



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

*Estudo fitoquímico e avaliação do
potencial de inibição da enzima
acetilcolinesterase de Simarouba
versicolor (SIMAROUBACEAE)*

José Ivan Ximenes de Carvalho

Fortaleza – Ceará
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Estudo fitoquímico e avaliação do potencial de
inibição da enzima acetilcolinesterase de
Simarouba versicolor
(SIMAROUBACEAE)**



Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Química Orgânica,
como requisito para obtenção do título de Mestre.

José Ivan Ximenes de Carvalho

**Fortaleza – Ceará
2008**

C324e Carvalho, José Ivan Ximenes de
Estudo fitoquímico e avaliação do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) / José Ivan Ximenes de Carvalho, 2008.
142f; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Co-orientadora: Profa. Dra. Antonia Lucia de Souza
Área de concentração: Química Orgânica
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

1. Mal de Alzheimer 2. Quassinóide 3. Cantinona 4. Citotoxicidade
I. Trevisan, Maria Teresa Salles (orient.) II. Souza, Antonia Lucia de (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica IV. Título

CDD 547

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Dra. **Maria Teresa Salles Trevisan**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará e co-orientação da Professora Dra. **Antônia Lúcia de Souza** da Universidade Federal da Paraíba.

“Eu garanto a vocês: se vocês tiverem fé do tamanho de uma semente de mostarda, podem dizer a esta montanha ‘ vá daqui para lá’ e ela irá e nada será impossível para vocês.”

(Jesus Cristo)

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus Cristo que é o único dono do leme da minha vida, que todos os dias me envolve de luz, me perfuma com o ar da vida, sendo a alegria do meu viver, me guiando pelos mares agitados da minha vida, que somente o Senhor, meu salvador, sabe o quanto são tortuosos e revoltos estes mares.

À minha amada mãe, Zeni, que sempre acreditou em meus presságios e esses nunca se realizam, contudo você nunca desistiu de confiar nos meus verdadeiros sonhos. Amo muito você mãe.

Ao meu pai, Sebastião, que sempre batalhou e batalha para dar aos filhos o melhor, mal sabe ele que o suficiente já é o ideal. Obrigado pai.

Aos meus irmãos: Neide, Piedade, Tatiana, João Paulo e Paulo Henrique pelo carinho e pelos incentivos dados de forma direta ou indiretamente a longo da minha vida.

Aos meus sobrinhos: Felipe, Marlon e Veyda por me tirarem, muitas vezes, a concentração e assim deixando minha vida menos estressante e mais alegre.

Ao meu amigo Pedro Guilherme pela força, incentivo, pelo apoio proporcionado em todos os momentos. Pela ajuda na conclusão desse trabalho. Eta! Gui, Obrigado por tudo.

À minha amiga Isabel, um ser humano iluminado, que me ajuda em todos os segmentos da minha vida e que sabe dos meus desejos mais profundos.

À minha querida orientadora, uma mulher de gênio forte, contudo de coração imenso, uma mulher brilhante em tudo que se propõe a fazer. Obrigado, Prof^a. Dr^a. Teresa Trevisan pela sua amizade, confiança, compreensão e por contribuir para a minha formação profissional.

À Prof^a. Dr^a. Antonia Lucia de Souza pela sua amizade, por indicar a *Simarouba versicolor* e pela dedicação na co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luquésio P. de Melo Jorge pela disponibilidade da coleta dos exemplares da espécie *Simarouba versicolor*.

Ao Prof. Dr. Raimundo Braz Filho por sua amizade e pela grande ajuda na elucidação estrutural dos compostos isolados.

À Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa pela disponibilidade e acessibilidade, que me foi dedicada em muitos momentos de meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Letícia e sua equipe pelas análises de citotoxicidade dos extratos do material vegetal estudado.

À Prof^a. Joana Analia Ribeiro Albuquerque da Casa de Cultura Britânica da UFC pela revisão do abstract.

Aos professores que compõem o programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, pelo conhecimento transmitido e pelo apoio proporcionando a realização com sucesso desse trabalho.

A todos que fazem o LPN, alunos, professores e funcionários por todo esse tempo trabalhando juntos.

Aos funcionários da Pós-Graduação pelo carinho e contribuição para o bom andamento das pesquisas.

Aos poucos e bons amigos que fiz na universidade e que quero carregar ao longo da minha vida: Daniele, Luciana, Fátima, Edangelo, Renata, Alexandre, Aliny, Guilherme, Rafael e Carol, que me ajudaram neste trabalho de uma forma direta ou indiretamente. Agradeço sempre a Deus por ter dado a oportunidade de conhecê-los e o privilégio de ter a amizade de vocês.

A UFC por minha formação.

As instituições CNPq CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro ao curso de Pós-Graduação. Em particular a CAPES pela bolsa de pesquisa concedida.

À todas as pessoas, e foram muitas, que me fizeram escrever páginas hipotéticas em cima das páginas autênticas da minha vida.

A não posso deixar de agradecer a todos os homens e mulheres que traíram os livros de suas épocas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	ix
LISTA DE QUADROS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO 2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA SIMAROUBACEAE E A ESPÉCIE <i>SIMAROUBA VERSICOLOR</i>	5
2.1. Considerações gerais sobre a família Simaroubaceae	5
2.2. Considerações gerais sobre a espécie <i>Simarouba versicolor</i>	6
CAPÍTULO 3 - LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	9
3.1. Quassinóides.....	11
3.2. Alcalóides	17
3.3. Triterpenóides	21
3.4. Esteróides	28
3.5. Cumarinas, Flavonóides e Quinonas	31
CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL	37
4.1. Determinação Estrutural de SVEFC01	37
4.2. Determinação Estrutural de SVEFC81	43
4.3. Determinação Estrutural de SVEFC/PGD	56
4.4. Determinação Estrutural de SVEFA – AZ	74
CAPÍTULO 5 - MATERIAIS E MÉTODOS	81
5.1. Métodos de análises	81
5.2. Atividade biológica <i>in vitro</i>	83
CAPÍTULO 6 - PARTE EXPERIMENTAL	87
6.1. Coleta do material	87
6.2. Triagem do material a partir do ensaio enzimático	88
6.3. Preparação do extrato hexânico e etanólico da casca do caule de <i>Simarouba versicolor</i>	89
6.4. Isolamento dos constituintes da casca do caule de <i>Simarouba versicolor</i>	91

CAPÍTULO 7 - ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	109
CAPÍTULO 8 - CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	113
CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES	116
CAPÍTULO 10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.

β	Beta
δ	Deslocamento químico
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
BB	Broad-band
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	Piridina deuterada
COSY	Correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPM	Desvio padrão da média
DTNB	Ácido 5, 5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico
EM	Espectrometria de massa
FDA	Food and Drug Administration
HCT-8	cólon – humano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IV	Infravermelho

J	Constante de acoplamento
MDA-MB435	mama – humano
MHz	Megahertz
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p.f.	Ponto de fusão
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SF-295	glioblastoma – humano
Sv	<i>Simarouba versicolor</i>
SVE	Extrato etanólico da <i>Simarouba versicolor</i>
SVEA	Fração acetato de etila do SVE
SVEC	Fração clorofórmica do SVE
SVEFC01	Mistura β -sitosterol e estigmasterol
SVEFC81	4,5-dimetóxicantin- 6-ona
SVEFC/PGD	11-Acetilamarolida
SVEFA - AZ	β - sistosterol glicosilado
SVEH	Fração hexânica do SVE
SVEH-C	Fração Hexano-clorofórmio (1:1) do SVE
SVEM	Fração metanólica do SVE
SVH	Extrato hexânico da <i>Simarouba versicolor</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Fotografias (a) da árvore da espécie <i>Simarouba versicolor</i> , (b) das folhas e inflorescências da <i>Simarouba versicolor</i> , (c) dos frutos da <i>Simarouba versículo</i> e (d) das sementes da <i>Simarouba versicolor</i>	7
FIGURA 02 - Estrutura dos precursores dos quassinóides	11
FIGURA 03 - Esqueletos básicos dos quassinóides	11
FIGURA 04 - Estruturas de quassinóides isolados de espécies do gênero <i>Simarouba</i>	15
FIGURA 05 - Núcleo fundamental Cantin-6-ona	17
FIGURA 06 - Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Simarouba</i>	20
FIGURA 07 - Estruturas de Triterpenóides isolados de espécies do gênero <i>Simarouba</i>	24
FIGURA 08 - Estruturas de esteróides isolados de espécies do gênero <i>Simarouba</i>	30
FIGURA 09 - Cumarina <i>per se</i>	31
FIGURA 10 - Núcleo fundamental dos flavonóides	32
FIGURA 11 - Estruturas de cumarinas, flavonóides e quinona isolados de espécies do gênero <i>Simarouba</i>	35
FIGURA 12 - Espectro de RMN ¹ H de SVEFC01 em CDCl ₃ a 500 MHz	39
FIGURA 13 - Espectro de RMN ¹³ C-BB de SVEFC01 em CDCl ₃ a 125 MHz	40
FIGURA 14 - Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de SVEFC01 em CDCl ₃ a 125 MHz	41
FIGURA 15 - Espectro de absorção de infravermelho de SVEFC81	46
FIGURA 16 - Espectro de massa de SVEFC81	47
FIGURA 17 - Proposta das principais fragmentações para SVEFC81	47
FIGURA 18 - Espectro de RMN ¹ H de SVEFC81 em CDCl ₃ a 500 MHz	48
FIGURA 19 - Espectro de RMN ¹³ C-BB de SVEFC81 em CDCl ₃ a 125 MHz	49
FIGURA 20 - Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de SVEFC81 em CDCl ₃ a 125 MHz	50

FIGURA 21 - Espectro de RMN 2-D COSY de SVEFC81, em CDCl ₃ a 500 MHz	51
FIGURA 22 - Espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC81, em CDCl ₃ a 500 MHz	52
FIGURA 23 - Espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC81, em CDCl ₃ a 500 MHz	53
FIGURA 24 – Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC81, em CDCl ₃ a 500 MHz...	54
FIGURA 25 - Espectro de absorção de infravermelho de SVEFC/PGD	59
FIGURA 26 - Espectro de massa de SVEFC/PGD	60
FIGURA 27 - Proposta das principais fragmentações para SVEFC/PGD	60
FIGURA 28 - Espectro de RMN ¹ H de SVEFC/PGD em CDCl ₃ a 500 MHz	61
FIGURA 29 - Espectro de RMN ¹³ C-BB de SVEFC/PGD em CDCl ₃ a 125 MHz	62
FIGURA 30 - Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de SVEFC/PGD em CDCl ₃ a 125 MHz.....	63
FIGURA 31 - Espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz	64
FIGURA 32 - Expansão espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz	65
FIGURA 33 - Expansão espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz	66
FIGURA 34 - Espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz	67
FIGURA 35 - Expansão espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz ...	68
FIGURA 36 - Expansão espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz ...	69
FIGURA 37 - Expansão espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz ...	70
FIGURA 38 - Expansão espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl ₃ a 500 MHz ...	71
FIGURA 39 - Espectro de NOESY do SVEFC/PGD em CDCl ₃	72
FIGURA 40 - Espectro de RMN ¹ H de SVEFA-AZ em C ₅ D ₅ N a 500 MHz	76
FIGURA 41 - Espectro de RMN ¹³ C-BB de SVEFA-AZ em C ₅ D ₅ N a 125 MHz	77
FIGURA 42 - Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de SVEFA-AZ em C ₅ D ₅ N a 125 MHz.....	78
FIGURA 43 - Fotografia da exicata de <i>Simarouba versicolor</i> (n° 039.443)	87
FIGURA 44 - Placa do ensaio de inibição da AChE	110

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Quassinóides isolados de plantas do gênero <i>Simarouba</i> com suas atividades biológicas	13
TABELA 02 - Alcalóides isolados de plantas do gênero <i>Simarouba</i> com suas atividades biológicas	19
TABELA 03 - Triterpenóides isolados de plantas do gênero <i>Simarouba</i> com suas atividades biológicas	22
TABELA 04 - Esteróides isolados de plantas do gênero <i>Simarouba</i> com suas atividades biológicas	29
TABELA 05 - Cumarinas, flavonóides e quinonas isolados do gênero <i>Simarouba</i> com suas atividades biológicas	34
TABELA 06 - Dados RMN ¹³ C de SVEFC01, comparados com valores descritos na literatura para β-sitosterol e estigmasterol (GOAD,1991)	42
TABELA 07 - Dados dos espectros de RMN de SVEFC81, comparados com valores descritos na literatura para 4,5-dimetóxicantin- 6-ona (RODRIGUES, 1992)	55
TABELA 08 - Dados dos espectros de RMN de SVEFC/PGD, comparados com valores descritos na literatura do composto análogo, amarolida diacetato (Hirota et al., 1991)	73
TABELA 09 - Dados RMN ¹³ C de SVEFA - AZ, comparados com valores descritos na literatura para β-sitosterol glicosilado (VOUTQUENNE et al., 1999)	79
TABELA 10 - Extratos das partes da <i>Simarouba versicolor</i> (SV)	89
TABELA 11 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca do caule de <i>Simarouba versicolor</i> (SVE)	91
TABELA 12 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica (SVEC)	93

TABELA 13 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da SVEC	94
TABELA 14 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.....	95
TABELA 15 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.....	95
TABELA 16 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.2.....	96
TABELA 17 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.2....	97
TABELA 18 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.....	98
TABELA 19 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.....	98
TABELA 20 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.....	99
TABELA 21 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2....	100
TABELA 22 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3....	101
TABELA 23 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC.5.2.3..	101
TABELA 24 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3.2.	102
TABELA 25 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3.2	102
TABELA 26 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 8	103
TABELA 27 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 8	103
TABELA 28 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da SVEA	105
TABELA 29 - Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEA. 3.....	106
TABELA 30 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEA. 3.....	106
TABELA 31 - Resultado do teste inibição da AChE.....	111
TABELA 32 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL. Valores são médias ± DPM.....	114

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 - Obtenção dos extratos hexânico e etanólico da casca do caule de <i>Simarouba versicolor</i>	90
Fluxograma 02 - Fracionamento do SVE	92
Fluxograma 03 - Fracionamento da fração SVEC e o isolamento das três substâncias.....	104
Fluxograma 04 - Fracionamento da fração SVEA e o isolamento de uma substância.....	107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Drogas aprovadas pelo FDA para tratamento da Doença de Alzheimer (FINKELSTEIN et al., 2002)	3
QUADRO 02 - Equação da reação do Teste de Ellman	109

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo químico e farmacológico da casca do caule da espécie *Simarouba versicolor*, pertencente à família Simaroubaceae. A espécie ocorre preferencialmente em áreas abertas de solos bem drenados, como cerrados e caatinga. Conhecida popularmente como “pau paraíba”, “mata-cachorro” ou “simaruba do Brasil”, a casca do seu caule possui propriedades inseticida e antihelmíntica. Com o objetivo de estabelecer uma possível relação extrato atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Foi realizada uma triagem dos extratos das partes (folhas, talos, Galhos, Casca do caule e Cerne) da espécie *Simarouba versicolor*, através do ensaio de Ellman. O extrato etanólico da casca do caule apresentou elevada inibição da AChE, desse extrato, as frações clorofórmica e acetato de etila foram identificadas como sendo responsáveis pela inibição da enzima. A prospecção química da fração clorofórmica resultou no isolamento de três compostos, uma mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol, um quassinóide, a 11-acetilamarolida e o alcalóide 4,5-dimetóxicantin-6-ona. Na fração acetato de etila foi isolado o 3- β -O- β -D-glicopiranosil sistosterol. A determinação estrutural desses compostos foi realizada através de análise espectroscópica pelos métodos de IV, EM, RMN¹H e ¹³C-BB utilizando técnicas uni e bidimensionais e por comparação com dados descritos na literatura. Na análise qualitativa de inibição AChE os extratos e os constituintes isolados 11-acetilamarolida e 4,5-dimetóxicantin-6-ona apresentaram bons resultados. Os extratos também apresentaram atividade citotóxica em três linhagens tumorais testados.

Palavras chave: Mal de Alzheimer; Quassinóide; Cantinona; Citotoxicidade.

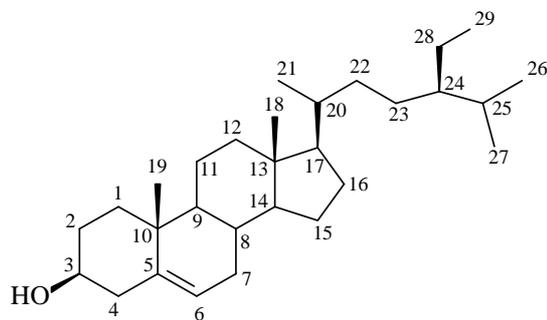
ABSTRACT

The present paper describes the chemical and pharmacological study of the stem bark of the species *Simarouba versicolor*, which belongs to the family Simaroubaceae. The species are found, mainly in open areas of well drained soils such as cerrado and caatinga. Known popularly as “*pau Paraiba*”, “*mata-cachorro*” or “*Brazilian simaruba*”, the bark of its trunk has insecticidal and antihelminthic properties. It aims to establish a possible extract inhibition of enzyme activity of acetyl cholinesterase (AChE) Relationship. It was accomplished a triage of the parts extracts (leaves, stems, branches, stem bark and heartwood) of the species *Simarouba Versicolor* by the Ellman test. The ethanol extract of stem bark showed high inhibition of AChE, from this extract, the chloroform fraction and ethyl acetate were identified as being responsible for the inhibition of the enzyme. The chemical prospect of the chloroform fraction resulted in the isolation of three compounds, a mixture of steroid β -sitosterol and stigma sterol, a quassinoid, the 11-acetylamarylde and the alkaloid 4.5-dimetoxicantin-6-one. In the ethyl acetate fraction it was isolated the 3- β -O- β -D-glucopyranosyl sitosterol. The Structure determination of these compounds was performed by spectroscopic analysis through the methods of IR, MS, RMN1H and 13C-BB using uni and bidimensional techniques and by comparison with the data reported in the literature. In qualitative analysis of the AChE inhibition the extracts and isolated constituents 11-acetylamarylde and 4.5-dimetoxicantin-6-one showed good results. The extracts also showed cytotoxic activity in three tumor lines tested.

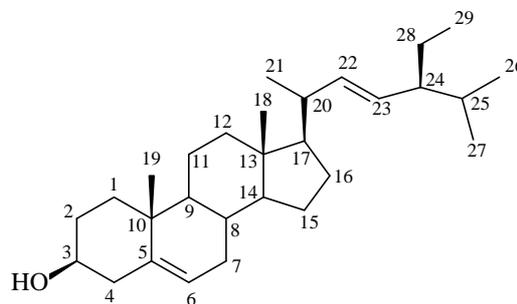
Key-words: Alzheimer disease; Quassinoid; Cantinone; Cytotoxicity.

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Esteróides



β -Sitosterol



Estigmasterol

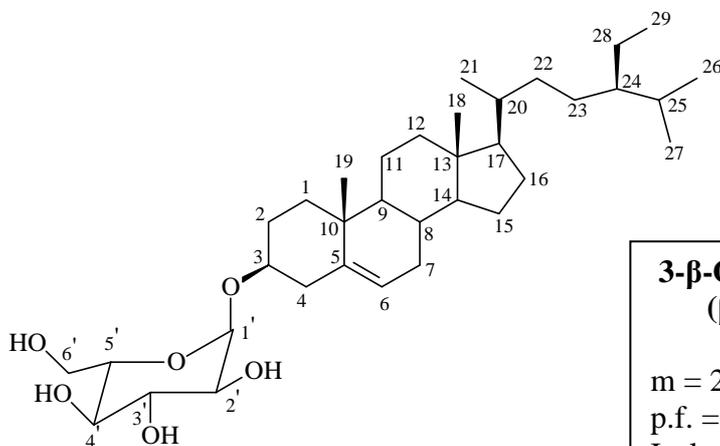
β -Sitosterol e Estigmasterol (em mistura)

m = 27,9mg

p.f. = 132,0 - 134,4 °C

Isolamento: pág. 99- 102

Identificação: pág. 38 - 44



3- β -O- β -D-glicopiranosil sistosterol (β - sistosterol glicosilado)

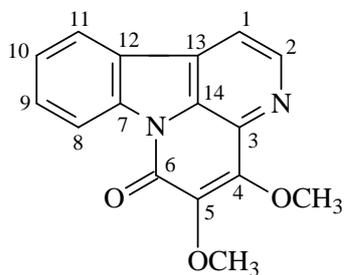
m = 25,1mg

p.f. = 286,0 - 288,2 C°.

Isolamento: pág. 111 - 113

Identificação: pág. 79 -84

Alcalóide



4,5-dimetóxicantin- 6-ona

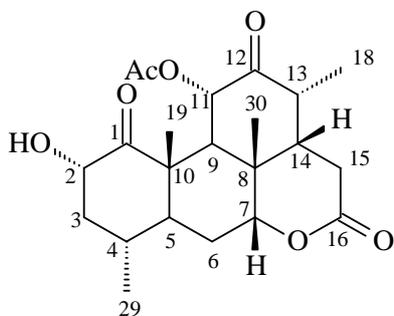
m = 9,0 mg

p.f. = 151,1 – 152,8 °C

Isolamento: pág. 102 - 107

Identificação: pág. 45 - 58

Quassinóide



11-Acetilamarolida

m = 5,1 mg

p.f. = 268,6 – 270,2°C

Isolamento: pág. 108 - 109

Identificação: pág. 59 - 78

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa, que atinge primeiramente a memória, a capacidade de raciocínio e a comunicação. Está associada à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, noradrenalina e serotonina (TREVISAN et al., 2003). O tratamento para o Mal de Alzheimer é sintomático e consiste justamente na tentativa de restauração da função colinérgica; a elevação do nível da acetilcolina pode se mostrar útil na melhora da deficiência da aprendizagem, um dos sinais da doença (PERRY, 1986).

Inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são amplamente usados no tratamento da doença, procedimento esse baseado na hipótese colinérgica. A galantamina (Quadro 01, pág. 3), um alcalóide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, apresenta uma longa ação seletiva, reversível e competitiva para inibir a acetilcolinesterase (FINKELSTEIN et al., 2002).

Finkelstein et al. (2002) lista as quatro drogas aprovadas pelo FDA dos Estados Unidos para o tratamento de Alzheimer. São elas: galantamina, já citada e a tacrina, rivastigmina e donezepil (Quadro 01, pág. 3). Todos estes compostos inibem a AChE, reversivelmente, isto é, a forma ativa da enzima é sempre regenerada.

Estes medicamentos estão disponíveis no mercado a um preço relativamente oneroso, o que torna a busca de novos inibidores de origem vegetal uma alternativa interessante e mais viável.

Atualmente, a literatura revela atividade relativamente intensa na busca de novos inibidores em extratos de plantas (RHEE et al., 2001), verificando-se expressivo interesse no isolamento e na identificação de novos inibidores da AChE.

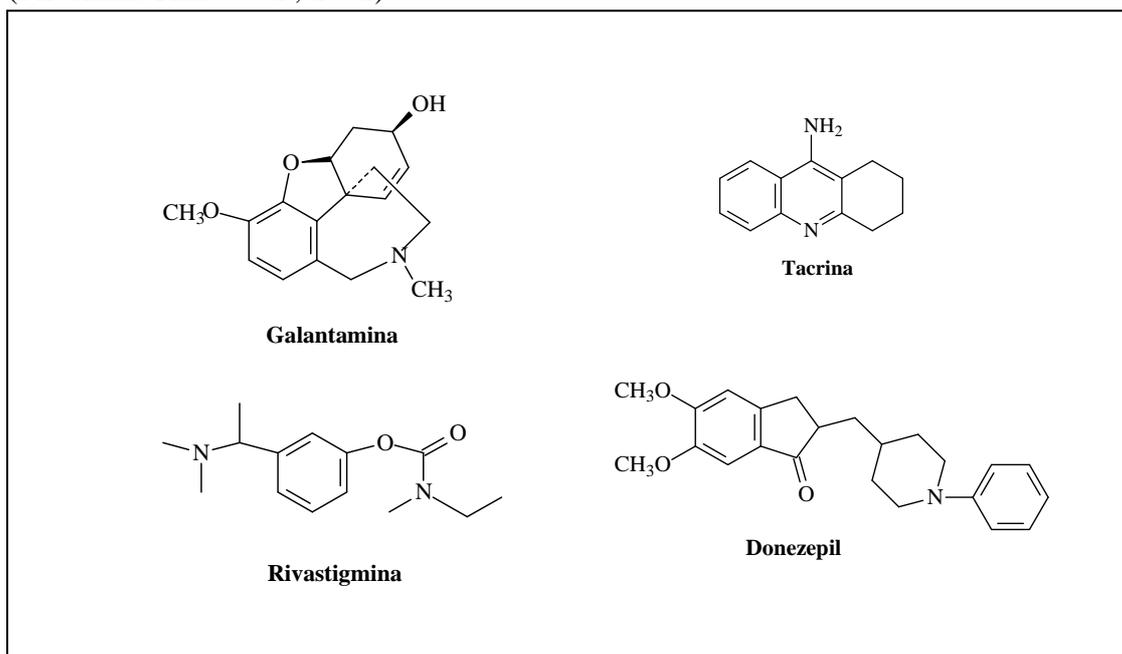
A utilização de AChE destaca-se como um dos bioensaios rápidos e sensíveis para a seleção de amostras com ação anticolinesterase. A medida da atividade da acetilcolinesterase pode ser realizada segundo o Método de Ellman (PERRY, 1986) modificado por Rhee et al. (2001).

Inibidores da acetilcolinesterase são também amplamente utilizados como inseticidas e como agentes de guerra. Compostos organofosforados e carbamatos são citados também como potentes inibidores da AChE (FINKELSTEIN et al., 2002 e WILLIAMS, 1995). Tais observações revelam a grande importância na realização de testes de atividade inseticida também destas substâncias.

Trabalhos anteriores relatam que plantas do gênero *Simarouba* possuem propriedades antimalárica (POLONSKY, 1973) e inseticida (LORENZI, 1998 e POLONSKY, 1985), essa última propriedade tem uma relação comum com a inibição da AChE.

A literatura cita que a espécie *Simarouba versicolor* apresenta em sua constituição substâncias da classe dos flavonóides, triterpenos e quassinóides. Sabe-se que alguns flavonóides e quassinóides poderiam impedir danos oxidativos através da retirada dos radicais livres, além de funcionarem como inibidores da enzima acetilcolinesterase. Esse fato associado à propriedade inseticida da espécie despertou o interesse em estudar *Simarouba versicolor*.

Quadro 01 - Drogas aprovadas pelo FDA para tratamento da Doença de Alzheimer (FINKELSTEIN et al., 2002).



Capítulo 2

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA SIMAROUBACEAE E A ESPÉCIE *SIMAROUBA VERSICOLOR*.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA SIMAROUACEAE E A ESPÉCIE *SIMAROUBA VERSICOLOR*.

2.1. Considerações gerais sobre a família Simaroubaceae.

A família Simaroubaceae é composta por aproximadamente 32 gêneros em 200 espécies entre arbustos e árvore distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta (ALMEIDA et al., 2007).

No Brasil, as plantas da família Simaroubaceae são representadas pelos gêneros *Quassia* e *Picrolemma* na região Amazônica; *Castela* e *Picrasma* no sul do país. *Simaba* e *Simarouba* estão presentes em quase todas as regiões brasileiras (HALL et al., 1983; ALMEIDA et al., 2007).

As espécies desta família possuem uma classe de substâncias (quassinóides) que as distingue de sabor bastante amargo, encontrada principalmente em seu córtex. Esta classe de substâncias tornou-se marcador taxonômico das Simaroubaceae (ALMEIDA et al., 2007). Provavelmente é a presença dos quassinóides que confere as atividades farmacológicas atribuídas a algumas plantas da família Simaroubaceae.

Nos últimos anos, aumentou-se o interesse na pesquisa das espécies de Simaroubaceae, devido suas substâncias terem várias propriedades farmacológicas como antitumoral (FUKAMIYA et al., 2005), antileucêmica (KUPCHAM et al., 1975; JIANG e SHING, 2001), anti-HIV (OKANO et al., 1996) e antimalárica (MUHAMMAD et al., 2004).

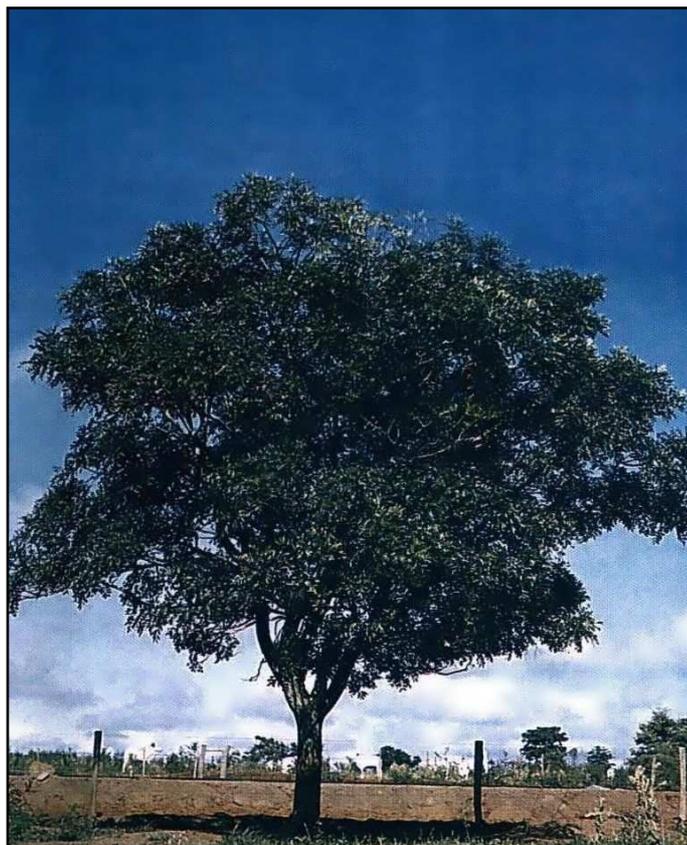
Além destas atividades biológicas mencionadas acima, as Simaroubaceae, principalmente o gênero *Simarouba*, do qual a espécie *Simarouba Versicolor* pertence, possuem uma propriedade que está intrinsecamente relacionada ao mal de Alzheimer, sua atividade inseticida (LORENZI, 1998 e POLONSKY, 1985), pois se sabe que substâncias inibidoras da enzima acetilcolinesterase (AChE) são potentes agentes inseticidas. Esse fato motivou a escolha da espécie *Simarouba versicolor* para estudo.

2.2. Considerações gerais sobre a espécie *Simarouba versicolor*.

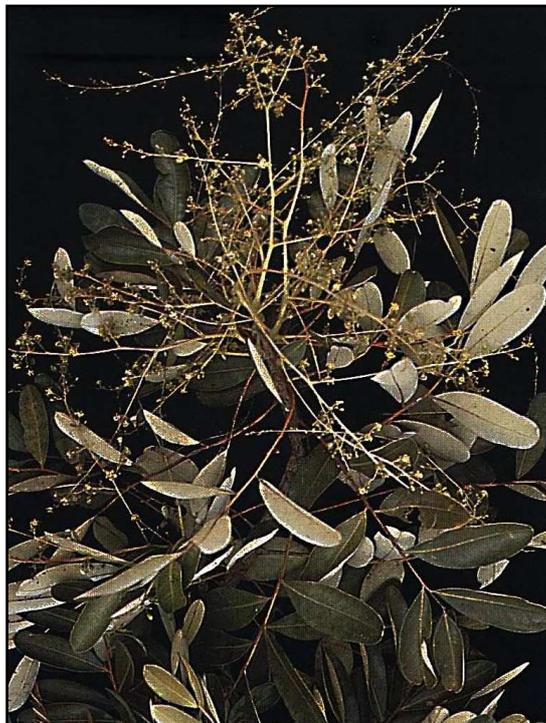
Planta semidecídua, heliófita (espécie vegetal intolerante ao sombreamento que necessita de muita luz para o seu estabelecimento e desenvolvimento), seletiva xerófita (organismo adaptado à vida num meio seco), pioneira, característica dos cerrados, cerradões e na caatinga, ocorrendo preferencialmente em áreas abertas e capões de solos bem drenados. No Brasil são encontradas desde o Nordeste até o estado de São Paulo e em alguns pontos dos estados do Pará e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 1998).

Segundo Lorenzi, 1998, *Simarouba versicolor* pode atingir 11 metros, dotada de copa arredondada, tronco curto e cilíndrico, com casca grossa, fibrosa e fissurada longitudinalmente, de 30-60 cm de diâmetro. Possui folhas alternas, compostas pinadas, com raque de 8-16 cm de comprimento, sobre pecíolo de 4-6 cm. Folíolos alternos, discolores, em número de 5-7, curto-peciolulados, com a nervura central bem visível em ambas as faces, de 3-9 cm de comprimento por 1,5-3,0 cm de largura, com a fase superior glabra. Inflorescências em panículas terminais compostas, de 25-35 cm de comprimento. Fruto drupa ovalada, de polpa carnosa, com uma semente (Fig. 01, pág. 07).

A madeira desta Simaroubaceae é considerada leve com densidade de $0,48\text{g/cm}^3$, porosa, de baixa resistência mecânica, sujeita ao apodrecimento quando exposta, porém resistente ao ataque de cupins de madeira seca. A casca possui propriedades inseticida e antihelmíntica (LORENZI, 1998).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 01 – Fotografias (a) da árvore da espécie *Simarouba versicolor*, (b) das folhas e inflorescências da *Simarouba versicolor*, (c) dos frutos da *Simarouba versicolor* e (d) das sementes da *Simarouba versicolor*. Fonte: LORENZI, 1998.

Capítulo 3

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O GÊNERO *SIMAROUBA*

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O GÊNERO *SIMAROUBA*

Segundo Almeida et al., 2007, Simaroubacea é uma família de plantas constituída por aproximadamente 200 espécies de plantas, agrupadas em 32 gêneros das quais existem apenas 6 gêneros no Brasil.

O gênero botânico *Simarouba* está presente em quase todas as regiões brasileiras, sendo composto por 10 espécies de plantas, a saber:

Simarouba amara;

Simarouba berteroana;

Simarouba glauca;

Simarouba laevis;

Simarouba monophylla;

Simarouba obovata;

Simarouba officinalis;

Simarouba opaca;

Simarouba tulae;

Simarouba versicolor.

Das 10 espécies do gênero *Simarouba*, verificou-se através deste levantamento que somente 30%, ou seja, 3 espécies, apresentam estudos correlacionados com isolamento ou caracterização de substâncias naturais. Apresenta o maior número de publicações a espécie *Simarouba amara* seguida pela espécie *Simarouba glauca* e *Simarouba versicolor*, esta com o menor número de artigos.

Devido ao pequeno número de estudos relacionados ao gênero *Simarouba* e ao fato de as espécies já pesquisadas apresentarem uma vasta gama de substâncias bioativas, surgiu o interesse no levantamento das substâncias isoladas das 3 espécies, tendo como fonte de consulta principalmente os “sites” científicos de buscas, *web of Science*, *Science@Direct*, *Scielo* e outros. Foram observados registros de publicações nos anos de 1954 a 2006.

O resultado deste levantamento encontra-se dividido por classe de substâncias, suas atividades biológicas e respectivas estruturas, com destaque aos Quassinóides e Alcalóides do tipo Cantinona, duas classes de substâncias marcadoras quimiotoxonômicas que são em grande parte as principais responsáveis por atividades biológicas presentes na família Simaroubaceae.

Espero que este levantamento contribua não só para a ampliação do conhecimento do gênero *Simarouba* e das substâncias isoladas das três espécies estudadas, mas também para os futuros estudos deste gênero tão rico em propriedades biológicas, contudo tão pouco explorado.

