



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DE CISTEÍNO PROTEASES DE
VOCHYSIA THYRSOIDEA(VOCHYSIACEAE)**

Lorena Ramos Freitas de Sousa*

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Co-orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

* Bolsista CAPES

**Anápolis - GO
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Lorena Ramos Freitas de Sousa

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DE CISTEÍNO PROTEASES DE
VOCHYSIA THYRSOIDEA(VOCHYSIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Moleculares
(Físico-Química Molecular).

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Co-orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

* Bolsista CAPES

**Anápolis - GO
2011**

Estudo fitoquímico e avaliação das atividades citotóxica e inibitória das cisteíno proteases de *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae)

LORENA RAMOS FREITAS DE SOUSA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:

Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Prof. Dr. José Realino de Paula

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
MARÇO 2011

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, por ter me aceito como sua aluna sem mesmo conhecer-me. Agradeço pela orientação, ensinamentos e principalmente pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar pela oportunidade, ensinamentos, dedicação e por ter proporcionado todo o suporte necessário para a realização desta pesquisa.

Às professoras, Dr^a. Myrlei Luciene dos Santos, Dr^a. Máisa Borges Costa e Dr^a. Caridad Noda Pérez pela disposição, amizade e colaborações.

Ao prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes e a todos do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos professores da banca, Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves e Dr. José Realino de Paula pela disponibilidade e pela contribuição nesta dissertação.

Aos demais professores da UEG e UFSCar que contribuíram na minha formação.

Aos funcionários técnicos da UEG e UFSCar e em especial, à Luciana do laboratório de RMN pela disponibilidade em ajudar.

À CAPES e ao projeto PROCAD pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos da UFSCar e UEG: em especial à Suelem, Josiane, Jame's, Caio, Murilo, Marcela, Clayton e Rosa.

A minha família, principalmente aos meus pais e à minha irmã Priscila, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos.

Ao meu esposo Thiago, pelo carinho, respeito e apoio incondicional.

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

À Deus, Mestre dos mestres, pela fé, sabedoria e força durante esta caminhada. E pelas bênçãos em minha vida e por todos que fazem parte dela!!!!

“Tudo posso naquele que me fortalece”. (Filipenses 4:13)

Muito Obrigada!

CURRICULUM VITAE

1. Atuação profissional

- 2009-2009** Professora de Bioquímica (curso de enfermagem) - FIBRA Faculdade Instituto Brasil.
- 2008-2009** Colaborador: Química Responsável Técnico e consultorias de P&D de cosméticos - DERMOBRAZIL e SUNNYDAY (Ind. Manipulação e Comércio de Cosméticos Ltda)
- 2007-2008** Colaborador: Química Responsável Técnico - BRILAV Ind. e Comércio de Saneantes Domissanitários Ltda.
- 2005-2006** Colaborador: Analista Físico-químico – MABEL (CIPA Ind. Prod. Alimentares LTDA).
- 2003-2005** Estágio: Analista físico-químico e microbiológico de água e efluentes – MICROLAB (Laboratório de Análises Ambientais).

2. Formação complementar

- 2011** Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D (experimental e teórico)-UFSCar.
- 2010** Sistemas nanométricos auto-organizados – UFSCar.
- 2010** Fármacos Inorgânicos e seus mecanismos de ação – UFSCar.
- 2009** Atualização em Registro e Notificação Cosméticos-FIEG
- 2009** Quimiometria-UEG.
- 2009** Cosmetovigilância-FIEG.
- 2008** Boas Práticas de Fabricação - Tendências e Desafio- IGTF.
- 2008** Bases Moleculares e Celulares do Envelhecimento-INVESTIGA.
- 2008** Planejamento, Programação e Controle da Produção- ITCO
- 2008** Técnico-Científico em Fragrâncias- CRF-GO
- 2006** Curso de Inglês- QCC (Quinsigamond Community College-Worcester, MA U.S.A)
- 2004** Vigilância Sanitária na Indústria-IFG.
- 2004** Análises Ambientais (Físico-químicas e Microbiológicas)-MICROLAB
- 2004** Química Ambiental- Universidade de Fortaleza, UNIFOR.
- 2003** Voltametria em Análise Química Ambiental- Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP.
- 2003** Novas Técnicas moleculares na Análise Genética-UFG

2003 Introdução aos Produtos Naturais-UFG

3.Participação em Eventos

2010 XXX Escola de Verão em Química– UFSCar.

2010 Ciclo de Seminários do Laboratório de Bioensaios – UEG.

2009 I Simpósio Nacional em P&D de Fármacos-UEG

2008 Workshop Técnico Comercial de Cosméticos - Freedom Comunicações e OILS & FATS EDITORA, REVISTA H&C

2008 Workshop Confiabilidade Máxima nos Processos- GMP Consultoria em Gestão

2004 XLIV Congresso Brasileiro de Química – CBQ

2004 III Simpósio de Biomedicina-Análise de Água-PUC

2003 XLIII Congresso Brasileiro de Química.

2003 XIII Semana do químico-UFG

2002 XII Semana de química

4. Produção Bibliográfica

SOUSA, L. R. F.; MACHADO, C. C.; GODOI, N. C. “Análise de Água e Esgotos (físico-química e microbiológica)”. III Simpósio Regional de Biomedicina e I Encontro Goiano de Patologia clínica, 2004, Goiânia-GO.

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DAS CISTEÍNO PROTEASES DE *VOCHYSIA THYRSOIDEA* (VOCHYSIACEAE). O gênero *Vochysia* é composto por um grupo de árvores tropicais com espécies amplamente distribuídas no Cerrado e florestas do Brasil. Estas plantas, tem sido testadas em busca da identificação de novos compostos químicos potencialmente úteis e alguns trabalhos demonstraram um diverso campo de atividades farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, dentre muitas outras. Baseando-se em uma literatura etnofarmacológica foram coletadas amostras de *Vochysia thyrsoidea*, espécie utilizada na medicina popular como expectorante. Este trabalho apresenta o estudo fitoquímico e ensaios biológicos realizados com os extratos orgânicos e metabólitos secundários isolados das folhas e cascas do caule de *Vochysia thyrsoidea* Pohl (Vochysiaceae). Seis compostos foram isolados através de técnicas cromatográficas e identificados através de experimentos 1D- e 2D-RMN, espectrometria de IV e pela comparação com dados da literatura. Os compostos identificados foram: catequin-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo, catequin-3-O-ramnopiranosídeo, o ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico, ácido 3-Oxo-urs-12en-28-oico, 2-butil D-frutofuranosídeo, 1-butil D-frutofuranosídeo. Destes compostos as catequinas e os frutofuranosídeos são relatados pela primeira vez no gênero *Vochysia*. As substâncias testadas não apresentaram resultados consideráveis no ensaio inibitório enzimático da catepsina K, uma cisteíno protease que tem sido correlacionada com a osteoporose. No entanto, os ensaios frente à catepsina B, enzima que tem sido associada ao câncer, apresentaram resultados consideráveis de inibição, sendo o composto catequin-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo o mais promissor ($IC_{50} = 65,12 \mu M$). Dentre as substâncias testadas quanto à atividade citotóxica o frutofuranosídeo (2-butil D-frutofuranosídeo) apresentou o resultado mais significativo inibindo 100% (+/- 13,33) a linhagem tumoral do sistema nervoso central (SF-295). As substâncias submetidas às reações de modificação estrutural não obtiveram atividade biológica.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF CITOTOXIC AND CYSTEINE PROTEASES INHIBITORY ACTIVITIES OF *VOCHYSIA THYRSOIDEA* (VOCHYSIACEAE). The genus *Vochysia* is a group of tropical trees with a very widely distributed species in cerrado and forests in Brazil. These plants have been tested in an effort to identify new and potentially useful chemistry compounds, and some works shown a diverse array of pharmacological activities, as well as antibacterial, antifungal, antiinflammatory and many others. Based on the ethnopharmacological literature the specie *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (Vochysiaceae), used in folk medicine as an expectorant, was collected. This work presents the phytochemical study and biological tests performed with the organic extracts and secondary metabolites isolated from the leaves and of the stem bark of this plant. Six compounds were isolated using chromatographic techniques and the structural identification was carried out on the basis of 1D- and 2D-NMR experiments, IR spectrometry and comparison with literature data. The compounds identified were: catechin-3-O-ramno(3-cinnamoyl)pyranoside, catechin-3-O-ramnopyranoside, 2,4,6-trymetoxbenzoic acid, 3-oxo-urs-12-en-28-oic acid, 2-butyl D-fructofuranoside, 1-butyl D-fructofuranoside. The catechin and fructofuranosides are reported for the first time in the *Vochysia* genus. The average for all substances tested did not show considerable inhibition against cathepsin K, a cysteine protease that has been implicated in osteoporosis. However, in the enzyme inhibition assay against cathepsin B, enzyme has been implicated in the cancer disease, showed considerable results and the most promising compound was the catechin-3-O-ramno(3-cynamoil)pyranoside ($IC_{50} = 65.12 \mu M$). The citotoxic activities revealed the fructofuranoside (2-butyl D-fructofuranoside) as the most effective among all the substances tested, showed 100% (+/- 13.33) of inhibition in the cell lines of central nervous system tumor (SF-295). The substances submitted in reactions to structural changes didn't have biological activities.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. Bioensaio frente à <i>Artemia salina</i> Leach	02
2.2. Cisteíno peptidases	03
2.2.1. Catepsina B	03
2.2.2. Catepsina K	06
2.3. Câncer	08
2.4. Flavonóides	11
2.5. Triterpenóides	12
2.6. A família Vochysiaceae	15
2.7. O gênero <i>Vochysia</i>	15
2.8. A espécie <i>Vochysia thyrsoidea</i>	18
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1. Materiais Utilizados	20
3.1.1. Material botânico	20
3.1.2. Material e soluções	20
3.1.3. Equipamentos e materiais	21
3.2. Metodologia do estudo fitoquímico	21
3.2.1. Coleta e identificação do material botânico	21
3.2.2. Obtenção do extrato	21
3.2.3. Isolamento dos constituintes químicos de <i>V. thyrsoidea</i>	24
3.2.3.1. Estudo fitoquímico de VTCcA	24
3.2.3.2. Estudo fitoquímico de VTCcD	26
3.2.3.3. Estudo fitoquímico de VTCcB	28

3.2.3.4. Estudo fitoquímico de VTFE	30
3.2.4. Reação de acetilação de A8 para obtenção de AR8	30
3.2.5. Reação de acetilação de A11 para obtenção de AR11	31
3.3. Metodologia dos ensaios biológicos	31
3.3.1. Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	31
3.3.2. Ensaio de inibição enzimática das catepsinas K e B	32
3.3.3. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Substâncias isoladas	34
4.1.1. Determinação estrutural do flavonóide F1	36
4.1.2. Determinação estrutural do flavonóide FC3	43
4.1.3. Determinação estrutural do triterpeno T2	48
4.1.4. Determinação estrutural do ácido TC8	51
4.1.5. Determinação estrutural do frutofuranosídeo A8	53
4.1.6. Determinação estrutural do frutofuranosídeo A11	58
4.2. Reação de acetilação para obtenção de AR8	62
4.3. Reação de acetilação para obtenção de AR11	63
4.4. Atividades biológicas	64
4.4.1. Atividade citotóxica frente à <i>Artemia salina</i>	64
4.4.2. Ensaio de inibição enzimática	65
4.4.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	68
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
Φ	Diâmetro
acetona d_6	Acetona deuterada
AcOEt	acetato de etila
Actn	Acetona
AH	Acetato e hexano
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
D	Dubleto
Dd	Duplo dubleto
DEPT	Intensificação da distorção por transferência de polarização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
EtOH	Etanol
H	Altura
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
M	Multiplete
MD	Metanol e dicloro
Me	Metila
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Mega hertz
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
S	Singleto
T	Triplete

TAS	Ensaio de Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>
VTCcE	Extrato bruto etanólico das cascas do caule de <i>V. thyrsoidea</i>
VTCcEA	Fração Acetato de etila das cascas do caule de <i>V. thyrsoidea</i>
VTCcED	Fração Diclorometânica das cascas do caule de <i>V. thyrsoidea</i>
VTCcEH	Fração Hexânica das cascas do caule de <i>V. thyrsoidea</i>
VTCcEB	Fração n-Butanólica das cascas do caule de <i>V. thyrsoidea</i>
VTFE	Extrato bruto etanólico das folhas de <i>V. thyrsoidea</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da catequin-3-O-ramno(3-cinamoil)piranosídeo	40
Tabela 4.2.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da catequin-3-O-ramnopiranosídeo	46
Tabela 4.3.	Dados de RMN de ^1H do ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico	49
Tabela 4.4.	Dados de RMN de ^{13}C do ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico	50
Tabela 4.5.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico	52
Tabela 4.6.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do 2-butil D-frutofuranosídeo	55
Tabela 4.7.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do 1-butil D-frutofuranosídeo	59
Tabela 4.8.	Rendimento total da reação de acetilação de A8	62
Tabela 4.9.	Rendimento total da reação de acetilação de A11	63
Tabela 4.10.	Resultados de Letalidade frente à <i>Artemia salina</i>	64
Tabela 4.11.	Porcentagem de inibição das catepsinas B e K pelas substâncias testadas na concentração de 125 μM	65
Tabela 4.12.	Porcentagem de inibição de flavonoides frente às cisteíno peptidases (25 μM)	67
Tabela 4.13.	Resultados de inibição do ensaio MTT pelas frações de <i>V. thyrsoidea</i>	69
Tabela 4.14.	Resultados de inibição do ensaio MTT pelas substâncias testadas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	<i>Artemia salina</i> na fase adulta	2
Figura 2.2.	Catepsina B	4
Figura 2.3.	Substâncias com atividade inibitória frente à catepsina B	5
Figura 2.4.	Catepsina K	6
Figura 2.5.	Substâncias com atividade inibitória frente à catepsina K	7
Figura 2.6.	Camptothecine isolado de <i>Mappia foetida</i>	9
Figura 2.7.	Andrographolide isolado de <i>A. paniculata</i>	9
Figura 2.8.	Curcumina isolada de <i>Curcuma longa</i> e lignanas isoladas de <i>Phyllanthus amarus</i>	10
Figura 2.9.	Classificação dos flavonoides	11
Figura 2.10.	Triterpenos com atividades anti-inflamatória	13
Figura 2.11.	Triterpenos usados em aplicações cosméticas e magistrais	14
Figura 2.12.	Triterpenos com atividade antitumoral	14
Figura 2.13.	Ácidos triterpênicos de <i>V. divergens</i>	16
Figura 2.14.	Ácidos triterpênicos de <i>V. vismiaefolia</i>	16
Figura 2.15.	Ácidos triterpênicos de <i>V. ferrugínea</i>	17
Figura 2.16.	Foto de <i>Vochysia thyrsoidea</i>	18
Figura 2.17.	Tronco de <i>Vochysia thyrsoidea</i>	18
Figura 2.18.	Constituintes de <i>V. thyrsoidea</i>	19
Figura 3.1.	Partição do extrato bruto das folhas	22
Figura 3.2.	Partição do extrato bruto da casca do caule	23
Figura 3.3.	Fracionamento do extrato de acetato de etila	24
Figura 3.4.	Isolamento do flavonóide F1	25
Figura 3.5.	Isolamento do flavonóide FC3	26
Figura 3.6.	Isolamento do triterpeno T2	27
Figura 3.7.	Isolamento do ácido TC8	28
Figura 3.8.	Fracionamento do extrato n-butanólico	29
Figura 3.9.	Isolamento dos frutofuranosídeos A8 e A11	29

Figura 3.10.	Isolamento do flavonóide FC3	30
Figura 4.1.	Espectro de RMN ^1H do flavonóide F1 (MeOD, 400 MHz)	41
Figura 4.2.	Mapa de contorno de HSQC de F1 (MeOD, 400 MHz)	42
Figura 4.3.	Mapa de contorno de HMBC de F1 (MeOD, 400 MHz)	42
Figura 4.4.	Espectro de RMN ^1H do flavonóide FC3 (MeOD, 400 MHz)	45
Figura 4.5.	Mapa de contorno de HSQC de FC3 (MeOD, 400 MHz)	47
Figura 4.6.	Mapa de contorno de HMBC de FC3 (MeOD, 400 MHz)	47
Figura 4.7.	Espectro de RMN ^1H do triterpeno T2 (acetona d_6 , 400 MHz)	49
Figura 4.8.	Espectro de RMN ^{13}C do triterpeno T2 (acetona d_6 , 100 MHz)	51
Figura 4.9.	Espectro de RMN ^1H do ácido TC8 (acetona d_6 , 400 MHz)	52
Figura 4.10.	Espectro de RMN ^{13}C do ácido TC8 (acetona d_6 , 400 MHz)	53
Figura 4.11.	Espectro de infravermelho do frutofuranosídeo A8	56
Figura 4.12.	Espectro de RMN ^1H do frutofuranosídeo A8 (MeOD, 400 MHz)	56
Figura 4.13.	Mapa de contorno de HSQC de A8 (MeOD, 400 MHz)	57
Figura 4.14.	Mapa de contorno de HMBC de A8 (MeOD, 400 MHz)	57
Figura 4.15.	Espectro de RMN ^1H de A11 (MeOD, 400 MHz)	60
Figura 4.16.	Experimento de DEPT 135 de A11 (MeOD, 400 MHz)	60
Figura 4.17.	Mapa de contorno de HSQC de A11 (MeOD, 400 MHz)	61
Figura 4.18.	Mapa de contorno de HMBC de A11 (MeOD, 400 MHz)	61
Figura 4.19.	Esquema da reação de acetilação de A8	62
Figura 4.20.	Espectro de RMN ^1H de AR8 (MeOD, 400 MHz)	62
Figura 4.21.	Esquema da reação de acetilação de A11	63
Figura 4.22.	Espectro de RMN ^1H de AR11 (MeOD, 400 MHz)	63
Figura 4.23.	IC_{50} da catequin-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo sobre a catepsina B	66
Figura 4.24.	Flavonóides testados frente às catepsinas K, V, L e S	68

1.INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade e é detentor da floresta amazônica, maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o que permite o estudo de produtos naturais, que representa uma das áreas mais tradicionais da química de nosso país. Dentre as regiões brasileiras temos também o bioma do Cerrado, cujas áreas são pouco conhecidas e podemos assim ressaltar a necessidade de pesquisa nesta região (VARANDA, 2006; PUPO e GALLO, 2007).

As plantas medicinais são um recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, pois elas contribuem no fornecimento de substâncias de grande variedade que são úteis no tratamento empírico de doenças. Estas estruturas moleculares complexas fornecidas pelas plantas são praticamente impossíveis de se obter por síntese, sendo os medicamentos de origem vegetal de grande interesse para indústria farmacêutica (MONTANARI, 2001; PINTO *et al.*, 2002).

Todavia, é imprescindível o investimento em pesquisa de plantas medicinais, em vista que muitas destas espécies são utilizadas pela população sem nenhum esclarecimento sobre as atividades biológicas e os seus possíveis efeitos colaterais (BUSCHBACHER, 2000).

O presente estudo refere-se à *Vochysia thyrsoidea* Pohl., que foi selecionada devido seu uso medicinal e interesse quimiotaxonômico, com a finalidade de se identificar os componentes químicos e a realização de bioensaios.

Os extratos etanólicos foram preparados a partir das cascas do caule e das folhas deste vegetal, posteriormente realizaram-se o fracionamento e o isolamento dos constituintes químicos através de várias etapas cromatográficas.

Este trabalho proporcionou o isolamento dos metabólitos secundários de *V. thyrsoidea* que foram identificados através de técnicas espectrométricas de IV, RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC, HMBC e DEPT.

Foram realizados testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos brutos e partições para verificar presença de atividades biológicas. Os resultados significativos obtidos deste ensaio e as substâncias puras isoladas do estudo fitoquímico levaram a busca das possíveis atividades biológicas:

- i) Antitumoral: teste *in vitro* frente às células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon humano) e SF-295 (sistema nervoso central);

- ii) Ensaio de inibição enzimática frente à catepsinas B, uma enzima que tem uma participação fundamental na invasão de células cancerígenas;
- iii) Ensaio de inibição frente à catepsina K, uma enzima correlacionada às patologias: osteoporose, artrite reumatóide, artrose, aterosclerose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioensaio frente à *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água salgada e serve como alimento vivo para peixes (LIMA *et al.*, 2009). Esta espécie tem a habilidade de produzir náuplios e cistos. Os cistos apresentam diâmetro médio de 250 µm, podem ser armazenados a seco, suportando o vácuo. Os náuplios recém eclodidos possuem 450 µm de comprimento e uma *Artemia* adulta (Figura 2.1) possui corpo alongado, podendo medir cerca de 10 mm de comprimento (IGARASHI, 2008).

A utilização de camarão marinho (*Artemia salina*) em teste de letalidade (TAS) tem sido desde 1982 como bioensaio preliminar no estudo de plantas e compostos com potencial atividade biológica (PISUTTHANAN *et al.*, 2004).



Figura 2.1. *Artemia salina* na fase adulta

A utilização desta espécie para monitorar os estudos fitoquímicos deve-se a sua capacidade em formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo para testes de citotoxicidade (LIMA *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos na literatura trazem também uma correlação entre ensaios de toxicidade frente a esta espécie de microcrustáceo e atividades, como antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral, tripanossomicida, dentre outras. Além disso, o ensaio TAS é um método rápido e de baixo custo, cuja simplicidade favorece sua utilização em laboratórios de produtos naturais (SIQUEIRA *et al.*, 1998; PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005).

2.2 Cisteíno peptidases

A sequência completa do genoma humano, publicada em 2003 proporcionou a identificação de um total de 11 catepsinas do tipo cisteíno peptidases lisossomais, são elas as catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X, as quais têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos (TURK *et al.*, 2000; BROMME e KALETA, 2002).

Estas enzimas também estão envolvidas em um amplo número de processos fisiológicos, tais como ativação e desativação de enzimas e hormônios, sendo que algumas delas tem sido amplamente estudadas por ter correlação com o desenvolvimento de algumas doenças como: artrite reumatóide, osteoporose, artrose, aterosclerose (ZHAO *et al.*, 2009; YASUDA *et al.*, 2005), progressão de tumores malignos e metástase (SLOANE *et al.*, 1994; FUSETANI *et al.*, 1999), além de doenças infecciosas (KOMINAMI *et al.*, 1997).

Desta forma, o mecanismo de inibição enzimática tem sido promissor como uma estratégia inovadora no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

2.2.1. Catepsina B

A correlação de um nível crescente de cisteíno peptidases e alta atividade proteolítica em tecidos cancerígenos, tem sido relatados em pessoas com desenvolvimento de tumores. Diversos estudos *in vitro* realizados confirmaram que as catepsinas estão associadas às importantes fases de invasão e potencial de metástase de tumores malignos, incluindo o câncer de mama, ovário, próstata, pulmão, melanoma, dentre outros (HERSZÈNYI *et al.*, 1999; DEVETZI *et al.*, 2009).

A catepsina B (Figura 2.2) é a principal representante das cisteíno peptidases e está presente em lisossomos de todos os tipos de células sob condições normais. Esta enzima está envolvida em etapas proteolíticas para ativação de outras proteinases e na degradação de elementos da matriz extracelular tais como colágeno e elastina, tendo assim um papel fundamental na invasão de células cancerígenas (HERSZÉNYI *et al.*,1999; SIEWINSKI *et al.*,2003).

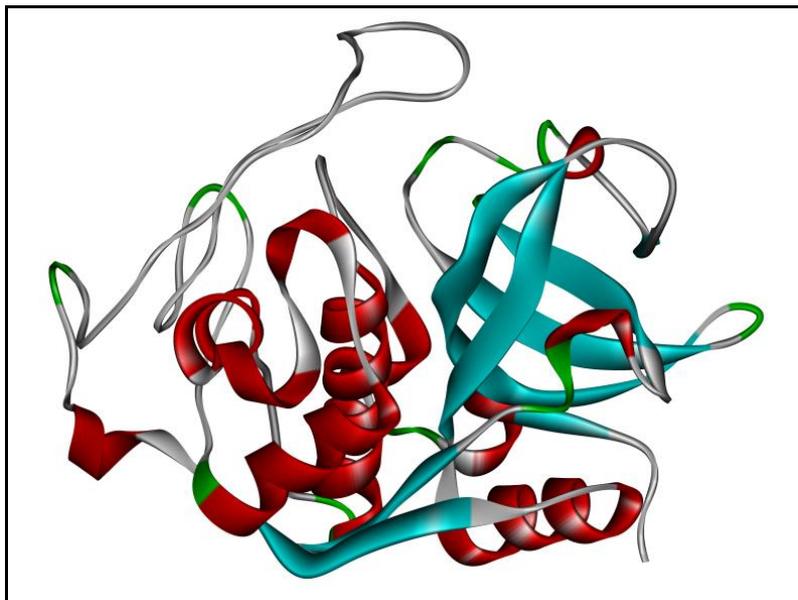


Figura 2.2. Catepsina B

Pesquisas demonstraram que a inibição *in vivo* das atividades da catepsina B, retarda o início de crescimento de tumores primários e diminuem a expressão de metástase de vários tipos de câncer *in vitro* e em modelos com animais (HAZEN *et al.*,2000). Desta forma, inibidores da catepsina B podem ser potenciais drogas anticancerígenas, principalmente em relação à metástase que é a maior preocupação dentro dos tratamentos quimioterápicos (FUSETANI *et al.*,1999).

Alguns trabalhos com produtos naturais demonstraram ser fontes potenciais de inibidores específicos, isolando constituintes tais como: as biflavonas (figura 2.3) isoladas de *Taxodium mucronatum* Ten. (Taxodiaceae) e *Cycas guizhouensis* K.M.Lan (Cycadaceae); e os derivados de pteridina isolados de *Asteropus simplex* Carter., apresentaram atividade inibitória frente a esta enzima (MURAYAMA *et al.*,2008; PAN *et al.*,2005; ZENG *et al.*,2006).

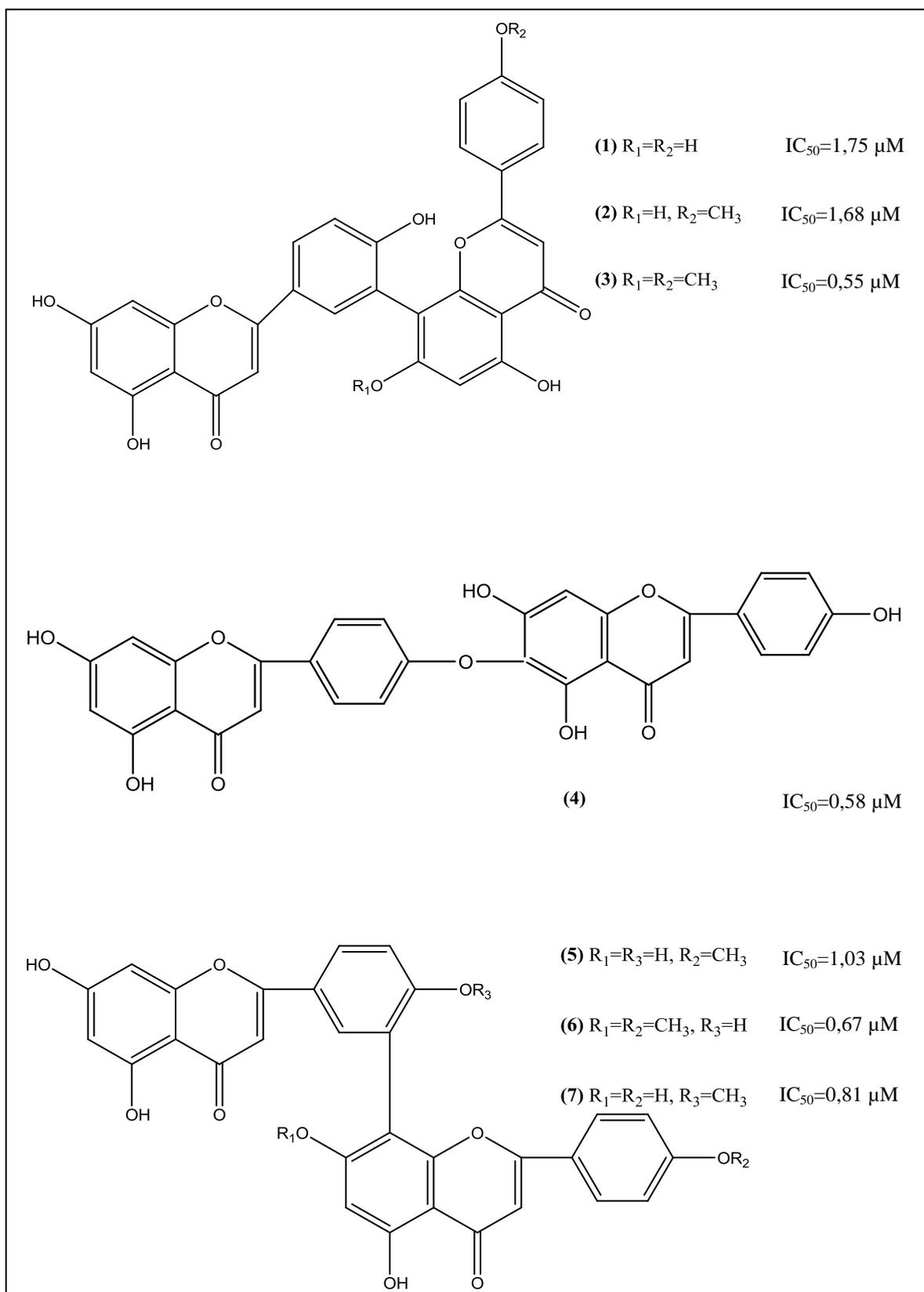


Figura 2.3. Substâncias com atividade inibitória frente à catepsina B

2.2.2. Catepsina K

A catepsina K (figura 2.4) é um membro da classe das cisteíno proteases, pertencente à família das papaínas e tem sido detectada em vários tecidos, incluindo ossos, ovário, coração, placenta, pulmão, músculo esquelético, cólon e no intestino delgado (ZHAO *et al.*,2009; TAKAHASHI *et al.*,2009).

Esta enzima é expressada altamente em osteoclastos que medeiam à reabsorção óssea e está relacionada com algumas patologias tais como, osteoporose, artrite reumatóide, artrose, aterosclerose. Na osteoporose, a liberação da catepsina K provavelmente provoca a lesão tecidual, pois esta catepsina é secretada pelos osteoclastos para remover a matriz orgânica, degradando uma série de proteínas (ex: colágeno tipo 1) (ZHAO *et al.*,2009).

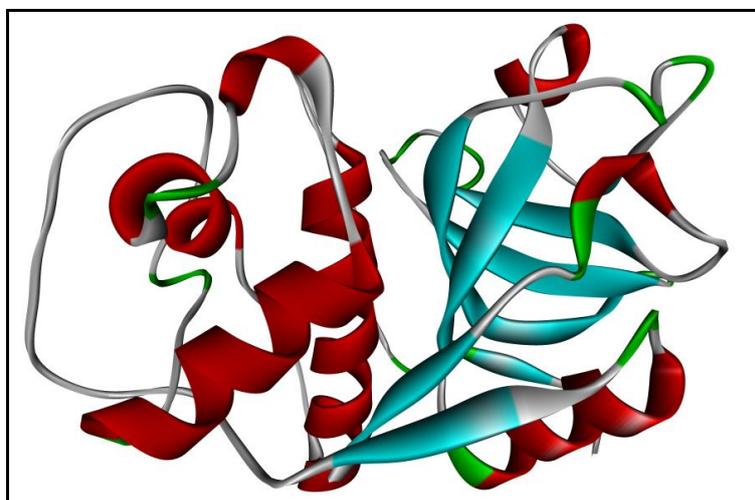


Figura 2.4. Catepsina K

A osteoporose pós-menopausa é caracterizada pelas alterações na remodelação óssea, com um desequilíbrio entre a excessiva reabsorção óssea e a formação óssea inadequada. Atualmente, o tratamento da osteoporose baseia-se na utilização de inibidores de reabsorção óssea e mais especificamente, os bisfosfonatos, o ranelato de estrôncio e os estrógenos (durante a terapia de reposição hormonal) (ROUX, 2010; CHAPPARD *et al.*,2010).

Assim, encontrar inibidores específicos para catepsina K pode providenciar tratamentos benéficos para tais processos patológicos (ZHAO *et al.*,2009; ROUX, 2010).

Alguns metabólitos secundários isolados de plantas apresentaram significativa atividade inibitória frente à catepsina K, os quais podem-se citar as furanoquinonas (11-14) isoladas de *Paulownia tomentosa* Thunb., o derivado de flavonóides (8), a chalcona (9) e flavonas isolados de *Artocarpus altilis* (Park.) Fosb. (Moraceae) e derivados de alcalóides (10) (figura 2.5) (PATIL *et al.*,2002; PARK *et al.*,2009).

