



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS (UEG)  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
(UnUCET)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS  
MOLECULARES**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL  
E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM*  
(ERYTHROXYLACEAE)**

Guilhermina Costa Nascimento

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

ANÁPOLIS, GO  
OUTUBRO 2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Catálogo na Fonte  
Biblioteca UnUCET – UEG  
Helenir Freire Batista Machado – CRB 1704

- 615.32 Nascimento, Guilhermina Costa.  
N244e Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antitumoral e Citotoxicidade *In Vitro* de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae). / Guilhermina Costa. Nascimento, – Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, 2008.
- 86p. il. ; 29,5 cm. – (Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual de Goiás , Programa de pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares).
- I. Nascimento, Guilhermina Costa; II. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antitumoral e Citotoxicidade *In Vitro* de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) .  
1-*Erythroxylum deciduum* 2-flavonóide 3-triterpeno 4-*HCT-8* (côlon – humano), 5-*SF-295* (glioblastoma – humano) 6-*HL-60* (Leucemia – humano) 7-7,4'-dimetoxi-quercentina-3-*O*- $\beta$ -*D*-glicopiranosídeo 8-quercentina-3-*O*- $\alpha$ -*D*-arabinofuranose 9-ácido *n*-hexadecanóico 10-estearato de  $\beta$ -amirina 11-linhagem tumoral *K562* .
- III. Dissertação de Mestrado .

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E  
CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM*  
(ERYTHROXYLACEAE)

**GUILHERMINA COSTA NASCIMENTO**

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológica, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências moleculares (Físico-Química - molecular).

Aprovada por:

---

**Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (Orientador – UEG)**

---

**Prof. Dr. José Realino de Paula (UFG)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caridad Noda Perez (UEG)**

ANÁPOLIS, GO - Brasil  
OUTUBRO2008

Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Daise Fialho Costa Nascimento e  
Genivaldo do Nascimento Souza,  
pessoas admiráveis e trabalhadoras,  
que durante toda a minha vida não  
mediram esforços para que eu  
chegasse a esse momento,  
proporcionando amor, carinho,  
amizade, confiança, apoio, paciência e  
incentivo.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida, sabedoria e força que recebi ao longo de mais uma etapa. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes por todo o ensinamento, pela confiança, pela paciência, disposição, amizade, sugestões e contribuição na execução desse trabalho
- A Unidade de Ciências Exatas e Tecnológica, pelo apoio institucional.
- A todos os professores que fazem parte deste programa de pós-graduação pelo incentivo.
- Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares da UEG, Eduardo, Lílian, Sérgio, Vítor, Graciele, José Maria Maia, Marcela e Rosa pela amizade, paciência, apoio, dicas, sugestões e incentivo.
- Aos alunos de iniciação científica Letícia, Clayton e Ana Paula pelo apoio e amizade.
- Aos alunos Marcus Vinícius e Nathália pela amizade, colaboração, empenho, auxílio e paciência no curto período que estiveram comigo.
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizangela de Paula Pereira Lacerda pelas análises da atividade antitumoral frente à célula K562.
- Ao Prof. PhD. Manoel Odorico de Moraes pelas análises de citotoxicidade *in vitro*.
- A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caridad Noda Perez pelo apoio e incentivo.
- Ao Valter Henrique pela amizade, auxílio nas análises estatísticas, construção das moléculas, paciência, atenção, colaboração e sugestões no trabalho realizado.
- Aos técnicos de laboratório Valéria, Tiago, Dayane, Thalita, Sr. Fernando e Kátia pela paciência, apoio e todo o suporte necessário para desenvolver a parte experimental.
- Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri pelas análises no CG-MS, atenção e colaboração.

- A minha maravilhosa família (pais, irmãos, primos, sobrinho, cunhadas e tios) pelo incentivo, colaboração, paciência, compreensão, companheirismo e amor durante todo este período.
- Ao André Magno e família pelo apoio, incentivo e amizade.
- A todos os meus amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

Eféios 3:20

Deus é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo aquilo quanto pedimos ou pensamos, conforme seu poder que opera em nós.



## RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTOXICIDADE IN VITRO DE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* (ERYTHROXYLACEAE). É uma planta conhecida popularmente como cocão, fruta de pomba ou baga-de-pomba, encontra-se do Nordeste ao Sul do Brasil, em várias formações vegetais. O gênero *Erythroxylum* é utilizado na medicina popular como antioxidante, antitumoral dentre outros. Este trabalho teve como objetivos: realizar o estudo fitoquímico das frações dos extratos metanólico e hexânico das folhas de *E. deciduum*, visando o isolamento e identificação de substâncias; avaliar a atividade antitumoral do extrato metanólico dos frutos nas células K562 de leucemia mielóide crônica, como também avaliar o potencial citotóxico dos extratos metanólico, hexânico, diclorometânico e de acetato de etila das folhas, nas linhagens de células tumorais: HCT-8 (côlon – humano), SF-295 (glioblastoma – humano) e HL-60 (Leucemia – humano). O extrato metanólico das folhas foi fracionado por coluna cromatográfica usando Celulose Microcristalina D como fase estacionária, eluente por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. As sub-frações metanólica e hexânica foram submetidas à cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de solventes em polaridade crescente. Na fração hexânica utilizou-se como sistema de solvente eluente: acetato de etila/hexano, enquanto que na metanólica a mistura foi metanol/diclorometano. Foram isolados e identificados o estearato de  $\beta$ -amirina, da fração hexânica, e 7,4'-dimetoxi-quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose, obtidos da fração metanólica. Para identificação estrutural destas substâncias foram utilizados métodos espectroscópicos usuais (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), comparando-se com dados da literatura e o ácido graxo obtido da hidrólise do estearato de  $\beta$ -amirina submetido a (CG/EM). A avaliação da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica) demonstrou que há um elevado potencial citotóxico nas frações metanólicas dos frutos de *E. deciduum*. Também foi averiguado que nenhuma das amostras testadas apresentaram potencial citotóxico significativo nas linhagens celulares testadas HL-60, SF 295 e HTC 8.

## ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ACTIVITY AND ANTITUMORAL IN VITRO CYTOTOXICITY OF *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* (ERYTHROXYLACEAE). It is a plant popularly known as coca, fruit or berry of dove-of-dove, is the Northeast to Southern Brazil in various plants. The genus *Erythroxylum* is used in folk medicine as an antioxidant, anti-among others. This study aimed to carry out the study of phytochemical fractions of hexane and methanol extracts from the leaves of *E. deciduum*, aimed at the isolation and identification of substances, assess the antitumour activity of methanol extract of the fruits of K562 cells in chronic myeloid leukemia, but also assess the cytotoxic potential of methanol, hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts of the leaves, among strains of tumor cells: HCT-8 (colon - human), SF-295 (glioblastoma - human) and HL-60 (leukemia - human). The methanol extract of the leaves was fractionated by chromatography column using microcrystalline cellulose D as stationary phase eluent in ascending order of polarity: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. The sub-fractions methanol and hexane were submitted to using column chromatography on silica gel as stationary phase and a mixture of solvents in increasing polarity. In hexanic fraction was used as eluent system solvent: ethyl acetate / hexane, while in methanol, the mixture was methanol / dichloromethane. Were isolated and identified the  $\beta$ -amyrin stearate, the fraction hexane, and 7,4'-dimethoxy-quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and quercetin-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose, obtained from the fraction methanol. For structural identification of these substances were used spectroscopic methods usual ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR), compared to data from literature and fatty acid obtained by the hydrolysis of  $\beta$ -amyrin stearate subjected to (GC / MS). The assessment of antitumour activity (chronic myeloid leukemia) showed that there is a high potential cytotoxic in fruits methanolic fractions of *E. deciduum*. Also investigated was that none of the samples tested showed significant potential cytotoxic cell lines tested in HL-60, SF 295 and HTC8.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1. Histórico do uso de produtos naturais .....	2
2.2. A Família Erythroxyllaceae Kunth .....	5
2.3. O Gênero <i>Erythroxyllum</i> e a ocorrência de flavonóides e alcalóides .....	5
2.4. A espécie <i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St. - Hil .....	13
2.5. Câncer: definições e estatísticas .....	14
2.6. Câncer: classificação.....	16
2.7. Tipos de tratamento contra o câncer .....	18
2.8. Produtos Naturais e atividade anticancerígena .....	19
2.9. Estatística Experimental.....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Materiais e reagentes utilizados .....	24
3.2. Equipamentos .....	24
3.3. Material botânico .....	24
3.3.1. <i>Erythroxyllum deciduum</i> - coleta .....	24
3.3.2. Obtenção dos extratos brutos .....	25
3.3.3. Fracionamento dos extratos brutos com celulose .....	25
3.3.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>E. deciduum</i> . .....	25
3.3.5 Fracionamento da fração metanólica das folhas de <i>E. deciduum</i> ....	26
3.3.6. Fracionamento da fração hexânica das folhas de <i>E. deciduum</i> .....	26
3.3.6.1. Hidrólise básica do triterpeno estearato de $\beta$ -amirina.....	26
3.3.6.2. Identificação do ácido graxo ligado ao triterpeno estearato de $\beta$ -amirina por CG/EM .....	27
3.4. Teste para alcalóides .....	27
3.5. Preparação da fração vegetal e drogas controle para o teste de atividade antitumoral in vitro e citotoxicidade dos frutos. ....	28
3.6. Linhagem de células tumorais, obtenção e cultivo .....	28
3.7. Ensaio de atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) com o extrato metanólico dos frutos de <i>E. deciduum</i> .....	29
3.8. Citotoxicidade in vitro .....	30
3.9. Análise estatísticas.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>32</b>
4.1. Resultados da extração.....	32
4.2. Resultados do fracionamento dos extratos brutos com celulose.....	33
4.3. Resultados do fracionamento da fração metanólica das folhas de <i>Edeciduum</i> .....	34
4.4. Resultados do fracionamento da fração hexânica das folhas de <i>Edeciduum</i> .....	34
4.5. Resultados do teste de alcalóides nas frações de folhas de <i>Erythroxyllum</i> <i>deciduum</i> .....	35
4.6. Resultados do Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos .....	36

4.6.1. Identificação estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (F-1) por RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C.....	36
4.6.2. Identificação estrutural do flavonóide quercetina-3-O-α-D-arabinofuranose (F-2) por RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C.....	42
4.6.3. Identificação estrutural do triterpeno estearato de β-amirina T-1 por RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C .....	48
4.7. Identificação estrutural do ácido graxo ligado ao triterpeno estearato de β-amirina T-1 por CG/EM .....	53
..... 4.8. Avaliação da atividade citotóxica da fração metanólica do extrato dos frutos ( <i>EDFrM</i> ) de <i>Erythroxylum deciduum</i> sobre a linhagem tumoral K562....	57
4.9. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> frente às células HCT-8 (cólono humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL-60 (Leucemia - humano) aplicada nos extratos EDFMM, EDFMH, EDFMA e EDFMD.....	63
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6. Sugestões para estudos posteriores .....</b>	<b>65</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Estrutura da Cocaína. ....	6
Figura 02:	Estruturas químicas da calistegina. ....	7
Figura 03:	Estruturas derivadas de quercetina e kaempferol encontrados em <i>E. nummularia</i> . ....	8
Figura 04:	Estruturas dos alcalóides alaternifoline e eritrorotundina isolados das folhas e casca do caule de <i>E. alaternifolium</i> e <i>E. rotundifolium</i> . ....	8
Figura 05:	Estruturas químicas dos alcalóides encontrados no gênero <i>Erythroxylum</i> . ....	9
Figura 06:	Estrutura química dos derivados de Taxifolina. ....	10
Figura 07:	Estrutura química da quercetina. ....	10
Figura 08:	Estrutura química da fisetina. ....	11
Figura 09:	Estrutura química do kaempferol. ....	11
Figura 10:	Estrutura química do didroxikaempferol. ....	12
Figura 11:	Estrutura química do kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo. .	12
Figura 12:	Estruturas químicas dos flavonóides glicosilados do caule de <i>Erythroxylum novogranatense</i> . ....	13
Figura 13 e 14:	Fotos de <i>E. deciduum</i> , Campus UEG, Anápolis. GO, Nascimento, G. C., novembro de 2006. ....	13
Figura 15:	Algumas estruturas químicas de modelos e fármacos antineoplásticos importantes da terapêutica moderna. ....	20
Figura 16:	Obtenção do extrato metanólico das folhas de <i>Erythroxylum deciduum</i> . ....	32
Figura 17:	Obtenção dos extratos metanólico e hexânico do fruto de <i>Erythroxylum deciduum</i> . ....	33
Figura 18:	Fracionamento da fração do extrato metanólico das folhas de <i>E. deciduum</i> . ....	34
Figura 19:	Cromatografia da fração do extrato hexânico das folhas de <i>E. deciduum</i> . ....	35
Figura 20:	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz) ....	40
Figura 21:	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz) ....	41
Figura 22:	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz) ....	45
Figura 23:	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz) ....	46
Figura 24:	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz) ....	47
Figura 25:	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do triterpeno T-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ....	51
Figura 26:	Espectro de RMN <sup>13</sup> C triterpeno T-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) ....	52
Figura 27:	Espectro do ácido graxo ligado ao triterpeno hexadecanoato de β-amirina. ....	54
Figura 28:	Espectro e fórmula estrutural do ácido graxo ligado ao triterpeno hexadecanoato de β-amirina. ....	55
Figura 29:	Rearranjo de MacLafferty. ....	56
Figura 30:	Percentual de citotoxicidade da fração metanólica <i>in vitro</i> sobre células tumorais de leucemia mielóide crônica K562, comparada com o taxol e a ciclofasfamida. ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das partições do extrato metanólico das folhas de <i>E. deciduum</i> .....	33
Tabela 2 – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1 ....	38
Tabela 3 – Dados de RMN de <sup>13</sup> C (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1 ...	39
Tabela 4 – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-2 ....	43
Tabela 5 – Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100MHz, em DMSO) para o flavonóide F-2 ...	44
Tabela 6 – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) para o triterpeno T-1 .....	49
Tabela 7 – Dados de RMN de <sup>13</sup> C (100MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) para o flavonóide T-1 ....	50
Tabela 8 – Distribuição dos valores de densidade ótica e suas médias, desvio padrão, coeficiente de variação, porcentagem de crescimento e porcentagem de citotoxicidade conforme concentrações da fração do extrato metanólico de <i>E. deciduum</i> sobre células K562, bem como das drogas padrão.....	58
Tabela 9 – Análise de Variância e Teste de Tukey entre as frações metanólicas e os padrões adotados .....	61
Tabela 10 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL (extratos). Valores expressos em média ± DPM. ....	63

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATCC	(American Type Cell Collection) – Coleção americana de Cultura de Células
Aco	Acetato
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em camada Delgada
CG	Cromatografia gasosa
CGEM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Conc.	Concentração
d	Dubleto
dd	Duplo Dupleto
EM	Espectro de Massa
fr.	Frações
h	Altura
Hz	Hertz
INC	Instituto Nacional de Câncer
J	Constante de Acoplamento
M	Multiplete
Me	Metila
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MTT	Método Colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
m/z	Relação massa/carga do íon (pela retirada de um elétron)
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Singleto
t	Triplete
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

# 1. INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde os primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, como utensílios para manifestações artísticas, cultural e religioso e como meio restaurador da saúde (SIMÕES, *et al.*, 2002).

As plantas medicinais têm uma importância histórica para a terapêutica, pois são utilizadas como fonte de matérias-primas farmacêuticas, protótipos de fármacos e no desenvolvimento de fitoterápicos (SIMÕES, *et al.*, 2002).

Estudos fitoquímicos feitos com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* (pertencente à família Erythroxylaceae que é uma das mais representativas do cerrado brasileiro) levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides que apresentam atividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, atividade anti-inflamatória dentre outras (EVANS, 1981; ANSELL *et al.*, 1993 e NAKAMURA, 2003).

COLODEL *et al.* estudaram os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da intoxicação natural pelos frutos de *E. deciduum* em ovinos, que ocorreu de janeiro a março de 2004 no município de Lagoa Vermelha, RS. Os autores verificaram que a ingestão espontânea de frutos da planta vinha sendo a causa de mortandade dos animais. Além disso, os frutos administrados por via oral nos ovinos foram tóxicos em dose única de 60 g/Kg ou quando fracionado em pelo menos 4 doses de 17 g/Kg a cada 12 horas. Os principais sinais clínicos nos animais intoxicados, natural e experimentalmente, foram neurológicos e caracterizados por ataxia, hiperexcitabilidade e tremores musculares que se pronunciavam durante o manejo. Próximo à morte, os ovinos apresentavam dispnéia com respiração abdominal e cianose (COLODEL *et al.*, 2003).

A intoxicação dos frutos nos ovinos, bem como o fato da planta *E. deciduum* ser encontrada no cerrado e pertencer a mesma família de *E. coca*,



na qual se extrai a cocaína, motivaram o estudo da mesma. Esperava-se encontrar alcalóides, flavonóides e triterpenos em *E. deciduum*, pois é uma característica fitoquímica deste gênero.

Como o câncer é uma patologia que representa um dos principais problemas do mundo, causando temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, viu-se a necessidade de se realizar o estudo da atividade antitumoral.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações dos extratos metanólico e hexânico das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, visando o isolamento e identificação de substâncias. Dentre os objetivos também estava avaliar a atividade antitumoral das células K562 de leucemia mielóide crônica do extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*, bem como avaliar o potencial citotóxico dos extratos metanólico, hexânico, diclorometânico e de acetato de etila das folhas, nas linhagens de células tumorais: HCT-8 (côlon – humano), SF-295 (glioblastoma – humano) e HL-60 (Leucemia – humano).

Foram utilizados as folhas e frutos de *E. deciduum* onde os extratos brutos foram obtidos com metanol, e em seguida realizou-se o ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) apenas com o extrato bruto dos frutos. Já com o extrato metanólico das folhas realizou-se o fracionamento do extrato bruto com celulose, isolou-se e purificaram-se os constituintes químicos obtendo-se dois flavonóides e um triterpeno, identificados com a análise espectroscópica através da Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG/EM.

Nos extratos fracionados das folhas de metanol, diclorometano, hexano e acetato de etila realizaram-se a Citotoxicidade *in vitro*.

Ao contrário do que se esperava não foram encontrados alcalóides nas folhas ou frutos da planta estudada.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico do uso de produtos naturais

O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais, pelos povos primitivos e indígenas, demonstra ao longo da história da humanidade que pela própria necessidade humana, as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados, proporcionando o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas (CORRÊA *et al.*, 2000).

A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas, bem como da inter-relação animais com insetos e plantas (VIEGAS JR *et al.*, 2006).

Dentre estes, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON e ANDERSON, 1998).

Devido as suas variedades vegetais, o Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético tem valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Verifica-se que de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies existentes no país, das quais 55.000 estão catalogadas, apenas 8% dessas espécies vegetais foram estudadas em busca de compostos bioativos (SIMÕES *et al.*, 2004; PINTO, 1990; CALIXTO, 2003 e LAPA *et al.*, 2003).

O cerrado brasileiro forma um relevante conjunto de ecossistemas com cerca de 2.000.000Km<sup>2</sup>, representando 25% do território nacional. Ele engloba 1/3 da biota nacional. Possui o segundo maior conjunto de animais da Terra e tem uma riqueza biológica estimada em 160.000 espécies de plantas e animais

que corresponde a 5% da flora e fauna mundiais. Este bioma apresenta clima tropical, vegetação peculiar, baixa fertilidade de solo, predomínio de uma longa estação seca, bem como, material para a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças, dentre elas o câncer (MANS *et al.*, 2000 e GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Segundo Koehn e Carter (2005) cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas atualmente. Cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais

Com isso, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (AMOROZO e GELY, 1988).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

De acordo com Fernandes e Antunes (2000) o único recurso terapêutico de 2/3 da população do planeta utiliza fitoterápicos, cujo mercado mundial deste recurso movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Para se ter uma idéia, o Brasil exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, bardana, catuaba, ipeca e quina. Entretanto, importa uma quantidade

considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro paradoxo para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta. Esta falta do status de medicamento que garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário, é um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil, como também a possibilidade de exportação (SIANI e GILBERT, 2000).

Já na Europa, a fitoterapia já é parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em muitas farmacopéias. Podendo destacar os extratos de ginseng e de *Hypericum*, o fitoterápico TMPZ-2 (extrato de *Ligusticum chuanxiong*, utilizado no tratamento da angina) e *Crategus bu-wang* utilizado como antiolesteromêmico (YUNES *et al.*, 2001).

## 2.2. A Família *Erythroxylaceae* Kunth

*Erythroxylaceae* é uma família de plantas angiospérmicas pertencente à ordem Malpighiales, à classe Magnoliopsida (Dicotiledóneas - planta cujo embrião contém dois ou mais cotilédones). O grupo contém 4 gêneros e aproximadamente 250 espécies, incluindo a planta da coca (AMARAL JÚNIOR, 1980).

