

**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE DUAS ESPÉCIES
VEGETAIS BUSCANDO O ISOLAMENTO E A IDENTIFICAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS LEISHMANICIDAS E TÓXICAS PARA CÉLULAS
TUMORAIS**

por

Carolina Paula de Souza Moreira

**Belo Horizonte
Março/2008**

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE DUAS ESPÉCIES VEGETAIS
BUSCANDO O ISOLAMENTO E A IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
LEISHMANICIDAS E TÓXICAS PARA CÉLULAS TUMORAIS**

por

Carolina Paula de Souza Moreira

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde na área de concentração Biologia
Celular e Molecular e subárea de Química de
Produtos Naturais.**

Orientação: Dra. Tânia M. de Almeida Alves

Co-orientação: Dr. Carlos Leomar Zani

Belo Horizonte

Março/2008

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M835e
2008

Moreira, Carolina Paula de Souza.

Estudo químico biomonitorado de duas espécies vegetais buscando o isolamento e a identificação de substâncias leishmanicidas e tóxicas para células tumorais, ou, Bioassay-guided isolation and structural characterization of cytotoxic and leishmanicidal compounds from two plant species / Carolina Paula de Souza Moreira. – Belo Horizonte, 2008.

xviii, 139 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 131 - 139

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/quimioterapia 2. Neoplasias/quimioterapia 3. Produtos Naturais/isolamento & purificação 4. Saponinas/química 5. Flavonóides/química
I. Título. II. Alves, Tânia Maria de Almeida (Orientação)
III. Zani, Carlos Leomar (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da quinquagésima primeira defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Carolina Paula de Souza Moreira, sob a orientação da Dra. Tânia Maria de Almeida Alves e co-orientação do Dr. Carlos Leomar Zani.

Aos vinte e sete dias do mês de março do ano de dois mil e oito, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da quinquagésima primeira dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação da aluna Carolina Paula de Souza Moreira intitula-se "Estudo químico biomonitorado de duas espécies vegetais buscando o isolamento e a identificação de substâncias leishmanicidas e tóxicas para células tumorais". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Tânia Maria de Almeida Alves - CPqRR/Fiocruz (orientadora e presidente da banca), Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta - UFMG (membro titular), Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - CPqRR/Fiocruz (membro titular) e Dra. Betânia Barros Cota - CPqRR/Fiocruz (membro suplente). Após arguir a aluna e considerar se a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada aprovada. Uma vez encerrado o exame, eu, Tânia Maria de Almeida Alves, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e sete de março de dois mil e oito.

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Dra. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Trabalho realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com auxílio financeiro da própria instituição e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos meus pais José Cornélio e
Erneci pelo exemplo de luta e por
todo amor que me foi dedicado.

Ao Max pelo apoio, paciência e amor
que foram imprescindíveis para
chegar até aqui.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me concedido tantas bênçãos e ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas. A Nossa Senhora pela sua constante intercessão e amparo nos momentos difíceis.

À minha orientadora Dra. Tânia pela amizade sincera, pelas inúmeras oportunidades ao longo desses anos, por compartilhar comigo seus conhecimentos, por abrir para mim as portas da ciência. Muito obrigada!

Ao Dr. Carlos Zani pela confiança, pelos vários ensinamentos e lições que vou levar por toda a vida, pelas brilhantes discussões e pelos vários momentos agradáveis fora do laboratório.

Aos amigos do LQPN: Ezequias, Márcio, Luiz, Renata, Elaine, Leonardo, Vívian e Isabel pela maravilhosa convivência. À Patrícia, Daniela e Rodrigo pela realização dos ensaios e amizade. À Susana e Fernanda minhas companheiras em todos os momentos. A Marcinha pelo sorriso largo, doçura e amizade que tornam o ambiente muito mais feliz.

À Betania, figura essencial para o alcance dessa dissertação. Por toda dedicação, por me ouvir, me ajudar. Obrigada por sua amizade!

Meus agradecimentos a Djalma, que como um anjo, veio em meu socorro. Obrigada por tudo!

Aos meus pais pelo amor, pela confiança e por me apoiar sempre nos estudos. Obrigada pela certeza de ter um porto seguro em vocês.

À minha família por ser minha alegria, meu alicerce, meu amparo, meu tudo. Especialmente a Valéria por ser muito mais que uma irmã. Aos meus amados sobrinhos Rodrigo, Fernanda, Gabriel, Guilherme e Alissa, por todos os momentos de alegria e brincadeiras.

À minha “turminha” que rezou por mim do início ao fim. Vocês que percorreram toda jornada ao meu lado. Vocês são mais que amigos!

Às amigas Flávia, Brenda, Fabiana e Fernanda por não desistirem de mim e fazerem das nossas diferenças a força que nos mantém unidas. A Mariana pela doçura de sempre. Obrigada meninas!

Aos amigos da Funed: Cláudia, Gorette, Vera, Andréa, Nilma, Fernanda, Bruno, Thiago e Thiaguinho, que me apoiaram, me compreenderam e rezaram por mim. Obrigada!

Especialmente a Fernanda, minha companheira de René e Funed pelo apoio e amizade.

Ao Max pela paciência, compreensão, companheirismo e amor. Sem o seu ombro teria sido muito mais difícil percorrer todas essas etapas. A vitória é nossa!

Ao Instituto René Rachou e à FAPEMIG pelo suporte técnico e financeiro para a realização deste trabalho.

“A natureza não faz nada sem propósito ou utilidade”.

Aristóteles

Sumário

Agradecimentos	i
Sumário	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	x
Lista de esquemas	xi
Lista de anexos	xii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Produtos naturais no descobrimento de fármacos	5
2.2. Biodiversidade brasileira fonte de produtos naturais	11
2.3. Produtos naturais e o câncer	12
2.4. Produtos naturais e as leishmanioses	19
2.5. <i>Pittosporum undulatum</i> Vent.	24
2.6. <i>Piptadenia adiantoides</i> (Spreng.) J. F. Macbr.	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	35
4.1. Preparo de extrato vegetal	35
4.2. Registro de dados	35
4.3. Detecção de classes de produtos naturais	36
4.4. Partição dos extratos entre solventes	36
4.4.1. Extratos brutos	36
4.4.2. Fração ALM	36
4.5. Métodos cromatográficos utilizados no fracionamento	37

4.5.1. Cromatografia por contracorrente de alta velocidade (CCCAV)	37
4.5.2. Cromatografia por co-corrente	37
4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	38
4.5.4. Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)	38
4.5.5. Cromatografia centrífuga radial (CCR).....	39
4.5.6. Cromatografia de exclusão	39
4.6. Hidrólise ácida	39
4.7. Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray	40
4.8. Espectrometria no Infravermelho	40
4.9. Espectrometria no Ultravioleta	40
4.10. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	42
4.11. Ensaio biológicos	42
4.11.1. Ensaio de toxicidade para células tumorais humanas	43
4.11.1.1. Preparo da suspensão de células.....	43
4.11.1.2. Plaqueamento das células	44
4.11.1.3. Plaqueamento das amostras	44
4.11.1.4. Controles	44
4.11.1.5. Contagem colorimétrica e interpretação dos resultados	45
4.11.2. Ensaio para avaliação de atividade leishmanicida para formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	46
4.11.2.1. Preparo da suspensão de amastigotas-axênicas	46
4.11.2.2. Plaqueamento das amastigotas e amostras na placa teste.....	47
4.11.2.3. Contagem colorimétrica e interpretação dos resultados	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. <i>PITTOSPORUM UNDULATUM VENT.</i>	50
5.1.1. Obtenção de sapogeninas	53
5.1.2. Elucidação estrutural das sapogeninas.....	56
5.1.3. Tentativa de purificação das saponinas	65
5.1.4. Determinação da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (CI ₅₀) da fração ALS.....	76
5.2. <i>PIPTADENIA ADIANTOIDES (SPRENG.) J. F. MACBR.</i>	78
5.2.1. Fracionamento biomonitorado de EX2903.....	78
5.2.2. Fracionamento de AFM e isolamento da rutina	84
5.2.2.1. Análise dos espectros de UV de FLA-4	86
5.2.2.2. Análise dos espectros de RMN de FLA-4 e identificação da rutina	88