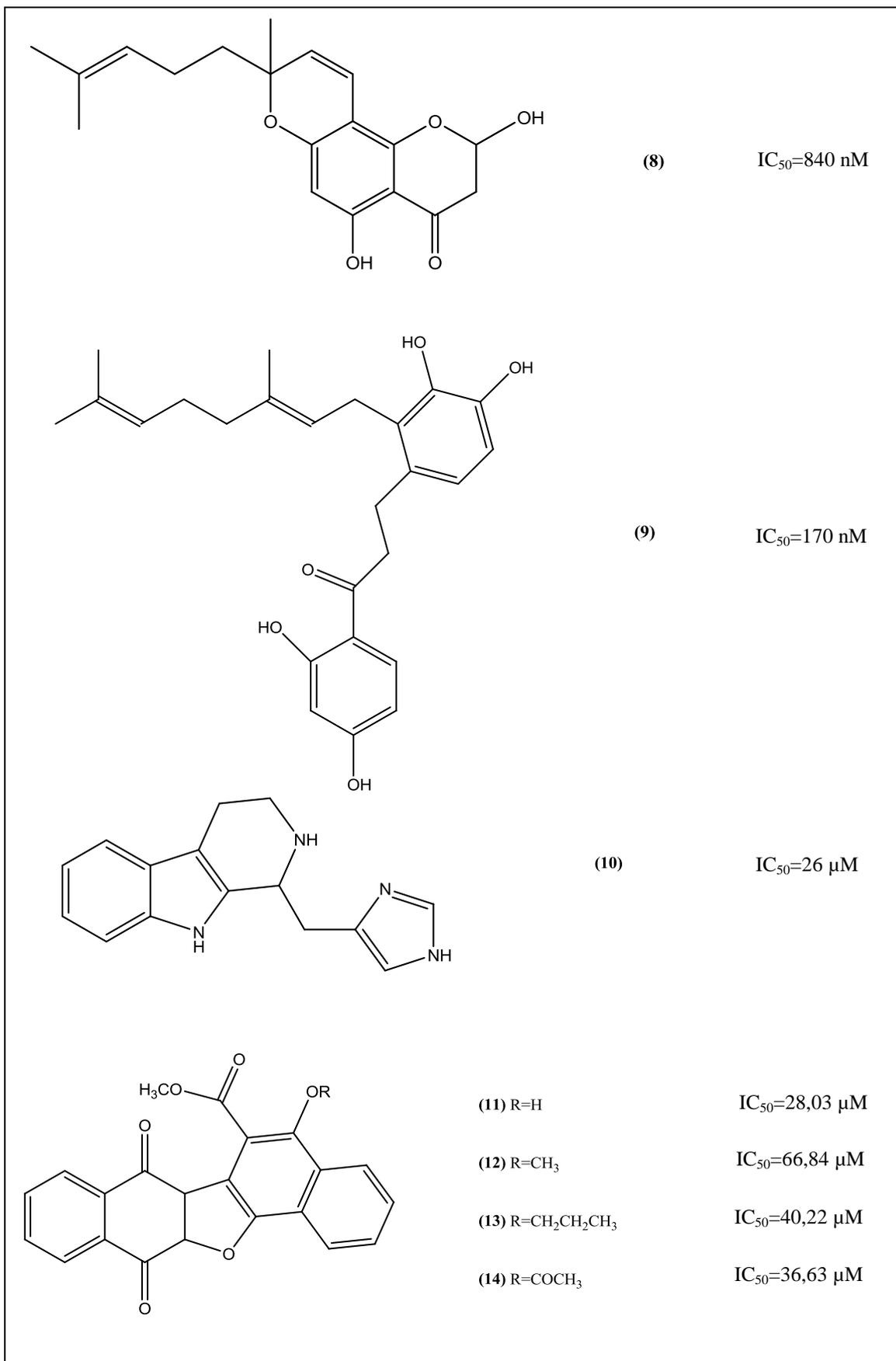


Figura 2.5. Substâncias com atividade inibitória frente à catepsina K

2.3. Câncer

O câncer é um dos mais antigos males da humanidade e ainda é no mundo um grande problema de saúde pública. As estimativas para o ano de 2010 e 2011 é que no Brasil ocorrerão aproximadamente 490 mil casos novos de câncer, onde os mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão em homens, e os cânceres de mama e de colo do útero em mulheres (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Apesar do câncer ser uma doença genética, a prevalência das formas mais significantes de câncer se tornou mais elevada nos países onde existem fatores de risco como o fumo, hábitos alimentares pouco saudáveis e exposição a produtos químicos e agentes físicos carcinogênicos no trabalho ou no meio ambiente, mostrando o efeito dos inúmeros carcinógenos ambientais (WARD, 2002).

As terapias contra o câncer apresentam atualmente um dilema, pois embora a maioria dos pacientes respondam à terapia, apenas alguns ficam definitivamente curados. Apesar de haver hoje uma grande quantidade de agentes quimioterápicos, este tipo de tratamento resulta em vários tipos de toxicidade que tornaram um problema significativo no tratamento do câncer. Um exemplo é o 5-fluorouracil, um agente quimioterápico comum que é conhecido por causar cardiotoxicidade e mielotoxicidade. De forma similar a bleomicina causa toxicidade pulmonar e cutânea. Além disso, os quimioterápicos e as demais estratégias usadas para eliminar a parte visível do tumor, não conseguem eliminar na totalidade o câncer (DUEÑAS *et al.*, 2010; DESAI *et al.*, 2008).

Contudo, novas substâncias que possam vir a ser mais promissoras no tratamento desta doença são buscadas e neste aspecto as plantas são uma fonte considerável de compostos químicos com potencial atividade antitumoral (MANOSROI *et al.*, 2006).

Há um grande número de constituintes químicos com atividade biológica sendo identificados em estudos fitoquímicos e dentre estes, potentes inibidores tumorais, como os que foram purificados a partir de extratos metanólicos de *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Languas galanga* (L.) Willd. (Zingiberaceae) e *Citrus hystrix* DC. (Rutaceae). Muitas plantas medicinais continuam a ser avaliadas em termos de possíveis efeitos citotóxicos tais como *Cymbopogon citratus* D.C., *Ocimum sanctum* Linn. (manjeriçã), e *Ocimum basilicum* L. dentre muitas outras (MANOSROI *et al.*, 2006; DESAI *et al.*, 2008).

O camptothecine (figura 2.6) é um exemplo de composto isolados da planta *Mappia foetida* Miers., que apresentou ser um potente fármaco quimioterápico usado no tratamento da leucemia (DESAI *et al.*, 2008).

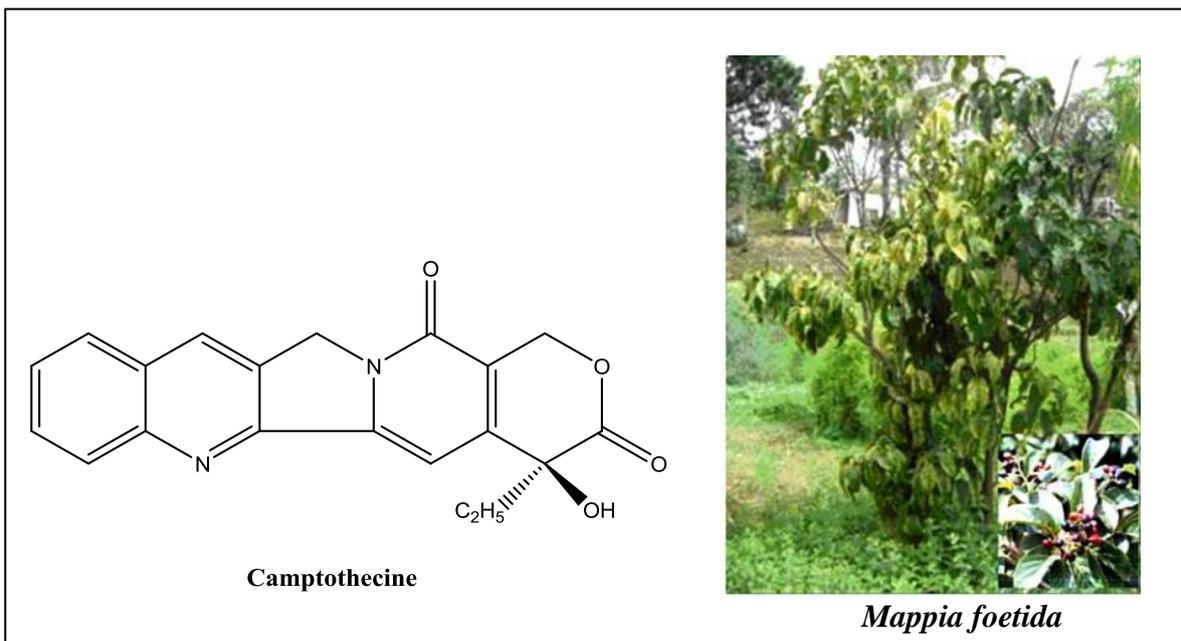


Figura 2.6. Camptothecine isolado de *Mappia foetida* Miers.

O constituinte químico isolado de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, o andrographolide (figura 2.7) tem significativa atividade anticancerígena, visto em teste *in vivo* a inibição da proliferação de células tumorais sem nenhum sinal de toxicidade em ratos, mesmo com doses relativamente altas. E os compostos, curcumina isolada de *Curcuma longa* Linn. e as lignanas (figura 2.8) isoladas da fração hexânica do extrato de *Phyllanthus amarus* Linn., também tiveram em testes *in vitro* efeitos antitumorais (DESAI *et al.*, 2008).

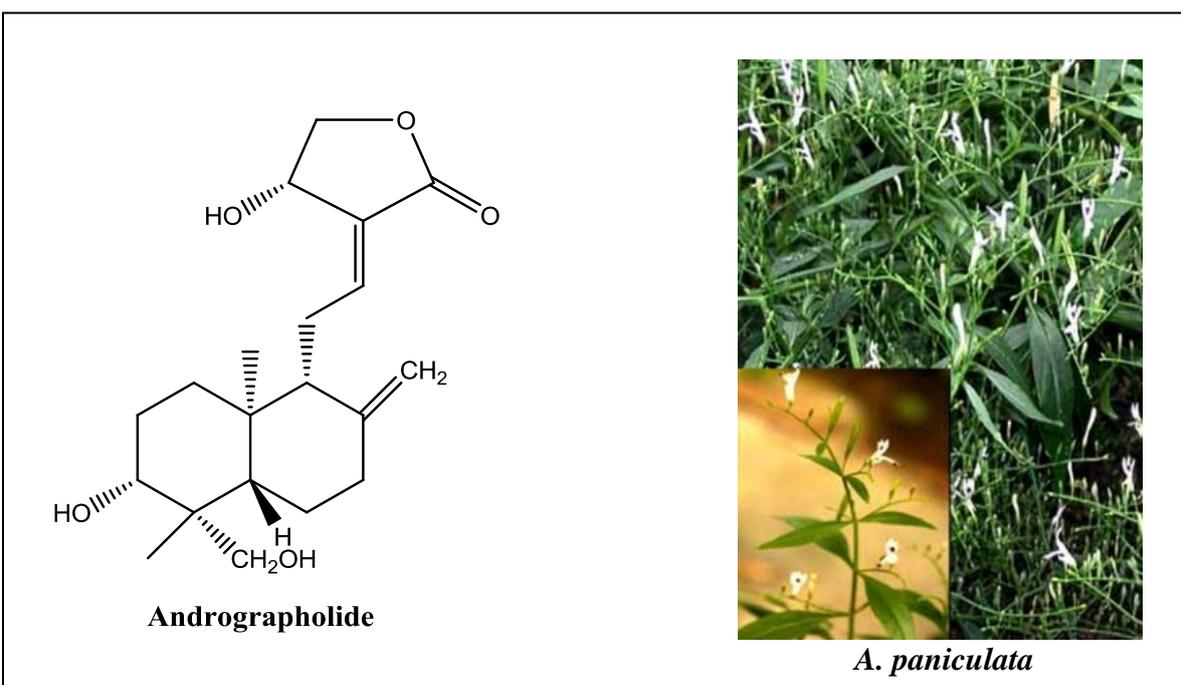


Figura 2.7. Andrographolide isolado de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees

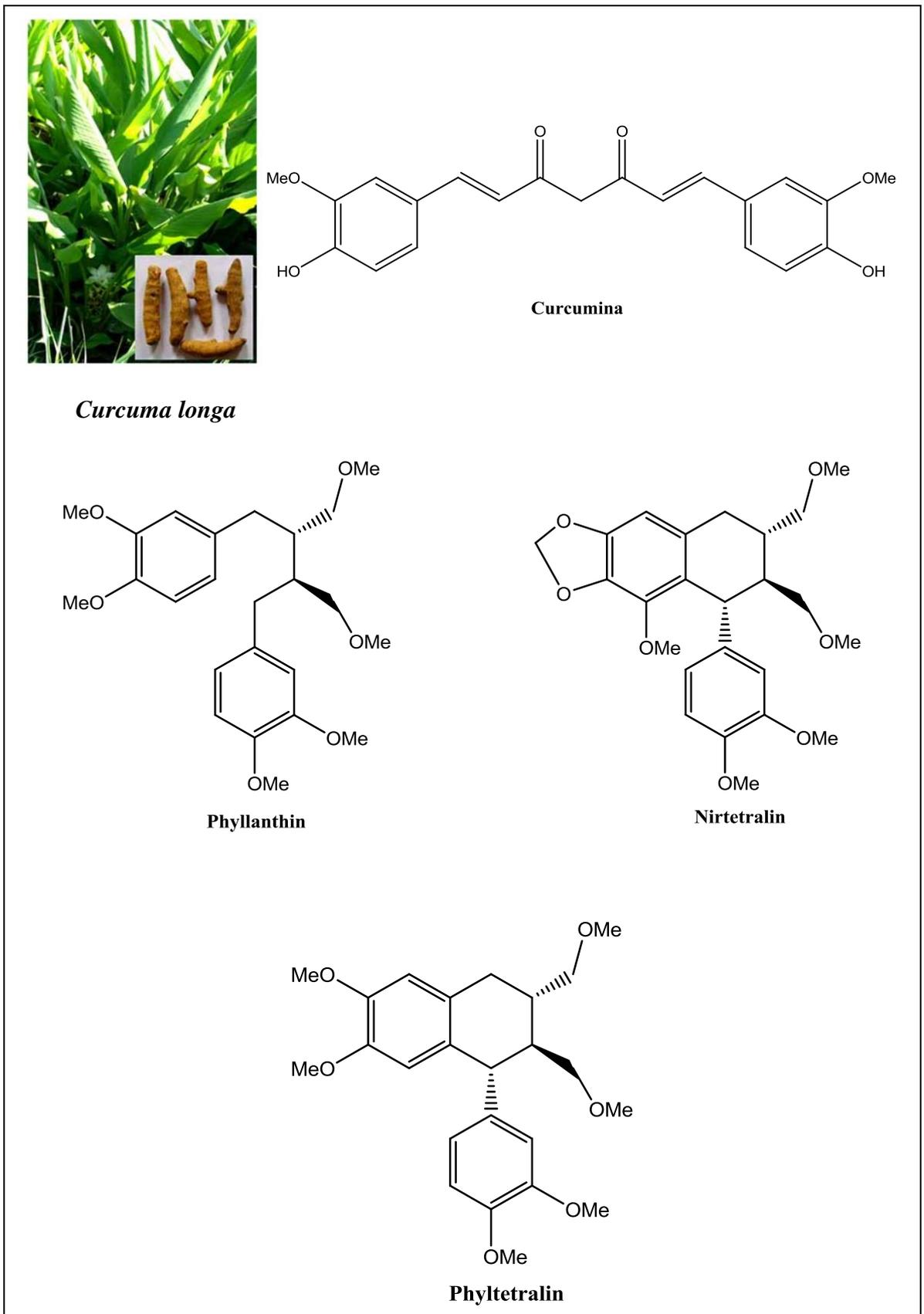


Figura 2.8. Curcumina isolada de *Curcuma longa* e lignanas isoladas de *Phyllanthus amarus*

2.4. Flavonóides

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, com uma estrutura base de dois anéis fenil –A e B– ligados através de um anel pirano –C, no qual baseado no grau de oxidação e saturação no anel heterocíclico –C dos flavonoides, podem ser divididos em grupos como segue a figura 2.9 (GROTEWOLD, 2006).

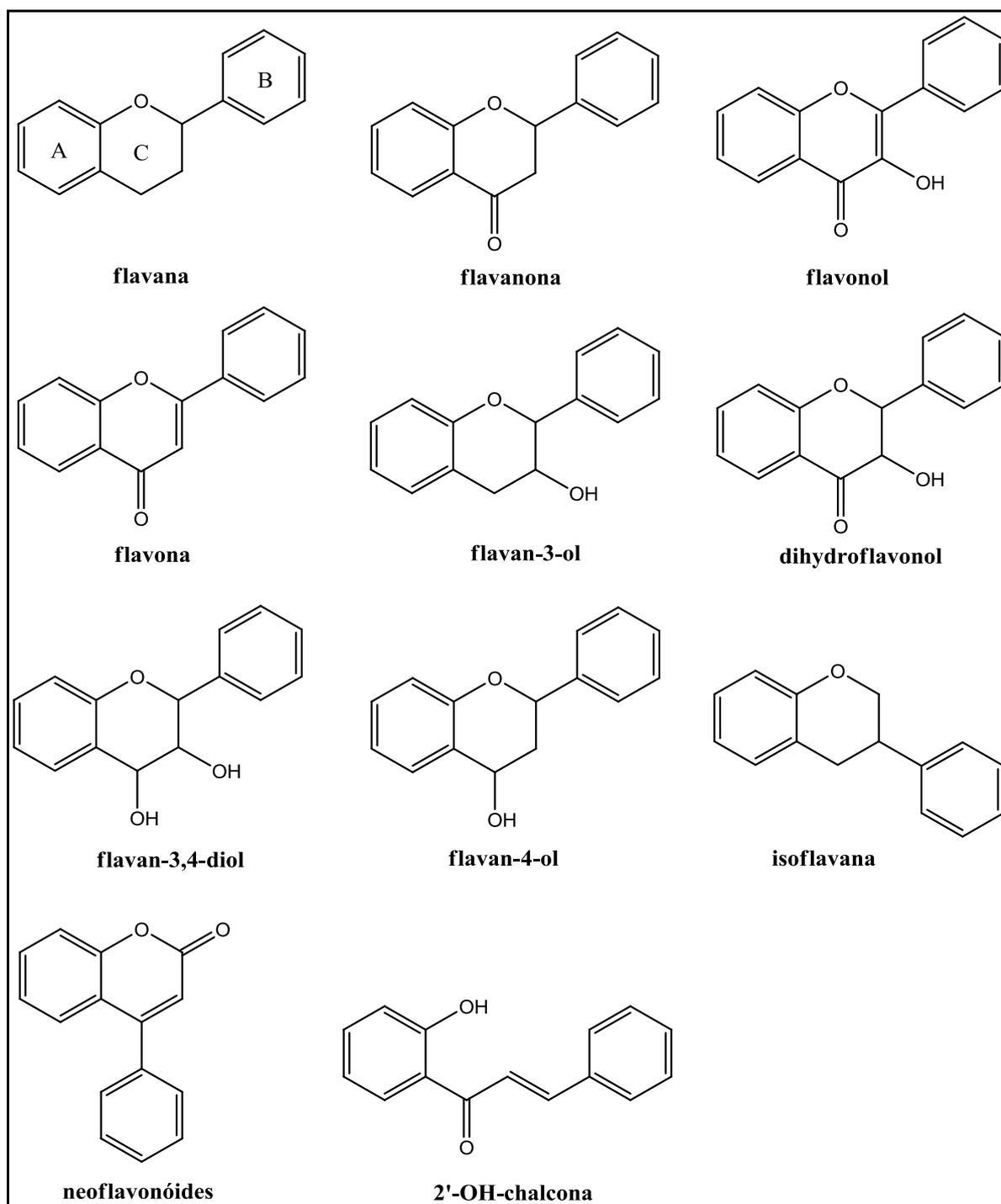


Figura 2.9. Classificação dos flavonóides

Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários de plantas, que derivam da combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido shiquímico) e ácido acético. Estes derivados são uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA que se condensam formando as chalconas, a partir da qual todos os flavonóides são formados (HUBER e AMAYA, 2008; DEWICK, 2002).

Estas moléculas são encontradas como pigmentos naturais em vegetais e além de desempenharem um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, várias outras atividades têm sido atribuídas a estas moléculas, tais como a inibição de proliferação celular, atividade estrogênica, anti-inflamatória, antifibrótica, anticoagulante, antibacteriana, antioxidante, antitumoral e antihipertensiva (HUBER e AMAYA, 2008; DEWICK, 2002).

2.5. Triterpenóides

Existem pelo menos cerca de 4000 triterpenóides conhecidos encontrados na natureza, a maioria deles facilmente encontrados em muitas plantas. Os triterpenóides são moléculas derivadas do esqualeno, um hidrocarboneto com 30 átomos de carbono e estão dotadas de atividades farmacológicas (CUNHA, 2005).

Assim como os flavonóides, cumarinas e alcalóides os triterpenos são metabólitos secundários provenientes da biossíntese e são encontrados em muitos constituintes amargos, os quais o sabor existente em plantas admite-se inibir os herbívoros de as comer. Eles podem ser tetracíclicos ou pentacíclicos, geralmente estes compostos são encontrados ligados a oses pela hidroxila em C₃, originando heterósidos (glicosídeos de terpenos) conhecidos como saponinas (CUNHA, 2005).

Os triterpenóides são divididos em famílias (CUNHA, 2005):

-Esqualeno: estrutura linear, encontrado no azeite e nos tubarões;

-Policíclicos: estrutura pentacíclica, encontrados nas plantas (oleanano, ursano, lupano e hopano).

Os triterpenóides em geral apresentam propriedades medicinais com grandes potencialidades em atividades biológicas, como: anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésico, antitumoral, dentre outras. Devido a sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades, principalmente: ácido betulínico, betulina, lupeol, ácido ursólico e oleanólico (CONNOLY e HILL, 2002).

A betulina é um triterpeno encontrado em maior abundância na natureza e juntamente com os seus derivados são excelentes emulsificantes para sistemas óleo/água, sendo utilizados como componente na fabricação de cosméticos em pó, condicionadores e shampoo. Os ésteres de betulina além de serem usados na produção de cosméticos, também podem ser usados como plastificantes para PVC (PATOCKA, 2003).

Além destas propriedades é interessante ressaltar as atividades biológicas apresentadas por estes triterpenos pentacíclicos, onde vários experimentos realizados trazem resultados significantes para betulina e o lupeol (Figura 2.10) quanto à atividade anti-inflamatória (PATOCKA, 2003; GEETHA e VARALAKSHMI, 2001).

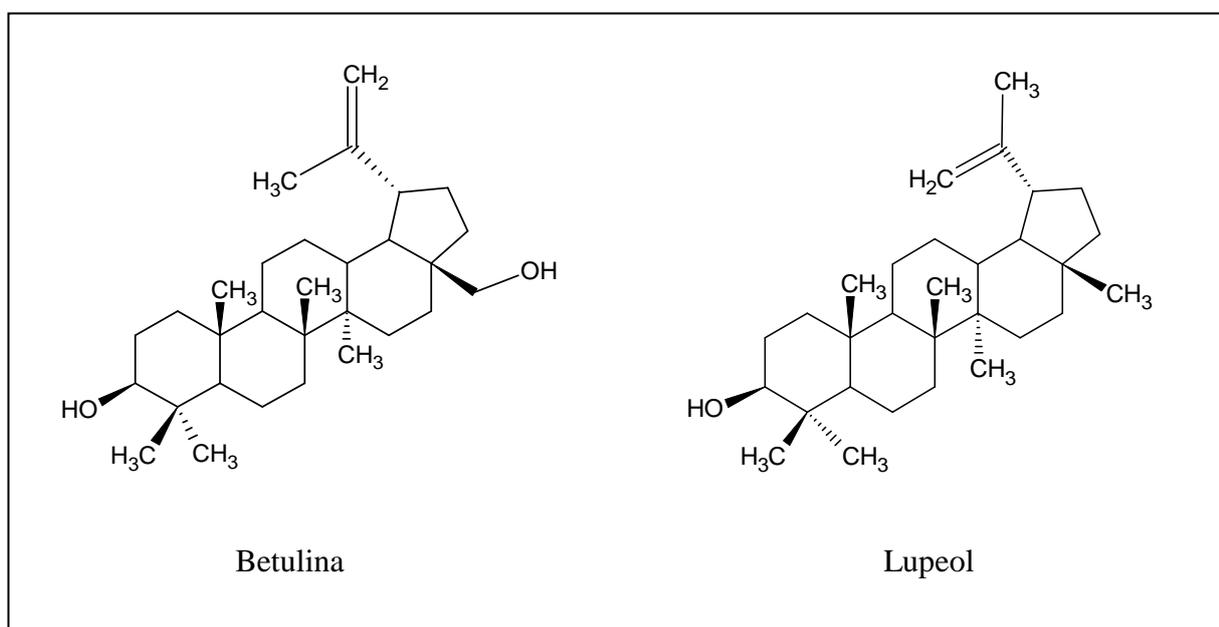


Figura 2.10. Triterpenos com atividade anti-inflamatória

Os ácidos madasiático e asiático (Figura 2.11), são triterpenos isolados de *Centella asiatica* (Apiaceae), que associado a estruturas similares são usados em alguns países, inclusive no Brasil, em preparações de uso tópico e interno (Madecassol®). Em seu emprego farmacêutico através de preparações magistrais e cosméticas, são usados como cicatrizante em queimaduras e no tratamento de insuficiência venosa crônica (YU *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2007; JAMES e DUBERY, 2009).

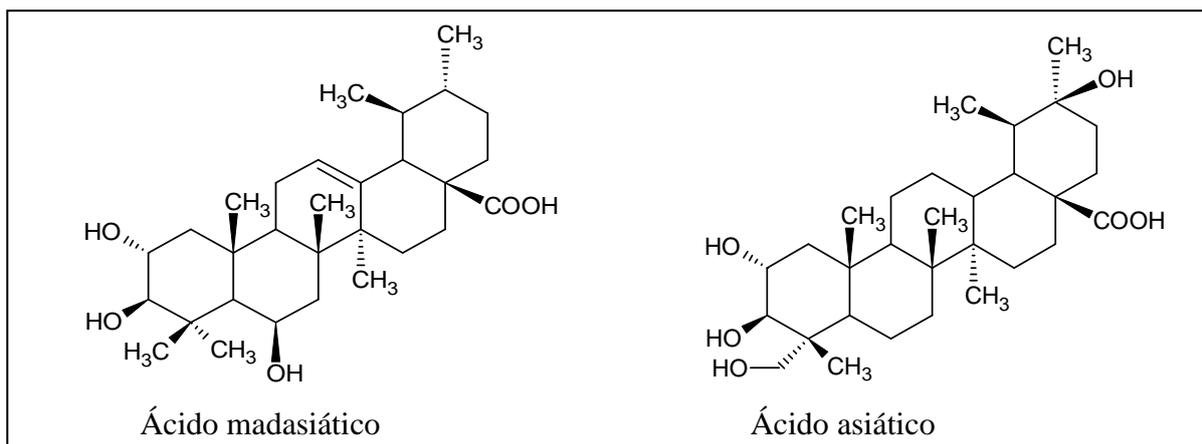


Figura 2.11. Triterpenos usados em aplicações cosméticas e magistrais

O ácido betulínico (Figura 2.12) é encontrado em pequenas quantidades em diversas espécies de plantas, mas pode ser quimicamente obtido da betulina. Este é um dos compostos mais potentes biologicamente e dentre as suas propriedades temos a ação anti-inflamatória e antitumoral. Investigações sobre o potencial citotóxico para células de melanoma cancerígenas demonstraram que este ácido além de inibir o crescimento de células malignas, também provoca a autodestruição das mesmas (apoptose) (PATOCKA, 2003).

O ácido euscáfico, ácido tormêntico e ácido 2 α - e 3 β -acetil-tormêntico (Figura 2.12) também são exemplos de triterpenos com atividade antitumoral. Estes ácidos foram avaliados quanto à citotoxicidade em linhagens de células leucêmicas, revelando-se o potencial como fontes para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas (ROCHA *et al.*, 2007).

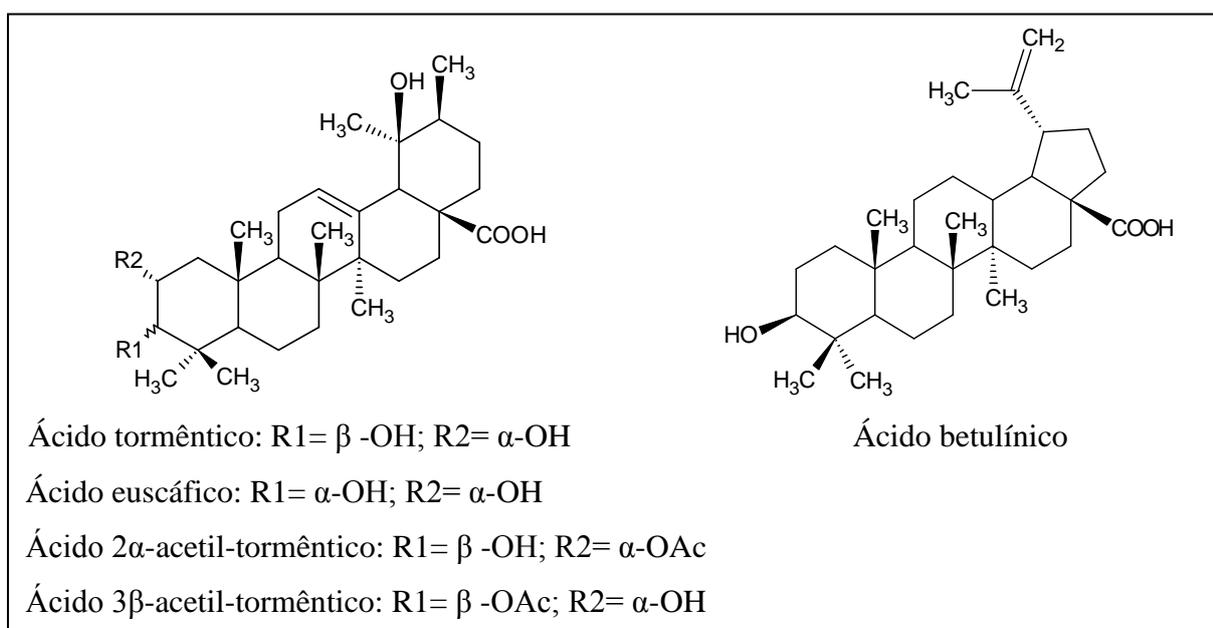


Figura 2.12. Triterpenos com atividade antitumoral

2.6. A família Vochysiaceae

A família Vochysiaceae é constituída por árvores tropicais de duas tribos, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies. Destas, a tribo Erismae contém dois gêneros, chamados *Erismadelphus* (3 espécies) e *Erisma* (20 espécies), enquanto a tribo Vochysieae é composta de quatro gêneros; *Callisthene* (10 espécies), *Qualea* (60 espécies), *Salvertia* (1 espécie) e *Vochysia* (105 espécies) (MAYWORM e SALATINO, 2002).

No Brasil ocorrem sete gêneros e 150 espécies, e há diversos estudos fitoquímicos sendo realizados principalmente do gênero *Vochysia*. Estes estudos químicos caracterizam esta família com a presença de ácidos graxos, triterpenóides, flavonóides e taninos (KHALIL *et al.*, 2006).

2.7. O gênero *Vochysia*

O gênero *Vochysia* contém 105 espécies e está composto de árvores e arbustos sendo encontrado frequentemente no Cerrado brasileiro. Através dos estudos fitoquímicos relatados das espécies deste gênero, pode-se notar que são abundantes fontes de terpenos, que apresentam propriedades farmacológicas. Devido a sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (CONNOLLY e HILL, 2002).

Várias espécies do gênero *Vochysia* possuem propriedades medicinais, como exemplo a *Vochysia tucanorum* Mart., planta medicinal usada no Cerrado brasileiro contra problemas gástricos, que revelaram esta ação farmacológica gastroprotetora provavelmente devido à presença de triterpenóides (GOMES C. *et al.*, 2008).

A espécie *Vochysia divergens* Pohl. também é usada na medicina popular contra infecções e asma. Dentre as substâncias isoladas desta espécie, temos o ácido betulínico, ácido divergióico, ácido sérico, 24-hidroxitormêntico, o éster (28→1) β-Dglucopiranosílico derivado do 24-hidroxitormêntico e o β-sitosterol (Figura 2.13) (HESS *et al.*, 1999).

HESS *et al.* (1995), estudaram as propriedades antibacterianas destes constituintes isolados das cascas do caule de *V. divergens* Pohl., os quais, tiveram ação contra *Escherichia coli*. O ácido sérico apresentou ainda, atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexinere* e especialmente ação sobre *Streptococcus sp.*.

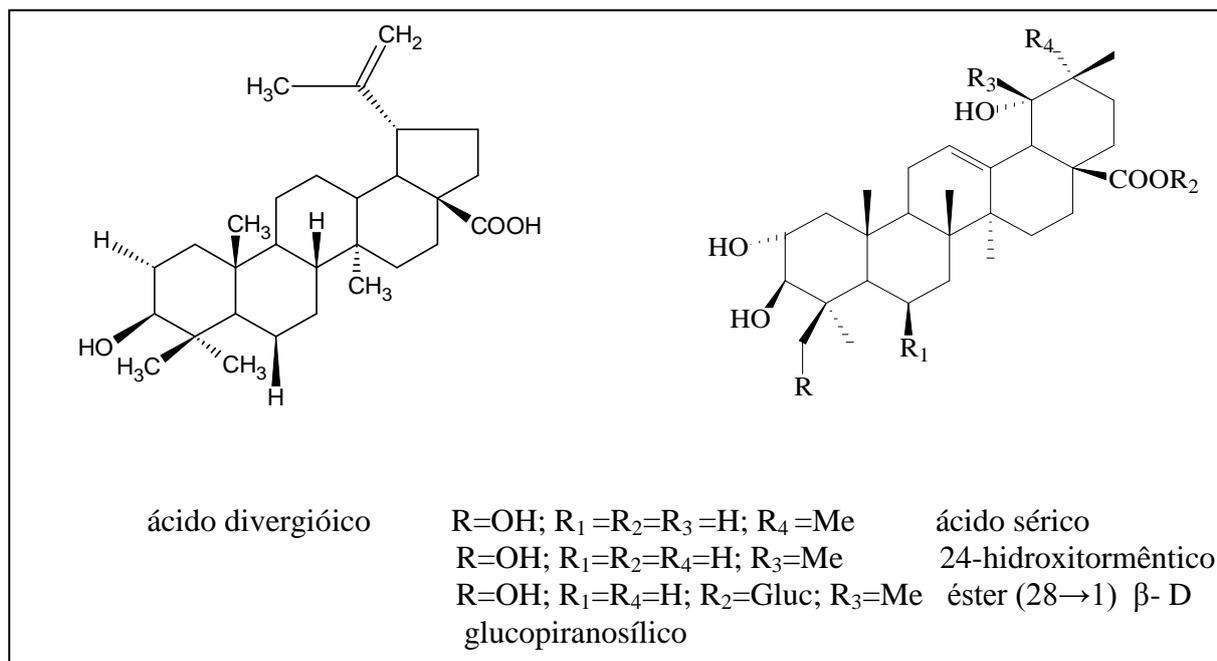


Figura 2.13. Ácidos triterpênicos de *Vochysia divergens* Pohl.

