



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
PLANTA *Myrsine cuneifolia* (MYRSINACEAE)**

Orientador: Professor Dr. Antônio Carlos Severo Menezes

Co-orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

Mestranda: Marcela Carmen de Melo Burger

Anápolis

2009

Catálogo na Fonte
Biblioteca UnUCET – UEG
Jerusa da Silva Alves Guimarães – CRB 1/1938

547	Burger, Marcela Carmen de Melo
B954e	<i>Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas da planta Myrsine cuneifolia(Myrsinaceae)</i> / Marcela Carmen de Melo Burger – Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, Mestrado em Ciências moleculares, 2010. 83p. il. ; 31 cm. – (Dissertação / Universidade Estadual de Goiás, Mestrado em Ciências moleculares.)

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
PLANTA *Myrsine cuneifolia* (MYRSINACEAE)

MARCELA CARMEN DE MELO BURGER

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

Aprovada por:



Prof. Dr. Antônio Carlos Sévero Menezes



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Nunes



Prof.ª Dr.ª Lucília Kato

ANÁPOLIS, GO- BRASIL
DEZEMBRO 2009

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Helena de Melo, exemplo de mulher, com as palavras certas nos momentos necessários. Pela sua raça que me proporcionou chegar até aqui, com muito amor, carinho, dedicação, paciência, força e braveza.

Aos meus padrinhos Rosimeire e Roberto pela força, atenção, amor, confiança e encorajamento que me ajudaram nesta conquista; minha madrinha Odete por estar sempre presente em todos os momentos; à Regina e Waldomiro Neto, que são considerados como pais, sendo um grande apoio na minha caminhada para essa vitória.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela minha vida, pelas oportunidades dadas, pela sabedoria e força para aproveitá-las e por me conceder mais uma vitória.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes, por todo o ensinamento, confiança, paciência, disposição, amizade, sugestões e encorajamento contínuo durante este trabalho. Aos demais mestres da casa, pelos conhecimentos transmitidos. A Unidade de Ciências Exatas e Tecnológica pelo apoio institucional.
- À Prof^ª. Dr^ª. Myrlei Luciene dos Santos, pela disposição e ajuda que foram essenciais.
- Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, membro da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade, pelo ensinamento, pela confiança, por toda dedicação e ajuda na realização deste projeto. Aos demais mestres da casa, pelos conhecimentos transmitidos. À própria UFSCar pelo apoio institucional durante os 8 meses de pesquisa e todo o suporte necessário para desenvolver a parte experimental.
- Ao projeto PROCAD pelo apoio financeiro durante os 8 meses de mestrado sanduíche na Universidade Federal de São Carlos.
- Aos colegas da UFSCar, todos os membros do PN, em especial os novos grandes amigos: Jame's pela amizade, orientação e disposição em ajudar, Titi por toda paciência e brincadeiras que tornaram os dias mais fáceis, Nayara pela doçura sempre pronta para ajudar, Tati por todo carinho, auxílio e amizade, Babi pela amizade, ajuda e companheirismo em todos os momentos, Olívia por toda descontração e carinho, Lívia pela amizade, companheirismo e pelos grandes momentos, Paulinha pela ajuda e paciência, Kátia pela atenção e amizade, Moacir pela recepção e carinho, Thiagão pela amizade e atenção, Douglas, Sabá, Cris, Marsele, Cristovam e demais colegas pela grande recepção, atenção e disposição a mim dedicados desde o primeiro momento. A Roberta, técnica do PN, por toda paciência, amizade e ajuda quando necessitei.
- À minha amiga e companheira de mestrado, Gracielle, pelo apoio, paciência, sugestões, incentivo e carinho. Aos demais colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares da UEG, em especial, Rosa e Bruna, por toda amizade e atenção. Aos alunos de iniciação científica Clayton e demais

pela ajuda e carinho. Aos técnicos de laboratório da UEG pela paciência e apoio.

- A minha maravilhosa família (mamãe, irmão, Zuíta, primos, sobrinho, cunhada, madrinhas e tios) pelo incentivo, colaboração, paciência, compreensão, companheirismo e amor durante todo este período.
- A todos os meus amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, em especial Silvinha, Kenya, Brunna, Fran, Mari, Amanda, Moema, Mariana e Carol pelo carinho de sempre e pela grande amizade apesar da distância.

“Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão, sempre, vencedores”.

M. Gandhi

CURRICULUM VITAE

1. Formação complementar:

- 2009 – 2009: Química Verde: Fundamentos e Aplicações.. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal de São Carlos.
- 2009 – 2009: Supramolecular and Biomimetic Chemistry. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal de São Carlos.
- 2009 – 2009: Química de Produtos Naturais Secundários. (Carga horária: 195h).
Universidade Federal de São Carlos.
- 2009 – 2009: Ressonância Magnética Nuclear 1D Experimental. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de São Carlos.
- 2008 – 2008: Modelagem Molecular de Fármacos. (Carga horária: 10h).
Universidade Católica de Goiás.
- 2007 – 2007: Fitoterápicos. (Carga horária: 15h).
Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil.
- 2006 – 2006: Extensão universitária em Tratamento Químico de Águas do sistema de Vapor. (Carga horária: 60h).
Universidade Estadual de Goiás, UEG, Brasil.

2. Atuação profissional

Universidade Estadual de Goiás

Vínculo institucional:

08/2006 – 10/2007: Vínculo: iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 580h, Regime: Dedicção exclusiva.

2004 – 2004: Vínculo: Monitor, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 40h. Atividades: Show da Química - Atividades de Participação em Projeto, Ciência e Tecnologia.

3. Produção bibliográfica - Apresentação de trabalhos e Resumos publicados em anais de congressos

1. BURGER, Marcela Carmen de Melo; MENEZES, A. C. S.; VIEIRA, P. C.; SILVA, J. A.; G. S. de Oliveira; LIMA, R. da S.. Inhibitory activity of myrsinoic A acid and derivatives isolated from *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) on cathepsin K. In: 2 nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, 2009, São Pedro.

2. G. S. de Oliveira; MENEZES, A. C. S.; VIEIRA, P. C.; SILVA, J. A.; BURGER, Marcela Carmen de Melo; LIMA, R. da S.. Evaluation of the inhibitory activities of

compounds isolated from *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) on cathepsin K. In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, 2009, São Pedro.

3. BURGER, Marcela Carmen de Melo; MENEZES, A. C. S.; MOURA, B. H. F.; MENDES, M. M.; NASCIMENTO, G. C.. Avaliação da Atividade Coagulante das frações Obtidas dos Frutos de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo.

4. BURGER, Marcela Carmen de Melo; MENEZES, A. C. S.; MOURA, B. H. F.; MENDES, M. M.; NASCIMENTO, G. C.. Avaliação da Atividade Hemorrágica das Frações Obtidas dos Frutos de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo.

5. NASCIMENTO, G. C.; MENEZES, A. C. S.; VIEIRA, P. C.; BURGER, Marcela Carmen de Melo; LACERDA, E. S. P.. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* (ERYTHROXYLACEAE). In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo.

6. BURGER, Marcela Carmen de Melo; ASCHERI, D. P. R.; MALHEIROS, L. V.; OLIVEIRA, V. N.. Curvas de Secagem e Caracterização de Hidrolisados de Bagaço de cevada. In: XLVII Congresso Brasileiro de Química, 2007, Cidade de Natal.

7. BURGER, Marcela Carmen de Melo; MENEZES, A. C. S.; MOURA, B. H. F.; MENDES, M. M.. Avaliação da Atividade Coagulante de Extratos Fracionados dos Frutos de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). In: V Seminário de iniciação científica, 2007, Anápolis - GO.

8. BURGER, Marcela Carmen de Melo, MENEZES, A. C. S., SANTOS, M. L., ANDRADE, R. M., BRANDEBURGO, M. I. H.; Ação Inibitória do Extrato Vegetal Bruto (Metanólico) das Folhas de *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae) sobre a Atividade Fosfolipásica In: II Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação, 2007, Anápolis.

9. BURGER, Marcela Carmen de Melo, MENEZES, A. C. S., ANDRADE, R. M., BRANDEBURGO, M. I. H., SANTOS, M. L.; Ação Inibitória do Extrato Vegetal Bruto (Metanólico) das Folhas de *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae) sobre a Atividade Fosfolipásica In: V Seminário de Iniciação Científica, 2007, Anápolis.

Organização de eventos

1. BURGER, Marcela Carmen de Melo. 2º SEMANA DA QUÍMICA. 2006.

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICA DA PLANTA *Myrsine cuneifolia* (MYRSINACEAE). A planta *Myrsine cuneifolia* é pertencente à família Myrsinaceae e ao gênero Myrsine, caracterizado sob o ponto de vista fotoquímico pela presença de alquilbenziquinonas e uma série de triterpenóides, as plantas deste gênero são conhecidas como capororoca, e vários estudos relatam atividades biológicas tais como: citotóxica, contraceptiva, biocida, anti-espermatogênica, antiséptica, bactericida, antiinflamatória, antioxidante, antiplasmodial, e contra diabetes mellitus. Após levantamento bibliográfico onde se observou que não há relatos de estudos sobre esta planta até o presente momento. Além de um grande número de compostos ter sido elucidados e as várias atividades apresentadas sobre a sua família e o seu gênero, e também pelo fácil acesso, *Myrsine cuneifolia* foi escolhida para ser estudada fitoquimicamente, e avaliada quanto ao potencial antitumoral, antimicrobiano, inseticida e contra às catepsinas K e B. Foram isolados e identificados o ácido myrsinóico A, que foi submetido às reações de modificações estruturais visando uma relação estrutura-atividade, catequina, quercetina, quercetrina e aspartato de etila, além disso foi observada a presença de vários flavonóides glicosilados, não identificados por dificuldade de isolamento.

Palavras chave: Myrsinaceae, Ácido myrsinóico A, flavonóides.

ABSTRACT

PHYTOCHEMISTRY AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY THE PLANT *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae). The plant *Myrsine cuneifolia* is owned by the family Myrsinaceae and gender Myrsine, characterized by alquilbenziquinonas and a number of triterpenoids, the plants of this genus are known as capororoca, and several studies have reported biological activities such as cytotoxic, contraceptive, biocidal, anti-spermatogenic, antiseptic, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, antiplasmodial, and against diabetes mellitus. After literature where it was observed that there are no reports of studies on this plant so far. Besides a large number of compounds have been elucidated and the various activities presented on their family and their gender, and also for easy access, *Myrsine cuneifolia* was chosen for phytochemical studies, and evaluated for potential anti-tumor, antimicrobial, insecticidal and front the cathepsin K and B. Were isolated and identified myrsinóico A acid, which was submitted to the reactions of structural changes aimed at a structure-activity relationship, catechin, quercetin, quercetrin and ethyl aspartate, also observed the presence of several flavonoid glycosides, unidentified due to difficulties in isolation.

Keywords: Myrsinaceae, myrsinóico A acid, flavonoids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Plantas Medicinais.....	4
3.2. Flavonóides	8
3.3. O Cerrado Brasileiro.....	9
3.4. A Planta <i>Myrsine cuneifolia</i> (Myrsinaceae)	10
3.5. Catepsinas	14
3.6. Antimicrobianos.....	15
3.7. Inseticidas	16
3.8. Câncer.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Materiais equipamento e Reagentes utilizados.....	18
4.2. Material botânico	19
4.3. Isolamento das substâncias	21
4.3.1. Substância 1.....	21
4.3.2. Flavonóides	23
4.3.2.1. Substância 7	23
4.3.2.2. Substância 8	24
4.3.2.3. Substância 9	25
4.3.3 Substância 10.....	27
4.4. Reações de síntese.....	27
4.4.1. Reação de Metilação	27
4.4.2. Reação de Acetilação	27
4.4.3. Reação de Hidrogenação	27
4.4.4. Reação de Acetilação da substância 5	27
4.5. Ensaio biológicos.....	28
4.5.1. Ensaio enzimáticos contra as catepsinas K e B	28
4.5.2. Ensaio antimicrobianos	28
4.5.3. Ensaio inseticida.....	30
4.5.4. Ensaio antitumoral	30
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	32
5.1. Isolamento das substâncias	32
5.1.1. Substâncias 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	32

5.1.2. Substância 7.....	39
5.1.3. Substância 8.....	41
5.1.4. Substância 9.....	43
5.1.5. Substância 10.....	50
5.2. Testes biológicos.....	56
5.2.1. Frente às catepsinas K e B.....	56
5.2.2. Antimicrobianos.....	58
5.2.3. Inseticidas.....	61
5.2.4. Antitumoral.....	62
6. CONCLUSÃO.....	64
7. BIBLIOGRAFIA.....	66

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
COSY	Correlação Heteronuclear ^1H - ^{13}C
d	Dubleto
dd	Duplo Dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
h	Altura
HMBC	Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações
HSQC	Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
Me	Metila
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Mega Hertz
ppt	Precipitado
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	Singleto
t	Triplete
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
φ	Diâmetro
IC_{50}	Concentração de inibição de 50%

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados relativos ao material vegetal de <i>M. cuneifolia</i>	20
TABELA 2 – Microrganismos utilizados para o ensaio antimicrobiano	29
TABELA 3 – Valores dos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) da substância 1	35
TABELA 4 – Valores dos espectros de RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) da substância 7 em comparação com os mesmos da literatura.....	39
TABELA 5 – Valores dos espectros de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da substância 8 em comparação com os mesmos da literatura.....	43
TABELA 6 – Valores dos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (MeOD, 400 MHz) da substância 10	52
TABELA 7 – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testadas	60
TABELA 8 – Médias da duração da fase larval e pupal, peso pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com o extrato, a 1000 mg kg ⁻¹ , de <i>M. cuneifolia</i>	61
TABELA 9 – Médias das mortalidades larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com o extrato, a 1000 mg kg ⁻¹ , de <i>M. cuneifolia</i>	62
TABELA 10 – Porcentagens de inibição celular (média) e desvio padrão das amostras testadas frente às células tumorais	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura dos primeiros compostos isolados	6
FIGURA 2 – Estruturas de famosos metabolitos secundários	7
FIGURA 3 – Esqueleto básico de um flavonóide.....	8
FIGURA 4 – Estrutura das hidroxibenzoquinonas isoladas de <i>M. guianensis</i>	10
FIGURA 5 – Flavonóide glicosilado isolado de <i>M. africana</i>	11
FIGURA 6 – Estruturas dos flavonóides glicosilados isolados de <i>M. seguinii</i>	12
FIGURA 7 – Estruturas dos ácidos isolados de <i>M. seguinii</i>	13
FIGURA 8 – Foto da planta <i>M. cuneifolia</i>	13
FIGURA 9 – Papéis fisiológicos das cisteíno proteases humanas (grupo das papaínas)	14
FIGURA 10 – Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>M. cuneifolia</i> . Partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila.....	20
FIGURA 11 – Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico dos frutos de <i>M. cuneifolia</i> . Partição em coluna cromatográfica utilizando solventes em ordem de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol	21
FIGURA 12 – Fluxograma de refracionamento da amostra MCFrEH para o isolamento da substância 1.....	22
FIGURA 13 – Fluxograma de refracionamento da amostra MCFrEA para isolamento de maior massa da substância 1.....	23
FIGURA 14 – Fluxograma de refracionamento da amostra MCFEA como etapa de isolamento da substância 7.....	24
FIGURA 15 – Fluxograma de refracionamento da fração 13B com a finalidade de isolar a substância 7.....	24
FIGURA 16 – Fluxograma de refracionamento da fração 7B com a finalidade do isolamento da substância 8.....	25
FIGURA 17 – Fluxograma de refracionamento da fração 14B com a finalidade do isolamento da substância 9.....	26
FIGURA 18 – Fluxograma de refracionamento da fração 9E com a finalidade do isolamento da substância 9.....	27
FIGURA 19 – Estrutura química do ácido myrsinóico A (S1) isolado de <i>M. cuneifolia</i> e seus derivados (S2, S3 e S4).....	32
FIGURA 20 – Estrutura química dos derivados (S5 e S6) de S1.....	33
FIGURA 21 – Espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S1.....	34
FIGURA 22 – Espectros de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) de S1.....	34
FIGURA 23 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S2.....	36

FIGURA 24 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S3.....	36
FIGURA 25 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S4.....	37
FIGURA 26 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S5.....	38
FIGURA 27 – Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de S6.....	38
FIGURA 28 – Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) de S7.....	40
FIGURA 29 – Estrutura química da catequina (S7).....	41
FIGURA 30 – Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) de S8.....	42
FIGURA 31 – Estrutura química da quercetina (S8).....	43
FIGURA 32 – Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da substância 9	44
FIGURA 33 – Anel B de um flavonóide	44
FIGURA 34 – Espectro de correlação HSQC (MeOD, 400 MHz) da substância 9	45
FIGURA 35 – Espectro de correlação HMQC (MeOD, 400 MHz) da substância 9	46
FIGURA 36 – Correlações HMBC do anel B de um flavonóide para identificação da substância 9	46
FIGURA 37 – Correlações HMBC do anel A de um flavonóide para identificação da substância 9	47
FIGURA 38 – Espectro de correlação COSY (MeOD, 400 MHz) da substância 9	48
FIGURA 39 – Interações COSY da ramnose para identificação da substância 9	48
FIGURA 40 – Espectro de RMN ¹ H (Piridina, 400 MHz) da substância 9	49
FIGURA 41 – Estrutura química da Quercetina-3-β-O-raminosídeo acetilado (S9).....	50
FIGURA 42 – Estrutura química da Quercetina-3-β-O-raminosídeo (Quercetrina).....	50
FIGURA 43 – Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 400 MHz) da substância 10	51
FIGURA 44 – Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 400 MHz) da substância 10	52
FIGURA 45 – Espectro de correlação COSY (MeOD, 400 MHz) da substância 10	53
FIGURA 46 – Espectro de correlação HSQC (MeOD, 400 MHz) da substância 10	54
FIGURA 47 – Espectro de correlação HMBC (MeOD, 400 MHz) da substância 10	55
FIGURA 48 – Estrutura química do aspartato de etila com correlação HMBC	55
FIGURA 49 – Estrutura química do aspartato de etila (S10).....	55
FIGURA 50 – Gráfico de IC ₅₀ de S1, isolado das folhas de <i>M. cuneifolia</i> , contra a catepsina K.....	56
FIGURA 51 – Gráfico de IC ₅₀ de S6 contra a catepsina K.....	57
FIGURA 52 – Gráfico de IC ₅₀ de S4 contra a catepsina B.....	57

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a utilização de plantas para o tratamento de doenças apresenta fundamental influência da cultura indígena, africana e européia. Os índios utilizavam a fitoterapia dentro de uma visão mística em que o pajé da tribo fazia o uso de plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que revelaria a erva ou o procedimento a ser seguido para a cura do enfermo. Os europeus, por meio dos padres da Companhia de Jesus, chefiados por Nóbrega, em 1579, elaboraram receitas chamadas “botica dos colégios”, obtidos a partir de plantas, para o tratamento de doenças (MARTINS, 1995).

Portanto, o uso de plantas como cura para doenças é um conhecimento tradicional, datado de centenas de anos. Ao procurar plantas para o seu sustento e alimentação, o homem, desde a pré-história, acabou descobrindo espécies de plantas com ação tóxica ou medicinal, construindo assim um conhecimento empírico das suas ações medicinais. Como exemplo tem-se o curare, um veneno utilizado nas flechas por certas tribos indígenas da floresta amazônica que deu origem à descoberta de poderosos relaxantes musculares utilizados nos dias atuais, como auxiliares indispensáveis em determinadas intervenções cirúrgicas (HOSTETTMANN, 2003).

As plantas medicinais constituem um reservatório de princípios ativos que podem ser usados como medicamento para uma infinidade de patologias. (MENDES, 2007). Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem um potencial quase inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades biológicas (WALL & WANI, 1996). A busca de plantas úteis para a saúde humana nos conhecimentos populares é de grande importância para a ciência, uma vez que essas informações podem indicar quais as plantas podem atuar sobre determinadas doenças. (MENDES, 2007).

Existe um problema: o fato de que a maioria das plantas é utilizada com base no seu conhecimento popular (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006), e muitas vezes as propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validação científica, por não terem sido investigadas ou comprovadas em testes clínicos, observando-se também escasso conhecimento dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica, ou possíveis interações que envolvam as inúmeras moléculas presentes no extrato (CALIXTO, 2003).

O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior

parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (FARNSWORTH *et al.*, 1985; KAUR *et al.*, 2005).

O surgimento do conceito “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa erradamente a “ausência de produtos químicos”, os quais muitas vezes podem causar dano ou, de alguma forma, representam perigo. Assim, produtos naturais passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos, o que nem sempre é verdade (MENGUE *et al.*, 2001).

Estritamente falando, qualquer molécula biológica é um produto natural, mas o termo é geralmente reservado para metabólitos secundários, pequenas moléculas produzidas por um organismo, mas que não são estritamente necessárias para a sobrevivência do organismo, ao contrário das macromoléculas mais prevalentes como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos que compõem a máquina de base para os processos mais fundamentais da vida. Isolamento de produtos naturais difere do das macromoléculas, porque os produtos naturais são menores e quimicamente mais diversificados do que as proteínas relativamente homogêneas, ácidos nucleicos e carboidratos, e métodos de isolamento deve levar isso em conta (CANNELL, 1998).

Os produtos naturais fornecem medicamentos úteis cuja produção na forma sintética é difícil ou muitas vezes inviável economicamente. Compostos básicos também podem ser retirados de fontes naturais que modificados tornam-se mais eficazes ou menos tóxicos (ROBBERS *et al.*, 1997). A procura de fármacos através de “screening” de uma grande variedade de vegetais para testes biológicos específicos é uma das formas racionais adotadas para a procura de fármacos de origem vegetal. (NISBET & MOORE, 1997).

No cerrado brasileiro encontra-se a família Myrsinaceae, pertencente à Ordem Primulales, que inclui cerca de 33 gêneros com 1000 espécies largamente distribuídas pelas regiões tropicais do mundo todo. Esta família é subdividida em três subfamílias: *Myrsinoideae* (31 gêneros, sendo 4 representados no Brasil: *Ardisia*, *Myrsine*, *Cybianthus* e *Stylogine* englobando 61 espécies), *Mesoideae* (Gênero *Maesa* com 100 espécies) e *Aegiceratoideae* (com 2 espécies). Do ponto de vista fitoquímico, a família é conhecida por conter benzoquinonas e taninos na maioria dos seus gêneros. O gênero *Myrsine* é composto por 140 espécies distribuídas pelo mundo, das quais 113 estão mencionadas na literatura (JANUÁRIO, 1990).

Este trabalho visou um estudo fitoquímico da planta *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) e a avaliação biológica dos seus extratos e substâncias isoladas contra às catepsinas K e B, quanto à atividade antibacteriana, quanto à atividade inseticida e contra a células tumorais.

2. OBJETIVOS

Realizar o estudo fitoquímico da planta *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae), visando a obtenção de substâncias que possam ter inibição contra as catepsinas K e B, contra a células tumorais, quanto à atividade antimicrobiana e inseticida.

2.1. Objetivos específicos

- a) Realizar o estudo fitoquímico de *M. cuneifolia*, visando à elucidação de seus constituintes químicos, sendo que se trata de uma espécie inédita.
- b) Ensaiair os extratos e substâncias isoladas de *M. cuneifolia* contra as catepsinas K e B.
- c) Determinar a atividade antimicrobiana das substâncias isoladas de *M. cuneifolia*.
- d) Observar o potencial inseticida dos extratos dos frutos e folhas de *M. cuneifolia*.
- e) Avaliar o potencial antitumoral das substâncias isoladas da planta *M. cuneifolia*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Plantas medicinais

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana (RATES, 2001). Uma estreita relação entre o homem e as plantas consideradas curativas sempre existiu em todas as fases de desenvolvimento das várias civilizações (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993).

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

Nos finais dos anos 60, grupos diferenciados da sociedade, começaram a buscar modos de vida mais em harmonia com a natureza e produtos mais naturais. Nos anos 80, o mercado de consumo na Europa e EUA absorvem esta tendência que leva a sociedade a exigir alimentos sem contaminação de pesticidas e outras substâncias tóxicas. Este movimento da sociedade conhecido como “onda verde” vem ampliando significativamente o interesse em produtos terapêuticos derivados de plantas como uma alternativa “natural” aos medicamentos sintéticos com sua costumeira lista de efeitos colaterais. Esta onda tem levado empresas de distribuição de plantas medicinais na Europa a buscar em toda parte “produtos novos” para atender o mercado em expansão (FERREIRA, 1998).

