



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais

***Guarea macrophylla* (Meliaceae): Estudo Fitoquímico e
Avaliação da Atividade Biológica.**

Cristiane Pereira

Dissertação de mestrado
apresentada ao programa de
Pós – graduação em Química
de Produtos Naturais, Núcleo
de Pesquisas de Produtos
Naturais da Universidade
Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos
necessários para a obtenção
do título de Mestre em
Ciências.

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

***Guarea macrophylla* (Meliaceae): Estudo
Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica.**

Cristiane Pereira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais

Programa de Química de Produtos Naturais

Orientadores

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (UFRJ)

Prof^a. Dr. Naomi Kato Simas

Faculdade de Farmácia (UFRJ)

Rio de Janeiro

2010

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – NPPN

Mestrado em Química de Produtos Naturais

***Guarea macrophylla* (Meliaceae): Estudo Fitoquímico e
Avaliação da Atividade Biológica.**

Cristiane Pereira

**Dissertação submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos à
obtenção do grau de Mestre em Ciências.**

Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2010.

Aprovada por:

Prof^ª Dr. Gilda Guimarães Leitão

Prof^º. Dr. Leandro Machado Rocha

Prof^ª Dr. Bernadete Pereira de Silva

Prof^º Dr. José Paz Parente

Prof^ª Dr. Fabíola Dutra Rocha

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Cristiane.

Guarea macrophylla (Meliaceae): Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica/ Cristiane Pereira. Rio de Janeiro: UFRJ/ NPPN, 2010.

30 cm, 95 pag.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

Prof^a Dr. Naomi Kato Simas

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ NPPN/ Programa de Pós – graduação em Química de Produtos Naturais, 2010.

Referências Bibliográficas: pags 76-88.

1. *Guarea macrophylla*. 2. Meliaceae. 3. Flavonóides. 4. Atividade biológica. I. Kuster, R. M. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Programa de Pós – graduação em Química de Produtos Naturais. III. Título.

“Desafios e privações fazem parte de qualquer pró-cura, de qualquer busca. Aprecie os resultados dos desafios, o êxtase da descoberta, as amizades que fará ao longo da vida. Veja a carreira à sua frente como uma oportunidade única de crescimento e realização profissional. O que é fácil não tem valor algum, pois não nos ajuda a crescer”

Marcelo Gleiser.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Domingos e Rosania e ao meu irmão Luty pelo amor, paciência, incentivo, suporte financeiro, emocional e pelas incontáveis risadas juntos. Agradeço por tornarem nossa casa o local mais aconchegante e necessário do planeta. Vocês são meus melhores amigos e parceiros para a vida inteira.

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Luciana pelo apoio e amizade.

Aos meus sobrinhos Mariana e Pedro Augusto, pelo olhar carinhoso e amor puro.

Ao meu querido orientador, Ricardo Machado Kuster, agradeço pela amizade, paciência e generosidade. Admiro sua capacidade de reunir pessoas incríveis ao seu redor, fazendo com que o Richard's Lab seja uma verdadeira família. Por fim, agradeço a confiança e o esforço feito ao longo destes anos, principalmente nestes 2 últimos, para estar presente e participativo, mesmo sabendo que à 500 km do Rio há pessoas que precisam de você. Vielen Dank!

À minha querida orientadora, Naomi Kato Simas, pelo rigor, amizade, grande ajuda e por não ter desistido de mim no início de nossa convivência. Um dia você me disse que se orgulhava do meu trabalho, hoje digo que tenho muito orgulho do que conseguimos fazer. É bom saber que você está sempre ao meu lado. Muito obrigada.

Às grandes amigas, Kassia e Annecat por toda ajuda, amizade, “momentos de terapia em grupo”, viagens sensacionais e por serem minha família aqui na Cidade Maravilhosa. Agradeço por todas as dicas, incentivo, carinho e principalmente, por me “aguentarem” nos meus dias de grande mau humor e, por não se incomodarem em ouvir a trilha sonora que apenas eu seleciono! Tenho realmente muita sorte de ter vocês ao meu lado.

Ao Celsão pela amizade, carinho e por toda a inestimável ajuda para a realização deste trabalho.

À grande amiga Hallyni Ruela, pela confiança, ajuda e carinho constante.

À Meriane Pires pela amizade, grande ajuda e paciência para a elaboração do “POP” do MestreNova.

À Kassia e Álvaro pela paciência na formatação adequada do texto e por todas as dicas sobre os recursos do office.

À família Waldhelm, em especial à tia Milza, por me receber sempre de braços abertos e quitutes na mesa!

À Luciana, Isabel, Ilana, Gleyce, Kelly e Carolina Ávila pelo prazer da convivência ao longo destes 6 anos, pelo carinho e amizade.

À professora Cássia Mônica Sakuragui (Departamento de Biologia – UFRJ) pela ajuda na coleta e identificação da espécie.

Ao Bruno Meireles por ser meu companheiro de madrugadas produtivas no laboratório. Obrigada pelo apoio e amizade.

Ao Cléber Barreto pela amizade e ajuda na realização dos espectros de RMN.

À Luzia Silva Sampaio (Instituto de Biofísica – UFRJ) pela orientação e realização dos testes de atividade $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPásica e pela amizade.

Aos professores Marcelo Lamas e Adalberto Vieyra (Instituto de Biofísica – UFRJ) pelo auxílio e interesse na realização dos testes de atividade $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPásica.

À Beatriz Kaippert, Josiane Bentes e professora Morgana Castelo Branco (Laboratório de Biologia Celular-UFRJ) pela realização dos testes de citotoxicidade, orientação e amizade.

Aos amigos do Richard's Lab: Michelle, Ivaldo, Tati, Jéssica, Karen, Letícia, Leandro, Paulo, Palloma, Cristiane Victório, Lívia, Alda, Danielle, Jefferson e Kátia pela convivência agradável, risadas, apoio e por todas as festas.

Aos amigos da pós – graduação do NPPN pela agradável convivência.

Aos professores do NPPN pelos ensinamentos essenciais para a minha formação.

Aos funcionários do NPPN, em especial ao Ari, Nívea e Chiquinho, por serem sempre solícitos para a realização das análises.

Aos professores Gilda Guimarães Leitão, Leandro Machado Rocha, Fabíola Dutra Rocha, Bernadete Pereira da Silva e José Paz Parente por tão amavelmente aceitarem o convite para avaliar este trabalho.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço as escolhas que fiz, à minha boa saúde e todo o suporte recebido para a realização deste projeto.

ÍNDICE GERAL

	Pag.
Índice de Esquemas	XII
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XVI
Lista de Abreviaturas	XVII
Resumo	XX
Abstract	XXI
1 – Introdução	1
1.1 – Sobre a Ordem Rutales	1
1.1.1 – Sobre a Família Meliaceae	2
1.1.2 – Estudos químicos e biológicos na família Meliaceae	3
1.2 – Estudos químicos e biológicos no gênero <i>Guarea</i>	8
1.2.1 – A espécie <i>Guarea macrophylla</i>	11
1.2.2 – Estudos químicos da espécie <i>Guarea macrophylla</i>	12
1.2.3 – Atividades biológicas relacionadas com a espécie <i>G. macrophylla</i>	12
1.3 – Flavonóides	13
1.3.1 – Biossíntese	14
1.3.2 – Classificação e Variação Estrutural	16
1.3.3 – Ocorrência e Distribuição	17
1.3.4 – Atividade Biológica	18
1.3.5 – Flavonóides e Atividade Antioxidante	20
1.3.6 – Flavonóides como Inibidores Enzimáticos	22
1.3.7 – Flavonóides e Atividade Antitumoral	22
1.3.8 – Inibição da Na⁺ K⁺ ATPase e câncer	23
1.3.9 – Isolamento e Identificação de Flavonóides	24
1.3.10 – Elucidação Estrutural	25

2 – Objetivos	27
3 – Material e Métodos	28
3. 1 – Material	28
3. 1. 1 – Fases Estacionárias Utilizadas para Cromatografia	28
3. 1. 2 – Solventes	28
3. 1. 3 – Reagentes	29
3. 1. 4 – Equipamentos	30
3. 2 – Métodos e Técnicas	31
3. 2.1 – Obtenção do material botânico.	31
3.2.2 – Obtenção do extrato bruto	32
3. 3 – Ensaio de Atividade Antioxidante da Partição Butanólica pelo método do radical DPPH	33
3. 4 – Determinação da atividade inibitória da enzima Na⁺K⁺ATPase	34
3. 4. 1 – Análise Estatística.	34
3. 5 – Determinação da Atividade citotóxica da Partição Butanólica.	35
3. 6 – Fracionamento Cromatográfico da Partição Butanólica.	36
4 – Resultados	38
4. 1 – Geral	38
4. 2 – Obtenção do Extrato Bruto	38
4. 3 – Análise do potencial inibitório das partições de <i>G. macrophylla</i> frente à enzima Na⁺K⁺ ATPase.	39
4. 3. 1 – Análise do potencial inibitório das frações da partição butanólica frente à enzima Na⁺K⁺ ATPase	40
4. 4 – Avaliação da Atividade Anti-tumoral frente à linhagem de células de câncer de pulmão H640	43
4.5 – Avaliação da Atividade Antioxidante da partição butanólica pelo método do DPPH	44
4. 6 – Estudo Fitoquímico da Partição Butanólica.	45
4. 7 – Elucidação Estrutural de Flavonóides, Amostra CP2010.	51

4. 7. 1 – Elucidação Estrutural CP2010, HSQC.	55
4. 7. 2 – Elucidação Estrutural CP2010, HMBC.	58
4. 7. 3 – Elucidação Estrutural CP2010, NOESY.	62
4. 7. 4 – Isoquercitrina e Hiperina: CP2010.	64
4. 8 – Elucidação Estrutural de Flavonóides, Espectro de UV (CP2013).	64
4.8.1 – Elucidação Estrutural CP2013, RMN ¹H.	65
4. 8. 2 – Elucidação Estrutural CP2013, COSY ¹H-¹H.	67
4. 8. 3 – Elucidação Estrutural CP2013, HSQC.	67
4. 8. 4 – Elucidação Estrutural CP2013, HMBC.	69
5 – Conclusões	74
6 – Referências Bibliográficas	75
7 – Anexos	88

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1: Formação de Flavanonas a partir de unidades malonil CoA e cinamoil CoA (adaptado de Dewick, 2002).	14
Esquema 2: Biossíntese de núcleos Flavonoídicos, flavonas e flavonóis (adaptado de Dewick, 2002).	15
Esquema 3: Fluxograma simplificado para o fracionamento da partição butanólica.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1: Quassialactol e picraqualida, exemplos de quassinóides de Simaroubaceae (Almeida e col., 2007).	2
Figura 2: Gedunina e Nimbina, exemplos de limonóides de Meliaceae (Roy, 2005).	3
Figura 3: Azadirachtina, limonóide isolado das sementes de <i>Azadirachta indica</i> (Morgan, 2009).	4
Figura 4: Flavonóide glicosilado isolado das folhas de <i>Melia azedarach</i> (Salib e col., 2008).	5
Figura 5: Marikarina, ciclopenta [b] benzofurano isolado de espécies de <i>Aglaia</i> (Greger, 2001).	6
Figura 6: Odoralida, exemplo de limonóide de <i>Cedrela odorata</i> (Kipassa, 2008).	7
Figura 7: Cinchonoina a, flavalignana isolada das cascas do caule de <i>Trichilia catigua</i> (Pizzolatti, 2002).	8
Figura 8: Exemplos de terpenóides presentes em <i>Guarea guidonea</i> (Brochini, 2000; Lago, 2002).	9
Figura 9: Diterpenos do tipo caurano isolados das folhas de <i>Guarea kunthiana</i> (Garcez, 2004).	10
Figura 10: Terpenóides isolados de <i>Guarea rophalocarpa</i> (Camacho, 2001).	11

Figura 11: Diterpenos do tipo clerodano isolados das folhas de <i>Guarea trichilioides</i> (Furlan, 1996).	11
Figura 12: Foto de <i>Guarea macrophylla</i> , acessado em 17 de agosto de 2010.	11
Figura 13: Terpenóides isolados de <i>Guarea macrophylla</i> (Lago, 2005).	12
Figura 14: Exemplos de agliconas e posições mais comuns de glicosilações (Cuyckens, 2004).	16
Figura 15: Requisitos estruturais mínimos para atividade antioxidante de flavonóides (Hein, 2002).	20
Figura 16: Estrutura do Radical DPPH (Brand-Williams, 1995).	21
Figura 17: Atividade inibitória enzimática das partições.	40
Figura 18: Atividade inibitória enzimática das frações.	41
Figura 19: Atividade citotóxica da partição butanólica.	43
Figura 20: Atividade antioxidante da partição butanólica.	44
Figura 21: CCD positiva para flavonóides revelada com NP/Peg.	46
Figura 22: CCD positiva para flavonóides observada sob luz UV à 365nm.	46
Figura 23a: Cromatograma da partição butanólica.	47
Figura 23b: Espectro de UV típico de flavonóis obtido do cromatograma da partição butanólica.	47
Figura 23c: Espectro de UV típico de flavonóis obtido do cromatograma da partição butanólica.	47
Figura 24: CCD positiva para fenilpropanóides revelada com NP/Peg sob luz UV à 365nm.	48
Figura 25a: Cromatograma da fração rica em fenilpropanóides.	48
Figura 25b: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção: 24,39min.	49

Figura 25c: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção:33,33min.	49
Figura 25d: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção:34, 08min.	49
Figura 26: Espectro de RMN H^1 da amostra CP500 a 400MHz, provável derivado terpenoídico	50
Figura 27: Espectro de RMN H^1 da amostra CP500 a 400MHz, provável derivado terpenoídico (ampliação).	51
Figura 28a: Espectro de RMN H^1 (400MHz) da amostra CP2010.	52
Figura 28b: Espectro de RMN H^1 (400MHz) da amostra CP2010, região aromática (ampliação).	53
Figura 28c: Espectro de RMN H^1 (400MHz) da amostra CP2010, H-6 e H-8 [Anel A] (ampliação).	53
Figura 28d: Espectro de RMN H^1 (400MHz) da amostra CP2010, H-5' (ampliação).	54
Figura 28e: Espectro de RMN H^1 (400MHz) da amostra CP2010, H-anoméricos (ampliação).	54
Figura 29a: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010.	55
Figura 29b: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010, região aromática (ampliação).	56
Figura 29c: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010, H-5' (ampliação).	56
Figura 29d: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010, H-6 e H-8 [anel A] (ampliação).	57
Figura 29e: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010, H-anoméricos (ampliação).	57
Figura 30a: Mapa de correlação HMBC para CP2010 (400MHZ).	59
Figura 30b: Mapa de correlação HMBC para CP2010 (400MHZ), região glicosídica (ampliação).	59
Figura 31a: Correlações de HSQC e HMBC para o anel A dos flavonóides.	59
Figura 31b: Correlações de HSQC e HMBC para o anel B da Hiperina.	60

Figura 31c: Correlações de HSQC e HMBC para o anel B da Isoquercitrina.	60
Figura 31d: Correlações de HSQC e HMBC para a galactose.	61
Figura 31e: Correlações de HSQC e HMBC para a glucose.	61
Figura 32: Mapa de correlação espacial, NOESY para CP2010.	62
Figura 33: Correlações de NOESY para CP2010.	63
Figura 34: Isoquercitrina.	64
Figura 35: Hiperina.	64
Figura 36: Espectro de UV característico do flavonol kaempferol.	65
Figura 37: Espectro de RMN ^1H (600 MHz), sinais de hidroxilas em C-5 (ampliação)	66
Figura 38: Espectro de RMN ^1H (600 MHz), sinais relativos a H-2' e H-6' para dois isômeros de kaempferol (ampliação).	67
Figura 39: Mapa de correlação COSY para CP2013, anel B (ampliação).	68
Figura 40: Mapa de correlação HSQC (600MHz), CP2013 (ampliação)	69
Figura 41: Assinalamentos referentes ao anel B para os dois núcleos flavonoídicos.	70
Figura 42: Mapa de correlação HMBC (600MHz), região de H-anoméricos (ampliação).	71
Figura 43a: Correlações obtidas com o experimento de HMBC para CP2013(a)	72
Figura 43b: Correlações obtidas com o experimento de HMBC para CP2013(b)	72
Figura 44: Kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo e kaempferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo.	73

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1: Rendimentos do extrato bruto e partições em relação ao material vegetal seco.	39
Tabela 2: Atividade antioxidante da partição butanólica	44
Tabela 3: Deslocamentos químicos obtidos com o experimento de HSQC, amostra CP2013.	69
Tabela 4: Correlações de HMBC para hidrogênios anoméricos, CP2013.	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[]	Concentração
1-D	Monodimensional
2-D	Bidimensional
AA(%)	Percentual da Atividade Antioxidante
APRT	Enzima Adenina Fosforribosiltransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCPNP	Células de Câncer de Pulmão Não Pequenas
CE ₅₀ máxima.	Concentração efetiva para obtenção de metade da resposta
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoA	Coenzima A
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dupleto
D.A.D	Detetor de Feixe de Diodos
dd	Dupleto duplo
DMSO	Sulfóxido de Dimetila
DPPH	2,2 – difenil-1-picrilhidrazila
E 1	Primeiro Estado Conformacional da Na ⁺ K ⁺ ATPase
E 2	Segundo Estado Conformacional da Na ⁺ K ⁺ ATPase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por “Eletrospray”
FAB	Fast Atom Bombardment
gGAPDH	Enzima Glicossomal Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
LDL	Lipoproteína de Baixa densidade
m	Multiplete
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
MMP	Metaloproteínases de Matriz Celular
MS	Mass Spectrometry
MTT	3, 4, 5 – dimethy thiazol-2-yl 2,5-diphenyl-tetrazolium
Na ⁺ K ⁺ ATPase	Adenosina Trifosfatase ativada por Sódio, Potássio e Magnésio
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NP	Natural Product (Reagente)
p.a.	Para análise
PEG	Polietilenoglicol (Reagente)
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PKC	Proteína Cinase C
ppm	Partes por milhão (expressão)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP-18	Fase Inversa (ODS)
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano

TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
U.V.	UltraVioleta
v/v	volume por volume
δ	Deslocamento Químico

RESUMO

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós – graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Guarea macrophylla (Meliaceae) popularmente conhecida como “Atauba”, é encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Alguns estudos fitoquímicos mostram a presença de sesquiterpenos, di – e triterpenos em suas folhas, frutos e galhos. Até o momento não há relatos do isolamento de flavonóides e derivados do ácido caféico nem da realização de testes de atividade biológica nesta espécie.

Quatro flavonóides foram identificados da partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* (quercetina 3-O- β -D – glucopiranosídeo, quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo, kaempferol 7-O- β -D – glucopiranosídeo e kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo). Todas as estruturas foram propostas por meio de métodos espectroscópicos tais como RMN ^1H , HSQC, HMBC, NOESY, COSY e métodos cromatográficos.

Tanto a partição butanólica quanto algumas sub-frações apresentaram atividade inibitória sobre a enzima Na^+/K^+ ATPase de rim suíno, bem como atividade tóxica frente à linhagem de células de câncer de pulmão. Este trabalho inclui-se portanto, no esforço para aumentar as informações químicas e biológicas sobre esta espécie.

ABSTRACT

Guarea macrophylla, popularly known as “Atauba” is found in many regions of Brazil. Some chemical studies have shown the presence of sesquiterpenes, di – and triterpenes on their leaves, barks and fruits. Up to now, there are no reports concerning the isolation of flavonoids and caffeic acid derivatives or biological studies for this specie.

Four flavonoids were identified from the leaves of *Guarea macrophylla* (quercetin 3-O- β -D – glucopyranoside, quercetin 3-O- β -D-galactopyranoside, kaempferol 7-O- β -D – glucopyranoside and kaempferol 7-O- β -D-galactopyranoside). Their structures were proposed based on spectroscopic methods, such as ^1H – NMR, HSQC, HMBC, COSY and chromatographic methods.

The butanolic fraction and some subfractions showed inhibitory activities in tests using Na^+/K^+ ATPase enzyme from porcine kidney and lung tumor cells. Therefore, this work is a contribution for establishing the chemical and biological profiles of *G. macrophylla*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sobre a Ordem Rutales

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para o estudo de produtos naturais (Pinto, 2002). O uso de plantas para o tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Atualmente, elas continuam desempenhando papel de destaque em saúde pública. Cerca de 30% dos medicamentos em uso são derivados naturais ou produtos semi-sintéticos de origem natural. Portanto, estudos envolvendo áreas multidisciplinares como botânica, farmacologia e fitoquímica são altamente relevantes, pois juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (Maciel et al. 2002).

Dentro do contexto de diversidade de espécies podemos mencionar as plantas pertencentes à ordem Rutales, que inclui as famílias Rutaceae, Meliaceae, Simaroubaceae, Burseraceae e Cneoraceae que tem sido citadas como uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas (Ambrozim, 2004).

A família Rutaceae representa o maior grupo da ordem Rutales possuindo 150 gêneros e cerca de 1500 espécies de tamanhos variados, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre. No Brasil são descritas cerca de 160 espécies. Essa família apresenta grande diversidade de metabólitos secundários destacando-se os alcalóides, especialmente os derivados

do ácido antranílico, cumarinas, flavonóides, terpenóides e limonóides (Ambrozim, 2004).

A família Simaroubaceae, outro importante membro da ordem Rutales, é constituída por aproximadamente 32 gêneros e 200 espécies, distribuídas em todas as regiões subtropicais e tropicais, inclusive no Brasil. Plantas da família Simaroubaceae geralmente se apresentam como árvores ou arbustos, tendo como característica marcante o sabor amargo em seu córtex, devido à presença de quassinóides, triterpenos modificados com alto padrão de oxigenação (Figura 1). Este grupo de substâncias naturais é quase exclusivo de espécies de Simaroubaceae, podendo assim, ser considerado marcador taxonômico da família (Almeida, 2007).

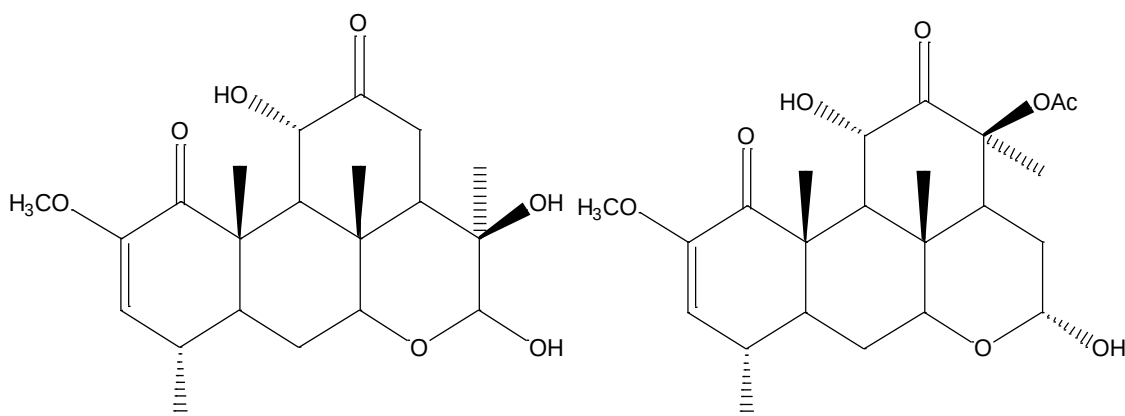


Figura 1: Quassialactol e picraqualida, exemplos de quassinóides de Simaroubaceae (Almeida e col., 2007)

1.1.1 Sobre a Família Meliaceae

A família Meliaceae apresenta 51 gêneros e cerca de 1400 espécies. Esta família é formada por árvores de grande porte, fornecedoras de madeira com alto valor comercial (Penington e Styles, 1975). As espécies de Meliaceae têm

despertado grande interesse da comunidade científica em função da produção de limonóides, triterpenos modificados que apresentam inúmeras atividades biológicas já determinadas, tais como inseticida, antiviral, antibacteriana, antitumoral entre outras. Esta especificidade química da família é interessante, uma vez que a distribuição desta classe de substâncias no reino vegetal é restrita às plantas da ordem Rutales, sendo que os limonóides de Meliaceae são considerados estruturalmente mais complexos (Figura 2) (Roy, 2005).

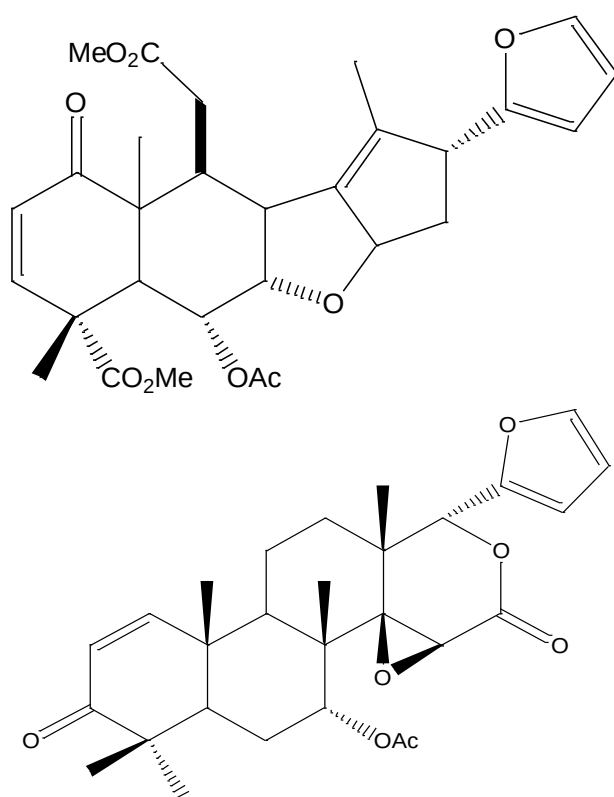


Figura 2: Gedunina e nimbina, exemplos de limonóides de Meliaceae (Roy, 2005).

1.1.2 Estudos químicos e biológicos na família Meliaceae

Azadiractha indica, popularmente conhecida como “Nim”, talvez seja a espécie mais estudada da família Meliaceae. É nativa da Índia, no entanto,

atualmente apresenta ampla distribuição mundial. Corresponde a uma árvore de médio porte e crescimento rápido que é muito conhecida por não sofrer ataques de insetos. Esta característica despertou ao longo dos anos o interesse dos pesquisadores, que constataram que as sementes desta planta apresentavam grandes quantidades de limonóides, entre eles a azadirachtina (Figura 3) um dos triterpenóides com maior grau de oxigenação isolados de plantas até o momento (Morgan, 2009). A atividade inseticida relacionada à azadirachtina também é bastante complexa e interessante, visto que os insetos ao consumirem esta substância não morrem imediatamente, diferentemente do que acontece com a utilização da maioria dos pesticidas. Seu mecanismo de ação se dá pela interferência no ciclo reprodutivo do inseto, no padrão de alimentação e desenvolvimento corpóreo. Como esta atividade só ocorre quando há o consumo da azadirachtina, insetos polinizadores não são afetados. Testes têm mostrado a eficiência deste limonóide no combate a cerca de 200 espécies diferentes de insetos (Roy, 2005).

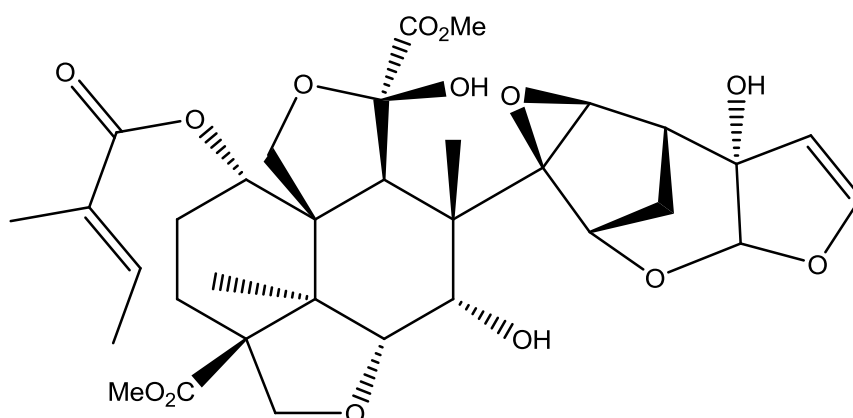


Figura 3: Azadirachtina, limonóide isolado das sementes de *Azadirachta indica* (Morgan, 2009).

Melia azedarach, denominada “Chinaberry”, corresponde também a uma espécie muito conhecida de Meliaceae com ampla distribuição mundial. Suas folhas e frutos apresentam diversas atividades biológicas conhecidas tais como antihelmíntica, fagorrepelente, inibidora enzimática (Zhou, 2005) e antiviral (Petrera, 2009). A maioria dos estudos químicos e biológicos com espécies deste gênero está relacionada com o isolamento e a caracterização estrutural de limonóides. Podemos citar os trabalhos de Mishra, 1984, Marco, 1986 e Salib e col., 2008 como alguns dos poucos estudos fitoquímicos envolvendo a família Meliaceae que descrevem o isolamento de flavonóides glicosilados (Figura 4).

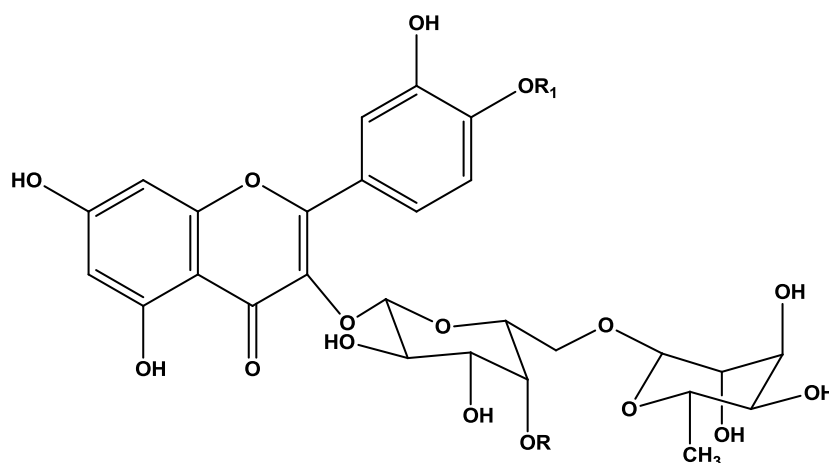


Figura 4: Flavonóide glicosilado isolado das folhas de *Melia azedarach* (Salib e col., 2008).