3.1. Quassinóides

Quassinóides são substâncias biossintetizadas apenas por plantas da família Simaroubaceae, de forma que são os principais marcadores taxonômicos das Simaroubaceae. São considerados terpenos degradados com alto padrão de oxigenação e têm como precursores os triterpenos tirucalol e eufol, figura 02, (POLONSKY, 1985).

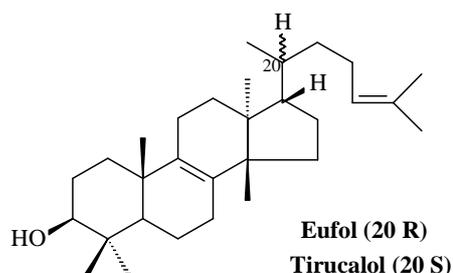


Figura 02 – Estrutura dos precursores dos quassinóides

Os quassinóides podem ser classificados em diferentes grupos de acordo com seus esqueletos básicos, sendo cinco esqueletos observados: C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂ e C₂₅. O C₂₅ apresenta duas variações (Fig. 03). A grande maioria dos Quassinóides isolados possui esqueleto tipo C₂₀. (ALMEIDA et al., 2007).

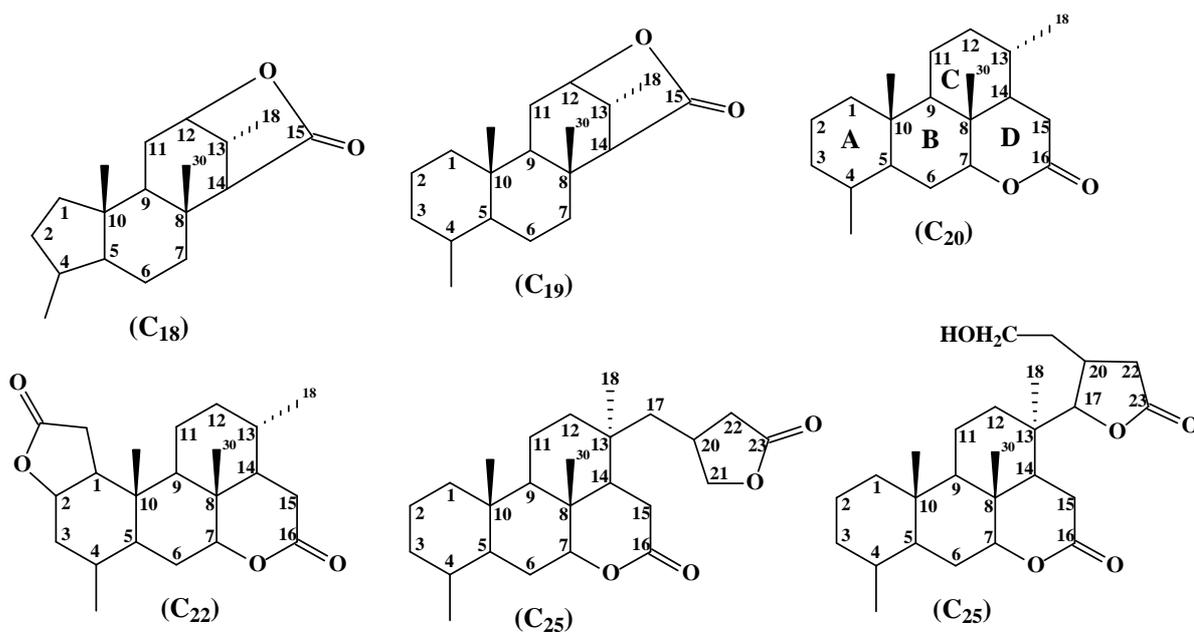


Figura 03 – Esqueletos básicos dos Quassinóides.

Os quassinóides contêm nos seus esqueletos básicos lactonas, raramente possuem mais que uma ligação dupla e apresentam em sua grande maioria diferentes grupos funcionais contendo oxigênios, como hidroxilas, hidroxilas esterificadas, carbonilas, óxidos, metoxilas e carboximetilas. Essas funções são encontradas em todos os átomos de carbonos, com exceção dos carbonos C-5 e C-9 e dos grupos metilas nas posições C-4 e C-10 dos esqueletos fundamentais. (POLONSKY, 1985). Neste levantamento observou-se que todos os quassinóides isolados das três espécies de plantas do gênero *Simarouba* possuem esqueleto tipo C₂₀ (Tab. 01, pág. 13 e 14) e figura 04 (pág. 15 e 16).

Os quassinóides apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, tais como: antitumoral, antileucêmica, antimalárica, antiinflamatória, antioxidante, fitotóxica, fago-inibidora em insetos, amebicida, antiviral, antiúlcera, antifertilidade masculina, anti-HIV. (ALMEIDA et al., 2007).

Tabela 01 – Quassinóides isolados de plantas do gênero *Simarouba* com suas atividades biológicas.

Espécies	Parte estudada	Const. químicos	Referências	Atividades biológicas	Ref. da Atividade biológica
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	11-Acetilamarolida (1)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas e talos	2,11-diacetilamarolida (2)	Ghosh et al., 1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	frutos	2'-Acetilglaucarubinona (3)	O'Neill et al., 1988	antimalárica	O'Neill et al., 1988
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	2'-Acetilglaucarubina (4)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba amara</i>	n.d.		Polonsky et al., 1978		
<i>Simarouba amara</i>	frutos	Holacantona (5)	O'Neill et al., 1988	fitotóxica antileucêmica antimalárica	Dayan et al., 1999 Polonsky, 1985 O'Neill et al., 1988
<i>Simarouba amara</i>	n.d.	13,18-Diidroglauucarubinona (6)	Polonsky et al., 1978	antileucêmica	Polonsky et al., 1978
<i>Simarouba amara</i>	casca	Simarolida (7)	Polonsky, 1959	antimalárica inseticida fago-inibidora	Almeida et al., 2007
<i>Simarouba glauca</i>	sementes	Glaucarubolona-15-O-β-D-glucopiranosida (8)	Bhatnagar et al., 1984	fago-inibidora	Gutiérrez et al., 1999
<i>Simarouba glauca</i>	sementes	Glaucarubol-15-O-β-D-glucopiranosida (9)	Bhatnagar et al., 1984	----	----
<i>Simarouba glauca</i> <i>Simarouba amara</i>	n.d. talos	Glaucarubol (10)	Ham et al., 1954 Wright et al., 1988	----	----
<i>Simarouba glauca</i>	n.d.	Glaucanol (11)	Ham et al., 1954	----	----

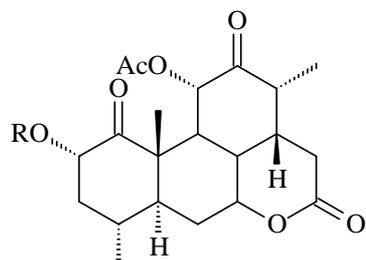
(continua)

Tabela 01 (continuação)

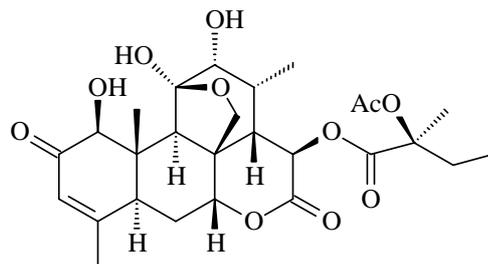
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba amara</i>	folhas e talos frutos	Ailantinona (12)	Ghosh et al., 1977 O'Neill et al., 1988	antileucêmica amebicida antimalárica	Polonsky, 1985 Almeida et al., 2007 O'Neill et al., 1988
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba glauca</i> <i>Simarouba amara</i>	raízes, talos e frutos sementes n.d.	Glaucarubinona (13)	Arriaga et al., 2002 Monseur e Motte, 1983 Polonsky et al., 1978	inseticida fagoïnibidora antileucêmica antimalárica	Arriaga et al., 2002 Polonsky, 1985 O'Neill et al., 1988
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba glauca</i>	raízes, talos e frutos frutos	Glaucarubina (14)	Arriaga et al., 2002 Cuckler et al., 1958	amebicida	Cuckler et al., 1958
<i>Simarouba amara</i>	talos	Quassina (15)	Wright et al., 1988	inseticida antifertilidade masc.	Simões et al., 2000 Almeida et al., 2007
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba glauca</i> <i>Simarouba amara</i>	caule n.d. n.d.	Glaucarubolona (16)	Simote, 2006 Moron e Polonsky, 1968 Pozo e Gimenez., 1998	amebicida fitotóxica	Almeida et al., 2007 Dayan et al., 1999

n.d. = não divulgado

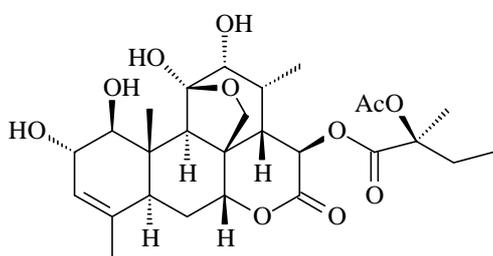
Figura 04 – Estruturas de quassinóides isolados de espécies do gênero *Simarouba*.



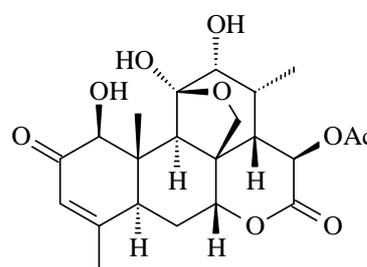
(1) R = H
(2) R = Ac



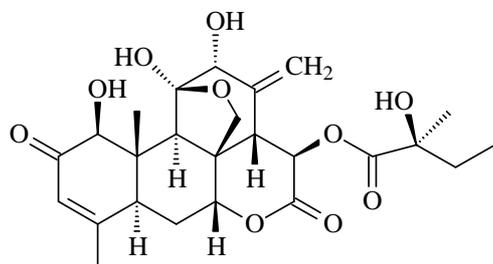
(3)



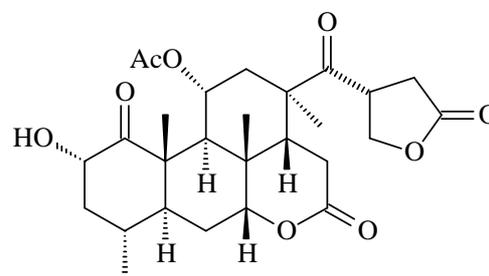
(4)



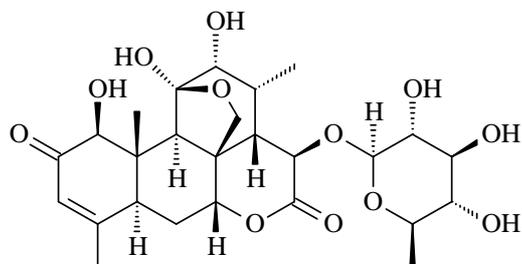
(5)



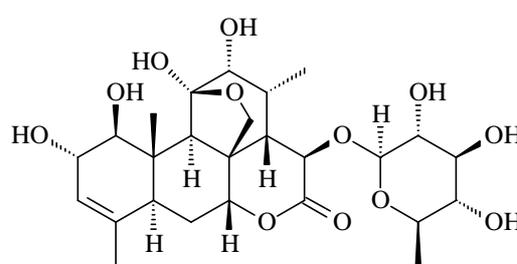
(6)



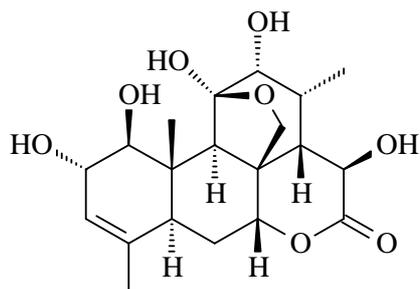
(7)



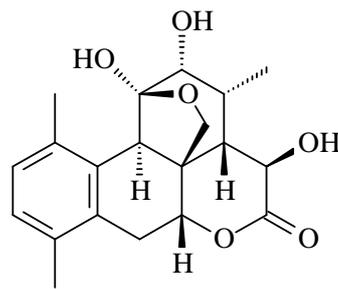
(8)



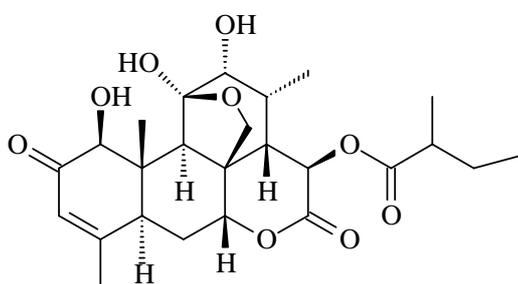
(9)



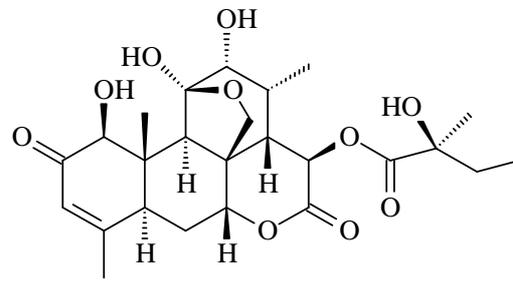
(10)



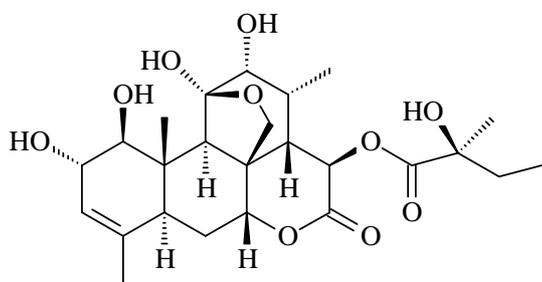
(11)



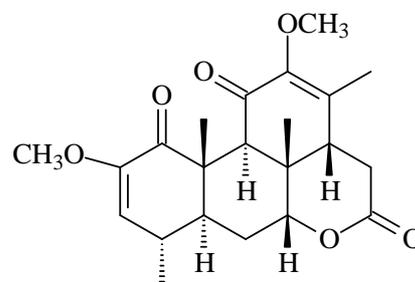
(12)



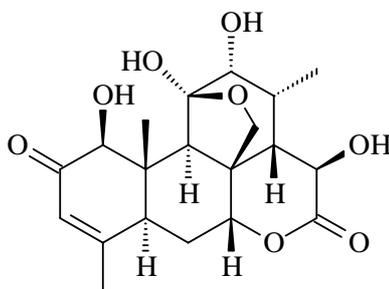
(13)



(14)



(15)



(16)

3.2. Alcalóides

Alcalóide é uma substância orgânica cíclica, nitrogenada e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos com um amplo espectro de atividades farmacológicas (SIMÕES et al., 2000).

Os alcalóides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, devido a diversos rearranjos do esqueleto original na rota biossintética, com grande número de centros assimétricos, sendo classificados de acordo com a sua origem biogenética, aminoácido precursor (SIMÕES et al., 2000).

Mais de trinta e cinco alcalóides do tipo cantinona têm sido isolados de trinta e seis espécies de plantas, sendo vinte e nove desses alcalóides foram isolados de espécies da Família Simaroubaceae. Portanto, os compostos cantinônicos formam um importante grupo de marcadores quimiotaxonômicos dessa família (SIMOTE, 2006). No levantamento sobre substâncias isoladas no gênero *Simarouba*, nas três espécies de plantas submetidas a estudos, descreve-se o isolamento de oito cantinonas e dois alcalóides indólicos simples, conforme descritos na tabela 02 (pág. 19) e mostrado na figura 06 (pág. 20).

O alcalóide cantinônico mais simples é a cantin-6-ona (Fig. 05), que apresenta o núcleo fundamental das demais cantinonas, sendo, formado por um anel aromático orto dissustituído (A), um anel piridínico (B) e um anel quinolônico (C) (Lactama).

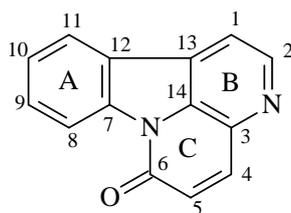


Figura 05 - Núcleo fundamental Cantin-6-ona.

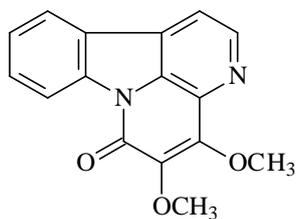
A cantin-6-ona pode ter várias substituições em seu núcleo fundamental, sendo os grupamentos metoxilas e hidroxilas os mais freqüentes distribuídos em vários carbonos. Esses compostos são de fácil identificação e, por serem altamente conjugadas, possuem coloração às vezes fosforescente e forte absorção no UV (SIMOTE, 2006).

Os alcalóides apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: amebicida, anticolinérgica, anti-hipertensiva, antimalárica, antitumoral, hipnoanalgésica, estimulante do SNC, diurética, miorelaxante, antiviral e outras. A gama de propriedades biológicas, bem distintas, está relacionada à grande variedade estrutural deste grupo de substâncias (SIMÕES et al., 2000).

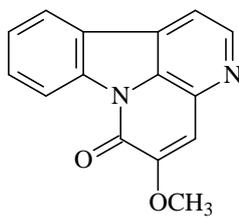
Tabela 02 – Alcalóides isolados de plantas do gênero *Simarouba* com suas atividades biológicas.

Espécies	Parte estudada	Const. químicos	Referências	Atividades biológicas	Ref. da Atividade biológica
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba glauca</i>	galhos ramos	4,5-Dimetoxicatin-6-ona (17)	Simote, 2006 Rivero et al., 2005	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	galhos	5-metoxicantin-6-ona (18)	Simote, 2006	Antifúngica	Thouvenel et al., 2003
<i>Simarouba versicolor</i>	caule	7-hidróxi-1-etil β -carbolina (19)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	caule	7-hidróxi-1,1' - propionato de metila β -carbolina (20)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	Cantin-6-ona (21)	Rivero et al., 2005	antifúngica leishmanicida citotóxica antimalárica	Thouvenel et al., 2003 Rivero et al., 2005 Kuo et al., 2003 Ferreira et al., 2002
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	9-Metoxicantin-6-ona (22)	Rivero et al., 2005	citotóxicas antimalárica	Rivero et al., 2005 Kuo et al., 2003
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	Cantin-2,6-diona (23)	Rivero et al., 2005	citotóxica	Rivero et al., 2005
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	2-Metoxicantin-6-ona (24)	Rivero et al., 2005	citotóxica	Rivero et al., 2005
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	4,5-Dihidroxicantin-6-ona (25)	Rivero et al., 2005	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca da raiz	5-Hidroxicantin-6-ona (26)	Lassak et al., 1977	----	----

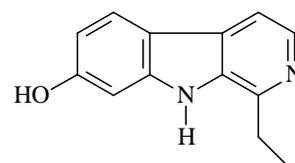
Figura 06 – Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero *Simarouba*.



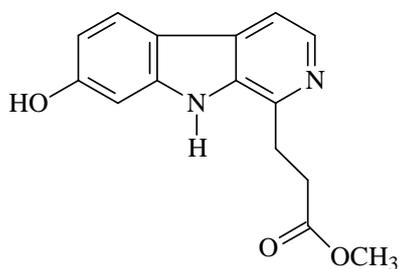
(17)



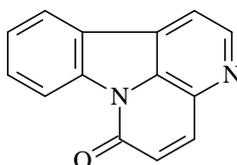
(18)



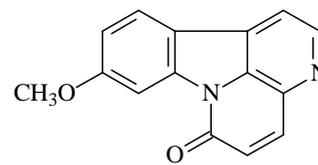
(19)



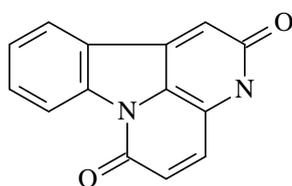
(20)



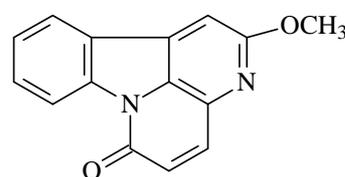
(21)



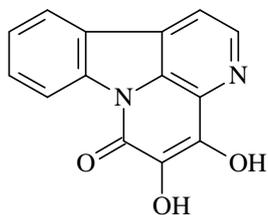
(22)



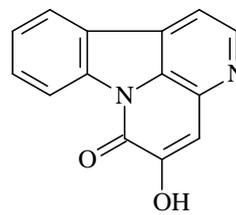
(23)



(24)



(25)



(26)

3.3. Triterpenóides

Os triterpenóides, pertencentes à classe dos terpenos, são metabólitos secundários produzidos apenas pelas plantas. São igualmente provenientes do óxido de esqualeno, mas ao contrário dos esteróis não há degradação da cadeia carbônica e, portanto apresentam um esqueleto com trinta átomos de carbono (PATOCKA, 2003). Foram identificados 27 triterpenos das três espécies estudadas do gênero *Simarouba*, (Tab. 03, pág. 22 e 23) e mostrados na figura 07 (pág. 24 a 27). Pode-se observar que a espécie *Simarouba amara* apresentou o maior número de triterpenos isolados, totalizando 16 compostos.

Os triterpenóides apresentam diversos relatos de atividades biológicas. São antiinflamatórios, bactericidas, fungicidas, antimicrobianos, antivirais, analgésicos, cardiovasculares, antitumorais (MENDES, 2004).

Tabela 03 – Triterpenóides isolados de plantas do gênero *Simarouba* com suas atividades biológicas.

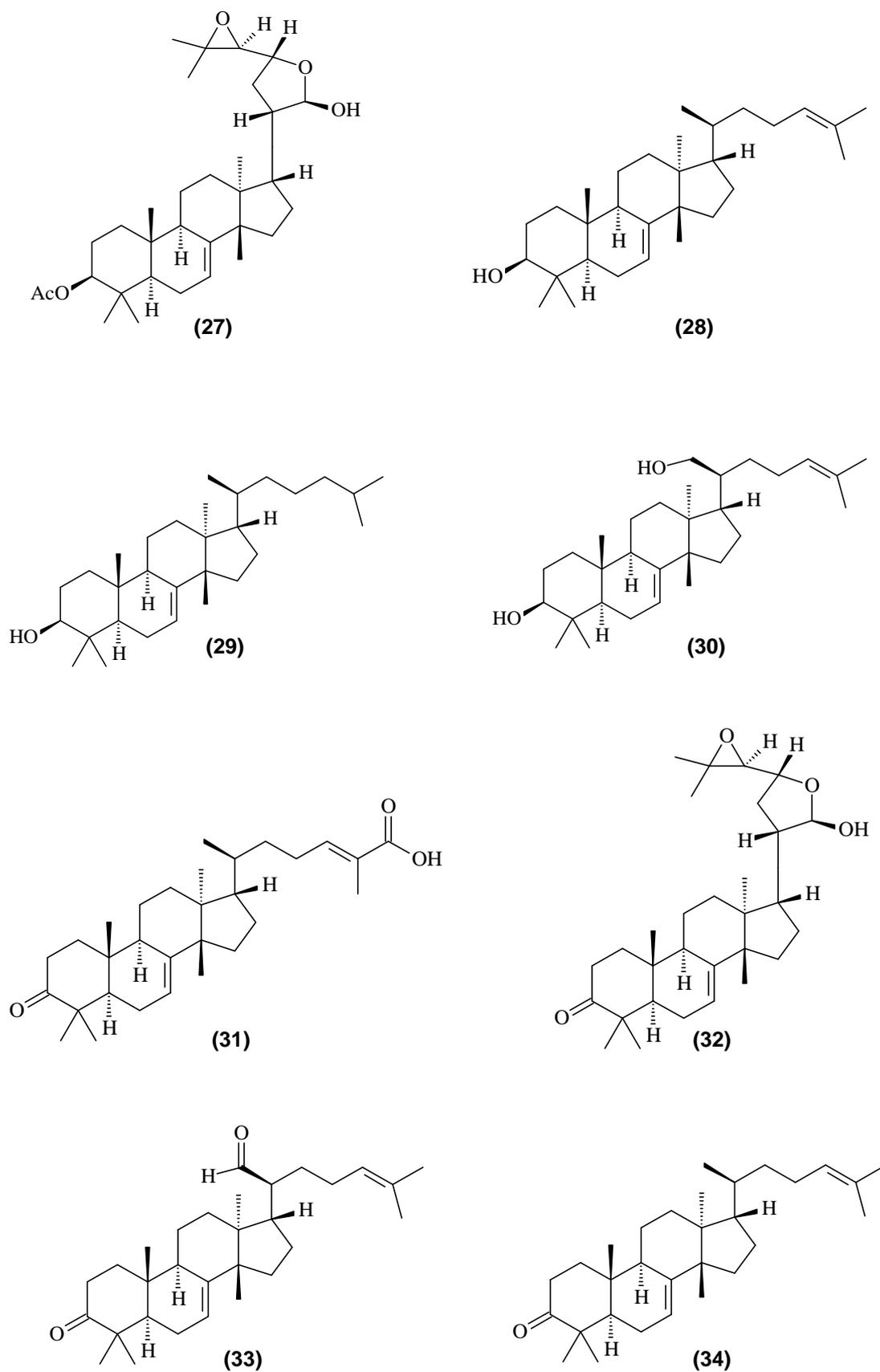
Espécies	Parte estudada	Const. químicos	Referências	Atividades biológicas	Ref. da Atividade biológica
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Turreantina (27)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Tirucal-7,24-dien-3 β -ol (28)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Tirucal-7-enol (29)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Lanosta-7,24-dieno-3,21-diol (30)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Terebintona (31)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Melianona (32)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	3-Oxotirucal-7,24-dien-21-al (33)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	Tirucal-7,24-dien-3-ona (34)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos		Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba amara</i>	raízes	20-21-Anhidromelianona (35)	Polonsky et al.,1977	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	24,25-Epoxi-3-oxotirucal-8-en-23-ol (36)	Sumieya et al., 2006	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	Simaroubina A (37)	Sumieya et al., 2006	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	Simaroubina B (38)	Sumieya et al., 2006	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	Simaroubina C (39)	Sumieya et al., 2006	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	Simaroubina D (40)	Sumieya et al., 2006	----	----

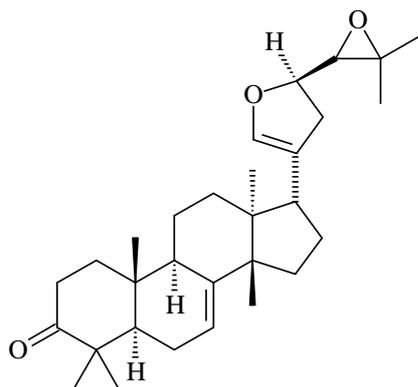
(continua)

Tabela 03 (continuação)

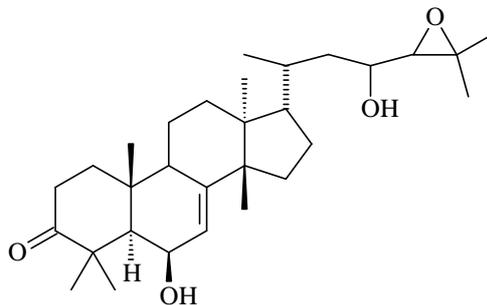
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	Octanorsimaroubina A (41)	Sumieya et al., 2006	----	----
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	Melianodiol (42)	Rivero et al., 2005	citotóxica	Rivero et al., 2005
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	14-Deacetileurileno (43)	Rivero et al., 2005	citotóxica	Rivero et al., 2005
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas e talos	Epilupeol (44)	Ghosh et al., 1977	antiviral antituberculose	Choudhury et al., 1990 Akihisa et al., 2005
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	Ocotilona (45)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	Nilocitina (46)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule		Sumieya et al., 2006		
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	Bourjutiolona A (47)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	3-Episapelina A (48)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	21,23-Epóxi-21 β ,24,25- trihidroxitirucal- 7-en -3-ona (49)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	21,23-Epóxi-21 α ,24,25- trihidroxitirucal- 7-en-3-ona (50)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	Eurilieno (51)	Arriaga et al., 2002	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	galhos	22S,3 α -diidroxitirucal-7,24- dien-23-ona (52)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas	Lupeol (53)	Simote, 2006	antiinflamatória	Rajic et al., 2000

Figura 07 – Estruturas de Triterpenóides isolados de espécies do gênero *Simarouba*.

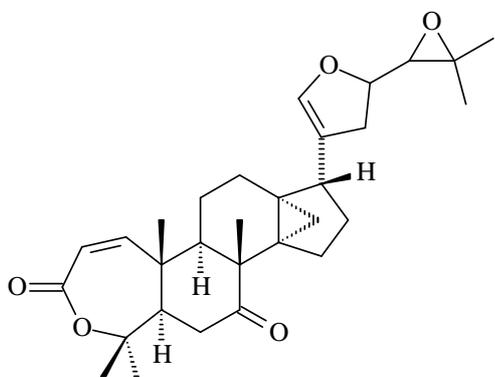




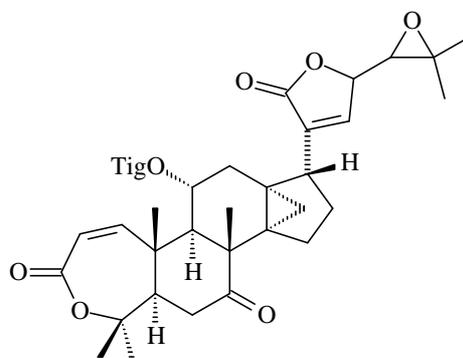
(35)



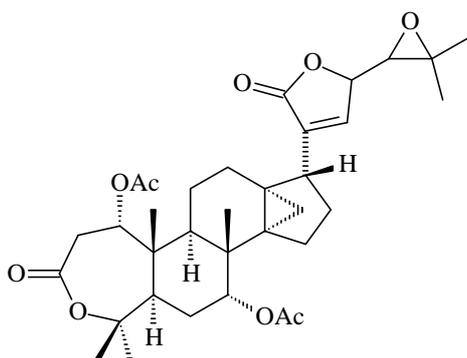
(36)



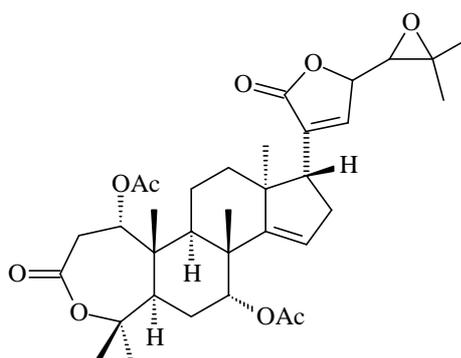
(37)



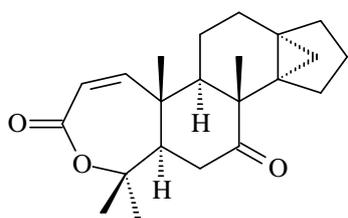
(38)



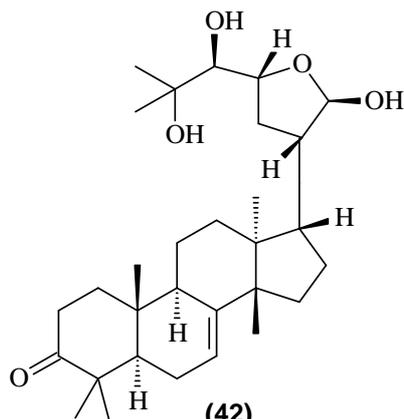
(39)



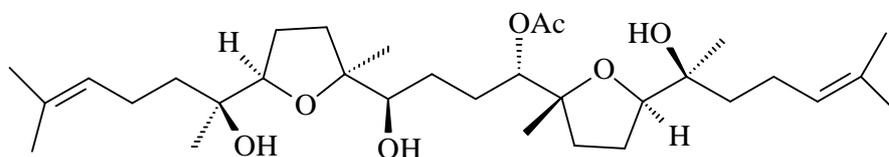
(40)



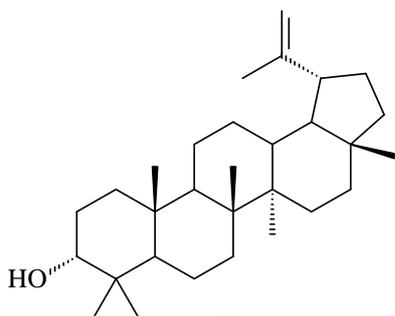
(41)



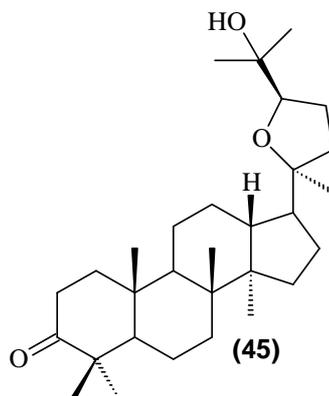
(42)



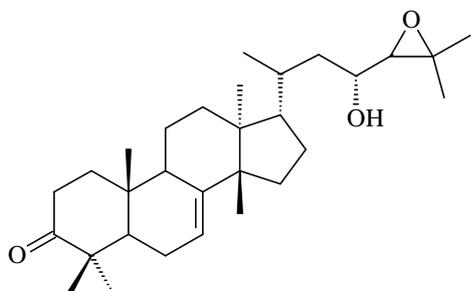
(43)



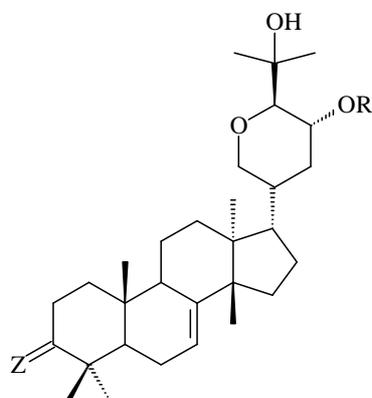
(44)



(45)

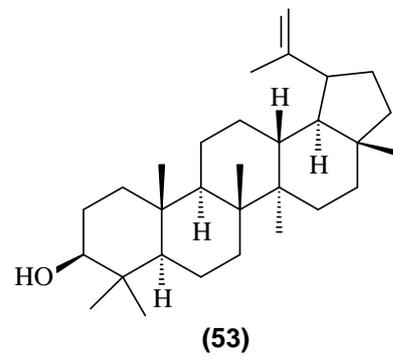
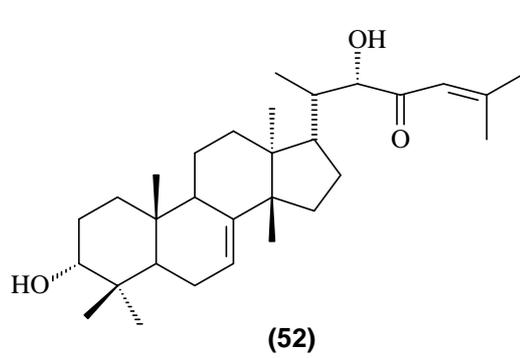
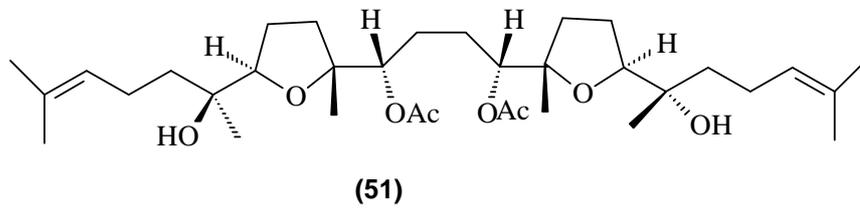
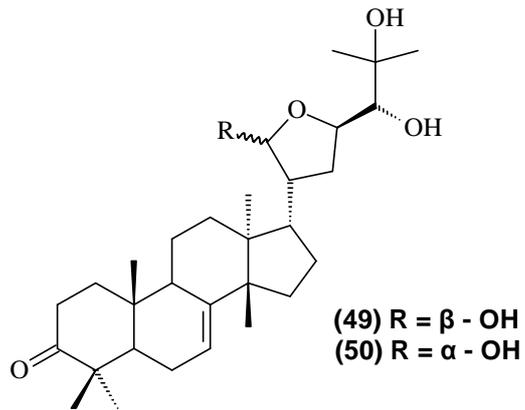


(46)



(47) Z = O, R = H

(48) Z = β -OH, R = H



3.4. Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados, sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais (DEWICK, 2001). Possuem um esqueleto formado por quatro anéis fundidos (tetracíclicos do lanosterol), de três a seis membros e um anel de cinco membros, podendo estar ou não ligado a uma cadeia de tamanho variável e na posição três está oxidada com um grupo hidroxila ou carbonila. Estes podem ocorrer na forma livre, esterificados ou conjugados como glicosídeo (JONES et al., 2000).

