



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

JENNIFER SILVA CARVALHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO A PARTIR DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Salacia crassifolia*
(CELASTRACEAE)**

Orientador

Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

**Anápolis-GO
2013**

JENNIFER SILVA CARVALHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO A PARTIR DA
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Salacia crassifolia*
(CELASTRACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Anápolis-GO
2013

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram: aos meus queridos pais, José e Eunice, pelo apoio e incentivo; ao meu irmão Johnathan pelo companheirismo e amizade; ao meu esposo Jesus pela compreensão e pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida a mim concedido e pela graça de concluir mais este projeto.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes pelos ensinamentos, orientação e atenção.

Às Professoras Dra. Máisa Borges e Dra. Joelma Abadia pela colaboração e pelas contribuições.

A todos do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos professores da banca, Dr. Luciano Lião e Dra. Joelma Abadia, pela disponibilidade e contribuição com esta dissertação.

Aos professores da Universidade Estadual de Goiás que contribuíram para minha formação.

Aos técnicos do laboratório de química da UEG pelo auxílio, atenção e troca de experiências.

À CAPES pela ajuda financeira.

À minha amiga e companheira de mestrado Luciene Mendes pelo constante incentivo e amizade; aos amigos Anielly Monteiro, João Honorato, Patrícia Xavier, Gislene Ventura e Leonardo Capeletti pelas divertidas conversas e pelo auxílio.

Ao aluno Danilo Martins pelas sugestões e apoio na análise estatística.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares da UEG, em especial, Ana Paula Nunes e Marcos Pereira pelo companheirismo.

Aos amigos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho e aos meus familiares pelo incentivo, paciência e carinho.

CURRICULUM VITAE

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA:

- **2005-2009:** Graduação em Química Licenciatura – Universidade Estadual de Goiás.

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL:

- **2007-2007:** Monitora de Química Inorgânica II (40h) – UEG.
- **2008-2008:** Monitora de Química Orgânica I (40h) – UEG.
- **2008-2009:** Professora estagiária no Colégio Estadual José Ludovico de Almeida.
- **2010-2011:** Professora regente no Centro de Educação Profissional de Anápolis (CEPA).

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

- 2011:** Metodologia de Pesquisa – Conhecimento, saber e Ciência (5h). Fundação Getúlio Vargas (FGV-online).
- 2011:** Ciência e Tecnologia (15h).
Fundação Getúlio Vargas (FGV-online).
- 2009:** Popularização Científica (2h).
Universidade estadual de Goiás.
- 2008:** A formação de professores e as novas realidades educacionais (2h). Universidade Estadual de Goiás.
- 2007:** Elaboração de perfumes e colônias (4h).
Centro Universitário de Anápolis.
- 2007:** As visões de Ciência em desenhos animados (6h).
Universidade Estadual de Goiás.

- 2007:** Tecnologias Educacionais (4h).
Universidade Estadual de Goiás.
- 2007:** A importância do teste de equivalência farmacêutica (4h).
Universidade Estadual de Goiás.
- 2007:** A pesquisa na formação inicial e continuada de Professores (4h). Universidade Estadual de Goiás.
- 2007:** Alquimia Interior. (4h).
Universidade Estadual de Goiás.
- 2007:** O Bioma Cerrado e as Bacias Hidrográficas de Goiás (4h).
Centro Universitário de Anápolis.
- 2007:** A importância do tratamento de água (8h).
Centro Universitário de Anápolis.
- 2007:** Degradação ambiental: causas, consequências e soluções (4h).
Centro Universitário de Anápolis.
- 2006:** Preservação dos recursos hídricos no município de Anápolis (8h).
Universidade Estadual de Goiás.

4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- 2012:** VII Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação - UEG.
- 2012:** I Workshop em Ciências Moleculares - UEG.
- 2010:** V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação - UEG.
- 2010:** VIII Seminário de Iniciação Científica - UEG.
- 2008:** VI Seminário de Iniciação Científica - UEG.

2007: III Jornada de Educação e Ciências Sociais - Unievangélica.

2007: III Semana de Química - UEG.

2006: I Jornada Científica de Estudos Biológicos - Unievangélica.

2006: II Jornada de Educação e Ciências Sociais - Unievangélica.

5. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

IV SEQUI – Semana de Química da UEG – 2008.

6. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

CARVALHO, J. S.; MENEZES, A. C. S. Estudo fitoquímico e avaliação biológica de extratos fracionados de *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. In: I Workshop em Ciências Moleculares-UEG, 2012, Anápolis.

CARVALHO, J. S.; MENEZES, A. C. S. Estudo fitoquímico e avaliação biológica de extratos fracionados de *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. In: VII Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação-UEG, 2012, Anápolis.

Resumo

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO A PARTIR DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Salacia crassifolia* (CELASTRACEAE). O presente trabalho descreve o estudo citotóxico e fitoquímico dos extratos de *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. DON, (Celastraceae). O estudo citotóxico foi realizado através do método MTT (Mosman, 1983) com 4 linhagens tumorais distintas. Os testes evidenciaram o forte potencial citotóxico desta espécie. Investigou-se os extratos a partir da casca e das folhas de *S. crassifolia*, a fração de hexano (SCC_cM-H) apresentou percentagem de inibição contra as três linhas celulares testadas, em relação à estirpe foram de 101,22% MDA-435 (melanoma), 95,45% de HCT-8 (cólون humano), e 95,54% para o SF-295 (sistema nervoso central). Já a fração de acetato de etila (SCC_cM-A) demonstrou uma percentagem de 95,96% em comparação com a linha de HCT-8 (cólون humano). Todavia, a fração metanólica (SCFMc-M) descreve os valores de percentagem de inibição correspondentes a linhas celulares HCT-8 frontal (cólون humano) e OVCAR-8 (mama) (95,68% (HCT-8) e 97 73% (OVCAR-8)). A partir do estudo fitoquímico de *S. crassifolia* foram isolados e identificados os compstos lupeol, α -amirina, β -amirina, os isômeros, catequina e epicatequina e os esteróides β -sitosterol e estigmasterol. A elucidação das estruturas foi efetuada por análise de ^1H RMN e ^{13}C e GC / MS.

Palavras-chave: *Salacia crassifolia*, Celastraceae, citotoxicidade, antitumoral.

Abstract

PHYTOCHEMICAL BIOMONITORED STUDY FROM CYTOTOXIC ACTIVITY *Salacia crassifolia* (CELASTRACEAE). The present work describes the cytotoxic and phytochemical study of *Salacia crassifolia* extracts (Mart. Ex Schult.) G.DON, (CELASTRACEAE). The cytotoxic study was accomplished through MTT (colorimetric analysis), Mosman (1983)), with 4 distinct tumor strains. The tests revealed the strong cytotoxic potential of this specie. We investigated the extracts from the bark and leaves of *S. crassifolia*, and the fraction of hexane (SCCcM-H) showed a percentage inhibition against all three cell lines tested compared to 101.22% strain were MDA-435 (melanoma), 95.45% of HCT-8 (human colon), and 95.54% in the SF-295 (CNS). However, the fraction of ethyl acetate (SCCcM-A) expressed a percentage of 95.96% compared with the line HCT-8 (human colorectal). Nevertheless, the methanolic fraction (SCFMc-M) describes the percent inhibition values corresponding to the HCT-8 cell lines front (human colon) and OVCAR-8 (breast) (95.68% (HCT-8) and 97.73% (OVCAR-8)). In a phytochemical study of *S. crassifolia* were isolated and identified as lupeol, α -amyrin, β -amyrin, isomers, catechin and epicatechin and steroids β -sitosterol and stigmasterol. The elucidation of the structures were performed by analysis of ^1H and ^{13}C NMR and GC / MS.

Key-words: *Salacia crassifolia*, Celastraceae, Cytotoxicity, Antitumoral.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AcO	Acetato
AAS	Ácido Acetilsalicílico
BzO	Benzoato
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas
d	dubleto
dd	duplo dubleto
h	Altura
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento (em Hz)
m/z	Relação massa/carga
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	singleto
t	tripleto

Principais Símbolos

δ	Deslocamento químico (em ppm)
Φ	Diâmetro

Lista de Figuras

Figura 1: Constituintes comuns à família Celastraceae.....	32
Figura 2: Árvore de <i>Salacia crassifolia</i>	57
Figura 3: Flores e frutos de <i>Salacia crassifolia</i>	58
Figura 4: Folhas de <i>Salacia crassifolia</i>	59
Figura 5: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes da casca frente à célula tumoral MDA-MB-435.....	79
Figura 6: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes da casca frente à célula tumoral HCT-8.....	80
Figura 7: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes da casca frente à célula tumoral SF-295.....	81
Figura 8: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral MDA-MB-435.....	84
Figura 9: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral HCT-8.....	85
Figura 10: Percentual de citotoxicidade <i>in vitro</i> das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral SF-295.....	86
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H da mistura de esteróides J3, CDCl ₃ , 500MHz.....	89
Figura 12: Expansão da região de δ 3,4 a 5,4 ppm do espectro de RMN ¹ H da mistura de esteróides J3, CDCl ₃ , 500MHz.....	90
Figura 13: Cromatograma da mistura de esteróides J3.....	92
Figura 14: Espectro de massa do β-sitosterol	92
Figura 15: Espectro de massa do estigmasterol.....	92
Figura 16: Infravermelho da mistura de esteróides J3.....	93
Figura 17: Espectro RMN ¹ H da mistura de triterpenos (G2), CDCl ₃ , 500MHz.....	94
Figura 18: Expansão da região de δ 4,1 a 5,7 ppm do espectro de RMN ¹ H da mistura de triterpenos (G2), CDCl ₃ , 500MHz	94
Figura 19: Expansão da região de δ 4,0 a 5,7 ppm do espectro de RMN ¹ H da mistura de triterpenos (G2), CDCl ₃ , 500MHz.....	95

Figura 20: Expansão da região de δ 3,0 a 5,5ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz.....	96
Figura 21: Expansão da região de δ 0,6 a 1,8 ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz.....	97
Figura 22: Infravermelho da mistura de triterpenos (G2).....	98
Figura 23: Difração de raio-X da fração D4.....	99
Figura 24: Infravermelho da fração D4.....	100
Figura 25: Espectro de RMN ^1H da fração D4, MeOD, 500MHz.....	101
Figura 26: Expansão da região de δ 5,3 a 6,0 ppm do espectro de RMN ^1H da fração D4, MeOD, 500MHz	102
Figura 27: Espectro RMN ^{13}C da fração D4, MeOD, 500MHz.....	104
Figura 28: Espectro de correlação HSQC (DMSO, 500 MHz) da fração D4.....	105
Figura 29: Espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz.....	107
Figura 30: Expansão da região de δ 4,0 a 6,0 ppm do espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz.....	107
Figura 31: Espectro RMN ^{13}C da fração D6, MeOD, 500MHz.....	108
Figura 32: Expansão da região de δ 3,5 a 5,4 ppm do espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz	110
Figura 33: Espectro de correlação HMBC (MeOD, 500 MHz) da fração D6.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1: Massa das frações provenientes da partição líquido-líquido do extrato metanólico das cascas de <i>Salacia crassifolia</i>	66
Tabela 2: Massa das frações provenientes da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de <i>Salacia crassifolia</i>	66
Tabela 3: Massa das frações provenientes da partição com celulose do extrato metanólico das folhas de <i>Salacia crassifolia</i>	66
Tabela 4: Comparação entre médias dos tratamentos realizados com as frações da casca de <i>Salacia crassifolia</i>	82
Tabela 5: Médias percentuais e desvio padrão do teste de citotoxicidade frente às frações do extrato metanólico (extração com celulose) das folhas de <i>S. crassifolia</i> ..	87
Tabela 6: Dados espectroscópicos RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) da fração D4 em comparação com os da literatura.....	102
Tabela 7: Dados espectroscópicos RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) da fração D4 em comparação com os da literatura..	103
Tabela 8: Dados espectroscópicos RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) da fração D6 em comparação com os da literatura.....	108
Tabela 9: Dados espectroscópicos RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) da fração D6 em comparação com os da literatura.....	109

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
	2.1 Produtos naturais.....	22
	2.2 Metabólitos primários e secundários.....	26
	2.3 Câncer e os produtos naturais	27
	2.4 FamíliaCelastraceae	31
	2.5 Gênero <i>Salacia</i>	33
	2.5.1 Substâncias isoladas no gênero <i>Salacia</i>	35
	2.6 <i>Salacia crassifolia</i> (Mart. Ex Schult.) G. Don.	57
3	OBJETIVOS.....	61
	3.1 Objetivo geral.....	62
	3.2 Objetivos específicos	62
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	63
	4.1 Materiais Cromatográficos	64
	4.1.1 Cromatografia em coluna de vidro	64
	4.1.2 Cromatografia em camada delgada analítica.....	64
	4.2 Solventes.....	64
	4.3 Reveladores.....	64
	4.4 Material Botânico.....	64
	4.5 Obtenção dos extratos.....	65
	4.6 Fracionamento dos extratos brutos.....	65
	4.7 Metodologia dos ensaios Biológicos.....	66
	4.7.1 Preparo das frações vegetais para teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	67
	4.7.2 Preparo das células para teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	67
	4.7.3 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	67
	4.7.4 Análise Estatística.....	68
	4.8 Isolamento das substâncias.....	68
	4.8.1 Extrato metanólico das folhas (Partição líquido-líquido).....	68

4.8.1.1	Obtenção das frações D4 e D6.....	68
4.8.1.2	Obtenção da fração J2.....	71
4.8.2	Extrato metanólico das cascas.....	74
4.8.2.1	Obtenção da fração G3.....	75
4.8.2.2	Obtenção das frações K6.1 e K10.1.....	76
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1	Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico da casca de <i>Salacia crassifolia</i> (SCC _c M).....	79
5.1.1	Análise Estatística dos dados obtidos no teste com extrato das cascas de <i>S. crassifolia</i>	82
5.2	Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico das folhas de <i>S. crassifolia</i> (SCFM) (extração líquido-líquido).....	84
5.3	Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico das folhas de <i>S. crassifolia</i> (SCFM _c) (extração com celulose).....	87
5.4	Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Salacia crassifolia</i>	89
5.4.1	Identificação dos esteróides (J3) isolados do extrato SCC _c M-A (casca).....	89
5.4.2	Identificação α , β amirina e lupeol (G2) isolados do extrato SCC _c M-A (casca).....	93
5.4.3	Identificação da epicatequina (D4) isolada do extrato SCFM-A (folhas).....	99
5.4.4	Identificação da catequina (D6) isolada do extrato SCFM-A (folhas).....	106
6	CONCLUSÕES.....	112
7	PERSPECTIVAS.....	114
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Durante vários séculos, as formas medicamentosas eram inteiramente de origem natural, provenientes de ervas, produtos de origem animal e materiais inorgânicos. Inicialmente o homem pode ter combinado estes ingredientes com misticismo ou religião para tratamento de enfermidades; mas é certo que os tratamentos eficazes foram posteriormente recodificados e documentados. O conhecimento de drogas cresceu a partir desses registros que forneceram uma descrição científica de materiais naturais utilizados na medicina (DEWICK, 2001).

O conhecimento sobre as plantas e sua constituição tem sido historicamente muito importante para o Brasil que é possuidor de um extenso litoral e de uma flora diversificada, sendo detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta. Esta diversidade contribui com o estudo de produtos naturais, que representa uma das áreas mais tradicionais da química de nosso País (PINTO et al., 2002; PUPO e GALLO, 2007).

Considerando sua grande riqueza vegetal ainda pouco explorada e as possibilidades de desenvolvimento de novos medicamentos, o Brasil apresenta um futuro promissor na área de produtos naturais. Analisando todas as fases do desenvolvimento da química de plantas medicinais, pode-se evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina complementar, mas como fonte de novos e potentes fármacos (YUNES et al., 2001).

Dentre as diversidades regionais existentes no Brasil o Cerrado é considerado o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia (BORLAUG, 2002).

O Cerrado apresenta grande importância mundial devido sua extensão continental, diversidade e endemismo das espécies biológicas e pelo seu patrimônio genético, bem como pela variedade ecossistêmica dos biomas (ASSUNÇÃO; FELFILI, 2004).

No Cerrado brasileiro encontra-se a *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. DON, pertencente à família Celastraceae. Esta família apresenta inúmeras descrições sobre atividade biológica, além disso, diversas espécies pertencentes a esta família são utilizadas na medicina popular do Brasil contra várias patologias

(RODRIGUES et al., 2006; SILVA JÚNIOR, 2005; CORRÊA, 1984; SOARES et al., 2004).

Esta espécie, portanto foi escolhida com o intuito de avaliar suas possíveis potencialidades biológicas através de teste de citotoxicidade frente às linhagens celulares: SF-295 (sistema nervoso central), OVCAR-8 (mama), HCT-8 (côlon-humano) e MDA-MB-435 (melanoma), bem como sua constituição fitoquímica.

Capítulo 2

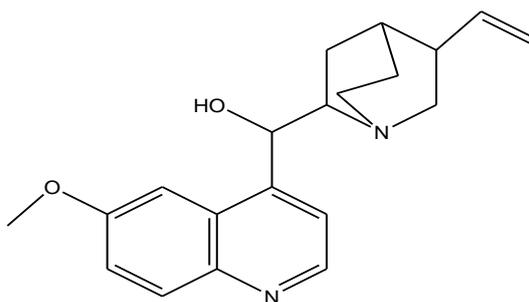
Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JUNIOR et al., 2006). O mais provável é que, pela experimentação direta, as populações humanas foram aprendendo a distinguir as plantas úteis e de efeito benéfico, daquelas sem quaisquer efeitos terapêuticos ou tóxicos, bem como qual o processamento e combinações poderiam ser usados para obtenção de resultados positivos (YUNES et al., 2001).

Historiadores de todo o mundo evidenciaram que, aparentemente, todos os povos primitivos usavam ervas. Esta prática de medicina natural existiu, portanto, de uma forma ou de outra em diferentes culturas e civilizações, como no Egito, no Ocidente, na China e no Japão. Muitas vezes a utilização de extratos vegetais como tratamento de doenças era feita de uma forma acertada mesmo não conhecendo a verdadeira composição de determinada espécie; exemplo disso é a quinina (**1**) extraída de plantas do gênero *Cinchona* que foi usada para tratar os sintomas da malária muito antes da doença ser identificada (GILANI et al., 2005).



1

É importante mencionar, que além das plantas serem empregadas na medicina popular como fontes terapêuticas, elas também tem contribuído para a descoberta de novos fármacos que são amplamente utilizados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Aspirina, atropina, morfina, efedrina, quinidina, reserpina, taxol, vincristina e vinblastina são exemplos de drogas que foram originalmente descobertas por meio

do estudo de curas tradicionais, como também pelo conhecimento popular dos povos indígenas. Apesar do enorme avanço na área de sínteses, existem casos em que algumas destas substâncias não podem ser substituídas por outras já que muitas vezes a produção sintética pode ser muito difícil ou economicamente inviável (RATES, 2001; GILANI et al., 2005).

Como a diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, existem vários estudos direcionados aos produtos naturais, considerando que durante os milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória realmente inigualável (YUNES et al., 2001).

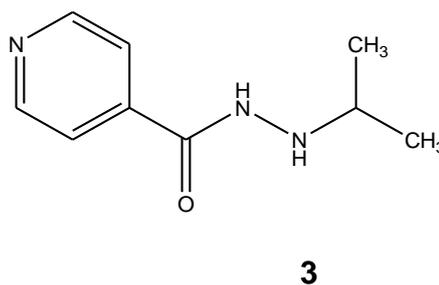
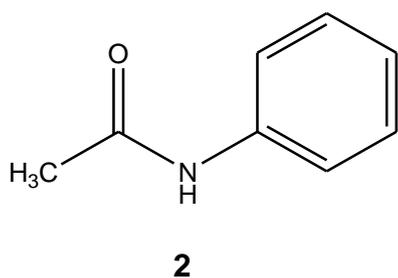
É impressionante o fato desses produtos encontrados na natureza revelarem um potencial tão elevado no que se refere a diversidade estrutural e às várias propriedades biológicas (WALL & WANI, 1996).

A diversidade de estruturas moleculares é indicada como razão fundamental do interesse de grandes indústrias pela pesquisa de produtos naturais. No entanto, existem outros fatores que demonstram a importância de pesquisas neste ramo, como a utilização dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos e potentes fármacos, além de outros produtos de interesse, como os aplicados à agricultura (YUNES et al., 2001).

As moléculas provenientes dos produtos naturais podem ser utilizadas, em muitos casos, como base para o surgimento de moléculas protótipo, possibilitando assim, o planejamento racional de novos fármacos e também a descoberta de ações terapêuticas não atribuídas a compostos já existentes (RATES, 2001). Sendo assim, no Brasil, a pesquisa de produtos naturais pode contribuir para o desenvolvimento da tecnologia nacional, já que a biodiversidade natural do País reserva riquezas muito pouco exploradas como fonte de substâncias de interesse farmacológico (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

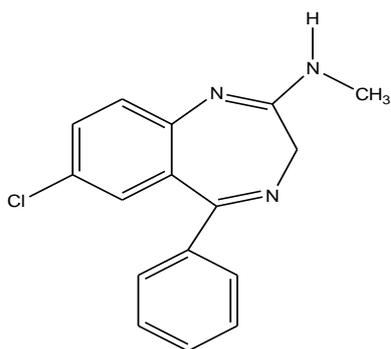
As plantas abrigam em sua constituição uma diversidade de princípios ativos que podem ser usados na medicina contra uma infinidade de patologias. Neste sentido a medicina popular vem contribuir com a pesquisa científica, já que o conhecimento popular pode indicar quais plantas apresentam possível atividade diante de determinadas enfermidades (SOUZA et al., 2010).

Apesar de existirem diversas pesquisas no ramo de produtos naturais, na busca de novas substâncias com ação farmacológica, em determinados momentos da história, a descoberta científica foi feita ao acaso, um exemplo disso é a acetanilida (**2**), sua atividade antipirética só foi evidenciada quando a mesma foi administrada erroneamente a um paciente. A iproniazida (**3**) foi tida como antidepressiva somente após ser usada como tuberculostático (BARREIRO; FRAGA, 2001; MALERBA et al., 2001).

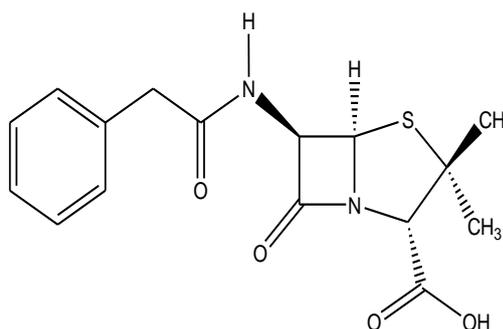


Outra importante descoberta feita ao acaso foi a do librium (**4**). O librium serviu de protótipo para o desenvolvimento de todos os outros benzodiazepínicos que se encontram disponíveis no arsenal terapêutico como tranquilizantes, sua descoberta ocorreu no âmbito de um programa de síntese de substâncias. Nenhum dos produtos obtidos conforme o planejado apresentou a atividade tranquilizante desejada, no entanto, uma das substâncias obtida de forma inesperada, de acordo com o plano de síntese, o librium, apresentou a atividade (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Um dos mais importantes exemplos da contribuição do “acaso” para a descoberta de novos fármacos é a penicilina (**5**), reconhecida por volta de 1928, por Sir Alexander Fleming. Certo dia em seu laboratório, Fleming observou algumas placas de cultura esquecidas sobre a bancada com reduzido crescimento de *Staphylococcus* que haviam sido semeados no início do verão. Posteriormente, Fleming constatou que houve inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus* se verificou a presença de metabólitos do fungo *Penicillium notatum* com propriedade antibacteriana, conduzindo assim a identificação da penicilina. Este processo de descoberta ao acaso foi, portanto substituído por estratégias racionais baseadas em modificações moleculares ou no alvo terapêutico (MALERBA et al., 2001; BARREIRO; FRAGA, 2001).



4



5

A descoberta do AAS foi um dos marcos do final deste período onde a busca por substâncias naturais úteis na medicina era feita ao acaso. Na busca pelo planejamento racional na descoberta de novos fármacos, os primeiros estudos sobre a relação entre estrutura química e sua atividade ganharam destaque durante a Segunda Guerra, uma vez que a pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na química sintética, motivada pela necessidade de tratamento de infecções, da dor, de processos alérgicos e da depressão (DEWICK, 2001; YUNES et al., 2001).

A associação de pesquisas no ramo da química sintética e dos produtos naturais contribuiu muito com a evolução na área farmacológica dentre outras; as descobertas na área de produtos naturais colaboram com o conhecimento na área da química sintética, já que ao se isolar uma nova substância e através de testes farmacológicos for evidenciado atividade biológica de tal substância esta nova estrutura pode ser sintetizada (desde que seja viável economicamente e possível de ser feita) e em quantidades maiores, já que nos produtos naturais a maioria das substâncias isoladas apresenta baixo rendimento (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

O repertório químico oferecido pelos organismos vivos, especialmente as plantas, precisa continuar sendo explorado racionalmente no intuito de se aprender, copiar e imitar a natureza, já que ela oferece uma infinidade de estruturas distintas.

A riqueza proveniente das plantas servirá inquestionavelmente para o avanço científico das nações, além de proporcionar contribuição para a proteção e sobrevivências da vida e para compreensão e conservação das condições ambientais do planeta Terra (BRAZ-FILHO, 1994).

2.2 Metabólitos Primários e Secundários

Todos os organismos precisam transformar e interconverter um grande número de compostos orgânicos para se capacitar a viver, crescer e se reproduzir. As plantas dependem de transformações químicas executadas pelo seu metabolismo, para garantir assim sua sobrevivência. Estes organismos possuem duas formas de metabolismo: o primário, responsável pela produção de substâncias como aminoácidos, lipídios, carboidratos entre outros; e o secundário, responsável pela produção de substâncias muitas vezes características de grupos taxonômicos, tais como família e gênero. O metabolismo secundário é o que mais interessa ao químico de produtos naturais. Através deste mecanismo de ação das plantas é possível explorar novas substâncias e novos métodos de síntese (BRAZ-FILHO, 1994).

Em contraste com as vias metabólicas primárias, que sintetizam os compostos comumente encontrados em todos os organismos, o metabolismo secundário diz respeito a compostos que têm uma distribuição muito mais restrita na natureza. Estes compostos são encontrados apenas em organismos específicos, ou grupos de organismos e são uma expressão da individualidade das espécies. Metabólitos secundários não são necessariamente produzidos em todas as condições, e na grande maioria dos casos, a função destes compostos e os benefícios para o organismo não é ainda conhecido (DEWICK, 2001).

A maior parte das substâncias provenientes do metabolismo secundário estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação das plantas ao meio em que vivem. Diversas funções são atribuídas a esta classe de metabólitos como: defesa contra herbívoros; proteção contra os raios UV; atração de polinizadores e de animais dispersores de semente, entre outras (SANTOS, 1999).

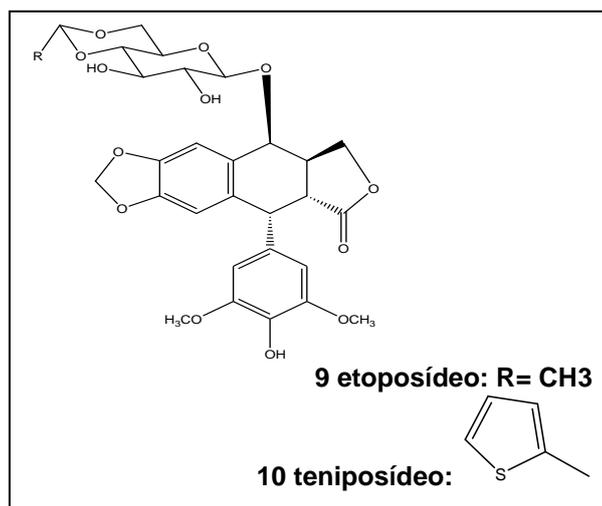
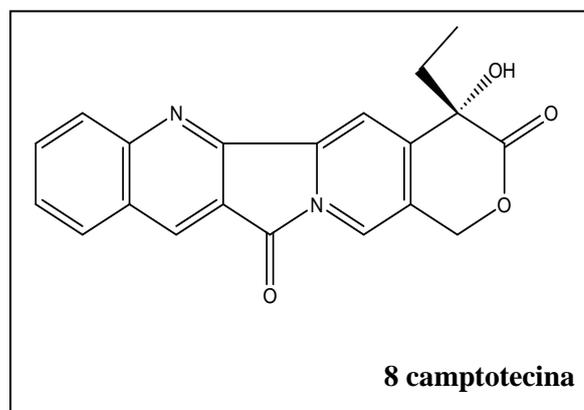
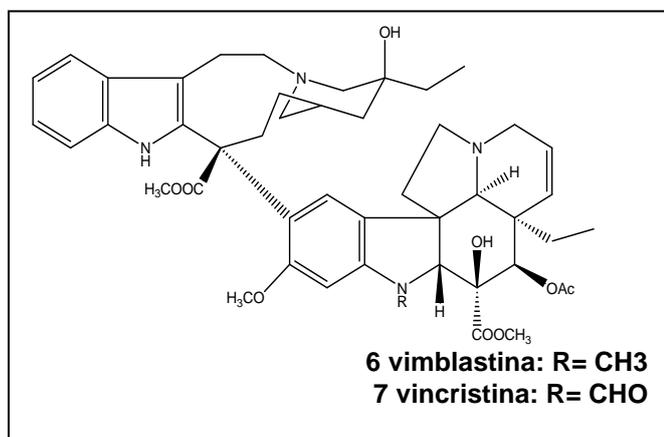
As principais características dos metabólitos secundários são: baixo peso molecular, estrutura complexa, atividades biológicas marcantes e são normalmente encontrados em concentração relativamente baixa e em determinados grupos de plantas. Alguns pesquisadores acreditavam que os metabólitos secundários não passavam de subproduto do metabolismo primário, no entanto, é mais aceita a ideia de que as plantas gastam sua energia para fabricar estes produtos que são essenciais à sua vitalidade (SIMÕES et al., 2004).

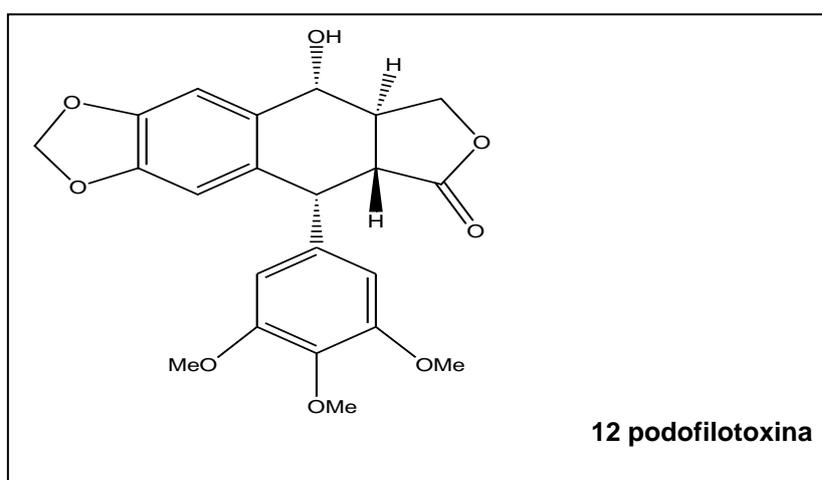
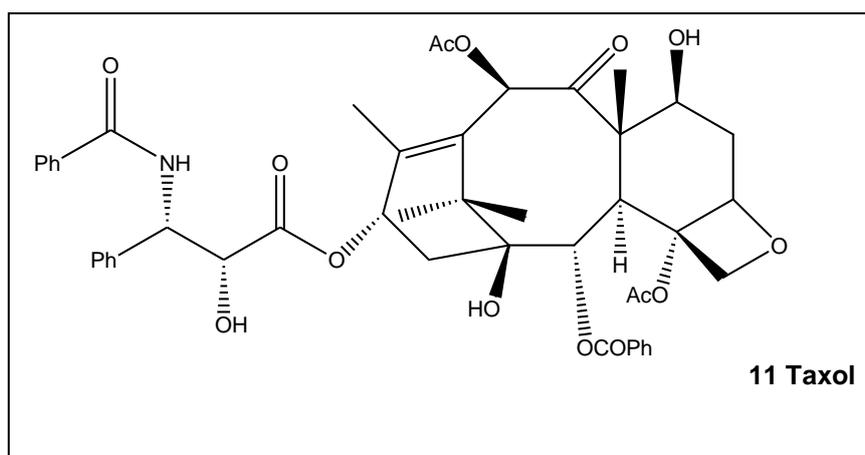
2.3 Câncer e produtos naturais

Apesar das diversas utilidades previstas para os produtos naturais, a área mais explorada é a farmacologia, já que grande parte dos produtos oriundos desta pesquisa são empregados na descoberta de novos medicamentos (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007).

Os extratos de plantas estão entre as fontes mais atraentes de novos medicamentos e, em particular, têm produzido resultados promissores no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer (FERNANDES, 2011).

Nos últimos tempos houve um acréscimo no número de pesquisas de produtos naturais no intuito de chegar a substâncias que combatam o câncer. De acordo com Cragg; Newman (2007) 60% das substâncias utilizadas em terapias contra o câncer provém de plantas. Dentre estas substâncias se destacam a vimblastina (**6**) e a vincristina (**7**), a camptotecina (**8**), os análogos etoposídeo (**9**) e teniposídeo (**10**), o Taxol (**11**) e a podofilotoxina (**12**). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002).





As substâncias vimblastina (**6**) e vincristina (**7**), foram descobertas no final dos anos 30, são alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae) considerados indispensáveis para o tratamento da leucemia. O Taxol (**11**), isolado pela primeira vez no final dos anos 60 a partir das cascas do *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) teve seu desenvolvimento brevemente interrompido por vários problemas, no entanto em 1992, sua comercialização foi liberada. Pode ser utilizado no combate ao câncer de ovário e em tratamento ginecológico (HOSTETTMANN et al., 2003; VIEGAS Jr. et al., 2006).

A camptotecina (**8**) foi isolada a partir da *Camptotheca acuminata* D. (Nyssaceae) no fim dos anos 60, apresentou elevada atividade antitumoral, no entanto mostrou-se altamente tóxica e pouco solúvel, portanto de difícil administração. Após diversas tentativas uma estrutura análoga, menos tóxica, foi desenvolvida e liberada para uso em tratamento de casos avançados de câncer de

ovário quimioresistentes, o Topotecan (HOSTETTMANN et al., 2003; VIEGAS Jr. et al., 2006; CRAGG; NEWMAN, 2005).

O etoposídeo (**9**) (4-demetil-7-[4,6-O-etilideno β-D-glicopiranosil epipodofilotoxina]) e o teniposídeo (**10**) (4-demetil-7-[4,6-O-tenilideno- β-D-glicopiranosil epipodofilotoxina]) são derivados semissintéticos da podofilotoxina (obtida a partir da *Podophyllum emodi*). Estes foram desenvolvidos em 1970, na tentativa de preparar derivados dessa lignana que não possuíssem efeito tóxico gastro-intestinal. Nos 15 anos seguintes, o etoposídeo e o teniposídeo foram introduzidos no tratamento clínico e estes fármacos têm tido uma participação muito importante no tratamento quimioterápico do câncer (BRANDÃO et al., 2010).

Diante de tantas descobertas, são vários os desafios dos pesquisadores, dentre eles: encontrar substâncias que tenham atividade contra a célula cancerígena, porém que não causem efeitos colaterais, substâncias que tenham ação específica contra determinadas células cancerígenas, substâncias que impeçam a multiplicação celular ou levem a célula cancerígena à apoptose (morte celular) (ALMEIDA et al., 2005).

Tendo em vista as dificuldades de tratamento contra o câncer devido a diversos efeitos colaterais provenientes dos tratamentos já existentes, percebe-se ainda mais o valor da pesquisa na área buscando medicamentos com maior eficácia (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Os agentes supressores do câncer são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (BRANDÃO et al., 2010).