Na última década, o gênero *Aglaia* pertencente à família Meliaceae tem sido alvo de diversos estudos, pois representa uma possível fonte de novos produtos naturais com atividade inseticida (Greger, 2001). Ao contrário dos outros gêneros de Meliaceae, a alta atividade inseticida apresentada por espécies de *Aglaia* se relaciona com a presença de um grupo estruturalmente único de substâncias derivadas do flavonol-cinamato ciclopenta [b] benzofuranos (Figura

5), denominados derivados de rocaglamidas, com ocorrência exclusiva neste gênero (Lin, 2001). Espécies de *Aglaia* também apresentam bisamidas com potencial de reverter a resistência a quimioterápicos em culturas de células tumorais (Saifah, 1993).

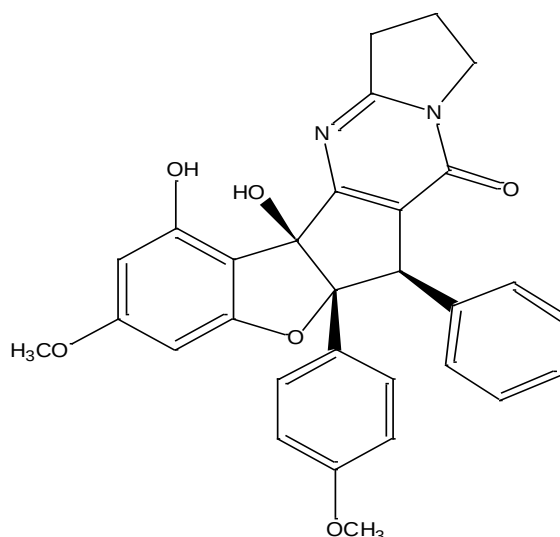


Figura 5: Marikarina, ciclopenta [b] benzofurano isolado de espécies de *Aglaia* (Greger, 2001).

Os gêneros da família Meliaceae com maior distribuição no Brasil são *Cabralea*, *Cedrela*, *Trichilia*, *Guarea* e *Swietenia* (Pennigton e Styles, 1975). A espécie *Cedrela odorata* é utilizada popularmente na América do Sul para o tratamento de casos de diarreia, febre, vômitos, indigestão, além de atuar como antiinflamatório. Estudos fitoquímicos com esta espécie indicaram a presença de limonóides derivados da nomilina/obacunilina (Kipassa, 2008), (Figura 6) com potencial fagorrepelente.

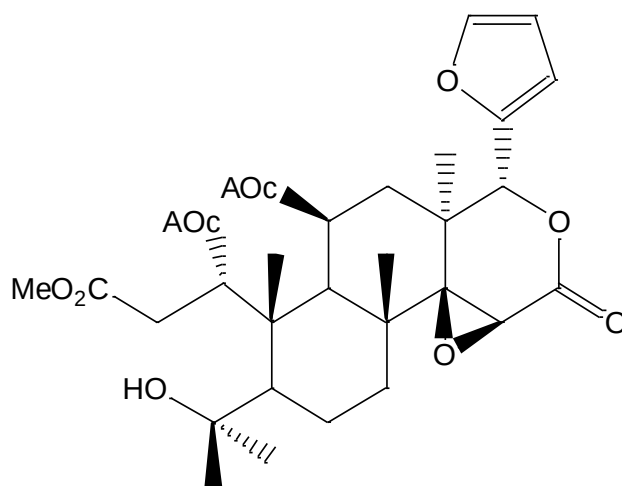


Figura 6: Odoralida, exemplo de limonóide isolado de *Cedrela odorata* (Kipassa, 2008).

O gênero *Swietenia* pertence à subfamília Swietenioideae de Meliaceae, que consiste nos gêneros *Khaya* e *Entandrophragma* na África, *Swietenia* e *Cedrela* na América Latina e *Toona* na Ásia e Austrália. Todas estas espécies são alvos constantes de ataques de insetos do gênero *Hypsipyla* (Lepidoptera: Pyralidae), lepidóptero causador de grandes danos em cultivos de espécies de Meliaceae. Estudos com a espécie *Swietenia macrophylla* utilizando a técnica CLAE-RMN com interrupção de fluxo culminou com a caracterização de limonóides presentes em suas sementes (Shefer, 2006).

O gênero *Trichilia* apresenta aproximadamente 70 espécies, que ocorrem na América tropical e África. Apresenta o maior número e variedade de limonóides da subfamília Meliaodeae, onde está classificada (Pennigton and Styles, 1975). A espécie *Trichilia catigua*, conhecida como catuaba, é utilizada tradicionalmente como tônico físico, mental e especialmente, como estimulante sexual. Seu extrato é um dos componentes do medicamento fitoterápico Catuama®. Estudos fitoquímicos com esta espécie indicaram a presença de uma mistura de flavalignananas, cinchonaínas 1a e 1b (Figura 7), que apresentaram atividade

metanólico de suas folhas culminou com o isolamento de triterpenos de tipo cicloartano, bem como o isolamento de sesquiterpenos derivados do eudesmano oriundos do óleo essencial (Lago, 2002). Os galhos desta espécie são utilizados popularmente como agentes abortivos e febrífugos, já as folhas e frutos são consideradas tóxicas para o gado. Do extrato em diclorometano dos galhos de *G. guidonia* foram isolados derivados seco- e di-seco pregnanos, sendo este o primeiro trabalho que mostra a ocorrência de pregnanos em Meliaceae (Garcez, 2008).

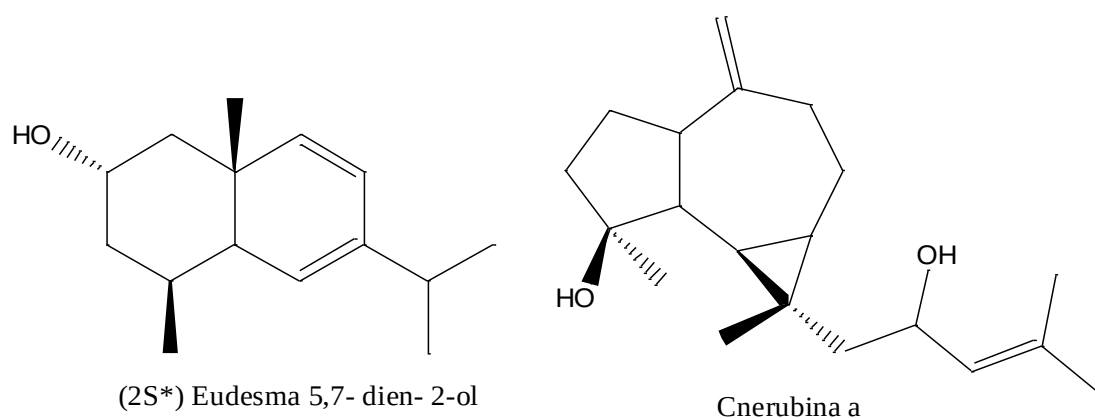


Figura 8: Exemplos de terpenóides presentes em *Guarea guidonea* (Brochini, 2000; Lago, 2002).

Do extrato etanólico das folhas de *Guarea kunthiana* foram isolados diterpenos do tipo cembrano e ent-caurano (Figura 9) e alguns sesquiterpenos (Garcez, 2004). Estudos fitoquímicos feitos com o extrato hexânico da raiz desta espécie levaram ao isolamento do limonóide 22, 24-diepoxitirucall-7-en-3-ona, com potencial leishmanicida (Lima, 2006).

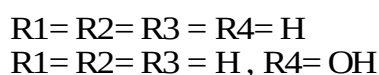
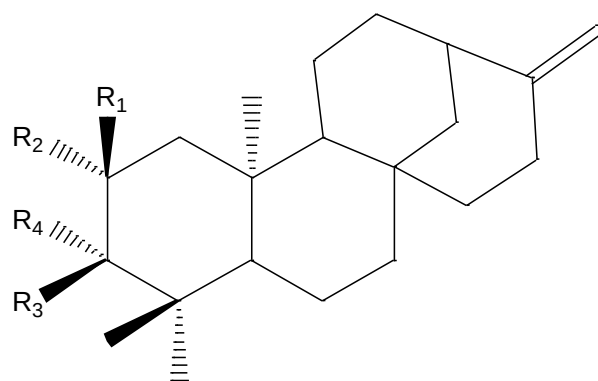


Figura 9: Diterpenos do tipo caurano isolados das folhas de *Guarea kunthiana* (Garcez, 2004).

O extrato metanólico das folhas de *Guarea rhopalocarpa* apresentou atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania donovani*, formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* e frente às cepas de *Plasmodium falciparum*. Desta espécie foram isolados diterpenóides sandaracopimaradianos, triterpenóides do tipo lanostano (Figura 10) e uma cumarina (Camacho, 2001).

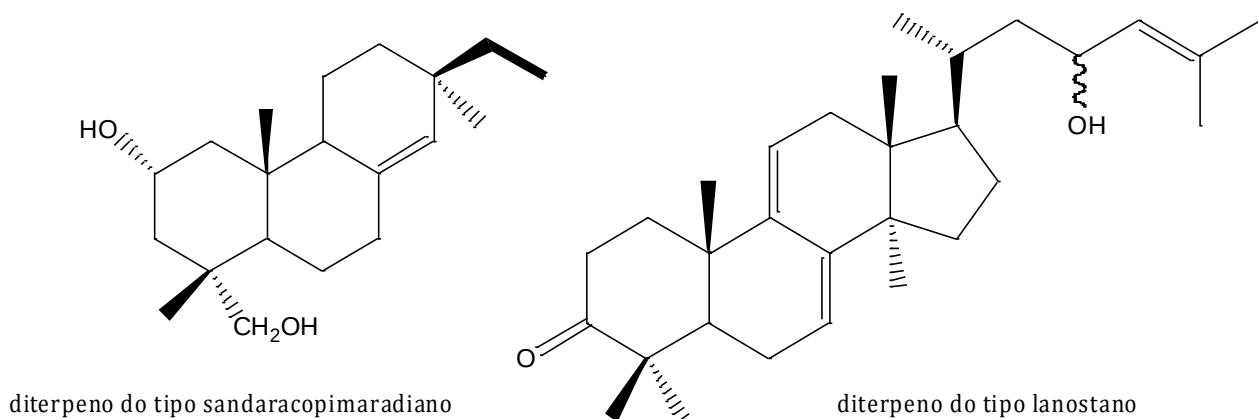


Figura 10: Terpenóides isolados de *Guarea rhopalocarpa* (Camacho, 2001).

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *Guarea trichilioides* levaram ao isolamento de diterpenóides do tipo labdano e dois derivados clerodano (Figura 11) (Furlan, 1996).

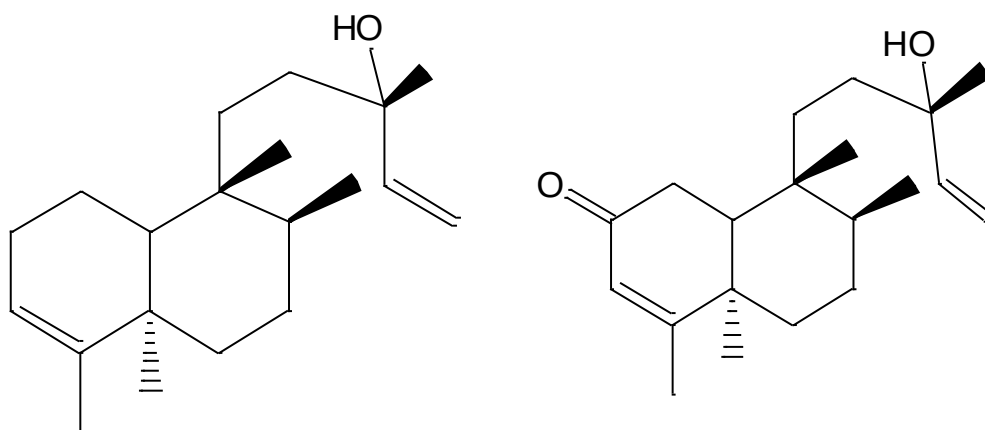


Figura 11: Diterpenos do tipo clerodano isolados das folhas de *Guarea trichilioides* (Furlan, 1996).

1.2.1 A espécie *Guarea macrophylla*

Guarea macrophylla (Meliaceae) popularmente conhecida como ataúba, ocorre como uma árvore de 3 a 10 m de altura essencialmente no Sul e Sudeste do Brasil, estando presente também na Amazônia peruana (Corrêa, 1984).



Figura 12: *Guarea macrophylla* (foto disponível no site:

http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=302, acessado no dia 17/08/2010)

1.2.2 Estudos químicos da espécie *Guarea macrophylla*

Estudos fitoquímicos realizados por Lago e colaboradores, 2000, 2002a, 2002b, 2005, 2006, 2009 descreveram o isolamento de sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (Figura 13) das folhas e cascas do tronco da espécie *G. macrophylla*, além dos constituintes dos respectivos óleos voláteis.

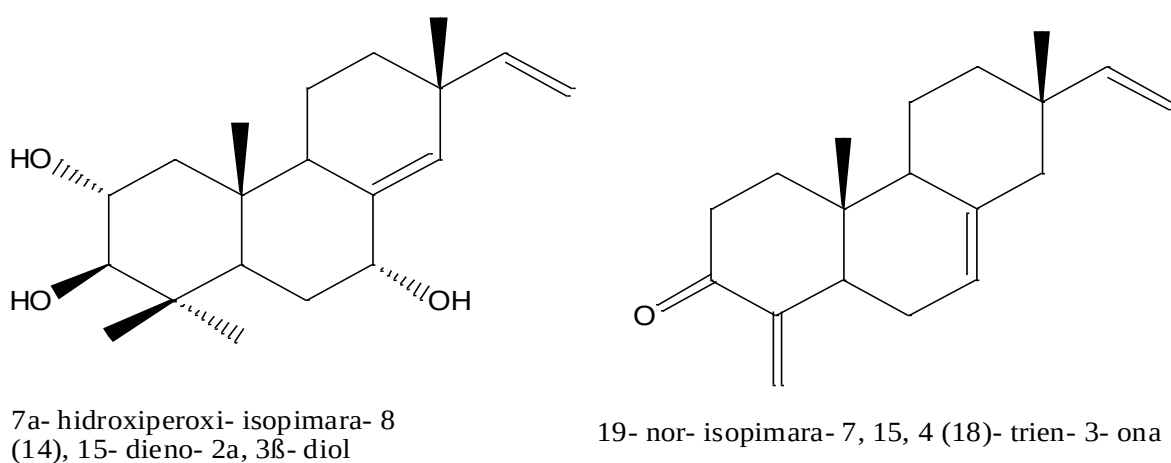


Figura 13: Exemplos de terpenóides isolados de *Guarea macrophylla* (Lago, 2005).

1.2.3 Atividades biológicas relacionadas com a espécie *Guarea macrophylla*

O óleo essencial oriundo das folhas de *G. macrophylla* mostrou resposta eletroantenográfica frente a *Hypsipyla grandella*, inseto causador de grandes danos às culturas de Meliaceae (Lago, 2006).

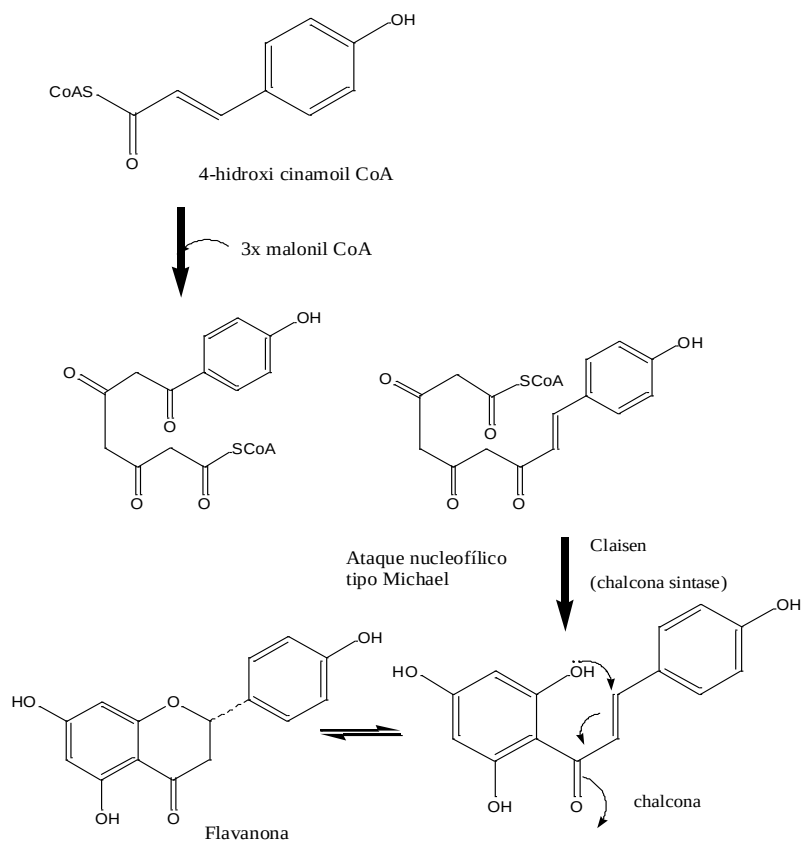
1.3 Flavonóides

Flavonóides são metabólitos secundários de baixo peso molecular que de maneira diferente dos metabólitos primários, não são considerados essenciais para a sobrevivência da planta. No entanto, sua diversidade química, tamanho, forma tridimensional, propriedades físicas e bioquímicas fazem com que eles interajam com alvos em diferentes localizações celulares e assim influenciem nas atividades biológicas de plantas, animais e microorganismos (Buer, 2010). Do ponto de vista químico, flavonóides são formados por uma série de reações de condensação entre o ácido cinâmico e derivados (formação do anel B e maior parte do anel C, posições 2, 3 e 4) e resíduos malonila (formação do anel A) dando origem a uma estrutura básica C₆-C₃-C₆ (Cuyckens, 2004).

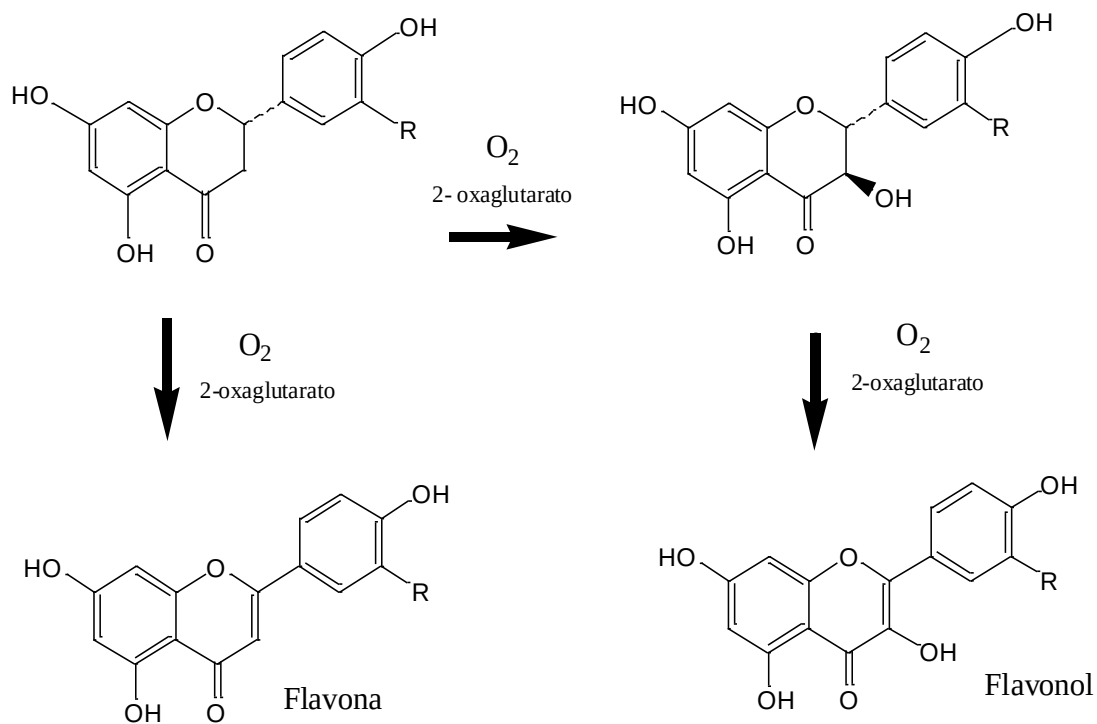
Flavonóides, de maneira geral, têm sido alvo de muitos estudos em virtude dos benefícios potenciais à saúde, uma vez que apresentam propriedades quimiopreventiva e antioxidante (Heim, 2002), além de exibirem ampla faixa de atividades biológicas, tais como proteção cardiovascular (Arts, 2001), potencial antibacteriano (Mandalari, 2010), leishmanicida (Tasdemir, 2006), antiviral (Mercader, 2010), antitumoral (Marchand, 2002) entre outros. Estudos recentes sobre a relação estrutura-atividade dos flavonóides sugeriram que pequenas modificações em sua estrutura ocasionam mudanças significativas nas atividades biológicas relacionadas (Abjalan e col., 2005).

1.3.1 Biossíntese

Flavonóides, como já mencionado anteriormente, apresentam os tioésteres cinamoil- CoA e 3 unidades de malonil- CoA como precursores. A enzima chalcona sintase é responsável pela condensação entre estas unidades e consequente formação das chalconas (Esquema 1), que dão origem aos diferentes tipos de flavonóides presentes no reino vegetal (Dewick, 2002). A maioria dos flavonóides apresenta anéis de seis membros formados por ataques nucleofílicos tipo adição de Michael entre a hidroxila fenólica e a cetona α - β insaturada, para a formação das flavanonas. Estas estruturas por sua vez, podem dar origem às diversas variações no núcleo básico flavonoídico, com a formação das flavonas, flavonóis, catequinas e antocianidinas (Esquema 2). Modificações no padrão de hidroxilação dos dois anéis aromáticos ocorrem geralmente no estágio de flavanona ou diidroflavonol, metilações, glicosilações e desmetilações também são possíveis e garantem o aumento na variabilidade das estruturas formadas (Dewick, 2002; Torssell, 1997).



Esquema 1: Formação de Flavanonas a partir de unidades malonil CoA e cinamoil CoA (adaptado de Dewick, 2002).



Esquema 2: Biossíntese de núcleos flavonóidicos, flavonas e flavonóis (adaptado de Dewick, 2002).

1.3.2 Classificação e variação estrutural

De acordo com a ciclização e com o grau de insaturação e oxidação, os flavonóides podem ser classificados em diversos grupos. As agliconas de maior ocorrência correspondem aos flavonóis, flavonas e flavanonas respectivamente (Figura 14). Além disso, são bem descritas agliconas dos tipos isoflavonas, chalconas, diidrochalconas, diidroflavonóis, auronas, flavanas e antocianidinas (Veitch, 2007). Os flavonóides podem ocorrer em plantas nas formas metoxiladas, com hidroxilações adicionais, preniladas e mais frequentemente sob a forma de glicosídeos (O ou C- glicosídeos) (Cuyckens, 2004).

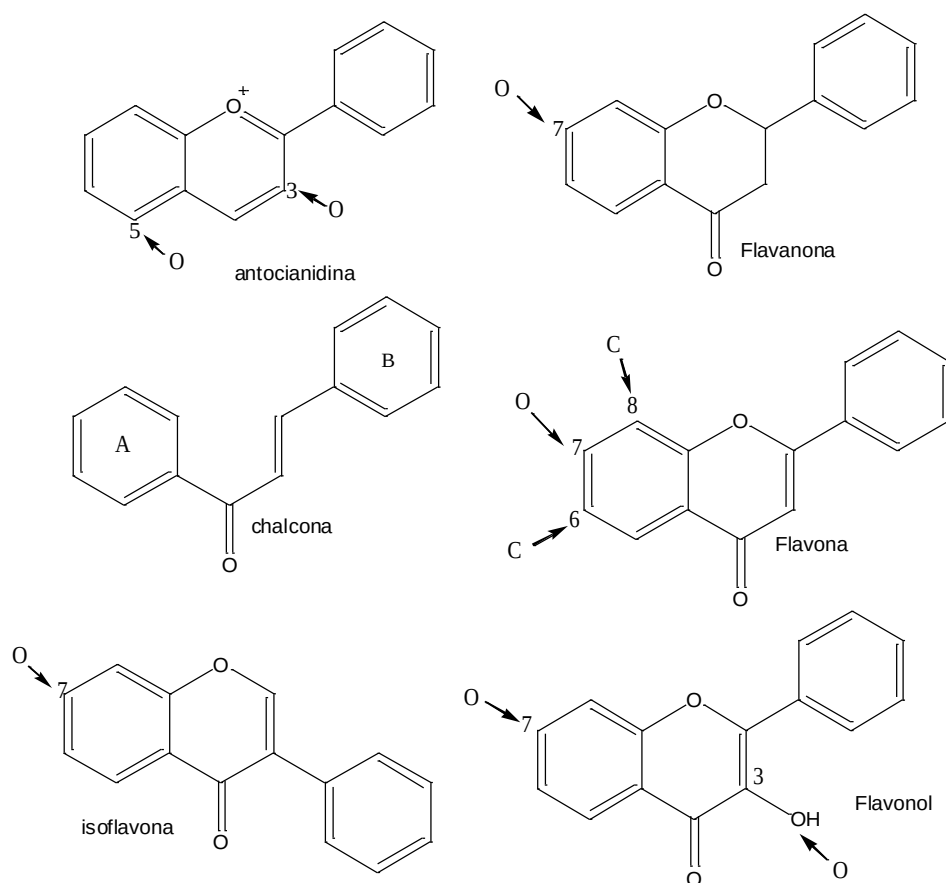


Figura 14: Exemplos de agliconas e posições mais comuns de glicosilações (Cuyckens, 2004).

Flavonóides ocorrem frequentemente sob a forma de O-glicosídeos, os quais apresentam um ou mais grupos hidroxila fenólica com substituição do hidrogênio por unidades de açúcar com a formação de ligações glicosídicas, que correspondem a acetais susceptíveis à hidrólise ácida. Em princípio, qualquer hidroxila fenólica pode sofrer glicosilação, no entanto algumas posições são mais favorecidas, por exemplo, a hidroxila na posição 7 é preferencial para glicosilação em flavonas, flavanonas e isoflavonas. Para flavonóis as posições C-3 e C-7 são preferenciais, já em antocianidinas, as posições C-3 e C-5 são as mais freqüentes (Cuyckens, 2004).

Flavonóides podem ser encontrados sob a forma C-glicosilada, neste caso, o açúcar se liga diretamente ao núcleo básico do flavonóide, via ligação C-C resistente a hidrólise ácida. Até o momento, foram isolados apenas C- glicosídeos nas posições C-6 e C-8 do núcleo flavonoídico (Zhi- Duo, 2010).

Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados em ligações glicosídicas são a glicose e a ramnose e, menos frequentemente a arabinose, xilose, manose, entre outros (Vukics, 2010). Os dissacarídeos mais encontrados associados aos flavonóides são a rutinose (ramnosil-(α 1 $\rightarrow$ 6)-glicose) e a neohesperidose (ramnosil-(α 1 $\rightarrow$ 2)-glicose. Tri e tetrassacarídeos, ocasionalmente, são encontrados ligados à flavonóides (Cuyckens, 2004).

1.3.3 Ocorrência e Distribuição

Flavonóides apresentam grande distribuição e diversidade estrutural entre angiospermas, sendo que também há registros de seu isolamento em

pteridófitas e briófitas (Simões e col., 1999). Em virtude desta boa distribuição no reino vegetal, especificidade em determinados gêneros e relativa facilidade de identificação, flavonóides são muitas vezes utilizados como marcadores taxonômicos (Harbonne, 2000). No caso da família Meliaceae a presença desta classe de metabólitos não é muito evidente, havendo a ocorrência descrita nos gêneros *Azadirachta*, *Melia*, *Khaya*, *Toona*, *Xylocarpus*, *Aglaia*, *Desoxylum*, *Trichillia* e *Cedrela* (Salib e col., 2008, Ademola, 2009, Fang, 2010, Shen, 2009, Puripattavanong, 2000, Barbara, 1996, Rolim, 2006 e de Paula, 1997).

1.3.4 Atividade Biológica

Flavonóides, de maneira geral, desempenham diferentes papéis na fisiologia da planta, entre eles podemos mencionar proteção contra a herbivoria (Markhan, 2006), influência no transporte do hormônio vegetal auxina, modulação nos níveis de espécies reativas de oxigênio (Buer, 2010) e resistência à radiação UV-B (280±315 nm), uma vez que, ao absorverem energia nessa faixa, os flavonóides atuam como filtros e garantem proteção aos tecidos da planta contra possíveis danos. As antocianidinas são pigmentos responsáveis pelas cores vermelha e violeta de cerejas, vinhos e alguns vegetais e, sua presença nas flores, facilita o processo de polinização (Harbonne, 2000).

Muitos dos efeitos benéficos à saúde associados aos flavonóides são atribuídos ao seu potencial antioxidante e quelante de íons, principalmente o ferro (Heim, 2002). Em função da capacidade de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), esta classe de substâncias tem demonstrado importantes

efeitos cardioprotetores. Estudos indicam que dietas ricas em flavonóides possibilitam a diminuição dos riscos de mortalidade por doenças coronarianas, menor incidência de infarto do miocárdio em populações de homens idosos (Arts, 2001) e em mulheres pós-menopausa (Yochum, 1999).

Estudos têm demonstrado os efeitos hipoglicemiantes de flavonóides; esta é uma atividade bastante relevante, pois o diabetes mellitus é uma doença metabólica complexa, sendo considerado grave problema de saúde pública. Estudos in vivo mostram que injeções intraperitoniais de epigallocatequina-3-O-galato são capazes de diminuir os níveis sanguíneos de glicose (Cazzarolli, 2008).

Flavonóides derivados do kaempferol auxiliam na diminuição da pressão arterial uma vez que são capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Loizzo, 2007), além disso, estudos mostram que flavonóis e proantocianidinas apresentam atividade vasodilatadora o que pode contribuir para o controle da hipertensão primária (Valadares, 2003).