Quase sempre os esteróides encontram-se em misturas devido as suas semelhanças estruturais dificultando desta maneira o isolamento individual. Do gênero *Simarouba* apenas na espécie *Simarouba glauca* não há relato de isolamento de esteróides (Tab. 04, pág. 29 e Fig. 08, pág. 30).

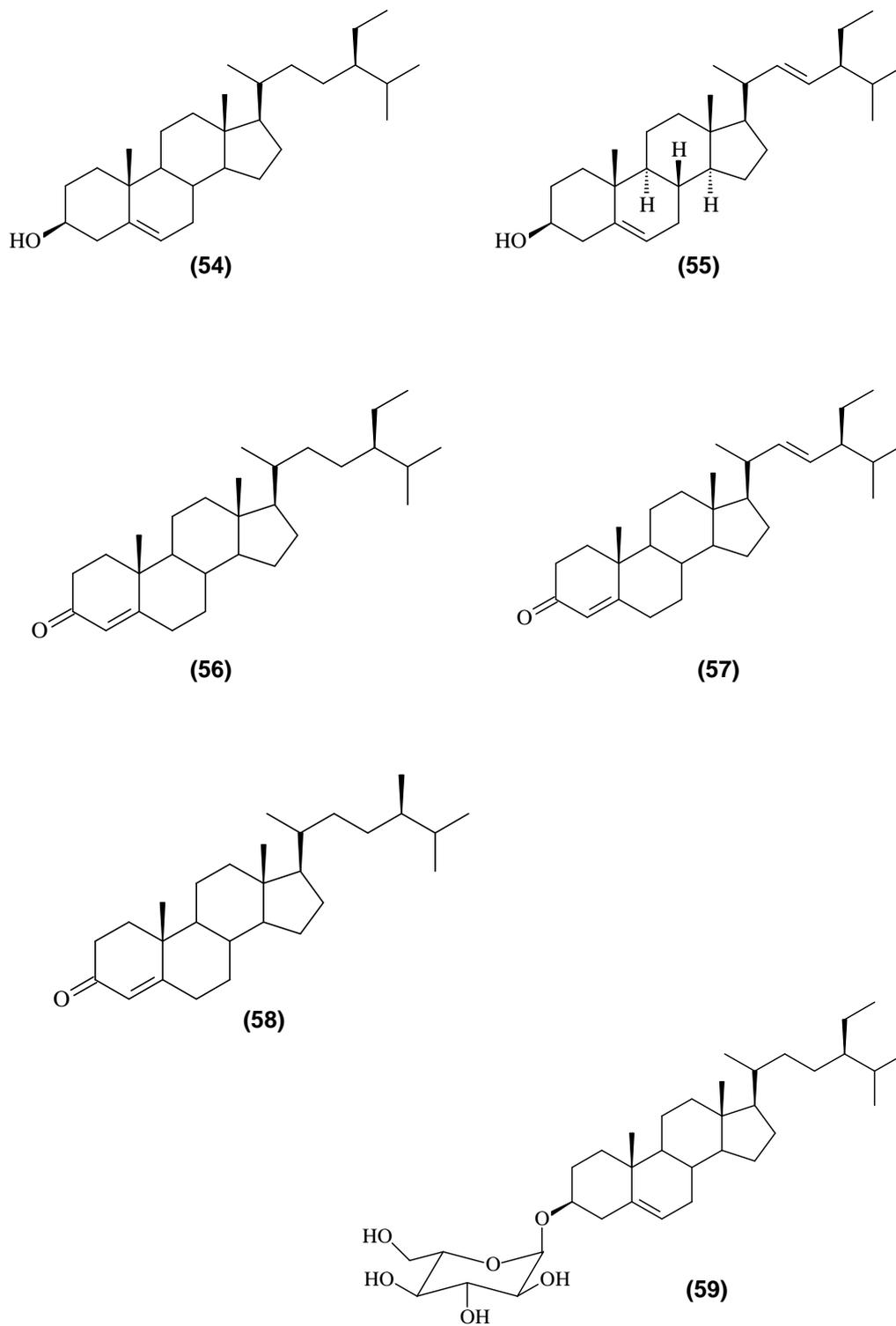
Vários estudos vêm revelando os efeitos indiretos dos fitosteróis na redução das doenças cardíacas, através da diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-colesteróis. No Brasil uma produtora de margarina vem enriquecendo o seu produto com a adição de 14% de ésteres de fitosterol, sendo 47% o β -sitosterol (54) (MORAIS e BRAZ-FILHO, 2007).

Tabela 04 – Esteróis isolados de plantas do gênero *Simarouba* com suas atividades biológicas.

Espécies	Parte estudada	Const. químicos	Referências	Atividades biológicas	Ref. da Atividade biológica
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba amara</i>	galhos n.d.	β -sitosterol (54)	Simote, 2006 Polonsky et al.,1976	Melhora a atividade do sistema imunológico	Morais e Braz-Filho, 2007
<i>Simarouba amara</i> <i>Simarouba versicolor</i>	n.d. galhos	Estigmasterol (55)	Polonsky et al.,1976 Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	galhos	Sitostenona (56)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	galhos	Estigmastenona (57)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	galhos	Campestenona (58)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i> <i>Simarouba amara</i>	galhos n.d.	3 β -O-3 β -D-glucopiranosil sitosterol (59)	Simote, 2006 Pozo e Gimenez, 1998	Melhora a atividade do sistema imunológico	Morais e Braz-Filho, 2007

n.d. = não divulgado

Figura 08 – Estruturas de esteróides isolados de espécies do gênero *Simarouba*.



3.5. Cumarinas, Flavonóides e Quinonas

3.5.1. Cumarinas

As cumarinas constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. São substâncias encontradas em diferentes partes das plantas, sendo comum em diversas famílias. A cumarina (1,2-benzopirona) foi a primeira representante isolada, em 1820, da espécie *Coumarona odorata* (MURRAY, 1978). Este composto por ser o mais simples tornou-se o esqueleto básico de todos os outros derivados cumarínicos, conhecido como cumarina *per se* (Fig. 09).

Estruturalmente são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (SIMÕES et al., 2000). Podendo ser considerada também como a fusão dos anéis benzeno e 1-2-pirona (primeiro átomo numerado do ciclo é o oxigênio, sem dupla ligação), essa numeração de seus carbonos é baseada na sua origem biossintética (CARPENTER et al., 1969).

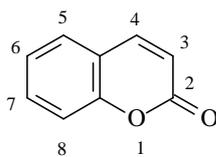


Figura 09: Cumarina *per se*.

As substâncias dessa classe são classificadas quimicamente em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (SOUSA, 2005). No gênero *Simarouba* foram isoladas cinco cumarinas, todas cumarinas simples (Tab. 05, pág. 34) e mostrados na figura 11 (pág. 35).

Há relatos de 32 atividades biológicas atribuídas as cumarinas. Entre elas estão: antibacteriana, antitumoral, antioxidante, anti-HIV, atividade diurética e analgésica (SOUSA, 2005).

3.5.2. Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C6-C3-C6). A figura 10 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono com a denominação de cada anel (SIMÕES et al., 2000). Atualmente, já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo (PIETTA, 2000).

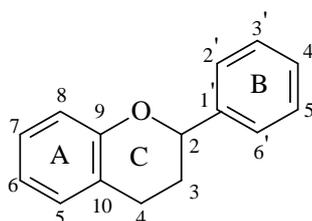


Figura 10: Núcleo fundamental dos flavonóides.

De um modo geral, estes compostos diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou não da dupla ligação e da carbonila no anel C (anel pirano). Além disso, podem ser encontrados derivados glicosilados, metilados, acetilados ou sulfatados (SIMÕES et al., 2000).

Dependendo da substituição e do nível de oxidação no anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo as mais importantes e que se incluem na dieta humana essencialmente cinco classes: Flavanóis, Flavonas, Antocianidinas, Isoflavonóides e Flavononas (SIMÕES et al., 2000).

No levantamento do gênero *Simarouba* verificou-se o isolamento de quatro flavonóides, todos provenientes da espécie *Simarouba versicolor*, sendo duas flavononas (**66**) e (**67**), uma flavona (**68**) e um flavanol (**65**) (Tab. 05, pág. 34 e Fig. 11, pág. 35).

Na literatura esta classe de compostos apresenta importantes propriedades farmacológicas, tais como: anticarcinogênica, antiinflamatória, antiviral, antidiabética e antioxidante (PIETTA, 2000).

3.5.3. Quinonas

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis, apresentando dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C, possuindo as carbonilas sempre nas posições 1,2- ou 1,4-dicetonas cíclicas, ou seja, *orto*- ou *para*-quinona. Há três grupos principais de quinonas classificadas como **benzoquinonas**, **naftoquinonas** e **antraquinonas** (SIMÕES et al., 2000).

O único exemplar das quinonas foi isolado da espécie *Simarouba amara*, do tipo benzoquinona a 3,5-Dimetoxybenzoquinona (**69**) (Tab. 05, pág. 34 e Fig. 11, pág. 35).

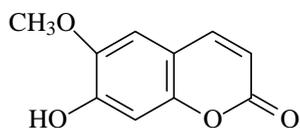
As quinonas apresentam uma diversidade de atividades biológicas. As naftoquinonas são responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral, além de atividade contra *Leishmania*. Algumas benzoquinonas apresentam atividade contra tripanossomatídeas (SIMÕES et al., 2000).

Tabela 05 – Cumarinas, flavonóides e quinonas isolados de plantas do gênero *Simarouba* com suas atividades biológicas.

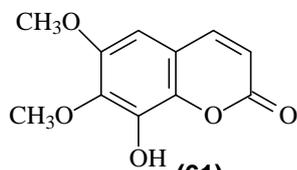
Espécies	Parte estudada	Const. químicos	Referências	Atividades biológicas	Ref. da Atividade biológica
Cumarinas					
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	7-hidroxi-6-metoxicumarina (60)	Rivero et al., 2005	antiespasmódica	Simões et al., 2000
<i>Simarouba glauca</i>	ramos	8-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (61)	Rivero et al., 2005	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	caule	7-hidroxicumarina (62)	Simote, 2006	Atividade citostática (inibidora da bomba de prótons)	Kasinadhuni et al., 1999
<i>Simarouba versicolor</i>	caule	6,7-dimetoxicumarina (63)	Simote, 2006	imunossupressora	Hoult e Payá, 1996
<i>Simarouba versicolor</i>	caule	6-hidroxi-7,8-dimetoxicumarina (64)	Simote, 2006	----	----
Flavonóides					
<i>Simarouba versicolor</i>	raízes, talos e frutos	Kaenferol (65)	Arriaga et al., 2002	antiinflamatória antiúlcera	Goel e Maiti, 1996
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas	Flavanona (66)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas	Isosakuranetina (67)	Simote, 2006	----	----
<i>Simarouba versicolor</i>	folhas	5,7,3',4',5'-pentametóxi-flavona (68)	Simote, 2006	----	----
Quinona					
<i>Simarouba amara</i>	casca do caule	3,5-Dimetoxibezoquinona (69)	Polonsky et al., 1959	----	----

Figura 11 – Estruturas de cumarinas, flavonóides e quinona isolados de espécies do gênero *Simarouba*.

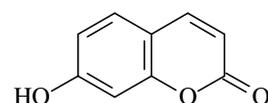
Cumarinas



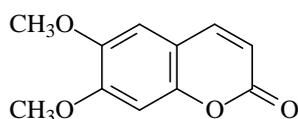
(60)



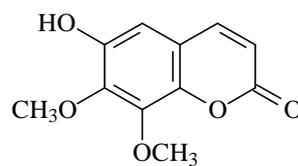
(61)



(62)

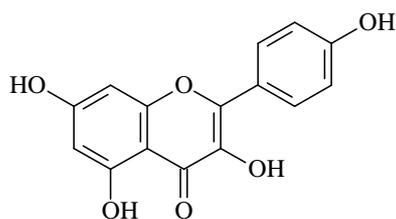


(63)

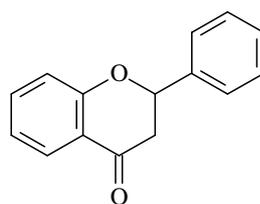


(64)

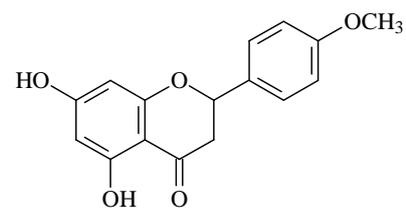
Flavonóides



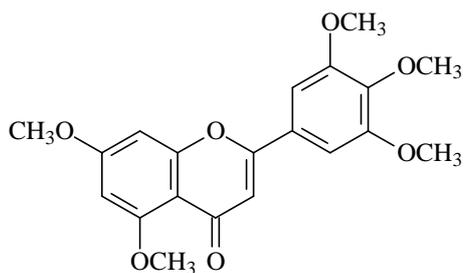
(65)



(66)

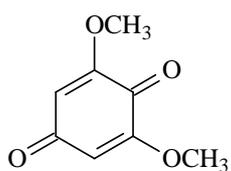


(67)



(68)

Quinona



(69)

Capítulo 4

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

4.1. Determinação Estrutural de SVEFC01

O fracionamento cromatográfico em sílica gel da fração clorofórmica (Fluxograma 03, pág. 104) resultou em dez subfrações. Na terceira obteve-se a fração SVEC 3.2 (Tab. 16 e 17, pág. 96 e 97) e desta as subfrações 7-19 que se apresentaram como um sólido amorfo de coloração branca, com sabor levemente adocicado, sendo solúvel em clorofórmio, cujo ponto de fusão está entre 133,2 – 135,6 °C. Sendo denominado SVEFC01.

A determinação estrutural foi possível através de análise dos dados espectrais de RMN¹H e ¹³C-BB e comparação com dados da literatura (GOAD, 1991) conforme descritos na tabela 06, pág. 42.

4.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de SVEFC01.

No espectro de RMN¹H, 500MHz em CDCl₃, (Fig. 12, Pág. 39) verificou-se um grande agrupamento de sinais na região mais blindada do espectro na faixa entre δ 0,68 – 2,29 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos comuns em terpenos e de núcleo esteroidal. Revelou também a presença de um multipletto em δ 3,53, deslocamento característico de hidrogênio ligado a carbono sp³ oxigenado. Foram observados sinais espectrais múltiplos entre δ 5,04 e 5,36 típicos de hidrogênios olefínicos, na qual, o dubleto largo em δ 5,36 (dl, $J = 5,1$ Hz) é atribuído ao H-6 dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol, os sinais em δ 5,16 (dd, $J = 15,2$ Hz e $J = 8,6$ Hz) e δ 5,04 (dd, $J = 15,2$ Hz e $J = 8,6$ Hz) são referentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 pertencentes ao estigmasterol, caracterizando uma mistura de esteróides.

4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de SVEFC01.

No espectro de RMN¹³C-BB, 125MHz em CDCl₃, (Fig. 13, Pág. 40) observou-se a presença de vinte e nove linhas espectrais principais e que conjuntamente com o DEPT 135° (Fig. 14, pág. 41) foi possível atribuir os sinais em δ 140,9 e 121,9 a carbonos insaturados pertencentes a uma dupla ligação trissubstituída (C-5 e C-6). Nesta região de aborção de carbono olefínico, aparecem ainda dois sinais de menor intensidade, ambos de carbonos metínicos, em δ 138,5 e 129,5 referentes aos carbonos

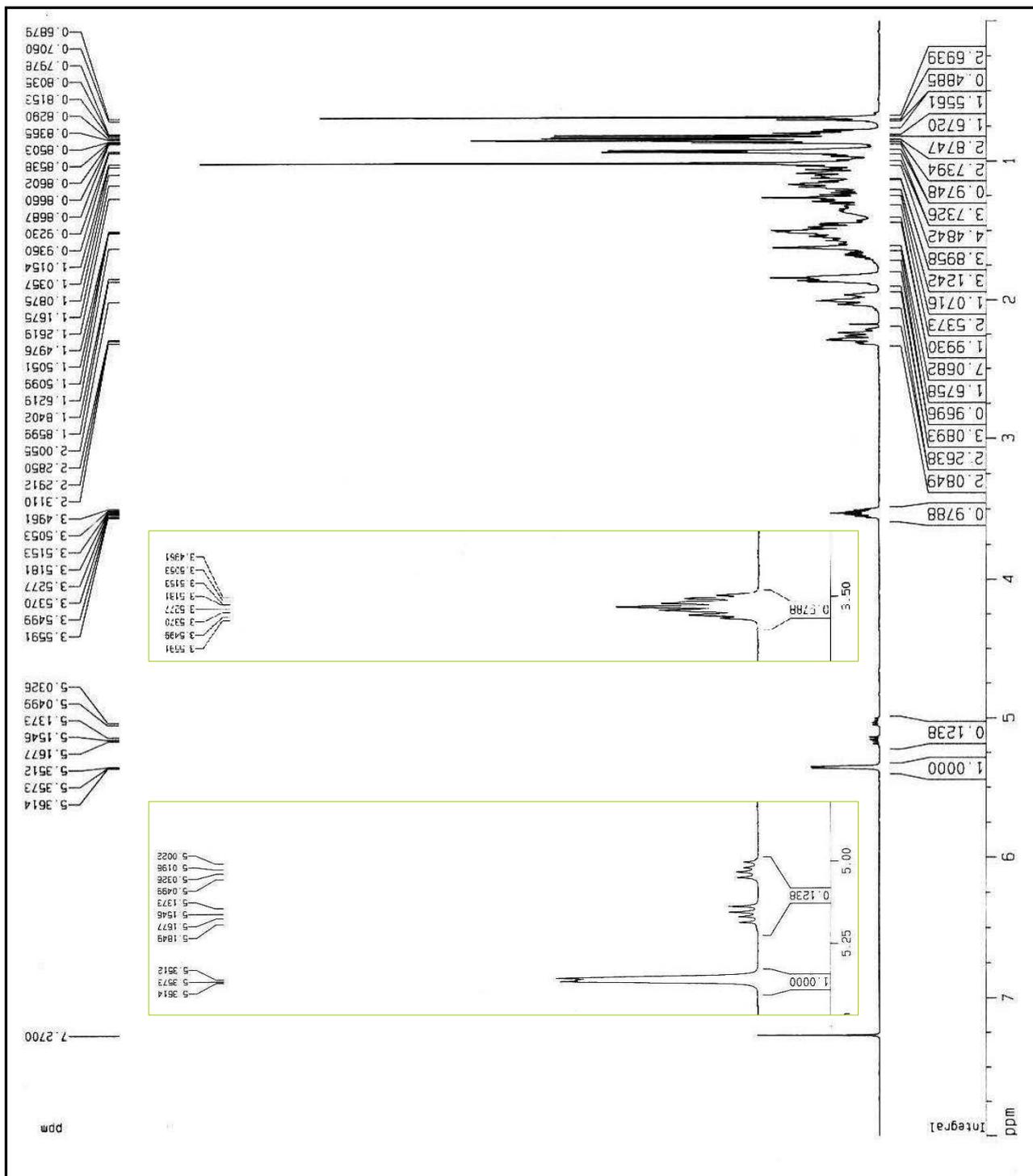


Figura 12 - Espectro de RMN^1H de SVEFC01 em CDCl_3 a 500MHz.

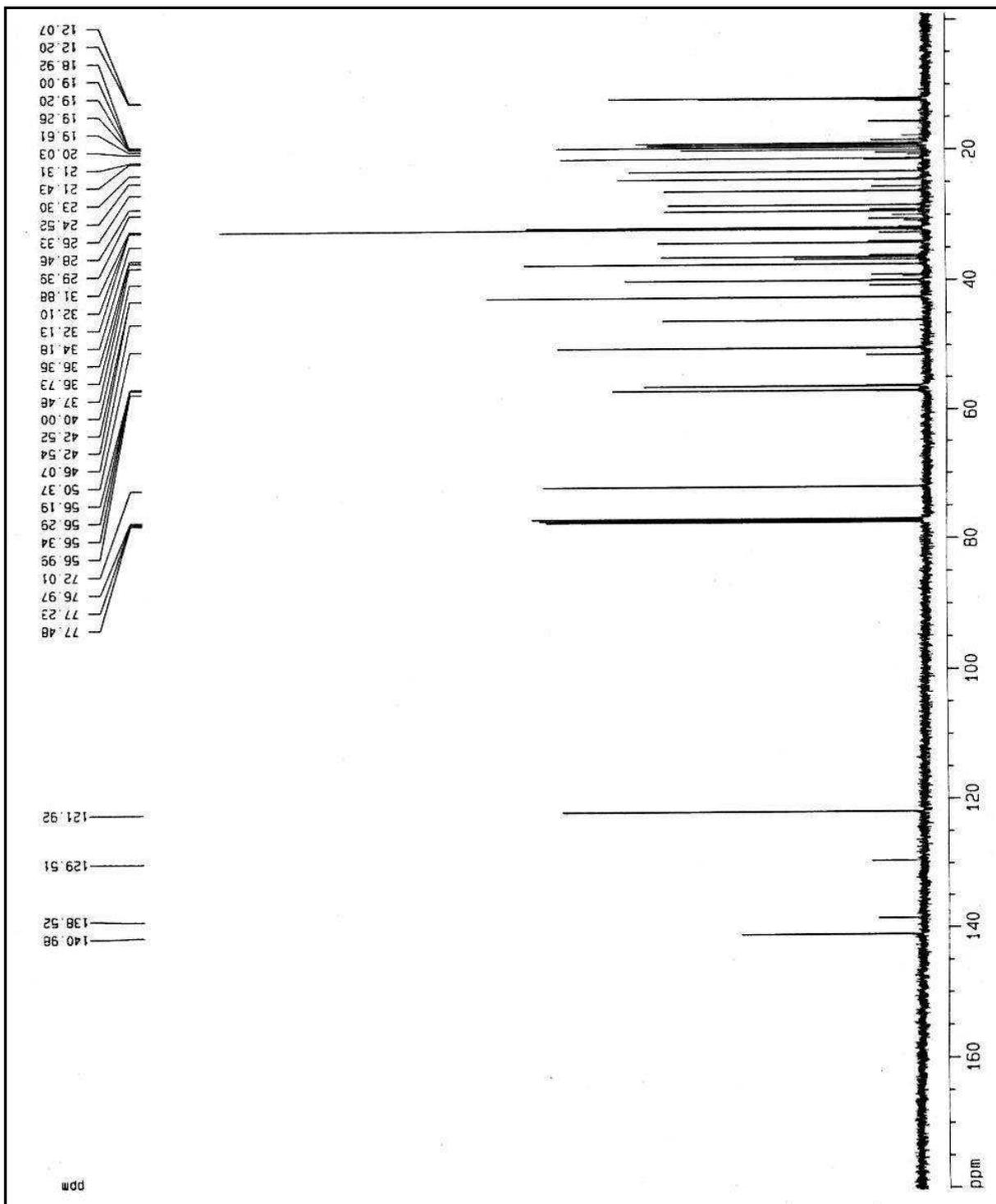


Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C -BB de SVEFC01 em CDCl_3 a 125MHz.

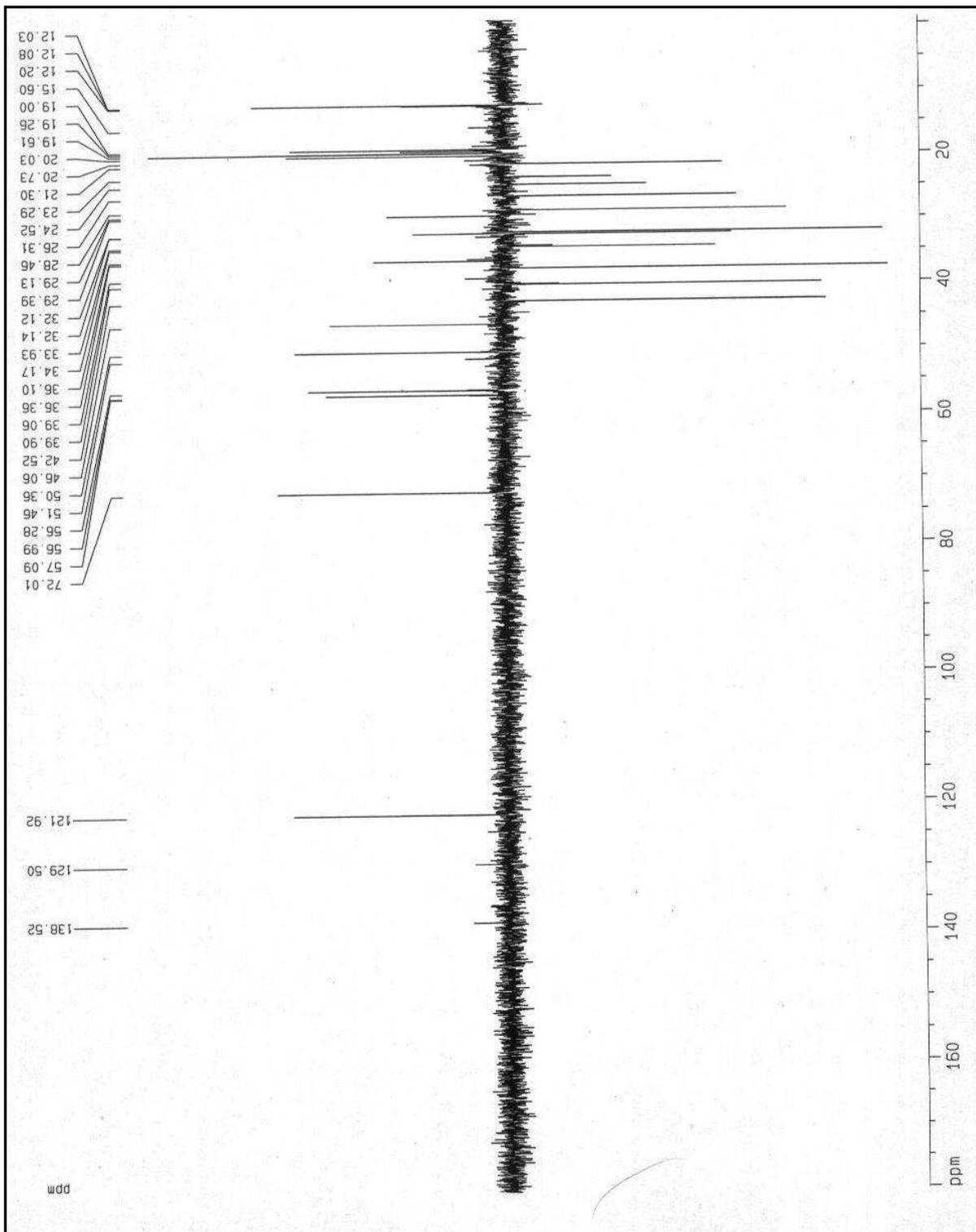


Figura 14 - Espectro de RMN¹³C – DEPT 135° de SVEFC01 em CDCl₃ a 125MHz.

Tabela 06 - Dados RMN¹³C de SVEFC01, comparados com valores descritos na literatura para β-sitosterol e estigmasterol (GOAD, 1991).

CARBONO		DESLOCAMENTO ¹³ C (ppm)			
Número	Tipo	β-SITOSTEROL SVEC01	β-SITOSTEROL (GOAD, 1991)	ESTIGMASTEROL (GOAD, 1991)	ESTIGMASTEROL SVEC01
1	CH ₂	36,4	37,3	37,3	36,4
2	CH ₂	32,1	31,6	31,7	32,1
3	CH	72,0	71,7	71,8	72,0
4	CH	42,5	42,3	42,2	42,5
5	C	140,9	140,8	140,8	140,9
6	CH	121,9	121,6	121,7	121,9
7	CH ₂	32,1	31,9	31,9	32,1
8	CH	32,1	31,9	31,9	32,1
9	CH	50,3	50,2	50,2	50,3
10	C	36,7	36,5	36,6	36,7
11	CH ₂	21,3	21,1	21,1	21,3
12	CH ₂	39,9	39,8	39,7	39,9
13	C	42,5	42,3	42,4	42,5
14	CH	56,9	56,8	56,9	56,9
15	CH ₂	24,5	24,3	24,4	24,5
16	CH ₂	28,4	28,3	29,0	29,1
17	CH	56,2	56,1	56,1	56,2
18	CH ₃	12,0	11,9	12,1	12,1
19	CH ₃	19,6	19,4	19,4	19,6
20	CH	36,1	36,2	40,5	40,0
21	CH ₃	19,0	18,8	21,1	20,7
22	CH₂ ou CH	33,9	33,9	138,4	138,5
23	CH₂ ou CH	26,3	26,1	129,3	129,5
24	CH	46,0	45,9	51,3	51,4
25	CH	29,3	29,2	31,9	31,8
26	CH ₃	20,0	19,8	21,3	20,7
27	CH ₃	19,2	19,1	19,0	19,2
28	CH ₂	23,2	23,1	25,4	24,5
29	CH ₃	12,2	12,3	12,3	12,2

4.2. Determinação Estrutural de SVEFC81

O composto SVEFC81 foi isolado da quinta subfração oriunda da fração clorofórmica do extrato etanólico da casca do caule de *Simarouba versicolor*, como mostra o fluxograma 03, pág. 104. Sua determinação estrutural foi realizada através da análise dos espectros de massa, RMN¹H, ¹³C-BB, COSY, HMBC, HSQC como também do espectro de absorção na região do infravermelho e por comparação com dados da literatura (RODRIGUES et al., 1992), conforme tabela 07, pág. 55.

Este composto foi isolado sob a forma de um sólido branco, solúvel em clorofórmio, cujo ponto de fusão está entre 151,1 – 152,8 °C, facilmente observado em CCD, apresentando diretamente a coloração amarela claro quando exposto ao revelador vanilina, denominado SVEFC81.

4.2.1. Espectrometria no Infravermelho de SVEFC81

O espectro de absorção na região do infravermelho de SVEFC81 (Fig.15, pág. 46) mostra algumas absorções relevantes para a determinação: em 1080 cm⁻¹ é atribuído à deformação axial simétrica de C-O e vibrações entre 1275 e 1131 cm⁻¹ são referentes também à deformação axial de ligações C-O; em 1337 cm⁻¹ associada à deformação axial de C-N sugerindo um alcalóide e a absorção em 1439 cm⁻¹ é correlacionada a deformações axiais de C=C e C=N em anel, indicando a existência de um alcalóide piridínico; em 1657 cm⁻¹ refere-se a uma deformação axial de C=O e as absorções em 2914 e 2844 cm⁻¹ são atribuídas a ligações C-H de grupos alifáticos.

4.2.2. Espectrometria de Massas de SVEFC81

O espectro de massas de SVEFC81 (Fig. 16, pág. 47) apresentou o pico do íon molecular, com razão massa/carga, de 280 daltons e um pico base de 251. O valor do íon molecular (massa do composto) par possibilitou sugerir a presença de um número par de átomos de nitrogênio no alcalóide. Os principais fragmentos estão expostos na figura 17, pág. 47.

4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 de SVEFC81.

A análise do espectro de RMN¹H (500MHz, em CDCl₃) de SVEFC81 (Fig. 18, pág. 48) mostra a presença de dois dubletos, referentes aos hidrogênios do anel piridínico, um em δ 7,93 (d, $J = 5,0$ Hz; H-1) e outro em δ 8,84 (d, $J = 5,0$ Hz; H-2), este com maior deslocamento devido à proximidade maior a um nitrogênio.

O espectro RMN de hidrogênio (Fig. 18, pág. 48), também, apresenta quatro sinais na região típica de hidrogênios aromáticos, sendo um dubleto largo em δ 8,65 (dl, $J = 8,2$ Hz) atribuído ao hidrogênio H-8 por acoplar com o H-9 com uma constante orto. Um sinal, tripleto de dubleto, em δ 7,69 (td, $J = 8,0; 1,1$ Hz) foi designado ao H-9 por ter correlação com uma constante orto com os H-8 e H-10. Outro tripleto de dubleto foi observado em δ 7,49 (td, $J = 8,0; 0,7$ Hz) referente ao H-10 acoplando na posição orto com os H-9 e H-11. Por último, um dubleto largo em 8,08 (dl, $J = 7,7$ Hz) que foi atribuído ao H-11 por acoplar apenas com o H-10 na posição orto. Estas interações entre os hidrogênios foram confirmadas através do espectro COSY ¹H-¹H, mostrado a figura 21, pág. 51.

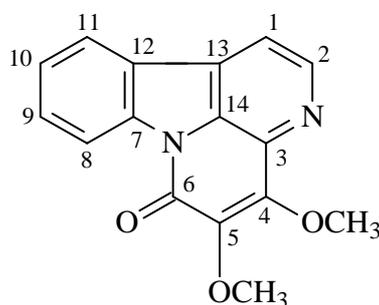
No espectro de RMN de hidrogênio ainda foram observados dois sinais (singletos) em δ 4,08 e 4,47 com integração para três hidrogênios manifestando, devido ao deslocamento químico de ambos, o indício para dois grupos metoxilas nas posições C-5 e C-4. Sendo confirmados através do espectro de RMN¹³C (Fig. 19, pág. 49), onde se observam dois sinais de carbonos metílicos em δ 61,64 e δ 61,75, referentes respectivamente as metoxilas ligadas ao C-5 (δ 140,52) e C-4 (δ 152,81), mostrados na tabela 07, pág. 55.

O espectro de RMN¹³C (Fig. 19, pág. 49) apresentou ainda quatorze sinais, sendo um sinal de carbono carbonílico, C-6, em δ 158,56 e os demais sinais espectrais, são observados na região de absorção de carbonos aromáticos. No DEPT 135° (Fig. 20, pág. 50) foram observados apenas oito sinais. Através da comparação dos espectros de RMN¹³C e DEPT 135° foi possível determinar a existência de oito carbonos não hidrogenado, dois já citados acima, C-5 e C-4, os deslocamentos dos demais carbonos foram precisamente elucidados através dos experimentos de HSQC e HMBC (Fig. 22 a 24, pág. 52 a 54).

4.2.4. Espectrometrias Bidimensionais e Heteronuclear (^1H - ^{13}C) de SVEFC81.

O espectro HSQC (Fig. 22, pág. 52) permitiu associar de forma inequívoca os acoplamentos de todos os hidrogênios com seu respectivo carbono, possibilitando atribuir o deslocamento químico, com exatidão, dos seis carbonos metínicos (Tab. 07, pág. 55).