5.2.2.3. Análise da rotina por IES-EM.....	91
6. CONCLUSÃO	97
7. PERSPECTIVAS.....	100
7.1. Referentes à <i>Pittosporum undulatum</i>	100
7.2. Referentes à <i>Piptadenia adiantoides</i>	100
7.3. Referente aos demais ensaios biológicos citados.....	100
8. ANEXOS.....	102
9. REFERÊNCIAS.....	131

Lista de figuras

FIGURA 1 – Estrutura da morfina	6
FIGURA 2 – Medicamentos utilizados no tratamento de malária	7
FIGURA 3 – AAS e seus precursores	8
FIGURA 4 – Penicilina	8
FIGURA 5 – Biomas Brasileiros (Fonte: www.wwf.org.br)	12
FIGURA 6 – Alcalóides da vinca e seus derivados	14
FIGURA 7 – Podofilotoxina e análogos em uso clínico	15
FIGURA 8 – Camptotecina e derivados	15
FIGURA 9 – Produtos naturais em estudo clínico para o câncer	16
FIGURA 10 – Estrutura do paclitaxel	18
FIGURA 11 – Classificação das moléculas não-biológicas introduzidas no mercado farmacêutico do câncer entre 1981 a 2006.	18
FIGURA 12 – Antimoniais comercializados. Estrutura proposta por Raht et al, 2003.	21
FIGURA 13 – Estrutura da pentamidina	21
FIGURA 14 – Estrutura da anfotericina B	22
FIGURA 15 – Estrutura da miltefosina	22
FIGURA 16 – Estrutura da paramomicina	23
FIGURA 17 – Produtos naturais com atividade leishmanicida	24
FIGURA 18 – Fotos da espécie <i>P. undulatum</i> coletada na RPPN Santuário do Caraça. (A) Planta inteira; (B) Frutos; (C) Frutos abertos mostrando sementes.....	25
FIGURA 19 – Terpenóides mais comuns nos óleos essenciais de <i>Pittosporum</i> spp.	26
FIGURA 20 – Sapogeninas e saponinas isoladas das folhas de <i>P. undulatum</i>	28
FIGURA 21 – Estrutura do R ₁ -barrigenol	29
FIGURA 22 – Estrutura da Bufotenina	30
FIGURA 23 – Substâncias isoladas de <i>P. gonoacantha</i>	30

FIGURA 24 – Fotos da espécie <i>P. adiantoides</i> coletada na RPPN Santuário do Caraca. (A) Folhas e vagens (B) Inflorescência.....	31
FIGURA 25 – Estrutura da Sulfarrodamina B.....	46
FIGURA 26 – Esquema da redução do MTT.....	48
FIGURA 27 – Esqueletos básicos de sapogeninas: esteroidais (coluna à esquerda) e triterpênicas (coluna à direita).....	52
FIGURA 28 – Espectro no IV de AL-Ac (KBr, cm^{-1}).....	54
FIGURA 29 – (a) Imagem digitalizada da placa de CCD ODS revelada com vanilina sulfúrica, das frações obtidas por CCR. Fração 60 marcada com círculo. (b) Cromatograma da fração 60: coluna ODS, λ_{210} nm, 70% ACN por 25 min.....	55
FIGURA 30 - Sapogeninas isoladas das folhas de <i>P. undulatum</i> por Higuchi et al. (1983a).....	57
FIGURA 31 – Estrutura do R_1 -barrigenol	58
FIGURA 32 – Estruturas das sageninas isoladas do extrato etanólico dos frutos de <i>P. undulatum</i>	60
FIGURA 33 – Espectro de IES-EM de SG1 (a) Espectro de ALG de 100 a 2000 m/z ; (b) aprisionamento do íon 655 m/z ; (c) fragmentação do íon 655 (CID 23%) com perda de 60 Da (ácido acético).....	63
FIGURA 34 – Espectro de IES-EM de SG2 (a) Espectro de ALG de 100 a 2000 m/z ; (b) aprisionamento do íon 653 m/z ; (c) fragmentação do íon 653 (CID 23%) com perda de 60 Da (ácido acético) seguida de perda de 100 Da (ácido acrílico).....	64
FIGURA 35 – (a) Cromatograma: coluna ODS, fluxo 1 mL/min, detecção λ_{210} nm (vermelho) e λ_{254} nm (preto), eluição isocrática 30% ACN (0,1% ácido fórmico) por 40 min. (b) Espectro de massas com IES: modo positivo, varredura de 100 a 2000 m/z	70
FIGURA 36 – Espectros de massas com IES obtidos por infusão direta. (a) modo positivo (b) modo negativo.....	71
FIGURA 37 – Espectro no IV de ALS (KBr, cm^{-1}).....	72
FIGURA 38 – IES-EM (modo negativo): fragmentação de m/z 1291 por CID.....	74
FIGURA 39 – Proposta de estruturas para as saponinas de ALS.....	75
FIGURA 40 – Curva dose-resposta da amostra ALS para células tumorais renais (TK-10). Valores de -100 a 0% de proliferação: atividade citocida, de 0-100%: atividade citostática. CI (concentração de inibição da proliferação), CL (concentração letal).....	77

FIGURA 41 – Massa das frações obtidas no fracionamento de AFD por Co-CCC ...	83
FIGURA 42 – (a) Imagem digitalizada da placa de CCD (sílica): AcOEt:MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH (6,5:1,5:1,5:2,0) revelada com vanilina/H ₂ SO ₄ , das frações obtidas por CLAE. (b) Cromatograma da fração 7: coluna ODS, 250 nm, 10-35% ACN :0,01% TFA em 20 min + 35-100% em ACN :0,01% TFA 5 min.....	85
FIGURA 43 – Localização das bandas de absorção de UV-VIS em flavonas.....	86
FIGURA 44 – Espectros de UV-VIS de FLA-4, varredura de 200 a 500 nm.....	87
FIGURA 45 – Espectros de IES-EM, modo positivo, da rutina. (a) <i>full</i> espectro da rutina; (b) fragmentação de 611 <i>m/z</i> ; (c) fragmentação de 465 <i>m/z</i> ; (d) fragmentação de 303 <i>m/z</i>	92
FIGURA 46 – Esquema da fragmentação da rutina por IES-EM (modo positivo)	93
FIGURA 47 – Espectros de IES-EM, modo negativo, da rutina. (a) <i>full</i> espectro rutina (b) fragmentação de 609 <i>m/z</i> ; (c) fragmentação de 301 <i>m/z</i>	94
FIGURA 48 – Esquema da fragmentação da rutina por IES-EM (modo negativo).....	95








Lista de tabelas






TABELA 1 – Novas entidades químicas lançadas no mercado farmacêutico entre 01/1981-06/2006.....	10
TABELA 2 – Avaliação biológica <i>in vitro</i> dos extratos de <i>P. undulatum</i>	50
TABELA 3 – Avaliação da atividade antineoplásica e leishmanicida das frações obtidas na partição do extrato EX2933.....	51
TABELA 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da sapogenina 1 (SG1) em piridina	61
TABELA 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da sapogenina 2 (SG2) em piridina	62
TABELA 6 – Análise da massa dos íons principais da amostra ALS nos modos positivo e negativo e proposta de massa molecular para as substâncias presentes	72
TABELA 7 – Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas na partição do extrato EX2903	79
TABELA 8 – Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas no fracionamento de AFD por CCCAV	80
TABELA 9 – Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas no fracionamento de AFD por Co-CCC	84
TABELA 10 – Dados de UV de FLA-4.....	87
TABELA 11 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de FLA-4 e rutina.....	89
TABELA 12 – Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) de FLA-4 e rutina.....	90

Lista de esquemas




ESQUEMA 1 – Obtenção de saponinas.....	56
ESQUEMA 2 – Fracionamento químico do extrato EX2933 e resultados dos ensaios biológicos de atividade antineoplásica e leishmanicida com amostras na concentração de 20 µg/mL.....	67
ESQUEMA 3 – Fracionamento biomonitorado das saponinas e resultados dos ensaios biológicos de atividade antineoplásica e leishmanicida com amostras na concentração de 20 µg/mL.....	69
ESQUEMA 4 – Fracionamento de EX2903 e obtenção de três flavonóides (FLA-1 a FLA-3).....	81
ESQUEMA 5 – Fracionamento de AFM e obtenção de um flavonóide (FLA-4).....	86