Outros terpenos isolados por ARAÚJO e SOUZA (1990), através do estudo da *Vochysia vismiaefolia* Spruce foram o ácido vismiaefólico e ácido bartogênico (Figura 2.14).

KHALIL *et al.* (2006)., fizeram estudos de diferentes extratos de *Vochysia discolor* Mart., e verificaram um potencial de atividade antioxidante na contenção de radicais livres, sendo que os antioxidantes naturais podem apresentar outras propriedades farmacológicas.

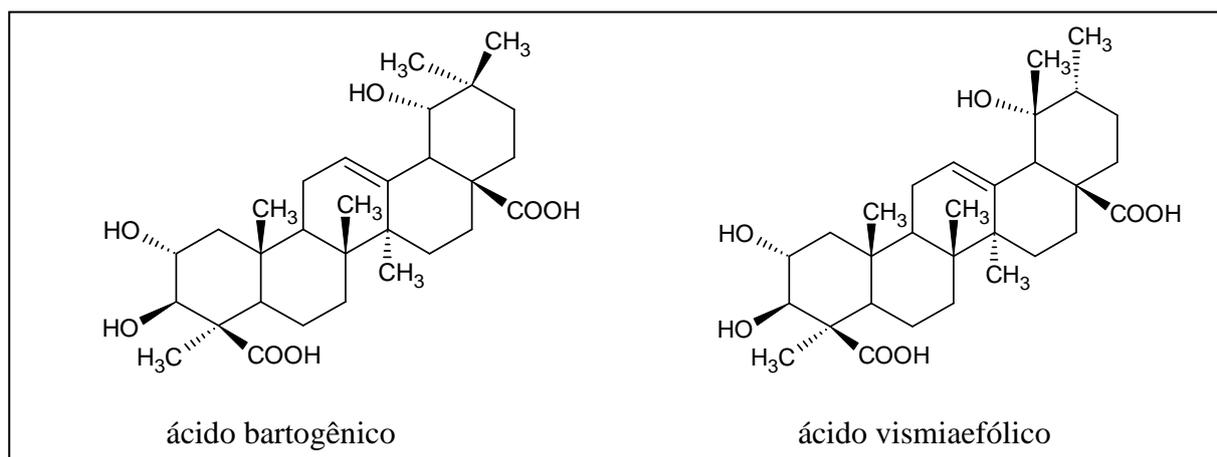


Figura 2.14. Ácidos triterpênicos de *V. vismiaefolia* Spruce

Outra planta deste mesmo gênero é a *Vochysia ferruginea* Mart., cujos ensaios realizados com extrato metanólico das folhas apresentaram resultados significativos quanto às atividades anti-inflamatória e analgésica (CALDERÓN *et al.*, 2001).

O estudo fitoquímico das folhas e frutos de *V. ferrugínea* Mart., revelaram também um novo ácido triterpenóide pentacíclico, o ácido 2 α ,3 β ,6 β -trihidroiolean-12-en-28-óico (ácido 6 β -hidroximaslínico), dentre outros compostos como, ácidos ursólico e oleanólico, β -sitosterol-glucosídeo, uvaol e eritrodíol (Figura 2.15) (ZURACO *et al.*, 2000; ARAÚJO e CHAVES, 2005).

Diversas plantas de uso tradicional que contêm estes ácidos triterpênicos possuem atividades como anti-inflamatória, hepatoprotetora, analgésica, cardiotônica e sedativa, sendo muitos destes usos comprovados cientificamente. Além destas atividades, estes ácidos apresentam atividade antitumoral, sendo os esqueletos oleano e ursano interessantes farmacóforos na busca de novos agentes para terapia oncológica (VECHIA *et al.*, 2009).

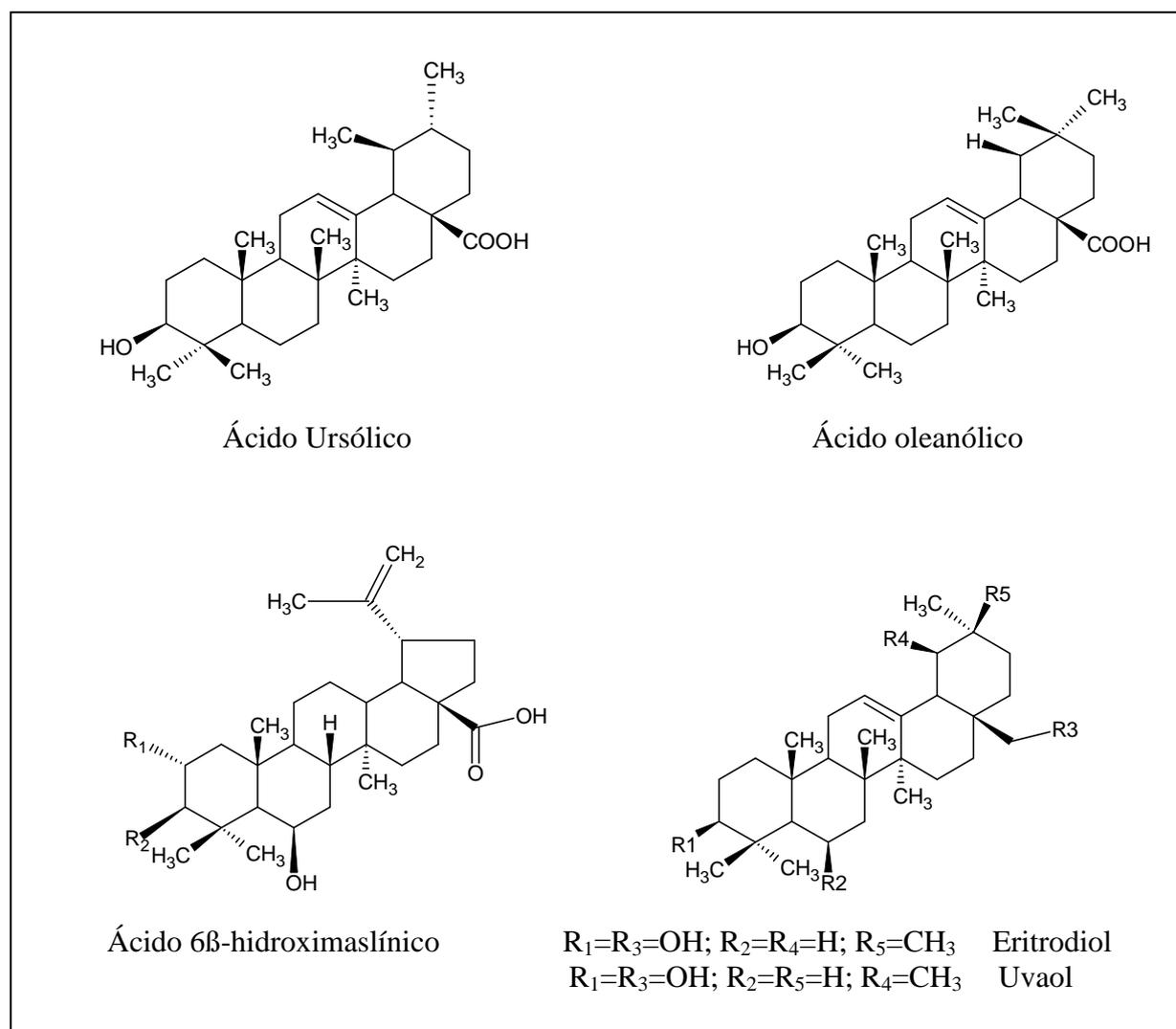


Figura 2.15. Ácidos triterpênicos de *V. Ferruginea*

2.8. A espécie *Vochysia thyrsoidea*

A espécie *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (figura 2.16) é encontrada em abundância no cerrado brasileiro e campos cerrados de altitude, desde o Ceará, Bahia até São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Popularmente esta planta é conhecida por nomes comuns como: gomeira, pau-de-goma, casca-doce, árvore do vinho, vinheiro-do-campo, goma-arábica, gomeiro-de-minas, goma-arábica-da-lagoa-santa e pau-d'água (SILVA, 2005; LORENZI, 1998).

Esta planta possui tronco grosso (figura 2.17) revestido de ritidoma espesso e rimoso com casca escura, fendida longitudinalmente, com diâmetro de 20-40 cm, sendo uma das árvores mais altas do cerrado. O fuste retilíneo às vezes contorcido pode atingir até 12 m de altura (LORENZI, 1998).



Figura 2.16. Foto de *Vochysia thyrsoidea*



Figura 2.17. Tronco de *V. thyrsoidea*

As folhas são simples, rígidas, coriáceas, verticiladas, oblongas ou elípticas em número de três a cinco por verticilo. Inflorescências em ráceros terminais com flores amarelas, florescem durante os meses de novembro-dezembro, e os frutos amadurecem em agosto-

setembro. A *V. thyrsoidea*, fornece através da exudação do tronco uma substância adesiva muito mais aglutinante que a goma arábica (LORENZI, 1998).

Os frutos secos são empregados no artesanato, à seiva fermentada é consumida como vinho. A goma, os frutos e sementes alimentam a fauna. Na medicina popular é usada como expectorante (SILVA, 2005).

Na literatura há trabalhos sobre a caracterização anatômica e química da madeira de *V. thyrsoidea*, especificando suas características morfológicas e também existe uma abordagem quanto à alta viscosidade da goma desta espécie em comparação com outras espécies, determinando os polissacarídeos presentes na goma (WAGNER *et al.*, 2008).

Dos estudos fitoquímicos apenas foi encontrado um levantamento do doseamento de fenóis totais do extrato alcoólico das folhas desta espécie, pelo método de Folin-Ciocalteu e o ensaio de precipitação de proteínas para a quantificação de taninos pelo método de Hagerman e Butler (1978). A concentração de fenóis totais para VT relatada foi em média $2,11 \text{ mg.ml}^{-1}$ ou 4,22%, e a concentração de taninos foi de $0,13 \text{ mg.ml}^{-1}$ ou 0,52% (JACOBSON *et al.*, 2007).

E em relação à caracterização química dos constituintes desta espécie encontrou-se o isolamento de dois ácidos elágicos e da 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (figura 2.18) (CORRÊA *et al.*, 1975).

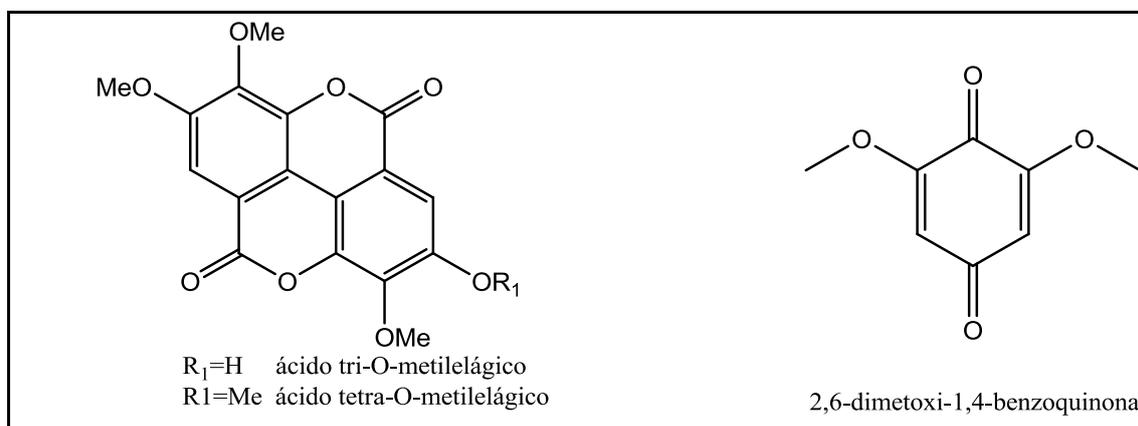


Figura 2.18. Constituintes de *V. thyrsoidea*

Neste contexto, ressaltamos a importância de se estabelecer uma relação entre a composição química e atividades biológicas da espécie *Vochysia thyrsoidea*, a fim de validar o seu efeito medicinal, bem como a segurança do seu uso.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Material botânico

- Folhas e cascas do caule da planta *Vochysia thyrsoidea*

3.1.2 Materiais e soluções

Materiais cromatográficos

- Cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254 MERC
- Sílica gel 60 (230 – 700 Mesh) – MERCK
- Sílica gel 60 (60 – 200 Mesh) – MERCK
- Sílica gel 60 (230-400 Mesh) – ACROS ORGANICS
- Sephadex LH20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

Solventes usados no isolamento e identificação dos compostos

- Solventes deuterados para RMN (ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL – CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES)
- Solventes para uso cromatográfico (QHEMIS, NEON, DINÂMICA, VETEC): etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e n-butanol.

Reveladores de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA)

- Solução de vanilina
- Lâmpada na região do UV (254 e 365 nm)

Soluções usadas nos testes biológicos

- Solução Salina (para hemólise)
- Solução de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$)
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- DET (ditioeritritol)

Reagentes usados na acetilação

- 4-(dimetilamino)-piridina - DMAP(QHEMIS)
- Anidrido acético P.A. (VETEC)

3.1.3. Equipamentos e materiais

- **Espectrofluorímetro:** leitor de placa de ELISA: Molecular Devices Corporation – Spectra MAX GEMINI XS.
- **Evaporadores rotativos (BUCHI)**
- **Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN):** aparelhos da BRUKER modelo ARX 200 MHz e DRX 400 MHz.
- **Espectrômetro de infravermelho (IV):** BOMEM modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna (uso de pastilhas de KBr).
- **Moinho de facas tipo cróton Modelo MA-580**

3.2 Metodologia do estudo fitoquímico

3.2.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas e cascas do caule da planta *Vochysia thyrsoidea*, foram coletadas no mês de março de 2010, na Serra dos Pirineus, Pirenópolis-GO, Brasil e identificadas pela Prof^a Dr^a Mirley Luciene dos Santos.

Uma exsicata (n^o7051) foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Goiás, campus Henrique Santillo.

3.2.2 Obtenção do extrato

O material foi previamente pesado, rotulado e armazenado. As folhas e cascas foram secas em uma estufa a 40°C durante três dias e depois moídas em moinho de facas.

Posteriormente, as amostras secas e moídas foram pesadas e colocadas em erlenmeyers com etanol 95% por 3 dias para a extração. O extrato bruto concentrado foi obtido com a evaporação do solvente em um rotoevaporador sobre pressão reduzida, a temperatura de 40°C nas quantidades descritas nos fluxogramas (figura 3.1 e 3.2).

Foi realizado o fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas de *V. thyrsoidea* usando coluna cromatográfica, recheada com celulose microcristalina D como fase estacionária, obtendo-se as frações especificadas na Figura 3.1.

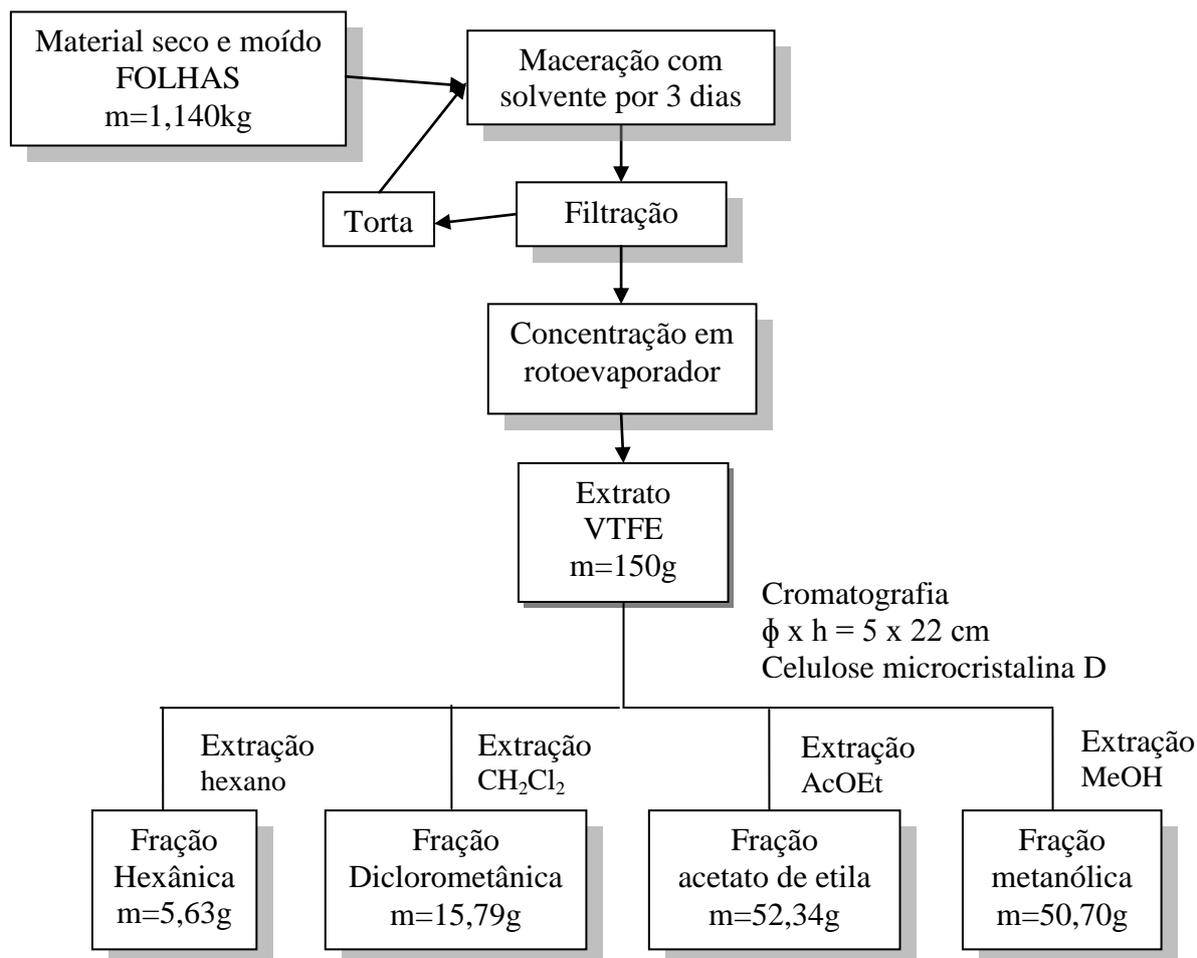


Figura 3.1. Partição do extrato bruto das folhas

O extrato bruto etanólico das cascas do caule foi fracionado usando a técnica de partição líquido-líquido e obteve-se as frações apresentadas na Figura 3.2.

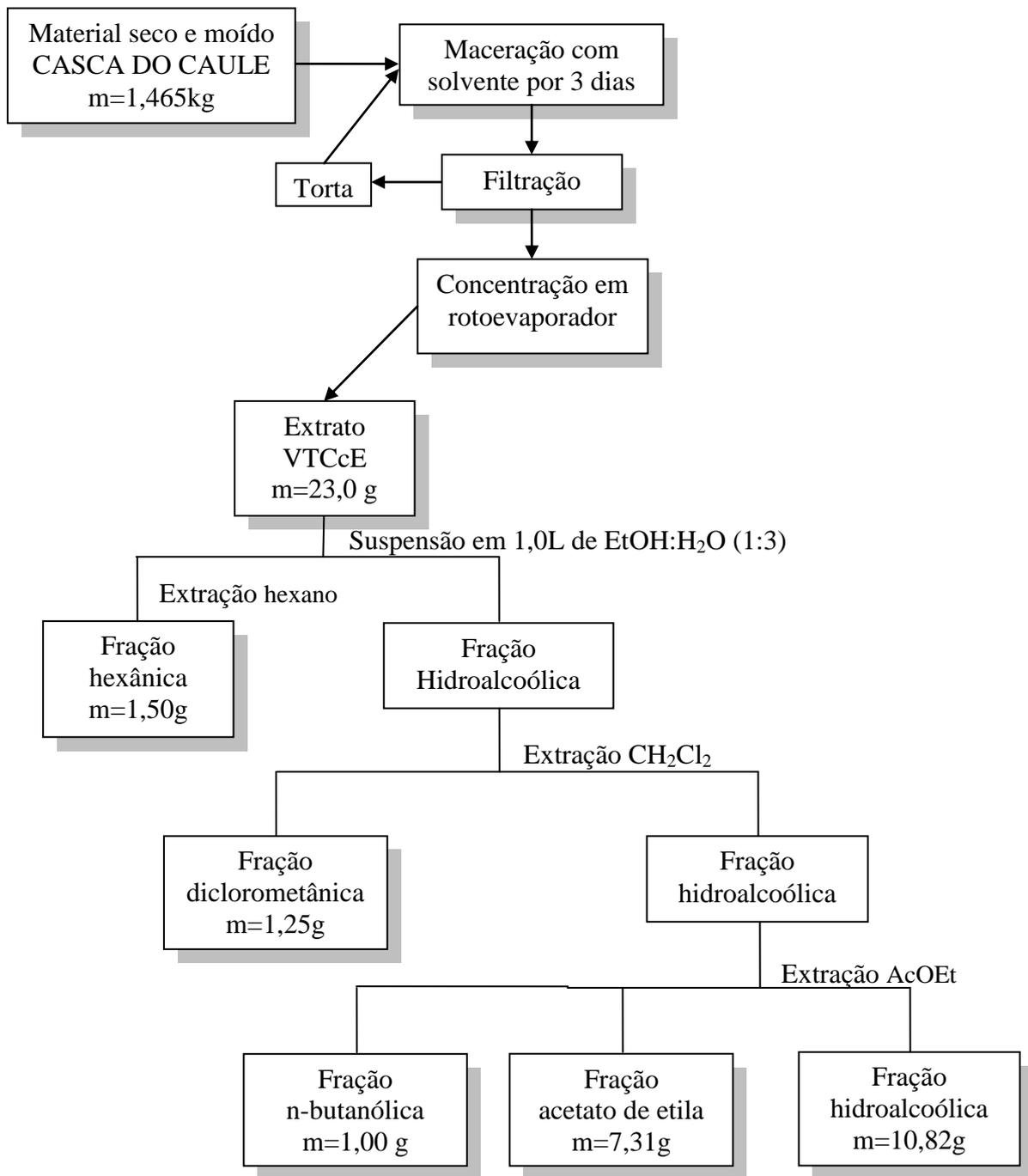


Figura 3.2. Partição do extrato bruto da casca do caule

3.2.3. Isolamento dos constituintes químicos de *V. thyrsoidea*

A partir da obtenção de um espectro de RMN de ^1H das 4 frações obtidas do extrato etanólico das cascas do caule de *V. thyrsoidea* (VTCcE), a fração de acetato de etila (VTCcA) foi escolhida para estudo devido a presença de sinais interessantes, sendo alguns destes sinais relacionados a presença de flavonoides.

3.2.3.1. Estudo fitoquímico de VTCcEA

A fração de acetato de etila (VTCcEA) foi submetida a etapas cromatográficas, assim como as subfrações obtidas a partir dela e proporcionou o isolamento dos flavonóides **F1** e **FC3**, ambas pela primeira vez relatadas no gênero *Vochysia*.

Isolamento do flavonóide F1

O primeiro fracionamento foi feito através de cromatografia líquida em coluna de vidro ($\phi= 5$; $h= 18$ cm), tendo como fase estacionária sílica gel 60-200 mesh, e como fase móvel a mistura de solventes (MeOH:AcOEt) com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade (Figura3.3). Desta coluna obteve-se 85 frações, que foram submetidas à análise por CCDA e então reunidas em 4 frações segundo as semelhanças apresentadas.

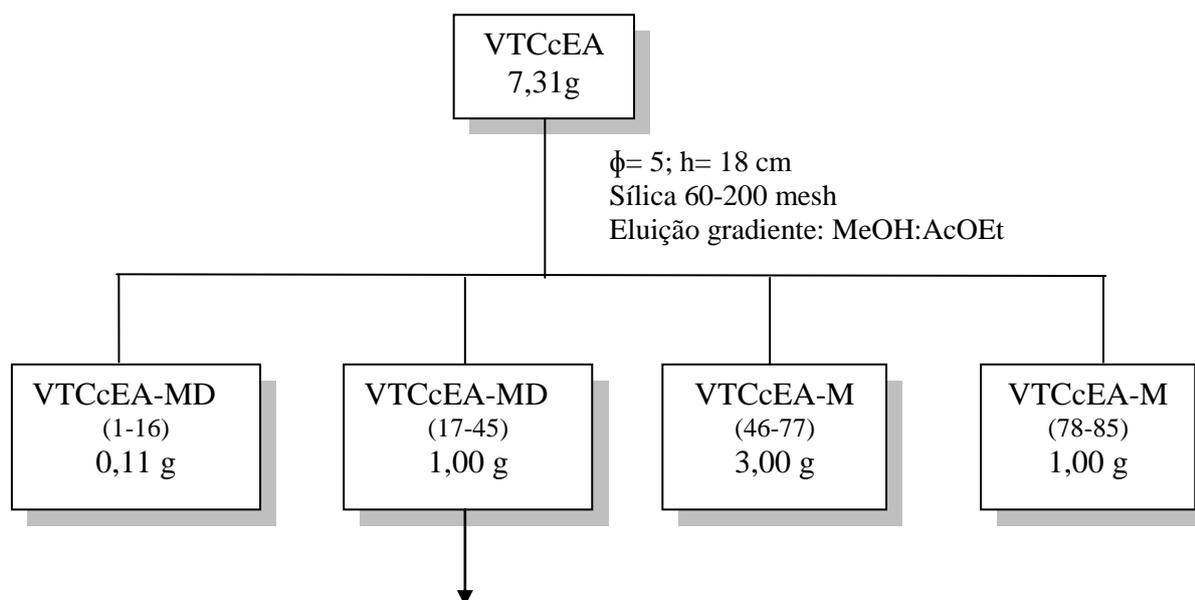


Figura 3.4

Figura 3.3. Fracionamento do extrato de acetato de etila

O flavonóide **F1** foi obtido a partir da fração MD (17-45) através de cromatografia de adsorção, usando como fase móvel a mistura de solventes (MeOH:CH₂Cl₂) no modo isocrático de eluição, sendo posteriormente identificada por RMN de ¹H e experimentos de correlação heteronuclear.

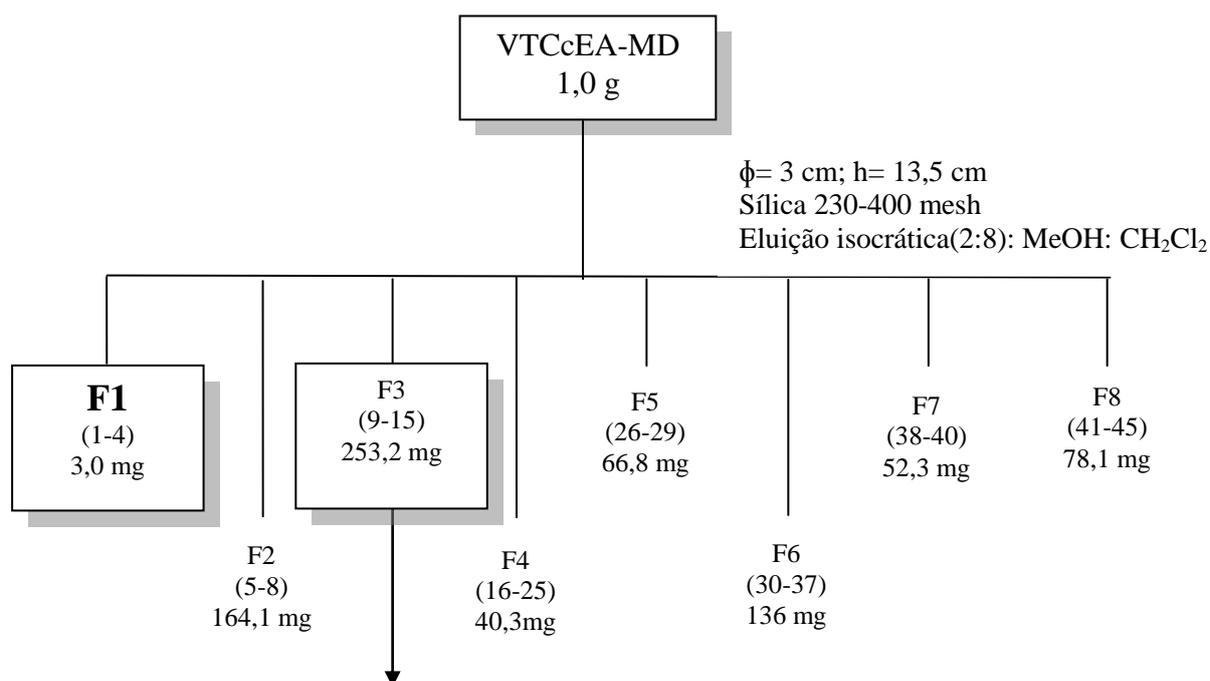


Figura 3.5

Figura 3.4. Isolamento do flavonóide **F1**

Isolamento do flavonóide FC3

A partir da fração F3 realizou-se o refractionamento por cromatografia de exclusão, utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária e eluição em MeOH 100%, obtendo-se 55 frações (figura 3.5) que foram analisadas por CCDA e reunidas em 6 novas frações.

Destas 6 frações, a fração F3-2 foi submetida novamente a cromatografia de exclusão usando sephadex como fase estacionária, da qual foi identificada por RMN ¹H (uni e bidimensional) o flavonóide **FC3** (figura 3.5).

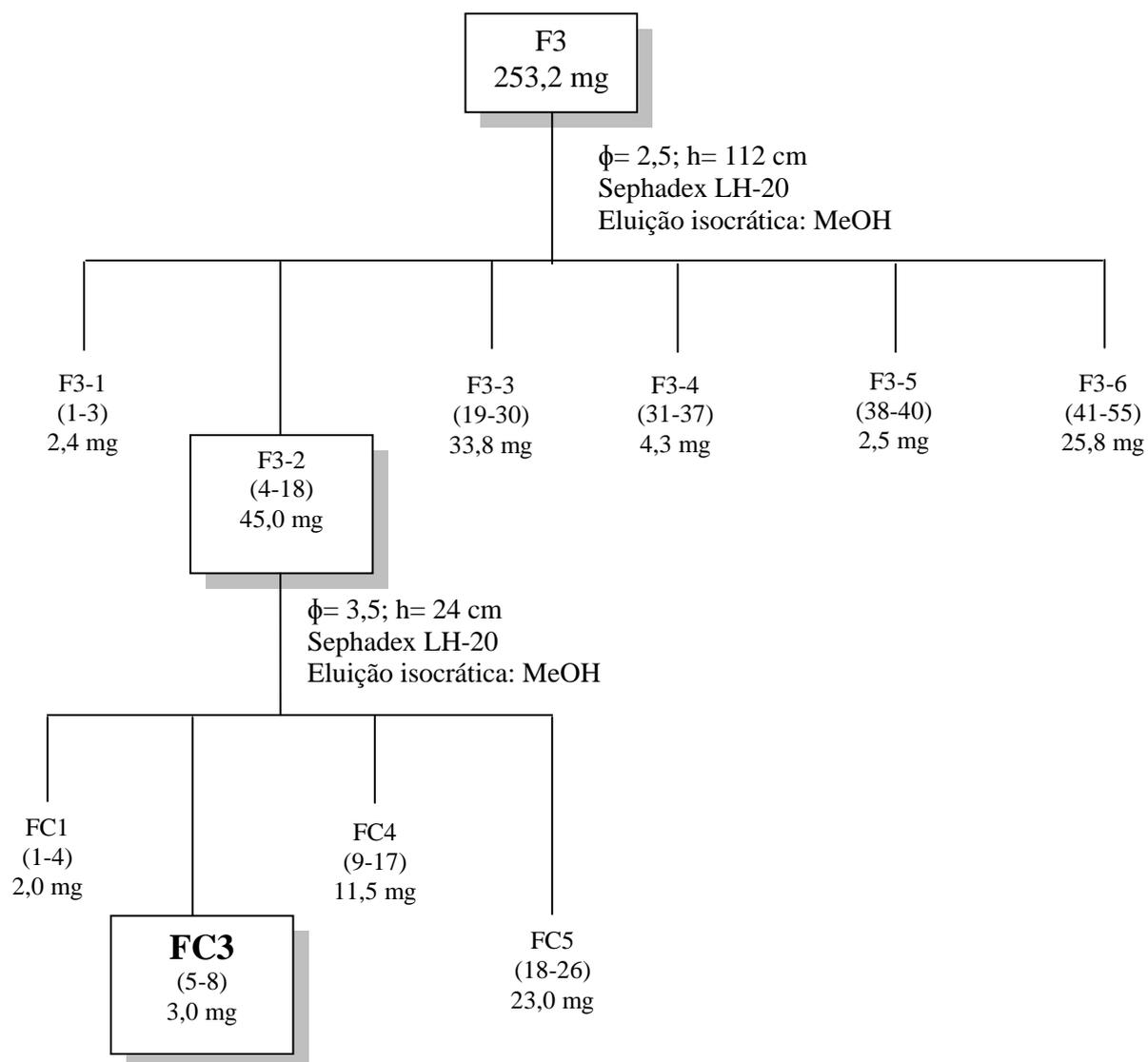


Figura 3.5. Isolamento do flavonóide **FC3**

3.2.3.2. Estudo fitoquímico de VTCcD

Através de testes preliminares em CCDA, o extrato diclorometânico (VTCcED) despertou maior interesse, pois apresentava uma maior variedade de constituintes, sendo a maioria deles de média polaridade. Deste extrato obteve-se as substâncias **T2** e **TC8**.