A lista de atividades biológicas associadas aos flavonóides é muito extensa, cabe ressaltar ainda os potenciais antiviral (Mercarder, 2010), antibacteriano (Mandalari, 2010) e leishmanicida (Tasdermir, 2006). Estudos envolvendo a determinação do mecanismo de ação desta classe de substâncias devem ser realizados. É importante mencionar que grande parte dos ensaios foram realizados in vitro, sendo indispensável para propiciar o desenvolvimento de aplicações terapêuticas, a avaliação de dados farmacocinéticos relativos à absorção, metabolismo e eliminação (Germano, 2006).

1.3.5 Flavonóides e atividade antioxidante

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Barreiros, 2006). No entanto, seu excesso pode estar relacionado com o surgimento de várias patologias, tais como artrite, doenças do coração, câncer, entre outras. Os radicais livres formados no organismo podem ser combatidos por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, entre eles podemos destacar os flavonóides (Bianchi, 1999).

As propriedades químicas dos polifenóis possibilitam que estes atuem como seqüestradores de radicais livres, uma vez que em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável eles são capazes de regenerá-lo ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo, além disso, o radical resultante é estabilizado por ligação de hidrogênio intramolecular (Rice-Evans, 1995). Estudos da relação estrutura-atividade de flavonóides indicam que a presença do grupo (3', 4') catecólico livre no anel B, bem como a presença da ligação dupla nos carbonos C2 e C3 do anel C e da hidroxila fenólica livre na posição 3 (Figura 15) contribuem fortemente para a atividade antioxidante dos flavonóides (Hein, 2002). A

glicosilação quando presente na posição C-3, reduz bastante a capacidade antioxidante dos flavonóides. No entanto, uma hidroxila fenólica adicional no anel B aumenta consideravelmente a atividade antioxidante, como é o caso do flavonol miricetina (Pietta, 2000).

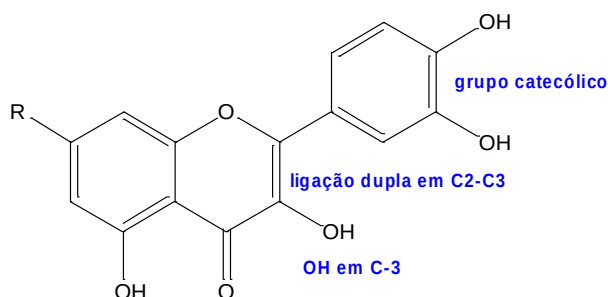


Figura 15: Requisitos estruturais mínimos para atividade antioxidante de flavonóides (Hein, 2002).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias fenólicas. Podemos destacar o método de seqüestro de radicais livres, DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, como um dos métodos mais utilizados (Figura 16). Neste caso, este radical ao receber o elétron, muda sua coloração do violeta para amarelo e pode, dessa maneira, ser medido fotocolorimetricamente (Brand-Williams, 1995).

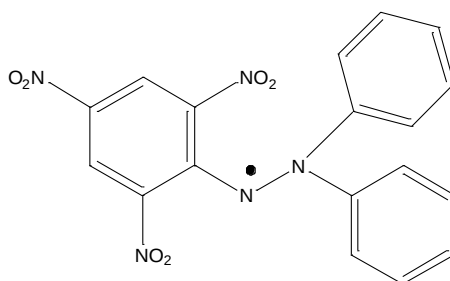


Figura 16: Estrutura do radical DPPH (Brand- Williams, 1995).

1.3.6 Flavonóides como inibidores enzimáticos

Flavonóides têm sido amplamente estudados e citados como potentes inibidores ou modificadores de diversos sistemas enzimáticos. Estudos realizados com o flavonol quercetina e seus derivados glicosilados (isoquercitrina e rutina) indicaram excelente atividade inibidora da enzima α -glucosidase, relacionada com a metabolização de carboidratos e consequente diminuição dos níveis de glicose sanguíneos (Li, 2009). Segundo Agullo e col., (1997), flavonóides são capazes de inibir alguns tipos de proteínas cinases (PKCs) e tirosina cinases que estão envolvidas em processos de proliferação celular descontrolada. Estudos de relação estrutura-atividade indicam que a posição, número e substituições de grupos OH no anel B do flavonóide e, a ligação dupla nos carbonos C2 e C3 do anel C, são importantes para atividade inibidora da proteína fosfatidilinositol 3-cinase-a (3K-P a), enzima relacionada com a transdução de sinais e transformações celulares. Estudos realizados com a quercetina indicam que este flavonol é capaz de inibir metaloproteínases de matriz celular (MMP) que estão relacionadas com o desenvolvimento e progressão de lesões ateroscleróticas (Saragusti, 2010).

1.3.7 Flavonóides e atividade anti-tumoral

Dados experimentais acumulados ao longo dos anos apontam flavonóides como substâncias com grande potencial na prevenção e tratamento do câncer. Testes in vitro indicaram a quercetina como importante agente anti tumoral in vitro uma vez que esta substância é capaz de induzir a apoptose de diversas linhagens de células tumorais, entre elas a K562, de leucemia mielóide crônica

(Wei, 1994). Estudos atuais relacionam o maior consumo de soja (isoflavonas) com uma menor incidência nos casos de câncer de mama no período pós menopausa, o aumento no consumo de chá verde e o menor risco de desenvolvimento de câncer no estômago, além da maior ingestão de maçãs e cebolas com a diminuição dos casos de câncer de pulmão. No entanto, efeitos protetores de flavonóides ainda carecem de aumento nos dados de estudos epidemiológicos (Marchand, 2002).

1.3.8 Inibição da Na⁺K⁺ ATPase e câncer

A enzima Na⁺K⁺ ATPase tem papel importante na manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática das células animais. Esta enzima é formada pelas sub-unidades α -catalítica, β glicosilada e γ . A sub-unidade catalítica apresenta pelo menos quatro isoformas: $\alpha 1$ ($\alpha 1\text{NaK}$), $\alpha 2$ ($\alpha 2\text{NaK}$), $\alpha 3$ ($\alpha 3\text{NaK}$) e $\alpha 4$ ($\alpha 4\text{NaK}$). Sendo que a sub-unidade $\alpha 1$ ($\alpha 1\text{NaK}$) é encontrada em todos os tipos celulares. Estudos recentes têm mostrado que a sub-unidade $\alpha 1\text{NaK}$ pode ser um potencial alvo para o tratamento de diversos tipos de câncer, uma vez que dados da literatura indicam que esta sub-unidade se apresenta super expressa em amostras clínicas de carcinoma hepatocelular, células de câncer de pulmão não pequenas (CCPNP) e em glioblastomas quando comparadas com células de tecidos normais (Shibuya, 2010). Se a atividade aumentada da Na⁺K⁺ ATPase nas células CCPNP for uma característica importante na patofisiologia do câncer de pulmão, substâncias ouabaína-like ou que tenham potencial de inibir a enzima Na⁺K⁺ ATPase por mecanismo diferente da ouabaína, poderiam ser úteis para o tratamento de alguns tipos de câncer. (Mijatovic, 2007).

1.3.9 Isolamento e identificação de flavonóides

As técnicas clássicas de separação de substâncias fenólicas correspondem à cromatografia em coluna utilizando poliamida, Sephadex LH-20, amberlite XAD-2, XAD-7 e 16, além de cromatografia em camada delgada. Precipitação com etanol, metanol ou clorofórmio quando aplicados corretamente também oferecem excelentes resultados (Simões e col., 1997). A presença dos anéis fenólicos na estrutura dos flavonóides facilita muito a sua análise, uma vez que este excelente cromóforo possibilita a obtenção de espectros de ultravioleta que fornecem informações estruturais que nos permitem distinguir o tipo de aglicona e o padrão de oxidação (Markhan, 2006).

Em virtude do aumento do conhecimento sobre os benefícios à saúde e propriedades quimiopreventivas dos flavonóides, há um esforço contínuo para a melhoria dos métodos analíticos para o isolamento, caracterização e monitoramento dos níveis de flavonóides em plantas, especialmente frutas e legumes, bem como o desenvolvimento de novas técnicas para identificar os sítios de interação desta classe de substâncias com moléculas biológicas (March, 2008). Grande parte dos trabalhos publicados atualmente se refere à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como a ferramenta mais utilizada rotineiramente para a análise de substâncias fenólicas, sendo os detectores de UV e fotodiodos (DAD) os mais comuns (Markhan, 2006). No entanto, há trabalhos que descrevem a utilização do CLAE acoplado a detectores de fluorescência, para a análise de flavonas polimetoxiladas e outros derivados fenólicos de espécies de *Citrus sp.* (Mertens-Talcott, 2007). Aparelhos de cromatografia líquida acoplados a

espectrômetros de massas (ESI, por exemplo) têm sido citados como a ferramenta analítica mais poderosa para a análise de polifenóis (March, 2008, Boros, 2010). Além disso, há trabalhos sobre a utilização da eletroforese capilar acoplada ao detector de UV para a identificação simultânea dos constituintes polares presentes no chá verde (Arce, 1998) e cromatografia contracorrente de alta eficiência (HSCCC) para a análise de flavonóides (Yuan, 2002).

Portanto, a escolha dos métodos e estratégias para isolamento e identificação de flavonóides varia entre os grupos de pesquisa e estão diretamente relacionadas com o tipo de flavonóide estudado e os recursos disponíveis.

1.3.10 Elucidação Estrutural

A espectroscopia no ultravioleta é a principal técnica tanto para a detecção quanto para o monitoramento da pureza de derivados flavonoídicos durante os processos de isolamento. Em geral, as outras técnicas espectroscópicas, infravermelho e ressonância magnética nuclear (1 e 2D) são reservadas para substâncias puras (Simões e col., 1997).

Desenvolvimentos na instrumentação da RMN, incluindo a utilização de campos magnéticos mais altos, probes supercondutores, melhoramentos das seqüências de pulsos e dos softwares utilizados fizeram com que a espectroscopia de ressonância magnética nuclear se tornasse a ferramenta mais importante para a elucidação estrutural de flavonóides. Além disso, atualmente, há maior procura por métodos de análise estrutural não degradativos, visto que a mesma amostra utilizada nas análises pode ser usada em ensaios biológicos (Markhan, 2006). A

espectroscopia de RMN ^1H tem papel crucial na elucidação estrutural de produtos naturais, especialmente nos casos de glicosídeos. A ressonância magnética nuclear de hidrogênio, em princípio, contém grande quantidade de informações estruturais que podem levar a conclusões sobre o ambiente químico, a estereoquímica relativa e o tipo de açúcar em questão. Além disso, as propriedades conformacionais da molécula bem como a sequência e locais das glicosilações também podem ser obtidas (Pauli, 2000). As técnicas bidimensionais, tanto homo- quanto heteronucleares, tais como COSY, HSQC/HMQC, HMBC, NOESY/ROESY, TOCSY 1 e 2D entre outras, são utilizadas rotineiramente para a análise de flavonóides glicosilados (Vilegas, 2000).

Adicionalmente, técnicas modernas de espectrometria de massas com ionização branda, como FAB, MALDI e ESI são excelentes para análise de flavonóides, uma vez que podem fornecer informações estruturais importantes e o peso molecular da substância em questão com a utilização de pequenas quantidades de amostras puras ou em mistura. Informações estruturais mais detalhadas podem ser obtidas quando espectrômetros de massa são utilizados acoplados (MS/ MS) (Cuyckens, 2004). Além disso, por ser uma técnica bastante sensível, há necessidade de pequena quantidade de amostra, o que é bastante relevante, visto que flavonóides frequentemente são isolados na escala de miligramas (Vukics, 2010).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é a avaliação do potencial bioativo da partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* bem como a realização de seu estudo fitoquímico.

Os objetivos específicos são:

Avaliar o potencial bioativo da partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* com a realização de 2 testes biológicos distintos: teste de inibição da enzima Na⁺K⁺ ATPase e teste de toxicidade frente à linhagem de células de câncer de pulmão H640.

Avaliação da atividade antioxidante da partição butanólica pelo método DPPH.

Isolar e caracterizar substâncias potencialmente ativas presentes na partição butanólica das folhas.

Aplicar as técnicas de RMN para a elucidação estrutural de flavonóides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Fases Estacionárias utilizadas para Cromatografia

- ♦ Sephadex LH-20 (PHARMACIA®).
- ♦ XAD-2 (Sigma- Aldrich ®)
- ♦ Gel de sílica 60 G (para CCD) MERCK®.

3.1.2 Solventes

para cromatografia

- Solventes em grau para análise (p.a.) para cromatografias em camada delgada e coluna e, em grau espectroscópico, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As misturas de solventes foram feitas sempre volume a volume (v/v).
- H₂O destilada para cromatografia em coluna.

para RMN

- Solvente deuterado (DMSO- d₆ Merck ®).

3.1.3 Reagentes

Para a análise das CCD foram utilizados os seguintes reagentes cromogênicos:

- Orcinol MERCK® - 2 g em 100mL de etanol.
- NP/ PEG – solução de 2-aminoetildifenilborato em etanol a 1 mg/ml (NP) SPECTRUM®, seguida de polietilenoglicol 4000 a 5% em etanol (PEG) FLUKA®.
- Vanilina VETEC®- 1g em 100 mL de etanol.
- Solução de H₂SO₄ a 10%.

Para avaliação da atividade Na⁺K⁺ ATPase:

- EDTA, Bis-Tris propano e ouabaína (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

- Solução 0,3mM de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) SIGMA®.

Para o teste de atividade citotóxica

- Meio de cultura RPMI + Glutamax (GIBCO, Invitrogen™)
- MTT (Sigma®).

- Amostra clínica de células de tumor de pulmão H640.

3.1.4 Equipamentos

- A análise por CLAE acoplada ao detector de feixe de fotodiodos foi realizada em aparelho SHIMADZU® CBM-10 A, equipado com bomba LC-10AD e detector ultravioleta de feixe de fotodiodos SPD-M10A. A coluna utilizada foi a Lichrosorb-RP-18 de 25 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro.
- Para medidas no ultravioleta (UV) foi utilizado um espectrofotômetro SHIMADZU® modelo U.V.-1601 com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm QS HELLMA®.
- Lâmpada de UV Mineral light com lâmpadas de 254 e 365nm.
- Para RMN foram utilizados os espectrômetros Varian 400MHz e Bruker DRX 400 e 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e a multiplicidade destes descrita como: simpleto, (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m) e duplete duplo (dd). Os experimentos HSQC editado, HMBC, COSY, TOCSY- 1D e NOESY foram realizados utilizando-se o software de aquisição pertencente aos sistemas utilizados. A calibração dos espectros foi feita com o sinal do TMS ou com o sinal do solvente utilizado. O processamento dos espectros foi realizado utilizando-se o software MestreRenova.
- Para evaporação dos extratos e frações foi utilizado evaporador rotatório PEMEM® juntamente com bomba de vácuo COLE PARMER INSTRUMENT

COMPANY modelo 7049-50 e banho FISATOM® modelo 550 (1200 W 230 V).

- A liofilização foi realizada em liofilizador LABCONCO®.
- Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica modelo AB204 METTLER TOLEDO MICRONAL S/A.

Para os testes de inibição da enzima Na⁺K⁺ ATPase:

- Centrífuga Sorvall ® SCR20B com rotor RPR12-2 (Hitachi®).
- Espectrofotômetro SHIMADZU®

Para os testes de atividade citotóxica

- Leitor de Elisa, Sunrise ®, número de série: 708000805.
- Placas de 96 poços

3.2 Métodos e Técnicas

3.2.1 Obtenção do material botânico

As folhas de *Guarea macrophylla* foram coletadas no bairro Jacarepagua, Rio de Janeiro, Brasil. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Cássia Mônica Sakuragui do Instituto de Biologia da UFRJ. A exsicata encontra-se depositada no

Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número de registro RB 466067.

3.2.2 Obtenção do extrato bruto

As folhas *G. macrophylla* (600g) foram secas em estufa a 50 °C e posteriormente moídas em moinho de facas. Estas foram submetidas à extração a frio (maceração) com solução de Metanol: H₂O (8:2). O extrato hidroalcoólico das folhas de *G. macrophylla* (32g) foi submetido à partição líquido- líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e butanol. O resíduo aquoso remanescente foi liofilizado. As partições obtidas foram levadas à secura sob pressão reduzida, sendo seus rendimentos: 13g para a fração em diclorometano, 500mg para a fração em acetato de etila, 6g para a butanólica e 10g para o resíduo aquoso.

A partição butanólica foi submetida à CCD e análise por CLAE/ UV. Esta partição foi selecionada para estudo fitoquímico devido à presença de flavonóides, isto foi evidenciado pela revelação positiva com o reagente cromogênico NP/PEG e pelo espectro de UV obtido de alguns sinais do cromatograma que são característicos de derivados fenólicos.

Os solventes utilizados para a obtenção do perfil em CLAE da partição butanólica de *Guarea macrophylla* foram: Solução A (H₂O: H₃PO₄ 1%) e solução B (MeOH: H₃PO₄ 1%). A eluição foi feita em modo gradiente de 0% até 70% de B em 72 min, 1mL/ min. A detecção de UV foi realizada com detector DAD e os canais observados foram de 254 e 365nm.

3.3 Ensaio de Atividade Antioxidante da partição butanólica pelo método do radical DPPH

Foi feita uma solução mãe da partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* na concentração de 1mg/ mL utilizando metanol: água (1:1) como solvente. O extrato padronizado do Ginkgo biloba EGb 761® foi usado como padrão positivo para a atividade antioxidante por esse método.

A solução mãe foi diluída até as concentrações finais de 750, 500, 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/ml. A todas as diluições foi adicionado 1,0 ml da solução de DPPH 0,3 mM (amostra A) em triplicata. As reações transcorreram a temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, foram feitas as leituras de absorvância em espectrofotômetro de UV a 518 nm. Para cada concentração testada foi feito o ensaio em branco (B) (contendo 1,0 ml do solvente e 2,5 ml da solução diluída), bem como o controle (C) positivo (contendo 1 mL de solução de DPPH 0,3mM em 2,5mL de solvente). Desta forma foi possível obter a atividade antioxidante percentual para a partição butanólica e a concentração efetiva de 50% para obter um efeito máximo em 100% (CE 50). Os valores de absorvância foram convertidos em atividade antioxidante percentual (AAO%) conforme a fórmula: $AAO\% = 100 - \{[(ABSA - ABSB) \times 100] / ABSC\}$. Os resultados foram expressos em valores de CE 50.

3.4 Determinação da atividade inibitória da enzima Na⁺K⁺ ATPase

A atividade Na⁺K⁺ ATPase foi determinada colorimetricamente dosando-se o fosfato inorgânico (Pi), resultante da hidrólise do ATP. Foi utilizado 0,5mL do meio de ensaio contendo: Bis-Tris propano 50 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 120 mM, a partição butanólica e as sub-frações contendo flavonóides e fenilpropanóides, todos com a concentração final de 1,5 mg/ml. Depois das amostras serem pré-incubadas a 37° C, por 10 minutos, na presença de 0,1 mg/ml de proteína, foram adicionados KCL 24 mM e ATP 5 mM (pH 7,0) para iniciar a reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,75 ml de carvão ativado (0,17 g/ml) com HCL 0,1 N para adsorção do ATP não hidrolisado, ainda presente na solução. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 1.900 g, por 5 minutos. Alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes foram retiradas e o Pi determinado colorimetricamente pelo método descrito por Taussky e Shorr, 1952.

A atividade da Na⁺K⁺ ATPase foi calculada pela diferença entre as atividades medidas com e sem 1 mM de ouabaína (inibidor da Na⁺K⁺ ATPase).

Todos os testes de inibição foram realizados em triplicata.

3.4.1 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando foram observadas diferenças significativas entre as médias, utilizou-se o teste de Bonferroni com $p \leq 0,05$.

3.5 Determinação da atividade tóxica da partição butanólica frente à linhagens de células de câncer de pulmão H640

O método colorimétrico quantitativo com MTT (Mosmann, 1983) foi utilizado para medir a viabilidade celular da linhagem de células de tumor de pulmão frente a partição butanólica de *Guarea macrophylla*.

As células foram crescidas em garrafas de 25 cm com 5 ml de meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e estreptomicina-penicilina (0,1%). A contagem das mesmas foi realizada por microscopia ótica em Câmara de Neubauer e os repiques foram realizados duas vezes por semana, após lavagem com PBS. As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, utilizando-se 180 µl de suspensão celular (104 células/poço). Após 24 h de incubação a 37°C, foram adicionados 20 µl de cada amostra vegetal nas concentrações de 50, 125, 250 e 500 µg/ml, em triplicata. O controle do ensaio foi preparado com DMSO nas concentrações finais de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0%. Os poços do branco foram preparados com 200 µl de DMSO. Um controle celular foi preparado com 180 µl de suspensão celular e 20 µl do meio de cultura.

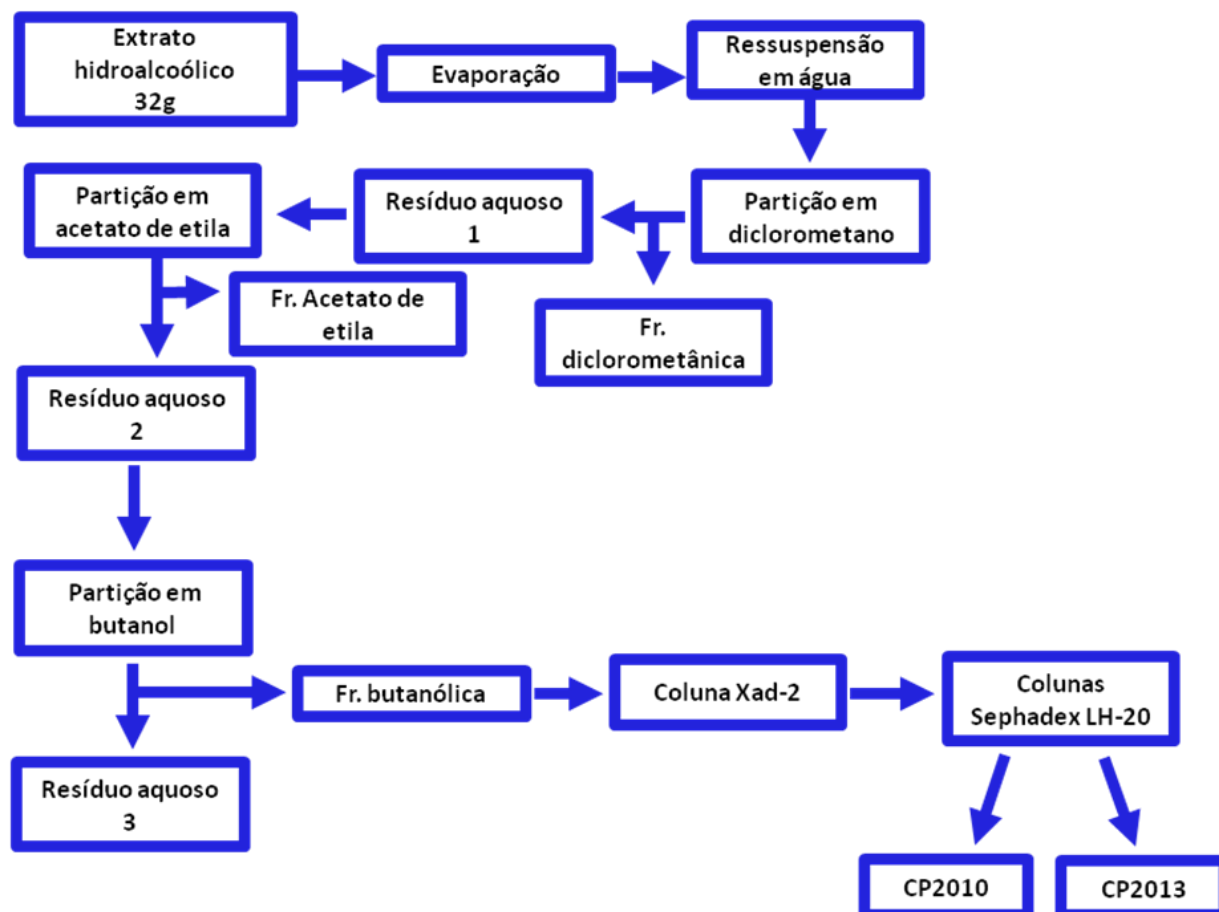
Após 48h de incubação em estufa a 37°C, as placas foram reveladas com MTT e a leitura das absorvâncias foi feita em leitor de microplacas em comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade foi calculada utilizando-se os valores obtidos com DMSO como controle e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da viabilidade celular.

3.6 Fracionamento Cromatográfico da partição butanólica

2,0 g da partição butanólica (BuOH) foram ressuspensos em solução de metanol: H₂O (9:1) e submetidos à cromatografia em coluna XAD-2. A coluna foi feita com gradiente de concentração de solventes iniciando com 200mL de solução de metanol: H₂O (1:9) até 100% de metanol. As 10 frações recolhidas foram reunidas de acordo com suas semelhanças cromatográficas (CCD). As cromatoplasmas foram eluídas em solução de butanol: H₂O: ácido acético nas proporções de 40: 50: 10 e reveladas com soluções de NP/PEG e Orcinol sulfúrico.

As frações eluídas com 70 a 50% de H₂O foram agrupadas por semelhança cromatográfica (FR Cris 1), concentradas e seu rendimento foi de 380mg. Este material foi submetido à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 com 100% de H₂O, tendo sido obtidas 60 frações de aproximadamente 20 mL cada. As 15 primeiras frações foram agrupadas e submetidas à nova cromatografia em coluna Sephadex LH-20 com 100% de acetona para a purificação de derivados do ácido caféico (FA 150mg). As frações 21 a 29 (FB 40mg) e 51 e 52 (FC 15mg) foram reunidas de acordo com suas semelhanças cromatográficas (CCD) e submetidas a novas cromatografias em coluna Sephadex LH-20 com 100% de H₂O.

Da fração FC foram eluídas 20 subfrações de aproximadamente 5 mL. As subfrações de números 13 a 18 (CP 2010/ 5mg) foram agrupadas e analisadas. Da fração FB foram eluídas 40 subfrações de 5 mL cada. As frações de números 17 a 22 (CP2013/ 5,8mg) também foram analisadas por UV e enviadas para análise por Ressonância magnética nuclear (Esquema 3).



Esquema 3: Fluxograma simplificado para o fracionamento da partição butanólica

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Geral

As espécies da família Meliaceae são conhecidas pela grande produção de terpenóides. A espécie *Guarea macrophylla* já foi amplamente investigada em relação ao seu perfil terpenoídico por Lago e col., 2000, 2002a, 2002b, 2005, 2006, 2009. Portanto, a baixa quantidade de informações químicas acerca da produção de substâncias fenólicas e glicosiladas nas espécies de Meliaceae, incluindo o gênero *Guarea*, somado aos bons resultados de atividade biológica apresentados pela partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* nos motivaram a realizar seu estudo fitoquímico.

Toda a metodologia empregada foi inicialmente desenvolvida com a finalidade de se obter frações menos complexas a partir de uma separação com a utilização da menor quantidade de solventes orgânicos possível, uma vez que as frações obtidas seriam encaminhadas para testes de atividade biológica cujos modelos são bastante susceptíveis a solventes não aquosos. A avaliação dos constituintes presentes em cada fração ao longo de toda metodologia utilizada foi realizada através de sucessivas CCD devidamente reveladas com os reagentes cromogênicos NP/PEG e orcinol sulfúrico.

4.2 Obtenção do extrato bruto

O extrato bruto foi obtido por maceração a frio por 2 semanas com solução de MeOH: H₂O (8:2). Este extrato foi concentrado, ressuspendido em água e submetido à partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de

polaridade: diclorometano, acetato de etila e butanol. O resíduo aquoso remanescente foi liofilizado. Os rendimentos do extrato bruto bem como das partições em relação ao material vegetal seco estão na tabela 1.

Folhas secas	Extrato bruto seco	Rendimento
600g	32g	5,4%
Partições		
Diclorometano		2,2%
Acetato de etila		0,08%
Butanol		1%
Resíduo aquoso		1,7%

Tabela 1 - Rendimentos do extrato bruto e partições em relação ao material vegetal seco.

4.3 Análise do potencial inibitório das partições de *Guarea macrophylla* frente à enzima Na⁺K⁺ ATPase

As partições em diclorometano, butanol e o resíduo aquoso foram submetidas ao teste de atividade inibidora da enzima Na⁺K⁺ ATPase. No gráfico abaixo está representada a atividade da enzima na presença de ouabaína (inibidor da enzima)

e na presença das partições na concentração final de 1,5mg/mL . Podemos observar que a atividade da enzima foi diminuída em mais de 50% pela partição butanólica.

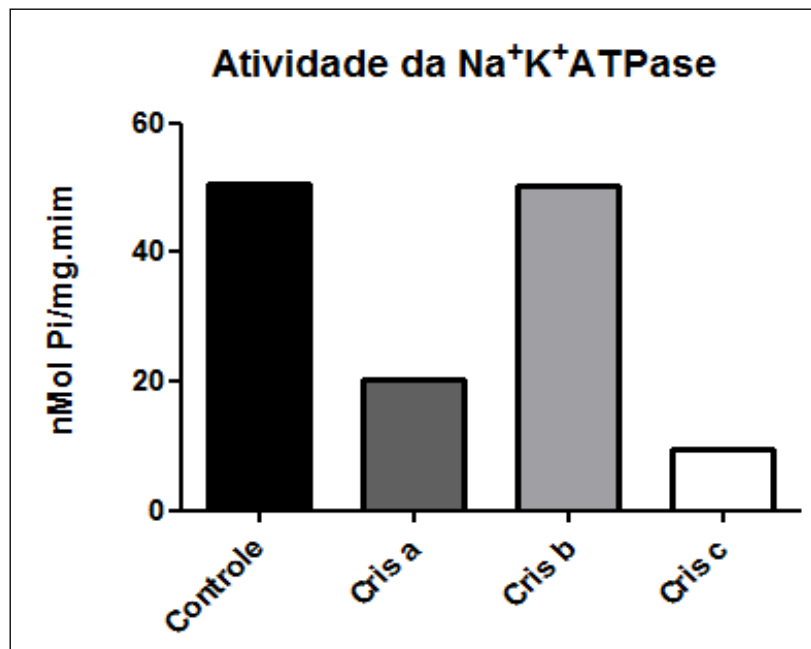


Figura 17: atividade inibitória das partições butanólica (cris a), em diclorometano (cris b) e resíduo aquoso (cris c).

A inibição apresentada pelo resíduo aquoso foi desconsiderada uma vez que ela apresentou menor resultado que o branco utilizado no teste.