Esta família é uma das mais representativas dos cerrados, tem seus principais centros de diversidade e endemismo no Sul da América, Sudeste asiático e Madagascar. A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum* P. Browne, que apresenta distribuição ampla nos continentes Americano, Africano, Asiático e Oceania, principalmente na América tropical. Os outros três gêneros, *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Excell e *Mendonça*, possuem poucas espécies e apresentam distribuição exclusiva na África (PLOWMAN, 1999; NAKAMURA, 2003 e Dally *et al.*, 1997).

## 2.3. O Gênero *Erythroxylum* e a ocorrência de flavonóides e alcalóides

O gênero *Erythroxylum* tem aproximadamente 250 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo que para o Brasil é descrita a ocorrência de aproximadamente 130 espécies, em ambientes florestais e de Cerrado (AMARAL JÚNIOR, 1980)

Estudos anteriores sobre a composição química do gênero *Erythroxylum* indicam a ocorrência de alcalóides tropânicos em folhas e frutos (BRACHET *et al.*, 1997; BRINGMANN *et al.*, 2000; CHRISTEN *et al.*, 1995; EI-IMAN *et al.*, 1998; GRIFFIN and LIN, 2000; PAYOL-HILL *et al.*, 2000; ZUANAZZI *et al.*, 2001). Especialmente flavonóides e óleos triterpênicos tem sido bem relatados. (BOHM *et al.*, 1988; CHAVEZ *et al.*, 1996; KOLODZIEJ *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 2003, BARREIROS *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 1996).

Estudo fitoquímico feito com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides (EVANS, 1981; ANSELL *et al.*, 1993).

Várias espécies do gênero *Erythroxylum* possuem propriedades medicinais, como a popular coca (*E. coca* Lamk. e *E. novogranatense*) e suas variedades as mais conhecidas e estudadas devido à presença de alcalóides em suas folhas, onde a cocaína (**Figura 01**), pode chegar até 2% da folha de massa seca que foi empregada como anestésico local em pequenas cirurgias (BIERAS e SAJO, 2004; PLOWMAN e BERRY, 1999; BOHM *et al.*, 1982; GRIFFIN e LIN, 2000).

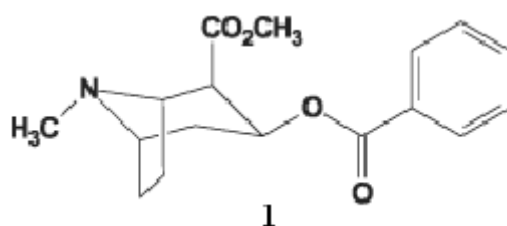


FIGURA 01: Estrutura da Cocaína

Verificou-se acúmulo de cocaína em *E. coca* e *E. novogranatense*, porém, vestígios em algumas outras espécies, que pode não ser um carácter distintivo filogenético da família Erythroxylaceae. Calisteginas foram identificadas em numerosas espécies cultivadas e silvestres do gênero

*Erythroxylum*, no total de até 0,32% de matéria seca foliar. A ocorrência simultânea de calistegina, cocaína, e outros alcalóides com estruturas de um 3  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$  ou 3-hidroxitropano, juntamente com nicotina, apoiam o conceito de etapas comuns de biossíntese de alcalóides de *Erythroxylum*, semelhante as de *Solanaceae* <sup>1</sup>. Foram detectadas calisteginas A<sub>3</sub> e B<sub>2</sub> (**Figura 02**), na maioria das espécies como *E. novograntense*, *E. amazonicum* <sup>2</sup>, *E. argentinum* <sup>3</sup>, *E. campestre* <sup>4</sup>, *E. havanense* <sup>5</sup>, *E. macrocarpum* <sup>6</sup> e *E. pulchrum* <sup>7</sup> (1=BROCK *et al.*, 2005; 2=SALAMA *et. al.*, 1994; 3=ZUANAZZI *et. al.*,2001; 4=AYNILIAN *et. al.*, 1974; 5=DOMINICIS and FERNANDEZ, 1991; 6=AL-SAID *et. al.*, 1986; 7=AYNILIAN *et al.*, 1974).

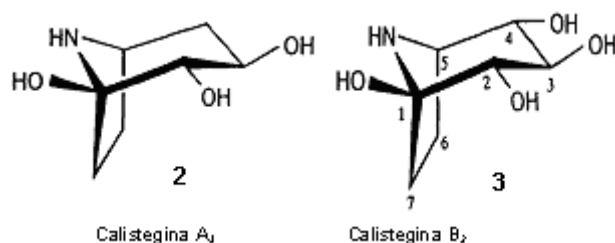
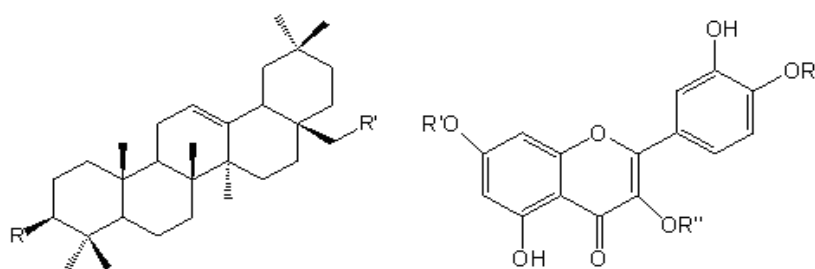


FIGURA 02: Estruturas químicas da calistegina

Na região do Alto Rio Grande, MG, *Erythroxylum campestre* e *Erythroxylum tortuosum* vêm sendo usados como fitoterápicos. Suas raízes são utilizadas na forma de infuso como laxante, enquanto a casca do caule da espécie *E. tortuosum* é indicada como adstringente no caso de hemorragias, também na forma de infuso. (RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Barreiros *et al.*, (2004) estudando a planta *E. nummularia* isolou e identificou os flavonóides querentina e kaempferol (**Figura 03**). Pois a presença de flavonóides e estéres de ácido graxo de triterpenos demonstraram uma característica comum nas espécies brasileiras de *Erythroxylum* (BARREIROS e FRAGA, 2001 e CHAVES *et al.*, 1996).



4. : R= OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R'= H  
n=14, n=16
5. : R= OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>; R'= OH  
n=14, n=16
6. : R= OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>; R'= COOH
7. : R= R'= CH<sub>3</sub>; R''=H
8. : R=R'=H; R''= GLUC

FIGURA 03: Estruturas derivadas de quercetina e kaempferol encontrados em *E. nummularia*

Payo-Hill *et al.*,(2000) em Cuba isolou e identificou nas folhas de *E. alaternifolium* e nas folhas e casca do caule de *E. rotundifolium* os alcalóides 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dibenzoiloxi-6 $\beta$ -hidroxi-tropano denominado alternifólia (**Figura 04**), bem como o 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxi-cinamoiloxi)-7 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-6 $\alpha$ -hidroxi-tropano denominado eritrorotundina.

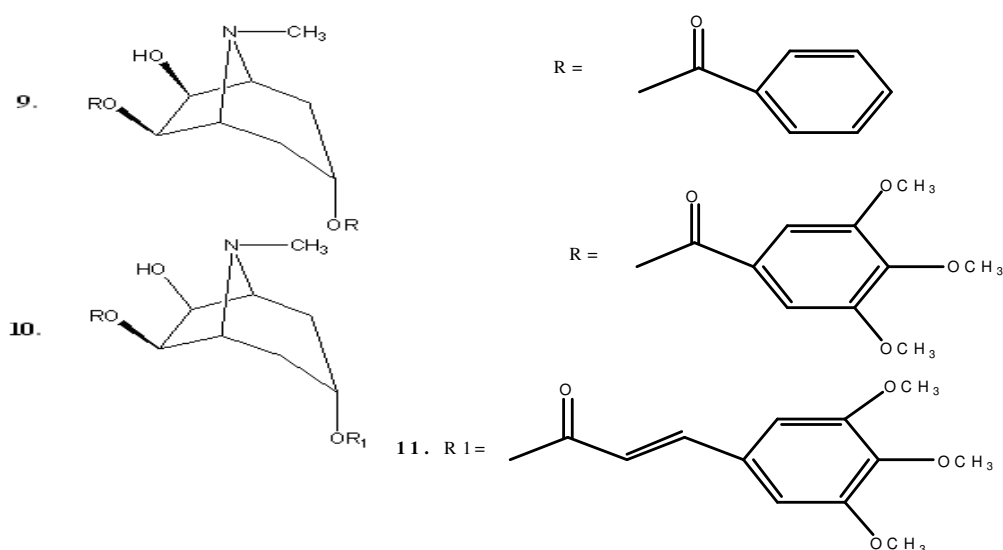


FIGURA 04: Estruturas dos alcalóides alternifoline e eritrorotundina isolados das folhas e casca do caule de *E. alaternifolium* e *E. rotundifolium*.

Griffin, W.J. e Lin, G.D., (2000) descrevem a presença de alcalóides encontrados no gênero *Erythroxylum*, como a ecgonina, cocaína, tropanococaína e  $\alpha$ -truxilline (**Figura 05**).

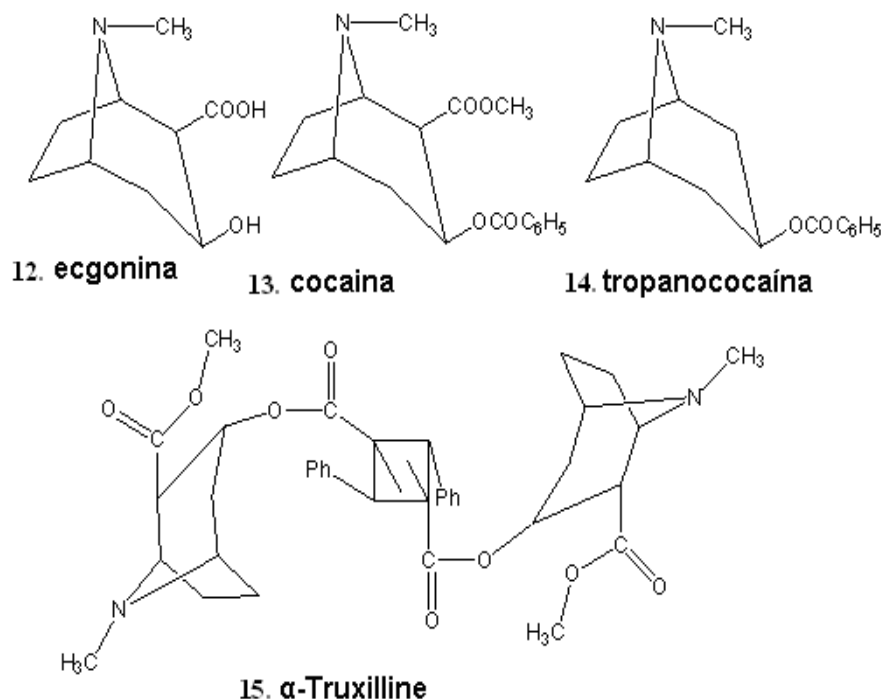
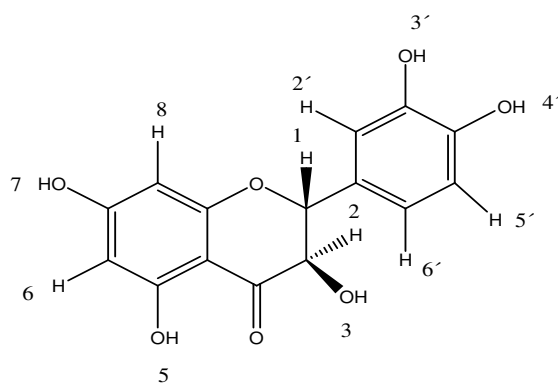


FIGURA 05: Estruturas químicas dos alcalóides encontrados no gênero *Erythroxylum*

Identificou nas espécies *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* e *E. coca* var. *ipadu* os seguintes flavonóides (JOHNSON *et al.*, 1998):

- Taxifolina, presente na fração polar do extrato foliar seco de *E. c. var. ipadu* (**Figura 06**), que apresenta atividades: inativação de substâncias citotóxicas e efeito anti-oxidante <sup>1</sup>, efeito anti-diabetes <sup>2</sup>, efeito anti-oxidante que protegem a peroxidação lipídica, a redução do teor de lipoproteínas de baixa densidade no fígado e soroefeito anti-tumoral <sup>3</sup> e efeito anti-mutagênico <sup>4</sup>, efeito anti-viral <sup>5</sup>, dentre outros (**1**=TUKAVKINA *et al.*, 1996; **2**=HARAGUCHI *et al.*, 1997; **3**=CHU *et al.*, 1992; **4**=HUANG *et al.*, 1983 e **5**=BIZIAGOS *et al.*, 1987).

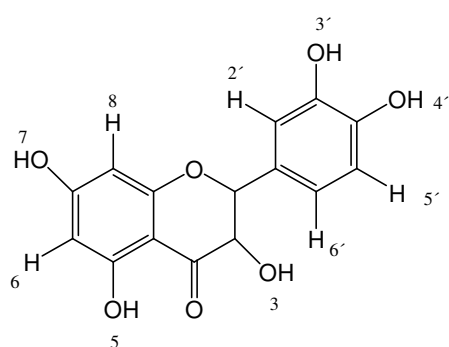




	3'	4'	3	5	7
<b>16.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	OH	OH	H	OH	TetraAcil   Ramnosil
<b>17.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	H	TetraAcil   Ramnosil	OH	OH	TetraAcil   Ramnosil
<b>18.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	OH	TetraAcil   Ramnosil	OH	OH	TetraAcil   Ramnosil
<b>19.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	OH	TetraAcil   Ramnosil	TetraAcil   Ramnosil	OH	OH
<b>20.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	OH	TetraAcil   Ramnosil	TetraAcil   Ramnosil	OH	TetraAcil   Ramnosil

FIGURA 06: Estrutura química dos derivados de Taxifolina

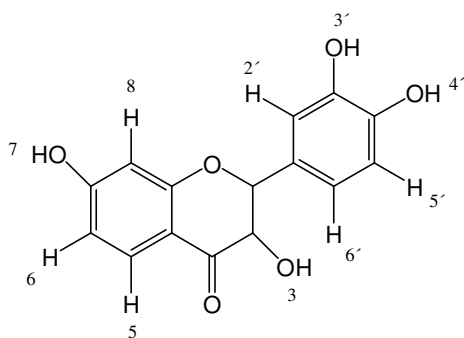
- Quercetina (**Figura 07**) presente na fração polar do extrato das folhas de *E. c. var. ipadu* e *E. n. var. truxillense*, que apresentou atividade anti-tumoral <sup>1</sup>, atividade anti-inflamatória <sup>2</sup>, bem como atividade anti-mutagênica <sup>3</sup> (1=CHU *et al.*, 1992; 2=SCHWARTZ e MIDDLETON, 1984 e 3=BJELDANES e CHANG, 1977).



	3'	4'	3	5	7
<b>21.</b> <i>E. c. var. ipadu</i>	TetraAcil   Ramnosil	OH	H	OH	TetraAcil   Ramnosil
<b>22.</b> <i>E. n. var. truxillense</i>	Ramnosil	OH	glucosil	OH	Acetil Ramnosil

FIGURA 07: Estrutura química da quercetina

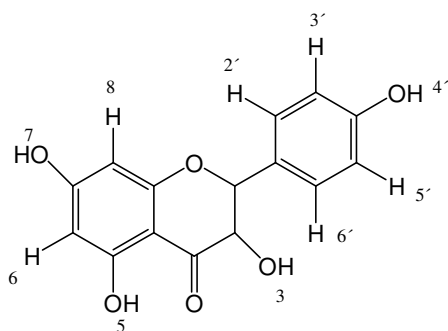
- Fisetina (**Figura 08**), presente na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, apresentou atividade anticarcinogênica <sup>1</sup>, efeito anti-alérgico, atividade antioxidante <sup>2</sup> (1=LU *et al.*, 2005 e 2=TROUP *et al.*, 2007).



	3'	4'	3	5	7
<b>23.</b> <i>E. n. var. truxillense</i>	H	OEt	Ramnosil	H	Acetil Ramnosil

FIGURA 08: Estrutura química da fisetina

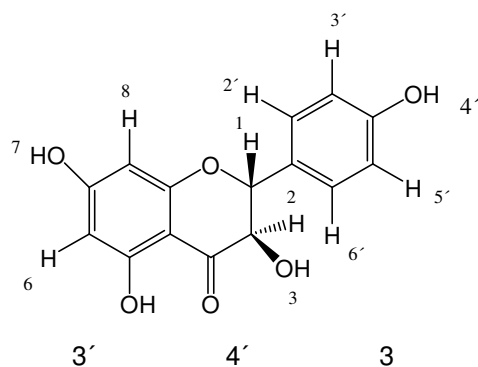
- Kaempferol (**Figura 09**) encontrado na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, apresentou atividade anti-inflamatória <sup>1</sup>, atividade antioxidante, anti-alérgico, antiistamínico, inibidor de ciclooxigenase <sup>2</sup> (1=HÄMÄLÄINEN, *et al*, 2007 e 2=DUKE, 2000)



	3'	4'	3	5	7
<b>24.</b> <i>E. n. var. truxillense</i>	H	OEt	Ramnosil	H	Acetyl Rhamnosyl

FIGURA 09: estrutura química do kaempferol

Diidroxikaempferol (**Figura 10**) verificada na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*.



25. *E. n. var. truxillense*

H

OEt

Rhamnosyl

OH

Acetyl

Rhamnosyl

FIGURA 10: Estrutura química do diidrokaempferol

Um novo flavonóide, Kaempferol ramnosil diglicosilado, foi isolado das folhas *Erythroxylum coca var. ipadu Plowman*, cultivadas na Amazônia, denominada kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo (**Figura 11**). Atualmente cultivado em áreas colombianas e é útil como marcador taxonômico (JOHNSON *et al.*, 2003).

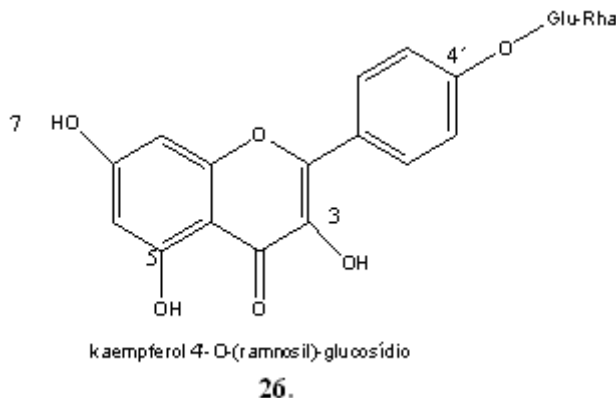


FIGURA 11: Estrutura química do kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo

Outro novo flavonóide glicosilado foi isolado do caule de *Erythroxylum novogranatense*, e sua estrutura foi elucidada baseada no espectro de massa e RMN-<sup>1</sup>H como (+)-catechin 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo. Numa base semelhante, de produtos químicos e provas espectroscópicas, a presença de ombuin 3-O-rutinosídeo foi estabelecida. Além disso, a ocorrência do biflavonóide procianidina. As estruturas estão descritas na **Figura 12** (BONEFELD, 1986).

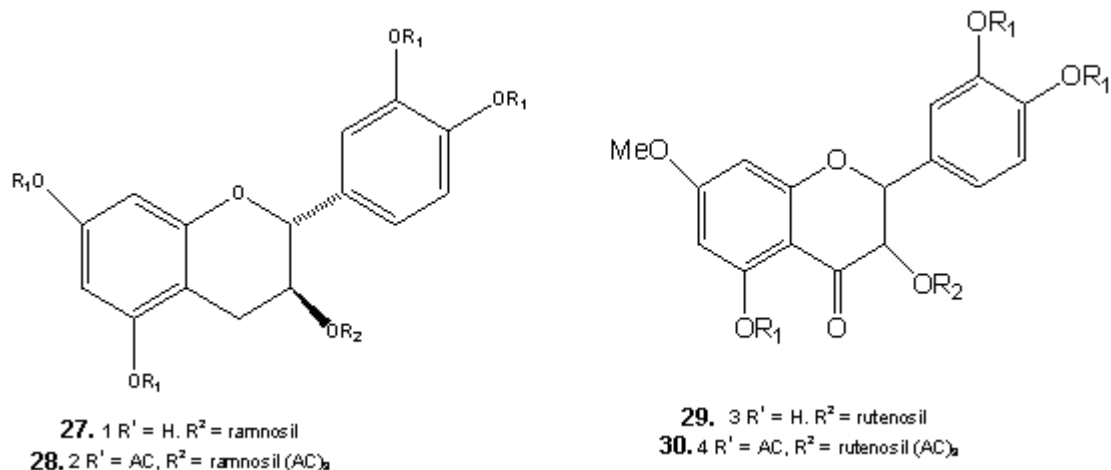
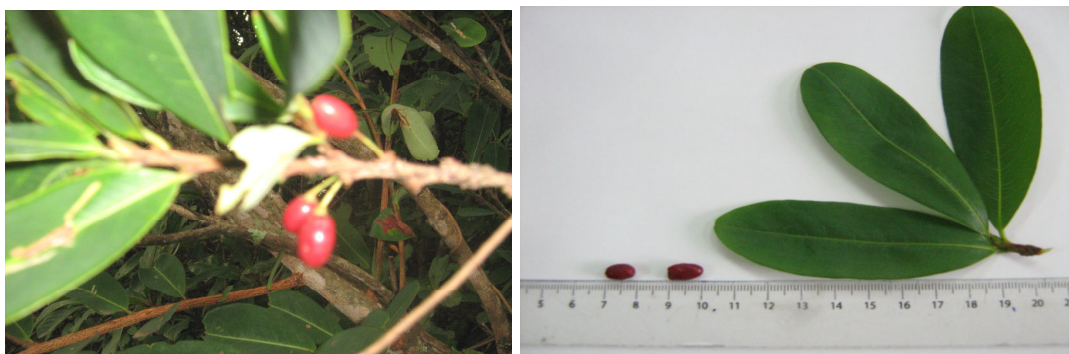


FIGURA 12: Estruturas químicas dos flavonóides glicosilados do caule de *Erythroxylum novogranatense*.