Na análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear á longa distância ($^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ e $^4\text{J}_{\text{C-H}}$) de RMN ^1H - ^{13}C HMBC (Fig. 23 e 24, pág. 53 e 54). Foram observadas vinte correlações, o que permitiu fazer atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos. O espectro mostrou correlação do hidrogênio de absorção em δ 8,84 (H-2) com C-3 de deslocamento em 133,47. Outra dúvida esclarecida através do HMBC foi o deslocamento de C-14, dos quais os sinais dos H-1 (δ 7,93) e H-8 (δ 8,65) mantêm interação com esse carbono, certificando deste modo o seu deslocamento em δ 145,25 (C-14). Observaram-se interações dos hidrogênios em δ 8,65 (H-8); 7,69 (H-9); 8,08 (H-11) com δ 139,54 (C-7). Foram também observadas as correlações dos hidrogênios em δ 8,65 (H-8); 7,93 (H-1) e 7,49 (H-10) com δ 124,92 (C-12) e em δ 7,93 (H-1) e 8,84 (H-2) com C-13, (Tab. 07, pág. 55). De acordo com os dados discutidos acima e ainda com base na análise comparativa entre os dados de RMN do composto em questão com os descritos na literatura, chegou-se à conclusão de que a SVEFC81 tratava-se de um alcalóide tipo cantinona a 4,5-dimetóxicantin-6-ona, a qual já havia sido isolada da *Simarouba versicolor* (SIMOTE, 2006).



4,5-dimetóxicantin-6-ona

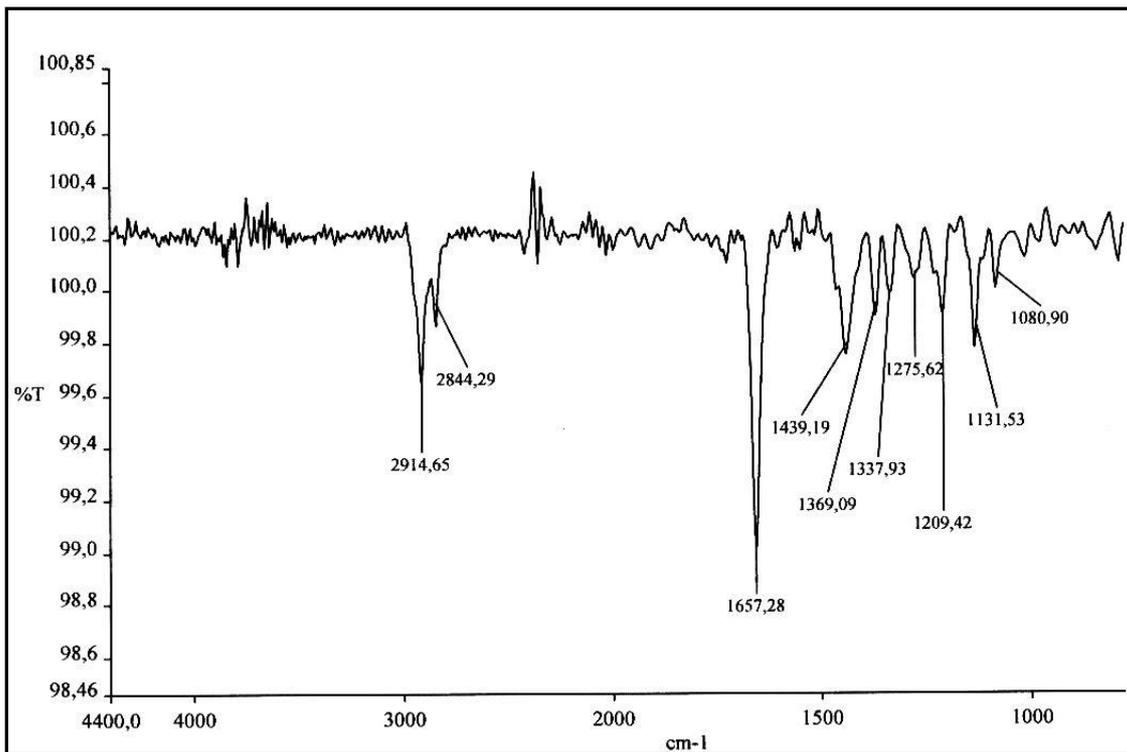


Figura 15 - Espectro de absorção de infravermelho de SVEFC81.

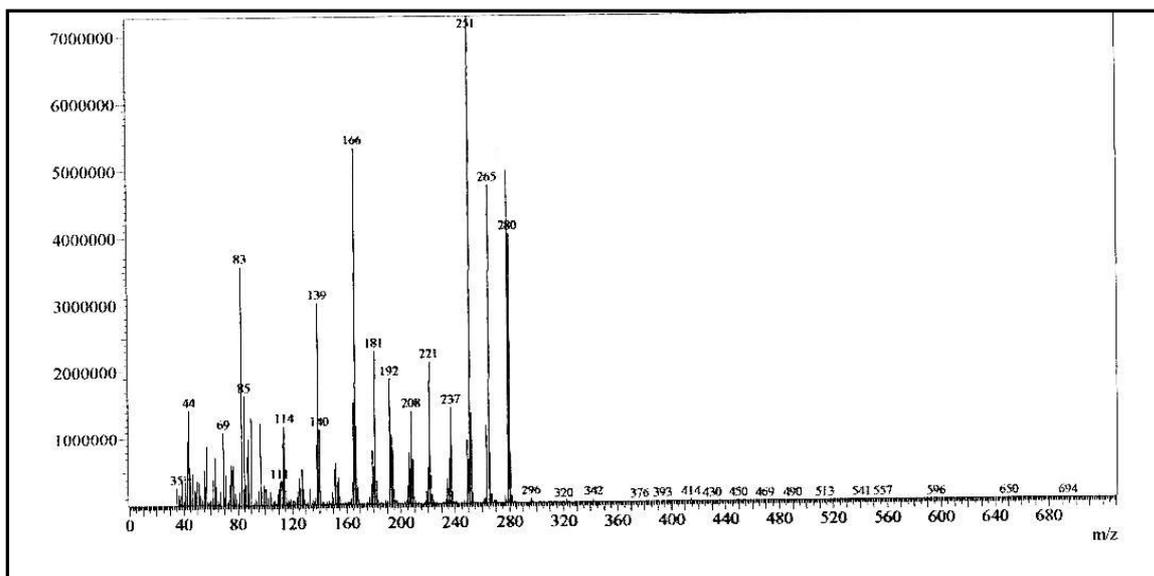


Figura 16 - Espectro de massa de SVEFC81.

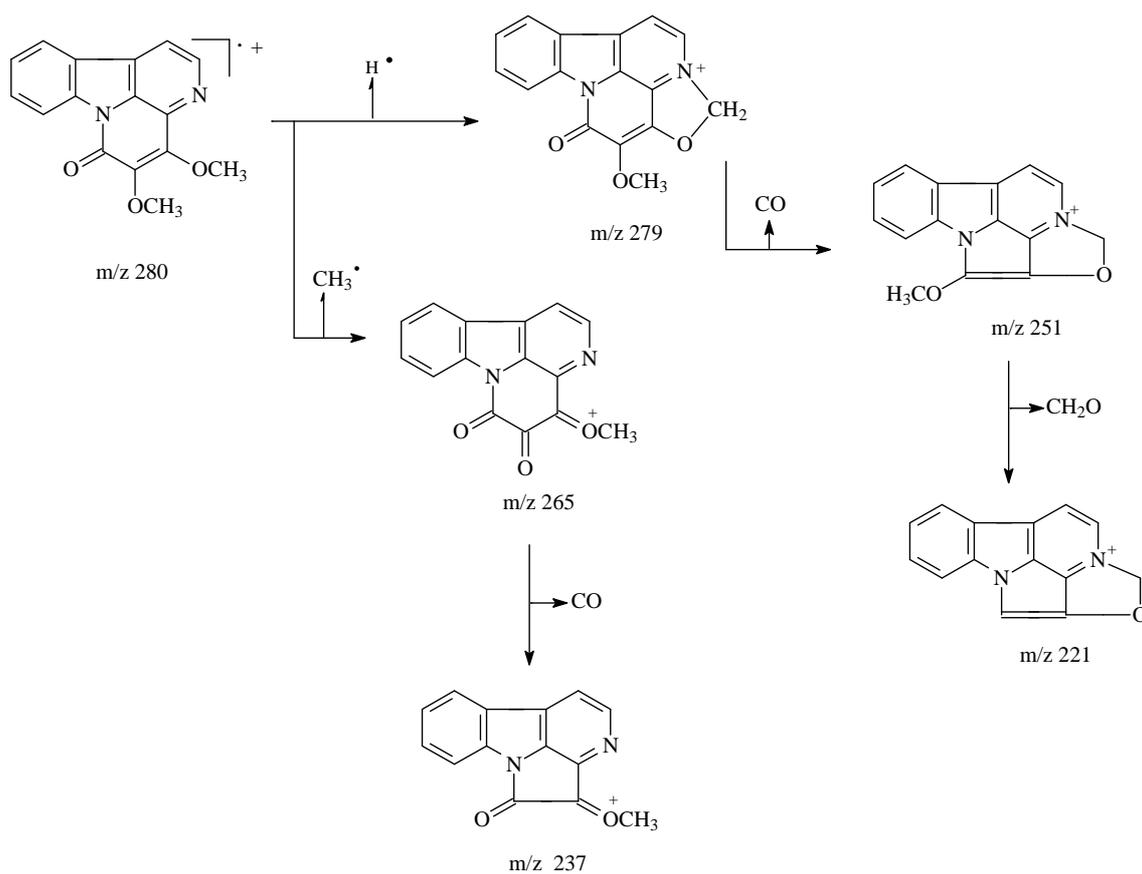


Figura 17 - Proposta das principais fragmentações para SVEFC81.

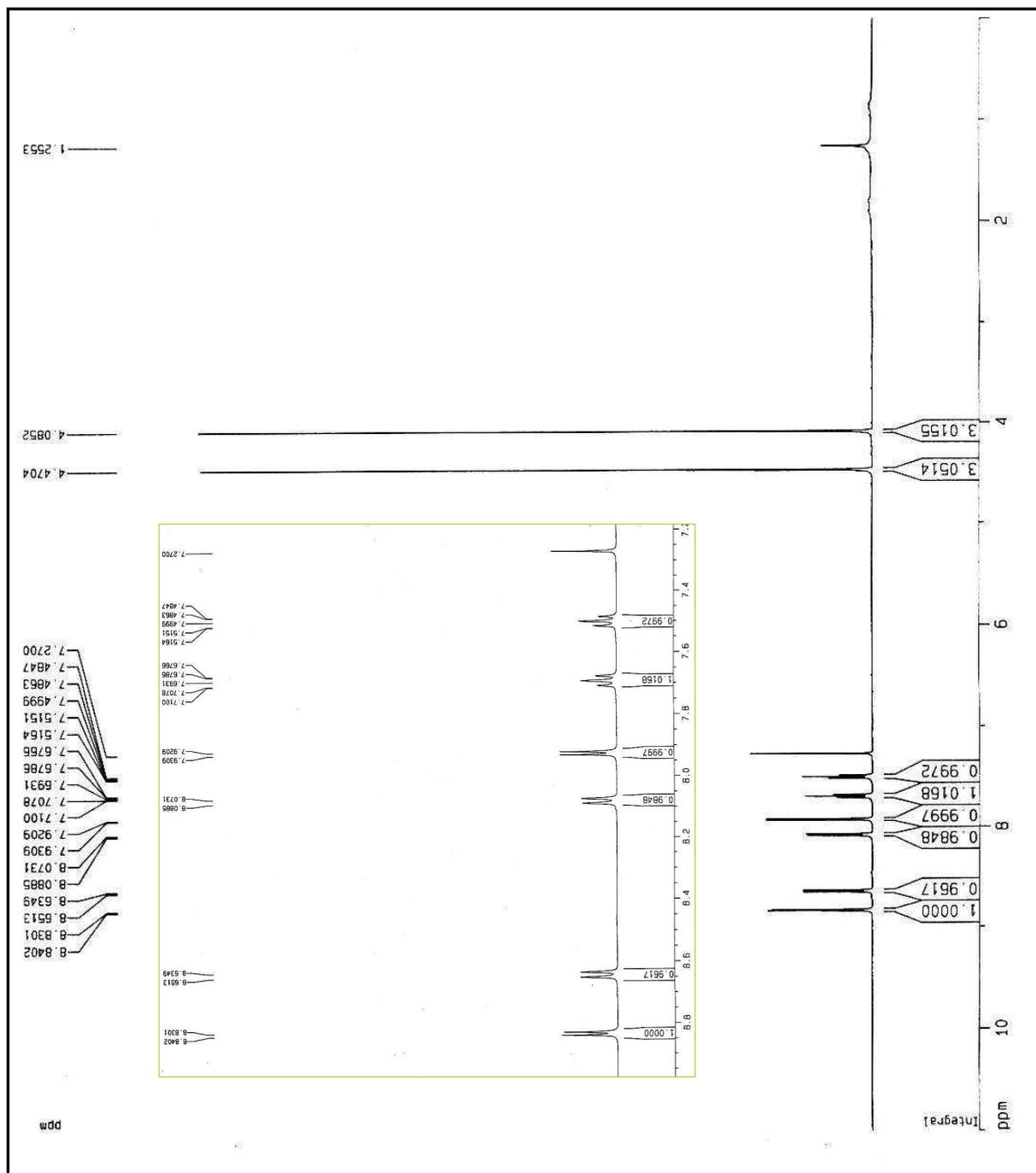


Figura 18 - Espectro de RMN^1H de SVEFC81 em CDCl_3 a 500MHz.

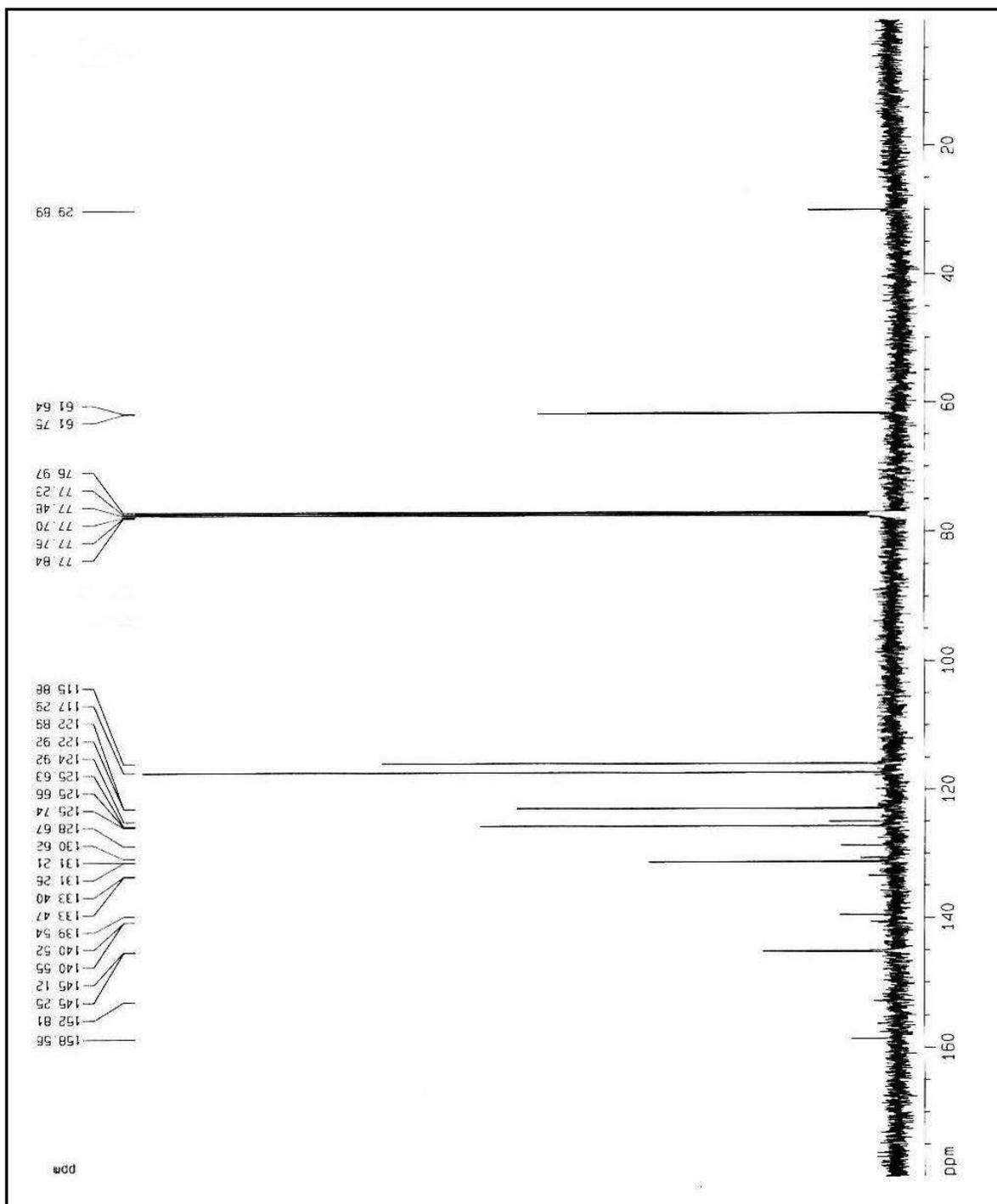


Figura 19 - Espectro de RMN^{13}C -BB de SVEFC81 em CDCl_3 a 125MHz.

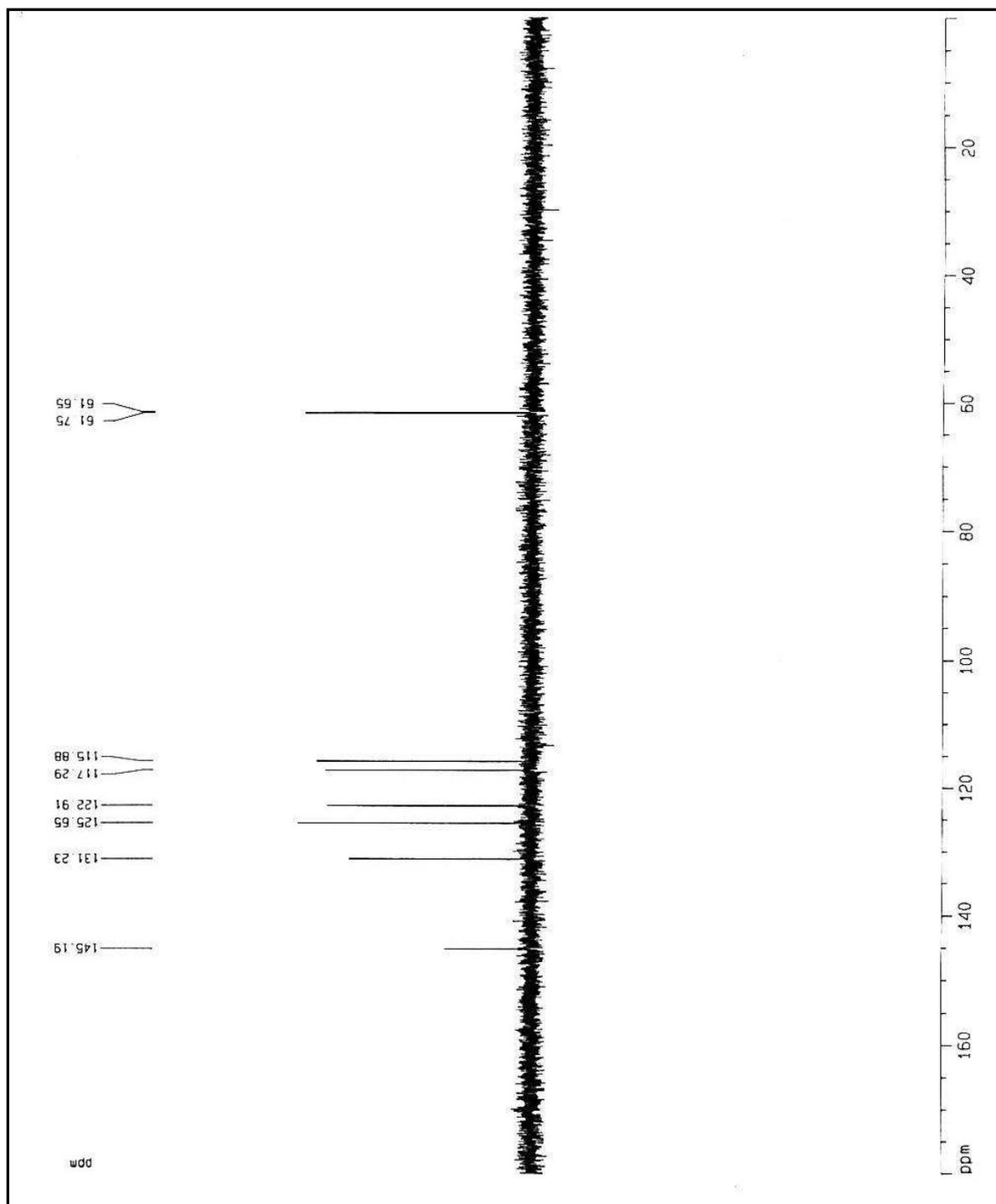


Figura 20 - Espectro de RMN^{13}C – DEPT 135° de SVEFC81 em CDCl_3 a 125MHz.

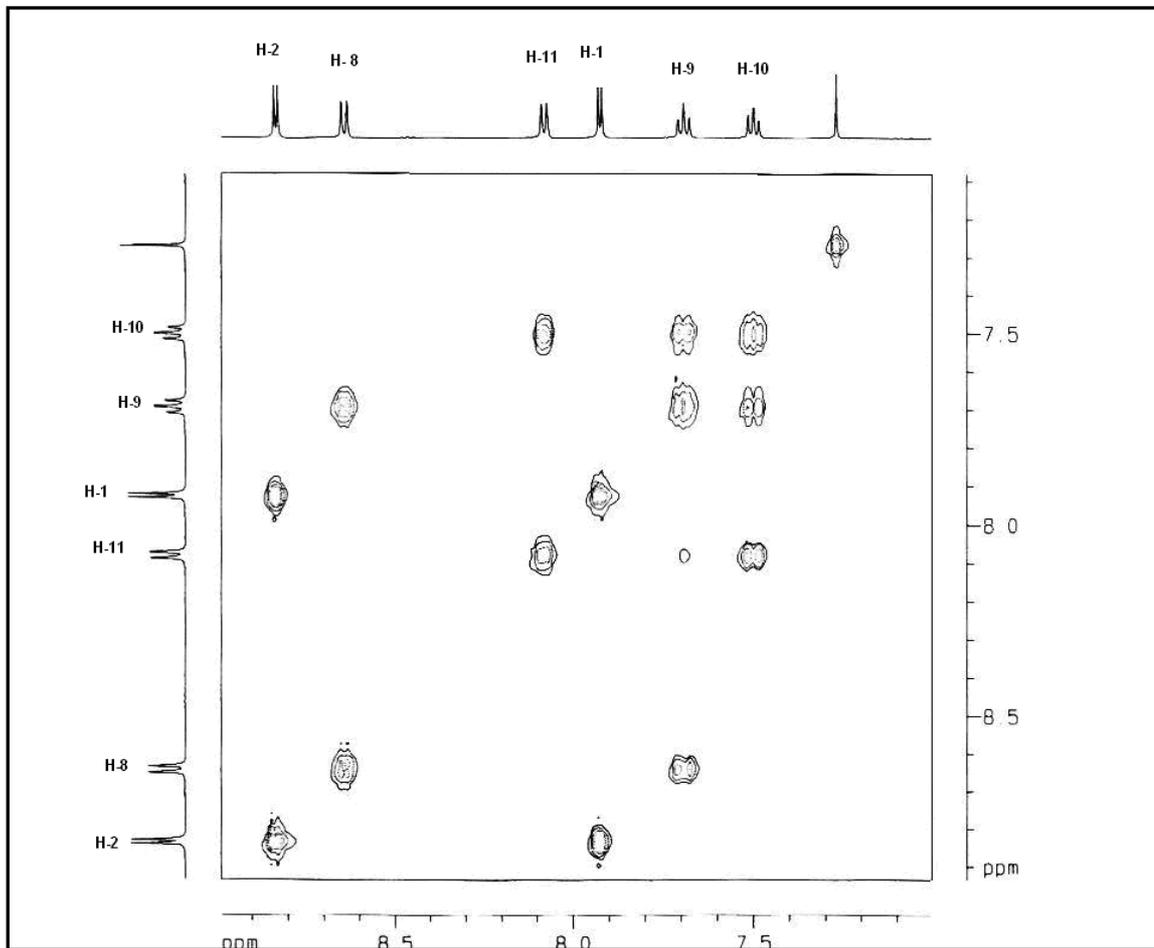


Figura 21 - Espectro de RMN 2-D COSY de SVEFC81, em CDCl_3 a 500 MHz.

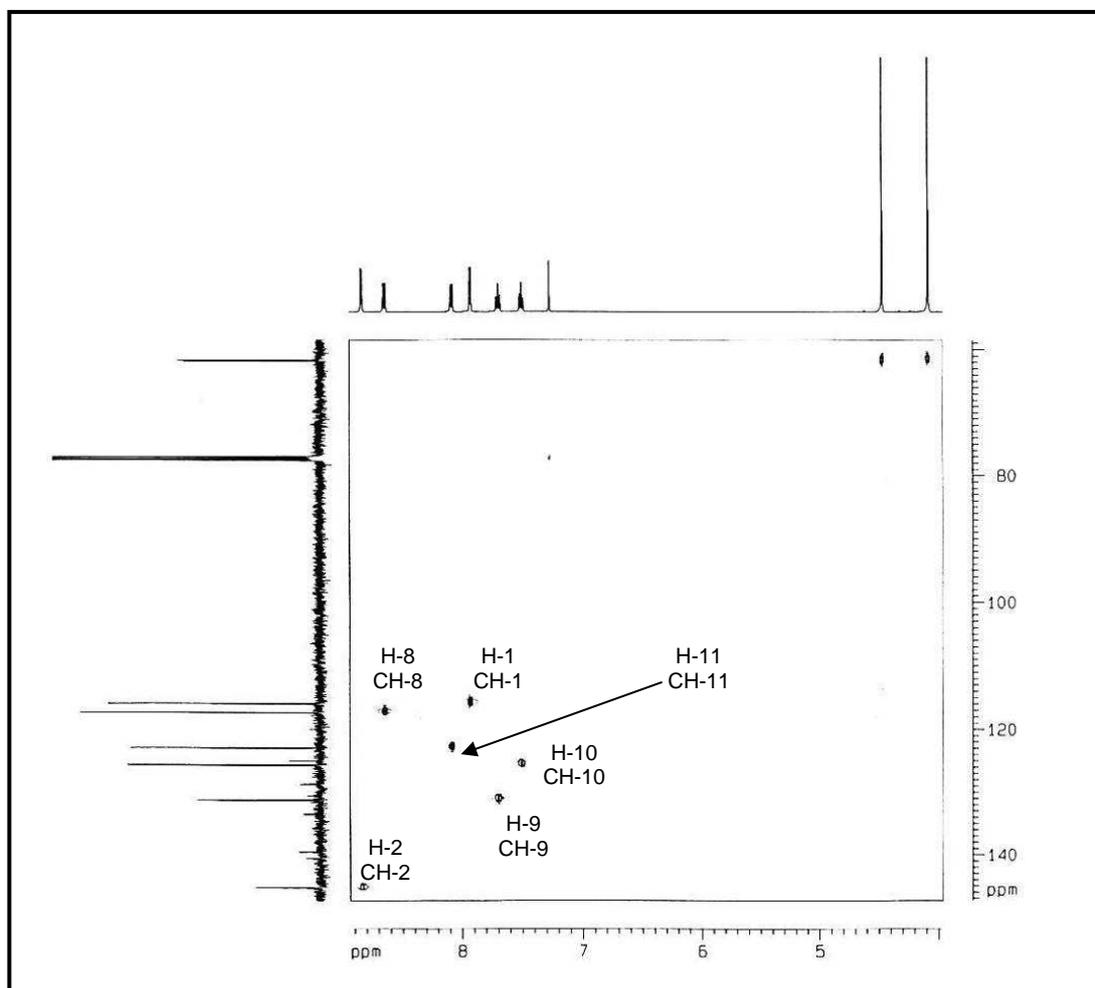
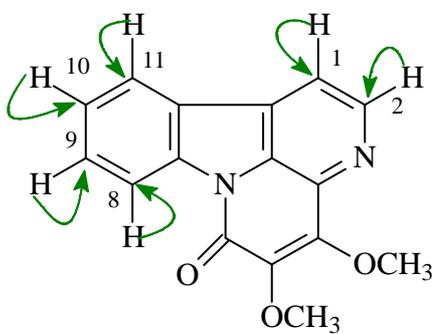


Figura 22 - Espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC81, em CDCl_3 a 500 MHz.



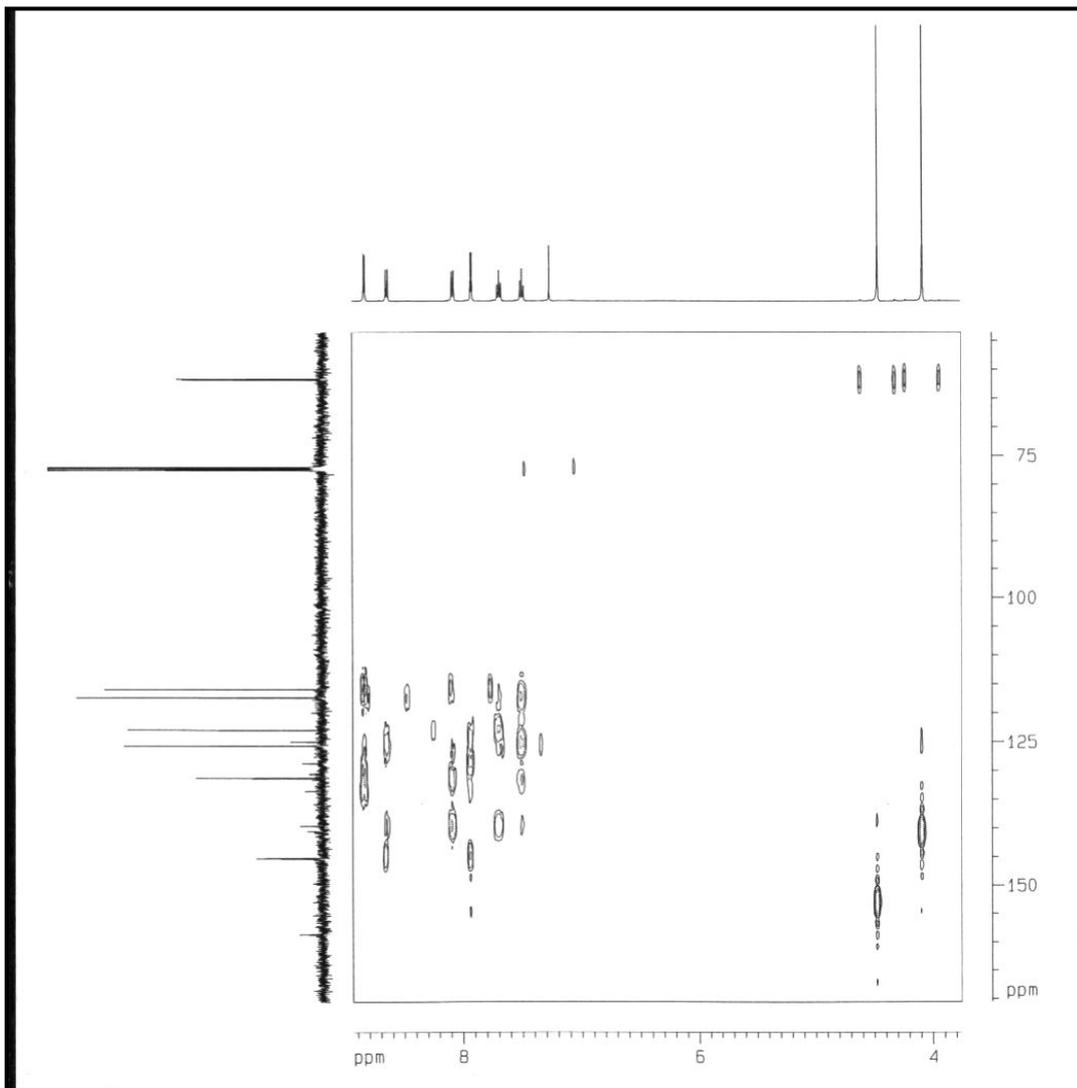
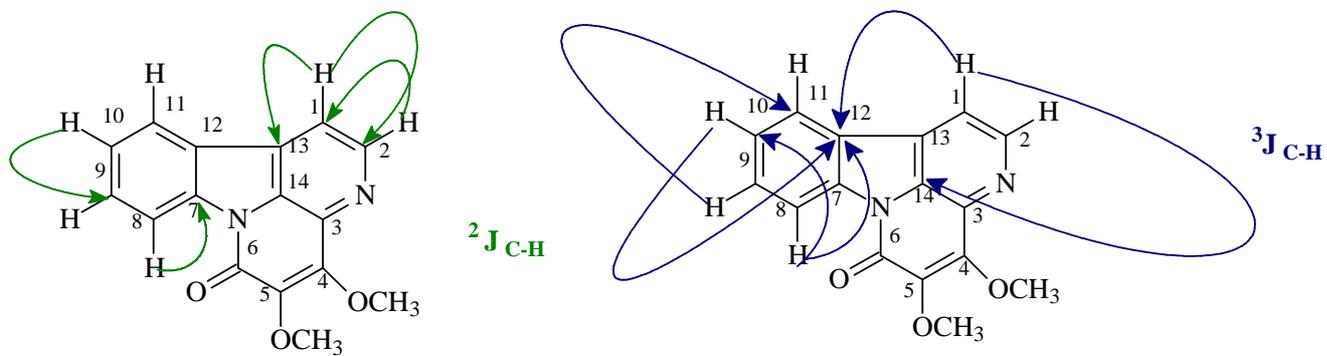


Figura 23 - Espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC81, em CDCl_3 a 500 MHz.