A primeira substância natural utilizada no combate ao câncer foi encontrada por Farber em 1954, que utilizou um antibiótico, a Actinomicina D, extraída de uma espécie de *Streptomyces*, no tratamento de um paciente com câncer. A partir daí surgiram diversas pesquisas na área e muitas substâncias foram encontradas e utilizadas (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A descoberta de substâncias naturais com potente atividade anticancerígena renovou o interesse das indústrias pelos medicamentos de origem vegetal; exemplo disso são a vimblastina e a vincristina, acima citadas. Outra importante substância proveniente dos vegetais com atividade antitumoral é o lapachol; Este composto tem mostrado elevado potencial farmacológico, foi isolado de duas espécies encontradas no nordeste brasileiro: o ipê-roxo ou pau d'arco-roxo (*Tabebuia avelanaedae* Lor.. ex

Griseb.) e o ipê-amarelo ou pau d'arco-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichol.) ambos pertencentes à família Bignoniaceae (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007). A atividade antitumoral encontrada nesta espécie foi atribuída a alguns de seus constituintes, principalmente à naftoquinona lapachol e a outras quinonas, como a β -lapachona que são objeto de pesquisa e investigação (SIMÕES et al., 2004). O Lapachol é uma naftoquinona isolada de várias espécies de plantas da família Bignoniáceas, encontrado facilmente nas regiões norte e nordeste do Brasil. Conhecido por suas propriedades anticancerígenas possui ainda atividade anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma e antiulcerogênica (ARAÚJO et al., 2002).

Além das valiosas descobertas, outro importante motivo que mantém o interesse das indústrias pela pesquisa no ramo dos produtos naturais é a busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Portanto, diante da importância de pesquisas que viabilizam o encontro de novas estruturas com potencial farmacológico, especialmente com atividade anticancerígena e tendo em vista a dificuldade ao se deparar com estruturas complexas, um dos caminhos viáveis a serem seguidos é a síntese de moléculas mais simples com atividade biológica comparável. Neste caso a estrutura original dos produtos naturais deixa de ser o princípio ativo e passa a ser então a base para o desenvolvimento de fármacos (HARVEY, 2008), assim a diversidade de substâncias proveniente dos produtos naturais não deixa de contribuir com a pesquisa.

2.4 Família Celastraceae

As plantas da família Celastraceae estão agrupadas em 98 gêneros e cerca de 1.264 espécies e podem ser encontradas principalmente nas regiões tropicais. Esta família foi dividida em duas subfamílias: Hippocratioideae e Salacioideae (SIMMONS et al., 2001). Os dois gêneros da família Celastraceae mais comuns no Brasil são: *Maytenus* e *Salacia*, ambos produtores de frutos comestíveis, sendo a *Salacia* o gênero mais frequente em todo o Estado de Goiás (BRAGA FILHO et al., 2001).

Diante das diversas descrições de atividade biológica das plantas pertencentes à família Celastraceae, houve um aumento no número de pesquisas com espécies desta família. Dentre as atividades biológicas descritas estão: antireumáticas, antibacterianas, antitumorais (no tratamento de câncer de pele), ações curativas de feridas de pele, ações antiulcerogênicas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, inseticidas, imunossupressoras, antimicrobianas, antimalariais, tripanomicidas, no tratamento de diabéticos e outras (FONSECA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2006; SILVA JÚNIOR, 2005).

Na medicina popular do Brasil há uma ampla utilização das folhas de plantas da família Celastraceae, que são aplicadas como analgésicos, anti-inflamatórios e antiulcerogênicos, sendo a eficácia e segurança confirmadas por estudos farmacológicos e clínicos (CORRÊA, 1984; SOARES et al., 2004; LORENZI e MATOS, 2002).

De acordo com Buffa Filho e colaboradores (2002) testes clínicos realizados com triterpenos insaturados, derivados do esqueleto friedo-nor-oleanano, proveniente de espécies da família Celastraceae, demonstraram efetiva atividade *in vivo* frente a diferentes tipos de carcinomas, tais como epidermóide, do estômago e do sistema linfático.

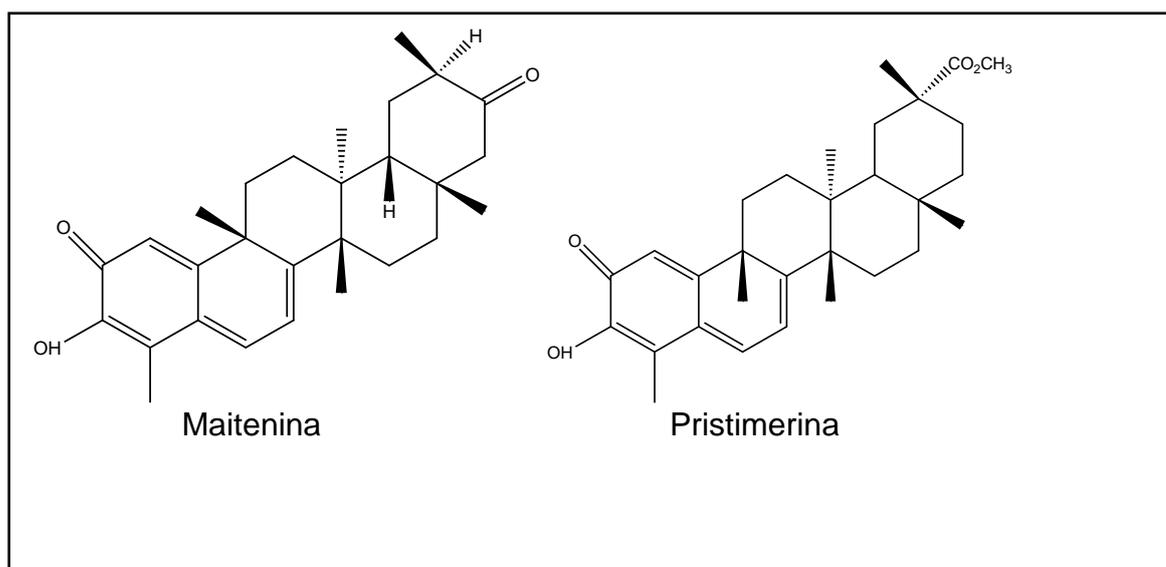
Testes realizados com a entrecasca do caule de *Maytenus rigida* Mart. demonstraram que os extratos e frações desta planta inibiram o crescimento da bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, no entanto, não apresentaram atividade antimicrobiana quando testados frente às bactérias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp. De acordo com Bruni e colaboradores (2006), outras espécies de *Maytenus*, como a *M. krukovii* A.C.Sm.,

não apresentam atividade antimicrobiana significativa. Esta variação em relação a presença de atividade antimicrobiana, pode estar relacionada não só a características da planta, uma vez que diferentes espécies apresentam diferentes princípios ativos, mas também com as características das cepas testadas e da metodologia analítica empregada (SANTOS et al., 2011).

Os principais compostos isolados da família Celastraceae são os triterpenos (SOUSA et al., 1990), sesquiterpenos (VIEIRA FILHO et al., 2002), flavonóides (CHABARIBERI et al., 2009). Uma classe abundante nesta família são os triterpenos pentacíclicos, dentre os quais destacam-se: friedelanos, oleananos, ursanos e lupanos (SOUSA, 2012).

Também já foram isolados de Celastraceae derivados agarofurânicos, catequinas, proantocianidinas, glicosídeos, flavonóides glicosilados e alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (FONSECA et al., 2007). No entanto as plantas desta família caracterizam-se por apresentar triterpenos quinonametídeos (Figura 1) e alcalóides piridínicos sesquiterpênicos em abundância, os quais são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae (Corsino et al.; 1998).

Figura 1. Constituintes comuns à família Celastraceae



2.5 Gênero *salacia*

As plantas do gênero *Salacia* são comumente encontradas em campos e matas e são caracterizadas por serem arbóreas, lenhosas, com folhas inteiras e flores pequenas hermafroditas (JOLY, 2002).

De acordo com Souza & Lorenzi (2005) o gênero *Salacia* é classificado da seguinte forma: Classe *Magnoliopsida*, Ordem Celastrales, Família Celastraceae R. Brown, Subfamília: Salacioideae (considerado um grupo parafilético).

Salacia representa um dos seis gêneros pertencentes à subfamília Salacioideae (família Celastraceae), e compreende cerca de 200 espécies em todo mundo (SIMMONS, 2004; LOMBARDI, 2006).

Existem diversos estudos relacionados ao gênero *Salacia* evidenciando sua diversidade química além de um amplo potencial biológico.

Através de estudo fitoquímico de diversas espécies de *Salacia* foram isoladas e identificadas várias substâncias, dentre as quais estão: triterpenos (friedelanos, maiteninos, oleananos, ursanos e lupanos), flavonóides, esteróides, alcalóides (sesquiterpênicos, macrocíclicos ou maitansinóides), e outras substâncias, além dos triterpenos quinonametideos os mais representativos, os quais são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae (FONSECA et al.; 2007; RODRIGUES et al., 2006).

Somwong e colaboradores (2011), isolaram triterpenos friedo-oleananos de *Salacia verrucosa* Wight (Celastraceae) com forte potencial citotóxico frente a linhagens tumorais, especialmente frente a linhagem de carcinoma de cólon humano.

Através do estudo fitoquímico das raízes de *Salacia amplifolia* Merr. ex Chun & F.C. How foram isolados 13 triterpenos, incluindo quinonametideos, friedelanos, oleananos e triterpenos ursanos, três fenólicos simples, um poliol e um cromanona. Todos eles foram isolados a partir desta planta pela primeira vez (WANG et al., 2011). Duarte e colaboradores (2010) também relatam o isolamento do triterpeno friedelano 1,3-dioxo-16 α -hidroxifriedelano (**25**) pela primeira vez nos galhos de *Salacia elliptica* (Mart. ex Roem. Schult.) G. Don. Também foi citado por Figueiredo e colaboradores (1998) o isolamento de 3 novos triterpenos quinonametideos das raízes de *Salacia kraussii* (Harv.) Harv. que demonstraram atividade antimalárica *in vitro*.

Os triterpenos quinonametídeos são produtos naturais de ocorrência restrita à família Celastraceae. Muitos representantes destes triterpenos são conhecidos por suas propriedades medicinais, sendo usados como agentes antibióticos, anticâncer e antimaláricos (CARVALHO et al., 2005).

O estudo fitoquímico das raízes e caule da *Salacia elliptica* realizado por Silva (2009) conduziu ao isolamento dos triterpenos quinonametídeos maitenina e pristimerina. Ensaio biológicos, também realizados por Silva (2009), com frações e partições purificadas de *Salacia elliptica* também mostraram a bioatividade desta espécie frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Kocuria rhizophila*. Dentre os resultados obtidos usando a bioautografia (método aplicado na avaliação de possíveis atividades antifúngica e antibacteriana) como ensaio biológico, o maior índice de inibição foi detectado para o extrato diclorometano da raiz e das folhas de *Salacia elliptica*, com total inibição do crescimento de todas as bactérias (SILVA, 2009).

As pesquisas já realizadas em espécies da família Celastraceae e do gênero *Salacia* ressaltam a importância deste estudo, pois evidenciam uma diversidade de substâncias isoladas bem como bioatividades encontradas em constituintes desta família, em especial atividade antimicrobiana e anticancerígena.

2.5.1 Substâncias isoladas no gênero *Salacia*

No quadro abaixo estão descritas algumas substâncias já isoladas no gênero *Salacia*.

Quadro1. Substâncias isoladas do gênero *Salacia*.

Espécie	Substância isolada	Estrutura	Referência
<i>Salacia elliptica</i>	3-oxofriedelano	13	(DUARTE et al.,2010)
	3 β-hidroxifriedelano	14	
	3-stearyloxyurs-12-en	15	
	3 β-stearyloxyolean-12-en	16	
	metil 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato	17	
	ácido3,4-seco-friedelan-3-óico	18	
	Ácido Palmítico	19	
	28-hidroxi-3-oxofriedelano	20	
	β-sitosterol glicosilado	21	
	Etil glucopiranosídeo	22	
	mangiferina	23	
	dulcitol	24	
	1,3-dioxo-16α-hidroxifriedelano	25	
	16 α -hidroxi-3-oxofriedelano	26	
	30-hidroxi-3-oxofriedelano	27	
	16 α,28-dihidroxi-3-oxofriedelano	28	
β-sitosterol	29	(YOSHIKAWA et al., 2002)	
3,16-dioxofriedelano	30		
mangiferina	23		
(-)-epicatequina	31		
(-)-epigallocatequina	32		
(-)-4-O-metilepigallocatequina	33		
(-)-epiafzelechin-(4_38)-(-)-4-O-methilepigallocatequina	34		
(-)-epicatequina-(4_38)-(-)-4-O-metilepigallocatequina	35		

	hidroxiferruginol	36	
	Ácido lambertico	37	
	kotalagenin 16-acetate	38	
	26-hidroxi-1,3-friedelanodiona	39	
	ácido maiten-fólico	40	
	ácido 3,22-dihidroxiolean-12-en-29-oico	41	
	salacinol	42	
<i>Salacia campestri</i>	3-friedelanol	43	(CORSINO et al., 2000)
	friedelina	44	
	maitenina	45	
	pristimerina	46	
	22-hidroximaitenina	47	
	20-hidroximaitenina	48	
	celastrol	49	
	netzahualcoyone	50	
<i>Salacia petenensis</i>	3-metoxifriedel-2-en-1-ona	51	(SETZER et al., 2001)
		52	
	tingenona		
	netzahualcoyonol	53	
	29-hidroxifriedelan-3-ona	54	
<i>Salacia kraussii</i>	28-nor-isoiguesterina-17-carb-aldeido	55	(FIGUEIREDO et al., 1998)
	17-(methoxycarbonil)-28-nor-isoiguesterina	56	
	28-hidroxi-isoiguesterina	57	
	celastrol	49	
	pristimerina	46	
	isoiguesterina	58	
	isoiguesterol	59	
	2 α ,26dihidroxi-D:Afriedooleanan-3-ona	60	

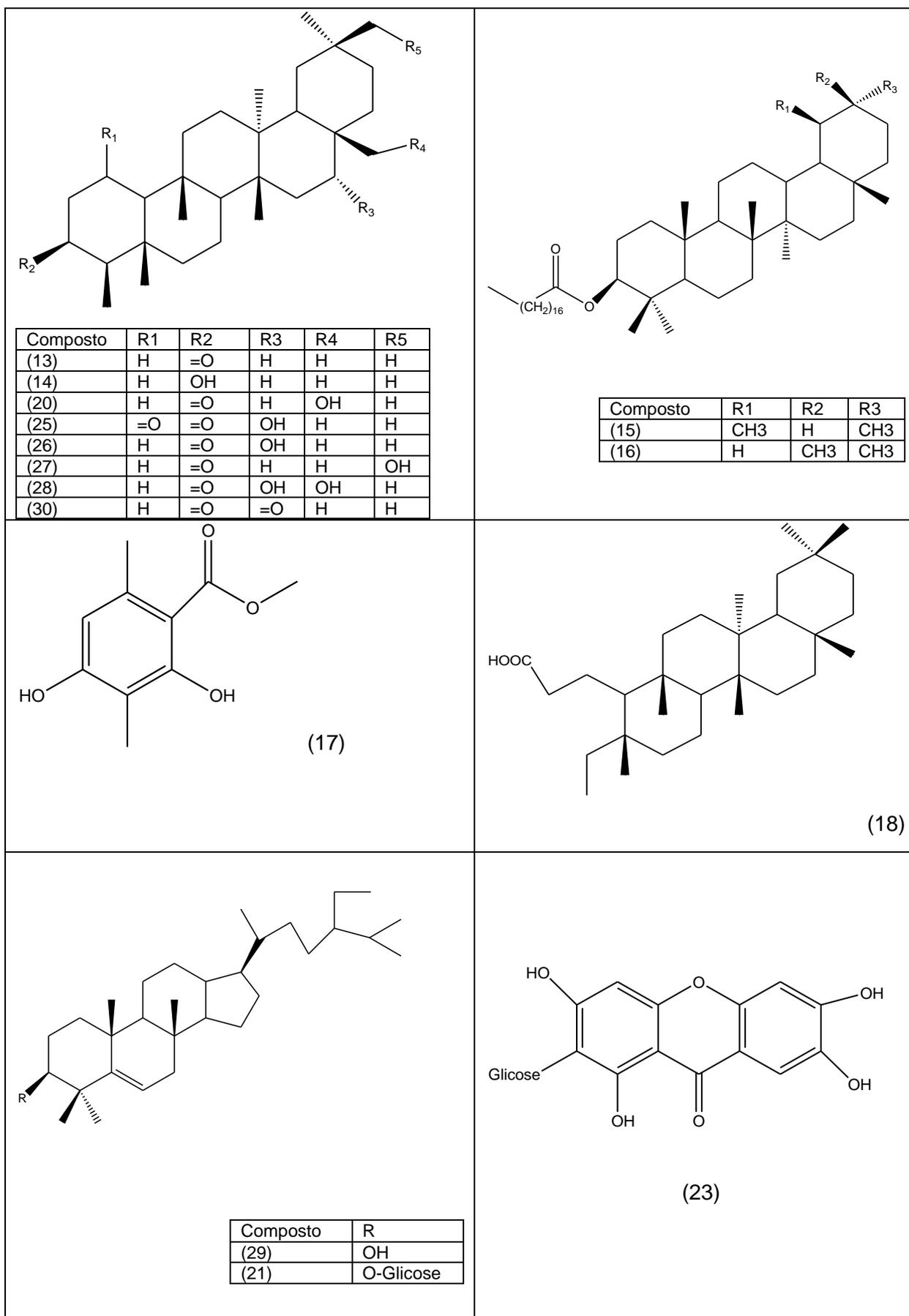
<i>Salacia reticulata</i>	3-Oxo-D: A-fiedooleananp-210r,26diol-diacetate	61	(KUMAR et al., 1985)
	2 α -Hidroxi-D:A-fiedooleanan-3-ona	62	
	D:A-fiedooleanan-21a-ol	63	
	25hidroxi-D: A-fiedooleanan-3-ona	64	
	D:Afiedooleanan-3a-ol	65	
	D: A-fiedooleanan-3,2l diona	66	
	3-0x0-D: A-fiedooleanan-26-al	67	
<i>Salacia verrucosa</i>	21 α -Hidroxifriedelano-1,3-diona	68	(SOMWONG et al., 2011)
	30-hidroxi-friedelano-1,3-diona	69	
	friedelano-1,3-diona	70	
	26-hidroxifriedelano-1,3-diona	71	
	friedelina	44	
	21 α -hidroxi-D:A-fiedo-olean-3-ona	72	
	kokoonol	73	
<i>Salacia madagascariensis</i>	20- <i>epi</i> -isoiguesterinol	74	(THIEM et al., 2005)
	isoiguesterol	59	
	Di-hidro-20- <i>epi</i> -Isoiguesterinol-triacetate	75	
	isoiguesterina	58	
	triterpeno 6-oxofenólico 6-oxoisoiguesterina	76	
	salasones D	77	
	salasones E	78	
	salaquinone B	79	
	salasol B	80	
	ácido maitenólico	81	
	Friedelan-3-ona-29-ol	82	
	15- α -hidroxifriedelan-3-ona	83	

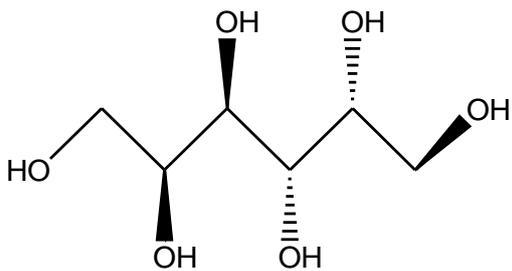
<i>Salacia chinensis</i>	ácido wilforic C	84	(KISHI et al., 2003)
	ácido salaspérico	85	
	ácido orthosphenic	86	
	ácido 3 β ,22 β -di-hidroxi-olean-12-en-29-oico	87	
	ácido maiten-fólico	88	
	β -amirina	89	
	ácido 22- α -hidroxi-3-oxo-olean-2-en-29-oico	90	
	β -amir-en-ona	91	
	ácido Tripterygic A	92	
	demethylregelin	93	
	tingenona	52	
	22 β -hidroxitingenona	94	
	Regeol A	95	
	Triptocalline A	96	
	Celahin C	97	
	mangiferina	23	
	(+)-lyoniresinol	98	
	(+)-isolariciresinol	99	
	(+)-8-methoxyisolariciresinol	100	
	(-)-epigallocatequina	32	
(-)-epicatequina	31		
(+)-catequina	101		
<i>Salacia chinensis</i>	Foliasalacin D1	102	(ZHANG, 2008)
	Foliasalacin D2	103	
	Foliasalacin D3	104	
	3 β -hidroxi-20-oxo-30-nor-lupano	105	
	29-nor-lupan-3,20-diona	106	
	lup-20(29)-en-3 β ,15 α -diol	107	
	20 betulina	108	
	lup-20(29)-en-3-on-28-ol	109	
	ácido betulínico	110	
	lup-20(29)-en-3 β ,30-diol	111	

	30-hidroxi lup-20(29)-en-3-ona	112	
	3 β ,20-dihidroxilupano	113	
	friedelina	44	
	4-epifriedelina	114	
	friedelan-3-ona-29-ol	115	
	octandronol	116	
	12b-hidroxiD:A-friedo-oleanan-3-ona	117	
	ácido oleanóico	118	
	erythrodiol	119	
	ácido ursólico	120	
	uvaol	121	
	19 α (H)-taraxastane-3b,20 α -diol	122	
	isoursenol	123	
<i>Salacia chinensis</i>	Foliachinenoside E	124	(NAKAMURA et al., 2011)
	Foliachinenoside F	125	
	Foliachinenoside G	126	
	Foliachinenoside H	127	
	Foliachinenoside I	128	
	Foliachinenoside j	129	
	Foliachinenoside K	130	
	Foliachinenoside L	131	
	2,4,6-tri-methoxi-fenol 1-O- β -D-glucopiranosidio	132	
	2,6-dimethoxi-4-(2-hidroxi- etil)fenol-1-O- β -D- glucopiranosidio	133	
	coniferin	134	
	syringin	135	
	<i>cis</i> -syringin	136	
	dihydrosyringin	137	
	<i>trans</i> -psinapoyl- β -D-glucopiranosidio	138	
(<i>E</i>)-coumaroyl-1-O- β -D- glucopyranoside	139		

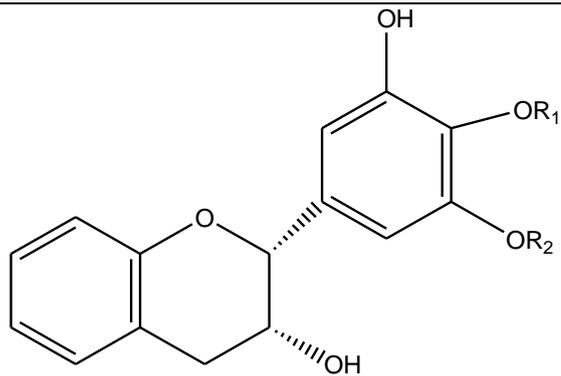
	1-[(2Z)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoate]- β -D-glucopyranoside	140	
	myzodendrone	141	
	hovetrichoside A	142	
	4,7,9-trihydroxy-3,3-dimethoxy-8-O-4-neolignan-9-O- β -D-glucopyranoside[7S, 8R-erythro]	143	
	syringaresinol mono- β -D-glucopyranoside	144	
	eleutheroside E2	145	
	7R,8S-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-O β -D-glucopyranoside	146	
<i>Salacia campestris</i>	wilforina	147	(LIÃO, 1997)
	euojaponina	148	
	euonina	149	
	wilforjina	150	
	neowilforjina	151	
	wilforzina	152	
	forrestina	153	
	euonimina	154	
	ebenifolina E-I	155	
	4-hidroxi-7-epi-chuchuhuanina	156	

Quadro 2: Estruturas das substâncias isoladas do gênero *Salacia*

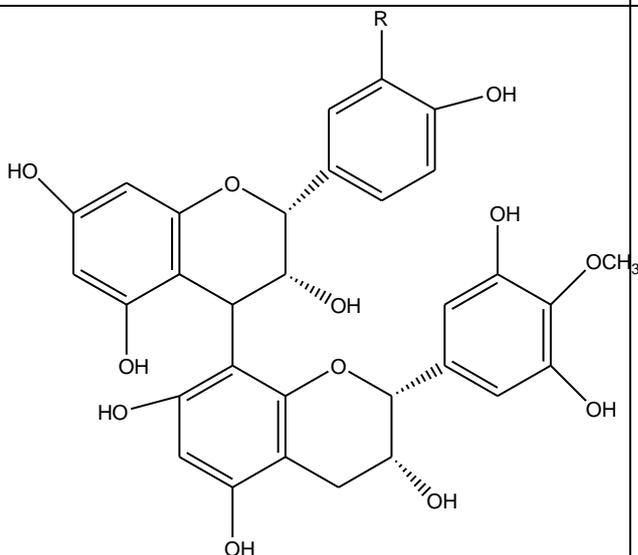




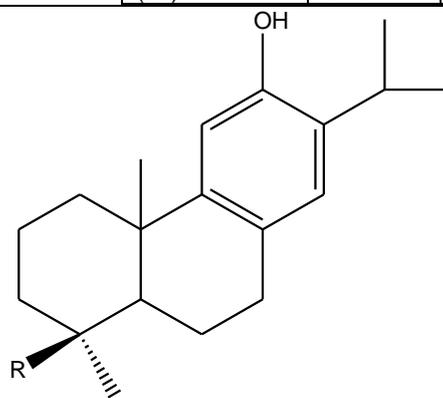
(24)



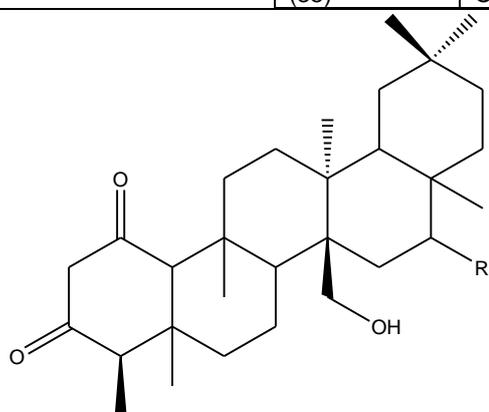
Composto	R1	R2
(31)	H	H
(32)	H	OH
(33)	CH3	OH



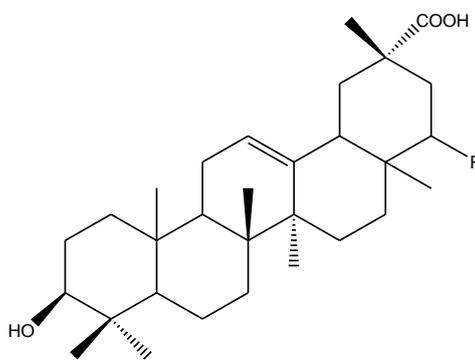
Composto	R
(34)	H
(35)	OH



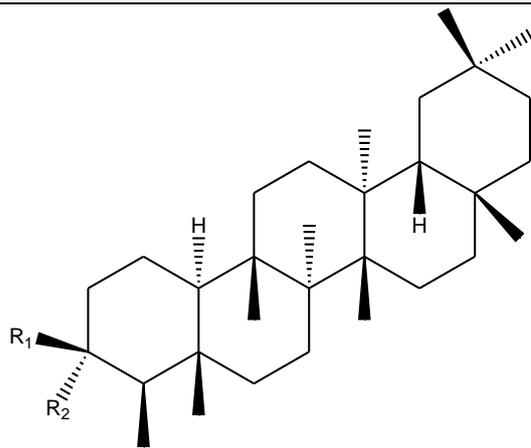
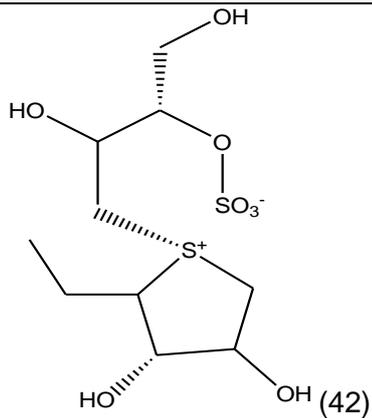
Composto	R
(36)	CH2OH
(37)	COOH



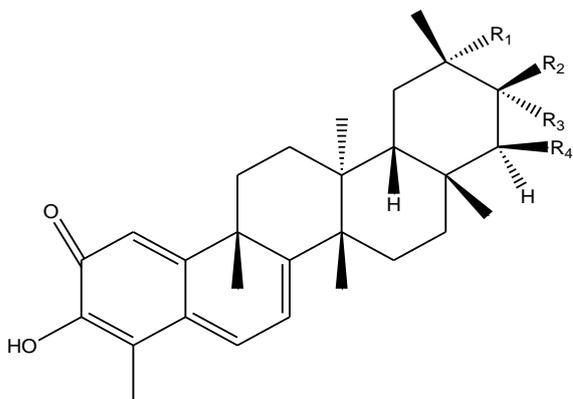
Composto	R
(38)	OCOCH3
(39)	H



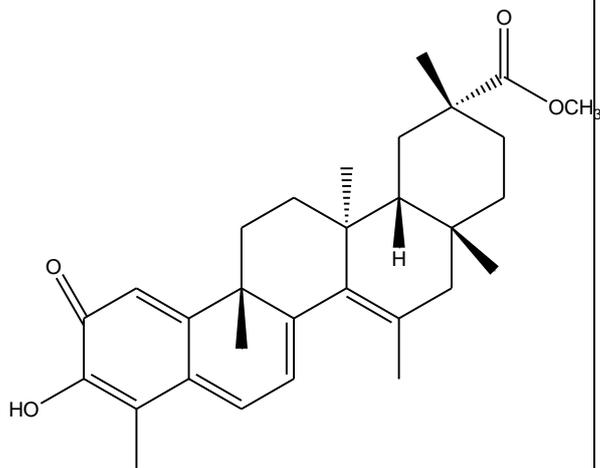
Composto	R
(40)	α - OH
(41)	β - OH



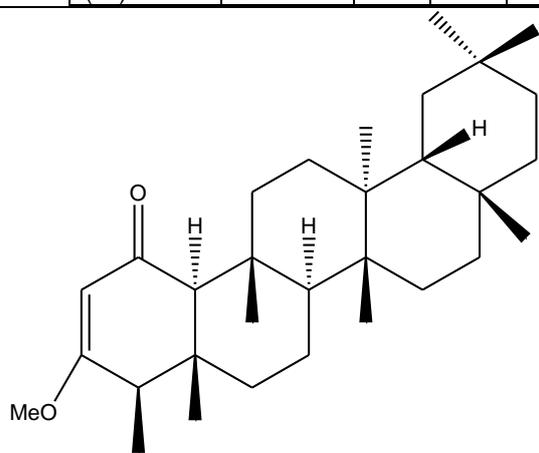
Composto	R1	R2
(43)	OH	H
(44)	=O	=O



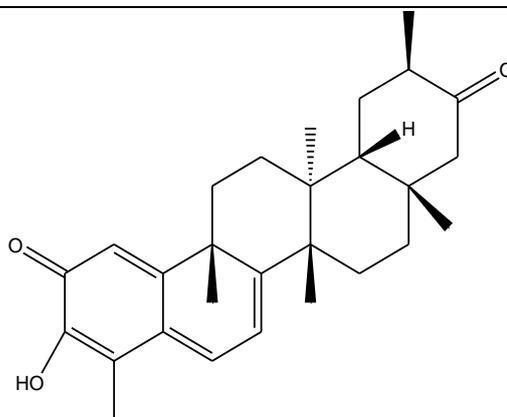
Composto	R1	R2	R3	R4
(45)	H	=O	=O	H
(46)	COOCH3	H	H	H
(47)	H	=O	=O	OH, H
(48)	OH	H	H	H
(49)	COOH	H	H	H



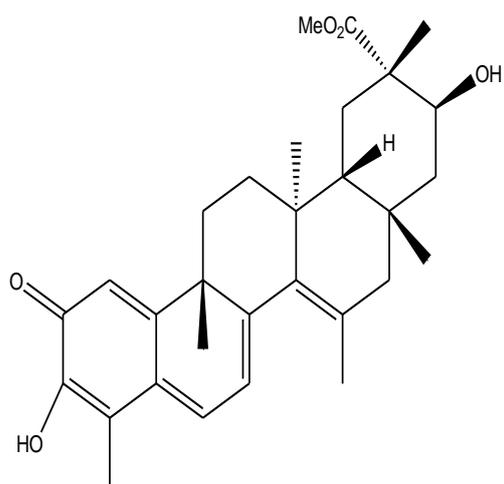
(50)



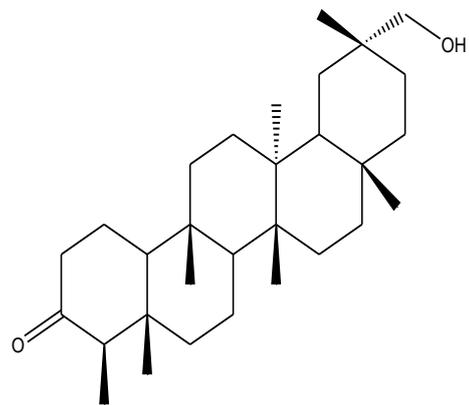
(51)



(52)

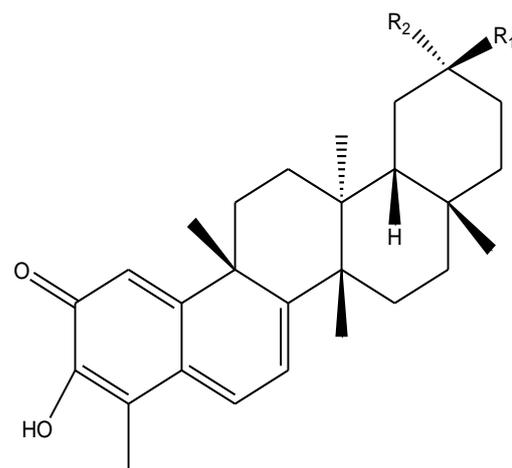
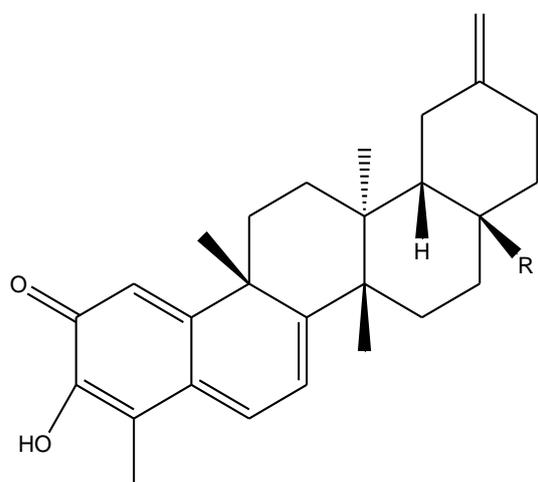


(53)

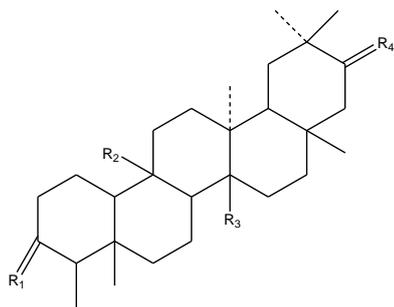


(54)

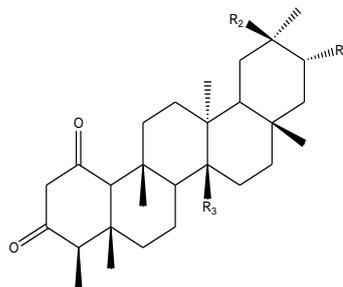
Composto	R
(55)	CHO
(56)	COO CH3
(57)	CH2 OH
(58)	CH3



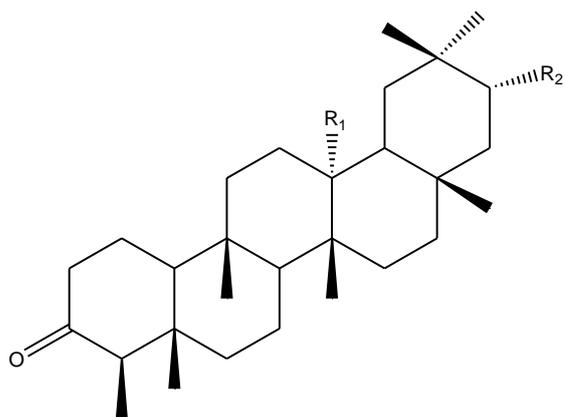
(59)