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelos homens das cavernas até as formas mais sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (LORENZI & ABREU, 2002).

Os produtos naturais fornecem medicamentos úteis cuja produção na forma sintética é difícil ou muitas vezes inviável economicamente. De fontes naturais também podem ser retirados compostos básicos que modificados tornam-se mais eficazes ou menos tóxicos (ROBBERS et al., 1997).

Atualmente, observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso desses medicamentos, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (RIBEIRO et al., 2005).

Com o aumento já descrito na utilização de fitoterápicos, cresce também o interesse na pesquisa de novas substâncias ativas, de origem vegetal, várias

empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área (CALIXTO, 2000).

Segundo Koehn e Carter (2005), cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas nesta época. Cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais. Dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde 11% são de origem vegetal e um número significativo são substâncias sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

De acordo com Fernandes (2000) o único recurso terapêutico da parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta são os fitoterápicos, cujo mercado mundial deste recurso movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Para se ter uma idéia, o Brasil exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, bardana, catuaba, ipeca e quina. Entretanto, importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro paradoxo para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta. Esta falta do status de medicamento que garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário, é um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil, como também a possibilidade de exportação (SIANI, 2000).

Os constituintes químicos, encontrados nos vegetais, são sintetizados e degradados por inúmeras reações que constituem o metabolismo das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, fazem parte do metabolismo primário das plantas. Enquanto que os compostos sintetizados por outras vias e que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, fazem parte do metabolismo secundário, logo são denominados de metabólitos secundários (SOUSA *et al.*, 1991).

Com base na sua origem biosintética, metabólitos secundários de plantas podem ser divididos em três grupos principais: (i), flavonóides e compostos fenólicos e aliados polifenólicos, (ii) terpenóides e (iii) nitrogenados, alcalóides e compostos contendo enxofre. (CROZIER, 2006).

Portanto, as plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade, assim é importante o estudo da atividade biológica dos extratos

vegetais (MACIEL et al., 2002).

No fim do século XIX e início do século XX, foram isolados os primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como morfina, estricnina, quinina (**Figura 1**) e outros, marcando uma nova era na obtenção de medicamentos e iniciando a pesquisa moderna com plantas medicinais (PHILLIPSON, 2001).

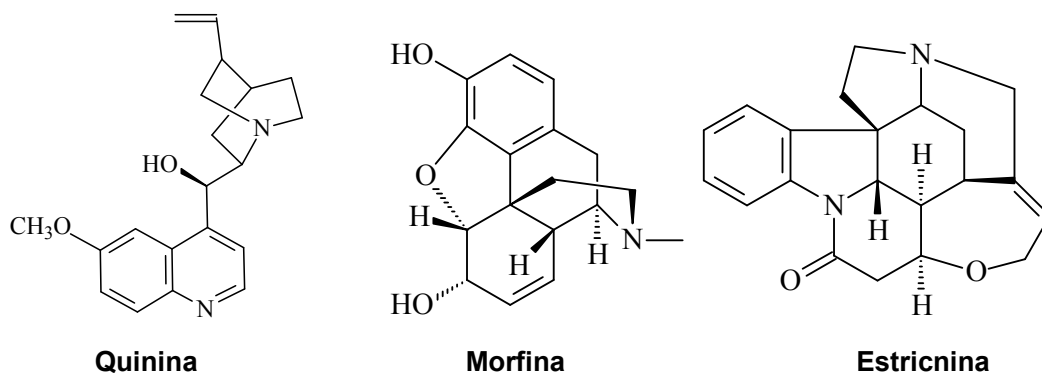
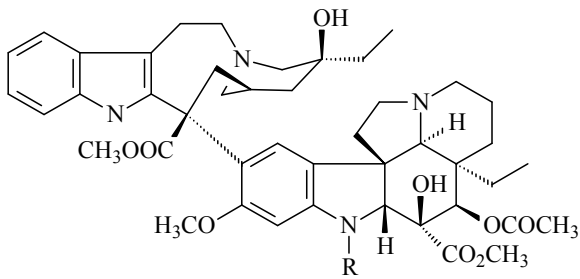


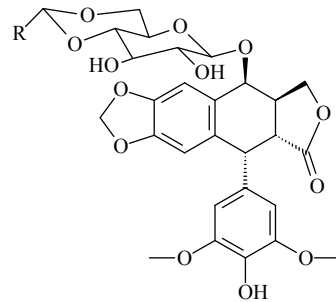
Figura 1. Estrutura dos primeiros compostos isolados

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida, ou de fármacos imprescindíveis como, vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®) extraídas da espécie *Cataranthus roseus*, drogas utilizadas no tratamento de tumores hematológicos, podofilotoxina e os análogos teniposídeo (Vumon®) e etoposídeo (Vepeside®) que tem ação reconhecida no tratamento de carcinomas testiculares, carcinomas pulmonares e leucemias não-linfocíticas, taxol (Paclitaxel; Taxol®) um diterpenoide taxano derivado de *Taxus sp* foi registrado nos E.U.A. para tratamento de câncer ovariano e depois também a camptotecina (**Figura 2**) e derivados (PINTO 2002).




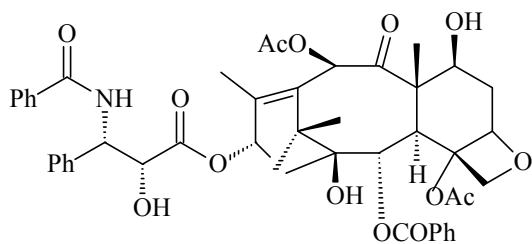
R=CH₃ Vimblastina

R=CHO Vincristina

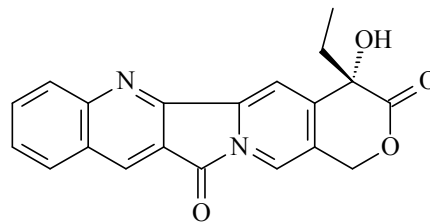


R=CH₃ Etoposídeo

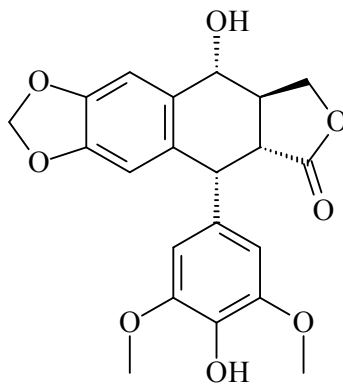
R=  Teniposídeo



Taxol



Camptotecina



Podofilotoxina

Figura 2. Estruturas de famosos metabolitos secundários

Foi registrado nos E.U.A., um medicamento (a nabilona) derivado do tetrahydrocannabinol (princípio ativo da *Cannabis sativa*) para tratamento de náuseas associadas ao tratamento quimioterápico de câncer. O ácido elágico e os tocoferóis têm sido avaliados como protótipos de agentes antimutagênicos e preventivos de cânceres. Vários produtos naturais de plantas têm sido utilizados como estruturas básicas para desenho, síntese e desenvolvimento de novos medicamentos. Alguns

produtos naturais que eram obtidos de plantas, como a cafeína, teofilina, efedrina, emitina, papaverina, L-DOPA, ácido salicílico etc, agora são produzidos comercialmente por síntese química. Outros produtos naturais obtidos de plantas servem como modelos químicos para a estrutura e a síntese de novos medicamentos. Como exemplos, a beladona, a fisostigmina, a quinina, a cocaína, os opiáceos, a papaverina e o ácido salicílico têm servido de modelos como estrutura e para síntese de drogas anticolinérgicas, anticolinesterases, antimaláricas, assim como a benzocaína, procaína, lidocaína, aspirina dentre outras (GARCIA, 1995).

A medicina natural com toda sua tradição milenar é agora um novo conceito de mercado. A necessidade exige e a ciência busca a unificação do progresso com aquilo que a natureza oferece, respeitando a cultura do povo em torno do uso de produtos ou ervas medicinais para curar os males. Nos dias atuais, cientistas pesquisam as plantas com poder de curar à luz da fitoterapia que confirma cientificamente os conhecimentos populares sobre estas plantas (ACCORSI, 2000).

3.2. Flavonóides

Flavonóides são metabolitos secundários, heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo substâncias fenólicas do tipo $C_6-C_3-C_6$. Apresentam-se como sólidos coloridos, por exemplo, amarelos, ou ainda incolores e concentram-se mais nas partes aéreas das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e rizomas (DEWICK, 2002).

Na nomenclatura usual, os anéis são designados como anéis A, B e C e os átomos de carbono individuais são referidos por um sistema de numeração que utiliza números arábicos para os anéis A e C e os mesmos marcados com (') para o anel B (**Figura 3**) (MARKHAM, 1982).

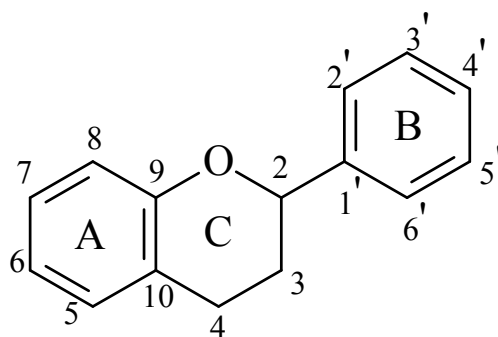


Figura 3. Esqueleto básico de um flavonóide.

Os flavonóides têm origem biossintética mista, ou seja, parte do seu esqueleto deriva do caminho do acetato e a outra parte deriva do caminho do chiquimato, mais

precisamente do ácido p-cumarico (DEWICK, 2002).

3.3. O Cerrado Brasileiro

O Brasil está entre os 12 países com maior biodiversidade. A variedade de espécies de plantas é impressionante e o Brasil é particularmente rico em plantas medicinais (BOLZANI et al., 1999).

O Cerrado brasileiro destaca-se mundialmente pelo seu alto grau de biodiversidade e ocorrência de espécies endêmicas, situação que resulta do mosaico de habitats característico das regiões abrangidas por esse bioma (LE BOURLEGAT, 2003). É o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia (BORLAUG, 2002). Forma um relevante conjunto de ecossistemas com cerca de 2.000.000Km², representando 25% do território nacional. Ele engloba 1/3 da biota nacional. Possui o segundo maior conjunto de animais da Terra e tem uma riqueza biológica estimada em 160.000 espécies de plantas e animais que corresponde a 5% da flora e fauna mundiais (GUIMARÃES et al., 2006). Este bioma apresenta clima tropical, vegetação peculiar, baixa fertilidade de solo, predomínio de uma longa estação seca, bem como, material para a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças (MANS et al., 2000).

O cerrado é de grande importância para a economia do país, as plantas que servem de alimentos têm muitas variedades. Utilizam na maior proporção os frutos de araticum (*Annoma crassiflora Mart*), caju (*Anacardium spp.*), curriola (*Pouteria ramiflora Radlk.*), ingá (*Inga uruguensis*), muríci (*Byrsomima sp.*), pequi (*Cariocarpus brasiliensis*), dentre outras. Os homens do cerrado trabalham, constroem casas, curais e instrumentos com a madeira do carvoeiro (*Sclerolobium paniculatum Vog.*), jacaré (*Piptadenia sp.*), marinho (*Guarea guidonea (L.) Sleumer*), e muitas outras. Muitas plantas são utilizadas na medicina popular ou caseira pelas populações tradicionais como algodãozinho (*Cochlospermum regium Mart et Schl*), anador (*Alternanthera sp.*), assa peixe (*Vernonia sp.*), bananeira (*Salvertia convallariodora A.St. Hil.*), cabelo-de-negro (*Oureata hexasperma (St. Hil.) Bail.*), carrapicho (*Acanthospermum sp.*), caroba (*Jacaranda ruffa Manso*), cascavel (*Crotalaria sp.*), chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus (Kunth.)*), favela (*Dimorphandra molis Benth*), gervão (*Stachytarpheta chamissonis Walp*), graviola-do-cerrado (*Annona sp.*), imbé (*Philodendron sp.*), pau santo (*Kielmeyra coriacea Spr.*), pé-de-perdiz (*Croton antissiphylyticus St. Hil.*), roseira (*Kielmeyera sp.*), barbatimão (*Stryphnodendron sp.*), sabugueiro (*Sambucus australis Cham.*), azedinho (*Oxalis hirsutissima Mart & Zuuc*), buchinha (*Luffa operculata Cogn.*), anilinho (*Indigofera sp.*), salsa-do-campo (*Smilax sp.*), sangue-de-cristo (*Sabicea brasiliensis Wernh*), tiborna (*Himatanthus obovatus M. Arg.*), trançagem (*Plantago major*

L.), furquilha de pote (*Croton sp.*), velame branco (*Macrosiphonia velame St. Hil.*), porrete de malina (*Dalechampia sp.*); dessas plantas geralmente utilizam-se as folhas, a entrecasca e as raízes. (RIGONATO & ALMEIDA, 2003).

3.4. *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae)

A família Myrsinaceae, pertence à Ordem Primulales, inclui cerca de 33 gêneros com 1000 espécies largamente distribuídas pelas regiões tropicais do mundo todo. Esta família é subdividida em três subfamílias: *Myrsinoideae* (31 gêneros, sendo 4 representados no Brasil: *Ardisia*, *Myrsine*, *Cybianthus* e *Stylogine* englobando 61 espécies), *Mesoideae* (Gênero *Maesa* com 100 espécies) e *Aegiceratoideae* (com 2 espécies). Do ponto de vista fitoquímico, a família é conhecida por conter benzoquinonas e taninos na maioria dos seus gêneros. O gênero *Myrsine* é composto por 140 espécies distribuídas pelo mundo, das quais 113 estão mencionadas na literatura (JANUÁRIO, 1990).

Várias plantas do gênero *Myrsine* apresentam diversas atividades, dentre elas atividade bactericida do composto Rapanone (**Figura 4 – (1)**), um dos principais compostos encontrados em *Myrsine guianensis*, que mostrou atividade contra bactérias gram-positivas e gram negativas (REGUERO et al., 1989). Desta mesma espécie foi isolado outro alquilbenzoquinona, o embeline (**Figura 4 – (2)**), ambos possuem atividade contraceptiva. CORDERO et al (2004) realizou testes de citotoxicidade com o rapanone, e observou a atividade positiva desta substância frente às quatro linhagens de células: células de adenocarcinoma (HT-29), células de epelioma (Hep-2), células do câncer de mama (MCF-7) e células do câncer de estômago (MKN-45).

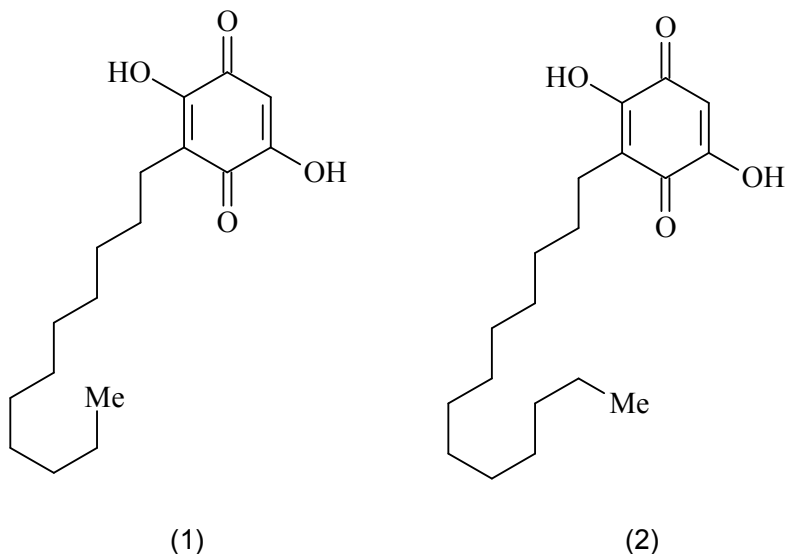


Figura 4. Estrutura das hidroxibenzoquinonas isoladas de *M. guianensis*.

LAURENCE et al (1996) revela o isolamento de flavonóide glicosilado, myrcetina-3-O-rhaminosideo (**Figura 5**), em *Myrsine africana* (Myrsinaceae). Posteriormente, GATHUAMA et al (2004) realizou estudos avaliando a eficácia da *M. africana* contra vermes platelmintos, e obteve resultados bastante promissores.

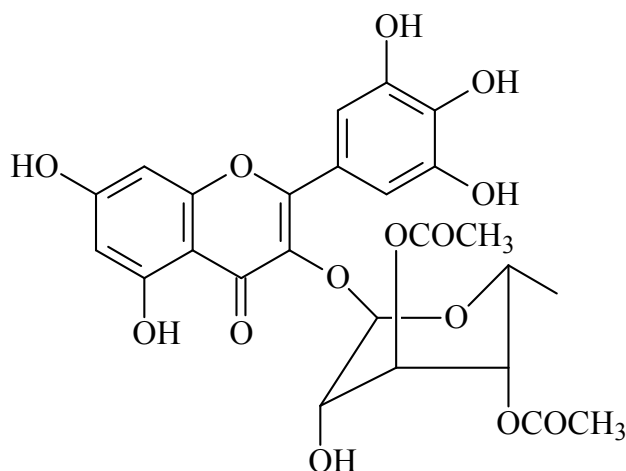


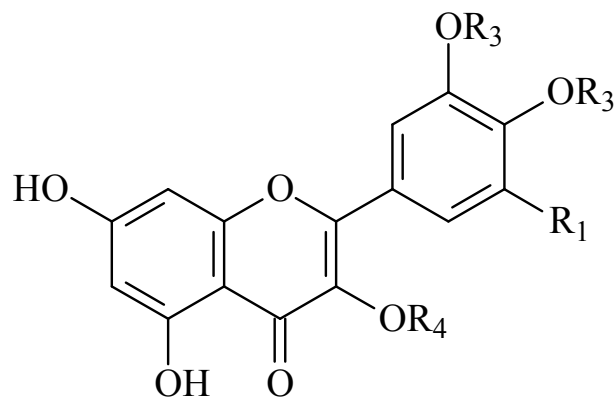
Figura 5. Flavonóide glicosilado isolado de *M. africana*.

ILZA et al (2000) determinou a presença de glicosídeos cianogênicos em *Myrsine umbellata*.

BHANDARI (2008) revela que a planta *Embelia ribes* (conhecida popularmente por Vidanga), pertencente à família Myrsinaceae, possui atividade contra diabetes mellitus.

O extrato clorofórmico de *Maesa lanceolata* (Myrsinaceae) apresentou promissora atividade antiplasmodial no estudo feito por KATUURA et al (2007). BAGALWA & CHIFUNDERA (2007) observou que saponinas isoladas também de *M. lanceolata* apresentaram atividade biocida positiva contra insetos aquáticos adultos (*Aeschnidae*, *Coenagrionidae*, *Hydrobidae*), mosquitos (*Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, *Culex sp*), caracóis (*Biomphalaria pfeifferi* e *Lymnae natalensis*), furcocercária do *Schistosoma mansoni* e peixes (*Haplochromis sp*, *Oreochromis nilotica* e *Oreochromis macrochir*) mas é prejudicial para a bioma aquático.

ZHONG et al (1997) descreveu a presença de flavonóides glicosilados (**Figura 6**) em *Myrsine seguini*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1 - Quercetrina	H	H	H	Rha
2 - Quercetina-3-rhaminosideo-3'-glicosideo	H	H	Glc	Rha
3 - Myricetrina	OH	H	H	Rha
4 - Myrecetina-3-rhaminosideo-3'-glicosideo	OH	H	Glc	Rha
5 - Myricetina- 3,4'-dirhamnoside	OH	Rha	H	Rha
6 - Quercetina-4'-glicosideo	H	Glc	H	H

Figura 6. Estruturas dos flavonóides glicosilados isolados de *M. seguinii*.

Posteriormente, DONG et al (1999) determinou um ácido benzóico chamado ácido myrsinóico A (**Figura 7**), do extrato metanólico das folhas de *Myrsine seguinii*, e testou a atividade antiinflamatória do mesmo e três derivados, obtendo resultados positivos, sendo o ácido myrsinóico A o mais ativo. Mais tarde, HIROTA *et al* (2002) determinou mais outros três ácidos benzóicos, chamados ácidos myrsinóicos B, C e F (**Figura 7**), do mesmo extrato, estes também apresentaram atividade antiinflamatória.

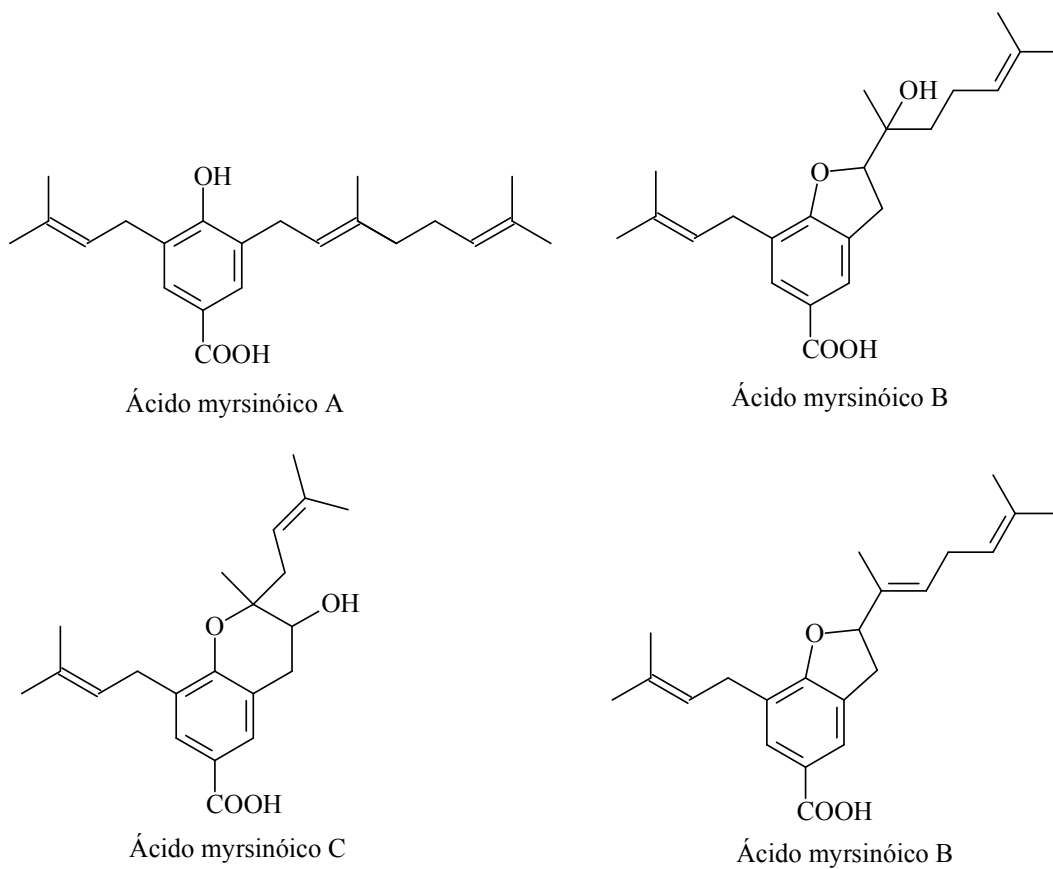


Figura 7. Estruturas dos ácidos isolados de *M. seguinii*.

Não há registros na literatura de estudos sobre a planta *Myrsine cuneifolia*, diante do exposto sobre sua família e gênero e auxiliado pelo fácil acesso, *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) (**Figura 8**) foi escolhida para estudo.



Figura 8. Foto da planta *M. cuneifolia*.

3.5. Catepsinas

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, devido principalmente ao seu papel essencial em inúmeras vias bioquímicas associadas a desordens e doenças em humanos. A aspirina (acetilsalicilato), por exemplo, inibe a enzima que catalisa a primeira etapa na síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em muitos processos, incluindo alguns que produzem dor (LEHNINGER, 2006).

Catepsinas, também conhecidas como proteases lisossomais, estão envolvidas em muitas situações patológicas como o câncer e a osteoporose, sendo intensamente estudadas como potentes alvos terapêuticos. Cisteíno proteases podem ser agrupadas em duas superfamílias: a família das enzimas relacionadas à conversão enzimática de 1- β -interleucina e a superfamília papaína de cisteíno proteases (CHAPMAN et al., 1997). Na base de dados do projeto genoma humano há 11 catepsinas (grupo das papaínas), suas funções fisiológicas são descritas na **Figura 9** (LECAILLE et al., 2002).

