácido fórmico (de 8 gotas para 1 mL) de acordo com as frações. As placas cromatográficas foram reveladas em carbonato de sódio e reagente de Folin-Ciocalteau e a reunião se deu como mostrado no **Esquema 4**.

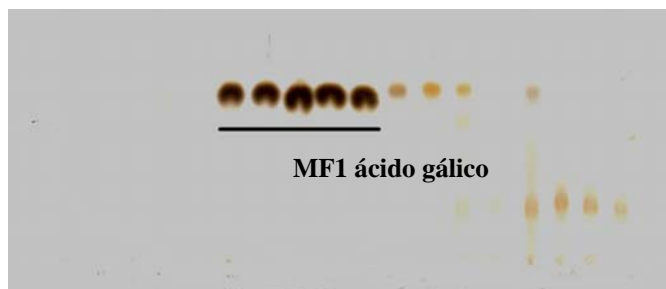


**Esquema 4** Separação cromatográfica em contracorrente da partição em acetato de etila de *Mabea fistulifera* em gradiente crescente de polaridade de butanol [hexano/acetato de etila/butanol/metanol/água 1,0:0,5:(0,5;0,8;1,0;1,5;2,0):0,5:1,0].

As frações fr: 24-36 do **Esquema 3** e fr: 41-49 do **Esquema 4** quando comparadas por CCDA, revelaram semelhança entre uma determinada substância majoritária. As duas frações foram reunidas e submetidas à coluna de Sephadex LH-20 MeOH:H<sub>2</sub>O (85:15) fornecendo a substância **MF1**. As frações foram reunidas de acordo com o **Esquema 5**.



**Esquema 5** Separação cromatográfica em coluna de Sephadex LH-20 para obtenção de **MF1**.



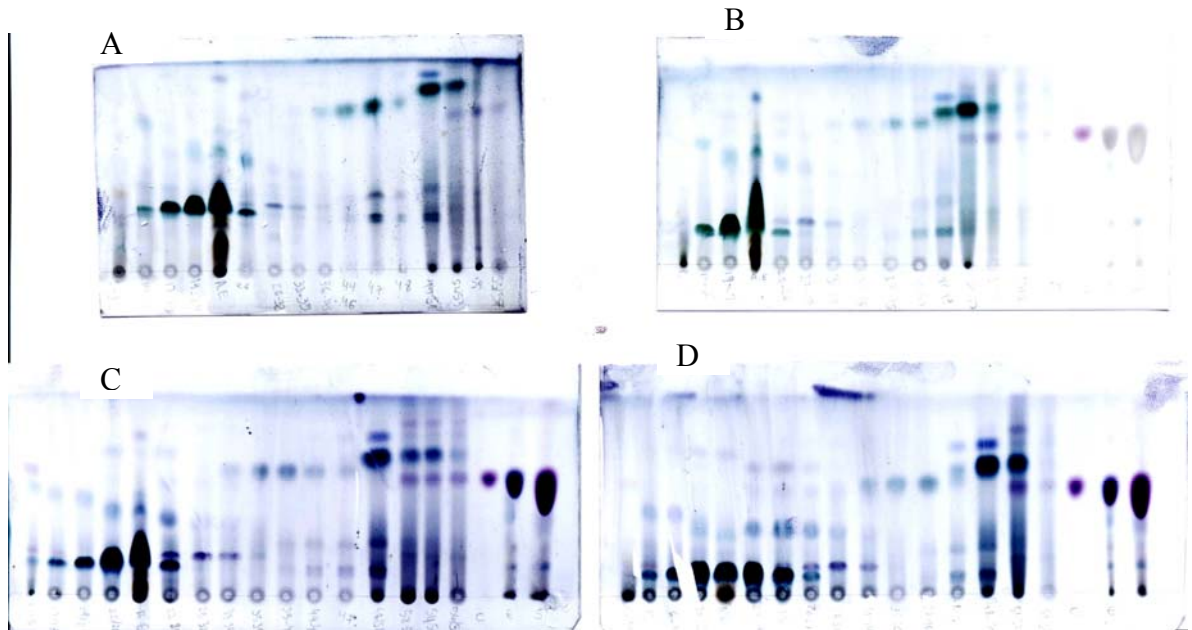
**Figura 7** CCDA das frações da coluna em Sephadex LH-20

Todas as frações mostradas no **Esquema 5** foram enviadas para testes com a enzima Pdr5p. A fração fr: 35-65, **MF1**, após elucidação estrutural foi identificada como ácido gálico.

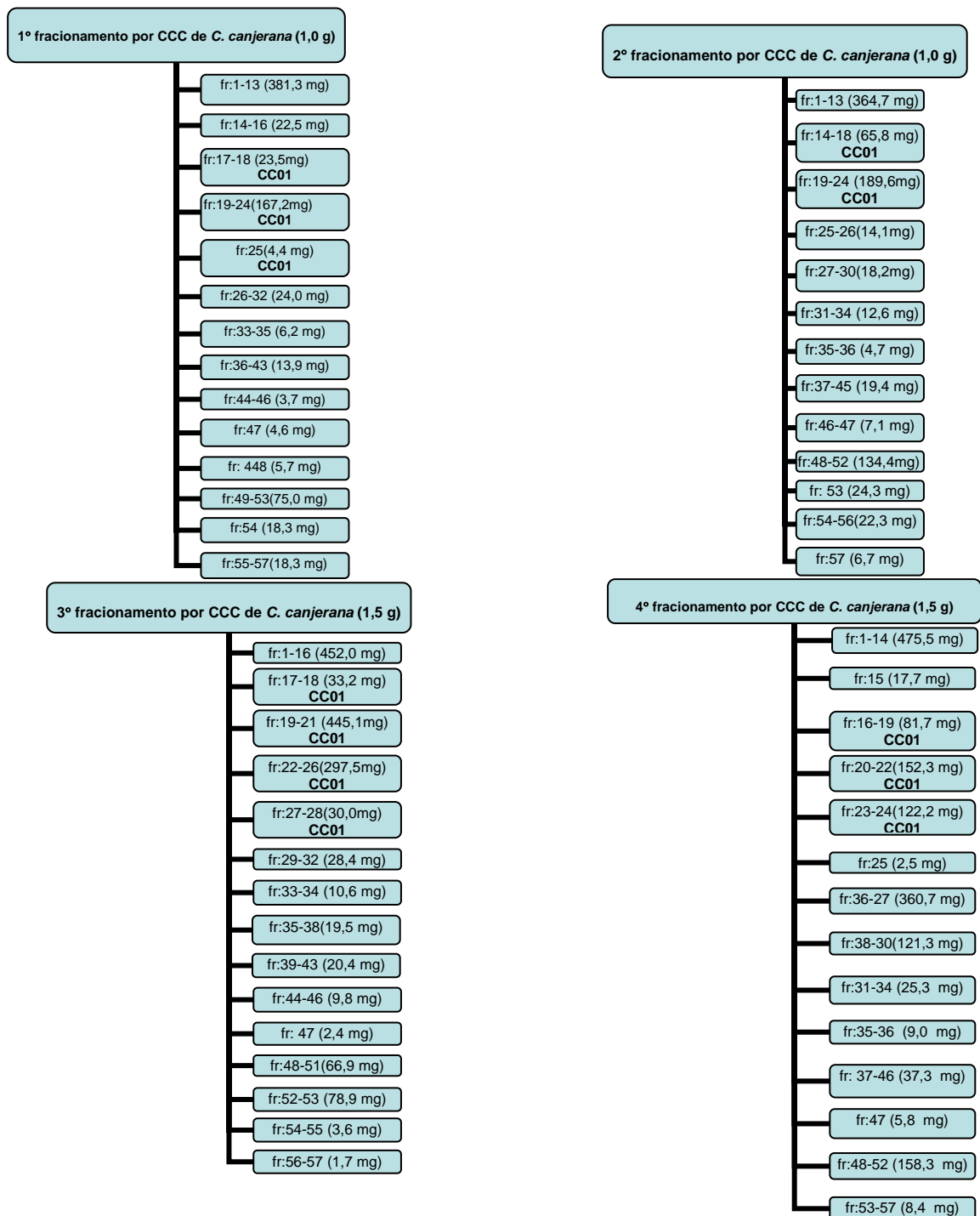
## 7.2 ESTUDO DA PARTIÇÃO EM DICLOROMETANO DE *Cabralea canjerana*

A partição em diclorometano de *C. canjerana* foi submetida a fracionamento por CCC, com base nos resultados dos ensaios biodirigidos ativos para o teste antituberculose e frente enzima Pdr5p, sob as seguintes condições: a fase estacionária superior do sistema de solvente hexano-acetato de etila-metanol-água 1:1,5:2,5:1,0 (v/v/v/v), foi bombeada para dentro da coluna no sentido cabeça-cauda. Depois de encher a coluna com a fase estacionária, iniciou-se a rotação e a fase móvel foi bombeada até todo excesso da fase estacionária sair da coluna ( $V_m = 20$  mL,  $S_F = 0,75$ , notado quando apenas a fase móvel extravasa da coluna). Cerca de 1,0 g da amostra foi dissolvida em 10 mL do sistema de solvente e introduzida no equipamento. Cinquenta e sete tubos foram coletados e a rotação foi interrompida no tubo quarenta. As frações oriundas desta separação foram eluídas em CCDA com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (6:0,2) e revelada em vanilina sulfúrica 2%. No **Esquema 6** podem

ser observadas 3 repetições realizadas sob as mesmas condições, bem como a reunião das frações obtidas. As placas de cromatografia em camada delgada analítica das 4 eluições estão mostradas na **Figura 8**, sendo que da esquerda para a direita, a partir da segunda placa as 3 últimas aplicações foram reservadas para os padrões de campesterol, estigmasterol e sitosterol respectivamente.

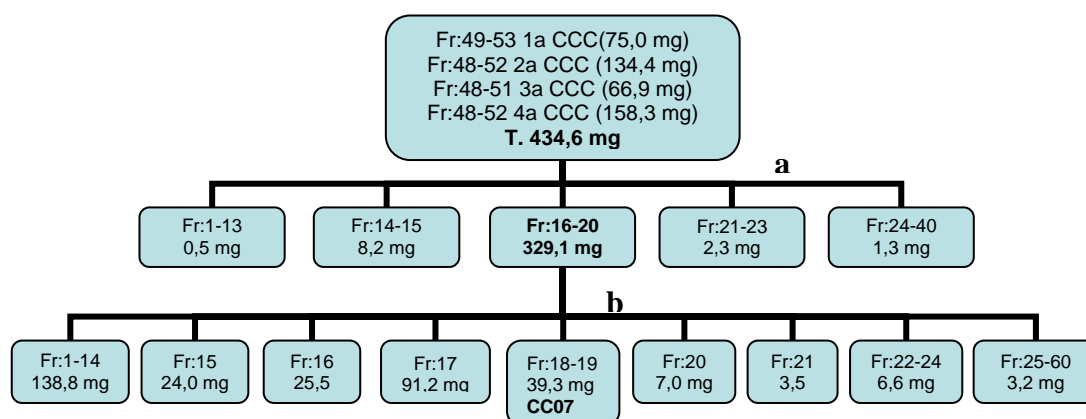


**Figura 8** CCDA referente às 4 CCC da partição em diclorometano de *Cabralea canjerana* (CCPD). A = 1<sup>a</sup> separação (1,0g); B = 2<sup>a</sup> separação (1,0g); C = 3<sup>a</sup> separação (1,5 g); D = 4<sup>a</sup> separação (1,5g).



**Esquema 6** Reunião das frações do 1º ao 4º fracionamento por cromatografia contracorrente da partição em diclorometano de *Cabralea canjerana* em sistema isocrático hexano/acetato de etila/metanol/água 1,0:1,5:2,5:1,0 (v/v/v/v).

As frações fr:49-53 1ª CCC (75,0 mg), fr:48-52 2ª CCC (134,4 mg), fr:48-51 3ª CCC (66,9 mg) e fr:48-52 4ª CCC (158,3 mg) quando analisadas por CCDA mostraram padrão de substâncias semelhantes, portanto, foram reunidas e submetidas a novo fracionamento por cromatografia contracorrente utilizando-se para este fracionamento o sistema isocrático hexano-acetato de etila-acetonitrila 1,0:0,4:1,0 (v/v/v) (**Esquema 7a**). A fração fr:16-20 oriunda do **Esquema 7A** foi submetida a fracionamento por cromatografia contracorrente com mesma combinação de solventes em sistema isocrático anterior na seguinte concentração hexano/acetato de etila/acetonitrila 0,7:0,2:0,5 (v/v/v). **Esquema 7b**.



**Esquema 7** Fracionamento por cromatografia contracorrente da partição em diclorometano de *Cabralea canjerana*.

**a)** Reunião das frações do 1º ao 4º fracionamento por cromatografia contracorrente da partição em diclorometano de *C. canjerana* em sistema isocrático hexano/acetato de etila/acetonitrila 1,0:0,4:1,0 (v/v/v).

**b)** Purificação da fração Fr:16-20 proveniente do fracionamento da reunião de frações oriundas do **Esquema 7a** por cromatografia contracorrente em sistema isocrático hexano/acetato de etila/acetonitrila 0,7:0,2:0,5 (v/v/v).

Os parâmetros utilizados em cada fracionamento por cromatografia contracorrente bem como os resumos das substâncias isoladas estão mais bem explicitados na **Tabela 3**.

As amostras **CC01** e **CC07** obtidas foram submetidas à análise por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e APT. Para esta última foram realizadas ainda as técnicas de RMN bidimensionais como COSY e HMQC e cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG/EM) o que tornou possível identificá-las como sendo: ácido eichleriânico (**CC01**) e eichlerianato de metila (**CC07**).

**Tabela 3** Parâmetros utilizados nas cromatografias contracorrente para obtenção de CC01 e CC07.

Parâmetros	Amostra	Sistema de solvente	Velocidade de fluxo	Fase móvel	Vin	Total tubos	Rotação interrompida	Substâncias isoladas	K	Rendimento	Volume total de solvente
1ª CCC	1,0 g	Hex/AcOet/MeOH/H <sub>2</sub> O 1,0:1,5:2,5:1,0	2,0 mL/min	inferior	20 mL	57	T 40	fr17-25 CC01	1,05	195,1mg (19,5%)	200:300:500:200
2ª CCC	1,0 g	Hex/AcOet/MeOH/H <sub>2</sub> O 1,0:1,5:2,5:1,0	2,0 mL/min	inferior	20 mL	57	T 40	fr14-24 CC01	1,05	255,4mg (25,5%)	200:300:500:200
3ª CCC	1,5 g	Hex/AcOet/MeOH/H <sub>2</sub> O 1,0:1,5:2,5:1,0	2,0 mL/min	inferior	9 mL	57	T 40	fr17-26 CC01	1,05	775,8mg (51,7%)	200:300:500:200
4ª CCC	1,5 g	Hex/AcOet/MeOH/H <sub>2</sub> O 1,0:1,5:2,5:1,0	2,0 mL/min	inferior	23 mL	57	T 40	fr16-24 CC01	0,95	356,2mg (23,7%)	200:300:500:200
Esquema 7 (a)	434,6 mg	Hex-AcOet-ACN 1,0:0,4:1,0	2,0 mL/min	inferior	24 mL	40	T 40	—	—	—	150:60:150
	fr49-53										
	1ª CCC										
	fr48-52										
	2ª CCC										
fr48-51											
3ª CCC											
fr48-52											
4ª CCC											
Esquema 7 (b)	329,1 mg	Hex-AcOet-ACN 0,7:0,2:0,5	2,0 mL/min	inferior	24 mL	60	T 30	fr18-19 CC07	0,92	39,3mg (11,94%)	350: 100: 250
	Fr16-20										

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 BIOENSAIO LARVICIDA

A **Tabela 4** mostra os dados relativos à % de mortalidade das larvas de *A. aegypti* testados frente aos 37 extratos de plantas, com especial destaque a *Cabralea canjerana*, capaz de causar morte em mais de 50% das larvas.

**Tabela 4** Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* expostas a extratos etanólicos de plantas em concentração de 100 ppm.

Espécie	Família	% de mortalidade
1 <i>Malouetia arborea</i>	Apocynaceae	4
2 <i>Aparisthium cordatum</i>	Euphorbiaceae	2
3 <i>Croton floribundus</i>	Euphorbiaceae	6
4 <i>Mabea fistulifera</i>	Euphorbiaceae	0
5 <i>Pera heteranthera</i>	Euphorbiaceae	0
<b>6 <i>Cabralea canjerana</i></b>	<b>Meliaceae</b>	<b>52</b>
7 <i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae	6
8 <i>Siparuna arianeae</i>	Siparunaceae	0
<b>9 <i>Siparuna reginae</i></b>	<b>Siparunaceae</b>	<b>42</b>
10 <i>Sorocea bonplandii</i>	Moraceae	0
11 <i>Virola oleifera</i>	Myristicaceae	2
12 <i>Bathysa australis</i>	Rubiaceae	2
13 <i>Psychotria vellosiana</i>	Rubiaceae	2
14 <i>Astronium fraxinifolium</i>	Anacardiaceae	2
15 <i>Peschiera affinis</i>	Apocynaceae	0
<b>16 <i>Sparattosperma leucanthum</i></b>	<b>Bignoniaceae</b>	<b>30</b>
17 <i>Pera leandri</i>	Euphorbiaceae	0
18 <i>Carpotroche brasiliensis</i>	Flacourtiaceae	0
19 <i>Cariniana estrellensis</i>	Lecythidaceae	0
20 <i>Piptadenia gonoacantha</i>	Fabaceae	26
21 <i>Dalbergia nigra</i>	Fabaceae	14
22 <i>Guapira opposita</i>	Nyctaginaceae	0
23 <i>Guettarda viburnoides</i>	Rubiaceae	0
24 <i>Simira glaziovii</i>	Rubiaceae	0
25 <i>Pouteria filipes</i>	Sapotaceae	0
26 <i>Senefeldera multiflora</i>	Euphorbiaceae	0
27 <i>Luehea grandiflora</i>	Tiliaceae	0
28 <i>Brosimum guianense</i>	Moraceae	2
29 <i>Simira sampaioana</i>	Rubiaceae	0
30 <i>Melanoxylon brauna</i>	Fabaceae	0
31 <i>Cesearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	2
32 <i>Apuleia leiocarpa</i>	Fabaceae	0
33 <i>Bombacopsis stenopetala</i>	Bombacaceae	0
34 <i>ficus gomelleria</i>	Moraceae	0



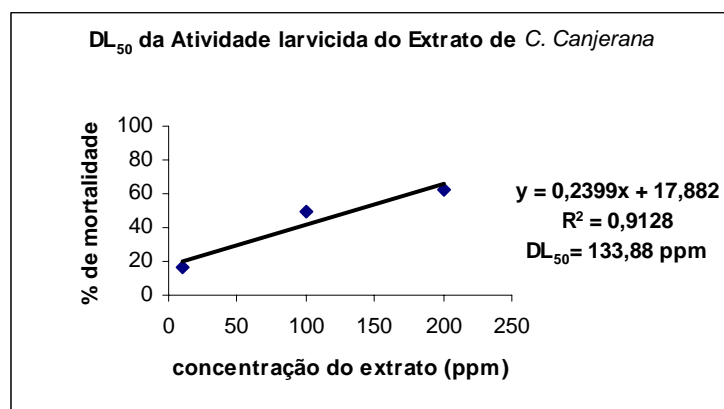
35	<i>Anadenanthera colubrina</i>	Fabaceae	22
36	<i>Plathymenia foliolosa</i>	Fabaceae	0
37	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Rutaceae	0

Dos trinta e sete extratos testados, três foram capazes de causar maior percentagem de mortalidade entre as larvas. A **Tabela 5** apresenta o resultado da repetição do teste dos extratos das três plantas mais ativas nas concentrações, 10, 100 e 200 ppm.

**Tabela 5** Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* expostas a extratos etanólicos das três plantas mais ativas nas concentrações: 10, 100 e 200 ppm.

Espécie	Família	% mortalidade 10 ppm	% mortalidade 100 ppm	% mortalidade 200 ppm
<i>Cabralea canjerana</i>	Meliaceae	16	50	62
<i>Siparuna reginae</i>	Siparunaceae	38	8	66
<i>Sparattosperma leucanthum</i>	Bignoniaceae	4	6	4

Analisando o resultado obtido para o extrato de *S. reginae* (**Tabela 5**) observa-se uma irregularidade no valor da percentagem de mortalidade (38 e 8) quando se aumenta a concentração do extrato de 10 ppm para 100 ppm respectivamente. Os resultados obtidos para o extrato de *S. leucanthum* mostram quase que uma percentagem de mortalidade constante quando se aumenta a concentração da amostra de 10 para 200 ppm. Os resultados do extrato da planta *C. canjerana* é o mais compatível com o que se espera no que diz respeito ao aumento da percentagem de mortalidade, pois à medida que a concentração do extrato aumenta, a percentagem de mortalidade das larvas também aumenta. Sendo assim estabeleceu-se que o valor da  $DL_{50}$  para o extrato de *C. canjerana* é 133,88 ppm (**Figura 9**).



**Figura 9** Percentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* nas concentrações de 10, 100 e 200 ppm de extrato de *Cabralea canjerana*.

Testes realizados com as partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol deste extrato apresentaram baixas, no caso da partição em diclorometano, ou nenhuma mortalidade, no caso das outras partições (**Tabela 6**). Entretanto, das quatro partições testadas, a partição em diclorometano foi a que apresentou melhor comportamento, matando 18% das larvas, por este motivo esta partição foi escolhida para ser fracionada.

**Tabela 6** Percentagem de mortalidade de larvas de 3º estágio de *Aedes aegypti* expostos às partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *Cabralea canjerana* a concentração de 100 ppm.

Partições de <i>C. canjerana</i>	% de mortalidade
Partição em hexano	2
Partição em diclorometano	18
Partição em acetato de etila	0
Partição em butanol	0

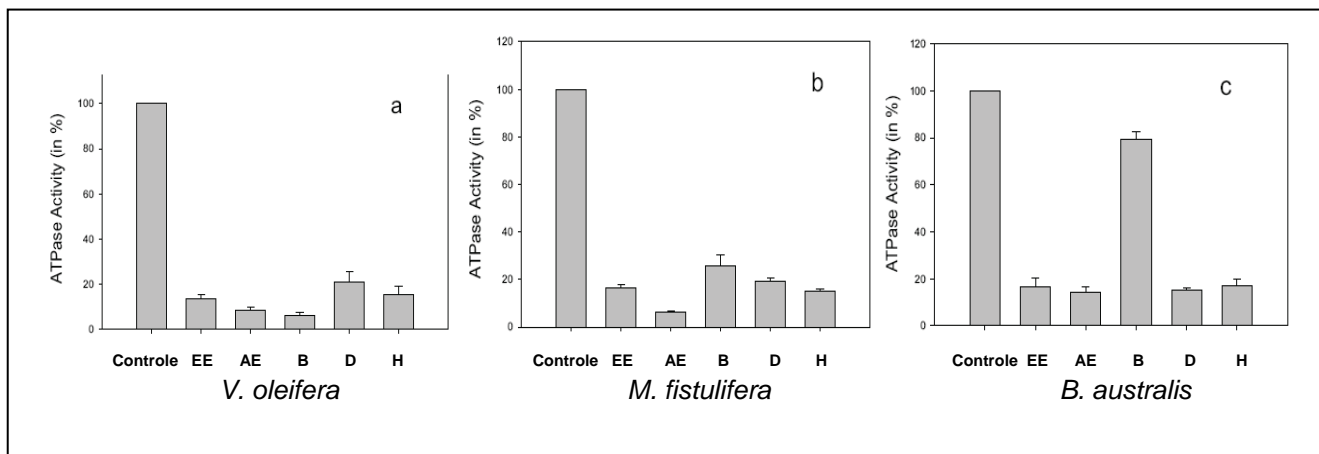
Valores de  $DL_{50}$  em torno de 100 ppm têm sido considerados promissores no estudo da atividade inseticida com extratos de plantas (Ciccia *et al*, 2000).