#### 2.4. A espécie *Erythroxylum deciduum* A. St.- Hil

A *Erythroxylum deciduum*, conhecida popularmente como cocão, baga-de-pomba, fruta de pomba, concon, (**Figuras 13 e 14**) é uma árvore de grande porte, podendo chegar até 8 metros de altura, dotada de copa alongada e densa. Tronco curto e cilíndrico, de 20-35 cm de diâmetro, com casca grossa e finamente fissurada de maneira um pouco oblíqua em relação ao eixo do fuste. No Brasil, essa espécie encontra-se do Piauí e Nordeste até Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, em várias formações vegetais. Também na Argentina e Paraguai (LORENZI, 2000).



FIGURAS 13 e 14: Fotos de *E. deciduum*, Campus UEG, Anápolis.GO, NASCIMENTO, G. C., novembro de 2006.

*E. deciduum* floresce dos meses de agosto-outubro junto com o surgimento de novas folhas. Os frutos amadurecem de outubro a janeiro. A madeira é indicada para pequenas obras de construção civil, marcenaria leve, esquadrias, obras de torno e cabo de ferramentas. Os frutos são muito consumidos por várias espécies de pássaros. A árvore pode ser empregada para arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas e também recomendadas para reflorestamentos preservacionistas (LORENZI, 2000).

## 2.5. Câncer: definições e estatísticas

Câncer é uma patologia que representa um dos principais problemas do mundo <sup>1</sup>, causando temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Esta palavra deriva do latim caranguejo, presumivelmente pelo fato de um câncer “aderir a qualquer parte e agarrar-se de modo obstinado, como um caranguejo” <sup>2</sup> (1=RIBEIRO *et al.*, 2003 e 2=ALMEIDA, 2005).

Câncer é uma neoplasia, ou seja, uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e não está coordenado com ele, persistindo da mesma maneira excessiva após o término do estímulo que induziu a alteração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Neoplasias são classificadas em benignas e malignas. Quase todos os tumores benignos crescem como massas coesivas em expansão, que permanecem localizadas em seu sítio de origem, porém sem capacidade de infiltração, invasão ou metástases para locais diferentes (COTRAN *et al.*, 2000).

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou *neoplasias malignas*. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagorosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Na maioria dos casos, os tumores benignos possuem crescimento e expansão lenta, e usualmente são envolvidos por uma faixa de tecido conjuntivo denominada cápsula fibrosa. Esse encapsulamento tende a manter

a neoplasia benigna como massa isolada, facilmente manifesta e móvel, passível de enucleação cirúrgica. Os tumores malignos são, em sua maioria, não encapsulados e invasivos, o que dificulta a sua ressecção cirúrgica. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando assim, a oportunidade de disseminação ou metástase. A falta de diferenciação ou anaplasia é considerada uma característica básica da transformação maligna e sua velocidade de crescimento está relacionada com o nível de diferenciação, de modo que os tumores malignos crescem, em sua maioria, mais rapidamente do que as lesões benignas (COTRAN *et al.*, 2000).

Parkin e colaboradores (2002) estimaram para o ano de 2000 que o número de casos novos de câncer em todo o mundo seria maior que 10 milhões. Os tumores de pulmão (902 mil casos novos) e próstata (543 mil) seriam os mais freqüentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino as maiores ocorrências seriam os tumores de mama (1 milhão de casos novos) e de colo do útero (471 mil).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão (1,3 milhão); estômago (cerca de 1 milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil); e, mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderia ser prevenido.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em 2008 são esperados 231.860 casos novos para o sexo masculino e 234.870 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

## 2.6. Câncer: classificação

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo, ou seja, a classificação primária do câncer se dá de acordo com o tipo de célula que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele, porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Quase todos os tipos de câncer podem ser colocados em um dos seguintes grupos, onde o sufixo – *oma* significa literalmente tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

- *Carcinomas*: originam-se de células que recobrem o corpo (ectodermais), como os tecidos epiteliais, bem como uma série de revestimentos internos (endodermais), como os da boca, brônquios, esôfago, intestino, estômago, útero, ovário e bexiga, os recobrimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas. Também existem tumores geralmente malignos, derivados de dois tipos de tecidos embrionários e os teratomas, derivados de três tipos de tecidos embrionários, que são denominados carcinosarcomas (MURAD e KATZ, 1996).
- *Sarcoma*: é um cancro (tumor) do osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos, ou de tecidos moles. O termo advém do termo grego que significa "crescimento carnosos". Os tumores ósseos também são chamados de sarcomas embora estejam noutra categoria devido às suas características clínicas, microscópicas e por terem um tipo de tratamento diferente (ALMEIDA, 2005).
- *Linfomas*: é originado de células denominadas linfócitos, encontradas em todo o organismo, especificamente em glândulas linfáticas e sangue. De acordo com o tipo de célula afetada, os linfomas são distribuídos em Hodgkin e não-Hodgkin (ALMEIDA, 2005).

- *Leucemia*: refere-se a um grupo de cânceres que afetam as células brancas do sangue. A leucemia se desenvolve na medula óssea, a qual produz três tipos de células sanguíneas: hemoglobina, células brancas e plaquetas e é caracterizada pela produção excessiva de células brancas anormais (cerca de  $7,5 \times 10^3/\text{mm}^3$  para  $105-106 \text{ mm}^3$ ), superpovoando a medula óssea. A infiltração da medula óssea resulta na diminuição da produção e funcionamento de células sanguíneas normais. Dependendo do tipo, a doença pode se espalhar para os nódulos linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central e outros órgãos e tecidos, causando inchaço na área afetada. Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo dessas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).
- *Mielomas*: alteração celular que tem tendência a agravar-se nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos (ALMEIDA, 2005).
- *Tumores das células germinativas*: propagam-se a partir de células dos testículos e/ou ovários, responsáveis pela produção de espermatozoides e óvulos (ALMEIDA, 2005).
- *Melanomas*: desenvolvem-se a partir de células da pele que produzem pigmentos, os melanócitos (ALMEIDA, 2005).
- *Gliomas*: são provenientes das células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal. Raramente ocorre metástase (ALMEIDA, 2005).
- *Neuroblastomas*: Tumor geralmente pediátrico (8 milhões de crianças até 15 anos de idade por ano; 80% dos casos com até 4 anos de idade) derivado de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais, desde gânglios simpáticos até medula adrenal e outros pontos (SPENCE *et al.*, 2001).

As causas do câncer são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, inter-relacionadas. As causas exógenas



relacionam-se ao meio ambiente social ou cultural. As causas endógenas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (RIBEIRO *et al.*, 2003).

## 2.7. *Tipos de tratamento contra o câncer*

O tratamento do câncer pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar essas modalidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Radioterapia é um tratamento no qual se utilizam radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. Estas radiações não são vistas e durante a aplicação o paciente não sente nada. Ela pode ser usada em combinação com a quimioterapia ou outros recursos usados no tratamento dos tumores. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O tratamento, em que se utilizam medicamentos para combater o câncer denomina-se quimioterapia. A administração é na maioria das vezes endovenosa, podendo também ser dada por via oral, intramuscular, subcutânea e tópica. Alcançando a corrente sanguínea, os medicamentos se distribuem a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes, que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo. Este tratamento aumentou significativamente os índices de cura de alguns tumores, em especial das neoplasias hematológicas, as quais não eram controladas com sucesso pelo emprego da cirurgia e radioterapia (MANS, 2000 e MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Transplante de medula óssea é um tipo de tratamento proposto para algumas doenças malignas que afetam as células do sangue. Ele consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Devido à toxicidade das drogas, seu uso está limitado porque a maioria dos cânceres humanos são quimioresistentes e ainda podem causar danos ao DNA de células normais, induzindo a formação de uma segunda neoplasia.

Também, como a seletividade entre as células normais e tumorais evidencia-se modesta e os efeitos colaterais acentuados <sup>1</sup>, torna-se evidente a necessidade de ensaios para o tratamento dessa doença, além de um melhor conhecimento do comportamento do tumor a ser tratado, envolvendo a biologia celular e molecular dos mesmos <sup>2</sup> (1=GARRETT, 1999 e 2=NAM *et al.*, 2003).

De acordo com Raw e Moro (1999), está longe de poder utilizar tudo o que se conhece sobre a carcinogênese para evitar ou tratar o câncer. Dentre as drogas existentes no tratamento antineoplásico tem-se: Metotrexato , Fluorouracil, Azacitidina que atuam no bloqueio da síntese dos ácidos nucléicos, Ciclofosfamida, Titepa, Cisplatina, Daunorrubicina e outros que inibem a replicação do DNA, Vimblastina e Taxol que atuam na inibição da mitose, onde estas inibem a síntese ou atividade das ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK) entre outros.

## 2.8. Produtos Naturais e atividade anticancerígena

Nos últimos 20 anos, alguns fármacos introduzidos na terapêutica, foram fundamentais para o ressurgimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente. Podendo citar os quimioterápicos para o câncer, como a vimblastina (31) e a vincristina (32) extraídas da espécie *Cataranthus roseus*, drogas utilizadas no tratamento de tumores hematológicos, o etoposídeo (33), o teniposídeo (34) e o taxol (35, **Figura 15**) (PINTO, 2002).

Outro exemplo de agente antineoplásico é a camptotecina (36, Figura 15), extraída de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL e WANI, 1966; OBERLIES e KROLL, 2004).

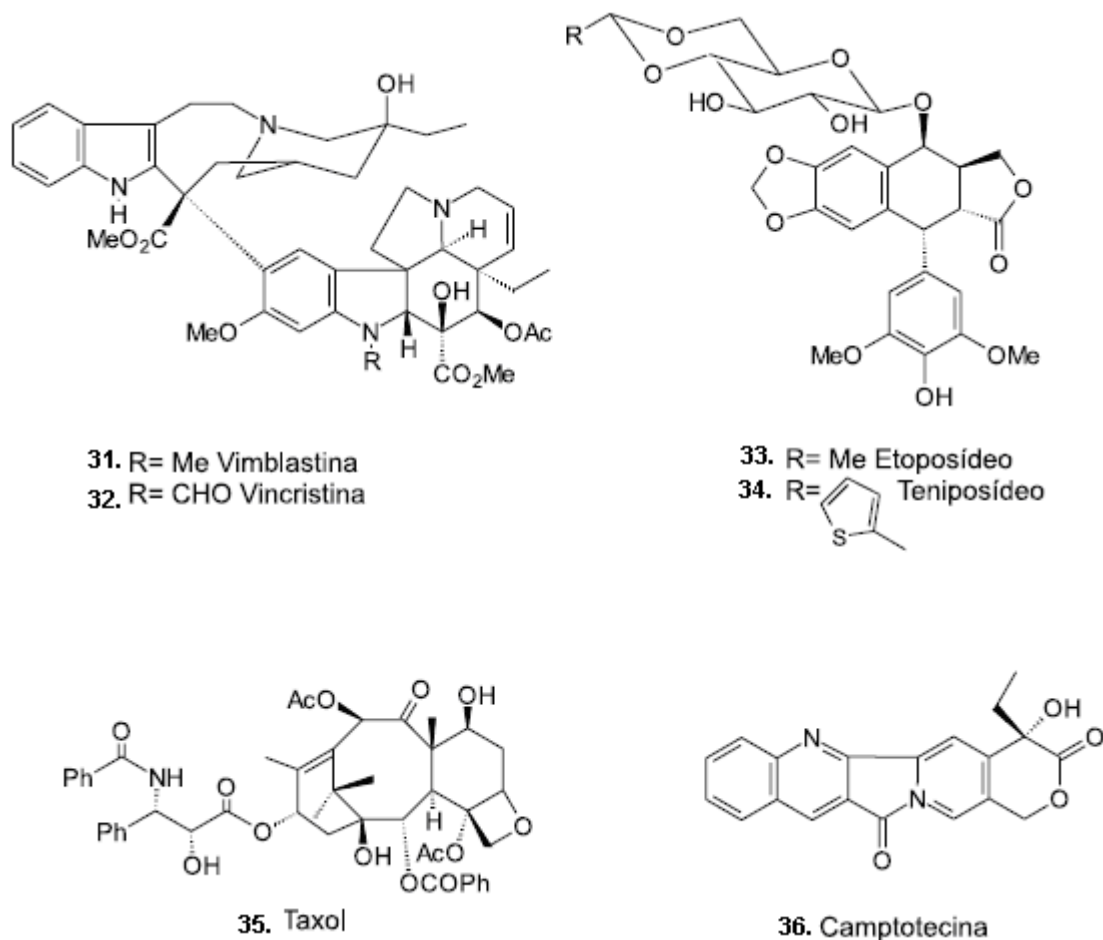


FIGURA 15: Algumas estruturas químicas de modelos e fármacos antineoplásicos importantes da terapêutica moderna

## 2.9. Estatística Experimental

De acordo com o exemplo de R.A. Fisher, a Estatística é definida como a Matemática aplicada aos dados de observação. Mas tais dados são, em muitos casos, colhidos através de trabalhos feitos propositalmente e em condições previamente especificadas: tem-se então dados experimentais, obtidos de experimentos. O estudo dos experimentos, seu planejamento, execução e análise, é que constitui o objeto da Estatística Experimental (GORNES, 1987).

O uso da estatística em especial das técnicas de planejamento de experimentos são imprescindíveis para as tomadas de decisão visando a

avaliação de novos procedimentos ou a otimização de processos e produtos (MONTGOMERY, 2004).

Um experimento planejado é um teste, ou série de testes, no qual são feitas mudanças propositais nas variáveis de entrada de um processo, de modo a podermos observar e identificar mudanças correspondentes na resposta de saída. O processo, pode ser visualizado como uma combinação de máquinas, métodos e pessoas, que transforma um material de entrada em um produto de saída (MONTGOMERY, 2004).

Este produto de saída pode ter uma ou mais características da qualidade observáveis ou respostas. Algumas das variáveis do processo são controláveis, enquanto outras são não-controláveis (embora possam ser controláveis para efeito de teste). Algumas vezes, esses fatores não-controláveis são chamados fatores de ruído (MONTGOMERY, 2004).

Os métodos de planejamento experimental podem ser usados tanto no desenvolvimento do processo quanto na solução de problemas do processo, para melhorar o seu desempenho ou obter um processo que seja robusto ou não-sensível a fontes externas de variabilidade (MONTGOMERY, 2004).

Cabe ao experimentador, pois verificar se as diferenças observadas num experimento são ou não são significativas. Uma diferença significativa se aceita como possivelmente devida ao acaso, e é deixada de lado, até que novos resultados venham confirmá-la ou negá-la. Já um resultado significativo demonstra que os elementos ensaiados não são equivalentes, dão resultados que aceitamos como realmente diferentes (GORNES, 1987).

Para que seja possível planejar de modo adequado a coleta de dados, devem ser entendidos princípios básicos do planejamento de experimentos como a réplica (são repetições do experimento feitas sob as mesmas condições experimentais), a aleatorização (tanto a alocação do material experimental às diversas condições de experimentação, quanto a ordem segundo a qual os ensaios individuais do experimento serão realizados, são determinados ao acaso) e a formação de blocos (são conjuntos homogêneos de unidades experimentais) (MONTGOMERY, 2004).

Para usar a abordagem estatística no planejamento e na análise de um experimento é necessário que as pessoas envolvidas na experimentação tenham, antecipadamente, uma idéia clara do que será estudado e da forma

como os dados serão coletados. Também é recomendado que se tenha uma idéia qualitativa de como os dados serão analisados (MONTGOMERY, 2004).

Como foi realizado a avaliação da atividade citotóxica sobre a linhagem tumoral K562 pelo método colorimétrico MTT (Método Colorimétrico 3-(4,5-imetiltiazol-2-il-2,5-Difenil Brometo de Tetrazoilium), fez-se uma análise de variância com planejamento aleatorizado com um único fator. Já que este método apresenta uma distribuição normal utilizou-se o teste de Tukey

O teste de Tukey, está baseado na amplitude total estudentizada e pode ser usado para comparar todos os pares de contrastes que envolvem diferenças de médias. O teste é exato de nível  $\alpha$  quando o número de repetições é o mesmo para todos tratamentos e aproximado quando o número de repetições é diferente para os tratamentos. Este teste pode ainda ser usado para a construção de intervalos de confiança para a diferença entre as médias dos tratamentos. O procedimento está baseado na distribuição de amplitude total estudentizada (studentized range statistic) dada por (MONTGOMERY, 2004):

$$q = \frac{\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}}{\sqrt{\frac{QM_E}{n}}} \quad (3.8)$$

onde  $\bar{y}_{\max}$  e  $\bar{y}_{\min}$  são as maiores e menores médias amostrais respectivamente, calculadas para um grupo de  $p$  amostras. A distribuição de  $q_\alpha(p, f)$ , com  $\alpha$  sendo o percentil superior de pontos de  $q$  com  $f$  graus de liberdade, associado ao estimador  $QME$  é calculada computacionalmente.

Para um número igual de repetições, o teste Tukey detecta diferenças significativas entre pares de duas médias se o valor absoluto da diferenças das médias amostrais exceder

$$T_\alpha = q_\alpha(k, f) \sqrt{\frac{QM_E}{n}}$$

De forma equivalente, constrói-se intervalos de  $100(1-\alpha)\%$  de confiança para todos os pares de médias dada por:

$$\bar{y}_i - \bar{y}_j - T_\alpha \leq \mu_i - \mu_j \leq \bar{y}_i - \bar{y}_j + T_\alpha, i \neq j .$$

Para tamanhos amostrais diferentes (diferente n° de repetições), temos:

$$T_\alpha = \frac{q_\alpha(k, f)}{\sqrt{2}} \sqrt{QM_E \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

e

$$\bar{y}_i - \bar{y}_j - T_\alpha \leq \mu_i - \mu_j \leq \bar{y}_i - \bar{y}_j + T_\alpha, i \neq j \text{ respectivamente.}$$

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. *Materiais e reagentes utilizados*

- Materiais cromatográficos:
  - Cromatofolhas de Alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> MERC
  - Sílica gel 60 (230 - 700Mesh) - MERCK
- Solventes:
  - Para cromatografia:
    - Solventes P.A. – QHEMIS, NEON, DINÂMICA
  - Para RMN:
    - Solventes deuterados P.A.– (clorofórmio e DMSO) – MERCK e ALDRICH e como referência interna tetrametilsilano (TMS)
- Reveladores:
  - vanilina PA

#### 3.2. *Equipamentos*

- Evaporador: rotativo TECNAL (TE120)
- Moinho de facas tipo cróton Modelo MA-580
- Espectrômetro de RMN:
  - Bruker DRX-400 – DQ – UFSCar
- GC-MS Shimadzu QP5050A - UFG

#### 3.3. *Material botânico*

##### 3.3.1. *Erythroxylum deciduum* – coleta

Foram coletados no mês de novembro de 2006, no Campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) na cidade de Anápolis-GO, Brasil 979g de folhas frescas e 75,2g de frutos frescos da planta *Erythroxylum deciduum*. Sendo identificados pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mirley Luciene dos Santos, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG e as exsiccatas do

material vegetal foram depositadas no herbário desta Unidade, cujos números de tombo são 5274, 5275 e 5276.

### *3.3.2. Obtenção dos extratos brutos*

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C durante 48h, depois pulverizadas em moinho de facas. Em seguida colocou-se em erlenmeyers de 2 L e o extrato obtido a frio com metanol P.A. durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. A seguir o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto metanólico das folhas (EBMF).

Já os frutos frescos foram macerados com almofariz e pistilo, extraídos a frio inicialmente com hexano em erlenmeyer de 500 mL, durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. Após a extração exaustiva com hexano, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto hexânico dos frutos. Depois, passou-se a extrair com metanol por 5 dias durante 3 vezes, repetindo-se o processo que realizou-se anteriormente com hexano.

### *3.3.3. Fracionamento dos extratos brutos com celulose*

O extrato metanólico das folhas de *E. deciduum* (EDFM) foi fracionado por cromatografia em coluna, utilizando-se celulose microcristalina D, como fase estacionária, com o intuito de se retirar os pigmentos, e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Obtiveram-se as seguintes frações das folhas: hexânica (EDFM-H), diclorometânica (EDFM-D), acetato de etila (EDFM-A), bem como metanólica (EDFM-M) (GAMBOA, 2001).