Isolamento do triterpeno T2

O triterpeno **T2** foi isolado depois de duas etapas cromatográficas de adsorção em sílica gel de 230-400 mesh, ambas em eluição isocrática com acetato de etila e hexano. A

identificação deste triterpenóide foi feita através de RMN ^1H e ^{13}C . A figura 3.6 resume como foi realizado o estudo.

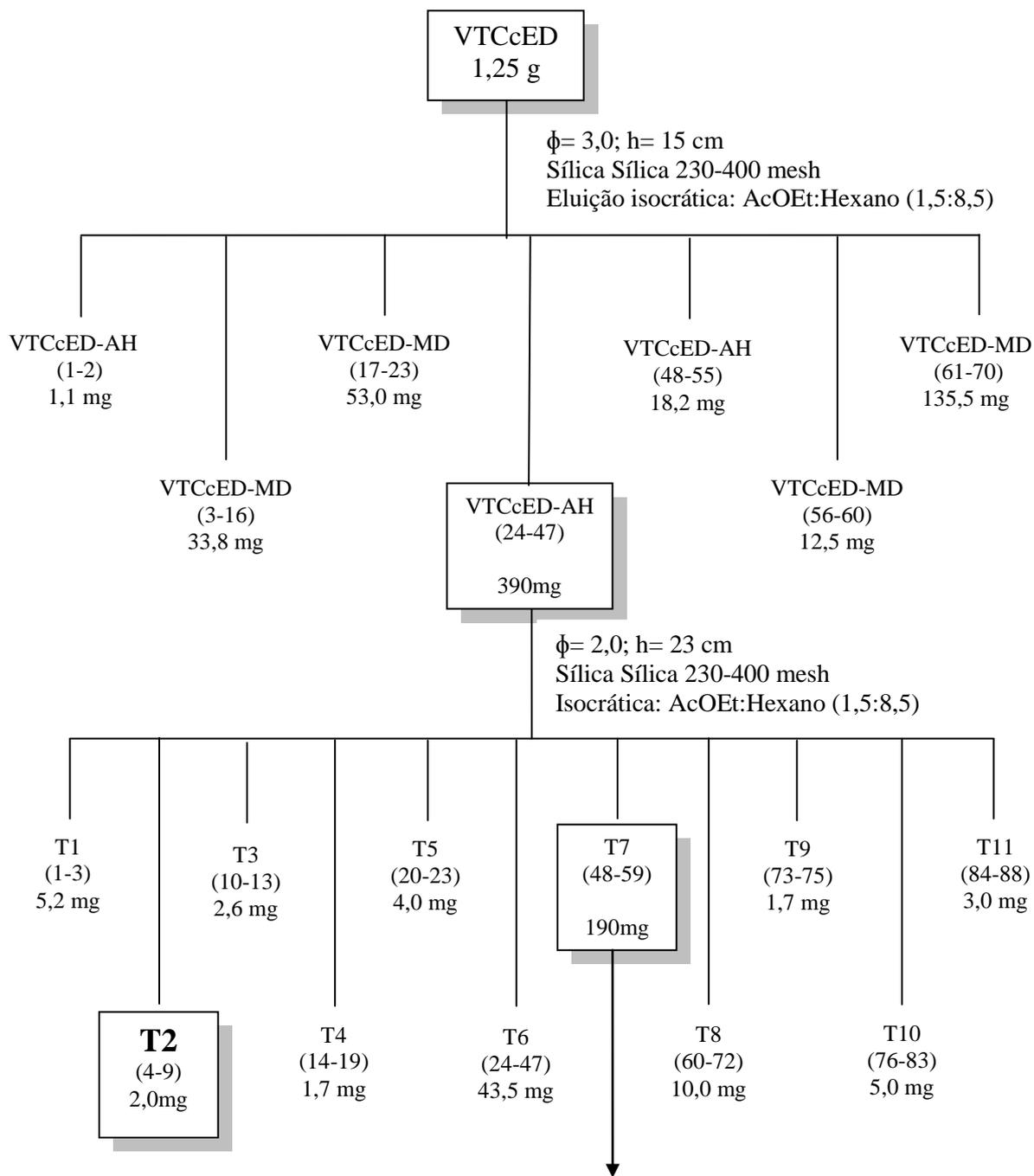


Figura 3.7

Figura 3.6. Isolamento do triterpeno T2

Isolamento do ácido TC8

Após obtenção da fração T7, realizou-se o refraçãoamento desta por cromatografia líquida em coluna utilizando-se sílica gel (230-400 mesh) em modo isocrático como representado no fluxograma (figura 3.7). Desta fração obtivemos **TC8**, substância identificada pelos métodos espectrométricos de ressonância magnética nuclear (1D e 2D).

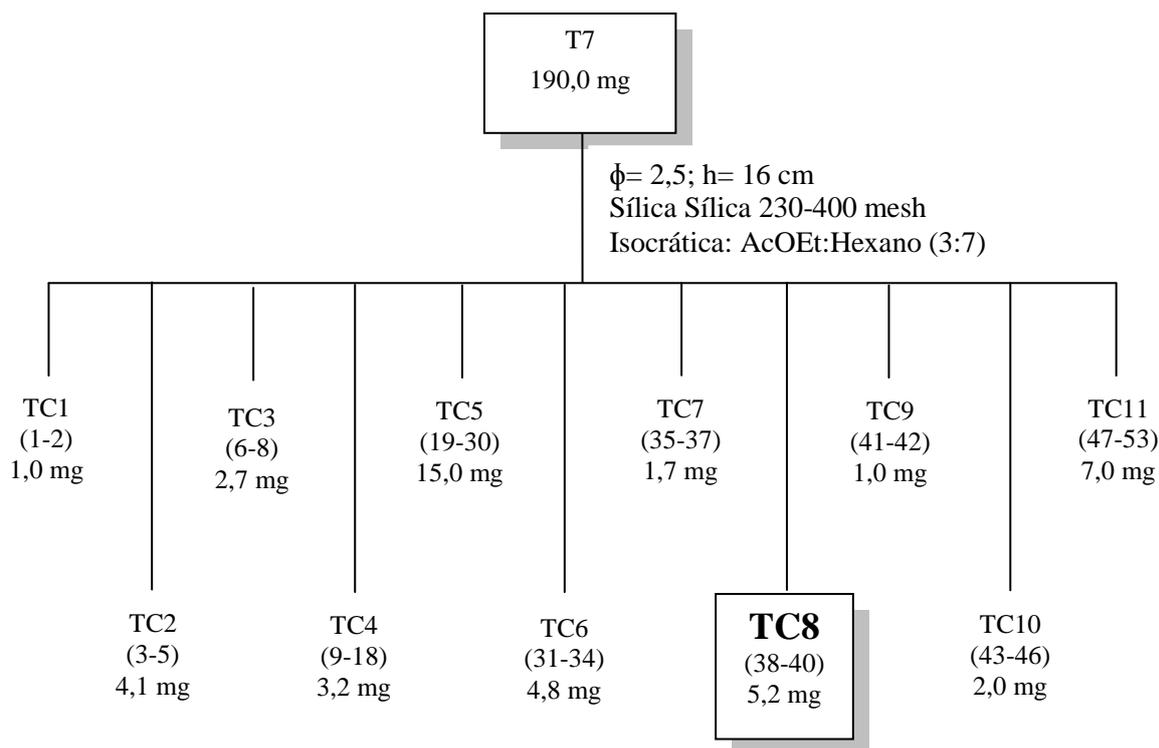


Figura 3.7. Isolamento do ácido **TC8**

3.2.3.3. Estudo fitoquímico de VTcCb

A fração n-butanólica das cascas do caule de VT foi fracionada, assim como as subfrações obtidas a partir dela, de acordo com os Fluxogramas (figura 3.8, 3.9 e 3.10). Esta fração proporcionou o isolamento dos alquilglicosídeos **A8** e **A11**, e levou também ao isolamento do flavonóide **FC3**, já isolada anteriormente na fração de acetato de etila. As substâncias foram identificadas por experimentos de RMN (1D e 2D), DEPT e IV.

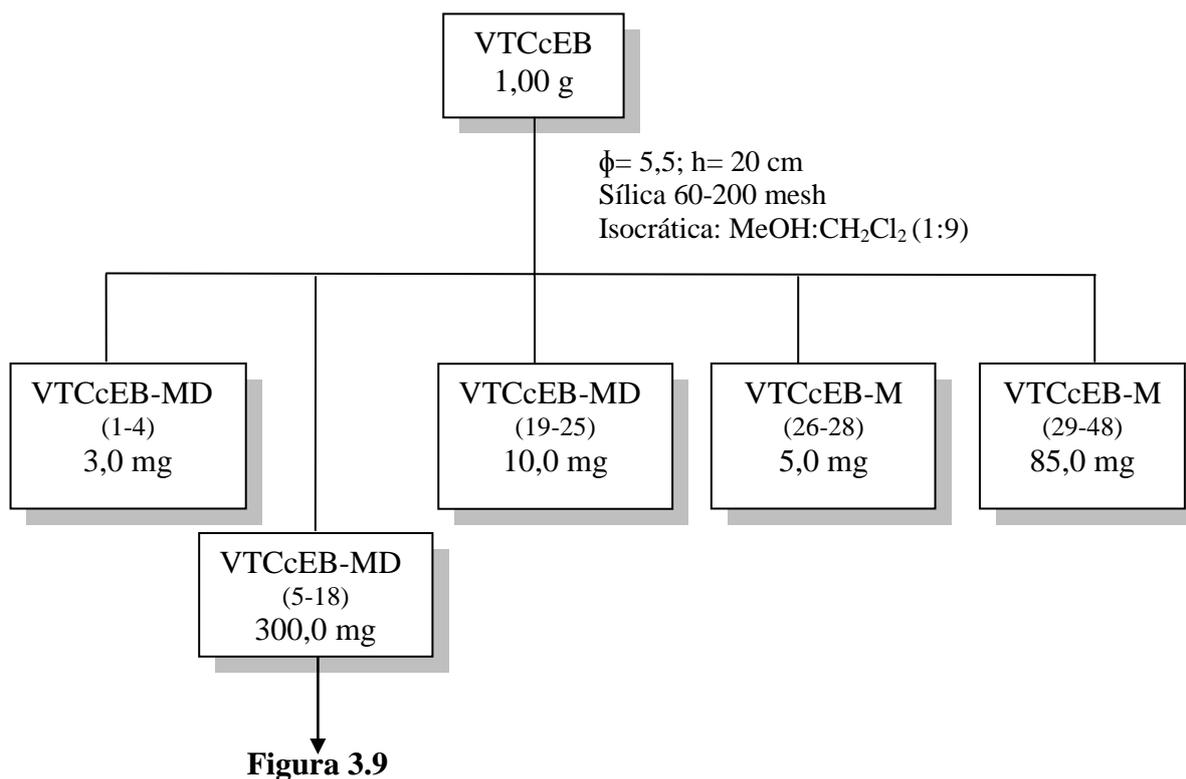


Figura 3.8. Fracionamento do extrato n-butanólico

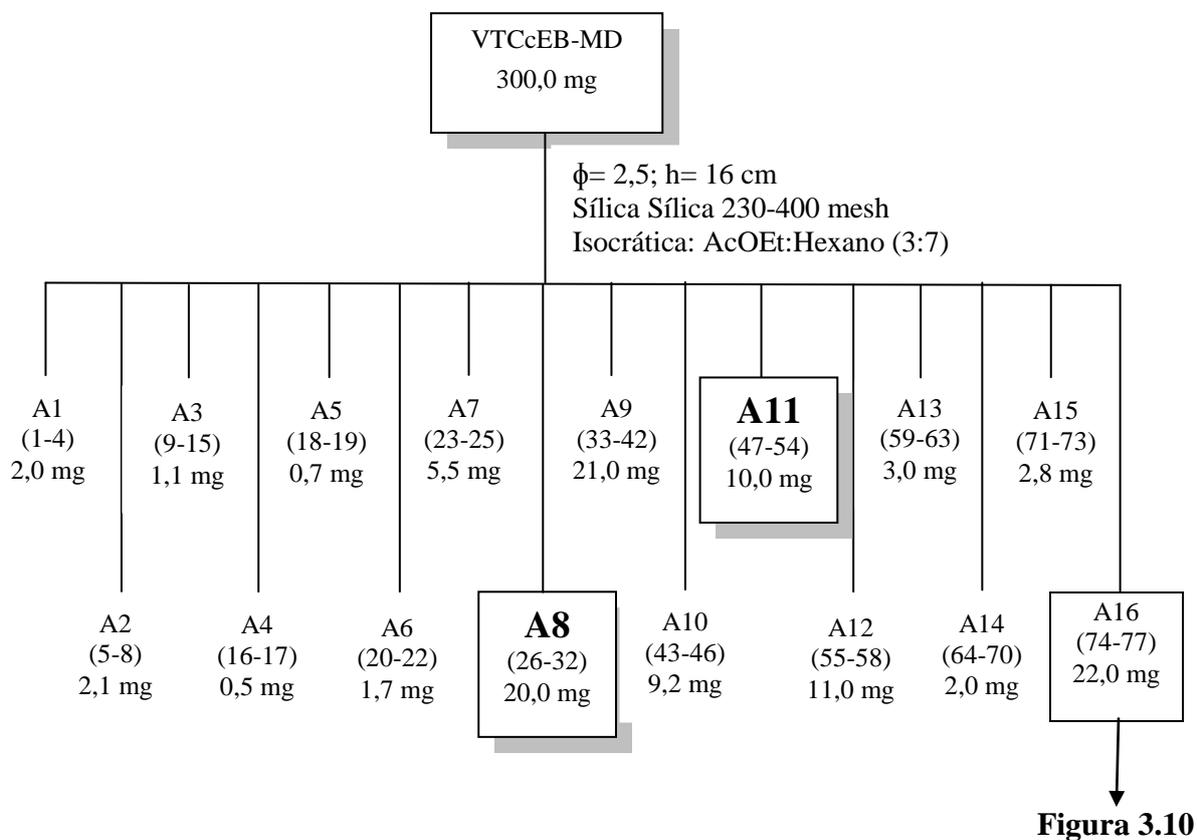


Figura 3.9. Isolamento dos fructofuranosídeos A8 e A11

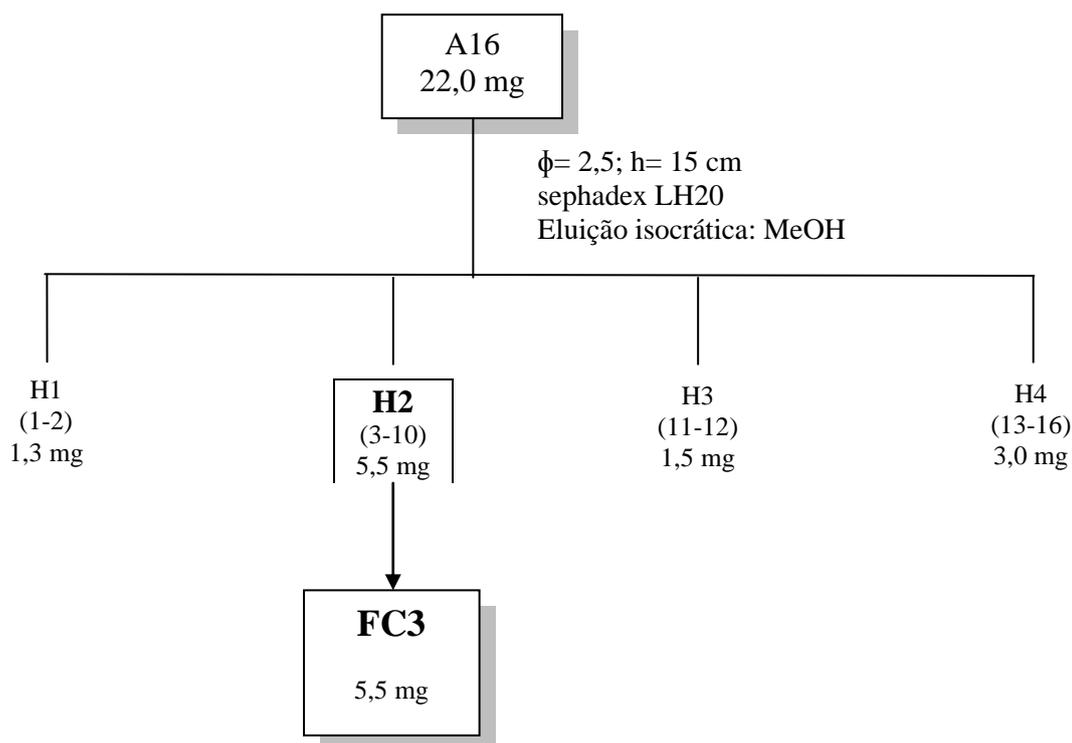


Figura 3.10. Isolamento do flavonóide **FC3**

3.2.3.4. Estudo fitoquímico de VTFE

A análise de RMN ^1H dos extratos hexânico (VTFEH) e diclorometânico (VTFED) das folhas de *V. thyrsoidea* forneceram sinais relativos a uma quantidade elevada de material graxo, e os fracionamentos realizados não forneceram nenhum metabólito de interesse.

Já os extratos de Acetato de etila (VTFEA) e metanólico (VTFEM) tiveram boa análise para estudo cromatográfico, entretanto o alto teor de clorofila dificultou bastante os diversos fracionamentos, sendo este material reservado.

3.2.4. Reação de acetilação de A8 para obtenção de AR8

A substância **A8** (20 mg) foi submetida à reação de acetilação, através da adição de 1mg de 4-(dimetilamino)-piridina ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ – DMAP) e 4,0 mL de anidrido acético (CH_3CO) $_2\text{O}$). Esta solução ficou sobre agitação a temperatura ambiente e a reação foi acompanhada por CCDA. Depois de terminada a reação fez-se a extração da fase orgânica num funil de separação, utilizando acetato de etila para solubilizar esta solução e lavando-a 3 vezes com

água destilada. O produto da reação foi então posteriormente submetido a ensaios de RMN ^1H para confirmar a acetilação.

3.2.5. Reação de acetilação de A11 para obtenção de AR11

A substância **A11** (10 mg) foi colocada em um balão e submetida à reação de acetilação, através da adição de 0,3mg de 4-(dimetilamino)-piridina ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ – DMAP) e 1,5 mL de anidrido acético $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$. Esta solução ficou sobre agitação a temperatura ambiente e a reação foi acompanhada por CCDA. Depois de terminada a reação fez-se a extração da fase orgânica num funil de separação, utilizando acetato de etila para solubilizar esta solução e lavando-a 3 vezes com água destilada. O produto da reação foi então posteriormente submetido a ensaios de RMN ^1H para confirmar a acetilação.

3.3. Metodologia dos ensaios biológicos

3.3.1 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Baseado na metodologia de MEYER *et al.* (1982), com algumas adaptações, foi preparado em uma cuba de vidro com capacidade para 1000 mL um ambiente adequado para o desenvolvimento da *Artemia salina*. A este sistema foram adicionados 1000 mL de água salina (36,5 g NaCl/L) previamente tratada, pH= 8,5 e temperatura ambiente (26°C), e submetido a luz artificial e aeração suave. Os cistos foram então mantidos por 48 h até a eclosão dos náuplios.

Os extratos brutos e particionados da casca do caule e das folhas de *V. thyrsoidea* foram solubilizados em água salina e DMSO 1%, e partindo-se de soluções padrão efetuaram-se diluições.

Foram separadas 10 larvas por tubo de ensaio contendo 10 mL das soluções nas concentrações de 125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em triplicata. Cada teste foi acompanhado de um controle negativo, solução salina e o veículo usado para diluir os extratos (DMSO 1%), e controle positivo com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($\text{DL}_{50} = 20$ a 40 ppm). As *A. salina* em testes foram mantidas a temperatura ambiente (26°C) sob iluminação artificial por um período de 24 horas. Após este período, foram realizadas leituras da contagem do número de larvas sobreviventes e mortas.

Análise dos dados

A obtenção da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL₅₀) foi feita por cálculos do método PROBIT de análise, através do software STATPLUS[®] 2005 (95% de confiança).

A porcentagem de larvas vivas, em relação ao aumento da concentração do extrato aquoso de *V. thyrsoidea*, ajustou-se em uma equação linear simples, a qual foi usada para estimar a DL₅₀.

3.3.2 Ensaio de inibição enzimática das Catepsinas B e K

Os ensaios de inibição enzimática frente à catepsina B e K foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos, usando-se as mesmas condições experimentais para ambas as catepsinas.

A metodologia de determinação da inibição enzimática consiste na detecção do aumento da fluorescência, devido à hidrólise do substrato fluorogênico Z-FRMCA detectado em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{ex}= 380$ nm e emissão $\lambda_{em}= 460$ nm.

A catepsina B usada neste ensaio foi obtida comercialmente através da empresa Sigma, enquanto a catepsina K, uma enzima não comercial pertencente ao Laboratório de Produtos Naturais do DQ-UFSCar, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Dieter Bromme da University of British Columbia, Vancouver, Canadá. Foram utilizadas placas de ELISA de 96 poços de coloração preta e fundo plano, mantida em compartimento termostaticado a 27°C.

Inicialmente 3 poços foram preenchido com 5 μ L de DMSO (controle negativo), e os demais poços da placa com 5 μ L de inibidor, que consiste dos compostos dissolvidos em DMSO a uma concentração de 125 μ M, sendo avaliados em triplicata.

Em seguida adicionou-se o MIX 1, que é a enzima em concentração 3mM em tampão (acetato de sódio 100 mM com 5 mM de EDTA e pH de 5,5) pré-ativada com DTE (5,0 mM) durante 5 minutos. Deixou-se esta enzima pré-incubada em contato com os compostos por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 10 μ M do MIX 2 (substrato fluorogênico Z-FRMCA em tampão), realizando-se a leitura em seguida.

A leitura da fluorescência detectada em espectrofluorímetro foi convertida em μ mols de substrato hidrolisado por minuto a partir das curvas de fluorescência das soluções de

substrato antes e depois da hidrólise total. O percentual de inibição foi calculado através da comparação da atividade enzimática na ausência e presença do inibidor.

Os compostos que apresentaram inibição significativa (superior ou igual a 80%) frente às catepsinas B e K foram selecionados e posteriormente encaminhados para a determinação dos valores de IC₅₀, que é a concentração do inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima.

O potencial de inibição foi determinado utilizando dez diferentes concentrações do inibidor e construindo uma curva de concentração x resposta através do método de regressão não-linear do programa Origin.

3.3.3. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

As análises da citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sobre responsabilidade da doutoranda Kristiana Cerqueira Mousinho, através do método de MTT.

Este método é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela de MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo, sendo um método rápido, sensível e barato.

As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon humano), SF-295 (sistema nervoso central) e HL-60 (leucemia), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido cultivadas em frascos plásticos para cultura, utilizando o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário às células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de $1,0 \times 10^5$ céls/100µL.

As substâncias foram diluídas em DMSO puro e estéril na concentração de 5µg/mL (dose única) e adicionadas em placas de 96 poços (100µL/poço). O quimioterápico doxorrubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 72 horas, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500rpm/15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200µL da solução de MTT 10% em RPMI 1640, sendo a placa colocada em estufa a 5% de CO₂ por 3 horas. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a

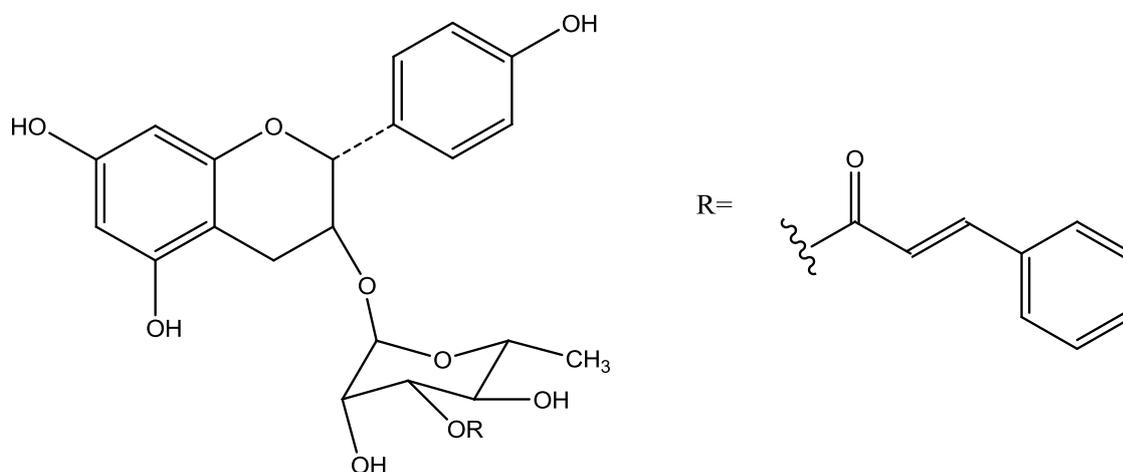
3000rpm/10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e o precipitado ressuspenso em 150µL de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até completa dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 550nm.

Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Substâncias isoladas

O estudo fitoquímico de *V. thyrsoidea*, permitiu o isolamento de 6 metabólitos secundários. E através das reações de acetilação dos compostos A8 e A11 obtiveram-se os compostos AR8 e AR11.

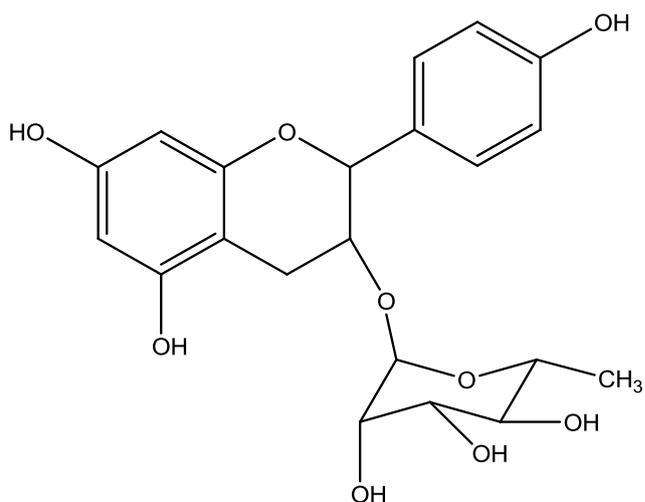


Catequin-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosideo

Massa: 3,0 mg

Isolamento: p. 25

Identificação: p.36 - 42



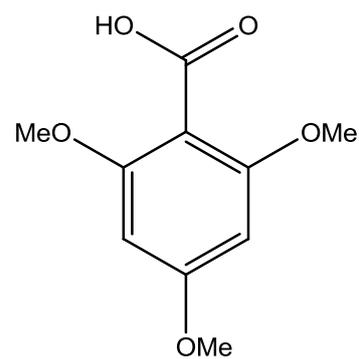
FC3

Catequin-3-O-ramnopiranosideo

Massa: 8,5 mg

Isolamento: p. 26 e 30

Identificação: p. 43 - 47



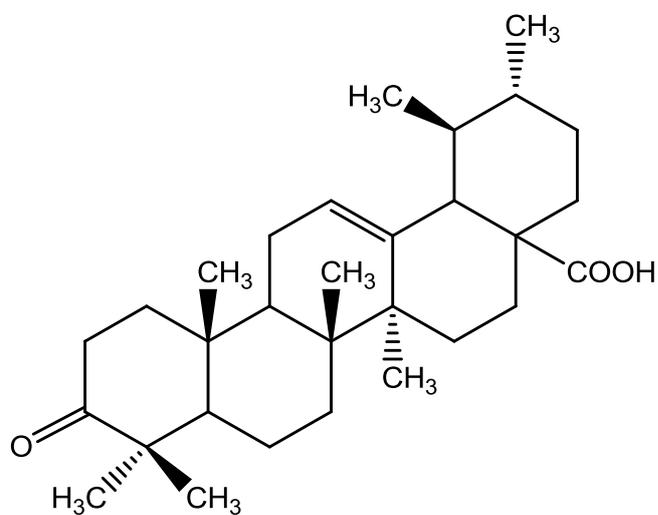
TC8

Ácido 2,4,6-Trimetoxibenzóico

Massa: 5,2 mg

Isolamento: p. 28

Identificação: p. 51 - 53



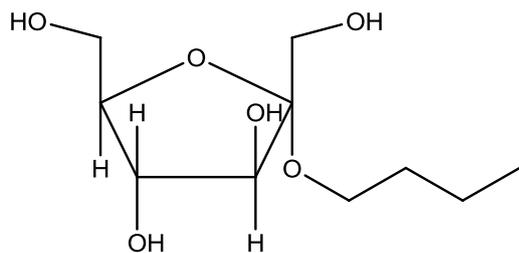
T2

Ácido 3-Oxo-urs-12en-28-oico

Massa: 2,0 mg

Isolamento: p. 27

Identificação: p. 48 - 51



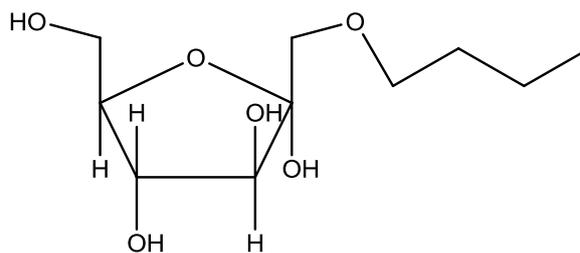
A8

2-Butil D-frutofuranosideo

Massa: 20,0 mg

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 53 - 57



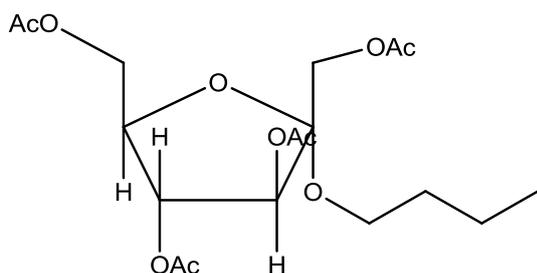
A11

1-Butil D-frutofuranosideo

Massa: 10,0 mg

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 58 - 61



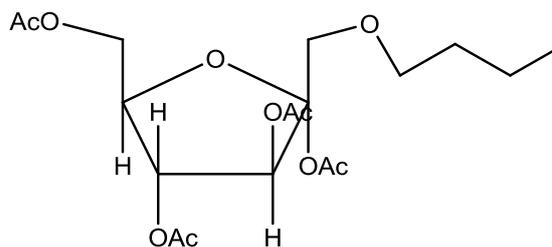
AR8

2-Butil D-frutofuranosideo acetilado

Massa: 16,2 mg

Reação: p. 30

Identificação: p. 62



AR11

1-Butil D-frutofuranosideo acetilado

Massa: 9,3 mg

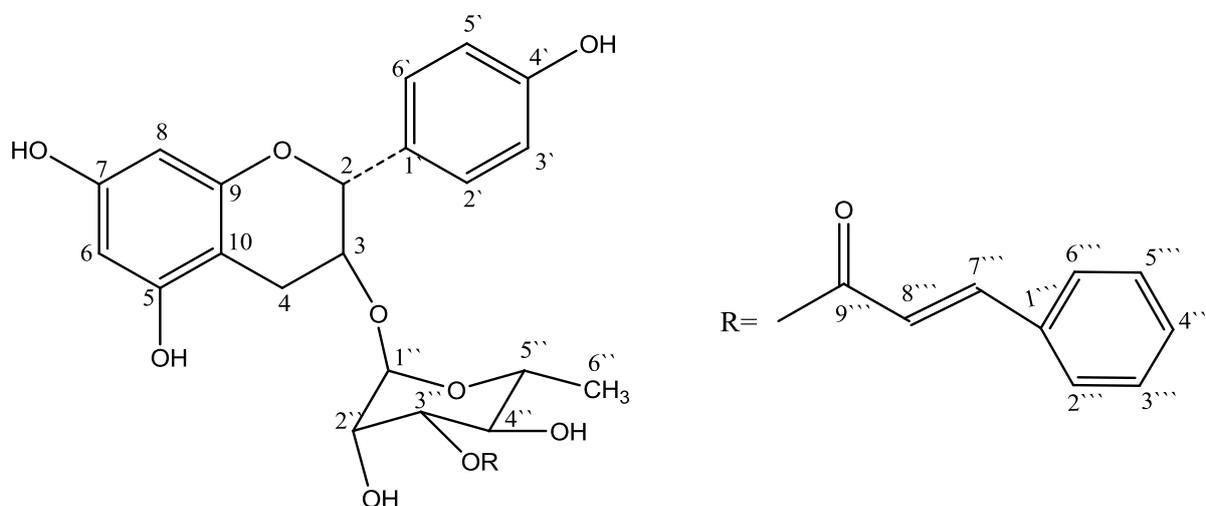
Reação: p. 31

Identificação: p. 63

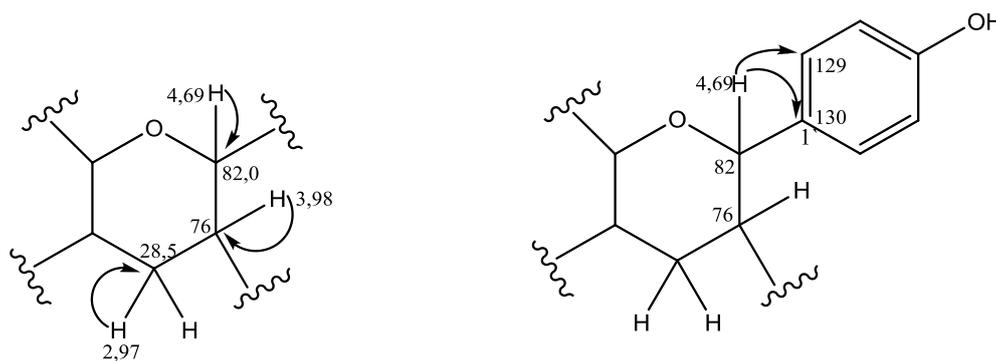
4.1.1. Determinação estrutural do flavonóide F1

A substância **F1** (3,0 mg) é um flavonóide da classe dos flavanonols (flavan-3-ols ou catequinas) e foi isolada da fração de acetato de etila (VTCcA) proveniente do extrato etanólico das cascas do caule de *V. thyrsoidea*. Sua estrutura foi determinada através dos

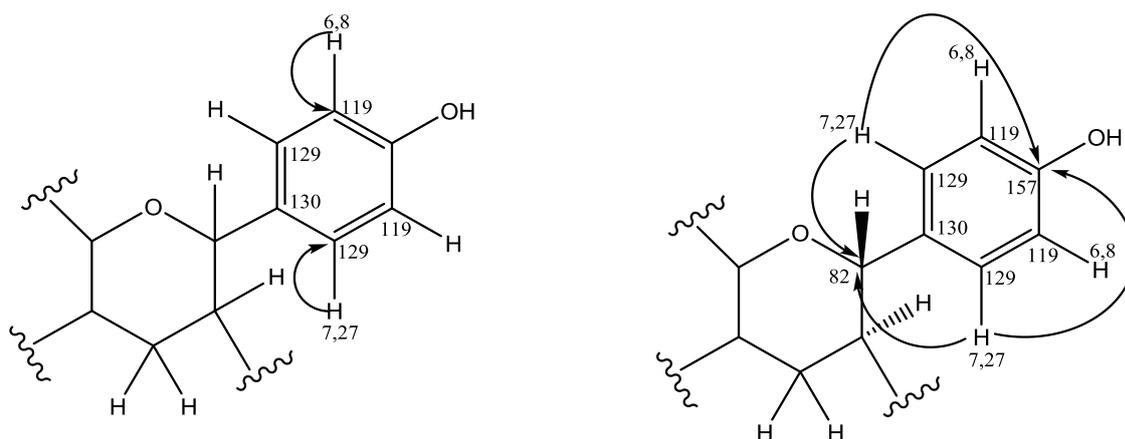
experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC e também da comparação com dados na literatura (LOKVAMA *et al.*, 2004; DAVID, *et al.*, 2006; KRAFT, *et al.*, 2001).