Lista de anexos

ANEXO 1 – Espectro de RMN de ^1H (piridina, 400 MHz) de ALG	102
ANEXO 2 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)	103
ANEXO 3 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)	104
ANEXO 4 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)	105
ANEXO 5 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)	106
ANEXO 6 – Espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)	107
ANEXO 7 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)	108
ANEXO 8 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)	109
ANEXO 9 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)	110
ANEXO 10 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)	111
ANEXO 11 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)	112
ANEXO 12 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)	113
ANEXO 13 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)	114
ANEXO 14 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 	115
ANEXO 15 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 	116
ANEXO 16 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 	117
ANEXO 17 – Mapa de contorno (^1H - ^1H COSY) de ALG (piridina, 400 MHz). 	118
ANEXO 18 – Expansão do mapa de contorno (^1H - ^1H COSY) de ALG (piridina, 400 MHz). 	119
ANEXO 19 – Mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 	120
ANEXO 20 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 	121

ANEXO 21 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).  ^1H	122
ANEXO 22 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).  ^1H	123
ANEXO 23 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da rotina	124
ANEXO 24 – Subespectro de RMN de ^{13}C , DEPT (DMSO- d_6 , 100 MHz) da rotina	125
ANEXO 25 – Expansão do subespectro de RMN de ^{13}C , DEPT (DMSO- d_6 , 100 MHz) da rotina	126
ANEXO 26 – Mapa e contorno HSQC de rotina (DMSO- d_6 , 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).  ^1H	127
ANEXO 27 – Mapa de contorno HSQC de rotina (DMSO- d_6 , 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).  ^1H	128
ANEXO 28 – Mapa de contorno (^1H - ^1H COSY) de rotina (DMSO- d_6 , 400 MHz).  ^1H	129

Lista de abreviaturas e símbolos

	Deslocamento químico
	Número de onda
1H-1H COSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy
AAS	Ácido acetilsalicílico
AcOEt	Acetato de etila
AcONa	Acetato de sódio
AFD	Fração diclorometânica da partição de EX2903
AFM	Fração hidrometanólica da partição de EX2903
AL-Ac	Fração em acetato de etila da hidrólise ácida de ALS
AL-Ac'	Fração em acetato de etila da hidrólise ácida de ALM
AL-Aq'	Fração aquosa da hidrólise ácida de ALM
ALB	Fração butanólica da partição de ALM
ALD	Fração diclorometânica da partição de EX2933
ALG	Mistura SG1 e SG2
ALM	Fração hidrometanólica da partição de EX2933
ALS	Fração rica em saponinas
AMB	Anfotericina B
BHCB	Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG
BOD	Estufa de demanda bioquímica de oxigênio
BuOH	Butanol
CCCAV	Cromatografia por Contracorrente de Alta Velocidade
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCR	Cromatografia Centrífuga Radial
CID	Collision Induced Dissociation
CI50	Concentração inibitória de 50% da proliferação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CMSP	Células de mononucleares do sangue periférico
Co-CCC	Cromatografia co-corrente
	Comprimento de onda

Da	Daltons
DCM	Diclorometano
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
D.O.U.	Diário Oficial da União
DQ	Departamento de Química da UFMG
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
EX2903	Extrato etanólico do caule de <i>Piptadenia adiantoides</i> (Spreng.) J. F.
Macbr	
EX2933	Extrato etanólico dos frutos de <i>Pittosporum undulatum</i> Vent.
F	Fração
FLA	Flavonóide isolado
HE	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
ICEEx	Instituto de Ciências Exatas
IES	Ionização por eletrospray
IRR	Instituto René Rachou
LAREMAR	Laboratório de ressonância magnética nuclear do DQ/ICEEx
LQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
m/v	Massa por volume
m/z	Relação massa/carga
MCF-7	Células de tumor de mama humano
MeOH	Metanol
MeONa	Metóxido de sódio
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio
NAPRALERT	Banco de dados Alerta de Produtos Naturais (Natural Products Alert)
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
NP/PEG	Natural Products/Polietilenoglicol
ODS	Octadecilsilano
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato em solução salina

PN	Produto natural
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	Unidade deslocamento químico nos espectros de RMN
RCF	Força Centrífuga Relativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
SbV	Antimônio com nox 5
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SG1	Sapogenina 1
SG2	Sapogenina 2
TCA	Ácido trifluoracético
TDR	Special Programme for Research and Training in Tropical Disease
TFA	Ácido trifluoracético
TK-10	Células tumorais renais humanas
TMS	Tetrametilsilano
Tol	Tolueno
TR	Tripanotona redutase
UACC-62	Células de melanoma humano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
V	Volt

RESUMO

Duas espécies vegetais foram objeto de estudo para esta dissertação: *Pittosporum undulatum* Vent. (Pittosporaceae) e *Piptadenia adiantoides* (Spreng.) J. F. Macbr. (Fabaceae). Elas foram selecionadas a partir da triagem realizada durante um projeto multidisciplinar envolvendo o LQPN e grupos do IRR e da UFMG. Os extratos etanólicos dos frutos de *P. undulatum* e do caule de *P. adiantoides* demonstraram citotoxicidade para uma ou mais linhagens de células tumorais humanas (MCF-7, UACC-62 e TK-10). Da primeira foi obtida uma fração rica em saponinas que mostrou elevada atividade citotóxica, com CI_{50} (concentração capaz de inibir em 50% a proliferação celular) de 1,7 $\mu\text{g/mL}$, um valor menor do que o encontrado por Oliveira e colaboradores (2006) para a droga controle etoposídeo (12 $\mu\text{g/mL}$). A fração rica em saponinas foi hidrolisada em meio ácido e o fracionamento da mistura reacional forneceu uma fração composta de duas sapogeninas triterpênicas. A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e dos dados de IES-EM permitiram a elucidação da estrutura dessas sapogeninas como sendo o (3 β ,15 β ,16 β ,21 β ,22 β)-21-(acetiloxi)-3, 15, 16, 28-tetraidroiolean-12-en-22-il 2-metilbutanoato e o (3 β ,15 β ,16 β ,21 β ,22 β)-21-(acetiloxi)-3,15,16,28-tetraidroiolean-12-en-22-il 3-metilbut-2-enoato. Esta é a primeira vez que são descritas sapogeninas derivadas de R1-barrigenol esterificadas em C-21 e C-22 para a espécie *P. undulatum*. Da segunda espécie vegetal, a fração dicloromêtanica (AFD), obtida por partição do extrato etanólico do caule, demonstrou atividade citostática para células MCF-7 inibindo em 100% a proliferação celular quando testada a 20 $\mu\text{g/mL}$. AFD foi fracionada empregando-se diversas técnicas cromatográficas resultando em frações ricas flavonóides que mostraram atividade citotóxica para as três linhagens de células tumorais. A fração MeOH:H₂O obtida da partição do extrato foi fracionada e forneceu a rutina (quercetina-3-O-[O- β -ramnopiranosil (1 β)- β -D-glicopiranosídeo)]. Esta é a primeira vez que esta espécie é investigada quimicamente e quanto à sua atividade biológica.

ABSTRACT

Two plant species were investigated in this work: *Pittosporum undulatum* Vent. (Pittosporaceae) and *Piptadenia adiantoides* (Spreng.) J. F. Macbr. (Fabaceae). They were selected after a screening in a multidisciplinary project performed by groups from IRR and UFMG. The ethanol extracts of *P. undulatum* fruits and *P. adiantoides* stem displayed toxicity against one or more human cancer cell lines (MCF-7, UACC-62, and TK-10). Active fractions of *P. undulatum* yielded a saponin rich fraction that showed GI₅₀ values (50% growth inhibition) of 1.7 µg/mL, smaller than that found for Oliveira e co-workers (2006) for the control drug etoposide (12 µg/mL). After acid hydrolysis of this fraction, a mixture of two triterpene sapogenins was obtained following column chromatography. Analysis of the ¹H and ¹³C NMR and ESI-MS spectra of this mixture allowed the structural elucidation of the sapogenins as (3^S, 15^S, 16^S, 21^S, 22^S)-21-(acetyloxy)-3, 15, 16, 28-tetrahydroxyolean-12-en-22-yl 2-methylbutanoate and (3^S, 15^S, 16^S, 21^S, 22^S)-21-(acetyloxy)-3,15,16,28-tetrahydroxyolean-12-en-22-yl 3-methylbut-2-enoate. This is the first report on the occurrence of C-21 and C-22 esters of R1-barrigenol in *P. undulatum*. The phytochemical and biological investigation of the second plant species (*P. adiantoides*) is reported here for the first time. It afforded a fraction (AFD) which inhibited by 100% the growth of MCF-7 at 20 µg/mL. AFD was fractionated using different chromatographic techniques resulting in a flavonoid rich fraction which were toxic to the three cancer cell lines. The MeOH:H₂O fraction (AFM) yielded rutin (quercetin-3-O-[O-(⁶-L-rhamnopyranosyl (1⁶)-⁶-D-glucopyranoside)], identified by analysis of its NMR and ESI-MS data.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Apesar de todo o avanço da química combinatorial, os produtos naturais continuam a exercer um importante papel no processo de descobrimento e desenvolvimento de fármacos (Newman & Cragg, 2007). Vários são os exemplos de medicamentos disponíveis no mercado que foram obtidos de espécies vegetais, sendo os produtos naturais isolados utilizados diretamente como medicamento ou como protótipo para o desenvolvimento de fármacos mais potentes e/ou menos tóxicos.