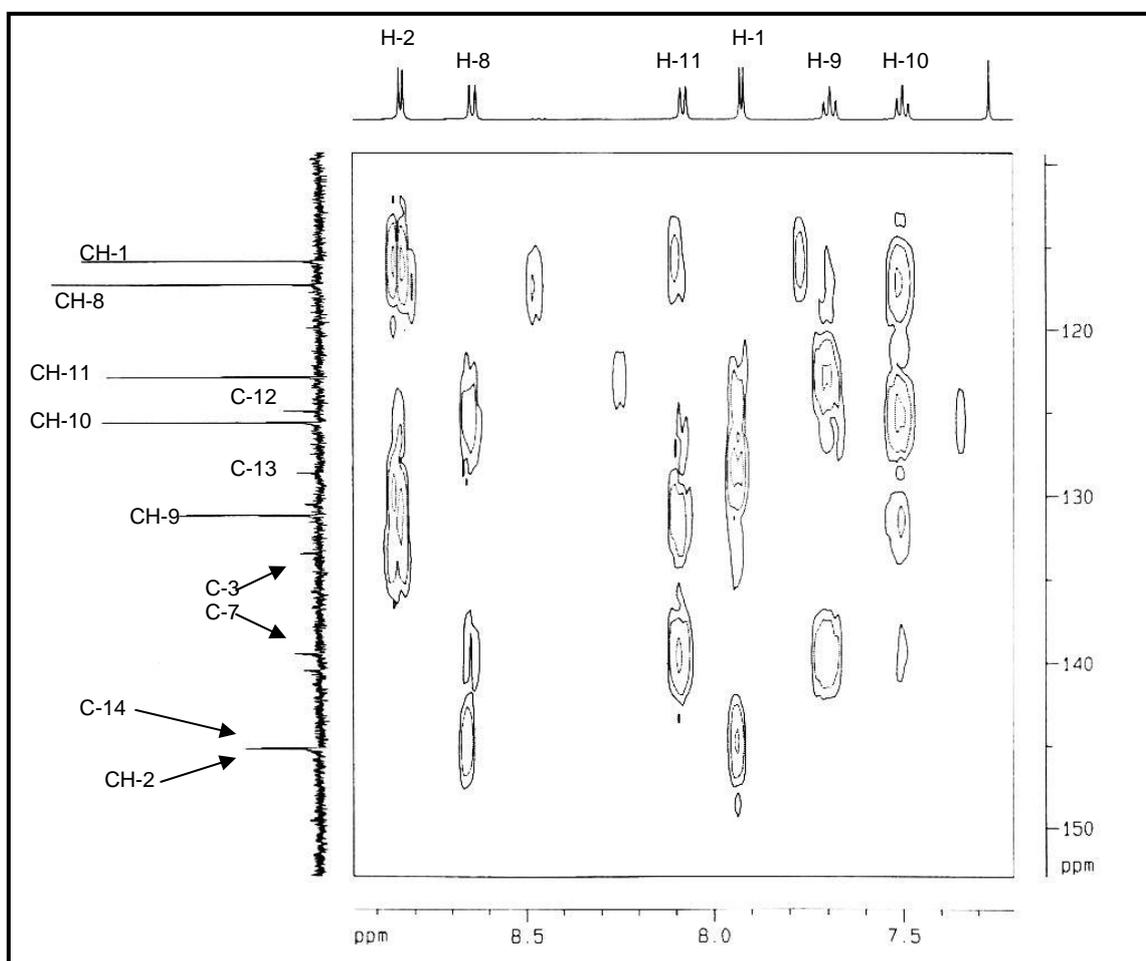
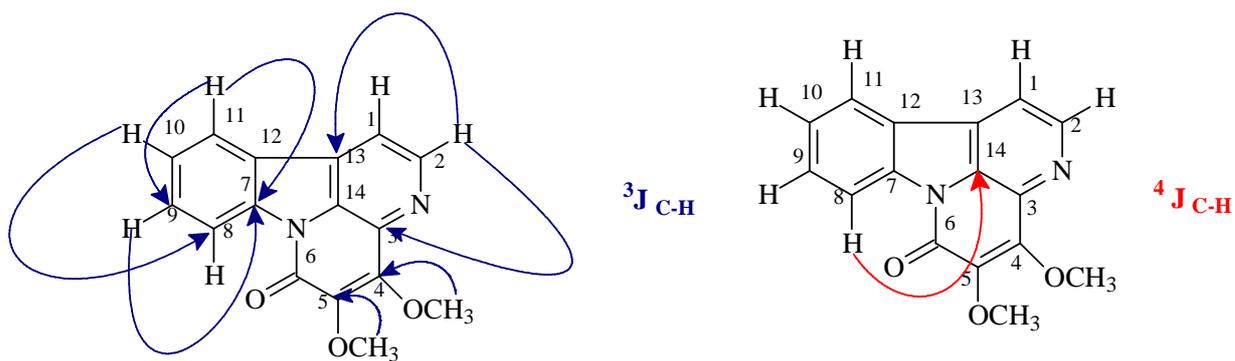
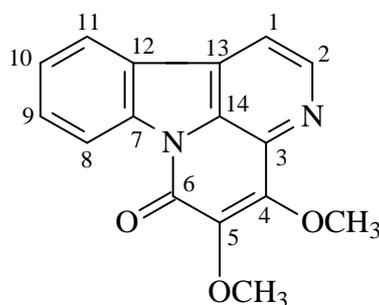


Figura 24 - Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC81, em $CDCl_3$ a 500 MHz.

Tabela 07 - Dados dos espectros de RMN de SVEFC81, comparados com valores descritos na literatura para 4,5-dimetóxicantin- 6-ona (RODRIGUES et al., 1992).

δ em ppm	HSQC		HMBC			LITERATURA (Rodrigues, 1992)	
	δC	δH	² J _{CH}	³ J _{CH}	⁴ J _{CH}	δC	δH
C							
3	133,47	—	—	H -2	—	140,1	—
4	152,81	—	—	CH ₃ O - 4	—	152,4	—
5	140,52	—	—	CH ₃ O - 5	—	139,0	—
6	158,56	—	—	—	—	158,3	—
7	139,54	—	H -8	H -9; H -11	—	138,8	—
12	124,92	—	—	H -8; H -10; H -1	—	124,7	—
13	128,67	—	H -1	H -2	—	129,4	—
14	145,25	—	—	H -1	H -8	133,7	—
CH							
1	115,88	7,93 (d, J = 5,0 Hz)	H -2	—	—	115,6	7,89 (d, J = 5,1 Hz)
2	145,12	8,84 (d, J = 5,0 Hz)	H -1	—	—	145,3	8,81 (d, J = 5,1 Hz)
8	117,29	8,65 (dl, J = 8,2 Hz)	—	H -10	—	116,9	8,60 (dd, J = 8,0; 1,0 Hz)
9	131,26	7,69 (td, J = 8,0; 1,1 Hz)	H -10	H -11	—	130,7	7,67 (td, J = 8,0; 1,3Hz)
10	125,66	7,49 (td, J = 8,0; 0,7 Hz)	—	H -8	—	125,3	7,47(dt, J = 8,0; 1,0 Hz)
11	122,92	8,08 (dl, J = 7,7 Hz)	—	H -9	—	122,5	8,04 (dd, J = 8,0; 1,0 Hz)
CH₃O							
4	61,75	4,47 (s)	—	—	—	61,4	4,67 (s)
5	61,64	4,08 (s)	—	—	—	61,3	4,08 (s)



4,5-dimetóxicantin- 6-ona

4.3. Determinação Estrutural de SVEFC/PGD

Do fracionamento cromatográfico em coluna aberta, usando gel de sílica, foi obtido o composto denominado de SVEFC/PGD isolado da oitava subfração oriunda da fração clorofórmica, do extrato etanólico da casca do caule da *Simarouba versicolor*, como mostra o fluxograma 03, pág. 104. Sua determinação estrutural foi realizada através da análise dos espectros de massa, RMN¹H, ¹³C-BB, HMBC, HSQC, NOESY como também o espectro de absorção na região do infravermelho e por comparação com os dados da literatura (Hirota et al., 1991) conforme tabela 08, pág. 73.

Este composto foi isolado sob a forma de um sólido amorfo branco, solúvel em clorofórmio. A substância, denominada SVEFC/PGD, apresentou ponto de fusão entre 268,6-270,2 °C.

4.3.1. Espectrometria no Infravermelho de SVEFC/PGD

O espectro de absorção na região do infravermelho de SVEFC/PGD (Fig. 25, pág. 59) mostrou absorção em 1084 cm⁻¹ sendo atribuído à deformação axial de ligação C-O associados aos ésteres e/ou álcoois secundários. As vibrações entre 1234 e 1115 cm⁻¹ são referentes à cetona cíclica, absorções moderadas em consequência das vibrações de deformação axial e angular de C-C-C do grupo cetona cíclica; em 1726 cm⁻¹ é associado à deformação axial de C=O de ésteres carboxílicos e lactonas e a absorção em 2920 cm⁻¹ é atribuída a ligações C-H.

4.3.2. Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 de SVEFC/PGD.

Os espectros de RMN¹H (500MHz em CDCl₃) e RMN ¹³C-BB (125MHz, em CDCl₃) de SVEFC/PGD (Fig. 28 e 29, pág. 61 e 62) apresentaram sinais característicos do esqueleto básico dos quassinóides tipo C₂₀ (Fig. 03, pág. 11).

A análise do espectro de massa (Fig. 26, pág. 60) apresentou o pico do íon molecular com razão massa/carga, de 406 daltons, que corresponde ao peso molecular do composto, cuja fórmula molecular deduzida foi C₂₂H₃₀O₇. As principais fragmentações estão expostas na figura 27, pág. 60.

O espectro de RMN ^{13}C -BB de SVEFC/PGD (Fig. 29, pág. 62) apresentou 22 linhas espectrais, dentre as quais quatro correspondentes a carbonos de grupo carbonila, corroborando com as informações extraídas do espectro do infravermelho. As absorções em δ_{C} 202,31 (C-12) e 212,80 (C-1) foram atribuídas a carbonilas de cetona não conjugadas, as absorções em δ_{C} 168,84 (C-16) e 170,41 (AcO-11) foram compatíveis com carbonilas de lactonas e éster, respectivamente.

Fundamentado nos dados dos espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135°, (Fig. 30, pág. 63), verificou-se ainda dois carbonos não hidrogenados, em δ_{C} 35,66 (C-8) e 49,65 (C-10). Identificou-se também a presença de três carbonos metilênicos em δ_{C} 26,45 (C-6), 28,51 (C-15) e 49,00 (C-3) ratificados no espectro do HSQC (Fig. 31, pág. 64) através da correlação dos seus respectivos hidrogênios.

Verificaram-se cinco sinais referentes a grupos metilas em δ_{C} 12,82 (C-19), metila característica de quassinóides ligada ao C-10, em δ_{C} 20,55 (AcO-11) e 21,92 (C-30), que mostraram correlação com singletos em δ_{H} 1,31, δ_{H} 2,03 e δ_{H} 1,56 no espectro do HSQC (Fig. 31, pág. 64) denotando que essas três metilas estão ligadas a carbonos não hidrogenados. Observa-se ainda sinais em δ_{C} 10,74 (C-18) e 18,39 (C-29) esse ligada ao carbono C-4 comum nos quassinóides. A expansão do espectro de HSQC (Fig. 33, pág. 66) mostra a correlação dos dois carbonos (C-18 e C-29) com os dubletos em δ_{H} 1,06 (d, $J = 6,7$ Hz) e 0,92 (d, $J = 6,4$ Hz), respectivamente.

Três sinais em δ_{C} 70,12 (C-2), 74,89 (C-11) e 81,87 (C-7) são atribuídos a carbonos sp^3 metínicos oxigenados, tendo o último, maior deslocamento em relação ao carbono oxigenado do anel lactônico. Estes e os demais carbonos metínicos foram elucidados com maior facilidade e precisão através das associações dos espectros do HSQC (Fig. 31, pág. 64) e HMBC (Fig. 34, pág. 67).

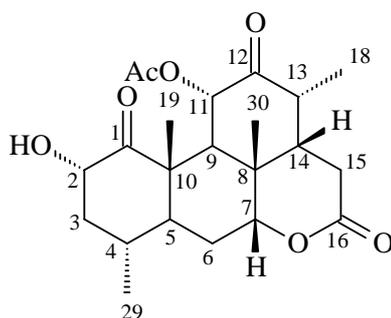
4.3.3. Espectros de HSQC, HMBC e NOESY de SVEFC/PGD.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação, HSQC (Fig. 31, pág. 64) permitiu afirmar de forma inequívoca os acoplamentos de todos os hidrogênios com seu respectivo carbono, como podem ser observados nos espectros de HSQC (Fig. 31 a 33, pág. 64 a 66) e na tabela 08, pág. 73.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C com detecção no canal de hidrogênio HMBC (Fig. 34, pág. 67) mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação de hidrogênio e carbono ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$). Foram observadas mais de 45 correlações, o que permitiu fazer atribuições inequívocas dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios. Estas correlações estão expostas nos espectros de HMBC (Fig. 34 a 38, pág. 67 a 71) e na tabela 08, pág. 73.

O espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – NOESY (500MHz, em CDCl_3) de SVEFC/PGD (Fig. 39, pág. 72) foi de grande importância na determinação da conformação espacial do composto. Revelou o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 2,19 (H-14) com os três hidrogênios da metila-18 (3H-18, δ_{H} 1,06). Os acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 3,04 (H-13) e δ_{H} 5,29 (H-11 axial) com os hidrogênios da metila-30 em δ_{H} 1,56 (3H-30). Já os hidrogênios em δ_{H} 2,01 (H-4) e δ_{H} 4,73 (H-2 axial) acoplaram com os três hidrogênios da metila-19 (3H-19). Verificou-se também o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 1,48 (H-5 axial) com os três hidrogênios da metila-29 (3H-19, δ_{H} 0,92), (Fig. 39, pág. 72).

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para a substância SVEFC/PGD através da análise desses dados e a comparação dos valores espectrais descritos na literatura revelou um composto análogo, a amarolida diacetato (Hirota et al., 1991). Concluiu-se que o SVEFC/PGD tratava-se da 11-acetilamarolida, um quassinóide que já havia sido isolado na espécie *Simarouba versicolor* (Arriaga et al., 2002), (Tab. 08, pág. 73).



11-Acetilamarolida

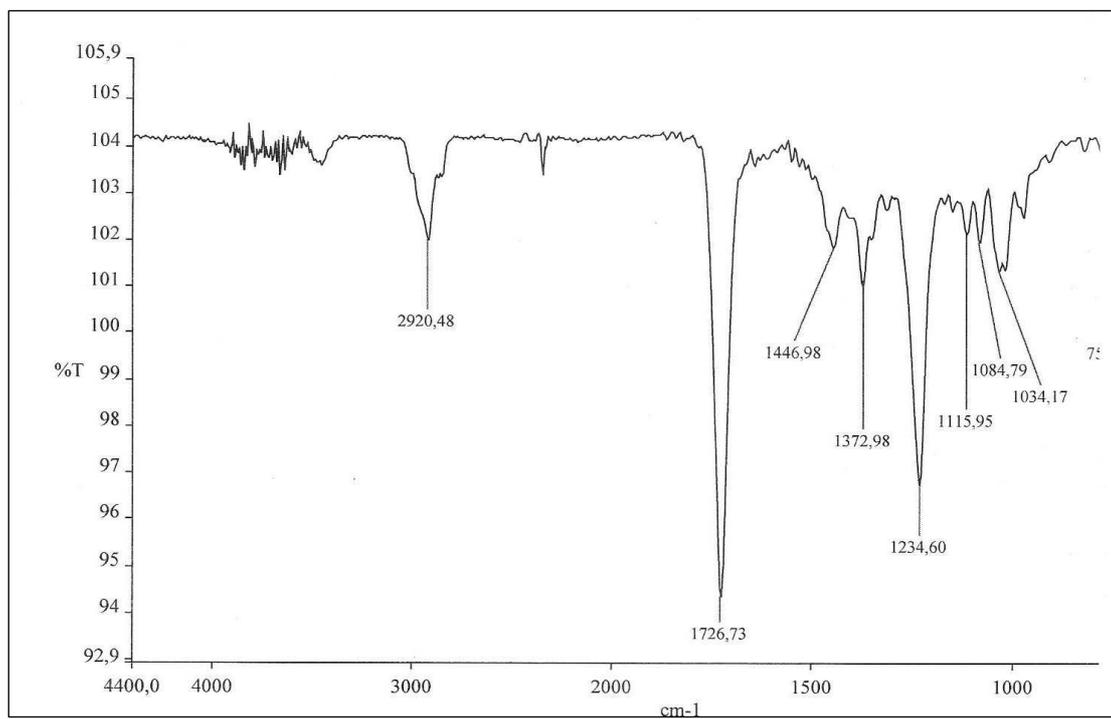


Figura 25 - Espectro de absorção de infravermelho de SVEFC/PGD.

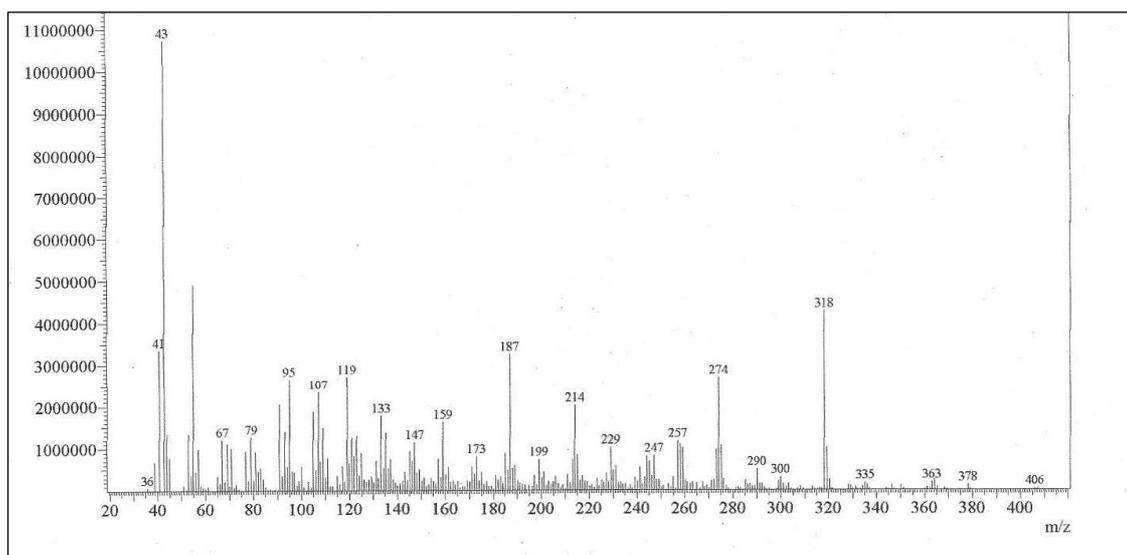


Figura 26 - Espectro de massa de SVEFC/PGD.

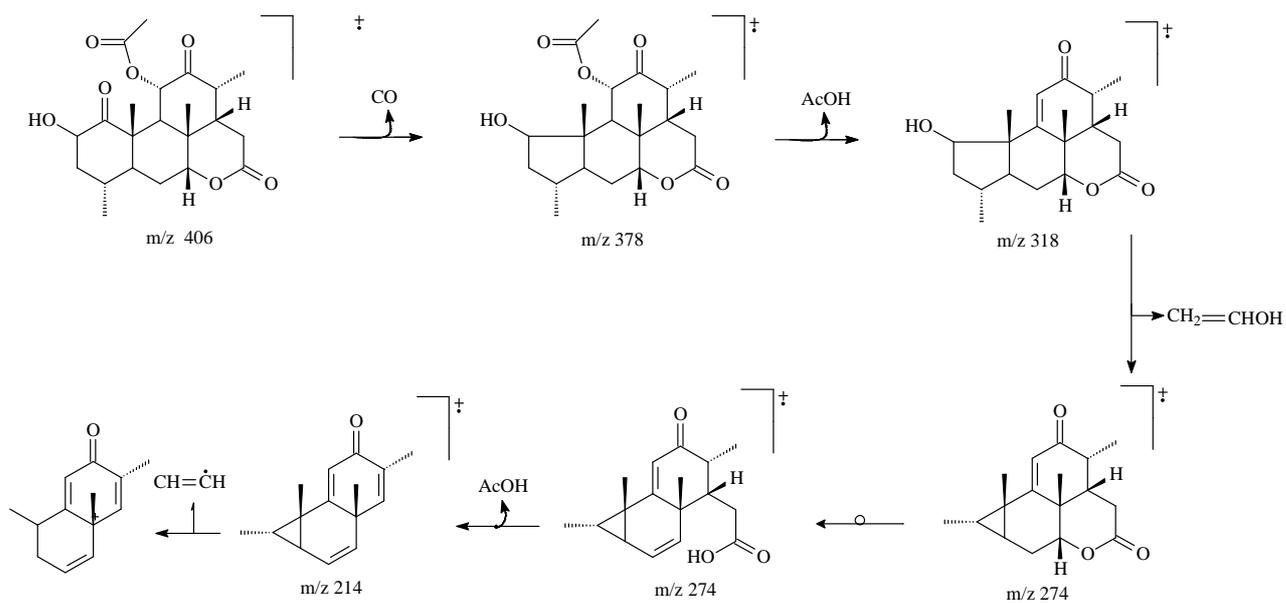


Figura 27 - Proposta das principais fragmentações para SVEFC/PGD.

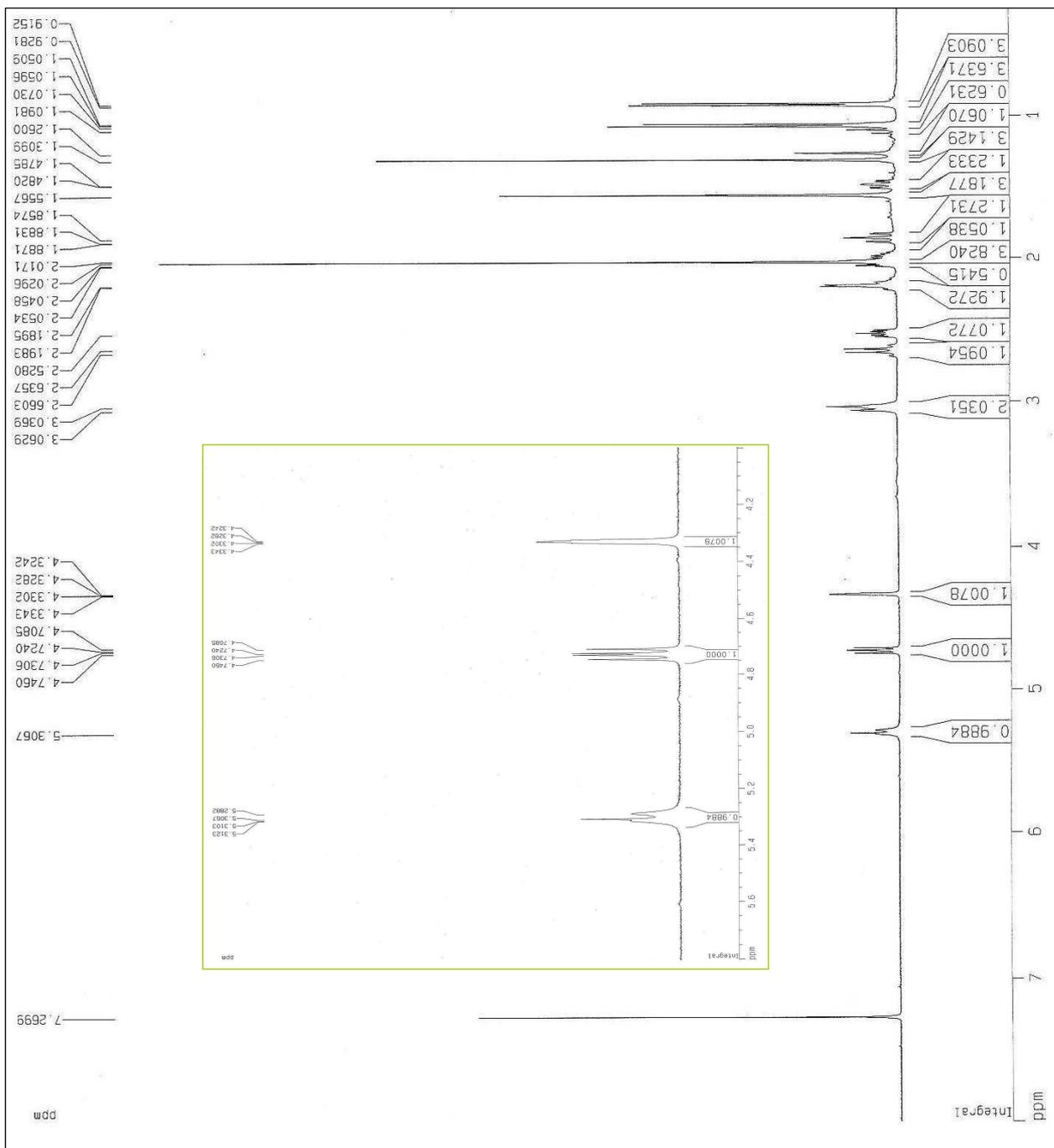


Figura 28 - Espectro de RMN¹H de SVEFC/PGD em CDCl₃ a 500MHz.

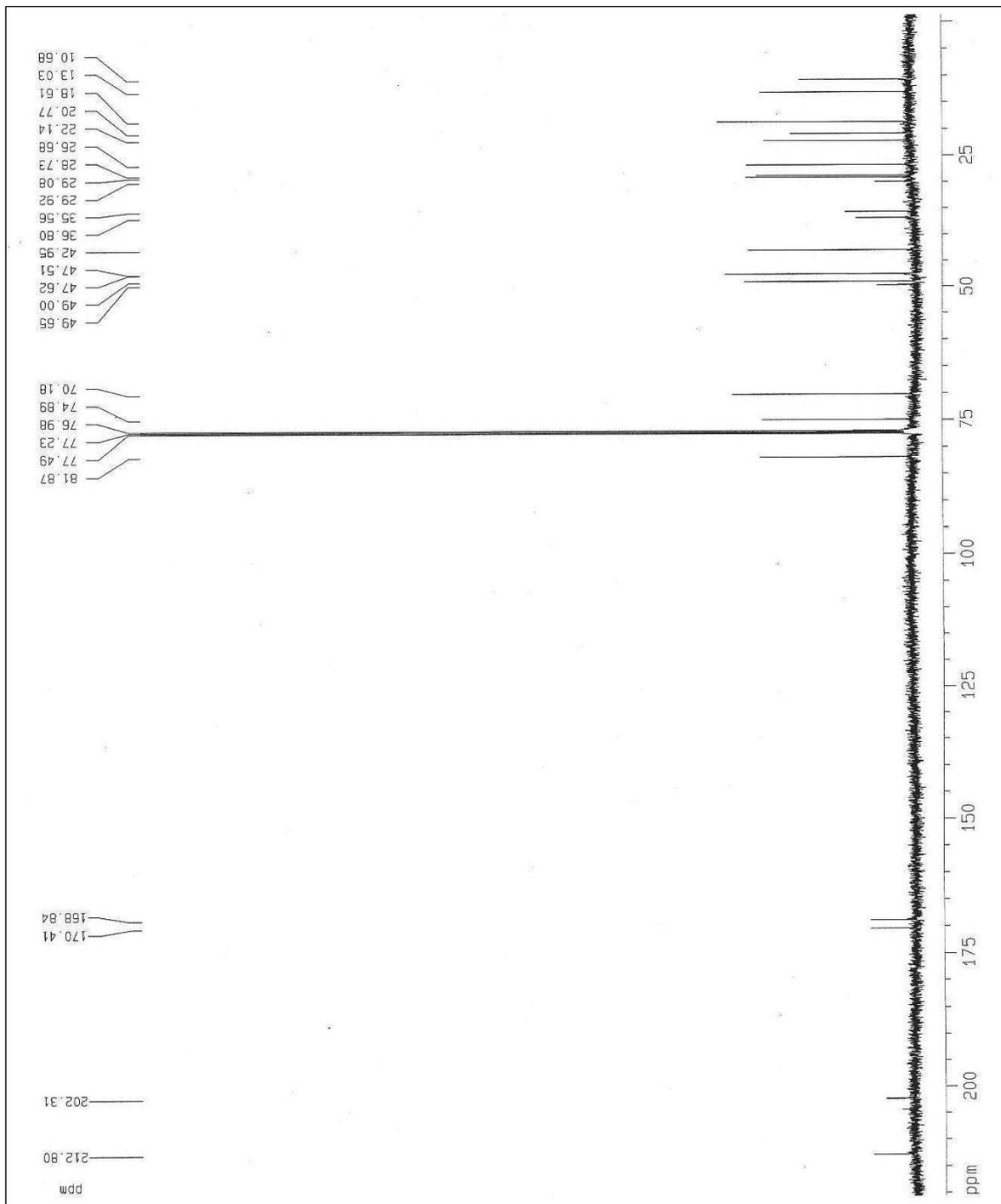


Figura 29 - Espectro de RMN^{13}C -BB de SVEFC/PGD em CDCl_3 a 125MHz.

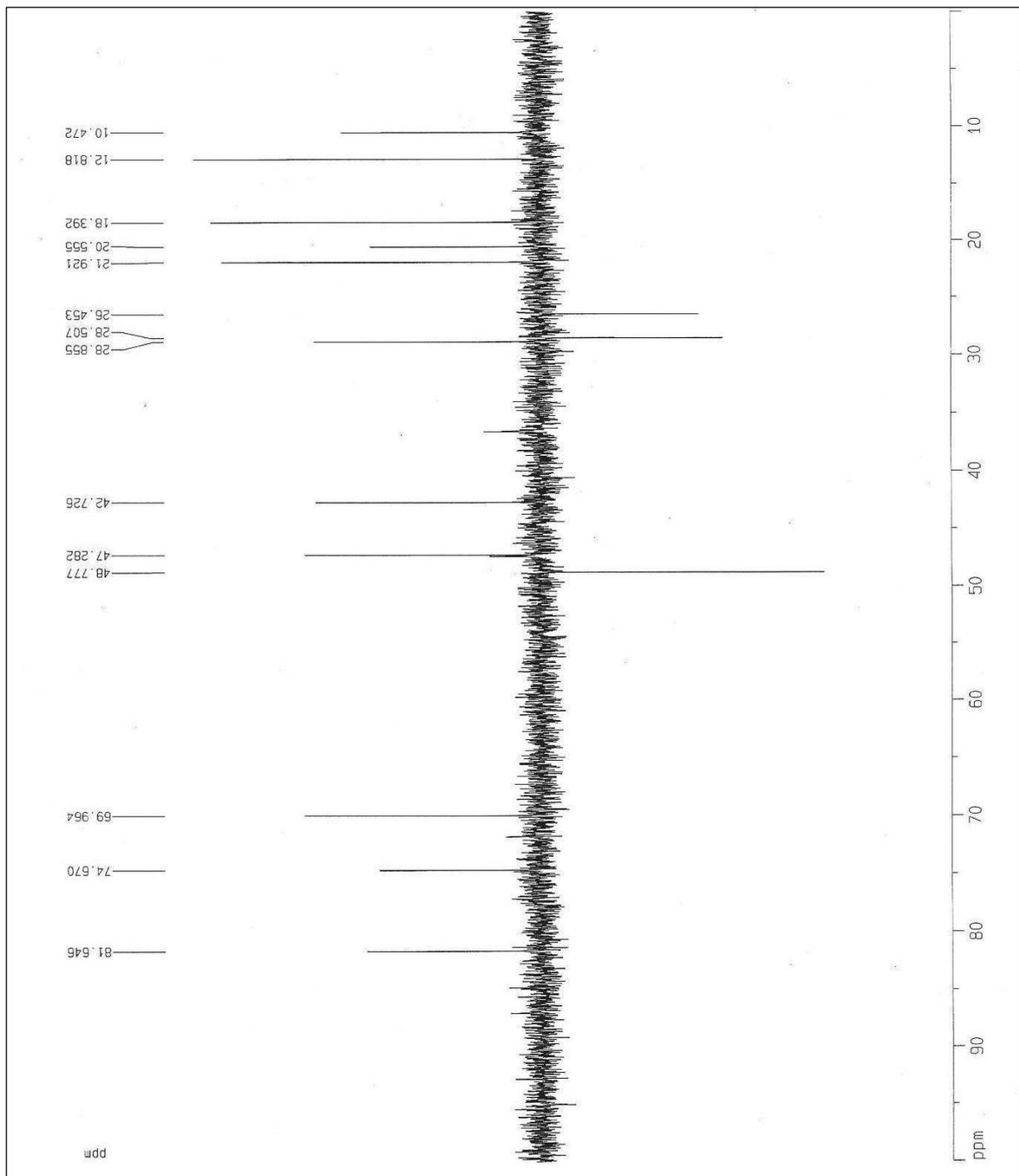


Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de SVEFC/PGD em CDCl_3 a 125MHz.