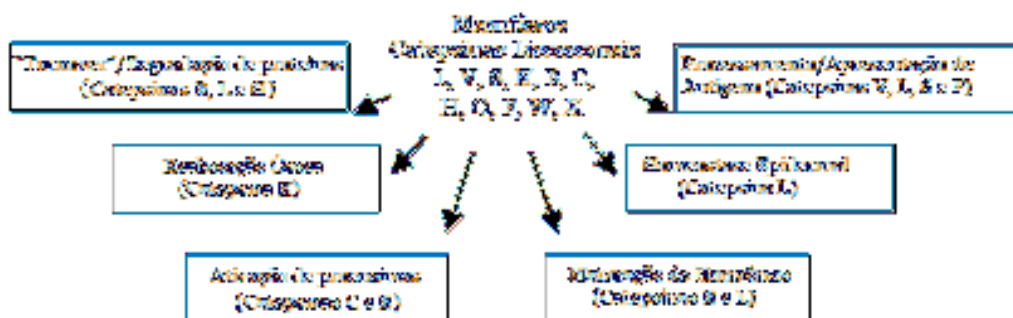


Figura 9: Papéis fisiológicos das cisteíno proteases humanas (grupo das papaínas)

As catepsinas K e B são exemplos das numerosas cisteíno catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W), e todas elas estão envolvidas na degradação de proteínas intracelulares. Algumas dessas enzimas têm uma larga distribuição tecidual (catepsinas L e B) enquanto outras possuem uma distribuição bem mais seletiva (catepsinas K, S e W) (ROBICHAUD et al., 2003).

O papel crítico da catepsina K na reabsorção óssea foi claramente confirmado pela descoberta de que a deficiência da catepsina K no ser humano leva a uma desordem óssea denominada picnodisostose (YASUDA, 2005). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu osteoporose como sendo uma doença sistêmica do esqueleto, caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da micro-

arquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e tendência à ocorrência de fraturas (BERNARDES, 2003).

Estudos recentes e investigações clínicas verificaram que a catepsina B é um indicador altamente confiável para o diagnóstico e o prognóstico do câncer metastático e invasivo (COUTO et al., 2007). A alta atividade da catepsina B é freqüentemente observada em vários tumores, localizada na membrana plasmática das células tumorais para garantir a degradação da matriz extracelular e lâmina basal nos processos de invasão (TALIERI et al., 2004). Os tumores malignos são, em sua maioria, não encapsulados e invasivos, o que dificulta a sua ressecção cirúrgica. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando assim, a oportunidade de disseminação ou metástase (COTRAN, 2000). A Estimativa de Incidência do Câncer no Brasil revela que aproximadamente 470 mil novos casos da doença deverão ocorrer no país em 2008 e 2009. O tipo mais incidente será o câncer de pele não melanoma, com 115.010 casos a cada ano. Em seguida, vêm: câncer de próstata (49.530 novos casos), mama (49.400), pulmão (27.270), cólon e reto (26.990), estômago (21.800) e colo de útero (18.680) (MINISTERIAO DA SAÚDE, 2009).

3.6. Antimicrobianos

As bactérias de modo geral são causadoras de diversas patologias. A gravidade da infecção depende de diversos fatores, dentre eles a imunidade do hospedeiro, bactéria causadora, local da infecção, resistência da bactéria a antibióticoterapia. As bactérias implicadas nestas infecções podem ser verdadeiramente patógenas ou patógenas oportunistas (TRABULSI *et al.*, 1999).

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta. Torna-se urgente adotar, portanto, medidas de enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de antibióticos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sintéticas e naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI) (PINTO *et al.*, 2003).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais e compostos isolados. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Para determinar a CMI ou

a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição, utilizando utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL, mais barato e cerca de 30 vezes mais sensível que outros métodos encontrados em literaturas, desenvolvido por Eloff em 1998. O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (Pinto et al., 2003).

3.7. Inseticidas

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma das principais pragas da cultura do milho, podendo seu dano levar à redução de até 34% no rendimento de grãos, dependendo principalmente, do estágio de cultura em que ocorre o ataque (VALICENTE & CRUZ 1991).

A lagarta-do-cartucho ocorre durante todo o ano, é uma praga polífaga que além do milho ataca também sorgo, soja, trigo, algodão, alfafa, amendoim, arroz, capins, aveia, batata doce, cana-de-açúcar e hortaliças. Os adultos migram de uma lavoura a outra e até para outras regiões pelo próprio vôo e pelo vento (VIANA et al., 2001).

No milho, a lagarta é usualmente controlada usando agrotóxicos, empregados quando a desfolhação é notada nas plantações. No entanto, problemas associados com o uso de pesticidas, especialmente a possibilidade de resistência e redução de predadores e insetos parasitóides, comprometem o controle natural (CRUZ, 1995).

Novas substâncias naturais são excelentes opções para o efetivo controle de pragas, já que podem oferecer maior segurança, seletividade, biodegradabilidade mais rápida que os sintéticos, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixos impactos ambientais, não deixando resíduos nos alimentos ou no meio ambiente (VIEGAS, 2003).

Diante do exposto e importante a busca de substâncias que auxiliem na redução das lagartas para o melhoramento da cultura do milho.

3.8. Câncer

Por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, o câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade. A palavra *cancer* vem do latim e significa “caranguejo” e pode ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento da doença que é infiltrante, podendo ser comparado às pernas do

crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (ALMEIDA, 2005).

As neoplasias são classificadas em benignas e malignas, na maioria dos casos, os tumores benignos possuem crescimento e expansão lenta, e usualmente são envolvidos por uma faixa de tecido conjuntivo denominada cápsula fibrosa. Esse encapsulamento tende a manter a neoplasia benigna como massa isolada, podendo se facilmente retirada por rescisões cirúrgicas. Os tumores malignos são, em sua maioria, não encapsulados e invasivos, o que dificulta a sua ressecção cirúrgica. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando assim, a oportunidade de disseminação ou metástase. (COTRAN, 2000).

O câncer é uma das doenças mais prevalentes no Brasil e no mundo. Atualmente, a radioterapia e a quimioterapia são utilizadas como tratamento de primeira escolha para esta doença e caracterizam-se por não possuir toxicidade seletiva, causando sérios efeitos adversos como a inibição da resposta imunológica e a mielossupressão. O desenvolvimento de novas drogas, visando terapias mais eficientes, vem aumentando a procura por fitoterápicos para o tratamento do câncer (MELO, 2004).

Na literatura fica comprovado que vários extratos de plantas apresentam resultados significativos em relação à atividade citotóxica. Pode-se destacar, os estudos realizados por LIMA (2005) com extratos das plantas *Jodina rhombifoila* e *Carapa guianenses*, onde foi verificado através de testes *in vitro* os efeitos antiproliferativos dos extratos sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano. O extrato bruto de *Bauhinia microstachya*, reduz o crescimento tumoral e estimula a hematopoese, segundo BREHMER (2005). MADJAROF (2004) verificou atividade positiva do extrato bruto hidroalcoólico obtido de *Didymopanax vinosum*, principalmente para as linhagens celulares de (UACC) melanoma, rim (786.0), leucemia (K.562) e próstata (PC.03).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Materiais equipamento e Reagentes utilizados*

A) Suportes para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica gel 230-400 mesh (sílica gel flash), para cromatografia em coluna (CC);
- Sephadex LH-20.

B) Eluente utilizados para preparação dos extratos brutos

- Foram utilizados solvente PA da Merck;

C) Eluentes utilizados para cromatografia

- Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar;
- Solventes de grau cromatográfico Tedia utilizados para análises de CLAE.

D) Solventes utilizados para análise espectroscópicas

- Solventes da Cambridge Isotope Laboratories, Inc e Isotes Inc (RMN) 98-99,9% deuterados

E) material utilizado nos ensaios enzimáticos

- Fluorímetro GEMINI – XS
- Substrato fluorogênico Z-FRMCA (Sigma)
- Placas 96 poços (placas de Elisa)
- Catepsinas K e B
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma
- DTT

F) Material utilizado nos ensaios antimicrobianos

- Caldo Mueller Hinton – DIFCO
- Agar Mueller Hinton – DIFCO
- Caldo Sabouraud - DIFCO
- Cloreto de sódio – Sigma
- Solução reveladora TTC (sal de 2,3,5-trimetil-tetrazólio) – Mallinckrodt
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma
- Placas 96 well (placas de Elisa)
- Tubo padrão de sulfato de bário (0.5 da escala de McFarland: 10^8 UFC/mL)
- Antibióticos padrões:
 - Nistatina
 - Cloridrato de Vancomicina – VANCOCINA CP (ABL)
 - Cloridrato de Tetraciclina – TETRACLIN (TEUTO)

G) Cromatógrafo para CLAE

- Shimadzu LC-10AD (Preparative Liquid Chromatograph)
- Detector: Shimadzu SPD-6AV; UV-VIS Spectrophotometric detector
- Estufa FANEM 347 CD

- Coluna de fase estacionária C-18 ODS Phenomenex (150 x 4,6 mm), fase reversa.

H) Espectrômetro de RMN (Pertencentes a Universidade Federal de São Carlos):

- Brüker DRX 4200 MHz
- Brüker DRX 400 MHz

I) Balança Analítica

- Mettler P163

J) Rotoevaporador rotativo

- TECNAL (TE120)

K) Cromatografia em coluna:

- colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem cromatografadas.

L) Cromatografia em camada delgada:

- folhas de alumínio (com sílica gel 60 F254, $\phi = 0,2$ mm) - Merck.

M) Reveladores:

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

N) Moinho

- Moinho de facas tipo cróton Modelo MA-580

O) Material utilizado no ensaio inseticida

- Água destilada
- Ágar
- Extrato de levedura
- Gérmen de trigo
- Ácido sórbico
- Ácido ascórbico
- Formaldeído 40 %
- Tetraciclina (50 mg)
- Nipagin (1,1 g)
- Feijão carioquinha

4.2. Material botânico

As folhas e frutos de *Myrsine cuneifolia* foram coletados no mês de Setembro de 2008, em Anápolis-Goiás, no Campus da Universidade Estadual de Goiás, após identificação realizada pela Prof^a Dr^a Mirley Luciene dos Santos. A exsiccata do material vegetal, n^o=4215, foi depositada no herbário do Departamento de Ciências Biológicas

da Universidade Estadual de Goiás. As quantidades do material vegetal coletado estão descritos na **tabela 1**.

Parte da Planta	Quantidade
Folhas (F)	Secas: 675,5g
Frutos (Fr)	Frescos: 412,5g

Tabela 1. Dados relativos ao material vegetal de *M. cuneifolia*

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar à temperatura de aproximadamente 50°C, moídas em moinho de facas e depois foram feitas extrações exaustivas com etanol a frio. Os frutos foram macerados e também levados a extrações exaustivas com etanol a frio. Em ambos o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, à temperatura de 45°C, e à pressão reduzida, sendo obtido os extratos bruto etanólicos das folhas e dos frutos (MCFE e MCFrE, respectivamente).

O extrato bruto etanólico das folhas foi fracionado por partição líquido-líquido utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo-se frações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidroalcolica (MCFEH, MCFED, MCFEA e MCFEW, respectivamente). Após a adição do hexano e do diclorometano houve a formação de dois precipitados (MCFEHppt e MCFEDppt, respectivamente) (**Figura 10**).

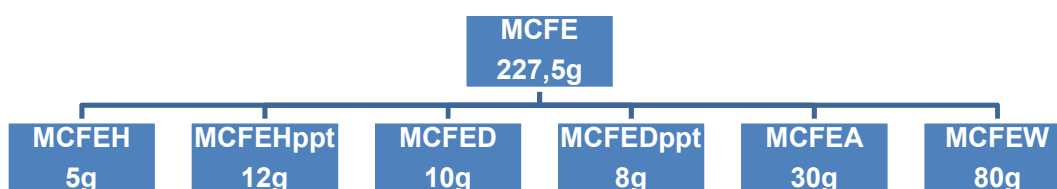


Figura 10. Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico das folhas de *M. cuneifolia*. Partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila.

Já o extrato bruto dos frutos foi fracionado por cromatografia em coluna ($\varphi = 3$ 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, diclorometânica, acetato de etila e metanólica (MCFrEH, MCFrED, MCFrEA e MCFrEW, respectivamente) (**Figura 11**).

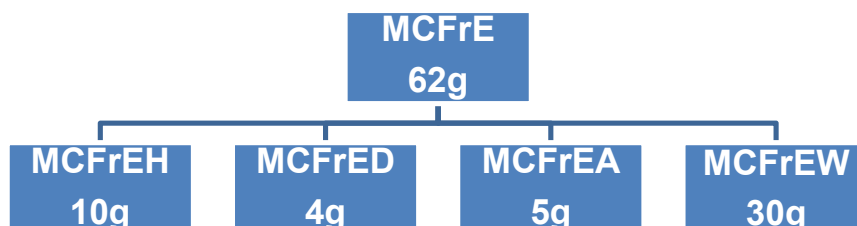
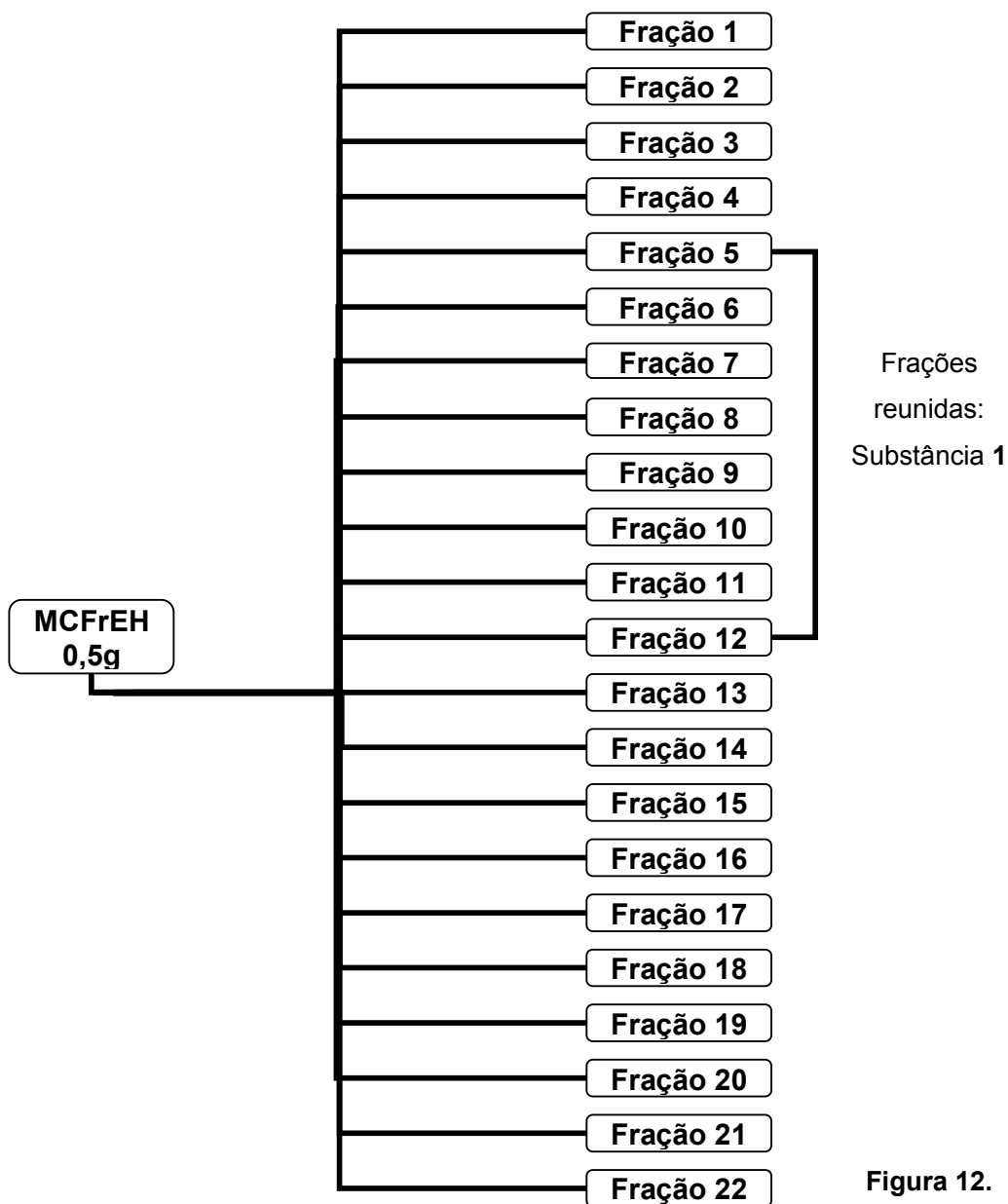


Figura 11. Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico dos frutos de *M. cuneifolia*. Partição em coluna cromatográfica utilizando solventes em ordem de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

4.3. Isolamento das substâncias

4.3.1. Substância 1

A fração MCFrEH (10,5g) foi refractionada por cromatografia em coluna isocrática utilizando como fase estacionária Sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-acetato de etila 5% ($\varphi=3$ cm x h=19cm) (**Figura 12**). Por meio deste refractionamento foi possível a obtenção da substância 1, pela reunião das frações de 5 a 12.



Frações
reunidas:
Substância 1

Figura 12.
Fluxograma

de refração da amostra MCFrEH para o isolamento da substância 1.

A fração MCFrEA (1,5g) foi refraçãoada por cromatografia em coluna isocrática utilizando como fase estacionária Sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-acetato de etila 5% ($\varphi=3,5\text{cm} \times h=20\text{cm}$) (**Figura 13**). Por meio deste refraçãoamento foi possível a obtenção de mais massa da substância 1, pela reunião das frações de 5A a 10A.

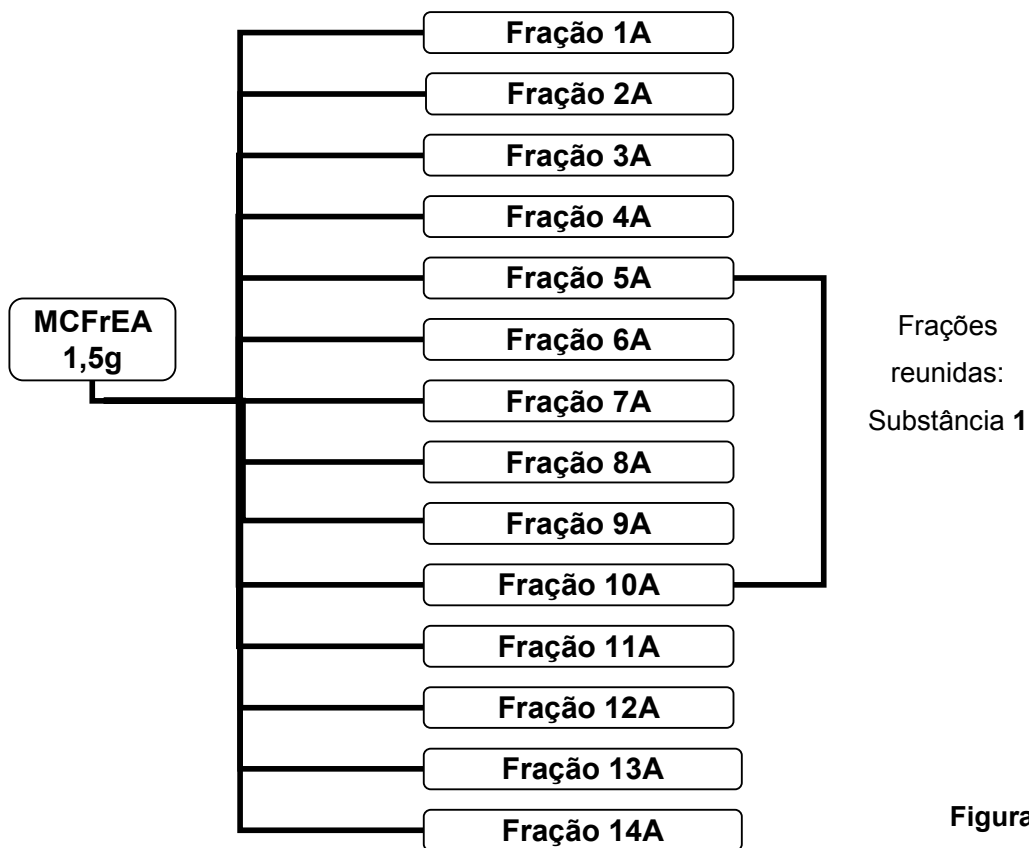


Figura 13. Fluxograma de refração da amostra MCFrEA para isolamento de maior massa da substância 1.

4.3.2. Flavonóides

O estudo fitoquímico da fração MCFEA de *M. cuneifolia* resultou no isolamento e identificação de três flavonóides: substâncias 7, 8 e 9.

4.3.2.1. Substância 7

Primeiramente a fração MCFEA (5g) foi submetida à Cromatografia em Coluna utilizando como fase estacionária Sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-metanol 10% ($\varphi=5,5\text{cm} \times h=24\text{cm}$) (**Figura 14**). Após este refração as frações foram observadas por CCD e a fração 13B (500mg) foi refração por cromatografia em coluna utilizando sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-metanol 10% ($\varphi=3\text{cm} \times h=15\text{cm}$) (**Figura 15**), novamente as frações foram observadas por CCD, e a fração 3C (150mg) submetida à separação por CLAE, coluna preparativa C18, phenomenex, ($\varphi=1\text{cm} \times h=30\text{cm}$), utilizando como fase móvel metanol-água 25%. Assim foi possível obter da substância 7.

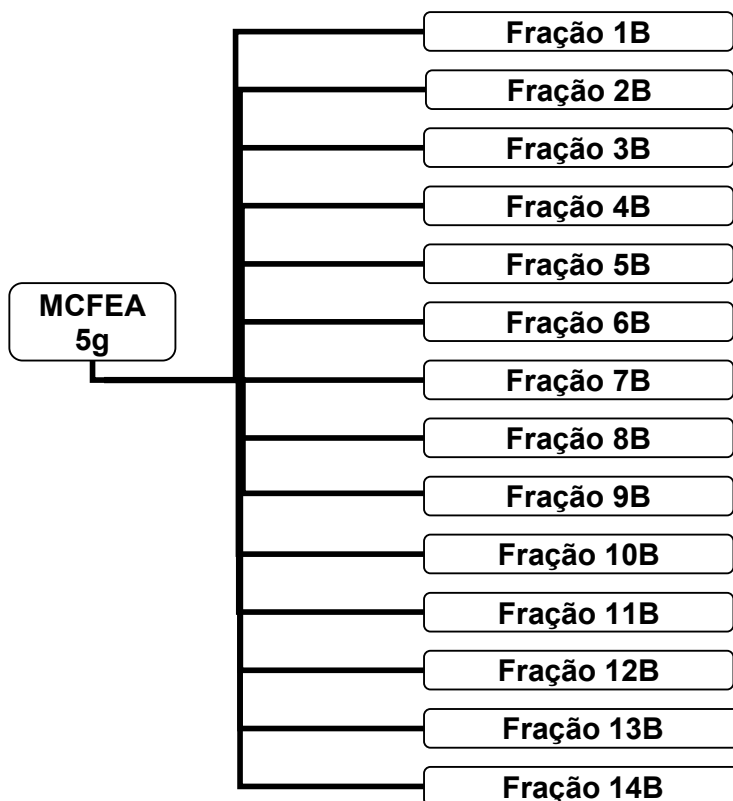


Figura 14. Fluxograma de refração da amostra MCFEA como etapa de isolamento da substância 7.

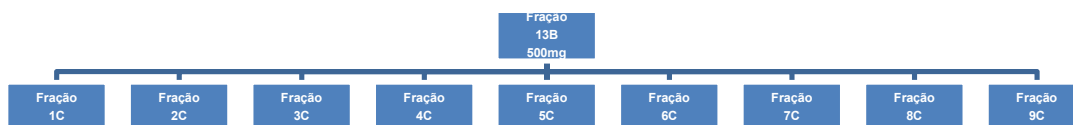


Figura 15. Fluxograma de refração da fração 13B com a finalidade de isolar a substância 7.

4.3.2.2. Substância 8

A fração 7B (400mg) foi refração por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-metanol 4% ($\varphi=3\text{cm} \times h=19\text{cm}$) (**Figura 16**). A fração 11D (50mg) foi observada que se dividia em duas por solubilidade, uma parte era solúvel em diclorometano e outra

em metanol, assim estas foram separadas e por CCD em uma das partes foi observado à presença de uma só substância, assim foi obtida a substância **8**.