### *3.3.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos de E. deciduum*

O método de separação utilizado para o isolamento das substâncias foi a cromatografia de adsorção em sílica gel. A seguir são apresentados



esquemas dos procedimentos experimentais utilizados para o isolamento das substâncias de folhas de *E. deciduum*.

### 3.3.5. *Fracionamento da fração metanólica das folhas de E. deciduum*

Da fração EDFMM após ter evaporado todo o solvente, foi pesado 30,0g, em seguida, esta foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) e eluída com essa mistura de solventes em polaridade crescente até 100% de metanol. Coletou-se 122 frações, reunidas em 07 novas frações, de acordo os Rf observados nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) após serem reveladas com vanilina.

As amostra EDFMM (31-40 = F-1) e (41-53 = F-2) foram recristalizadas com metanol P.A., filtradas com pressão reduzida, obtendo-se sólidos amarelos amorfos. Ademais as mesmas foram submetidas à Ressonância Magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### 3.3.6. *Fracionamento da fração hexânica das folhas de E. deciduum*

A fração EDFMH (9,1 g) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de acetato de etila/hexano (95:5) e eluída com essa mistura de solventes em polaridade crescente até 100%. Foram coletadas 110 frações, reunidas em 8 novas frações de acordo com o perfil cromatográfico dos Rf observados nas placas de CCD após serem reveladas com vanilina.

Depois da análise por CCD das frações, observou-se uma única mancha na fração hexânica 22. Ademais o sólido branco amorfo foi submetido à Ressonância Magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , em seguida foi realizada uma hidrólise básica e análise através do CG/EM.

#### 3.3.6.1 *Hidrólise básica do triterpeno estearato de $\beta$ -amirina*

A amostra 22 foi hidrolisada em solução de KOH 10% em etanol, sob refluxo, por aproximadamente 2 horas (o acompanhamento da reação foi feito

por CCD), terminada a reação, a mistura foi diluída em água destilada e neutralizada com solução de ácido clorídrico 5%, os produtos da reação foram extraídos com acetato de etila. Em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para secar a substância, filtrou-se e evaporou o solvente em um evaporador rotativo.

#### 3.3.6.2. Identificação do ácido graxo ligado ao triterpeno estearato de $\beta$ -amirina por CG/EM

O triterpeno *estearato de  $\beta$ -amirina* depois de hidrolisado, foi submetido a uma análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria quadrupolar de massas (CG/EM) em um equipamento Shimadzu QP505A, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida (VBP-5, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme de 5% fenilmetilpolisiloxano), mantendo-se uma vazão de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , 72,3 kPa de Hélio, como gás de arraste; temperatura do injetor a 280°C e interface a 300°C e aquecimento com temperatura programada (100°C a 270°C, com um gradiente de 10°C  $\text{min}^{-1}$  até 260°C, mantendo-se uma isoterma de 5 min, com um tempo total de 22 min). O volume de injeção da amostra foi de 1,0  $\mu\text{L}$  diluídas em diclorometano (~20% p/v), com uma razão de split de 1:20. A análise foi conduzida no modo varredura, com a energia de ionização de 70 V, intervalo de massa 40-600 m/z e uma velocidade de 1,0 scan  $\text{s}^{-1}$ .

#### 3.4. Teste para alcalóides

Pegou-se as frações dos extratos das folhas de *E. deciduum*, EDFMH, EDFMD, EDFMA e EDFMM e realizou-se o teste para verificação da presença de alcalóides, através de cromatografia em camada delgada – CCD, utilizando-se 10 mL de fase móvel com Diclorometano/Metanol 5% e Cromatofolhas de Alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> MERC, em béqueres de 50 mL e como revelador o reagente Dragendorff.

### 3.5. *Preparação da fração vegetal e drogas controle para o teste de atividade antitumoral in vitro e citotoxicidade dos frutos*

Para o ensaio de atividade antitumoral e citotóxica foram pesados 10 mg da fração metanólica dos frutos de *Erythroxylum deciduum* (EDFrM) a qual foi dissolvida em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com Dimetil sulfóxido (DMSO) à 0,1 %. Posteriormente a EDFrM foi submetido à agitação vigorosa para dissolução completa, e por fim esterilizado em membranas de 0,22 µm. Após a diluição, o pH foi estabelecido em 7,2.

Como drogas controles foram utilizadas Taxol e Ciclofosfamida que foram dissolvidas em meio RPMI 1640.

### 3.6. *Linhagem de células tumorais, obtenção e cultivo*

Para a realização do ensaio biológico com o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) foi utilizada a linhagem tumoral estabelecida K-562 (Leucemia mielóide crônica). As células K562 foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás, onde foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 M L-Glutamina, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> segundo protocolo estabelecido pela Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC).

Os testes de citotoxicidade in vitro foram realizados pelo laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC) que teve por finalidade avaliar o potencial citotóxico dos extratos EDFMM, EDFMA, EDFMH e EDFMD. Essa análise faz parte da etapa inicial da bioprospecção de substâncias com potencial anticâncer.

As linhagens tumorais utilizadas, HCT-8 (côlon – humano), SF-295 (glioblastoma – humano) e HL-60 (Leucemia – humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI – EUA) e foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 50 µg/mL

### 3.7. Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) com o extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*

Para avaliar a atividade citotóxica e antitumoral do extrato EDFrM foi utilizado o método colorimétrico MTT. O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, em que as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o MTT levando à quebra desta molécula bem como sua redução, produzindo assim o azul de formazan. Para o teste de redução do MTT,  $2 \times 10^5$  de células K562 foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença de EDFrM em concentrações variando de 0,039 a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  ou ciclofosfamida e taxol na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Após o tratamento as células foram incubadas por 24 h em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e seguido 3hs, foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de SDS a 10% diluído em HCl/0,01mol/L. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro utilizando-se filtro de interferência de 550 nm. Para o cálculo da porcentagem de crescimento e citotoxicidade foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$(A)\% \text{ de crescimento} = \frac{[\text{D.O Tumor (na presença do agente antitumoral)} - \text{D.O Basal MTT/SDS}] \times 100}{[\text{D.O Tumor (controle/ meio de cultura)} - \text{D.O Basal MTT/SDS}]}$$

Onde:

D.O = densidade óptica

$$\% \text{ de citotoxicidade dos extratos} = 100 - \% \text{ de crescimento celular (A)}$$

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados, sendo considerado como diferença significativa valores onde o p-value era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Foram considerados significativos percentuais de citotoxicidade superiores a 30%.

### 3.8. Citotoxicidade in vitro

A técnica do Alamar blue faz uso de um indicador de óxido-redução (redox), o Alamar Blue ou resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzido por células viáveis a resorufina (róseo e altamente fluorescente) <sup>1</sup>. No ensaio do Alamar blue é quantificado apenas a redução da resazurina a resorufina. O Alamar blue é um indicador sensível da função mitocondrial <sup>2</sup> (**1**=ZHI-JUN *et al.*, 1997 e **2**=SPRINGER *et al.*, 1998).

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,3 \times 10^5$  cel/mL para as linhagens HCT-8 e SF-295 e  $0,3 \times 10^6$  cel/mL para a linhagem HL-60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término do teste, foram adicionados 10 µL de solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue (resazurina, Sigma Aldrich Co) em todos os poços incubados por 4 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida a absorbância foi determinada nos comprimentos de onda 570 nm (estado oxidado) e 595 nm (estado reduzido), utilizando um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckam Coulter). A percentagem de Alamar blue reduzido foi calculada segundo a fórmula:

**% reduzido =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_o) \times 100$** , onde:

$A_{LW}$  = representa a leitura do estado oxidado

$A_{HW}$  = representa a leitura do estado reduzido

$R_o$  = representa a divisão  $AO_{LW} / AO_{HW}$

$AO_{LW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em baixo comprimento de onda

$AO_{HW}$  = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em alto comprimento de onda.

### 3.9. Análise estatística

A análise de variância nos indica que há uma diferença entre as médias, mas ela não diz qual média que difere. Existem procedimentos específicos

chamados de procedimentos de comparação múltipla, para testar as diferenças entre as médias específicas seguindo uma análise de variância. Dentre os testes mais conhecidos destacamos o teste Tukey que está baseado na amplitude total estudada e pode ser usado para comparar todos os pares de contrastes que envolvem diferenças de médias e foi utilizado para Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica frente à célula K562) (MONTGOMERY, 2004).

Já na Citotoxicidade in vitro foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Resultados da extração

Foram obtidos os extratos brutos metanólicos tanto das folhas como dos frutos de *E. deciduum* conforme descrito no procedimento 3.3.2. (p. 26), onde se obteve 17,1% de EDFM e 0,93% de EDFrM conforme descrito nas **Figuras 16 e 17**.

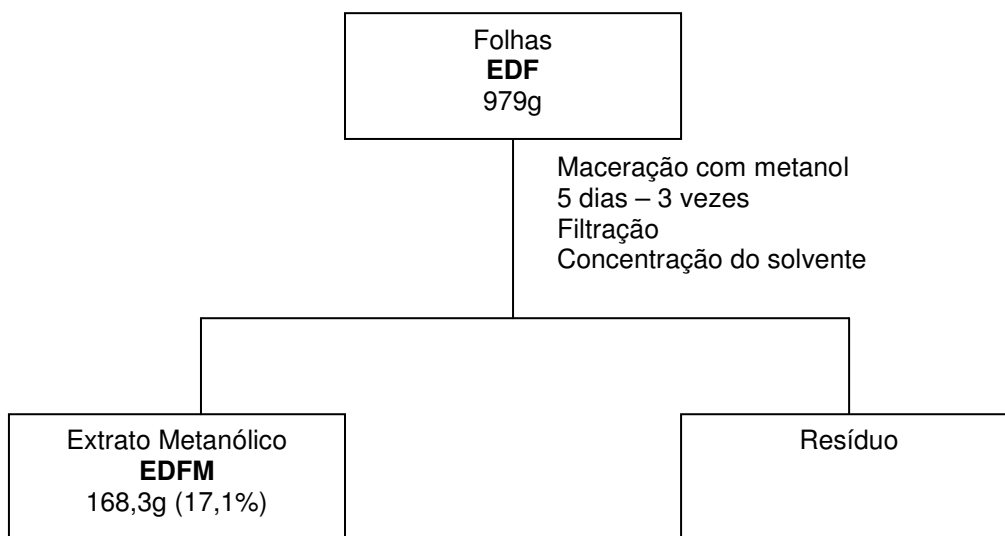


FIGURA 16 – Obtenção do extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum deciduum*

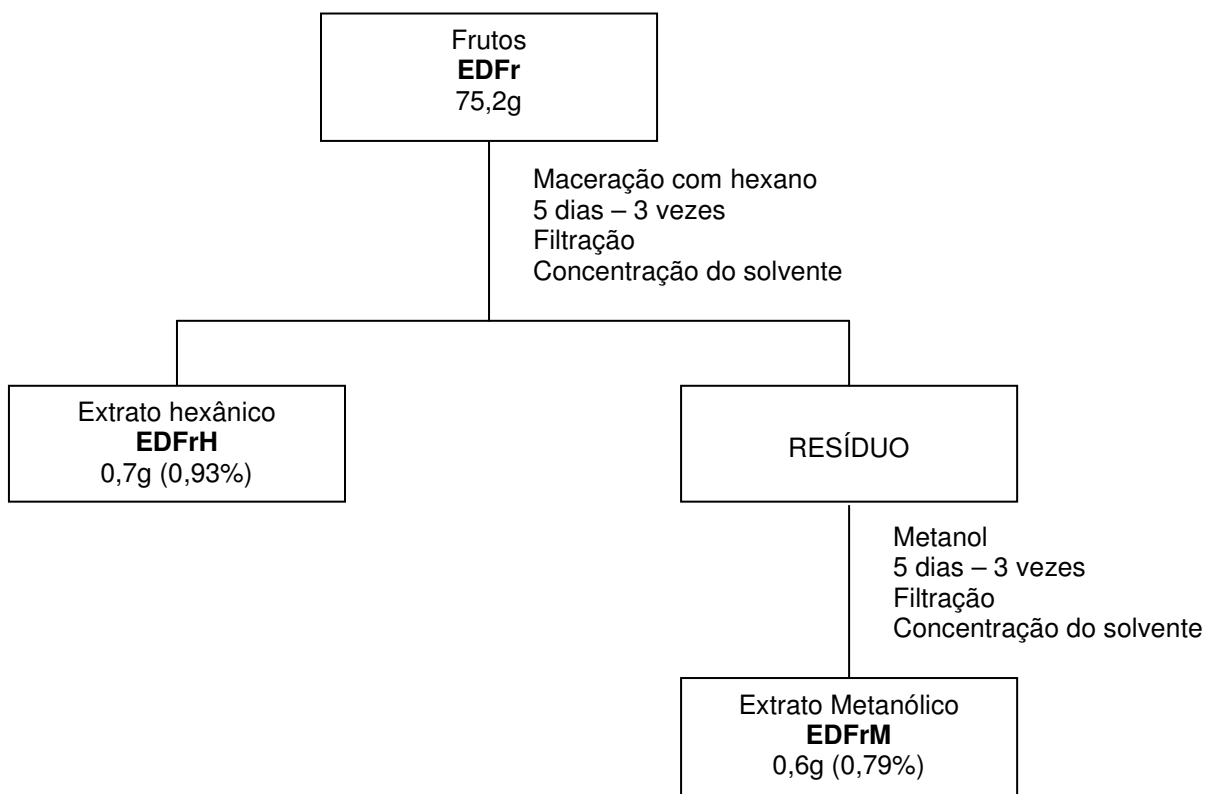


FIGURA 17 – Obtenção dos extratos metanólico e hexânico do fruto de *Erythroxylum deciduum*

#### 4.2. Resultados do fracionamento dos extratos brutos com celulose

A tabela abaixo descreve a quantidade inicial do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*, bem como os valores obtidos das subfrações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica após o fracionamento com celulose.

TABELA 01 – Resultados das partições do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*.

Extrato metanólico	Fração	Código	Quantidade
Folhas 168,3g	Hexano	EDFMH	14,9 g
	Diclorometano	EDFMD	12,2 g
	Acetato de etila	EDFMA	3,4 g
	Metanólico	EDFMM	77,4 g



4.3. Resultados do fracionamento da fração metanólica das folhas de E. deciduum utilizando-se sílica gel

Verifica-se na **figura 18** as 122 frações, reunidas em 7 novas frações com suas respectivas massas, obtidas de 30,0 g de EDFMM que foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) conforme descrito no procedimento 3.3.5. (p. 27). É interessante ressaltar as amostras **F-1** e **F-2** que se apresentaram como sólidos amarelos amorfos.

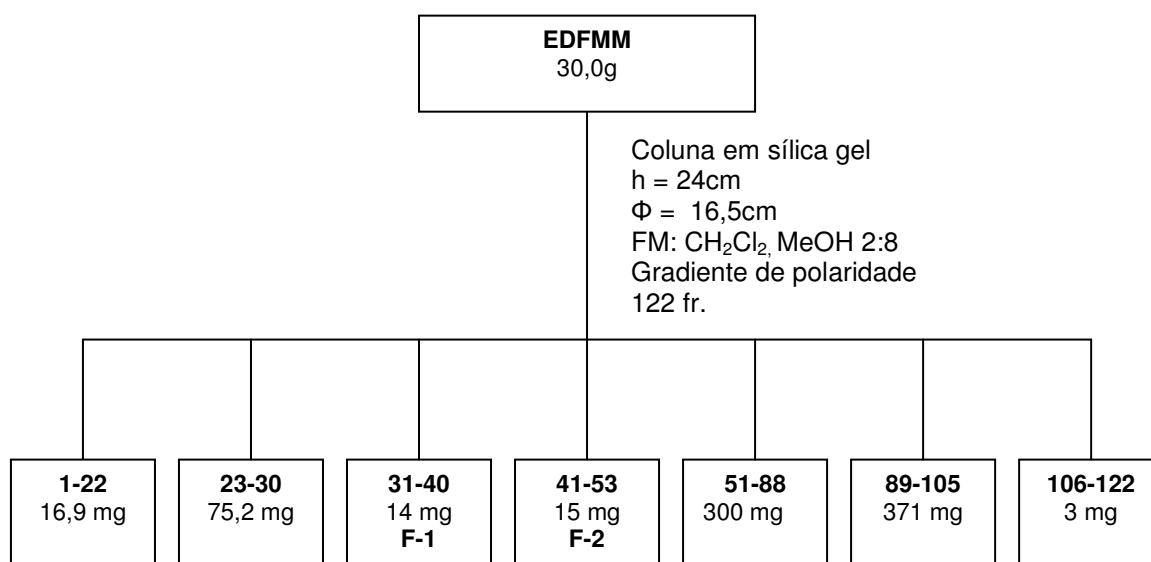


FIGURA 18 – Fracionamento da fração do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*

4.4. Resultados do fracionamento da fração hexânica das folhas de E. deciduum

Observa-se na **Figura 19** que a partir de 9,1 g de EDFMH foram obtidas 110 frações reunidas em 8 novas frações, com suas respectivas massas, de acordo com o perfil cromatográfico dos R<sub>f</sub> observados nas placas de CCD conforme descrito no procedimento 3.3.6. (p. 27). Destaca-se a amostra **T-1** por se apresentar como sólido branco e amorfo.

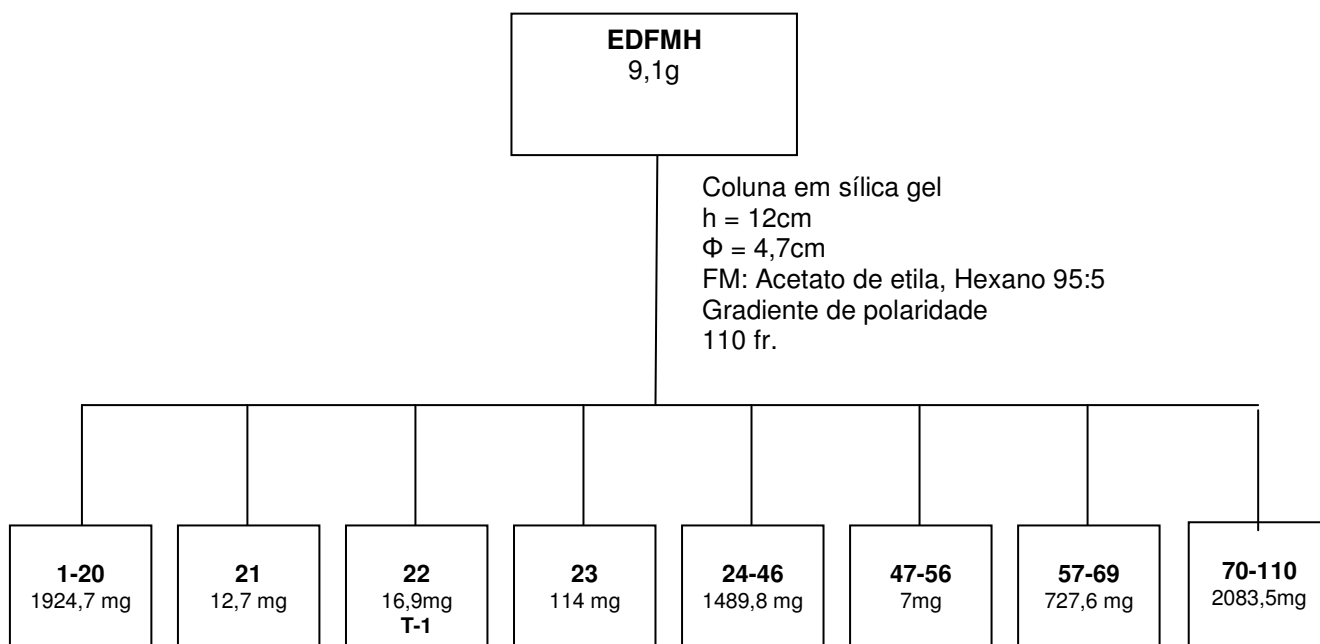


FIGURA 19– Cromatografia da fração do extrato hexânico das folhas de *E. deciduum*

#### 4.5. Resultados do teste de alcalóides nas frações de folhas de *Erythroxyllum deciduum*

O gênero *Erythroxyllum* é caracterizado pela presença de alcalóides e flavonóides, constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário de vegetais. O teste para verificação de alcalóides, utilizando o reagente de Dragendorff (específico para alcalóides), apresentou resultado negativo para todas as frações metanólica, diclorometânica, hexânica e acetato de etila das folhas de *E. deciduum*. Então se concluiu que não há presença de alcalóides nesta planta, apesar deste metabólito secundário ser um marcador taxonômico deste gênero. Porém não podemos afirmar que nenhuma planta *E. deciduum* não apresente alcalóide, pois pode-se inferir que haja diferença sazonal ou até mesmo estação do ano na qual a planta foi coletada.

#### 4.6. Resultados do Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos

As frações hexânica EDFMH (14,9 g) e metanólica EDFMM (77,4 g) foram submetidas à cromatografia em coluna de adsorção em sílica gel, com gradientes hexano/acetato de etila para EDFMH, bem como metanol/diclorometano para EDFMM. Após as frações serem coletadas em frascos coletores de 10 mL, foram analisadas, através de CCD e, depois de terem sido revelados com vanilina, foram reunidas, baseadas nos seus Rf.