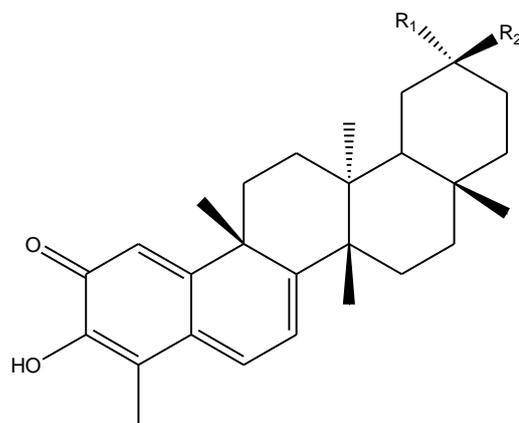
Composto	R1	R2	R3	R4
(60)	=O	CH3	CH2OH	α - OH β - H
(61)	=O	CH3	CH2OAc	α - OAc β - H
(62)	=O	CH3	CH3	α - OH β - H
(63)	H2	CH3	CH3	α - OH β - H
(64)	=O	CH2OH	CH3	H2
(65)	α - OH β - H	CH3	CH3	H2
(66)	=O	CH3	CH3	=O
(67)	=O	CH3	CHO	H2



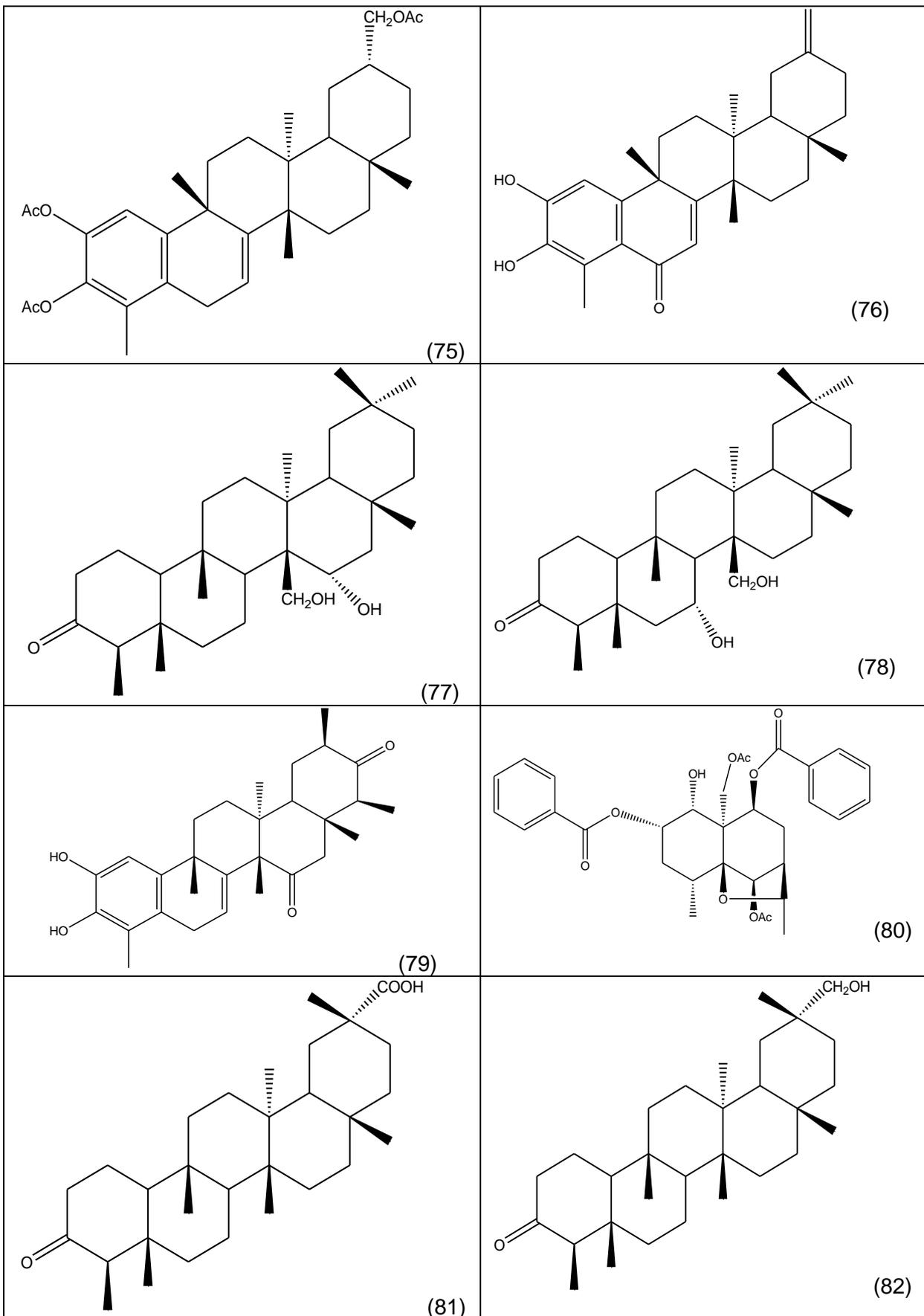
Composto	R1	R2	R3
(68)	OH	CH3	CH3
(69)	H	CH2OH	CH3
(70)	H	CH3	CH3
(71)	H	CH3	CH2OH

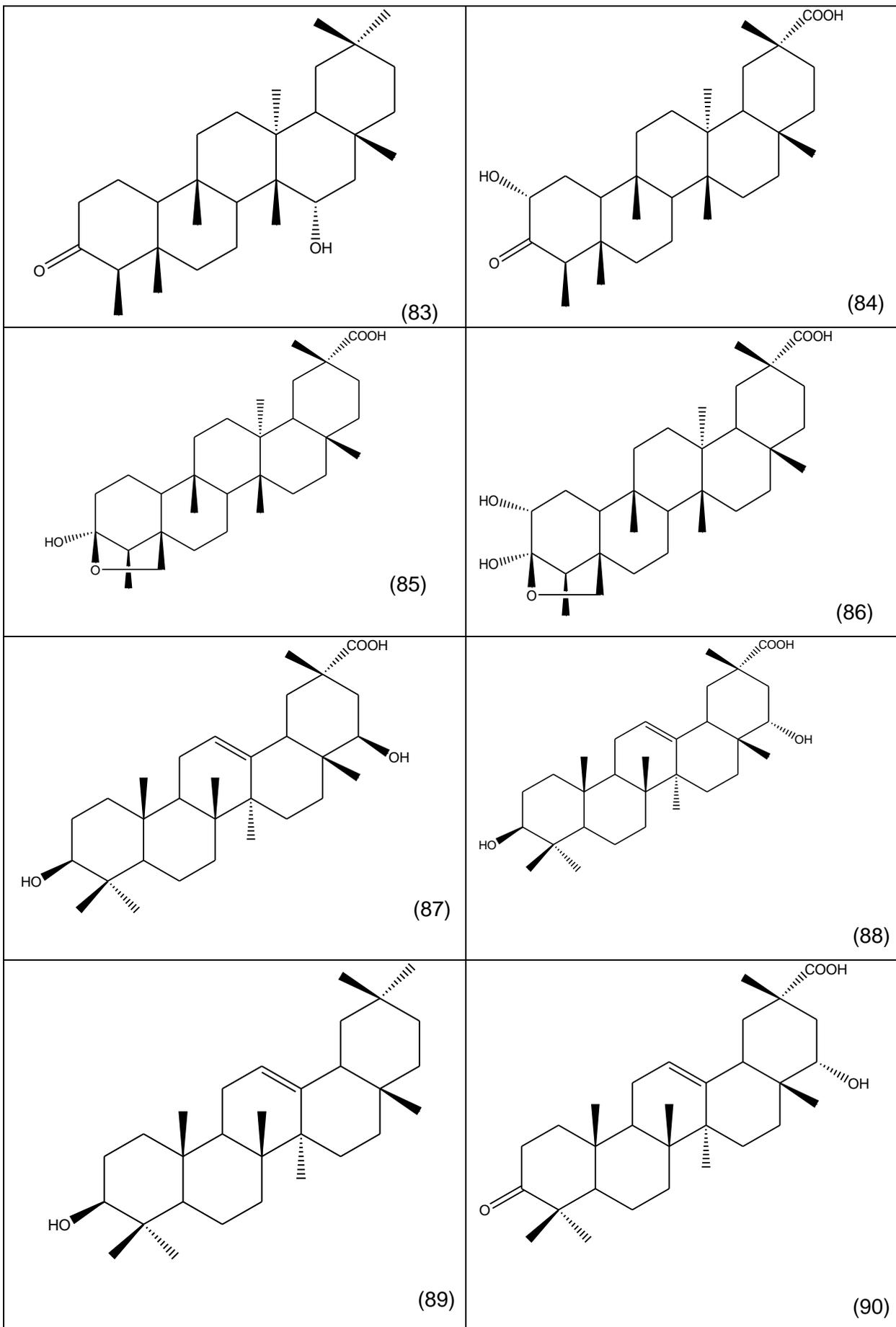


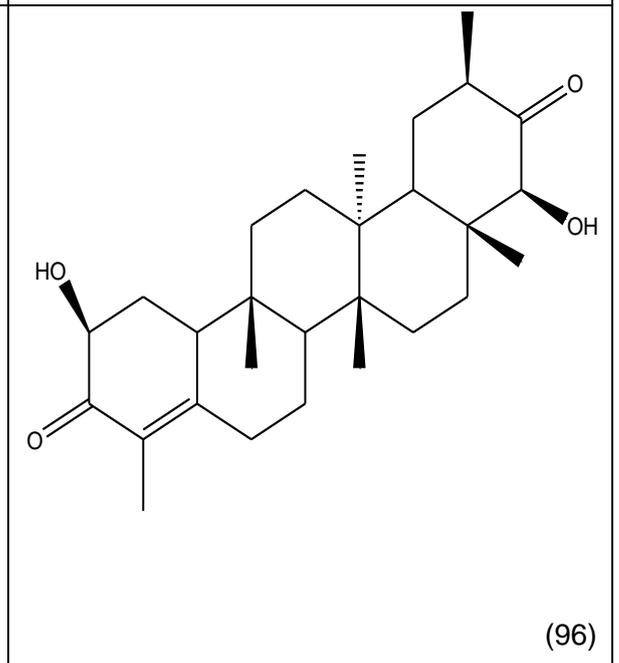
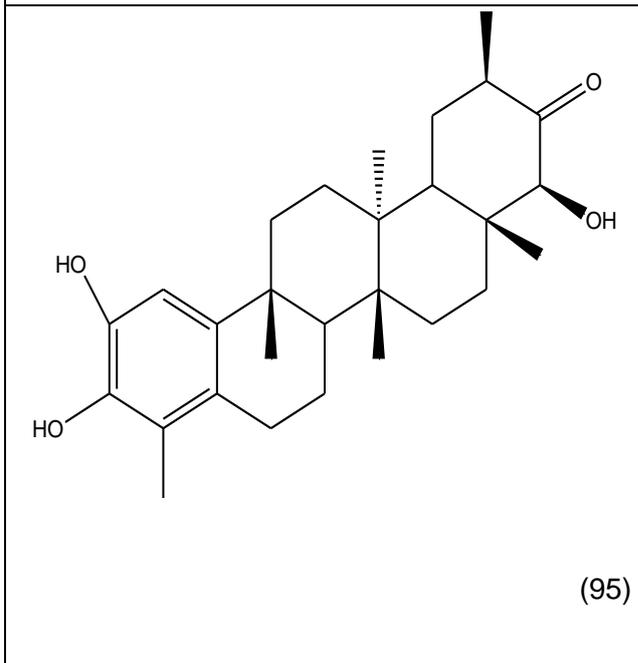
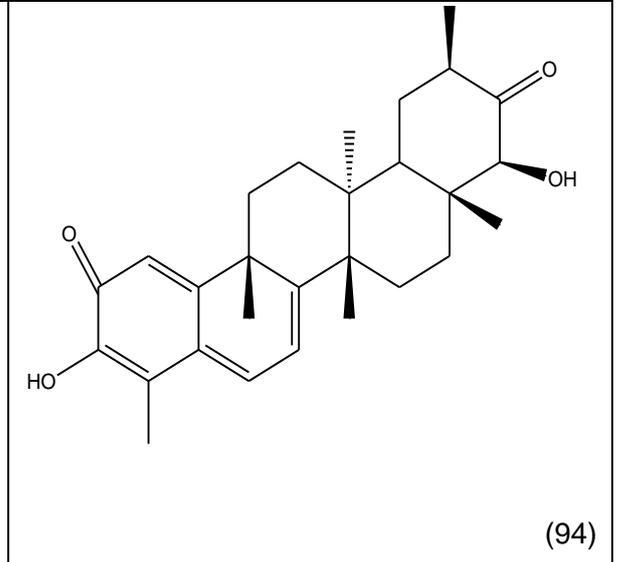
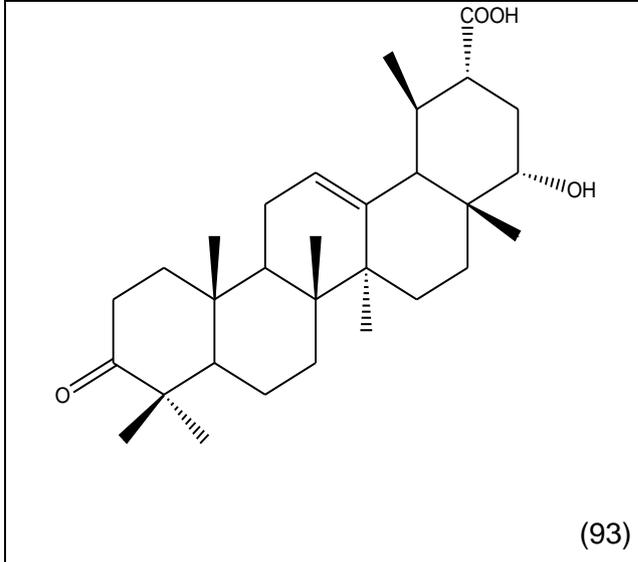
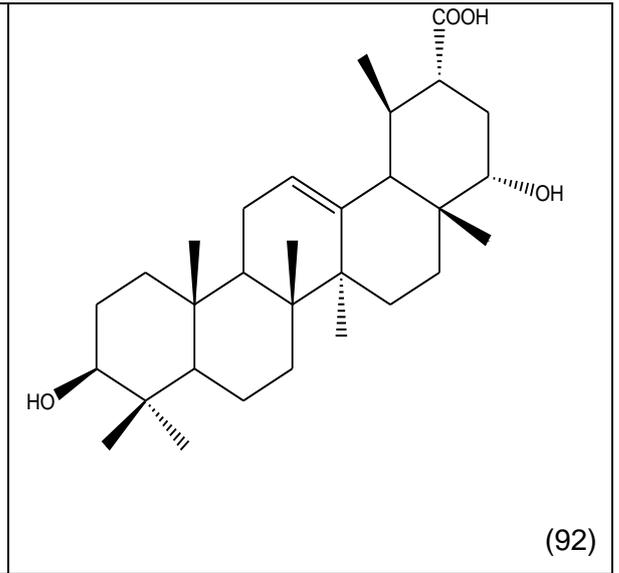
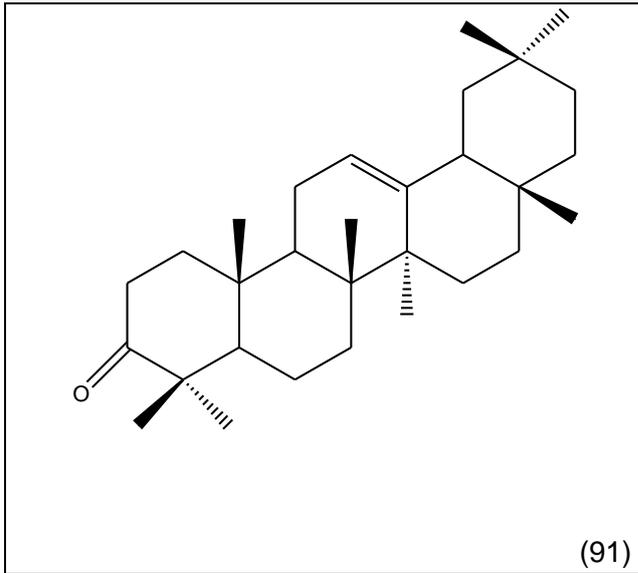
Composto	R1	R2
(72)	CH3	OH
(73)	CH2OH	H

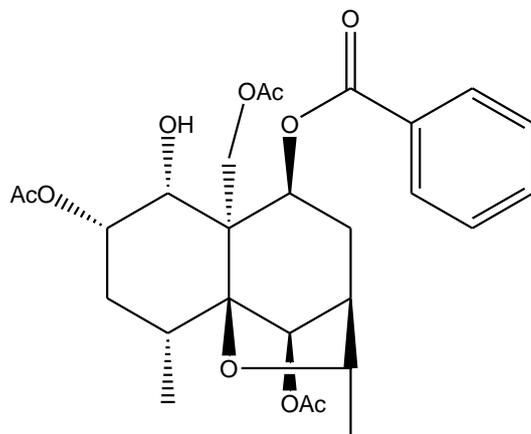


(74)

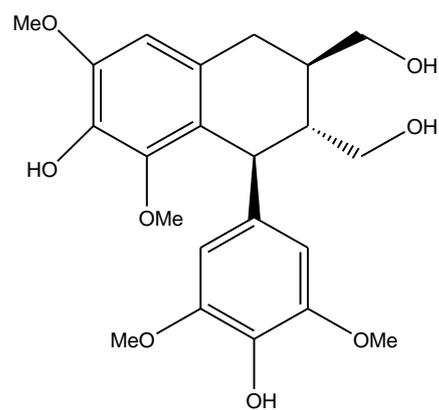




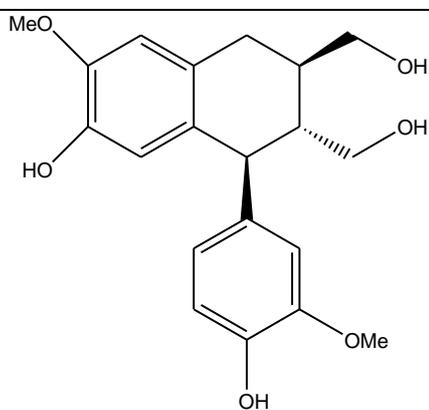




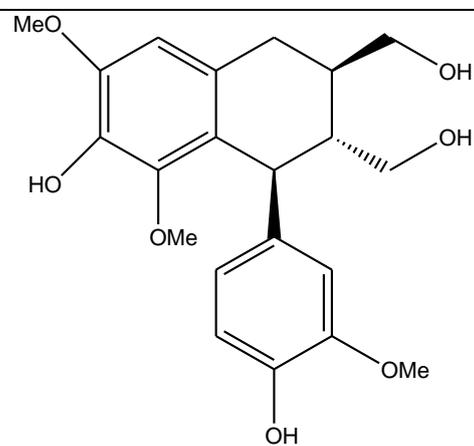
(97)



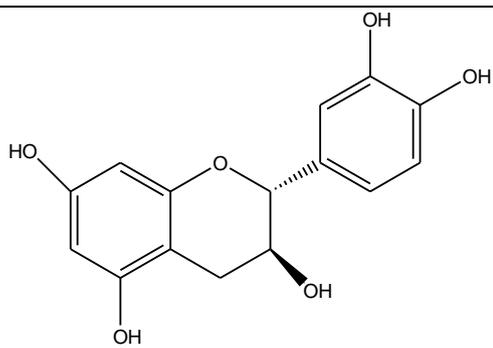
(98)



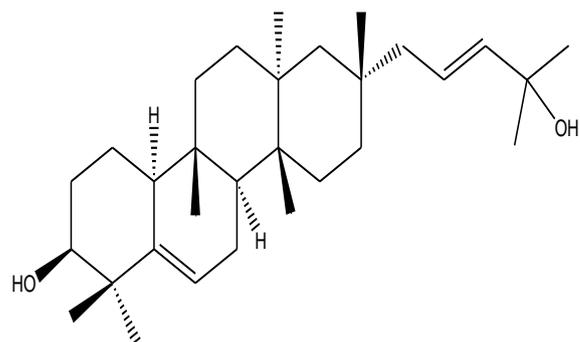
(99)



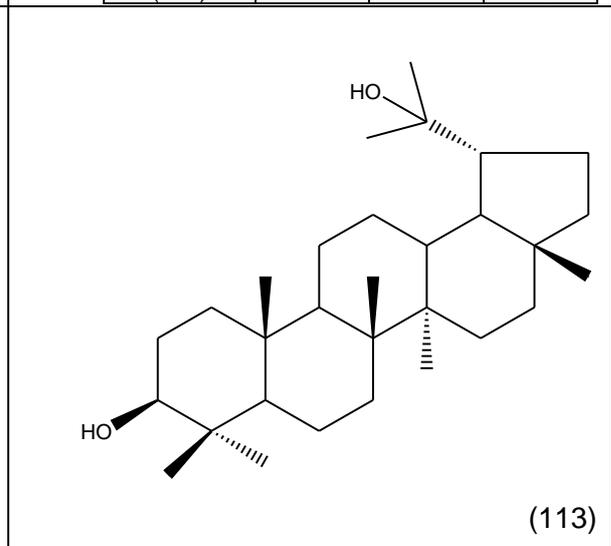
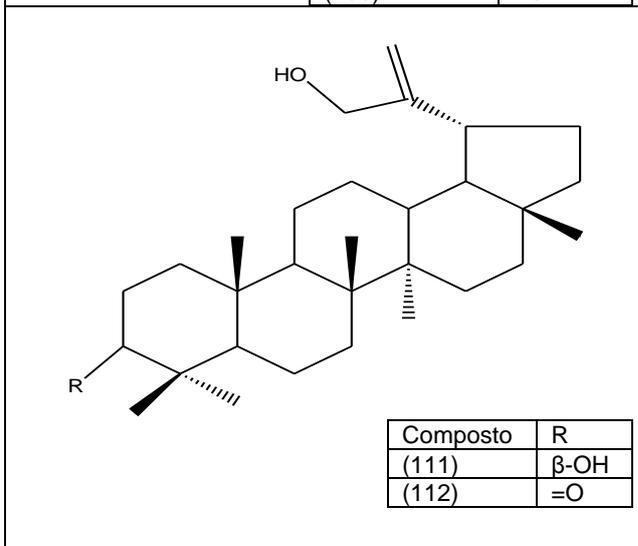
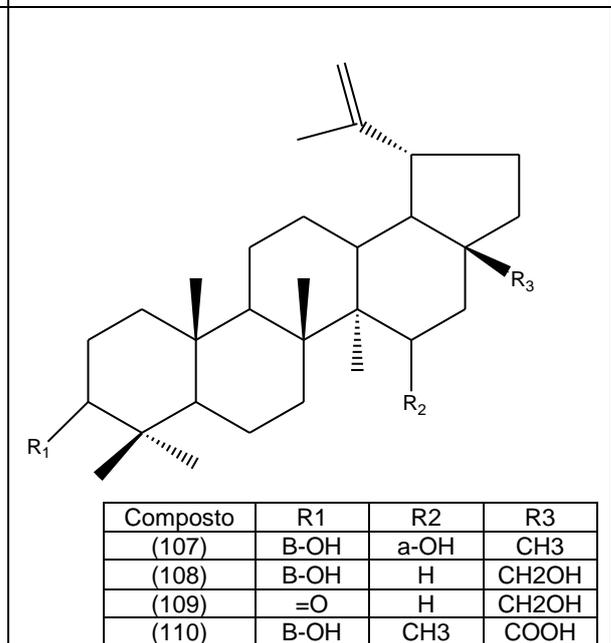
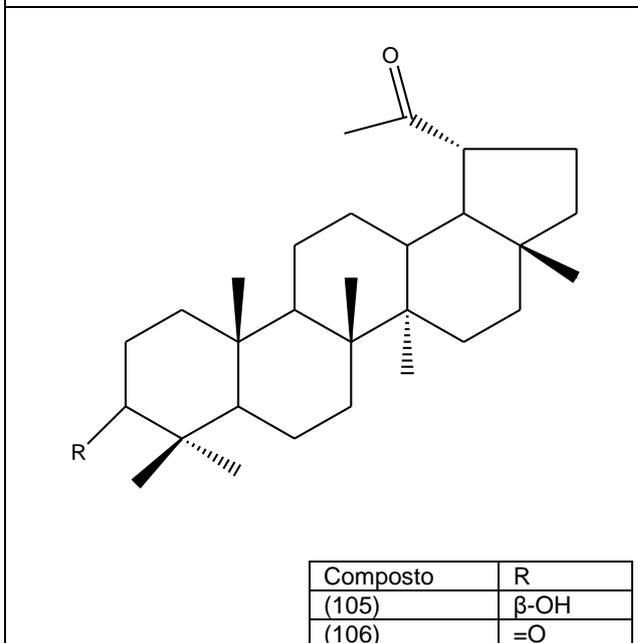
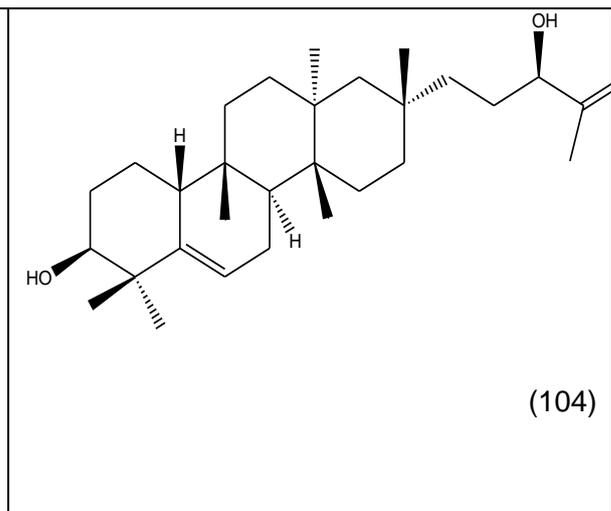
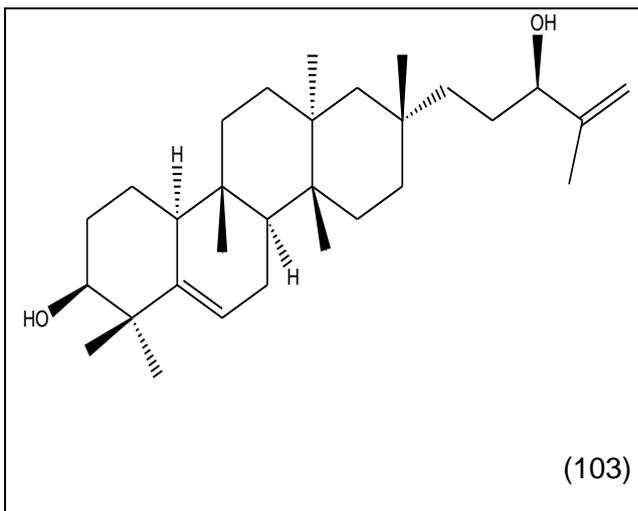
(100)

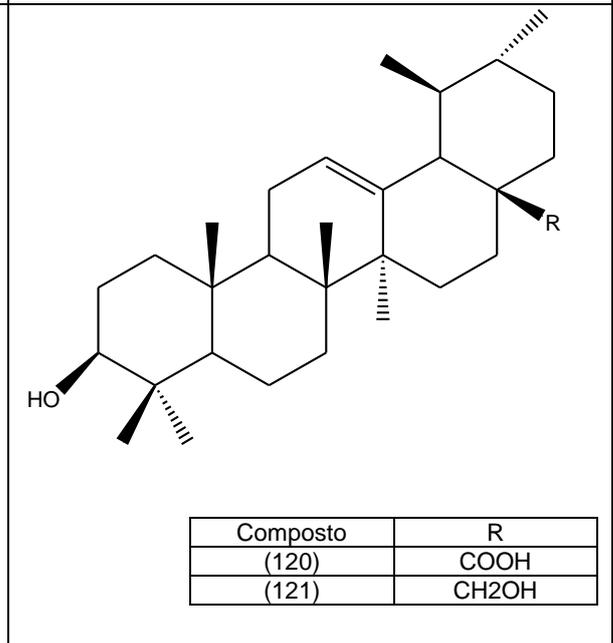
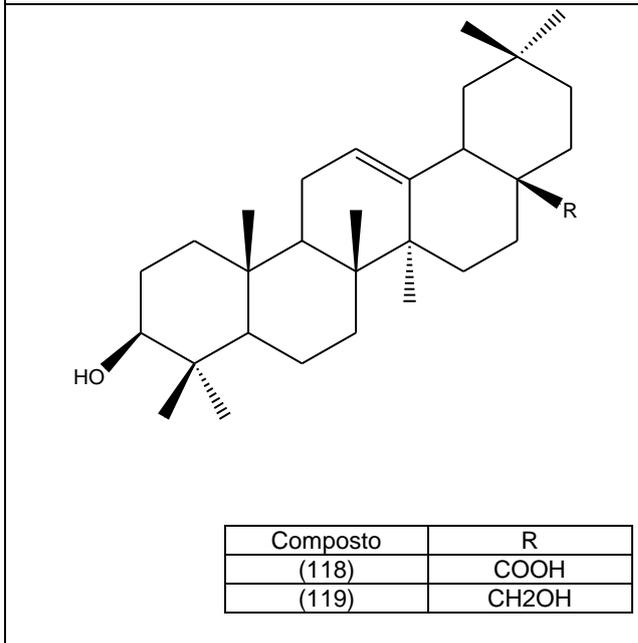
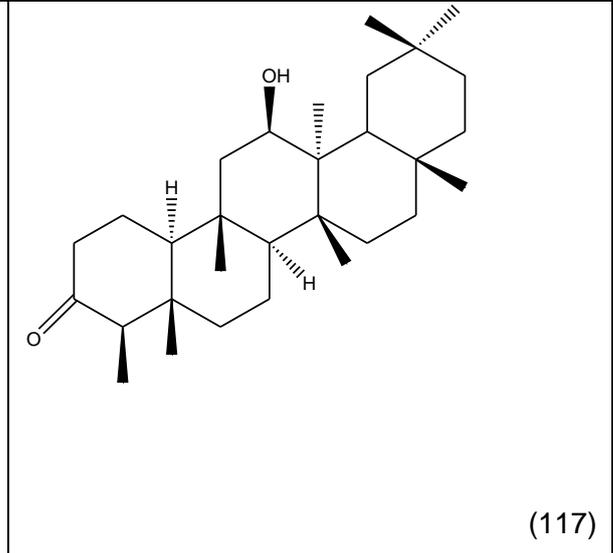
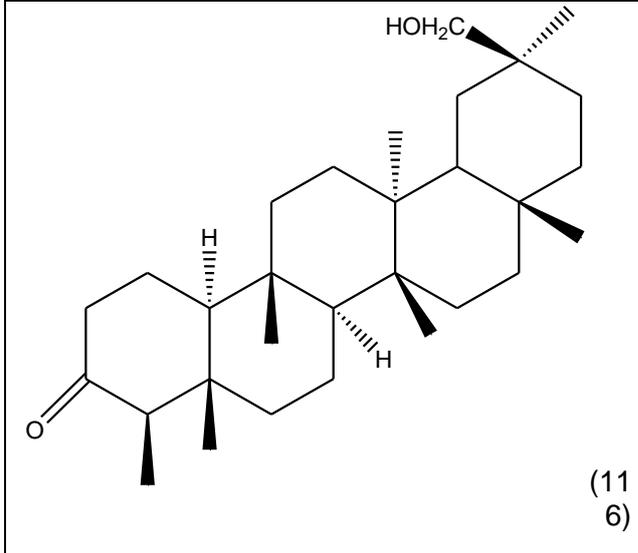
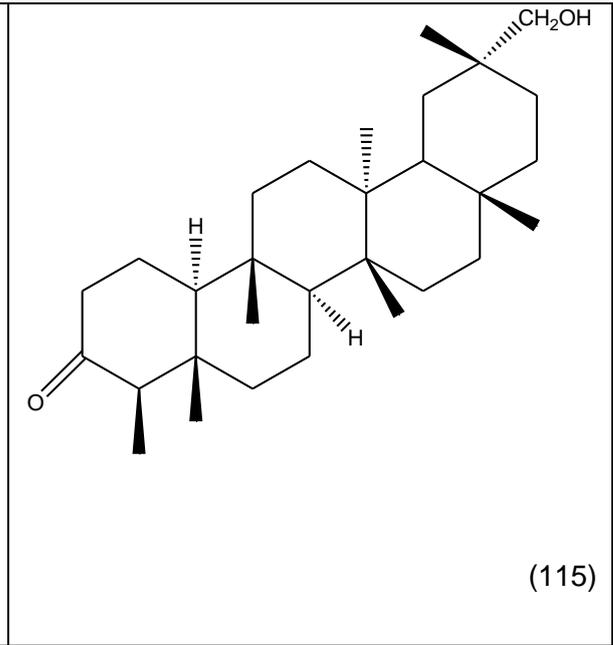
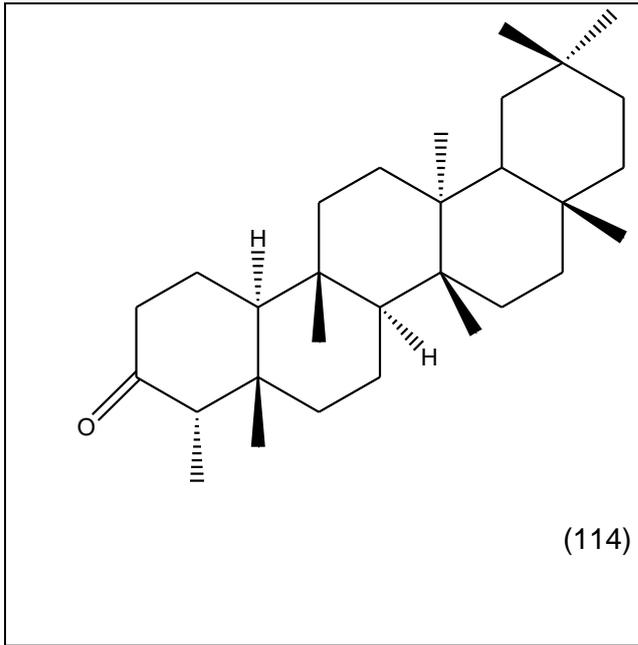