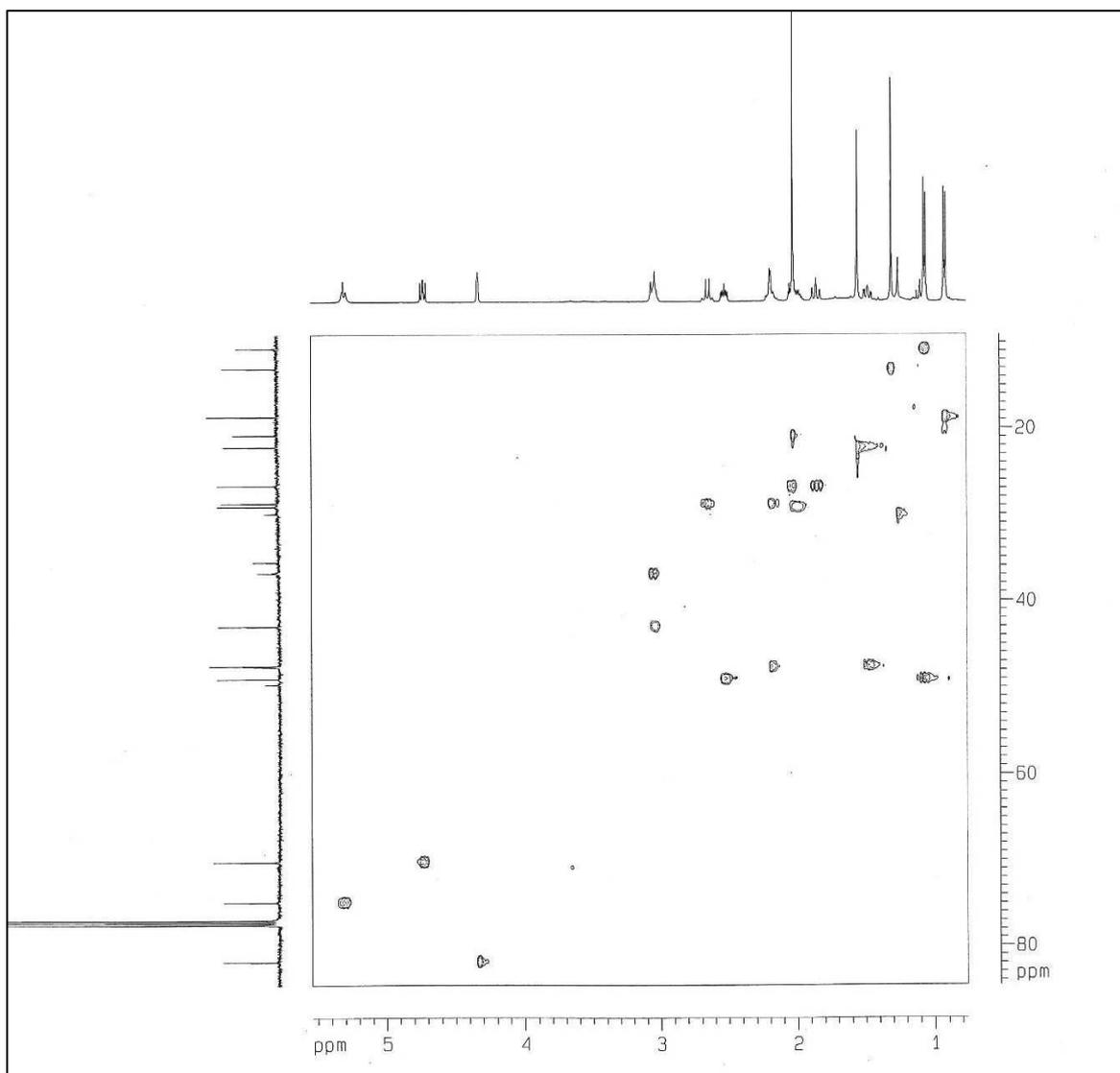


Figura 31 - Espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

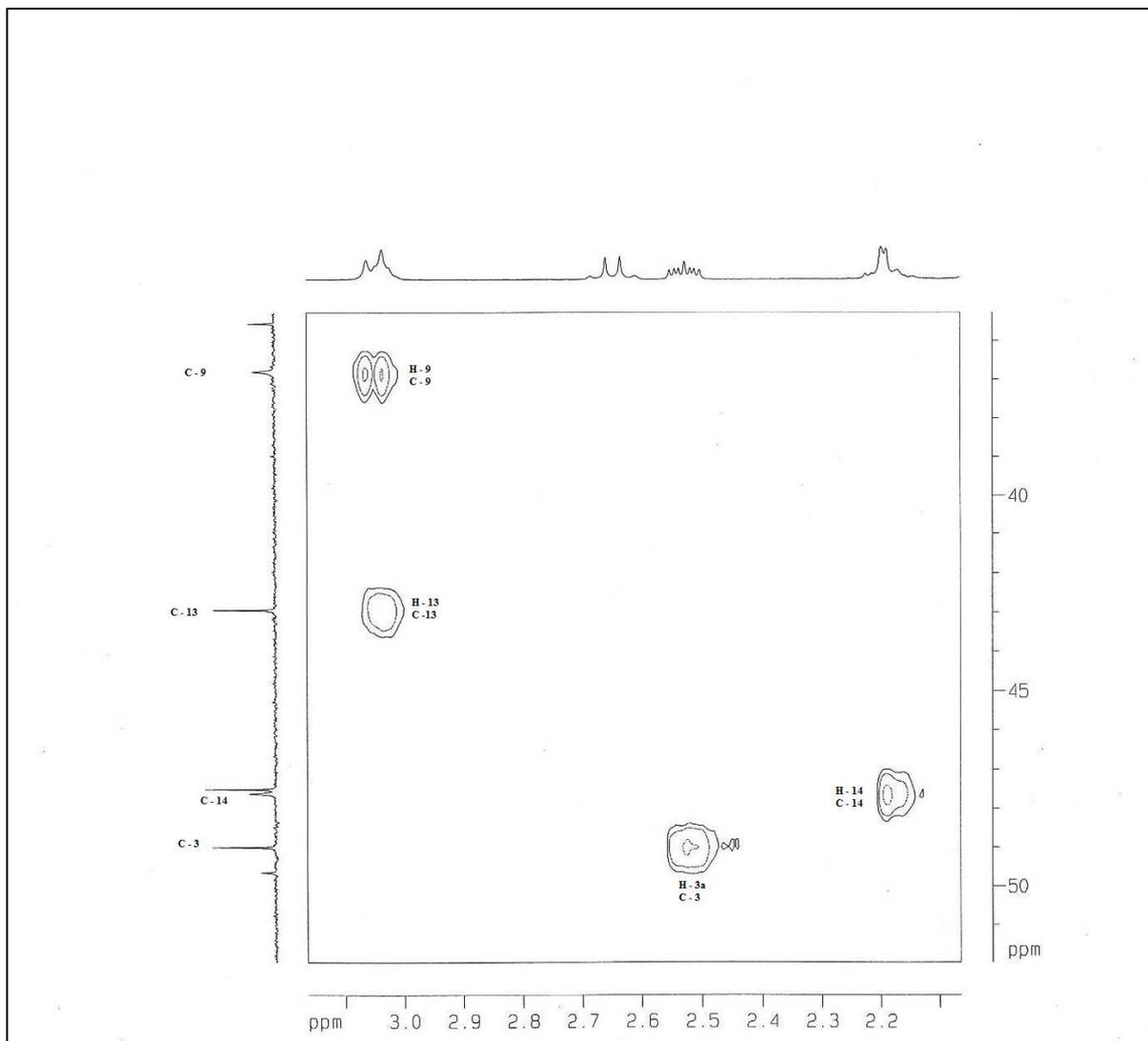


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

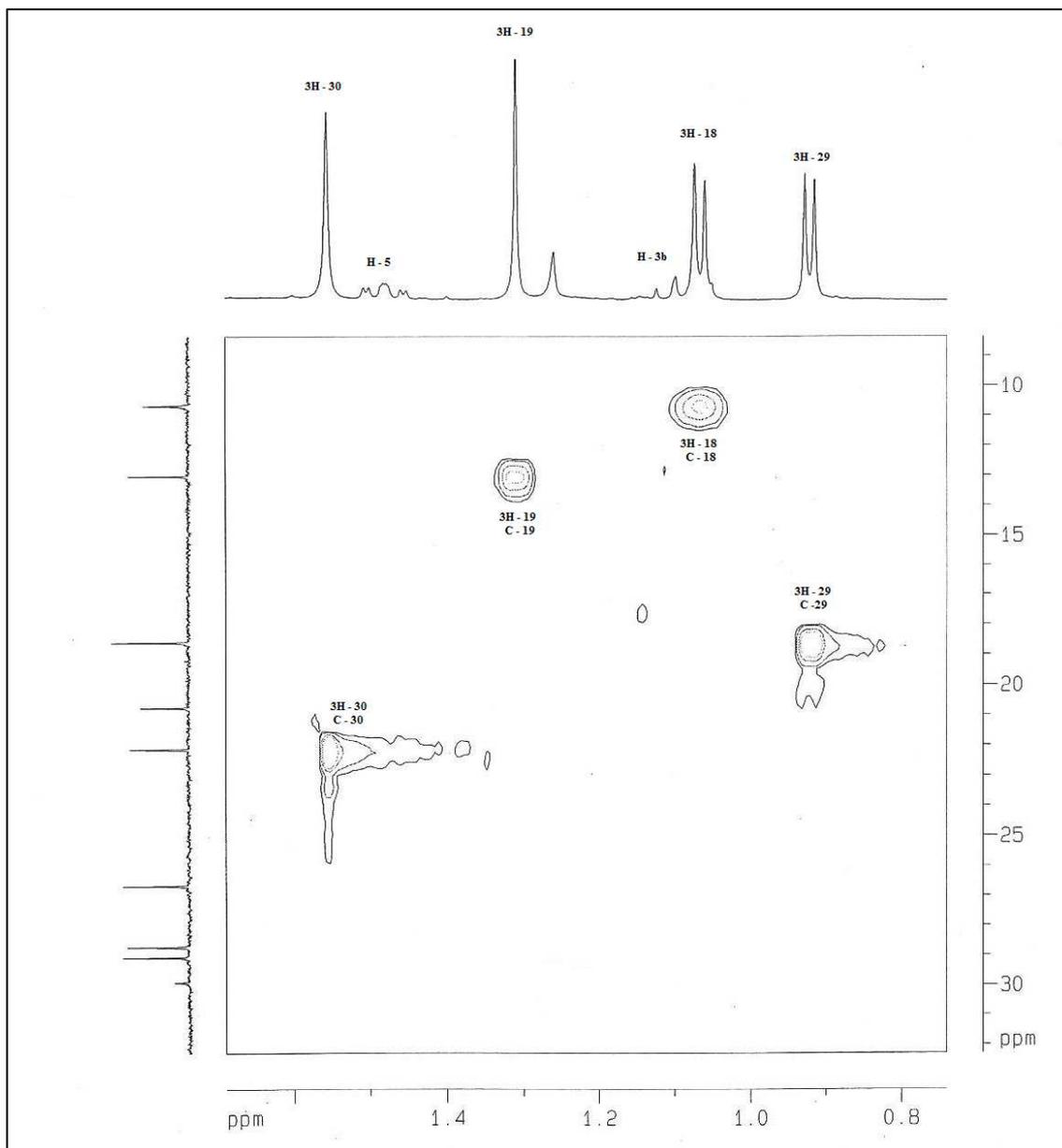


Figura 33 - Expansão do espectro de RMN 2-D HSQC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

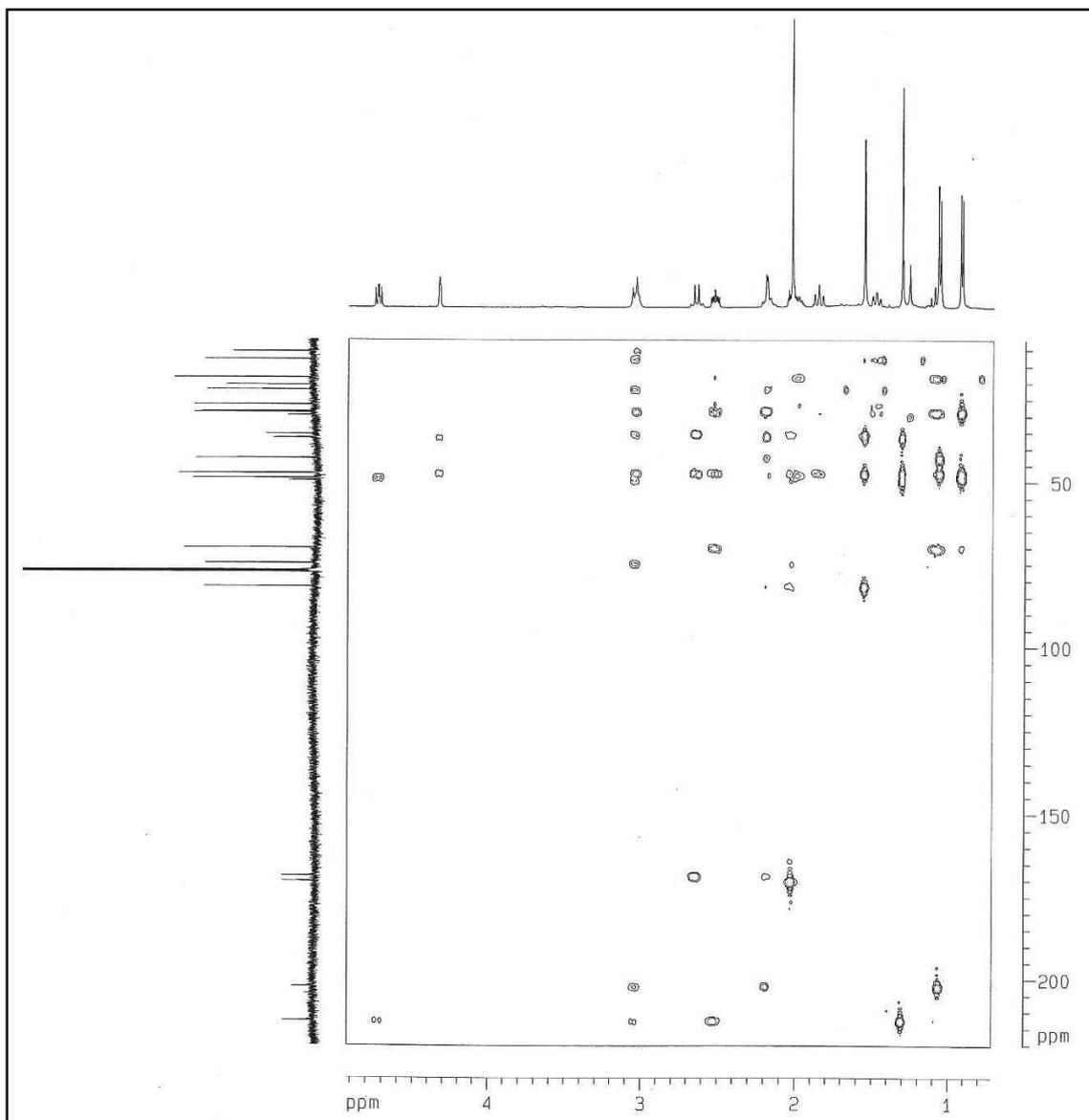


Figura 34 - Espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

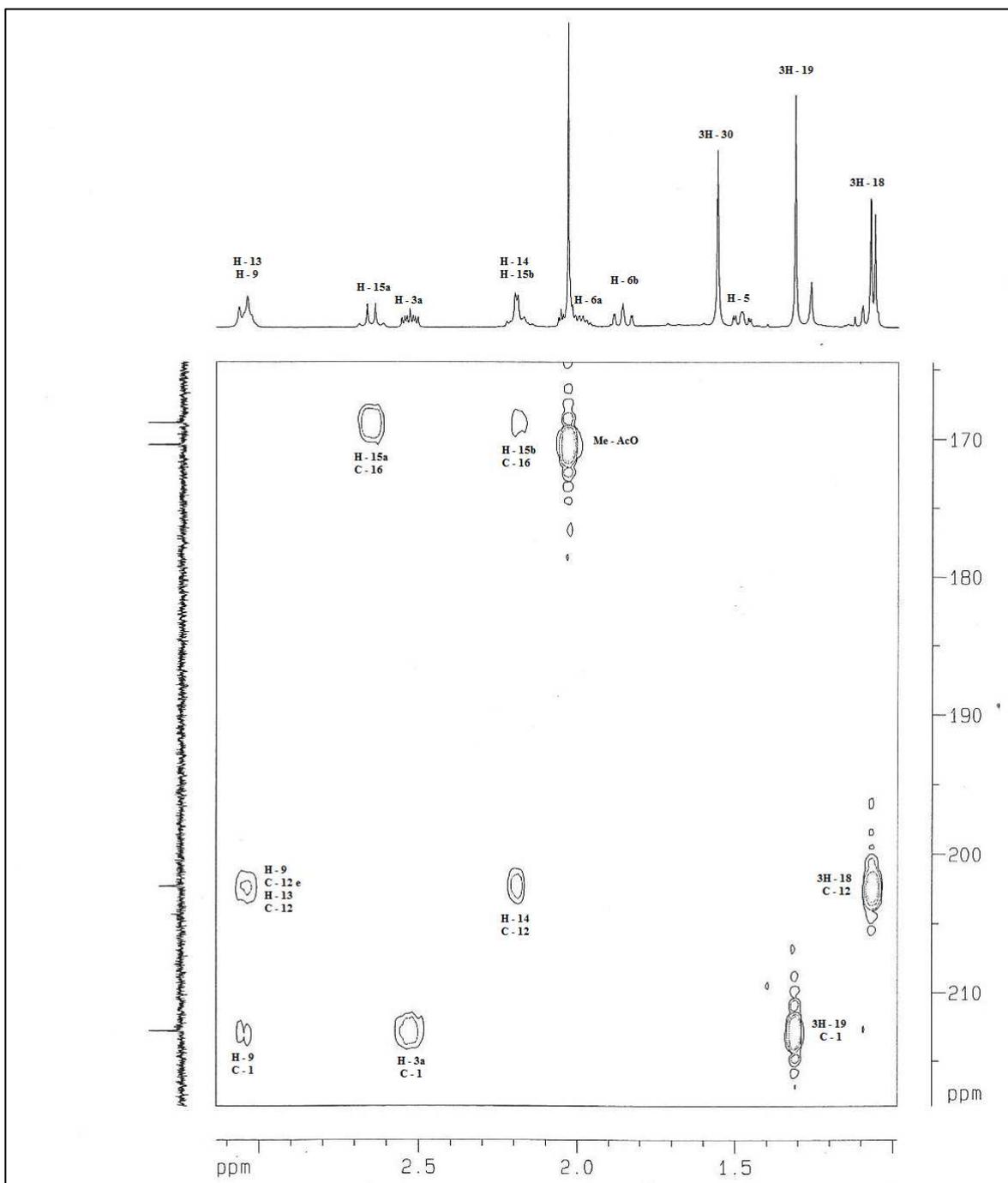


Figura 35 - Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

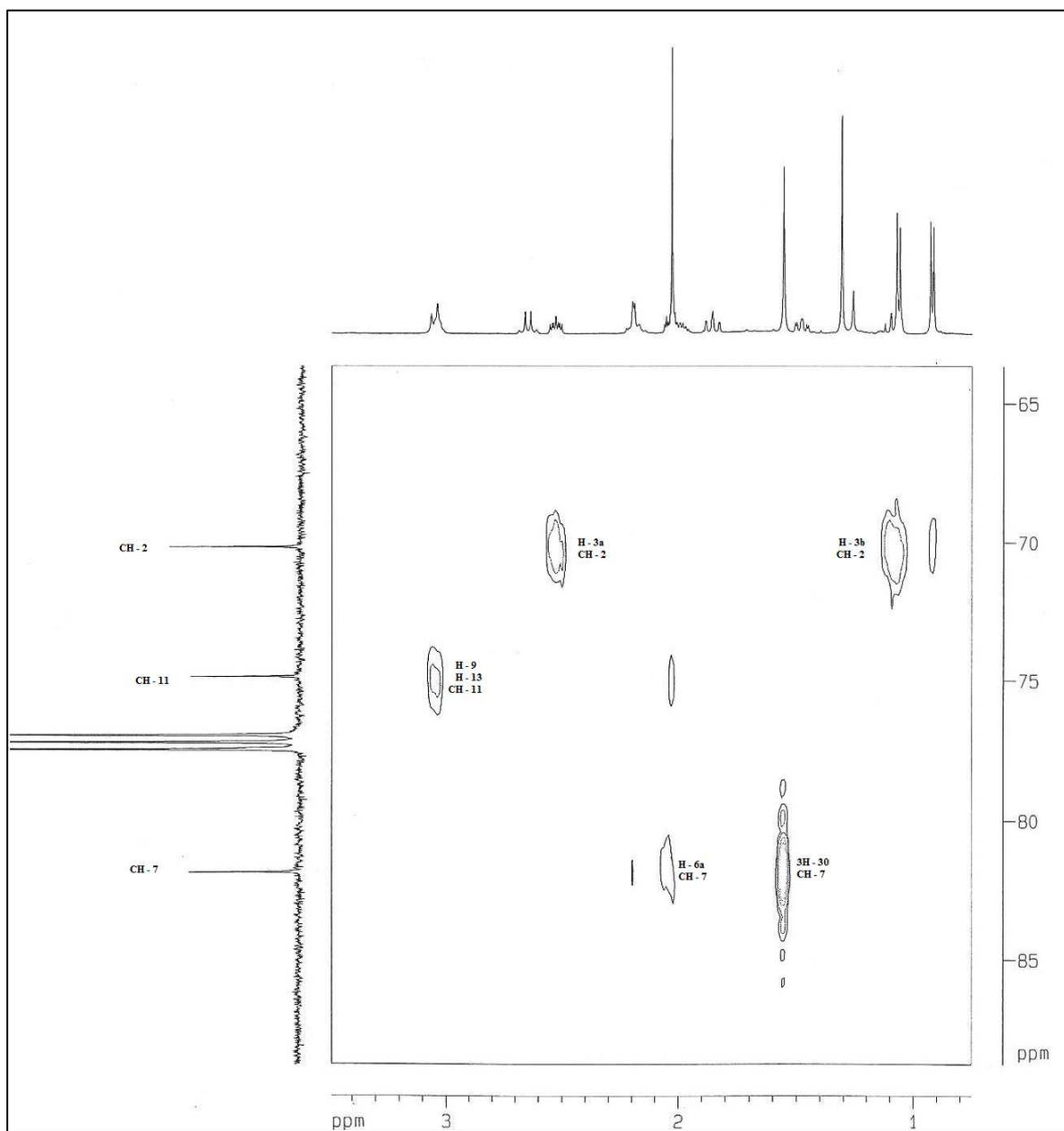


Figura 36 - Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

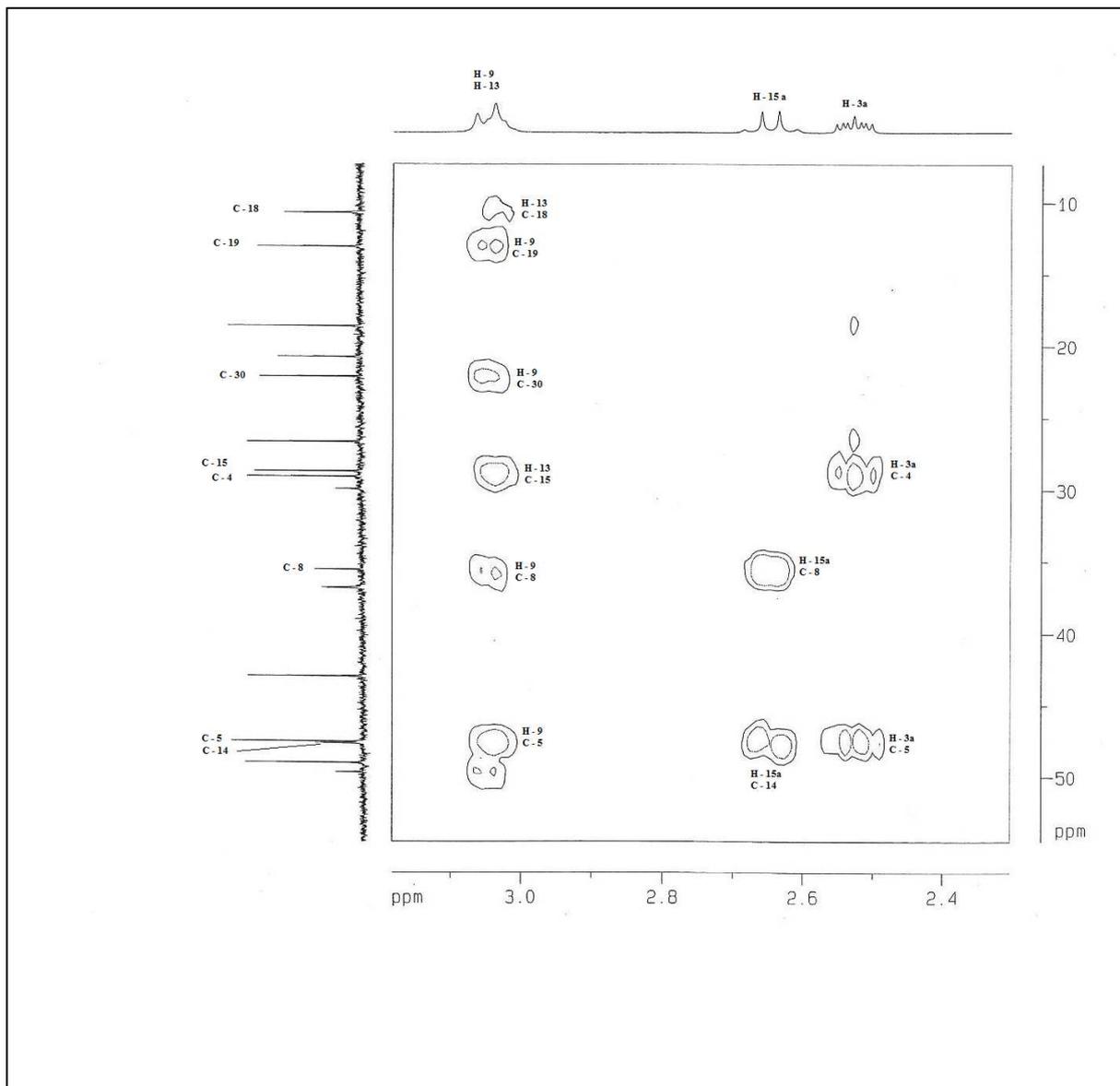


Figura 37 - Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl₃ a 500 MHz.

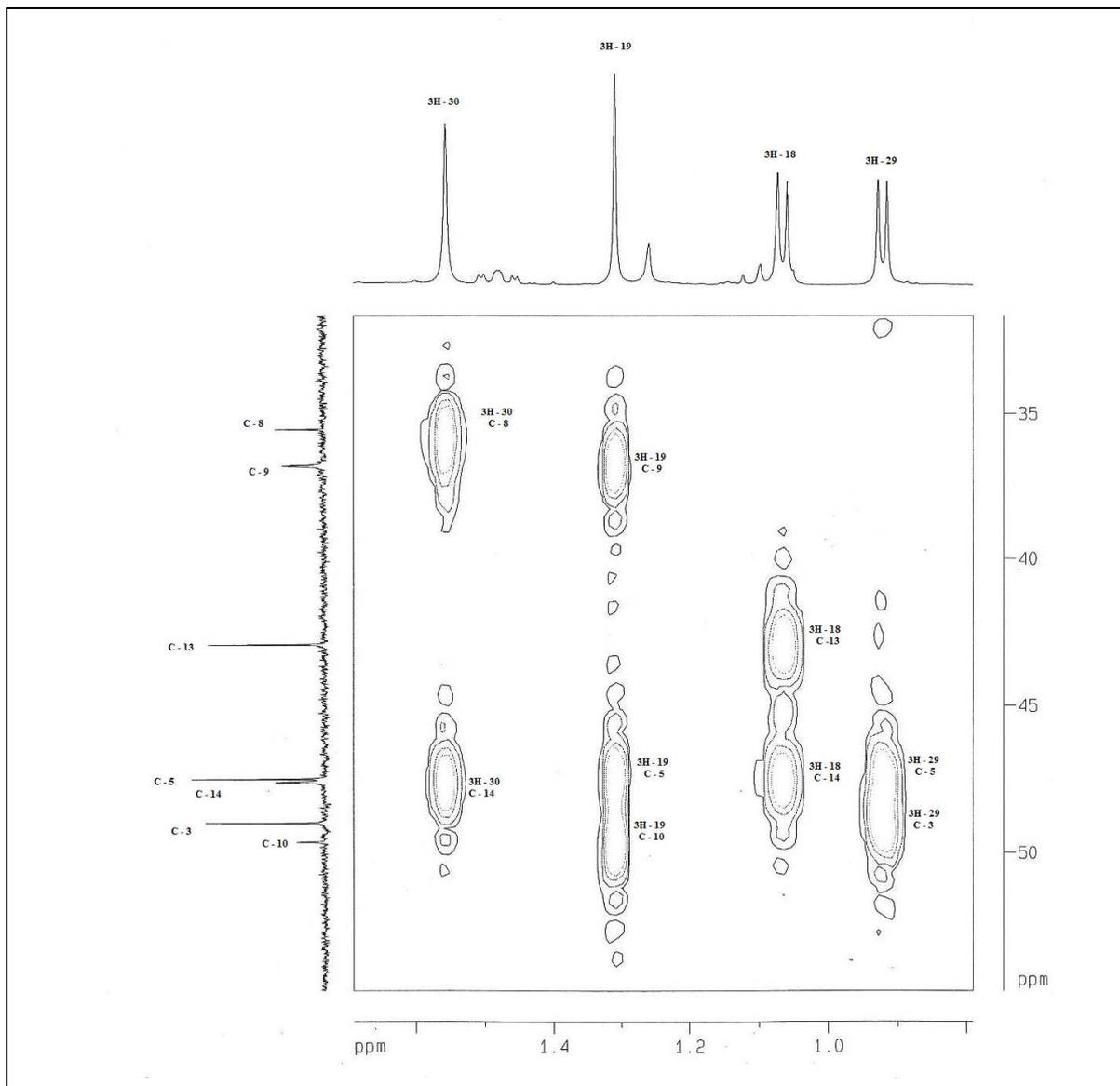


Figura 38 - Expansão do espectro de RMN 2-D HMBC de SVEFC/PGD, em CDCl_3 a 500 MHz.

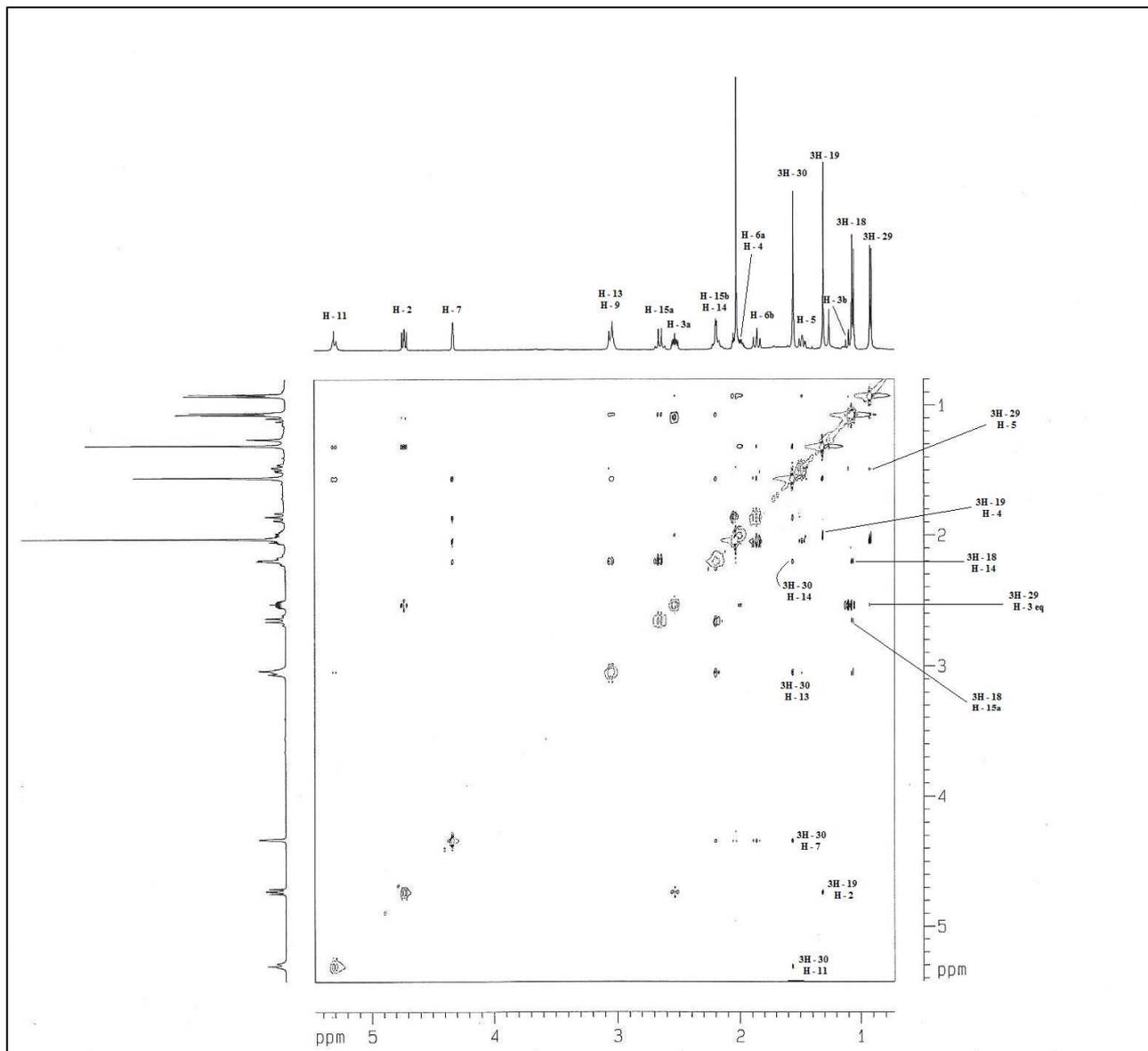


Figura 39 - Espectro de NOESY do SVEFC/PGD em $CDCl_3$.

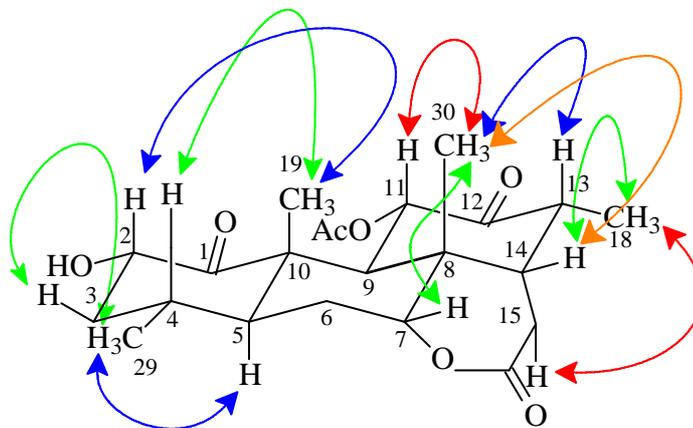


Tabela 08 - Dados dos espectros de RMN de SVEFC/PGD, comparados com valores descritos na literatura do composto análogo, amarolida diacetato (Hirota et al., 1991).

δ em ppm	HSQC		HMBC		LITERATURA (Hirota et al., 1991)	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
1	212,80	—	H-2	H -3a; H-9; 3H-19	205,1	—
8	35,66	—	H-7;H-9, 3H-30	H -6a; H-15a	35,5	—
10	49,65	—	3H-19	H-2	50,1	—
12	202,31	—	—	H-9; H-14; 3H-18	201,9	—
16	168,84	—	2H -15	—	168,3	—
AcO-11	170,41	—	Me/AcO	—	171,0	—
AcO-2	—	—	—	—	169,8	—
CH						
2	70,12	4,73 (dd, J = 11,0; 7,7 Hz), H-2ax	2H -3	—	72,3	5,56 (dd, J = 12,0; 8,0 Hz)
4	28,85	2,01 (m)	H -3b; 3H-29	—	29,0	—
5	47,28	1,48 (dt, J = 14,8; 2,5 Hz), H-5ax	2H-6	H-3a; 3H-19; 3H-29	46,7	—
7	81,87	4,92 (dd, J = 3,0; 2,0 Hz), H-7eq	H-6a	H -14; 3H-30	81,7	4,31 (dd, J = 3,3Hz)
9	36,80	3,05	—	H -14; 3H-19; 3H-30	36,3	2,99 (d, J = 14,0 Hz)
11	74,89	5,29 (dl, J = 12,0 Hz), H-11ax	H-9	H-13	74,5	5,30 (d, J = 14,0 Hz)
13	42,94	3,04	H-14; 3H-18	H-15b	42,2	—
14	47,62	2,19	H-15a	H-7; 3H-18; 3H-30	47,2	—
CH₂						
3	49,00	2,54 (m), 1,12 (t, 11,1 Hz), H-3ax	—	3H-29	42,7	—
6	26,45	2,05 (m), 1,86 (dt, 14,8; 2,0 Hz)	—	—	26,5	—
15	28,51	2,65; 2,17	H-14	H-13	28,5	—
CH₃						
18	10,47	1,06 (d, 6,7 Hz)	H-13	—	10,4	1,04 (d, J = 7,5 Hz)
19	12,82	1,31 (s)	—	H-9	12,5	1,39 (s)
29	18,39	0,92(d, 6,4 Hz)	H-4	H-3b	18,5	0,98 (d, J = 7,0 Hz)
30	21,92	1,56 (s)	—	H-9; H-14	21,9	1,57(s)
AcO-11	20,55	2,03 (s)	—	—	20,5	2,12(s)
AcO-2	—	—	—	—	20,4	2,12(s)

4.4. Determinação Estrutural de SVEFA – AZ

A fração SVEA 3.2 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração SVEA (Tab. 28, pág. 105) forneceu através de recristalização em acetato de etila um sólido amorfo branco, solúvel em piridina com ponto de fusão entre 286,0 - 288,2 °C, que foi codificada SVEFA-AZ (Fluxograma 04, pág. 107).

A determinação estrutural veio através de análise dos dados espectrais de RMN¹H e ¹³C-BB e comparação com dados da literatura (VOUTQUENNE et al., 1999).

4.4.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de SVEFA - AZ.

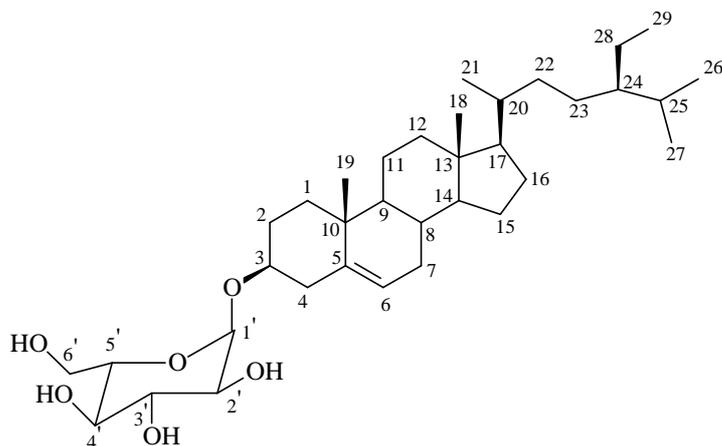
O espectro de RMN¹H, 500MHz em C₅D₅N (Fig. 40, pág. 76) apresenta sinais referentes a hidrogênios alifáticos entre δ 0,67 – 2,76, típicos de esqueletos terpênicos ou esteroídicos. Pode-se observar um acúmulo de sinais na região entre δ 3,95 – 5,09 atribuídos a hidrogênios carbinólicos sugerindo a presença de molécula de açúcar na estrutura.

4.4.2. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 de SVEFA-AZ.

O espectro de RMN¹³C-BB, 125MHz em C₅D₅N (Fig. 41, pág. 77) apresentou cinco sinais referentes a carbonos oxigenados em δ 72,2; 75,8; 78,6; 78,9 e 63,3. Os sinais em δ 141,4 e 122,4 caracterizam a dupla ligação entre C-5 e C-6 respectivamente. Verificou-se ainda uma linha espectral em δ 103,1 (C-1') característico de carbono anomérico de unidade glicosídica.