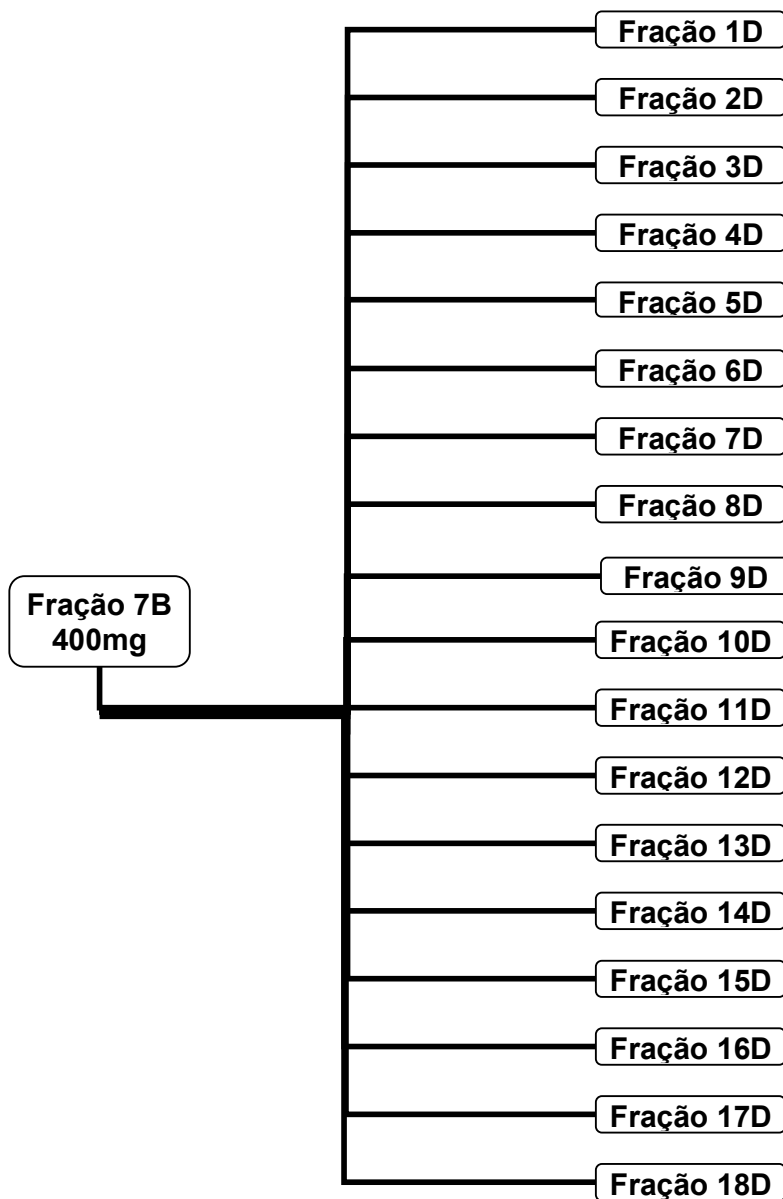


Figura 16. Fluxograma de refração da fração 7B com a finalidade do isolamento da substância **8**.

4.3.2.3. Substância **9**

Primeiramente a amostra 14B (700mg) foi submetida à reação de acetilação através da adição de 10 mL de piridina e 10 mL de anidrido acético, a reação foi confirmada por CCD assim como foi observado que não houve contaminante e subprodutos. Depois esta fração foi levada a cromatografia em coluna utilizando-se

como fase estacionária sílica flash 230-400 mesh e como fase móvel diclorometano-metanol 10% ($\varphi=5\text{cm} \times h=12\text{cm}$) (**Figura 17**). Após este fracionamento as frações foram observadas por CCD e a fração 9E (225mg) foi refracionada por cromatografia em coluna utilizando sephadex e como fase móvel metanol-diclorometano 10% ($\varphi=2,5\text{cm} \times h=87\text{cm}$) (**Figura 18**), novamente as frações foram observadas por CCD, e a fração 3F foi submetida à separação por CLAE, coluna de exclusão por tamanho, shodex, utilizando como fase móvel metanol, fluxo de 3mL/min, em reciclo durante 6 horas, sendo a corrida de 50 minutos, e o comprimento de onda utilizado foi de 254nm. Assim foi possível obter da substância **9**.

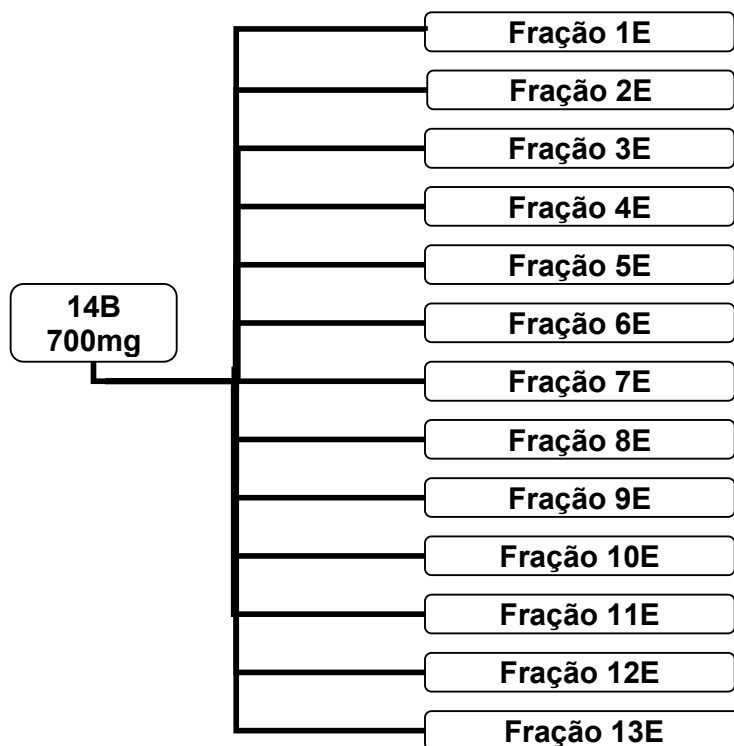


Figura 17. Fluxograma de refracionamento da fração 14B com a finalidade do isolamento da substância **9**.

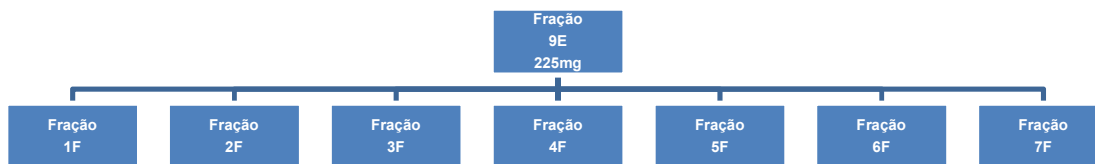


Figura 18. Fluxograma de refração da fração 9E com a finalidade do isolamento da substância **9**.

4.3.3. Substância 10

A fração 9C (**Figura 15**) foi observada por CCD e obtivemos a substância **10**.

4.4. Reações de Síntese

4.4.1. Reação de Metilação

Acidionou-se 10ml de diazometano a 7mg de ácido myrsinóico A, deixou-se ao ar livre até secagem e através da análise de CCD percebeu-se a presença de mais de uma substância, os quais foram separados por cromatografia em coluna ($\varphi=2\text{cm} \times h=13\text{cm}$), utilizando sílica flash 230-400 mesh, isocrática: hexano-diclorometano 25%. Assim foram obtidas as substâncias **2** e **3**. A quantidade obtida dos compostos foi 1,5 mg e 1 mg, respectivamente.

4.4.2. Reação de Acetilação

Solubilizou-se 10 mg do ácido myrsinóico A em 1mL de piridina e adicionou-se 2mL de anidrido acético em 10mg de ácido myrsinóico A, deixou-se secar ao ar livre, por CCD confirmou-se a reação e observou-se que durante esta não houve contaminação e nem subprodutos, assim foi obtida a substância **4**.

4.4.3. Reação de Hidrogenação

Primeiramente solubilizou-se 20mg de ácido myrsinóico A em 4mL de metanol, adicionou-se 10mg de paládio-carvão (Pd-c), e deixou-se em contato com o gás hidrogênio durante 12h, sob agitação constante, após este tempo filtrou-se com celite, obtivemos a substância **5**.

4.4.4. Reação de Acetilação da Substância 5

A substância **5** (5mg) foi submetida à reação de acetilação, através da adição de 0,5 mL de piridina e 1mL de anidrido acético, a reação foi confirmada por CCD e

obtivemos a substância **6**.

4.5. Ensaios biológicos

4.5.1. Ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas K e B

Os ensaios enzimáticos frente às catepsinas foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética e Bioquímica em colaboração com a Prof^a Dr^a. Heloisa Araújo, na Universidade federal de São Carlos (UFSCar).

A atividade enzimática foi determinada pelo aumento de fluorescência devido à hidrólise dos substratos que serão continuamente registradas. A leitura foi convertida em μ moles de substrato hidrolisado por minuto a partir das curvas de fluorescência das soluções de substrato antes e depois da hidrólise total. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando o programa Origin.

As atividades enzimáticas frente aos inibidores naturais foram determinadas pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-FRMCA (SIGMA). Essa medida foi monitorada por um fluorímetro de placa de 96 poços, com fenda de excitação ajustada para λ_{ex} 380 nm e emissão λ_{em} 460 nm. Nas determinações, as placas foram mantidas em compartimento termostaticado (27 °C). As enzimas são pré-ativadas com DTT (2,0 mM) por 5 min. Em seguida adiciona-se 5 μ L da solução a ser testada (extrato ou substância pura) e deixa-se pré-incubando por 5 min. Em seguida adiciona-se 10 μ M de Z-FR-MCA, substrato para realização do teste, e realiza-se a leitura em tempo real. Os ensaios com a catepsina K e B foram realizados em fluorímetro GEMINI – XS, com placa de ELISA preta de 96 poços e com volume final de 200 μ L.

4.5.2. Ensaios antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS, 2003) e adaptação das normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS, 2002).

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (ELISA), onde diluições seriadas em triplicatas das amostras e antibióticos de referência foram preparadas usando caldo de Mueller-Hinton para o crescimento das bactérias e caldo Sabouraud para leveduras. As amostras foram transferidas para as placas de microdiluição depois de dissolvidas no solvente (DMSO: amostras polares, Tween 80: amostras de média polaridade e apolares) e caldo seletivo de crescimento microbiano numa concentração

inicial de 500 µg/mL para as amostras testadas. Os inóculos microbianos foram preparados nestes meios e a concentração ajustada frente ao tubo 0.5 McFarland de turbidez padrão (10⁸ unidades formadoras de colônias – UFC/mL) e respectivamente diluídos nas razões de 1:10 no caldo para o procedimento de microdiluição.

Porções de 5 µL de cada suspensão microbiana foram transferidas para todos os poços da placa de microdiluição contendo 100 µL da amostra a ser testada ou do antibiótico de referência (controle). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o crescimento e leitura dos resultados foram realizadas as sementeiras do meio líquido contido nos pocinhos que apresentaram inibição no crescimento do microrganismo. A sementeira foi realizada em placas de Petri com o ágar específico para o microrganismo, confirmando o efeito bacteriostático ou bactericida da amostra. Depois da retirada do material para sementeira, as placas de Elisa foram reveladas com 10 µL do revelador de crescimento microbiano – resazurina, que muda de coloração (azul para vermelho) quando há o crescimento do microrganismo, tornando as culturas dos mesmos avermelhados. A concentração mínima inibitória (CMI) nestes ensaios foi considerada a menor concentração da amostra que impede visivelmente o crescimento microbiano.

A **Tabela 2** relaciona os microrganismos utilizados nos ensaios e os antibióticos controle.

Microrganismos	Antibióticos de referências
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6623	Vancomicina
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Tetraciclina
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi</i> ATCC 6539	Tetraciclina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Tetraciclina
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Tetraciclina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Tetraciclina
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Tetraciclina
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Nistatina
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Nistatina
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707	Nistatina

Tabela 2. Microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos e seus respectivos antibióticos de referências com as concentrações iniciais utilizadas nas placas de microdiluição e as concentrações mínimas inibitórias (CMI).

4.5.3. Ensaio inseticida

Os ensaios biológicos com os extratos brutos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, mantido a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h.

Uma dieta artificial (KASTEN et al., 1978) contendo água destilada (600 mL), ágar (10,3 g), extrato de levedura (25,3 g), gérmen de trigo (39,6 g), ácido sórbico (0,8 g), ácido ascórbico (2,6 g), formaldeído 40 % (6,3 mL), tetraciclina (50 mg), nipagin (1,1 g) e feijão carioquinha (82,5 g) foi utilizada para a realização dos ensaios biológicos.

Para a realização dos bioensaios, os extratos foram solubilizados em uma pequena quantidade de solvente e misturado ao ácido ascórbico contido na dieta artificial (KASTEN et al. 1978). Logo após, o solvente foi evaporado e a mistura (ácido ascórbico e extrato) foi incorporada à dieta quando esta atingiu uma temperatura de 50°C . Foram utilizadas trinta lagartas para cada tratamento. Cada extrato foi incorporado à dieta artificial para *S. frugiperda* na proporção de 100 mg de extrato para 100 g de dieta (1000 mg Kg^{-1}). Além da dieta correspondente a cada extrato, também foi preparada uma dieta testemunha, sem extrato, utilizando os solventes em que foi solubilizado o extrato. Depois da preparação, as dietas foram vertidas em tubos de vidro ($8,5 \times 2,5 \text{ cm}$), previamente esterilizados, em estufa a 170°C por 1 h e em seguida tampados com algodão hidrófugo. Após a colocação da dieta, os tubos foram mantidos por 24 h em grades de arame para eliminação do excesso de umidade (gotículas de água) de suas paredes. A seguir, foi feita a inoculação das lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta por tubo de vidro.

As pupas obtidas foram pesadas um dia após a pupação, e transferidas para copos plásticos de 50 mL de capacidade, onde permaneceram até a emergência dos adultos.

Os parâmetros avaliados foram duração das fases larval e pupal, peso das pupas e porcentagem de insetos mortos (mortalidade) ao final de cada fase. Para cada tratamento foram utilizadas 30 lagartas, distribuídas em três repetições de dez lagartas cada, em delineamento completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação entre médias dos tratamentos foi feita através do Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.5.4. Ensaio antitumoral

Ensaio realizado na Universidade Federal do Ceará. As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano), SF-295 (sistema nervoso central) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido cultivadas em meio

RPMI 1640, suplementos com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute dos Estados Unidos* (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Análise que tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ céls./100 µL, para células aderidas. Os diversos compostos foram incubados 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 200 µL da solução MTT e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a 550nm.

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

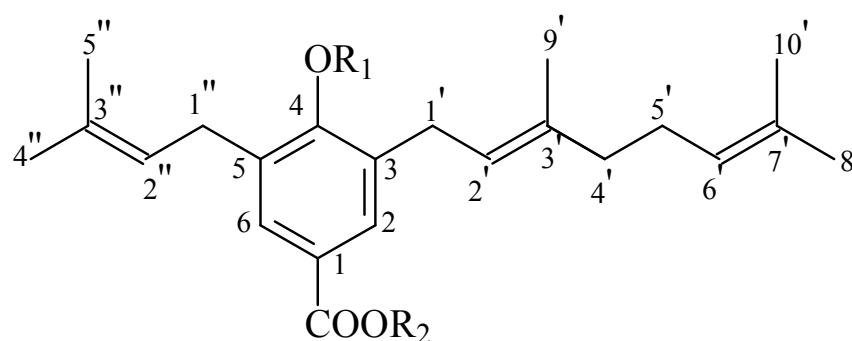
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das substâncias

5.1.1. Substâncias 1, 2, 3, 4, 5 e 6

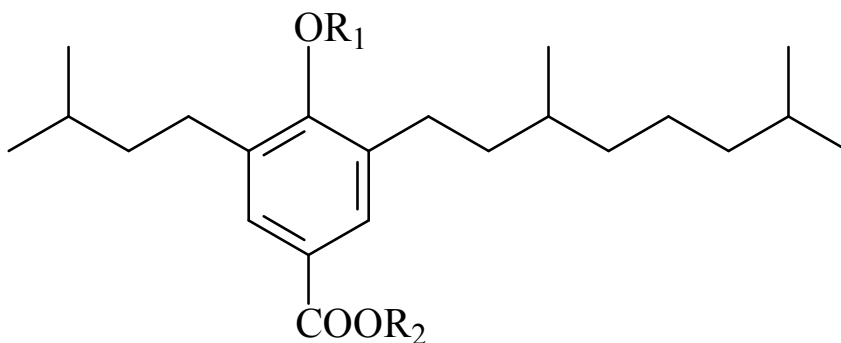
Foi isolado aproximadamente 500mg da substância **1**, ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3''-metil-2''-butenil) benzóico, conhecido como ácido myrsinóico A (S1) (**Figura 19**), uma das substâncias característica da família myrsinaceae.

Através das reações de síntese, visando uma análise da relação estrutura-atividade biológica, foram obtidos quatro compostos, substância **2**, **3**, **4**, **5** e **6**, ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3''-metil-2''-butenil) benzóico metil éster, 3-geranil-4-metoxi-5-(3''-metil-2''-butenil) benzóico metil éster, ácido 3-geranil-4-acetoxi-5-(3''-metil-2''-butenil) benzóico (**Figura 19**), ácido 3-(3',7'-metil-octanil)-4-hidroxi-5-(3'-metil-2'-butanil) benzóico e ácido 3-(3',7'-metil-octanil)-4-acetil-5-(3'-metil-2'-butanil) benzóico (**Figura 20**), respectivamente.



Substância	R ₁	R ₂
1	H	H
2	H	CH ₃
3	CH ₃	CH ₃
4	COCH ₃	H

Figura 19. Estrutura química do ácido myrsinóico A (S1) isolado de *M. cuneifolia* e seus derivados (S2, S3 e S4).



<i>Substância</i>	R_1	R_2
5	H	H
6	COCH ₃	H

Figura 20. Estrutura química dos derivados (S5 e S6) de S1.

A análise por CCD indicou como substância pura, por análises do espectro de RMN ¹H (**Figura 21**) e ¹³C (**Figura 22**) (CDCl₃, 400 MHz) foi feita a identificação de S1 como sendo o ácido myrsinóico A, os dados destes espectros são descritos na **tabela 3**. Por análise do RMN ¹H vemos o sinal de hidrogênio aromático em 7.68 ppm (s) dos H-2 e H-6, além dos sinais do H-1' em 3.33 ppm (d, J = 7,2 Hz), do H-2' e H-6' em 5.01 ppm (t, J = 13,6 Hz), do H-4' e H-5' em 2.03 ppm (s), do H-8' em 1.61 ppm (s), do H-9' em 1.53 ppm (s), do H-10' em 1.70 ppm (s), do H-1'' em 3.33 ppm (dd, J = 7,2 Hz), do H-2'' em 5.25 ppm (t, J = 14,4 Hz), do H-4'' e do H-5'' em 1.70 ppm (s).

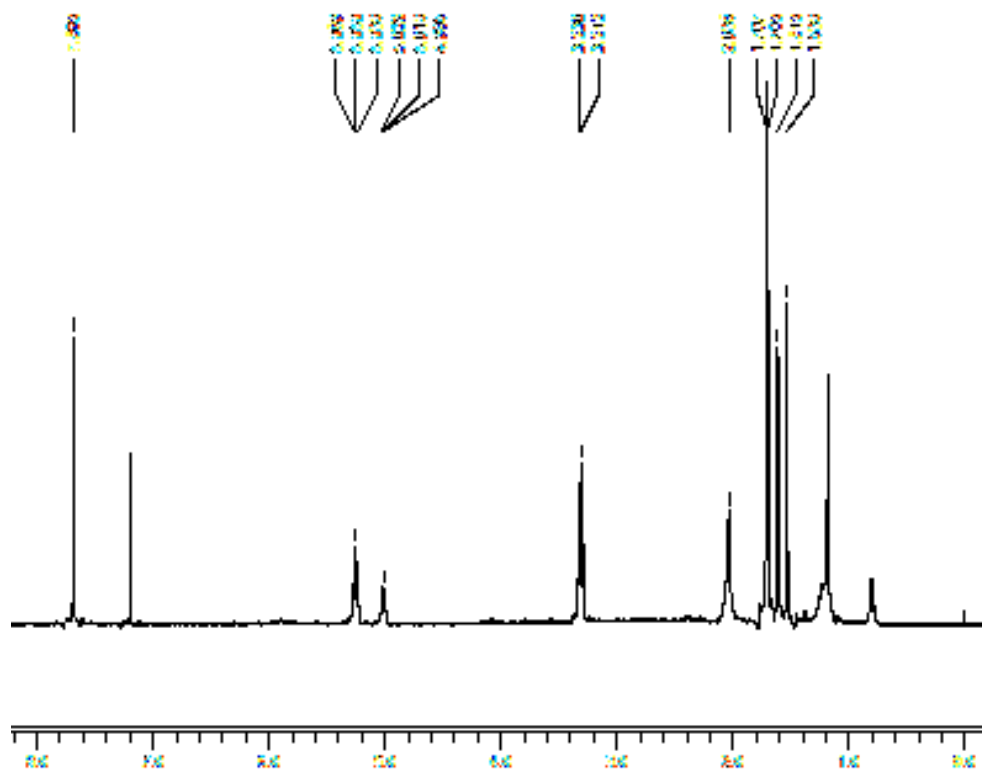


Figura 21. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de S1.

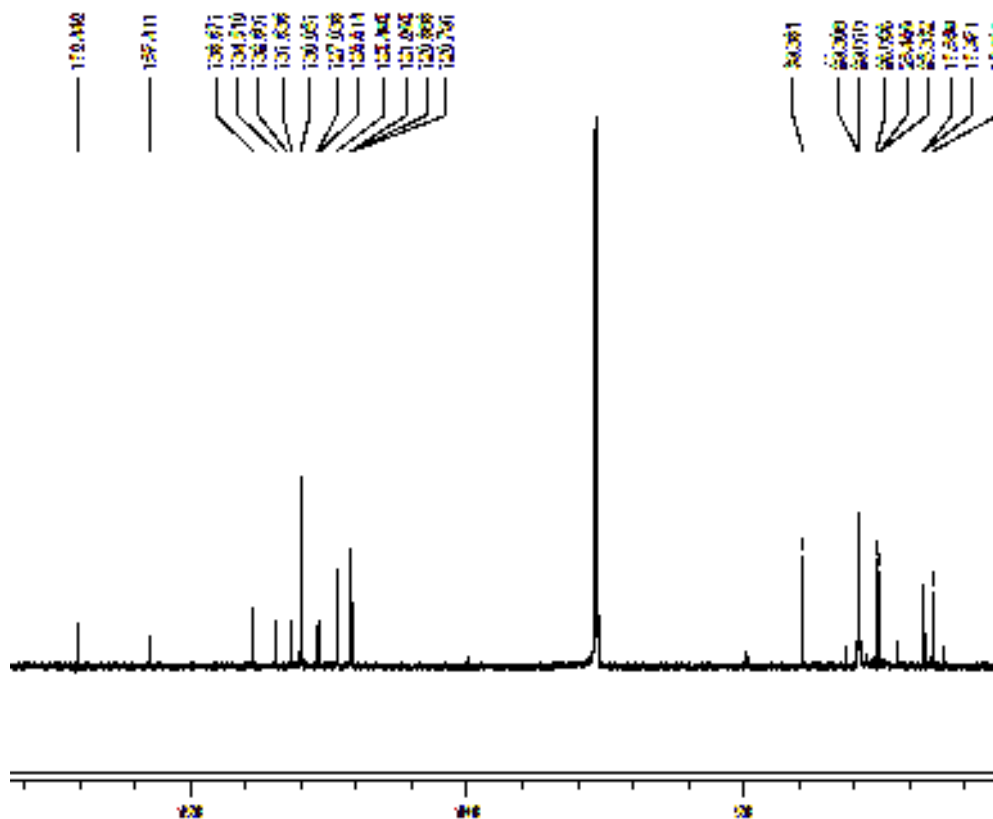


Figura 22. Espectros de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) de S1.