A flora brasileira é reconhecidamente uma das maiores do mundo. Apesar do amplo número de espécies descritas, sabe-se que um pequeno número delas já foi investigado do ponto de vista farmacológico e um número ainda menor foi submetido ao processo de isolamento e identificação das substâncias ativas.

O reconhecimento de que a diversidade biológica (e conseqüentemente, a diversidade química) da terra está diminuindo rapidamente tem renovado e intensificado o interesse da pesquisa de produtos naturais (McChesney, 2007).

Com o objetivo de contribuir para o estudo da flora do estado de Minas, buscando a descoberta de novas fontes de substâncias potencialmente úteis no tratamento de doenças, foi desenvolvido no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), do Instituto René Rachou, o projeto intitulado "Bioprospecção da Biodiversidade Mineira e Desenvolvimento de Novas Drogas". A bioprospecção pode ser definida como a busca sistemática e o desenvolvimento de novas fontes de substâncias, genes, micro e macroorganismos, e outros produtos biológicos de valor econômico (Makhubu, 1998). Nesse projeto cerca de três mil extratos vegetais foram avaliados em um painel de oito ensaios biológicos preditivos de atividade antimicrobiana, antiparasitária, antineoplásica e imunomoduladora relevantes para a detecção de substâncias úteis para o desenvolvimento de novas drogas. Os ensaios, todos *in vitro*, realizados no projeto foram:

- ₁ Ensaio de inibição da enzima tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi*;
- ₂ Ensaio de toxicidade para formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- ₃ Ensaio de toxicidade para formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;

- ☐ Ensaio de inibição da proliferação de três linhagens de células tumorais humanas;
- ☐ Ensaio de atividade antimicrobiana para *Bacillus tuberculosis*;
- ☐ Ensaio de atividade sobre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico.

Os extratos vegetais que apresentaram atividades biológicas acima do ponto de corte (determinado para cada ensaio) foram selecionados para investigação química biomonitorada, buscando-se o isolamento e a identificação das substâncias ativas, que poderão ser utilizadas como fármacos ou servir de protótipo para o desenvolvimento destes.

Para a presente Dissertação, foram selecionadas duas espécies vegetais, a *Piptadenia adiantoides* (Spreng.) J. F. Macbr. que apresentou atividade citotóxica para uma das linhagens de células tumorais humanas e a espécie *Pittosporum undulatum* Vent. que apresentou atividade citotóxica para as três linhagens de células tumorais humanas e também para formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar.

O estudo químico biomonitorado dos extratos etanólicos obtidos dessas espécies foi realizado com o objetivo de orientar o processo de fracionamento, visando o isolamento das substâncias ativas. As substâncias isoladas tiveram sua estrutura química elucidada mediante análise de dados espectrais e foram avaliadas quanto à atividade biológica. Esses dados são preliminares no processo de desenvolvimento de fármacos, aos quais se segue a necessidade de ensaios mais sofisticados e melhoramento estrutural, visando ao final à obtenção de substâncias mais potentes, menos tóxicas e mais facilmente comercializáveis.

Tendo em vista a crescente necessidade de novos agentes antineoplásicos e o papel fundamental dos países em desenvolvimento na descoberta de medicamentos para doenças negligenciadas, como é o caso das leishmanioses, é fundamental que estudos de avaliação do potencial terapêutico da flora brasileira sejam realizados. Esses estudos não só lançam novas moléculas no mercado da indústria farmacêutica, como servem de fundamentação científica para a proteção da nossa biodiversidade e de alavanca para o desenvolvimento tecnológico.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Produtos naturais no descobrimento de fármacos

Metabólitos secundários, ou produtos naturais, incluem uma vasta diversidade de substâncias que na atualidade somam mais de 200.000 estruturas definidas (Hartman, 2007). Os metabólitos secundários participam de várias funções bioquímicas e fisiológicas nos vegetais, como controle oxidativo intracelular, defesa contra patógenos, interações alelopáticas, atração de insetos, entre outros.

O metabolismo primário é responsável por todos os processos essenciais para o crescimento e desenvolvimento celular, enquanto o metabolismo secundário é indispensável para a sobrevivência do indivíduo em seu ambiente. As características principais do metabolismo secundário são sua alta plasticidade genética e diversidade química, que garantem uma adaptação flexível dos vegetais às constantes mudanças ambientais (Hartman, 2007).

Os produtos naturais são reconhecidos por sua alta diversidade estrutural, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que fazem com que essas substâncias produzam resultados expressivos no processo de descobrimento de novos fármacos (Koenh & Carter, 2005; Harvey, 2007). Os metabólitos secundários podem ser vistos como uma população privilegiada de estruturas selecionadas pela evolução para interagir especificamente com uma grande variedade de alvos biológicos, conduzindo a uma multiplicidade de indicações terapêuticas (Koenh & Carter, 2005; Harvey, 2007).

Os produtos naturais têm sido investigados e utilizados no alívio/tratamento de doenças desde o início da história da humanidade. No início do século XX, antes da 'era da síntese', 80% de todos os medicamentos eram obtidos de raízes, caules e folhas (McChesney et al., 2007). De fato, mais de 90% das classes terapêuticas atuais têm sua origem nos produtos naturais e, até hoje, cerca de $\frac{3}{4}$ da população mundial utiliza medicamentos a base de plantas nos cuidados primários à saúde (WHO, 2002). De fato, os produtos naturais continuam a significar uma importante fonte de fármacos ou seus protótipos. Seu papel dominante fica evidente quando as estatísticas mostram que aproximadamente 60% das substâncias anticâncer e 75% dos fármacos para doenças infecciosas são produtos naturais ou derivados de

produtos naturais (Newman et al., 2003; Cragg & Newman, 2005a; Newman & Cragg, 2007).

O estudo dos produtos naturais de origem vegetal começou, oficialmente, em 1806 quando Friedrich Wilhelm Sertürner isolou a morfina das papoulas de ópio (*Papaver somniferum*). Essa foi a primeira demonstração de que era possível isolar um princípio ativo de uma planta e atribuir a atividade biológica a essa única substância. A estrutura da morfina (Fig.1) foi elucidada em 1923 e sua síntese total foi completada em 1950, após 150 anos de seu isolamento (Hartman, 2007). A grande eficácia desse produto natural como analgésico foi reconhecida em 1853 e o início de sua utilização clínica ocorreu somente em 1961 (Viegas Jr & Bolzani, 2006).

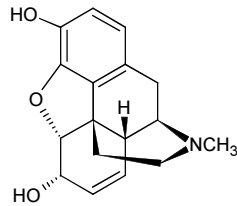


FIGURA 1 – Estrutura da morfina

O isolamento do antimalárico quinina (Fig.2) das cascas de espécie do gênero *Cinchona*, em 1820 por Caventou e Pelletier, despertou o interesse para o estudo químico de espécies vegetais que eram utilizadas na medicina popular. As cascas desses vegetais eram utilizadas por índios da Amazônia no tratamento de febres e tinham sido introduzidas na Europa em 1600 para o tratamento de malária. A quinina, após a II Guerra Mundial, serviu de protótipo para o desenvolvimento de cloroquina, mefloquina e primaquina (Fig.2), antimaláricos utilizados na atualidade (Cragg & Newman, 2005a; Viegas Jr & Bolzani, 2006). Outro produto natural utilizado no tratamento de malária, a artemisinina (Fig.2), foi isolada da *Artemisia annua* L., planta da medicina chinesa. Entretanto, devido às propriedades farmacocinéticas inadequadas, vários análogos modificados foram sintetizados (Fig.2), mantendo em sua estrutura a função endoperóxido necessária para a manutenção da atividade (Borstnik et al., 2002).