Estudos anteriores demonstram que plantas pertencentes à família Meliaceae são boas produtoras de substâncias com atividade inseticida (Mendonça *et al*, 2005;

Nugroho *et al*, 1999), entretanto nossos resultados não foram estimulantes o suficiente para o prosseguimento dos testes.

## 8.2 BIOENSAIO SOBRE A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Pdr5p DE LEVEDURAS.

Por ser homóloga a P-gp de mamíferos, tanto no que diz respeito ao comportamento funcional quanto ao estrutural, a Pdr5p encontrada em levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, foi escolhida como modelo para estudar agentes de reversão à múltipla resistência em plantas. A maior parte dos 37 extratos testados apresentaram baixo ou nenhum efeito sobre a atividade ATPase Pdr5p. Alguns deles, no entanto, foram capazes de produzir uma boa inibição a uma concentração fixa. Destes, os extratos de *Bathysa australis*, *Mabea fistulifera* e *Virola oleifera* estavam disponíveis em uma quantidade adequada e, por essa razão, foram selecionados para uma investigação mais aprofundada. As curvas dose-resposta foram obtidas para os extratos etanólicos bruto em concentrações variando de 0 a 400 µg/mL. Os três extratos apresentaram curvas semelhantes. O menor valor de EC<sub>50</sub> foi obtido para *V. oleifera*, 22,8 µg/mL, seguido por *B. australis*, 35,3 µg/mL, e *M. fistulifera*, 42,5 µg/mL. Com base nestes resultados, a atividade ATPásica em Pdr5p foi testada (200 µg/mL) para as partições oriundas destes extratos etanólicos bruto. (**Figura 10**) (Rangel *et al*, 2008).



**Figura 10** Efeito produzido por 200 µg/mL das partições obtidas do extrato etanólico (EE) de *V. oleifera*, *M. fistulifera* e *B. australis*. Os experimentos foram conduzidos como mencionados anteriormente para os extratos etanólicos. AE, partição em acetato de etila; B, partição em butanol; D, partição em diclorometano e H, partição em hexano. A barra de controle refere-se à atividade ATPase na ausência de qualquer inibidor e corresponde a 100% (Rangel *et al.*, 2008).

Na **Figura 10a**, está claro que as partições em acetato de etila e butanol de *Virola oleifera* foram capazes de produzir um efeito maior do que aquele obtido com o extrato etanólico bruto original, enquanto as frações em diclorometano e hexano, foram menos eficientes, ou tão eficiente quanto o extrato etanólico bruto desta planta.

É interessante notar que as frações em hexano e em diclorometano, onde se espera que sejam encontradas a lignanas, são as menos ativas, nessa espécie de planta. Por outro lado, espera-se que sejam encontrados flavonóides glicosilados nas partições em acetato de etila e butanol. Na realidade, o perfil do HPLC da fração em acetato de etila mostrou picos correspondentes à flavonol (Tabela 2), em  $T_R$  2,88 min. ( $\lambda_{m\acute{a}x.}$  255,3 e 353,9nm) e em  $T_R$  3,25 min. ( $\lambda_{m\acute{a}x.}$  256,2 e 349,7nm) (Mabry *et al.*, 1970). Também foi observado um pico em  $T_R$  4,25min. (**Tabela 7**), que é compatível

com banda benzenóide ( $\lambda_{\text{máx.}}$  272.8nm) que poderia ser devido a derivados do tipo lignóides.

**Tabela 7**  $T_R$  dos picos dos cromatogramas das partições em acetato de etila de *Virola oleifera*, *Mabea fistulifera* e *Bathysa australis* com espectros de UV (detector de foto diodo) que pode ser associado a cromóforos conhecidos de produtos naturais retirados da literatura.

Espécie	$T_R$ (min)	U.V $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Referências
<i>Virola oleifera</i>	2,88	255,3 e 353,9	Mabry <i>et al.</i> , 1970
Partição em acetato de etila	3,25	256,2 e 349,7	
	4,25	272,8	
<i>Mabea fistulifera</i>	2,45	278,8	Silverstein <i>et al.</i> , 1971
Partição em acetato de etila	3,31	270,5	
<i>Bathysa australis</i>	15,17	220-245, 270-310 e 290-320	Thylor and Farnsworth, 1973
Partição em acetato de etila	16,24	267,2 e 344,3	Mabry <i>et al.</i> , 1970

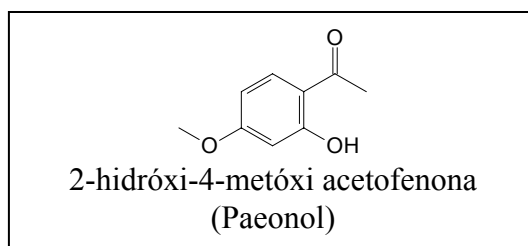
A **Figura 10b** mostra que a partição em acetato de etila de *Mabea fistulifera* foi uma das mais eficientes, enquanto as partições em butanol, diclorometano e hexano foram menos ou tão eficientes quanto o extrato etanólico bruto original de *M. fistulifera*.

O cromatograma da fração em acetato de etila do extrato etanólico de *M. fistulifera* mostrou picos em  $T_R$  2,45 e 3,31 min. (Tabela 7), que são compatíveis com espectros de UV de compostos benzenóides (Silverstein *et al.*, 1991). De fato, o ácido gálico foi isolado da fração em acetato de etila. O ácido gálico costuma ser encontrado livre, mas também como produto de degradação de taninos e, por esta razão, serve como um indicativo de que possa haver esta classe de produtos naturais na partição em acetato de etila desta planta (Rodríguez *et al.*, 2008).

Na **Figura 10c**, relativa ao extrato de *Bathysa australis*, observamos que as partições em acetato de etila, diclorometano e hexano apresentaram uma inibição muito semelhante ao efeito do seu extrato etanólico bruto sobre a atividade da Pdr5p, enquanto a partição em butanol produziu uma inibição muito pequena.

No Brasil, existem sete espécies do gênero *Bathysa*, algumas espécies de *Bathysa* estão incluídas entre as falsas quininas, a distribuição das espécies de *Bathysa*, restringe-se apenas a Mata Atlântica. Leoni (1995) constatou que na medicina popular brasileira a mucilagem de *B. australis* é empregada como cicatrizante (Germano-Filho, 1999).

Até onde sabemos, não existe relato fitoquímico sobre *B. australis*. Além disso, a química do gênero não é muito conhecida, com apenas um documento relatando o isolamento de paeonol, um derivado da acetofenona, a partir de raízes de *B. meridionalis* (Weeks *et al.*, 1977)(Figura 11).



**Figura 11** Paeonol isolado de *Bathysa meridionalis* (Weeks *et al.*, 1977).

O cromatograma da partição em acetato de etila desta planta (**Tabela 7**) mostrou sinal com  $T_R$  em 15,17 min., com bandas de UV em região típica de alcalóides indólicos, os três principais máximos de absorção são em: 220-245 nm, 270-310nm e 290-320nm) (Thylor and Farnsworth, 1973). Outros picos, em  $T_R$  16,24 e 17,47 min. são característicos de derivados flavonoídicos. O espectro de UV apresenta absorção máxima em  $\lambda_{m\acute{a}x.}$  267,2 e 344,3nm, e  $\lambda_{m\acute{a}x.}$  256,2 e 341,7 nm, respectivamente, compatível com derivados de luteolina  $\lambda_{m\acute{a}x.}$  242sh, 253, 267, 291sh e 349 nm (Mabry *et al.*, 1970). É interessante notar que, dentre as cinco espécies da família Rubiaceae testadas - *Bathysa australis*, *Guettarda virbunoides*, *Psychotria*

*vellosiana*, *Simira glaziovii*, *S. sampaioana*, e duas espécies da família Apocynaceae, *Malouetia arborea* e *Peschiera Affinis*, *Bathysa* destaca-se como a mais ativas. Estas duas famílias botânicas são conhecidas por serem fontes ricas em alcalóides indólicos (Dewick, 1997). Estas diferentes atividades podem ser devido a diferentes estruturas de alcalóides e/ou a presença de substâncias sinérgicas como flavonóides, como anteriormente descritos por Conseil *et al.*, 2000 como possuindo atividade inibitória da Pdr5p.

Pode ser observado em *Mabea fistulifera* e *Virola oleifera* que em ambos os casos as partições foram capazes de produzir um efeito maior do que o extrato etanólico original. Isso não é verdade para *Bathysa australis*, uma vez que as três partições mostraram-se tão eficientes quanto seus respectivos extratos etanólicos bruto. Isto pode ser devido a vários fatores tais como a concentração dos constituintes ativos na partição específica (*Mabea* e *Virola*) ou separação sinérgica das substâncias nas diferentes partições (*Bathysa*). De fato, todas as frações ativas indicaram a presença de flavonóides, conhecido pela sua capacidade de inibir a atividade da Pdr5p.

### 8.3 BIOENSAIO ANTIOXIDANTE

A **Tabela 8** mostra valores de  $EC_{50}$  dos extratos, obtidos por regressão logarítmica. Os valores de  $EC_{50}$  obtidos mostraram bom coeficiente de determinação ( $r^2 \geq 0,80$ ) para a maior parte dos extratos. Baseado na análise estatística apresentada na **Tabela 8** pode-se notar que os cinco valores de  $EC_{50}$  mais baixos foram obtidos em extratos cujas plantas pertencem a diferentes famílias, Euphorbiaceae, Lecythidaceae, Tiliaceae, Rubiaceae e Moraceae.

Apesar de não encontrarmos associação entre as cinco primeiras famílias e a atividade antioxidante, como regra geral percebe-se que plantas pertencentes à família Euphorbiaceae produzem extratos muito ativos frente ao radical livre DPPH. De todos os extratos etanólicos testados, *Mabea fistulifera*, foi a mais ativa, resultando num valor de EC<sub>50</sub> da ordem de 10<sup>14</sup> vezes menor que o padrão *Ginkgo biloba* (19,05 µg/mL).

Exceto para o extrato etanólico de *Psychotria vellosiana*, todas os outros extratos de Rubiaceae mostraram uma variação regular da atividade. Plantas pertencentes à família, Meliaceae, mostraram-se menos ativas usando o método do DPPH.

**Tabela 8** Valores de EC<sub>50</sub> dos extratos mais ativos.

Família	Espécie	<sup>a</sup> EC <sub>50</sub> (µg/mL)	Valor de r <sup>2</sup>
<b>Euphorbiaceae</b>	<b><i>Mabea fistulifera</i></b>	<b>2,22 x 10<sup>-15</sup></b>	<b>0,9</b>
Lecythidaceae	<i>Cariniana estrellensis</i>	2,95 x 10 <sup>-10</sup>	0,9
Tiliaceae	<i>Luehea grandiflora</i>	5,03 x 10 <sup>-9</sup>	0,1
Rubiaceae	<i>Bathysa australis</i>	8,37 x 10 <sup>-9</sup>	0,7
Moraceae	<i>Brosimum guianense</i>	2,7 x 10 <sup>-7</sup>	0,9
Fabaceae	<i>Anadenanthera colubrina</i>	9,73 x 10 <sup>-6</sup>	0,8
Euphorbiaceae	<i>Pera leandri</i>	1,75 x 10 <sup>-5</sup>	0,8
Euphorbiaceae	<i>Senefeldera multiflora</i>	6,27 x 10 <sup>-5</sup>	0,6
Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>	3,00 x 10 <sup>-3</sup>	0,7
Rubiaceae	<i>Simira glaziovii</i>	1,89	0,7
Fabaceae	<i>Melanoxylon brauna</i>	2,54	0,9
Myristicaceae	<i>Virola oleifera</i>	3,27	0,6
Euphorbiaceae	<i>Aparisthmium cordatum</i>	8,56	0,7
Flacourtiaceae	<i>Carpotroche brasiliensis</i>	1,08 x 10	0,8
Rubiaceae	<i>Guettarda viburnoides</i>	2,13 x 10	0,8
Euphorbiaceae	<i>Pera heteranthera</i>	2,81 x 10	0,9
Sapotaceae	<i>Pouteria filipes</i>	3,20 x 10	0,8
Apocynaceae	<i>Malouetia arborea</i>	3,31 x 10	0,9
Bignoniaceae	<i>Sparattosperma leucanthum</i>	3,97 x 10	0,9
Moraceae	<i>Ficus gomelleria</i>	4,30 x 10	0,9
Apocynaceae	<i>Peschiera affinis</i>	4,52 x 10	0,9
Anacardiaceae	<i>Astronium fraxinifolium</i>	5,45 x 10	0,9
Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i>	6,52 x 10	0,9
Fabaceae	<i>Dalbergia nigra</i>	6,58 x 10	0,9



Moraceae	<i>Sorocea bonplandii</i>	7,14 x 10	0,9
Fabaceae	<i>Piptadenia gonoacantha</i>	7,69 x 10	0,9
Rubiaceae	<i>Simira sampaioana</i>	7,79 x 10	0,9
Fabaceae	<i>Apuleia leiocarpa</i>	8,33 x 10	0,9
Siparunaceae	<i>Siparuna reginae</i>	8,97 x 10	0,9
Bombacaceae	<i>Bombacopsis stenopetala</i>	1,00 x 10 <sup>2</sup>	0,9
Siparunaceae	<i>Siparuna arianeae</i>	1,43 x 10 <sup>2</sup>	0,9
Meliaceae	<i>Cabrlea canjerana</i>	1,59 x 10 <sup>2</sup>	0,9
Fabaceae	<i>Plathymenia foliolosa</i>	1,66 x 10 <sup>2</sup>	0,9
Rubiaceae	<i>Psychotria vellosiana</i>	1,01 x 10 <sup>3</sup>	0,9
Rutaceae	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	1,20 x 10 <sup>3</sup>	0,9
Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i>	2,15 x 10 <sup>4</sup>	0,9
Flacourtiaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	2,36 x 10 <sup>6</sup>	0,9
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba (Egb 761)</i>	19,05	

<sup>a</sup>Valores obtidos por regressão logarítmica. O EC<sub>50</sub> é definido como a concentração suficiente para obter 50% um efeito máximo estimado em 100%.

As partições de *M. fistulifera* (extrato mais ativo) foram testadas e comparadas com seu extrato etanólico (**Figura 12**). Dentre as partições, aquelas mais polares (acetato de etila e butanol) são geralmente as que possuem maior atividade antioxidante (AA). O teste realizado a concentrações de 250; 125; 50; 25; 12,5; 5 e 2,5 µg/mL revelou que todas as partições, com exceção da partição em hexano, mostraram-se mais ativas que o extrato etanólico bruto. A partição em acetato de etila apresentou-se como sendo a mais ativa com EC<sub>50</sub> de 0,64 µg/mL. É importante observar que apesar da correlação geral entre a AA e a polaridade, a partição em n-butanol revelou uma atividade menor que as partições em diclorometano e acetato de etila. Como pode ser detectada a partição em hexano apresentou atividade antioxidante irrelevante quando comparado às outras partições do mesmo extrato.

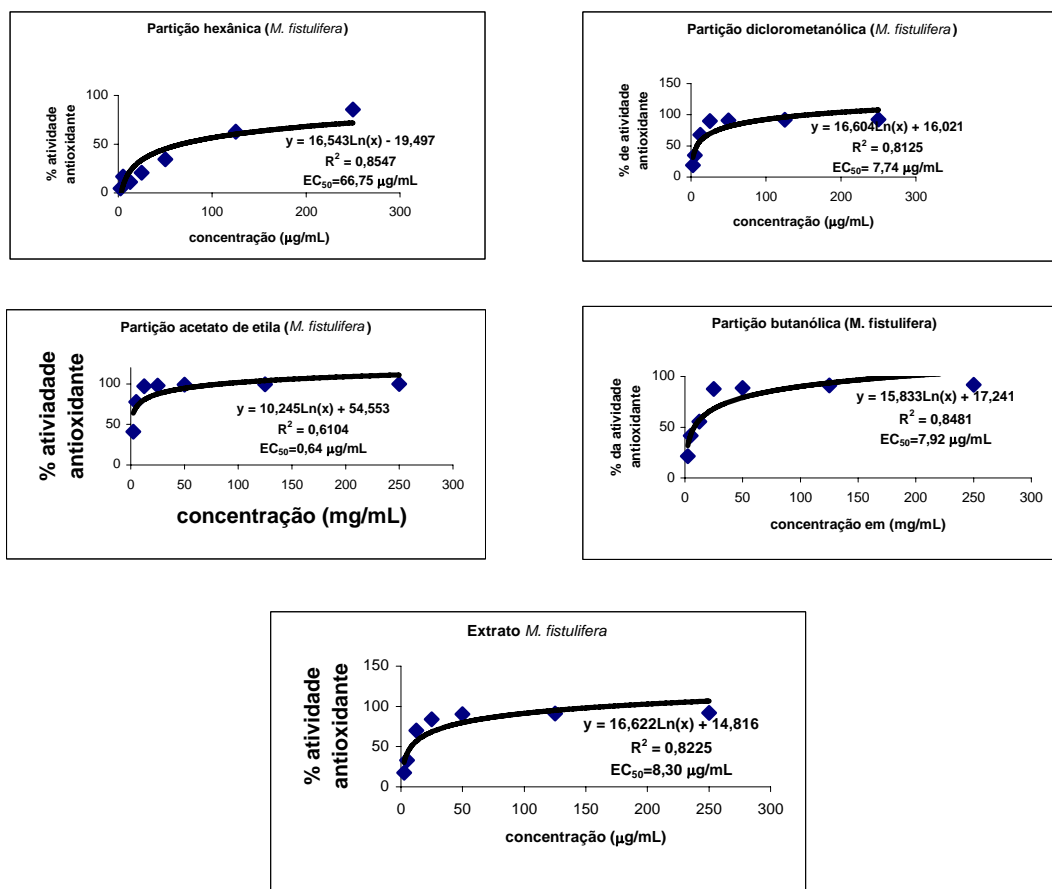


Figura 12 Valores de  $\text{EC}_{50}$  do extrato e das partições de *M. fistulifera*.

Os resultados obtidos mostram plantas de diferentes famílias com elevada percentagem de atividade antioxidante. Tais famílias possuem substâncias de natureza diversa tais como: flavonóides, alcalóides ou taninos que podem estar ou não relacionados com esta atividade.

Estudos recentes revelaram a presença de classes adicional de substâncias ativas, incluindo terpenoides, e ácidos fenólicos (Lu and Foo, 2001). Este último refere-se a um conjunto impressionante de substâncias ativas como o ácido caféico, variando entre trímeros, tetrámeros e oligâmeros.

A atividade antioxidante do ácido gálico, isolado de *M. fistulifera*, foi medida e o resultado encontrado foi ainda superior ao do extrato juntamente com suas partições (0,016 µg/mL) (Figura 13; Tabela 9).

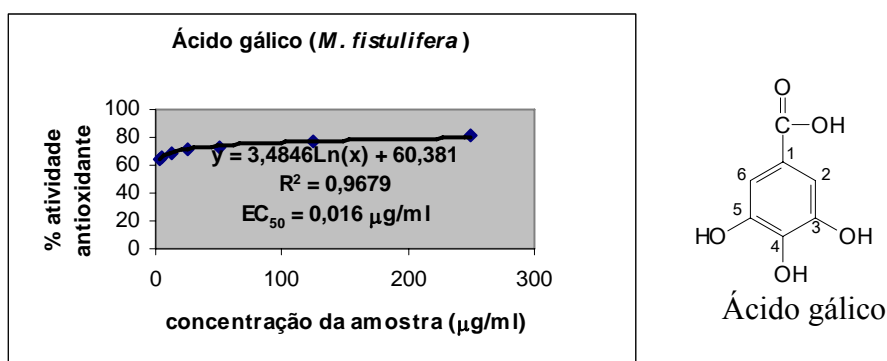
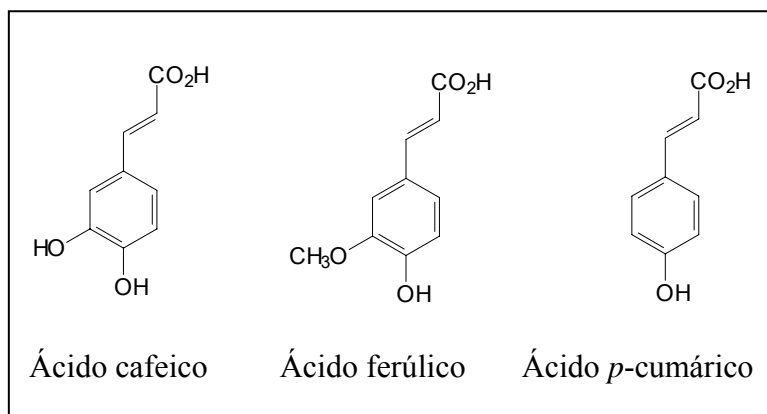


Figura 13 Valor de  $EC_{50}$  do ácido gálico de *M. fistulifera*.

Tabela 9 Comparação de valores de  $EC_{50}$  do extrato de *M. fistulifera*, suas partições e o ácido gálico isolado da partição em acetato de etila.

<i>Mabea fistulifera</i>	Valores de $EC_{50}$ em µg/mL
Ácido gálico	0,016
Partição em acetato de etila	0,64
Partição em diclorometano	7,74
Partição em butanol	7,92
Partição em hexano	66,75
Extrato etanolico bruto	8,30

Estudos sobre estrutura química-atividade de ácidos fenólicos têm mostrado que derivados do ácido cinâmico têm atividade antioxidante superior aos ácidos benzóicos análogos, que pode ser devido à presença de insaturações conjugadas que facilitam a deslocalização dos radicais livres resultantes. Dentre os ácidos cinâmicos, os ácidos caféicos são mais ativos do que ácidos ferúlicos, que por sua vez são mais ativos do que, os ácidos *p*-cumáricos (Lu and Foo, 2001)(Figura 14).



**Figura 14** Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.

Esta observação sugere que um *orto*-diidroxibenzeno, catecol, na estrutura é crucial para que haja um incremento da atividade antioxidante. De fato o ácido gálico isolado de *M. fistulifera* possui uma forte atividade antioxidante.

De acordo com a literatura o éster etílico do ácido gálico já foi isolado de *M. fistulifera* (Coqueiro *et al.*, 2007), porém, até onde se sabe o ácido gálico livre não havia sido isolado desta espécie até então.

#### 8.4 BIOENSAIO ANTIBACTERIANO

Os resultados foram animadores para a maioria das 37 plantas. Um total de vinte extratos exibiram atividade antibacteriana contra uma ou mais bactérias a uma concentração de 5 mg/disco. A maioria das plantas mostrou atividade antibacteriana frente a cepas Gram-positivas, *S. pyogenes*; apenas oito extratos foram ativos frente a cepas Gram-positivas, *S. aureus* e um extrato, *Carineana estrellensi*, apresentou efeito microbicida frente a cepas Gram-negativas de *P. aeruginosa*. Nenhum dos extratos produziu zona de inibição contra cepas Gram-negativas de *E. coli* (**Tabela 10**).