4.3.1 Análise do potencial inibitório das frações da partição butanólica frente à enzima Na⁺K⁺ ATPase

Em virtude da boa atividade inibitória apresentada pela partição butanólica foi realizado novo ensaio, desta vez foram utilizadas além da partição, duas frações oriundas de processos cromatográficos, uma oriunda da coluna XAD-

2 (FR Cris 1) contendo derivados do ácido cafêico e flavonóides e outra, com maior quantidade de flavonóides, oriunda do fracionamento em coluna Sephadex LH- 20 (Figura 18).

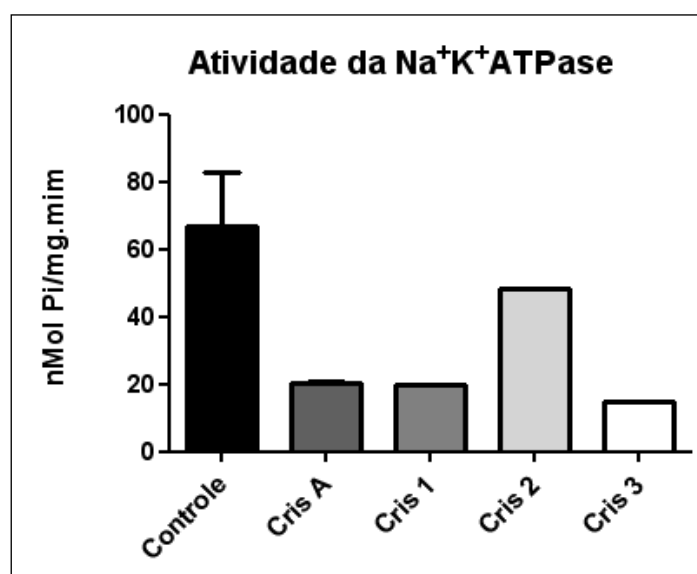


Figura 18: atividade inibitória das frações: cris A e cris 1 (partição butanólica), cris 2 (oriunda da coluna XAD-2), cris 3 (oriunda da coluna em Sephadex LH-20).

Todas as frações obtiveram bons resultados, sendo que a fração oriunda da coluna Sephadex LH-20, com maior concentração de flavonóides, foi a que apresentou melhor potencial inibitório, com cerca de 70% de inibição em relação ao controle. Sendo assim esta foi fracionada para isolamento dos seus constituintes ativos.

Sabe-se que a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é uma proteína integral de membrana que transporta ativamente Na^+ para o exterior e K^+ para o interior da célula através da hidrólise do ATP. Esta enzima apresenta as conformações E1 e E2 durante seu ciclo

catalítico, sendo que E1 apresenta maior afinidade por Na^+ e E2 por K^+ . Este transporte de íons através da membrana é essencial para a manutenção das características eletrofisiológicas da célula, além de mediar respostas de proliferação e crescimento celular (Corrêa, 2009).

Estudos realizados por Hirano e col., (1989), apontam flavonas como inibidores potenciais da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ de rins de cães. No entanto, o mecanismo de inibição dos flavonóides parece não se relacionar com aquele exercido pelos glicosídeos cardiotônicos. A enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é especificamente inibida pela ouabaína em virtude de sua ligação com a forma E2, sendo assim há alteração da afinidade da bomba pelo K^+ (Corrêa, 2009). Já os flavonóides presentes no chá verde garantiram a inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ de rins de porco, por favorecer a conformação E1, que apresenta maior afinidade por Na^+ e ATP (Ochiai, 2009).

Concentrações nanomolares de ouabaína endógena levam ao aumento dos níveis de Na^+ e Ca^{+2} intracelulares e conseqüente aumento na contração cardíaca e melhoria na eficiência de bombeamento de sangue pelo coração, devido ao melhor enchimento ventricular. (Ochiai, 2009). Sendo assim, pode-se supor que a utilização de chá verde e outros produtos contendo flavonóides poderiam apresentar benefícios à saúde semelhantes aqueles da ouabaína endógena, via inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$.

4.4 Avaliação da atividade anti-tumoral frente à linhagem de células de câncer de pulmão H640.

Estudos têm relacionado substâncias com atividade inibidora sobre a enzima Na⁺K⁺ATPase com atividade anti-tumoral (Mijatovic, 2007). Sabendo do potencial dos flavonóides como inibidores enzimáticos, e em virtude do excelente potencial inibitório frente a enzima Na⁺K⁺ATPase, a partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* foi submetida ao teste preliminar de atividade tóxica frente à linhagem de células de câncer de pulmão H640 (Figura 19).

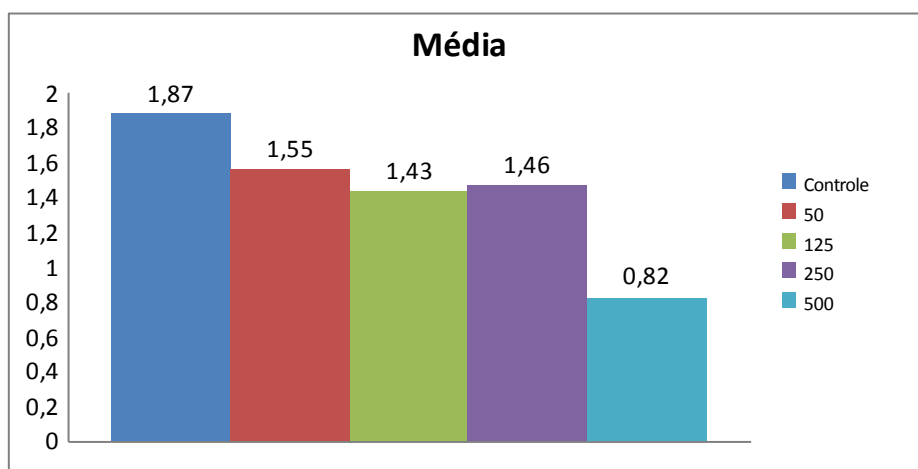


Figura 19: Atividade da partição butanólica em diversas concentrações frente à linhagem de células de câncer de pulmão H640.

A partição butanólica apresentou atividade tóxica dose-dependente no teste com células de câncer de pulmão H640.

Sabe-se que em estágios iniciais da tumorigênese ocorrem mudanças na atividade da Na⁺K⁺ATPase. Alguns trabalhos mostram que ocorre super expressão da isoforma $\alpha 1$ desta enzima em casos de câncer de cérebro, pulmão e pele. Neste contexto, substâncias com potencial de inibir a Na⁺K⁺ATPase podem ser importantes para a terapia de alguns tipos de câncer (Garcia, 2009).

Portanto, em virtude dos resultados apresentados estudos posteriores serão realizados com células humanas normais para verificar sua viabilidade, além de testes com as frações purificadas e flavonóides puros.

4.5 Avaliação da atividade antioxidante da partição butanólica pelo método do DPPH

A atividade antioxidante da partição butanólica das folhas de *G. macrophylla* foi analisada pelo método de DPPH. Com base nos resultados obtidos foi possível montar uma curva de atividade, e a concentração efetiva para obtenção de metade da resposta máxima, (EC_{50}) foi calculada. O desempenho da partição butanólica encontra-se abaixo (tabela 2).

[] $\mu\text{g/ml}$	AA(%)
5	2,23
10	3,47
25	12,12
50	50,72
125	93,32
250	94,35
500	93,70
750	93,32

Tabela 2: Atividade antioxidante da partição butanólica

Como pode ser observado, a partir da concentração de 125 µg/ml não houve aumento significativo da atividade antioxidante da partição butanólica, sendo que na concentração de 55,6 µg/ml há 50% da atividade máxima. Apesar da presença de flavonóides na partição butanólica de *G. macrophylla*, sua atividade antioxidante pode ser considerada baixa quando comparada a atividade do extrato padronizado do Ginkgo biloba EGb 761® (EC₅₀ 39µg/ml).

De maneira geral, flavonóides isolados apresentam alto potencial antioxidante. No entanto, estudos recentes utilizando o método do radical DPPH mostraram que determinadas misturas de flavonóides podem apresentar efeitos antagônicos, ou seja, dependendo do tipo de flavonóide na mistura pode ocorrer diminuição ou aumento de sua atividade antioxidante. Esta interação flavonóide-flavonóide é relevante quando levamos em consideração a análise da atividade antioxidante de extratos enriquecidos com flavonóides (Hidalgo, 2010). Além disso, a presença de flavonóides glicosilados no extrato, pode ocasionar redução da capacidade antioxidante dos mesmos (Pietta, 2000).

4.6 Estudo fitoquímico da partição butanólica

A metodologia utilizada para o fracionamento da partição butanólica foi direcionada para a obtenção de uma fração rica em flavonóides e posterior purificação destas. Desse modo optou-se pela realização de cromatografia em colunas XAD-2 e Sephadex LH-20.

A identificação dos flavonóides foi realizada segundo análise por CCD (Figura 21) com utilização do reagente NP/PEG, indicado para derivados fenólicos

como flavonóides e ácidos/ésteres fenilpropanoídicos, além da observação das placas sob luz UV a 254nm antes da revelação com NP/ PEG, e a 365 nm após revelação (Figura 22). Além disso, o espectro de UV de alguns sinais do cromatograma da partição butanólica nos forneceu informações sobre as agliconas presentes, visto que a banda I do espectro de UV dos flavonóides é diferente para cada tipo de aglicona, por exemplo, para flavonas a banda I ocorre entre 304-350nm, já para flavonóis, esta mesma banda se apresenta entre 352-385nm (Figuras 23a, b e c).



Figura 21: CCD positiva para flavonóides, revelada com NP/ PEG.

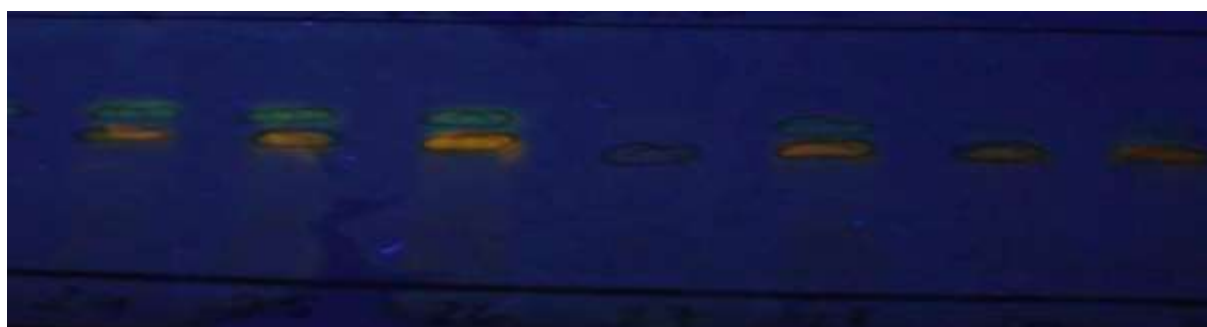
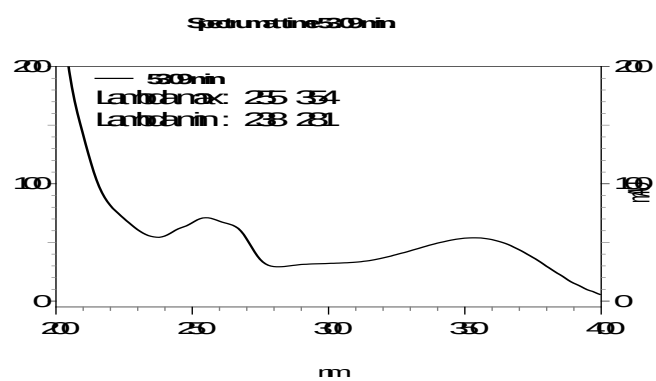
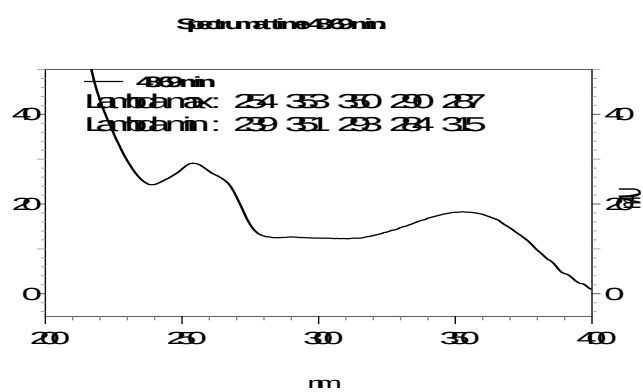
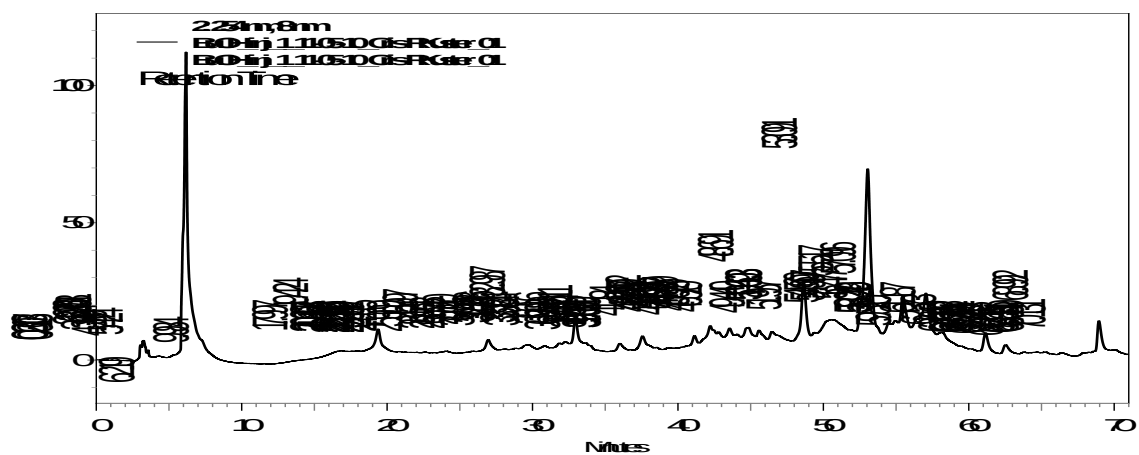


Figura 22: CCD positiva para flavonóides, observada sob luz UV à 365nm.



A partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* apresenta além de flavonóides, grandes quantidades de derivados do ácido caféico, estes podem ser observados pela análise das CCD, visto que apresentam coloração azul bem característica sob luz UV a 365 nm, após revelação com NP/PEG (Figura 24). Frações enriquecidas com fenilpropanóides foram obtidas após a realização de cromatografia em coluna Sephadex LH-20 em 100% de acetona como fase móvel, estas foram analisadas por CLAE/UV (Figura 25a,b, c e d).

Figura 24: CCD positiva para fenilpropanóides revelada com NP/ PEG sob luz UV a 365 nm.

Figura 25a: Cromatograma de fração rica em fenilpropanóides.

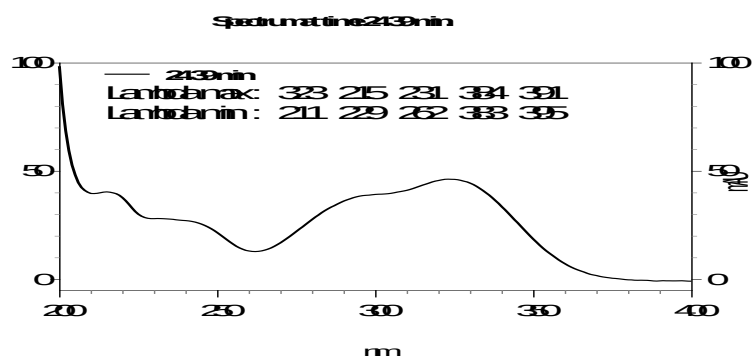


Figura 25b: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção: 24,39min.

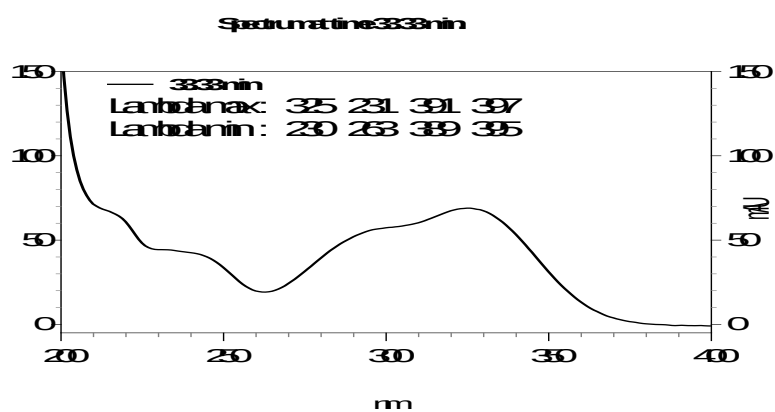


Figura 25c: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção:33,33min.

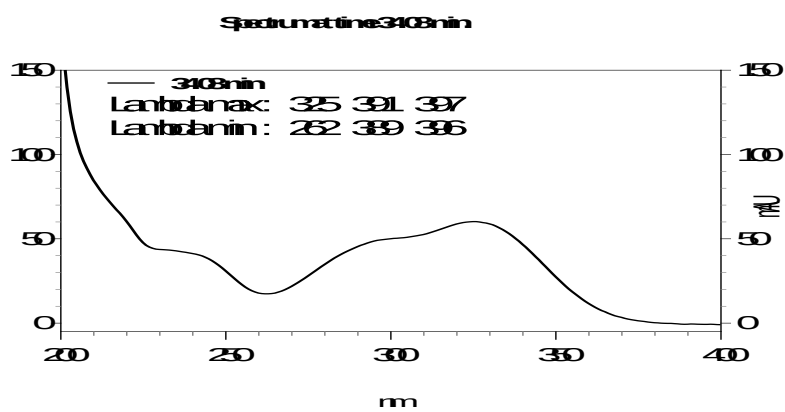


Figura 25d: Espectro de UV de derivado do ácido caféico, tempo de retenção: 34,08min.

As absorções no ultravioleta (240, 290 e 323 nm), conforme mostradas nas figuras acima indicam fortemente a presença de derivados do ácido caféico na partição butanólica de *Guarea macrophylla* (Carrasco-Pancorbo, 2006).

É digno de nota que a partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla* apresenta como constituintes majoritários dois sólidos brancos que precipitam de grande parte das frações obtidas. Um destes sólidos é insolúvel em solventes orgânicos, porém é prontamente solúvel em solução de HCl 10%. Ao ser dissolvido, este sólido libera grande quantidade de gás, o que sugere a presença de um carbonato. O outro sólido em questão não foi solúvel em solução de HCl 10%, porém é fracamente solúvel em DMSO. A realização do espectro de RMN ^1H desta amostra nos forneceu indícios da presença de um derivado terpenoídico, em virtude da quantidade de sinais que aparecem na região de alto campo magnético do espectro (Figuras 26 e 27).

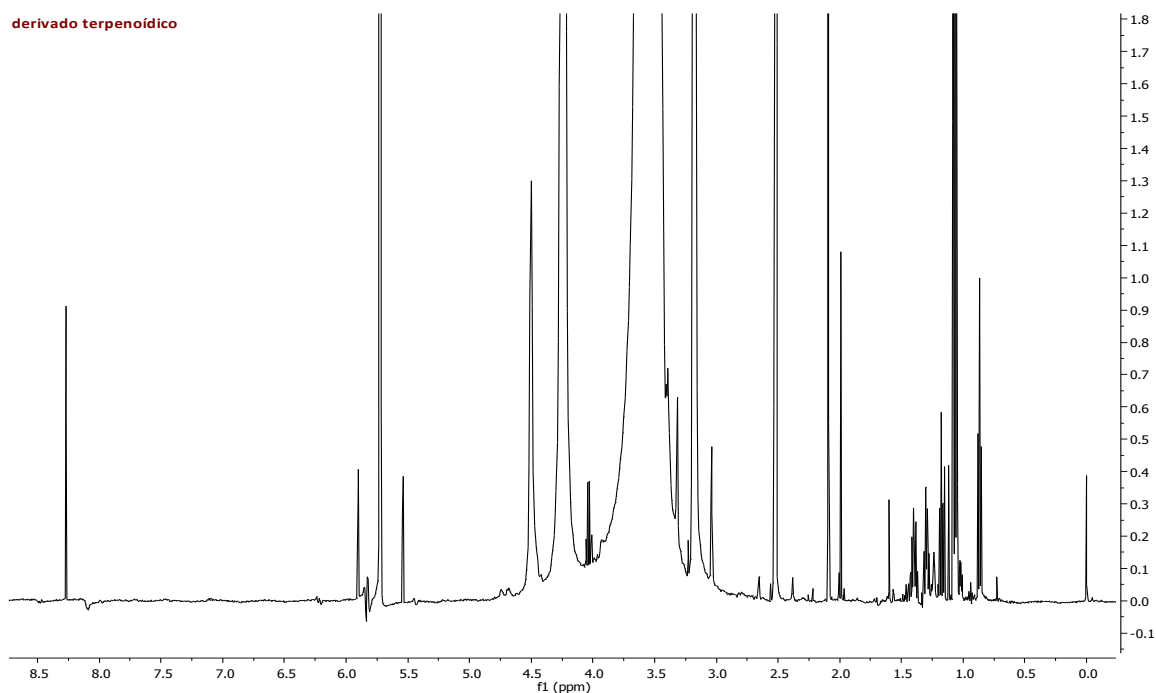


Figura 26: RMN ^1H da amostra CP 500 a 400 MHz (dms_6), provável derivado terpenoídico.

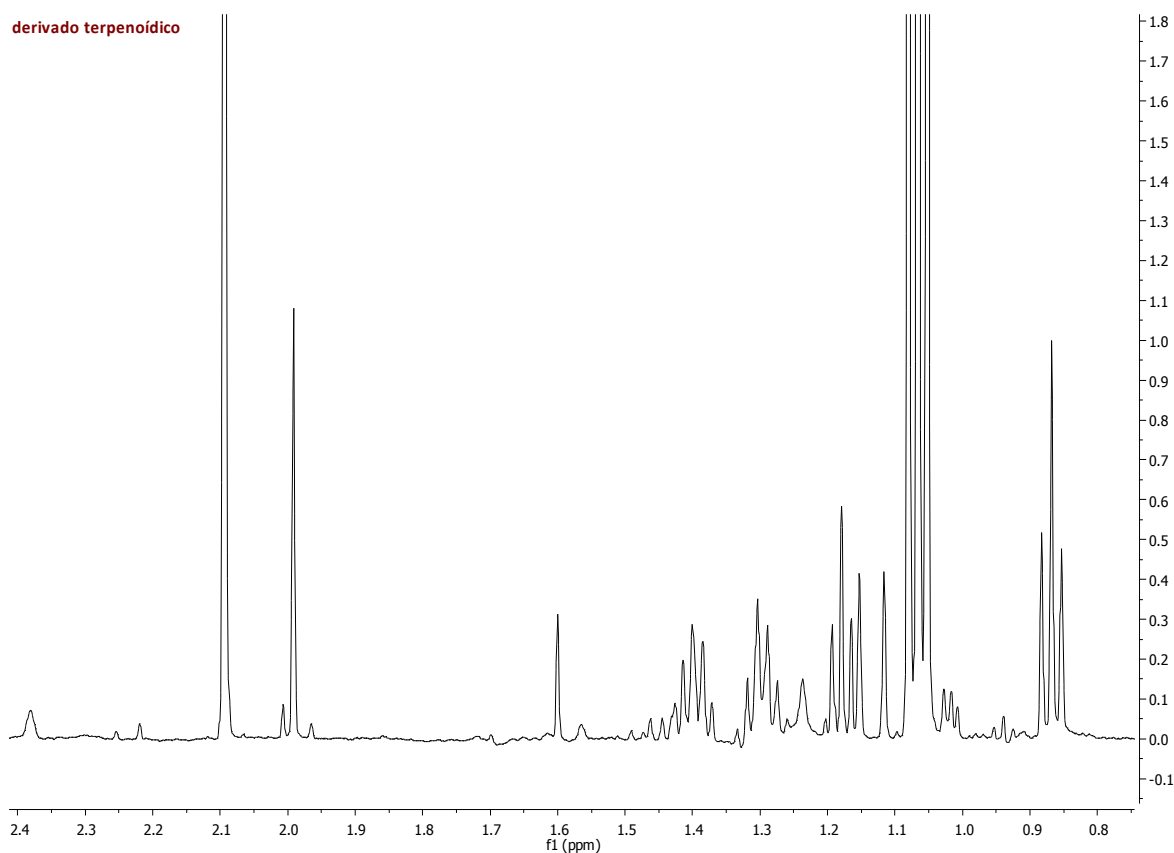


Figura 27: RMN ^1H da amostra CP 500 a 400 MHz (dmsO_6), provável derivado terpenoídico (ampliação).

4.7 Elucidação Estrutural de Flavonóides, amostra CP2010

No espectro de RMN ^1H da amostra CP2010 ($\text{DMSO } d_6$) (Figuras 28a, b, c, d e e) observamos um duplete em 6,39 ppm (que se apresenta como um sinal simples largo) ($J = 1,71 \text{ Hz}$, acoplamento meta) típico de H-8 e, em 6,17 ppm, um sinal com as mesmas características do anterior ($J = 1,71 \text{ Hz}$) típico de H-6. O sinal em 6,83 ppm ($J = 8,91 \text{ Hz}$, acoplamento orto), é característico de H-5', assim como o sinal em 6,81 ppm ($J = 8,47 \text{ Hz}$). A presença dos sinais em 6,81 e 6,83 ppm, bem como os sinais em 6,39 e 6,17 ppm e a presença do sinal característico de OH

quelatogênica em 12,59 ppm, típico de OH em C-5, indicam fortemente a presença de dois núcleos flavonoídicos típicos do flavonol quercetina (Rodrigues, 2009).

A presença dos sinais de H anoméricos em 5,43 ppm (duplete largo com $J=7,58\text{Hz}$) e 5,34 ppm (duplete com $J=7,70\text{ Hz}$) indicam a presença de duas unidades glicídicas.

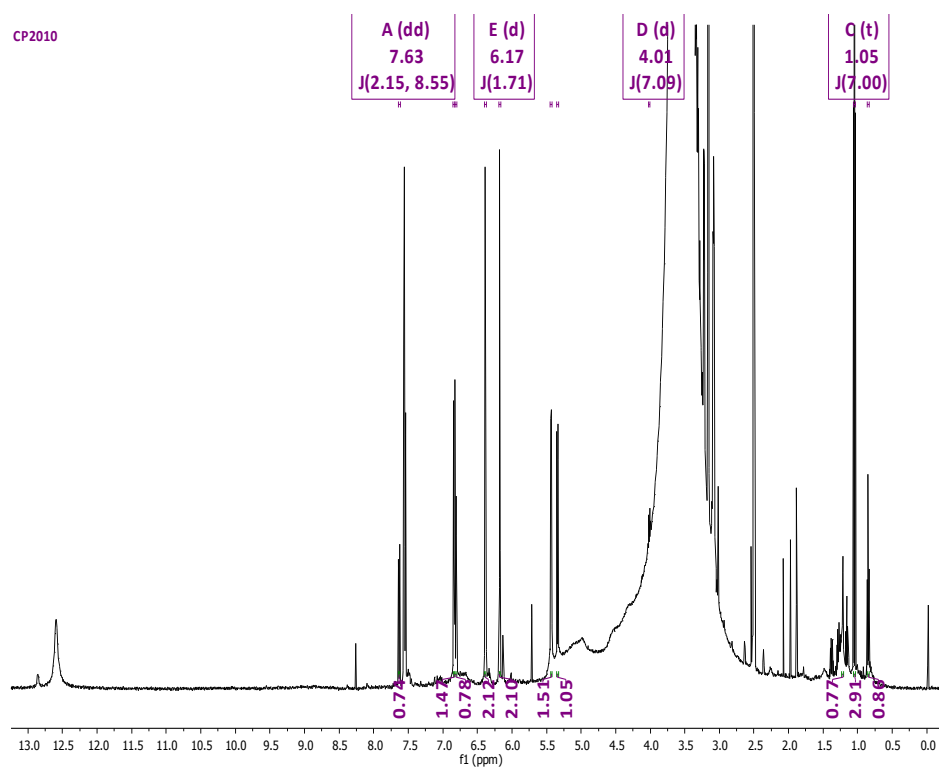


Figura 28a: Espectro de RMN ^1H (400MHz) da amostra CP2010 (dms d_6).

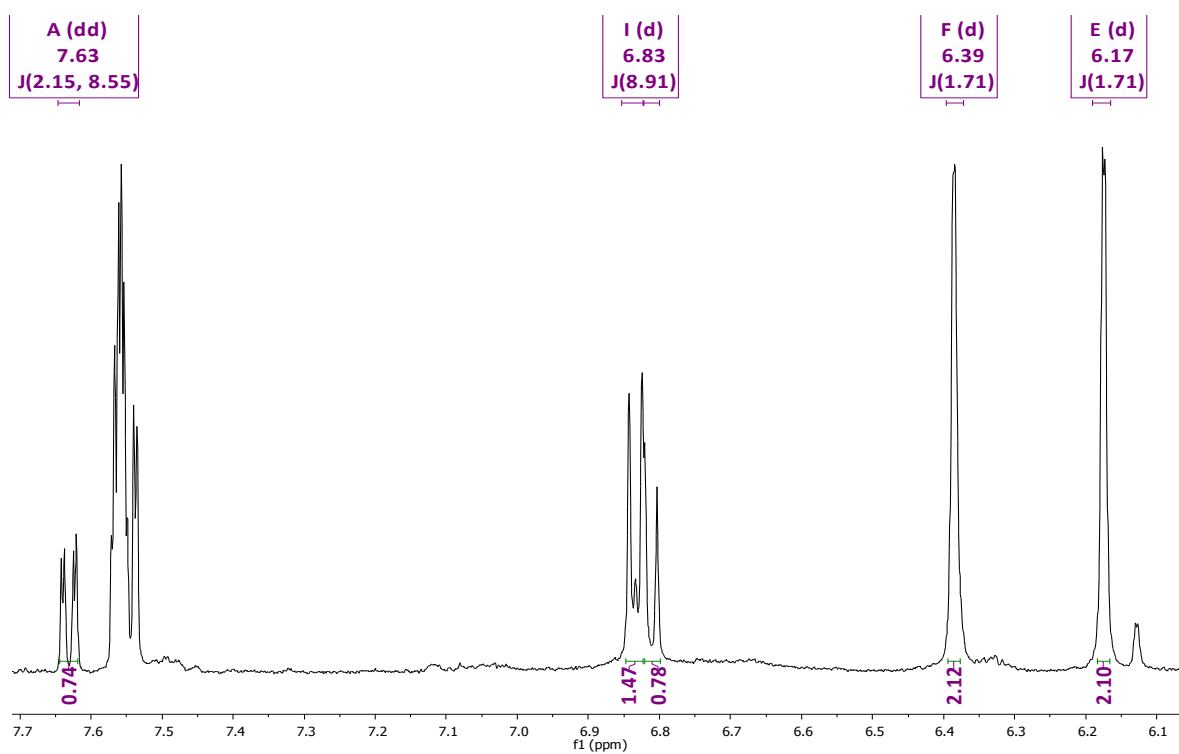


Figura 28b: Espectro de RMN ^1H (400MHz) da amostra CP2010 (dmsod6), região aromática (ampliação).