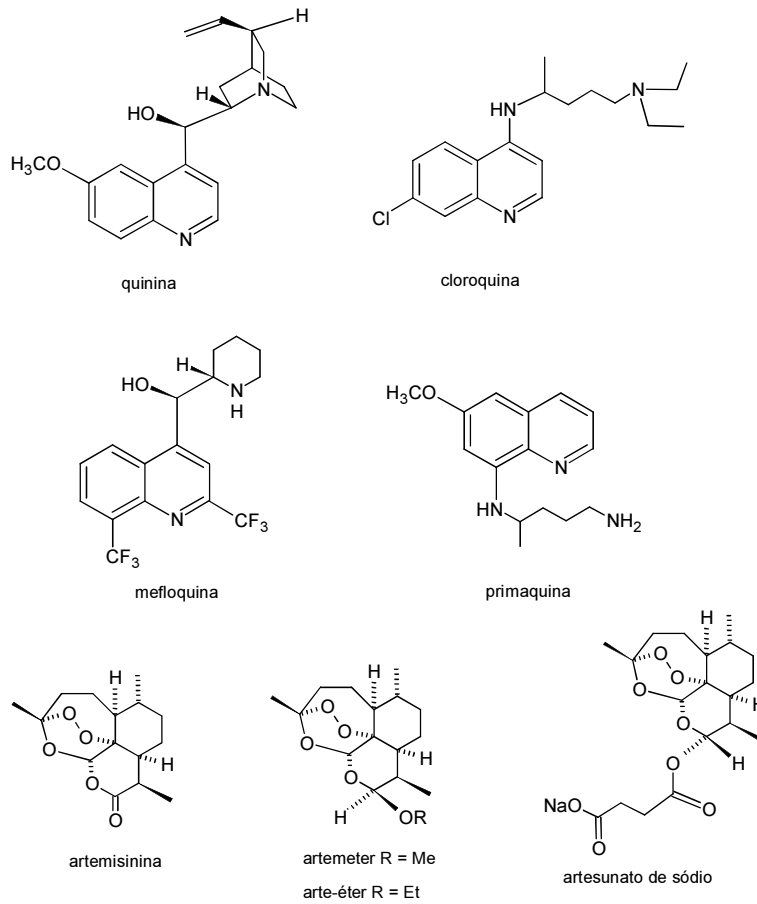


FIGURA 2 – Medicamentos utilizados no tratamento de malária

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais obtidos de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos da *Salix alba* L. Em 1828, no instituto de farmacologia de Munique, Johann A Buchner isolou o princípio ativo do vegetal, a salicina (Fig.3). Em 1860, Hermann Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (Fig.3) e seu sal sódico, que foi empregado clinicamente. Em 1878, Felix Hofmann, pesquisando a cura para a artrite que afligia seu pai, que era sensível ao salicilato de sódio, descobriu o ácido acetilsalicílico (AAS), o qual mantinha a atividade farmacológica (Fig.3). As

propriedades terapêuticas do AAS levaram a Bayer a produzi-lo e comercializá-lo a partir de 1897 com o nome de Aspirina[®] (Viegas Jr & Bolzani, 2006).

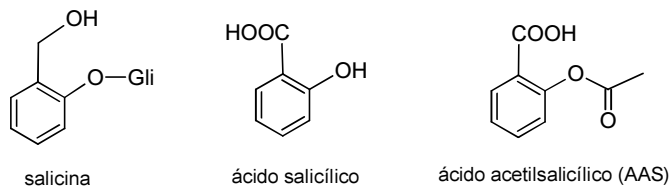


FIGURA 3 – AAS e seus precursores

A descoberta da penicilina (Fig.4) por Fleming em 1928, sua re-cristalização e estudos clínicos realizados por Chain e colaboradores na década de 40 e sua síntese e comercialização revolucionaram as pesquisas de descobertas de novas drogas (Butler, 2004).

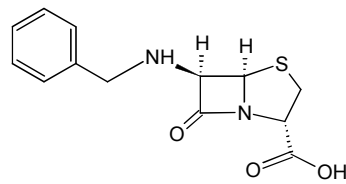


FIGURA 4 – Penicilina

A etapa inicial no descobrimento de fármacos necessita de várias substâncias para serem testadas frente a um ensaio biológico ou a um painel de ensaios. Aquelas que segundo os critérios estabelecidos são determinadas ativas são submetidas a outros ensaios em novas fases do processo.

Existem relativamente poucas fontes de substâncias para serem avaliadas: naturais, sintéticas, semi-sintéticas, de engenharia genética e de química combinatorial (Cordell, 2000). O principal objetivo da química combinatoria é identificar compostos biologicamente ativos através da triagem de um grande número de substâncias sintetizadas. É uma metodologia que foi desenvolvida para reduzir o tempo e o custo associados com a produção, mercado e introdução de novas drogas competitivas. Usa-se a química combinatoria para criar, sinteticamente, enormes coleções (bibliotecas) de moléculas, as quais podem ser ensaiadas eficientemente em massa (high throughput screening - HTS). Pela produção de compostos diversos em bibliotecas, há um aumento da probabilidade

de encontrar novos compostos de valor terapêutico e comercial (Leitão et al., 2000). O advento da química combinatorial criou uma grande expectativa na indústria farmacêutica e a maioria das grandes empresas alterou a estratégia de descoberta de novos fármacos para incluir uma grande porcentagem de substâncias desenvolvidas pela química combinatorial. Esse cenário fez com que o interesse nos produtos naturais fosse diminuído. Entretanto, os resultados dos ensaios com as primeiras bibliotecas foram decepcionantes, visto que não foi obtido grande número de substâncias líderes, e em meados de 1990 começaram os rumores sobre o verdadeiro valor da química combinatorial e a indicação de que os produtos naturais deveriam ser incorporados nos bons programas de descobrimento de fármacos (Cordell, 2000; Newman et al., 2003; Butler, 2004; Balunas et al., 2005).

Uma estratégia de sucesso de investigação de plantas visando o isolamento de substâncias biologicamente ativas é a triagem inicial seguida pelo fracionamento biomonitorado. Como exemplo pode ser citado o trabalho do NCI (*National Cancer Institut*) que será discutido mais adiante.

O fracionamento biomonitorado é um procedimento utilizado para identificar produtos naturais bioativos, sendo considerado um método de fluxo moderado e que depende de intensos recursos (Harvey, 2007). Entretanto, o rápido melhoramento dos instrumentos e robótica que revolucionaram o descobrimento de drogas também tem aumentado a velocidade de isolamento e identificação dos produtos naturais ativos (Butler, 2004). A dereplicação (ou seja, a identificação da substância ativa ainda na mistura, sem necessidade de isolamento) é hoje utilizada com frequência na orientação do processo de fracionamento biomonitorado. O acoplamento da espectrometria de massas e da ressonância magnética nuclear à cromatografia líquida aumentou muito a eficiência na análise e identificação dos produtos naturais ainda que presentes em amostras complexas como extratos e frações (Harvey, 2007).

A complexidade das estruturas químicas dos produtos naturais, característica crítica para a atividade biológica da substância, é com frequência apontada como impedimento para o processo de otimização do fármaco, assim como a pequena quantidade das substâncias puras que são frequentemente obtidas (Butler, 2004, McChesney et al., 2007). Entretanto, nos últimos anos tem havido um esforço significativo nos processos de semi-síntese e síntese de produtos naturais. O sucesso dessa estratégia é evidenciado pelo fato que 14 dos 15 fármacos derivados

de produtos naturais lançados de 2000 a 2003 são produzidos por semi-síntese (5 fármacos) ou síntese (9 fármacos). Esse esforço é particularmente evidente para drogas derivadas de produtos naturais utilizadas no tratamento de câncer, onde a síntese total é um passo crítico para a obtenção de material para estudos clínicos (Butler, 2004).