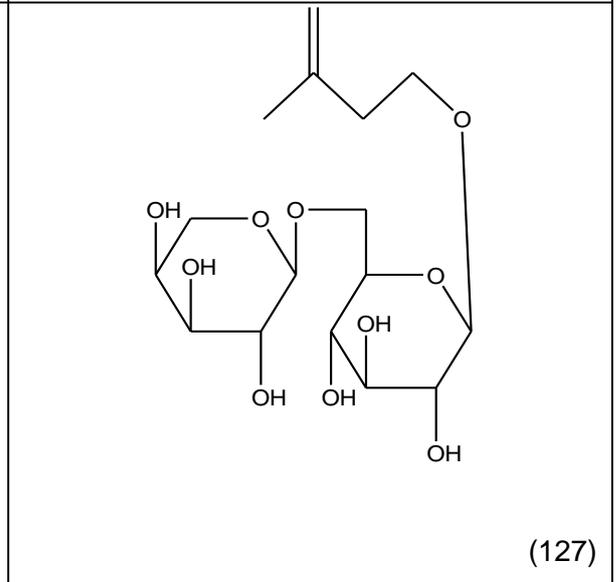
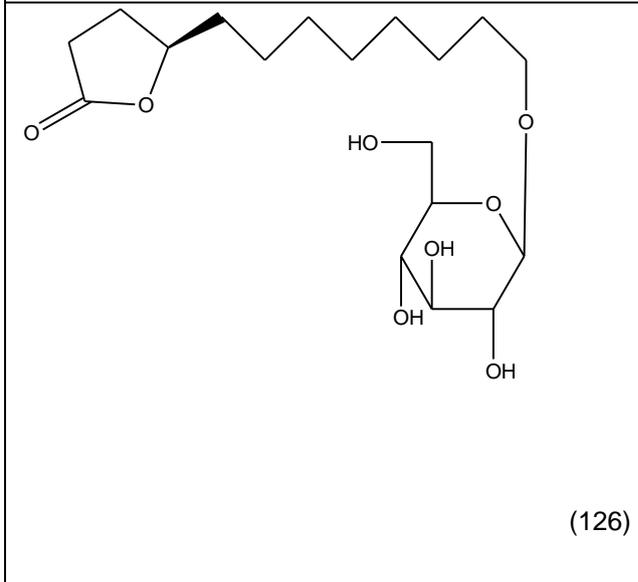
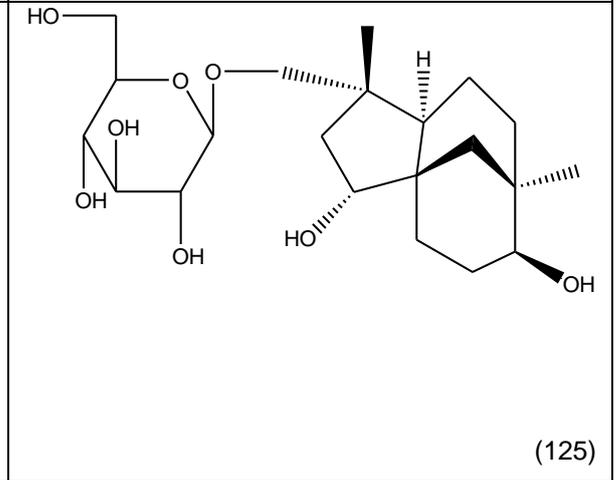
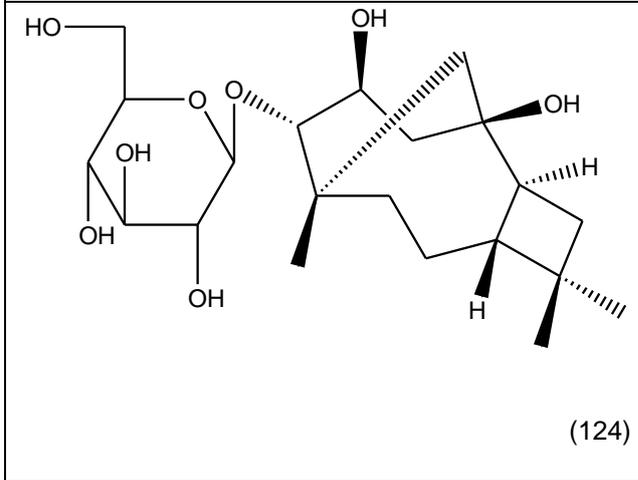
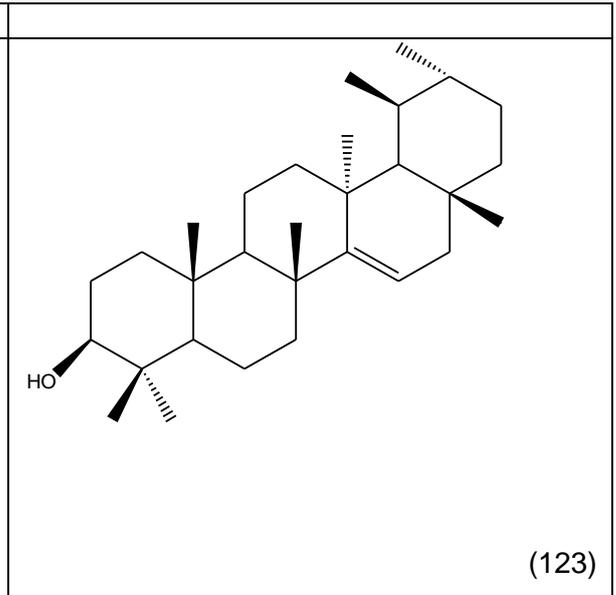
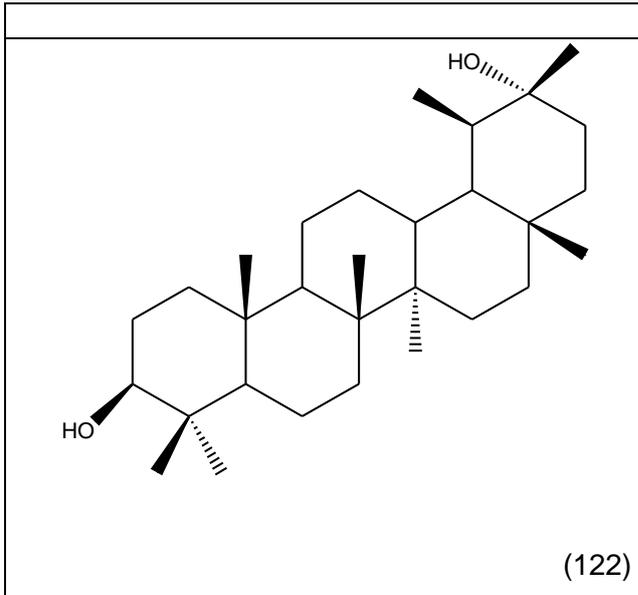
(101)

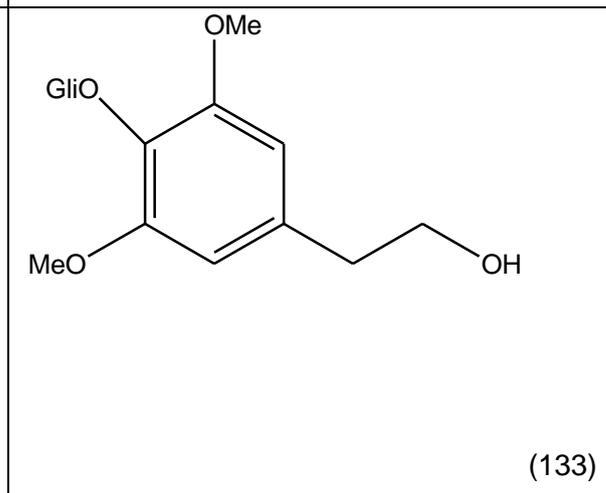
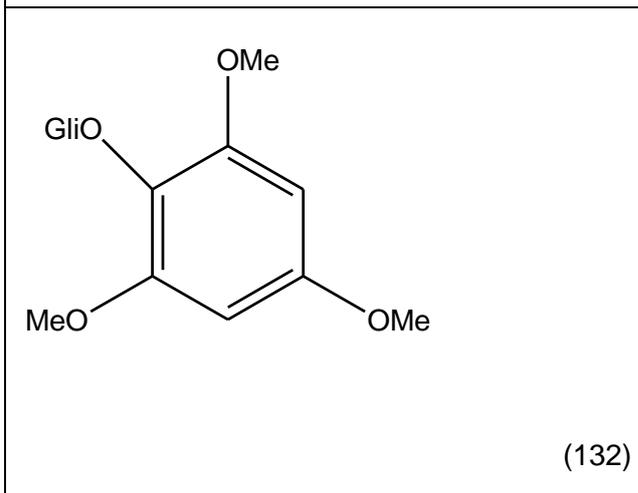
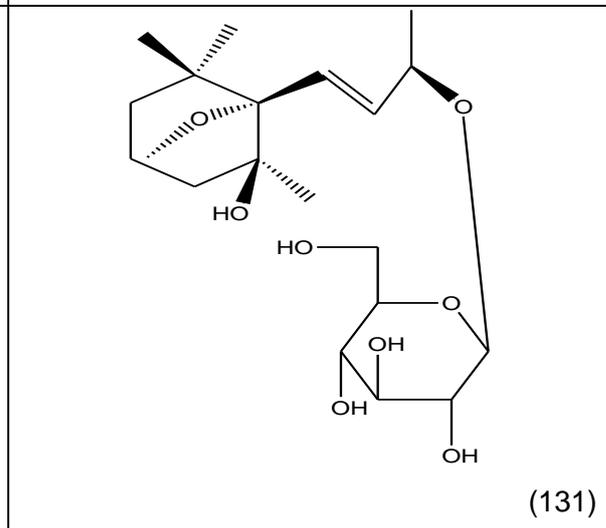
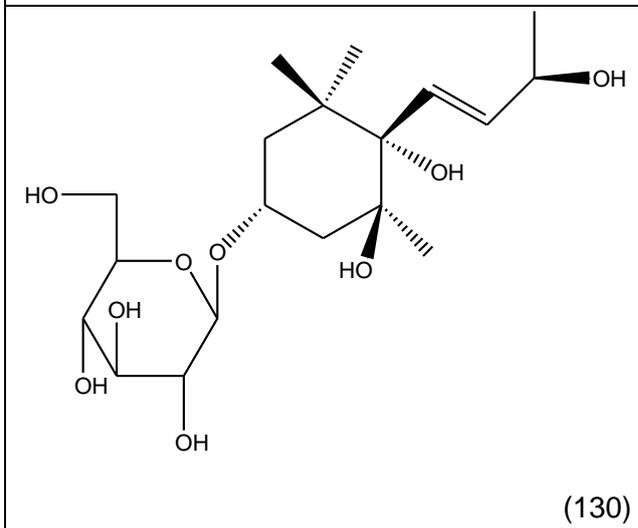
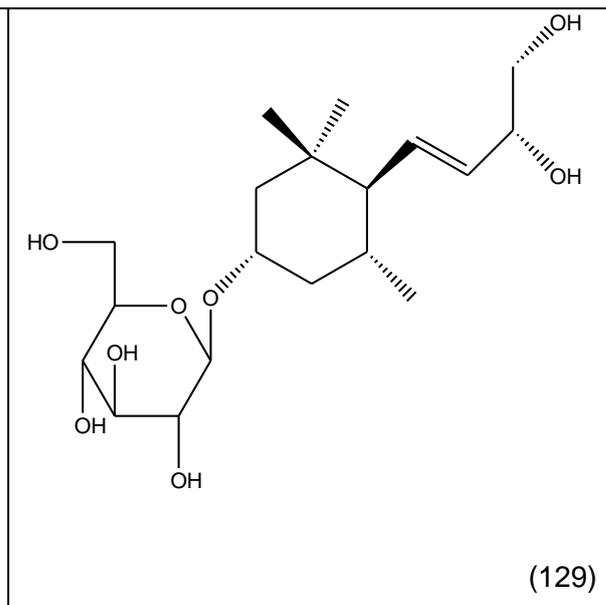
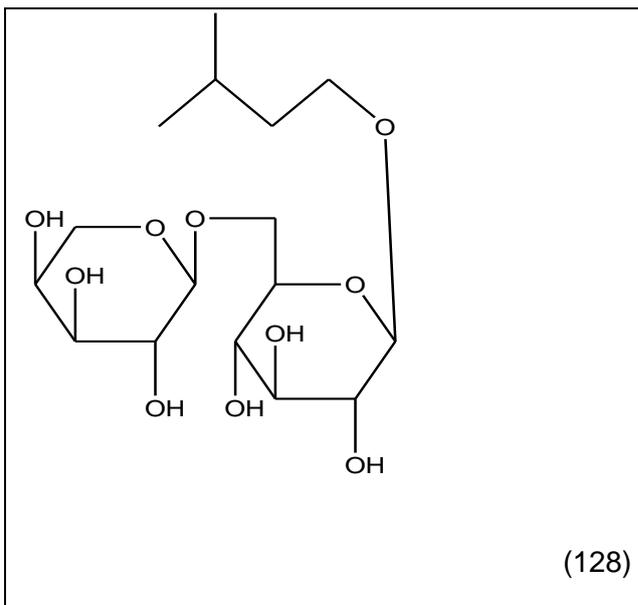


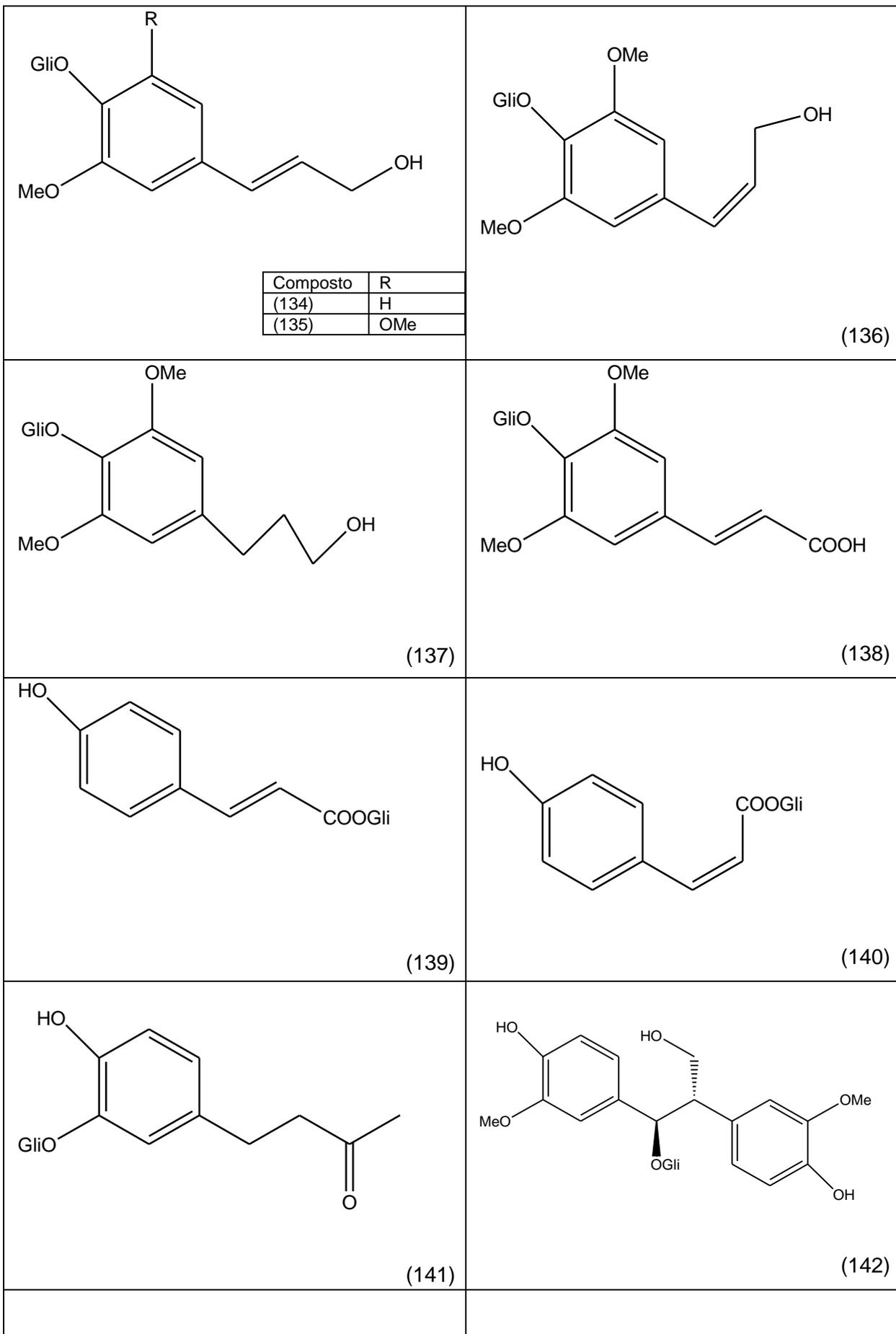
(102)

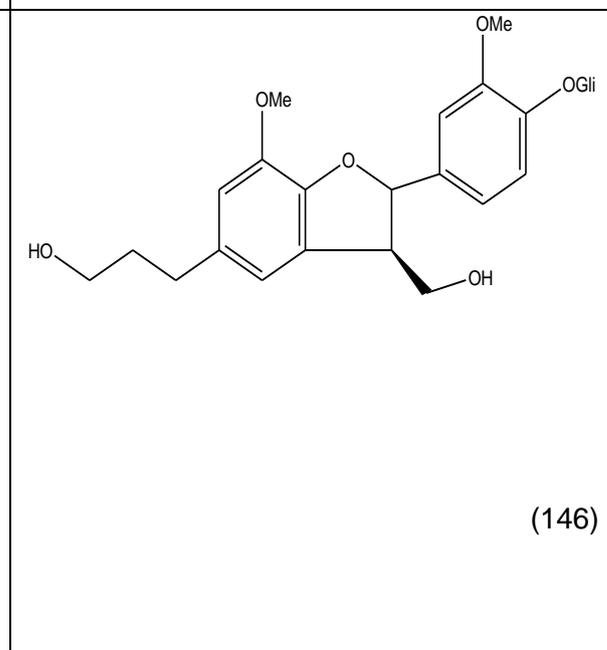
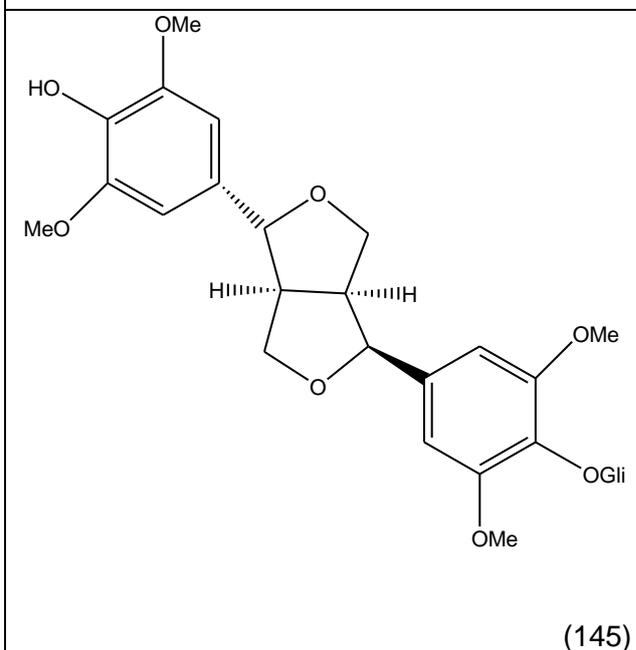
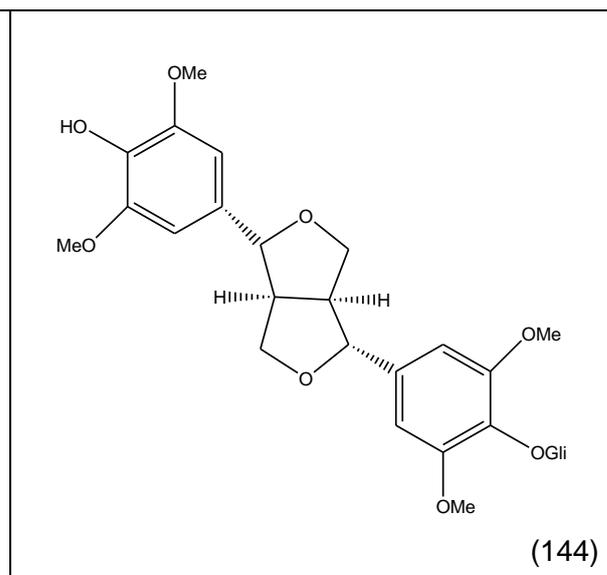
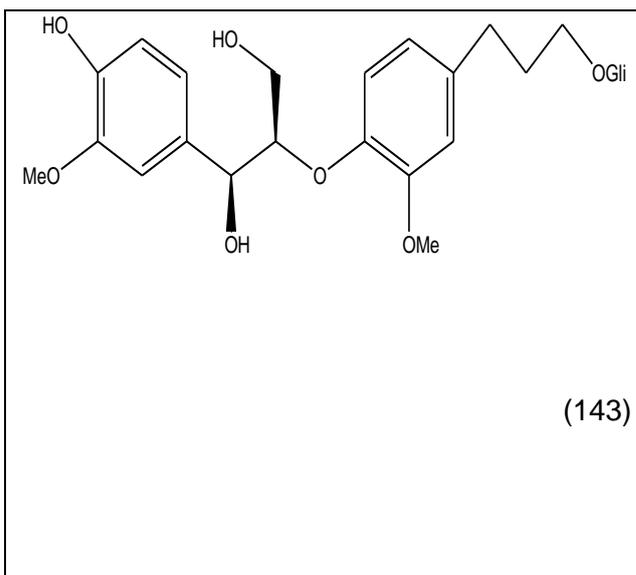


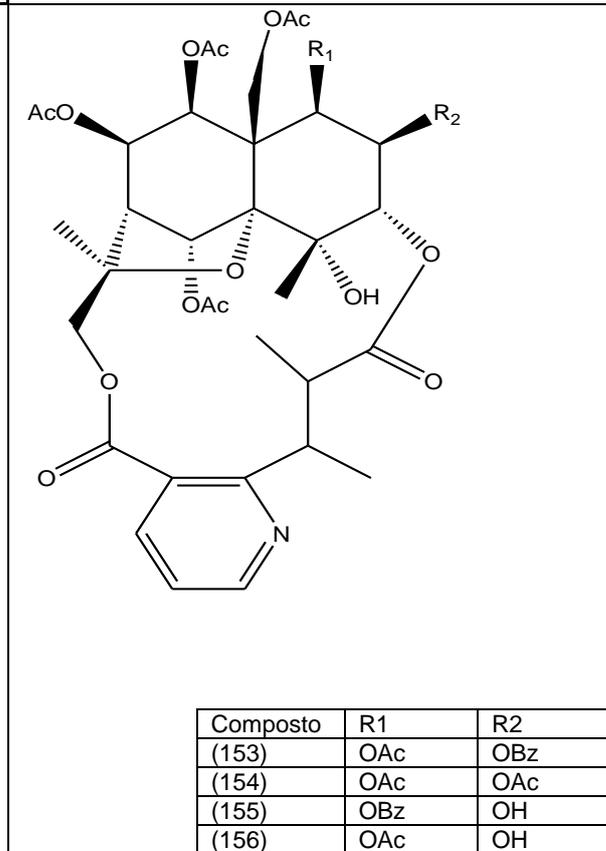
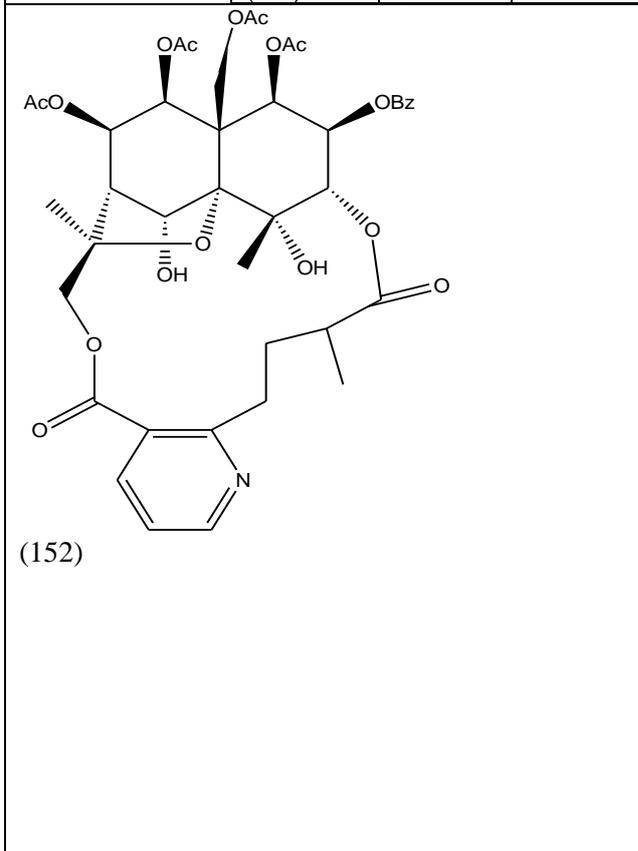
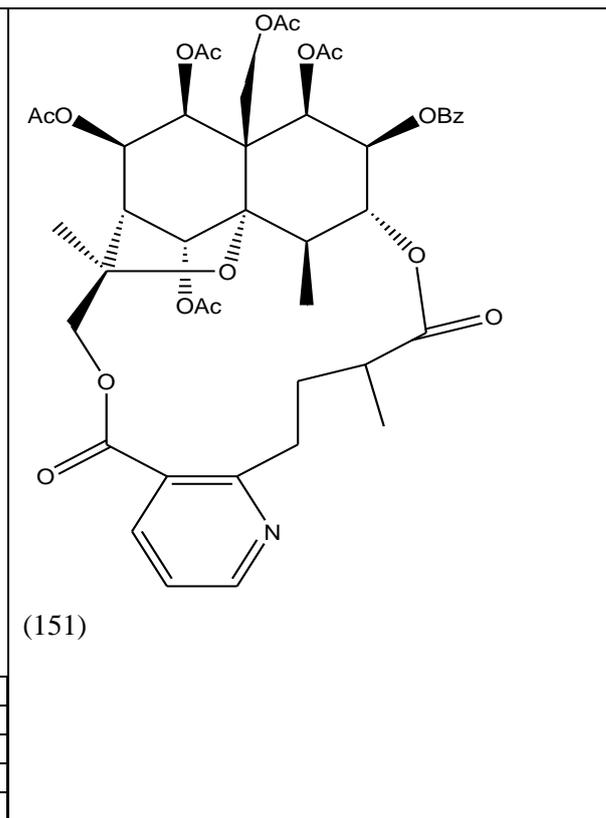
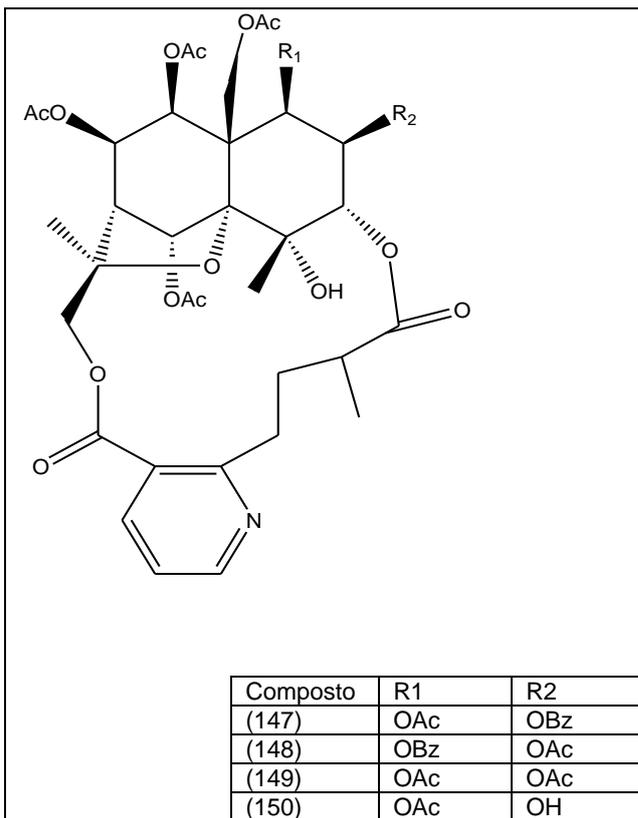












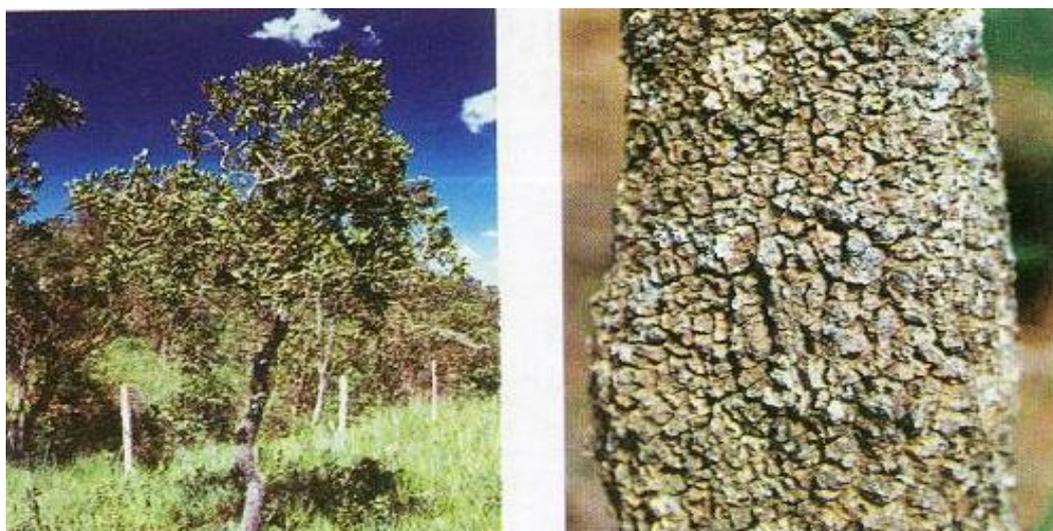
2.6 *Salacia crassifolia* (Mart. Ex Schult.) G. Don.

Salacia crassifolia (Mart. Ex Schult.) G. Don. (Celastraceae) possui frutos comestíveis conhecidos popularmente como bacupari do cerrado, cascudo e saputá. O habitat natural desta espécie são os campos e matas. A *S. crassifolia* é normalmente encontrada no DF e nos estados da BA, GO, MA, MG, MT, MS, PI e TO (JOLY, 2002; SILVA JUNIOR, 2005).

Salacia crassifolia é a espécie principal em Cerrado aberto, bem adaptada a longos períodos chuvosos intercalados por meses de forte seca, por possuir um sistema radicular bem desenvolvido (SANTOS, 2011).

É uma árvore de médio porte apresentando caule de diâmetro de até 17 cm (Fig. 2), flores de cinco pétalas de cor verde ou amareladas (Fig. 3) e frutos de até 5 cm de diâmetro estriados, alaranjados, com polpa carnosa de cor creme claro contendo de 1 a 3 sementes (Fig. 3). Suas folhas são simples, brilhantes na face superior ou com manchas escurecidas ou queimadas pela infestação do fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Fig. 4). O bacupari contém polpa saborosa, por isso é normalmente procurada por animais e pelo homem. Na medicina popular é utilizada como antibiótica e contra tumores. As folhas e ramos secos são usados em arranjos florais (SILVA JUNIOR, 2005).

Figura 2. Árvore de *Salacia crassifolia*.





Fonte: SILVA JUNIOR, 2005.

Figura 3. Flores e frutos de *Salacia crasifolia*



Fonte: SILVA JUNIOR, 2005.

Figura 4. Folhas de *Salacia crasifolia*



Fonte: SILVA JUNIOR, 2005.

Esta espécie é utilizada na Medicina popular no combate à tosse crônica, às doenças renais, dores de cabeça, úlceras, na cicatrização de feridas e contra Malária, no entanto existem poucos relatos sobre os constituintes desta planta seus possíveis benefícios e malefícios. Carneiro e colaboradores (2012) avaliaram a possível atividade mutagênica das frações acetato de etila, hidroalcoólica e hexânica da casca do caule de *Salacia crassifolia* frente à linhagem TA-100 de *Salmonella typhimurium* através do teste de Ames e não observou resultados positivos, bem como Flammang (2006) que também realizou o mesmo teste com extratos da raiz de *Salacia oblonga* Wall. ex Wight & Arn frente à linhagem *Salmonella typhimurium*, verificando a ausência de ação mutagênica também nesta espécie.

Existem também descrições de atividade antifúngica do extrato etanólico da casca do caule de *Salacia crassifolia* descrita por Theodoro (2009), este extrato apresentou atividade antifúngica frente a dois fungos: *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (ambos responsáveis por micoses cutâneas).

Em uma análise histoquímica realizada por Pereira e colaboradores (2010) constatou-se que as folhas de *S. crassifolia* podem conter compostos de interesse medicinal como óleos essenciais, lignina, flavonóides, taninos e alcalóides que podem estar relacionados com suas propriedades medicinais.

Com base em outra análise histoquímica realizada com a casca de duas espécies de *Salacia*, foi observado que tanto na *S. crassifolia* quanto na *S. elliptica*, há presença de flavonóides em grande quantidade na feloderme e no córtex destas espécies, terpenóides ocorrem no córtex da *S. crassifolia*, taninos são observados no córtex de ambas espécies e a presença de alcalóides foi evidenciada no córtex das duas espécies (PEREIRA et al., 2011).

Estudos também evidenciaram elevados níveis de compostos fenólicos na constituição química de algumas espécies de *Salacia*, inclusive em *S. crassifolia* (CARAMORI, 2004; YOSHIKAWA et al., 2002).

Diante de tão poucos relatos sobre a *S. crassifolia* e com base nos estudos acima citados, verifica-se a importância desta pesquisa no intuito de explorar alguns constituintes químicos que compõem esta espécie. A presença de compostos químicos já isolados bem como os indícios de atividade biológica apresentados por espécies desse gênero também ressaltam o valor deste estudo.

Capítulo 3
Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Realizar o estudo fitoquímico de *Salacia crassifolia* (Celastraceae) e avaliar o potencial citotóxico de seus extratos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e elucidar os principais constituintes químicos presentes na casca e folhas de *Salacia crassifolia*.
- b) Realizar ensaios de atividade citotóxica dos extratos das cascas e folhas de *Salacia crassifolia* frente às seguintes linhagens: SF-295(sistema nervoso central), OVCAR-8 (mama), HCT-116 (cólon) e MDA-MB-435 (melanoma).

Capítulo 4

Metodología Experimental

4. Metodologia Experimental

4.1 Materiais Cromatográficos

4.1.1 Cromatografia em coluna de vidro

- Sílica gel 60 (60-200 mesh) da Macherey-Nagel;
- Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da Macherey-Nagel;
- Sílica gel 60 (230-400 mesh) da Macherey-Nagel;
- Sílica gel 60 – camada delgada preparativa;
- Celulose microcristalina D

4.1.2 Cromatografia em camada delgada analítica

- Cromatoplaça de alumínio em sílica gel 60 (DC-Fertigfolien Alugram) Macherey-Nagel.

4.2 Solventes

Solventes Analíticos

- Diclorometano (CH_2Cl_2 P.A.) Neon;
- Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ P.A.) Neon;
- Metanol (CH_3OH 99,8%) Impex;
- Acetato de Etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 99,5%) Neon;

4.3 Reveladores

- Radiação na região do UV (254 e 360 nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico.

4.4 Material Botânico

A coleta da casca do caule e das folhas de *Salacia crassifolia* foi realizada no Campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis-GO, no dia 17 de janeiro de 2008 (coordenadas 16° 12' 49,2 ao sul e 48° 57' a 57 ao leste). Foram coletados 2143 g de casca e 3400g de folha, as quais foram identificadas pela Prof^a. Dr^a. Mirley Luciene dos Santos. A

exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (HUEG - 5910).

4.5 Obtenção dos extratos

Os materiais vegetais foram dessecados separadamente em estufa (MA035 – Marconi) com circulação de ar a 45°C durante 48 horas, em seguida foram pulverizados em moinho de facas modelo MA-580 e colocados em erlenmeyer de 2 litros para maceração com metanol. Os produtos das extrações foram concentrados em evaporador rotativo gerando extrato bruto metanólico das cascas e folhas. As massas dos extratos brutos metanólicos resultantes das extrações da casca (EBMC) e das folhas (EBMF) foram de 390g e 400 g, respectivamente.

4.6 Fracionamento dos extratos brutos

Uma parte do extrato obtido das folhas de *S. crassifolia* foi fracionada com uso de celulose (200 g) e a outra parte através de extração líquido-líquido (200 g).

O extrato metanólico das cascas e parte do extrato das folhas foram dissolvidos em solução de metanol:água (1:3), separadamente, e então fracionados através de partição líquido-líquido com solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo-se então as frações hexânica (ScCcM-H) (ScFM-H), diclorometânica (ScCcM-D) (ScFM-D), acetato de etila (ScCcM-A) (ScFM-A) e hidroalcoólica (ScCcM-W) (ScFM-W). A outra parte do extrato bruto metanólico das folhas foi fracionado por cromatografia em coluna ($\Phi = 5$ cm x h = 20 cm), utilizando-se celulose microcristalina D, como fase estacionária, e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtendo-se as frações: hexânica (ScFMc-H), diclorometânica (ScFMc-D), acetato de etila (ScFMc-A) e metanólica (ScFMc-M).

Todas as frações obtidas foram enviadas para testes de citotoxicidade; apenas as frações de acetato de etila provenientes das cascas e a fração acetato de etila e hexânica (partição líquido-líquido) das folhas foram utilizadas para novos fracionamentos, uma vez que apresentaram os maiores rendimentos. Nenhuma das frações provenientes da extração com celulose foram refracionadas.

As massas dos extratos brutos e das frações particionadas estão descritas nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela1. Massa das frações provenientes da partição líquido-líquido do extrato metanólico das cascas de *Salacia crassifolia*.

EBMC	Solvente	Massa obtida(g)	%	Código
	Hexano	4,7g	1,2%	ScCcM-H
EBMC	Diclorometano	0,4g	0,1%	ScCcM-D
390g	Acetato de Etila	26,8g	6,9%	ScCcM-A
	Hidroalcóolica	256,2g	65,7%	ScCcM-W
	Resíduo	98,3 g	25,2%	

Fonte: produzido pela autora.

Tabela 2. Massa das frações provenientes da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de *Salacia crassifolia*.

EBMF	Solvente	Massa obtida(g)	%	Código
	Hexano	19,9g	9,9%	ScFM-H
EBMF	Diclorometano	0,7g	0,35%	ScFM-D
200 g	Acetato de Etila	34,7g	17,35%	ScFM-A
	Hidroalcoólica	68,2g	34,1%	ScFM-W
	Resíduo	76,5 g	38,25%	

Fonte: produzido pela autora.

Tabela 3. Massa das frações provenientes da partição com celulose do extrato metanólico das folhas de *Salacia crassifolia*.