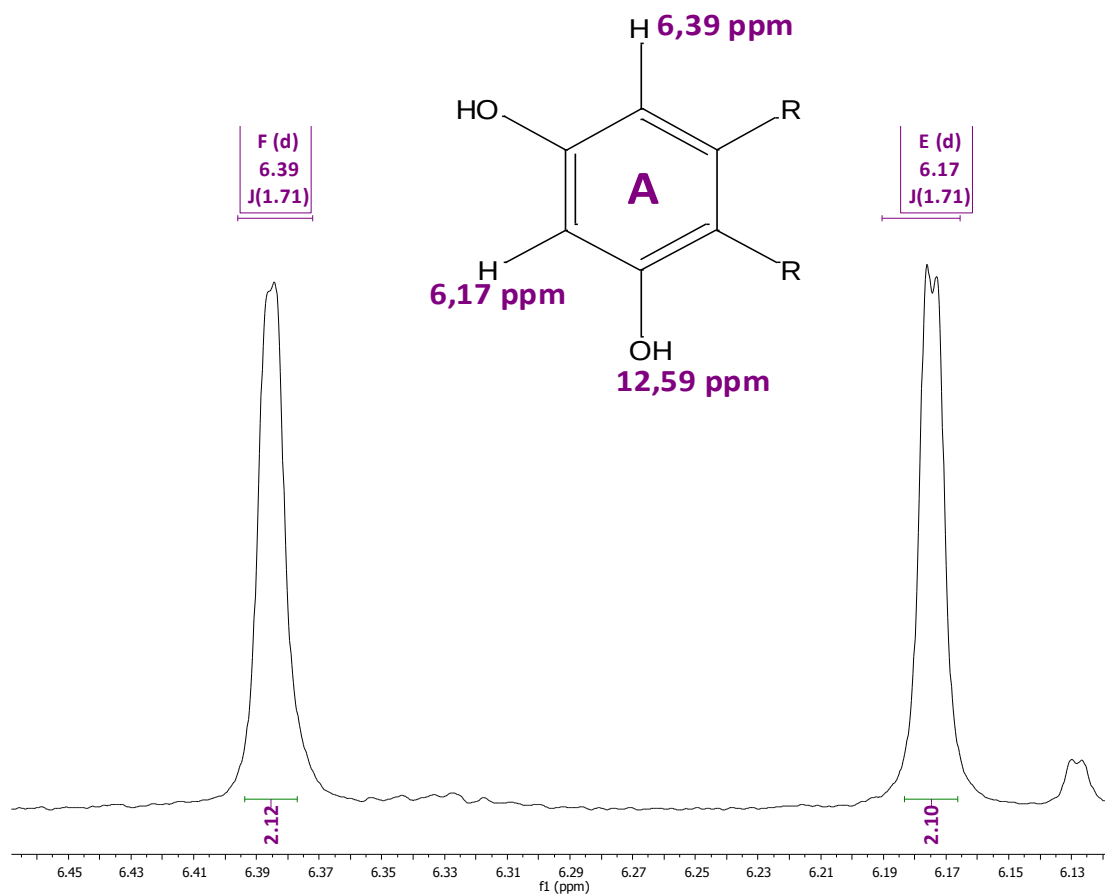


Figura 28c: Espectro de RMN ^1H (400MHz) da amostra CP2010(dmsod6), H-6 e H-8 [anel A] (ampliação)

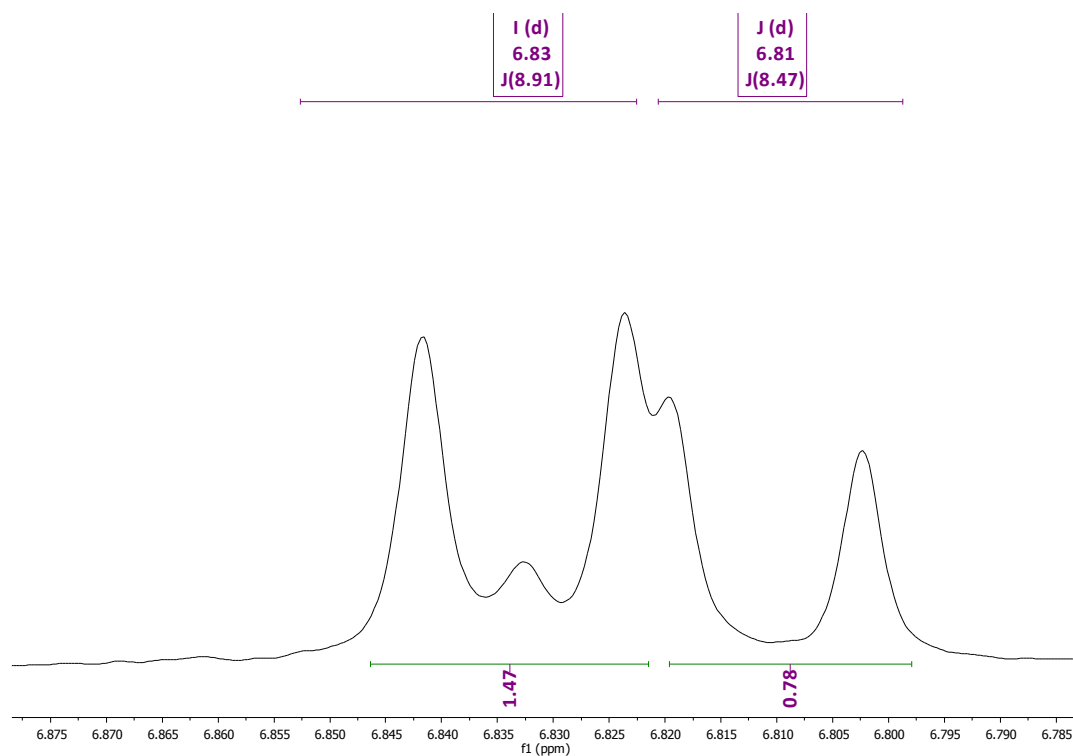


Figura 28d: Espectro de RMN ^1H (400MHz) da amostra CP2010 (dmso_6), H-5' (ampliação).

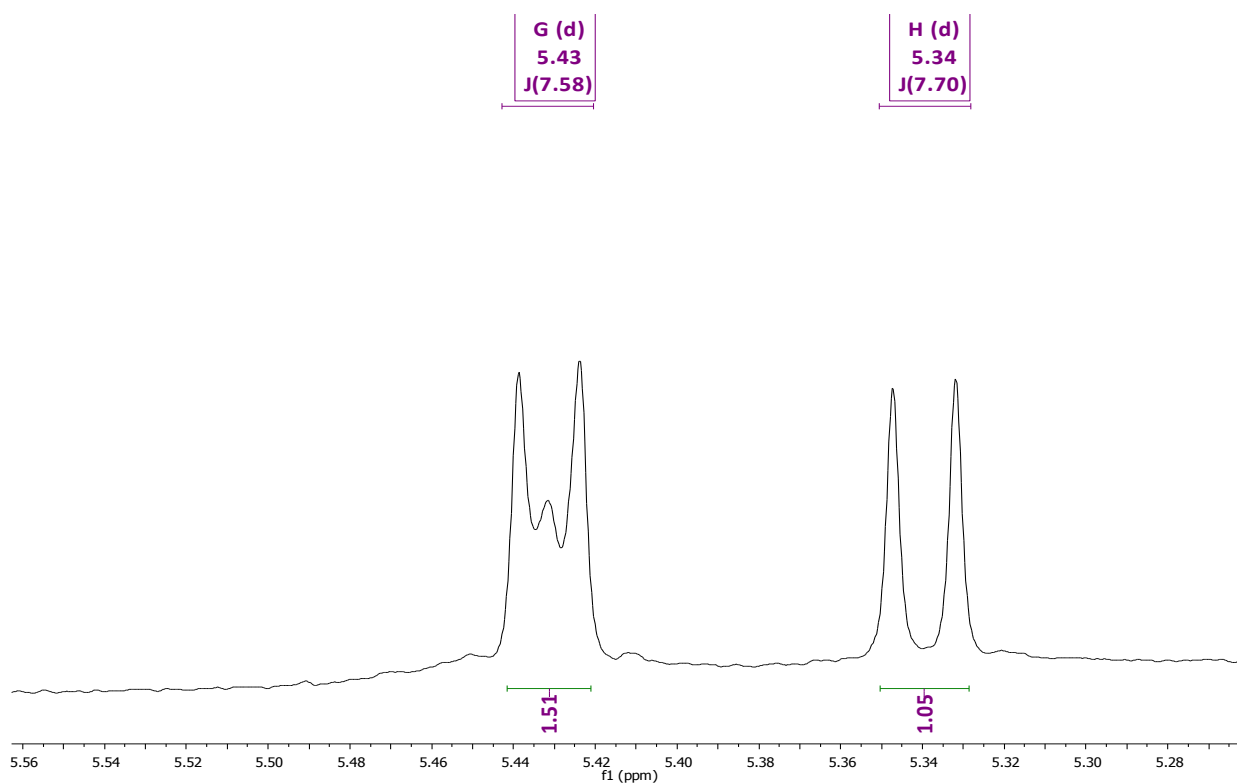


Figura 28e: Espectro de RMN ^1H (400MHz) da amostra CP2010(dmso_6), H anoméricos (ampliação).

4.7.1 Elucidação estrutural CP2010, técnicas bidimensionais.

Para a identificação de carbonos diretamente ligados à hidrogênios ($1J_{CH}$) foi realizado o experimento de correlação heteronuclear HSQC editado, onde é possível diferenciar os hidrogênios metilênicos dos demais (Figuras 29a, b, c, d e e). A partir desta análise foi possível a atribuição dos valores de deslocamentos químicos de carbono.

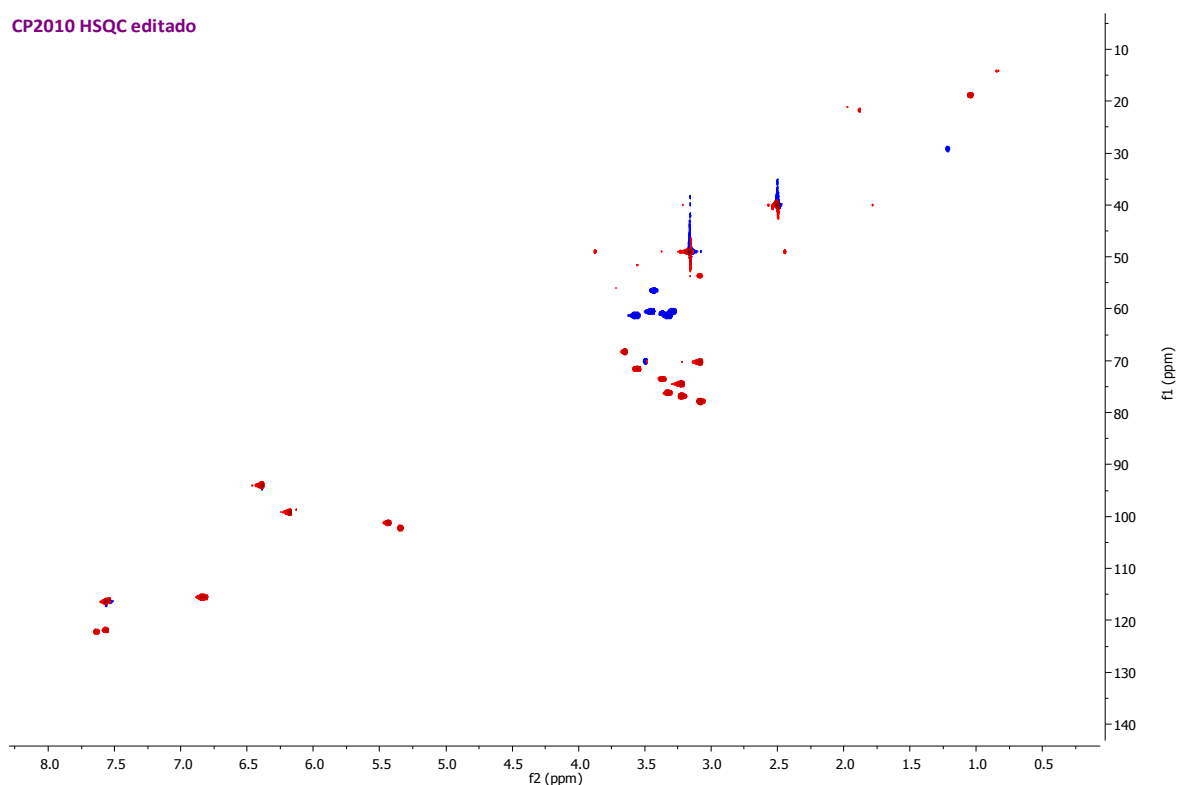


Figura 29a: Mapa de correlação HSQC editado para CP2010 (DMSO₆).

CP2010 HSQC editado

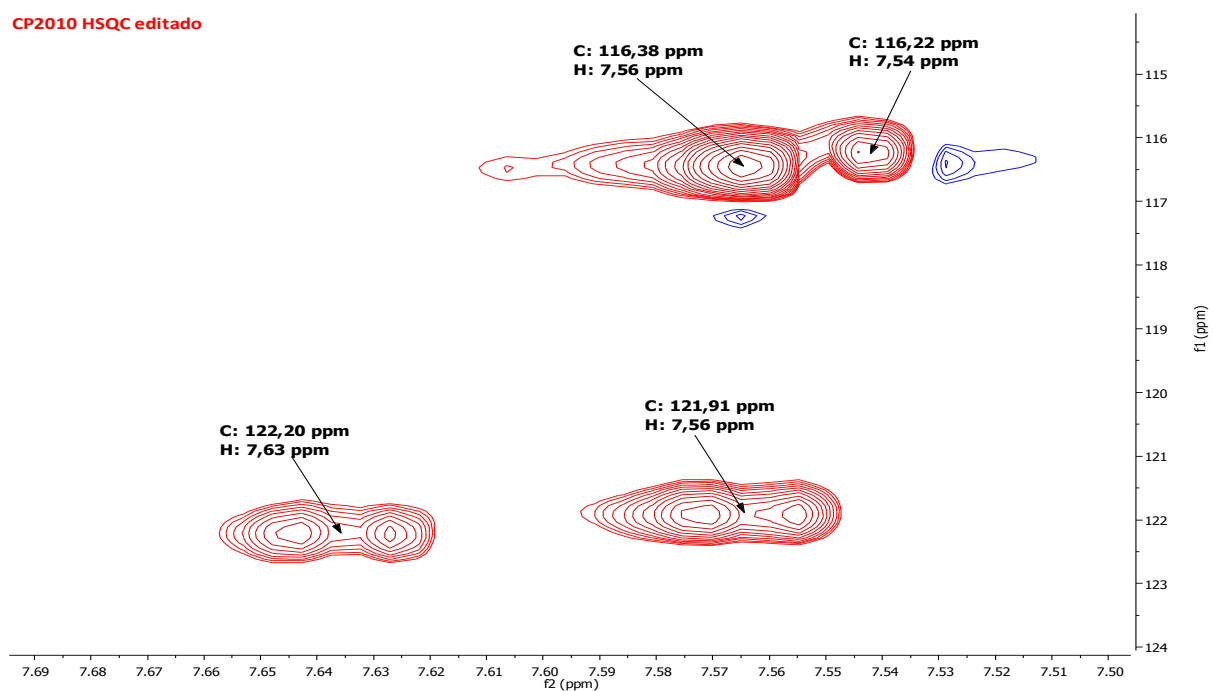


Figura 29b: Mapa de correlação HSQC editado (dmso₆), região aromática (ampliação).

CP2010 HSQC editado

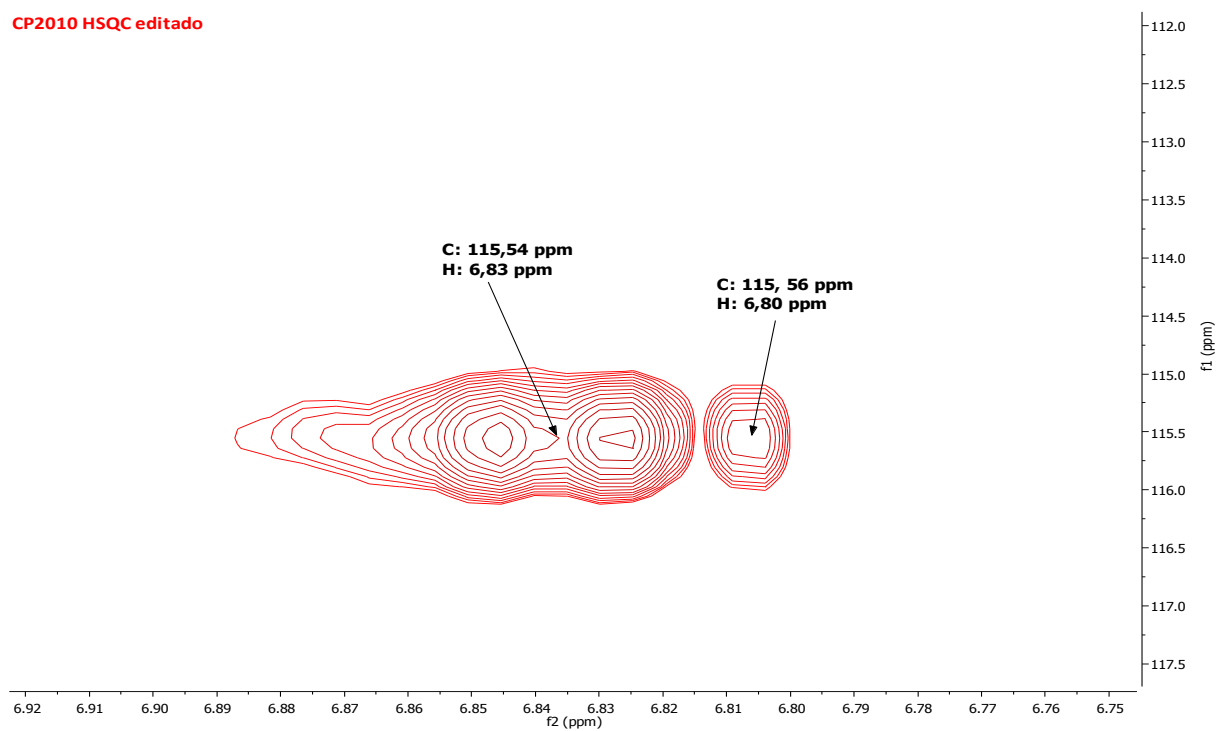


Figura 29c: Mapa de correlação HSQC editado (dmso₆), H-5' (ampliação).

CP2010 HSQC editado

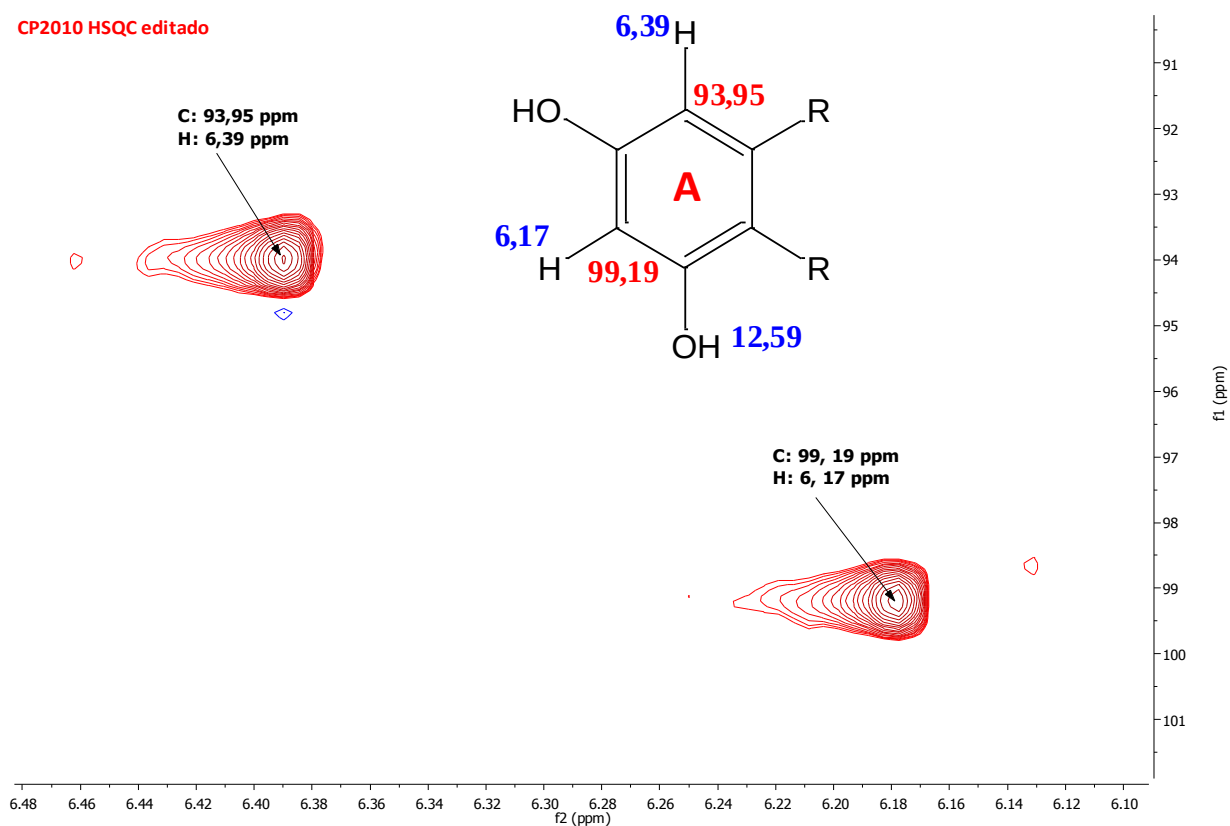


Figura 29d: Mapa de correlação HSQC editado (dmso₆), H-6 e H-8 [anel A] (ampliação).

CP2010 HSQC editado

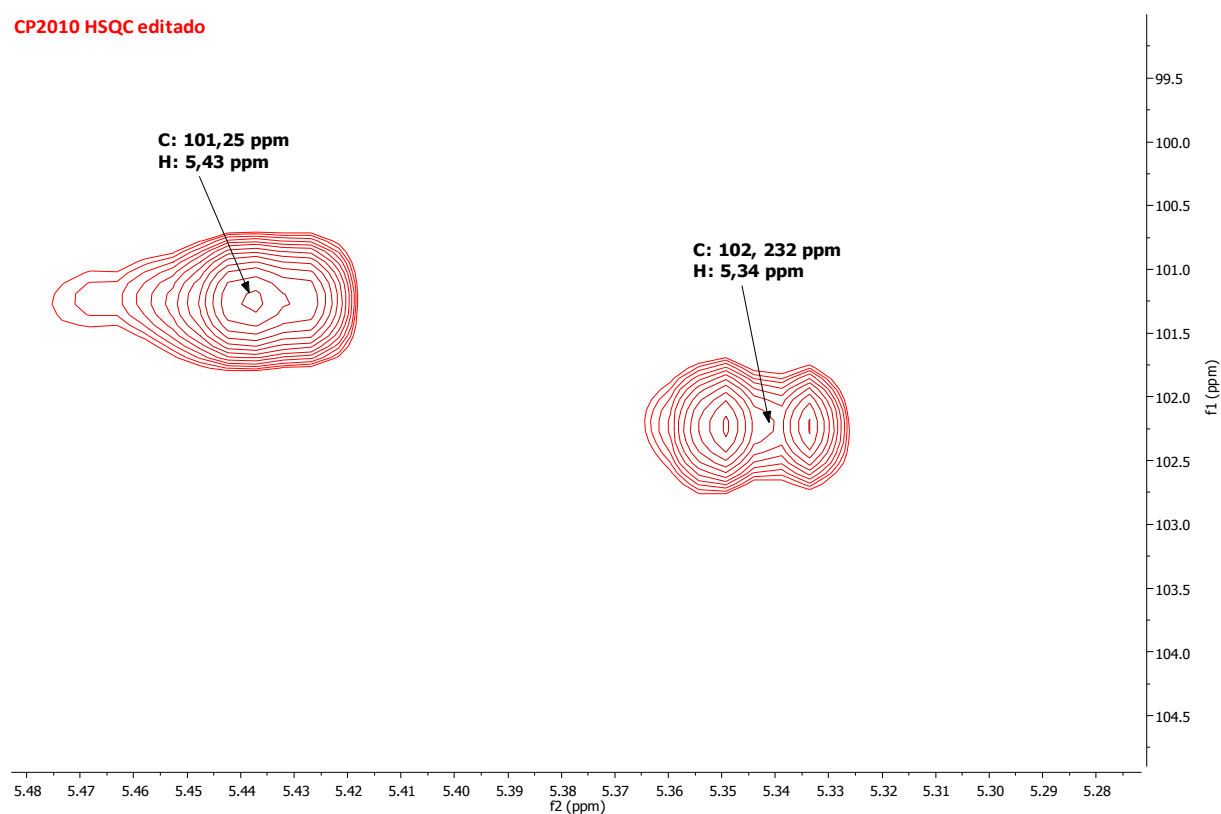


Figura 29e: Mapa de correlação HSQC editado (dmso₆), H- anoméricos (ampliação).

4.7.2 Elucidação estrutural CP2010, HMBC

Com as informações de correlações heteronucleares a longa distância, HMBC (Figura 30a e b) em conjunto aos dados acima descritos, foi possível confirmar que as duas agliconas presentes na mistura correspondem à quercetina e ambas estão glicosiladas na posição C-3. Os valores de deslocamentos químicos obtidos para os glicosídeos coincidem com aqueles descritos na literatura para a glucose e a galactose (Rodrigues, 2009).

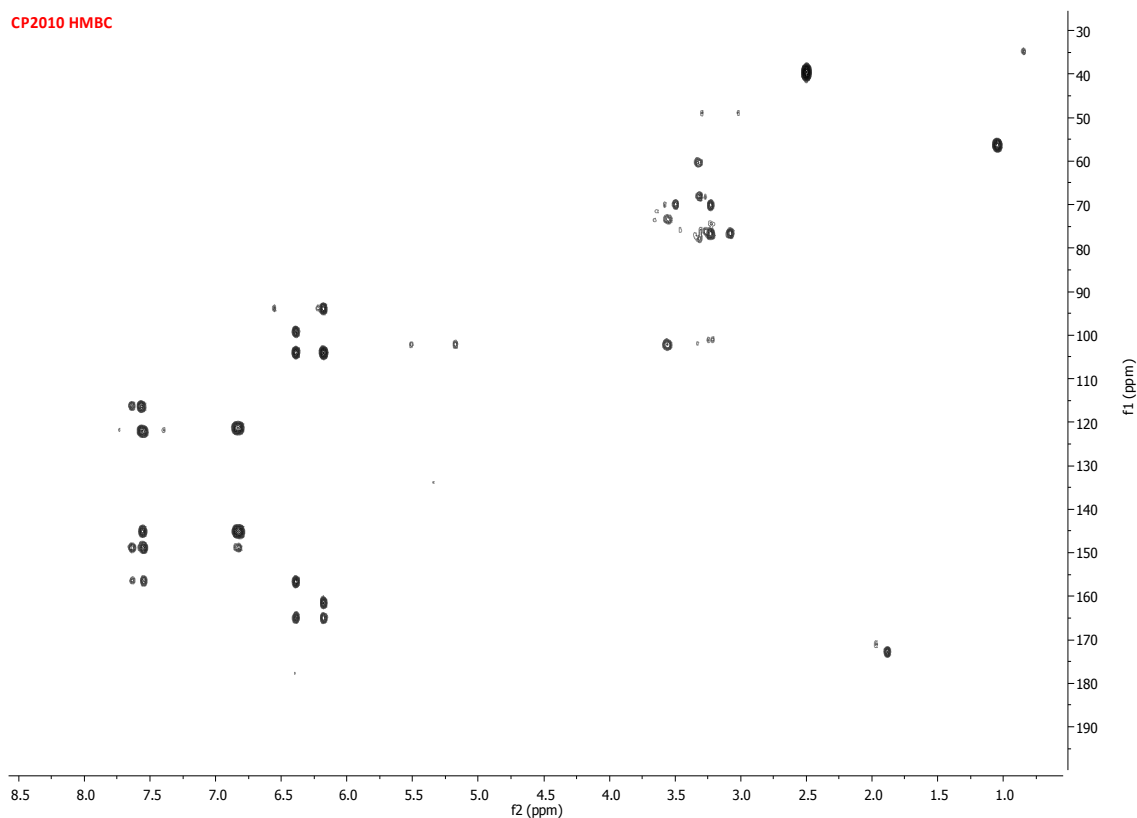


Figura 30a: Mapa de correlação HMBC, CP 2010 (400 MHz/dmso₆).