A atividade mais pronunciada, com zona de inibição maior que 14 mm, inibição de moderada a grande (Hamil *et al*, 2003) foi demonstrado pelo extrato de *Mabea fistulifera*. Como fração mais ativa do extrato de *M. fistulifera*, destaca-se a fração em acetato de etila com halo de 23 mm para *Streptococcus pyogenes* e 10 mm para *Staphylococcus aureus*, entretanto não se pode fazer uma relação eficaz entre a atividade antibacteriana e a polaridade das frações (**Tabela 11**).

Numa menor concentração, 1 mg/disco, apenas extratos de quatro plantas foram ativos contra *S. pyogenes*, produzindo zona de inibição entre 10-20 mm. Nesta mesma concentração, 1 mg/disco, nenhuma das amostras foram ativas frente a cepas Gram-negativas, *E. coli*, *P. aeruginosa* e Gram-positiva *S. aureus* (**Tabela 10**).

É interessante notar que atividades similares foram observadas para extratos com características químicas diferentes. No entanto, a atividade antimicrobiana de algumas espécies está relatada aqui pela primeira vez, como no caso das espécies: *M. fistulifera*, *B. australis*, *A. cordatum*, *S. multiflora*, *G. vibronoi*, *S. leucanthum*, *C. brasiliensis*, *S. glaziovii*, *S. sampaioana*, *M. brauna* e *B. stenopetala*.

Os resultados obtidos na **Tabela 10** são compatíveis com o padrão de inibição *in vitro* de outras triagens, a saber: bactérias Gram-positivas, em particular, *S. aureus* são mais facilmente inibidas por extratos vegetais do que as bactérias Gram-negativas (Grosvenor *et al*, 1995).

Estudo fitoquímico anteriormente realizado mostrou que a atividade antimicrobiana está relacionada com a presença de fitoconstituintes comuns como fenóis, taninos gálicos e condensados, glicosídeos, saponinas, flavonóides e alcalóides (Ahmad *et al*, 2001). Djipa sugerem que a atividade antimicrobiana está

relacionada com a alta quantidade de taninos, já que a eliminação destes suprimiu esta propriedade (Djipa *et al.*, 2000).

Muitas das plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas por diversos pesquisadores são ativas apenas contra cepas Gram positivas. No entanto, um dos extratos avaliados neste estudo, *Cariniana estrellensis* (Euphorbiaceae), mostrou-se ativa contra cepas Gram positivas e Gram negativas (Silveira *et al.*, 2005). Taninos elágicos e ácido gálico isolados de *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) mostraram atividade antibacteriana frente cepas de *S. aureus* e *E. coli* (Kloucek *et al.*, 2005). Estes resultados fornecem evidências da presença de substâncias antibacterianas em frações polares deste vegetal.

**Tabela 10** Atividade antibacteriana dos extratos.

Espécie vegetal	Famílias	Diâmetro da zona de inibição em (mm)							
		5 mg/disco				1 mg/disco			
		S. pyogenes	S. aureus	P. aeruginosa	E. coli	S. pyogenes	S. aureus	P. aeruginosa	E. coli
<i>Mabea fistulifera</i>	Euphorbiaceae	29	20	NI	NI	20	NI	NI	NI
<i>Cabralea canjerana</i>	Meliaceae	17	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Bathysa australis</i>	Rubiaceae	14	20	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Croton floribundus</i>	Euphorbiaceae	13	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Siparuna reginae</i>	Siparunaceae	12	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Aparisthium cordatum</i>	Euphorbiaceae	18	10	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Siparuna arianeae</i>	Siparunaceae	13	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Malouetia arborea</i>	Apocynaceae	15	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Sorocea bonplandii</i>	Moraceae	14	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Virola oleifera</i>	Myristicaceae	12	NI	NI	NI	11	NI	NI	NI
<i>Psychotria vellosiana</i>	Rubiaceae	11	NI	NI	NI	10	NI	NI	NI
<i>Brosimum guianense</i>	Moraceae	15	10	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Senifildera multiflora</i>	Euphorbiaceae	15	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Guettarda vibronoi</i>	Rubiaceae	12	9	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Pera leandri</i>	Euphorbiaceae	12	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Peschiera affinis</i>	Apocynaceae	12	11	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Cariniana estrellensis</i>	Euphorbiaceae	16	12	9	NI	16	NI	NI	NI
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Fabaceae	15	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Pouteria filipes</i>	Sapotaceae	13	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Astronium flaxinifolium</i>	Anacardiaceae	10	10	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Pera heteranthera</i>	Euphorbiaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Sparattosperma leucnthum</i>	Bignoniaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Carpotroche brasiliensis</i>	Flacourtiaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Fabaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Dalbergia nigra</i>	Fabaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

<i>Guapira opposita</i>	Nyctaginaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Simira glaziovii</i>	Rubiaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Luehea grandiflora</i>	Tiliaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Simira sampaioana</i>	Rubiaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Melanoxylon brauna</i>	Fabaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Cesearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Apuleia leiocarpa</i>	Fabaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Bombacopsis stenopetala</i>	Bombacaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Ficus gomelleria</i>	Moraceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Plathymenia foliolosa</i>	Fabaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Rutaceae	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

NI= nenhuma inibição

**Tabela 11** Halo de inibição do extrato etanólico (recoletado) e frações de *Mabea fistulifera* (10 mg).

Espécies	Diâmetro do halo	Diâmetro do halo	Diâmetro do halo
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Extrato etanólico de <i>M. fistulifera</i>	18 mm		
Fração em hexano	15 mm		
Fração em diclorometano	20 mm		
Fração em acetato de etila	23 mm	10 mm	
Fração em butanol	16 mm		



## 8.5 BIOENSAIO ANTITUBERCULOSE

Dos extratos avaliados, seis foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294 a uma concentração de 100 µg/ml: *P. vellosiana*, *P. affinis*, *P. filipes*, *P. foliolosa*, *C. canjerana* e *C. fissilis*, cujas concentrações mínimas inibitórias (CMI) foram 0,20 µg/mL; 0,20 µg/mL; 0,78 µg/mL; 0,78 µg/mL; 3,12 µg/mL e 3,12 µg/mL respectivamente. Apenas quatro extratos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155: *C. canjerana*, *P. foliolosa*, *P. vellosiana* e *P. filipes*, cujos halos de inibição foram 0,8; 0,8; 0,9 e 1,3 cm respectivamente.

Foram identificados, portanto, seis extratos com potencialidades para o isolamento de substâncias bioativas.

A disponibilidade do extrato e o fato de o mesmo ter apresentado resultado positivo para dois dos cinco ensaios realizados motivou a continuidade dos estudos com *C. canjerana* mesmo não apresentando o melhor dentre os resultados mostrados na **Tabela 12**.

**Tabela 12** Parâmetros de inibição dos extratos frente cepas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*.

Espécie	Família	CMI (µg/mL) <i>M.</i>	
		<i>tuberculosis</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>Peschiera affinis</i>	Apocynaceae	0,20	
<i>Psychotria vellosiana</i>	Rubiaceae	0,20	0,9
<i>Plathymentia foliolosa</i>	Fabaceae	0,78	0,8
<i>Pouteria filipes</i>	Sapotaceae	0,78	1,3
<i>Cabralea canjerana</i>	Meliaceae	3,12	0,8
<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae	3,12	

As partições deste extrato foram ensaiadas com intuito de se encontrar a concentração mínima inibitória (CMI) frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv e os resultados encontram-se na **Tabela 13**.

**Tabela 13** Parâmetros de inibição dos extratos frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

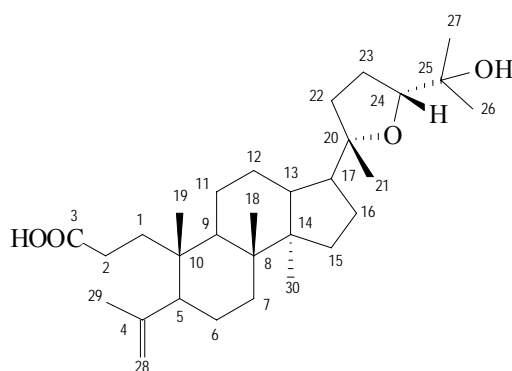
<i>Cabralea canjerana</i>	CMI (µg/mL) <i>M. tuberculosis</i>
<b>Partição em hexano</b>	25,0
<b>Partição em diclorometano</b>	6,25
F1-15	50
F16-18	100
F19-22 (ácido eichlerianico)	100
F23-28	>100
F29-37	>100
F38-47	100
F48-50	>100
F51-52	>100
F53-57	>100
<b>Partição em acetato de etila</b>	>100
<b>Partição em butanol</b>	>100

Os resultados apresentados na **Tabela 11** mostram que das quatro partições de *C. canjerana*, a partição em diclorometano foi a mais promissora, apresentando forte efeito inibitório com CMI 6,25 µg/mL, resultado este bastante superior aos das outras partições deste extrato. Este resultado corroborou para que fosse dado prosseguimento ao estudo fitoquímico da espécie com a partição em diclorometano. Observa-se na **Tabela 13** que o ácido eichlerianico produziu um fraco efeito inibitório com CMI 100 µg/mL. A primeira fração da partição em diclorometano (F1-15) produziu um efeito inibitório duas vezes maior que o ácido eichlerianico com CMI 50 µg/mL.

Segundo Pauli e colaboradores, o CMI de um extrato bruto pode ou não ser um indicador confiável de chances de sucesso de isolar um agente antimicrobacteriano potente. Existe a possibilidade de um extrato com CMI relativamente baixo (alta atividade) conter substâncias majoritárias que sejam constituintes moderadamente ativos, enquanto extratos moderadamente ativos podem conter substâncias minoritárias com alta atividade (Pauli *et al.*, 2005).

## 9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

### 9.1 TRITERPENO DAMARÂNICO CC01



**CC01**

O triterpeno do tipo damarânico ácido eichlerianico (**CC01**) (ácido 25 hidróxi-20S, 24S-3,4-*seco*-4(28)-damaren-3-óico) foi previamente isolado das espécies de Meliaceae: *Cabrlea canjerana*, *Cabrlea eichleriana*, *Dysoxylum richii*, *Aglaiia lawii*, *Aglaiia foveolata*, *Aglaiia elliptica* (Braga *et al.*, 2006) e *Aglaiia silvestris* (Serger *et al.*, 2008). Este triterpeno também foi isolado das espécies de Dipterocarpaceae *Dipterocarpus pilosus* (Gupta e Dev, 1971) e *Shorea sp.* (Bisset, *et al.*, 1971).

O triterpeno **CC01** foi identificado através de análise dos experimentos de RMN em uma dimensão como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ -APT e por comparação com dados de literatura de CC01 isolada de *Aglaia foveolata* (Roux *et al.*, 1998).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CC01 feito em  $\text{CDCl}_3$  (**Espectro 1**, p. 71; **Tabela 14**, p. 68) evidencia 10 sinais de hidrogênio, sendo observado dois sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,64 (*sl*) e  $\delta_{\text{H}}$  4,85 (*sl*) relativos aos hidrogênios vinílicos H-28a e H-28b e um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (*t*) relativo ao hidrogênio H-24. Na região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,2 e  $\delta_{\text{H}}$  2,3 observa-se um acúmulo de sinais relativos aos hidrogênios metilênicos e metínicos do esqueleto. Os sinais das sete metilas são observados no intervalo entre  $\delta_{\text{H}}$  0,84 e  $\delta_{\text{H}}$  1,74, sendo a metila mais desblindada relativa a metila vinílica, 3H-29, como indicado no espectro de RMN $^1\text{H}$  (**Espectro 1 e 2**, p. 71).

**Tabela 14** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para **CC01** comparados com dados de literatura (Roux *et al.*, 1998).

Hidrogênio	( $\delta_{\text{H}}$ ) CC01	( $\delta_{\text{H}}$ ) Ácido eichlerianico (Literatura)
Me-18	0,88 <i>s</i>	0,87 <i>s</i>
Me-19	0,84 <i>s</i>	0,84 <i>s</i>
Me-21	1,13 <i>s</i>	1,13 <i>s</i>
H-24	3,70 <i>t</i> ( $J = 6,2$ )	3,62 <i>dd</i> ( $J = 5,5; 10,0$ Hz)
Me-26	1,22 <i>s</i>	1,17 <i>s</i>
Me-27	1,10 <i>s</i>	1,09 <i>s</i>
H-28a	4,64 <i>sl</i>	4,64 <i>sl</i>
H-28b	4,85 <i>sl</i>	4,83 <i>sl</i>
Me-29	1,74 <i>s</i>	1,71 <i>s</i>
Me-30	1,00 <i>s</i>	0,99 <i>s</i>

O espectro de RMN $^{13}\text{C}$  parcialmente desacoplado de  $^1\text{H}$  e a seqüência APT (**Espectros 3 e 4**, p. 72; **Tabela 15**, p. 69) revelaram a presença de 30 sinais sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  179,4 relativo ao carbono carboxílico C-3 e dois sinais em

$\delta_C$  147,3 e  $\delta_C$  113,3 referentes aos carbonos  $sp^2$  C-4 e C-28, respectivamente. Observa-se ainda sinais de três carbonos carbinólicos relativos aos carbonos C-20 em  $\delta_C$  86,3, C-24 em  $\delta_C$  83,2 e C-25 em  $\delta_C$  71,5 respectivamente.

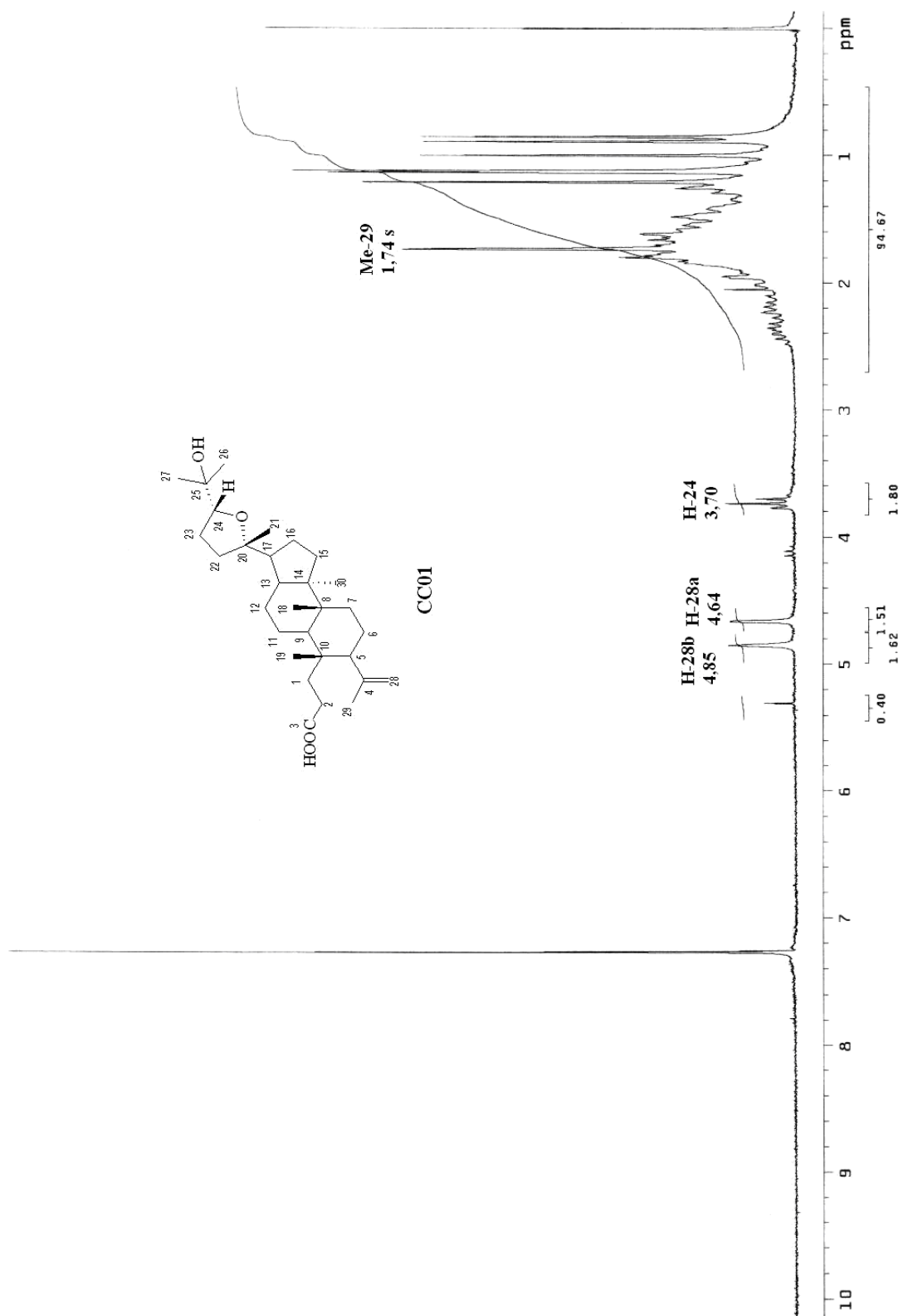
O espectro de RMN  $^{13}C$ -APT (**Espectro 4**, p. 72) mostra cinco sinais relativos a carbonos metínicos, voltados para a face negativa do espectro, sendo o mais desblindado relativo ao carbono carbinólico C-24 em  $\delta_C$  83,2. Este espectro permitiu evidenciar sete sinais, voltados para a face negativa do espectro, compatíveis com deslocamento químico metílicos que foram atribuídos comparando-se com dados descritos na literatura (Roux *et al.*, 1998).

A estereoquímica de C-20 e C-24 do ácido eichleriano (**CC01**) foi considerada 20*S*, 24*S*, por comparação com valores de deslocamento químico de C-20 e C-24 relatados na literatura, os quais se basearam em experimentos de Raio-X obtidos para os derivados do ácido shoreico (Roux *et al.*, 1998).

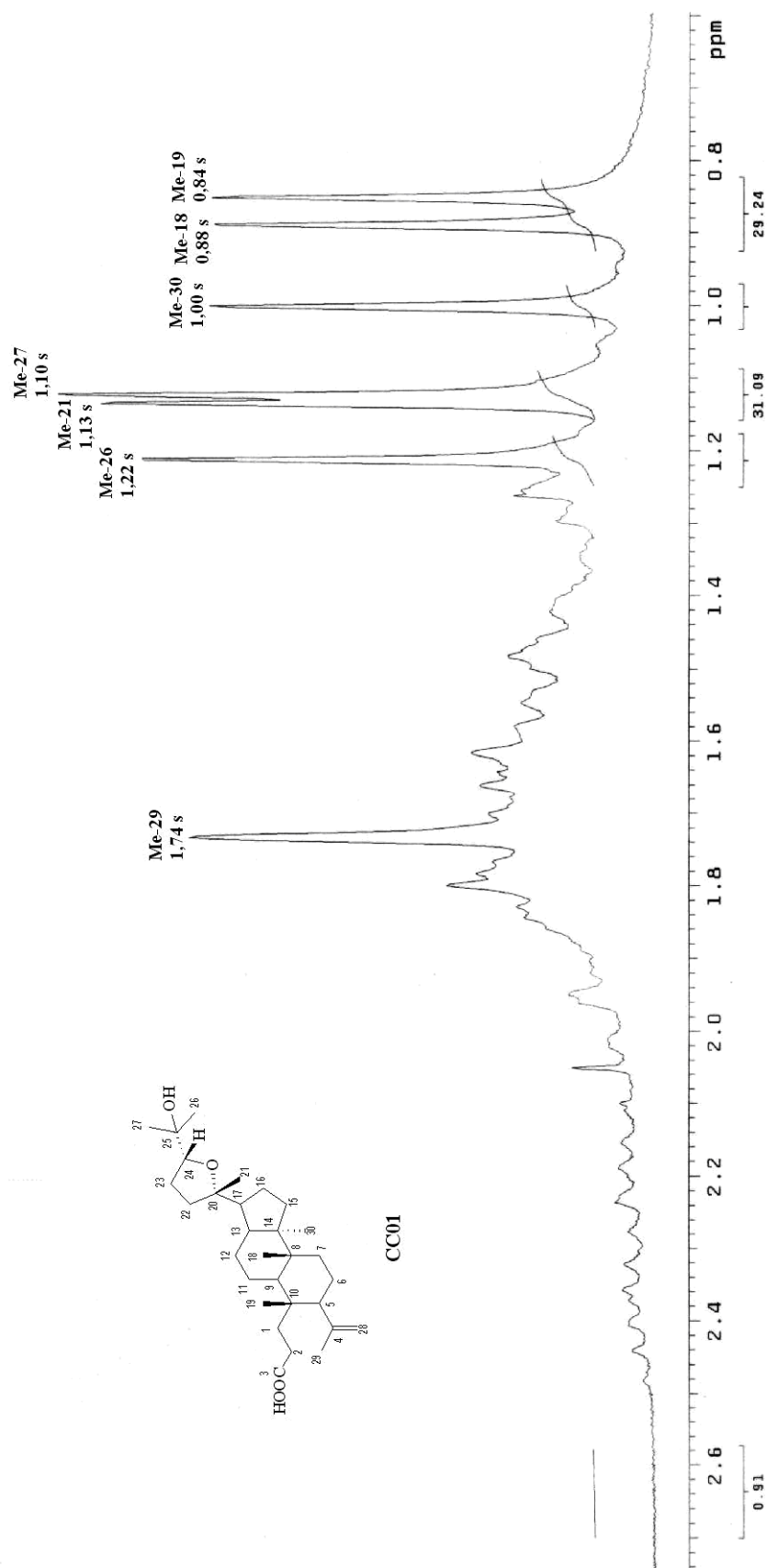
**Tabela 15** Dados de RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ) para **CC01** comparados com dados de literatura (Roux *et al.*, 1998).