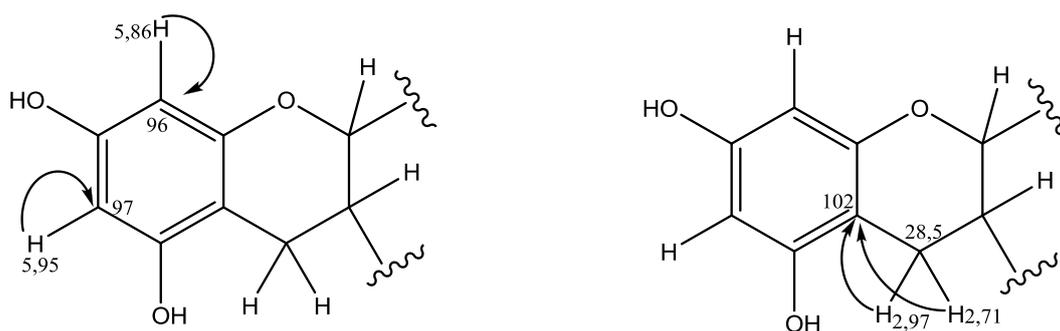
Analisando o espectro de RMN ^1H de **F1** (figura 4.1), observaram-se os sinais na região de hidrogênios alifáticos: δ 2,71(1H, dd, $J=8,4$ Hz e 15,6 Hz), δ 2,97(1H, dd, $J=5,2$ e 15,2 Hz), δ 4,69(1H, d, $J=7,6$ Hz) e δ 3,98(m) característicos dos hidrogênios H-4a, H-4b, H-2 e H-3 respectivamente; na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos os sinais δ 5,95 (1H, d, $J=2,4$ Hz) e δ 5,86 (1H, d, $J=2,4$ Hz) referem-se aos hidrogênios H-8 e H-6; os dois dubletos em δ 7,27 (2H, d, 8,4 Hz) e δ 6,80 (2H, d, 8,4 Hz), foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6', H-3' e H-5' referente a um sistema de acoplamento de spin AA'BB'.



No espectro de HSQC (figura 4.2), pôde-se observar a correlação do dubleto em δ 4,69 com um sinal de carbono em δ 82,0; o multiplete em δ 3,98 correlacionando com o carbono δ 76,0 e a correlação dos hidrogênios δ 2,97 e 2,71 (H-4a e H-4b) com o carbono δ 28,5. O experimento de HMBC (figura 4.3) mostrou as correlações do hidrogênio em δ 4,69 (H-2) com os carbonos em δ 129 (C-6') e 130 (C-1') respectivamente.



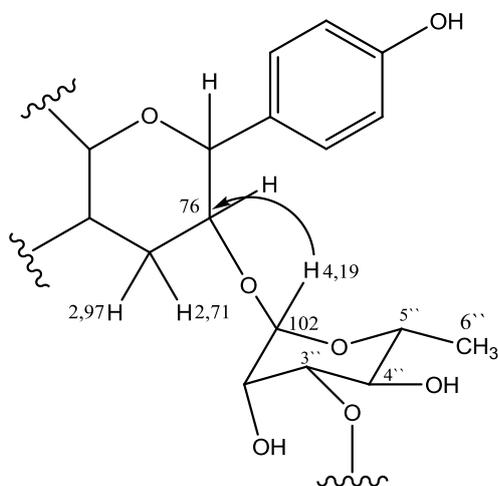
O espectro de HSQC mostrou também correlação com os hidrogênios δ 7,27 (H-2') e δ 6,8 (H-5') com os carbonos em δ 129 e δ 119. E a partir do espectro de HMBC estes hidrogênios H-2' e H-6' correlacionaram-se com os sinais de carbono δ 82,0 e δ 157,0 referentes aos carbonos C-2 e C-4'.



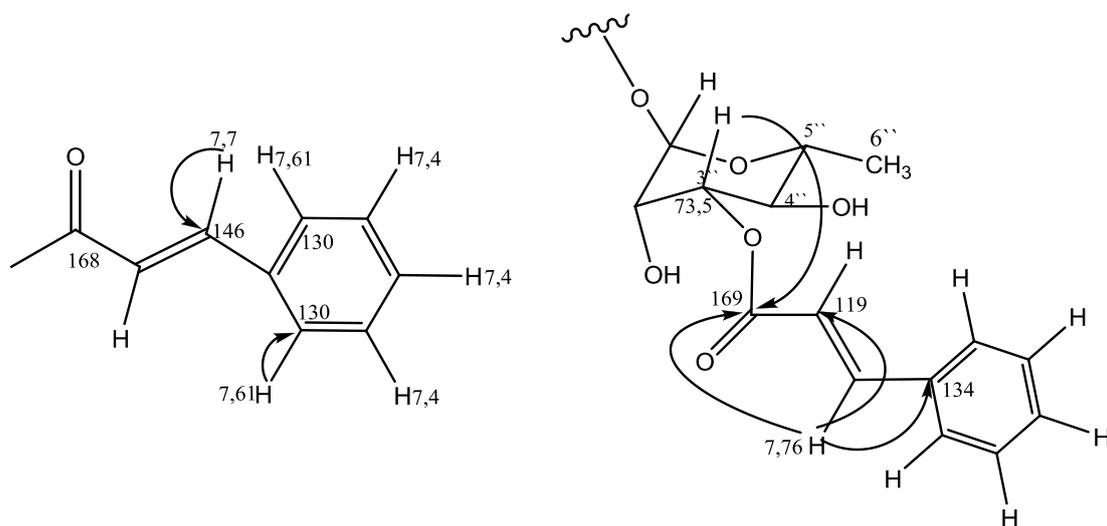
O dubleto em δ 5,86 (H-8) mostrou no espectro de HSQC correlacionar-se com o carbono em δ 96 (C-8), e o outro dubleto característico do hidrogênio em δ 5,95 (H-6) estar em correlação com o carbono δ 97 (C-6). As correlações observadas no HMBC entre os hidrogênios δ 2,71 e 2,97 com o carbono δ 102 (C-10) confirmaram a ligação com o anel A.

A presença do resíduo de açúcar nesta estrutura foi confirmada pela presença do dubleto em δ 4,19(d) (H-1'' anomérico), com uma constante de acoplamento bastante pequena devido ao acoplamento diequatorial do H-1'' e H-2'', e de hidrogênios carbinólicos entre δ 3,60 e 4,19. A caracterização da ramnose foi então realizada com base no sinal de dubleto em δ 1,30 referente ao acoplamento dos hidrogênios da metila (H-6'') com o hidrogênio H-5'' e em comparação aos dados da literatura.

Através do espectro de HMBC observou-se a correlação do hidrogênio anomérico da ramnose em δ 4,19 com o carbono em δ 76,0 (C-3), confirmando a unidade de ramnose ligada ao flavonóide nesta posição.



O ácido cinâmico presente pôde ser observado pelo conjunto de sinais no espectro de RMN ^1H , onde na região de aromáticos um conjunto de dois dubletos em δ 7,76 e 6,58 (H-7'' e H-8'') ambos com $J=16$ Hz integrando para um hidrogênio cada caracterizou o acoplamento em trans. Os multipletos em δ 7,61 e 7,40 apresentaram um padrão de acoplamento típico de anel aromático sem substituintes.



No espectro de HSQC verificamos a relação entre os sinais do hidrogênio em δ 7,76 (H-7'') e o carbono em δ 146; o hidrogênio em δ 7,61 correlacionando com o carbono em δ 130 (C-2''). E no espectro de HMBC pôde-se verificar as relações entre o hidrogênio com sinal em δ 7,76 (H-7'') com os carbonos em δ 119, δ 169 e δ 134; e através da correlação entre o

H-3'' e o carbono da carbonila δ 169 (C-9''') confirmou-se que o ácido cinâmico encontra-se ligado no oxigênio na posição do carbono C-3'' (δ 73,5) da ramnose.

Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da catequin-3-O-ramno(3-cinamoil)piranosideo

H/C	δ_{H} ^(a)	$\delta_{\text{H lit}}$ ^(c)	δ_{C} ^{(b)*}	$\delta_{\text{C lit}}$ ^(d)
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
2	4,69(d 7,6)	4,9(d 6,5)	82,0	79,6
3	3,98(m)	4,19(m)	76,0	76,3
4	2,97(dd 15,2; 5,2) 2,71(dd 15,6; 8,4)	2,91(dd 16,5; 5,5) 2,76(dd 16,5; 7,0)	28,5	26,7
5	-	-	147,0	152,7
6	5,95(d 2,4)	6,04(d 2,5)	97,0	96,3
7	-	-	157,2	157,7
8	5,86(d 2,4)	5,91(d 2,5)	96,0	95,5
9	-	-	-	156,5
10	-	-	102,0	100,3
1'	-	-	130,0	129,85
2'/6'	7,27(d 8,4)	7,56(d 8,5)	129,0	128,81
3'/5'	6,80(d 8,4)	6,96(d 8,5)	119,0	116,48
4'	-	-	157,0	156,4
1''	4,19(d)	4,12(d 1 β)	102	101
2''	3,62(dd 3,2; 9,2)	3,84(m)	72,5	69
3''	5,02(dd 4; 10)	5,12(dd 3; 9,7)	73,5	74
4''	3,68(m)	3,71(t 9,7)	71,5	70
5''	3,70(m)	4,41(dq 6,2; 9,7)	70,0	69,5
6''	1,30(d 6,4)	1,22(d 6,2; 9,7)	31,0	30
1'''	-	-	136	134
2''' e 6'''	7,61(m)	7,67(m)	130	128
3''' , 4''' , 5'''	7,40 (m)	7,44(m)	129	129
7'''	7,76(d 16)	7,71(d 16)	146	145
8'''	6,58(d 16)	6,53 (d 16)	119	118
9'''	-	-	169	168

(a) MeOD; (b) MeOD; (c) acetona d_6 (LOKVAMA *et al.*, 2004; DAVID, *et al.*, 2006); (d) acetona d_6 (DAVID, *et al.*, 2006; KRAFT, *et al.*, 2001)

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

A análise e comparação dos dados obtidos com a literatura permitiram identificar a substância **F1** como a catequín-3-O-ramno(3-cinamoil)piranosídeo, sendo esta a primeira vez relatada no gênero *Vochysia*.

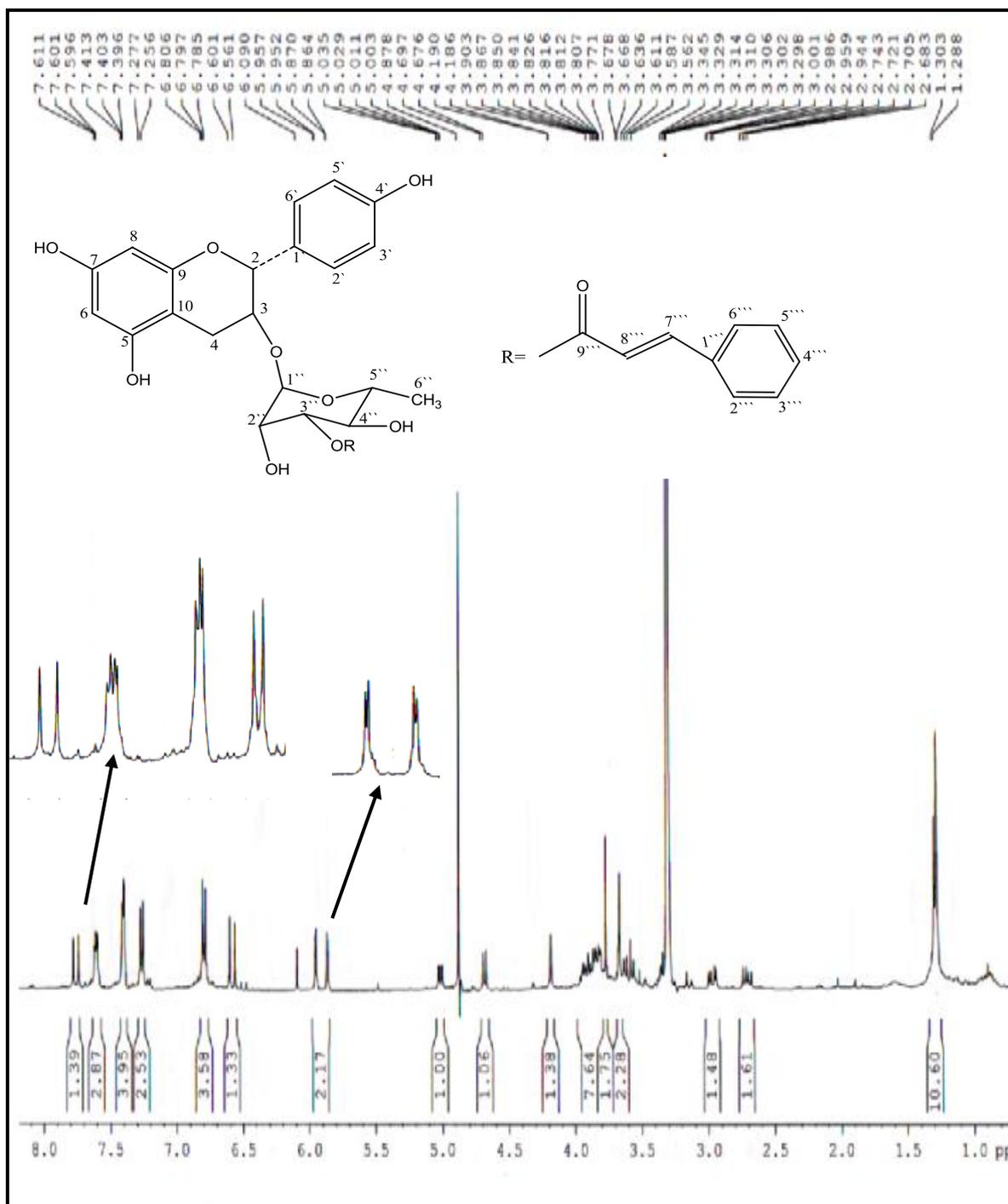


Figura 4.1. Espectro de RMN ¹H do flavonóide **F1** (MeOD, 400 MHz)

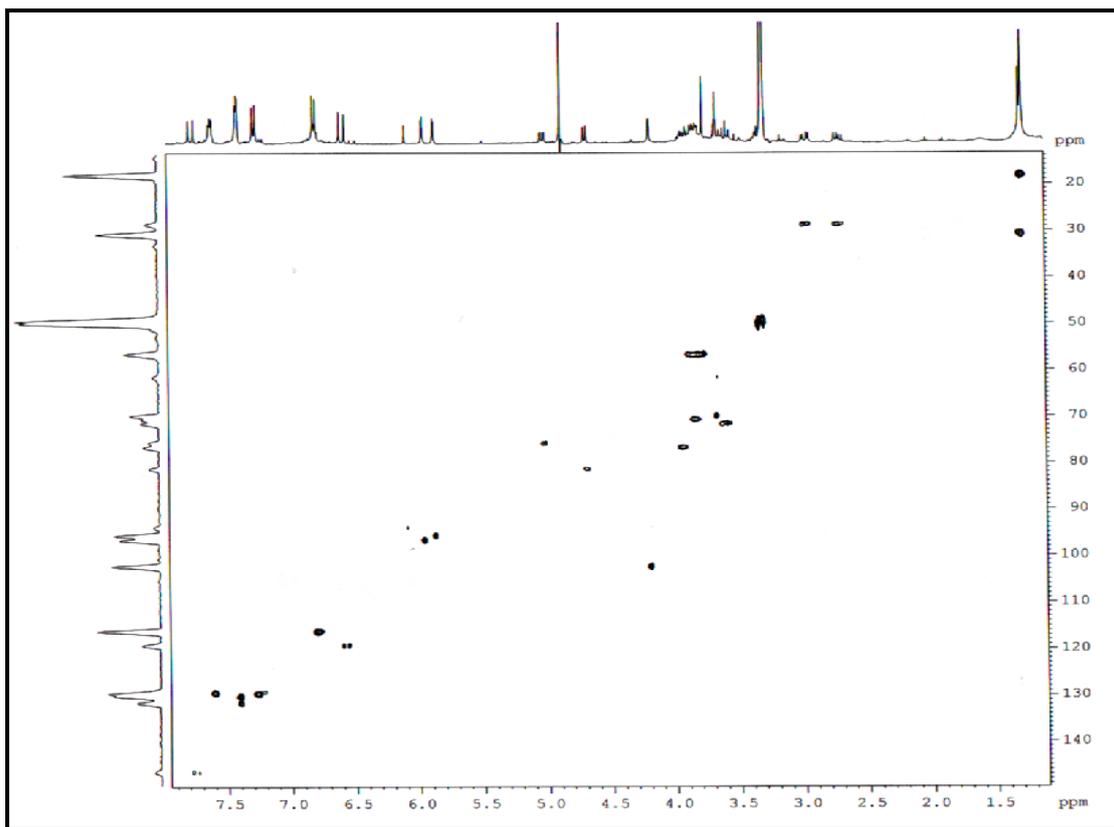


Figura 4.2. Mapa de contorno de HSQC de F1 (MeOD, 400 MHz)

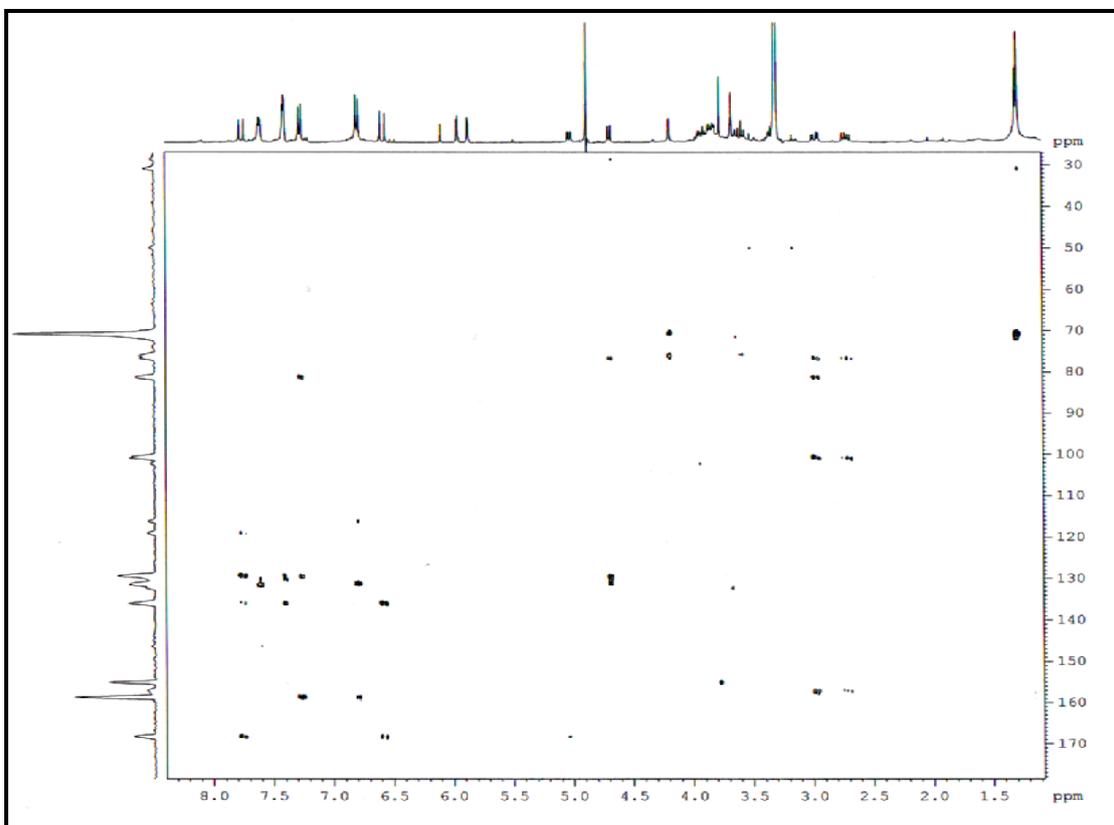
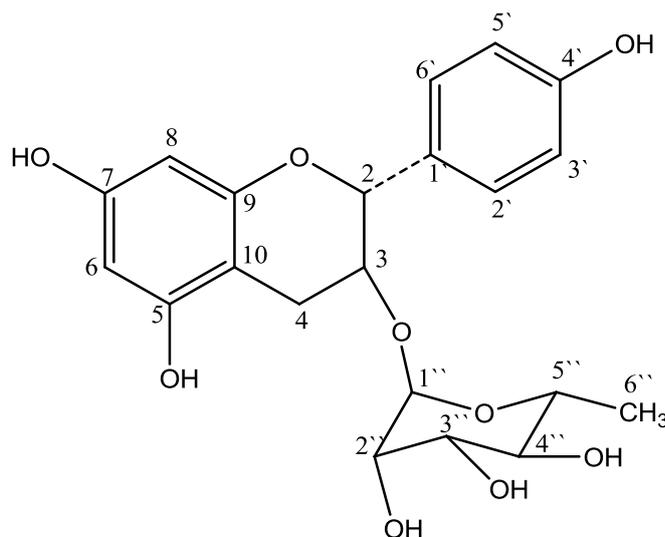


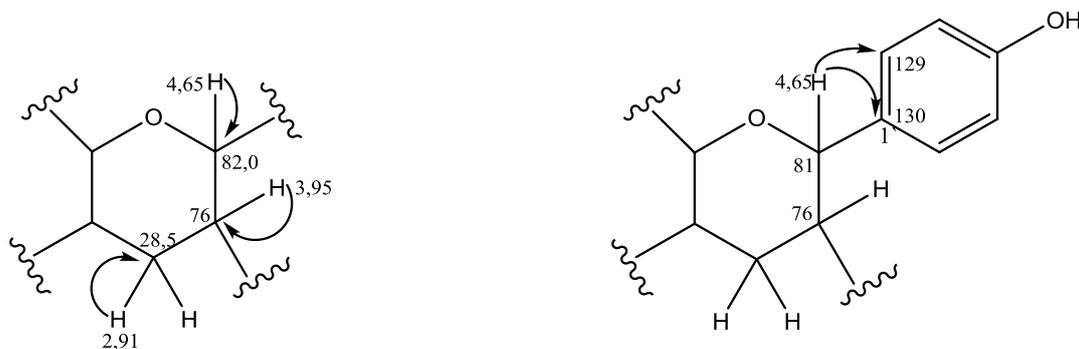
Figura 4.3. Mapa de contorno de HMBC de F1 (MeOD, 400 MHz)

4.1.2. Determinação estrutural do flavonóide FC3

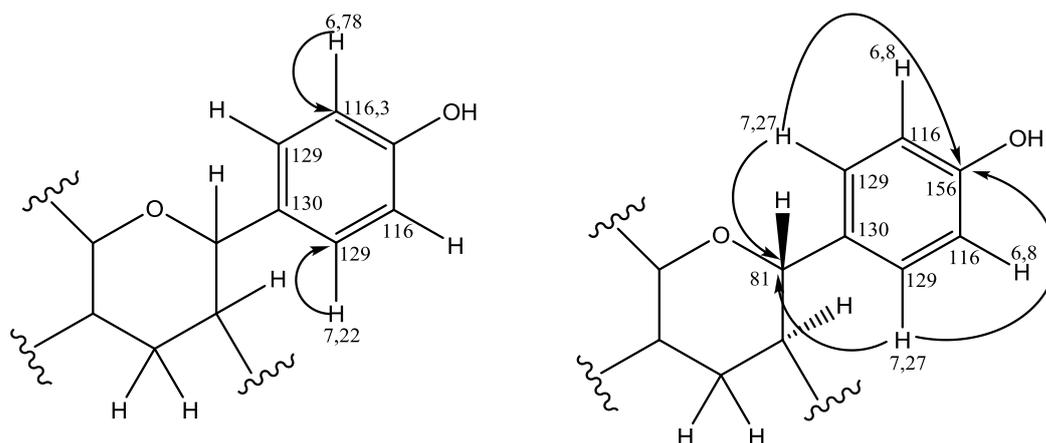
Foram isolados 8,5 mg da substância **FC3**, uma catequina glicosilada proveniente das frações n-butanólica (VTCcEB) e acetato de etila (VTCcEA) do extrato etanólico das cascas do caule de *V.thyrsoidea*. Sua estrutura foi determinada através dos experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC e também da comparação com dados na literatura (LOKVAMA *et al.*, 2004; DAVID, *et al.*, 2006; KRAFT, *et al.*, 2001).



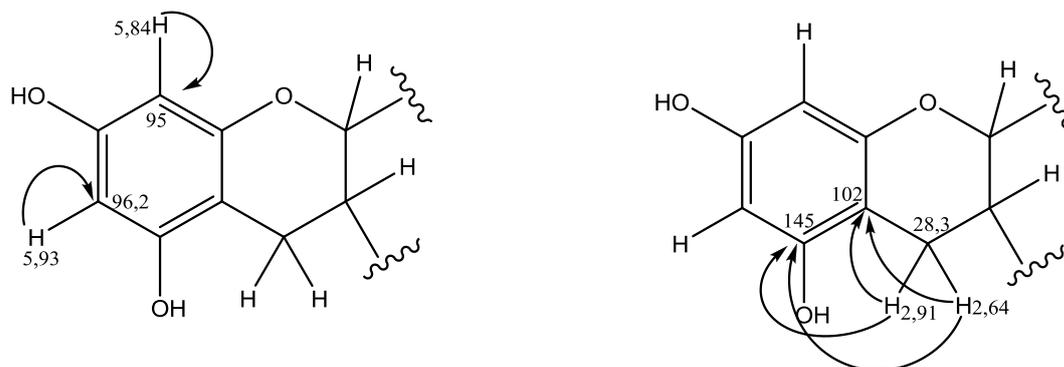
A análise do espectro de RMN ^1H de **FC3** (figura 4.4) apresentou sinais na região de hidrogênios alifáticos: δ 2,64(1H, dd, $J=8,4$ Hz e 16,4 Hz), δ 2,91(1H, dd, $J=6,0$ e 16,5 Hz), δ 4,65(1H, d, $J=8,0$ Hz) e δ 3,95(m) característicos dos hidrogênios H-4a e H-4b (diastereotópicos), H-2 e H-3 respectivamente; na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos os sinais δ 5,93 (1H, d, $J=2,4$ Hz) e δ 5,84 (1H, d, $J=2,4$ Hz) referem-se aos hidrogênios H-8 e H-6; os dois dubletos em δ 7,22 (2H, d, 8,5 Hz) e δ 6,78 (2H, d, 8,5 Hz), foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6', H-3' e H-5' referente a um sistema de acoplamento de spin AA'BB'.



No espectro de HSQC (figura 4.5), pôde-se observar a correlação do duplete em δ 4,65 com um sinal de carbono em δ 81,0; o multiplete em δ 3,95 correlacionando com o carbono δ 76,2 e a correlação dos hidrogênios δ 2,91 e 2,64 (H-4a e H-4b) com o carbono δ 28,3. O experimento de HMBC (figura 4.6) mostrou as correlações do hidrogênio em δ 4,65 (H-2) com os carbonos em δ 129 (C-6') e 130 (C-1').



O espectro de HSQC também apresentou correlação com os hidrogênios δ 7,22 (H-2') e δ 6,78 (H-5') com os carbonos em δ 129,0 e δ 116,3. E a partir do espectro de HMBC estes hidrogênios (H-2' e H-6') correlacionaram-se com os sinais de carbono δ 81,0 e δ 156,4 referentes aos carbonos C-2 e C-4'.



O duplete em δ 5,84 (H-8) mostrou no espectro de HSQC correlacionar-se com o carbono em δ 95 (C-8), e o outro duplete característico do hidrogênio em δ 5,93 (H-6) em correlação com o carbono δ 96,2 (C-6). As correlações observadas no HMBC entre os hidrogênios δ 2,64 e 2,91 com os carbonos δ 102 e 145 (C-10 e C-5) confirmaram a ligação com o anel A.

A presença do resíduo de açúcar nesta estrutura foi confirmada pela presença do duplete em δ 4,25(d) (H-1'' anomérico), com uma constante de acoplamento bastante pequena devido

ao acoplamento diequatorial do H-1'' e H-2'', e de hidrogênios carbinólicos entre δ 3,61 e 4,19. A caracterização da ramnose foi então realizada com base no sinal de dubleto em δ 1,24, referente ao acoplamento dos hidrogênios da metila (H-6'') com o hidrogênio H-5'', e em comparação aos dados da literatura.

Através do espectro de HMBC observou-se a correlação do hidrogênio anomérico da ramnose em δ 4,25 com o carbono em δ 76,2 (C-3), confirmando a unidade de ramnose ligada ao flavonóide.

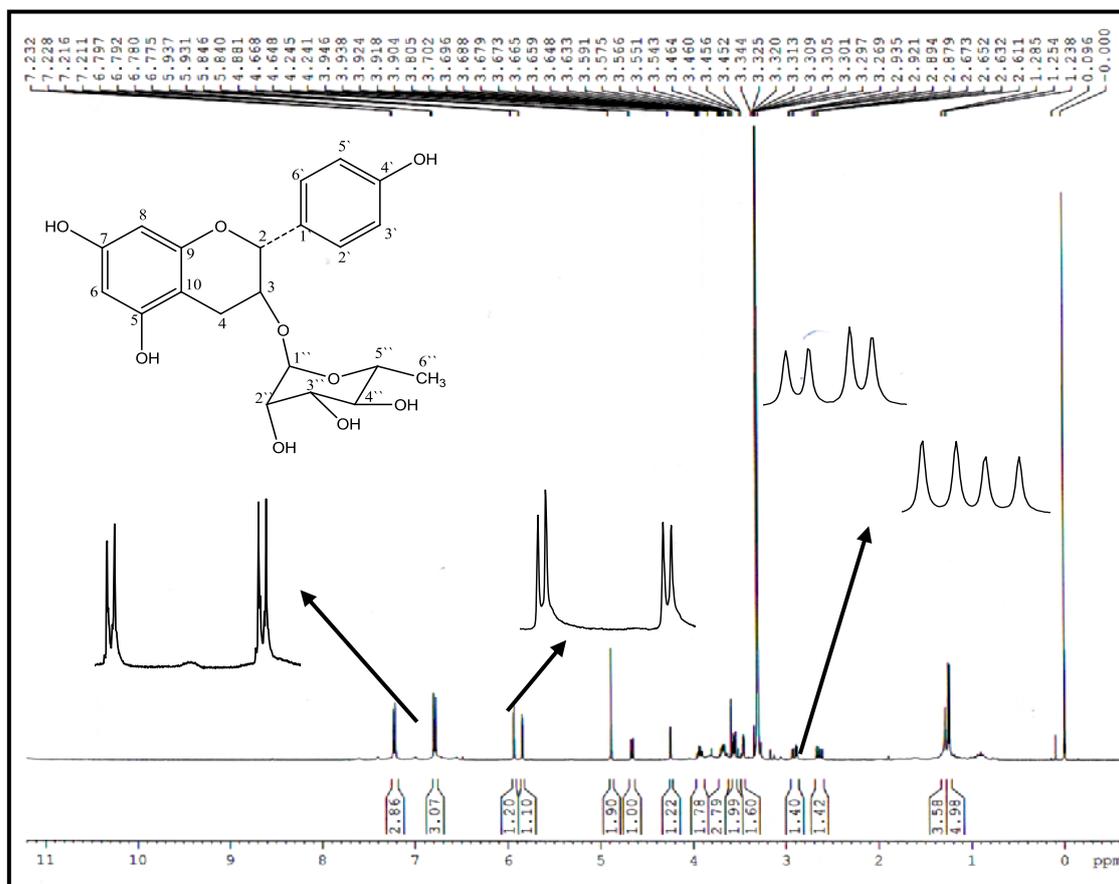
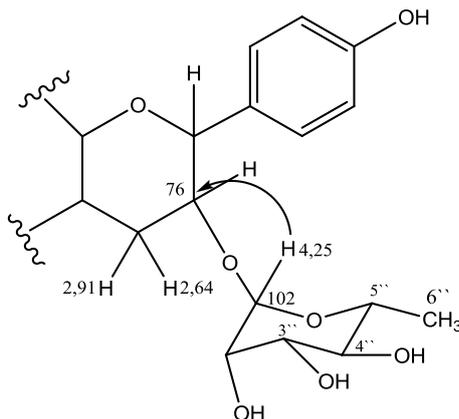


Figura 4.4. Espectro de RMN ^1H do flavonóide **FC3** (MeOD, 400 MHz)

Os dados experimentais obtidos e as correlações encontradas nestes experimentos em comparação com a literatura permitiram identificar a substância **FC3** como a catequin-3-O-ramnopiranosídeo.