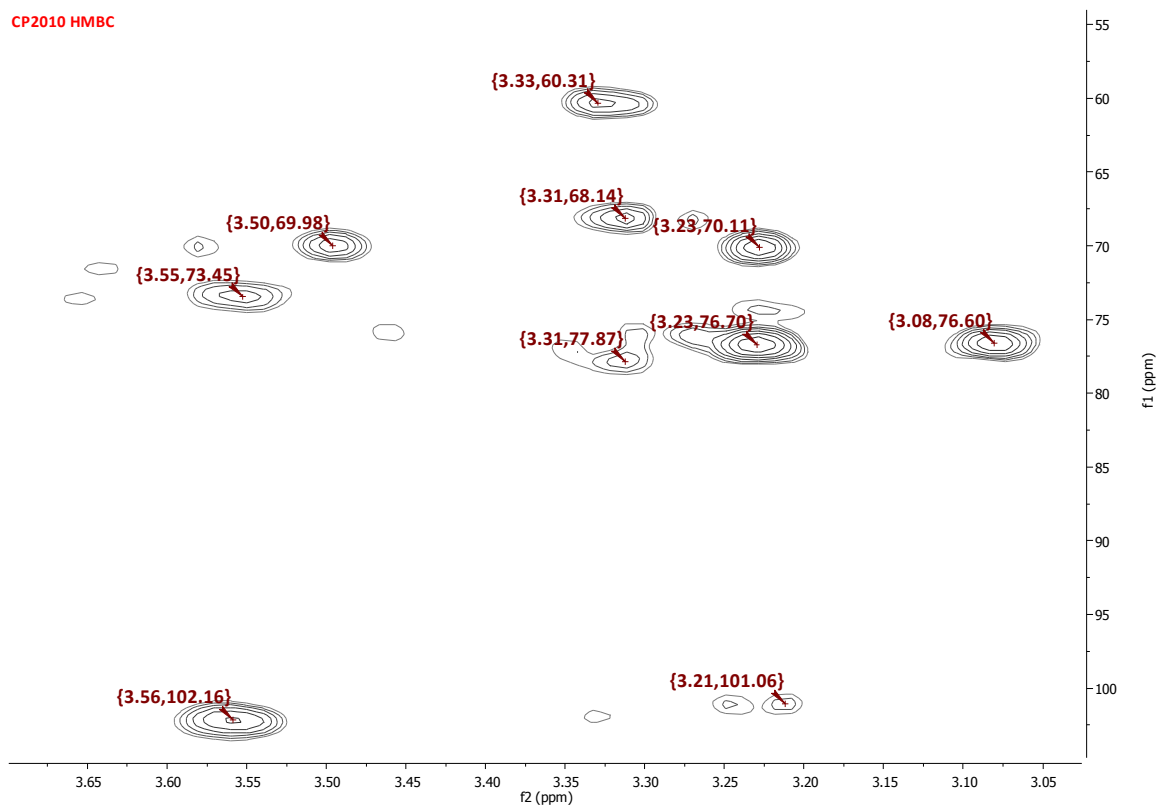


Figura 30b: Mapa de correlação HMBC para CP2010 (dmsod6), região glicosídica (ampliação).

Com base nas informações obtidas com os espectros de HSQC, HMBC e RMN-1H foi possível fazer as seguintes correlações (Figuras 31a, b, c, d e e).

Anel A dos Flavonóides (Hiperina e Isoquercitrina):

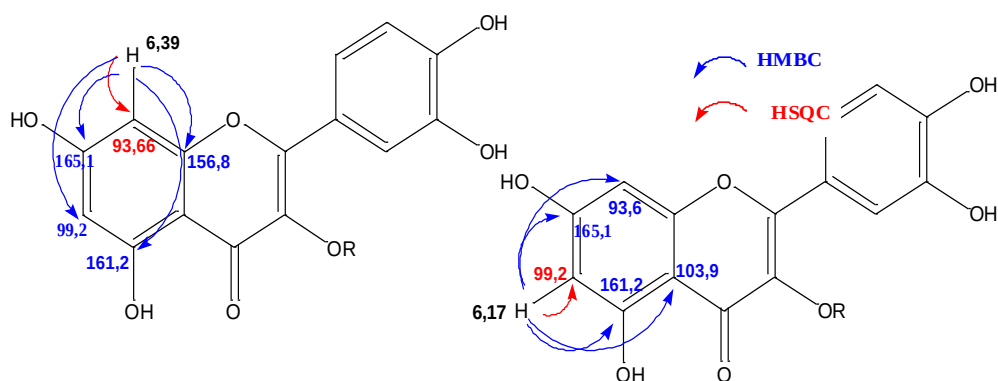


Figura 31a: Correlações de HSQC e HMBC para o anel A dos flavonóides, onde R= galactose para Hiperina e R= glucose para Isoquercitrina.

Anel B do Flavonóide (Hiperina):

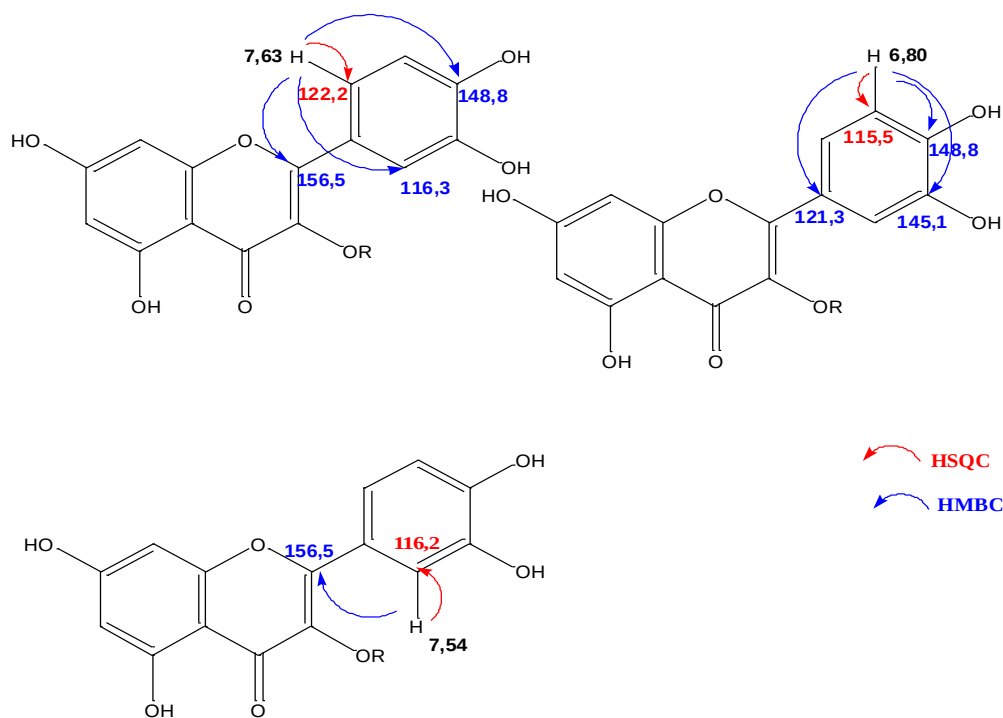


Figura 31b: Correlações de HSQC e HMBC para o anel B da Hiperina, onde R: galactose

Anel B do Flavonóide (Isoquercitrina):

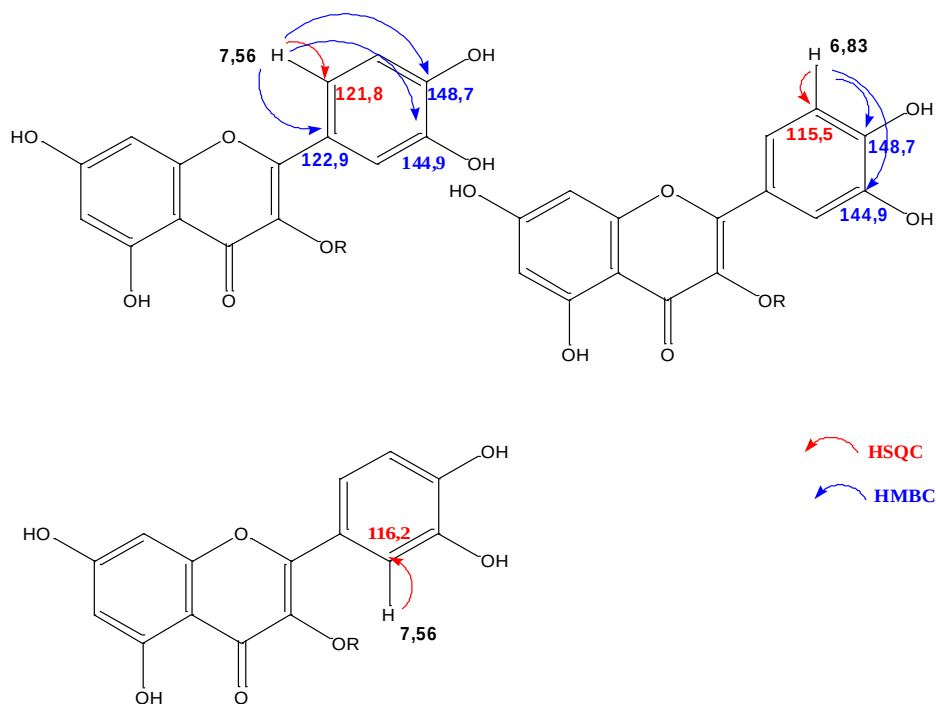


Figura 31c: Correlações de HSQC e HMBC para o anel B da Isoquercitrina, onde R: glucose.

Glicosilação (galactose): Hiperina

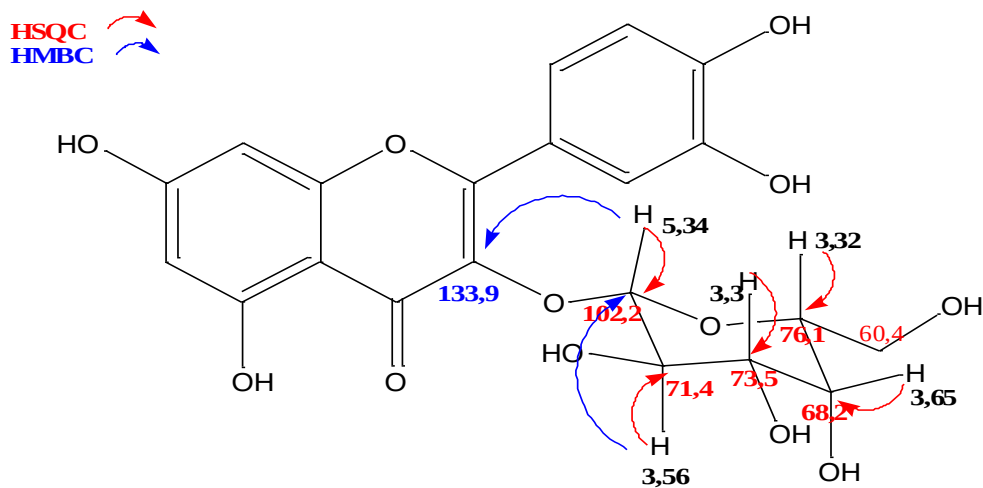


Figura 31d: Correlações de HSQC e HMBC para a galactose

Glucose

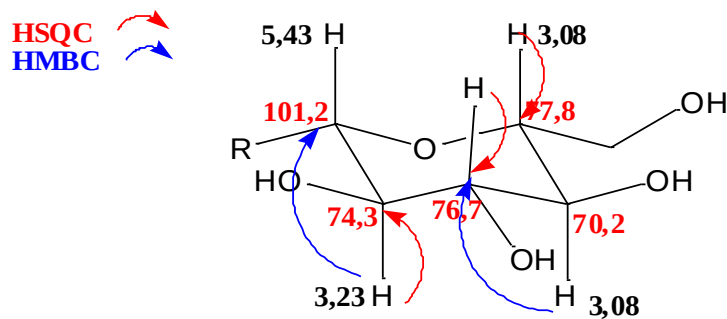


Figura 31e: Correlações de HSQC e HMBC para a glucose

Não foi possível observar no HMBC correlação da glucose com a aglicona, por este motivo foi realizado o experimento de NOESY.

4.7.3 Elucidação estrutural CP2010, NOESY

Para a confirmação da presença dos glucose na posição C-3 do flavonóide foi realizado o experimento de correlação via acoplamento espacial, NOESY. Esta análise é bastante usada para refinamentos conformacionais da estrutura proposta. Essencialmente, esse experimento correlaciona os hidrogênios que se apresentam com proximidade no espaço (Figuras 32 e 33).

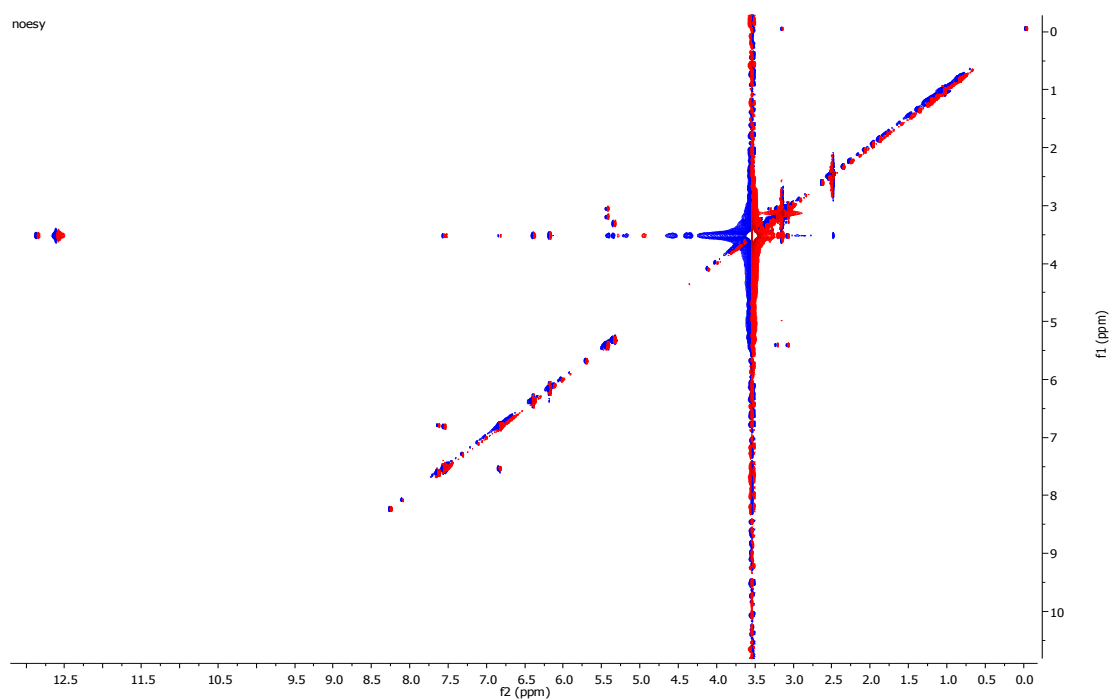


Figura 32: Espectro de correlação espacial, NOESY para CP2010.

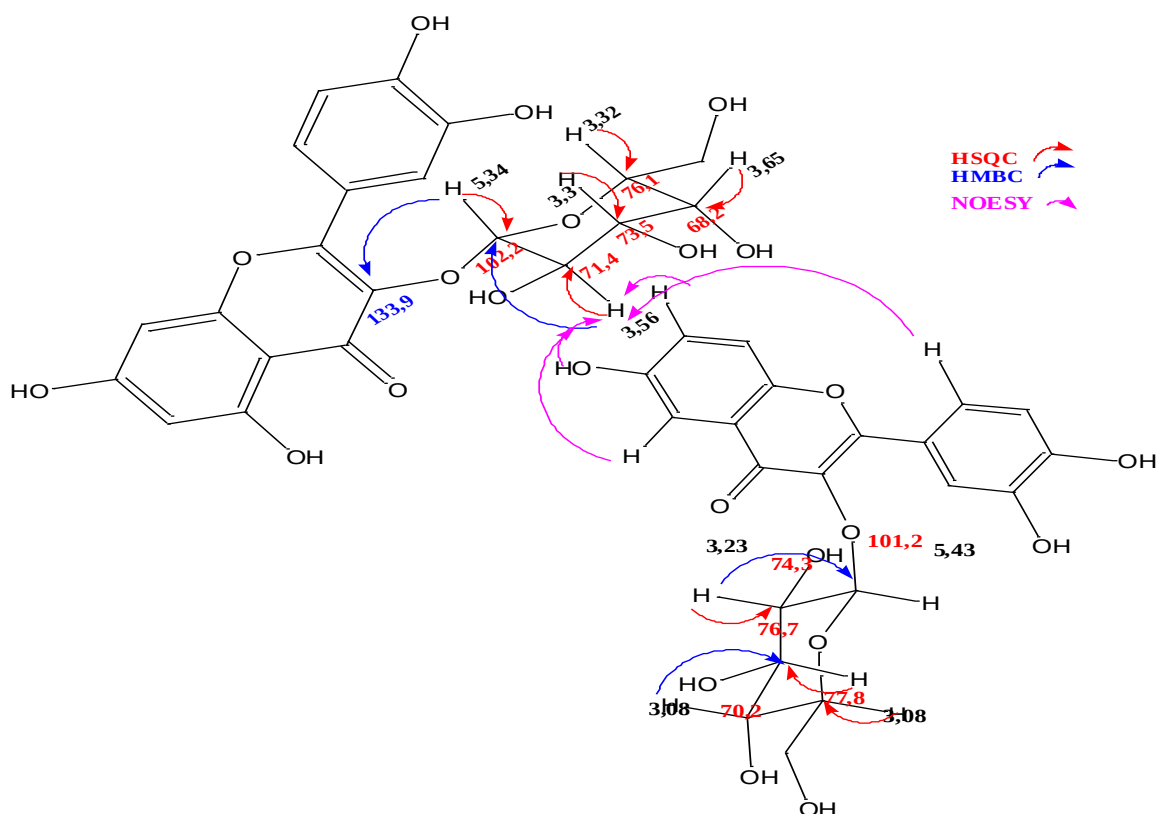


Figura 33: Correlações de NOESY para CP2010.

Como a amostra CP2010 corresponde a uma mistura de flavonóides, foi possível observar correlações de NOE entre os hidrogênios da aglicona de um flavonóide com o açúcar do outro flavonóide (Figura 33). Esta é a explicação mais coerente, uma vez que se as correlações NOESY observadas correspondessem a apenas um flavonóide, a glicosilação deveria estar na posição C-7 (Zheng, 2006), próxima aos hidrogênios H-6 e H-8. No entanto, os valores de deslocamentos químicos são característicos de flavonóides glicosilados na posição C-3 (Rodrigues, 2009). Quando ocorre glicosilação em C-7, os deslocamentos químicos de H-6 e H-8 são sensivelmente deslocados para frequências mais altas de ressonância. Desta maneira, o espectro NOESY de CP2010 foi capaz de indicar um possível

posicionamento conformacional entre a mistura dos dois flavonóides em solução de DMSO-d₆ (Zheng, 2006).

4.7.4 Isoquercitrina e Hiperina: CP2010

Através da análise dos espectros de RMN ¹H uni- e bidimensionais e comparação com os dados da literatura (Rodrigues, 2009) foi possível identificar na amostra CP2010 os flavonóides quercetina 3-O-β-D-glucopiranosídeo (isoquercitrina) (Figura 34) e quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina) (Figura 35).

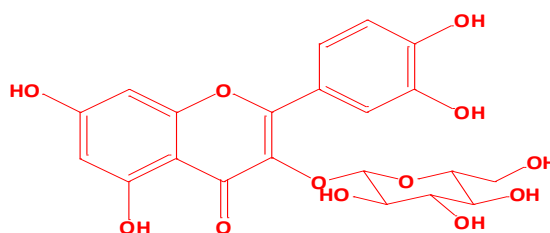


Figura 34: Quercetina 3-O-β-D-glucopiranosídeo (isoquercitrina).

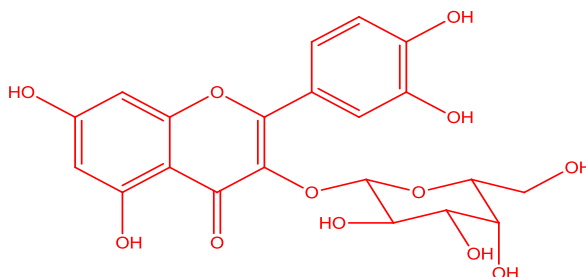


Figura 35: Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina).

4.8 Elucidação estrutural de flavonóides, espectro de UV (CP2013)

O espectro de UV da amostra CP2013 (Figura 36) é característico do flavonol kaempferol, isto porque a banda I, referente ao anel B do flavonóide, se apresenta com λ_{max} entre 362 e 365 nm. Se a aglicona em questão fosse a quercetina, o valor referente a banda I seria próximo a 380nm, pois com o aumento do grau de hidroxilação do núcleo flavonoídico há o aumento do efeito batocrômico e conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (Simões, 1999).

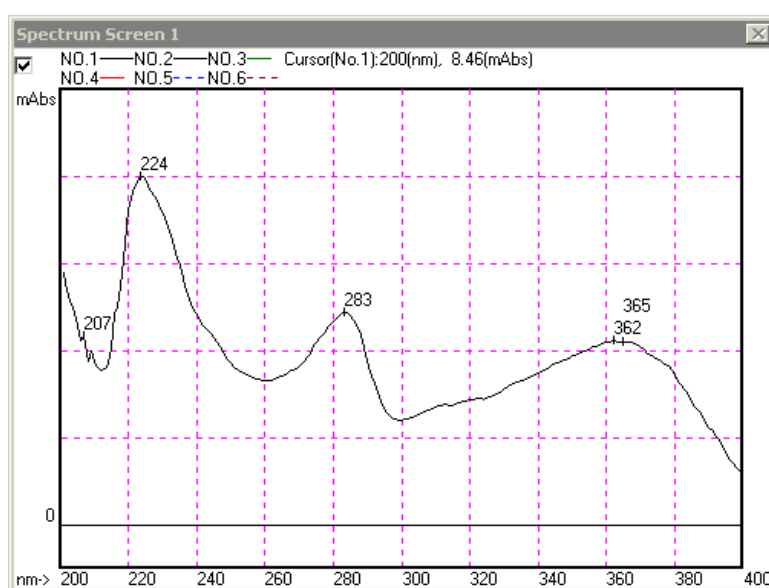


Figura36: Espectro de UV característico do flavonol kaempferol.

4.8.1 Elucidação estrutural CP2013, RMN ^1H

Sabendo que amostra CP2013 apresenta o kaempferol como aglicona foi analisado seu espectro de RMN ^1H . Em função da presença de dois sinais em 12,12 e 12,48 ppm, relativos às hidroxilas fenólicas na posição C-5, pode-se supor que a amostra CP2013 apresenta 2 agliconas (Figura 37). Além disso, é possível observar um sinal em 7,85 ppm ($J = 8,73$ Hz, acoplamento orto) típico de H-2' e H-6', bem

como outro sinal com as mesmas características de anterior em 7,96ppm ($J = 8,80$ Hz, acoplamento orto) também relativos à H-2' e H-6' (Figura 38) (Victorie, 1988).

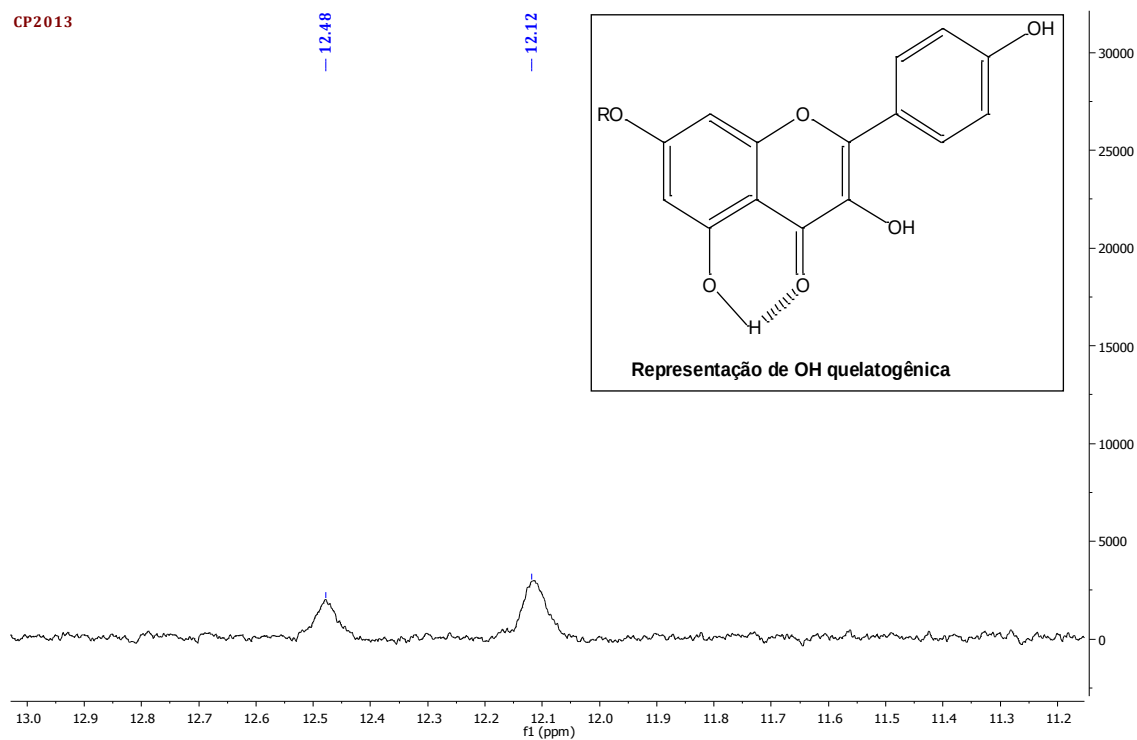


Figura 37: Espectro de RMN ^1H (600 MHz), sinais de hidroxilas em C-5 (ampliação).

CP2013

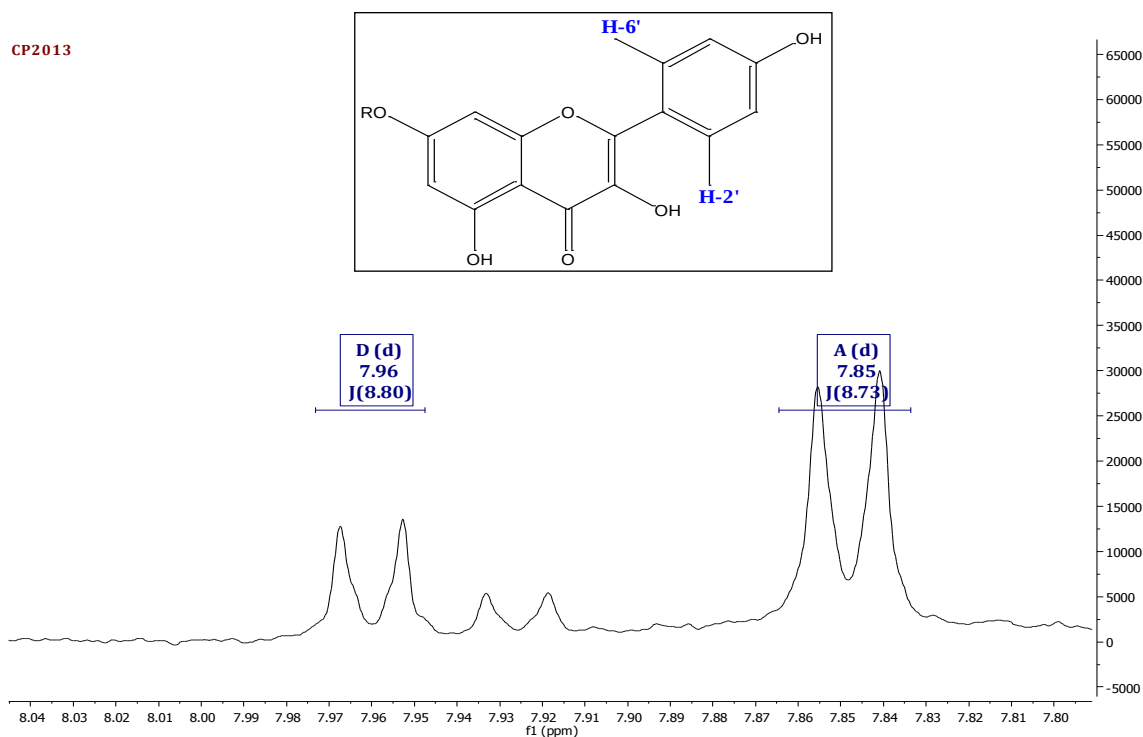


Figura 38: Espectro de RMN ^1H (600 MHz), sinais relativos a H-2' e H-6' para dois isômeros de kaempferol (ampliação).

4.8.2 Elucidação estrutural CP2013, COSY ^1H - ^1H

Através da análise do espectro de COSY ^1H - ^1H , (Figura 39) foi possível correlacionar o sinal em 7,93 ppm (H-6' e H-2') com o sinal em 6,75 ppm, típico de H-3' e H-5' do flavonol kaempferol. Além do sinal em 7,84 ppm (H-6' e H-2') com o sinal em 6,66 ppm (típico de H-3' e H-5') (Victorie, 1988).

COSY CP2013

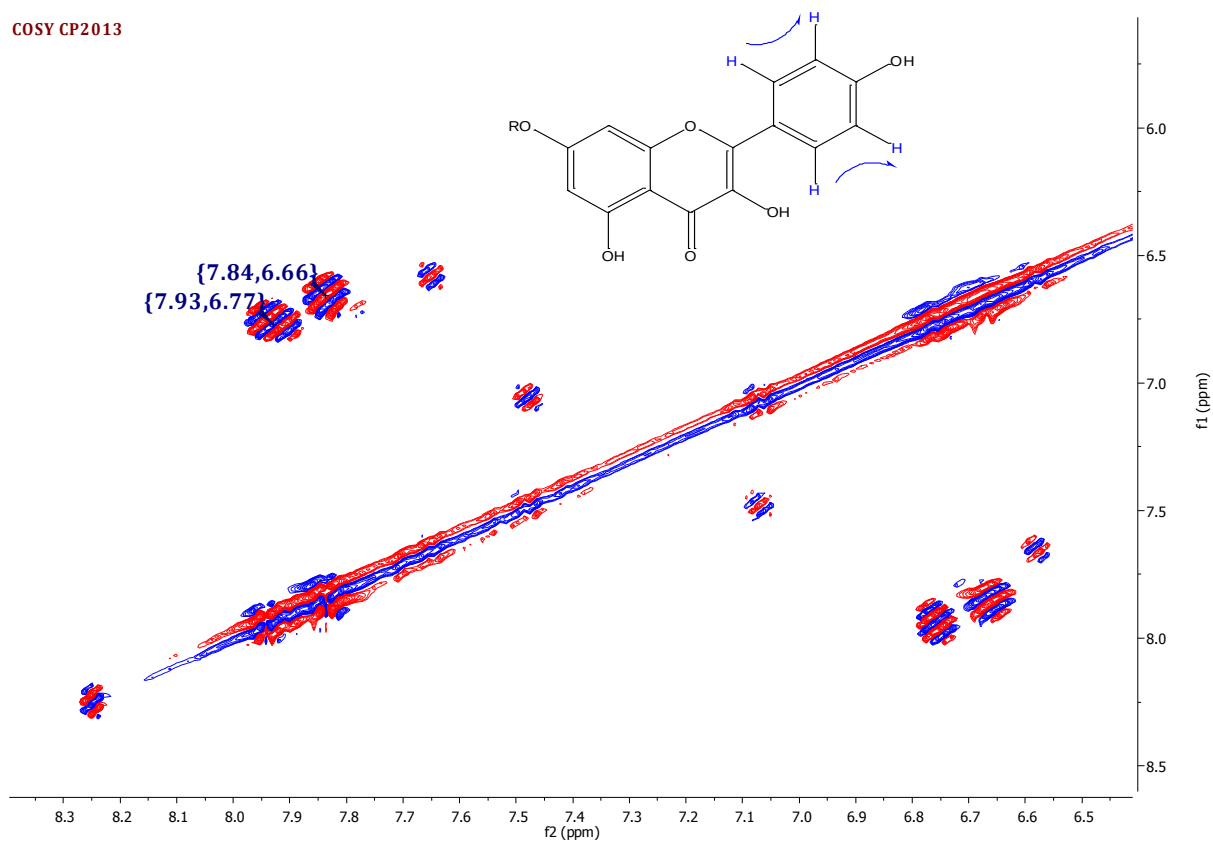


Figura 39: Mapa de correlação COSY para CP2013, anel B (ampliação).