A comparação dos espectros de RMN¹³C-BB e DEPT-135° (Fig. 42, pág. 78) contribuiu para elucidação da estrutura, revelando que os carbonos carbinólicos, citados acima, eram metínicos, além do sinal em δ 63,3 um carbono metilênico, todos pertencentes à glicose ligada ao esqueleto esteroideal. Foram observados ainda sinais de 3 carbonos não hidrogenados, 10 carbonos metínicos, 11 metilênicos e 6 carbonos metílicos.

Os resultados obtidos nos espectros comparados aos dados encontrados na literatura (VOUTQUENNE et al., 1999), permitiram caracterizar o SVEFC-AZ sendo o 3- β -O- β -D-glicopiranosil sistosterol (β -sistosterol glicosilado), esses dados estão contidos na tabela 09, pág. 79.



β - sistosterol glicosilado

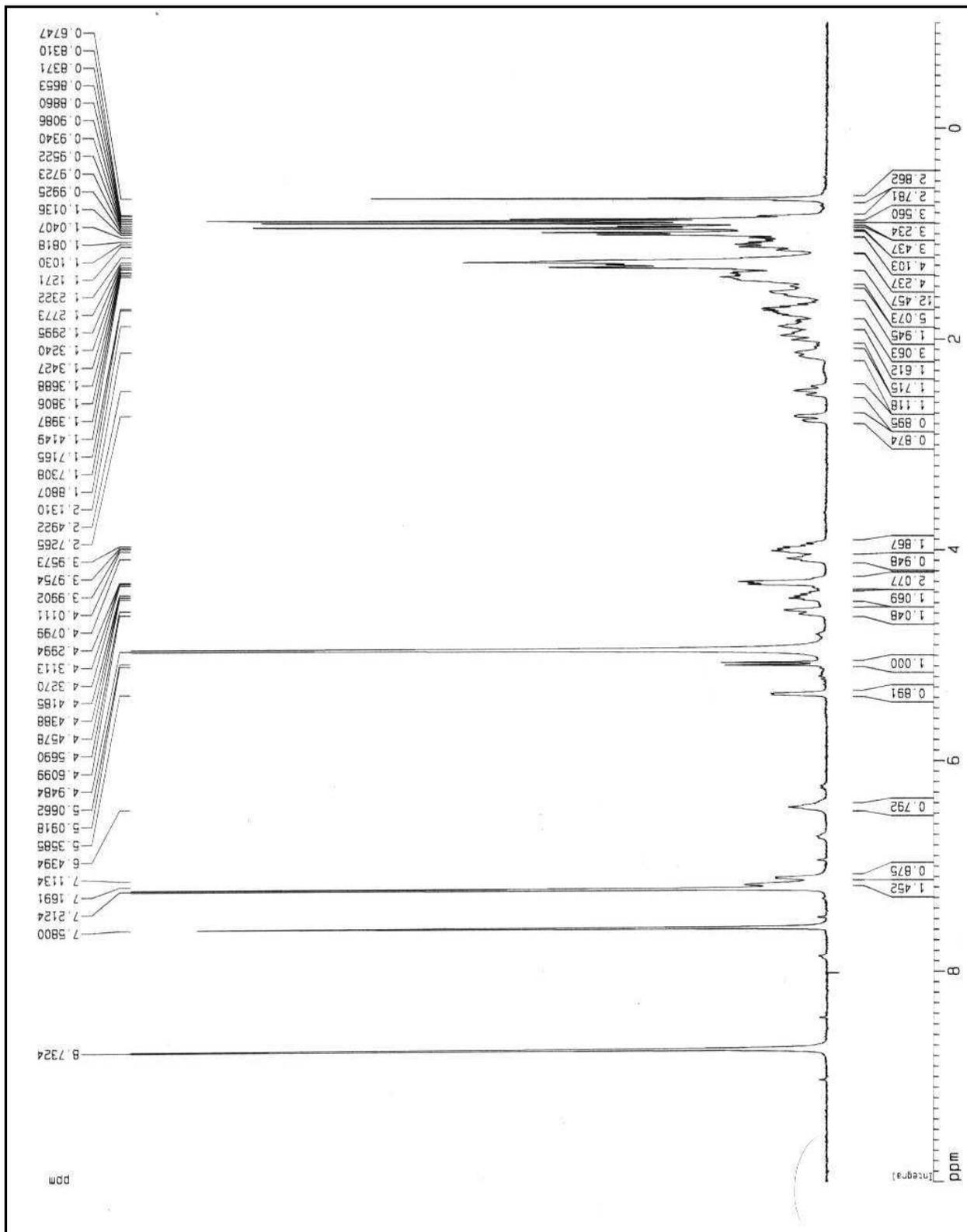


Figura 40 - Espectro de RMN¹H de SVEFA-AZ em C₅D₅N a 500MHz.

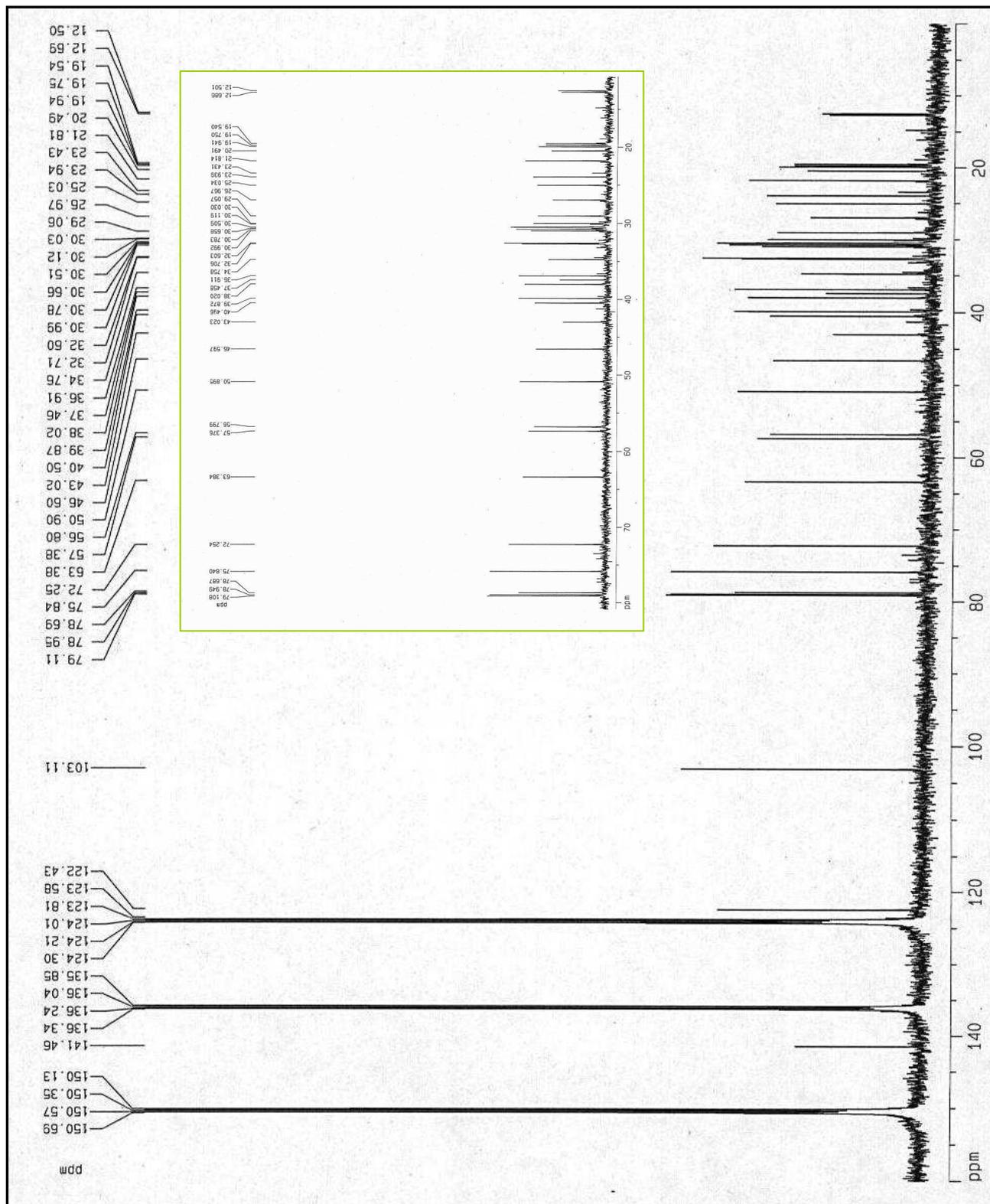


Figura 41 - Espectro de RMN^{13}C -BB de SVEFA-AZ em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 125MHz.

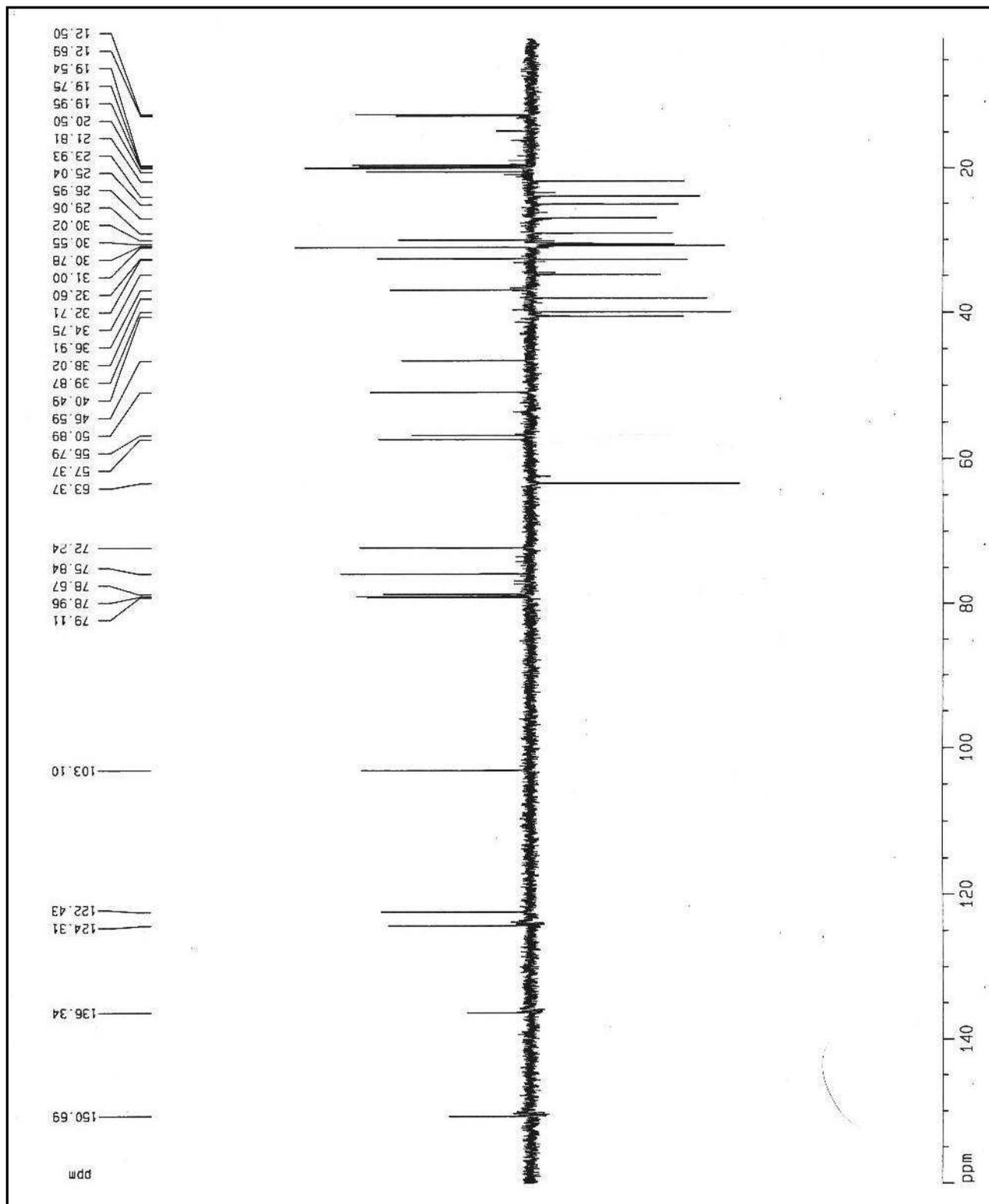


Figura 42 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de SVEFA-AZ em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 125MHz.

Tabela 09 - Dados RMN¹³C de SVEFA - AZ, comparados com valores descritos na literatura para β-sitosterol glicosilado (VOUTQUENNE et al., 1999).

CARBONO		DESLOCAMENTO ¹³ C (ppm)	
Número	Tipo	SVEFA - AZ	β-SITOSTEROL GLICOSILADO (VOUTQUENNE et al., 1999).
1	CH ₂	38,0	37,0
2	CH ₂	32,7	31,6
3	CH	79,1	79,0
4	CH ₂	39,8	39,5
5	C	141,4	141,4
6	CH	122,4	122,2
7	CH ₂	32,7	31,6
8	CH	32,5	31,7
9	CH	50,9	50,0
10	C	37,4	36,5
11	CH ₂	21,8	20,8
12	CH ₂	38,0	38,5
13	C	43,0	42,1
14	CH	57,3	56,5
15	CH ₂	25,0	24,5
16	CH ₂	29,0	28,7
17	CH	56,8	55,8
18	CH ₃	12,5	12,0
19	CH ₃	19,9	19,0
20	CH	36,9	36,0
21	CH ₃	19,5	18,5
22	CH ₂	34,7	34,0
23	CH ₂	29,0	28,0
24	CH	46,5	45,7
25	CH	30,0	28,9
26	CH ₃	20,5	19,5
27	CH ₃	19,7	18,7
28	CH ₂	23,9	22,8
29	CH ₃	12,5	12,0
1'	CH	103,1	100,9
2'	CH	75,8	73,3
3'	CH	78,9	76,2
4'	CH	72,2	70,0
5'	CH	78,6	75,4
6'	CH₂	63,3	61,7

Capítulo 5

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Métodos de análises

5.1.1. Métodos cromatográficos

Para as cromatografias de adsorção em coluna foi utilizado gel de sílica 60 ($\text{\O} 63 - 200\mu\text{m}$) da marca Vetec e nas cromatografias sob média pressão (flash) utilizou-se gel de sílica 60 ($\text{\O} 40 - 63\mu\text{m}$), da Vetec. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com alíquotas das amostras a serem cromatografadas, assim como a quantidade de adsorvente utilizado.

Na cromatografia de adsorção sob média pressão foram utilizadas colunas que continham bulbos no ápice, com objetivo de armazenar solvente. Empregou-se um sistema adaptado com uma bomba de ar comprimido do modelo Inalar Compact .

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatoplaças de gel de sílica 60 ($\text{\O} 5 - 40\mu\text{m}$) sobre alumínio, com indicador de fluorescência na faixa 254nm da Merck.

As revelações das substâncias nas cromatoplaças analíticas foram realizadas através de exposição destas à irradiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda 254nm, emitidos por lâmpada modelo UVSL-28 da Sovereing Computer Systems, e/ou pulverizada com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 0,5g) e ácido perclórico (HClO_4 , 0,75M, 10ml) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 10ml), seguido de aquecimento em estufa a aproximadamente 100°C por cerca de quatro minutos.

Os solventes, de qualidade P.A da marca Synth, utilizados nas cromatografias citadas anteriormente foram hexano (H), diclorometano (D), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M), usados na forma pura ou combinada em proporções de modo a obter um gradiente crescente de polaridade.

5.1.2. Métodos físicos de análises

5.1.2.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) ressonância magnética nuclear de carbono (RMN^{13}C), unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500, operado na frequência de 125 MHz para carbono-13 e 500MHz para hidrogênio.

Equipamento pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará.

Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pela Merck e Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN¹H pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente clorofórmio em (δ_{H} 7,26) e piridina (δ_{H} 8,71; 7,55 e 7,19). Para RMN¹³C, pelos picos de carbono-13 do clorofórmio (δ_{C} 77,0) e piridina (δ_{C} 149,2; 135,5 e 123,5) (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

As multiplicidades das bandas em RMN¹H foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (triplete), td (triplete de dubleto), q (quarteto), m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através de utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção a terminologia: metílico (CH_3), metilênico (CH_2), metínico (CH) e carbono não hidrogenado.

5.1.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região de absorção do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Sendo utilizadas pastilhas de Cloreto de Sódio (NaCl) ou de Brometo de Potássio (KBr).

5.1.2.3. Espectrometria de massa

O espectro de massa das substâncias isoladas foi determinado por impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo QP 5050, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

5.1.2.4. Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias foram obtidos em equipamento da Micro Química, modelo MQAPF-301 do Laboratório de Produto Natural da Universidade Federal do Ceará. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2°C/min.

5.2. Atividade biológica *in vitro*

5.2.1. Estudo da atividade anticolinesterásica

O método para determinação da atividade do extrato, frações ou substâncias como inibidores da AChE foi baseado no ensaio enzimático descrito por Ellman et al., 1961, sendo modificado para CCD por RHEE et al., 2001.

5.2.1.1. Tampões

No ensaio enzimático para determinação da inibição da enzima acetilcolinesterase foram utilizados os seguintes tampões:

- 1 - Tris/HCl (Tris(hidrometil)metilamina) 50mM pH 8,0;
- 2 - Tris/HCl (Tris(hidrometil)metilamina) 50mM pH 8,0, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA);
- 3 - Tris/HCl (Tris(hidrometil)metilamina) 50mM pH 8,0, contendo NaCl 0,1M e MgCl₂.6H₂O 0,02M.

5.2.1.2. Enzima utilizada nos ensaios

A enzima acetilcolinesterase, AChE, (tipo VI-s, pó liofilizado, 292U/mg sólido, 394U/mg de proteína), da marca Sigma Chemical Co. Esta enzima foi estocada em tampão 1 para o ensaio em CCD e para a pulverização foi diluída em tampão 2 na concentração de 4U/mL.

5.2.1.3. Substrato

Foi utilizado como substrato o Iodeto de Acetilcolina (ATCI), da marca Aldrich Chem. Co., o mesmo foi diluído no tampão 1 para obtenção de uma solução de ATCI 1 mM para o ensaio CCD.

5.2.1.4. Reagente de Ellman

Para o ensaio CCD foi utilizado o ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 1mM em tampão 1, da Aldrich Chem. Co.

5.2.1.5. Placa para o ensaio em CCD

Foram utilizadas cromatoplasas de sílicagel 60 (\varnothing 5 - 40 μ m) sobre alumínio, com indicador de fluorescência na faixa 254nm e 0,2mm de espessura da Merck.

5.2.1.6. Inibidores de referência

Como inibidor de referência foram utilizados os alcalóides cafeína anidra, da marca VETEC e a Galantamina, alcalóide utilizado no tratamento da doença Alzheimer.

5.2.2. Citotoxicidade

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

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

5.2.2.1. Material

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama – humano), HCT-8 (cólon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640,

suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Os extratos foram testados na concentração de 50µg/mL.

5.2.2.2. Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism.

Capítulo 6

PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Coleta do material

Os exemplares da espécie *Simarouba versicolor* (Sv) estudada foram coletados na localidade de Uberaba do município de Beberibe no estado do Ceará, no dia 20 de agosto de 2006, pelo professor Luquésio P. de Melo Jorge, lotado no Departamento de Matemática da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica da espécie foi realizada pelo professor Edson de Paula Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsicata (Fig. 43) encontra-se armazenada no Herbário Prisco Bezerra pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, sob o número 039.443.



Figura 43 - Fotografia da exsicata de *Simarouba versicolor* (n° 039.443).

6.2. Triagem do material a partir do ensaio enzimático.

A planta foi dividida em partes (folhas, talos das folhas, cerne, casca do caule e galhos) para a triagem através da aplicação do teste enzimático de inibição da AChE. Os exemplares da espécie foram triturados e secos à temperatura ambiente.

As amostras (50g de cada) foram submetidas à extração exaustiva a frio, por sete dias em duplicada, utilizando-se primeiramente o solvente hexano e posteriormente o solvente metanol ou etanol.

A remoção dos solventes dos extratos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, marca Fisatom – modelo 825 T e depois mantido na temperatura ambiente para eliminar resquício de solvente. Os resultados das extrações encontram-se descritos na tabela 10, página 89. O resultado da avaliação dos extratos quanto ao potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase encontra-se na tabela 31, página 111. A partir deste ensaio optamos por estudar a casca do caule.

Tabela 10 - Extratos das partes da *Simarouba versicolor* (SV).

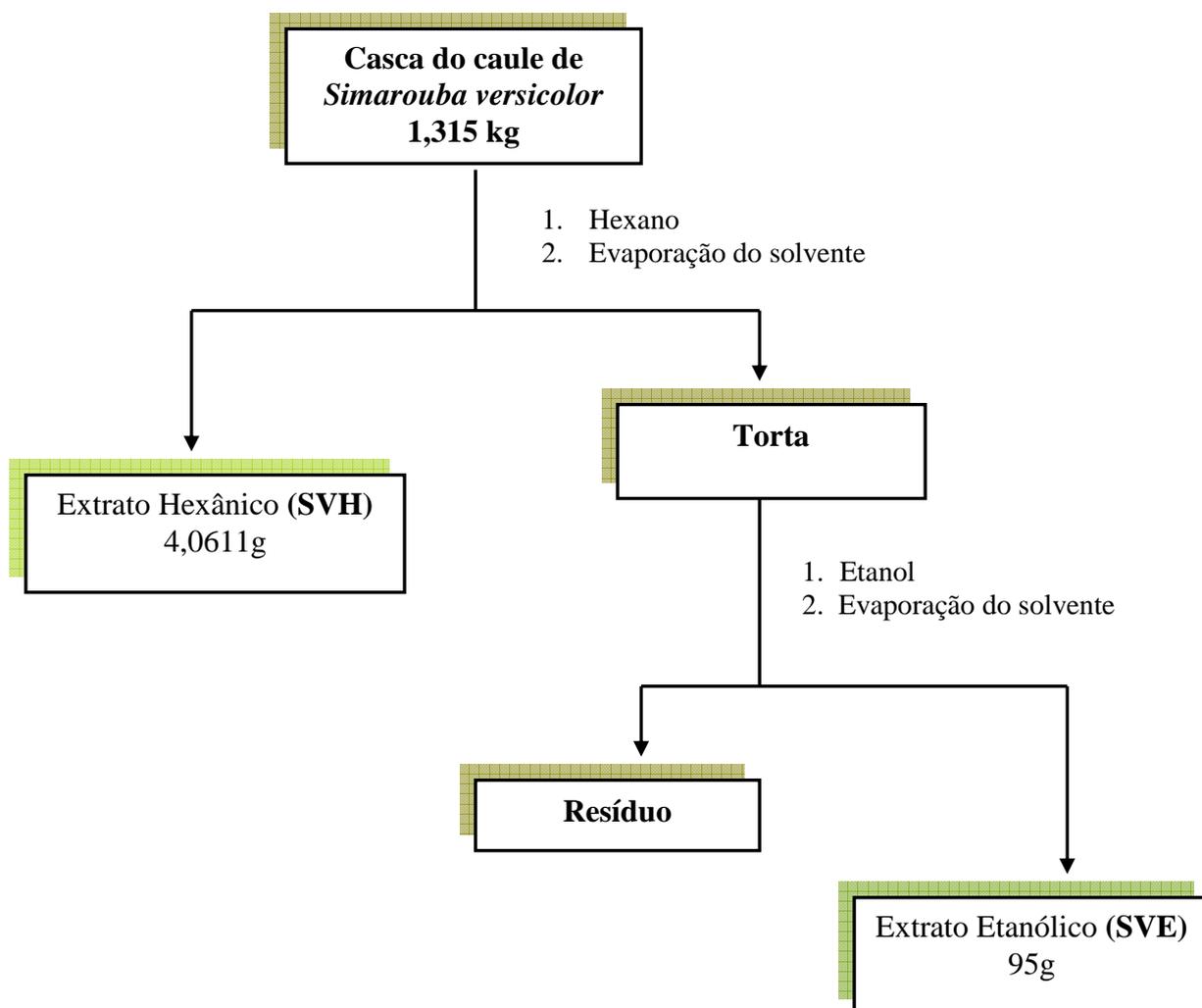
Parte da Planta	Solvente	Peso (g)
Folha	Hexano	2,408
Folha	Metanol	5,429
Talo	Hexano	0,507
Talo	Metanol	4,754
Cerne	Hexano	0,146
Cerne	Etanol	1,203
Casca do caule	Hexano	0,262
Casca do cule	Etanol	4,239
Galho	Hexano	0,256
Galho	Etanol	2,130

6.3. Preparação do extrato hexânico e etanólico da casca do caule de *Simarouba versicolor*.

As cascas do caule (1,315kg peso seco) foram trituradas e secas à temperatura ambiente, mostrando uma taxa de 47,93% de umidade, depois foram submetidas à extração exaustiva com hexano a frio durante sete dias. Para tanto, utilizaram-se aproximadamente 11 litros de hexano e posteriormente mesma quantidade de etanol. Foram realizadas duas extrações com cada solvente.

A retirada dos solventes dos extratos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, marca Fisatom – modelo 825 T, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 55°C, e posteriormente expondo-se à temperatura ambiente para eliminar resquício de solvente, o que resultou em 4,061g do extrato hexânico (SVH) e 95g do extrato etanólico (SVE) (Fluxograma 01, pág. 90).

Fluxograma 01 - Obtenção dos extratos hexânico e etanólico da casca do caule de *Simarouba versicolor*.



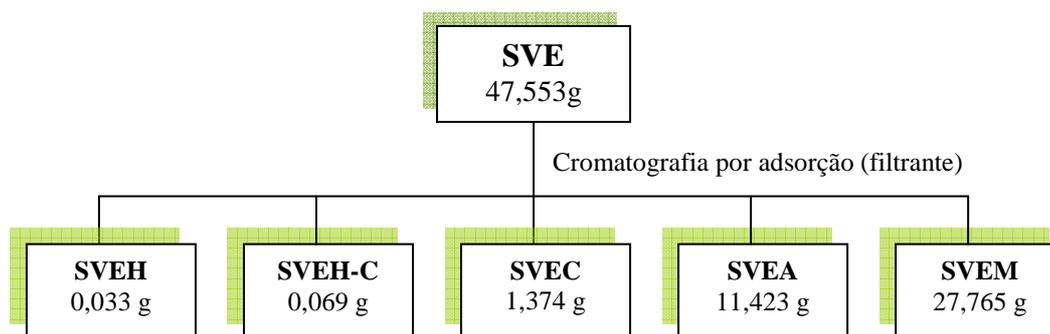
6.4. Isolamento dos constituintes da casca do caule de *Simarouba versicolor*.

6.4.1 Fracionamento cromatográfico do SVE (Fluxograma 02, pág. 92).

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico ocorreu com a adsorção de 47,553g do extrato em 37,427g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e submetido ao processo de desadsorção escalonada (coluna filtrante) em coluna da marca Pyrex de 1000ml e 8,0cm de diâmetro, contendo 167,323g de gel de sílica. A eluição foi realizada utilizando a seguinte série de solventes: hexano, hexano-clorofórmio (1:1), clorofórmio, acetato de etila e metanol, o que resultou nas frações contidas na tabela 11.

Tabela 11 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca do caule de *Simarouba versicolor* (SVE).

ELUENTES	FRAÇÃO	PESO (g)
Hexano	SVEH	0,033
Hexano-clorofórmio (1:1)	SVEH-C	0,069
Clorofórmio	SVEC	1,374
Acetato de etila	SVEA	11,423
Metanol	SVEM	27,765
TOTAL		40,664

Fluxograma 02 - Fracionamento do SVE.**6.4.2. Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica (SVEC) do extrato etanólico. (Fluxograma 03, pág. 104).**

A fração SVEC (1,374g) foi adsorvida em 1,566g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana. A mistura foi acondicionada sobre 21,519g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 125ml e 4,4cm de diâmetro. Empregou-se como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade através de misturas binária ou solvente puro. Foram coletadas 421 frações de aproximadamente 9ml cada (Tab. 12, pág. 93), estas foram analisadas por comparação em CCD e reunidas de acordo com as suas similaridades, como está representado na Tabela 13.

Tabela 12 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica (SVEC).

Frações (9ml)	Eluentes
1-24	Hexano
25-36	Hexano-clorofórmio (9:1)
37-182	Hexano-clorofórmio (8:2)
183-205	Hexano-clorofórmio (1:1)
206-254	Hexano-clorofórmio (2:8)
255-278	Clorofórmio
279-301	Clorofórmio-acetato de etila (7:3)
302-320	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
321-337	Clorofórmio-acetato de etila (2:8)
338-367	Acetato de etila
368-388	Acetato de etila -metanol (8:2)
389-401	Acetato de etila -metanol (1:1)
401-421	Metanol

Tabela 13 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da SVEC.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-103	SVEC. 1	206,3
104-138	SVEC. 2	62,9
139-185	SVEC. 3	285,4
186-208	SVEC. 4	75,5
209-218	SVEC. 5	102,4
219-255	SVEC. 6	173,1
256-281	SVEC. 7	93,0
282-311	SVEC. 8	143,8
312-342	SVEC. 9	11,6
343-421	SVEC. 10	33,0
TOTAL		1187,0

6.4.2.1. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3 (Fluxograma 03, pág. 104)

A fração SVEC. 3 (139-185) resultou em 285,4mg de material. Este foi macerado em 303,0mg de gel de sílica. A mistura foi acondicionada em coluna de 2,2 cm de diâmetro, utilizando 7,84g de gel de sílica como fase estacionária. Os eluentes foram hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, aumentado gradativamente à polaridade. As 211 subfrações coletadas, com aproximadamente 9ml cada, encontram-se descritas na tabela 14, página 95, e foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o grau de semelhança, conforme tabela 15.

Tabela 14 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.

Frações (9ml)	Eluentes
1- 46	Hexano
47-131	Hexano-clorofórmio (9:1)
132-137	Hexano-clorofórmio (8:2)
138-142	Hexano-clorofórmio (6:4)
143-147	Hexano-clorofórmio (4:6)
148-151	Hexano-clorofórmio (3:7)
152-191	Clorofórmio
192-202	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
203-206	Acetato de etila
207-211	Metanol

Tabela 15 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-108	SVEC. 3.1	18,3
109-138	SVEC. 3.2	169,9
139-145	SVEC. 3.3	3,7
146-153	SVEC. 3.4	5,9
154-168	SVEC. 3.5	8,3
169-211	SVEC. 3.6	11,2
TOTAL		217,3

6.4.2.2. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.2 e o isolamento de SVEFC01 (fluxograma 03, pág. 104).

As frações reunidas 109-138 (169,9mg) denominadas SVEC. 3.2 foram maceradas em 157,3mg de gel de sílica. O material macerado foi disposto sobre 1,0764 g de gel de sílica numa coluna de 1 cm de diâmetro. No fracionamento utilizaram-se os seguintes solventes: hexano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade por combinação binária ou pura. Foram 37 subfrações coletadas, cada uma com aproximadamente 8ml, tabela 16, sendo analisadas e após comparação em CCD foram reunidas. As frações resultantes encontram-se descritas na tabela 17, página 97.

Tabela 16 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.2.

Frações (8ml)	Eluentes
1-10	Hexano-clorofórmio (9:1)
11-21	Hexano-clorofórmio (8:2)
22-27	Hexano-clorofórmio (7:3)
28-33	Clorofórmio
34-37	Metanol

Tabela 17 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 3.2.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-6	SVEC. 3.2.1	2,6
7-19	SVEC. 3.2.2 (SVEFC01)	27,9
20-23	SVEC. 3.2.3	10,7
24-37	SVEC. 3.2.4	73,2
TOTAL		114,4

As frações 7-19, pesando 27,9mg, denominadas de SVEC. 3.2.2, apresentaram um sólido amorfo branco, solúvel em clorofórmio, de suave odor adocicado com uma faixa de fusão entre 132,0-134,4°C. O composto foi denominado de SVEFC01, posteriormente através de métodos físicos e comparação com a literatura foi possível determinar que se tratasse de uma mistura de esteróides, β -sistosterol e estigmasterol.

6.4.2.3. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5 (Fluxograma 03, pág. 104).

A fração denominada SVEC. 5 (209-218) resultou em 102,4mg de material, seu subfracionamento ocorreu com a adsorção em 120,4mg de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana em seguida disposto sobre 6,0920g de gel de sílica numa coluna de 2,2cm de diâmetro. Como eluentes foram utilizados hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Estes solventes foram usados numa crescente de polaridade através de combinação ou na forma pura. Foram coletados 133 subfrações, com aproximadamente 9ml cada, como descrito na tabela 18, estas foram agrupadas após análise por CCD na tabela 19.

Tabela 18 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.

Frações (9ml)	Eluentes
1-7	Hexano
8-12	Hexano-clorofórmio (9:1)
13-63	Hexano-clorofórmio (7:3)
64-79	Hexano-clorofórmio (1:1)
80-86	Hexano-clorofórmio (2:8)
87-93	Clorofórmio
94-100	Clorofórmio-acetato de etila (8:2)
101-105	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
106-111	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
112-117	Acetato de etila
118-126	Acetato de etila-metanol (1:1)
127-133	Metanol

Tabela 19 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-17	SVEC. 5.1	0,8
18-80	SVEC. 5.2	78,8
81-133	SVEC. 5.3	10,3
TOTAL		89,9

6.4.2.4. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2. (Fluxograma 03, pág. 104).

A fração SVEC. 5.2 (78,8mg) foi macerada com 75,2mg de sílica em gral de porcelana. A mistura foi acondicionada sobre 4,8776g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 1,5cm de diâmetro. Utilizaram-se como eluentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, que foram usados numa combinação ou na forma pura num gradiente crescente de polaridade, esta coluna forneceu 141 subfrações com aproximadamente 9ml cada (Tab. 20), analisadas através de comparação por CCD e reunidas de acordo como mostra a tabela 21, página 100.

Tabela 20 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.

Frações (9ml)	Eluentes
1-30	Hexano-clorofórmio (9:1)
31-39	Hexano-clorofórmio (8:2)
40-44	Hexano-clorofórmio (7:3)
45-80	Hexano-clorofórmio (1:1)
81-97	Hexano-clorofórmio (3:7)
98-114	Clorofórmio
115-125	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
126-131	Acetato de etila
132-141	Metanol

Tabela 21 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-46	SVEC. 5.2.1	11,5
47-53	SVEC. 5.2.2	6,4
54-81	SVEC. 5.2.3	34,0
82-141	SVEC. 5.2.4	1,1
TOTAL		53,0

6.4.2.5. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3 (Fluxograma 03, pág. 104).

A fração SVEC. 5.2.3 (34,0mg) foi macerada com 25,2g de gel de sílica. Esta mistura foi submetida ao fracionamento cromatográfico sobre 1,4333 g de gel de sílica numa coluna de 1cm de diâmetro, como fase estacionária. Para fase móvel foram usados os solventes hexano, clorofórmio e metanol na forma pura ou em misturas binárias, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Resultou em 38 subfrações com aproximadamente 8ml cada, tabela 22, página 101. As subfrações após comparação em CCD foram reunidas em duas frações, como mostra a tabela 23. Observou-se que a segunda fração (SVEC. 5.2.3.2) apresentava um sólido amorfo de coloração branca.

Tabela 22 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3.

Frações (8ml)	Eluentes
1-5	Hexano-clorofórmio (7:3)
6-13	Hexano-clorofórmio (6:4)
14-19	Hexano-clorofórmio (1:1)
20-31	Hexano-clorofórmio (4:6)
32-35	Hexano-clorofórmio (3:7)
36	Clorofórmio
37-38	Metanol

Tabela 23 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-7	SVEC.5.2.3.1	3,2
8-38	SVEC.5.2.3.2	25,8
TOTAL		29,0

6.4.2.6. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 5.2.3.2 e o isolamento de SVEFC81 (Fluxograma 03, pág. 104).