Logo após foi feita análise espectroscópica através da Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  utilizando como solvente clorofórmio deuterado para a fração EDFMH 22 e DMSO para EDFMM (31-40) e (41-53). Depois da interpretação dos espectros, identificou-se na fração EDFMH 22 o triterpeno estearato de  $\beta$ -amirina (**T1**), na fração EDFMM (31-40) o flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**F1**) e na fração EDFMM (41-53) o flavonóide quercentina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose (**F2**).

##### 4.6.1. Identificação estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (F-1) por RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$

O sólido amorfo amarelo da fração polar do extrato das folhas de *E. deciduum* foi submetido à análise por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Os resultados desta análise são apresentados a seguir:

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**F-1, Figura 20 e Tabela 02**) observou-se na região de hidrogênios aromáticos, um duplo dubleto em  $\delta$  7,61 ppm referente ao hidrogênio H-6' (J=2,0 e 9,0 Hz); dubleto em  $\delta$  7,63 ppm referente ao hidrogênio H-2' (J=2,0 Hz) e em  $\delta$  6,86 ppm referente ao hidrogênio H-5' (J=9,0 Hz). Além de dois dubletos largos em 6,42 e 6,22 ppm atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente.

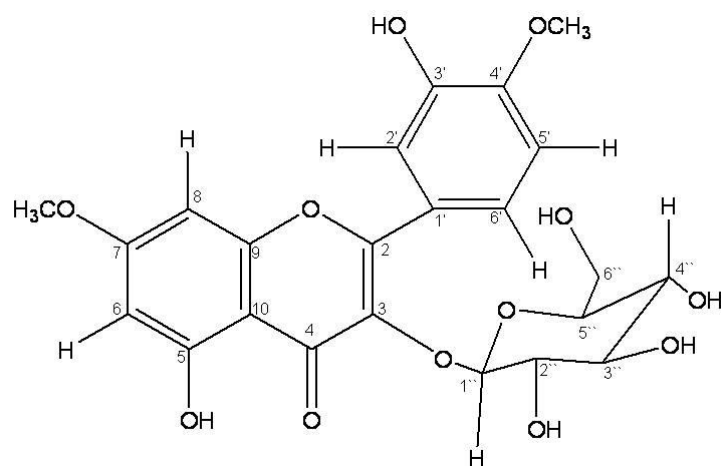
A presença de multipletos relativos a hidrogênios carbinólicos, na região entre  $\delta$  3,0 e 3,8 ppm e um dubleto para cada substância, absorvendo em  $\delta$  5,5 ppm (J = 7,6 Hz;), atribuído ao hidrogênio anomérico, sugere a existência de unidade de açúcar ligado a este flavonóide, o valor da constante de acoplamento em torno de 7,6 Hz entre os hidrogênios H-1" ( $\alpha$ ) e H-2" ( $\beta$ ) indica

um ângulo diedro de  $0 - 20^\circ$  ou  $150 - 180^\circ$ , entre esses hidrogênios, o que sugere que o açúcar está ligado ao flavonóide pela face  $\beta$ . O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 21 e Tabela 03**) desta substância, apresenta, sinais com deslocamentos químicos próximos a  $\delta$  177,4 ppm típico de carbonilas queladas em flavonóides (SILVERSTEIN, 1998).

A ocorrência de cinco sinais na região entre  $\delta$  61,4 e 77,8 ppm, e um sinal em  $\delta$  101,5 ppm referente ao carbono anomérico vem confirmar a existência de uma unidade de açúcar no flavonóide.

A unidade do açúcar presente é evidenciada através dos dados característicos observados no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$ , indicando que D-glicopiranosídeo (**F-1**) está ligado ao flavonóide.

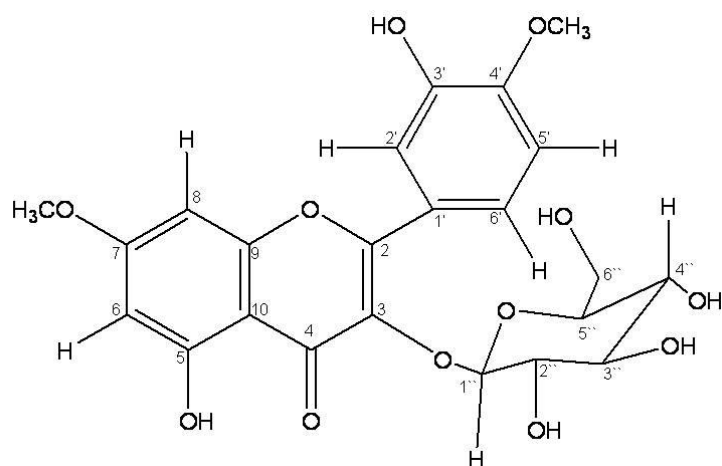
Além disso, as análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e posterior comparação com os dados descritos na literatura resultou na identificação do flavonóide quercetina-3-O-  $\beta$  -D-glicopiranosídeo (**F-1**) (AGRAWAL, 1989).



**F-1**

TABELA 02 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

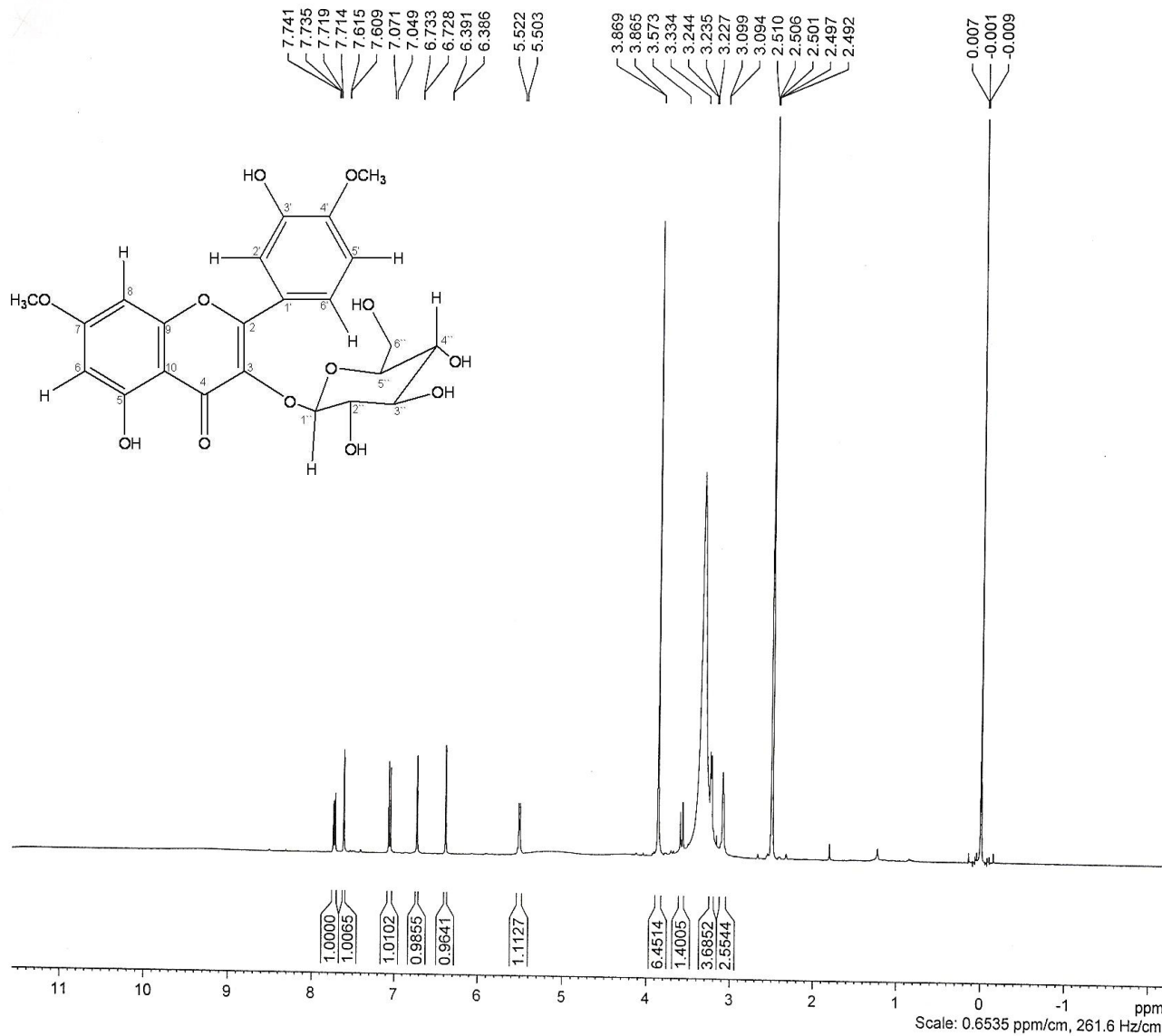
H	F-1
6	6,42 d (1,4 Hz)
8	6,22 d (1,4 Hz)
2'	7,63 d (2,0 Hz)
3'	-
5'	6,86 d (9,0 Hz)
6'	7,61 dd (2,0 e 9,0 Hz)
Açúcar	
1''	5,5 d (7,6 Hz)
2'' a 6''	3,0 – 3,8 m
- OMe	3,86 (s)



**F-1**

TABELA 03-Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

<b>C</b>	<b>F-2</b>	<b>Literatura AGRAWAL</b>
		<b><i>et al.</i>, 1989</b>
C-2	157,1	156,5
C-3	134,4	133,7
C-4	178,2	177,6
C-5	161,4	161,3
C-6	98,7	98,8
C-7	165,9	164,2
C-8	92,9	93,6
C-9	157,1	156,5
C-10	105,6	104,2
C-1'	123,0	121,4
C-2'	112,1	115,2
C-3'	146,3	144,8
C-4'	150,9	148,5
C-5'	116,4	116,5
C-6'	122,1	121,6
C-1''	101,5	101,4
C-2''	74,7	74,3
C-3''	76,9	76,8
C-4''	70,4	70,3
C-5''	77,8	77,5
C-6''	61,4	61,3



TL/UEG  
amostra 40

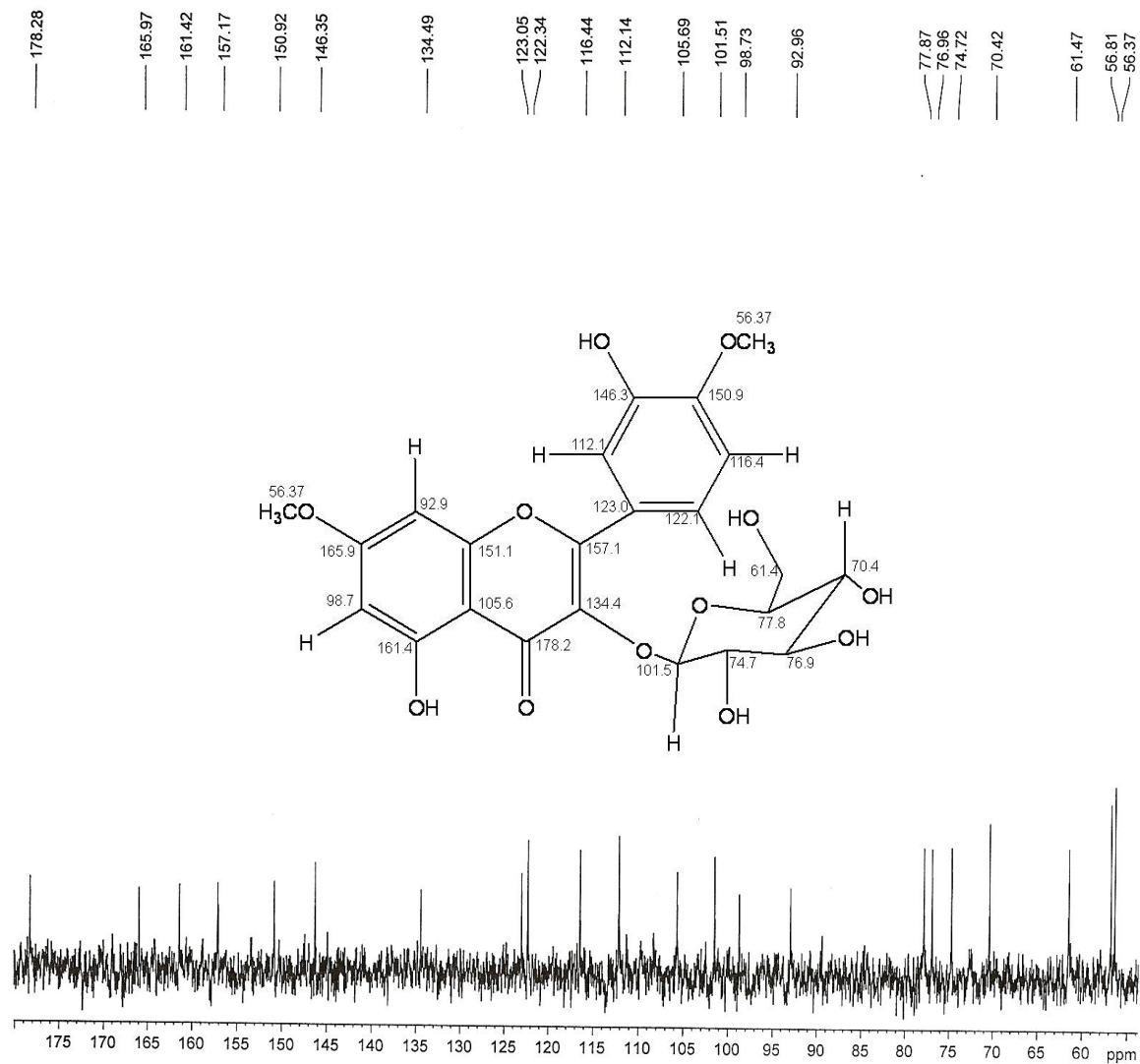
Current Data Parameters  
NAME TLUEG\_40  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20080220  
Time 17.41  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm Multinucl  
PULPROG zg  
TD 65536  
SOLVENT DMSO  
NS 32  
DS 0  
SWH 5518.764 Hz  
FIDRES 0.084210 Hz  
AQ 5.9376116 sec  
RG 101.6  
DW 90.600 usec  
DE 6.00 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.79999995 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 8.50 usec  
PL1 0.00 dB  
SFO1 400.2118787 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 400.210053 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

FIGURA 20: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)



```

Current Data Parameters
NAME      Antonio_F2
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080927
Time     10.37
INSTRUM  spect
PROBHD   2.5 mm BBO BB-
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  DMSO
NS       194555
DS       0
SWH      23980.814 Hz
FIDRES   0.731836 Hz
AQ       0.6832628 sec
RG       32768
DW       20.850 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       0.10010000 sec
d11      0.03000000 sec
DELTA    0.00010000 sec
TDO      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        8.20 usec
PL1       4.00 dB
SFO1     100.6429474 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   waltz16
NUC2       1H
PCPD2     90.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12      20.50 dB
PL13      20.50 dB
SFO2     400.2116008 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        100.6333360 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        3.00 Hz
GB        0
PC        0.02

```

FIGURA 21: Espectro de RMN <sup>13</sup>C do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)



#### 4.6.2. Identificação estrutural do flavonóide quercetina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose (F-2) por RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$

O sólido amorfo amarelo obtido da fração polar EDFMM do extrato das folhas de *E. deciduum* foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Os resultados desta análise são apresentados a seguir:

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 22, 23 e Tabela 04**) observa-se, na região de hidrogênios aromáticos, um duplo dubleto em torno de  $\delta$  7,5 ppm, referente ao hidrogênio H-6' ( $J = 8,6$  e  $2,4$  Hz); 7,4 ppm referente ao hidrogênio H-2' ( $J = 2,4$  Hz) e em 6,8 ppm referente ao hidrogênio H-5' ( $J = 8,4$  Hz). Além de dois dubletos largos em 6,4 e 6,1 ppm atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente.

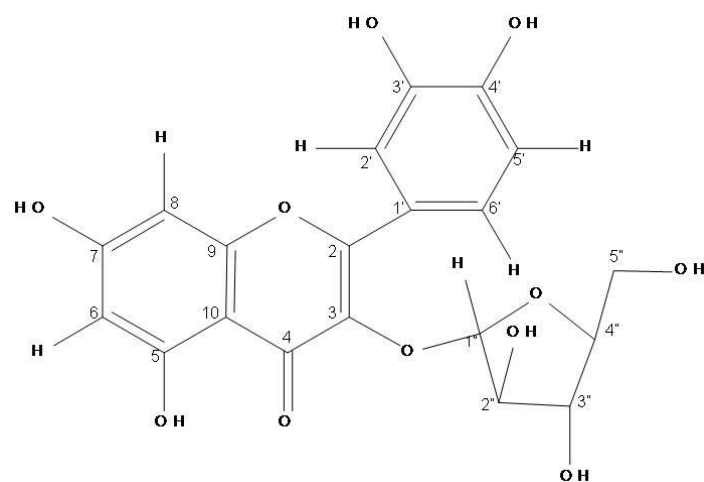
A presença de multipletos relativos à hidrogênios carbinólicos, na região entre  $\delta$  3,0 e 3,8 ppm e um dubleto para cada substância, absorvendo em  $\delta$  5,5 ppm ( $J = 1,2$  Hz;), atribuído ao hidrogênio anomérico, sugere a existência de unidade de açúcar ligado a este flavonóide pela face  $\alpha$ , indicada pela constante de acoplamento em torno de 1,2 Hz (SILVERSTEIN, 1998).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 24 e Tabela 05**) desta substância apresenta sinais com deslocamentos químicos próximos à  $\delta$  177,5 ppm típico de carbonilas queladas em flavonóides.

A ocorrência de quatro sinais na região entre  $\delta$  61 e 86 ppm, e um sinal em  $\delta$  108 ppm referente ao carbono anomérico vem confirmar a existência de uma unidade de açúcar no flavonóide.

A unidade do açúcar presente é evidenciada através dos dados característicos observados no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$ , indicando que D-arabinofuranose está ligado ao flavonóide.

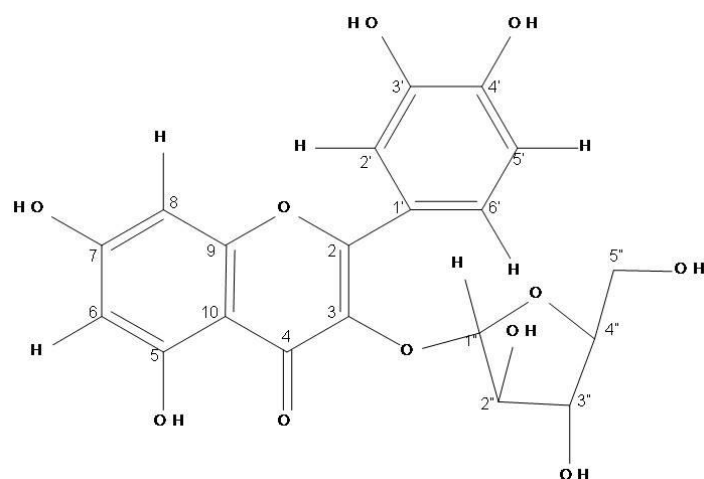
Além disso, as análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e posterior comparação com os dados descritos na literatura resultou na identificação do flavonóide quercentina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose **F-2** (AGRAWAL, 1989).