EBMF	Solvente	Massa obtida(g)	%	Código
	Hexano	8,8g	4,4%	SCFMc-H
EBMF	Diclorometano	5,6g	2,8%	SCFMc-D
200 g	Acetato de Etila	3,2g	1,6%	SCFMc-A
	Metanólica	67,4g	33,7%	SCFMc-M
	Resíduo	115 g	57,5%	

Fonte: produzido pela autora.

4.7 Metodologia dos ensaios Biológicos

Os testes citotóxicos foram realizados na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Oncologia Experimental sob orientação do Professor Dr. Manoel Odorico.

O teste citotóxico foi realizado pelo método do MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), um método rápido, sensível e barato, descrito primeiramente por Mosman (1983). Este teste analisa a viabilidade e o

estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

4.7.1 Preparo das frações vegetais para teste de citotoxicidade in vitro

Todas as frações foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO)P.A.. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL. Para determinação da CI50, as amostras foram testadas em concentrações crescentes.

4.7.2 Preparo das células para teste de citotoxicidade in vitro

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 utilizando suplementos com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. Foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.7.3 Ensaio de citotoxicidade in vitro

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará com as frações da casca e das folhas de *S. crassifolia*. As linhagens tumorais utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata. As amostras foram selecionadas de acordo com percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90% nas linhagens celulares utilizadas em MTT.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ céls./100µL (e na concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8), para células aderidas. As frações utilizadas no teste foram diluídas em DMSO P.A.. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL, em dose única, em seguida, foram incubadas por 72

horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Antes do término do período de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 200µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO P.A. em espectrofotômetro de placa a 550nm.

As frações obtidas dos extratos metanólicos tanto da casca quanto da folha de *S. crassifolia* tiveram suas citotoxicidades testadas frente às seguintes linhagens: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano), SF-295 (sistema nervoso central) e OVCAR-8 (mama).

4.7.4 Análise Estatística

Nos experimentos de MTT para as frações das cascas e folhas os resultados foram analisados de acordo com suas médias e respectivos desvio-padrão no programa GraphPad Prism. Os resultados dos testes com as frações das cascas foram também avaliados estatisticamente aplicando ANOVA a 95% de limite de confiança ($p < 0,05$). A diferença mínima significativa entre as amostras foi determinada pelo teste de *Tukey* com nível de significância de 0,05. A estatística foi obtida por meio do programa *Software R* versão 2.15.2 for Windows (2012).

4.8 Isolamento das substâncias

4.8.1 Extrato metanólico das folhas (Partição líquido-líquido)

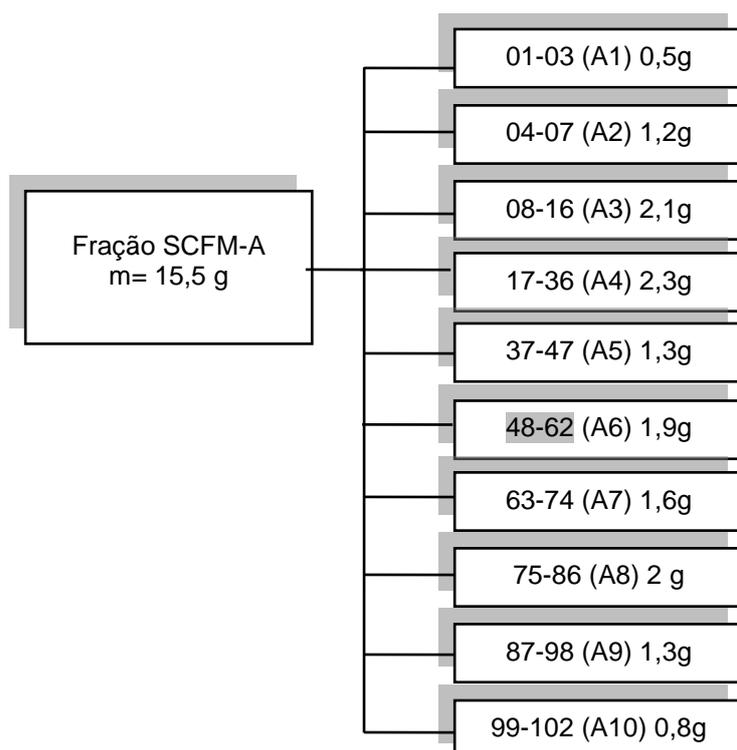
4.8.1.1 Obtenção das frações (18-19) D4 e (28-32) D6 (fração acetato de etila)

A fração de acetato de etila (ScFM-A) (15g) foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro (h=29,5 cm e $\Phi = 5$ cm) utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária e como fase móvel o sistema de solventes diclorometano/metanol 2% com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade. Neste fracionamento foram obtidos 102 frascos dos quais, de acordo

com a semelhança nos valores do fator de retenção (R_f), apresentados na análise de CCD, foram reunidos em 10 frações. A fração A6 foi submetida novamente a um fracionamento.

Fluxograma 1

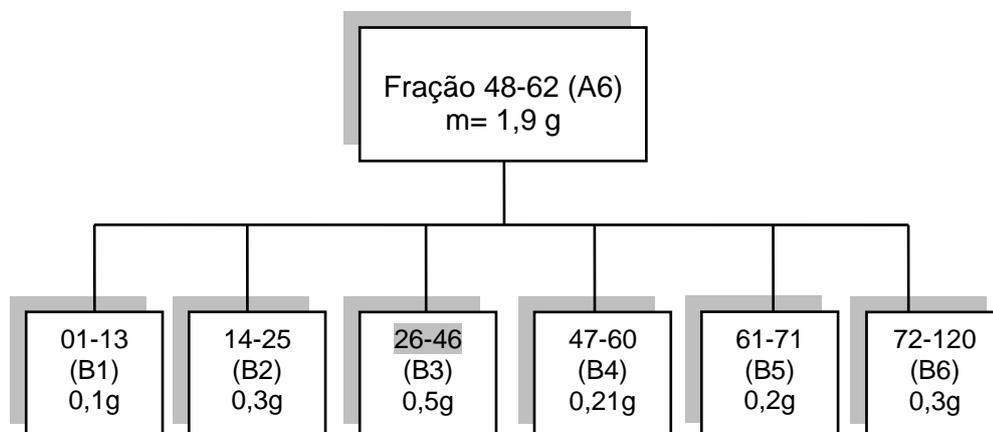
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração acetato de etila (folhas)



Para o fracionamento de A6 foi utilizado coluna cromatográfica ($h= 22$ cm e $\Phi= 5$ cm) com sílica gel 60 (60-200 mesh) como fase estacionária e diclorometano/metanol 10% (com gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade) como fase móvel. Foram obtidos 120 frascos reunidos, através da semelhança nos valores do fator de retenção (R_f), apresentados na análise de CCD, em 6 frações, das quais a B3 foi submetida novamente a um fracionamento .

Fluxograma 2

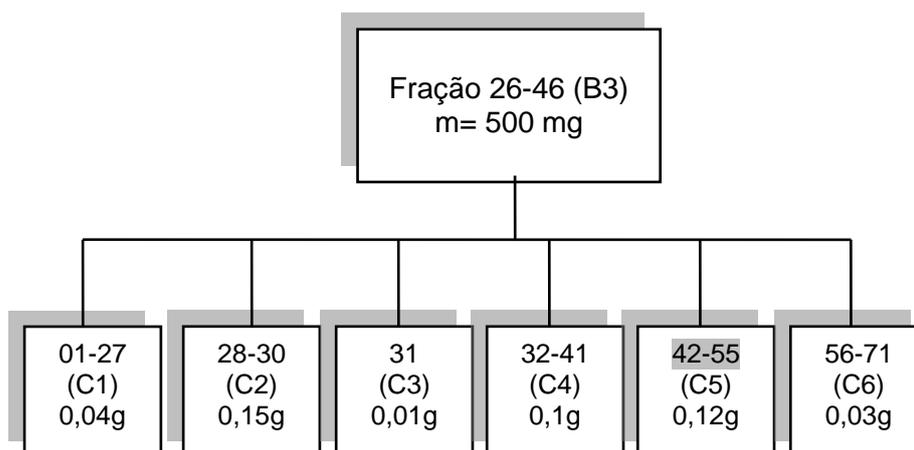
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração A6



No fracionamento da amostra B3 foi utilizada CC ($h= 20$ cm e $\Phi= 3$ cm); a fase estacionária foi sílica gel 60 (70-230 mesh) e a fase móvel o esquema de solventes diclorometano/metanol 1% com aumento do gradiente de polaridade. Obteve-se, então, 71 frascos que através de análise comparativa por CCD foram reunidos em 6 frações.

Fluxograma 3

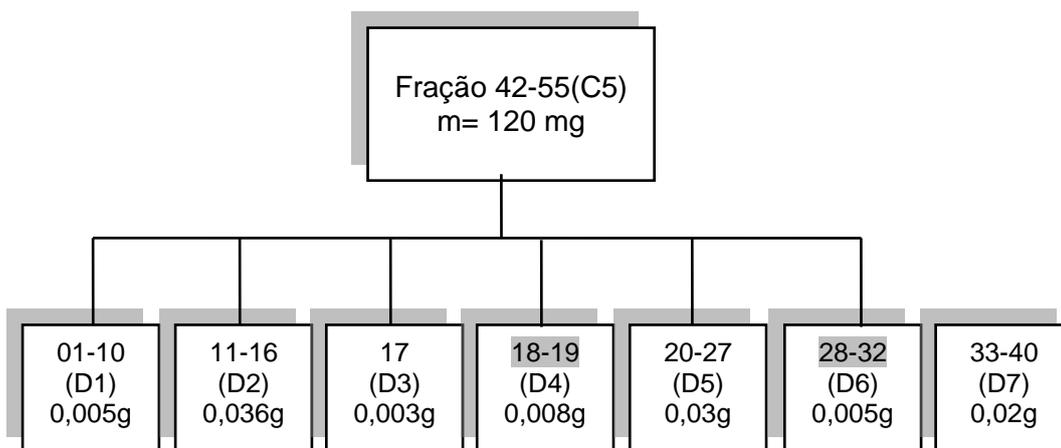
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração B3



A fração C5 foi submetida a CC ($h=18,5$ cm e $\Phi= 2,5$ cm) utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh) e diclorometano/metanol 1% (com aumento do gradiente de polaridade) como fase móvel. Foram obtidos 40 frascos reunidos em 6 frações através de análise comparativa por CCD. As frações D4 e D6

foram caracterizadas como epicatequina e catequina respectivamente; ambas foram identificadas posteriormente através de análises espectroscópicas.

Fluxograma 4
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração C5

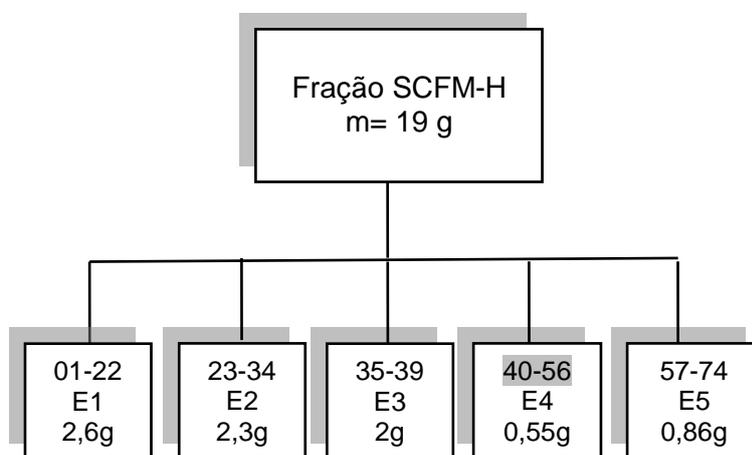


4.8.1.2 Obtenção da fração G2 (fração hexânica)

A fração hexânica (SCFM-H) (19g) foi fracionada através de cromatografia em coluna de vidro ($h = 25$ cm e $\Phi = 5$ cm) tendo como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh), e fase móvel o sistema de solvente hexano/acetato de etila 2% aumentando gradativamente a polaridade. Foram obtidos 74 frascos dos quais foram reunidos através de análise comparativa por CCD, em 5 frações.

Fluxograma 5

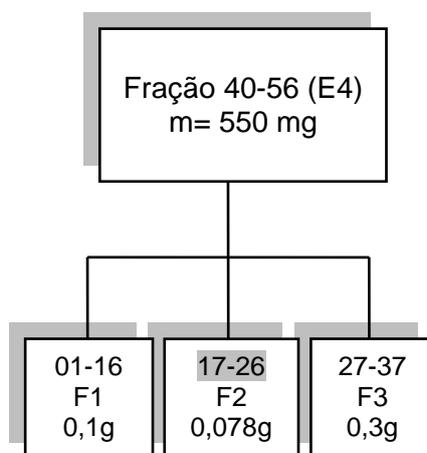
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração SCFM-H



A fração E4 foi submetida a um novo fracionamento por adsorção em coluna de vidro (h=18 cm e $\Phi= 2,5$ cm) onde foi usada como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh) e como fase móvel o sistema de solventes hexano/acetato de etila 2% aumentando o gradiente de polaridade. Deste fracionamento foram obtidos 37 frascos reunidos por semelhança em CCD, em 3 frações.

Fluxograma 6

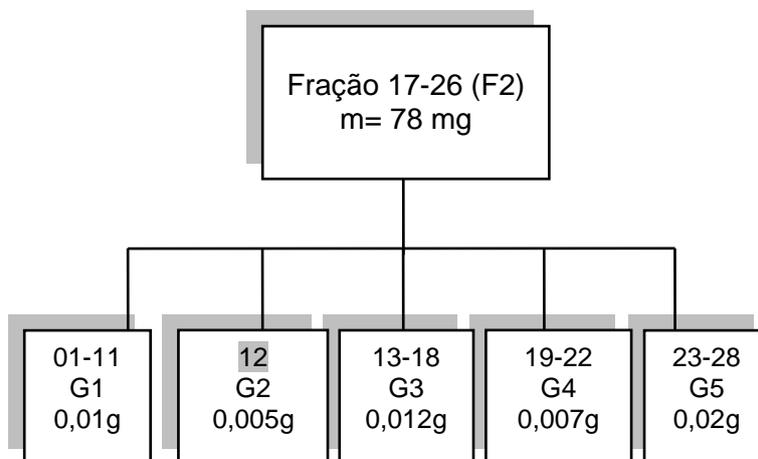
Fluxograma da coluna cromatográfica da fração E4



A fração F2 foi fracionada através de CC (h=18 cm e $\Phi= 2,5$ cm), tendo como fase estacionária sílica-gel 60 (70-230 mesh) e como fase móvel o sistema de solventes hexano/acetato de etila 2% aumentando o gradiente de polaridade. Deste fracionamento foram obtidos 28 frascos reunidos através de análise comparativa por CCD, em 5 frações.

Fluxograma 7

Fluxograma da coluna cromatográfica da fração F2



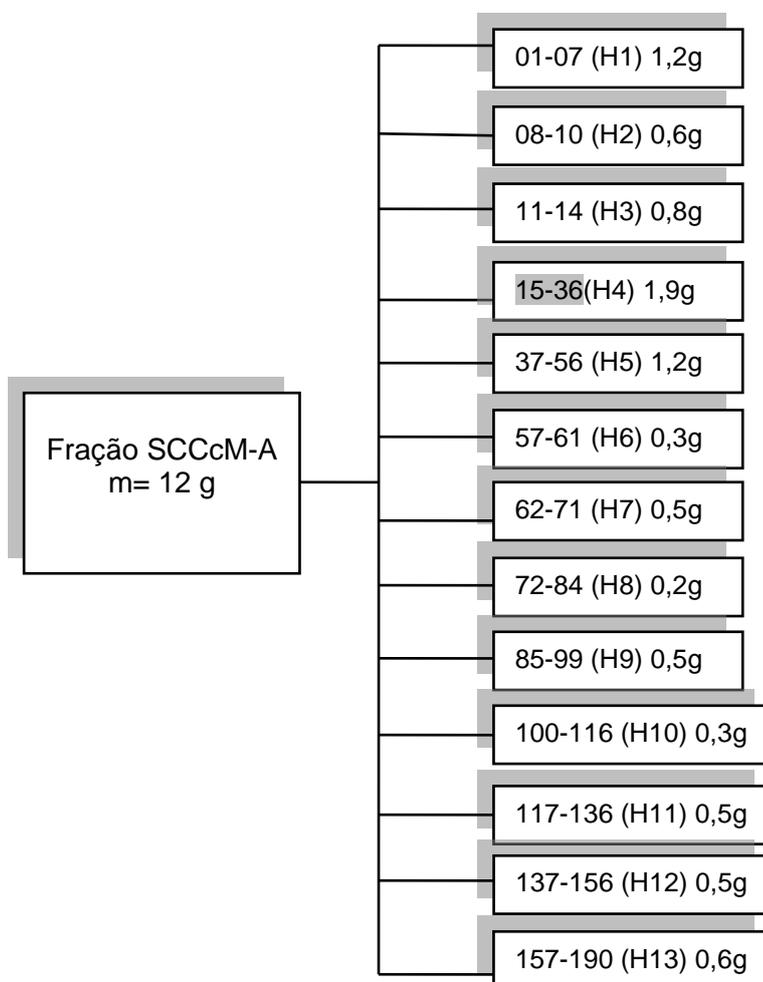
A fração G2 foi caracterizada como uma mistura de triterpenos, identificados posteriormente através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

4.8.2 Extrato metanólico das cascas

Foram fracionados 12g do extrato de acetato de etila (SCCcM-A) através de cromatografia em coluna de vidro ($\Phi= 5$ cm e $h= 14$ cm). Fase estacionária utilizada: sílica gel 60(70-230 mesh), fase móvel: sistema de solvente hexano/acetato de etila 7%, aumentando-se gradativamente a polaridade. As frações obtidas nesta coluna foram submetidas a outros fracionamentos até chegar às substâncias purificadas.

Fluxograma 8

Fluxograma da coluna cromatográfica da fração de acetato de etila (cascas).

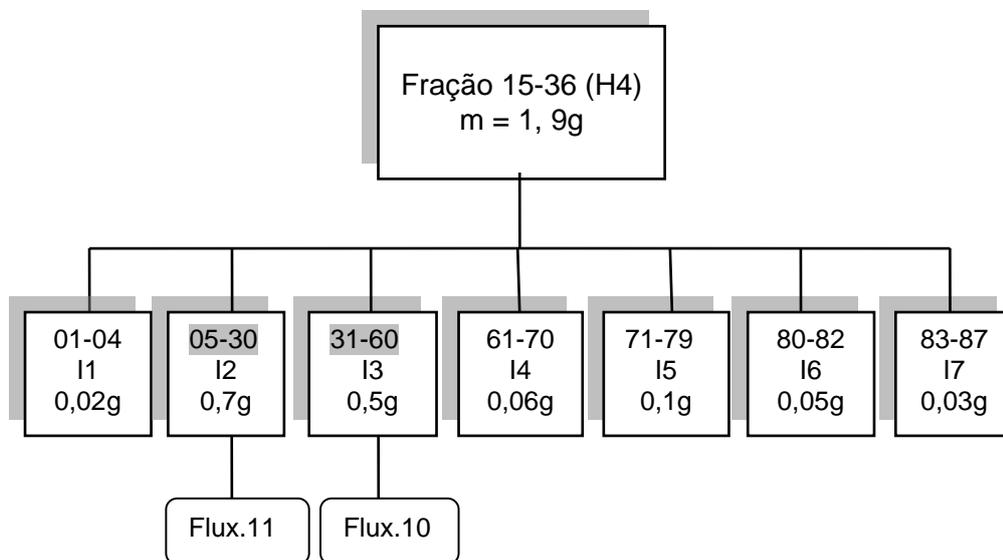


4.8.2.1 Obtenção da fração J3

A partir da fração H4 obtida na primeira coluna esquematizada no fluxograma 8 (fração do extrato acetato de etila) realizou-se mais 3 partições em coluna cromatográfica até chegar à substância isolada. A fração H4 foi fracionada através de coluna cromatográfica ($h = 28,5$ cm e $\Phi = 2,5$ cm) usando como fase estacionária sílica gel 60 (70-230 mesh) e como fase móvel o sistema de solventes diclorometano/metanol 0,5% aumentando-se o gradiente de polaridade. A massa obtida da amostra H4 foi de 1,9 g. Neste fracionamento foram obtidos 87 frascos, reunidos posteriormente em 7 frações através de análise comparativa de CCD.

Fluxograma 9

Fluxograma da coluna cromatográfica da fração H4

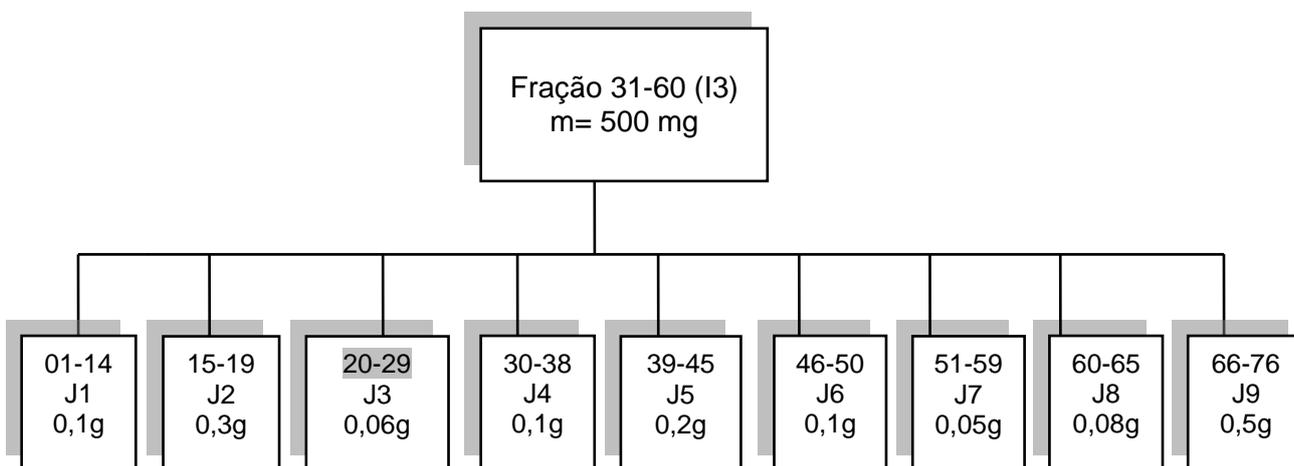


Das 7 frações adquiridas utilizou-se a I3 de massa 500,8 mg. Esta foi fracionada em coluna cromatográfica ($h = 16,5$ cm e $\Phi = 2,5$ cm) tendo como fase estacionária sílica gel 60 (230-400 mesh) e fase móvel o sistema de solventes diclorometano/metanol 0,1% aumentando-se o gradiente de polaridade, resultando

assim na obtenção de 76 frascos reunidos, através de análise comparativa por CCD, em 9 frações.

Fluxograma 10

Fluxograma da coluna cromatográfica da fração I3.



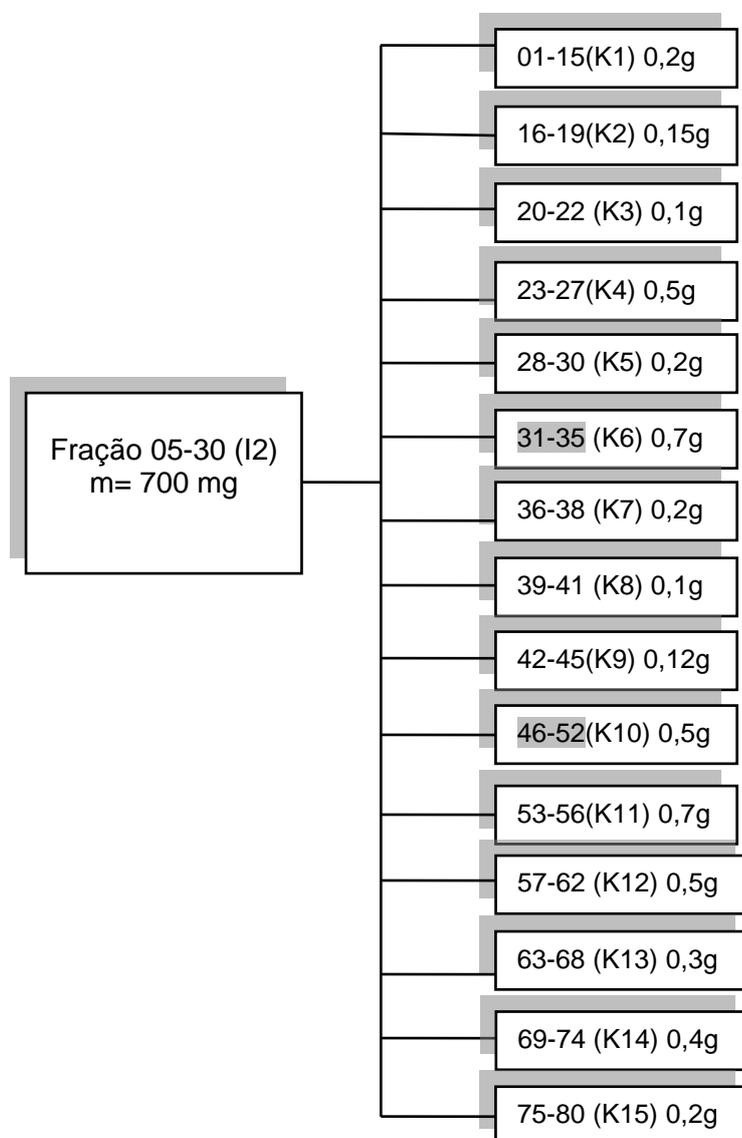
A fração J3 foi caracterizada como uma mistura de esteróides identificados posteriormente através da análise de IV, RMN de¹H e CG/EM.

4.8.2.2 Obtenção da fração 31-35-1 (K6.1) e 46-52-1 (K10.1)

A fração F2 (05-30), de massa aproximada de 700 mg, foi refracionada via cromatografia em coluna (h= 18 cm e Φ = 2,5 cm) onde a fase estacionária utilizada foi sílica gel 60(70-230 mesh) e como fase móvel o sistema de solventes hexano/acetato de etila 2% (com aumento gradativo da polaridade). Foram obtidos 84 frascos, reunidos através de análise comparativa por CCD, em 14 frações.

Fluxograma 11

Fluxograma da coluna cromatográfica da fração de extrato de acetato de etila.



As frações 31-35 (K6) e 46-52 (k10), com massa aproximada de 70 mg e 56 mg respectivamente, foram submetidas à CCDP (sílica gel 1mm, hexano/acetato de etila 10%). Em ambas as frações verificou-se a presença de triterpenos. Através da CCDP da fração K6 foi isolada e identificada a presença do lupeol (K6.1), já na CCDP da fração K10 obteve-se uma mistura dos esteróides (K10.1) estigmasterol e β -sitosterol juntamente com lupeol.

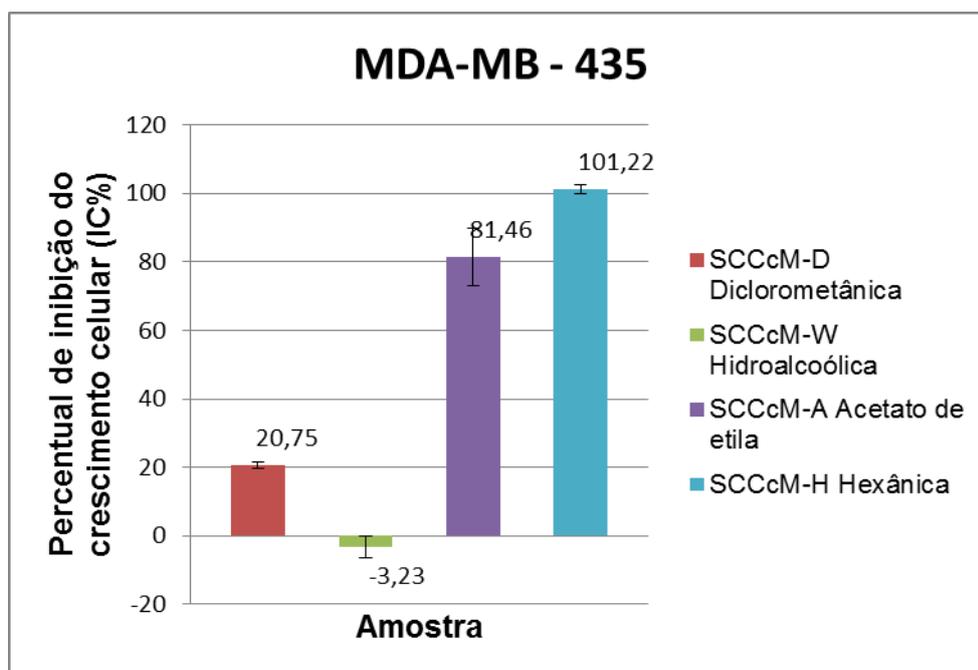
Capítulo 5
Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1 Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico da casca de *Salacia crassifolia* (SCCcM).

As atividades citotóxicas das frações SCCcM-H, SCCcM-D, SCCcM-A e SCCcM-W frente à linhagem MDA-MB-435 (melanoma) estão ilustradas na Figura 5 com suas respectivas porcentagens de inibição celular e desvio padrão.

Figura 5. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das cascas frente à célula tumoral MDA-MB-435



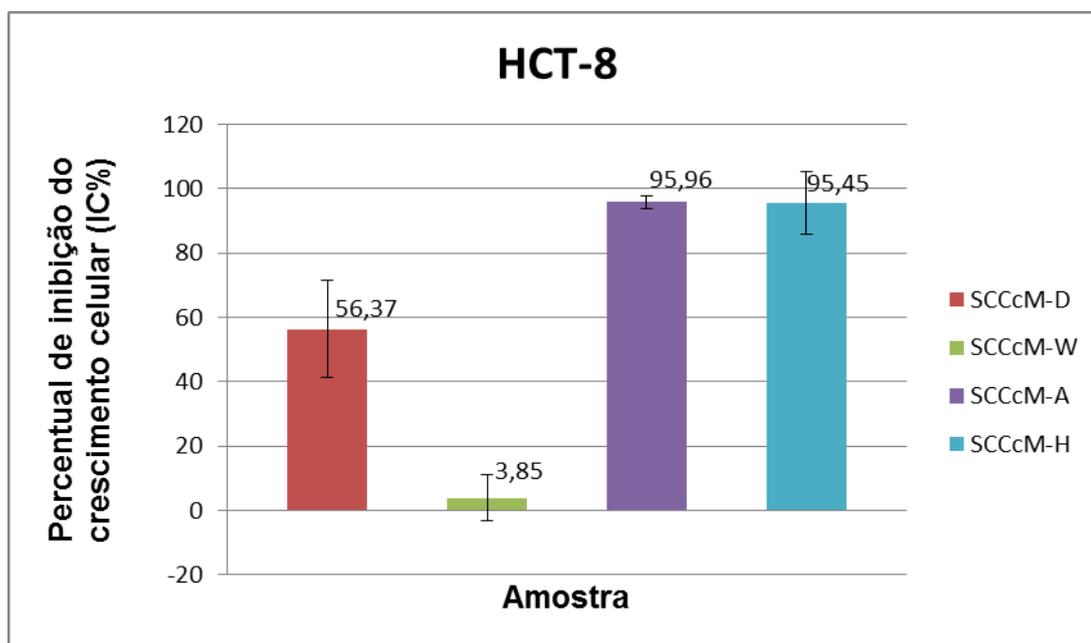
Fonte: produzido pela autora.

Algumas das frações testadas destacam-se por seus percentuais de inibição do crescimento tumoral maior que 90% frente à célula MDA-MB-435 (melanoma) utilizada em MTT, tendo em vista que apenas as frações que apresentarem resultados acima deste valor (90%) são consideradas como inibidores celulares. Com isso, a fração de SCCcM-H, com percentual de inibição de 101,22%, demonstrou perfil citotóxico promissor. As frações SCCcM-A (81,46%) e SCCcM-D

(20,75%) não apresentaram valores correspondentes a inibição no crescimento celular, uma vez que os resultados estão abaixo de 90%; a fração SCCcM-W (-3,23%) ao contrário, levou a proliferação celular.

Já a Figura 6 ilustra o percentual de citotoxicidade e desvio padrão dessas frações frente à linhagem HCT-8 (cólون-humano).

Figura 6. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das cascas frente à célula tumoral HCT-8

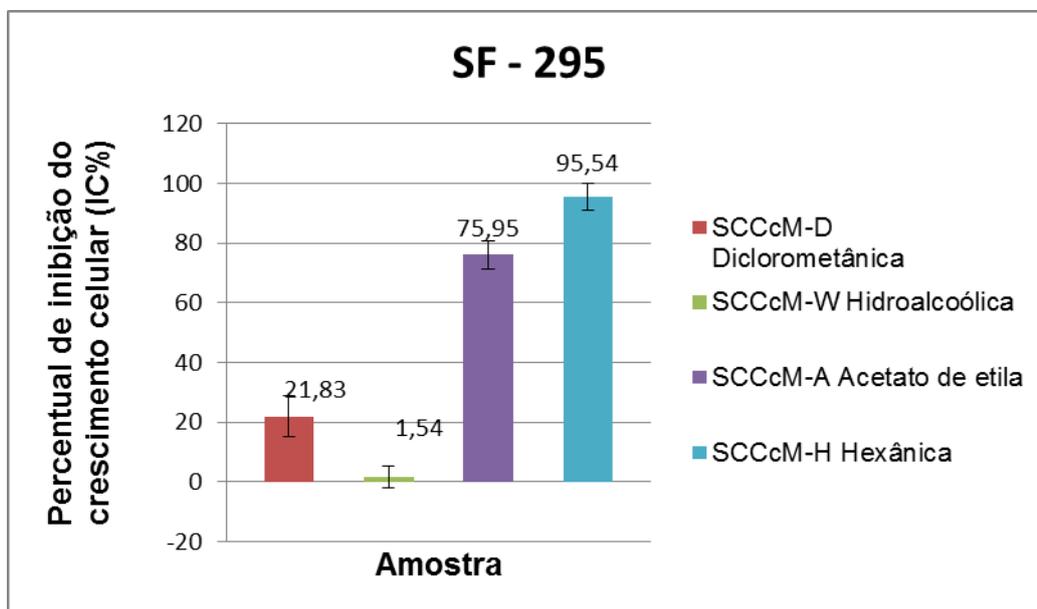


Fonte: produzido pela autora.

Das frações do extrato das cascas de *S. crassifolia* testadas frente à linhagem celular de HCT-8 destacam-se a SCCcM-H com 95,45% e SCCcM-A com 95,96%, portanto apresentam potencial para inibição celular. As frações de SCCcM-D (56,37%) e SCCcM-W (3,85%) não apresentaram valores correspondentes a inibição no crescimento celular, já que os resultados foram abaixo de 90%.

A Figura 7 ilustra o percentual de citotoxicidade e desvio padrão dessas frações frente à linhagem SF-295 (sistema nervoso central).

Figura 7. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das cascas frente à célula tumoral SF-295



Fonte: produzido pela autora.

A fração de SCCcM-H demonstrou potencial citotóxico promissor, com valor percentual de 95,54%. As frações de SCCcM-A (75,95%), SCCcM-D (21,83%) e SCCcM-W (1,54%) não apresentaram resultados favoráveis de inibição celular, pois resultaram em valores abaixo de 90%.

Portanto, diante dos resultados, as frações hexânica (SCCcM-H) e acetato de etila (SCCcM-A) apresentaram alto potencial de inibição do crescimento das células tumorais testadas em método MTT.

5.1.1 Análise Estatística dos dados obtidos no teste com as cascas de *S. crassifolia*

A comparação entre médias dos tratamentos foi feita através do Teste de *Tukey*, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4. Comparação entre médias dos tratamentos realizados com as frações da casca de *S. crassifolia*.

Células	Amostra			
	SCCcM-A	SCCcM-D	SCCcM-W	SCCcM-H
MDA-435*	81,46 ± 8,55 ^a	20,75 ± 12,39 ^b	3,23 ± 3,07 ^b	101,22 ± 1,15 ^a
HCT-8	95,96 ± 2,02 ^a	56,37 ± 15,01 ^b	3,85 ± 7,09 ^c	95,45 ± 9,77 ^a
SF-295	75,95 ± 4,65 ^a	21,83 ± 6,78 ^b	1,54 ± 3,72 ^c	95,54 ± 4,45 ^d

*Média ± desvio padrão. Valores com letra diferente sobrescrita na mesma linha apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de *Tukey*

A Tabela 4 mostra as médias percentuais obtidas no teste citotóxico para as quatro frações do extrato metanólico das cascas e os resultados da análise estatística com teste de *Tukey*.