<i>Posição</i>	¹³ C	¹ H (ppm)
1	130.05	
2	131.63	7.68 - s
3	121.06	
4	157.41	
5	123.48	
6	127.03	7.68 - s
1'	29.01	3.33 - d
2'	120.79	5.01 - t
3'	138.67	
4'	39.38	2.03 - s
5'	26.09	2.03 - s
6'	126.61	5,01 - t
7'	134.51	
8'	25,33	1.61 - s
9'	17.37	1.53 - s
10'	15.90	1.70 - s
1''	29.30	3.33 - d
2''	120.88	5.25 - t
3''	132.60	
4''	25.46	1.70 - s
5''	17.55	1.70 - s
COOH	170.44	

Tabela 3. Valores dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) de S1.

Os derivados do ácido myrsinóico A foram também identificados por RMN ¹H em comparação com o mesmo de S1. Cujas diferenças são poucas, para os derivados da metilação, S2: a diferença é o aparecimento do sinal da éster em C-1, 3.86 ppm (s) (**Figura 23**) e S3: a diferença é o aparecimento de dois sinais do éster em C-1, 3.87 ppm (s) e da metoxila, 3.75 ppm (s) (**Figura 24**); para o derivado da acetilação, S4: a diferença é o aparecimento do sinal do éster, 2.33 ppm (s) (**Figura 25**).

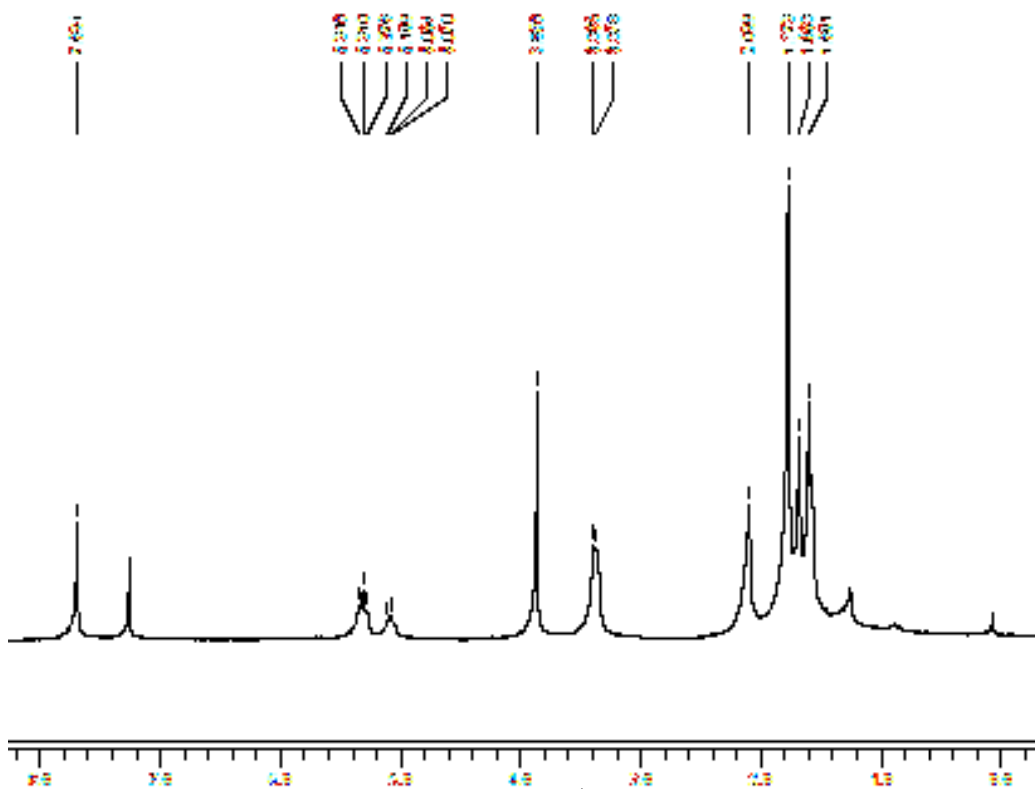


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de S2.

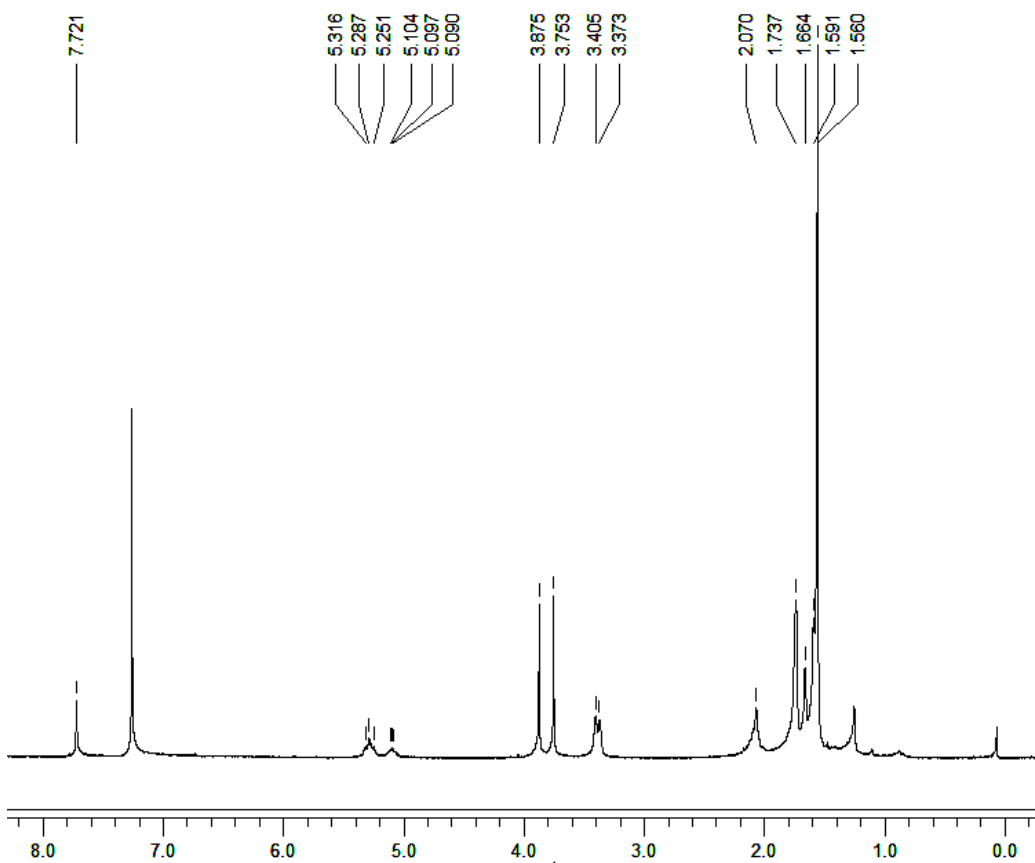


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) S3.

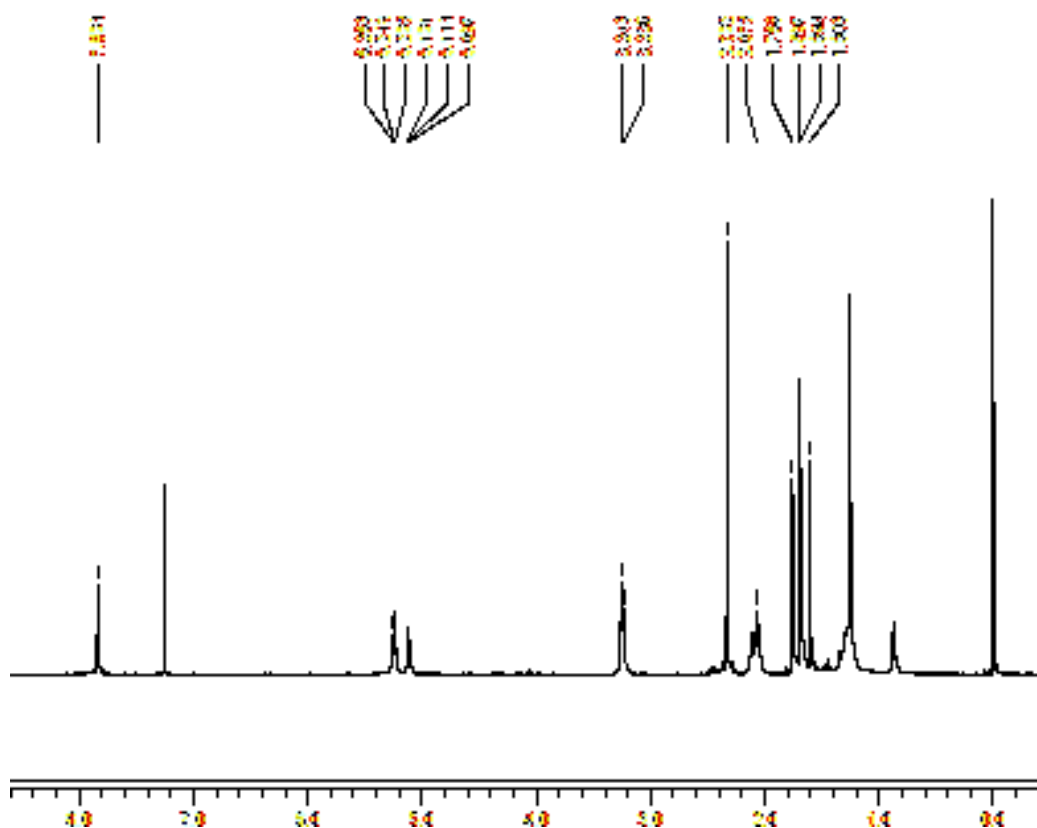
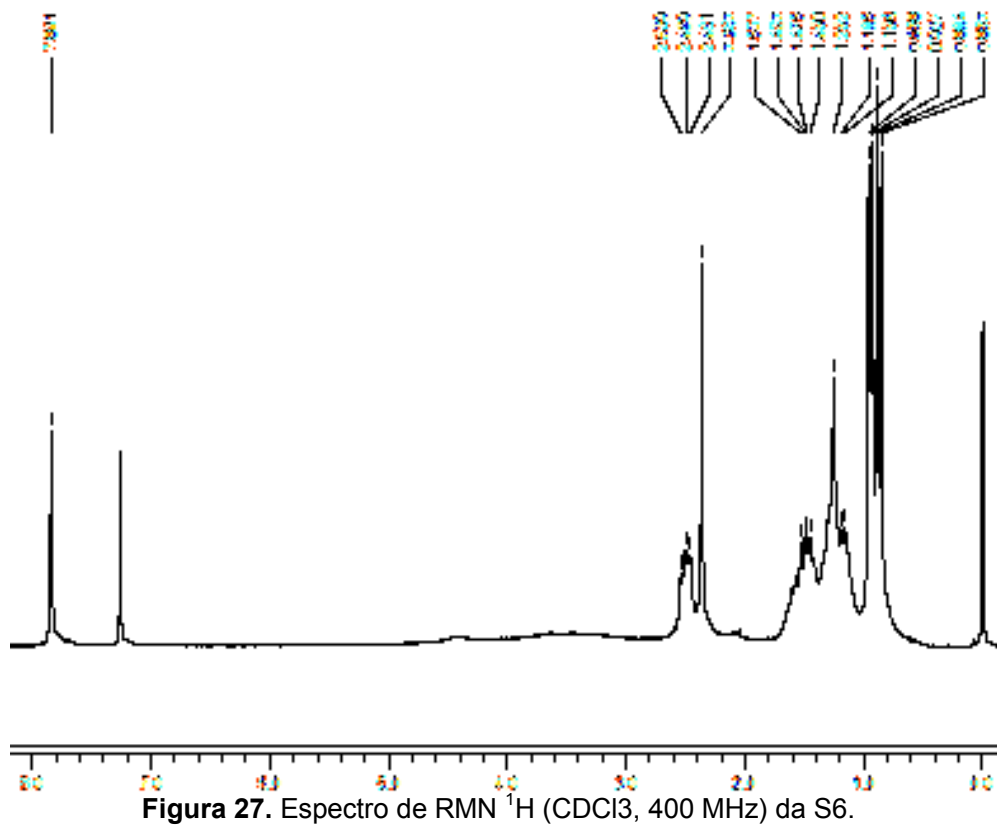
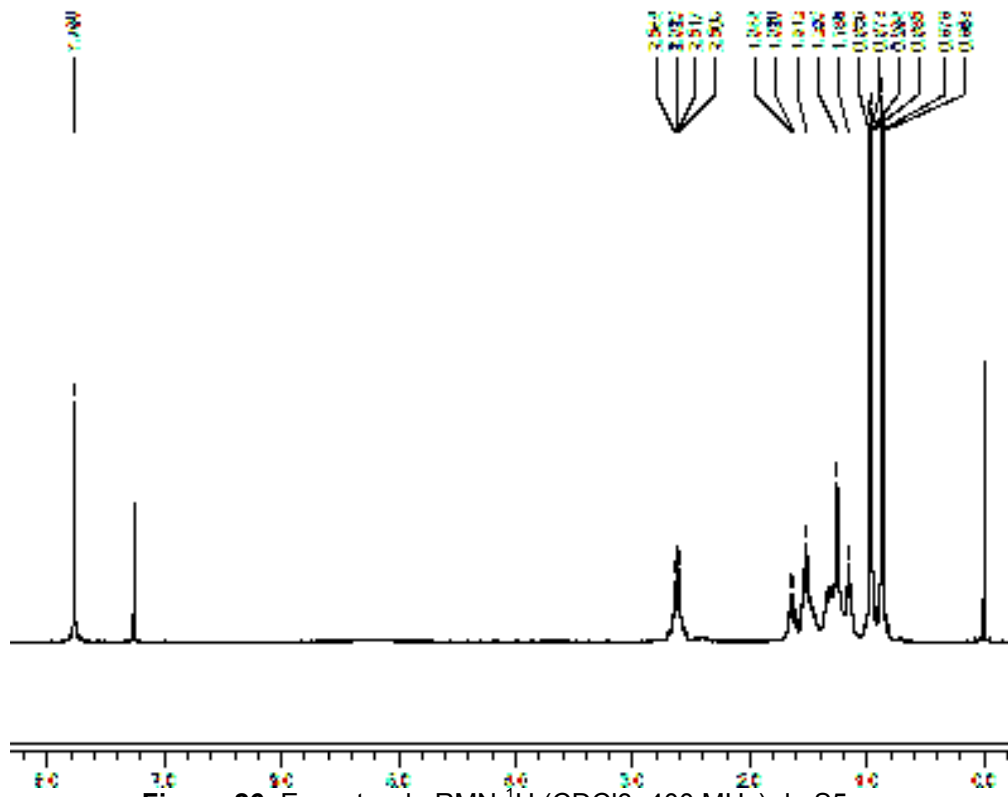


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da S4.

Já para o derivado da hidrogenação, S5, as diferenças são um pouco maiores, percebe-se o aparecimento dos sinais na região entre 0.8 ppm e 1.7 ppm e também o desaparecimento dos sinais de H-2'' em 5.25 ppm, de H-2' e H-6' ambos em 5.01 ppm (**Figura 26**), a S5 foi submetida a reação de acetilação dando origem a S6, a mudança foi o aparecimento do sinal do éster em 2.36 ppm (s) (**Figura 27**), estes dados confirmam a ocorrência das reações.



5.1.2. Substância 7

A substância **7** (10mg) foi identificada por espectro de hidrogênio, a amostra apresentou-se como sólido branco, a análise por CCD indicou como substância pura, os dados do RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) foram comparados (**Tabela 4**) com dados obtidos da literatura (ALMEIDA, 2007), por análises do espectro de RMN ^1H (**Figura 28**) foi possível observar sinais na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos em δ 5,92 ppm (d, J = 2,3 Hz) e δ 5,85 ppm (d, J = 2,3 Hz) referente aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente; o sinal em δ 6,83 ppm (d, J = 1,5 Hz) corresponde ao sinal do hidrogênio H-2' e o conjunto de sinais em δ 6,74 ppm (m) refere-se aos sinais dos hidrogênios H-5' e H-6'. Os sinais em δ 4,58 ppm (d, J = 7,5 Hz), δ 3,98 ppm (ddd, J = 5,2 Hz, 7,8 Hz e 12,0 Hz), δ 2,82 ppm (dd, J = 5,4 Hz e 16,4 Hz) e δ 2,52 ppm (dd, J = 8,0 Hz e 16,1 Hz) referem-se aos sinais dos hidrogênios H-2, H-3, H-4a e H-4b, respectivamente. Assim confirmou-se que a substância é a catequina (S7) (**Figura 29**).

Posição	^1H (ppm)	Literatura
2	4.58 - d	4.58 - d
3	3.98 - ddd	3.95 - ddd
4a	2.52 - dd	2.48 - dd
4b	2.82 - dd	2.83 - dd
5		
6	5.85 - d	5.84 - d
7		
8	5.92 - d	5.92 - d
9		
10		
1'		
2'	6.83 - d	6.83 - d
3'		
4'		
5'	6.74 - m	6.72 - m
6'	6.74 - m	6.72 - m

Tabela 4. Valores dos espectros de RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) de S7 em comparação com os mesmos da literatura.

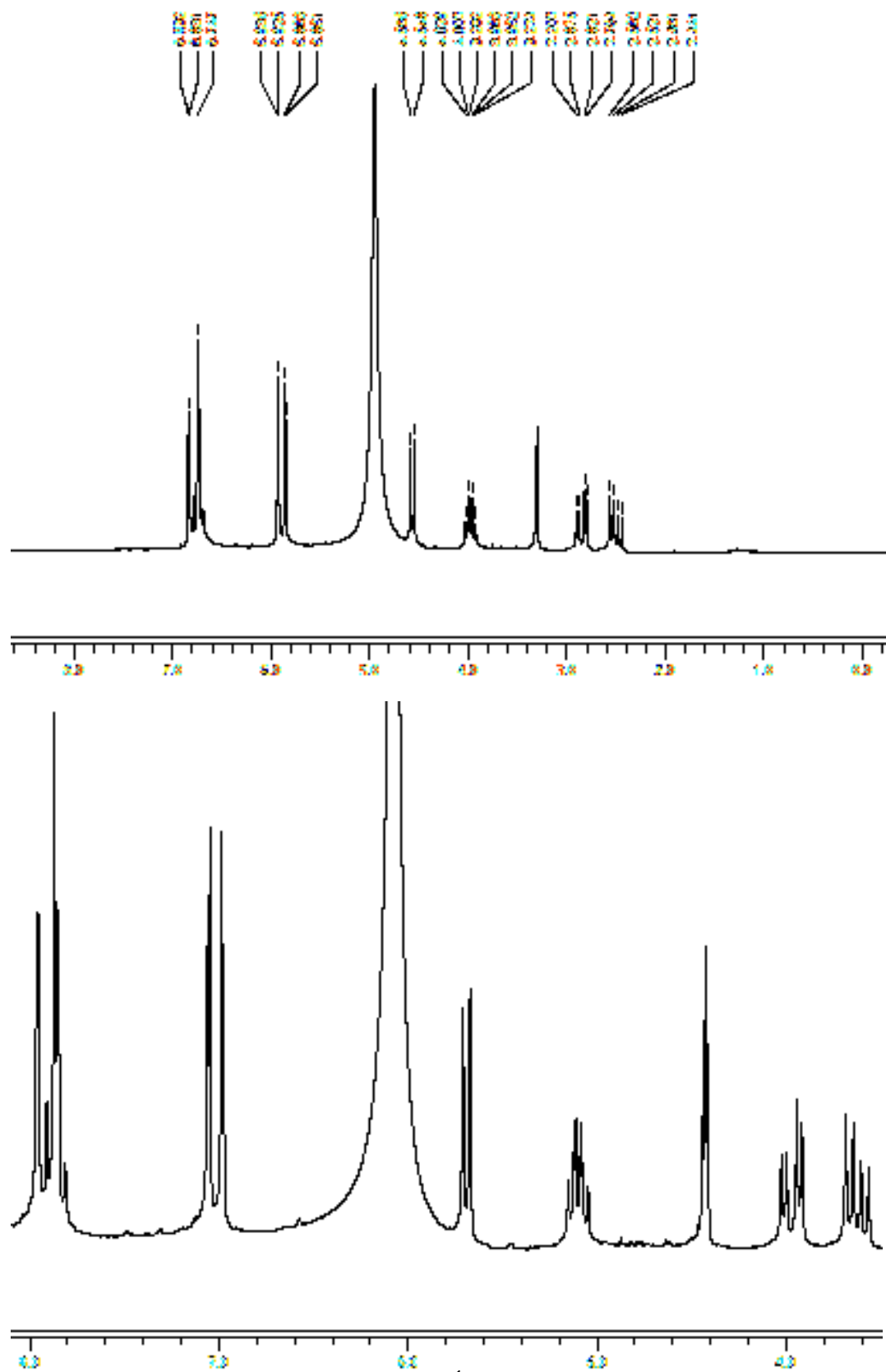


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) da S7.

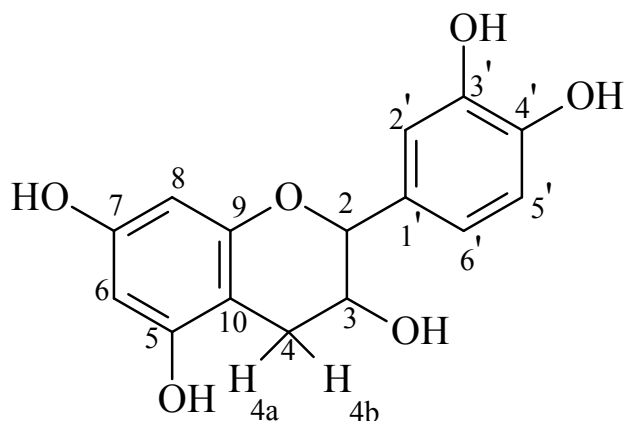


Figura 29. Estrutura química da catequina (S7).

5.1.3. Substância 8

A substância **8** (5mg) foi identificada por espectro de hidrogênio, a amostra apresentou-se como sólido amarelo, a análise por CCD indicou como substância pura, por análises do espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz, **Figura 30**) foi possível observar sinais característicos do anel C deste sistema em 7.82 ppm (d, J = 2,40 Hz) do H-2', 6.98 ppm (d, J = 8,40 Hz) do H-5' e 7.68 ppm (dd, J = 2,40 Hz e 8,80 Hz) do H-6' além dos sinais em 6.26 ppm (d, J = 2,00 Hz) do H-6 e em 6.52 ppm (d, J = 2,00 Hz) do H-8 do sistema benzopirânico e do sinal do hidrogênio quelado em 12.16 ppm (s). Os dados espectroscópicos foram comparados (**Tabela 5**) com dados obtidos da literatura (ALMEIDA, 2007) e confirmou-se que a substância é a quercetina (S8) (**Figura 31**).

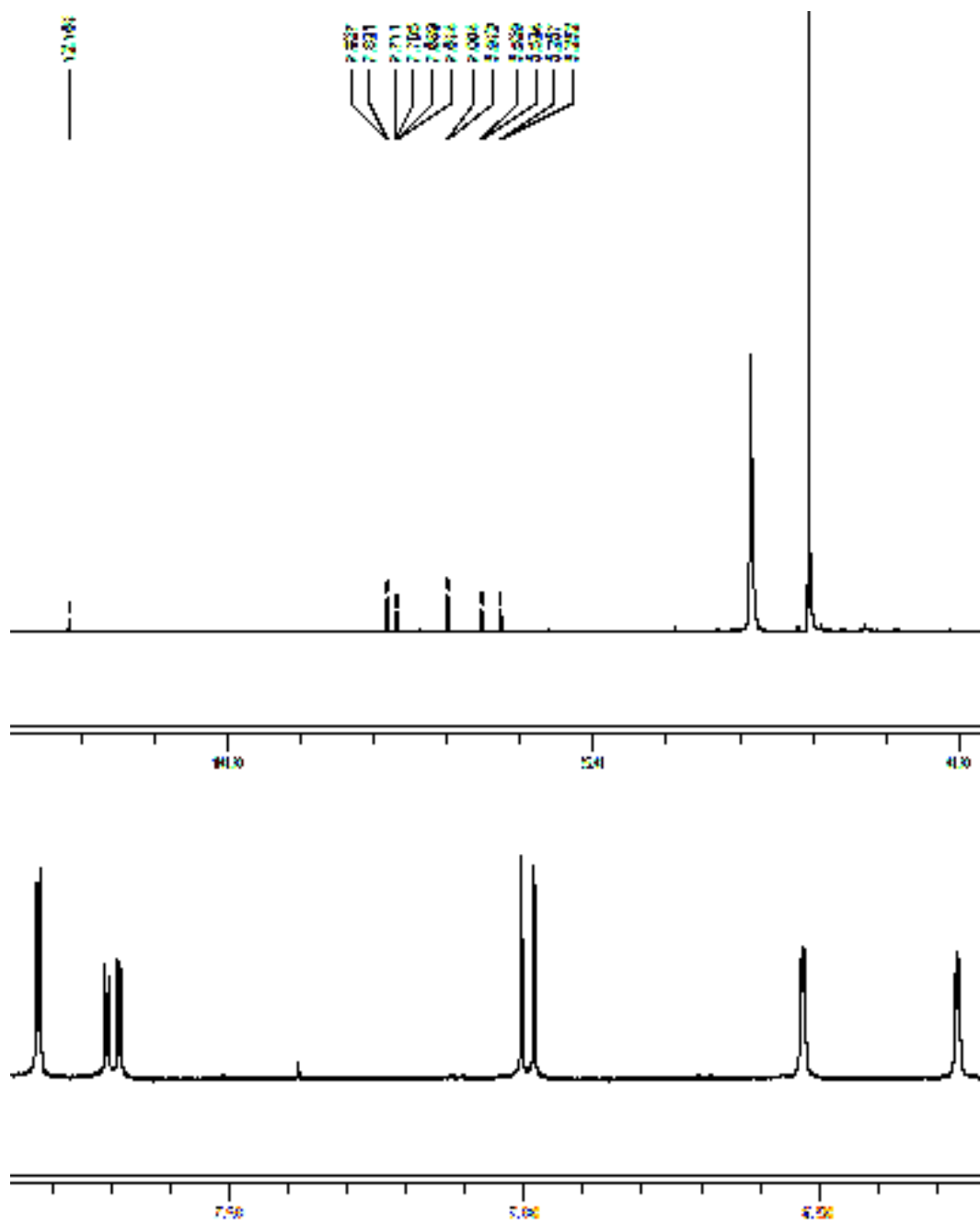


Figura 30. Espectro de RMN ¹H (MeOD, 400 MHz) da S8.