A fração SVEC. 5.2.3.2 (25,8mg) foi adsorvida em 20,0mg de gel de sílica num gral de porcelana e submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna flash com 1,2cm de diâmetro, contendo 4,4612g de sílica flash. A eluição foi realizada de forma isocrática utilizando uma mistura binária dos solventes Diclorometano-acetato de etila 10% e seguido por adição de acetato de etila puro. Foram coletados 40 subfrações de aproximadamente 6ml cada (Tab. 24). Após análise em CCD foram agrupadas conforme descreve a tabela 25.

Tabela 24 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC.

5.2.3.2 .

Frações (6ml)	Eluentes
1-33	Diclorometano-acetato de etila (9:1)
34-40	Acetato de etila

Tabela 25 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC.

5.2.3.2.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-8	SVEC. 5.2.3.2.1	4,7
9-45	SVEC. 5.2.3.2.2	8,2
16-40	SVEC. 5.2.3.2.3	9,0
	(SVEFC81)	
TOTAL		21,9

A fração SVEC. 5.2.3.2.3 apresentou um sólido amorfo de cor branca, solúvel em clorofórmio com ponto de fusão entre 151,1–152,8°C. Este material foi codificado de SVEFC81.

6.4.2.7. Fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 8 e o isolamento de SVEFC/PGD (fluxograma 03, pág. 104).

A fração denominada SVEC. 8 resultou em 143,8mg de material que foi macerado em 156,0mg de gel de sílica. A mistura foi acondicionada sobre 1.1096g de gel de sílica numa coluna de 1 cm de diâmetro. A eluição foi realizada através de uma ordem crescente de polaridade, usando-se os seguintes solventes: clorofórmio e acetato de etila como mostra a tabela 26. Foram coletadas 43 subfrações de aproximadamente 7ml cada, que após análise em CCD foram agrupadas conforme descreve a tabela 27.

Tabela 26 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 8.

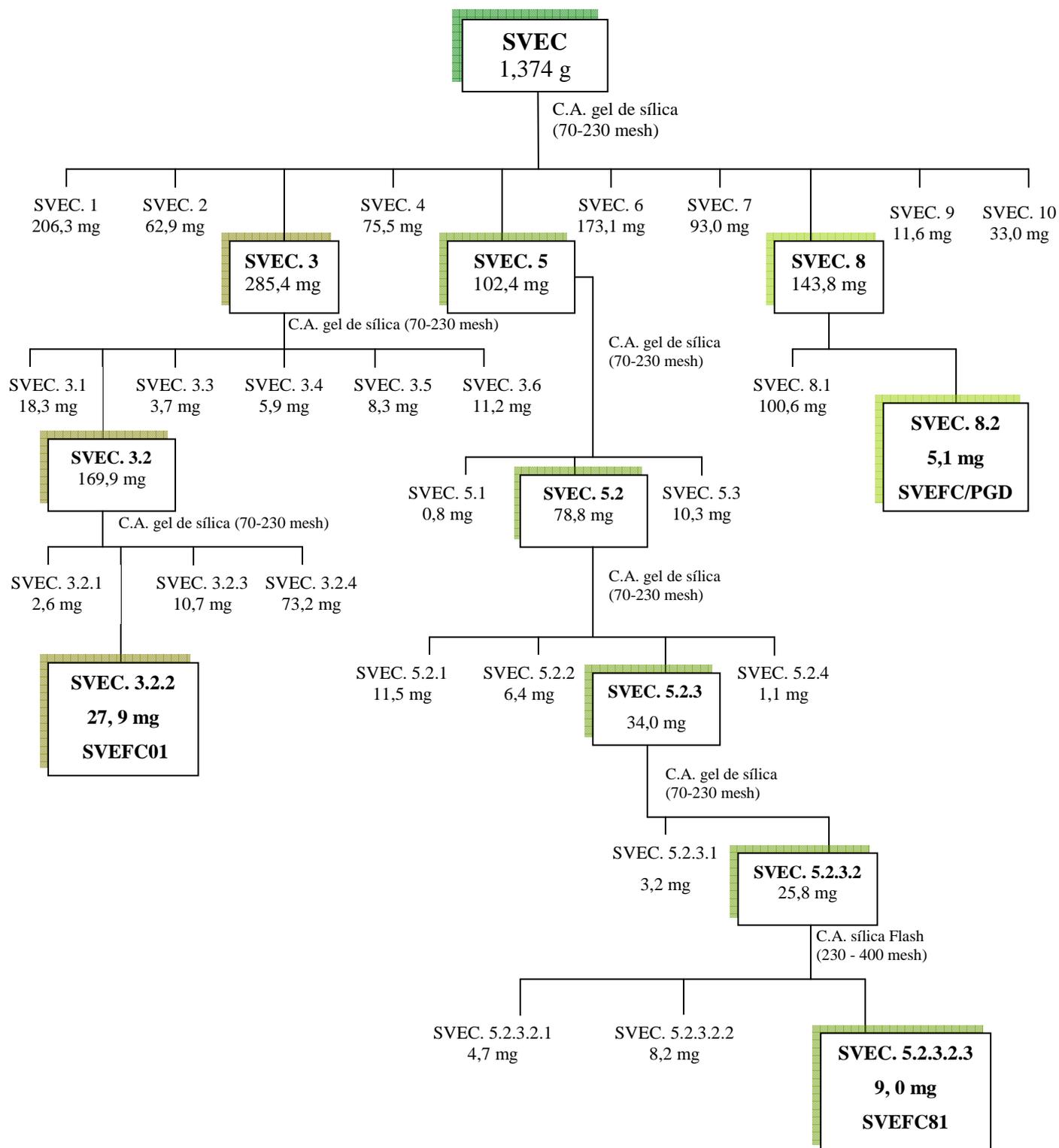
Frações (7ml)	Eluentes
1-10	Clorofórmio-acetato de etila (7:3)
11-20	Clorofórmio-acetato de etila (6:4)
21-34	Clorofórmio-acetato de etila (1:1)
35-38	Clorofórmio-acetato de etila (3:7)
39-43	Acetato de etila

Tabela 27 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEC. 8.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-28	SVEC. 8.1	100,6
29-43	SVEC. 8.2	5,1
	(SVEFC/PGD)	
TOTAL		105,7

Observou-se a partir da subfração 27 a presença de um sólido amorfo branco, sem aparente odor. As subtrações de 29 a 43 foram reunidas após análise em CCD, da qual se obteve 5,1mg deste material, que foi denominado de SVEFC/PGD. A substância, solúvel em clorofórmio, apresentou ponto de fusão entre 268,6-270,2 °C.

Fluxograma 03 - Fracionamento da fração SVEC e os isolamentos de três substâncias.



C.A. = Cromatografia por adsorção.

6.4.3. Fracionamento cromatográfico da fração acetato (SVEA) do extrato etanólico. (Fluxograma 04, pág. 107).

A fração SVEA, oriunda do fracionamento do extrato etanólico de SV, (Tab. 11, pág. 91) que continha 11,423g, foi adsorvida em 12,138g de sílica gel sendo macerado em um gral de porcelana e em seguida disposta sobre 52,261g de gel de sílica numa coluna cromatográfica de 8,0cm de diâmetro.

Empregaram-se como eluentes: Clorofórmio, Clorofórmio-Acetato de etila (1:1), Acetato de etila, Acetato de etila-Metanol (1:1) e Metanol. O resultado do fracionamento está contido na tabela abaixo.

Tabela 28 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da SVEA.

Frações	Frações	Peso (g)
Clorofórmio 100%	SVEA. 1	0,595
Clorofórmio-Acetato de etila (1:1) I	SVEA. 2	2,772
Clorofórmio-Acetato de etila (1:1) II	SVEA. 3	1,453
Acetato de etila	SVEA. 4	2,399
Acetato de etila-Metanol (1:1)	SVEA. 5	2,774
Metanol	SVEA. 6	0,167
TOTAL		10,160

6.4.3.1. Fracionamento cromatográfico da fração SVEA 3 (Fluxograma 04, pág. 107).

A fração denominada SVEA 3 resultou em 1,453g de material, que foi macerado em 1,371g de sílica gel. A mistura então foi submetida ao fracionamento cromatográfico sobre 25,500g de gel de sílica numa coluna de 5,4cm de diâmetro, com fase estacionária. Para a fase móvel foram utilizados os solventes Hexano, Acetato de etila e Metanol, na forma pura ou em mistura binária, através de um gradiente crescente de polaridade.

O fracionamento resultou em 215 subfrações com aproximadamente 9 ml cada, tabela 29. Após comparação por CCD, as subfrações foram reunidas de acordo com o grau de similaridade conforme a tabela 30.

Tabela 29 – Dados referentes do fracionamento cromatográfico da fração SVEA. 3.

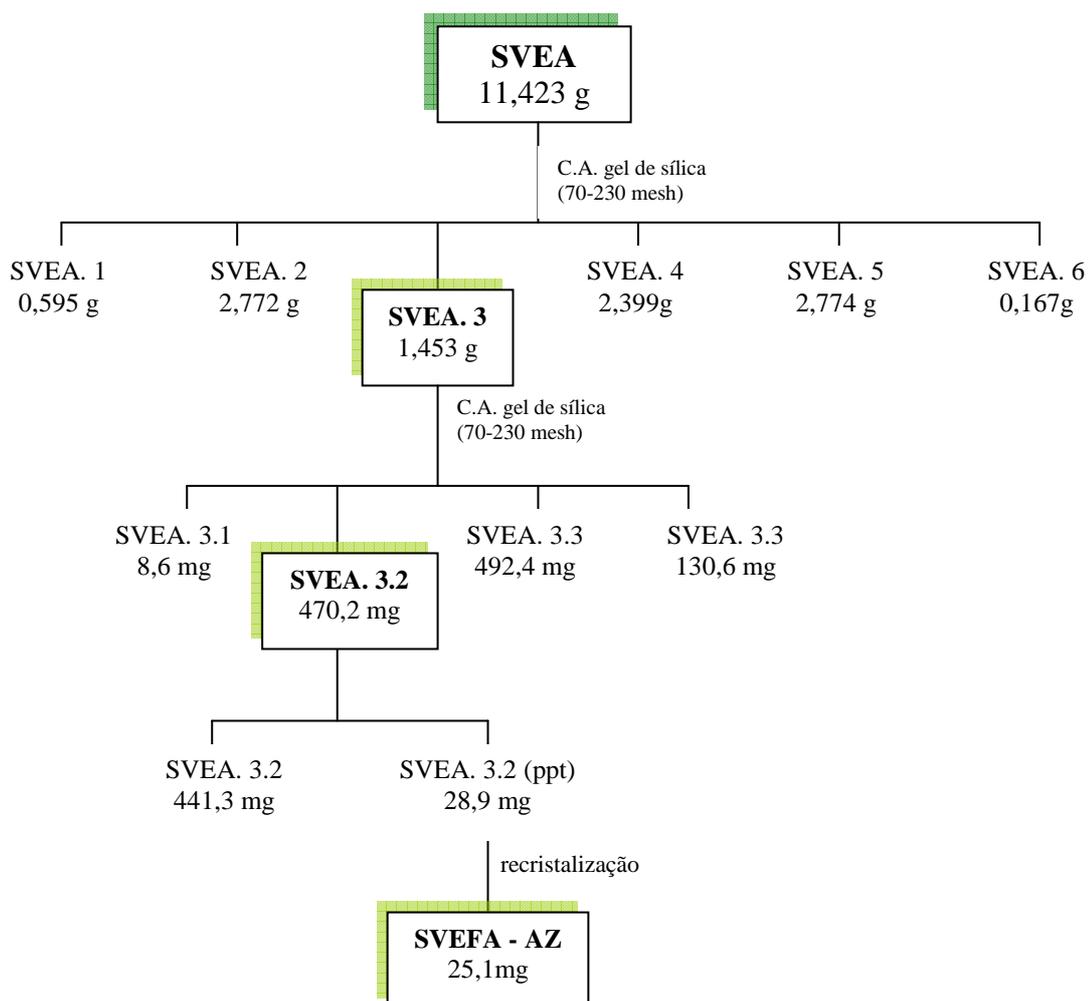
Frações (9ml)	Eluentes
1- 40	Hexano-Acetato de etila (1:1)
41-53	Hexano-Acetato de etila (6:4)
54-132	Hexano-Acetato de etila (8:2)
133-205	Acetato de etila
206-215	Metanol

Tabela 30 - Frações resultantes do fracionamento cromatográfico da fração SVEA. 3.

Frações reunidas	Frações	Peso (mg)
1-53	SVEA. 3.1	8,6
54-138	SVEA. 3.2	470,2
139-204	SVEA. 3.3	492,4
205-215	SVEA. 3.4	130,6
TOTAL		1101,8

A fração SVEA. 3.2 apresentou um precipitado de coloração branca, este foi separado (28,9mg) e analisado em CCD e então através de recristalização, com acetato de etila, tentou-se purificá-lo, resultando em 25,1mg do sólido branco, amorfo, solúvel em piridina com ponto de fusão entre 286,0-288,2 °C, sendo denominado SVEFA-AZ.

Fluxograma 04 - Fracionamento da fração SVEA e os isolamentos de uma substância.



C.A. = Cromatografia por adsorção.

Capítulo 7

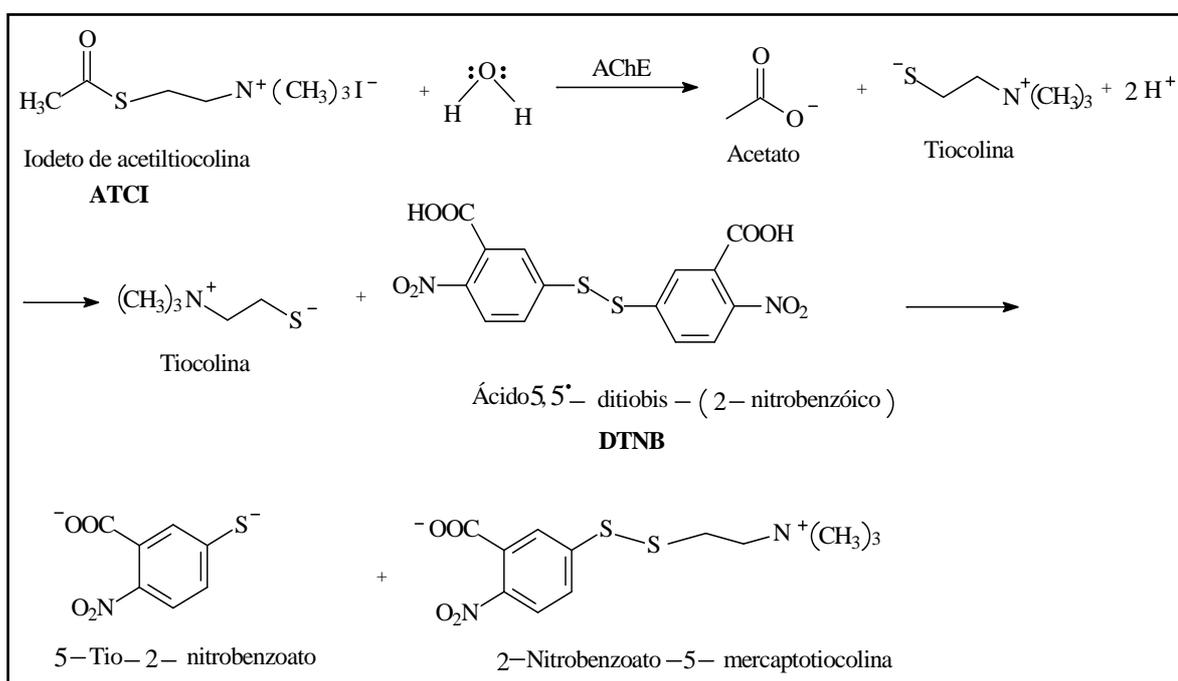
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

7. ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

7.1. Ensaio de Ellman

Os ensaios para prever o potencial inibitório da AChE são baseados no método de ELLMAN et al., 1961 adaptado para cromatografia de camada delgada por RHEE et al, 2001. É um método colorimétrico e pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, cuja equação da reação na qual se fundamenta é apresentada no quadro abaixo.

Quadro 02 - Equação da reação do Teste de Ellman.



O princípio do método de Ellman é a medida da razão de produção de tiocolina, quando o substrato acetiltiocolina é hidrolisado pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta reação é acompanhada pela reação contínua do tiol ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para produzir o ânion de coloração amarela 5-tio-2-nitrobenzoato. A razão da produção da cor amarela é medida a 405nm ou visualizada em CCD, através de halos brancos (amostra positiva), em uma placa completamente amarelada.

7.2. Teste de atividade inibidora da Acetilcolinesterase e resultados.

As amostras, nas concentrações de 4mg/ml para extratos e de 2mg/ml para substâncias isoladas e de controle positivo (Tab. 31), foram aplicadas em CCD por meio de um capilar de vidro e deixadas em repouso até secar o solvente. Em seguida, pulverizou-se a placa com uma solução contendo o substrato (ATCI, 1mM em tampão 1) e o reagente de Ellman (DTNB, 1mM em tampão 1) e aguardou-se a secagem da placa durante 3 a 5 minutos. Após esse tempo borrifou-se a enzima AChE na concentração de 3U/mL em tampão 1. Decorridos aproximadamente 7 minutos, a cromatoplaca desenvolveu uma coloração amarela, e surge o aparecimento de halo branco em torno dos “spots” das amostras onde houve inibição da enzima. Como controle positivo foram utilizados os alcalóides, cafeína (anidra) da marca VETEC e a Galantamina, droga utilizada no tratamento da doença Alzheimer, (Quadro 01, pág. 3). Os resultados desse ensaio qualitativo de inibição da AChE, estão descritos na tabela 31, página 111 (Fig. 44). Os bons resultados dos extratos etanólico e hexânico da casca do caule aliados à propriedade inseticida do mesmo, (LORENZI, 1998), foram determinantes na escolha do caule para este estudo.

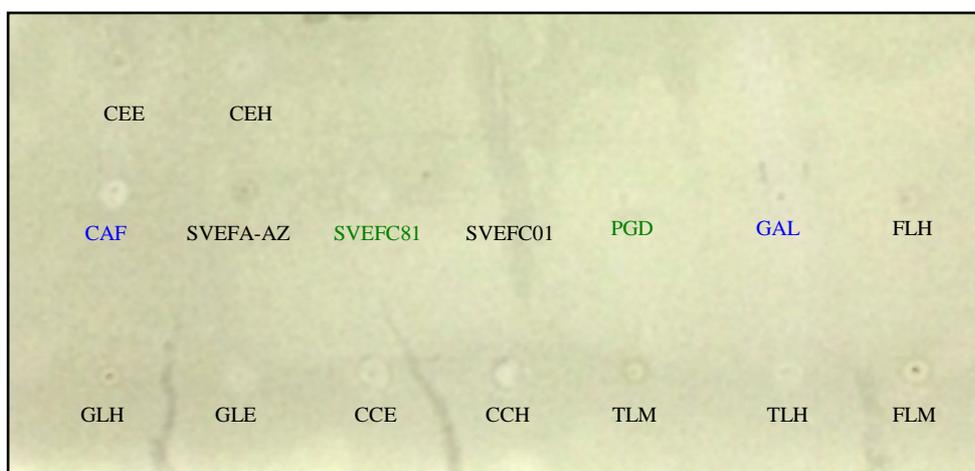


Figura 44 - Placa do ensaio de inibição da AChE.

Tabela 31 - Resultado do teste inibição da AChE.

	Amostras	código	Halos de inibição (mm)
Controle Positivo	Galantamina	GAL	8
	Cafeína	CAF	5
Substância Isolada	Mistura de esteróides	SVEFC01	-
	β - sistosterol glicosilado	SVEFA-AZ	-
	4,5-dimetóxicantin- 6-ona	SVEFC81	6
	11-Acetilamarolida	PGD	4
Extrato Hexânico	Casca do caule	CCH	5
	Cerne	CEH	5
	Galho	GLH	4
	Talo	TLH	5
	Folha	FLH	-
Extrato Etanólico (E) ou Metanólico (M)	Casca do caule (E)	CCE	5
	Cerne (E)	CEE	5
	Galho (E)	GLE	2
	Talo (M)	TLM	2
	Folha (M)	FLM	4

Capítulo 8

CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

8. CITOTOXICIDADE IN VITRO

8.1. Material

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

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Os extratos foram testados na concentração de 50µg/mL.

8.2. Método

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de “screening” do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

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

8.3. Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism.

8.4. Resultados

Tabela 32 – Percentual inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 μ g/mL. Valores são média \pm DPM.

Amostra (Extratos)	SF295 Média	GI% SD	HCT-8 Média	GI% SD	MDA- MB435 Média	GI% SD
Extrato Hex Talo <i>Sim.</i>	40.98	SV	18.90	SV	42.85	SV
Extrato Met Talo <i>Sim.</i>	73.87	SV	81.98	SV	81.25	SV
Extrato Hex Folha <i>Sim.</i>	-26.03	SV	6.82	SV	28.55	SV
Extrato Hex Cern. <i>Sim.</i>	16.05	SV	61.74	SV	49.97	SV
Extrato Et.Casca Caule <i>Sim.</i>	89.78	SV	92.77	SV	96.94	SV
Extrato Et. Cerne <i>Sim.</i>	91.14	SV	92.91	SV	99.31	SV
Extrato Hex Casca Caule <i>Sim.</i>	12.15	SV	30.36	SV	35.43	SV
Extrato Met Folha <i>Sim.</i>	64.85	SV	79.35	SV	72.99	SV

Capítulo 9

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Os extratos das folhas, talos, galhos, cascas do caule e cerne da *Simarouba versicolor*, submetidos ao teste de Ellman apresentaram bons resultados na inibição da enzima acetilcolinesterase, com exceção do hexânico das folhas. Os extratos que proporcionaram melhor inibição foram os etanólico e hexânico da casca do caule, cerne e o hexânico do talo, com halos de 5mm de diâmetro cada.

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca do caule possibilitou o isolamento e identificação da mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol, da 4,5-dimetóxicantin-6-ona e da 11-acetilamarolida, todos provenientes da fração clorofórmica. Esses dois últimos apresentaram ótimo potencial inibitório da AChE, com halos de inibição de 6mm e 4mm diâmetro respectivamente. Além desses, da fração acetato de etila foi isolado o esteróide β -sitosterol glicosilado.

O isolamento do constituinte 4,5-dimetóxicantin-6-ona e a 11-acetilamarolida, assim como os bons resultados obtidos dos extratos na inibição da enzima Acetilcolinesterase e da atividade citotóxica nas três linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama – humano), HCT-8 (cólon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), reforçam a importância do estudo das Simaroubaceae para o desenvolvimento de novos fármacos.

Capítulo 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19 a-h lupeol isolated from *strobilanthus callosus* and *strobilanthus ixiocephala* roots. **Indian Journal of Pharmacology**, 35, p. 384-387, 2003.

AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S. G.; UKIYA, M.; OKUDA, H.; ZHANG, F.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 28 (1), p. 158-160, 2005.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, 30, p. 935-951, 2007.

ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. J.; CARVALHO, M. G.; SIQUEIRA, J. A.; ALEGRIO, L. V.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 74 (3), p. 415-424, 2002.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, Switzerland, 4, p. 14-19, 1996.

BHATNAGAR, S.; POLONSKY, J.; PRANGE, T.; PASCARD, C. New toxic quassinoid glucosides from *Simarouba glauca*. X-ray analysis. **Tetrahedron Letters**, 25 (3), p. 299-302, 1984.

BROWN, W. A. C.; SIM, G. A. The constitution and absolute stereochemistry of simarolide, the bitter principle of *Simarouba amara*. **Proceeding of the Chemical Society**, (Sept.), p. 293-294, 1964.

CARPENTER, I.; LOCKSLEY, H.; SCHEIMANN, F. Xanthones in higher plants: biogenetic proposals and a chemotaxonomic survey. **Phytochemistry**, 8, p. 2013-2025, 1969.

CHOUDHURY, B. L.; HUSSAINI, F. A.; SHOEB, A. Antiviral constituents from *Vicoa indica*. **Pharmaceutical Biology**, 28, p. 121-124, 1990.

CUCKLER, A. C.; KUNA, S.; MUSHETT, C. W.; SILBER, R. H.; STEBBINS, R. B.; STOERK, H. C.; ARISON, R. N.; CUCHIE, F.; MALANGA, C. M. Chemotherapeutic and pharmacological studies on glaucarubin, a specific amebicide. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, 114, p. 307-321, 1958.

DAYAN, F. E.; WATSON, S. B.; GALINDO, J. C. G.; HERNÁNDEZ A.; DOU J.; MCCHESENEY J. D.; DUKE S. O. Phytotoxicity of Quassinoids: Physiological Responses and Structural Requirements. **Pesticide Biochemical and Physiology**, 65, p. 15-24, 1999.

- DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic Approach. New York: **John Wiley & sons**, 2^a ed., p. 507, 2001.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7, p. 88-95, 1961.
- FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R.; DE ORTIZ, S. T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, 80 (2-3), p. 199-202, 2002.
- FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; DE ARIAS, A. R.; SCHININI, A.; DE BILBAO, N. V.; SERNA, E.; LAGOUTTE, D.; AGATON, F. S.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 109 (2), p. 258-263, 2007.
- FINKELSTEIN, L. B.; BENNER, E. A.; HENDRIXSON, M. C.; KRANIS, K. T.; RAUH, J. J.; SETHURAMAN, M. R.; MCCANN, S. F. Tricyclic cyanoguanidinas: synthesis, site of action and insecticidal activity of a novel class of reversible acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 10, p. 599-613, 2002.
- FUKAMIYA, N.; LEE, K. H.; MUHAMMAD, I.; MURAKAMI, C.; OKANO, M.; HARVEY, I.; PELLETIER, J. Structure-activity relationships of quassinoids for eukaryotic protein synthesis. **Cancer Letters**, 220, p. 37-48, 2005.
- GHOSH, P. C.; LARRAHONDO, J. E.; LE QUESNE, P. W.; RAFFAUF, R. F. Antitumor Plants. IV. Constituents of *Simarouba versicolor*. **Journal of Natural Products**, 40, p. 364-369, 1977.
- GOAD, L.J. Methods in plant Biochemistry. Liverpool, **Academic Press Limited**, 1991.
- GOEL, R. K.; MAITI, R. N. Role endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. **Fitoterapia**, LXVIII, n.6, p. 548-552, 1996.
- GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituíntes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, 16, p. 95-100, 1993.
- GUTIÉRREZ, C.; GONZALEZ-COLOMA, A.; HOFFMANN, J. J. Antifeedant properties of natural products from *Parthenium argentatum*, *P. argentatum* x *P. tomentosum* (Asteraceae) and *Castela emoryi* (Simaroubeaceae) against *Reticulitermes flavipes*. **Industrial Crops and Products**, 10, p. 35-40, 1999.

- HALL, I. L.; LEE, K. H.; IMAKURA, Y.; OKANO, M.; JOHNSON, A. Antiinflammatory agents III. Structure-activity relationships of brusatol and related quassinoids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 72, 1282-1284, 1983.
- HAM, E. A.; SCHAFFER, H. M.; DENKEWALTER, R. G.; BRINK, N. G. Structural studies on glaucarubin from *Simarouba glauca*. **Journal of the American Chemical Society**, 76, p. 6066-6068, 1954.
- HIROTA, H.; YOKOYAMA, A.; MIYAJI, K.; NAKAMURA, T.; IGARASHI, M.; TAKAHASHI, T. Total synthesis of (+ -) – Amarolide, a quassinoid bitter principle. **Journal of Organic Chemistry**, 56 (3), p. 1119-1127, 1991.
- HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, 27, p. 713-722, 1996.
- JIANG, Q.; SHING, T. K. M. Synthetic studies on quassimarin and simalikalactone D: functionalization of ring C. **Tetrahedron Letters**, 42, p. 5271-5273, 2001.
- JONES, P. J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F. Y. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. **Journal of Lipid Research**, 41, p. 697-704, 2000.
- KASINADHUNI, V. R. R.; RAJASHEKHAR, G.; RAJAGOPALAN, R.; SHARMA, V. M.; VAMSI KRISHNA, C.; SAIRAM, P.; SAI PRASAD, G.; SADHUKHAN, S.; GANGADHAR RAO, G. Anti-ulcer potential of *Halinia cordifolia*. **Fitoterapia**, 70, p. 93-95, 1999.
- KUMALA, S.; UTJI, R.; SUDARMONO, P.; KARDONO, L. B. S. Cytotoxic secondary metabolites from fermentation broth of *Brucea javanica* endophytic fungus 1.2.11. **Research Journal of Microbiology**, 2 (8), p. 625-631, 2007.
- KUO, P. C.; SHI, L. S.; DAMU, A. G.; SU, C. R.; HUANG, C. H.; KE, C. H.; WU, J. B.; LIN, A. J.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; WU, T. S. Cytotoxic and antimalarial β -carboline alkaloids from the roots of *Eurycoma longifolia*. **Journal of Natural Products**, 66 (10), p.1324-1327, 2003.
- KUPCHAN, S. M.; BRITTON, R. W.; LACADIE, J. A.; ZIEGLER, M. F.; SIGEL, C. W. The isolation and structural elucidation of bruceatin and bruceantanol, new potent antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. **Journal of Organic Chemistry**, 40, p. 648-654, 1975.
- LASSAK, E. V.; POLONSKY, J.; JACQUEMIN, H. 5-Hydroxycanthin-6-one from *Simarouba amara*. **Phytochemistry**, 16 (7), p. 1126-1127, 1977.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Editora Plantarum**, 2ª ed, p. 324, 1998.

- MENDES, C. L. A. Triterpenóides e a sua actividade anti-inflamatória. **Informativo da Universidade Nova de Lisboa**, departamento de química, Faculdade de ciência tecnologias. p. 1-8, 2004.
- MONSEUR, X.; MOTTE, J. C. Quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of the bitter quassinoid compounds from *Simaruba glauca* seeds. **Journal of Chromatography**, 264 (3), p. 469-473, 1983.
- MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. Produtos naturais: Estudos químicos e biológicos. **Editora da UECE**, 1, p. 347, 2007.
- MORON, J.; POLONSKY, J. Triterpene origin of bitter constituents of the Simaroubaceae. **Tetrahedron Letters**, 4, p. 385-390, 1968.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, p. 55-63, 1983.
- MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L. A. A New Antimalarial Quassinoid from *Simaba orinocensis*. **Journal of Natural Products**, 67, p. 772-777, 2004.
- MURRAY, R. D. H. Naturally occurring plant coumarins. New York: **Springer-verlag/wien**, p. 200-209, 1978.
- OKANO, M.; FUKAMIYA, N.; TAGAHARA, K.; COSENTINO, M.; LEE T. T. Y.; NATSCHKE, S. M.; LEE, K. H. Anti-HIV Activity of Quassinoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 6, p. 701-706, 1996.
- O'NEILL, M.J.; BRAY, D.H.; BOARDMAN, P.; WRIGHT, C.W.; PHILLIPSON, J. D.; WARHURST, D.C.; GUPTA, M.P.; CORREYA, M.; SOLIS, P. Plants as sources of antimalarial drugs, part 6: activities of *Simarouba amara* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, 22 (2), p. 183-190, 1988.
- PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, 1, p. 7-12, 2003.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63 (7), p.1035-1042, 2000.
- PERRY, E. K. The cholinergic hypothesis. **British Medicinal Bulletin**, 42, p. 63, 1986.
- POLONSKY, J.; LEDERER, E. Note on the isolation of 2,6-dimethoxybenzoquinone from the bark and wood of some Simarubaceae and Meliaceae. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, p. 1157-1158, 1959.
- POLONSKY, J. The constituents of the bark of *Simaruba amara*: isolation of a new bitter principle: simarolide. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, p. 1546-1547, 1959.

- POLONSKY, J. Quassinoids Bitter Principles. **Fortschr. Chem. Org. Nat.**, 30, p. 101-150, 1973.
- POLONSKY, J.; VARON, Z.; DAS, B. C. Tetracyclic triterpenes from *Simarouba amara*. **Phytochemistry**, 15 (2), p. 337-339, 1976.
- POLONSKY, J.; VARON, Z.; RABANAL, R. M.; JACQUEMIN, H. 21,20-Anhydromelianone and melianone from *Simarouba amara* (Simaroubaceae); carbon-13 NMR spectral analysis of 7-tirucallol-type triterpenes. **Israel Journal of Chemistry**, 16 (1), p. 16-19, 1977.
- POLONSKY, J.; VARON, Z.; JACQUEMIN, H.; PETTIT, G. R. The isolation and structure of 13,18-dehydroglauucarubinone, a new antineoplastic quassinoid from *Simarouba amara*. **Experientia**, 34 (9), p.1122-1123, 1978.
- POLONSKY, J. Quassinoids Bitter Principles II. **Fortschr. Chem. Org. Nat.**, 47, p. 221-264, 1985.
- POZO, X.; GIMENEZ, A. Biodirected analysis of *Simarouba amara* (Simaroubaceae) using the *Artemia salina* bioassay. **Revista Boliviana de Quimica**, 15 (1), p. 52-66, 1998.
- RAJIC, A.; KWERFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.; CHANDLER, D.; POLYA, G. Inhibition of Serine Proteases by Anti-inflammatory Triterpenoids, **Planta Medica**, 66, p. 206-210, 2000.
- RHEE, I. K.; MEENT, M. V. D.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, 915, p. 217-223, 2001.
- RIVERO, J. F. C.; LEZUTEKONG, R; LOBO, T. E.; ITO, A; MI, Q; CHAI, H. B.; SOEJARTO, D. D.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; SWANSON, S. M.; MORELLI, I.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the twigs of *Simarouba glauca* collected from a plot in southern Florida. **Phytotherapy Research**, 19 (2), p.136-140, 2005.
- RODRIGUES, E. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, F. G. F. Canthin-6-one alkaloids from *Picrolemma granatensis*. **Phytochemistry**, 31, p. 2499-2501, 1992.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. **LTC**, 6ªed., 2000.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Editora da Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2000.

SIMOTE, S. Y.; Estudo Fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e Busca de um Processo de Microencapsulação de Compostos Ativos, Visando o Controle de Formigas Cortadeiras. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for Anticancer-DrugScreening. **Journal of the National Cancer Institute**, 82 (13), p. 1107-1112, 1990.

SOUSA, S. M. Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. **Dissertação de Mestrado (Biotecnologia)**, departamento de microbiologia e parasitologia, centro de ciência biológicas, Universidade federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

SUMIEYA, N. J. G.; MASCOLL, K.; STEWART, M.; WILLIAM, F. R.; WINSTON, F. T. Tirucallane, Apotirucallane, and Octanorapotirucallane Triterpenes of *Simarouba amara*. **Journal of Natural Products**, 69, p. 1315-1318, 2006.

THOUVENEL, C.; GANTIER, J. C.; DURET, P.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLER, R.; FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R.; FOURNET, A. Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Phytotherapy Research**, 17 (6), p.678-680, 2003.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DEN MEENT, M.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, 26, p. 301, 2003.

VOUTQUENNE, L.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; SEVENET, T.; HADI, H. A. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *dimocarpus fumatus*. **Phytochemistry**, 50, p. 63-69, 1999.

WILLIAMS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4^a ed., 1995.

WRIGHT, C. W.; O'NEILL, M. J.; PHILLIPSON, J. D.; WARHURST, D. C. Use of microdilution to assess in vitro antiamoebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem, and a number of quassinoids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 32 (11), p. 1725-1729, 1988.

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](#)