4.8.3 Elucidação estrutural CP2013, HSQC

Para a identificação de carbonos diretamente ligados à hidrogênios (¹J_{CH}) foi realizado o experimento de correlação heteronuclear HSQC (Figura 40). A partir desta análise foi possível montar a seguinte tabela (tabela 3).

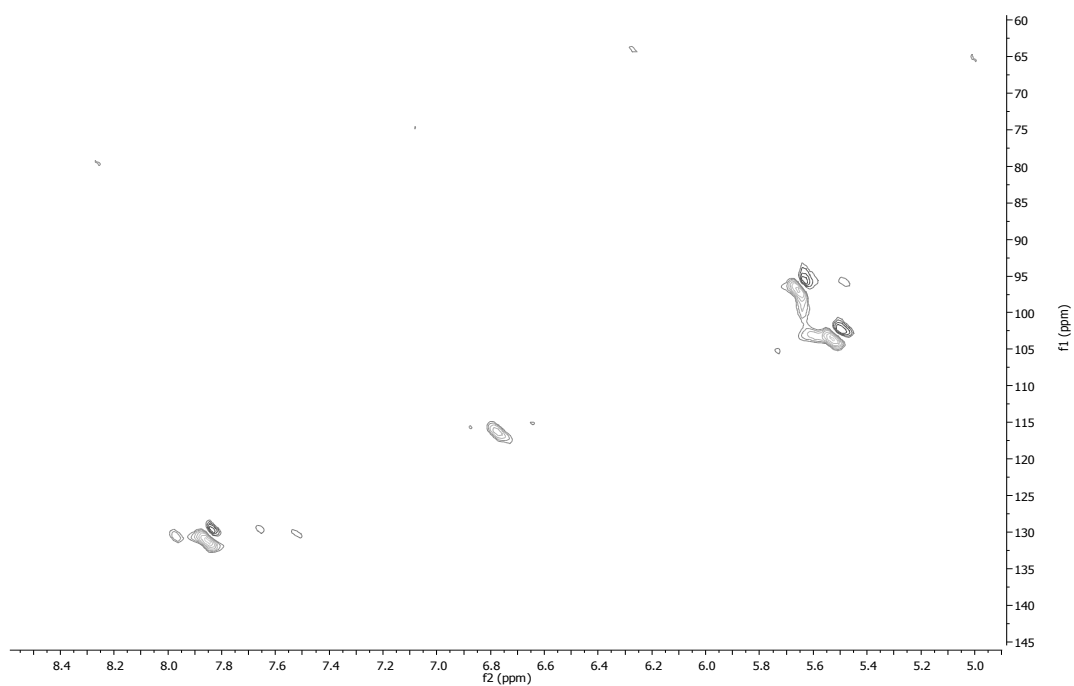


Figura 40: Mapa de correlação HSQC (600MHz), CP2013 (ampliação).

Tabela com as correlações obtidas no experimento de HSQC:

¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
7,96	130,52
7,85	131,13
6,78	116,27
6,65	115,10
5,66	96,87
5,53	103,40

Tabela 3 - deslocamentos químicos obtidos com o experimento de HSQC, amostra CP2013.

A partir das informações obtidas através dos espectros de HSQC, COSY e RMN ^1H , foi possível fazer os assinalamentos dos sinais para o anel B dos dois isômeros de kaempferol presentes na amostra CP2013 (Figura 41). Além disso, com base nos valores de deslocamentos químicos de carbono referentes aos dois hidrogênios anoméricos podemos afirmar que os glicosídeos presentes na amostra estão sob a forma O-glicosídica (Victorie, 1987).

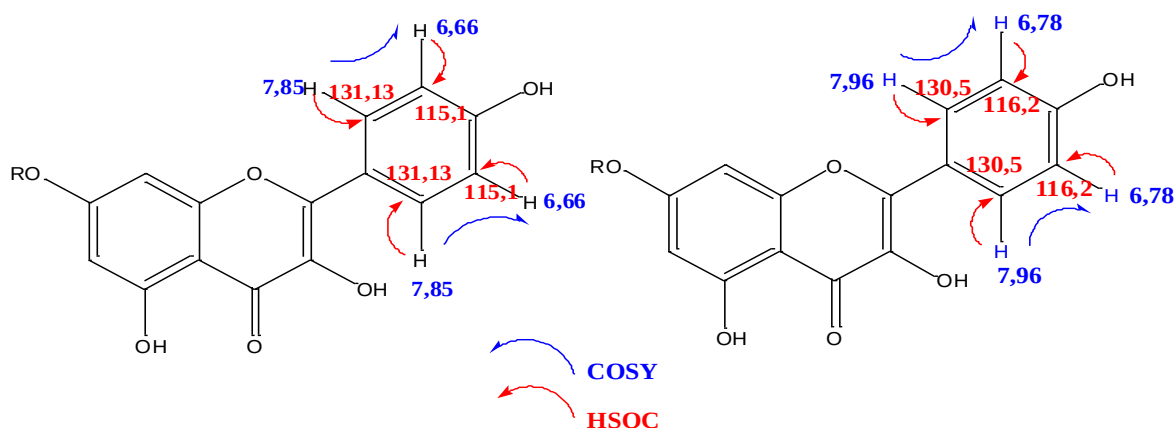


Figura 41: Assinalamentos referentes ao anel B para os dois núcleos flavonoídicos.

4.8.4 Elucidação Estrutural CP2013, HMBC

Com as informações obtidas pelo espectro de HMBC (Figura 42) foi possível fazer os assinalamentos referentes ao anel A das agliconas por meio das correlações apresentadas pelos hidrogênios anoméricos (tabela 4). Os dados de correlações heteronucleares associados ao espectro de UV obtido da amostra CP2013, nos permite afirmar também, que a glicosilação de ambos os flavonóides é em C-7 (Victorie, 1988) (Figuras 43a e b).

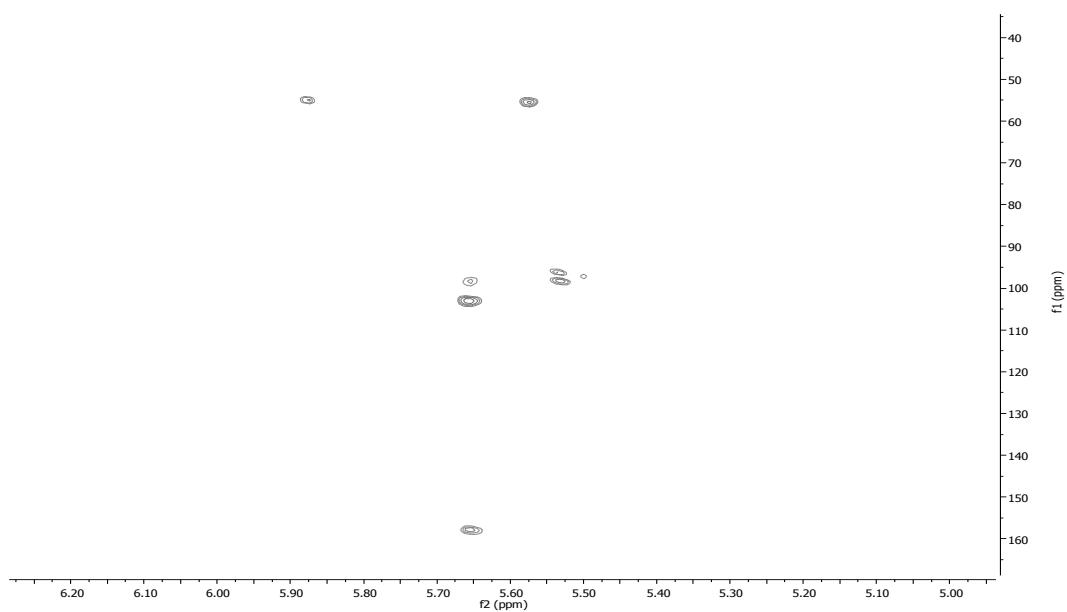


Figura 42: Mapa de correlação HMBC (600MHz), região de H-anoméricos (ampliação).

Tabela com as correlações a longa distância dos hidrogênios anoméricos.

H anomérico (5,65 ppm)	H anomérico (5,53 ppm)
157,89 ppm	98,26 ppm
103,13 ppm	96,19 ppm
98,26 ppm	

Tabela 4: correlações de HMBC para hidrogênios anoméricos.

Correlações para o anel A do kaempferol (para o H anomérico em 5,65 ppm)

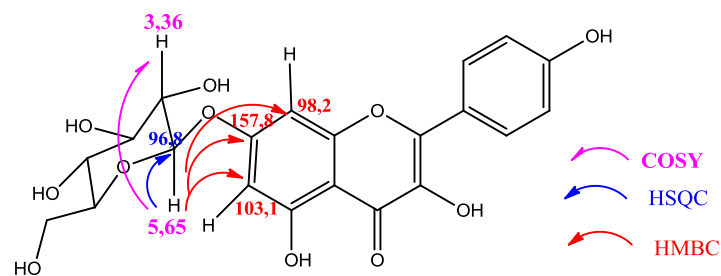


Figura 43a: Correlações obtidas com o experimento de HMBC para CP2013.

Correlações para o anel A do kaempferol (para o H anomérico em 5,53ppm)

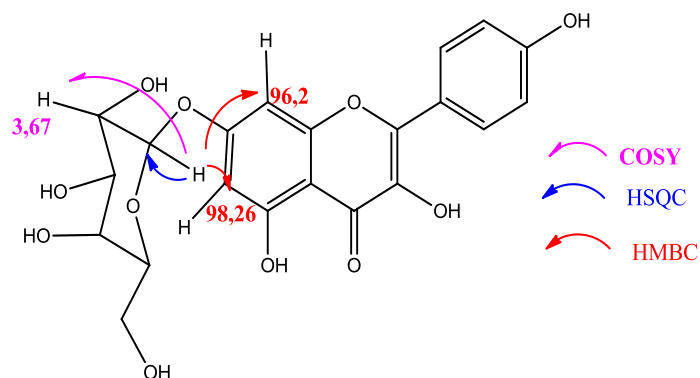


Figura 43b: Correlações obtidas com o experimento de HMBC para CP2013

Através da análise dos espectros de UV, RMN ^1H uni- e bidimensionais e comparação com os dados da literatura (Victorie, 1988) foi possível identificar na amostra CP2013 os flavonóides kaempferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo e kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo (Figura 44). É digno de nota que a ocorrência de glicosilação de flavonóis na posição C-7 é pouco frequente quando comparada com a glicosilação na posição C-3 (Cuyckens, 2004).

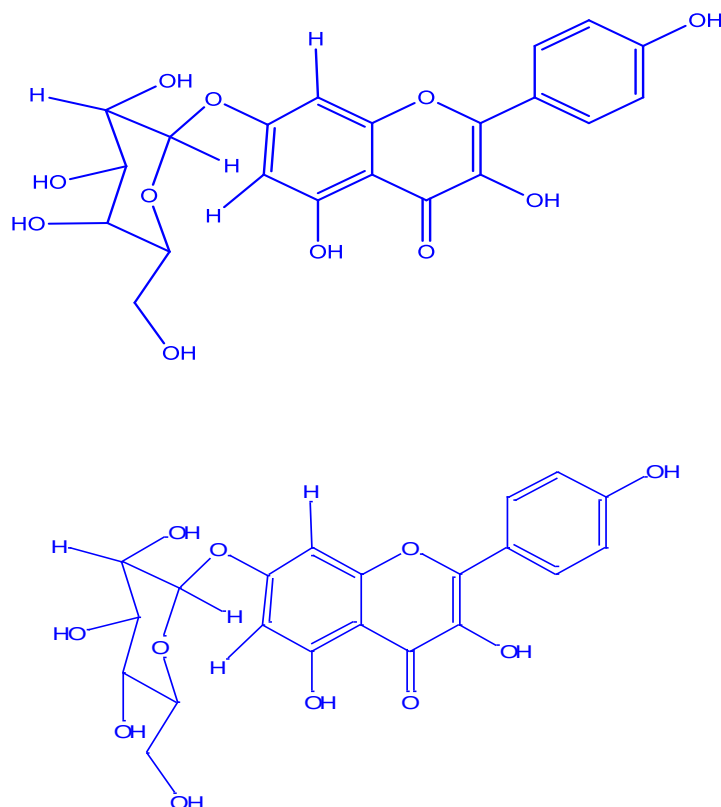


Figura 44: kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo e kaempferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo.

Plantas da família Meliaceae são muito estudadas em função da grande produção de limonóides e de sua atividade inseticida potencial, no entanto, pouca atenção tem sido dispensada em relação à estudos que visem a identificação de substâncias de alta polaridade, tais como flavonóides glicosilados e derivados do ácido caféico. Até onde sabemos, este corresponde ao primeiro relato da identificação dos flavonóis Kaempferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo e Kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo em Meliaceae, bem como do isolamento de flavonóides em *Guarea*.

Além disso, nenhum estudo de atividade biológica havia sido descrito para a espécie *Guarea macrophylla*. A baixa atividade antioxidante apresentada pela

partição butanólica pode ser em função da presença de flavonóides glicosilados. No entanto, as atividades de inibição da enzima Na^+K^+ ATPase e toxicidade frente à células de tumor de pulmão descritas nesta dissertação para a partição butanólica de *G. macrophylla* e suas frações são bastante promissoras, e devem ser investigadas, visto que tal atividade é bem descrita apenas para substâncias da classe dos cardenolidos e bufadienolidos (Prassas, 2008; Piacente, 2009). Aos flavonóides pode ser atribuída parte desta ação, visto que a fração enriquecida com flavonóides obteve cerca de 70% de inibição enzimática.

Sendo assim, estudos já estão sendo realizados por nosso grupo para o isolamento e elucidação estrutural dos demais componentes presentes na partição butanólica das folhas de *Guarea macrophylla*, bem como a realização de testes de viabilidade e vias de morte celular, tais como necrose e apoptose ou, por inibição da enzima Na^+K^+ ATPase com as substâncias puras, com o objetivo de identificar produtos naturais, mais especificamente flavonóides, que inibam a Na^+K^+ ATPase e tenham atividade frente à linhagens de células de câncer de pulmão, enfermidade com altos índices de mortalidade e ocorrência mundial.

5 Conclusões

Foi observada a presença de flavonóis glicosilados e derivados de ácido caféico na composição da partição butanólica das folhas de *G. macrophylla*.

A atividade antioxidante da partição butanólica apresentou um $EC_{50} = 55,6 \mu\text{g/mL}$.

Tanto a partição butanólica quanto suas sub-frações, na concentração de $1,5\text{mg/mL}$, apresentaram excelente atividade inibitória da enzima Na^+K^+ ATPase quando comparadas à ouabaína.

A partição butanólica apresentou atividade tóxica dose-dependente em teste preliminar frente à células de câncer de pulmão H640.

4 flavonóis glicosilados foram identificados na partição butanólica de *Guarea macrophylla*:

- Kaempferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo
- Kaempferol 7-O- β -D-galactopiranosídeo
- Quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo (Hiperina)
- Quercetina 3-O- β -D-glucopiranosídeo (Isoquercitrina)

Trata-se do primeiro trabalho sobre a identificação de flavonóides no gênero *Guarea* e, da ocorrência dos isômeros de kaempferol 7-O- glicosilados em *Meliaceae*.

6 Referências Bibliográficas

- ♦ Abjalan, K.; Abliz, Z.; Shang, X. Y.; He, J. M.; Zhang, R. P.; Shi, J. G. Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41: 352-360, 2006.
- ♦ Ademola, I.O.; Fagbemi, B. O.; Idowu, S.O. Bioseparation and activity of *Khaya senegalensis* fractions against infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 165: 170-174, 2009.
- ♦ Agullo, G.; Payrastre-Garnet, L.; Maneti, S.; Viala, C.; Rémésy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* 53: 1649-1657, 1997.
- ♦ Almeida, M. M. B.; Arriaga, A. M. C.; Santos, A. K. S.; Lemos, T. L. G.; Braz-Filho, R.; Vieira, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Química Nova* 30, N° 4, 935-951, 2007.
- ♦ Ambrozim, A. R. P. Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos e antileishmanioses. Tese de Doutorado- Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 2004.

- ♦ Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *Journal of Chromatography A*, 827: 113–120, 1997.
- ♦ Arts, I. C. W.; Hollman, P. C. H.; Feskens, E. J. M.; de Mesquita, H. B. B.; Kromhout, D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 227-232, 2001.
- ♦ Barbara, K. H.; Timmermann, N.; Aladesanmi, A. J.; Zeng, Lu. A biflavonoid from *Desoxyllum lenticellare gillespiei*. *Phytochemistry* 42 (4): 1199-1201, 1996.
- ♦ Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29(1): 113-123, 2006.
- ♦ Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista de Nutrição* 12(2): 123-130, 1999.
- ♦ Boros, B.; Dörnyei, A.; Horváth, G.; Pluháre, Z.; Kilar, F.; Felinger, A. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. Doi:10.1016, 2010.
- ♦ Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28 (1): 25-30, 1995.

- ♦ Brochini, C. B.; Roque, N. F. Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11 (4): 361-364, 2000.
- ♦ Buer, C.S.; Imin, N.; Djordjevic, M. A. Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 98-111, 2010.
- ♦ Camacho, M. R.; Phillipson, J. D.; Croft, S. L.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C.; Solis, P. N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry* 56: 203-210, 2001.
- ♦ Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A M.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extravirgin olive oil. *Journal of Separation Science* 29: 2221-2233, 2006.
- ♦ Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S.R. B.; Folador, P.; Damazio, R. G.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8:1032-1038, 2008.
- ♦ Corrêa, G. de R. Efeito trófico da ouabaína em neurônios centrais. Tese de Doutorado- Departamento de Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, 2009.
- ♦ Correa, M. P. Dicionário de Plantas úteis e das Exóticas Cultivadas, vol. 1. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.

- ♦ Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15, 2004.
- ♦ de Paula, J. R.; Vieira, I. J. C.; Silva, M. F. G. F.; Fo, E. R.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Pinheiro, A. L.; Vilela, E. F. Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and Flavonoids of *Cedrela odorata* Graft on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry* 44: 1449-1454, 1997.
- ♦ Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Ed John Wiley and Sons, Ltd, 2002.
- ♦ Fang, X.; Di, Y. T.; He, H. P.; Hu, G. W.; Li, S. L.; Hao, X. J. Chemical constituents of *Toona microcarpa* (C. DC.) Harms in Engl. (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 128–130, 2010.
- ♦ Furlan, M. F.; Lopes, M.N.; Fernandes, J. B.; Pirani, J. R. Diterpenes from *Guarea trichilioides*. *Phytochemistry* 41 (4): 1159-1161, 1996.
- ♦ Garcez, F. R.; Garcez, W. S.; da Silva, A. F. G.; Bazzo, R. C.; Resende, U. M. Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15(5): 767-772, 2004.
- ♦ Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Soares, L. R.; 16, 17-Seco- and 2, 3: 16, 17-di-Seco-pregnanes from *Guarea guidonia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19 (6): 1073-1077, 2008.
- ♦ Garcia, D. G. Efeito do monoterpeno álcool perfílico na atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase. Dissertação de Mestrado, Departamento de Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, 2009.

- ♦ Germano, M. P.; D'Angelo, V.; Biasini, T.; Sanogo, R.; de Pasquale, R.; Catania, S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. Journal of Ethnopharmacology 105: 368–373, 2006.
- ♦ Greger, H.; Pacher, T.; Brem, B.; Bacher, M.; Hofer, O. Insecticidal Flavaglines and other compounds from Fijian *Aglaia* species. Phytochemistry 57: 57-64, 2001.
- ♦ Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504, 2000.
- ♦ Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity. Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572–584, 2002.
- ♦ Hidalgo, M.; Moreno-Sánchez, C.; Teresa-Pascoal, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. Food Chemistry 121: 691–696, 2010.
- ♦ Hirano, T.; Oka, K.; Akiba, M. Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on Na⁺ K⁺ ATPase: Aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. Life Sciences 45: 1111-1117, 1989.
- ♦ Kipassa, N. T.; Iwagawa, T.; Okamura, H.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nakatami, M. Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*. Phytochemistry 69: 1782–1787, 2008.

- ♦ Lago, J. H.; Brochini, C. B; Roque, N. F. Terpenoids from *Guarea guidonia*. *Phytochemistry* 60: 333–338, 2002b.
- ♦ Lago, J. H. G.; Brochini, C. B; Roque, N. F. Terpenes from leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Phytochemistry* 55: 727- 731, 2000.
- ♦ Lago, J. H. G.; Reis, A.A.; Roque, N. F. Chemical composition from volatile oil of the stem bark of *Guarea macrophylla* Vahl. ssp. *tuberculata* Vellozo (Meliaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 17: 255-257, 2002a.
- ♦ Lago, J. H. G.; Roque, N. F. Estudo fitoquímico da madeira de *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Química Nova* 32 (9): 2351-2354, 2009.
- ♦ Lago, J. H. G.; Roque, N. F. New Diterpenoids from Leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(3B): 643-646, 2005.
- ♦ Lago, J. H. G.; Soares, M. G.; Pereira, L. G. B.; Silva, M. F. G. F.; Corrêa, A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Roque, N. F. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: Seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry* 67 589–594, 2006.
- ♦ Li, Y. Q.; Zhou, F. C.; Gao, F.; Bian, J. S.; Shan, F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 11463–11468, 2009.
- ♦ Lima, R.C. Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida. Dissertação de Mestrado -Departamento de Farmacognosia, Universidade de Brasília, 2006.

- ♦ Lin, C. W. H.; Ebel, R.; Edrada, R. A.; Wray, V.; Nimtz, M.; Sumaryono, W.; Prokch, P. Rocaglamides, glycosides and putrescine bisamides from *Aglaia dasyclada*. *Journal of Natural products* 64:1216-1220, 2001.

- ♦ Loizzo, M. R.; Said,A.; Tundis, R.; Rashed, K.; Statti, G. A.; Hufner,A.; Menichini, F. Inhibition of angiotensin converting Enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytotherapy Research* 21: 32–36, 2007.

- ♦ Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25, No. 3, 429-438, 2002.

- ♦ Mandalari, G.; D'Arrigo, M.; Ginestra, G.; Arena, A.; Tomaino,A.; Wickham, M. S. J. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Letters in Applied Microbiology* 51: 83–89, 2010.

- ♦ March, R.; Brodbelt, J. Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *Journal of Mass Spectrometry* 43: 1581–1617, 2008.

- ♦ Marchand, L. L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56: 296–301, 2002.

- ♦ Marco, J. A.; Sanz, B. F.; Sanchez-Parareda, J. Flavonol diglycosides from *Melia azedarach*. *Journal of Natural Products* 49 (1), 1986.

- ♦ Markham, K.R.; Andersen, O.M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2006.

- ♦ Mercader, A. G.; Pomilio, A. B. QSAR study of flavonoids and biflavonoids as influenza H1N1 virus neuraminidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 1724–1730, 2010.
- ♦ Mertens-Talcott, S.U.; de Castro, W. V.; Manthey, J.A.; Derendorf, H.; Butterweck, V. Polymethoxylated flavones and other phenolic derivatives from *Citrus* in their inhibitory effects on P-glycoprotein-mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2563-2568, 2007.
- ♦ Mijatovic, T.; Roland, I.; Van Quaquebeke, E.; Nilsson, B.; Mathieu, A.; Van Vynckt, F.; F, Darro.; Blanco, G.; Facchini, V.; Kiss, R. The α 1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *Journal of Pathology* 212: 170–179, 2007.
- ♦ Mishra, M.; Srivastava, S. K. A new flavone glycoside from *Melia azedarach* Linn. *Current science* 53 (13), 1984.
- ♦ Morgan, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4096–4105, 2009.
- ♦ Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 63: 55- 65, 1983.
- ♦ Ochiai, H.; Takeda, K.; Soeda, S.; Tahara, Y.; Takenaka, H.; Abe, K.; Hayashi, Y.; Noguchi, S.; Inoue, M.; Schwarz, S.; Schwarz, W.; Kawamura, M. Epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of Na⁺K⁺-ATPase by favoring the E1 conformation. *Biochemical Pharmacology* 78: 1069–1074, 2009.

- ♦ Pauli, G. F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear resonance techniques. *Phytochemical analysis* 9: 177-185, 1998.
- ♦ Pennigton, T. D., Styles, B.D. A generic monograph of Meliaceae. *Blumea* 22: 419–540, 1975.
- ♦ Petrera, E.; Coto, C. E. Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection. *Phytotherapy Research*, 2009.
- ♦ Piacente, S.; Masullo, M.; De Neve, N.; Dewelle, J.; Hamed, A; Kiss, R.; Mijatovic, T. Cardenolides from *Pergularia tomentosa* Display Cytotoxic Activity Resulting from Their Potent Inhibition of Na⁺K⁺-ATPase. *Journal of Natural Products* 72: 1087–1091, 2009.
- ♦ Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042, 2000.
- ♦ Pinto, A.C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifânio, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* 25 (1): 45-61, 2002.
- ♦ Pizzolatti, M. G; Venson, A. F; Smânia Jr, A; Smânia, E. F. A; Braz-Filho, R. Two Epimeric Flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with Antimicrobial Activity. *Zeitung Naturforsch* 57C: 483-488, 2002.
- ♦ Prassas, I.; Diamandis, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 926:935, 2008.

- ♦ Puripattavanong, J.; Weber, S.; Brecht, V.; Frahm, A.W. Phytochemical Investigation of *Aglaia andamanica*. *Planta Medica* 66(8): 740-745, 2000.
- ♦ Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7): 933-956, 1996.
- ♦ Rodrigues, E. D.; da Silva, D. B.; de Oliveira, D. C. R.; da Silva, G. V. J. Dosy NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*. *Magnetic Resonance in Chemistry* 47: 1095- 1100, 2009.
- ♦ Rolim, A.; Oishi, T.; Maciel, C. P. M.; Zague, V.; Pinto, C. A. S.O.; Kaneko, T. M.; Consiglieri, V.O.; Velasco, M. V. R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. *International Journal of Pharmaceutics* 308: 107–114, 2006.
- ♦ Roy, A.; Saraf, S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29(2): 191—201, 2006.
- ♦ Saifah, E.; Puripattavanong, J. Bisamides from *Aglaia* species: Structure analysis and potential to reverse drug resistance with cultured cells. *Journal of Natural Products* 56 (4): 473-477, 1993.
- ♦ Salib, J. Y.; Michael, H. N.; El-Nogoumy, S. I. New lactoyl glycoside quercetin from *Melia azedarach* leaves. *Chemistry of Natural Compounds* 44(1), 2008.
- ♦ Saragusti, A. C.; Ortega, M. G.; Cabrera, J. L.; Estrin, D. A.; Marti, M. A.; Chiabrando, G. A. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase

activity: Molecular mechanism and structure–activity relationship of the flavonoid– enzyme interaction. *European Journal of Pharmacology* 644: 138–145, 2010.