Tabela 4.2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da catequin-3-O-ramnopiranosídeo

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} lit ^(c)	δ_{C} ^{(b)*}	δ_{C} lit ^(d)
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
2	4,65(1H, d 8,0)	4,9(d 6,5)	81,0	79,6
3	3,95(m)	4,19(m)	76,2	76,3
4	2,91(dd 16,5; 6,0)	2,91(dd 16,5; 5,5)	28,3	26,7
	2,64(dd 16,4; 8,4)	2,76(dd 16,5; 7,0)		
5	-	-	145,0	152,7
6	5,93(d 2,4)	6,04(d 2,5)	96,2	96,3
7	-	-	-	157,7
8	5,84(d 2,4)	5,91(d 2,5)	95,0	95,5
9	-	-	-	156,5
10	-	-	102,0	100,3
1'	-	-	130,0	129,85
2'/6'	7,22(d 8,5)	7,56(d 8,5)	129,0	128,81
3'/5'	6,78(d 8,5)	6,96(d 8,5)	116,3	116,48
4'	-	-	-	156,4
1''	4,25(d)	4,12(d 1 β)	102	101
2''	3,62(dd 3,2; 9,2)	3,84(m)	72,5	69
3''	-	5,12(dd 3; 9,7)	71,8	74
4''	3,68(m)	3,71(t 9,7)	71,5	70
5''	3,70(m)	4,41(dq 6,2; 9,7)	70,0	69,5
6''	1,24(d 6,4)	1,22(d 6,2; 9,7)	31,0	30

(a) MeOD; (b) MeOD; (c) acetona d_6 (LOKVAMA *et al.*, 2004; DAVID, *et al.*, 2006; KRAFT, *et al.*, 2001);

(d) acetona d_6 (LOKVAMA *et al.*, 2004; DAVID, *et al.*, 2006; KRAFT, *et al.*, 2001)

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

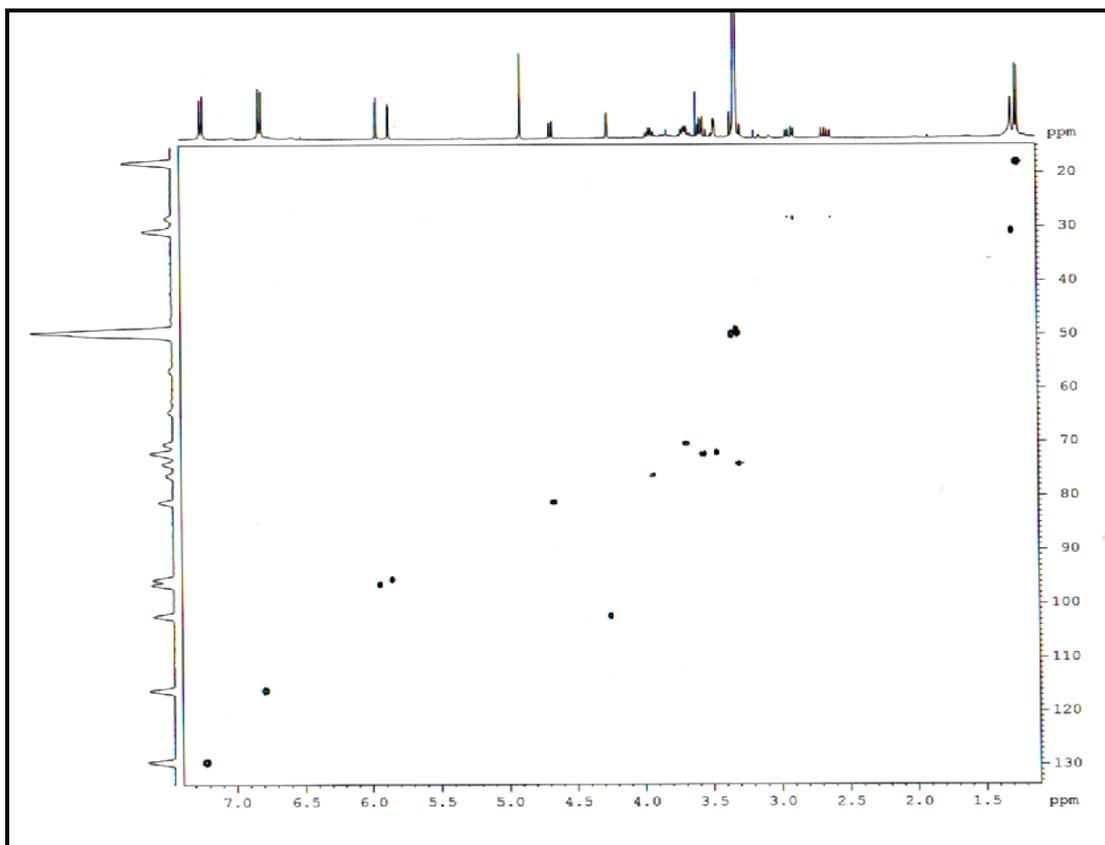


Figura 4.5. Mapa de contorno de HSQC de FC3 (MeOD, 400 MHz)

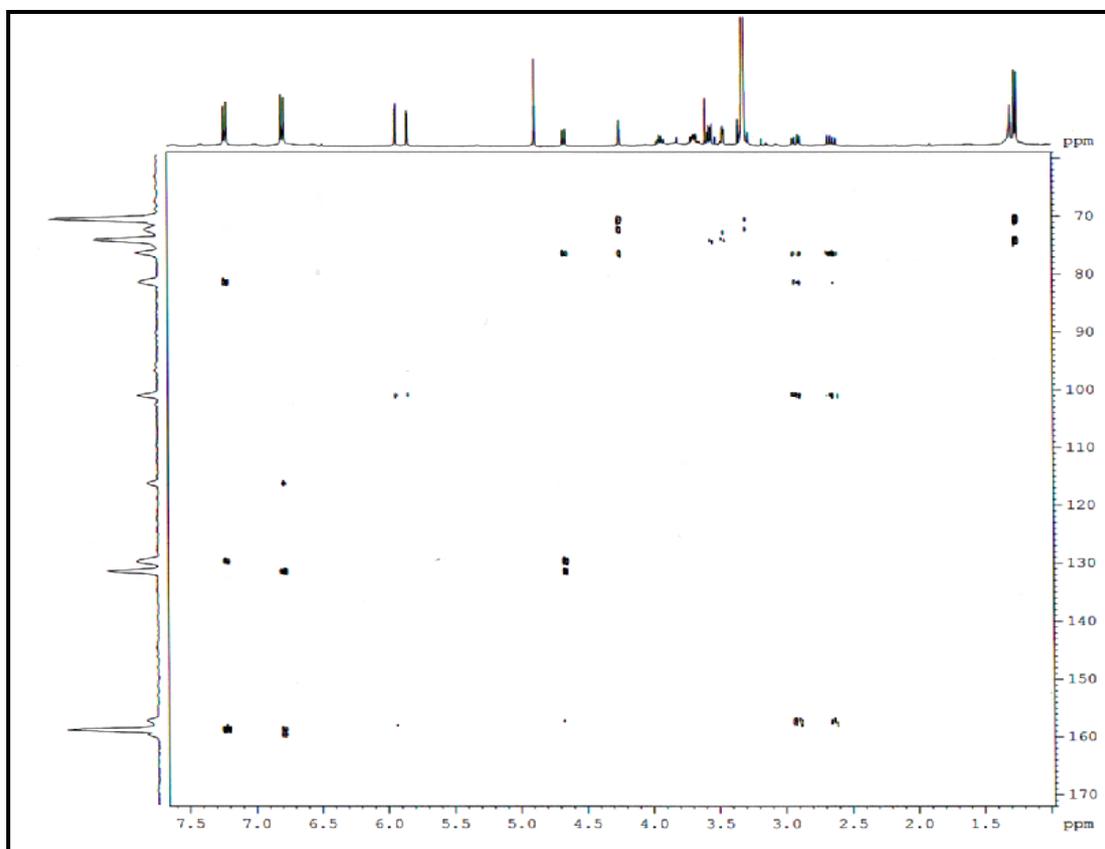
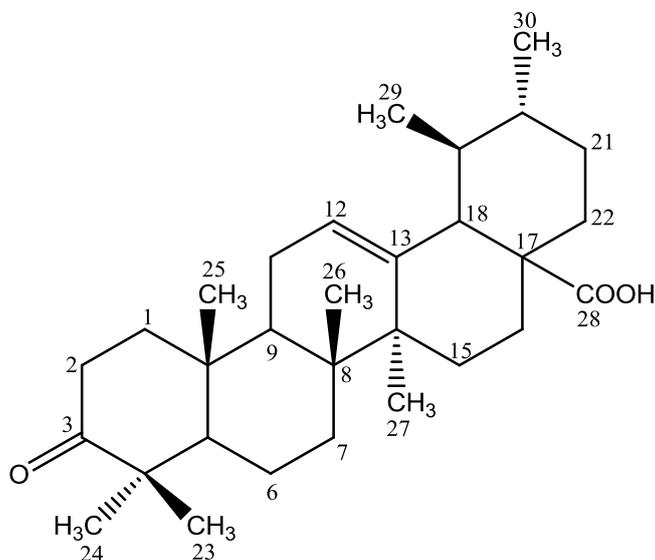


Figura 4.6. Mapa de contorno de HMBC de FC3 (MeOD, 400 MHz)

4.1.3. Determinação estrutural do triterpeno T2

A substância T2 é um triterpeno isolado da fração diclorometânica (VTCcED) proveniente do extrato etanólico das cascas do caule de *V.thyrsoidea*. Foi isolado 2,0 mg de um pó branco e amorfo, sendo revelado como uma única mancha roxa na CCDA, usando AcOEt:hexano 2:8. Sua estrutura foi determinada através dos experimentos de RMN ^1H , RMN ^{13}C e também da comparação com dados na literatura (GNOATTO *et al.*, 2008).



A análise dos espectros de RMN de ^1H (figura 4.7) mostrou um sinal centrado em δ 5,27 (m), referente ao H-12 olefínico. Já na região entre δ 0,75 e 1,5 percebe-se os hidrogênios de metilenos sendo 7 grupos metilas.

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 4.8) apresentou 30 carbonos demonstrando a característica de esqueleto triterpênico de seu constituinte, e os sinais de carbono sp^2 em δ 126,1 e 139,4 atribuídos aos carbonos C-12 e C-13 confirmaram a presença da dupla ligação.

Através da comparação do espectro de carbono com os dados descritos na literatura (GNOATTO *et al.*, 2008), observou-se que os sinais eram característicos de esqueleto ursânico, e o sinal em 216,2 característico de carbono de carbonila confirmou a estrutura do ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico.

Tabela 4.3. Dados de RMN de ^1H do ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico

H	δ_{H} ^(a)	$\delta_{\text{H lit}}$ ^(b)
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)
5 e 25	0,86(s)	0,87(s)
30	0,90(d 6,4)	0,91(d 6,3)
11 e 20	0,97(m)	0,95(m)
29	1,02(d)	0,99(d 6,0)
26	1,05(s)	1,07(s)
24	1,08(s)	1,11(s)
23 e 27	1,15(s)	1,13(s)
2,7 e 19	1,38(m)	1,36(m)
1, 15, 16 e 21	1,51(m)	1,52(m)
6	1,52(m)	1,64(td 14,3; 7,0)
16	1,71(m)	1,76(dd 13,6; 7,0)
15 e 22	1,97(m)	1,94(m)
18	2,25(d 12)	2,24(d 11,2)
12	5,27(m)	5,31(m)

(a) acetona d_6 ; (400 MHz) (b) CDCl_3 ; (500 MHz) (GNOATTO *et al.*, 2008)

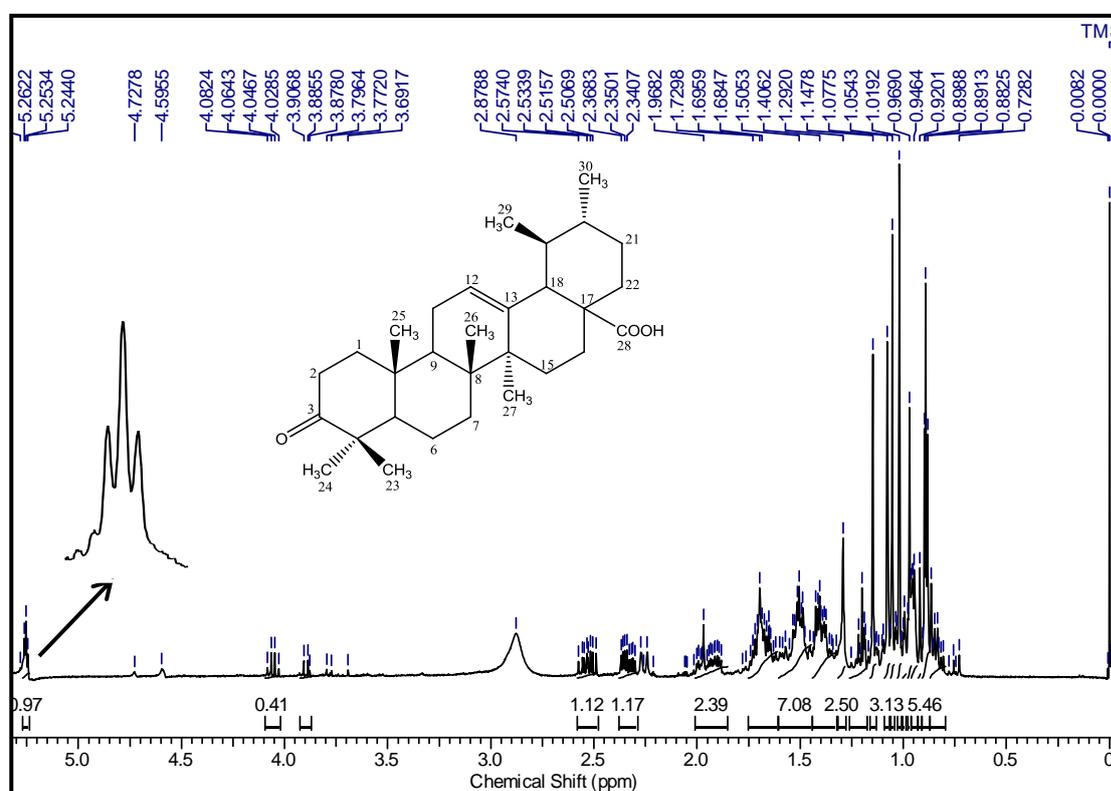


Figura 4.7. Espectro de RMN ^1H do triterpeno T2 (acetona d_6 , 400 MHz)

Tabela 4.4. Dados de RMN de ^{13}C do ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico

C	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{C}} \text{lit}^{(c)}$
	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
1	39,6	39,2
2	21,5	19,9
3	216,2	217,7
4	37,6	39,4
5	55,9	55,6
6	20,3	19,6
7	33,4	33,7
8	40,4	40,6
9	47,6	47,8
10	37,4	37,1
11	23,9	23,8
12	126,1	125,9
13	139,4	138,5
14	41,6	42,7
15	26,9	26,9
16	24,17	24,5
17	47,8	48,4
18	53,9	52,9
19	40,4	39,7
20	39,9	39,8
21	31,4	31,0
22	34,6	37,1
23	28,8	28,4
24	21,8	21,8
25	15,6	15,6
26	17,6	15,9
27	25,0	23,8
28	178,0	184,1
29	17,65	17,3
30	21,48	21,6

(b) acetona d_6 ; (200 MHz) (c) CDCl_3 ; (125 MHz) (GNOATTO *et al.*, 2008)

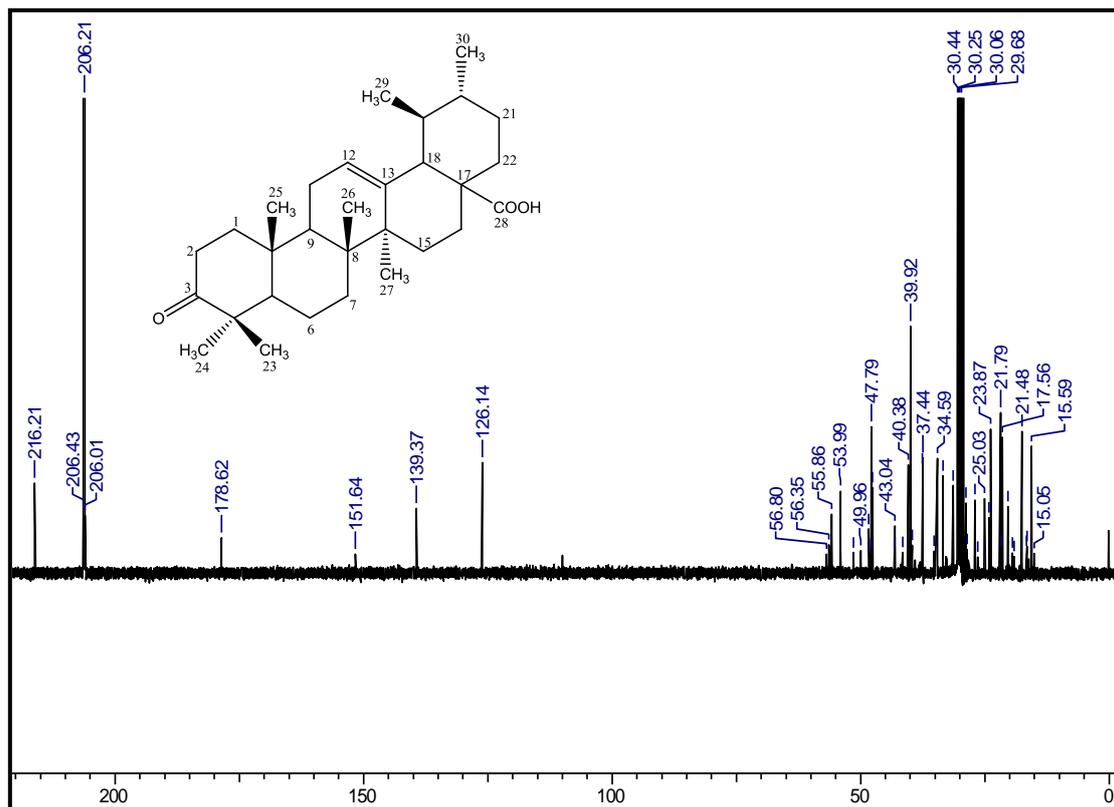
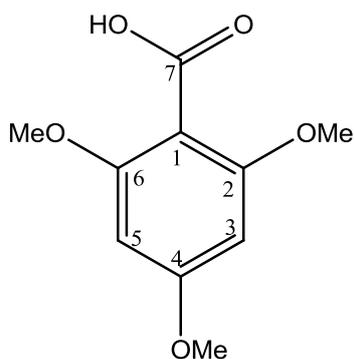


Figura 4.8. Espectro de RMN ^{13}C do triterpeno T2 (acetona d_6 , 200 MHz)

4.1.4. Determinação estrutural do ácido TC8



Do extrato etanólico, partição diclorometânica (VTCcED), da casca do caule de *V. thyrsoides*, após várias etapas cromatográficas em sílica, foi obtido 5,2 mg de uma substância amarela. A análise do espectro de RMN de ^1H (figura 4.9) revelou um sinal em δ 6,12(s), integrando para 2H (H-3 e H-5), sendo química e magneticamente equivalentes; e dois sinais em δ 3,74 e 3,61(singletos), integrando para nove hidrogênios no total. O espectro de RMN de ^{13}C (figura 4.10) revelou somente seis sinais, sendo dois referente à porção

aromática em δ 94,04 e 154,96, dois referentes às metoxilas em δ 60,67 e 56,25 e o carbono mais desblindado em δ 206,27 da carbonila.

Os dados espectrais obtidos e os dados relatados na literatura (RUSSEL et al., 1990), trouxeram a proposta da estrutura do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico.

Tabela 4.5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H lit}}^{(b)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{C lit}}^{(b)}$
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)
2 e 6 (OCH₃)	3,74(s 6H)	3,95(s 6H)	56,74	60,67
3 e 5	6,12(s 2H)	7,03(s 2H)	107,93	94,04
2, 6 e 4	-	-	154,96	-
4 (OCH₃)	3,61(s 3H)	3,90(s 3H)	52,185	56,25
7	-	-	206,54	206,27

(a) acetona d₆; RMN ^1H (400 MHz) (b) MeOD; RMN ^1H (500 MHz) (RUSSEL et al., 1990)

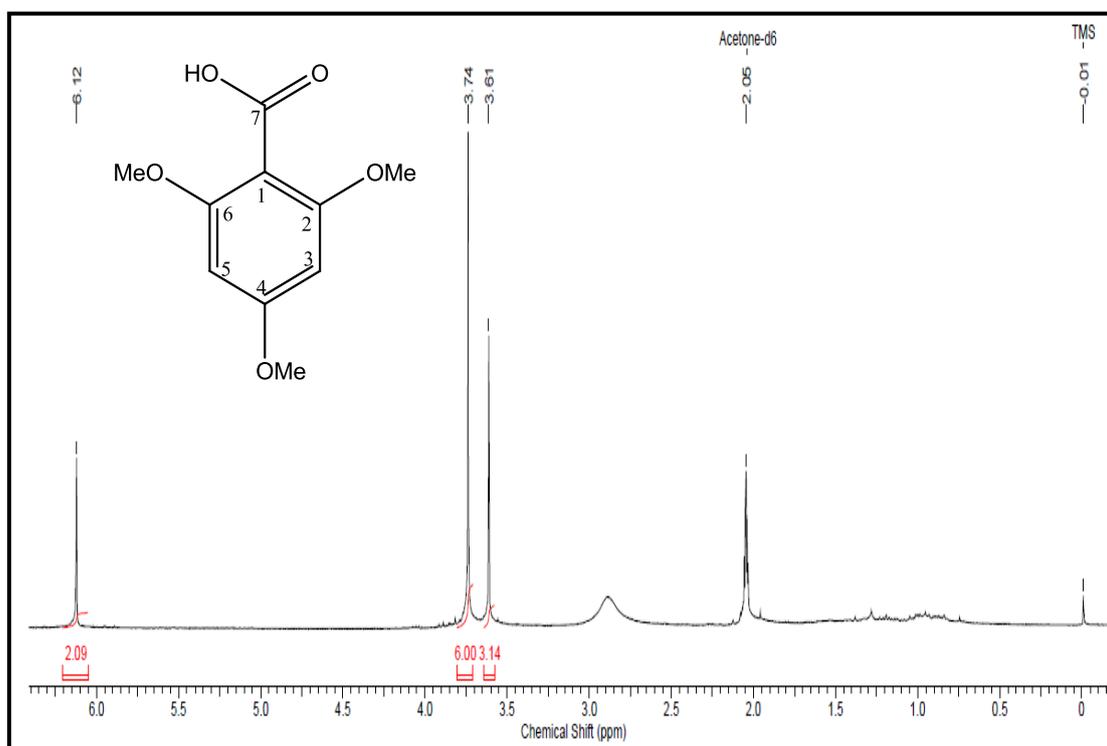


Figura 4.9. Espectro de RMN ^1H do ácido TC8 (acetona d₆, 400 MHz)

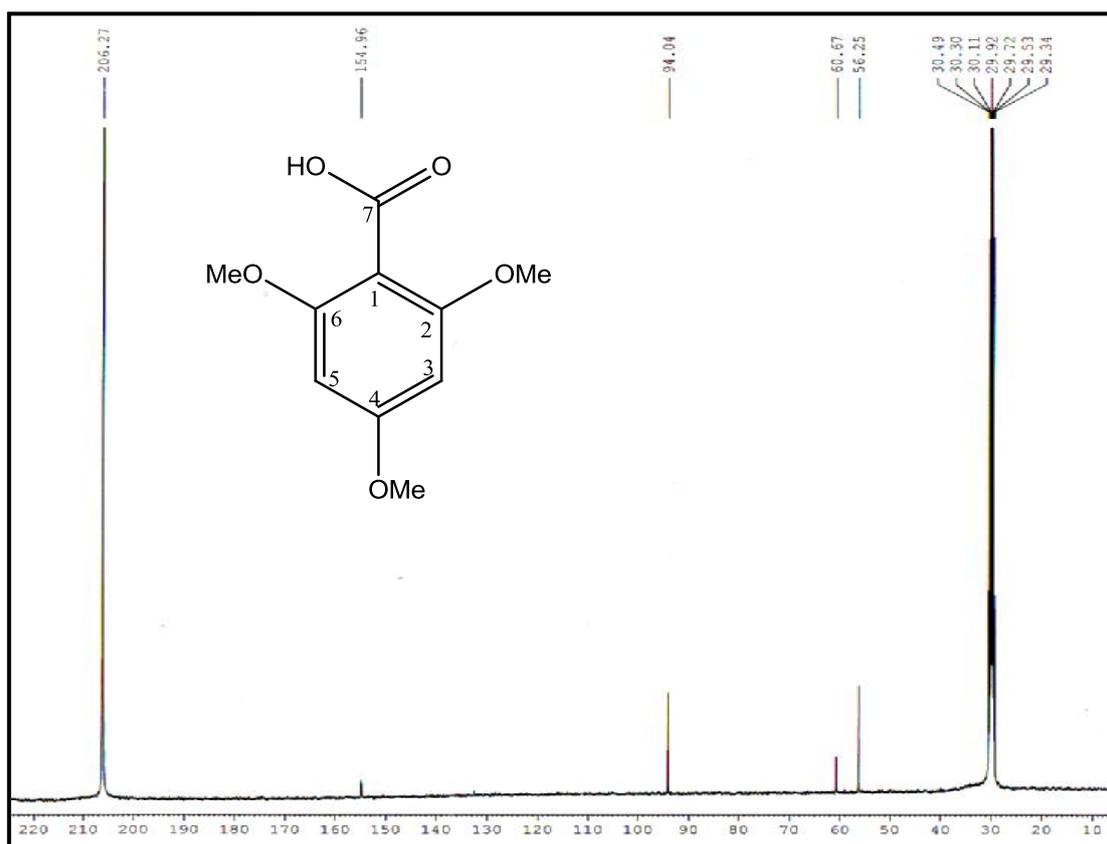
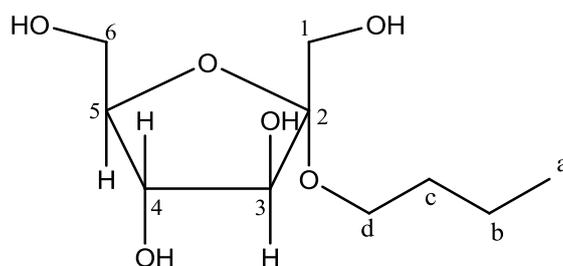


Figura 4.10. Espectro de RMN ^{13}C do ácido TC8 (acetona d_6 , 400 MHz)

4.1.5. Determinação estrutural do frutofuranosídeo A8

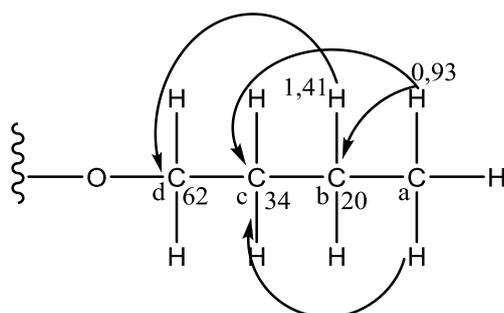
Foram isolados da fração n-butanólica (VTCcEB) proveniente do extrato etanólico das cascas do caule de *V.thyrsoidea*, 20,0 mg do frutofuranosídeo A8. Sua estrutura foi determinada através dos experimentos de IV, RMN ^1H , HSQC e HMBC e também da comparação com dados na literatura (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007).



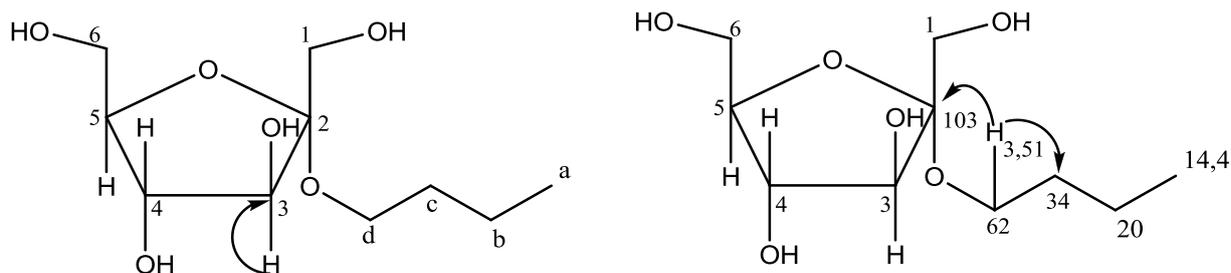
No espectro de infravermelho (figura 4.11) foram observadas absorções características de ligações O–H de hidroxilas ($\nu=3400$). A presença da deformação axial de C–O–C levaram usualmente a formação de um multiplete na região de 1028-1121 cm^{-1} , devido às ramificações dos átomos de carbono adjacentes ao oxigênio. E a cadeia alquílica pôde ser evidenciada por dois conjuntos de bandas de absorção, deformação axial de ligações C–H ($\nu=2874$, 2959 e 2932) e deformação angular ($\nu=1462$ e 1383).

O espectro de RMN ^1H (figura 4.12) mostrou um triploto bastante intenso em δ 0,93(t 3H) referente ao hidrogênio da metila; um sexteto em δ 1,41 e um quinteto em δ 1,53 integrados para dois hidrogênios cada. Um duplo-dubeto é observado em δ 3,51 (dd $J=6,4$; 9,0 Hz), indicando a presença de uma unidade O-glicosídica que provocou a desblindagem destes hidrogênios da cadeia alquílica (H-d). Neste experimento observa-se ainda a presença de multipletos na região de δ 3,47-3,77 relativos aos hidrogênios carbinólicos, e um dubeto em δ 4,1 (d 1H; 4,8) referente ao H-3, confirmando assim a presença de uma unidade de açúcar.

No espectro de HSQC (figura 4.13) é possível observar a correlação do sinal em δ 0,93 (H-a) com um sinal em δ 14,5, atribuído ao carbono da metila; o sexteto em δ 1,41(H-b) e o quinteto em δ 1,53 (H-c) mostraram correlação com seus respectivos carbonos em δ 20,0 e δ 34,0; e o duplo dubeto em δ 3,51 (H-d) correlacionando com um sinal em δ 62,0 (OCH₂) que é característico deste carbono. No HMBC (figura 4.14) visualizamos as correlações entre os hidrogênios e os carbonos adjacentes como é demonstrado abaixo, confirmando a cadeia n-butílica.



Foi observado também no HSQC que o dubeto em δ 4,10 (1H, H-3, $J=8,0$ Hz) correlacionou-se com o sinal em δ 83,0 (C-3) e os hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica que estão entre δ 3,47 e 3,77 correlacionaram-se com os sinais de carbono que comparados à literatura (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007) confirmam o açúcar frutofuranose.



Os sinais de carbono projetados no espectro de HMBC confirmam através das correlações este açúcar. Em específico, o sinal em δ 3,51 (H-d) correlacionando com os carbonos em δ 34,0 (CH₂) e δ 103,0 (C-2), confirmam a ligação da cadeia alquílica a unidade de açúcar na posição do carbono 2 podendo concluir a identificação de um 2-butil D-frutofuranosídeo.

Tabela 4.6. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do 2-butil D-frutofuranosídeo

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} lit ^(c)	δ_{C} ^{(b)*}	δ_{C} lit ^(d)
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
CH₃	0,93(t 3H)	0,92(t 3H)	14,5	14,4
CH₂	1,41(sexteto, 2H)	1,37(sexteto, 2H)	20,0	20,3
CH₂	1,53(quintet, 2H)	1,51(quintet, 2H)	34,0	33,5
OCH₂	3,51(dd 6,4; 9,0)	3,47-3,77(m)	62,0	64,2
1 e 1'	3,62(d 12 Hz) e 3,7(d 12 Hz)	3,47-3,77(m)	62,0	62,0
2	-	-	103,0	105,2
3	4,1(d 1H; 4,8)	4,11(d 1H; 8,1)	83,0	78,4
4	3,91(dd 1H; 7,6; 8,0)	3,92(dd 1H; 7,7; 7,8)	78,0	77,3
5	3,8-3,9(m)	3,47-3,77(m)	83,0	83,3
6	3,6-3,8(m)	3,47-3,77(m)	62,0	65,0

(a) MeOD; (b) MeOD; (c) CDCl₃ (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007); (d) CDCl₃ (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007)

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

Dados espectroscópicos de IV de A8

IV (Pastilha de KBr): $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$ 3400; 2959; 2932; 2874; 1730; 1635; 1461; 1383; 1286; 1198; 1120; 1097; 1076; 1028; 743; 702; 619.