A análise da Tabela 4 mostra que, em relação à linhagem celular MDA-MB-435, a fração de SCCcM-A apresentou semelhança à fração SCCcM-H, que por sua vez diferiu significativamente ($p > 0,05$) das frações SCCcM-D e SCCcM-W (ambas semelhantes entre si). Além disso, observou-se que as frações SCCcM-H e SCCcM-A apresentaram valores percentuais de inibição celular mais elevados. As frações SCCcM-D e SCCcM-W diferiram significativamente das demais apresentando valores percentuais de inibição celular muito baixos, não sendo considerados com potencial para inibição.

As frações de SCCcM-A e SCCcM-H não diferiram ($p > 0,05$) significativamente em relação a linhagem celular HCT-8, apresentando percentuais de inibição celular acima de 90%. As frações SCCcM-D e SCCcM-W apresentaram diferença significativa das demais obtendo valores percentuais abaixo do considerado para inibição celular. Ambas diferiram significativamente entre si também, uma vez que o valor percentual de inibição celular da fração SCCcM-W é muito inferior ao da fração SCCcM-D.

Com relação à linhagem celular de SF-295 houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre todas as frações testadas. A fração SCCcM-H, frente a esta linhagem, obteve percentual de inibição celular acima de 90%, confirmando seu potencial inibidor. As demais frações não obtiveram valores percentuais correspondentes a inibição celular frente a esta célula, no entanto, através do teste *Tukey* (ao nível de 5% de probabilidade), estas frações diferem significativamente entre si, já que a fração SCCcM-A obteve percentual inibidor relativamente alto de 75,9%, mas que não caracteriza inibição celular. A fração SCCcM-D apresentou percentual de médio a baixo com 21,83% e a fração SCCcM-W, com valor muito baixo de 1,54%. Portanto mesmo diferindo significativamente ($p > 0,05$) entre si devido a diferença entre os valores percentuais de inibição, nenhuma destas 3 frações apresenta potencial inibidor para esta linhagem.

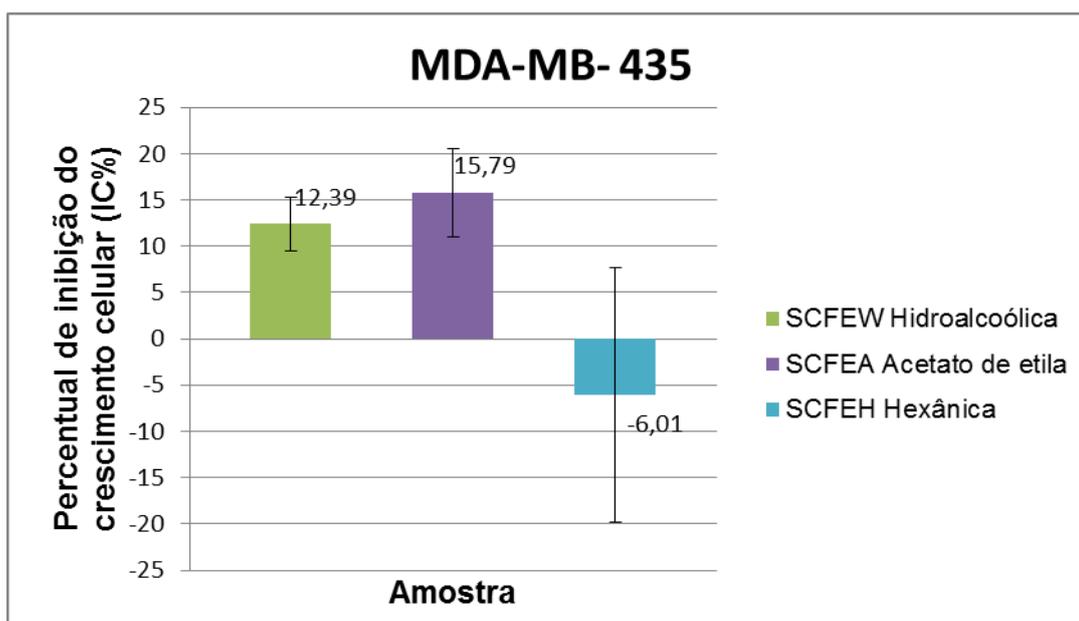
5.2 Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico das folhas de *Salacia crassifolia* (SCFM) (extração líquido-líquido).

As atividades citotóxicas das frações SCFM-H, SCFM-A e SCFM-W frente à linhagem MDA-435 (melanoma) estão ilustradas na Figura 8 com suas respectivas porcentagens de inibição celular e desvio padrão.

A fração diclorometânica obtida da partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de *S. crassifolia* (SCFM-D) não foi testada na inibição da atividade das células cancerígenas selecionadas para estudo, pois a quantidade de massa obtida não permitia a realização do experimento.

Nenhuma das três frações testadas frente à célula MDA-MB-435 (melanoma) utilizando método MTT apresentaram valores correspondentes à inibição do crescimento celular, já que os resultados foram abaixo de 90%. O maior valor percentual obtido foi da fração SCFM-A com 15,79%, não sendo considerado como atividade positiva.

Figura 8. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral MDA-MB-435

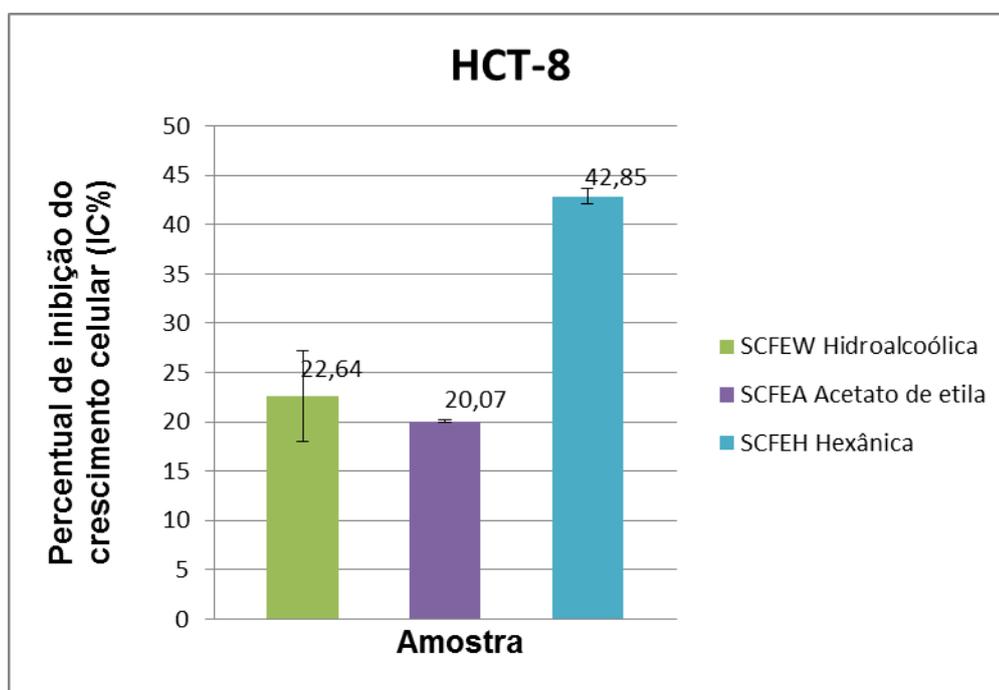


Fonte: produzido pela autora.

A Figura 9 ilustra o percentual de citotoxicidade e desvio padrão dessas frações frente à linhagem HCT-8 (cólون-humano).

Das frações do extrato metanólico das folhas de *S. crassifolia* testadas frente à linhagem celular de HCT-8 não houve valores percentuais correspondentes à inibição celular. Frente à célula HCT-8 utilizando método MTT a fração que obteve valor percentual mais elevado foi a SCFM-H com 42,85%, valor esse que não corresponde à inibição celular por estar abaixo de 90%.

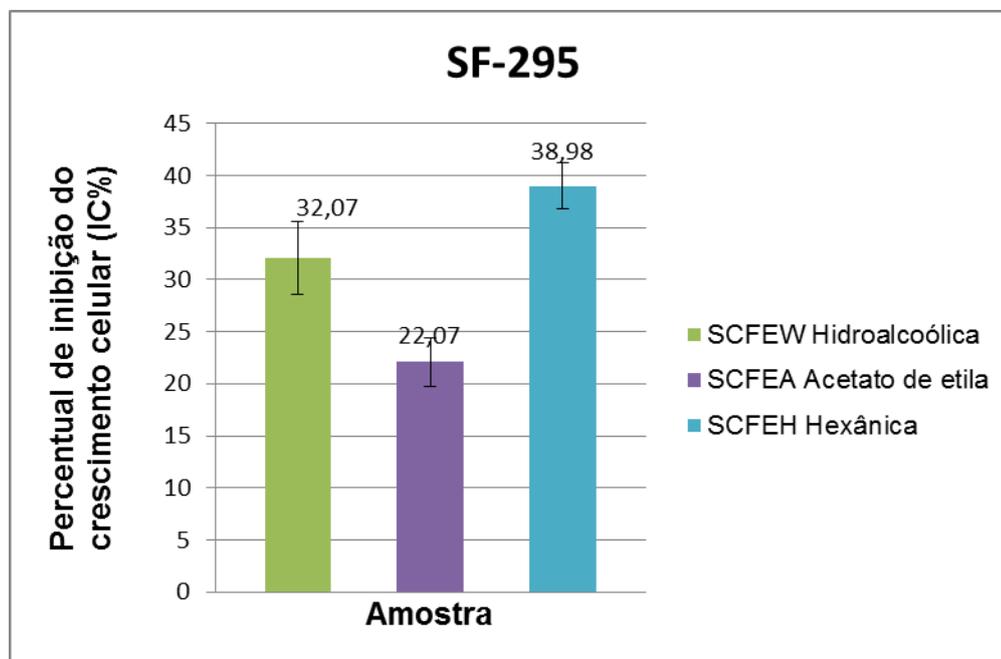
Figura 9. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral HCT-8



Fonte: produzido pela autora.

Diante dos resultados para a linhagem SF-295 observa-se que não houve nenhum efeito citotóxico significativo, já que o maior valor percentual de inibição celular SCFM-H com 38,98%, não sendo considerado como atividade positiva.

Figura 10. Percentual de citotoxicidade *in vitro* das frações provenientes das folhas frente à célula tumoral SF-295



Fonte: produzido pela autora.

O processo de fracionamento do extrato bruto pode estar ligado à diminuição da atividade citotóxica das frações. Este é um indicativo de que efeitos de sinergia podem estar ocorrendo quando do ensaio do extrato bruto, os quais são interrompidos quando o extrato sofre fracionamento cromatográfico (HOUGHTON et al., 1996).

Através dos testes realizados *in vitro* para se verificar o possível potencial citotóxico das frações das folhas de *S. crassifolia*, os resultados apresentados das diferentes frações e tipos de células cancerígenas demonstraram ter baixa atividade citotóxica frente aos modelos experimentais utilizados.

5.3 Ensaio de citotoxicidade com as frações do extrato metanólico das folhas de *Salacia crassifolia* (SCFMc) (extração com celulose).

Tabela 5. Médias percentuais e desvio padrão do teste de citotoxicidade frente às frações do extrato metanólico (extração com celulose) das folhas de *S. crassifolia*

Nº	Amostra	HCT-8	%	SF-295	%	OVCAR-8	%
	Identificação	Média %	SD	Média %	SD	Média %	SD
1	EBMF	7,65	8,9	27,93	4,35	6,72	2,64
2	SCFMc-H	>50	-	12,42	7,34	12,22	3,57
3	SCFMc-M	95,68	0,70	66,41	0,09	97,73	0,36
4	SCFMc-D	23,64	2,7	>50	-	27,83	1,93
5	SCFMc-A	>50	-	>50	-	17,68	2,29

EBMF= extrato bruto metanólico das folhas de *S. crassifolia*/ SCFMc-H= fração hexânica das folhas de *S. crassifolia*/ SCFMc-M= fração metanólica das folhas de *S. crassifolia*/ SCFMc-D= fração diclorometânica das folhas de *S. crassifolia*/ SCFMc-A= fração acetato de etila das folhas de *S. crassifolia*.

Os valores percentuais médios de citotoxicidade das frações provenientes do extrato metanólico das folhas (extração com celulose) e seus respectivos desvio-padrão estão apresentados na Tabela 5.

Como se pode ver o extrato bruto metanólico das folhas (EBMF) de *Salacia crassifolia* não apresentou potencial de inibição celular frente a nenhuma das células testadas já que os valores percentuais para inibição celular foram todos abaixo de 90%. A maior média percentual foi frente à célula SF-295 (27,93%), no entanto o valor é muito baixo e não apresenta nenhum efeito citotóxico significativo, não sendo considerado como atividade positiva.

As frações de hexano, diclorometano e acetato de etila também não apresentaram potencial de inibição celular frente a nenhuma das células testadas já que os valores percentuais para inibição celular foram todos abaixo de 90%. Os percentuais de inibição celular mais elevados foram 12,42% (SCFMc-H frente à célula SF-295), 27,83% (SCFMc-D), e 17,68% (SCFMc-A) ambos frente à célula OVCAR-8.

A fração metanólica (SCFMc-M) da folha de *Salacia crassifolia* apresentou atividade citotóxica moderada frente à célula SF-295 e atividade citotóxica elevada frente às linhagens HCT-8 e OVCAR-8 com 95,68% e 97,73% respectivamente.

Portanto, os resultados promissores das frações hexano e acetato das cascas e da fração metanólica das folhas podem estar associados à presença de determinadas substâncias em sua constituição. Em particular, a atividade das frações contra o carcinoma de cólon humano pode ser comparada e confirmada por testes realizados por outros autores, como Sowong e colaboradores (2011), que citam um friedelano isolado de *Salacia verrucosa* que foi testado frente a cinco linhas de células de cancro humano, utilizando o método de MTT apresentando forte atividade inibitória contra linhagem de cólon-humano. Sabendo que a família Celastraceae é rica em triterpenos deste tipo, pode-se associar a forte atividade inibitória das frações SCCcM-H e SCCcM-A frente à HCT-8 (cólon-humano) a este fato.

De acordo com outras literaturas as espécies da família Celastraceae apresentam forte atividade citotóxica contra diversas células; como exemplo disso Magalhães (2012) descreve a substância 16 β -hidroxipristimerina, isolada de *Maytenus* (Celastraceae), apresentando acentuada atividade citotóxica frente a linhagem de carcinoma de colo de útero humano.

Diante dos resultados percebe-se que as frações provenientes das cascas apresentaram melhores percentuais de inibição comparado com os extratos das folhas, isso pode estar associado ao fato de que a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes da planta (CECHINEL FILHO et al., 1998).

5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas de *Salacia crassifolia*

5.4.1 Identificação dos esteróides (J3) isolados do extrato SCCcM-A (casca)

Esta substância foi obtida na forma de um sólido branco amorfo de massa 6 mg. Foi isolada a partir do extrato de acetato de etila das cascas de *Salacia crassifolia* (SCCcM-A). Sua identificação se deu pelas análises de IV, RMN ^1H e CG/EM.

O espectro de RMN ^1H desta substância apresenta sinais entre δ 0,68 - δ 2,30 (Fig. 11) referentes aos hidrogênios ligados a carbonos metílicos, metilênicos e metínicos característico de esqueleto esteroidal.

Figura 11. Espectro de RMN ^1H da mistura de esteróides J3, CDCl_3 , 500MHz

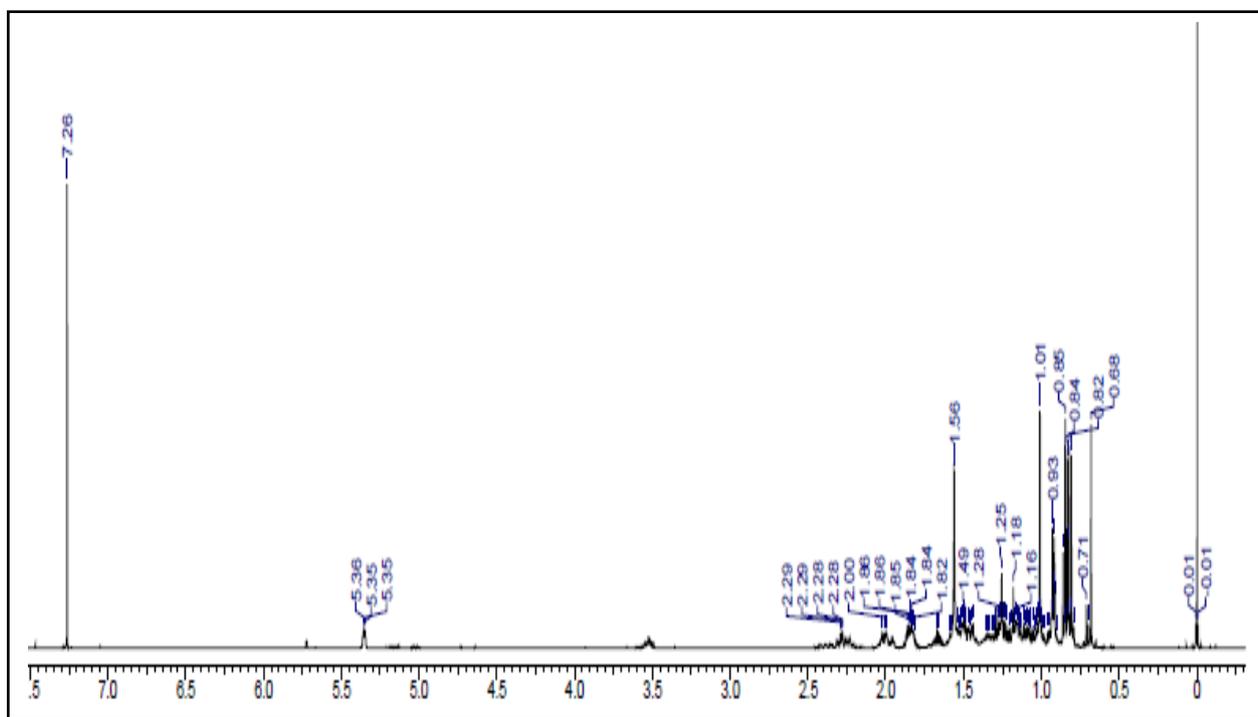
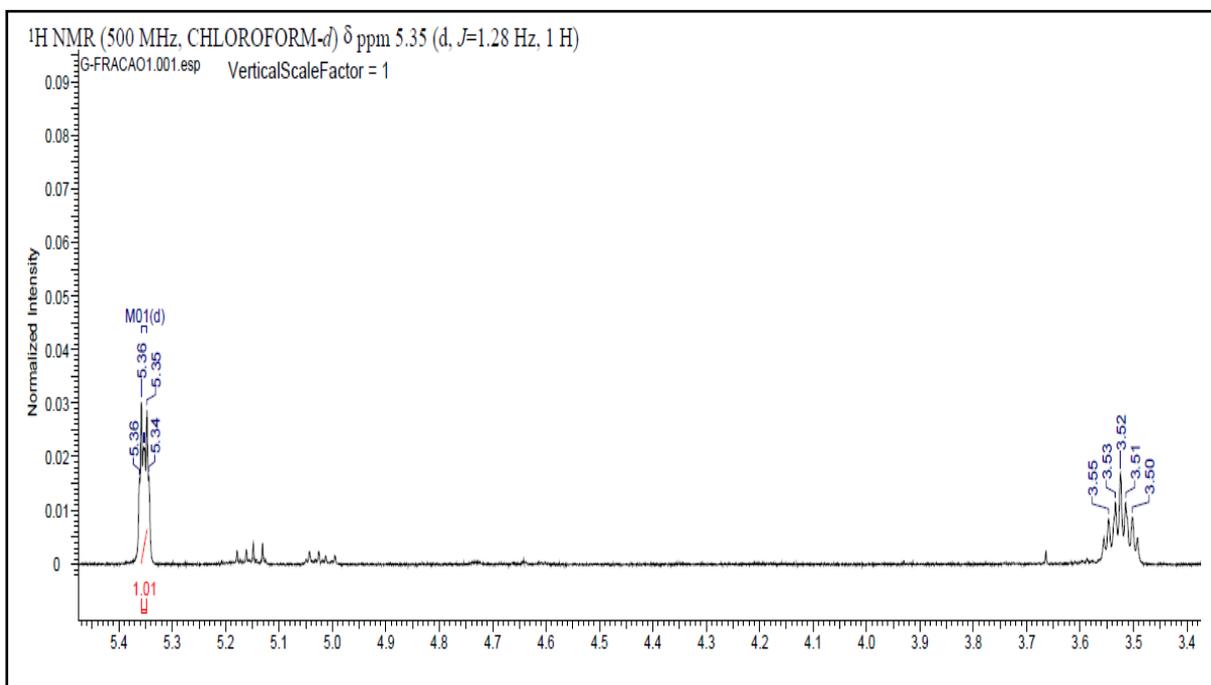
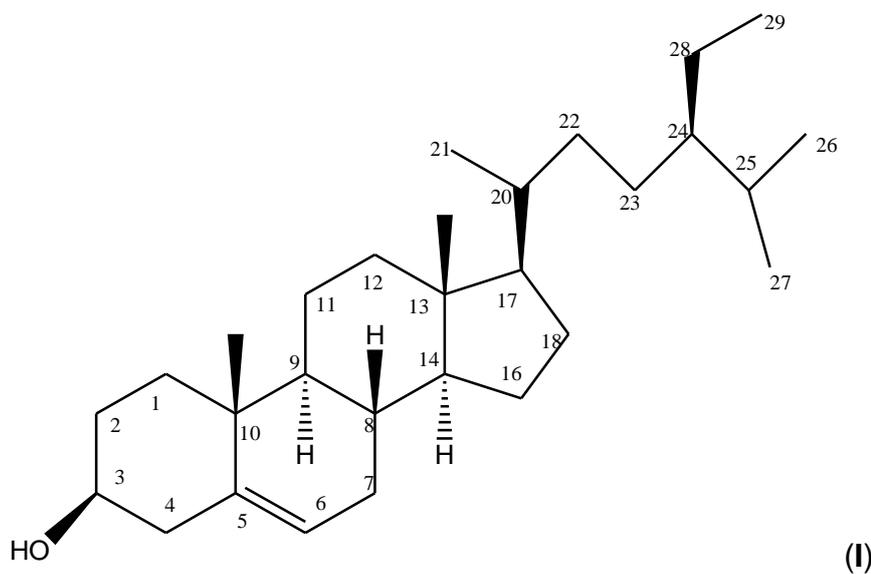


Figura 12. Expansão da região de δ 3,4 a 5,4 ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de esteróides J3, CDCl_3 , 500MHz

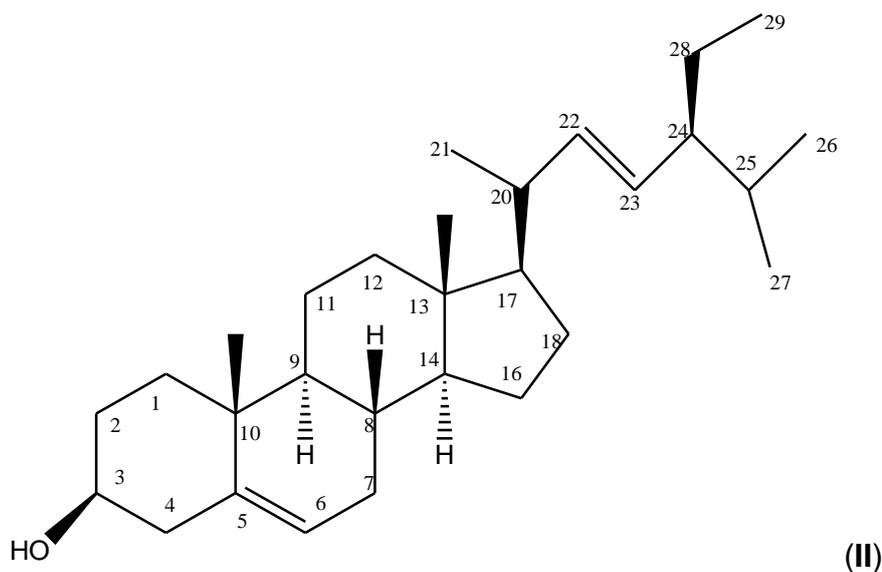


O duplete largo na região de δ 5,34 (Fig. 12) corresponde ao sinal do hidrogênio olefínico ligado ao carbono 6; o multiplete em δ 3,52 (Fig. 12) corresponde ao sinal do hidrogênio ligado ao carbono 3. Estes sinais são característicos de β -sitosterol (I).



(I)

O estigmasterol (II) pode ser evidenciado pela presença de sinais próximos a 5,01 e 5,14 (Fig.12) referentes aos hidrogênios olefínicos da ligação dupla da cadeia lateral de um esteróide. Estes sinais juntamente com os sinais de sitosterol caracterizam a presença do estigmasterol (JAIN; BARI, 2010). Portanto, estes sinais evidenciam presença do sitosterol e do estigmasterol, necessitando a realização de análise por CG/EM para verificar a possível presença de outros esteróides nesta mistura.



Estes esteróides são comumente encontrados em mistura de difícil separação já que apresentam propriedades físico-químicas semelhantes. Os mais comuns são β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (ABDELNUR, 2006).

A mistura de esteróides também foi submetida a CG/EM, para confirmação das estruturas propostas; a análise do cromatograma (Fig.13) revelou a presença de dois componentes na mistura e os espectros para as duas substâncias (Fig. 14, 15, 16) confirmaram as estruturas do estigmasterol com pico do íon molecular m/z 412, do β -sitosterol com pico do íon molecular m/z 414.

Figura 13. Cromatograma da mistura de esteróidesJ3

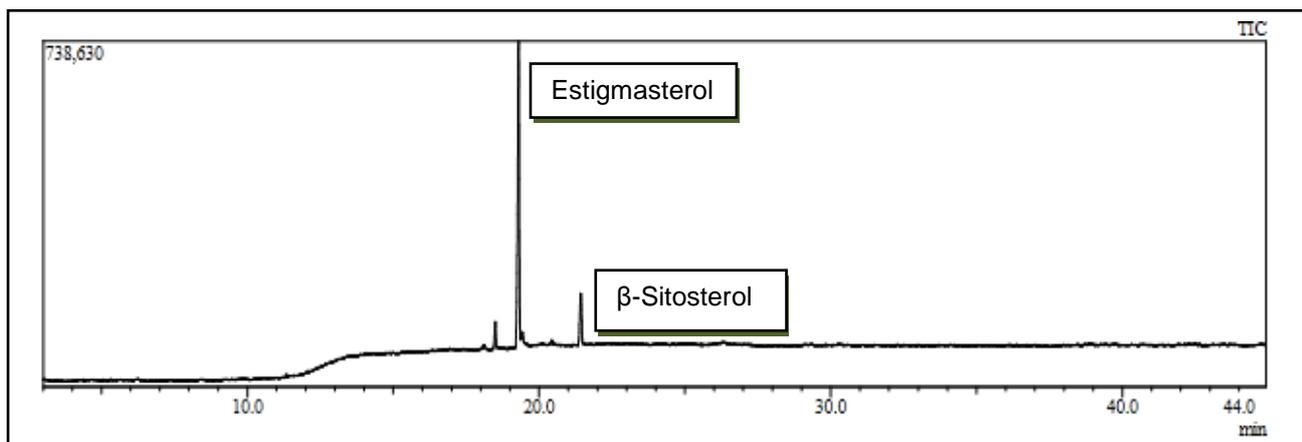


Figura 14. Espectro de massa do estigmasterol

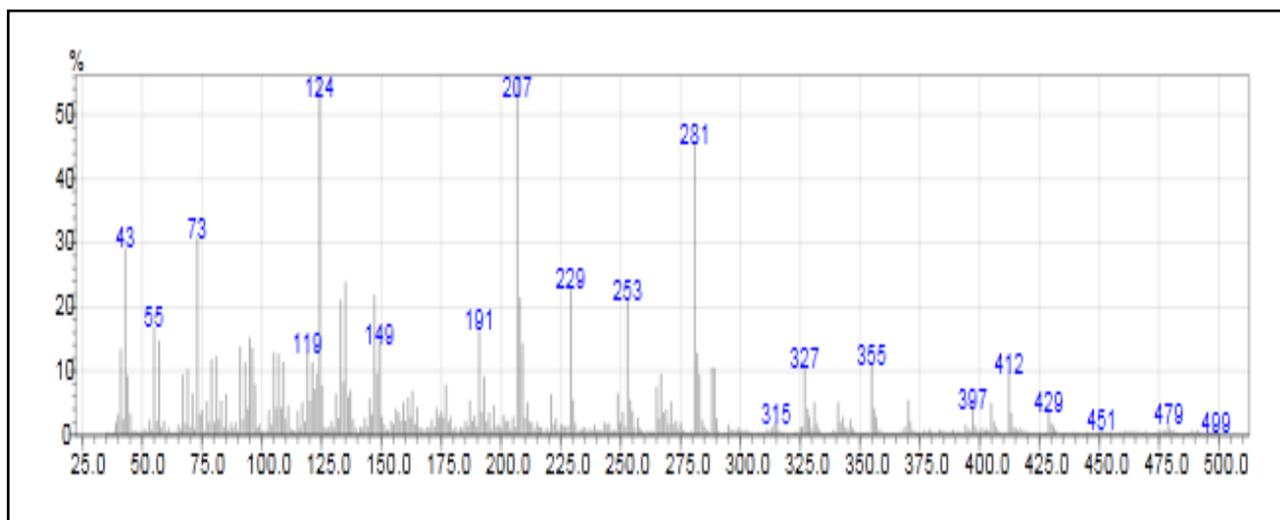
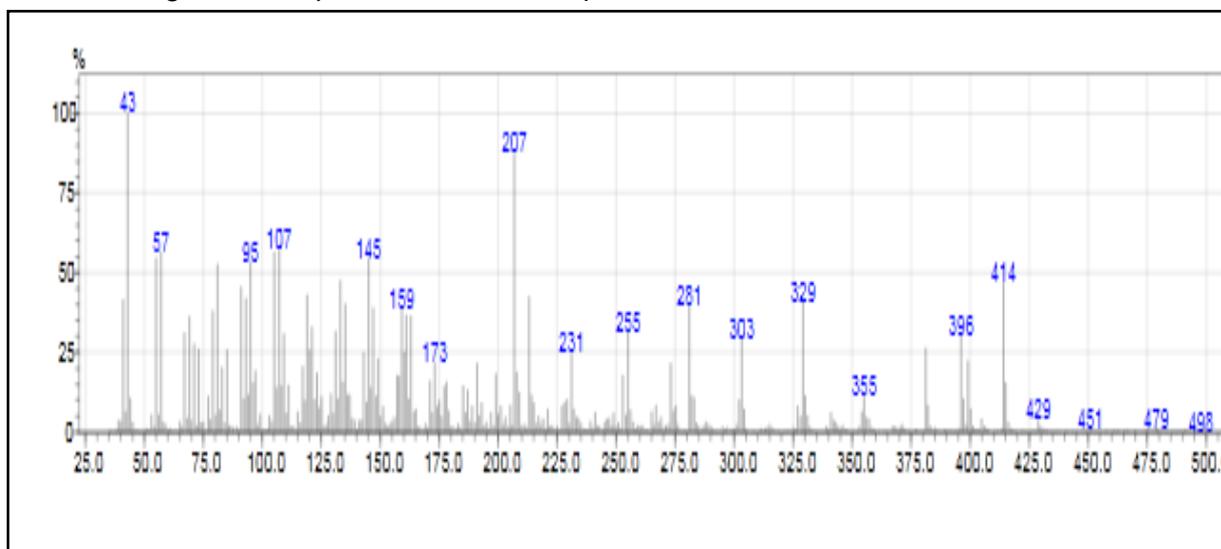
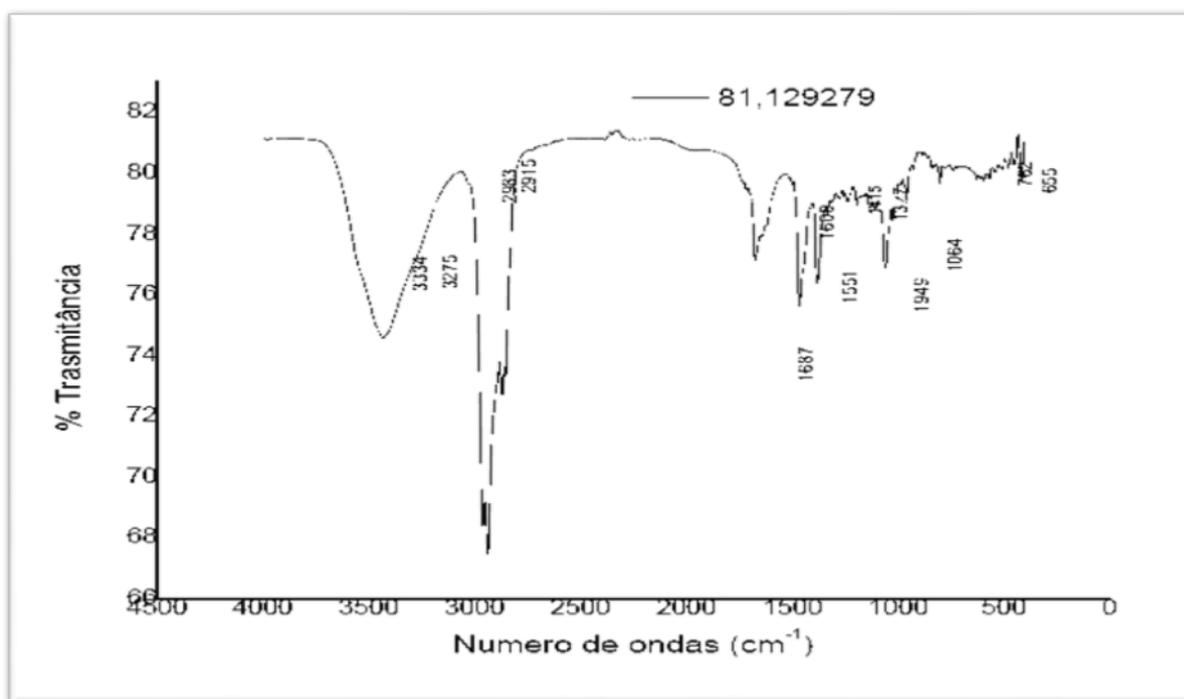


Figura 15. Espectro de massa do β -sitosterol



O espectro no IV (Figura 15) apresenta bandas na região de 3400 a 3300 cm^{-1} relativa à vibração de estiramento O-H, bandas na região de 3000 – 2800 cm^{-1} referentes à deformação axial C-H (PAVIA et al., 2010).

Figura 16. Infravermelho da mistura de esteróides J3



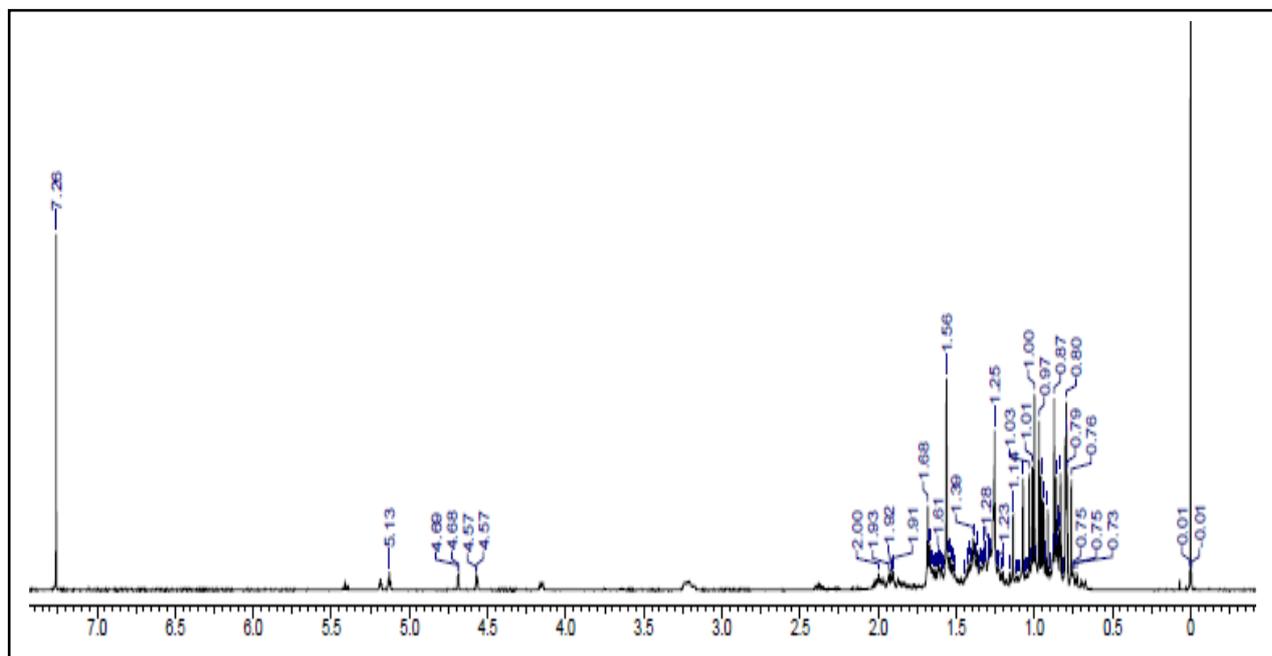
5.4.2 Identificação de α amirina, β amirina e lupeol (G2) isolados do extrato SCFM-H (folhas)

A fração G2 proveniente do extrato metanólico das folhas (fração SCFM-H) apresentou-se na forma de finos cristais brancos, com massa de 5 mg aproximadamente. Sua identificação estrutural se deu através de análise de RMN ^1H e IV.