Os produtos naturais continuam sendo fonte de inovação no processo de descobrimento de novos fármacos, exercendo um importante papel tanto na farmacologia quanto no entendimento das vias metabólicas celulares que são essenciais para atividade observada. Análogos sintéticos de produtos naturais podem ser preparados para melhorar a solubilidade em água, alterar características farmacológicas ou aumentar a segurança de utilização, diminuindo a toxicidade. Nos últimos anos a análise detalhada de esqueletos de produtos naturais tem levado à identificação de moléculas precursoras relativamente simples, as quais formam blocos construtores que são utilizados na química combinatorial e na síntese, produzindo várias moléculas mais potentes e provando relações de estrutura-atividade (Cragg & Newman, 2005a).

Newman & Cragg (2007) fizeram uma análise estatística das novas entidades químicas lançadas no mercado farmacêutico entre os anos de 1981 e 2006. Nesses 25 anos, utilizando um subgrupo de classificação formado por substâncias sintéticas que mimetizam produtos naturais, foi verificado que das 1184 novas entidades químicas, 616 (52%) são relacionados com produtos naturais (Tab.1). Considerando-se apenas os produtos naturais e seus derivados, verifica-se que representam 28% das novas substâncias que foram transformadas em medicamentos nesse período.

TABELA 1 – Novas entidades químicas lançadas no mercado farmacêutico entre 01/1981-06/2006*

Categoria	Percentual
Biológico	14
Produto natural (PN)	5
Derivado de produto natural	23
Mimético de PN obtido por síntese	10
Sintético com grupo farmacofórico de PN/ mimético	10
Sintético com grupo farmacofórico de PN	4
Totalmente sintético	30
Vacina	4

Fonte: Newman & Cragg, 2007

2.2. Biodiversidade brasileira fonte de produtos naturais

Segundo o Artigo 2 da Convenção Brasileira sobre Diversidade Biológica (Decreto Nº 2.519, de 16 de Março de 1998), a Diversidade Biológica é definida como sendo a variabilidade de ecossistemas vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (BRASIL, 2008b).

Os produtos naturais são derivados do fenômeno da biodiversidade. A interação entre os organismos dessa diversidade e deles com os ecossistemas promoveu a diversidade de estruturas químicas dos produtos naturais, os quais foram utilizados na competitividade e sobrevivência ao longo da evolução. A natureza tem realizado química combinatorial desde o início, não por uma ou duas décadas, e tem selecionado produtos dessa biblioteca combinatorial que possuem específicas vantagens biológicas (McChesney, 2007).

O reconhecimento de que a diversidade biológica, e conseqüentemente da diversidade química, da terra está diminuindo rapidamente tem renovado e intensificado o interesse da pesquisa em produtos naturais (McChesney, 2007). Além disso, o potencial econômico que as substâncias presentes em nossa flora e fauna podem representar, podendo servir de protótipo para medicamentos, fertilizantes, edulcorantes, inseticidas, etc, também tem intensificado os estudos na área.

Apesar da intensa investigação da flora terrestre, estima-se que apenas 5 a 15% de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores tenham sido estudadas química ou farmacologicamente (Cragg & Newman, 2005a).

O Brasil tem uma área de 8,5 milhões de Km², ocupando quase a metade da América do Sul. Essa área possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no norte, o semi-árido no nordeste e áreas temperadas no sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas chamadas biomas (Fig.5). A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileiras, tornando-as as mais diversas do mundo, contendo mais de 20% do número total de espécies do planeta (BRASIL, 2008b).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas – quase 19% da flora mundial (Giulietti et al., 2005). Entretanto, apenas uma pequena parcela foi avaliada quanto à atividade biológica e um número ainda menor foi fracionado visando o isolamento e identificação dos princípios ativos. Tendo em vista que muitos medicamentos são produtos derivados de espécies vegetais e que apenas um pequeno número de plantas foi estudado, é importante que ocorra o estudo de espécies vegetais visando o isolamento e a identificação de produtos naturais potencialmente úteis no tratamento de doenças.

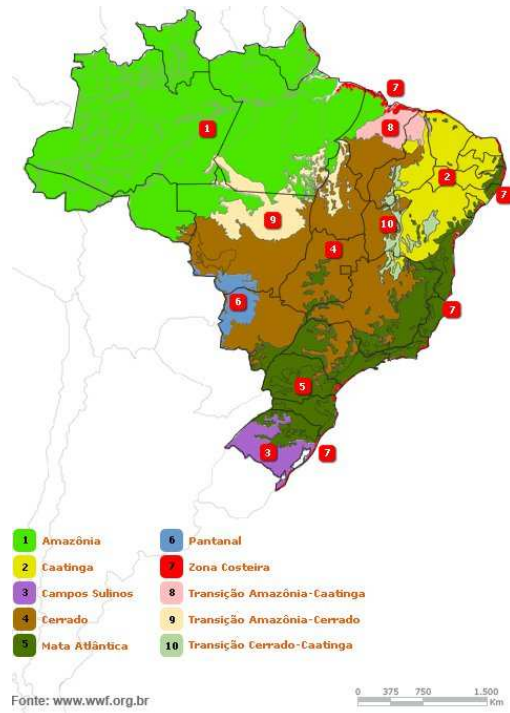


FIGURA 5 – Biomas Brasileiros (Fonte: www.wwf.org.br)

2.3. Produtos naturais e o câncer

O câncer é uma doença na qual ocorre alteração no processo normal de divisão celular. Vírus, substâncias químicas (carcinógenos), rearranjos de cromossomos ou transformações espontâneas de genes podem levar ao

desenvolvimento do câncer (Reddy et al., 2003). A carcinogênese é um processo de várias etapas no qual células normais são transformadas em células cancerígenas. A transformação envolve etapa de inicialização, freqüentemente causada por danos no DNA; etapa de promoção, na qual a proliferação das células é intensificada e etapa de progressão, que envolve outras alterações genéticas (Balunas & Kinghorn, 2005).

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer foram: pulmão (1,3 milhão); estômago (cerca de 1 milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil); e, mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (BRASIL, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (231.860 no sexo masculino e 234.870 no sexo feminino). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (BRASIL, 2008).

No último século o desenvolvimento de agentes citotóxicos revolucionou a terapia do câncer. Em alguns casos foi possível alcançar a cura, como no caso das leucemias agudas infantis, doença de Hodgkin, entre outras. O tratamento adjuvante também ofereceu benefícios adicionais aos obtidos com as cirurgias. Os agentes citotóxicos se mostraram capazes de controlar o crescimento dos tumores e também de oferecer melhor qualidade de vida aos doentes (Ismael et al., 2007).

A pesquisa por agentes antitumorais vindos de plantas começou no início dos anos 50 com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) e o isolamento das podofilotoxinas. Como resultado dessas descobertas, o NCI iniciou um intensivo programa de triagem de espécies vegetais focando plantas de áreas temperadas (Cragg & Newman, 2005b). Entre 1960 e 1986 mais de 35.000 espécies e 108.330 extratos foram triados em tumores murinos (Kinghorn & Balandrin, 1993).

Vimblastina e vincristina, conhecidas como alcalóides da vinca (Fig.6) foram isoladas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocinaceae) e estão em uso clínico por mais de 40 anos, sendo empregadas no tratamento de leucemias, linfomas e alguns tumores sólidos. Análogos semi-sintéticos de vimblastina e vincristina estão em uso clínico e incluem: vindesina, que é utilizada no tratamento de leucemias e câncer de pulmão; e vinorelbina, para o câncer de mama (Fig.6). Os alcalóides da vinca e vários derivados semi-sintéticos bloqueiam a mitose celular mediante ligação específica à tubulina, resultando em sua despolimerização (Kinghorn & Balandrin, 1993; Balunas & Kinghorn, 2005).