**F-2**

TABELA 4 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-2

<b>H</b>	<b>F-2</b>
6	6,41 d (2,0 Hz)
8	6,1 d (2,0 Hz)
2'	7,57 d (2,0 Hz)
3'	-
5'	6,8 d (8,4 Hz)
6'	7,5 dd (2,0 e 8,4 Hz)
Açúcar	
1''	5,5 d (1,2 Hz)
2'' a 6''	3,1 – 3,7 m



**F-2**

TABELA 05- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, em DMSO) para o flavonóide F-2

C	F-2	Literatura AGRAWAL <i>et al.</i> , 1989
C-2	156,5	156,5
C-3	133,5	133,8
C-4	177,5	175,5
C-5	161,5	161,2
C-6	98,6	98,6
C-7	164,5	164,0
C-8	93,4	93,4
C-9	156,6	156,3
C-10	104,0	104,0
C-1'	121,0	121,3
C-2'	115,4	115,2
C-3'	145,4	144,7
C-4'	148,5	148,5
C-5'	115,4	116,5
C-6'	121,5	121,8
C-1''	108	109,1
C-2''	82	81,5
C-3''	76,8	77,2
C-4''	85,6	84,7
C-5''	61,0	62,0

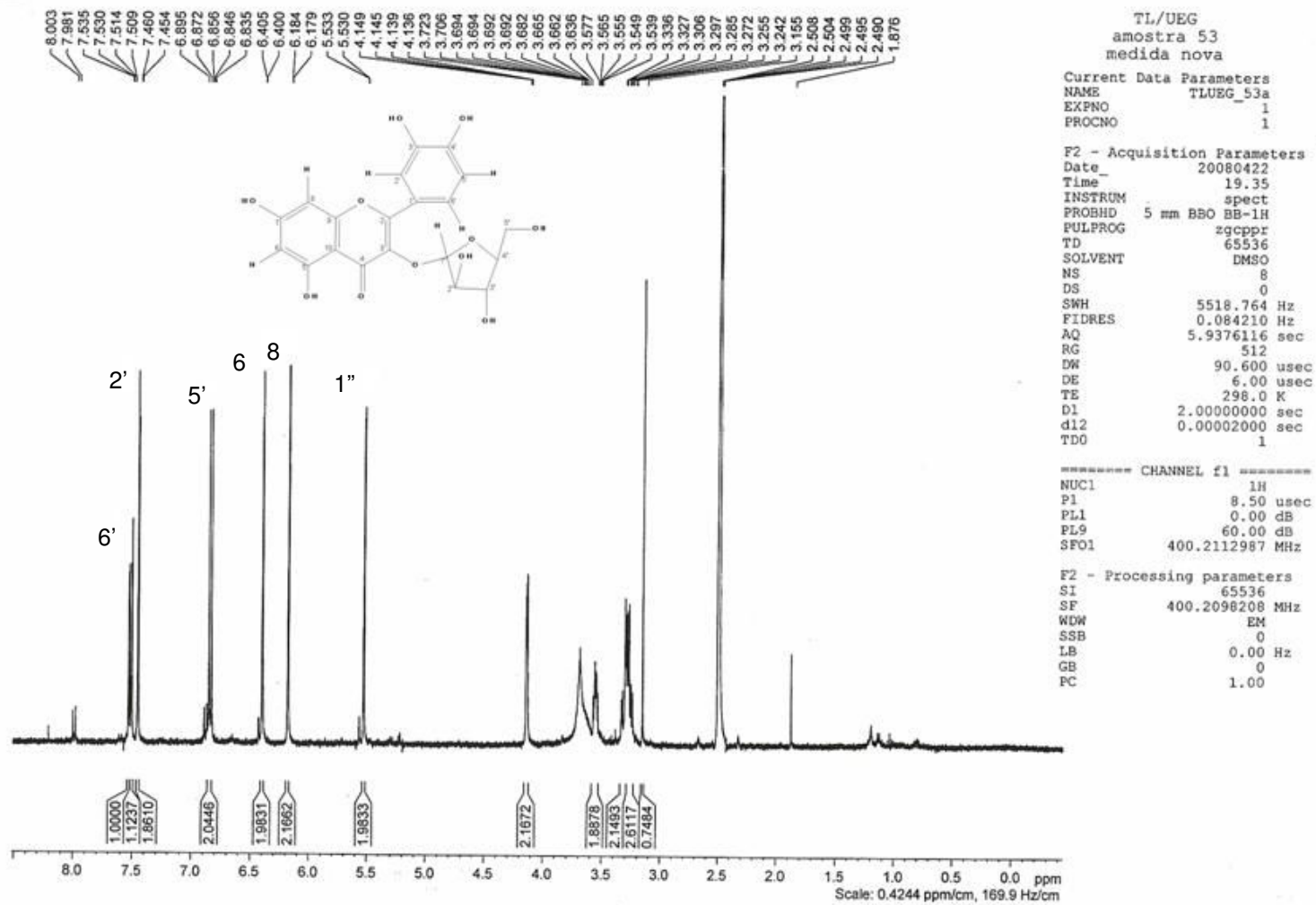


FIGURA 22: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz)

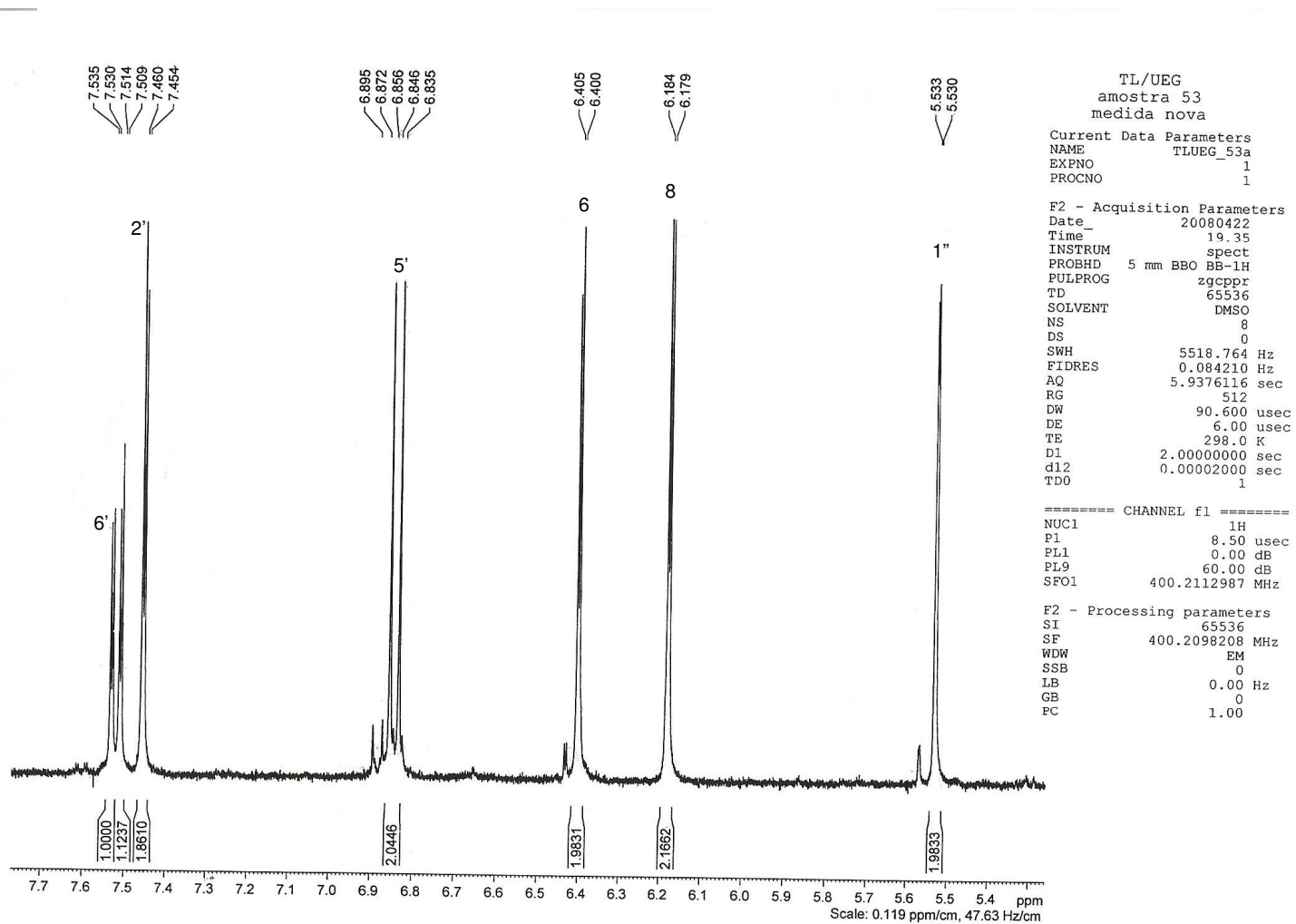


FIGURA 23: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  expandido do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz)

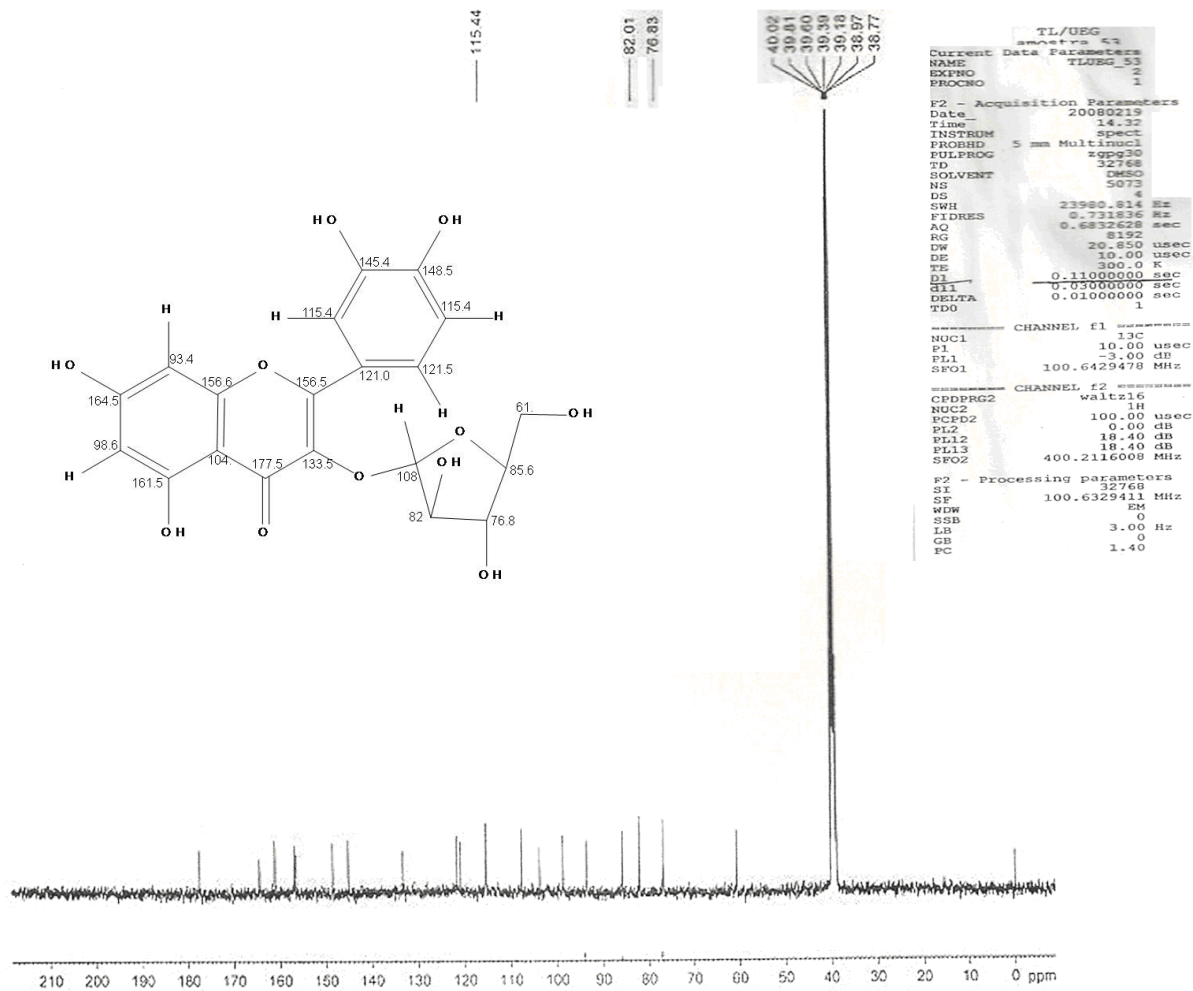


FIGURA 24: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do flavonóide F-2 (DMSO, 400MHz)

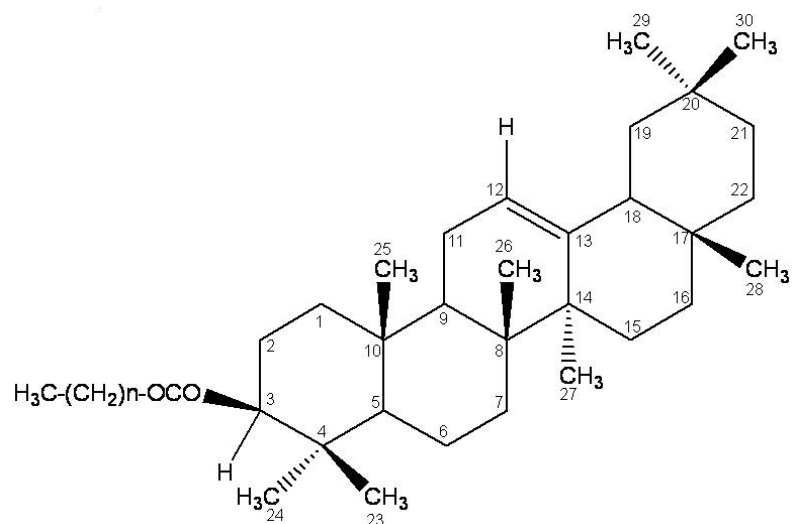
#### 4.6.3.. Identificação estrutural do triterpeno estearato de $\beta$ -amirina T-1 por RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$

O sólido amorfo branco obtido da fração apolar EDFMH-22 do extrato das folhas de *E. deciduum* quando analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  forneceu os seguintes resultados:

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 25, e Tabela 06**) observou-se na região de  $\delta$  4,5 ppm hidrogênios ligados ao carbono do grupo éster do ácido graxo, um tripleto em torno de  $\delta$  5,18 ppm, característico de dupla ligação referente ao H-12 e adjacentes a ele um  $\text{CH}_2$ . Já na região entre  $\delta$  1 e 2,5 ppm percebe-se hidrogênios de metilenos e 8 grupos metilas.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 26 e Tabela 07**) apresentou 30 carbonos demonstrando a característica de esqueleto triterpênico de seu constituinte, sinais de carbono  $\text{sp}^2$  em 121,1 ppm e 144,6 ppm atribuídos a C-12 e C-13 respectivamente, como também grupos metílicos.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e posterior comparação com os dados descritos na literatura <sup>1</sup>, observam-se sinais característicos do composto triterpênico  $\beta$ -amirina. O deslocamento em  $\delta$  4,5 ppm característico de H ligado ao carbono esterificado e a comparação com a literatura <sup>2</sup> levou a conclusão que o composto isolado é um triterpeno estearato de  $\beta$ -amirina **T-1** (**1**=MAHATO, 1994 e **2**=BARREIROS *et al.*, 2004).

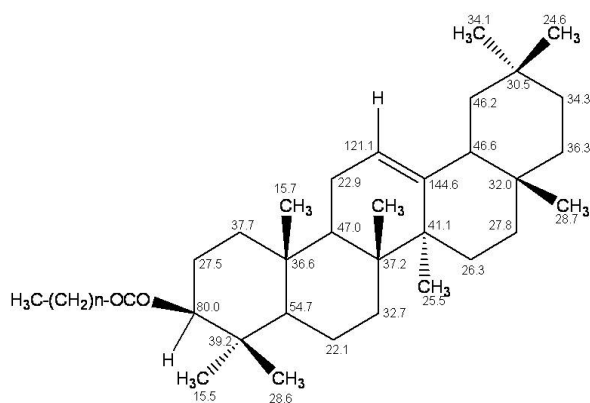


**T-1**

TABELA 06 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) para o triterpeno T-1

H	T-1
1 e 2	$\delta$ 1,7 ppm (m) multipleteo
3	$\delta$ 4,5 ppm dd (7,6Hz)
5, 6, 7, 9, 11	$\delta$ na região de 1,5 a 1,8 ppm (m)
12	$\delta$ 5,1 ppm (t)
15, 16, 18, 19, 21, 22	$\delta$ na região 0,8 a 1,8 ppm (m)
23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	$\delta$ na região de 0,7 a 1,5 ppm (s)





**T-1**

TABELA 07- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ ) para o triterpeno T-1

C	T-1	Literatura MAHATO 1994
C-1	37,7	38,7
C-2	27,5	27,3
C-3	80,0	79,0
C-4	39,2	38,8
C-5	54,7	55,3
C-6	22,1	18,5
C-7	32,7	32,8
C-8	37,2	38,8
C-9	47,0	47,7
C-10	36,6	37,6
C-11	22,9	23,6
C-12	121,1	121,8
C-13	144,6	145,1
C-14	41,1	41,8
C-15	26,3	26,2
C-16	27,8	27,0
C-17	32,0	32,5
C-18	46,6	47,4
C-19	46,2	46,9
C-20	30,5	31,1
C-21	34,3	34,8
C-22	36,3	37,2
C-23	28,6	28,2
C-24	15,5	15,5
C-25	15,7	15,6
C-26	16,9	16,9
C-27	25,5	26,0
C-28	28,7	28,4
C-29	34,1	33,3
C-30	24,6	23,7

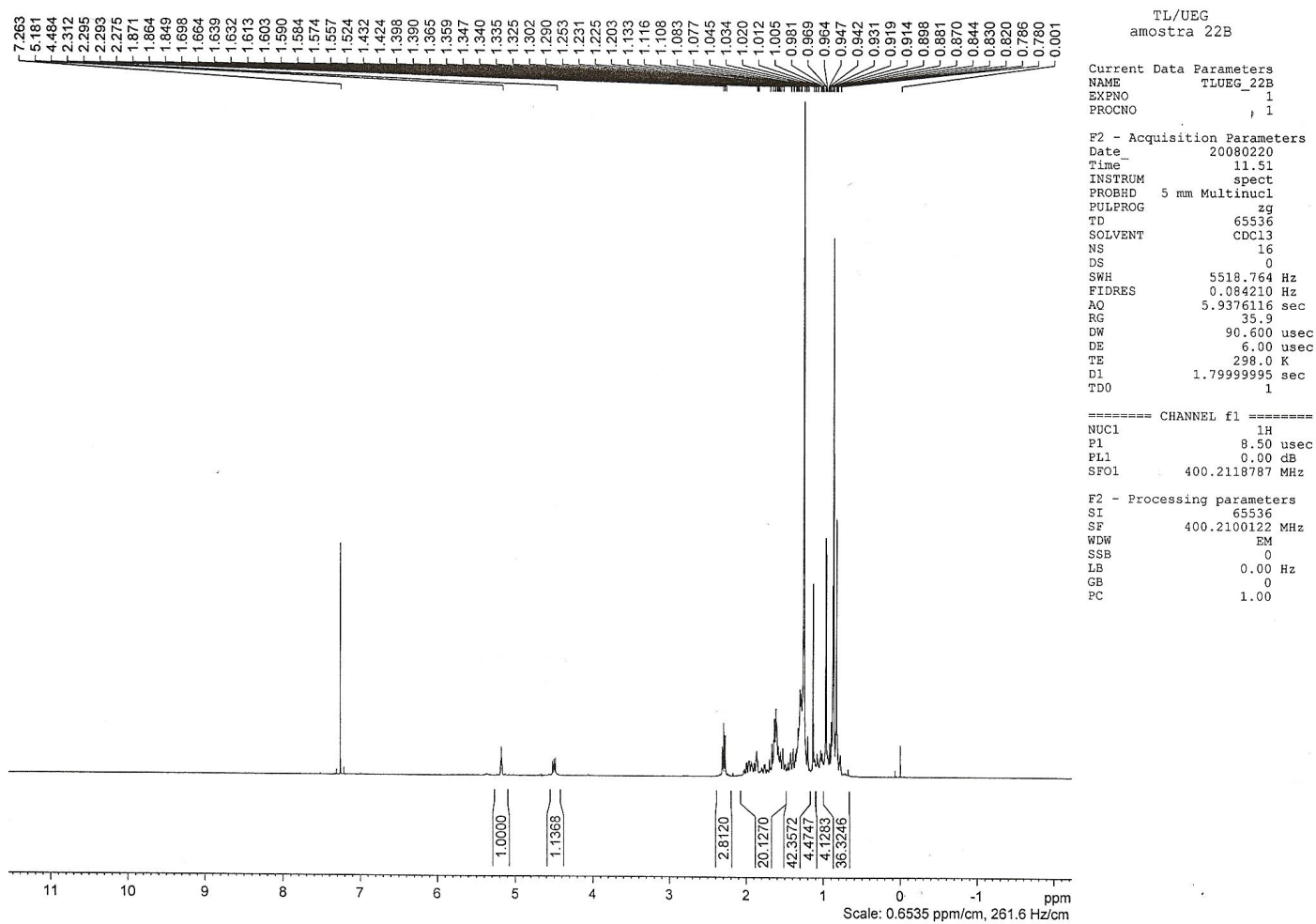
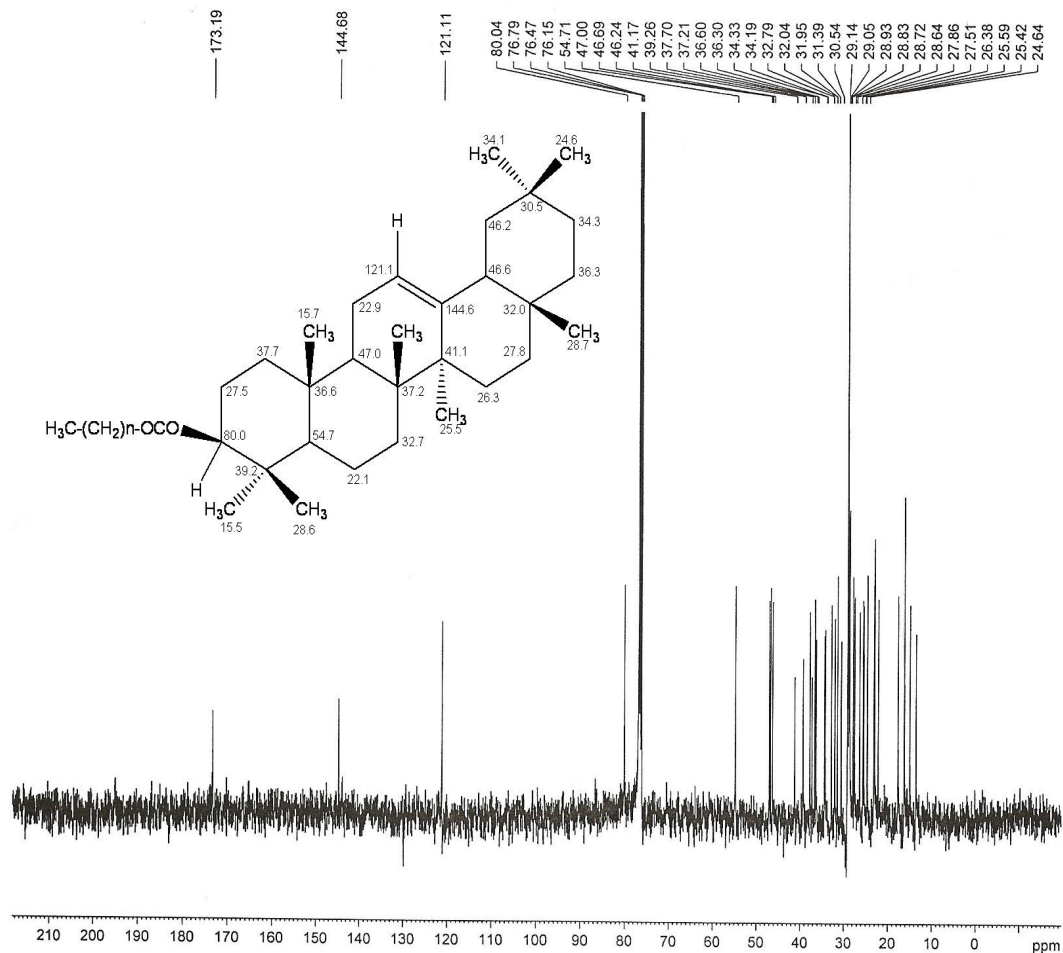