Através dos dados espectroscópicos foi possível detectar a mistura de α (III), β (IV) amirina e lupeol (V).

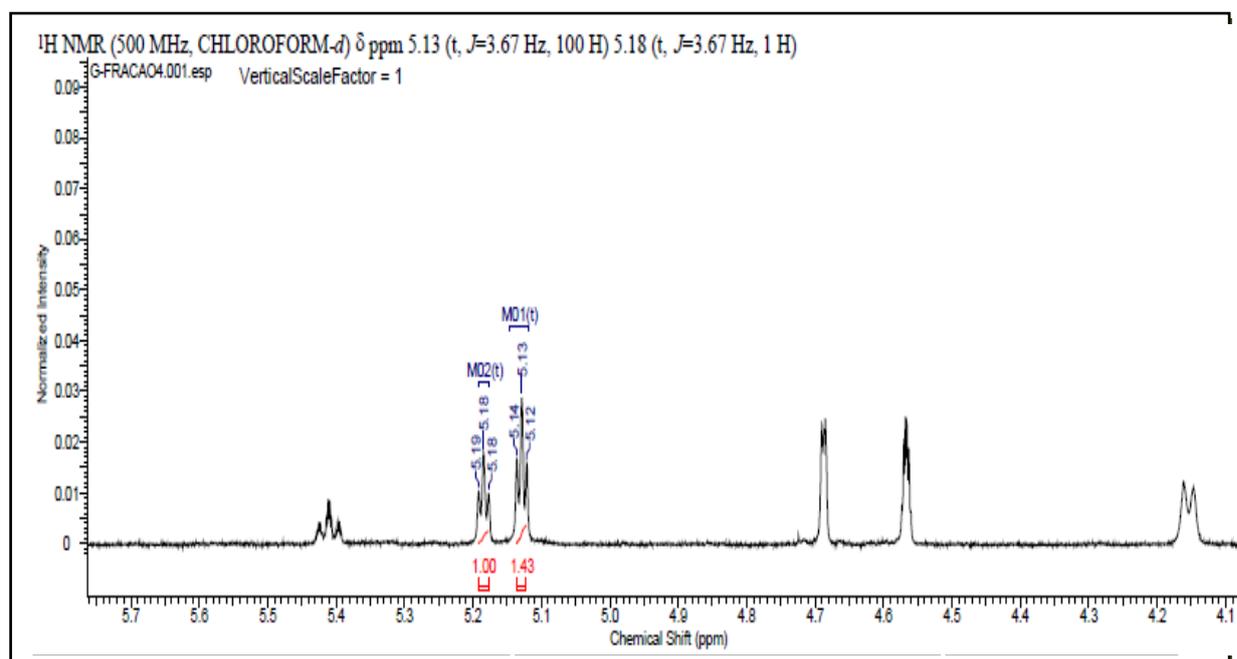
Os sinais de δH 0,7-2,0 ppm são característicos de triterpenos (Fig. 17).

Figura 17. Espectro RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz



De acordo com Balestrin (2006) e Vandresen (2005), os dois sinais tripletos, ambos com integração para um hidrogênio em δH 5,13 ($J = 3,6$ Hz) e em δH 5,20 ($J = 3,6$ Hz) são característicos dos triterpenos α e β -amirina (Fig. 18).

Figura18. Expansão da região de δ 4,1 a 5,7ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz



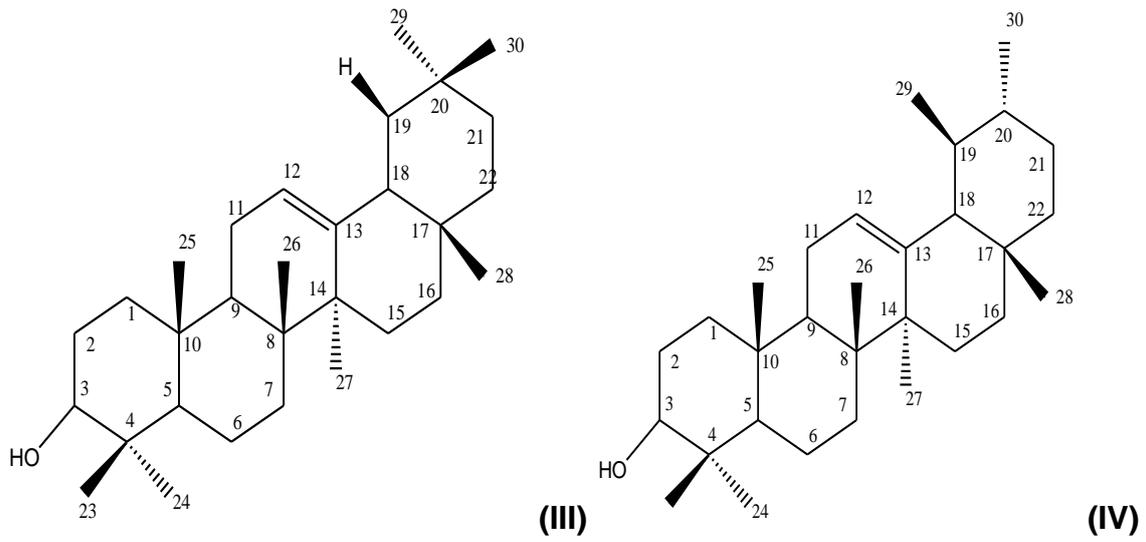


Figura 19. Expansão da região de δ 4,0 a 5,7ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz

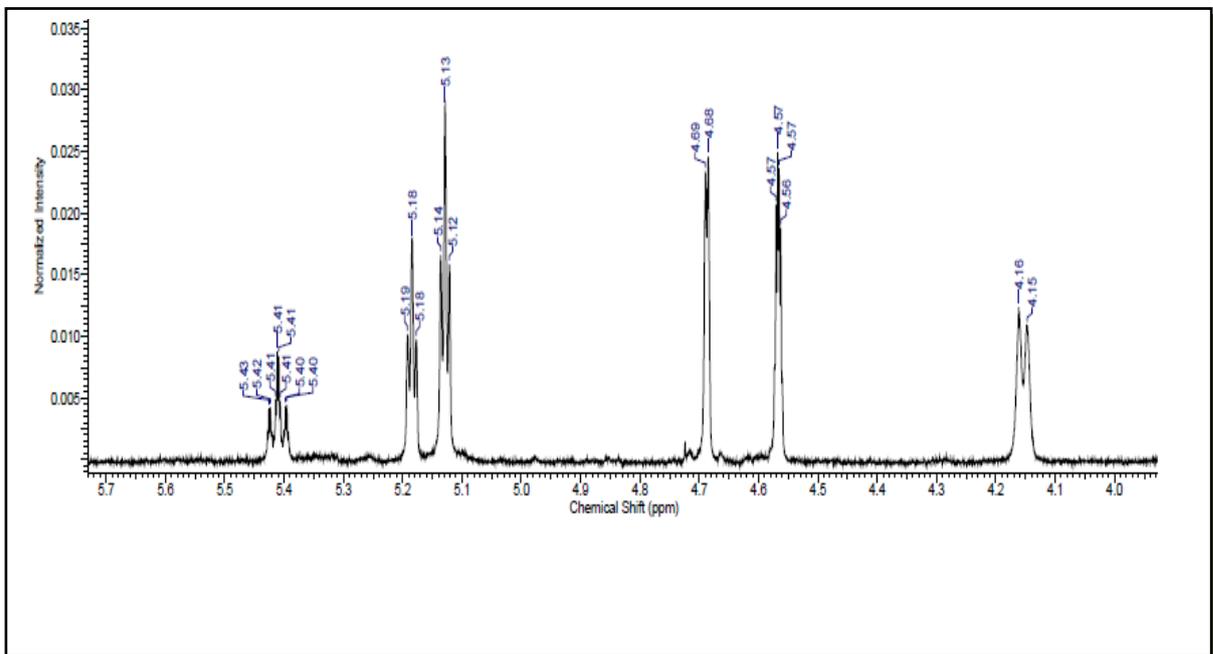
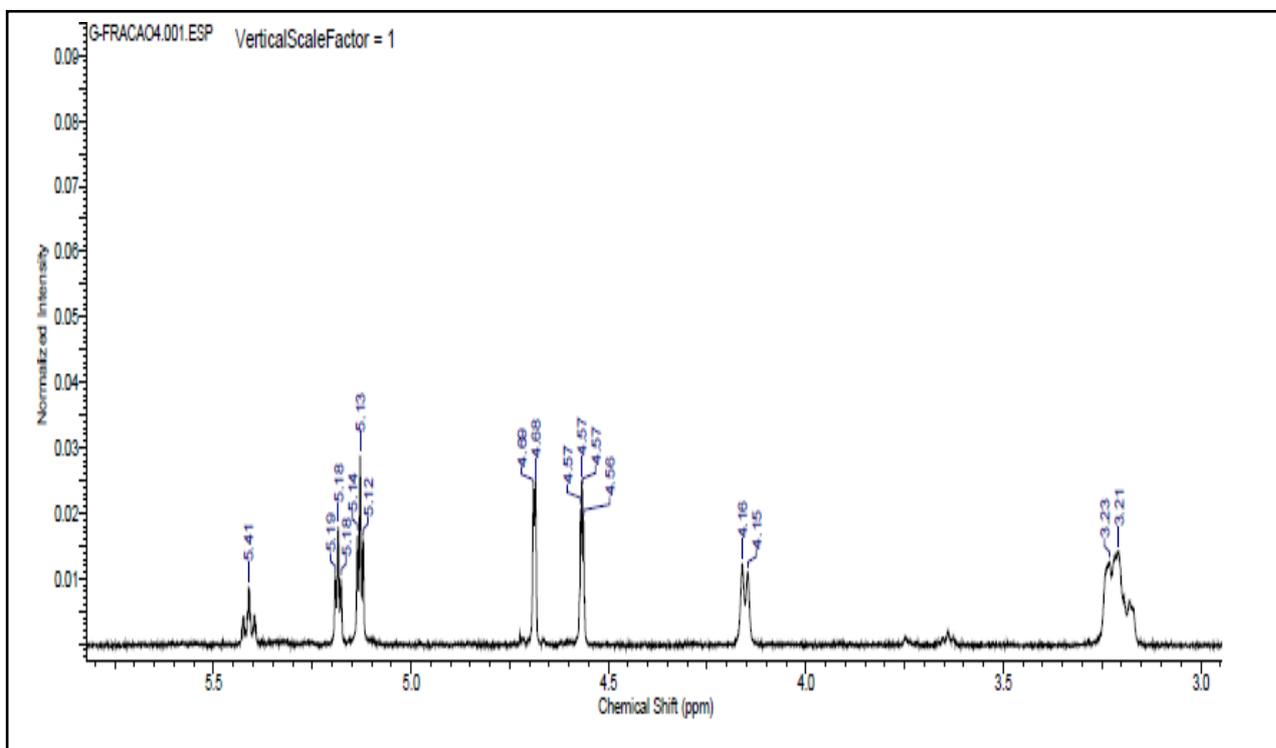
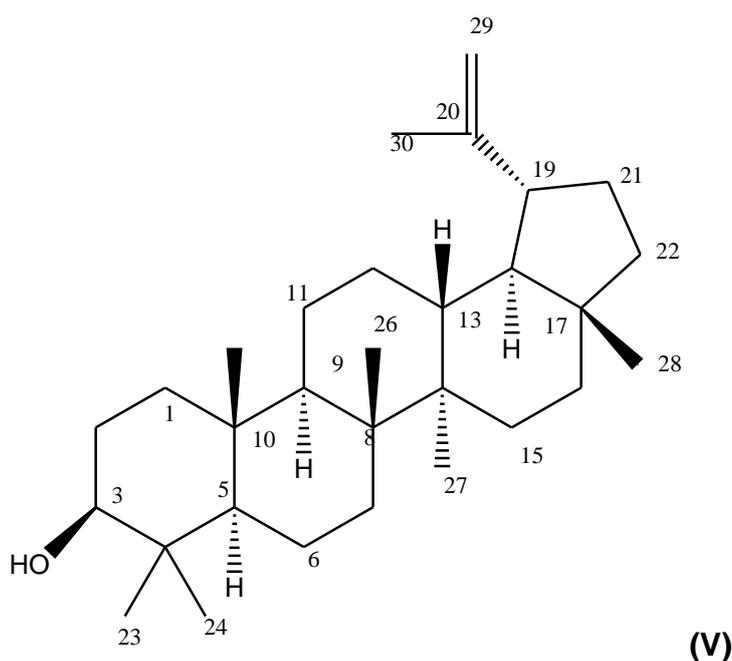


Figura 20. Expansão da região de δ 3,0 a 5,5ppm do espectro de RMN ^1H da mistura de triterpenos (G2), CDCl_3 , 500MHz



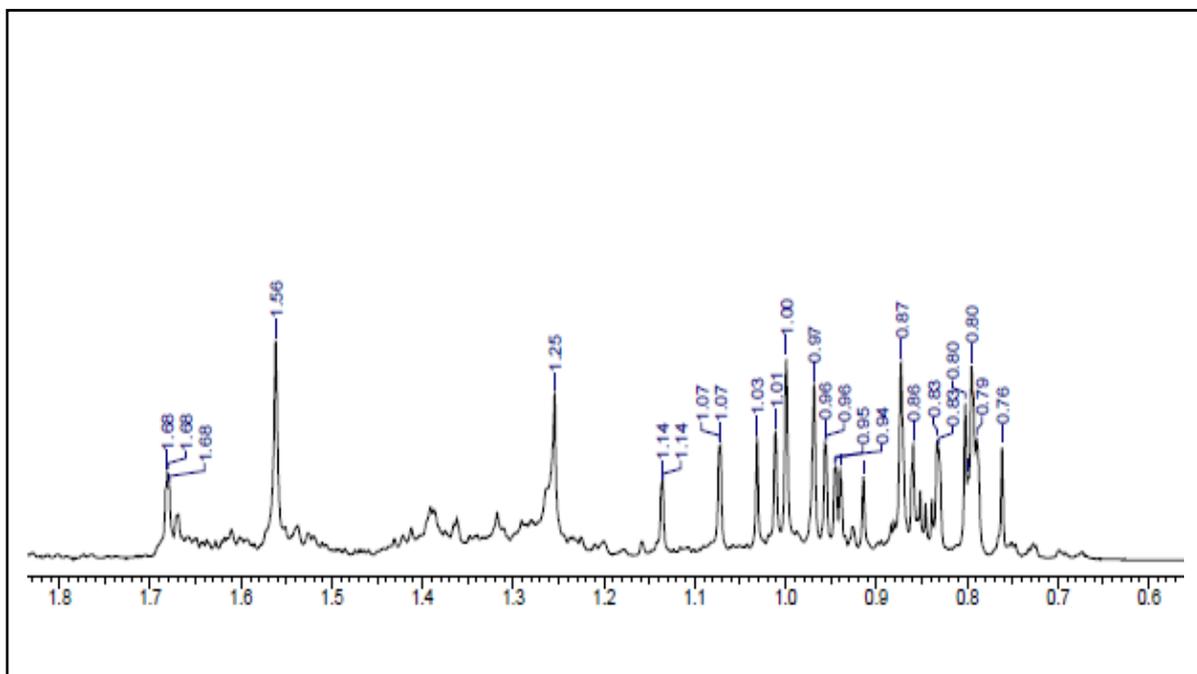
Os sinais em δH 4,69 e 4,57 (Fig. 19) são característicos dos dois H-29 do lupeol (**5**); e 3,20 (m) (Fig. 20) do H-3a é comum às três substâncias (lupeol, α e β amirina) (Fig. 19) (Souza et al., 2001).



De acordo com Aragão (1990), que também isolou α -amirina, β -amirina e lupeol em mistura, os sinais entre δ H 0,84 e 1,14 (Fig. 21) evidenciam a presença dos grupos metila de β -amirina e lupeol ligados a carbono sp^3 . O sinal próximo a δ H 1,60 (Fig. 21) confirma a metila ligada a carbono sp^2 no lupeol. O multiplete em δ H 5,13 (Fig. 20) refere-se ao próton olefínico de α -amirina.

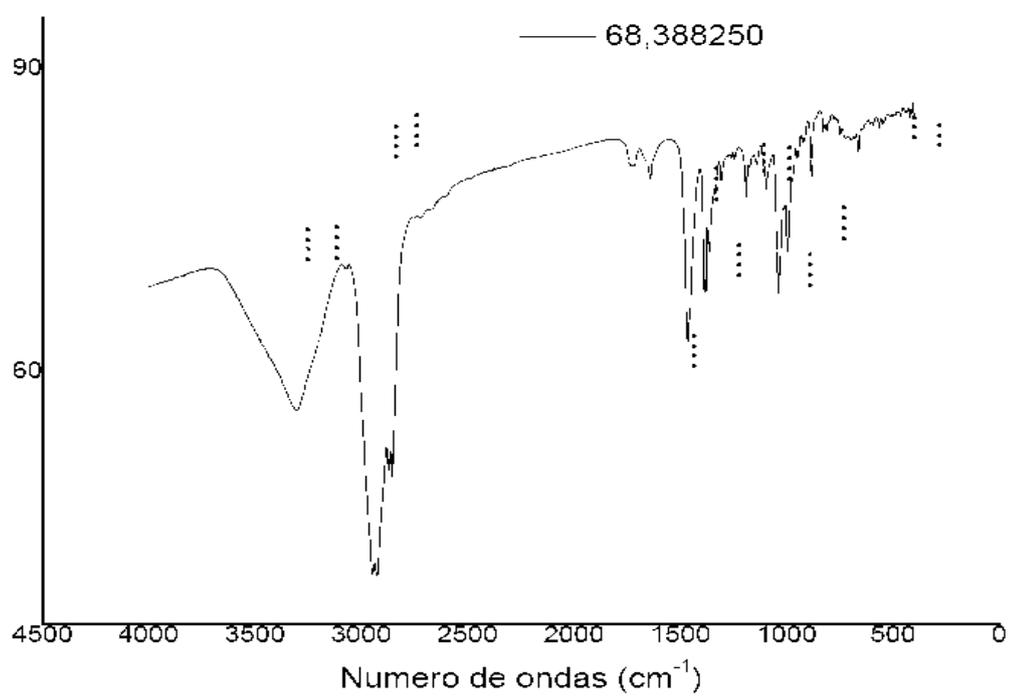
O singlete em δ H 1,68 (Fig. 21) é indicativo de hidrogênios de grupo metila ligado a carbono insaturado.

Figura21. Expansão da região de δ 0,6 a 1,8ppm do espectro de RMN 1 H da mistura de triterpenos (G2), $CDCl_3$, 500MHz



O espectro no Infravermelho desta amostra (Fig. 22) apresenta absorções na região de 3200 cm^{-1} correspondente a deformação axial característica do grupamento OH. Na região de 2900 cm^{-1} encontra-se a absorção correspondente a deformação axial do grupamento C-H. Na região de 1550 cm^{-1} existe absorção correspondente a deformação axial C=C (PAVIA et al., 2010).

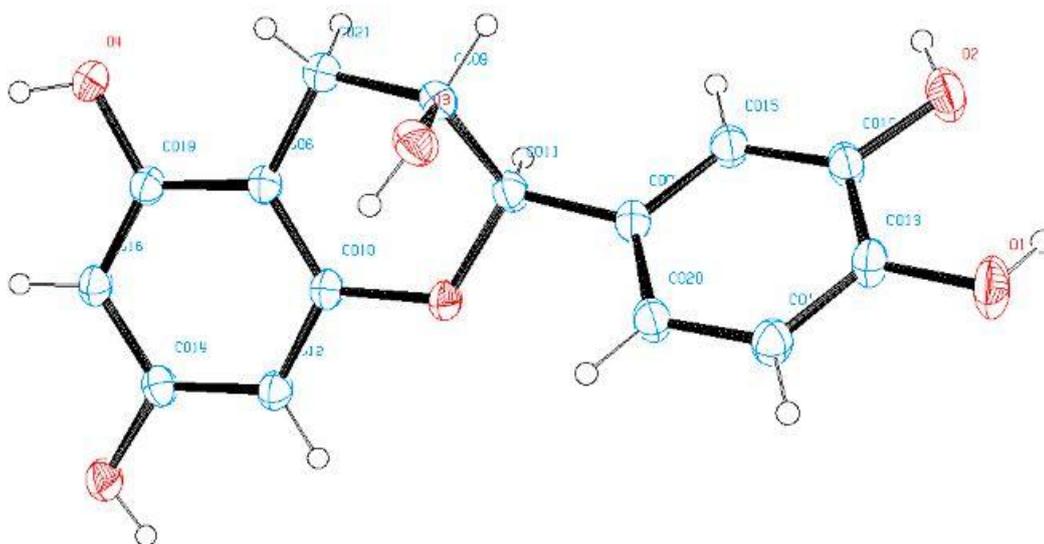
Figura 22. Infravermelho da mistura de triterpenos (G2)



5.4.3 Identificação da epicatequina (D4) isolada do extrato SCFM-A (folhas)

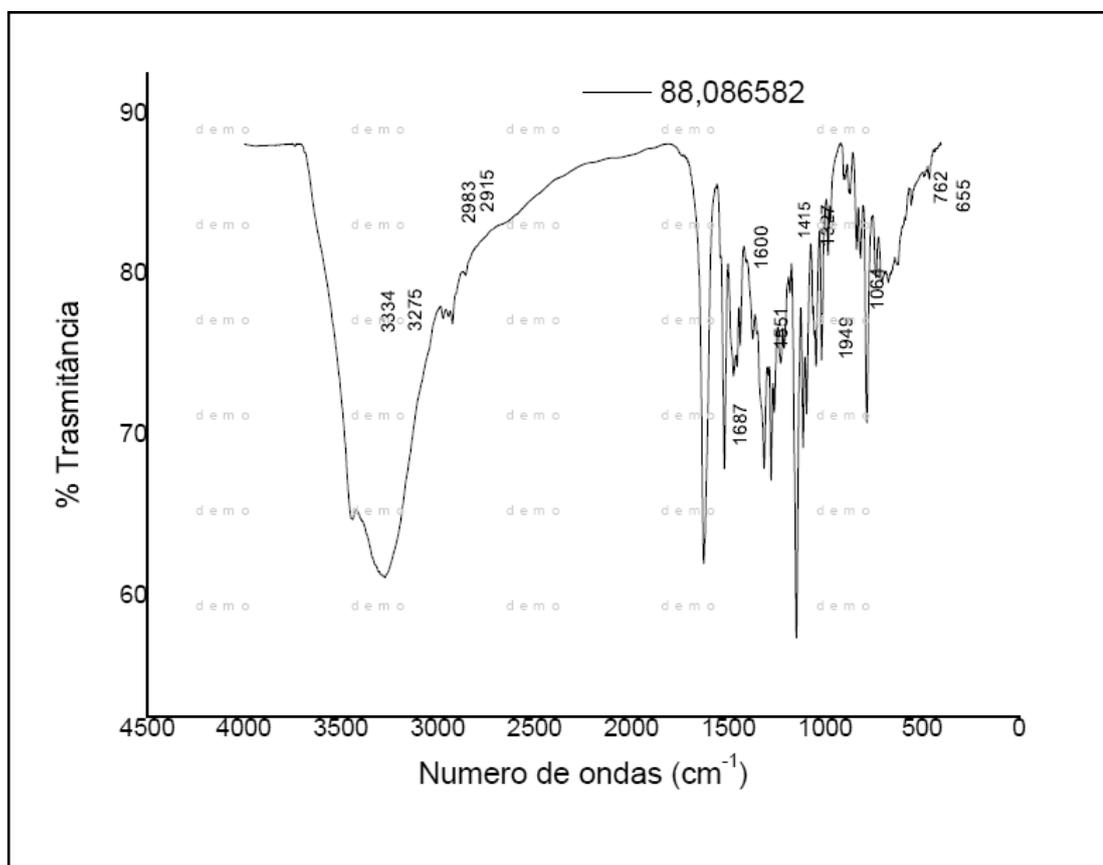
De acordo com Cunha (2008) a difração de raio-X é um método utilizado na obtenção de informações ao nível da resolução atômica, permitindo obter, mesmo que indiretamente, a correspondente imagem. Este método foi utilizado em uma das amostras desta pesquisa. A estrutura encontrada foi descrita abaixo.

Figura 23. Difração de raio-X da fração D4



Esta substância é um flavonóide da classe dos flavan-3-ols (catequinas) e foi extraído da fração de acetato de etila proveniente das folhas de *S. crassifolia* na forma de cristais levemente alaranjados, massa de aproximadamente 8mg. O espectro de IV (Fig. 24) apresenta bandas de absorção entre 3400 e 3300 cm^{-1} referentes à presença de grupo hidroxila. Estiramento de bandas entre 1600 e 1475 cm^{-1} referentes as ligações C=C; estiramento em 1064 cm^{-1} referente a ligação C-O (PAVIA et al., 2010).

Figura 24. Infravermelho da fração D4



Seu espectro (Fig. 25) apresentou dois dubletos localizados em δ H 5,97 e δ H 5,94, atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-8. Os sinais entre δ H 2,74 e δ H 2,91 estão associados ao H-4. Os demais sinais que caracterizam esta fração como epicatequina (**VI**) estão descritos na tabela 6 e comparados com valores encontrados na literatura.

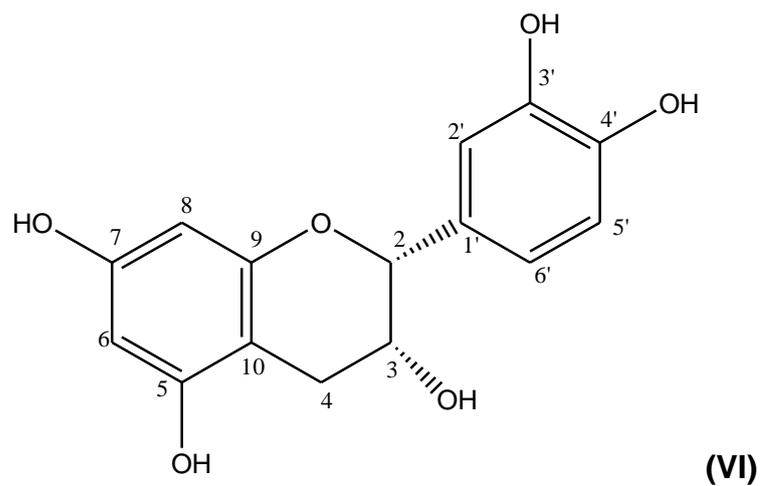


Figura 25. Espectro de RMN ^1H da fração D4, MeOD, 500MHz

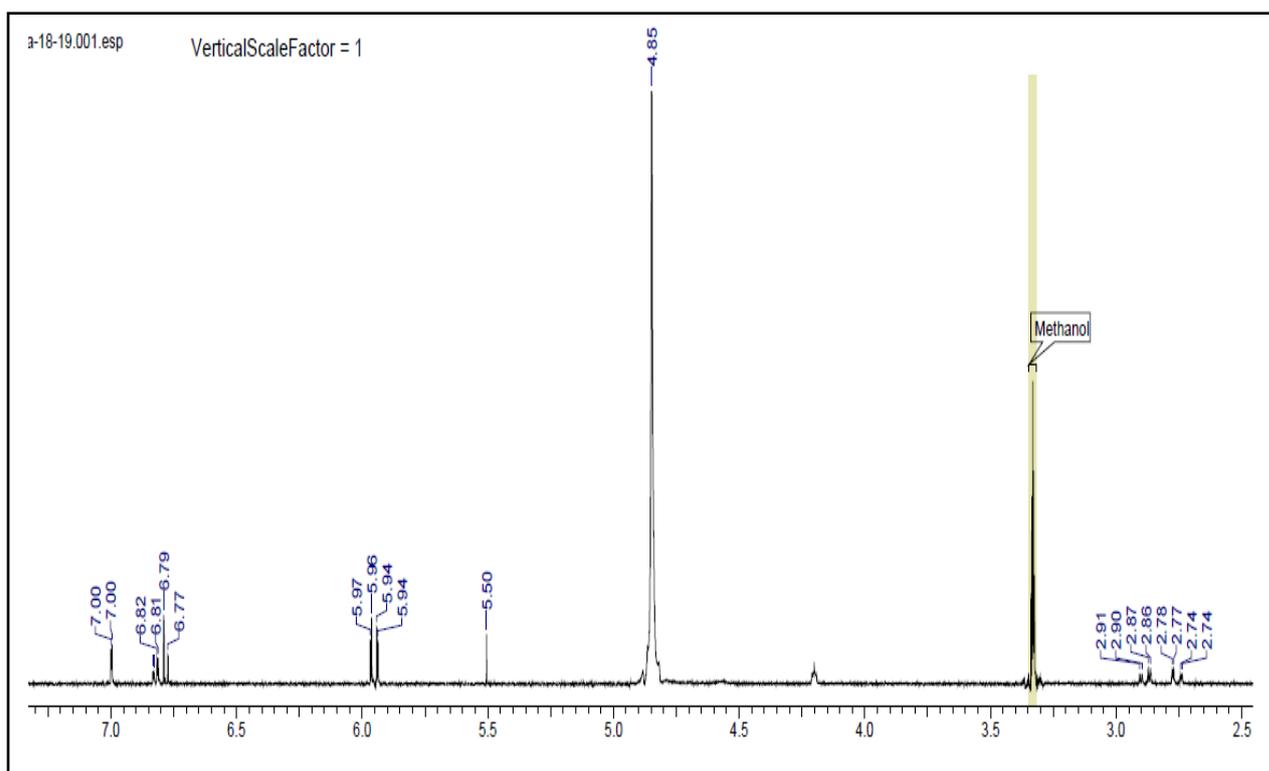
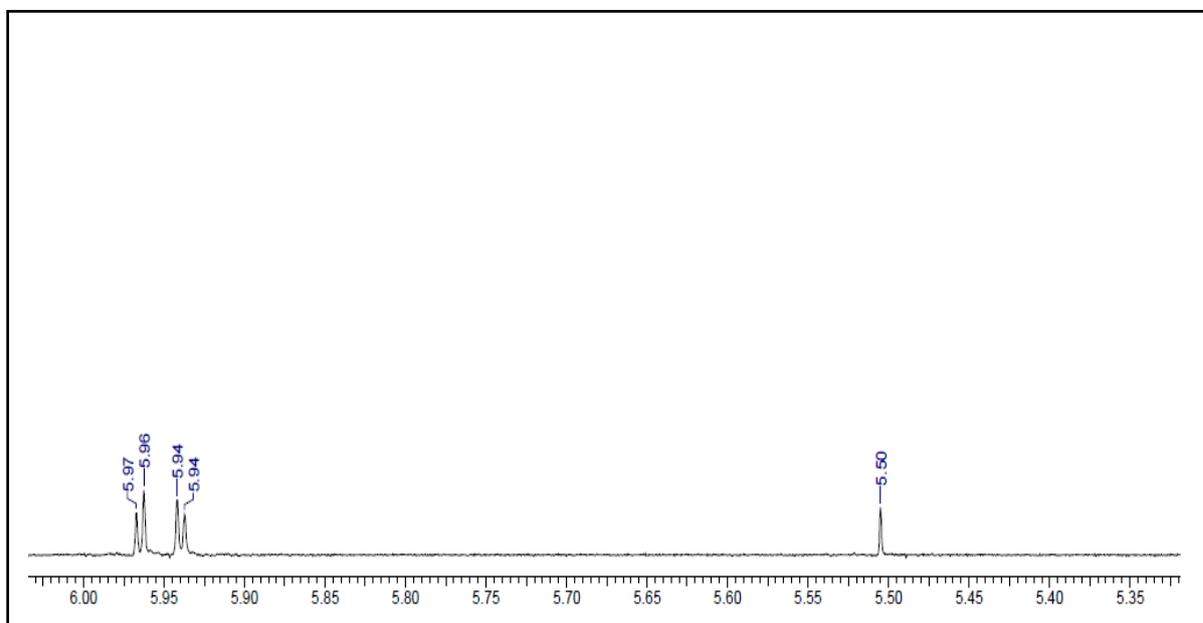


Tabela 6. Dados espectroscópicos RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) da fração D4 em comparação com os da literatura.

Posição	H (ppm)	Literatura (TANAKA, J. C. A. et al., 2005)
6'	6,83	6,79 – dd
5'	6,79	6,75 – d
6	5,97	5,93 – d
8	5,94	5,91 – d
2	4,85	4,81 – sl
3	4,20	4,17 – m
4b	2,86	2,86 – dd
4a	2,74	2,72 - dd

Figura 26. Expansão da região de δ 5,3 a 6,0ppm do espectro de RMN ^1H da fraçãoD4, MeOD, 500MHz

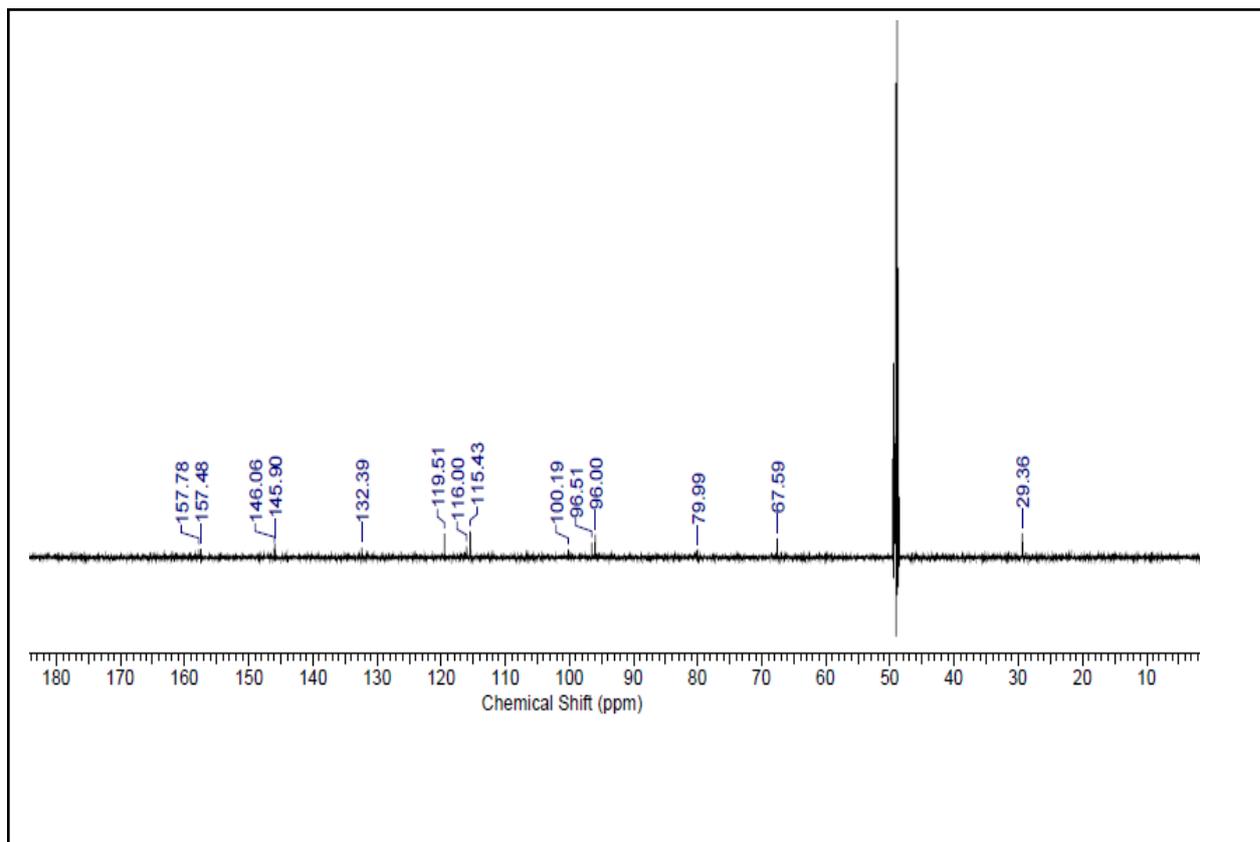


Os dados de RMN ^{13}C (Fig.27) foram comparados com os dados obtidos na literatura para a epicatequina e descritos na tabela 7.