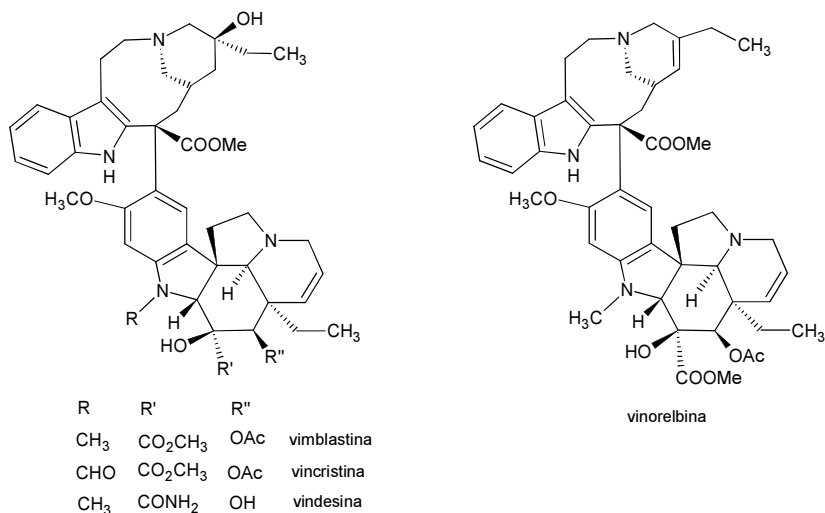


FIGURA 6 – Alcalóides da vinca e seus derivados

A podofilotoxina (Fig.7) foi isolada da resina da espécie *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae). Apesar da reputação das espécies do gênero *Podophyllum* no tratamento do câncer, a podofilotoxina e outras lignanas relacionadas se demonstraram extremamente tóxicas após a realização de estudos clínicos em meados de 1950. Vários análogos foram sintetizados com o objetivo de melhorar a solubilidade e diminuir a toxicidade resultando, 40 anos depois, na introdução de novos agentes clínicos: etoposídeo, que é utilizado no tratamento do câncer de pequenas células pulmonares, linfomas e câncer de testículo; e teneposídeo, que é utilizado no tratamento de tumores cerebrais (Fig.7). Esses análogos são epímeros da podofilotoxina na posição 1 e também se ligam à tubulina, impedindo a ação da

topoisomerase II e causando quebra da fita de DNA durante a fase G2 do ciclo celular (Kinghorn & Balandrin, 1993; Balunas & Kinghorn, 2005; Cragg & Newman, 2005b).

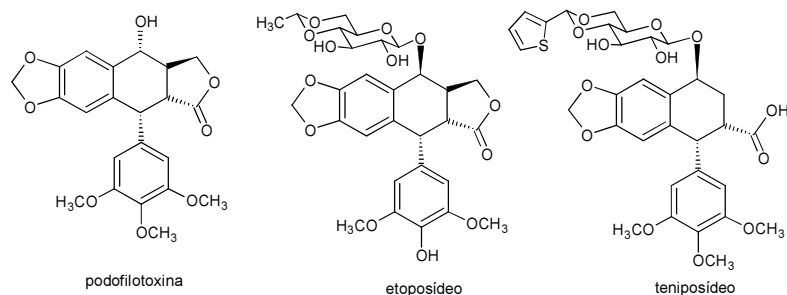


FIGURA 7 – Podofilotoxina e análogos em uso clínico

A camptotecina (Fig.8) foi isolada, em 1966, dos frutos de *Camptotheca acuminata* Decne. (Nissaceae), mas mostrou uma inaceitável mielosupressão. O interesse nessa substância foi renovado quando foi descoberto que ela agia seletivamente inibindo a topoisomerase I, estando envolvida na quebra das fitas do DNA. Modificações estruturais foram realizadas na molécula de camptotecina a fim de melhorar a solubilidade em água e diminuir a toxicidade, resultando em novas drogas, entre elas o topotecan e o irinotecan (Fig.8). O topotecan é empregado no tratamento de metástase de câncer de ovário e o irinotecan no tratamento de câncer colorretal. (Kinghorn & Balandrin, 1993; Balunas & Kinghorn, 2005; Cragg & Newman, 2005b; Ismael et al., 2007).

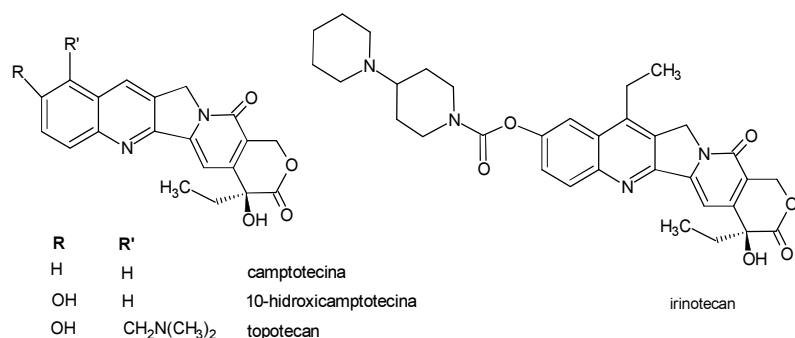


FIGURA 8 – Camptotecina e derivados

A busca por substâncias antineoplásicas não se restringiu ao programa do NCI iniciado em 1960. Após o encerramento do primeiro projeto, o Grupo Cooperativo Nacional de Descobrimto de Drogas (GCNDD), fundado por essa instituição, deu início ao projeto intitulado “Novas estratégias para agentes antineoplásicos derivados de plantas”, no qual triaram 2582 espécies, representando 1358 gêneros distintos e 288 famílias botânicas. Desta vez as plantas foram coletadas em florestas tropicais devido à grande biodiversidade encontrada nesse ecossistema. Extratos orgânicos (em clorofórmio) foram preparados e submetidos a ensaios *in vitro* frente a um painel de células tumorais. Os extratos ativos foram encaminhados para análise de dereplicação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e aqueles que mostraram ter substâncias inéditas para atividade antineoplásica foram submetidos ao fracionamento biomonitorado, permitindo o isolamento e a identificação das substâncias ativas que foram avaliadas em modelos *in vivo*. Algumas substâncias isoladas no projeto se encontram em estudo clínico, entre elas estão o ácido betulínico, o silvestrol e a pervileína A (Fig.9) (Balunas & Kinghorn, 2005).

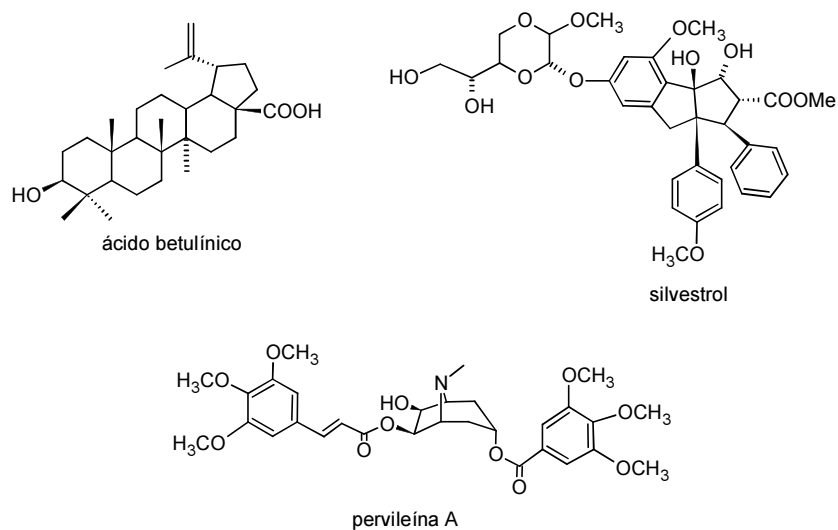


FIGURA 9 – Produtos naturais em estudo clínico para o câncer

O desenvolvimento de um fármaco é um processo complexo e que, em geral, demanda muitos anos. Um bom exemplo pode ser dado observando-se a história do paclitaxel. O Taxol[®] (paclitaxel), foi descoberto pelo programa do NCI de avaliação de extratos vegetais para atividade anticâncer. Em 1962 o botânico Arthur Barkley coletou a *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) e submeteu seu extrato ao programa do NCI. Em 1964 o extrato das cascas do caule se mostrou extremamente ativo no ensaio *in vitro* para células tumorais. O material vegetal foi então re-coletado e a atividade citotóxica confirmada em modelos animais. Em 1967, 1,36 toneladas de casca da planta haviam sido coletadas e processadas, permitindo em 1971 a elucidação da estrutura da substância (Fig.10). Investigações na década de 70 mostraram que o paclitaxel exercia sua atividade por um mecanismo novo de supressão de crescimento celular. Em 1977, depois de avaliado em diversos modelos animais e de mostrar elevada atividade, foi dado início ao processo de desenvolvimento do fármaco. Em 1983 o Taxol[®] foi submetido à utilização em humanos e em 1988 os primeiros resultados para câncer de ovário foram encorajadores, intensificando o processo de desenvolvimento do medicamento e aprovação de sua ampla utilização. O Taxol[®] começou a ser produzido por semi-síntese a partir de um precursor encontrado nas folhas de espécies do gênero *Taxus* e em 1992 foi aprovado para utilização em câncer de ovário refratário e no ano seguinte a Bristol-Myers Squibb faturou mais de 150 milhões de dólares com sua venda. No ano 2000, o Taxol[®] se tornou um medicamento genérico, mas suas vendas já haviam alcançado 2 bilhões de dólares para a empresa detentora da patente (McChesney, 2007).