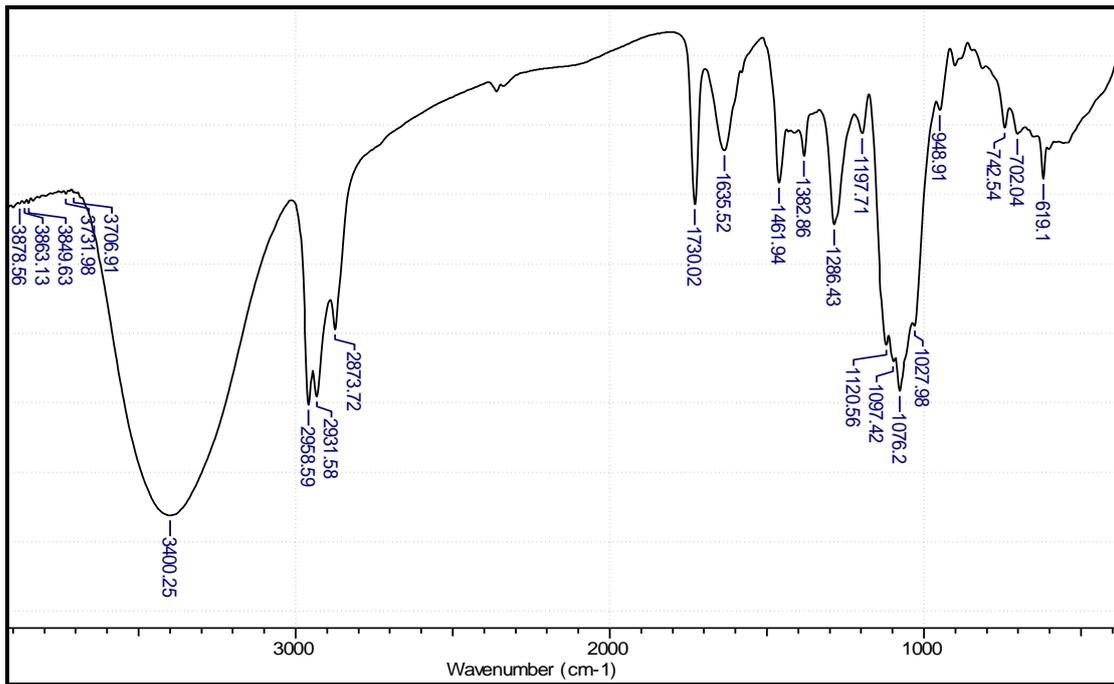


Figura 4.11. Espectro de infravermelho do frutofuranosídeo **A8**

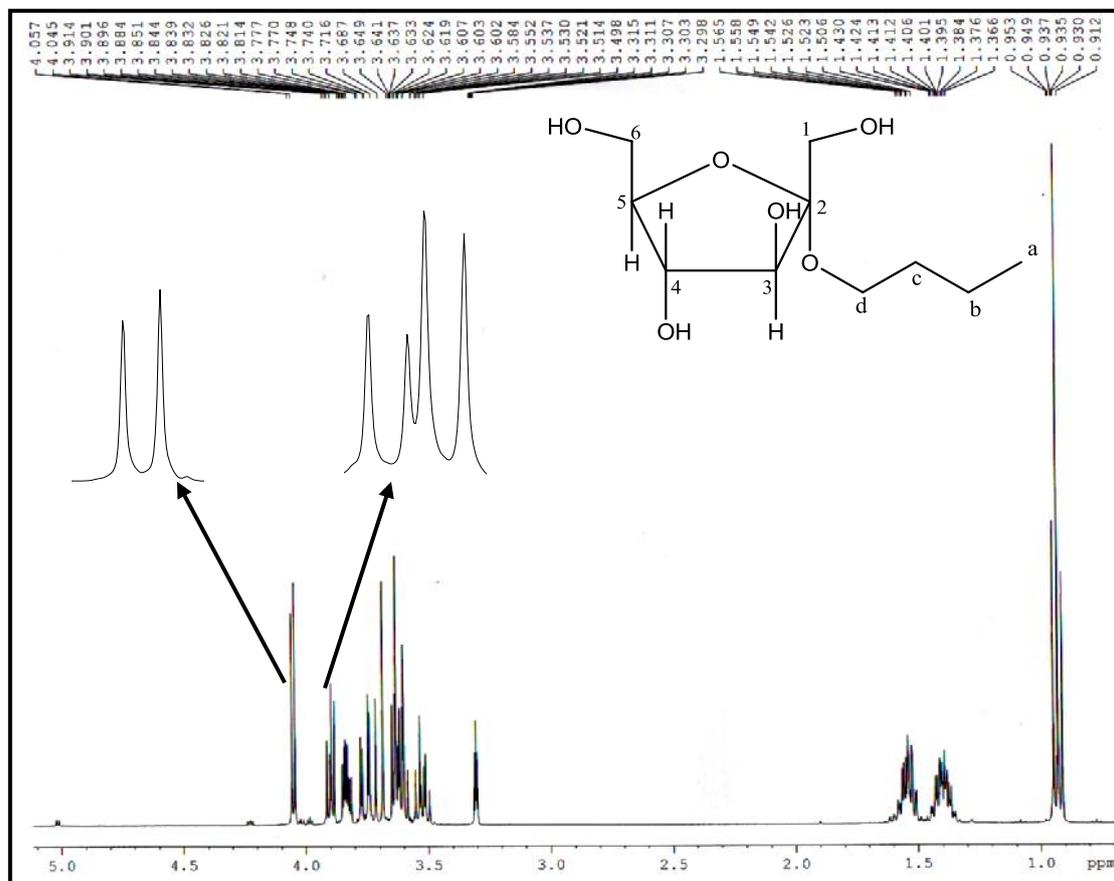


Figura 4.12. Espectro de RMN ^1H do frutofuranosídeo **A8** (MeOD, 400 MHz)

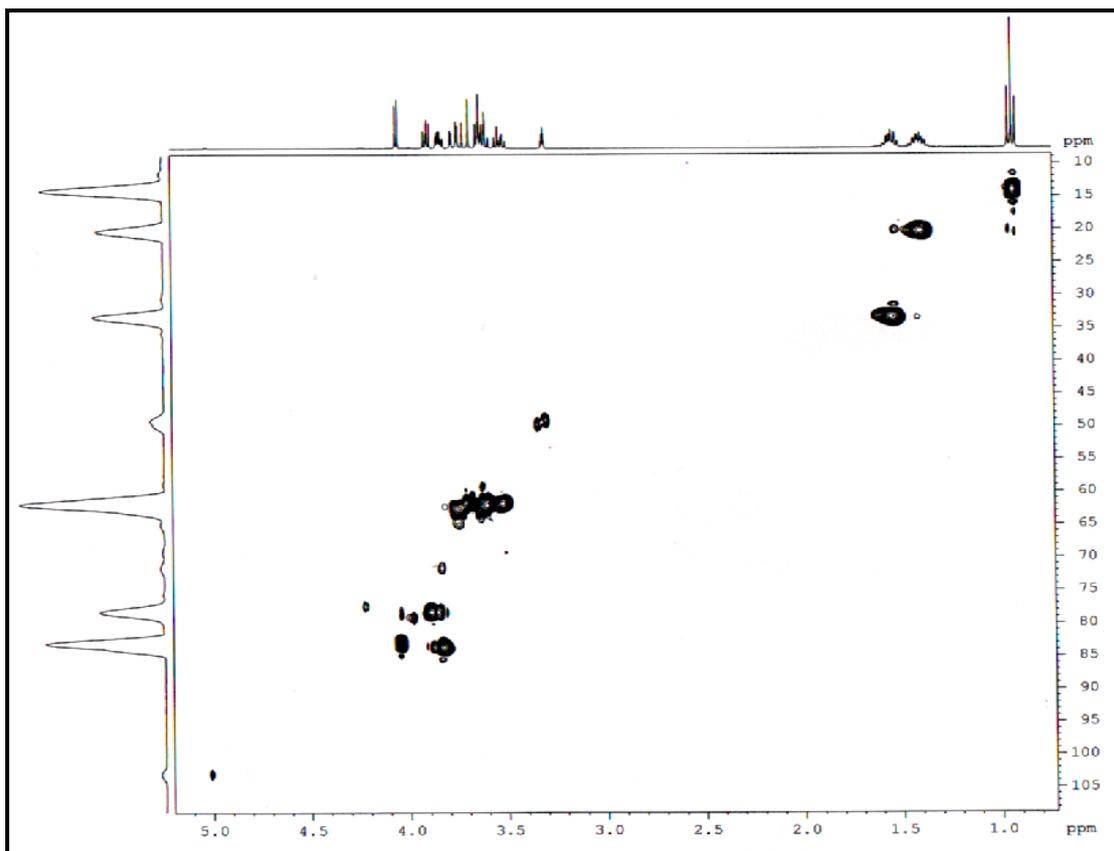


Figura 4.13. Mapa de contorno de HSQC de A8 (MeOD, 400 MHz)

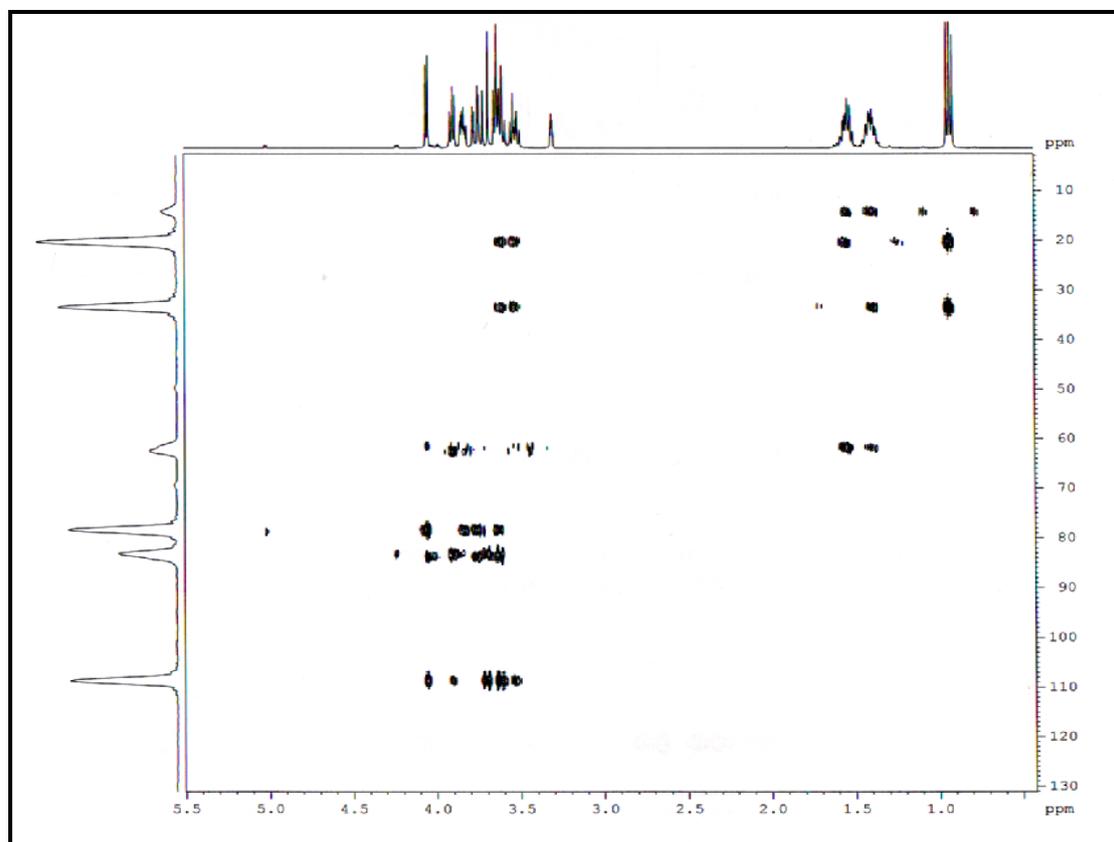
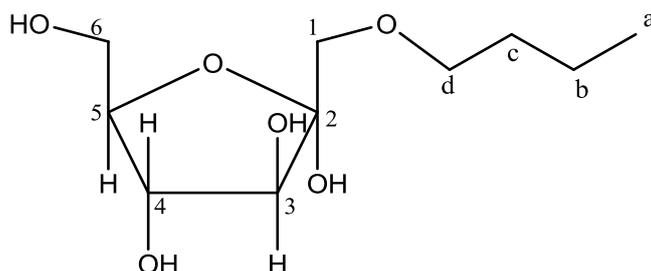


Figura 4.14. Mapa de contorno de HMBC de A8 (MeOD, 400 MHz)

4.1.6. Determinação estrutural do frutofuranosídeo A11

A substância A11 (10,0 mg) também é um frutofuranosídeo isolado da fração n-butanólica (VTCcEB) proveniente do extrato etanólico das cascas do caule de *V.thyrsoidea*. Sua estrutura foi determinada através dos experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC e DEPT, também da comparação com dados na literatura (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007).

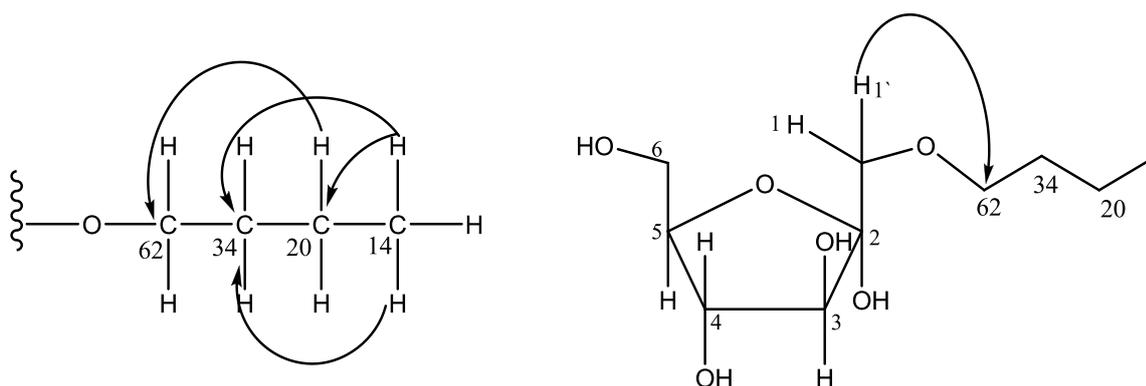


O experimento de DEPT 135 (figura 4.16) foi utilizado para determinar a multiplicidade dos carbonos e ajudar na determinação do açúcar presente nesta substância.

O espectro de RMN ^1H da substância **A11** (figura 4.15) mostrou um tripleto bastante intenso em δ 0,93 (t 3H) referente ao hidrogênio da metila; um sexteto em δ 1,41 e um quinteto em δ 1,53 integrados para dois hidrogênios cada. Observou-se também um duplo dubleto em δ 3,51 (dd $J=6,4; 9,0$ Hz), mostrando hidrogênios mais desblindados em consequência da presença do oxigênio ligado a este carbono.

Há ainda a presença de multipletos na região de δ 3,47-3,77 relativos aos hidrogênios carbinólicos, e um dubleto em δ 4,1 (d 1H; 4,8) referente ao H-3, confirmando assim a presença de uma unidade de açúcar.

No espectro de HMBC (figura 4.18) é possível observar a correlação do sinal em δ 0,93 (H-a) com um sinal em δ 20,0 (C-b) e 34,0 (C-c) atribuídos aos grupos CH_2 ; o sexteto em δ 1,41 (H-b) correlacionou-se com os carbonos em δ 34,0 (C-c), 14,4 (C-a) e 62,0 (C-d); o quinteto em δ 1,53 (H-c) mostrando correlação com os carbonos em δ 20,0 (C-b), δ 14,4 (C-a) e 62,0 (C-d).



A posição que o grupo alquila está ligado ao açúcar é confirmada pela relação entre os hidrogênios H-1 e H-1' com o sinal em δ 62,0 (C-d), sendo a substância A11 identificada como 1-butil D-frutofuranosídeo.

Tabela 4.7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do 1-butil D-frutofuranosídeo

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} lit ^(c)	δ_{C} ^{(b)*}	δ_{C} lit ^(d)
	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$ J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
CH₃	0,93(t 3H)	0,92(t 3H)	14,5	14,4
CH₂	1,41(sexteto, 2H)	1,37(sexteto, 2H)	20,0	20,3
CH₂	1,53(quintet, 2H)	1,51(quintet, 2H)	34,0	33,5
OCH₂	3,51(dd 6,4; 9,0)	3,47-3,77(m)	62,0	64,2
1 e 1'	3,62(d 12 Hz) e 3,7(d 12 Hz)	3,47-3,77(m)	62,0	62,0
2	-	-	103,0	105,2
3	4,1(d 1H; 8,0)	4,11(d 1H; 8,1)	83,0	78,4
4	3,91(dd 1H; 7,6; 8,0)	3,92(dd 1H; 7,7; 7,8)	78,0	77,3
5	3,8-3,9(m)	3,47-3,77(m)	83,0	83,3
6	3,6-3,8(m)	3,47-3,77(m)	62,0	65,0

(a) MeOD; (b) MeOD; (c) CD₃OD (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007); (d) CD₃OD (DUDÍKOVÁ *et al.*, 2007)

* valores obtidos através das projeções de carbono do HSQC e HMBC

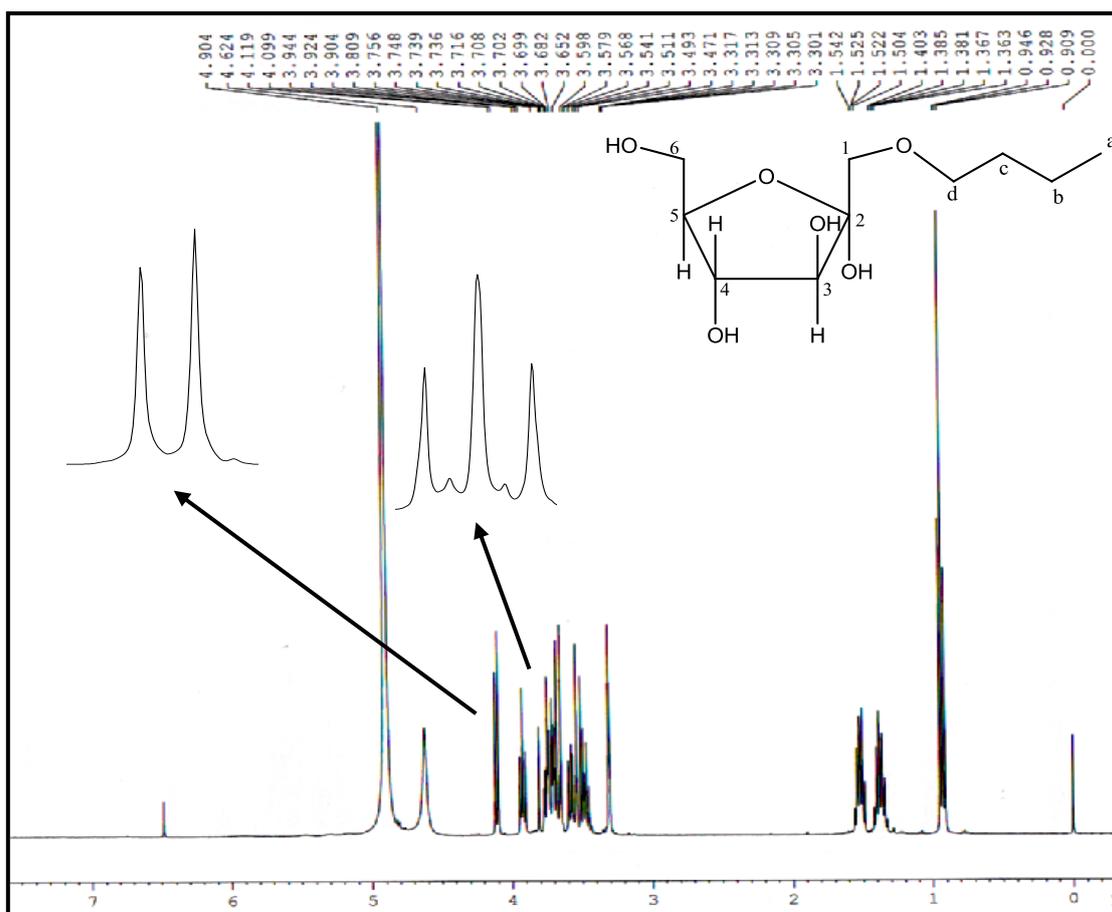


Figura 4.15. Espectro de RMN ^1H de A11 (MeOD, 400 MHz)

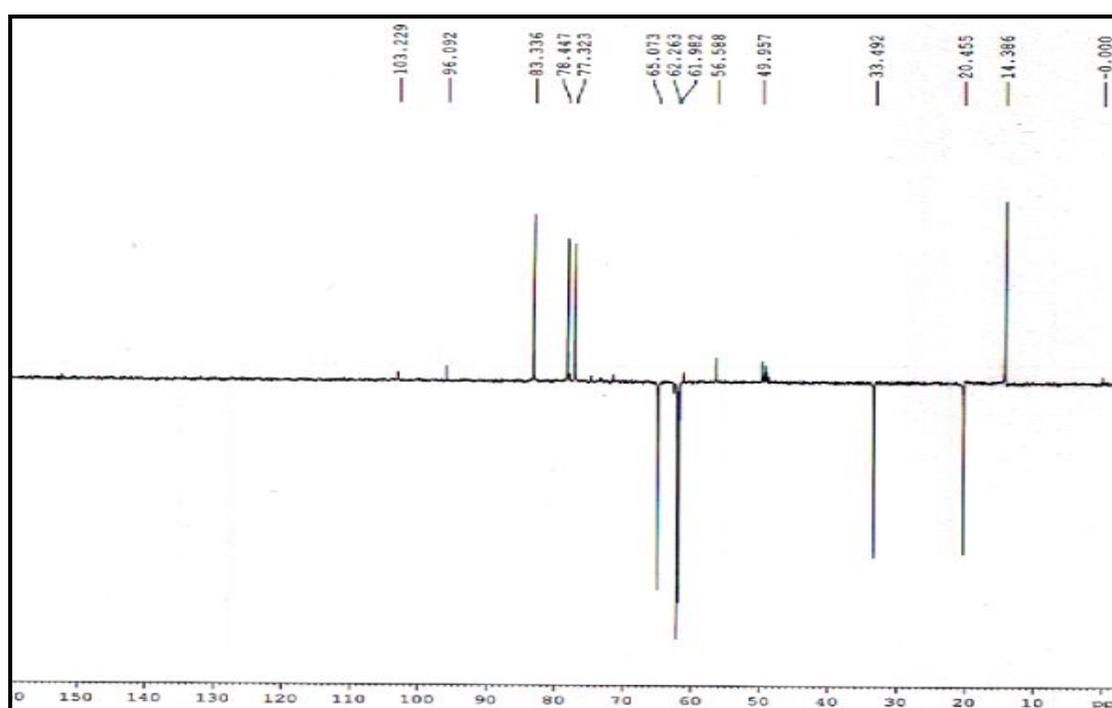


Figura 4.16. Experimento de DEPT 135 de A11 (MeOD, 400 MHz)

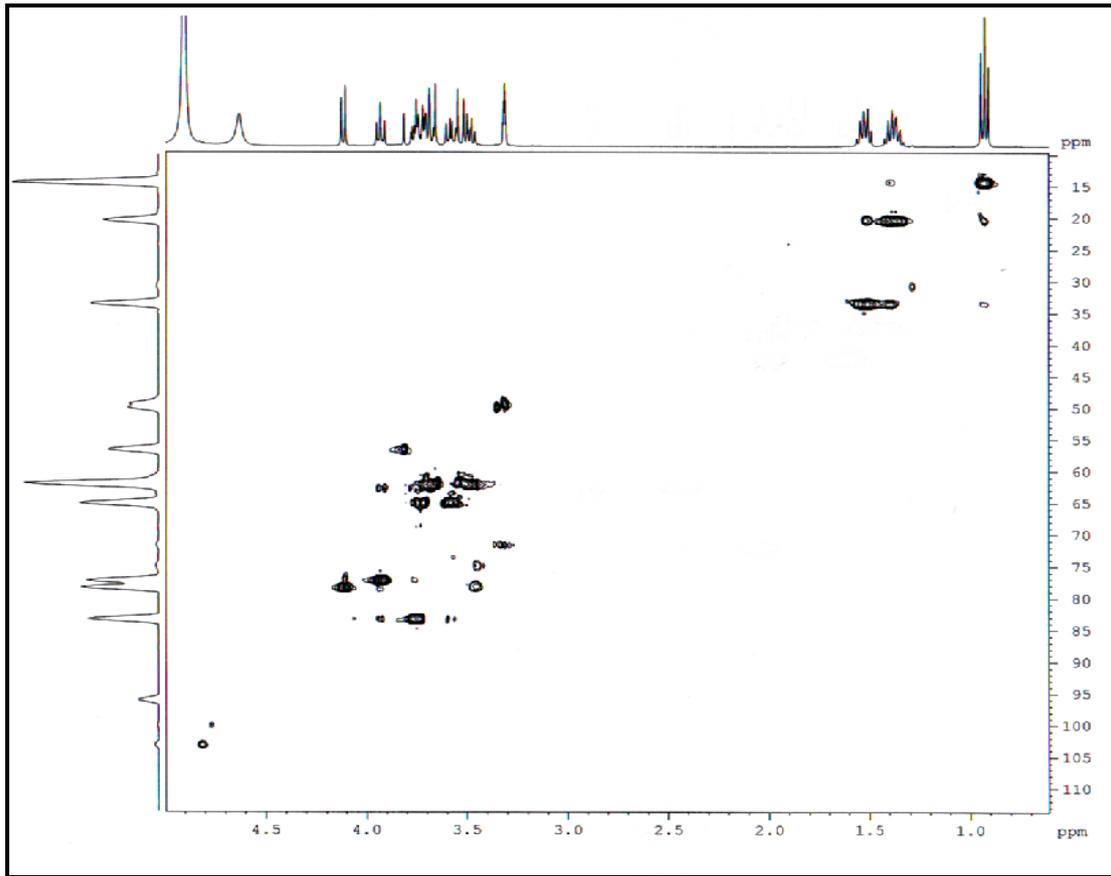


Figura 4.17. Mapa de contorno de HSQC de A11 (MeOD, 400 MHz)

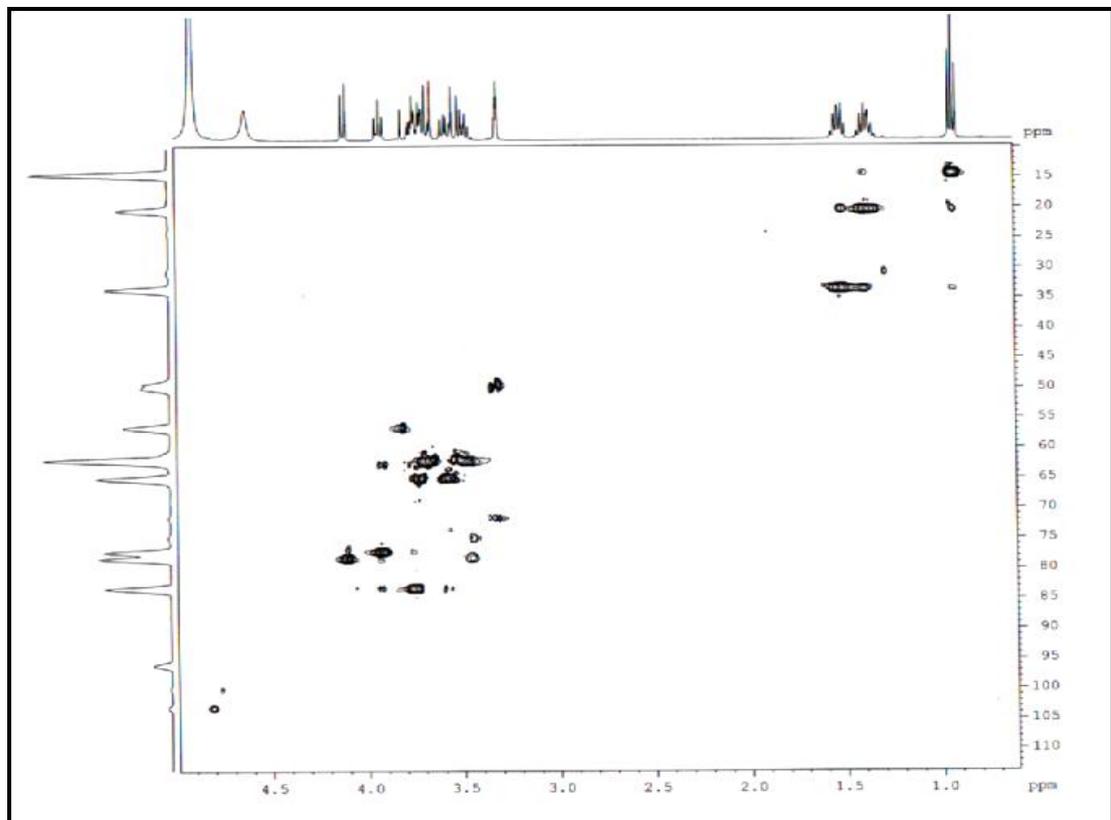


Figura 4.18. Mapa de contorno de HMBC de A11 (MeOD, 400 MHz)

4.2. Reação de acetilação para obtenção de AR8

A acetilação do 2-Butil D-frutofuranosídeo (A8) foi confirmado através dos experimentos de RMN ^1H (figura 4.20), onde foi observado a presença de um singlete em δ 2,86 integrando para 12H que confirmou a acetilação dos quatro grupos hidroxilas (AR8).

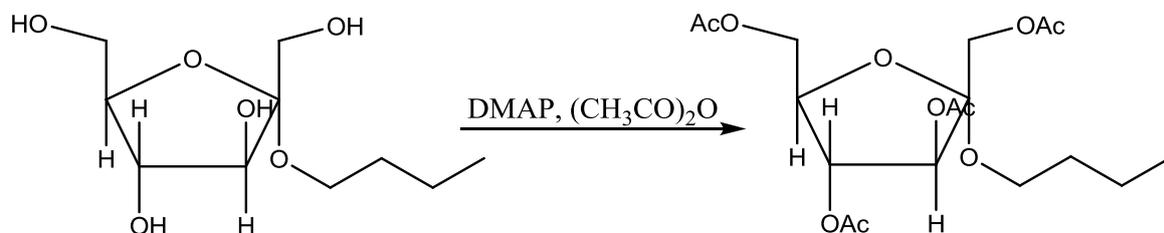


Figura 4.19. Esquema da reação de acetilação de A8

Tabela 4.8. Rendimento total da reação de acetilação de A8

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
2-Butil D-frutofuranosídeo A8 (20 mg; 0,10 mmol)	2-Butil D-frutofuranosídeo acetilado AR8 (16,2 mg; 0,044 mmol)	81%

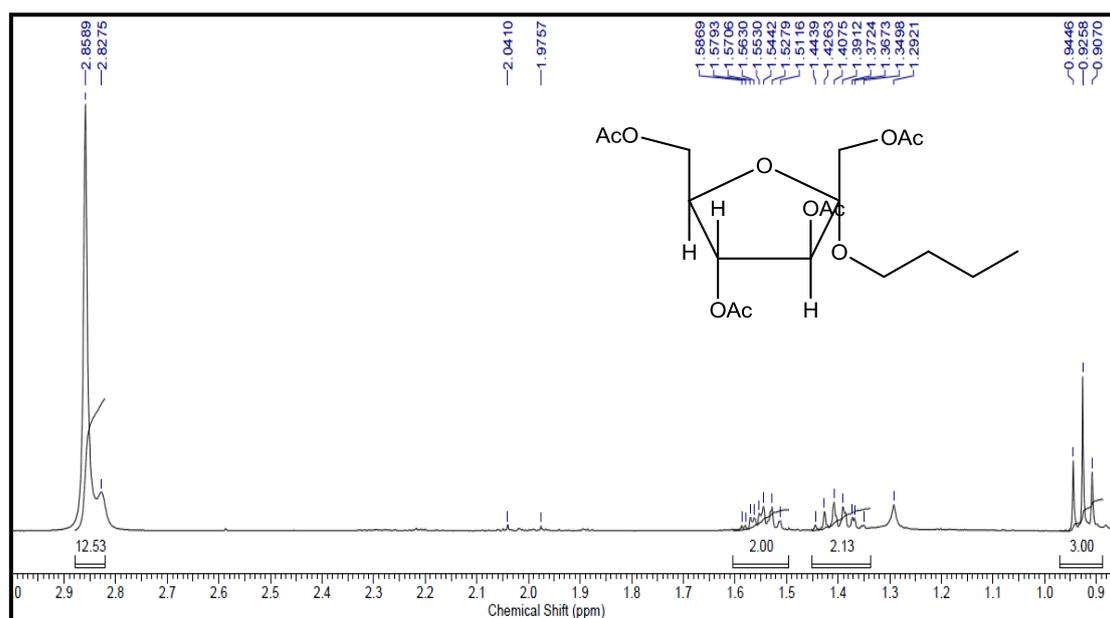


Figura 4.20. Espectro de RMN ^1H de AR8 (MeOD, 400 MHz)

4.3. Reação de acetilação para obtenção de AR11

O 1-Butil D-frutofuranosídeo acetilado (AR11) foi confirmado através dos experimentos de RMN ^1H (figura 4.22) pela observação da presença de um dubleto em δ 2,06 integrando para 9H e um singlete em δ 2,0 integrando para 3H referente aos hidrogênios das metilas do grupo acetil.