FIGURA 25: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do triterpeno T-1 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)



```

TL/UEG
ametra 22a
Current Data Parameters
NAME      TLUEG_22B
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080220
Time      11.59
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   zgpg30
TD        32768
SOLVENT   CDCl3
NS        5912
DS         4
SWH       23980.814 Hz
FIDRES    0.731836 Hz
AQ        0.6832628 sec
RG         8192
DW        20.850 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
D1        0.11000000 sec
d11       0.03000000 sec
DELTA     0.01000000 sec
TD0       1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        10.00 usec
PL1       -3.00 dB
SFO1      100.6429478 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     100.00 usec
PL2       0.00 dB
PL12      18.40 dB
PL13      18.40 dB
SFO2      400.2116008 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        100.6329411 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        3.00 Hz
GB         0
PC        1.40

```

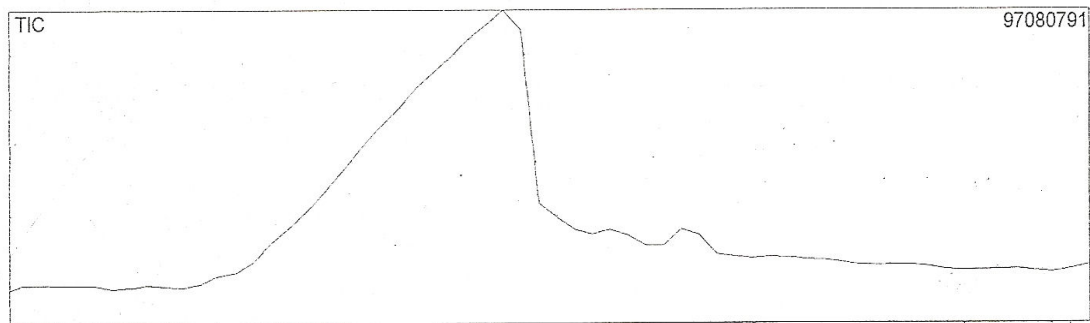
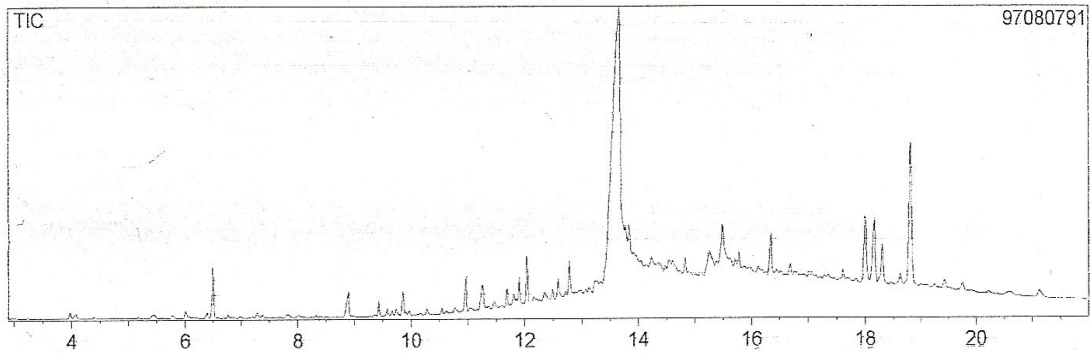
FIGURA 26: Espectro de RMN <sup>13</sup>C triterpene T-1 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

#### 4.7. Identificação estrutural do ácido graxo ligado ao triterpeno estearato de $\beta$ -amirina T-1 por CG/EM

O ácido graxo obtido da hidrólise do triterpeno estearato de  $\beta$ -amirina submetido a uma análise química por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria quadrupolar de massas (CG/EM) em um equipamento Shimadzu QP505A, apresentou um composto majoritário cuja fórmula molecular do hexadecanoato de  $\beta$ -amirina foi ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) e massa 256 m/z, denominado ácido n-hexadecanóico, conforme descrito no espectro **(Figuras 27 e 28)**.

A identificação dos constituintes do éster ligado ao triterpeno  $\beta$ -amirina foi realizada por comparação dos espectros de massa e índice de retenção com os da literatura, além da busca (automática e manual) dos espectros de massas, e uma base de dados informatizada MS usando biblioteca NIST (1988).

Data : ESTER-2.D01 08/07/04 09:32:31  
Sample : Ester-2 (ch2cl2)  
Method File Name : LAB-SINT.MET



14

Scan # : ( 640 - 648 ) B.G. Scan # : ( 674 - 676 )  
Mass Peak # : 185 Ret. Time : ( 13.550 - 13.683 )  
Base Peak : 73.05 ( 6130471 )

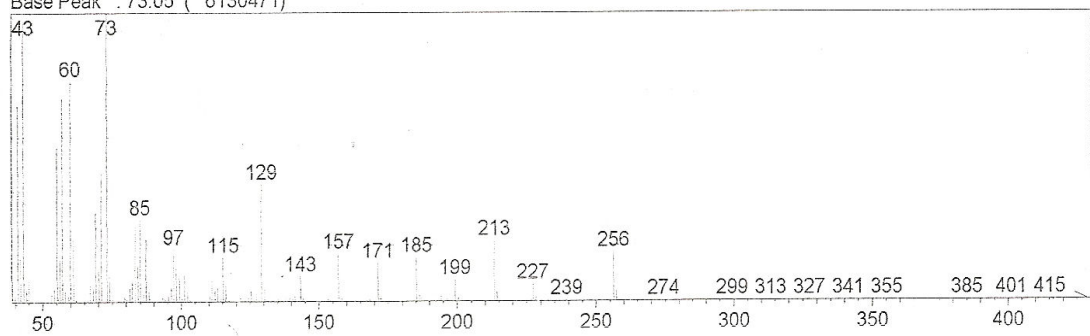
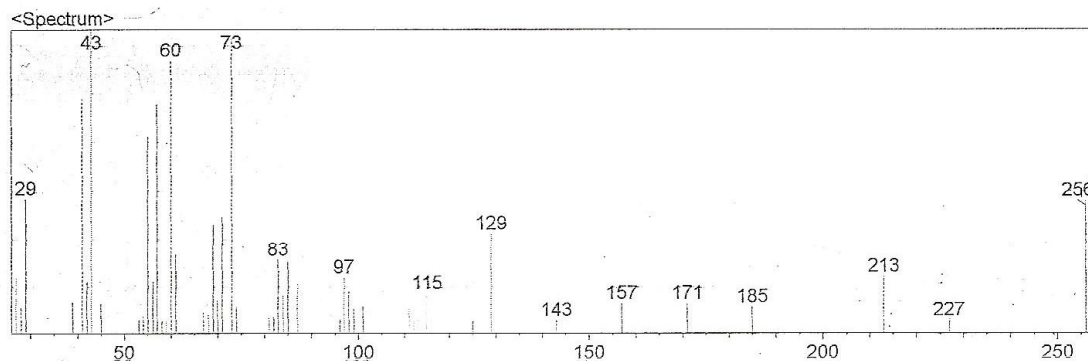


FIGURA 27: Espectro do ácido graxo ligado ao triterpeno hexadecanoato de  $\beta$ -amirina

<Compound Information>  
 Library : NIST21  
 Entry : 16079  
 CAS : 57-10-3 Mol.Wgt.: 256  
 Class :  
 Mol.Form.: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>  
 Name : n-Hexadecanoic acid



<Mass Table>  
 M/Z - Rel.Int ( 50 Peaks)

27- 18.0	67- 6.8	101- 8.8
28- 8.8	68- 6.0	111- 8.0
29- 44.4	69- 36.0	112- 4.0
39- 10.4	70- 10.8	113- 4.8
41- 77.2	71- 38.4	115- 12.8
42- 16.8	73- 97.2	116- 4.4
43- 100.0	74- 8.8	125- 4.0
45- 9.6	81- 4.8	129- 32.8
53- 4.4	82- 5.2	143- 4.0
54- 5.6	83- 24.0	157- 9.6
55- 65.2	84- 12.0	171- 9.6
56- 16.8	85- 23.2	185- 8.4
57- 75.6	87- 16.4	213- 18.4
58- 4.0	96- 4.4	227- 4.0
59- 4.4	97- 18.0	256- 43.6
60- 89.6	98- 13.6	257- 8.4
61- 26.0	99- 8.0	

<Structure>

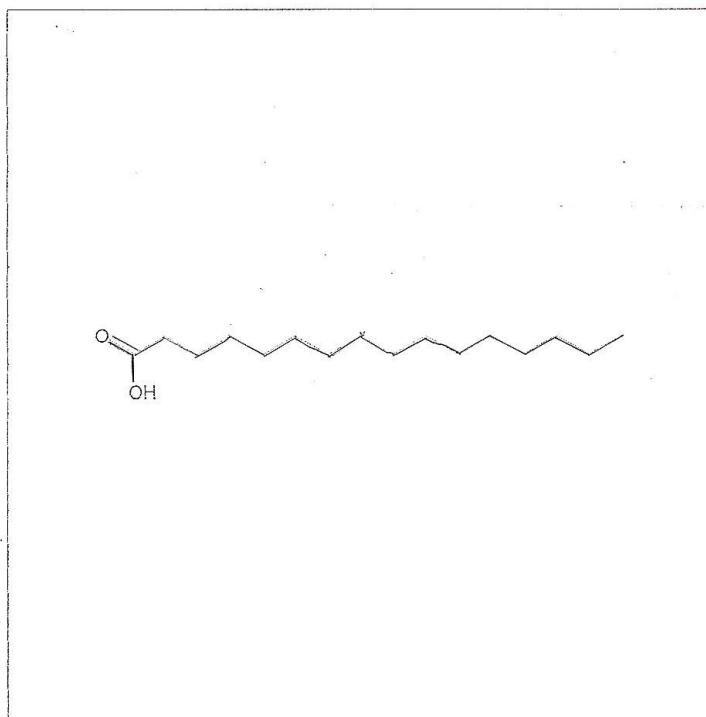


FIGURA 28: Espectro e fórmula estrutural do ácido graxo ligado ao triterpeno hexadecanoato de  $\beta$ -amirina

O isolamento do ácido n-hexadecanóico também é corroborado por dados de CG/EM. Nesse caso, a presença dos picos em m/z 256 e 60, associados ao íon molecular e rearranjo de McLafferty (**Figura 29**) são conclusivos para a estrutura de um ácido carboxílico linear.

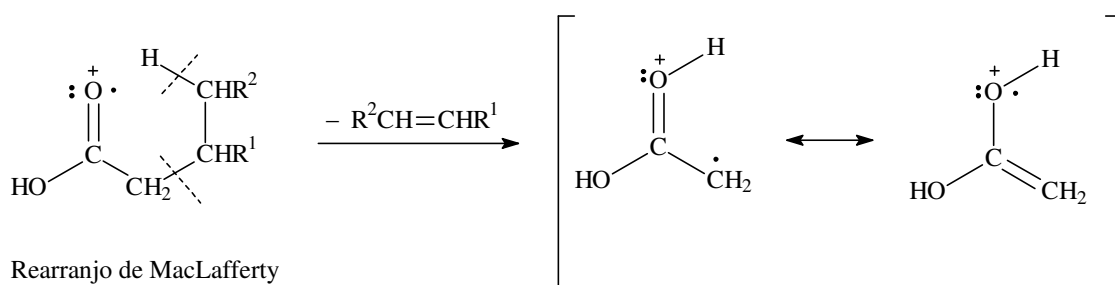


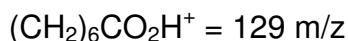
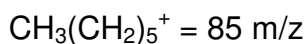
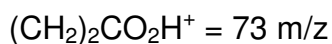
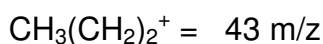
Figura 29: Rearranjo de MacLafferty

Aliado a isso, pode-se destacar, no espectro, uma série de picos em intervalos de 14 unidades, associados a picos intensos de estruturas do tipo  $C_nH_{2n-1}O_2$ , associados a fragmentação de ácidos carboxílicos de cadeia longa.

Abaixo estão descritos as porcentagens com as respectivas massas atômicas dos fragmentos do ácido n-hexadecanóico:

EM (M/Z): 29 (44,4%); 43 (100,0%); 60 (89,6%); 73 (97,2%); 83 (24,0%); 97 (18,0%); 115 (12,8%); 129 (32,8%); 143 (4,0%); 157 (9,6%); 171 (9,6%); 213 (18,4%); 227 (4,0%); 256 (43,6%); 257(8,4%).

Logo abaixo descreve-se as fragmentações do ácido n-hexadecanóico:



#### *4.8. Avaliação da atividade citotóxica da fração metanólica do extrato dos frutos (EDFrM) de *Erythroxylum deciduum* sobre a linhagem tumoral K562*

Para análise dos tratamentos observados através do método colorimétrico MTT, conforme descrito na metodologia, e das drogas padrões, foi realizada uma análise descritiva para se ter indícios da diferença entre os tratamentos. Em seguida fez-se uma análise de variância com planejamento aleatorizado com um único fator que comprovasse esta diferença entre os mesmos, e a partir do teste de Tukey foi possível comprovar quais amostras eram realmente diferentes. E foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade significativa somente se apresentasse valores superiores a 30% (MONTGOMERY, 2004).

As médias das densidades óticas (DO) encontradas na placa realizada através do método MTT, são demonstradas na **Tabela 08**, juntamente com o percentual de crescimento e de citotoxicidade, conforme concentrações da fração dos extratos de EDFrM para tratamento sobre as células K562.



Tabela 08. Distribuição dos valores de densidade ótica e suas médias, desvio padrão, coeficiente de variação, porcentagem de crescimento e porcentagem de citotoxicidade conforme concentrações da fração do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre células K562, bem como das drogas padrão.

Descrição	DO1	DO2	DO3	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação	% de crescimento	% de citotoxicidade
Branco (meio)	0,157	0,172	0,174	0,168	0,009	5,542	-	-
Meio cell	0,954	0,913	0,905	0,924	0,026	2,845	-	-
SDS 10%	0,060	0,066	0,078	0,068	0,009	13,478	-	-
Taxol 5mg/mL	0,132	0,155	0,129	0,139	0,014	10,258	-	91,74
Ciclofosfamida 5mg/mL	0,562	0,577	0,598	0,579	0,018	3,123	-	40,3
EDFrM5.0 mg/mL	0,265	0,317	0,291	0,291	0,026	8,935	26,05	73,95
EDFrM 2.5 mg/mL	0,284	0,323	0,330	0,312	0,025	7,936	28,54	71,46
EDFrM 1.25mg/mL	0,354	0,369	0,429	0,384	0,040	10,335	36,92	63,08
EDFrM 0.62mg/mL	0,515	0,527	0,475	0,506	0,027	5,385	51,13	48,87
EDFrM 0.3 mg/mL	0,641	0,660	0,435	0,579	0,125	21,564	59,66	40,34
EDFrM 0.15mg/mL	0,740	0,732	0,748	0,740	0,008	1,081	78,50	21,50
EDFrM 0.075mg/mL	0,803	0,759	0,748	0,770	0,029	3,779	82,01	17,99
EDFrM 0.03mg/mL	0,719	0,779	0,736	0,745	0,031	4,153	79,05	20,95

Através dos resultados apresentados neste trabalho, verificou-se que a fração metanólica de EDFrM apresentou citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual das drogas controles.

Analisando os resultados apresentados na **Tabela 08**, pode-se dizer que há indícios de que o taxol apresenta uma porcentagem de citotoxicidade de 91,74%, ou seja, é muito eficaz no tratamento de leucemia mielóide crônica. Já a ciclofosfamida forneceu um resultado menos satisfatório quando comparada ao taxol e as frações dos extratos de EDFrM, nas concentrações que variam de

0.62 a 5,0 mg.mL<sup>-1</sup>, pois evidenciou-se uma porcentagem de 40,3% de citotoxicidade, destruindo uma quantidade menor de células tumorais.

Os resultados deste teste são apresentados na **Figura 30** para a fração metanólica dos frutos de *Erythroxylum deciduum* nas concentrações de 0,039 a 5,0 mg.mL<sup>-1</sup> sobre a linhagem tumoral do K562, que apresentaram citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual dos controles positivos Taxol (100%) e Ciclofosfamida, na concentração 5,0 mg. mL<sup>-1</sup>. É interessante ressaltar que as frações dos extratos nas concentrações que variam de 0,3 a 5,0 mg. mL<sup>-1</sup> possuem maior eficiência que a ciclofosfamida. Ademais, pode-se sugerir que as células se mostraram dose-dependente das frações de EDFrM, pois o aumento da citotoxicidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração das mesmas.

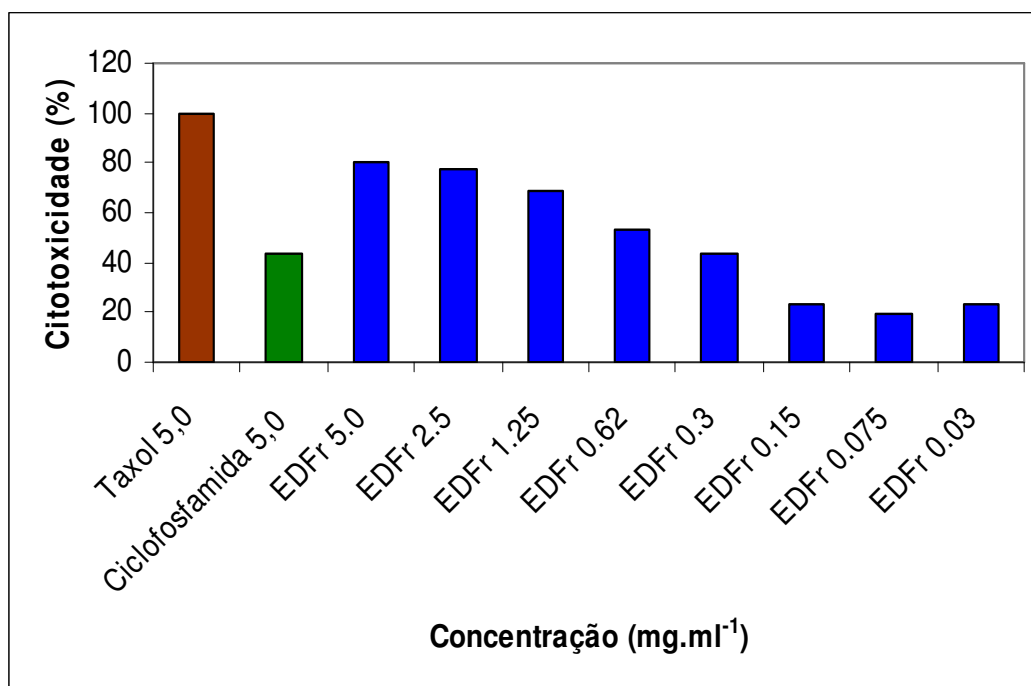


FIGURA 30: Percentual de citotoxicidade da fração metanólica *in vitro* sobre células tumorais de leucemia mielóide crônica K562, comparada com o taxol e a ciclofosfamida.

Verificou-se também que, quando a concentração da fração do extrato de EDFrM aumentava de 0,075 para 5,0 mg.mL<sup>-1</sup>, aumentava-se

gradativamente a porcentagem de citotoxicidade, indicando que há diferença relevante entre as concentrações dos mesmos. Porém, como foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade satisfatória, somente se apresentasse valores superiores a 30%, as frações com concentrações de 0,15, 0,0075 e 0,03 mg.mL<sup>-1</sup> demonstraram-se ineficazes nesta análise.