<i>Posição</i>	^1H (ppm)	<i>Literatura</i>
2		
3		
4		
5		
6	6.26 - d	6.17 - d
7		
8	6.52 - d	6.38 - d
9		
10		
1'		
2'	7.82 - d	7.73 - d
3'		
4'		
5'	6.98 - d	6.88 - d
6'	7.68 - dd	7.63 - dd

Tabela 5. Valores dos espectros de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) de S8 em comparação com os mesmos da literatura.

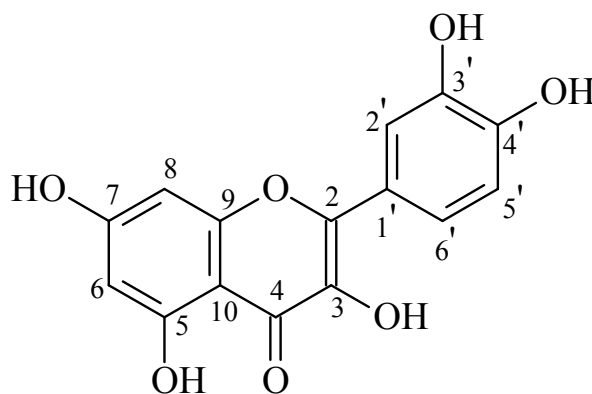


Figura 31. Estrutura química da quercetina (S8).

5.1.4. Substância 9

A substância **9** (0.8 mg) foi identificada por espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) (**Figura 32**), ^1H (Piridina, 400MHz), HMBC, HSQC e COSY (MeOD, 400 MHz). O espectro de RMN ^1H da substância **9** apresentou um dubleto em δH 7,33 (J= 2,4 Hz)

acoplado com um duplo dubleto em δ H 7,30 ($J= 8,4$ e $2,4$ Hz) e que por sua vez acopla com outro dubleto em δ H 6,94 ($J= 8,0$ Hz) o que evidencia um acoplamento meta entre os hidrogênios em δ H 7,33 e δ H 7,30, além deste último apresentar um acoplamento orto com o hidrogênio em δ H 6,94, que foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5', do anel B de um flavonóide (**Figura 33**).

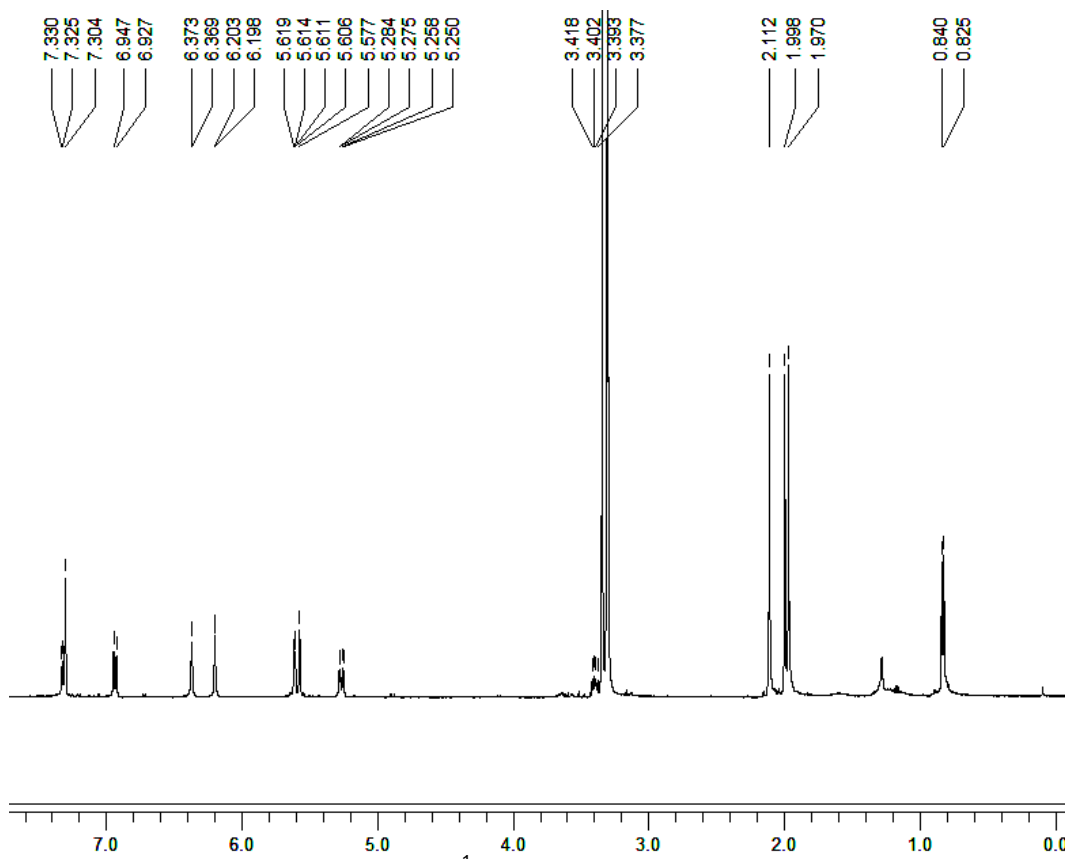


Figura 32. Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância **9**.

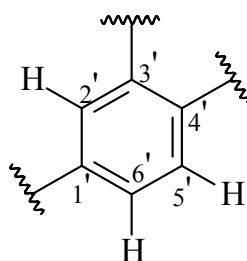


Figura 33. Anel B de um flavonóide.

O espectro de HSQC (**Figura 34**) mostra a correlação dos hidrogênios em δ H 7,33, δ H 7,30 e δ H 6,94 com os carbonos em δ C 122,9 (C-2'), δ C 116,5 (C-6') e δ C 116,6 (C-5'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (**Figura 35**) mostra a

correlação do sinal em δH 7,33 com os carbonos em δC 122,7, atribuído ao C-1'; δC 146,7, atribuído ao C-3'; δC 150,3, atribuído ao C-4' e do duplo dubleto em δH 7,30 com os carbonos em δC 150,3 (C-4'), a relação com o C-2' não foi observada mas na projeção do HSQC vimos esta correlação; e finalmente o dubleto em δH 6,90 com os carbonos em δC 122,7 (C-1'); δC 146,7 (C-3'); δC 150,3 (C-4'). A presença destas correlações e a correlação do hidrogênio em δH 7,33 com um carbono em δC 163,3, deslocamento este característico do carbono- β de um sistema carbonila α - β insaturada, podendo-se afirmar então que estes são os hidrogênios 2', 5' e 6' do anel B de uma flavonóide. As correlações do HMBC são mostradas na **figura 36**.

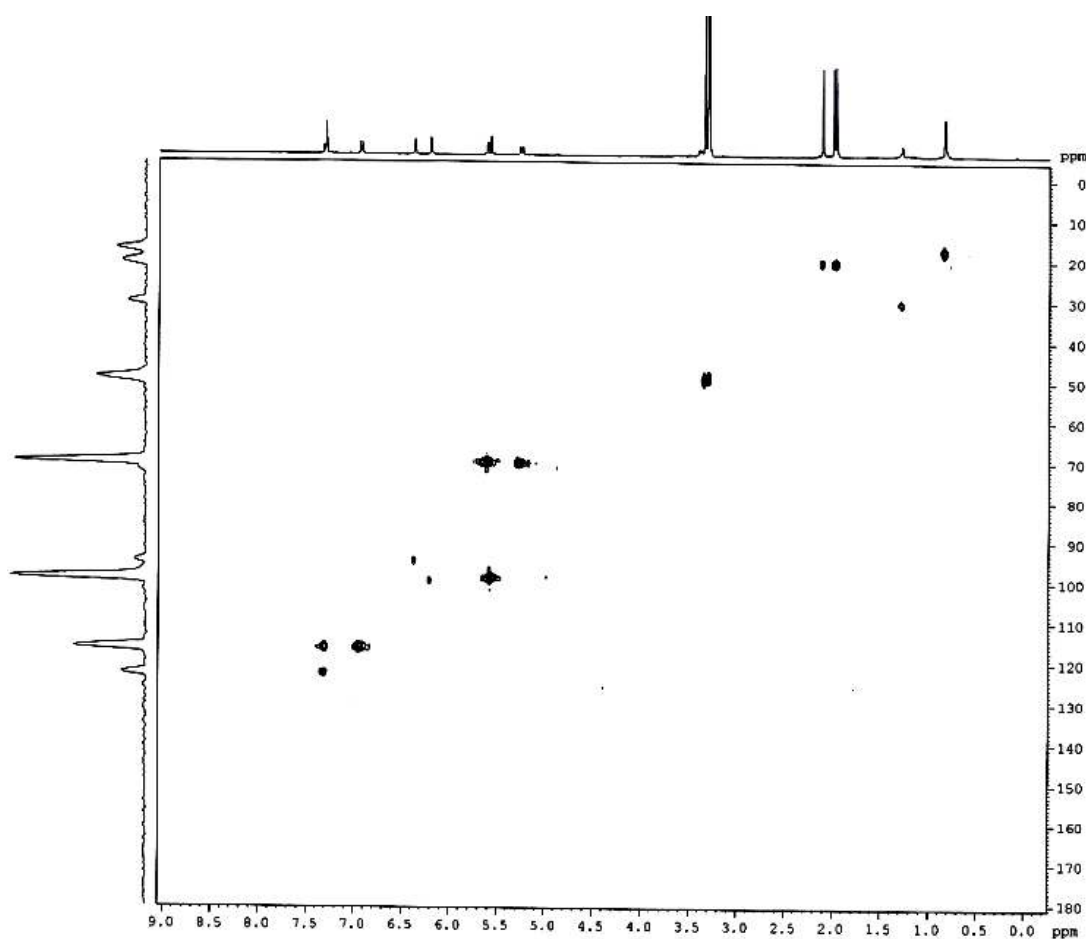


Figura 34. Espectro de correlação HSQC (MeOD, 400 MHz) da substância **9**.

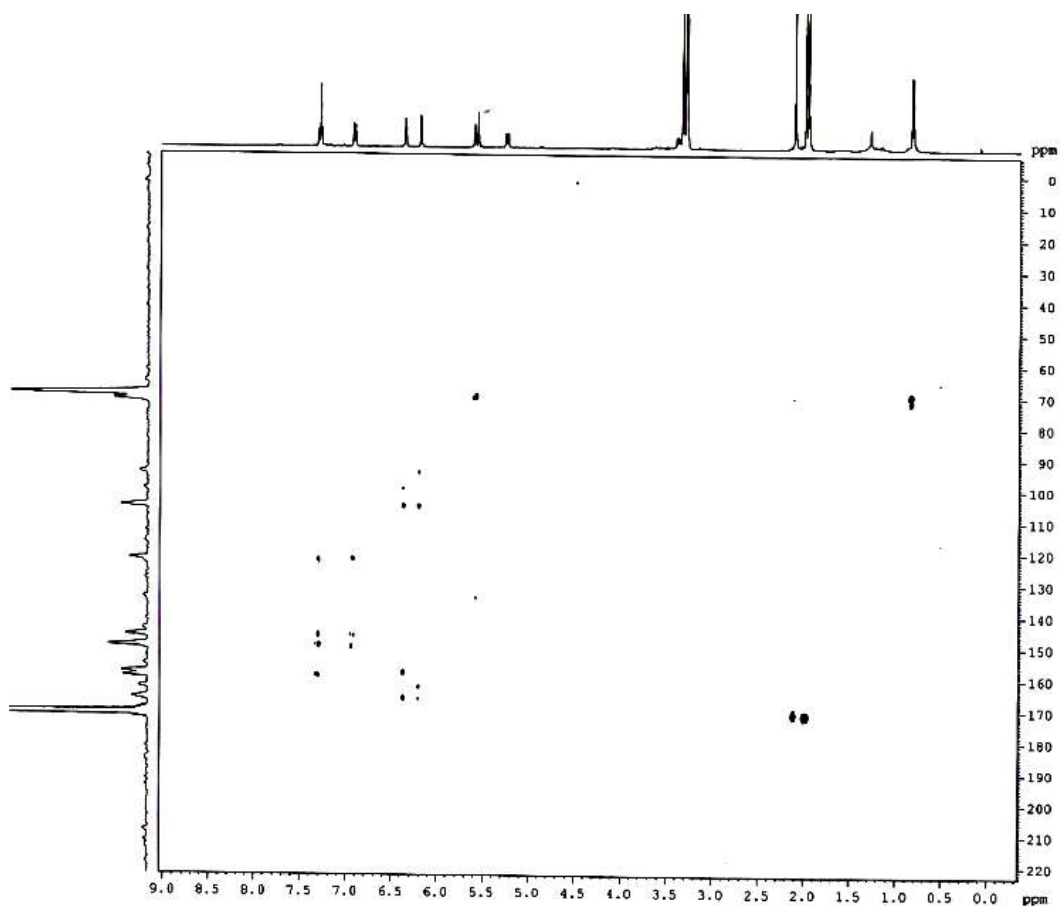


Figura 35. Espectro de correlação HMBC (MeOD, 400 MHz) da substância **9**.

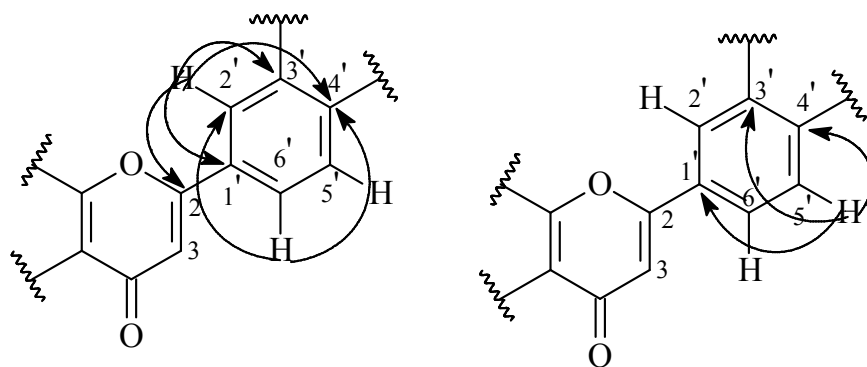


Figura 36. Correlações HMBC do anel B de um flavonóide para identificação da substância **9**.

Ainda no espectro de RMN ^1H tem-se um par de dubletos com $J = 2,4$ Hz em $\delta\text{H } 6,37$ e $\delta\text{H } 6,20$ que indicam os H-8 e H-6, respectivamente. O espectro de HSQC mostrou a correlação do hidrogênio em $\delta\text{H } 6,37$ com o carbono em $\delta\text{C } 95,0$ e também mostrou a correlação do hidrogênio em $\delta\text{H } 6,20$ com o carbono em $\delta\text{C } 100,2$. Através

do espectro de HMBC podem-se verificar a correlação do hidrogênio em δH 6,37 com os carbonos em δC 166,7, atribuído ao C-7; δC 99,0 (C-6); δC 105,5, atribuído ao C-10 e δC 159,8 atribuído ao C-9 e a correlação do hidrogênio em δH 6,20 com os carbonos em δC 166,7 (C-7); 163,3 (C-5); δC 94,5 (C-8) e δC 105,5 (C-10). A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de uma flavonóide. As correlações do HMBC são mostradas na **figura 37**.

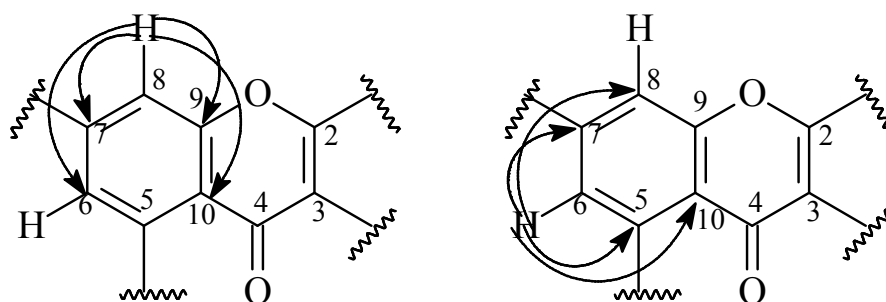


Figura 37. Correlações HMBC do anel A de um flavonóide para identificação da substância **9**.

Voltando ao espectro de RMN ^1H , a observação de sinais entre δH 3,4 sugerem a presença de uma unidade de açúcar, onde o dubleto em δH 0,84 (3H, H-6'', $J= 6,0$ Hz) é característico da metila de uma unidade de ramnose.

A estereoquímica do carbono anomérico da ramnose foi determinada basicamente por dados comparativos, sabendo-se que quando o flavonol liga-se ao açúcar pela face α , o anel B é impedido de assumir a coplanaridade com o anel C, devido ao efeito estérico, o que faz com que haja uma diminuição da conjugação com o C-1', assumindo então um deslocamento químico em torno de δC 130. No entanto, quando o flavanol liga-se pela face β do açúcar é possível haver conjugação entre os anéis C e B e o C-1' passa a ter deslocamento químico em torno de δC 120 quando o espectro é obtido metanol deuterado (ISIDORO, 2008). Portanto percebemos a presença do açúcar pela face β sendo nosso C-1' com deslocamento em δC 122,7.

O espectro em 2D de correlação homonuclear de COSY (**Figura 38**) foi usado para confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios presentes no anel da ramnose, neste caso acetilada. As interações entre os sinais destes hidrogênios encontram-se indicadas na **figura 39**. As interações com o H-4'' não foram observadas pois o sinal deste hidrogênio ficou encoberto pelo sinal do solvente MeOD Deuterado, mas no espectro de RMN ^1H em piridina foi possível a observação da presença deste hidrogênio.

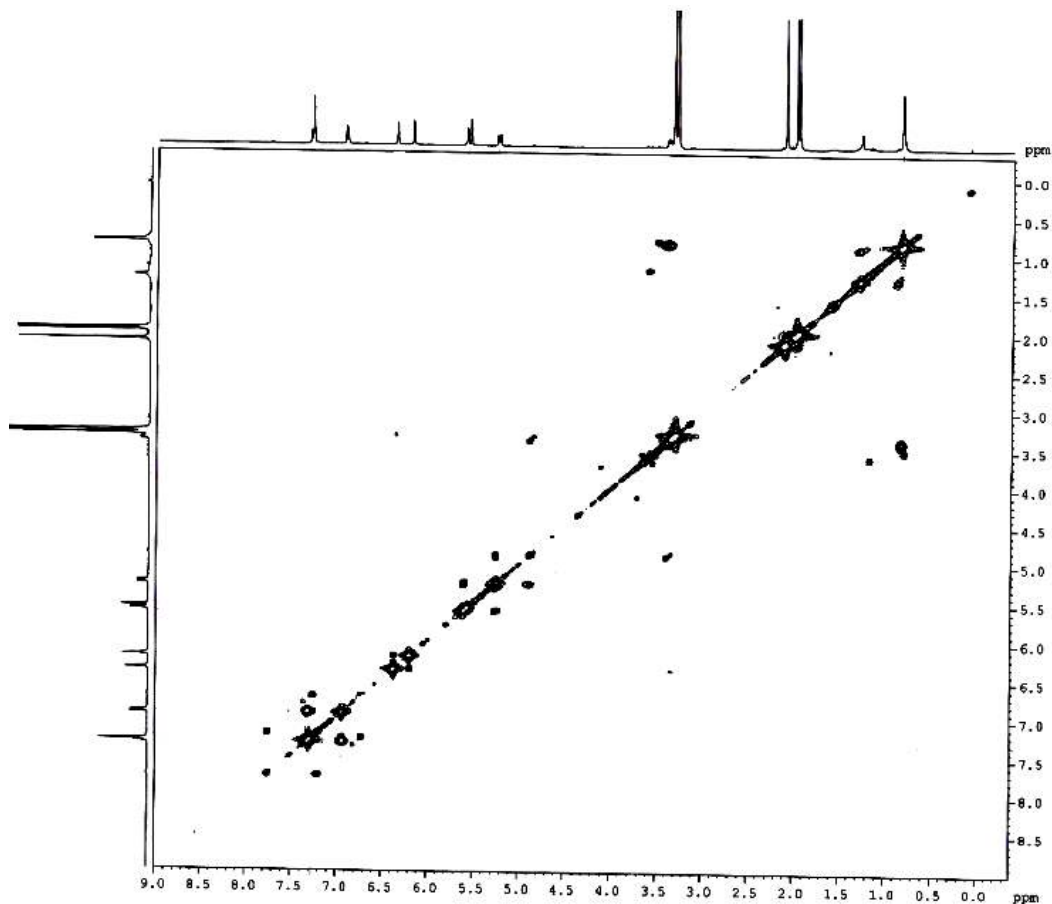


Figura 38. Espectro de correlação COSY (MeOD, 400 MHz) da substância **9**.

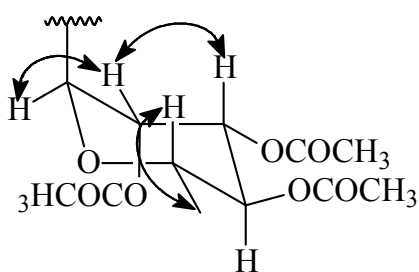


Figura 39. Interações COSY da ramnose para identificação da substância **9**.

Através do RMN ^1H , também podemos perceber um dubleto em 5,57 ppm do H-1'', um duplo dubleto em 5,27 ppm do H-3'', um duplo dubleto em 5,61 ppm do H-2'' e um multiplete em 3,40 ppm do H-5''. Apesar do espectro em piridina ter deslocados os valores, a presença do H-4'' foi observada no RMN ^1H , em piridina (**Figura 40**), um dubleto em 3,62 ppm, e também foi observado o sinal do hidrogênio quelado um singlete em 13,14 ppm.