Carbono	( $\delta_C$ ) CC01	$\delta_C$ Ácido eichleriano (Literatura)
<b>C</b>		
3	179,4	179,5
4	147,3	147,3
8	39,8	39,9
10	38,9	38,9
14	50,2	50,2
20	86,3	86,4
25	71,5	70,2
<b>CH</b>		
5	50,6	49,7
9	41,0	41,0
13	42,8	42,8

17	49,3	49,6
24	83,2	86,2
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	34,1	34,1
2	28,1	28,1
6	24,4	24,4
7	33,7	33,7
11	21,9	22,2
12	27,0	26,7
15	31,3	32,0
16	25,5	25,6
22	35,6	34,6
23	26,0	26,2
28	113,3	113,3
<b>CH<sub>3</sub></b>		
18	16,20	16,1
19	20,02	20,0
21	27,13	27,0
26	23,28	27,6
27	24,00	23,9
29	23,07	23,1
30	15,10	15,2

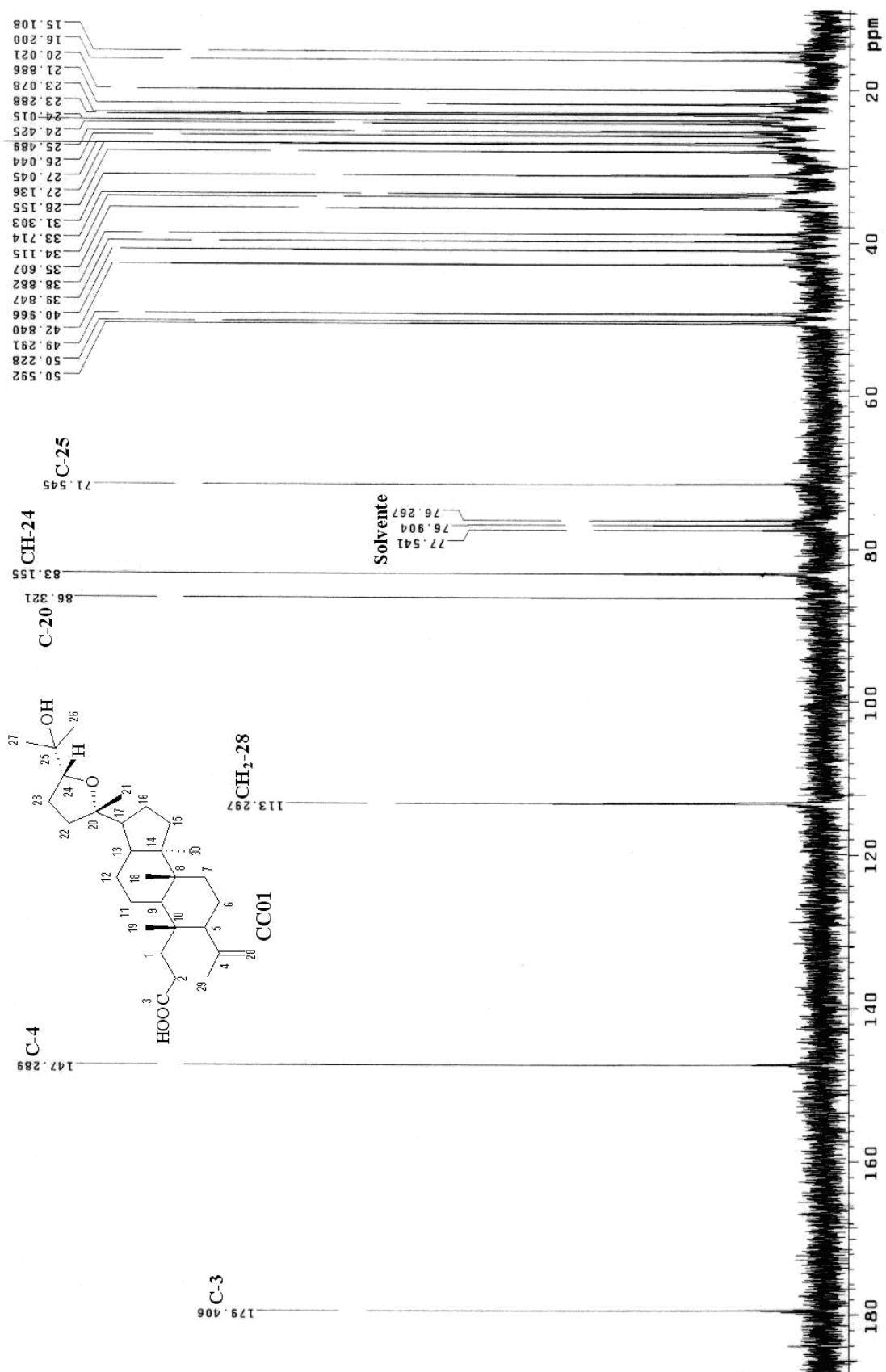


**Espectro 1** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **CC01** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

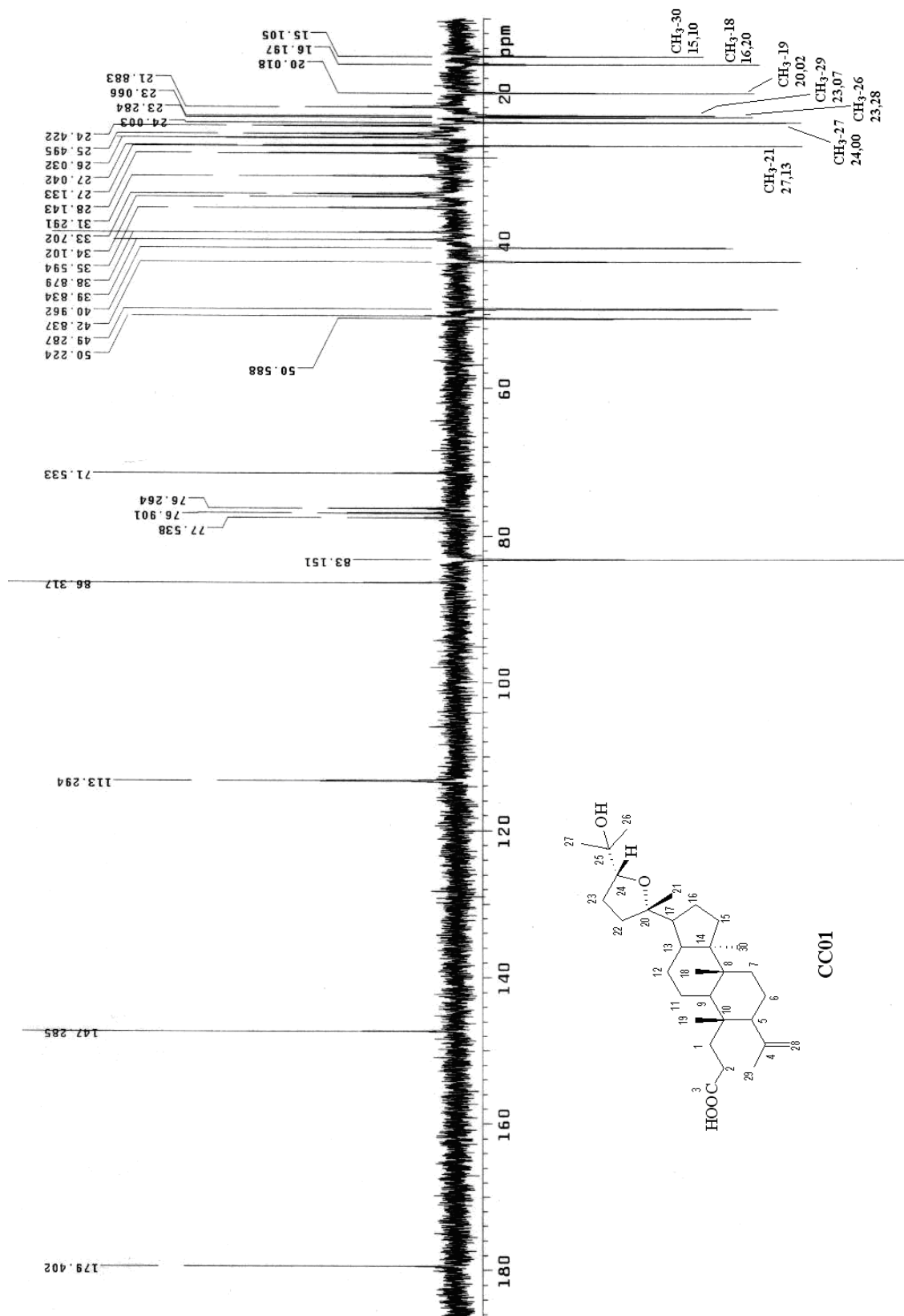


**Espectro 2** Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de **CC01** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



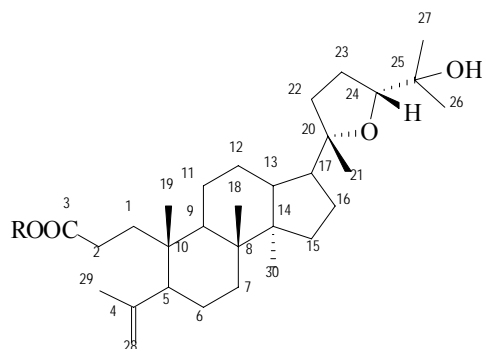


Espectro 3 Espectro de RMN <sup>13</sup>C de CC01 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Espectro 4** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de CC01 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## 9.2 TRITERPENO DAMARÂNICO CC07



O triterpeno do tipo damarânico eichleriano de metila (**CC07**), isolado na mistura **CC07** e **CC01**, foi identificado através da análise de espectros em uma dimensão RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ -APT, experimentos de RMN em duas dimensões como  $^1\text{H}$  –  $^1\text{H}$ -COSY e HSQC, cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) e por comparação com dados de literatura de **CC01** isolada de *Aglaia foveolata* (Mohamad *et al.*, 1999).

O triterpeno **CC07** por diferenciar de **CC01** apenas por ser seu éster metílico, apresenta nos espectros de RMN sinais equivalentes, havendo diferenciação apenas de um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  177, 64 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  relativo ao carbono carboxílico em C-3 de **CC01**. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **CC07** feito em  $\text{CDCl}_3$  (**Espectro 5**, p. 78; **Tabela 16**, p. 74) apresentou as mesmas características dos sinais obtidos para o triterpeno **CC01**, entretanto, observou-se um singlete intenso em  $\delta_{\text{H}}$  3,66. Associado a este dado, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 6**, p. 78) observou-se a presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  174,1. Estas diferenças foram atribuídas a esterificação do grupo carboxílico na posição C<sub>3</sub> do anel.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  evidenciou um sinal de hidrogênio centrado em  $\delta_{\text{H}}$  3,73 (*t*,  $J = 7,3$ ). Em  $\delta_{\text{H}}$  4, 85 (*sl*) e 4,66 (*sl*) observam-se os sinais relativos aos hidrogênios H-28a e H-28b respectivamente. Na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,94 e  $\delta$  1,73

observam-se os sete sinais de metilas do esqueleto, sendo a mais desblindada a metila vinílica Me-29 em  $\delta_H$  1,73. É possível observar um sinal em  $\delta_H$  1,96 atribuído a H-5, outro sinal centrado em  $\delta_H$  1,50 atribuído a H-9. Os demais sinais relativos aos hidrogênios metínicos são observados nesta mesma região entre  $\delta_H$  1,70 e  $\delta_H$  2,00.

**Tabela 16** Dados de RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ) para **CC07** comparados com dados de literatura (Mohamad *et al.*, 1999).

Hidrogênio	( $\delta_H$ ) CC07	( $\delta_H$ ) Aglinina metil éster (Literatura)
H-5	1,96 <i>m</i>	1,95 <i>m</i>
H-9	1,50 <i>m</i>	1,51 <i>m</i>
H-13	1,58 <i>m</i>	1,66 <i>m</i>
H-17	1,75 <i>m</i>	1,95 <i>m</i>
Me-18	0,99 <i>s</i>	1,00 <i>m</i>
Me-19	0,84 <i>s</i>	0,82 <i>s</i>
Me-21	1,12 <i>s</i>	1,09 <i>s</i>
H-24	3,73 <i>t</i> ( $J = 7,3$ )	—
Me-26	1,21 <i>s</i>	1,25 <i>s</i>
Me-27	1,13 <i>s</i>	1,22 <i>s</i>
H-28a	4,66 <i>sl</i>	4,64 <i>sl</i>
H-28b	4,85 <i>sl</i>	4,82 <i>sl</i>
Me-29	1,73 <i>s</i>	1,71 <i>s</i>
Me-30	0,88 <i>s</i>	0,86 <i>s</i>
MeO	3,66 <i>s</i>	3,64

O espectro de RMN  $^{13}C$  (**Espectro 6**, p. 78; **Tabela 17**, p. 75) mostra em  $\delta_C$  174,12 o sinal relativo ao carbono carboxílico em C-3, dois outros sinais em  $\delta_C$  147,40 e  $\delta_C$  113,26 relativos aos carbonos  $sp^2$  C-4 e C-28 respectivamente. Observa-se ainda sinais de três carbonos carbinólicos relativos aos carbonos C-20 em  $\delta_C$  86,2, C-24 em  $\delta_C$  83,2 e C-25 em  $\delta_C$  71,4 respectivamente.

**Tabela 17** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para **CC07** comparados com dados de literatura (Mohamad *et al.*, 1999).

Carbono	( $\delta_{\text{C}}$ ) CC07	( $\delta_{\text{C}}$ ) Aglinina metil éster (Literatura)
<b>C</b>		
3	174,12	174,7
4	147,40	147,7
8	39,84	40,2
10	39,01	39,3
14	50,28	50,9
20	86,26	88,8(88,0)
25	71,41	74,2(74,8)
<b>CH</b>		
5	50,63	50,9
9	40,97	41,3
13	42,91	43,5(43,0)
17	49,39	50,6(49,5)
24	83,19	108,6
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	34,34	34,7
2	28.53/28.30	28,5
6	24,63/24,50	24,7
7	33,79/33,70	34,0
11	21,97	22,2(22,0)
12	27,13	27,4(26,9)
15	31,35	31,7
16	25,53	26,0
22	35,69	34,7(37,0)
23	26,04	31,7(31,2)
28	113.26	113,5
<b>CH<sub>3</sub></b>		
18	15.15	15,5
19	20.04	20,3
21	24.13	24,4(25,2)
26	27.27	24,7(25,0)
27	23.33	24,2
29	23.21/23.15	23,4
30	16.22	16,5(16,3)
CO <sub>2</sub> Me	51.47	51,7

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (**Espectro 7**, p. 79) mostra cinco sinais relativos a carbonos metínicos, sendo o mais desblindado relativo ao carbono carbinólico C-24 em  $\delta_{\text{C}}$  83,2. Este espectro permitiu evidenciar sete sinais, voltados para a face negativa do espectro, compatíveis com deslocamento químico de

carbonos metílicos que foram atribuídos comparando-se com dados descritos em literatura (Mohamad *et al.*, 1999).

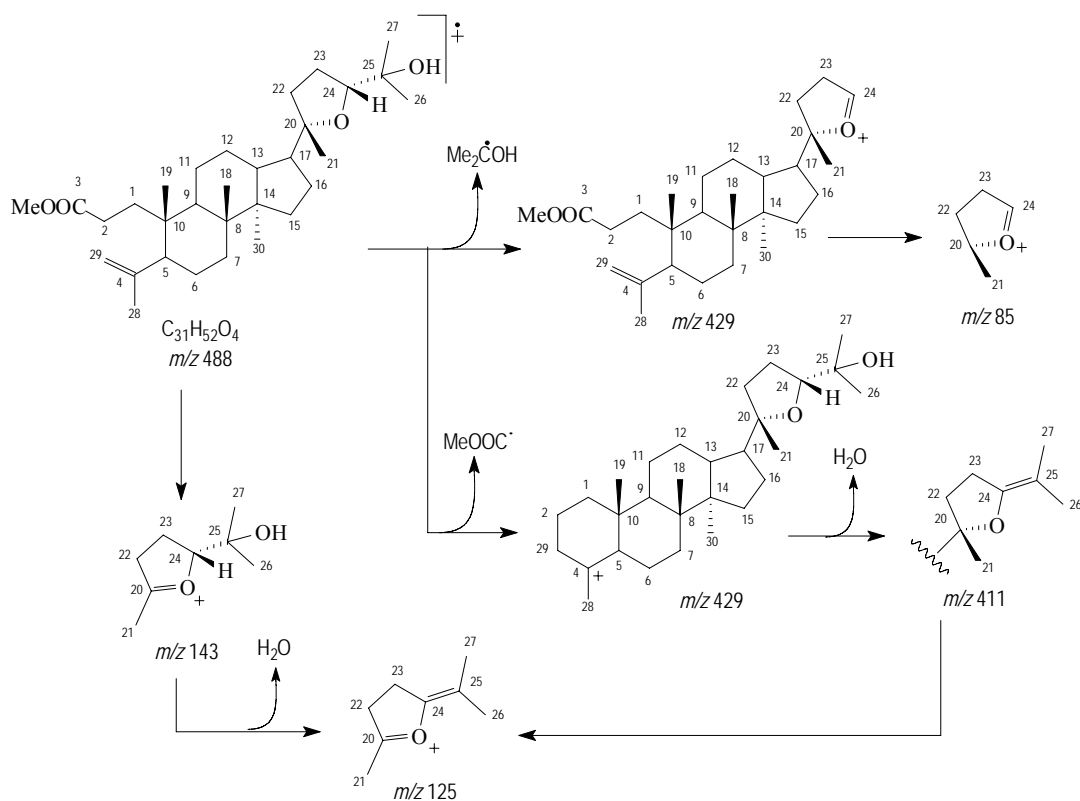
O espectro de HSQC (**Espectro 8**, p. 79) mostra a correlação a  $J^I$  dos hidrogênios H-28a e H-28b com C-28 em  $\delta_C$  113,3 além das correlações entre H-24 com C-24 em  $\delta_C$  83,2 e H-5 com C-5 em  $\delta_C$  50,63. Além disso, é possível observar as correlações entre H-17 e C-17 em  $\delta_C$  49,4; H-13 com C-13 em  $\delta_C$  42,9 e H-9 com C-9 em  $\delta_C$  40,9.

O espectro de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -COSY (**Espectro 9**, p. 80) mostra o acoplamento entre o sinal do hidrogênio H-24 em  $\delta_H$  3,73 com os hidrogênios H-23 (2H) na região entre  $\delta_H$  1,7 e 1,8. Outro acoplamento evidenciado neste espectro é entre a metila 3H-29 em  $\delta_H$  1,7 com os hidrogênios H-28 (2H) em  $\delta_H$  4,85 e  $\delta_H$  4,66.

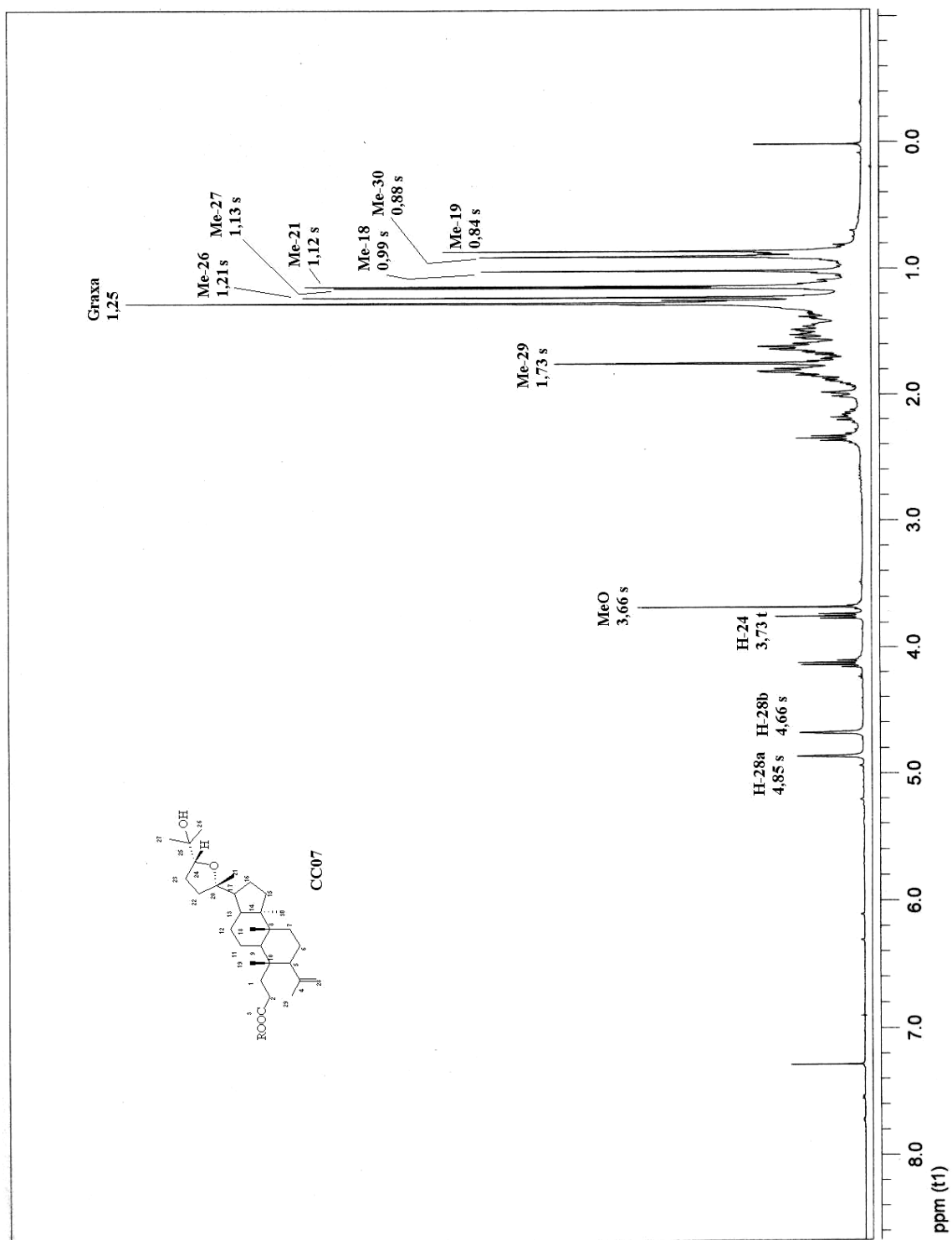
A interpretação do cromatograma obtido por análise de CG/EM (**Figura 15**, p. 80; **Esquema 8**, p. 77) constatou a presença de três picos de maior intensidade. O pico majoritário (1) apresentou  $T_R$  9,1 min, o pico (2) apresentou  $T_R$  18,0 min e o pico (3)  $T_R$  18,9 min. O pico (1) foi atribuído à presença de ácido graxo assim como os picos de menor intensidade localizados entre os tempos de retenção 8,5 a 11 min. A presença da mistura das substâncias CC01 e CC07 foi constatada a partir dos picos (2) e (3) e confirmada no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 6**, p. 78).

Os espectros de massas (**Espectro 10**, p. 81; **Espectros 11**, p. 81) permitiram reconhecer as fragmentações das substâncias correspondentes pelos picos moleculares  $m/z$  85,  $m/z$  125,  $m/z$ , 143,  $m/z$  (pico base) 411 e  $m/z$  429 para o pico (2) e os picos coincidentes em  $m/z$  85,  $m/z$  125 e  $m/z$  143 (pico base) para o pico (3) (**Esquema 8**, p. 77). A confirmação definitiva pode ser obtida através de espectros adicionais: HMQC (faltaram expansões necessárias), HMBC, NOESY, IV e EM. Os

espectros de RMN 2D permitirão confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos descritos afastando obviamente dúvidas existentes.