- ♦ Schefer, A. B.; Braumann, U.; Tseng, L. H.; Spraul, M.; Soares, M.G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Ferreira, A. G. Application to high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance coupling to the identification of limonoids from mahogany tree (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) by stopped-flow 1D and 2D NMR spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 1128: 152-163, 2006.
- ♦ Shen, L. R.; Guo, D.; Yua Y. M.; Yin, B. W.; Shia, Shi, Q. W.; Wang, Y. L.; Huo, C. H. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Xylocarpus*. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* 6: 1293-1308, 2009.
- ♦ Shibuya, K.; Fukuoka, J.; Fujii, T.; Shimoda, E.; Shimizu, T.; Sakai, H.; Tsukada, K. Increase in ouabain-sensitive K⁺-ATPase activity in hepatocellular carcinoma by overexpression of Na⁺,K⁺-ATPase α 3-isoform. *European Journal of Pharmacology* 638: 42-46, 2010.
- ♦ Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. Ed. Da Universidade, 1999.
- ♦ Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brum, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosum, F.; Rüedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and

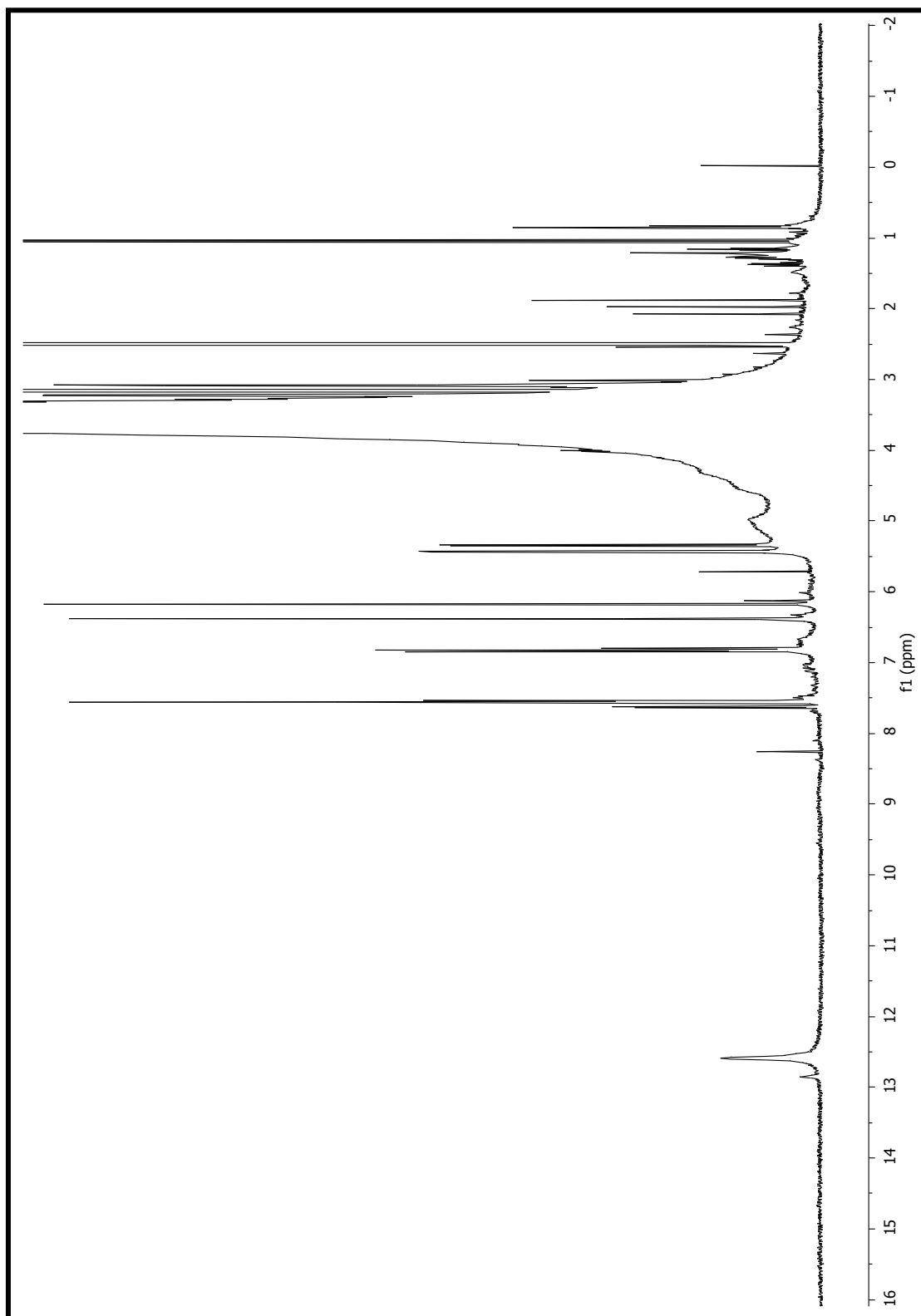
quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (4): 1352–1364, 2006.

- ♦ Taussky, H.; Shorr, H. E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Jornal of Biological Chemistry* 202: 675-682, 1952.
- ♦ Torssell, K. B. G. *Natural Product Chemistry: A Mechanistic Biosynthetic and Ecological Approach*. Apotekarsocieteten: Swedish Pharmaceutical Society, 1997.
- ♦ Valadares, Y. M.; Oliveira, A. B.; Côrtes, S. F.; Lombardi, J.A.; Braga, F. C. Atividade vasodilatadora in vitro de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 39(1), 2003.
- ♦ Veitch, N. C.; Grayer, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports* 25: 555–611, 2008.
- ♦ Victorie, C.; Berrurier, M. H.; Lobstein-Guthl, A.; Balz, J. P.; Antonl, R. Isolation of Flavonol Glycosides from *Ginkgo biloba* Leaves. *Planta medica*, 1988
- ♦ Vilegas, W.; Vilegas, J. H. Y.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Albert, T. Application of on-line C30 RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of *Maytenus aquifolium*. *Phytochemical Analysis* 11: 317-321, 2000.
- ♦ Vukics, V.; Guttman, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 29: 1–16, 2010.

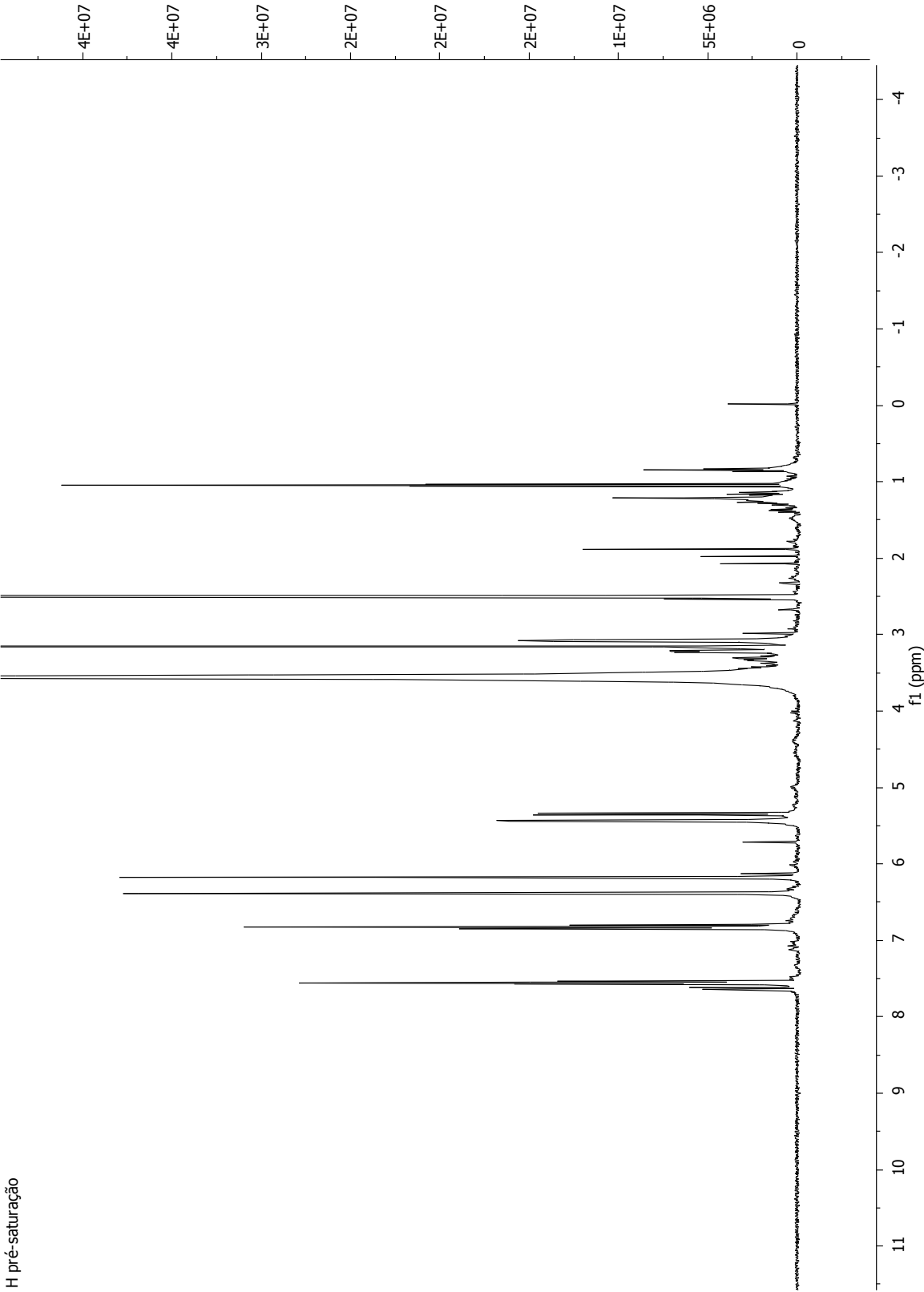
- ♦ Wei, Y.Q.; Zhao, X.; Kariya, Y.; Fukata, H.; Teshigawara, K.; Uchida, A. Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Research* 54: 4952-4957, 1994.
- ♦ Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K.; Folsom, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology* 149 (10): 943-949, 1999.
- ♦ Yuan, L. M.; Ai, P.; Chen, X. X.; Zi, M.; Li, W. Z. Y.; Chen, Y. G. Versatile two-phase solvent system for flavonoid prefractionation by high speed countercurrent chromatography. *Journal of liquid Chromatography & Related Technologies* 25(6): 889–897, 2002.
- ♦ Zheng, Z. P.; Liang, J. Y.; Hu, Li. H. Water soluble constituents of *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. *Journal of Integrative Plant Biology* 48 (8): 996–1000, 2006.
- ♦ Zhi-Du, Z.; Yang, X. W.; Han, H.; Cai, X. H.; Luo, X. D. A New Flavone C-Glycoside from *Clematis rehderiana*. *Molecules* 15: 672-679, 2010.
- ♦ Zhou, H.; Hamazaki, A.; Fontana, J. D.; Takahashi, H.; Wandeschner, C. B.; Fukuyama, Y. Cytotoxic Limonoids from Brazilian *Melia azedarach*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53(10): 1362—1365, 2005.

7 Anexos

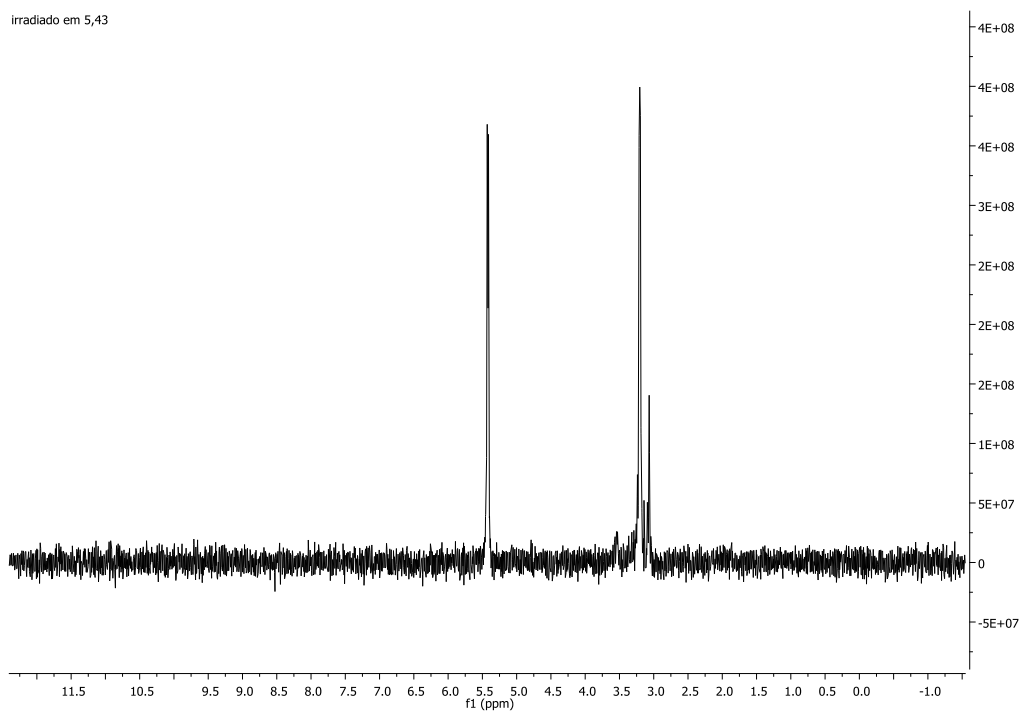
I. RMN 1H CP2010 (400MHz) dmsod



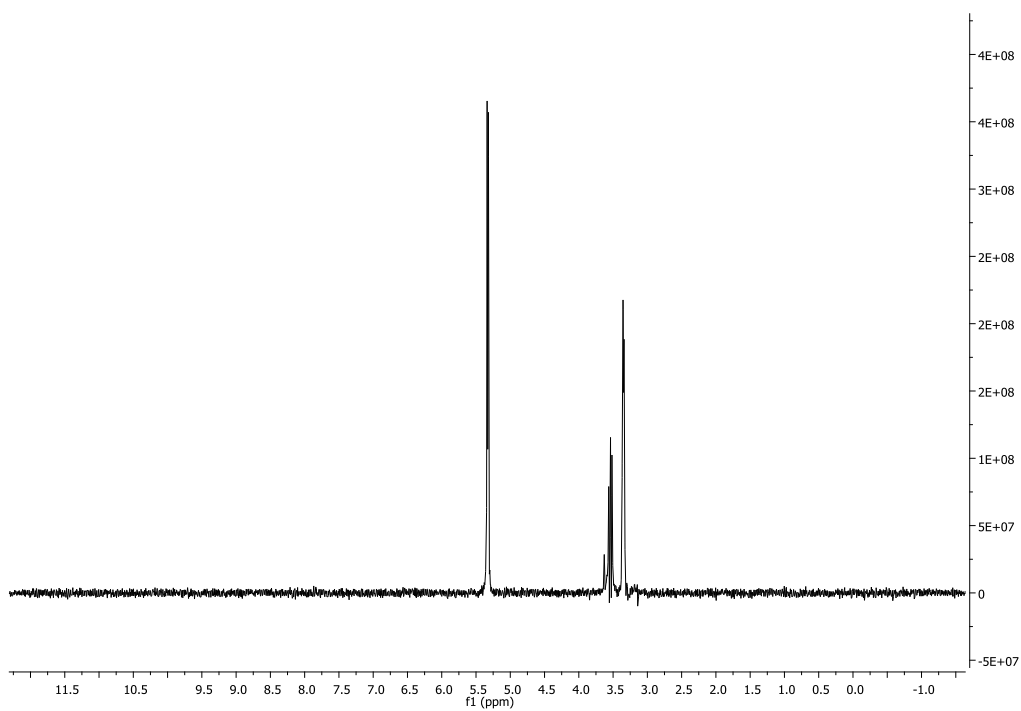
II. RMN 1H pré-saturação (400MHz) dmsod



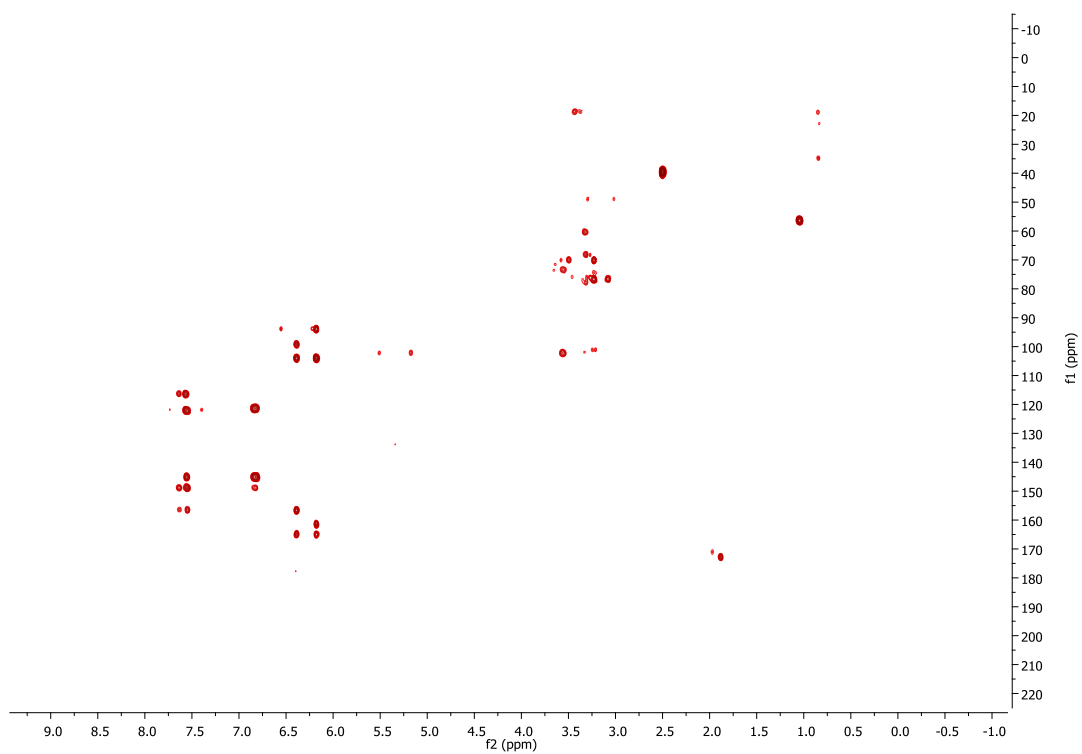
III. TOCSY 1D CP2010, irradiado em 5,43ppm



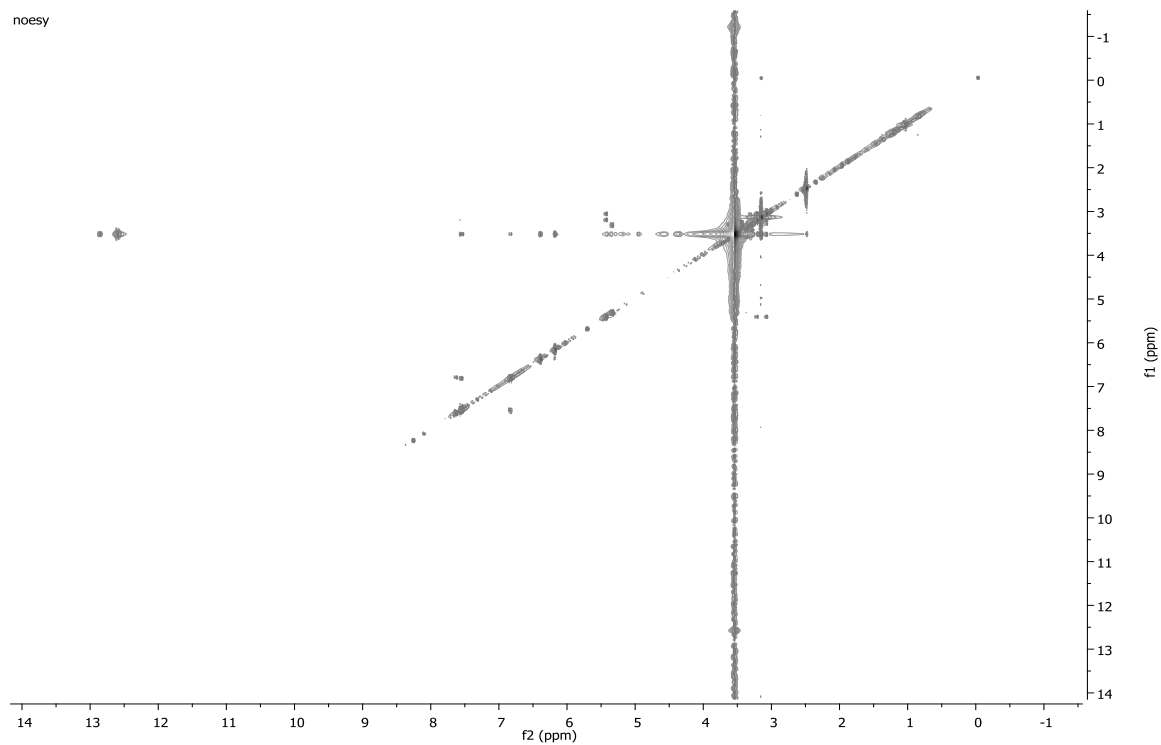
IV. TOCSY 1D CP2010, irradiado em 5,36ppm



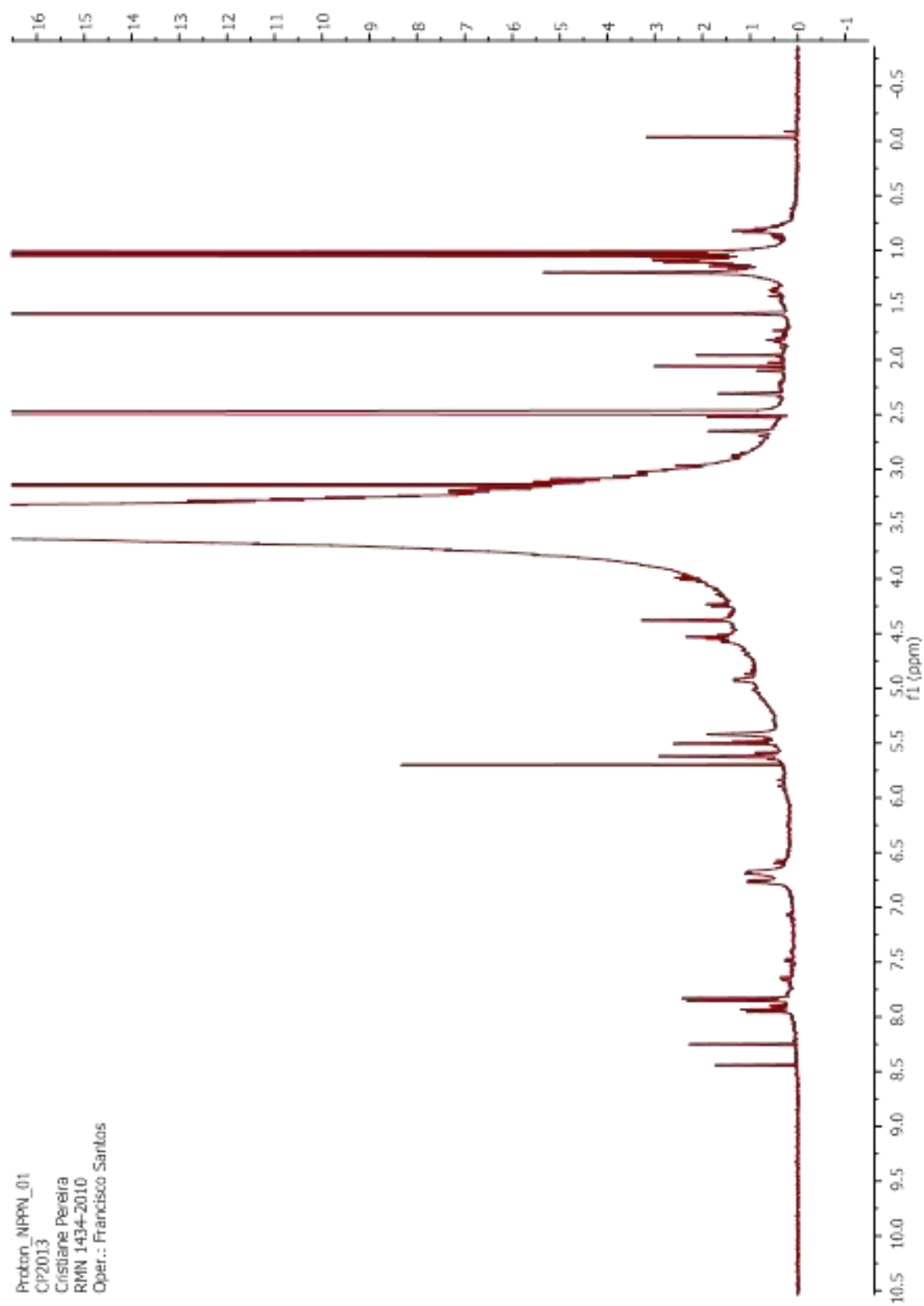
V. Espectro de HMBC amostra CP2010



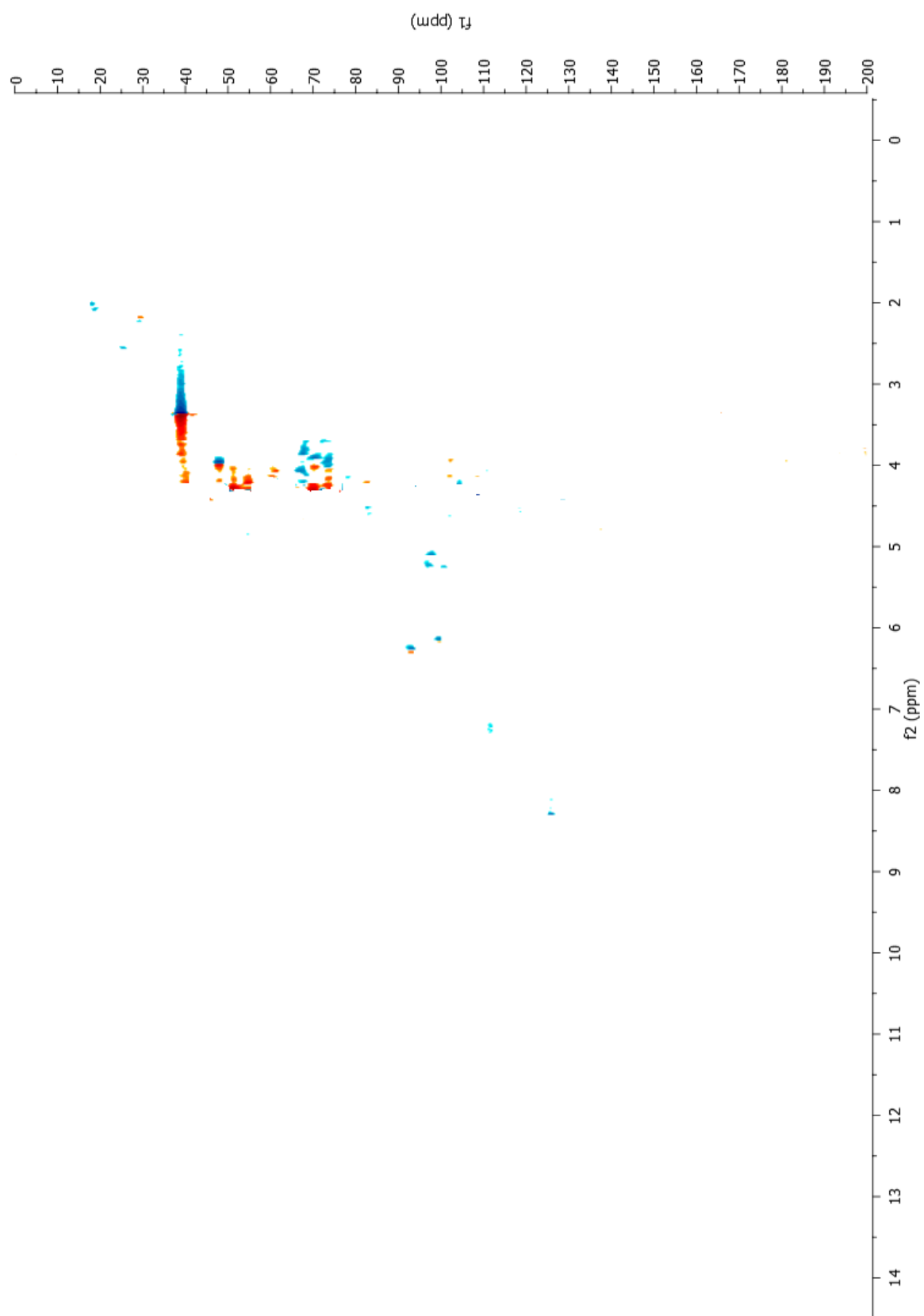
VI. Espectro de NOESY



VII. RMN H CP2013

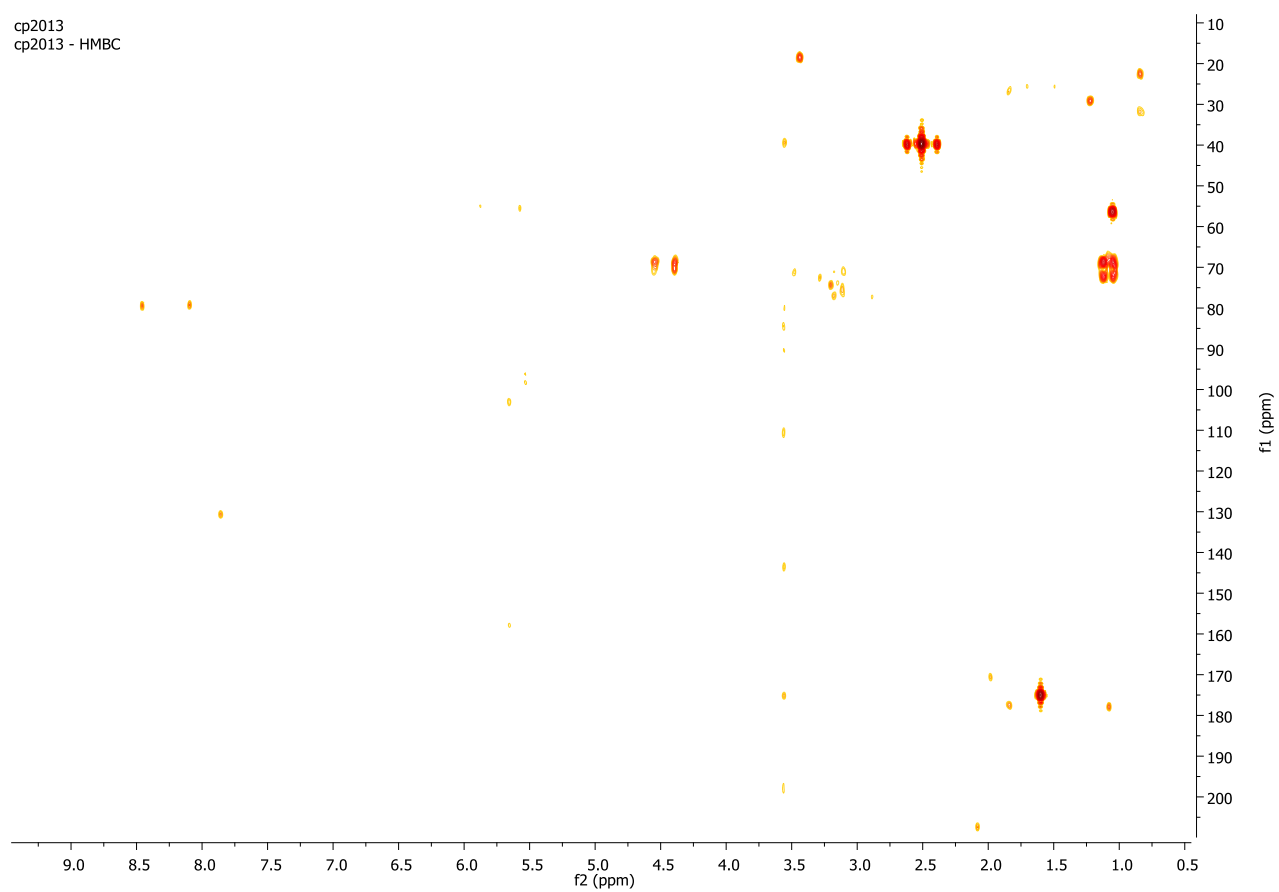


VIII. HSQC CP2013



IX. HMBC CP2013

cp2013
cp2013 - HMBC



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](#)