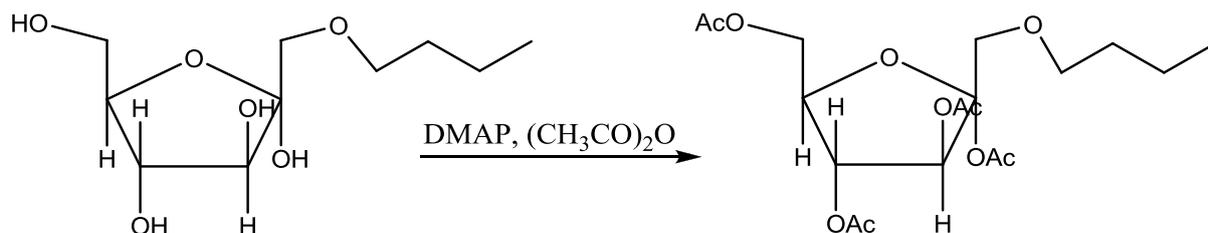


Figura 4.21. Esquema da reação de acetilação de A11

Tabela 4.9. Rendimento total da reação de acetilação de A11

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
1-Butil D-frutofuranosídeo	1-Butil D-frutofuranosídeo acetilado	93%
A11	AR11	
(10 mg; 0,042 mmol)	(9,3 mg; 0,023 mmol)	

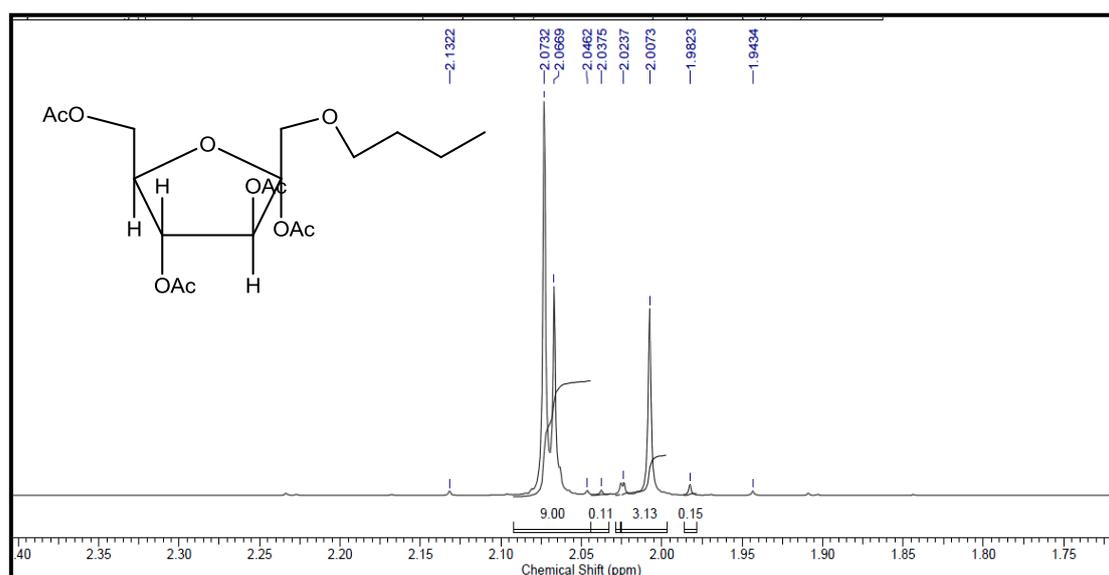


Figura 4.22. Espectro de RMN ^1H de AR11 (MeOD, 400 MHz)

4.4. Atividades biológicas

4.4.1. Atividade citotóxica frente à *Artemia Salina*

Os resultados de citotoxicidade em larvas de *Artemia salina* seguem na Tabela 4.10. A análise dos resultados do teste TAS segundo MEYER *et al.* (1982) é realizada através de uma relação entre a dose letal média, DL₅₀, e o grau de toxicidade, nos quais consideram-se tóxico valores de DL₅₀ < 1000 µg/mL.

Tabela 4.10. Resultados de Letalidade frente à *Artemia salina*

Amostra Analisada	TAS DL₅₀(µg/mL)	Letalidade
VTCcE	283,94	Ativo
VTCcEH	499,60	Ativo
VTCcED	288,33	Ativo
VTCcEA	476,58	Ativo
VTFE	209,08	Ativo
VTFEH	>1000	Inativo
VTFED	921,47	Ativo
VTFEA	32,06	Ativo
VTFEM	151,90	Ativo

V= *Vochysia*; T= *thyrsoides*; F= folha; Cc= casca do caule; E= etanol; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; M = Metanol

Todas as amostras apresentaram citotoxicidade ao TAS exceto o extrato hexânico (VTFEH). As frações obtidas da casca do caule apresentaram DL₅₀ superior ao valor encontrado para o extrato bruto (VTCcE), sugerindo que esta diminuição provavelmente ocorreu devido à separação de substâncias que agiam em sinergismo no extrato bruto. De maneira semelhante às frações de hexano e diclorometano das folhas, também apresentaram DL₅₀ superior ao valor encontrado para o extrato bruto (VTFE), 209,08 µg/mL.

No entanto, os resultados apresentados das frações do acetato e do metanol das folhas foram potencialmente mais ativos que o extrato bruto, sendo que possivelmente houve neste caso a concentração de substâncias letais à artêmia, o que potencializou a toxicidade.

Os ensaios de toxicidade frente a esta espécie de microcrustáceo apresentam correlação com diversas atividades biológicas, e baseando-se nas substâncias obtidas no estudo

fitoquímico foi realizado ensaios de inibição enzimática e de citotoxicidade (PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

4.4.2. Ensaio de inibição enzimática

Os produtos naturais isolados e os derivados sintéticos foram submetidos a ensaios de inibição enzimática das catepsinas B e K. Os resultados de inibição (%) na concentração de 125 μ M e desvio padrão (SD) são apresentados a seguir na tabela 4.11.

Tabela 4.11. Porcentagem de inibição das catepsinas B e K pelas substâncias testadas na concentração de 125 μ M

Amostra	Cat B	Cat K
FC3	9,87 (+/- 0,05)	0
F1	80,34 (+/- 1,69)	0
TC8	48,91 (+/- 3,54)	0
T2	3,99 (+/- 8,33)	10,78(+/- 6,84)

Os compostos testados não apresentaram inibição frente à catepsina K, exceto o triterpeno ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico (**T2**), que apresentou 10,78% (+/- 6,84) de inibição.

No entanto os resultados de atividade inibitória frente à catepsina B foram bastante distintos, nos quais o composto ácido 3-oxo-urs-12en-28-oico (**T2**) obteve inibição de 3,99% (+/- 8,33) e o ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico (**TC8**) inibiu 48,91% (+/- 3,54).

Os alquilglicosídeos (**A8 e A11**) e os seus derivados (**AR8 e AR11**) não apresentaram potencial inibitório contra as catepsinas testadas, sendo estas modificações estruturais por reação de acetilação pouco importantes em relação a esta atividade.

O flavonóide catequín-3-O-ramnopiranosídeo (**FC3**) inibiu 9,87% (+/- 0,05) e a catequina-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo (**F1**) apresentou um resultado bastante expressivo com inibição seletiva de 80,34% (+/- 1,69) da catepsina B, $IC_{50}=65,12$ (+/-2,99 μ M) (figura 4.23).

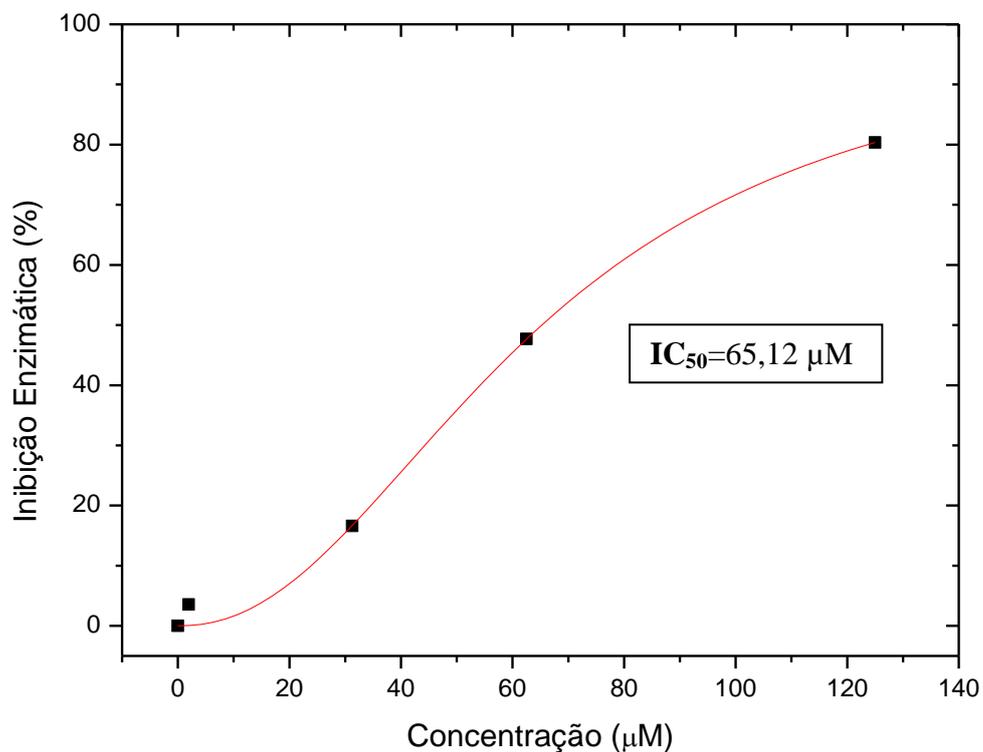
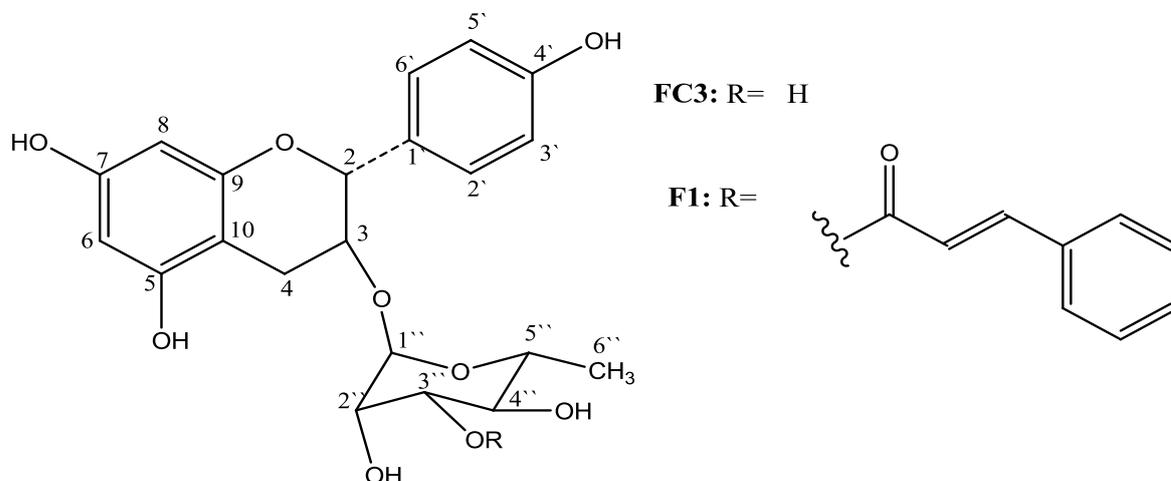


Figura 4.23. IC_{50} da catequina-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo sobre a catepsina B

Vale ressaltar que o composto **F1** e o composto **FC3** apresentam estruturas bastante semelhantes, diferenciando apenas no substituinte na posição 3'', sendo hidroxila e ácido cinâmico respectivamente, o que diferenciou significativamente as atividades frente à catepsina B.



Os flavonóides apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, como a atividade anti-inflamatória, anti-fibrótica, anticoagulante, antibacteriana, antioxidante, antitumoral e anti-hipertensiva. Assim, o estudo desta classe de composto tem sido de grande interesse (HUBER e AMAYA, 2008; DEWICK, 2002).

Trabalhos da literatura sobre flavonóides e derivados testados frente às cisteíno peptidases apresentaram resultados bastante interessantes, sendo compostos promissores na busca de inibidores específicos para estas enzimas.

PAN et al. (2005), mostraram atividade inibitória das bioflavonas isoladas de *Taxodium mucronatum* frente à catepsina B (IC₅₀ de 1,75, 1,68 e 0,55 µM). E alguns flavonóides como dihidrochalconas diméricas e flavonas isolados de *Artocarpus altilis* (Moraceae) mostraram significativa atividade inibitória frente à catepsina K (IC₅₀ de 170 e 840 nM) (PATIL et al., 2002).

Na busca de inibidores específicos frente às catepsinas K, V, L e S alguns derivados de catequinas foram estudados e tiveram boa atividade, como seguem os resultados na tabela 4.12 (KATUNUMA et al., 2006).

Tabela 4.12. Porcentagem de inibição de flavonóides frente às cisteíno peptidases (25 µM)

Flavonóide	Cat K	Cat V	Cat L	Cat S
15	0	0	0	14
16	0	0	0	0
17	0	83	26	20

Fonte: KATUNUMA et al., 2006.

A catequina (**17**) inibiu as catepsinas V, L e S sendo a atividade frente à catepsina V bastante considerável, enquanto o composto **15** inibiu apenas a catepsina S e o **16** não apresentou inibição frente às enzimas testadas.

A diferença estrutural observada entre estes flavonóides está na presença dos diferentes substituintes na posição 3 e no caso do composto **17** também na redução da carbonila na posição 4 que parece ser benéfica em relação a esta atividade biológica (KATUNUMA et al., 2006).

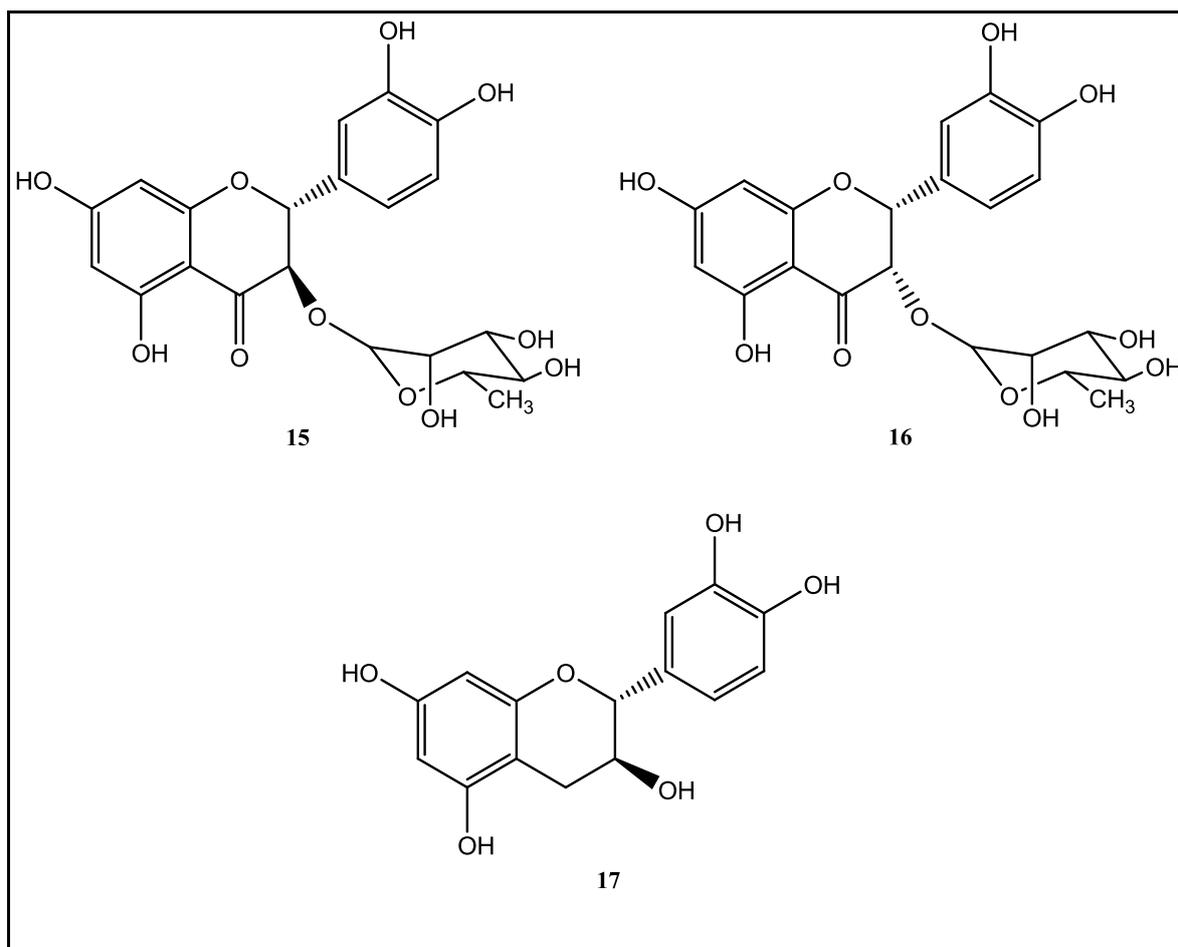


Figura 4.24. Flavonóides testados frente às catepsinas K, V, L e S

Estes dados descritos na literatura juntamente com os resultados obtidos experimentalmente, reforçam o potencial como compostos interessantes inibidores de cisteína peptidases lisossomais. A falta de um número maior de estruturas entretanto, ainda dificulta maiores conclusões em vista da correlação entre estrutura e atividade.

4.4.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

As frações obtidas do extrato bruto etanólico foram testadas em concentração única de 25µg/mL, e as substâncias puras isoladas na concentração de 5µg/mL. Estas amostras foram submetidas a ensaios de citotoxicidade para avaliação do potencial citotóxico em 3 linhagens celulares tumorais humana, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon-humano), SF-295 (sistema nervoso central). Os resultados de citotoxicidade com suas respectivas porcentagens de inibição celular e desvio padrão das amostras seguem nas tabelas 4.13 e 4.14.

Tabela 4.13. Resultados de inibição do ensaio MTT pelas frações de *V. thyrsoidea*

Linhagem Celular			
Amostra	MDA 435	HCT-8	SF-295
VTCcEH	25,30 (+/-0,82)	2,92 (+/-2,17)	36,59 (+/-0,06)
VTCcED	44,12 (+/-1,01)	27,77 (+/-0,14)	42,39 (+/-0,82)
VTCcEA	2,91 (+/-5,94)	-19,91 (+/-1,75)	4,07 (+/-1,58)
VTFEH	34,24 (+/-0,19)	16,7 (+/-0,56)	37,97 (+/-2,02)
VTFED	41,13 (+/-2,47)	13,83 (+/-4,19)	38,15 (+/-2,02)
VTFEA	0,85 (+/-3,16)	-24,11 (+/-1,4)	-7,52 (+/-3,84)
VTFEM	-23,42 (+/-1,07)	-32,95 (+/-1,75)	-19,55 (+/-0,19)

V= *Vochysia*; T= *thyrsoidea*; F= folha; Cc= casca do caule; E= etanol;
H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; M = Metanol

Os valores de percentual de inibição do crescimento tumoral são considerados relevantes quando são maiores que 90%. Das frações de *V. thyrsoidea* avaliadas nenhuma demonstrou potencial citotóxico relevante.

Tabela 4.14. Resultados de inibição do ensaio MTT pelas substâncias puras testadas

Linhagem Celular			
Amostra	MDA 435	HCT-8	SF-295
A8	25,40 (+/-6,23)	25,22 (+/-10,26)	100,00 (+/-13,33)
A11	0,00 (+/-10,62)	42,00 (+/-0,07)	0,00 (+/-37,73)
FC3	24,52 (+/-4,07)	23,71 (+/-0,71)	20,94 (+/-5,07)
TC8	34,02 (+/-6,75)	40,09 (+/-4,20)	5,25 (+/-4,75)

As substâncias puras **A11**, **FC3** e **TC8** não apresentaram inibição significativa frente as células tumorais testadas. Já a substância **A8** (2-butil D-frutofuranosídeo) apresentou um valor relevante de 100,0% (+/-13,33) de inibição frente a células tumorais do sistema nervoso central (SF-295), entretanto a mesma não foi encaminhada para avaliações subsequentes (IC_{50}), pois as substâncias só são escolhidas para novo *screening* se os valores de inibição $\geq 75\%$ forem em pelo menos duas linhagens tumorais testadas. As demais substâncias não foram testadas devido a pouca quantidade de massa.

5. CONCLUSÕES

Esta pesquisa contribuiu com a caracterização fitoquímica da planta *Vochysia thyrsoidea*, com o isolamento e identificação de 2 flavonóides do tipo flavanonols, 1 triterpeno de esqueleto ursânico, 2 alquilglicosídeos e 1 ácido benzóico.

Segundo levantamento bibliográfico das espécies de *Vochysia*, os flavonóides e alquilglicosídeos foram relatados pela primeira vez neste gênero. Os triterpenos têm sido relatados em grande quantidade neste gênero, sendo o derivado de ácido ursólico descrito pela primeira vez nesta espécie.

No ensaio de inibição enzimática não foram observados resultados consideráveis frente à catepsina K, contudo foi observado comportamento inverso para catepsina B que teve como resultado mais satisfatório $IC_{50}=65,12 \mu M$ apresentado pelo flavonóide catequin-3-O-ramino(3-cinamoil)piranosídeo (**F1**). No ensaio de citotoxicidade (TAS) o 2-butil, D-frutofuranosídeo (**A8**) obteve valor significativo de 100% de inibição na linhagem tumoral do sistema nervoso central (SF-295).

Neste contexto, os resultados obtidos com os ensaios biológicos descritos neste trabalho vieram complementar as atividades descritas na literatura de outras espécies da família Vochysiaceae e as substâncias com resultados promissores proporcionaram entusiasmo ao colaborar na busca por um auxílio no tratamento quimioterápico de doenças que atingem a população mundial, como a osteoporose e o câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, D. S.; CHAVE, M. H. “Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*”. *Quim. Nova*, **28** (6): 996-999, 2005.

ARAÚJO, F.W.L.; SOUZA, M. P. “ Vismiaefolic acid, a new triterpene from *Vochysia Vismiaefolia*”. *Journal of Natural Products*, **53** (6): 1436-1440, 1990.

BROMME, D.; KALETA, J. “Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design”. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 99-110, 2002.

BUSCHBACHER, R. “Expansão agrícola e perda da biodiversidade no cerrado: origens históricas e o papel do comércio internacional”. Brasília: WWF Brasil, 2000.

CALDERÓN, A. I.; AVELLA, M. E.; TELLO, R. E. B.; PEZZUTO, C. S.; GUPTA, M. P. “Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of *Vochysia ferruginea*”. *Pharmaceutical Biology*, **39** (1): 35-39, 2001.

CHAPPARD, D.; LIBOUBAN, H.; MINDEHOLM, L.; BASLÉ, M. F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. “The Cathepsin K Inhibitor AAE581 Induces Morphological Changes in Osteoclasts of Treated Patients.” *Microscopy Research and Technique*, **73**: 726-732, 2010.

CONNOLY, J. D.; HILL, R. A. “Triterpenoids”. *Nat. Prod. Rep.*, **19**: 494-513, 2002.

CORRÊA, D. B.; BIRCHAL, E.; AGUILAR, J. E. V.; GOTTLIEB, O. R. “Ellagic Acids from Vochysiaceae”. *Phytochemistry*, **14**: 1138-1139, 1975.

CUNHA, A. P. “Farmacognosia e Fitoquímica”. Av. De Berna/Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

DAVID, J. M.; SOUZA, J. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. “Estudo fitoquímico de *Davilla rugosa*: flavonóides e terpenóides”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **16**(1): 105-108, 2006.

DESAI, A. G.; QAZI, G. N.; GANJU, R. K.; TAMER, M. E.; SINGH, J.; SAXENA, A. K.; BEDI, Y. S.; TANEJA, S. C.; BHAT, H. K. “Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention”. *Current Drug Metabolism*, **9**: 581-591, 2008.

DEVETZI, M.; SCORILAS, A.; TSIAMBAS, E.; SAMENI, M.; FOTIOU, S.; SLOANE, B. F.; TALIERI, M. “ Cathepsin B protein levels in endometrial câncer: Potential value as a tumour biomarker”. *Gynecologic Oncology*, **112**: 531-536, 2009.

DEWICK, P. M. “Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach”. New York: John Wiley, 2ª ed., p.148-150, 2002.

DUDÍKOVÁ, J.; MASTIHUBOVÁ, M.; MASTIHUBA, V.; KOLAROVA, N. “ Exploration of transfructosylation activity in cell walls from *Cryptococcus laurentii* for production of functionalised β -d-fructofuranosides”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **45**: 27–33, 2007.

DUEÑAS, C. V.; COBALEDA, C.; LOSADA, J.P.; CARCÍA, I. S. “The evolution of câncer modeling: the shadow of stem cells.” *Disease Models & Mechanisms*, **3**: 149-155, 2010.

FUSETANI, N.; FUJITA, M.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S. “Tokaramide A, a New Cathepsin B Inhibitor from the Marine Sponge *Theonella aft. Mirabilis*”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**: 3397-3402, 1999.

GNOATTO, S. C.B.; KLIMPT, A. D.; NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K. GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. “Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition.” *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**: 1865e1877, 2008.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. “Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats”. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 77–80, 2001.

GOMES, R. C.; BONAMIM, F.; DARIN, D. D.; SEITOS, L. N. “Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection”. Physiology and Biophysics Department, Campinas State University-UNICAMP, p. 6109, São Paulo, 2008.

GROTEWOLD, E.; “The Science of Flavonoids”. Department of Cellular and Molecular Biology, Ohio, USA, p. 1-5, 2006.

HAZEN, L. G. M.; BLEEKER, F. E.; LAURITZEN, B.; BAHNS, S.; SONG, J.; JONKER, A.; DRIEL, B. E. M. V.; LYON, H.; HANSEN, U.; KOHLER, A.; NOORDEN, C. J. F. V. “Comparative Localization of Cathepsin B Protein and activity in Colorectal Cancer.” *The Journal of Histochemistry e Cytochemistry*, **48**(10): 1421-1430, 2000.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; RONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; et al. “Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (VOCHYSIACEAE)”. *Journal of Ethnopharmacology*, **47**: 97-100, 1995.

HESS, S. C.; DELLE MONACHE, F. “Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **10**: 104-106, 1999.

HERSZÈNYI, L.; PLEBANI, M.; CASSARO, P.; PAOLI, M.; ROVERONI, G.; CARDIN, R.; TULASSAY, Z.; NACCARATO, R.; FARINATI, F. “The Role of Cysteine and Serine Proteases in Colorectal carcinoma”. *American Cancer Society*, **86**: 1135-1142, 1999.

HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. “Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos”. *Alim. Nutr.*, **19**(1): 97-108, 2008.

IGARASHI, M. A. *Pubvet*, V. **2**(31), Ed. 42, Art. 386, 2008.

JACOBSON, T. K. B.; BUSTAMANTE, M. M. C.; SILVA, M. R. S.; COSAC, G. B. “Estudo preliminar da concentração de fenóis totais e taninos no extrato alcoólico de folhas de *Schefflera Macrocarpa* (Araliaceae) e *Vochysia Thyrsoides* (Vochysiaceae).” Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG, setembro, 2007.

JAMES, J.T.; DUBERY, I.A. "Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban". *Molecules* **14**: 3922-3941, 2009.

JÚNIOR, M. C. S. 100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo. p. 162–163, Brasília, 2005.

KATUNUMA, N.; OHASHIA, A.; SANO, E.; ISHIMARUB, N.; HAYASHIB, Y.; MURATAA, E. "Catechin derivatives: Specific inhibitor for caspases-3, 7 and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels". *FEBS Letters*, **580**: 741-746, 2006.

KHALIL, N. M. ; PETACCI, F.; LEITE, R. R. S.; SILVA, E.; et al. "Antioxidant Activity of *Vochysia discolor* Mart. Flowers". *Acta Farm. Bonaerense*, **25** (4): 564-566, 2006.

KOMINAMI, E.; KUNIO, I.; KATUNUMA, N. "Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular-dystrophy". *Am. J. Pathol.*, **127**: 461-466, 1997

KRAFT, C.; SIEMS, J. K.; SIEMS, K.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. "Andinermals A–C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*". *Phytochemistry*, **58**: 769–774, 2001.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D. ; VANISREE M.; TSAY, H.S.; SUBBARAJU, G. V. "Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay". *International Journal of Applied Science and Engineering*, **3**, **2**: 125-134, 2005.

LIMA, J. M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T. G.; SILVA, M. B. "Prospecção Fitoquímica de *Sonchus oleraceus* E sua Toxicidade sobre o Microcrustáceo *Artemia salina*." *SBCPD*, **27**(1): 7-11, 2009.

LOKVAMA, J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. "Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae)". *Phytochemistry*, **65**: 351–358, 2004.

LORENZI, H. "Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil". **2**: 351, 2.Ed., São Paulo, 1998.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. "Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines." *Cancer Letters*, **235**: 114-120, 2006.

MAYWORM, M. A. S.; SALATINO, A. "Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae". *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**: 961–972, 2002.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. " Brineshrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents." *Planta Med.*, **45**: 31, 1982.

MONTANARI, C. A.; "Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais". *Química Nova*, **24**. São Paulo, 2001.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. “Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*”. *Quím. Nova*, **26** (3): 309-311, 2003.

MURAYAMA, S.; NAKAO, Y.; MATSUGANA, S. “Asteropterin, na inhibitor of cathepsin B, from the marine sponge *Asteropus simplex*”. *Tetrahedron Letters*, **49**: 4186-4188, 2008.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.1; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. “Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae)”. *Rev. Ciênc. Farm. Básica*, **29** (2): 145-150, 2008.

OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M. C. “Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae.” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20(2)**: 201-207, 2010.

PACKER, J.F.; LUZ, M.S M. “Método para avaliação e pesquisa de atividade antimicrobiana de produtos de origem natural”. *Revista Brasileira de Farmacognosia e Brazilian Journal of Pharmacognosy* **17(1)**: 102-107, 2007.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. “Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B”. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, **13**: 5819-5825, 2005.

PARK, Y.; KONG, J. Y.; CHO, H. “A Furanquinone from *Paulownia tomentosa* Stem for a New Cathepsin K Inhibitor.” *Phytotherapy Research*, **23**: 1485-1488, 2009.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K. “A New Dimeric Dihydrochalcone and a New Prenylated Flavone from the Bud Covers of *Artocarpus altilis*: Potent Inhibitors of Cathepsin K.” *J. Nat. Prod.*, **65**: 624-627, 2002.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; CARTE, B.; TAYLOR, P. B.; JOHNSON, R. K.; FAULKNER, D.J. “Haploscleridamine, a Novel Tryptamine-Derived Alkaloid from a Sponge of the Order Haplosclerida: An Inhibitor of Cathepsin K.” *J. Nat. Prod.*, **65**: 628-629, 2002.

PATOCKA, J. “Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification”. *Journal of Applied Biomedicine*, **1**: 7-12, 2003.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. “Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas”. *Quím. Nova*, **25**. São Paulo, 2002.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. “Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae”. *Naresuan University Journal*, **12**: 13-18, 2004.

PUPO, T.; GALLO, M. B. C. *Biologia Química*: “Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais”. *Química Nova*, **30**: 1446-1455, 2007.

ROCHA, G. G.; SIMÕES, M. S.; LÚCIO, K. A.; OLIVIEIRA, R.R.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C.R. “Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**: 7355–7360, 2007.

ROUX, S. “New treatment targets in osteoporosis”. *Joint Bone Spine*, **77**: 222-228, 2010.

RUSSEL, K. M.; NOLAN, P.C.; WILKINS, A. L.; HOLLAND, P.T. “Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey.” *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 10-13, 1990.

SIEWINSKI, M.; SALEH, Y.; POPIELA, A.; ZIÓLKOWSKI, P.; JELEN, M.; GRYBOS, M. “Expression of High Molecular Weight Cysteine Proteinase Inhibitor in Ovarian Cancer Tissues: Regulation of Cathepsin B Expression by Placental CPI.” *Biol. Chem.*, **384**: 1103-1107, New York, 2003.

SILVA, M. C. J. “100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo”. p. 162–163, Brasília, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; et al. “Farmacognosia: da planta ao medicamento”. 6.ed. p. 711-734. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIQUEIRA, J. M. ; BOOM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. “Estudo Fitoquímico de *Unonopsis Lindmannii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia Salina* Leach”. *Química Nova*, **21**(5): 557-559, 1998.

SLOANE, B.F.; MOIN, K.; LAH, T. “Biochemical and molecular aspects of selected cancers”. *Academic Press*, San Diego, 411-466, 1994.

TAKAHASHI, D.; IWASAKI, N.; KON, S.; MATSUI, Y.; MAJIMA, T.; MINAMI, A.; UEDE, T. “Down-Regulation of Cathepsin K in Synovium Leads to Progression of Osteoarthritis in Rabbits”. *Arthritis e Rheumatism*, **60**: 2372-2380, 2009.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. “Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers”. *Biochem. Biophys. Acta*, **1477**: 98-11, 2000.

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BROMME, D.; “The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for design of new therapeutics”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 973-993, 2005.

YU, Quan-Lin; DUAN, Hong-Quan; TAKAISHI, Yoshihisa; GAO, Wen-Yuan. “A Novel Triterpene from *Centella asiatica*”. *Molecules*, **11**: 661-665, 2006.

VARANDA, E.A. “Atividade mutagênica de plantas medicinais”. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **27**: 1-7, 2006.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. “Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante”. *Quim. Nova*, **32**(5): 1245-1252, 2009.

WAGNER, R. ; SIMAS, F. F. ; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; et al. “A high-viscosity glycolglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*: Comparison with those of other *Vochysia* spp”. *ScienceDirect*, Carbohydrate Polymers, **72**: 382-389, 2008.

WARD, L. S. “ Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese”. *Arq. Bras. Endocrinol Metab*, **46** (4): 351-360, 2002.

ZHAO, Q.; JIA, Y.; XIAO, Y. “Cathepsin K: A therapeutic target for bone diseases”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **380**: 721-723, 2009.

ZENG, G. Z.; PAN, X. L.; TAN, N. H.; XIONG, J.; ZHANG, Y. M. “Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **41**: 1247-1252, 2006.

ZURACO, Z. Y. L.; COMPAGNONEA R. S.; HESS S. C.; DELLE, M. F. “6 β -Hydroxymaslinic Acid, a Triterpene from *Vochysia ferruginea*”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**: 241-244, 2000.

SITE: http://www.koenigstigersurzeitkrebse.de/images/artemia_parthenogenetica.JPG, acessado em junho de 2010.

SITE: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

PDB – Protein Data Bank . Acessado em 21 de fevereiro de 2011.