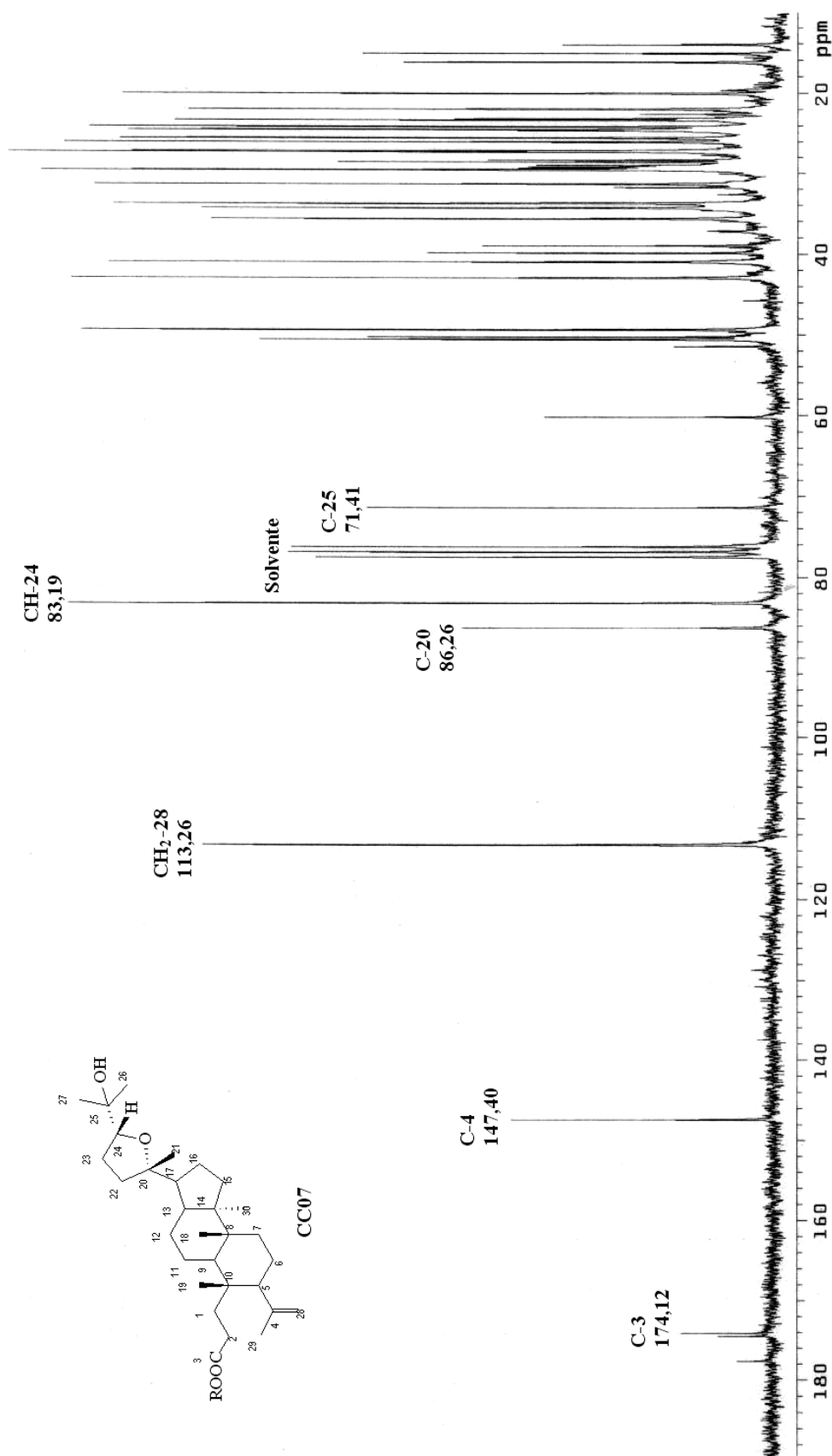


**Esquema 8** Proposta mecânica de fragmentação no CG-EM para a substância CC07.

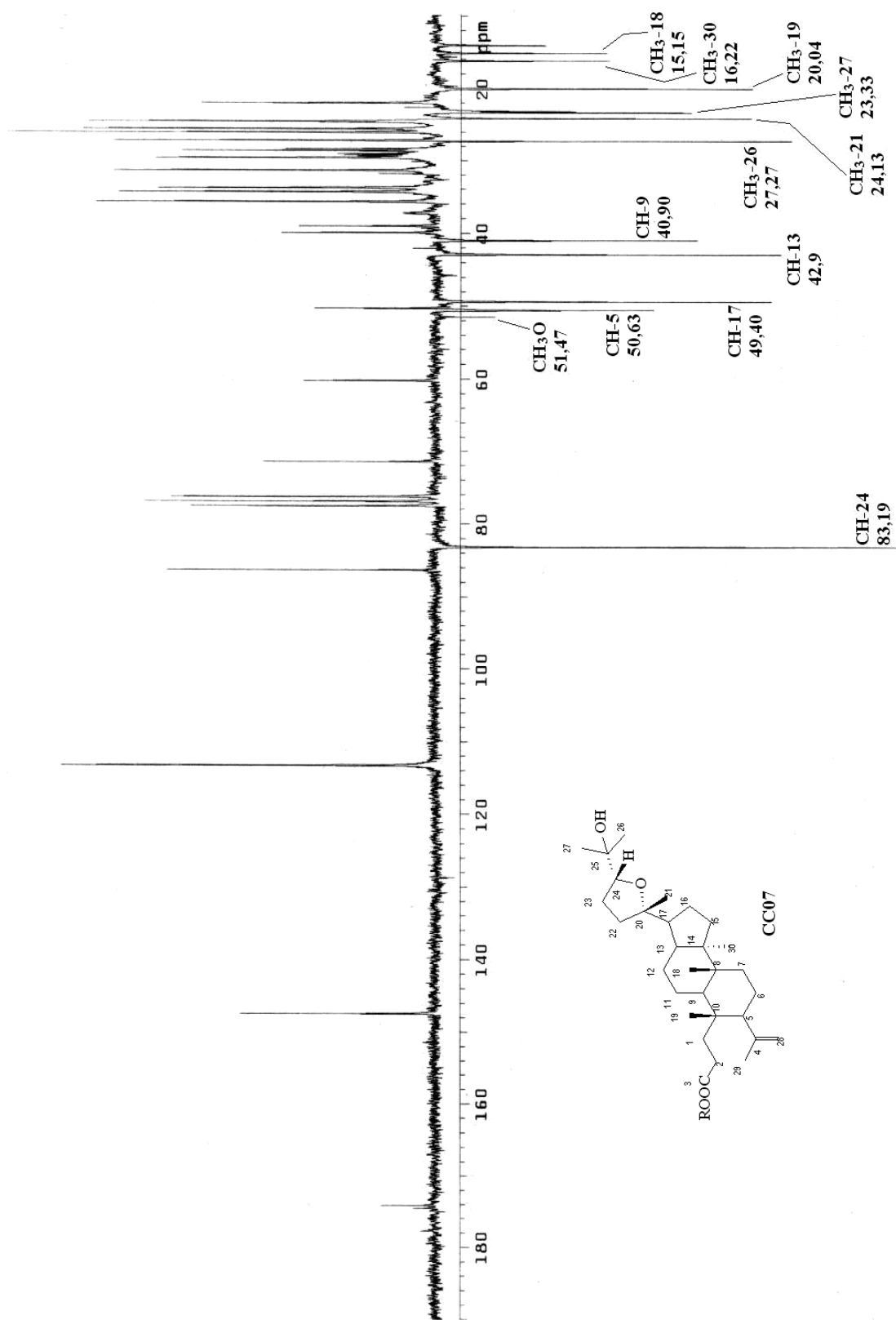


**Espectro 5** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de CC07 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

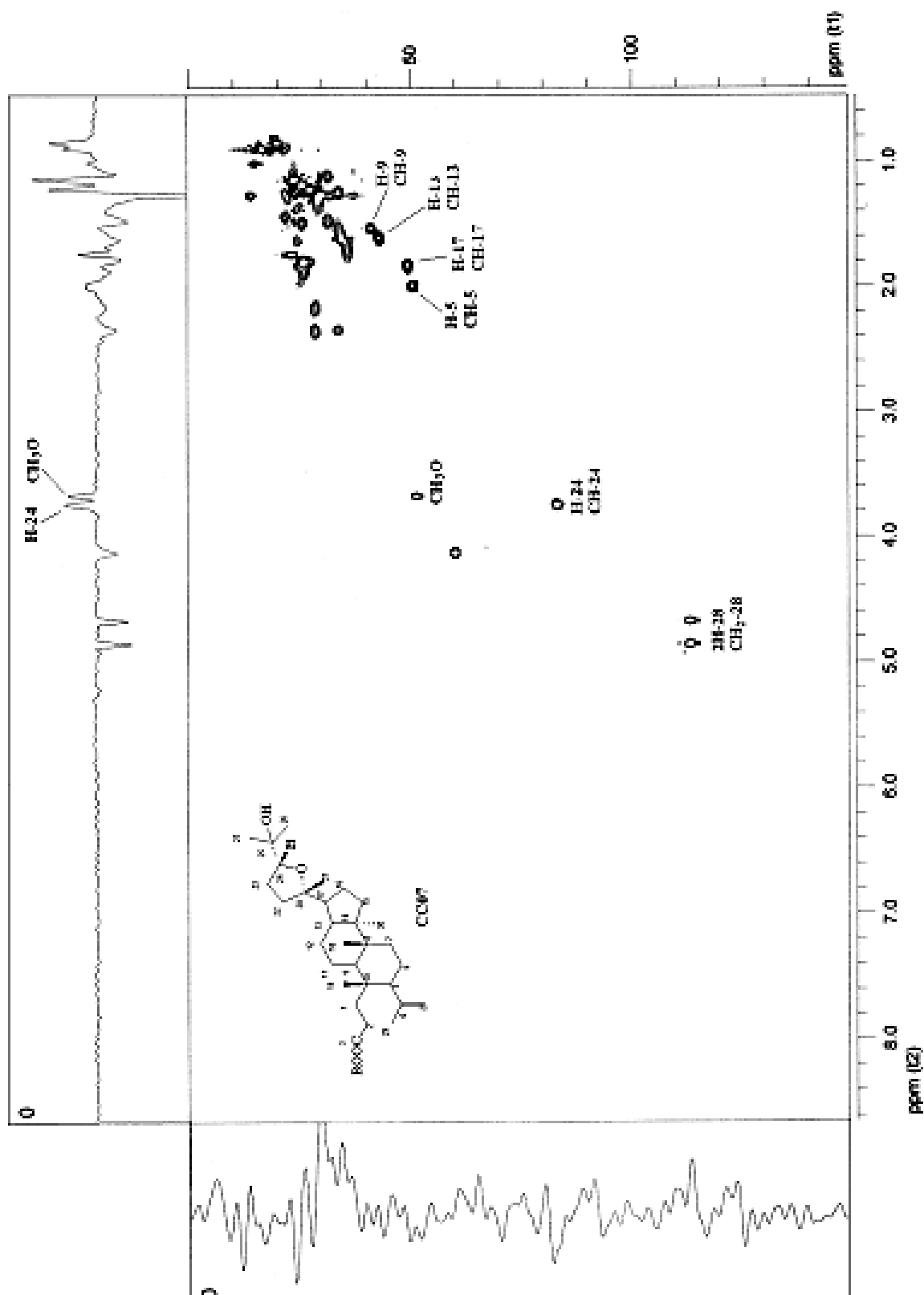




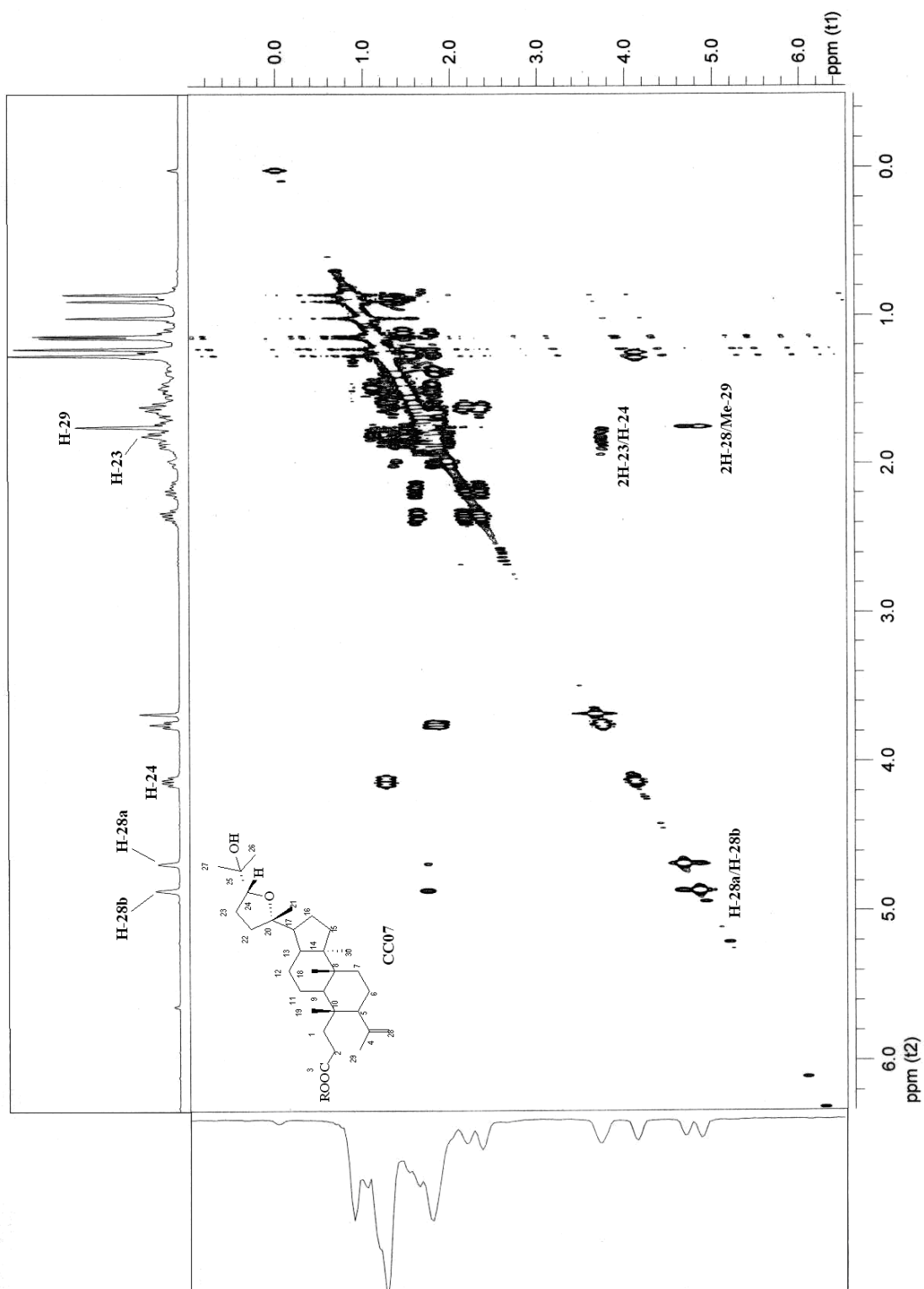
Espectro 6 Espectro de RMN <sup>13</sup>C de CC07 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Espectro 7** Espectro de RMN <sup>13</sup>C- APT de CC07 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Espectro 8** Espectro de HSQC de CC07 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Espectro 9** Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ -COSY de CC07 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

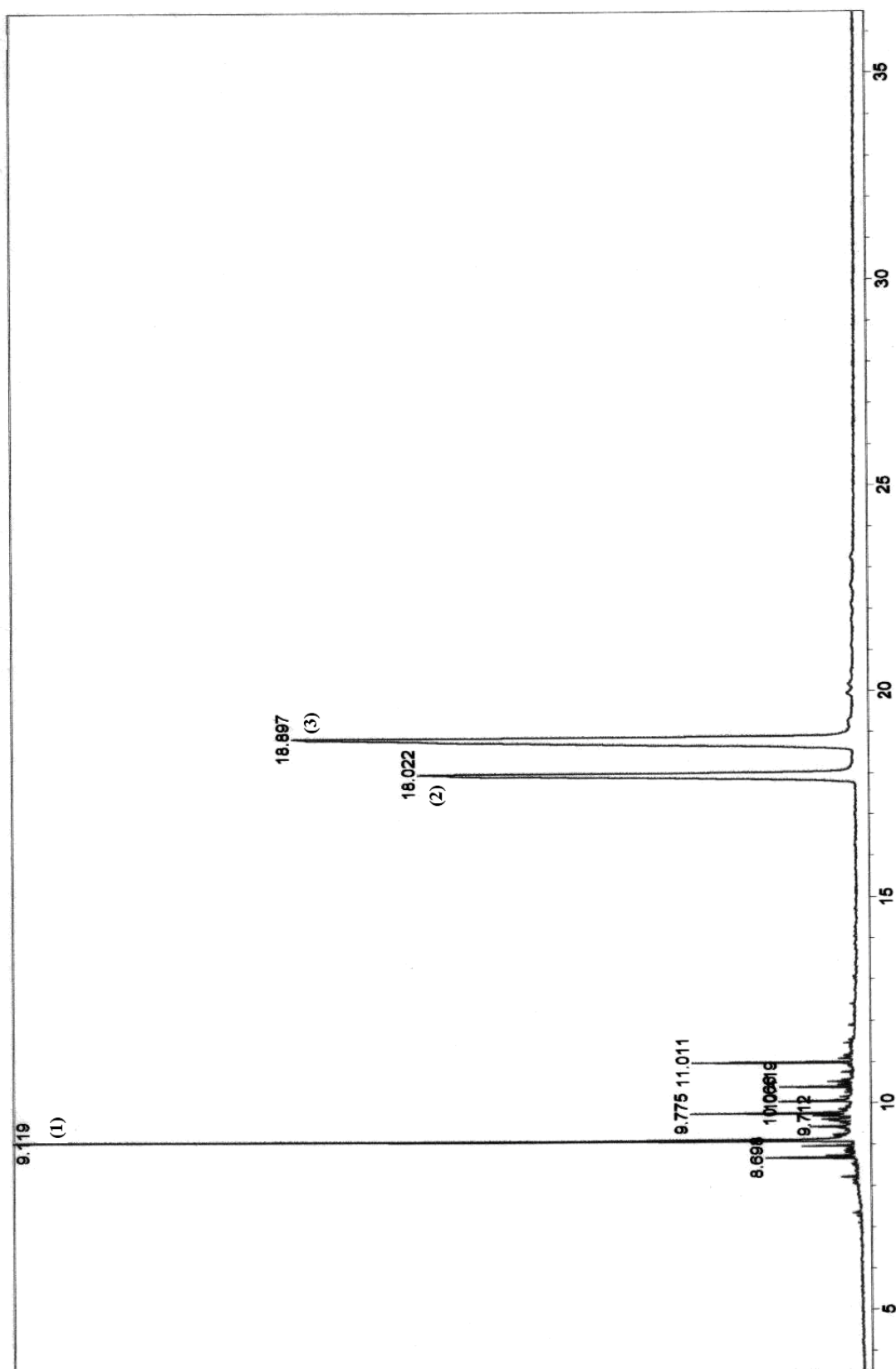
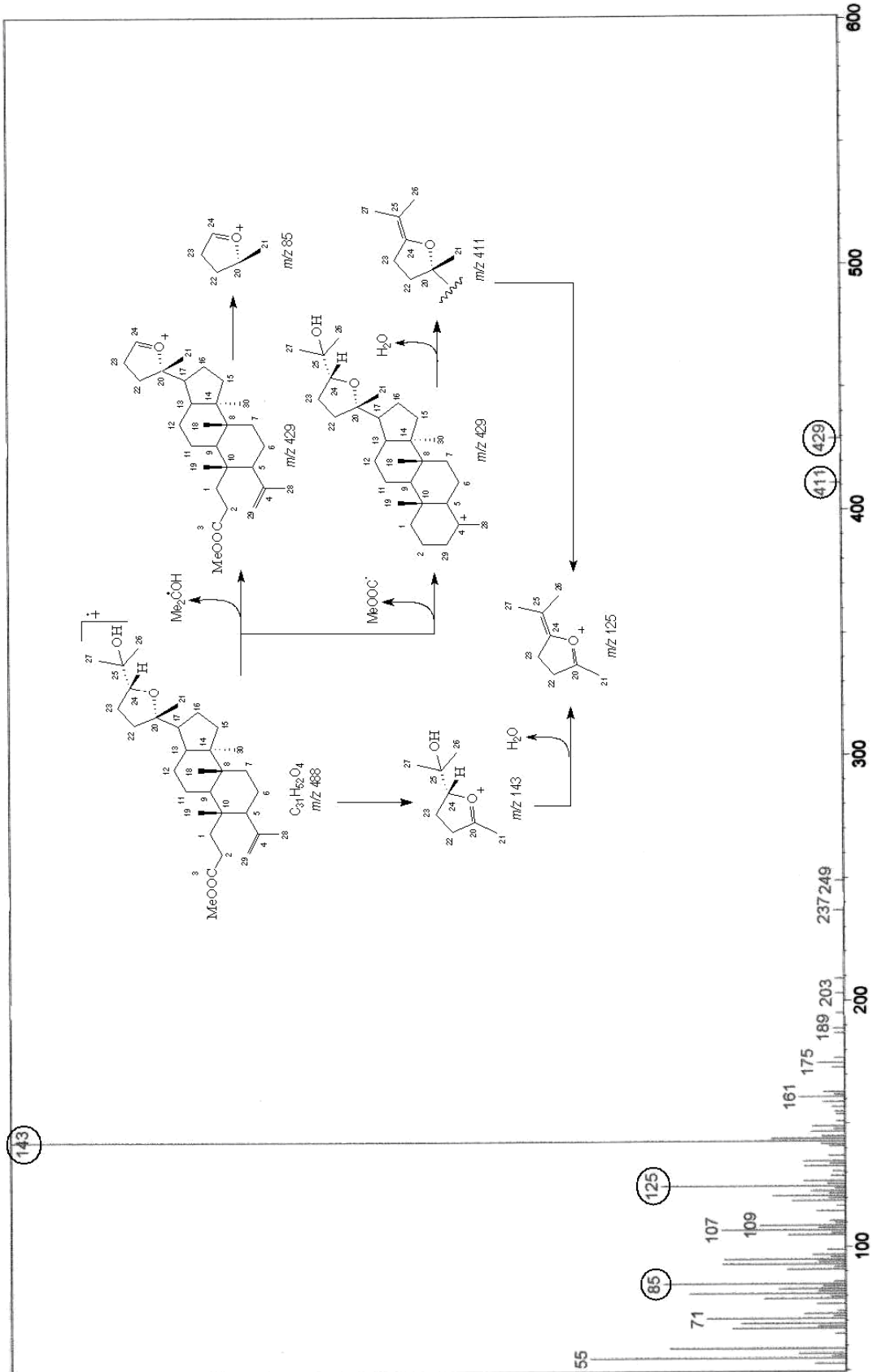
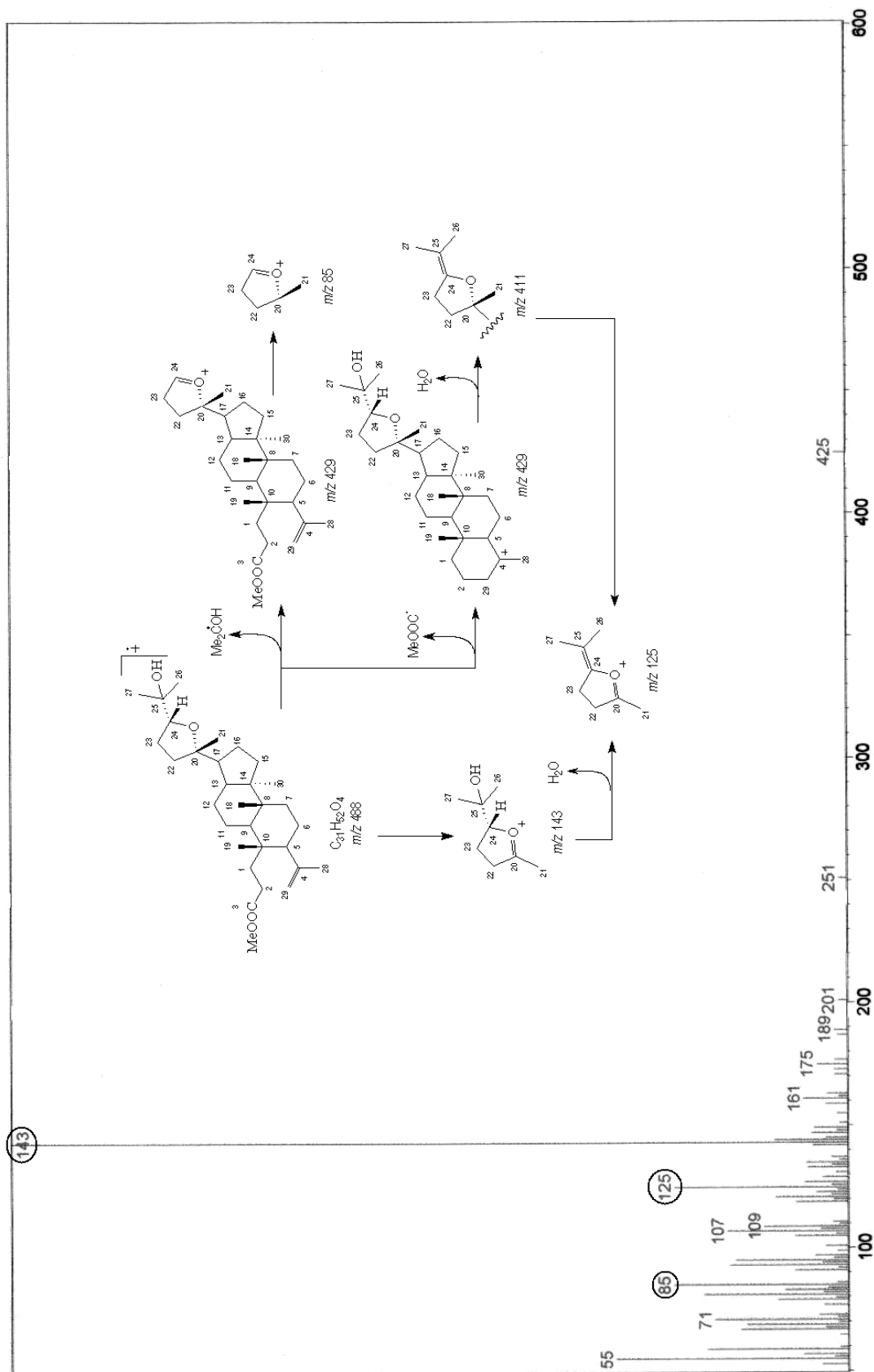


Figura 15 Cromatograma de CC07 obtido por CG-EM.