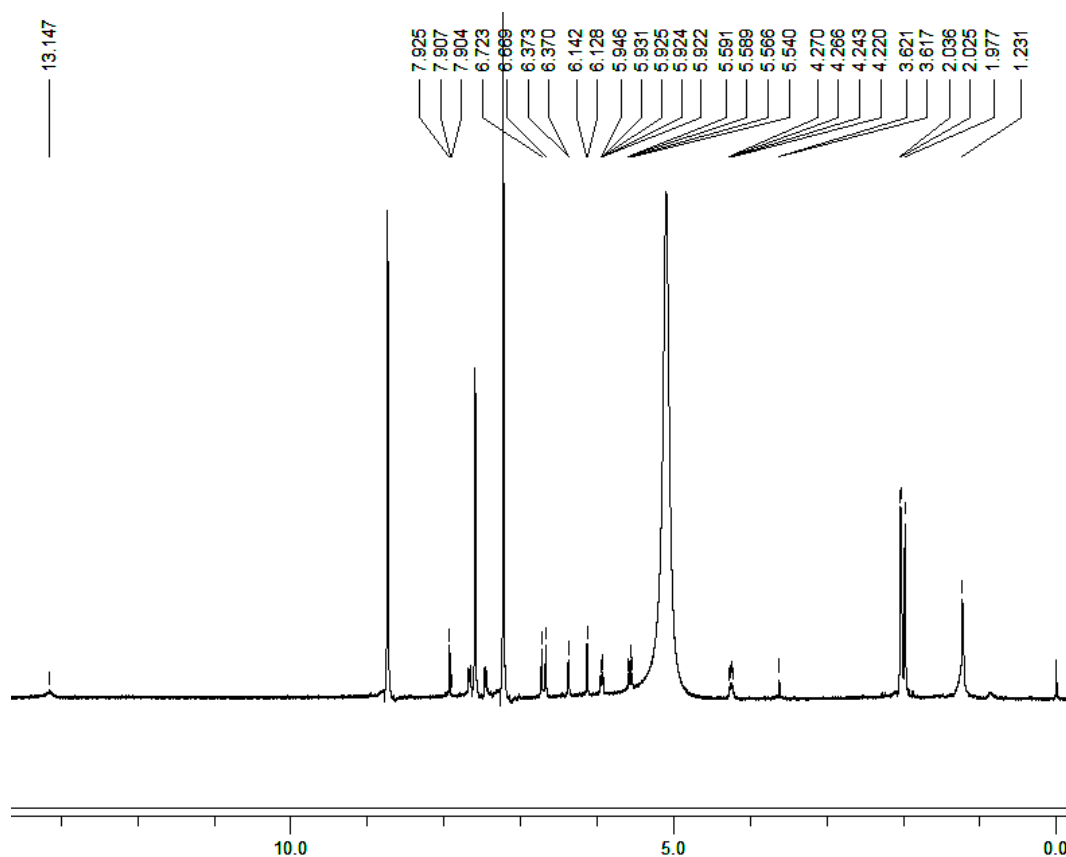


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (Piridina, 400 MHz) da substância **9**.

Para se determinar a posição na qual o raminosídeo está ligado, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC do hidrogênio anomérico H-1'' em 5,57 ppm com um carbono em δC 135,0 que foi atribuído ao C-3 do anel C da flavona, pois era o único que faltava ser atribuído. Os substituintes nos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4' da flavona são hidroxilas, devido à ausência de sinais característicos de metoxilas na região entre 3,5-4,5 ppm e no espectro de RMN ^1H , assim a substância é conhecida como Quercetina-3- β -O-raminosídeo acetilado (S9) (**Figura 41**).

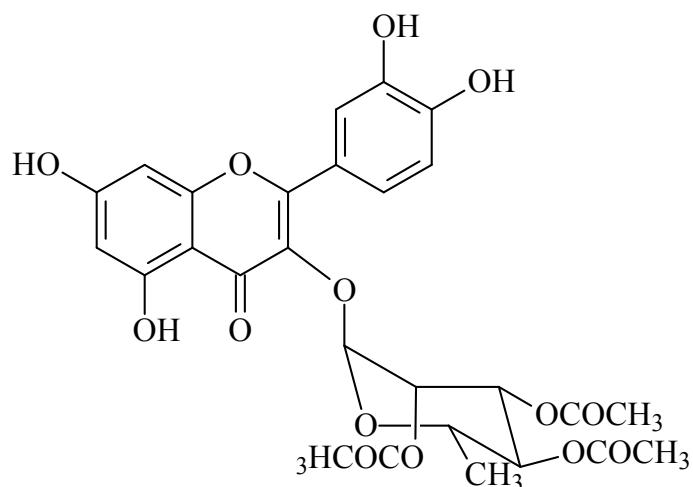


Figura 41. Estrutura química da Quercetina-3- β -O-raminosídeo acetilado (S9).

É importante ressaltar que a substância identificada como Quercetina-3- β -O-raminosídeo acetilado não é a substância encontrada nas folhas de *M. cuneifolia*, a ramnose foi determinada acetilada pois a fração que lhe deu origem foi submetida a uma reação de acetilação, devido à dificuldade de isolamento dos flavonóides em mistura, por serem em grande quantidade e glicosilados, portanto o flavonóide que realmente está presente nas folhas desta planta é a Quercetrina, Quercetina-3- β -O-raminosídeo (**Figura 42**).

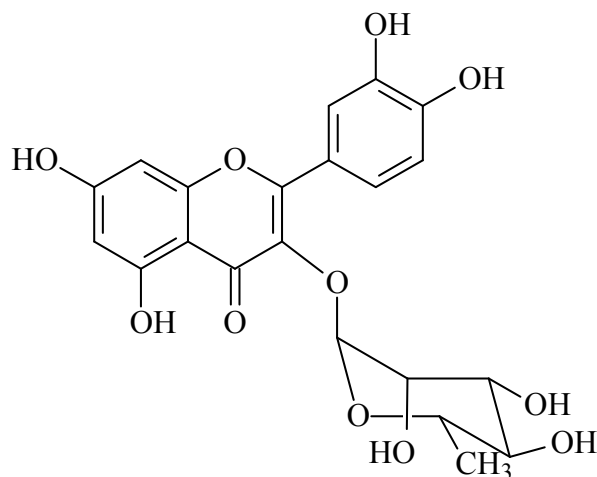


Figura 42. Estrutura química da Quercetina-3- β -O-raminosídeo (Quercetrina).

5.1.5. Substância 10

A substância **10** (mg) foi identificada por espectro de RMN ^1H (**Figura 43**), ^{13}C (**Figura 44**), HMBC, HSQC e COSY (MeOD, 400 MHz). A análise por CCD indicou como substância pura, por análises do espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) foi

possível observar sinais em 4.41 ppm (dd, $J = 2,40$ Hz e 11.6 Hz) do H-2, 2.60 ppm (m) do H-3, 4.18 ppm (dd, $J = 7,2$ Hz e 21.6 Hz) do H-5 e 1.27 ppm (t, $J = 14,4$ Hz) do H-6. Os dados espectroscópicos do RMN ^1H foram descritos juntamente com os dados do RMN ^{13}C na **tabela 6**.

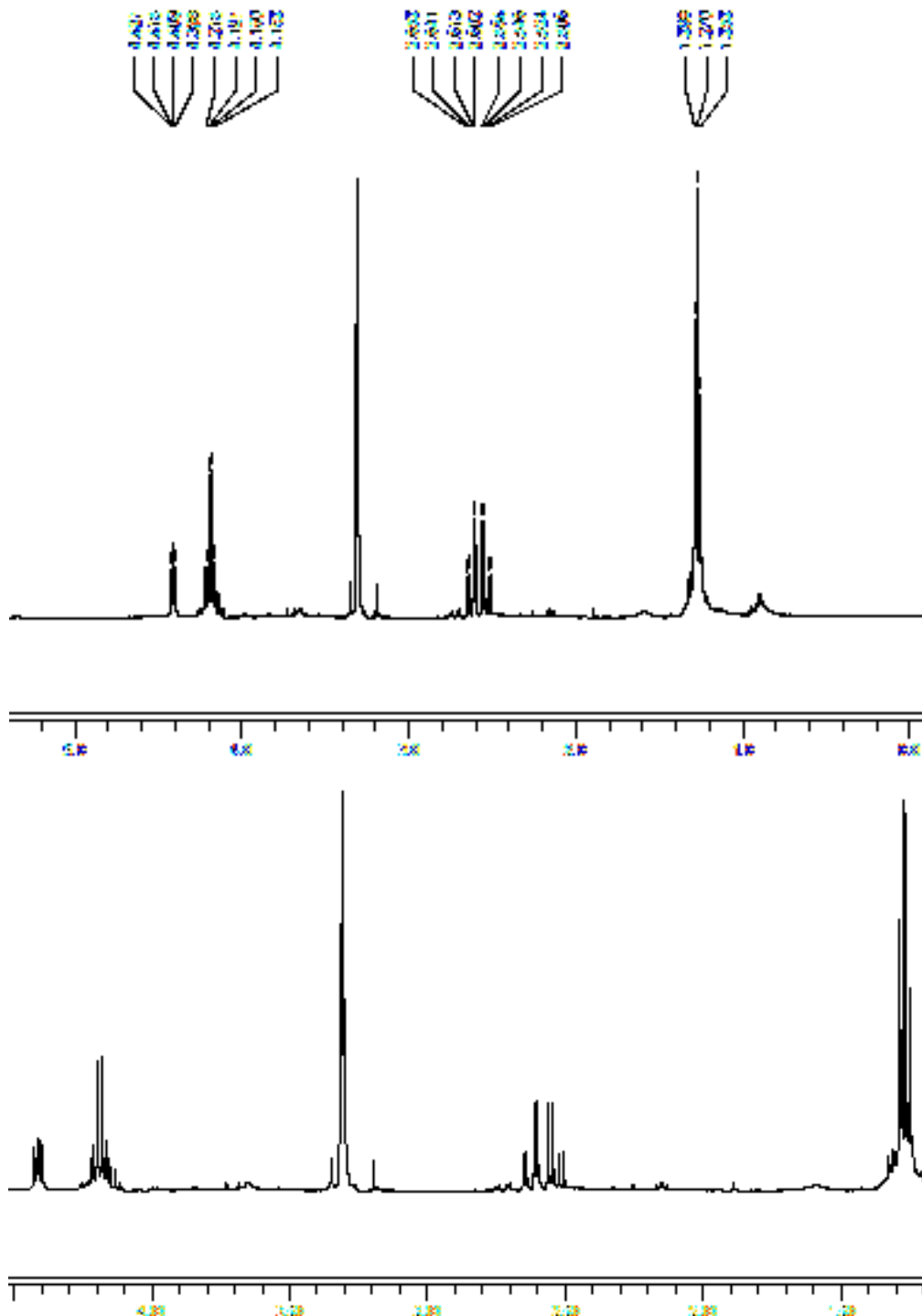


Figura 43. Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância **10**.

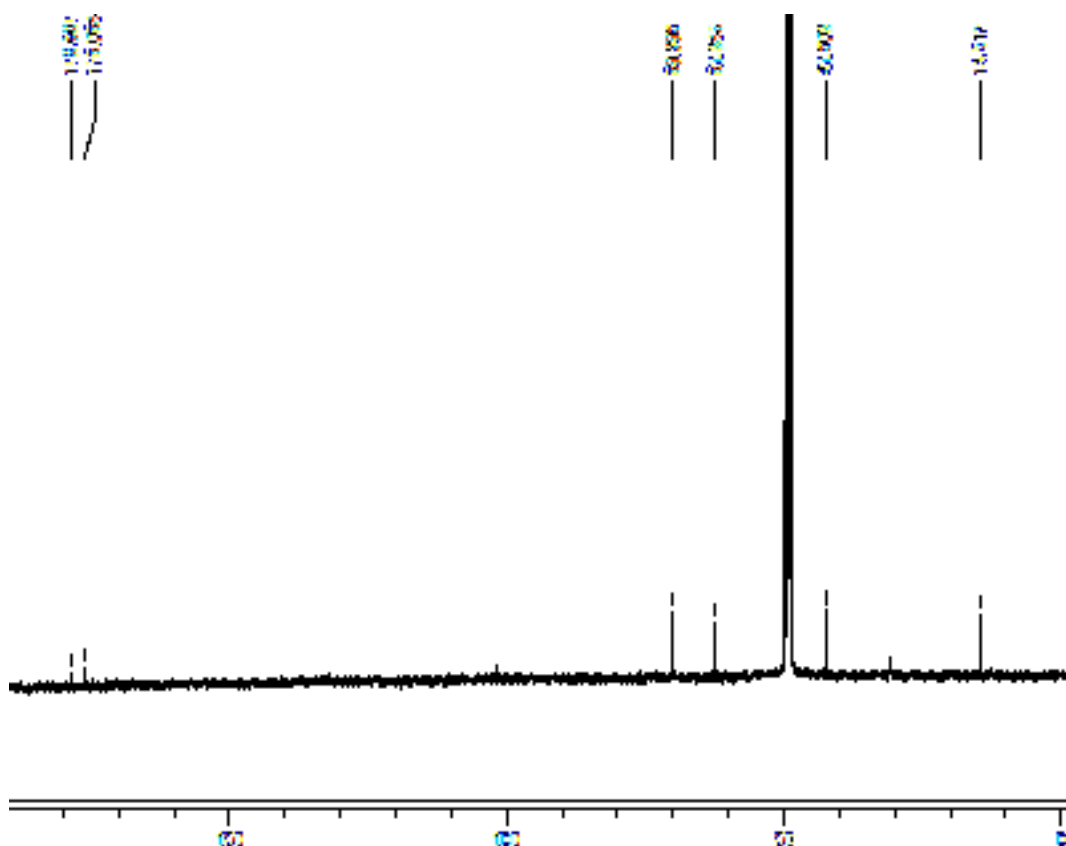


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 400 MHz) da substância **10**.

<i>Posição</i>	^{13}C	^1H (ppm)
1	178.6	
2	69.9	4.41 - dd
3	42.4	2.60 - m
4	176.0	
5	62.2	4.18 - dd
6	14.6	1.27 - t

Tabela 6. Valores dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 MHz) da substância **10**.

Pelo espectro de COSY (Figura 45) observamos a correlação entre os hidrogênios: H-5 em 4.18 (dd) e H-6 em 1.27 ppm (t) e também entre H-2 em 4.41 ppm (dd) e H-3 em 2.60 ppm (m).

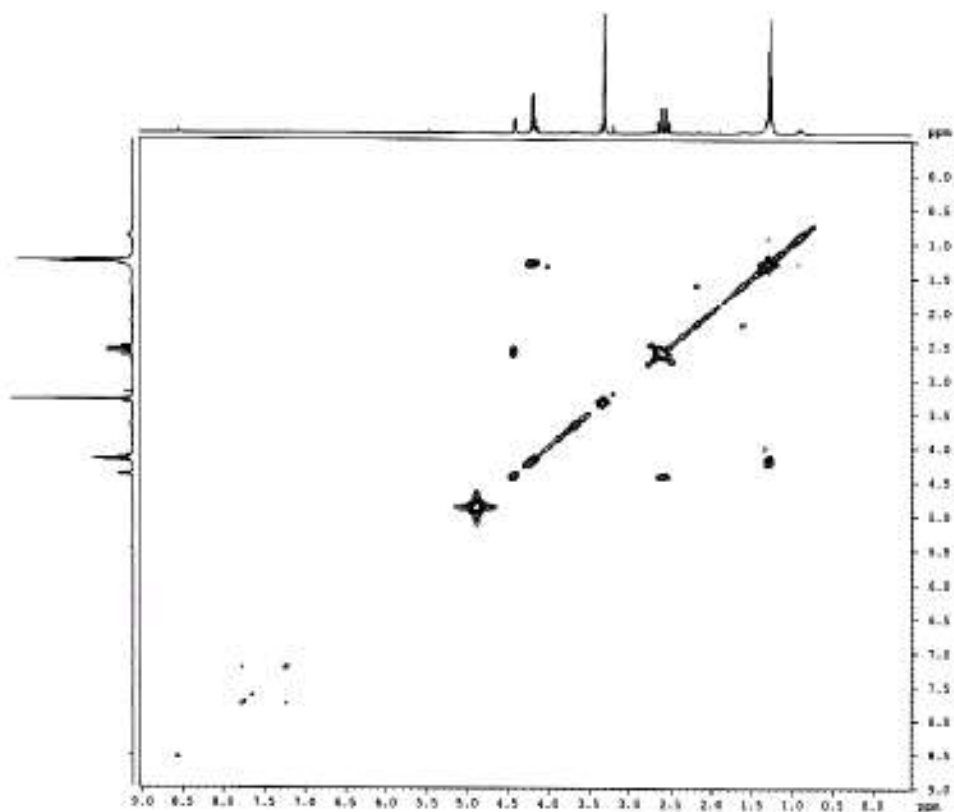


Figura 45. Espectro de correlação COSY (MeOD, 400 MHz) da substância **10**.

No mapa de correlações HSQC (**Figura 46**) pudemos perceber a correlação entre o H-2 com o C-2 em 69.9 ppm, entre o H-5 com o C-5 em 62.2 ppm, entre H-3 com o C-3 em 42.4 ppm e entre o H-6 e o C-6 em 14.6 ppm.

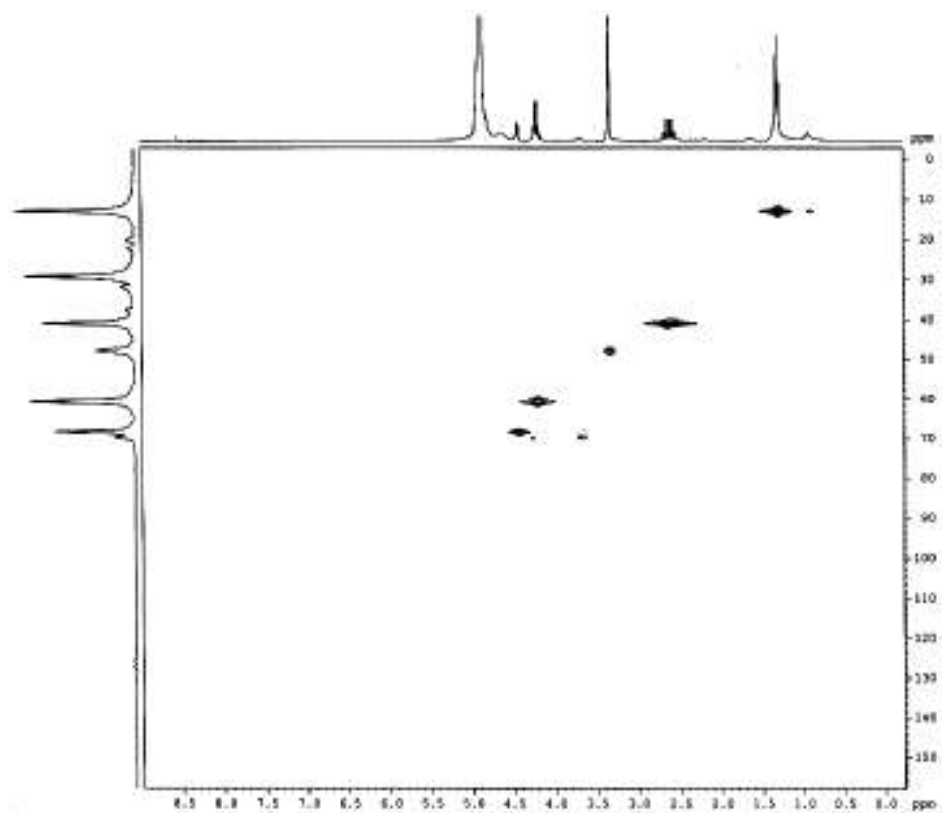


Figura 46. Espectro de correlação HSQC (MeOD, 400 MHz) da substância **10**.

Pelo mapa de correlação HMBC (**Figura 47**) observamos os demais dados, as correlações entre H-2 com os C-3 em 42.4 ppm, C-4 em 176.0 ppm e C-1 em 178.6 ppm, entre H-5 e os carbonos C-6 em 14.6 ppm e C-4 em 176.0, entre o H-3 com os carbonos C-2 em 69.9 ppm, C-4 em 176.0 ppm e C-1 em 178.6 ppm e entre H-6 com o C-5 em 62.2 ppm, estas correlações são mostradas na **figura 48**. Assim a substância **10** pode ser identificada como aspartato de etila (S10) (**Figura 49**).

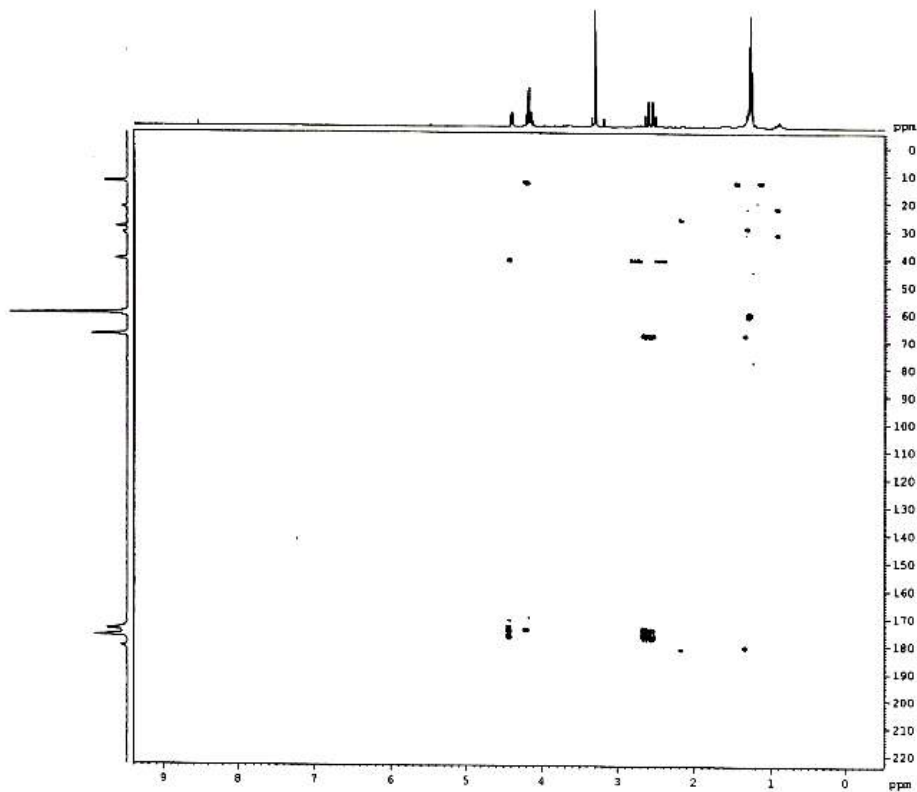


Figura 47. Espectro de correlação HMBC (MeOD, 400 MHz) da substância **10**

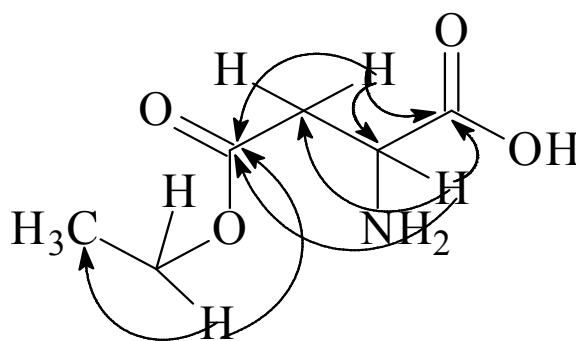


Figura 48. Estrutura química do aspartato de etila com correlação HMBC.

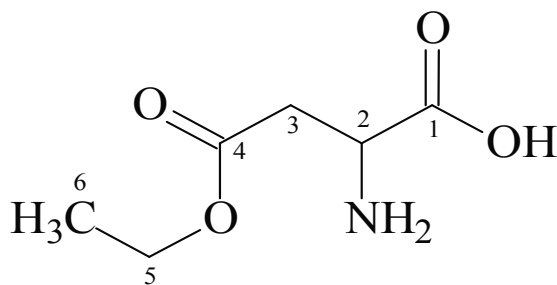


Figura 49. Estrutura química do aspartato de etila (S10).

5.2. Testes biológicos

5.2.1. Contra as catepsinas K e B

Foram testadas as frações MCFEH, MCFED e MCFEA frente as enzimas catepsinas K e B, ligadas aos processos de osteoporose e tumorais, respectivamente, e estas apresentaram 100% de atividade. Foram testadas também as amostras: S1, S2, S3, S4, S5 e S6 contras as duas catepsina. S1 apresentou atividade inibitória significativa contra a catepsina K, IC_{50} igual a $29,47\mu\text{M}$ (**Figura 50**), mas não apresentou inibição significativa contra a catepsina B. O IC_{50} foi calculado utilizando seis valores de concentração: $125\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $75\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $12,5\mu\text{M}$ e $0,25\mu\text{M}$, e foi feito em triplicata.