Em seguida, para averiguar se estas diferenças entre os tratamentos são realmente significativas, fez-se a comparação entre as médias dos dados através da análise de variância, e as diferenças exatas entre os tratamentos foram quantificadas através do teste de Tukey, conforme descrito na **Tabela 09**.

TABELA 09. Análise de Variância e Teste de Tukey entre as frações metanólicas e os padrões adotados

	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor de p
Tratamento	12	2.68749	0.22396	129.77	<2.2e-16
Amostras mg. mL <sup>-1</sup>		Diferença		Valor de p	
Ciclofosfamida-Taxol-5.0		0,44033		0,0000000	
EDFrM 5.0-Taxol-5.0		0,15233		0,0066800	
EDFrM 2.5-Taxol-5.0		0,17367		0,0014000	
EDFrM 1.25-Taxol-5.0		0,24533		0,0000073	
EDFrM 0.62-Taxol-5.0		0,36700		0,0000000	
EDFrM 0.3-Taxol-5.0		0,44000		0,0000000	
EDFrM 5.0-ciclofosfamida		-0,28800		0,0000004	
EDFrM 2.5-ciclofosfamida		-0,26667		0,0000017	
EDFrM 1.25-ciclofosfamida		-0,19500		0,0002867	
EDFrM 0.62-ciclofosfamida		-0,07333		0,6237200	
EDFrM 0.3-ciclofosfamida		-3,33E-04		1,0000000	
EDFrM 2.5-EDFr5.0		0,02133		0,9999800	
EDFrM 1.25-EDFr5.0		0,09300		0,2865400	
EDFrM 0.62-EDFr5.0		0,21467		0,0000671	
EDFrM 0.3-EDFr5.0		0,28767		0,0000004	
EDFrM 0.15-EDFr5.0		0,44900		0,0000000	
EDFrM 0.075-EDFr5.0		0,47900		0,0000000	
EDFrM 0.03-EDFr5.0		0,45367		0,0000000	
EDFrM 1.25-EDFr2.5		0,07167		0,6547800	
EDFrM 0.62-EDFr1.25		0,12167		0,0554500	
EDFrM 0.3-EDFr0.62		0,07300		0,6299600	
EDFrM 0.15-EDFr0.3		0,16133		0,0034700	
EDFrM 0.075-EDFr0.15		0,03000		0,9993100	
EDFrM 0.03-EDFr0.075		-0,02533		0,9998700	

Como pode ser visto na **Tabela 09** há diferença significativa entre os tratamentos, pois o valor de p apresentou um valor de  $2.2 \times 10^{-16}$ , assumindo o nível de significância de 5%. Além disso, há evidência que realmente existe diferença relevante entre as porcentagens de citotoxicidade, quando se compara o taxol com a ciclofosfamida, pois seu valor de p é ( $p < 0,05$ ). Como também, pode ser averiguado que o taxol difere significativamente das concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 0,3 a 5,0mg.mL<sup>-1</sup>

e difere da ciclofosfamida em concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 1,25 a 5,0 mg. mL<sup>-1</sup>. comprovando-se que há realmente um elevado potencial anti-tumoral destas frações.

Porém, quando se comparam as concentrações das frações dos extratos de EDFrM de 5,0 mg. mL<sup>-1</sup> com 2,5 e 1,25 mg. mL<sup>-1</sup>, percebe-se que não há diferença significativa entre eles, pois os mesmos apresentam valores de p superiores a 5% (p>0.05), ou seja, pode-se utilizar para destruir as células tumorais a concentração de 1,25 mg. mL<sup>-1</sup>, já que esta é semelhante a concentração de 5,0 mg. mL<sup>-1</sup> da fração do extrato em questão.

A **Tabela 09** também mostra que não existe diferença relevante entre as concentrações 0,3 e 0,62 mg. mL<sup>-1</sup>, 0,075 e 0,15 mg. mL<sup>-1</sup>, 0,03 e 0,075 mg. mL<sup>-1</sup>, pois seus valores de p são muito superiores a 5%.

Mediante esses dados, os testes realizados *in vitro* para se verificar o possível potencial antitumoral da fração metanólica, obtida dos frutos de *Erythroxylum deciduum*, revelam ter atividade antineoplásica significativa frente ao modelo experimental utilizado. Com exceção das concentrações de 0,03 a 0,3 mg . mL<sup>-1</sup> da fração metanólica, as demais concentrações apresentaram citotoxicidade acima de 50%.

Assim fica demonstrada a importância da triagem de extratos vegetais quanto às atividades biológicas, o que possibilita aos pesquisadores uma orientação no sentido de utilizar os melhores métodos de extração de substâncias com estas atividades em plantas para posterior isolamento e identificação química, além de concentrações otimizadas para que o extrato tenha sua máxima eficiência contra células tumorais.

Até o presente momento, a literatura apresenta apenas 2 artigos referentes a esta espécie, já mencionados na revisão bibliográfica, porém nenhum sobre estudo dos constituintes químicos e possível potencial citotóxico e antitumoral.

Viu-se então a necessidade de realização de mais estudos para se averiguar os potenciais terapêuticos e citotóxicos que a planta apresenta e não há dados na medicina popular.

4.9. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente às células HCT-8 (cólón – humano), SF-295 (glioblastoma – humano) e HL-60 (Leucemia – humano) aplicada nos extratos EDFMM, EDFMH, EDFMA e EDFMD

A atividade citotóxica de todas as amostras está representada na **Tabela 10**, com seus respectivos percentuais de inibição. De acordo com o protocolo experimental adotado, uma amostra somente é considerada com potencial atividade antitumoral quando o valor de inibição (%IC) é igual ou superior a 75% em pelo menos duas das três linhagens celulares utilizadas no teste de citotoxicidade. Este percentual de 75% é considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com possível potencial antitumoral (SPRINGER, 1998).

TABELA 10 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µg/mL (extratos). Valores expressos em média ± DPM.

Amostras/Linhagens celulares	HL-60 (%IC)	SF 295 (%IC)	HTC 8 (%IC)
EDFMH	13,26±12,13	0,0	0,0
EDFMM	28,49±10,30	0,0	0,0
EDFMA	12,12±07,41	0,0	0,0
EDFMD	0,0±07,58	0,0	46,16±6,14

Como pode ser verificado na tabela acima, nenhuma das frações hexânica, diclorometânica, metanólica ou de acetato de etila provenientes do extrato bruto metanólico das folhas de *E. deciduum* apresentaram atividade antitumoral com significativo potencial, pois nenhuma delas demonstraram valor de inibição (%IC) igual ou superior a 75% em pelo menos duas das três linhagens celulares (HL-60 , SF 295 e HTC 8 ) utilizadas no teste de citotoxicidade.

O maior valor observado foi 46,16% para a célula HCT-8 (cólón – humano) que também não demonstrou potencial antitumoral satisfatório.

## 5. CONCLUSÕES

- Estudo fitoquímico das folhas de *E. deciduum* levou ao isolamento e identificação de 3 substâncias, o triterpeno hexadecanoato de  $\beta$ -amirina, obtido da fração EDFMH (22) e os flavonóides 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose obtidos das frações EDFMM (31-40) e (41-53) respectivamente. Substâncias estas já conhecidas, mas não relatadas nesta espécie.
- Estudos da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica) demonstraram que há um elevado potencial citotóxico das frações metanólicas dos frutos de *E. deciduum*. Além disso, pode-se dizer que a fração do extrato a 5,0 mg. mL<sup>-1</sup> foi mais eficaz que a droga controle ciclofosfamida na mesma concentração, porém menos eficaz que o taxol.
- Nenhuma das amostras EDFMH, EDFMM, EDFMA, EDFMD testadas apresentou potencial citotóxico significativo nas linhagens celulares testadas HL-60, SF 295 e HTC 8.

## 6. Sugestões para estudos posteriores

- Realizar o *ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) com o flavonóide quercentina-3-O- $\alpha$ -D-arabinofuranose de E. deciduum.*



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. New York: **Elsevier Science Publishing Company Inc.**, 304-342, 1989.

ALMEIDA V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução; **Química Nova**; 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AL-SAID, M.S; EVANS, W.C; GROUT, R.J. Alkaloids of the genus *Erythroxylum*. Part6. Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. sideroxyloides*. **Phytochemistry** n. 24, p. 851-853, 1986.

AMARAL JUNIOR, A. **Erythroxilaceae**. In **Flora ilustrada catarinense** (R. Reitz, ed.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, p. 64, 1980.

AMOROZO, M. C.M.; GELY, A.; *Uso de Plantas Mediciniais por Caboclos do Baixo Amazonas*; Barcarena: PA; **Museu Paraense Emílio Goeldi**, n. 4, p. 47. 1988.

ANSEL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum species*. **Phytochemistry** n. 32, p. 953-959, 1993.

AYNILIAN, G. H; DUKE, J.A; GENTNER, W.A; FARNSWORTH, N.R. *Cocaine content of Erythroxylum species*. **J. Pharm. Sci.** n. 63, p. 1938-1939, 1974.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, 1. ed., **Ed. Artmed: Porto Alegre**, 2001.

BARREIROS. M.L.; *et al.* Flavonóides and triterpenes leaves of *Erythroxylum nummularia*, **Biochemical Systematics and Ecology**. n. 33, p. 537-540, 2004.

BARREIROS, M. L. ; DAVID, J. M. ; PEREIRA, P. A. P. ; GUEDES, M. L. S. ; DAVID, J. P. . Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. **Jornal da Sociedade Brasileira de Química, Brasil**, v. 13, n. 5, p. 669-673, 2002.

BERRY, B. HOLST e K. YATSKIEVYCH (eds). *Flora of the Venezuelan Guayana*. **St. Louis, Missouri Botanical Garden Press**, n.5, p.59-71, 1999.

BIERAS, A.C.; SAJO, M.G. Ontogenia foliar de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (*Erythroxylaceae*) ocorrentes no cerrado; **Revista Brasileira de Botânica**; n. 27, p.71-77, 2004.

BIZIAGOS, E; CRANCE, J.M.; PASSAGOT, J; DELOINCE, R.; May Effect of antiviral substances on hepatitis A virus replication in vitro. **J Med Virol**; n. v.22, n. 1, p. 57-66, 1987.

- BJELDANES, L.F.; CHANG, G.W. Aug. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science** n. 5, p. 577-578, 1977.
- BOHM, B. A.; GANDERS, F. R.; PLOWMAN, T. Byosystematics and evolution of cultivated coca (Erythroxylaceae). **Systematic Botany**; n.7: p.121-133, 1982.
- BOHM, B. A.; LOOT.; NICHOLLS, K.W; PLOWMAN, T. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Phytochemistry** n. 27, p. 833, 1988.
- BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H.; KOLODZIEJ. (+) –Catechin 3 Rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. **Phytochemistry**, Vol.25, nº 5, p.1205-1207, 1986.
- BRACHET, A; MUNOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J.L.; CHRISTEN, P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Phytochemistry** n. 46 p. 1439, 1997.
- BRINGMANM, G.; GUNTHER, C.; MÜHLBACHER, J.; GUNATHILAKE, L.P. WICKRAMASINGHE, A. Biochemical Systematics and Ecology : Flavonoids and triterpenes. **Phytochemistry** n. 53, p. 409. 2000.
- BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRAGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, n. 66, p.1231-1240, maio 2005.
- CALIXTO, J. B *et. al.* “Biodiversidade como Fonte de Medicamentos” artigo **Revista Ciência e Cultura Temas e tendências SBPC**; 55; n. 3; p 37-39; (Artigo) julho/agosto/setembro de 2003.
- CHAVES, J.P.; DOS SANTOS, I.D.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M. Flavanoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. **Phytochemistry** n. 41, p. 941, 1996.
- CHRISTEN, P.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J. D.; EVANS, W.C. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia* **Phytochemistry**, n. 38, p. 1053, 1995.
- CHU, S. C.; HSIEH, Y. S.; LIN, J.Y.. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. **J Nat Prod**, n.55(2), p. 179-183, feb. 1992.
- COLODEL, E. M. *et al.* Intoxicação por *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** n. 24(3): p. 165-168 jul./set, 2004.
- CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais do Cultivo a Terapêutica**, 3. ed. Petrópolis, p. 9-20, 2000.

COTRAN, RS; KUMAR, V.; COLLINS, T: **Patologia Estrutural e Funcional In.: Neoplasia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. Cap. 8, p. 233-295, 2000.

DALLY, D., *et al.* Erythroxyloaceae **Science**, n. 300, p.1508–1509, 1997.  
Disponível:<http://www.inca.gov.br/cancer> (21 DE JUNHO DE 2007).  
Disponível:[http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_vie\\_w.asp&ID=7](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_vie_w.asp&ID=7) (12 de março de 2008).

DOMINICIS, M.E.; FERNANDEZ, H. Phytochemical study of *Erythroxyllum zambesiacum havanense* Jacq. (Erythroxyloaceae). **Revista Cubana de Farmácia**, n.25, p. 137-139, 1991.

DUKE J. A. . Journal of Medicinal Food Biological Activity Summary for Cacao (Theobroma cacao L.), **Herbal Vineyard**, v. 3, p. 115-119, n. 2. Jun, 2000.

EL-IMAN, Y.M.A.; EVANS, W.C.; GROUT, R.J. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxyllum nummularia*. **Phytochemistry**, n. 27, p. 2181. 1988.

EVANS, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxyllum*. **J. Ethnopharmacol**, n. 3, p. 265-277, 1981.

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S.; Informações Estratégicas sobre Plantas Medicinais Obtidas a partir de Bases de Dados em Linha Mimeo, **Escola de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro: RJ. 2000.

GAMBOA, T.P.R. Estudo Químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoeae batatas* em associação ao controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. **Tese de doutorado**, PPGQ-UFSCar, São Carlos-SP, p. 269, 2001.

GARRETT, M. D.; WORKMAN, P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium, **Eur. Journ. of Cancer**, n. 99: p. 280-284, 1999.

GORNES, Frederico Pimentel. **Curso de Estatística Experimental**. 12. ed. São Paulo: Distribuidora, 1987, 1-25 p.

GRIFFIN, W. J.; LIN, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, n. 53, p. 623-637, jul. 2000.

GUIMARÃES, L. D.; SILVA, M.A.D.; ANACLETO, T. C. *Natureza Viva Cerrado. Caracterização e Conservação*. Goiânia. **Ed. UCG**, p. 21-44, 2006.

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M., MOILANEN, E.. **Mediators of Inflammation** Article, n. 45673, p.10, 2007.

HARAGUCHI, H.; OHMI, I.; FUKUDA, A.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W.H. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. **Biosci Biotechnol Biochem**, n. 61(4), p. 651-654, apr. 1997.

HUANG, M.T.; WOOD, A.W.; NEWMARK, H.L.; SAYER, J.M.; YAGI, H.; JERINA, D.M.; CONNEY, A.H. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. **Carcinogenesis**; n. 4(12), p. 1631-1637, dec 1983.

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F.; EMCHE, S. D.; MOSSOBA, M. M.; MUSSER, S. M.. kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. Var. *ipadu*. **Biochemical Systematics and Ecology** n. 31, p. 59-67, 2003.

JOHNSON, E.L.; SCHMIDT, W. F., NORMAN, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxylum Taxa: E. coca var. ipadu* and *E. novogranatense var. truxillense*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 26, p. 743- 759, mar, 1998.

JOHNSON, E.L.; SCHMIDT, W.F.; EMCHE, S.D.; MOSSOBA, M.M.; MUSSER, S.M. **Biochem. Syst. Ecol.** n. 31, p. 59, 2003.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KOŁODZIEJ, H.; BONEFELD, M. BURGER, J.F.W.; BRANDT, E.V.; FERREIRA, D. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Phytochemistry** n. 30, p. 1255, 1991.

LAPA, A. J.; S. CADEN.; TEREZA, M. R., LIMA, L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M.; **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**, v. 1, 1. ed., p 05-12, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 3.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.2, p. 352, 2000.

LU, X.; JUNG, J.; CHO, H. J.; LIM, Y.; LEE, H. S.; CHUN, H. S.; KWON, Y.; PARK, J. H.. Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. American Society for Nutrition **J. Nutr.** n. 135, p. 2884-2890. dec. 2005.

MACIEL , M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA V. F.; GRYNBERG , N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares **Quím. Nova** v.25 n.3 p. 429-438, São Paulo Maio 2002.

MAHATO, S.B.; JUNDI, A. P.;  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features, **Phytochemistry**, n. 37 (6), p. 1517-1575, 1994.

MANS, DR.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, n. 5, p. 185-98, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA - Controle do Câncer: Uma proposta de integração ensino serviço. - Rio de Janeiro: **INCA**. Copyright © 3. Ed,1996-2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Instituto Nacional do Câncer. (Online). Disponível:  
[HTTP://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=7](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=7) (12 de março de 2008).

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil.. Instituto Nacional do Câncer. (Online). Disponível:<http://www.inca.gov.br/cancer> (21 de junho de 2007).

MONTGOMERY, D.C.**Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade**, 4ª edição. Rio de Janeiro,RJ, LTC, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983

MURAD, A. M.; KATZ, A.; **Oncologia: Bases Clínicas do Tratamento**; 8. ed. Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41, 1996.

NAKAMURA, A. T. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (Erythroxylaceae); **Dissertação de Mestrado**; Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, 2003.

NAM, N.H.; PARANG, K. Current targets for anticancer drug discovery. **Curr. Drug Target**, n. 4, p. 159-79, 2003.

National Institute of Standards and Technology; PC version of the NIST/ EPA/ NIH Mass Spectral Database, U.S. **Department of Commerce**: Gaithersburg, 1988.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. AN ENDOPHYTIC *Neurospora* sp. FROM *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. **J. Nat. Prod**, n. 67, p. 129. 2004.

PARKIN D. M, WHELAN, SL, FERLAY J, TEPPON, L, THOMAS, D. B. Cancer incidence in five continents. Lyon France: IARC; **Scientific Publications**, n. 155, 2002.

PAYOL-HILL, A. L.; DOMINGUEZ, R. S.; SUAREZ, M. O.; BATISTA-BAEZ, M.;

CASTRO, H.T.V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Phytochemistry**, Cuba, n.54, p. 927-931, fev. 2000.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C. **J. Ethnopharmacol.**, n. 25, p. 61, 1998.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v.25, Supl. 1, p. 45-61, São Paulo. maio 2002.

PINTO, M. N. **Cerrado, Caracterização, ocupação e perspectivas**. SEMATEC, ed. UNB. Brasília, p. 9-11, 1990.

PLOWMAN, T. C. e BERRY, P. E. Erythroxylaceae. In: STEYERMARK, P. BERRY, B. HOLST e k YATSKIEVYCH (eds). Flora of the Venezuelan Guayana. **St. Louis, Missouri Botanical Garden Press**, n. 5, p. 59-71, 1999

RAW, I.; A. M. MORO. Medicina Molecular. **Ed. Roca Ltda**. P. 226, São Paulo, SP. 1999.

RIBEIRO L. R.; SALVADORI. D. M. F.; MARQUES E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: **Ed. ULBRA** p. 356, 2003.

RODRIGUES, V. E.G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado do Alto Rio Grande-Minas Gerais; **Ciências agrotécnicas Lavras**, v.25, n.1, p. 102-123, jan./fev., 2001.

SALAMA, A. M.; CALDERSON, S.; JORGE, E.; SANCHES, M.; NANCY, B. Phytochemical studies on some coca species grown in Colômbia. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas** n. 22, p. 27-30, 1994.

SCHWARTZ, A.; MIDDLETON, E. JR. Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. **Immunopharmacology**, n. 7(2), p. 115-126. apr. 1984.

SIANI, A. C., GILBERT, B.; **Riopharma**, n. 18, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRIL E T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. ISBN 0471134570, 6. ed. John Wiley e Sons, 1998.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre. Ed. da UFSC, p.301-302. 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.1102, 2004.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. In *Oncology*; JONHSTON, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford,; **Chabner, B. A.**; p. 1-14, 121-132, 2001.

SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; CARLSON, S. L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. **Brain Research Protocols** n. 2, p. 259-263, 1998.

TROUP, G.J.; HUTTONA, D.R.; O'Dea, L.; LANGFORDB, S.J. EPR and Antioxidant Efficiency studies of Resveratrol, Quercitin and Fisetin. **Proceedings - 31st annual condensed matter and materials meeting**, 2007.

TUKAVKINA, N.A.; RULENKO, I.A.; KOLESNIK, Y.A. **Voprosy Pitaniya** - Natural flavonoids - food antioxidants and biologically active additives, p.33 feb, 1996.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J**

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; PEDROSA, R. C. Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Ed. Artigos: CHAPECÓ, **Quim. Nova**, n. 24, p. 147, 2001.

ZHI-JUN, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR AHMED, S.. A dyebased lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **Journal of Immunological Methods**, n. 210, p. 25-39, 1997.

ZUANAZZI et al. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil; **Biochemical Systematics and Ecology**; n. 29, p. 819-825, 2001.

# 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](#)