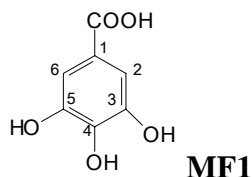


**Espectro 10** Espectro de CG-EM de CC01 ou CC07 referente ao pico 2.



**Espectro 11** Espectro de CG-EM de CC01 ou CC07 referente ao pico 3.

## 9.3 ÁCIDO 3,4,5-BENZÓICO MF1



A substância **MF1** isolada de *Mabea fistulifera* foi caracterizada como ácido gálico a partir de dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ -APT em conjunto com comparação com dados de literatura.

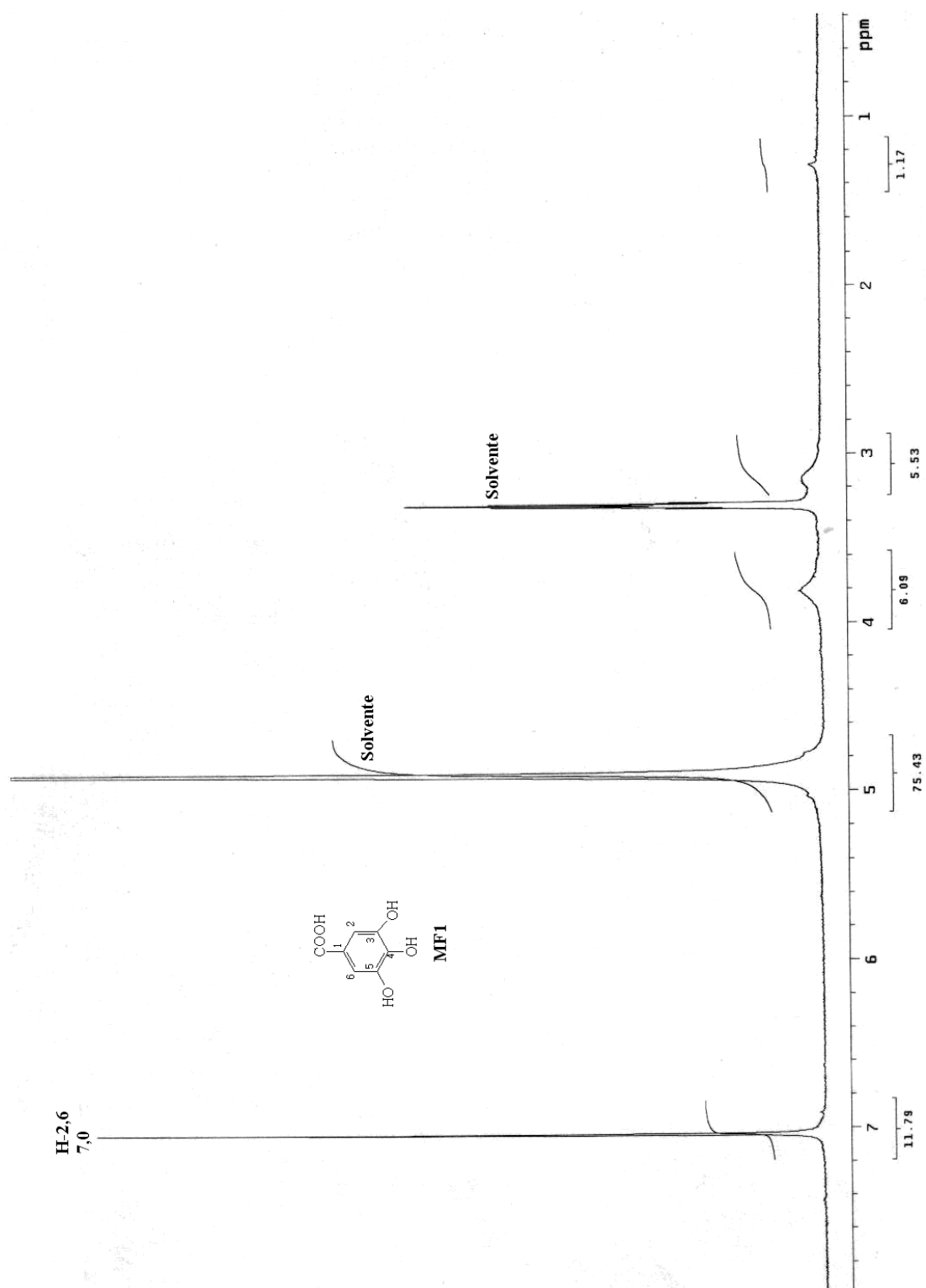
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 12**, p. 83) evidenciou um sinal na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,0 (2H, s), este sinal está compatível com o padrão de caracterização para hidrogênios *meta* acoplados e foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-6.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e a sequência APT (**Espectros 13**, p. 83 e **14**, p. 84; **Tabela 18**, p. 82) revelaram a existência de cinco sinais, sendo o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  172,5 compatível com carbonila de ácido carboxílico, quatro carbonos quaternários  $sp^2$  em [ $\delta_{\text{C}}$  146,5 para C-3,5]; [ $\delta_{\text{C}}$  139,0 para C-4] e [ $\delta_{\text{C}}$  124,7 para C-1] e o sinal voltado para a face negativa do espectro de APT foi atribuído aos dois carbonos metínicos  $sp^2$  em [ $\delta_{\text{C}}$  110,5 para C-2,6].

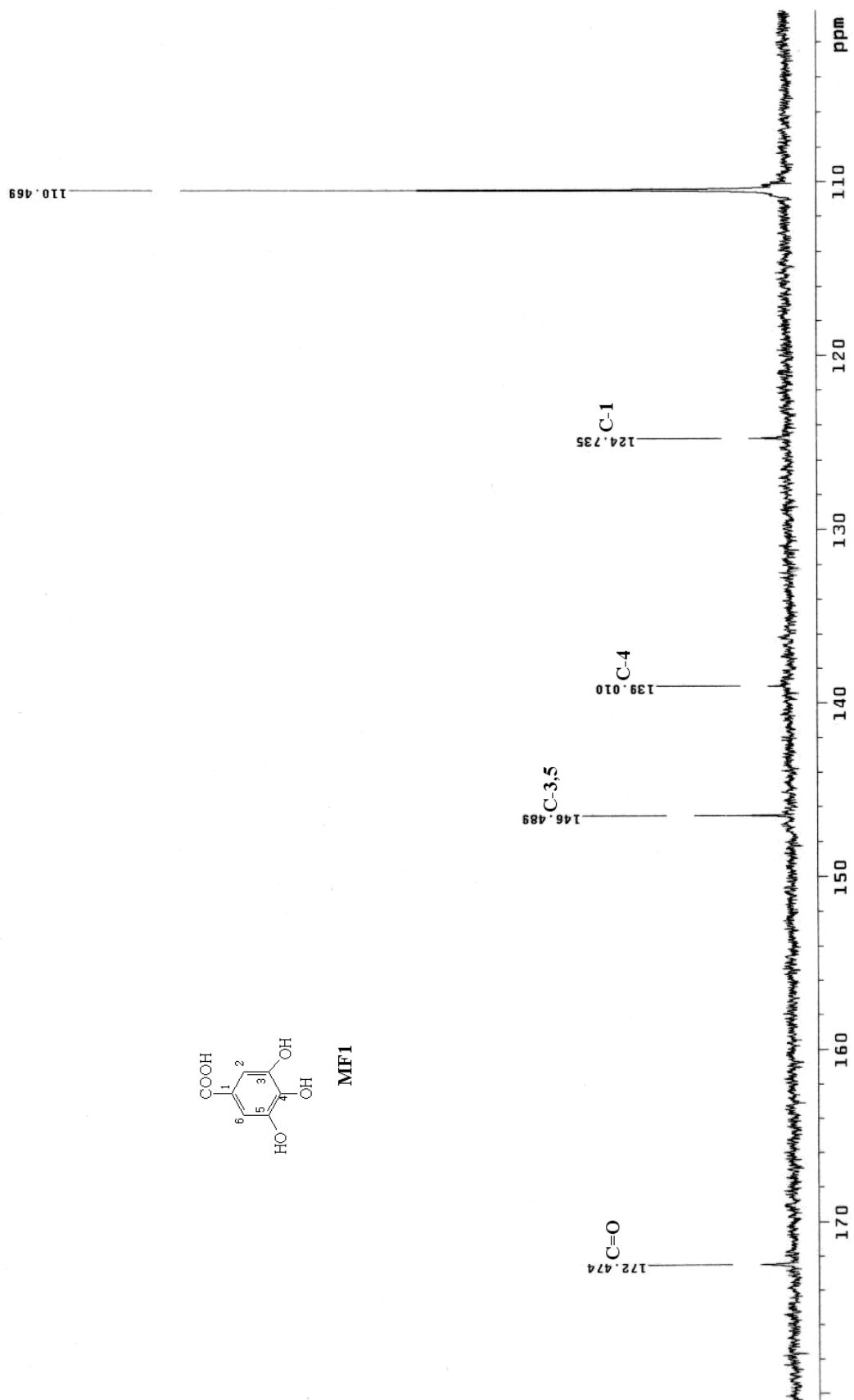
**Tabela 18** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para **MF1**.

Carbono	$\delta_{\text{C}}$ MF1
C-1	124,7
C-2,6	110,5
C-4	139,0
C-3,5	146,5
C=O	172,5

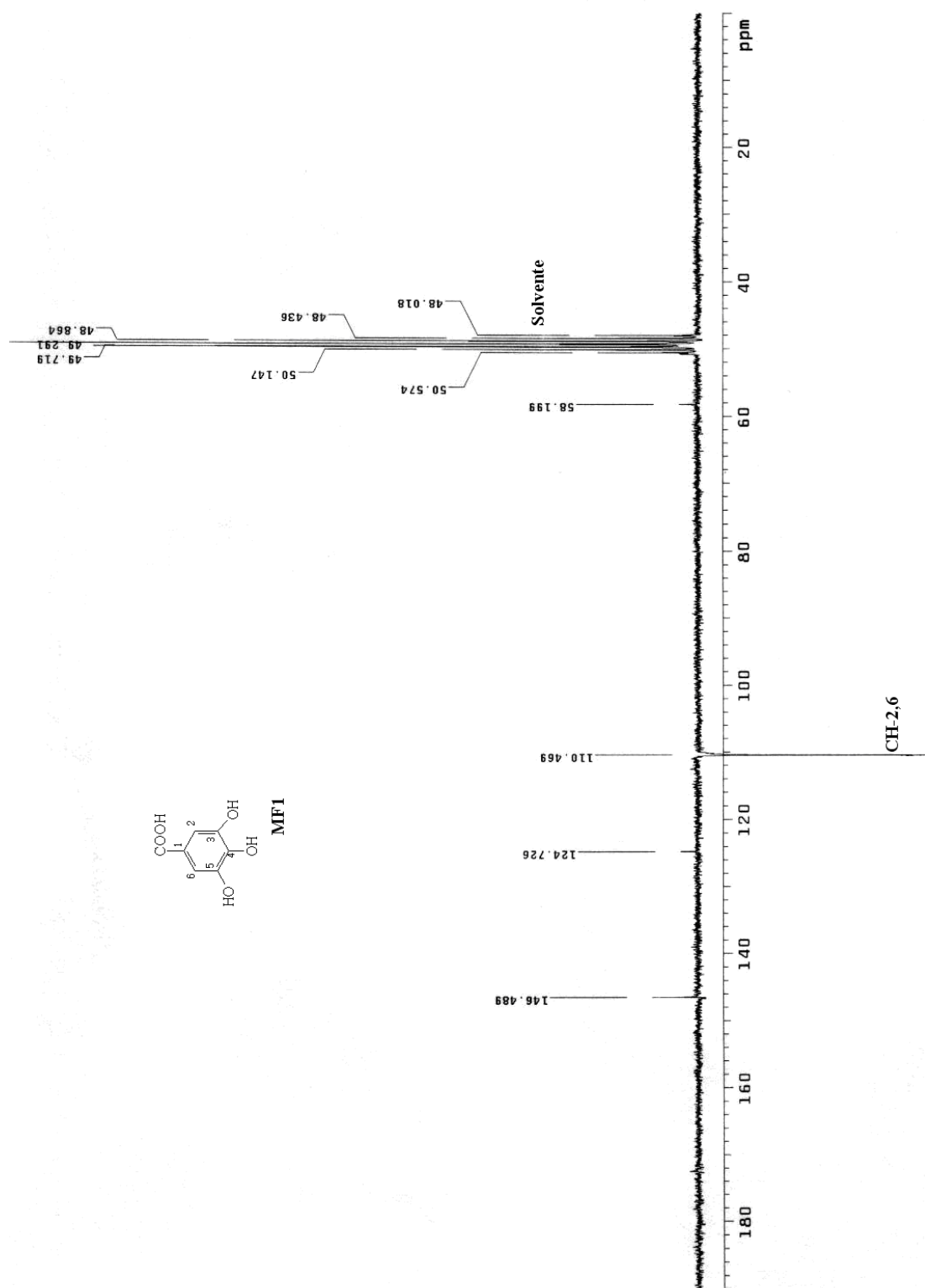




**Espectro 12** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **MF1** (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Espectro 13** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **MF1** (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Espectro 14** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de **MF1** (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Extratos de trinta e sete espécies vegetais obtidos por maceração a frio foram testados para atividades larvicida, antioxidante, antituberculose, antibacteriana e antitumoral. Cerca de 70% destes extratos apresentaram algum tipo de atividade.
- É possível viabilizar o uso do extrato bruto, desde que as substâncias responsáveis pela atividade estejam definidas. Logo, este trabalho contribui com a inclusão de mais uma espécie de Meliaceae, *Cabralea canjerana*, que pode ser um inseticida natural em potencial.
- *C. canjerana* apresentou resultado positivo para dois dos cinco ensaios realizados, atividade larvicida e atividade antituberculose.
- Dois triterpenos damarânicos, ácido eichlerianico e eichlerianato de metila foram isolados das folhas de *C. canjerana*.
- A atividade antioxidante foi avaliada usando o método do DPPH e indicou quatorze extratos com atividades antioxidante superior ao do padrão *Ginkgo biloba* (Egb 761).
- A atividade antioxidante do ácido gálico, isolado de *M. fistulifera*, foi medida e o resultado encontrado foi ainda superior ao do extrato juntamente com suas partições (0,016 µg/mL).
- A avaliação da atividade antimicobacteriana permitiu identificar seis extratos com potencialidades para o tratamento da tuberculose: *P. vellosiana*, *P. affinis*, *P. filipes*, *P. foliolosa*, *C. canjerana* e *C. fissilis*, cujas concentrações mínimas inibitórias foram 0,20 µg/mL; 0,20 µg/mL; 0,78 µg/mL; 0,78 µg/mL; 3,12 µg/mL e 3,12 µg/mL respectivamente.

- Os extratos de *Bathysa australis*, *Mabea fistulifera* e *Virola oleifera* foram capazes de produzir uma boa inibição sobre a atividade ATPase Pdr5p.
- A atividade antimicrobiana de algumas espécies está relatada aqui pela primeira vez, como no caso das espécies: *M. fistulifera*, *B. australis*, *A. cordatum*, *S. multiflora*, *G. vibernoi*, *S. leucanthum*, *C. brasiliensis*, *S. glaziovii*, *S. sampaioana*, *M. brauna* e *B. stenopetala*. Um dos extratos avaliados neste estudo, *Cariniana estrellensis* (Euphorbiaceae), mostrou-se ativa contra cepas Gram positivas e Gram negativas.
- O método de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) mostrou que tem capacidade de atingir alta resolução e reduzir as dificuldades envolvidas na descoberta de medicamentos de origem vegetal, ou seja, o caro e moroso passo para isolar constituintes ativos em plantas.
- A integração entre a tecnologia (HSCCC) e os bioensaios, guiando o processo de fracionamento de extrato vegetal, prestou um resultado favorável a este projeto e aos futuros projetos do grupo de pesquisa.
- Este trabalho poderá ser usado como ponto de partida para ampliar o conhecimento químico destas espécies vegetais.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURJAI, T., DARWISH, R. M. AL-KHALIL, S., MAHAFAZAH, A. AND AL-ABBADI, A. 2001. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**: 39-44.
- AHMAD, I., BEG, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**: 113 – 123.
- ARGOLO, A. C. C., SANT'ANA, A. E. G., PLETSCH, M. & COELHO, L. C. B. B. 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*. **95**: 229-233.
- AUDDY, B., FERREIRA, M., BLASINA, F., LAFON, L., ARREDONDO, F., DAJAS, F., TRIPATHI, P. C., SEAL, T. & MUKHERJEE, B. 2003. Screening of antioxidant activity of three Indian Medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. **84**: 131-138.
- AUSTIN, D. J., KRISTINSSON, K. G., ANDERSON, R. M. 1999. The Relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **96**: 1152-1156.

- BARJA DE QUIROGA G. 1992. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. **13**: 325-340.
- BARTH, O. M., JUSTO, R. L. AND BARROS, M. A. 1998. Catálogo sistemático do pólen das plantas arbóreas do Brasil meridional. XXX: Meliaceae. *Revista Brasileira de Biologia*. **58** (3): 497-513.
- BENTES-GAMA, M. M. 2002. Bioprospecção da Biodiversidade: Princípios e Ações Para o Uso Sustentável. [on line]. URL: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/bioprospec.htm>. Consultado em 25/05/2008.
- BIAVATTI, M. W., MARENSI, V., LEITE, S. N, REIS, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest *Revista Brasileira de Farmacognosia: Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **17**(4): 640-653.
- BISSET, N. G., CHAVANEL, V., LANTZ, J. AND WOLFF, R. E. 1971. Constituants sesquiterpéniques et triperpéniques des résines du genre *Shorea*. *Phytochemistry*. **10**: 2451-2463.

- BODEY, G. P., BOLIVAR, R., FAINSTEIN, V., JADEJA, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious Diseases*. **5**: 279-313.
- BRAGA, P. A. C., SOARES, M. S., SILVA, M. F. G. F., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B. AND PINHEIRO, A. L. 2006. Dammarane triterpenes from *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): Their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. **34**: 282-290
- BRAUSSALIS, A. M., FERRARO, G. E. G., MARTINO, V. S., PINZÓN, R., COUSSIO, J. D. & ALVAREZ, J. C. 1999. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds.
- CAPURRO, M. L., DRIBOLLA, P. E. M., BIANCHI, A. G., MARRELLI, M., CAROCI, A. S., MAGALHÃES, M., FEITOSA, F. M., CHINOCA, J. P. & BURINI, B. 2001. Mosquitos Transgênicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. **22**: 26-31.
- CARLSON, J., OLSON, K., HIGGS, S. & BEATY, B. 1995. Molecular genetic manipulation of mosquito vectors. *Annual review of entomology*. **40**: 359-388.
- CASE, R. J., WANG Y. , FRANZBLAU, S. G. , SOEJARTO, D. D. , MATAINAHU, L. , PISKAUT, P. , PAULI, G. F. 2007. Advanced applications of counter-current chromatography in the isolation of anti-tuberculosis



- constituents from *Dracaena angustifolia*. *Journal of Chromatography A*. **1151**: 169–174.
- CHARIANDY, C. M., SEAFORTH, C. E., PHELPS, R. H., POLLARD, G. V. & KHAMBAY, B. P. S. 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*. **64**: 265-270.
- CHENG, S.S., CHANG, H.T., CHANG, S. T., TSAI, K. H. & CHEN, W. J. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*. **89**: 99-102.
- CHEN, J. H. & HO, C. T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**: 2374-2378.
- CICCIA, G., COUSSIO, J. & MONGELLI, E. 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **72**:185-189.
- CONSEIL G, DECOTTIGNIES A, JAULT JM, COMTE G, BARRON D, GOFFEAU A, DI PIETRO, A. 2000. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **39**: 6910-6917.

- CONWAY, W.D. 1990. *Countercurrent Chromatography: Apparatus: Theory and Applications*. VCH, Weinheim.
- COQUEIRO, A., SARRAGIOTTO, M. H., ZOCOLER, M. A. AND VIDOTTI, G. J. 2007. Flavanone glycosides from *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. **35**: 717-719.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. 1997. *Natural Products in Drug Discovery and Development*. *Journal of Natural Products*. **60**: 52-60.
- DARWISH, R. M., ABURJAI, T., AL-KHALIL, S. & MAHAFZAH, A. 2002. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **79**: 359-364.
- DAUD, R. D. and FERES, R. J.F. 2005. Ecology, behavior and bionomic: Diversidade e Flutuação Populacional de Ácaros (Acari) em *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) de Dois Fragmentos de Mata Estacional Semidecídua em São José do Rio Preto, SP. *Neotropical Entomology*. **34**(2). 191-201.
- DETZEL, A. J., CAMPBELL, G. A. & MUTHARASAN, R. 2006. Rapid assessment of *Escherichia coli* by growth rate on piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors. *Sensors and Actuators B*. **117**: 58-64.

- DEWICK, P. M. 1977. Medical Natural Products, New York, John Wiley & Sons.
- DJIPA, C. D, DELMEE M, QUENTIN-LECLERCQ, J. 2000. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **71**:307-313.
- DRÖGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. **82**: 47-95.
- ENRÍQUEZ, G. Os caminhos da bioprospecção para o aproveitamento comercial da biodiversidade na Amazônia [on line]. URL: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/04/10.shtml>. Consultado em 25/05/2008.
- ESTANISLAU, A.A., BARROS, F.A.S.; PEÑA, A.P., SANTOS, S.C.; FERRI, P.H., PAULA, J.R. 2001. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **11**(2): 95-100.
- FENSTER, C. P., WEINSIER, R. L., DARLEY-USMAR, V. M., PATEL, R, P. 2002. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obesity Research*. **10**: 964-968.