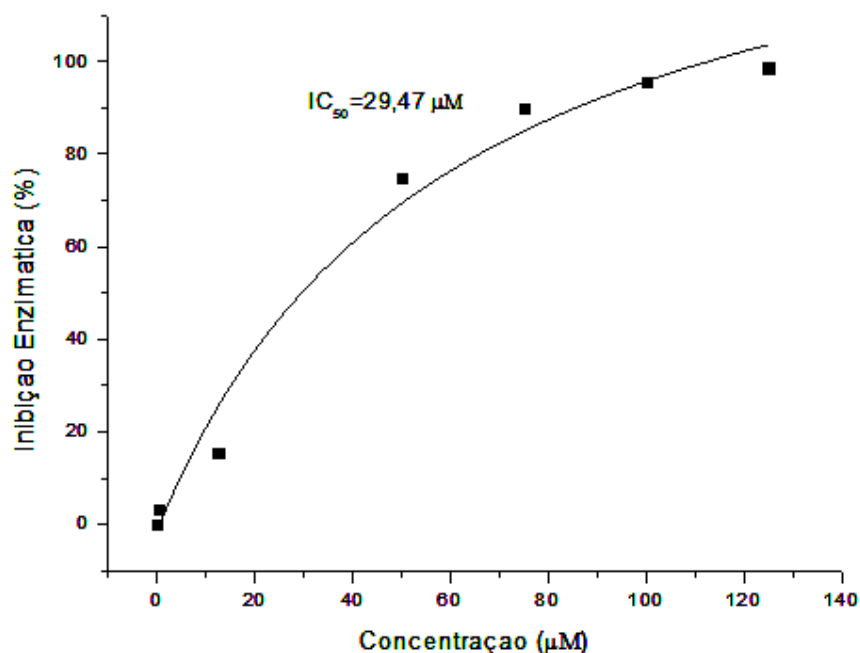


Figura 50. Gráfico de IC_{50} de S1, isolado das folhas de *M. cuneifolia*, contra a catepsina K.

S6 apresentou inibição significativa, praticamente igual a do seu precursor (S1), IC_{50} igual a $29,17\mu\text{M}$ (**Figura 51**), o IC_{50} foi calculado utilizando cinco valores de concentração: $125\mu\text{M}$, $62,5\mu\text{M}$, $15,6\mu\text{M}$, $7,8\mu\text{M}$, $4\mu\text{M}$ e $2\mu\text{M}$ e foi feito em triplicata. Os outros derivados não apresentaram inibição significativa frente à catepsina K.

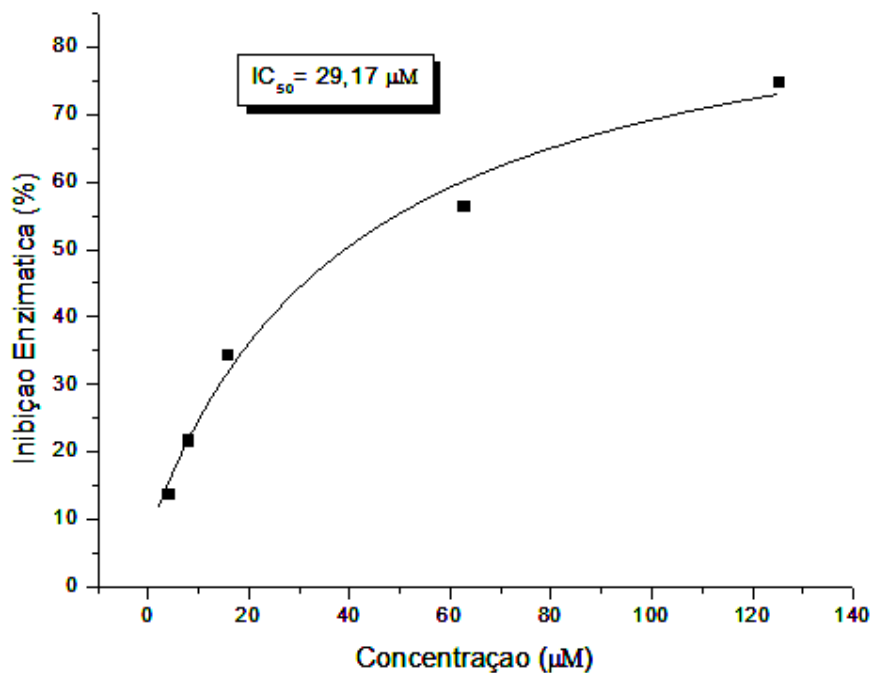


Figura 51. Gráfico de IC₅₀ de S6 contra a catepsina K.

Contra a catepsina B apenas a S4 apresentou inibição significativa, IC₅₀ igual a 41,99 µM (**Figura 52**), o IC₅₀ foi calculado utilizando quatro valores de concentração: 125 µM, 25 µM, 12,5 µM e 0,025 µM, e foi feito em triplicata.

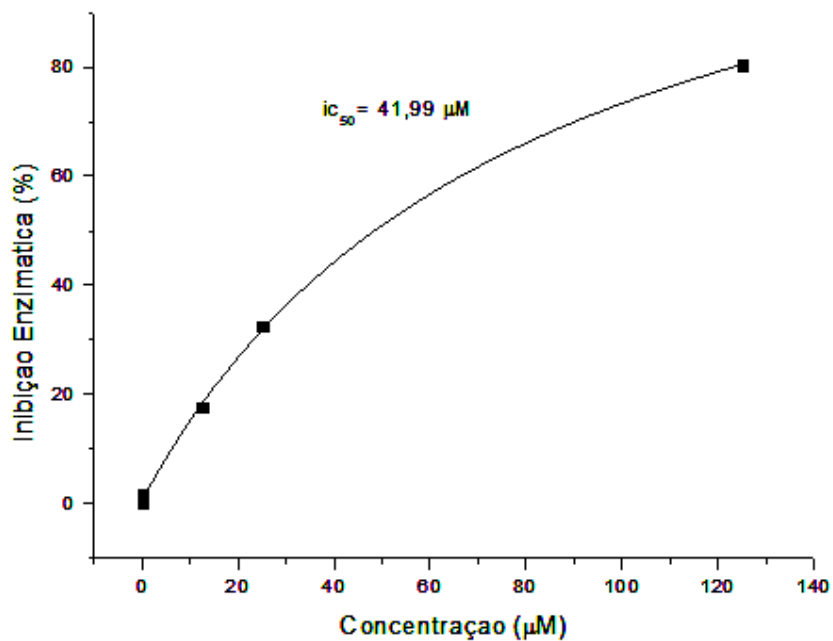


Figura 52. Gráfico de IC₅₀ de S4 contra a catepsina B.

Assim as modificações estruturais não foram significantes visando o aumento de inibição contra a catepsina K, apenas S6 apresentou potencial inibitório e não foi maior que o de seu precursor mas sim praticamente igual, já contra a catepsina B a reação de acetilação foi fundamental, pois o precursor não apresentou potencial inibitório mas seu derivado, no caso S4, apresentou inibição significativa.

Podemos então induzir que a presença das duplas ligações é importante para as duas atividades, principalmente contra a catepsina B, pois contra a catepsina K quando as ligações duplas foram reduzidas e a hidroxila fenólica substituída por um grupo éster a atividade foi mantida. A hidroxila fenólica não é importante para atividade frente a catepsina B, pois sua substituição por um grupo éster foi fundamental para o aparecimento de inibição, na catepsina K ela segue a explicação anterior, é importante juntamente com as ligações duplas, mas quando estas são reduzidas a substituição por um grupo éster é fundamental. Já o grupo ácido é importante para o potencial de inibição em ambas as catepsinas. Percebemos também que a metilação não foi importante para nenhuma das inibições.

5.2.2. Antimicrobianos

O Ácido Myrsinóico A e dois derivados, substâncias **4** e **5**, foram ensaiadas para verificar a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

A **Tabela 7** apresenta a concentração mínima inibitória (CMI) das substâncias testadas, S1, S4 e S5. S1 não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, em contrapartida os seus derivados, S4 e S5, apresentaram atividade antimicrobiana significativa nos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. S4 apresentou a CMI de 62,5 µg/mL no microrganismo *Bacillus subtilis* e CMI de 125 µg/mL nos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. S5 apresentou excelente resultado, CMI de 15,6 µg/mL nos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as concentrações testadas apresentaram efeito bacteriostático nos microrganismos citados acima. Nenhuma das substâncias testadas inibiram os microrganismos: *Micrococcus luteus*, *Cândida albicans*, *Salmonella entérica*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Streptococcus pyogenes*.

Substâncias	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)									
	<i>Bs</i>	<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Pa</i>	<i>MI</i>	<i>Ca</i>	<i>Ck</i>	<i>Ct</i>
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	62,5	125	-	125	-	125	-	-	-	-
S5	15,6	15,6	-	15,6	-	15,6	-	-	-	-

Ba= *Bacillus subtilis*; **Ec**= *Escherichia coli*; **St**= *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *typhi*; **Sa**= *Staphylococcus aureus*; **Sp**= *Streptococcus pyogenes*; **Pa**= *Pseudomonas aeruginosa*; **MI**= *Micrococcus luteus*; **Ca**= *Candida albicans*; **Ck**= *Candida krusei*; **Ct**= *Candida tropicalis*.

- : ausência de inibição

Tabela 7. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias testadas.

Os resultados descritos acima foram acompanhados por experimentos de controles do solvente (controle negativo), antibióticos padrões, controle do crescimento do microrganismo (caldo e microrganismo) e controle de precipitação da amostra, evitando possibilidade de resultado falso-negativo ou falso-positivo.

É interessante notarmos que as mudanças estruturais foram, portanto, importantes para o potencial de inibição frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Percebemos que as ligações duplas não são importantes para a atividade em todos os microrganismos testados e o grupamento ácido também não, mas o grupo éster da substância **4**, é fundamental para atividade cujo resultado foi igual para quase todos os microrganismos testados que foram inibidos, em exceção do *Bacillus subtilis*, cuja inibição foi em maior potencial.

5.2.3. Inseticidas

Ao compararmos as lagartas alimentadas com os extratos de folhas e frutos de *M. cuneifolia* incorporado à dieta artificial, observa-se que nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferença estatisticamente significativa (**Tabela 8**). O extrato de folhas de *M. cuneifolia* ocasionou uma moderada mortalidade larval de 46,67 % (**Tabela 9**).

Outro aspecto que deve ser observado é que apesar da moderada mortalidade larval, estes resultados não descartam a possibilidade de isolarmos substâncias de grande interesse deste extrato. As substâncias isoladas ainda não foram testadas frente às lagartas.

Tratamento	Duração da fase larval (dias)(±EP) ¹	Duração da fase pupal (dias)(±EP) ¹	Peso pupal (mg)(±EP) ¹
<i>M. cuneifolia</i>			
Folhas	36,00 ± 4,50 a	19,46 ± 2,37 a	260,27 ± 41,89 a
Frutos	35,05 ± 2,99 a	18,00 ± 1,24 a	273,09 ± 35,56 a
Controle	33,75 ± 5,22 a	18,09 ± 2,95 a	264,08 ± 28,77 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12 h.

Tabela 8. Médias da duração da fase larval e pupal, peso pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com o extrato, a 1000 mg kg⁻¹, de *M. cuneifolia*.

Tratamento	Mortalidade larval (%)(±EP) ¹	Mortalidade pupal (%)(±EP) ¹
<i>M. cuneifolia</i>		
Folhas	46,67 ± 15,27 a	11,33 ± 10,26 a
Frutos	26,67 ± 5,77 a	14,00 ± 14,53 a
Controle	20,00 ± 10,00 a	0,00 ± 0,00 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12 h.

Tabela 9. Médias das mortalidades larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com o extrato, a 1000 mg kg⁻¹, de *M. cuneifolia*.

5.2.4. Antitumoral

S1, S4, S5 e S7 foram testadas, estas amostras foram diluídas na concentração de 5 μ M (dose única) e testadas em concentração púnica, nas seguintes linhagens: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), SF-295 (SNC). As amostras são selecionadas de acordo com o percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90% nas linhagens celulares utilizadas em MTT.

As atividades citotóxicas das amostras estão apresentadas na **tabela 10** com suas respectivas porcentagens de inibição celular e desvio padrão (SD). Nenhuma das substâncias testadas apresentaram potencial inibitório significativo, maior que 90%, frente a qualquer célula, e portanto não seguiram para cálculo do IC₅₀.

Amostra	MDA 435 Média	MDA 435 SD	HCT-8 Média	HCT-8 SD	SF-295 Média	SF-295 SD
S1	4,24	4,03	37,71	0,30	33,76	1,73
S4	6,08	5,86	33,46	2,14	32,31	0,86
S5	8,32	1,34	39,52	6,67	41,94	3,45
S7	4,45	8,55	37,17	3,10	43,16	1,99

Tabela 10. Porcentagens de inibição celular (média) e desvio padrão das amostras testadas frente às células tumorais.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados deste trabalho são importantes para uma caracterização fitoquímica da planta *Myrsine cuneifolia*, cujo estudo é inédito, podendo prosseguir com este trabalho, sendo que muitas substâncias ainda estão na fase de isolamento e identificação.

- O estudo fitoquímico foi promissor, com o isolamento de 5 substâncias, sendo o aspartato de etila (S10) isolado pela primeira vez na família. A síntese de 5 substâncias derivadas do Ácido myrsinóico A (S1) isolado de *M. cuneifolia*, que foi excelente para análise das atividades e algumas vezes para melhorar a potencialidade.

- Ensaios realizados com extratos e substâncias puras, utilizando também comparação entre a substância isolada, S1, e seus derivados.

- Os testes com catepsinas K e B proporcionaram entusiasmo, sendo os extratos 100% ativos em ambas, e mesmo sendo bom o resultado do ácido myrsinóico A (S1), de S6 e de S4, podemos posteriormente chegar a uma substância com maior poder de inibição, podendo colaborar mais para um auxílio na quimioterapia de doenças que atingem a população mundial, osteoporose e câncer.

- Apesar do potencial inibitório não significativo obtidos dos extratos na avaliação do potencial inseticida, isto não retira a possibilidade de substâncias isoladas desta planta serem promissoras.

- Os resultados como antimicrobianos do ácido isolado (S1) não foram significativos mas de seus derivados foram muito interessantes, principalmente da substância 5, CMI de 15,6 µg/mL nos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, podendo seguir os estudos para um futuro fármaco promissor na inibição no crescimento de microorganismos.

- Mesmo os resultados inibitórios frente às células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon-humano), SF-295 (sistema nervoso central) não sendo potentes, isto não impede que estas substâncias sejam ativas frente a outras células tumorais e também que outras substâncias isoladas de *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) sejam potentes inibitórias frente a estas ou outras células tumorais.

- Estes resultados, são extremamente importantes para uma revisão sobre os potenciais da planta até então inédita, e também sobre as atividades biológicas trabalhadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- ACCORSI, W. R. **Medicina natural: Um novo conceito**. n°4, Vol. 2, p.5 (2000).
- ALMEIDA, S. S. M. S.; **Estudo Químico de Plantas com Atividade sobre Insetos Sociais**; Tese de doutorado, Departamento de química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2007.
- ALMEIDA V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução; **Química Nova**; 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- BAGALWA, M.; CHIFUNDERA, K.. Environmental impact evaluation of the stem bark extract of *Maesa lanceolata* used in Democratic Republic of Congo, **Journal of Ethnopharmacology**, 114, p.281–284, 2007.
- BREHMER, J. S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de ehrlich**. Itajaí, 2005.
- BERNARDES, J. M. A. de O. **Genética da Osteoporose Pós-menopausica**, Dissertação de mestrado; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, p. 5 (2003).
- BHANDARI, U.; JAIN, N.; ANSARI, M.N.; PILLAI, K.K.. Beneficial effect of *Embelia ribes* ethanolic extract on blood pressure and glycosylated hemoglobin in streptozotocin-induced diabetes in rats, **Fitoterapia**, 79, 351–355, 2008.
- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.; LOPES, M.N. "Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest". **An. Acad. Bras. Ci.**; 71 (2): 181-189, 1999.
- BORLAUG, N.E. **Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead**. In: R. Bailey, ed. Global warming and other eco-myths; Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. 2002.
- CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos – Biodiversidade. **Ciências e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37, 2003.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytotherapeutic Agents). **Braz J. Med Biol Res**, 33: 179-189, 2000.
- CANNELL R. J. P. **Natural Products Isolation**; Humana Press, New Jersey (1998).
- CHAPMAN, H. A.; RIESE, R. J.; SHI, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology, **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 63-88 (1997).
- CORDERO, C.P. *et al.* Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants, **Fitoterapia**, 75, p. 225–227 (2004).
- COTRAN, RS; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional. Neoplasia**. Rio de Janeiro, p. 233-295 (2000).

- COUTO , E. L. et al. **Cathepsin B and Heparanase activity and expression in head and neck squamous cell carcinoma**. 1st World Congress of the International-Academy-of-Oral-Oncology, p. 96-96 (2007).
- CROZIER A. et al.; **Plant Secondary Metabolites - Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (2006).
- CRUZ, I. **“A lagarta-do-cartucho na cultura do milho”**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, n. 21) p. 45, 1995.
- DEWICK, P. M.; **Medicinal Natural Products**; John Wiley & Sons Ltd, U.S.A., 2002.
- DONG, M.; NAGAOKA, M.; MIYAZAKI, S; IRIYE, R.; HIROTA, M.. 3-Geranyl-4-hidroxy-5-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoic acid as an Anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*; **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 66(9), 1650-1653, 1999.
- ELOFF J. N.; A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, 64: 711-713, 1998.
- FARNSWORTH, N. R, AKERELE, O., BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D., GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, 63(6):965-81 (1985).
- FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S.; **Informações Estratégicas sobre Plantas Medicinais Obtidas a partir de Bases de Dados em Linha Mimeo**, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 2000.
- FERREIRA S. H.; BARATA L. E. S.; SALLES S. L. M. e QUEIROZ S. R. R.; **Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências. São Paulo, 1998.
- GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 11 (3): 495-500, Jul/Sep, 1995.
- GATHUAMA, J. M.; MBARIA, J.M.; WANYAMAB, J.; KABURIA, H. F. A.; MPOKE, L.; MWANGI, J. N.. Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya; **Journal of Ethnopharmacology** , 91, p. 7–12, 2004.
- GOTTLIEB, O. & KAPLAN, M. A. “Das plantas medicinais aos fármacos naturais”, **Ciência Hoje**, 15 (89), 51-555, 1993.
- GUIMARÃES, L. D.; SILVA, M.A.D.; ANACLETO, T. C. **Natureza Viva Cerrado. Caracterização e Conservação**. Goiânia. Ed. UCG, p. 21-44 (2006).
- HIROTA, M.; MIYAZAKI, S.; MINAKUCHI, T.; TAKAGI, T.; SHIBATA, H.. Myrsinoic B, C and F, Anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*; **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 66(3), 655-659, 2002.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. EdUFSCar, São Carlos, 2003.
- ILZA, A.; PINOTTI F. P.; PINOTTI, M. H. H.; Cyanogenic Glycosides in Plants; **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n.5, p. 487-492, 2000.

- JANUÁRIO, A. M. **Estudo fitoquímico de *Myrsine umbrellata*, *M. lancifolia* e *M. guyanensis* (Myrsinaceae)**. Dissertação de mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 1990.
- KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R. P. “Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural”. **Rev. Agric.** 53: 68, 1978.
- KATUURA, E.; WAAKO, P.; TABUTI, J. R. S.; BUKENGA-ZIRABA, R.; OGWAL-OKENG, J.. Antiplasmodial activity of extracts of selected medicinal plants used by local communities in western Uganda for treatment of malaria, **African Journal of Ecology**, 45 (Suppl. 3), p.94–98, 2007.
- KAUR S, MICHAEL H, ARORA S, HÄRKÖNEN PL, KUMAR S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal Ethnopharmacol**, 97:15-20, 2005.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.
- LAWRENCE, O. AROT, M.; MIDIWO, J. O.; KRAUS, W.. A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves, **Phytochemistry**, Vol. 43, No. 5, pp. 1107-1109, 1996.
- LE BOURLEGAT, C.A. A fragmentação da vegetação natural e o paradigma do desenvolvimento rural. In: **Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região centro-oeste** (R. B. Costa, org.). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, p. 1-25, 2003.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design, **Chem. Rev.**, 2002.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. “**Princípios de Bioquímica**”. São Paulo: Sarvier, p. 543-678, 2006.
- LIMA, A. P., et al. **Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis***, Monografia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.
- LORENZI, H.; ABREU M. F. J. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**; Instituto Plantarum, São Paulo, 2002.
- MACIEL, M. S. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429, 2002.
- ISIDORO, M. M.; **Estudo fitoquímico de *Euxylophora paraensis* e avaliação das substâncias isoladas frente à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. Universidade Federal de São Carlos, Dissertação em Química Orgânica, São Carlos, 2008.
- MADJAROF, C. **Atividade antitumoral dos extratos e frações obtidos de *Didymopanax vinosum* (Araliaceae)**. Universidade Estadual de Campinas, Dissertação em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular, Campinas, 2004.

- MANS, DR.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, n. 5, p. 185-98 (2000).
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press; London, UK; 1982.
- MARTINS, E. R.; **Plantas medicinais**. Viçosa: UniversitáPria, p. 220, 1995.
- MELO, Adriana de. **Estudo da atividade imunomoduladora do extrato bruto de *Withania somnifera* em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich**. Tese de doutorado, 2004.
- MENDES, M. M.; **Estudo da ação antiofídica e da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Schizolobium parahyba***. Dissertação de mestrado; Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia (2007).
- MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; Uso de plantas medicinais na gravidez. In: SPRITZER, D. t.; SANSERVERINO, M. TT. V.; SCHÜLER-FACCINI, L.; **Manual de teratogênese**. 1ªed. Porto Alegre: UFRGS, p. 423, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. **Instituto Nacional do Câncer**. (Online). Disponível: <http://www.inca.gov.br/cancer> (14 de agosto de 2009).
- NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2, p.247-256 (2000).
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; 2th ed., Norma Aprovada (M27-A2). **NCCLS/CLSI**, Wayne, Pennsylvania - USA, 2002.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 6th ed., Approved Standard (M7-A6). **NCCLS/CLSI**, Wayne, Pennsylvania – USA, 2003.
- NISBEST, L. J.; MOORE, M. "Will natural products remain a important source of drug research for the future?". **Curr Opin. Biotechnol.**, 8 (6): 708-712, 1997.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, 56: 237-243 (2001).
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, Supl. 1, p. 45-61, São Paulo (2002).
- PINTO T. J. A., KANEKO T. M., OHARA M. T.; **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. Atheneu Editora, 2.ed., p. 325, São Paulo, 2003.
- RATES, S. M. K. "Plants as source of drugs". **Toxicon**, 39: 603-613, 2001.
- REGUERO, M. T., CALLE, J., MATA, R., Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Rapanea guianensis*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacêuticas**, 17, 57-61 (1989).

- RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Revista Brasileira de Farmacognosia; Brazilian Journal of Pharmacognosy*; 15(1): 65-70, Jan./Mar. 2005.
- RIGONATO, V. D. & ALMEIDA, M. G. **A Singularidade do Cerrado: a Inter-relação das Populações Tradicionais com as Fitofisionomias**. Encontro Regional de Geografia. A geografia no mundo da diversidade. Cidade de Goiás (2003).
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. “**Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**”, Baltimore: Willians & Wilkins, 1997.
- ROBICHAUD, J. et al. A Novel Class of Nonpeptidic Biaryl Inhibitors of Human Cathepsin K, *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 3709-3727 (2003).
- SIANI, A. C., GILBERT, B.; **Riopharma**, n. 18, 2000.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MCMAHON, J.; VISTECA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R.; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening; *J. Natl. Cancer Institute*, v. 82, n.13, p. 1107, 1990.
- SOUSA, M.P. et al. **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Brasileiras**. Ceará. Edições UFC, p. 416, 1991.
- TABULSI, L. R.;ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N.; **Microbiologia**, 3 ed., Atheneu, São Paulo, 1999.
- TALIERI, M. et al. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of coloretal adenoma to carcinoma. *Cancer Lett.*, v. 205, p. 97-106, 2004.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289, 2006.
- VALICENTE, F. H. & CRUZ, I. “Controle biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* com baculovirus”. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, **Circular Técnica**, n. 115, 1991.
- VIANA, P. A.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Manejo de pragas em agroecossistemas sob plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 22, p. 63, 2001.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326 (2006).
- VIEGAS, C. Jr. Terpenos com Atividade Inseticida: Uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos. **Química Nova**. 26, p. 390, 2003.
- WALL, M. E. & WANI, M. C. Camptothecin and Taxol: from Discovery to Clinic. *J. Ethnopharmacol*, 51, p. 239 (1996).

- YASUDA, Y.; KALETA, J.; BRÖMME, D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 973, 2005.

- ZHONG, X.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAZEDA, Y.. Hydroquinone diglycoside acyl esters from the leaves of *Myrsine seguinii*; **Phytochemistry**, 52, p. 923, 1999.