Tabela 7. Dados espectroscópicos RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) da fração D4 em comparação com os da literatura.

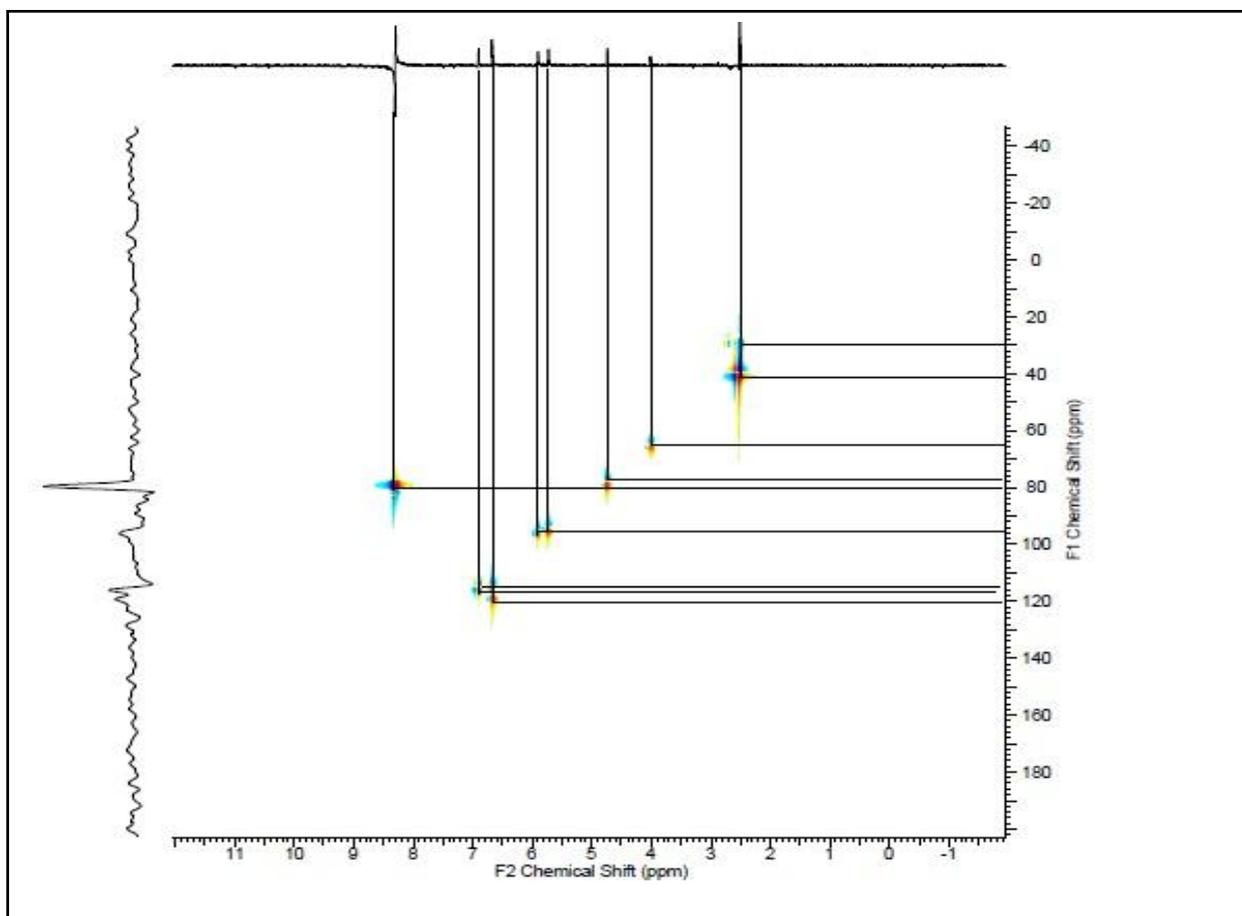
Posição	C (ppm)	Literatura(Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of Flavonoids, 1989)
2	79,99	79,4
3	67,59	66,9
4	29,36	29,1
5	157,78	157,4
6	96,51	96,2
7	157,48	157,4
8	96,00	95,7
9	-	157,0
10	100,19	99,7
1'	132,39	132,1
2'	115,43	115,2
3'	145,9	145,2
4'	146,06	145,2
5'	116,00	115,5
6'	119,51	119,4

Figura 27. Espectro RMN ^{13}C da fração D4, MeOD, 500MHz



O espectro de HSQC (Fig. 28) mostra a correlação dos hidrogênios em δH 6,83 e δH 6,79 com os carbonos em δC 114 (C-6') e δC 116 (C3') respectivamente. Os sinais de H em δH 5,94 e δH 5,97 correspondem aos carbonos C-6 e C-8 (δC 94). Observa-se ainda a correlação do singleto em δH 4,85 com um sinal de carbono em δ 78 (C-2); o multipletto em δH 4,20 correlacionando com o carbono δC 64 (C-3) e a correlação dos hidrogênios em aproximadamente δ 2 correspondem ao δC 28 (C-4).

Figura 28. Espectro de correlação HSQC (DMSO, 500 MHz) da fração D4



5.4.4 Identificação da catequina (D6) isolados do extrato SCFM-A (folhas)

A fração D6 foi obtida a partir da fração de acetato de etila proveniente do extrato metanólico das folhas de *S. crassifolia*. Essa substância é um flavonóide da classe dos flavan-3-ols e se apresentou na forma de cristais de coloração marrom, com 5mg aproximadamente. A identificação dessa estrutura como catequina (VII) se deu por meio de análise RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC. Os sinais de dubleto na região de δH 5,94 e 5,9 correspondem aos H-6 e H-8 respectivamente. O dubleto na região de δH 4,60 pode estar associado ao H-2 (Fig. 29 e 30). Os demais sinais e sua relação com seus respectivos H estão dispostos na tabela 8.

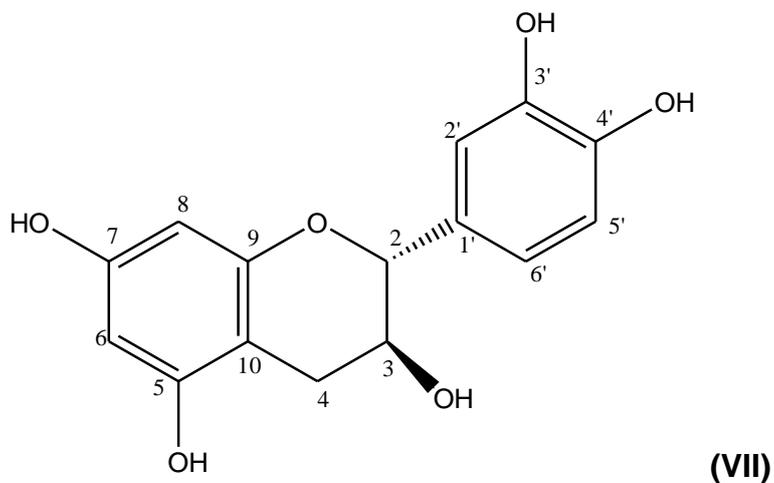


Figura 29. Espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz

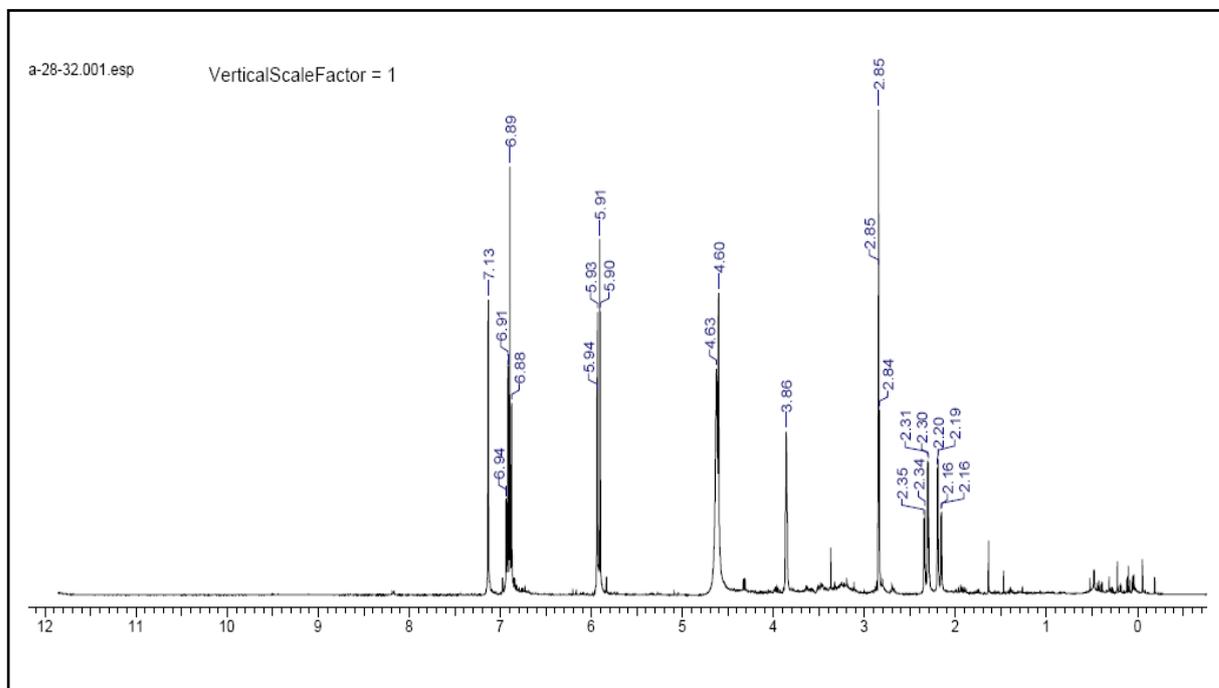


Figura 30. Expansão da região de δ 4,0 a 6,0 ppm do espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz

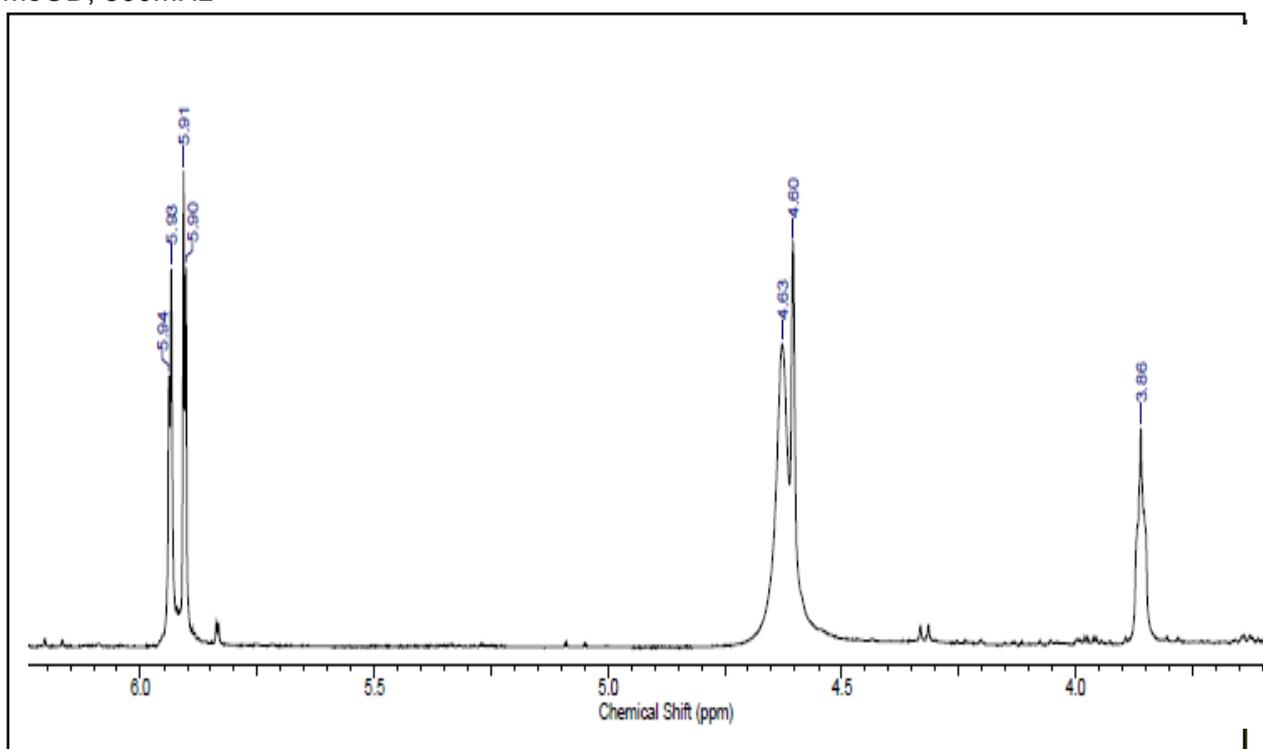


Tabela 8. Dados espectroscópicos RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) da fração D6 em comparação com os da literatura.

Posição	H (ppm)	Literatura (TANAKA, J. C. A. et al 2005)
2	4,6	4,59 – d
3	3,86	4,01–ddd
4a	2,35	2,52 – dd
4b	2,84	2,84 – dd
6	5,94	5,96 – d
8	5,9	5,89 – d
2'	6,94	6,85 – d
5'	6,92	6,79 – d
6'	6,89	6,72 - dd

Os dados de RMN ^{13}C (Fig. 31) foram comparados com os dados obtidos na literatura para a catequina e descritos na tabela 9.

Figura 31. Espectro RMN ^{13}C da fração D6, MeOD, 500MHz

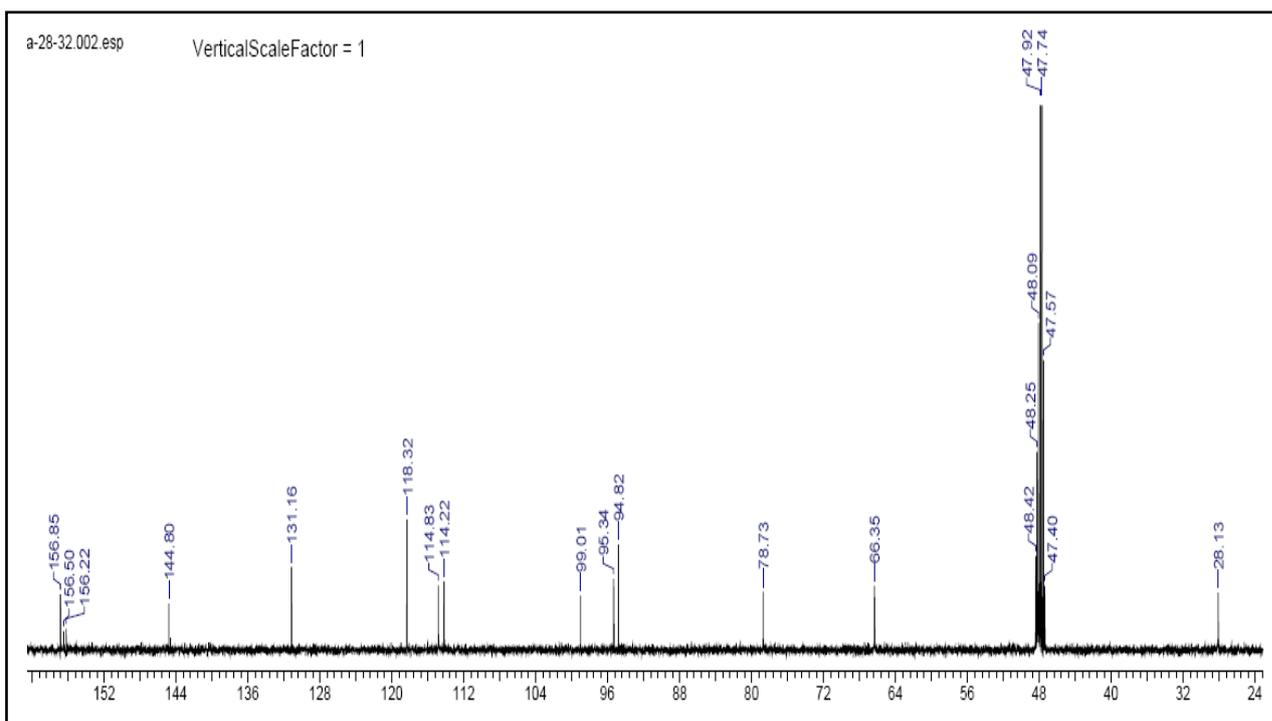


Tabela 9. Dados espectroscópicos RMN ^{13}C (MeOD, 500 MHz) da fração D6 em comparação com os da literatura.

Posição	C (ppm)	Literatura (Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of Flavonoids, 1989)
2	78,73	81,2
3	66,35	66,6
4	28,13	28,1
5	156,22	156,3
6	95,34	95,5
7	156,5	156,6
8	94,82	94,4
9	156,8	155,5
10	99,01	99,4
1'	131,16	130,8
2'	118,32	114,7
3'	114,8	145,0
4'	144,8	145,0
5'	---	115,4
6'	114,22	118,8

Os picos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C desta substância (D6) se assemelham com os descritos para a amostra D4, no entanto o que os diferencia é o valor da constante de acoplamento gerada pelos H-2 e H-3, valor este que vai indicar qual é a conformação destes átomos no espaço.

Catequinas podem existir como dois isômeros *trans*-catequina e *cis*-epicatequina, dependendo da estereoquímica configuracional dos grupos hidroxila e 3',4'-diidroxifenil ligados a C-3 e C-2 do anel C. Cada um dos diastereoisômeros existe como dois isômeros ópticos: (2R, 3S)-2,3-*trans*-(+)-catequina e (2S, 3R)-2,3-*trans*-(-)-catequina, (2R, 3R)-2,3-*cis*-(+)-epicatequina e (2S, 3S)-2,3-*cis*-(-)-epicatequina (Jung et al., 2008).

No espectro de ^1H observa-se um valor alto para a constante de acoplamento relacionada ao H-2 (d δ 4,6, $J= 11,5$ Hz) indicando configuração trans para a molécula da catequina, e o singlete largo (δ 4,85) atribuído ao H-2, sugere configuração cis entre H-2 e H-3 para seu isômero epicatequina.

Figura 32. Expansão da região de δ 3,5 a 5,4 ppm do espectro de RMN ^1H da fração D6, MeOD, 500MHz

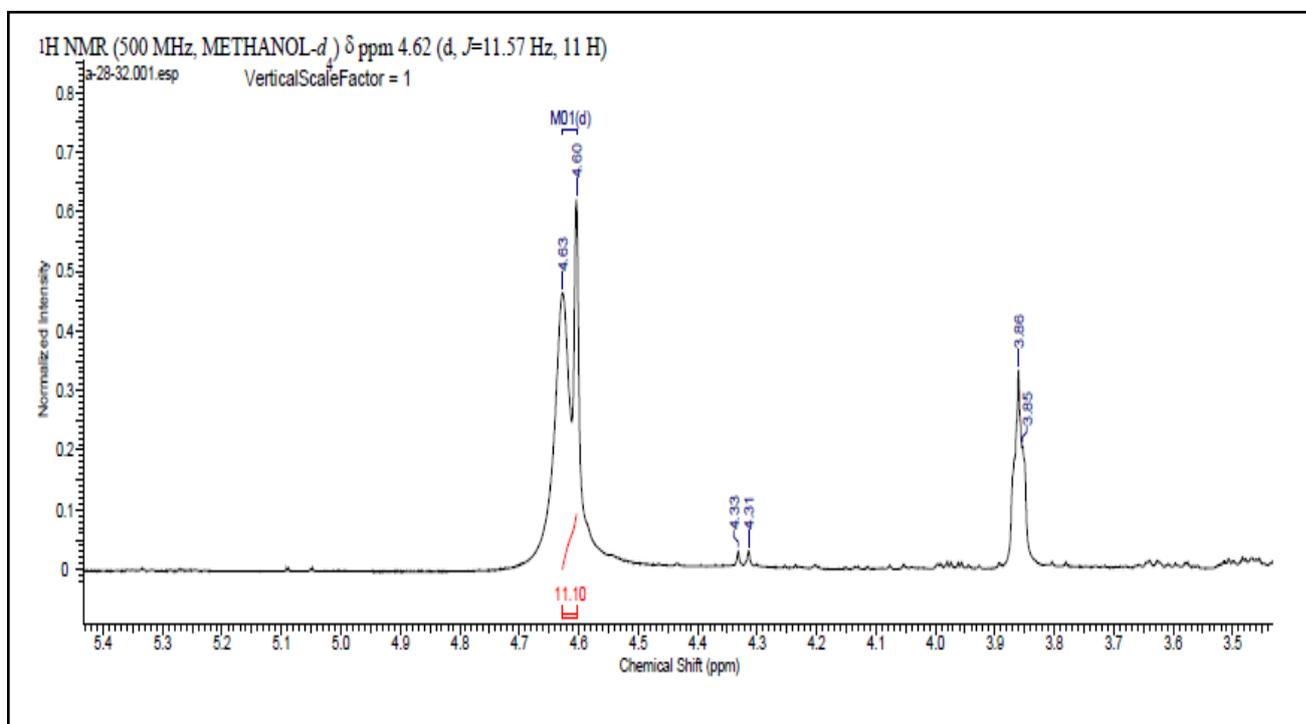
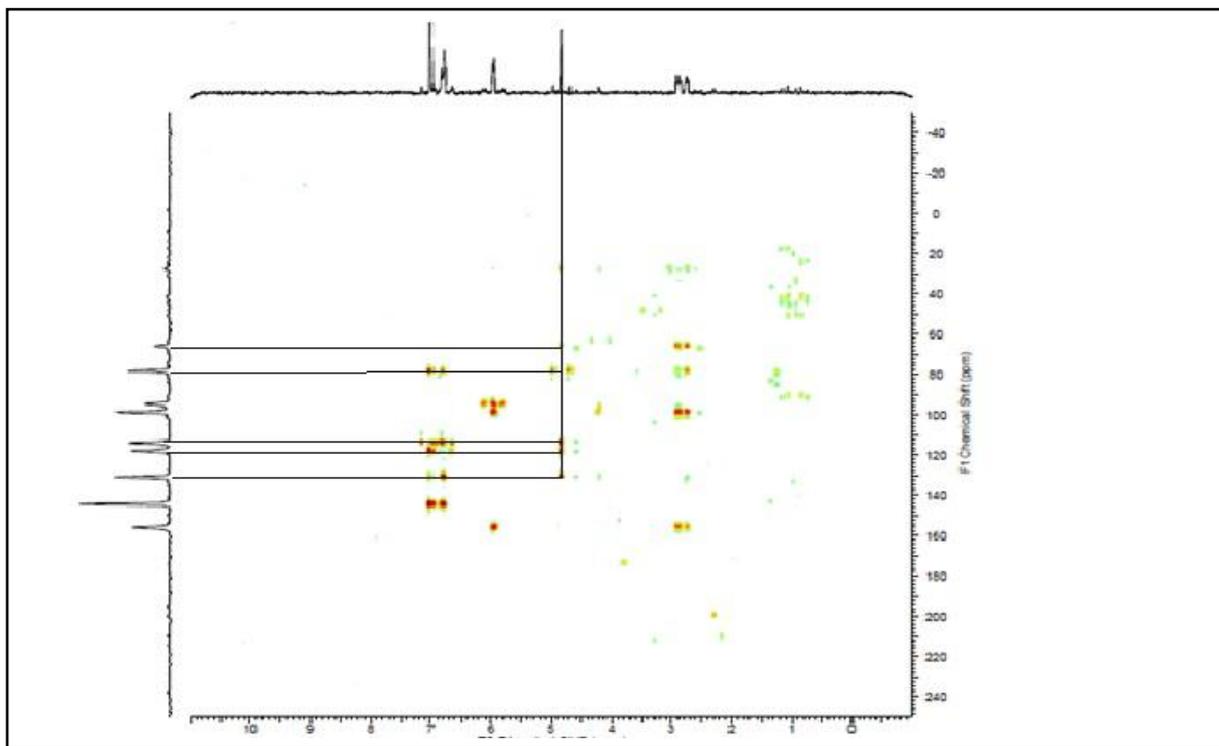
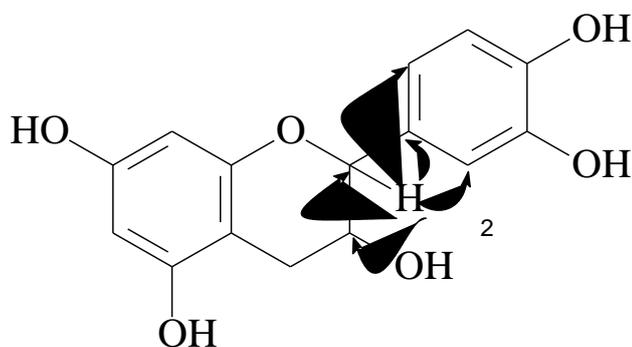


Figura 33. Espectro de correlação HMBC (MeOD, 500 MHz) da fração D6



A análise de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 33) vem confirmar a posição do H-2 ($\delta_{4,6}$) através da correlação deste H com os sinais de carbono δ_{78} e δ_{131} referentes aos carbonos C-2 e C-1' respectivamente. Além das correlações do H-2 com os carbonos em δ_{66} (C-3), δ_{114} (C-6') e δ_{118} (C-2'). A estrutura abaixo descrita vem demonstrar as correlações do H-2 com alguns carbonos, confirmando assim sua posição.



Capítulo 6

Conclusões

6. Conclusões

O estudo da espécie de *Salacia crassifolia* permitiu o isolamento e caracterização de 2 flavanóis, uma mistura de esteróides e 3 triterpenos.

Através do estudo citotóxico pôde-se observar que *Salacia crassifolia* possui forte potencial de inibição celular frente às células e ao modelo testado, já que o extrato hexânico das cascas (SCCcM-H) obteve valores positivos para inibição celular frente às três linhagens testadas e o extrato de acetato de etila (SCCcM-A), também das cascas, apresentou elevado valor percentual de inibição celular (95,96%) frente à linhagem HCT-8 (cólon-humano), bem como a fração metanólica (SCFMc-M) proveniente das folhas que mostrou forte potencial inibidor frente às células HCT-8 (cólon-humano) e OVCAR-8 (mama).

Este resultado vem complementar as pesquisas já descritas na literatura para as plantas pertencentes à família Celastraceae.

Capítulo 7
Perspectivas

7. Perspectivas

- Testar a citotoxicidade dos isômeros Catequina e Epicatequina isolados das folhas em linhagens tumorais.
- Submeter a fração metanólica das folhas a outros fracionamentos no intuito de isolar metabólitos com atividade citotóxica.
- Publicação de artigos em revistas especializadas na área.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDELNUR, P. V. **Estudo Fitoquímico de *citrus*: resistência a *Xylella fastidiosa* e interação com *oncometopia facialis***.2006. 275f.Dissertação (Mestrado em química orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids.**Elsevier**, Amsterdam, 1989.
- ALMEIDA, V. L. de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.**Quim. Nova**,v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ARAGÃO, P. C. de A. et al., Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Quim. Nova**, v. 13, n. 4, 1990.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p.57-59, 2002.
- ASSUNÇÃO, S. L.; FELFILI, J. M. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. **Acta bot. Brs**, v. 18, n. 4, p. 903-909. 2004.
- BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 117p, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.**Quim.Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal- as bases moleculares da ação dos fármacos**.Porto Alegre: ARTMED Editora, 2001.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts.**Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BRAGA FILHO, J. R.et al. Entomofauna Associada aos Frutos do Bacupari, *Salacia crassifolia* (MART.) Peyr, nos Cerrados do Brasil Central. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n.1, p. 47-54, 2001.
- BRANDÃO, H. N.;DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. DAVID, J. M.Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.
- BRAZ-FILHO, Raimundo. Química de Produtos Naturais: importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A Peregrinação de um Pacatubano. **Quim. Nova**,v. 17, n. 5, p.405-445, 1994.

BRUNI, R. et al. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia**, v.77, p.538-45, 2006.

BORLAUG, N.E. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA.

BUFFA FILHO, W. et al. Análise quantitativa de metabólitos secundários derivados do esqueleto *friedo-nor*-oleanano em variedades morfológicas de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Phytochemical Analysis**, EUA, v. 13, p. 75-78, 2002.

CARAMORI, S. S. et al. Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CARNEIRO, C. C.; PEREZ, C. N.; CHEN-CHEN, L. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE *Salacia crassifolia* EM *Salmonella typhimurium***. Disponível em: www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/.../mestrado-cristiene-costa.pdf. Acesso em: 16 abr. 2012.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v.21, n. 1, p.99-105, 1998.

CHABARIBERI, R. D. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactivesesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenusaquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998.

CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Ed. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v. 6, p. 134-135, 1984.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, Fortaleza, Ceará, v.2, n.1, p. 47-58, 2010.

COSTA, P. M. da. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v.22, p. 854–863, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**100, p.72-79, 2005.

CUNHA, Silvio. Métodos simples de formação de mocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração por difração de raios x. **Quim. Nova**, v. 31, n. 4, p. 906-909, 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. New York: John Wiley, 2001.

DUARTE, L. P. et al. Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae). **Quim. Nova**, v. 33, n. 4, p. 900-903, 2010.

FERNANDES, L. M. **Avaliação da atividade genotóxica de extratos e do alcalóide indol-monoterpênico obtidos das raízes de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae)**. 74f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

FIGUEIREDO, J. N. RAÄZ, B. SÉQUIN, U. Novel Quinone Methides from *Salacia kraussii* with in Vitro Antimalarial. **Activity. J. Nat. Prod.**, v. 61, p.718-723, 1998.

FLAMMANG, A. M. et al. Genotoxicity testing of *Salacia oblonga* extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1868-74, 2006.

FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Quim. Nova**, v. 30, n.4, p. 842-847, 2007.

GILANI, A. H. et al. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores.**São Paulo: EdUFSCar, 2003.

HOUGHTON, P. J. Medicinal plants and the control of parasites. Compounds with anti-HIV activity from plants. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 601-604, 1996.

JAIN, P. S.; BARI, S. B. Isolation of lupeol, stigmasterol and campesterol from petroleum ether extract of woody stem of *Wrightia tinctoria*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.3, p.163-167, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal.** 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.440, 2002.

JUNG, M. J.; HEO, S.I.; WANG, M.H. **Food Chem**, v.108,p.482,2008.

KISHI, A. et al. Structures of New Friedelane- and Norfriedelane-Type Triterpenes and Polyacylated Eudesmane-Type Sesquiterpene from *Salacia chinensis* LINN. (*S. prinoides* DC., Hippocrateaceae) and Radical Scavenging Activities of Principal Constituents. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 9, p. 1051-1055, 2003.

KUMAR, V.; WAZZER, M. I. M.; WIJERATNE, D. B. T. 21 α , 26-Dihydroxy-D:A-friedooleanan-3-one from *Salacia reticulata* Var. *Diandra* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 24, n. 9, p. 2067-2069, 1985.

LIÃO L. M. **Alcalóides sesquiterpênicos piridínicos e triterpenos quinonametídeos degradados de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae).** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 183 p, 1997.

LOMBARDI, J. A. A new species of *Tontelea* from Amazonian Peru and Equador, and notes on the *Tontelea attenuate* species group (Celastraceae, Hippocrateoideae). **Brittonia**, v. 58, n. 1, p. 52-58, 2006.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas.**Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MAGALHÃES, C. G. **Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Exatas, 186p, 2012.

MALERBA, F. ; ORSENIGO, L. Innovation and market structure in the dynamics of the pharmaceutical industry and biotechnology: towards a history friendly model. In: DRUID NELSON and WINTER CONFERENCE, Aalborg, 2001.

MONTANARI, C. A. BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. (Org.). **Produtos Naturais Estudos Químicos e Biológicos**. Fortaleza: EdUECE, 2007.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAMURA, S. et al. Chemical Structures and Hepatoprotective Effects of Constituents from the Leaves of *Salacia chinensis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.59, n. 8, p. 1020—1028, 2011.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. (tradução Pedro Barros). São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, Luana de Jesus. et al. Análise Histoquímica da Folha de *Salacia crassifolia* (MART.) Peyr (Celastraceae). In: IV FÓRUM DE DESENVOLVIMENTO REGIONAL, Montes Claros, 2010.

PEREIRA, Luana de Jesus. et al. Histoquímica Comparada da Casca do Sistema Subterrâneo de *Salacia elliptica* e *Salacia crassifolia* (MART. EX SCHULT.) G. Don. (Hippocrateoideae-Celastraceae). In: 5º FEPEG, Montes Claros, 2011. Disponível em: <http://www.fepeg.unimontes.br/index.php/eventos/forum2011/schedConf/presentations>. Acesso em: 29 jan. 2012.

PINTO, A.C. et al. Produtos Naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

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

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos : uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RODRIGUES, S. B. V. et al. Triterpenos pentacíclicos isolados de *Salacia elliptica* (Mart.) Peyr. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., Belo Horizonte, MG. 2006.

SANTOS, L. T. P. **Micobiota folícola de *Salacia crassifolia***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. 116p. 2011.

SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES C. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.333-364, 1999.

SANTOS, V.L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SETZER, W. N. et al. Isolation and Frontier Molecular Orbital Investigation of Bioactive Quinone-Methide Triterpenoids from the Bark of *Salacia petenensis*. **Planta Med**, v. 67, p. 65-69, 2001.

SILVA, G. A. da. Constituintes químicos do caule e raiz de *Salacia elliptica*. **Dissertação (Mestrado em Química)** – Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás, 44p, 2009.

SILVA-JÚNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado: guia de campo**. 1. ed. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005. p. 278.

SIMMONS, M. P.; **Celastraceae**. In: The families and genera of flowering plants: flowering plants, Dicotyledons, Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. Berlin: Springer, 2004.

SIMMONS, M. P., et al. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, rbcL, atpB, and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 353-366, 2001.

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.

SOMWONG, P.; SUTTISRI, R.; BUAKEAW, A. A new 1,3 – diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1047-1051, 2011.

SOUSA, G. F. de. **Estudo fitoquímico do extrato hexânico e da atividade biológica de constituintes das folhas de *Maytenus robusta* (Celastraceae)**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 166p, 2012.

SOUSA, J. R., et al. Triterpenos pentacíclicos e quinonametídeos de *Austroplenckia populnea*. **Quim. Nova**, v.13, n. 4, p.252-253, 1990.

SOUZA, A. D. L., et al. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, M. R. de M., et al. Conhecimento popular e uso de plantas tradicionais no meio rural em Minas Gerais. In: VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGIA RURAL, Porto de Galinhas, 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das plantas das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseada em APG II**. Nova Odessa. São Paulo, SP, 2005. p. 279.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata*. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

THIEM, D. A. et al. Bisanortriterpenes from *Salacia madagascariensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 251-254, 2005.

THEODORO, P. N. E. T. **Atividade *in vitro* de plantas da medicina tradicional do cerrado em dermatófitos e leveduras**. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade de Brasília, 146p, 2009.

VANDRESEN, F. **Constituição química, atividades antibacterina, antiedematogênica e toxicidade frente à *Artemia salina* da espécie vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, 182p, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA FILHO, S. A. et al. Constituintes químicos e atividade antiespermatogênica em folhas de *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 123-124, 2002.

YOSHIKAWA, M.; SHIMODA, H.; NISHIDA, N.; TAKADA, M.; MATSUDA, H. *Salacia reticulata* and Its Polyphenolic Constituents with Lipase Inhibitory and Lipolytic Activities Have Mild Antiobesity Effects in Rats. **The Journal of Nutrition**, p. 1819-1824, 2002.

YUNES, R. A. et al. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos editora universitária. 2001.

WALL, M. E. & WANI, M. C. Camptothecin and Taxol: from Discovery to Clinic. **J. Ethnopharmacol**, v. 51, p. 239, 1996.

WANG, Y. et al. Chemical constituents from *Salacia amplifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 205–208, 2011.

ZHANG, Y. et al. Absolute Structures of New Megastigmane Glycosides, Foliasalaciosides E1, E2, E3, F, G, H, and I from the Leaves of *Salacia chinensis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 56, n. 4, p. 547-553, 2008.