- FERNANDES, A. M. A. P., BARATA, L. E. S. AND FERRI, P. H. 1993. Lignans and a neolignan from *Virola oleifera* leaves. *Phytochemistry*. **32** (6): 1567-1572.
- FERNANDES, A. M. A. P., BARATA, L. E. S. AND FERRI, P. H. 1994. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *Virola oleifera*. *Phytochemistry*. **36** 533-534.
- FERNANDES, A. M. A. P., PRADO, A. L., BARATA, L. E. S., PAULO, M. Q., AZEVEDO, N. R. AND FERRI, P. H. 1997. A method to separate lignoids from *Virola* leaves. *Phytochemistry Analysis*. **8**: 18-21.
- FERRI, P.H. 1993. Fitoquímica das folhas de *Virola oleifera* e síntese de compostos [1,4]-benzodioxanos e análogos nitrogenados. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade de Campinas-UNICAMP, Campinas. (vol.1): 177p.
- FISH, D. N., PISCITELLI, S. C., DANZIGER, L. H. 1995. Development of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patient characteristics in 173 studies. *Pharmacotherapy*. **15**: 279-291.
- FISKE, C. H. AND SUBBAROW, Y. J. 1951. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. **66**: 375-400.

- FRANZBLAU, S. 2000. A rapid, microplate-based assay for evaluating the activity of drugs against *Mycobacterium leprae*, employing the reduction of Alamar Blue. *Leprosy Review*. **71**: S74-S75.
- GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M. & SILVA, W. P. 2005. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. Hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. *Archives of Veterinary Science*. **10** (1): 75-81.
- GERMANO-FILHO, P. 1999. Estudos Taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. *Rodriguésia*. **50** (76/77): 49-75.
- GOLDFARB, A. H. 1993. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*. **25**: 232-236.
- GORDON, S. M., SERKEY, J. M., KEYS, T. F., RYAN, T., FATICA, C. A., SCHMITT, S. K. 1988. Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. *The Annals of Thoracic Surgery*. **65**: 95-100.
- GOULART, M. F., RIBEIRO, S. P., AND LOVATO, M. B. 2005. Genetic, Morphological and Spatial Characterization of two Populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in Different Successional Stages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **48** (2): 275-284.

- GREEN, M., WALD, E. R. 1996. Emerging resistance to antibiotics impact on respiratory infections in the outpatient setting. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. **77**: 167-173.
- GROSVENOR, P. W., SUPRINO, A. AND GRAY, D. O. 1995. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonésia. Part 2, Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **45**: 97 – 111.
- GUERRANT, R. L. & BLACKWOOD, B. L. 1999. Threats to global health and survival: The growing crises of tropical infectious diseases – Our “unfinished agenda”. *Clinical Infectious Diseases*. **28**: 966-986.
- GUILLEMOT, D. 1999. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 494-498.
- GUPTA, A. S. AND DEV, S. 1971. Higher isoprenoids-I. Triterpenoids from the oleoresin of *Dipterocarpus pilusus*: hollongdione and dipterocarpolic acid. *Tetrahedron*. **27**: 823-834.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. 1994. *Nutrition Reviews*. **52**: 253-265.
- HALVORSEN, B. L., HOLTE, K., MYHRSTAD, M. C. W., BARIKMO, I., HVTTUM, E., REMBERG, S. F., WOLD, A. B., HAFFNER, K., BAUGEROD, H., ANDERSEN, L. F., MOSKAUG, J. O., JACOBS JR., DR.

- R. & BLOMHOFF, R. 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*. **132**: 461-471.
- HAMILL, F. A., APIO, S., MUBIRU, N. K., MOSANGO, M., BUKENYA-ZIRABA, R., MAGANYI, O. W. AND SOEJARTO, D. D. 2003. Traditional herbal drugs of southern Uganda. Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **87**: 15-19.
- HO, S. H., WANG, J., SIM, K. Y., EE, G. C. L., IMIYABIR, Z., YAP, K. F., SHAARI, K. & GOH, S. H. 2003. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. *Phytochemistry*. **62**: 1121-1124.
- HUGO, W. B., RUSSELL, A. D. 1995. Pharmaceutical Microbiology, 5<sup>th</sup>. *Blackwell Science*, Oxford: 391-402.
- JANTAN, I., ZAKI, Z. M., AHMAD, A. R. AND AHMAD, R. 1999. Evaluation of smoke from mosquito coils containing Malaysian plants against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. **70**:237-243.
- JOLY, A.B. 1998. Botânica – Introdução à taxonomia vegetal. 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional.

- JONES, R. N. 1998. Important and emerging beta-lactamase-mediated resistance in hospital based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases*. **31**: 461-466.
- KANAKIS, C.D., TARANTILIS, P.A., POLISSIOU, M.G., DIAMANTOGLU, S. & TAJMIR-RIahi, H.A. 2006. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*. ARTICLE IN PRESS.
- KARALI, N., GU'RSOY, A., KANDEMIRLI, F., SHVETS, N., KAYNAK, F. B., ÖZBEY, S., KOVALISHYN, V. AND DIMOGLO, A. 2007. Synthesis and structure–antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.**15**: 5888–5904.
- KINGHORN, A. D. 1987. Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. *Journal of Natural Products*. **50**: 1009-1024.
- KLOUCEK, P., POLESNY, Z., SVOBODOVA, B., VLKOVA, E. AND KOKOSKA, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology*. **99** (2): 309-312.



- KLUYTMANS, J. 1997. Surgical infections including burns. In: Wenzel, R. P. (Ed.), Prevention and control of nosocomial infections. *Williams & Wilkins, Baltimore, MD*: 841-865.
- KOLEVA, L. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A. AND EVSTATIEVA, L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. **13**: 8-17.
- KUNIN, C. M. 1993. Resistance to antimicrobial drug worldwide calamity. *Annals of Internal Medicine*. **118** (7) 557-561.
- KUROSHIMA, K. N., DE CAMPOS, F., DE SOUZA, M. M., YUNES, R. A., DELLE MONACHE, F., FILHO, V. C. 2001. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. *Journal of Biociences*. **56** (9-10): 703-706.
- LEITE, A. C., ELAINE CRISTINA CABRAL, D. A., SANTOS, D. A. P., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C. AND SILVA, M. F. G. F. 2005. Isolamento do Alcalóide Ricinina das Folhas de *Ricinus Communis* (EUPHORBIACEAE) Através de Cromatografias em Contracorrente. *Química Nova*. **28**:(6) 983-985

LEONI, S. L. 1995. Fitoterapia no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG.

*Pabstia*. **7** (1): 1-5.

LORENZI, H. 1998. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de

Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2.ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora

Plantarum.

LORENZI, H. 2002. Arvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de

plantas arbóreas do Brasil. Vol 1. 4ª. Edição. Nova Odessa. SP. Instituto

Plantarum.

LUNA, J. S., SANTOS, A. F., LIMA, M. R. F., OMENA, M. C., MENDONÇA, F.

A. C., BIEBER, L. W. & SANT'ANA, A. E. G. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil.

*Journal of Ethnopharmacology*. **97**: 199-206.

LU, Y AND FOO, L. Y. 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage

(*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*. **75**: 197–202.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B. 1970. The Sistematic

Identification of Flavonoids, Springer-Verlag. New York.

- MALLAVARAPU, G. O. 2001. Contribution of medicinal plants to modern medicine. *Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine* 22/4A-23/1A, p. 572 -578.
- MANACH, C., TEXIER, O., MORAND, C., CRESPIY, V., RÉGÉRANT, F., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. 1999. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radical Biology & Medicine*. **27**: 1259-1266.
- MARTIN, A., CAMACHO, M., PORTAELS, F. & PALOMINO, J. C. 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47** (11): 3616-3619.
- MENDONÇA, F. A. C., SILVA, K. F. S., SANTOS, K. K. L., JÚNIOR, K. A. L. & SANT'ANA, A. E. G. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. **76**: 629-636.
- MENSOUR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T., CPUBE, C. S. & LEITÃO, S. G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. **15**: 127-130.

- MIRANDA, C. L., STEVENS, J. F., HELMRICH, A., HENDERSON, M.C., RODRIGUEZ, R. J., YANG, Y. -H., DEINZER, M. L., BARNES, D. W. & BUHLER, D. R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic Effects of Prenylated flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemistry Toxicology*. **37**: 271-285.
- MOHAMAD, K., SÉVENET, T., DUMONTET, V., PAÏS, M., TRI, M. V., HADI, H., AWANG, K. AND MARTIN, M. T. 1999. Dammarane Triterpenes and pregnane steroids from *Aglaia lawii* and *A. tomentosa*. *Phytochemistry*. **51**: 1031-1037.
- MOLINA-SALINAS, G. M., RAMOS-GUERRA, M. C., VARGAS-VILLARREAL, J., MATA-CÁRDENAS, B. D., BECERRIL-MONTES, P. AND SAID-FERNÁNDEZ, S. 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*. **37**: 45-49.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. B., KENT, J. 2000. *Nature*. **403**: 853-858.
- NG, T.B. LIU, F. & WANG, Z.T. 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*. **66** (8):709-72.

- NIESS, A. M., DICKHUTH, H. H., NORTHOFF, H. & FEHRENBACH E. 1999. Free radicals and oxidative stress in exercise – imunological aspects. *Exercise Immunology Review*. **5**: 22-56.
- NUGROHO, B. W., EDRADA, R. A., WRAY, V., WITTE, L., BRINGMANN, G., GEHLING, M. AND PROKSCH, P. 1999. An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry*. **51**: 367 – 376.
- OLIVEIRA, R. M. E VALLA, V. V. 2001. As condições e as experiências de vida de grupos populares no Rio de Janeiro: repensando a mobilização popular no controle do dengue. *Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro*. **17**: 77-88.
- PAULI, G. F., CASE, R. J., INUI, T., WANG, Y., CHO, S., FISCHER, N. H. AND FRANZBLAU, S. G. 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences*. **78**: 485 – 494.
- PENNINGTON, T. D. AND STYLES, B. T. 1975. A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea*. **22** (3): 419-540.
- PEREIRA, R. S., SUMITA, T. C., FURLAN, M. R., JORGE, A. O. C. & UENO, M. 2004. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista da Saúde Pública*. **38** (2): 326-328.

- PIETTA, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **63**: 1035-1042.
- PINTO, A. C., SILVA, DULCE, H. S., BOLZANI, V. S. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. **25**: 45-61.
- POLLACK, M., MANDELL, G. L., BENETT, J. E., DOLIN, R. 1995. *Pseudomonas aeruginosa*. In: principles and practice of infectious diseases. *Churchill Livingstone*, New York: 1980-2003.
- PRAJAPATI, V., TRIPATHI, A. K., AGGARWAL, K. K. & KHANUJA, S. P. S. 2005. Insecticida, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*. **96**: 1749-1757.
- RANGEL, L. P. 2005. Efeito de Fitoterápicos sobre a Proteína Pdr5p de Leveduras. Tese de Mestrado. UFRJ. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes.
- RANGEL, L. R., ABREU, L. F., ANDRADE, A. R., LEITÃO, S. G., LEITÃO, G., G., PEREIRA, A. F. 2008. Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **18**(1): 30-36.

- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**: 933-956.
- RICE, L. B. 1999. Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharmacotherapy*. **19**: 120-128.
- RODRIGUES, W.A. 1980. Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. *Acta Amazônica*. v.10 (1), suplemento.
- RODRÍGUEZ, H., RIVAS, B., CORDOVÉS, C. G. AND MUÑOZ, R. 2008. Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry* .**107**: 664–670
- ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. 1997. Chemical constituents from Myristicaceae. *Natural Products Research in Brazil*. **49** (5/6): 345-53.
- ROSENSTEIN, B. J., HALL, D. E. 1980. Pneumonia and septicemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. *Johns Hopkins Medical Journal*: **147**: 188-189.
- ROUX, D., MARTIN, M. –T., ADELIN, M. –T., SEVENET, T., HADI, A. H. A. AND PAIS, M. 1998. Foveolins A and B, dammarane triterpenes from *Aglaia foveolata*. *Phytochemistry*.**49** (6):1745-1748.

- SCHULTES, R.E. 1979. Evolution of the identification of the Myristicaceous hallucinogens of South America. *Journal of Ethnopharmacology*. **1**: 211-239.
- SERGER, C., POINTINGER, S., GREGER, H. AND HOFER, O. 2008. Isoeichlerianic acid from *Aglaia silvestris* and revision of the stereochemistry of foveolin B. *Tetrahedron Letters*. **49**: 4313-4315.
- SHU, YUE-ZHONG. 1998. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Journal of Natural Products*. **61**: 1053-1071.
- SILVA, R. S. F. LEITÃO, G. G., BRUM, T. B., LOBATO, A. P. G., PINTO, M. C. AND F.R., PINTO, A. V. 2007. Applications of counter-current chromatography in organic synthesis purification of heterocyclic derivatives of lapachol. *Journal of Chromatography A*. **1151**: 197–202
- SILVEIRA, C.S., PESSANHA, C.M., LOURENÇO, M.C.S., NEVES JUNIOR, I., MENEZES, F.S., KAPLAN, M.A.C. 2005. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia: Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **15** (2): 143-148.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. 1994. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5ª. Edição, Guanabara Koogan.



- SIMAS, N. K., LIMA, E. C., CONCEIÇÃO, S. R., KUSTER, R. M. & FILHO, A. M. O. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de terpenóides e Fenilpropanóides. *Química Nova*. **27** (1): 46-49.
- STEVENS, J. F. & PAGE, J. E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*. **65**: 1317-133.
- THYLOR, W AND FARNSWORTH, N. R. 1973. The Vinca Alkaloids: Botany Chemistry and Pharmacology. New York, Marcel Dekker.
- Weeks, R. A., Dobberstein, R. H., Farnsworth, N. R. 1977. Isolation of paeonol from *Bathysa meridionalis*. *Journal of Natural Products*. **40**: 515-523.
- WIBLIN, R. T. 1997. Nosocomial pneumonia. In: Wenzel, R. P. (Ed), Prevention and Control of Nosocomial Infections. *Williams & Wilkins, Baltimore, MD*: 807-819.
- WILLIAMS, J. D., SEFTON, A. M. 1999. The prevention of antibiotic resistance during treatment. *Infection*. **2**: 29-31.
- WILLIAMSON, E. M., OKPAKO, D. T. & EVANS, F.J. 1996. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *Wiley*. West Sussex.

WILLIS, J.C. 1973. A dictionary of the flowering plants and ferns. P.771.  
CambridgeUniversity Press. Cambridge.

YANG, Y. & FIX, D. 2006. Genetic analysis of the anti-mutagenic effect of  
genistein in *Escherichia coli*. *Mutation Research*. 600: 193–206.

YOUNG, I. S. & WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease.  
*Journal of Clinical Pathology*. **54**: 176-186.

ZHANG, T. 2002. Countercurrent chromatography: The Support-Free Liquid  
Stationary Phase. (Comprehensive Analytical Chemistry, vol. XXXVII).  
Chapter 8.

Dengue: Rio de Janeiro, 2008: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dengue/den-Rio2008.html>. Consultado em 25/07/2008.

## 12 ANEXO

12.1 ANEXO 1 - ARTIGO: *Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity*

## Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity

Luciana Pereira Rangel,<sup>\*,1</sup> Lisandra Ferreira de Abreu,<sup>\*,2</sup> Ana Rodrigues de Andrade,<sup>1</sup>  
Suzana Guimarães Leitão,<sup>3</sup> Gilda Guimarães Leitão,<sup>2</sup> Antonio Ferreira-Pereira<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro-RJ, Brazil,

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941590 Rio de Janeiro-RJ, Brazil,

<sup>3</sup>Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941590 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

**RESUMO: “Efeito de extratos de plantas da Floresta Atlântica Brasileira sobre a atividade da Pdr5p ATPase”** No presente estudo, testamos o efeito de 27 extratos e frações de plantas de diferentes famílias botânicas sobre a atividade da proteína Pdr5p de membranas plasmáticas de leveduras, responsável pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas em leveduras. Alguns dos extratos foram capazes de produzir uma boa inibição na concentração fixa de 200 µg/mL e foram selecionados para uma investigação mais aprofundada. Curvas de dose-resposta foram obtidas para os extratos brutos etanólicos de *Bathysa australis* (A. St.-Hill.) Benth. & Hook f., *Mabea fistulifera* Mart. e *Virola oleifera* (Schott) A. C. Sm., com concentrações até 400 µg/mL. O menor valor de IC<sub>50</sub> foi obtido para *Virola oleifera*, 22,8 µg/mL, seguido por *Bathysa australis*, 35,3 µg/mL e *Mabea fistulifera*, 42,5 µg/mL. Após o fracionamento dos extratos brutos por partição líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, cada fração foi novamente testada, sendo que apenas algumas das frações mantiveram a habilidade de inibir a atividade enzimática. Quando analisadas por HPLC/DAD, as frações ativas demonstraram a presença de derivados de flavonóides, que já demonstraram ter a habilidade de inibir a atividade ATPásica da Pdr5p, assim como outras classes de metabólitos secundários, tais como lignanas e alcalóides.

**Unitermos:** Resistência a múltiplas drogas, levedura, Pdr5p, extratos de plantas, Mata Atlântica.

**ABSTRACT:** In the current study, we tested the effect of 27 plant extracts and fractions from different botanical families on the activity of Pdr5p from yeast plasma membrane, responsible for the multidrug resistance phenotype in yeast cells. Some of the extracts were able to produce a good inhibition in the fixed concentration (200 µg/mL) and were selected for a deeper investigation. Dose-response curves were obtained for the crude ethanol extracts of *Bathysa australis* (A. St.-Hill.) Benth. & Hook f., *Mabea fistulifera* Mart. and *Virola oleifera* (Schott) A. C. Sm. with concentrations ranging up to 400 µg/mL. The lower IC<sub>50</sub> value was obtained for *Virola oleifera*, 22.8 µg/mL, followed by *Bathysa australis*, 35.3 µg/mL, and *Mabea fistulifera*, 42.5 µg/mL. After fractionation of the crude extracts by liquid-liquid partition with different organic solvents and each fraction was tested again, only some of the fractions retained the ability to inhibit the enzymatic activity. When analyzed by HPLC/DAD, the active fractions showed the presence of flavonoid derivatives, already reported for their ability to inhibit Pdr5p ATPase activity, as well as other classes of secondary metabolites such as lignans and alkaloids.

**Keywords:** Multidrug resistance, yeast, Pdr5p, plant extracts, Atlantic Forest.

### INTRODUCTION

The search for new pharmacologically active agents obtained by screening natural sources such as microbial and plant extracts has led to the discovery of many clinical useful drugs that play a major role in the treatment of human diseases (Shu, 1998). A recent review pointed out that approximately 60% of the antitumor and anti-infective agents that are commercially available

or in late stages of clinical trials today are of natural product origin (Cragg et al., 1997). Historically, the majority of the natural product-based drugs including cyclosporine, paclitaxel, and camptothecin derivatives were first discovered by traditional cell-based in vitro assays (antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, or cytotoxic assays) before their real molecular biological targets were identified (Shu, 1998).

Anti-infective and antitumor targets have been,

historically, the effective research area for natural products screening programs. Today, with the advent of genomics research and newer molecular biology tools for developing bioassays, more sophisticated biological assays in addition to cell-based assays are being employed routinely in the drug discovery paradigm.

Consequently, in recent years a notable number of natural product-derived agents have been discovered by employing mechanism-based screening approaches involving cellular or biochemical targets in their assay design. In addition, a large number of natural products, especially plant-derived drugs, continue to be discovered on the basis of traditional or empirical local medicinal practices (Shu, 1998; Amaral et al., 2006; Barbosa-Filho et al., 2006; Saúde-Guimarães and Faria, 2007; Rocha et al., 2007).

Multidrug resistance is a serious problem for chemotherapy nowadays. This phenomenon consists in cellular resistance to several structurally and functionally unrelated drugs (Gottesman and Pastan, 1993), generally extruded from the cytoplasm by transporters that belong to the ABC (ATP Binding Cassette) Family (Higgins, 1992). The most studied member of this family is P-glycoprotein (P-gp), codified by the gene ABCB1 (previously called MDR1) (Roninson et al., 1986), which is responsible for resistance of cancer cells to drugs.

Homologous ABC transporters can be found in other organisms, such as *Candida glabrata* (Cdr1p and Pdh1p (Sanglard et al., 1999; Lupetti et al., 2002)). These fungal ABC transporters share homology (around 70%) with *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p (Decottignies et al., 1994), an ABC transporter involved in yeast multidrug resistance, which is also homologous to mammalian P-gp. Besides sequence homology, these transporters are also functional homologues because they share many drug substrates and are inhibited by the same compounds (Wolfer et al., 2001). For these reasons, Pdr5p is a good model for the search of novel multidrug resistance inhibitors.

This work shows that plant extracts can be a good source of new modulators for this class of transporters.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

Plants were collected from two Atlantic Forest fragments (Bela Fama Forest - Santana do Deserto city, MG and Boa Vista Forest - Levy Gasparian city, RJ), Brazil. Taxonomic identifications were done by Sebastião J. da Silva Neto from Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil. Voucher specimens are deposited at the Herbarium of the Federal University of Rio de Janeiro (see Table 1 for voucher numbers).

### Preparation of extracts

The air-dried and powdered leaves (20 g of each) were exhaustively extracted with ethanol 96° GL. The obtained extracts were filtered and evaporated under reduced pressure on a rotary evaporator. Crude ethanol extracts of *Bathysa australis*, *Mabea fistulifera* and *Virola oleifera* were fractionated by liquid-liquid partition between MeOH : H<sub>2</sub>O 9 : 1 and Hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH, in this order.

### Preparation of plasma membranes

Yeast cells from the mutant strain AD124567 overexpressing Pdr5p and multideleted in genes encoding the Pdr3p regulator and five ABC transporters (Yor1p, Snq2p, Pdr10p, Pdr11p, and Ycf1p) ( $\Delta$ Yor1::hisG,  $\Delta$ snq2::hisG,  $\Delta$ pdr10::hisG,  $\Delta$ pdr11::hisG,  $\Delta$ ycf1::hisG,  $\Delta$ pdr3::hisG) (Decottignies et al., 1998) were grown in 2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone and harvested in the exponential phase of growth. After washing with 10 mM NaN<sub>3</sub>, the cell wall was digested with zymolase 20T (Seigakagu®) at 37 °C for 60 min, in a proportion of 6.5 mg zymolase for each 1600 initial DO and 58  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoethanol for each 15 mL of zymolase buffer (2.8 M sorbitol, 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaN<sub>3</sub>). Unbroken cells and cell debris were removed by low-speed centrifugation (4,500  $\times$  g for 10 min). The supernatant was centrifuged for 40 min at 12,000  $\times$  g, as described before (Goffeau and Dufour, 1988) in order to remove possible contaminants as mitochondria and finally, the resulting supernatant was centrifuged at 20,000  $\times$  g. The final pellet, highly enriched in plasma membranes, was stored at -70 °C. The strain AD124567 was kindly provided by Joseph Nader (Unité de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, - Belgium).

### ATPase assays

ATP hydrolysis was measured by incubating the sample at 37 °C in a final volume of 500  $\mu$ L containing 3 mM ATP-Na, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.5 mM ouabain (inhibitor of plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase), 10 nM thapsigargin (inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase), 1 mM NaN<sub>3</sub> (inhibitor of mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase), 50 mM KNO<sub>3</sub> (inhibitor of phosphatases) and 100 mM Tris (adjusted for pH 7.5 with HCl). Assays were carried out as described before (Decottignies et al., 1994). Crude ethanol extracts or their fractions were added from stock solutions in dimethylsulfoxide up to 8% (v/v) final concentration. The DMSO concentrations used were tested previously and no interference was observed up to a 10% concentration. The data obtained with dose-response curves were used to calculate the IC<sub>50</sub> values for each of the extracts.

## HPLC Analyses

The HPLC profiles of the extracts of the plants were performed in a gradient elution mode with methanol : water (pH 3.0 with acetic acid) as eluent, 1 mL/min., using a linear gradient from a start mixture of 20:80 to an intermediate of 80:20 over 30 min, and then to 100% methanol over 1 min, which then held isocratic for 5 min. An ultrasonic bath, Thornton model T28220 was used to degas the HPLC solvents (5 min.) and to dissolve the samples. The HPLC equipment was a Lachrom HPLC System (Merck, Darmstadt, Germany) equipped with an interface D7000, pump L-7100, diode array detector (DAD) L-7450A and solvent degasser L-7612. The injections were done manually with an injector valve (Rheodyne) equipped with a 20  $\mu$ L sample loop. A Lichrosorb RP-18 column (Merck, Darmstadt, Germany, 5  $\mu$ m particle size, 250 x 4.6 mm i.d.) N. 738342, was coupled to a guard column Lichrocart 250-4 HPLC cartridge (Merck, Darmstadt, Germany). The UV detection was performed with a DAD in an integration range from 240 nm to 260 nm.

## Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times and the results are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analysis and IC<sub>50</sub> values were calculated using the computer program Sigma Plot version 8.0 (SPSS Science Marketing).

## RESULTS

*Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p has a substrate and an inhibitor profile which is similar to mammalian P-glycoprotein and other fungal ABC transporters, responsible for chemotherapeutic treatments failure. For this reason, added to the fact that yeast can be used as a tool for obtaining large amounts of protein for biochemical studies (Decottignies et al., 2001; Ferreira-Pereira et al., 2003), Pdr5p was chosen as a model for studying plant compounds as multidrug resistance reversal agents.

In order to select the most promising plant extracts, we performed a screening experiment of inhibition of Pdr5p ATPase activity, using a fixed crude ethanol extract concentration of 200  $\mu$ g/mL. Plant species used in this work are listed in Table 1 as well as their effect on Pdr5p ATPase activity. The results are shown in percentages of the control activity, which was considered as 100%.

Most of the tested extracts presented low or no effect on Pdr5p ATPase activity. Some of them, however, were able to produce a good inhibition in the fixed concentration. From these, *Bathysa australis*, *Mabea fistulifera* and *Virola oleifera* were available in a suitable amount, and for this reason, were the ones

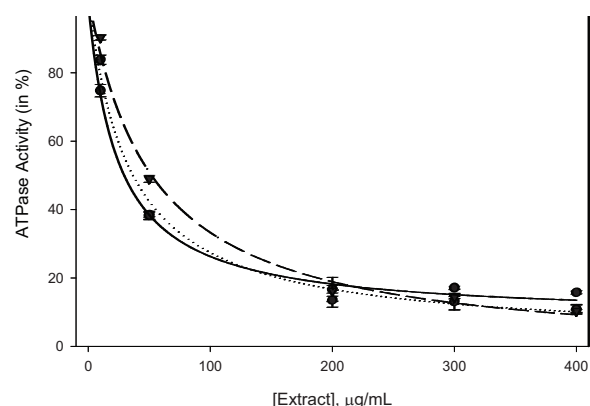
selected for a deeper investigation. Dose-response curves were obtained for the crude ethanol extracts with concentrations ranging from 0 to 400  $\mu$ g/mL (Figure 1). The three extracts presented similar curve profiles. The lower IC<sub>50</sub> value was obtained for *Virola oleifera*, 22.8  $\mu$ g/mL, followed by *Bathysa australis*, 35.3  $\mu$ g/mL, and *Mabea fistulifera*, 42.5  $\mu$ g/mL. Based on these results, these crude ethanol extracts were subsequently fractionated by liquid-liquid partition. The resulting hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions, after solvent evaporation and solubilization in 20% dimethylsulfoxide, were tested again on Pdr5p ATPase activity (200  $\mu$ g/mL) (Figure 2).

In Figure 2A, it is shown that the ethyl acetate and the butanol fractions of *Virola oleifera* were able to produce a higher effect than that obtained with the original crude ethanol extract, while the dichloromethane and hexane fractions were less or as efficient as the crude ethanol extract of this plant.

*Virola oleifera*, a plant from the South Eastern region of Brazil, has been used in traditional medicine for the treatment of diseases of the respiratory tract, rheumatism and asthma, as well as gastric or duodenal ulcers (Fernandes et al., 1994). The genus *Virola* is known to be an abundant source of lignans and neolignans (Fernandes et al., 1997). One lignan, oleiferin-C and two flavonoid glycosides, astilbin and quercitrin, previously isolated from the leaves of *Virola oleifera*, exhibited a good analgesic activity (Kuroshima et al., 2001).

Four lignans (lignan 7-ol, galbacin, eupamatenoid-8 and aristolignin), were also isolated from the leaves of this species, as components of the chlorophyll-free dichloromethane fraction of the ethanol extract (Fernandes et al., 1993). It is interesting to note that the hexane and dichloromethane fractions, where the lignans are expected to be found, are the less active ones, for this plant species. On the other hand, flavonoid glycosides are expected to be found in the ethyl acetate/butanol fractions. In fact, the HPLC profile of the ethyl acetate fraction showed peaks corresponding to flavonol compounds (Table 2), at Rt 2.88 min. ( $\lambda_{\max}$  255.3 and 353.9 nm) and 3.25 min. ( $\lambda_{\max}$  256.2 and 349.7 nm (Mabry et al., 1970). We also observed a peak at Rt 4.25 min. (Table 2), which showed a benzenoid band ( $\lambda_{\max}$  272.8 nm) that could be due to a lignan derivative.

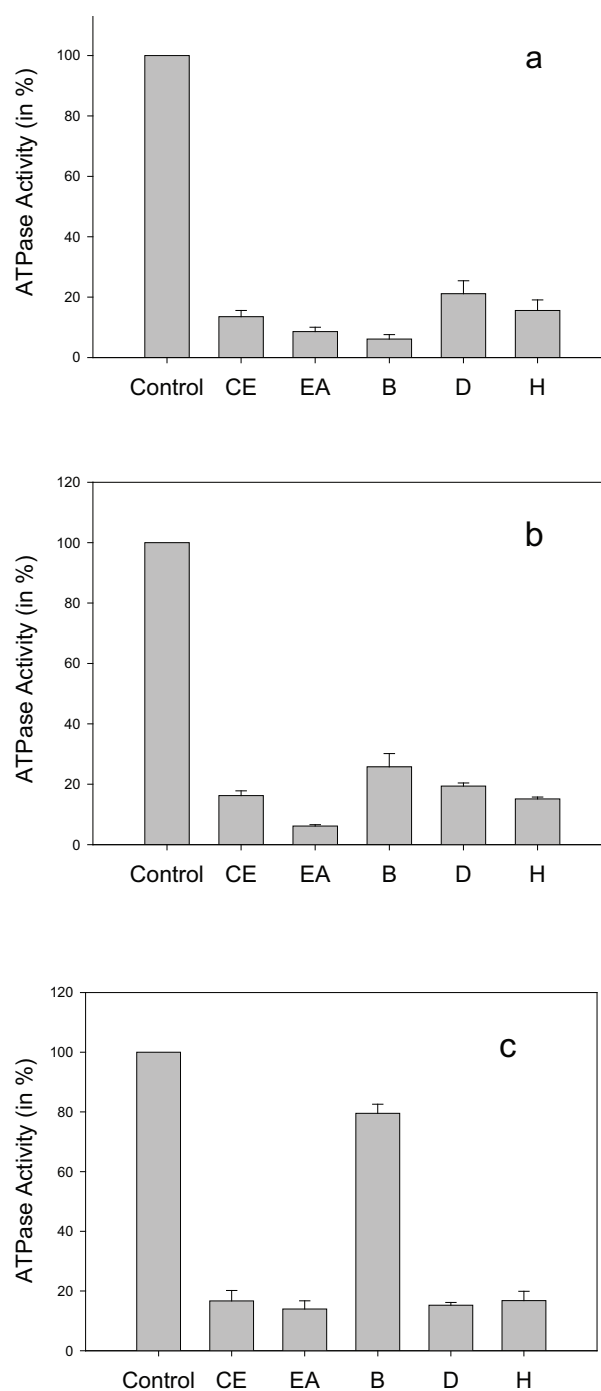
Figure 2b shows that the ethyl acetate extract from *Mabea fistulifera* was the most efficient one, while the butanol, dichloromethane and hexane fractions were less efficient or as efficient as the original *M. fistulifera* crude ethanol extract. Previous work showed that the ethanol extract from the fruits of this plant presented significant lethality to brine shrimp larvae. The isolation of a bioactive naringenin coumaroyl glycoside and two other inactive naringenin derivatives, along with gallic acid ethyl ester was reported (Garcez et al., 1997). The HPLC chromatogram of the ethyl acetate fraction of the ethanol extract of *M. fistulifera* showed peaks at



**Figure 1.** Inhibition of Pdr5p ATP hydrolytic activity. The Pdr5p-enriched plasma membranes ATPase activity was evaluated in the presence of ethanol extracts diluted in DMSO of either *Bathysa australis* (●), *Virola oleifera* (○) or *Mabea fistulifera* (▼) and the reaction was started with the addition of plasma membranes and stopped after 60 minutes of hydrolysis.

Rt 2.45 and 3.31 min. (Table 2) which UV spectra are compatible with a benzenoid compound (Silverstein et al., 1991). In fact, gallic acid was isolated from the ethyl acetate fraction by our group, along with minor gallogannins (structure under elucidation).

Concerning *Bathysa australis* extracts (Figure 2c), we observed that the ethyl acetate, dichloromethane and hexane fractions presented a very similar inhibition effect on Pdr5p ATPase activity in comparison to its crude ethanol extract, while the butanol fraction produced a very small inhibition. In Brazil there are seven species from the genus *Bathysa*, known as false Quina, all of them occurring in the South and Southeast regions of the Atlantic Rain Forest. The use in Brazilian Folk Medicine of *Bathysa australis* mucilage for wound healing is reported (Filho, 1999). As far as we know, there is no report on the phytochemistry of *B. australis*. Also, the chemistry of the genus is not well known, with only one paper reporting the isolation of paeonol, an acetophenone derivative, from roots of *B. meridionalis* (Weeks et al., 1977). The HPLC chromatogram of the ethyl acetate fraction from this plant (Table 2) showed a peak at Rt 15.17 min., which UV bands are in the range of an indole alkaloid (three main  $\lambda_{max}$  bands: 220-245 nm, 270-310 nm and 290-320 nm) (Thylor and Farnsworth, 1973). Other peaks, at Rt 16.24 and 17.47 min. are characteristic of flavonoid derivatives. The UV spectra for those peaks present absorption maxima at  $\lambda_{max}$  267.2 and 344.3 nm, and  $\lambda_{max}$  256.2 and 341.7 nm, respectively, compatible with luteolin derivatives  $\lambda_{max}$  242sh, 253, 267, 291sh and 349 nm (Mabry et al., 1970). It is interesting to note that, among five Rubiaceae species tested - *Bathysa australis*, *Guetarda virbunoides*, *Psychotria vellosiana*, *Simira glaziovii* and *S. sampaioana*, and two Apocynaceae species, *Malouetia arborea* and *Peschiera affinis*, *Bathysa* stands out as the most active. These two botanical families are known



**Figure 2.** Effect produced by 200 µg/mL of the partitions obtained from the ethanol extracts (CE) of either *Virola oleifera* (a), *Mabea fistulifera* (b) or *Bathysa australis* (c). The experiment was conducted as mentioned before for the ethanol extracts. EA, ethyl acetate partition, B, butanol partition, D, dichloromethane partition and H, hexane partition. The control bar refers to ATPase activity in the absence of any inhibitor and corresponds to 100%.

to be a rich source of indole alkaloids (Dewick, 1997). These differences in activity could be due to different alkaloid structures and/or the presence of synergistic compounds such as flavonoids, previously described as possessing Pdr5p inhibitory activity (Conseil et al.,

**Table 1.** Effect of crude ethanol extracts from plants of the Brazilian Atlantic Forest on Pdr5p ATPase activity.

Plant	Family	ATPase Activity (%) <sup>*</sup>	Voucher Specimen Number
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott ex Spreng.	Anacardiaceae	36.00 ± 5.71	RFA-31773
<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber	Moraceae	37.76 ± 1.97	RFA-31792
<i>Sparattosperma leucanthum</i> (Vell.) K. Schum.	Bignoniaceae	37.82 ± 4.75	RFA-31775
<i>Bathysa australis</i> (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f.	Rubiaceae	43.14 ± 1.88	RFA-31798
<i>Pera heteranthera</i> (Schrunk) I. M. Johnst.	Euphorbiaceae	44.48 ± 2.57	RFA-31777
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Allemão ex Benth.	Fabaceae	45.74 ± 0.60	RFA-31782
<i>Melanoxylon brauna</i> Schott	Fabaceae	45.77 ± 5.33	RFA-31783
<i>Mabea fistulifera</i> Mart.	Euphorbiaceae	48.04 ± 1.17	RFA-31778
<i>Virola oleifera</i> (Schott) A. C. Sm.	Myristicaceae	51.20 ± 1.27	RFA-31794
<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze	Lecythidaceae	54.79 ± 2.69	RFA-31787
<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Flacourtiaceae	55.44 ± 2.39	RFA-31780
<i>Ficus gomelleria</i> Kunth & Bouché	Moraceae	56.77 ± 5.00	RFA-31793
<i>Carpotroche brasiliensis</i> (Raddi) A. Gray	Flacourtiaceae	59.08 ± 8.13	RFA-31779
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J. F. Macbr.	Fabaceae	64.08 ± 4.77	RFA-31786
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Fabaceae	64.42 ± 4.25	RFA-31785
<i>Simira glaziovii</i> (K. Schum.) Steyerem.	Rubiaceae	64.51 ± 3.24	RFA-31797
<i>Pouteria filipes</i> Eyma	Sapotaceae	65.67 ± 2.21	RFA-31801
<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J. F. Macbr	Fabaceae	66.49 ± 5.60	RFA-31781
<i>Sorocea bonplandii</i> (Baill.) W. C. Burger	Moraceae	67.31 ± 4.22	RFA-32512
<i>Malouetia arborea</i> (Vell.) Miers	Apocynaceae	68.33 ± 5.52	RFA-31774
<i>Bombacopsis stenopetala</i> (Casar.) A. Robyns	Bombacaceae	70.31 ± 2.27	RFA-31776
<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	Nyctaginaceae	72.67 ± 2.79	RFA-31795
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	Rutaceae	73.93 ± 0.78	RFA-31800
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Meliaceae	79.98 ± 2.61	RFA-31788
<i>Simira sampaioana</i> (Standl.) Steyerem.	Rubiaceae	85.81 ± 5.25	RFA-31796
<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	Rubiaceae	93.35 ± 4.70	RFA-31799
<i>Plathymenia foliolosa</i> Benth.	Fabaceae	96.36 ± 8.26	RFA-31784

\*ATPase activity was assayed with plasma membranes with a fixed concentration of each extract (200 µg/mL). Data are expressed as mean ± SD of three (3) independent experiments. The control activity corresponds to 0.17 ± 0.02 µMol Pi. mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> and was considered as 100%.

**Table 2.** Rt of peaks in the chromatograms of the ethyl acetate partitions of *V. oleifera*, *M. fistulifera* and *B. australis* with UV spectra (DAD detector) that can be associated to known chromophores of natural compounds reported in literature.

Plant species	R <sub>t</sub> (min) <sup>#</sup>	U.V. λ <sub>max</sub> (nm)	Reference <sup>*</sup>
<i>Virola oleifera</i>	2.88	255.3 and 353.9	Mabry et al., 1970
Ethyl acetate partition	3.25	256.2 and 349.7	
	4.25	272.8	
<i>Mabea fistulifera</i>	2.45	278.8	Silverstein et al., 1971
Ethyl acetate partition	3.31	270.5	
<i>Bathysa australis</i>	15.17	220-245, 270-310 and 290-320	Thylor and Farnsworth, 1973
Ethyl acetate partition	16.24	267.2 and 344.3	Mabry et al., 1970
	17.47	256.2 and 341.7	

# R<sub>t</sub> (min) of peaks which UV spectra (DAD detector) can be associated to known chromophores of natural compounds reported in literature. \* Comparison with U.V. data from literature.

2000).

It can be seen, for *Mabea fistulifera* and *Virola oleifera* extracts that in both cases, at least one fraction was able to produce a larger effect than the observed for the original crude ethanol extract. This is not true for *Bathysa australis*, since the three fractions that presented a relevant effect were only as efficient as the crude ethanol extract. This can be due to many factors

such as concentration of active constituents in one specific fraction (*Mabea* and *Virola*) or the separation of synergistic compounds into different fractions (*Bathysa*). As a matter of fact, all active fractions indicated the presence of flavonoids, known for their ability to inhibit Pdr5p activity. Previous studies indicate that flavonoids constitute a new class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP-binding



site and steroid-interacting region within a cytosolic domain of P-glycoprotein (Conseil et al., 1998). The authors comment that flavones/flavonols (like quercetin or apigenin) bind more strongly than flavanones (naringenin), isoflavones (genistein) or glycosylated derivatives (rutin). Also, Di Pietro and co-workers (Di Pietro et al., 2002) state that prenylated flavonoids bind with high affinity, strongly inhibiting drug interaction and nucleotide hydrolysis, that corroborate with idea that these class of compounds could be a tool to study and understand the mechanism of multidrug resistance.

## DISCUSSION

Resistance to chemotherapy is a common clinical problem in patients with infectious diseases as well as in patients with cancer. This includes a several opportunistic infections caused by different microorganisms in patients with acquired immunodeficiency syndrome, which is very disturbing since we have an enormous increase in bacteria and opportunistic fungi infections that usually are very resistant to normal treatment. Therefore, it is necessary to find some strategies to reverse this drug resistance and the study of plant extracts could be one of them. In this work, we investigated three different plants (selected from 27 previously tested - Table 1): *Bathysa australis*, *Mabea fistulifera* and *Virola oleifera*, in order to verify the effect of extracts on the enzymatic activity of Pdr5p from yeast plasma membrane, the enzyme responsible for the multidrug resistance phenotype. The crude ethanol extracts from these plants were able to inhibit the enzymatic activity with high affinity, which can be observed by the  $IC_{50}$  values ranging from 22.8 to 42.5  $\mu\text{g/mL}$ . When partitions obtained from the ethanol extracts after extraction with different solvents were tested, we observed that in both plants the fraction ethyl acetate were more effective showing a step of separation and concentration of some substance(s) that may be a possible inhibitors of enzymatic activity. Analysis of these fractions using HPLC demonstrated the presence of flavonoids that have been considered good inhibitors and/or modulators of multidrug resistance activity (Boumendjel et al., 2002). Further investigations of the phytochemistry of the active plants are being conducted and we are working on these partitions with the aim of isolating the active compounds to study their effects on the purified enzyme and/or mammal cells that overexpress P-glycoprotein. We fully expect that these results will aid understanding not only Pdr5p but also many other ABC transporters and help in the discovery of new medicine for the treatment of the human diseases in which these transporters play a role.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Angela Hampshire for a

critical review of this manuscript and Joseph Nader (Physiological Biochemistry Unit (FYSA) - Université Louvain-la-Neuve/Belgium) for yeast strains. The present work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB).

## REFERENCES

- Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev Bras Farmacogn 16(Supl.)*: 696-720.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn 16*: 258-285.
- Boumendjel A, Di Pietro A, Dumontet C, Barron D 2002. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to p-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med Res Rev 22*: 512-529.
- Conseil G, Cortay HB, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro, A 1998. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA 95*: 9831-9836.
- Conseil G, Decottignies A, Jault JM, Comte G, Barron D, Goffeau A, Di Pietro A 2000. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry 39*: 6910-6917.
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod 60*: 52-60.
- Decottignies A, Kolaczowski M, Balzi E, Goffeau A 1994. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J Biol Chem 269*: 12797-12803.
- Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh D, Goffeau A 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem 273*: 12612-12622.
- Decottignies A, Rogers B, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Conseil G, Niimi K, Di Pietro A, Monk BC, Goffeau A 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Paulsen I.T., Lewis K. (Eds) *Microbial multidrug efflux*. Wymondham, Horizon Scientific Press, p.157-176.
- Dewick PM 1997. *Medicinal Natural Products*, New York, John Wiley & Sons.
- Di Pietro A, Conseil G, Pérez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfels E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte AM, Dumontet C, McIntosh DB, Goffeau A, Castanys S, Gamarro F, Barron D

2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* 59: 307-322.
- Fernandes AMAP, Barata LES, Ferri PH 1993. Lignans and a neolignan from *Virola oleifera* leaves. *Phytochemistry* 32: 1567-1572.
- Fernandes AMAP, Barata LES, Ferri PH 1994. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *Virola oleifera*. *Phytochemistry* 36: 533-534.
- Fernandes AMAP, Prado AL, Barata LES, Paulo MQ, Azevedo NR, Ferri PH 1997. A Method to separate lignoids from *Virola* Leaves. *Phytochem Analysis* 8: 18-21.
- Ferreira-Pereira A, Marco S, Decottignies A, Nader J, Goffeau A, Rigaud JL 2003. Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J Biol Chem* 278: 11995-11999.
- Filho PG 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* Presl (Rubiaceae, Rondeletiae) no Brasil. *Rodriguésia* 50: 49-75.
- Garcez WS, Garcez FR, Pellicciari I, Hara SM, Ferreira FC, Nakasse LY, Siqueira JM 1997. A bioactive narigenin coumaroyl glucoside from *Mabea fistulifera* subsp. *Robusta*. *Planta Med* 63: 386-386.
- Goffeau A, Dufour JP 1988. Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 157: 528-533.
- Gottesman MM, Pastan I 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427.
- Higgins CF 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- Kuroshima KN, de Campos F, de Souza MM, Yunes RA, Delle Monache F, Filho VC 2001. Phytochemical and pharmacological investigations of *Virola oleifera* leaves. *Z Naturforsch C* 56: 703-706.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8: 76-81.
- Mabry TM, Markham KR, Thomas MB 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York, Springer-Verlag.
- Rocha FD, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev Bras Farmacogn* 17: 631-639.
- Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I 1986. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4538-4542.
- Saúde-Guimarães DA, Faria AR 2007. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Farmacogn* 17: 455-465.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J 1999. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2753-2765.
- Shu YZ 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 61: 1053-1071.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC 1991. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. New York : John Wiley & Sons.
- Thylor W, Farnsworth NR 1973. *The Vinca Alkaloids: Botany, Chemistry and Pharmacology*. New York, Marcel Dekker.
- Weeks RA, Dobberstein RH, Farnsworth NR 1977. Isolation of paenol from *Bathysa meridionalis*. *J Nat Prod* 40: 515-523.
- Wolfger H, Mammun YM, Kuchler K 2001. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* 152: 375-389.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)