A história desse antineoplásico mostra que são necessários muitos anos desde a indicação da atividade biológica até a comercialização do fármaco. Entretanto, sem um processo de triagem, uma investigação química visando o isolamento da substância ativa, nenhum processo de desenvolvimento pode ser iniciado. São várias etapas de pesquisa e desenvolvimento, mas cada uma delas cabe a um grupo de pesquisadores diferente. Cada etapa com igual importância, pois são todas essenciais para a finalização do desenvolvimento do produto.

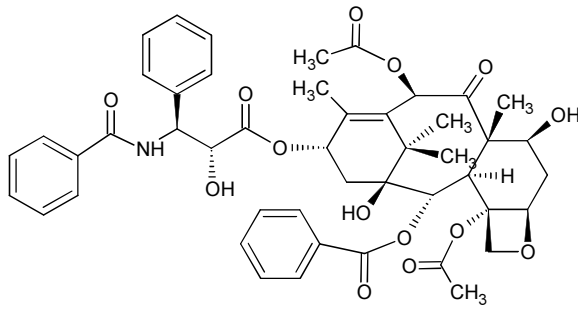


FIGURA 10 – Estrutura do paclitaxel

Segundo Newman & Cragg (2007) das 100 novas entidades químicas lançadas entre janeiro de 1981 a junho de 2006 no mercado farmacêutico do câncer, 81% eram moléculas não biológicas, divididas em: 9 produtos naturais (PN), 25 derivados de produtos naturais (DPN), 18 sintéticas (S), 12 miméticos de produtos naturais obtidos por síntese (MPNS), 11 semi-sintéticas (SS) e 6 miméticos de produtos naturais obtidos por semi-síntese (MPNSS). Desta forma, 61 (77,8%) das 81 substâncias antineoplásicas não biológicas comercializadas no período eram produtos naturais ou relacionadas a eles, mostrando que essa fonte de substâncias precisa ser continuamente investigada.

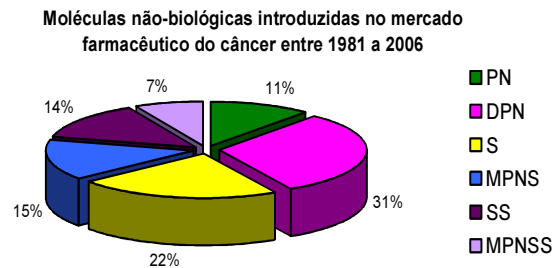


FIGURA 11 – Classificação das moléculas não-biológicas introduzidas no mercado farmacêutico do câncer entre 1981 a 2006.

Novos agentes citotóxicos precisam ser adicionados ao portfólio da terapia do câncer, trazendo ganhos em eficácia, diminuindo a frequência de efeitos adversos e oferecendo formas de administração mais convenientes.

2.4. Produtos naturais e as leishmanioses

As doenças parasitárias são muito comuns em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias e financeiras da população são precárias. Algumas dessas doenças ocorrem apenas nesses países e são consideradas negligenciadas pela OMS por não serem objeto de estudo das indústrias farmacêuticas para desenvolvimento de fármacos. Os recursos são particularmente limitados para a pesquisa envolvendo doenças negligenciadas, menos de 10% da quantia mundial gasta com pesquisas em saúde são destinados a essas doenças, embora elas sejam responsáveis por 90% dos problemas de saúde mundial (Remme et al., 2002).

A leishmaniose é uma doença considerada negligenciada e foi classificada pelo TDR (*Special Programme for Research and Training in Tropical Disease*), em 2002, como primeira categoria de prioridade. Uma das estratégias enfatizadas pelo programa da OMS é a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas, assim como o desenvolvimento de testes de diagnóstico, vacina e inseticidas (Remme et al., 2002).

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo o mundo, que afeta o homem e os animais, ocorrendo na Ásia, na Europa, na África e nas Américas (Rath et al., 2003). Existem 12 milhões de casos no mundo, sendo que a doença ocorre em 88 países e a incidência anual é de cerca de 2 milhões de novos casos (Gramiccia & Gradoni, 2005; Sereno et al., 2007).

Leishmania é um gênero de protozoário responsável por diversas patologias coletivamente denominadas de leishmaniose. As espécies do gênero *Leishmania* são organismos digenéticos que alteram entre a forma promastigota flagelada presente no flebotomíneo e a forma intracelular amastigota presente no hospedeiro vertebrado. As fêmeas dos flebotomínios transmitem as formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. As promastigotas se aderem aos fagócitos e são internalizadas por fagocitose. Dentro do macrófago as promastigotas sofrem várias alterações bioquímicas e metabólicas, se diferenciando na forma amastigota que é obrigatoriamente intracelular. As formas amastigotas se multiplicam dentro dos macrófagos, levando-os ao rompimento e re-invadindo novos macrófagos e também fibroblastos causando as diferentes manifestações clínicas (Davis & Kedzierski, 2005; Sereno et al., 2007). No novo mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença do homem, pertencentes ao

subgênero *Vianna* (V) e *Leishmania* (L), onde os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania* (V) *braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamenis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (L) mexicana*, *L. (L) amazonensis*, *L. (L) venezuelensis* e *L. (L) chagasi* (Rath et al., 2003).

As leishmanioses são classificadas em quatro formas clínicas: visceral, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa as quais se diferenciam pelas formas imunopatológicas e graus de morbidade e mortalidade (WHO, 2008). A leishmaniose visceral no novo mundo é, em geral, causada por parasitas da espécie *L. (L) chagasi* e é fatal se não tratada. As formas cutâneas são causadas por várias espécies, entre elas *L. (V) braziliensis* e *L. (L) amazonensis*, que são encontradas na América Latina. A forma mucocutânea é causada também pela espécie *L. (V) braziliensis* e, junto com as formas cutâneas, causam grande impacto social e econômico devido às lesões ulcerativas geradas, as quais muitas vezes levam à deformação da pessoa (Gramiccia & Gradoni, 2005).

A distribuição da doença não é uniforme nas áreas endêmicas: cerca de 90% dos casos das formas cutâneas ocorrem em sete países (Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria), enquanto cerca de 90% dos casos da forma visceral ocorrem nas áreas rurais e suburbanas de cinco países (Bangladesh, Índia, Nepal, Sudan e Brasil) (Gramiccia & Gradoni, 2005). O Brasil é um dos cinco países com maior número de casos das formas visceral e cutânea e a incidência vem aumentando nos últimos anos, sendo atribuída às mudanças ambientais e de comportamento que estão ocorrendo (Desjeux, 2004; WHO, 2008).

O principal tratamento recomendado, tanto para forma visceral como para a forma cutânea, foi introduzido há 50 anos. A demanda por novas drogas leishmanicidas tem sido intensificada nos últimos anos, principalmente com a crescente resistência aos antimoniais pentavalentes, terapia de primeira linha. Os fármacos que atualmente são recomendados no tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes: estibogliconato de sódio – PentostamTM (GlaxoSmithKline) e antimoniato de meglumina – Glucantime (Aventis); anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) e a pentamidina (Aventis) (Croft & Coombs, 2003; Davis & Kedzierski, 2005; Sundar & Chatterjee, 2006).

Os antimoniais foram introduzidos em 1945 e permanecem efetivos no tratamento de algumas formas de leishmaniose, mas necessitam mais de 28 dias de administração parenteral. O mecanismo preciso de ação dos antimoniais continua

desconhecido. Entretanto, é de consenso geral que o átomo de antimônio (Sb^{V}) age sobre vários alvos, interferindo no metabolismo bioenergético dos parasitas inibindo a glicólise, a beta-oxidação e a fosforilação do DNA. Também tem sido mostrado o bloqueio inespecífico de grupos SH de proteínas do parasito, causando a inibição da topoisomerase I (Croft & Coombs, 2003; Sundar & Chatterjee, 2006). O antimônio é um agente clastogênico, sendo o responsável pelos principais efeitos tóxicos do medicamento (Rath et al., 2003). A variável eficácia frente às formas visceral e cutânea, a emergente resistência do parasito e a toxicidade são fatores que têm limitado a utilização desses fármacos.

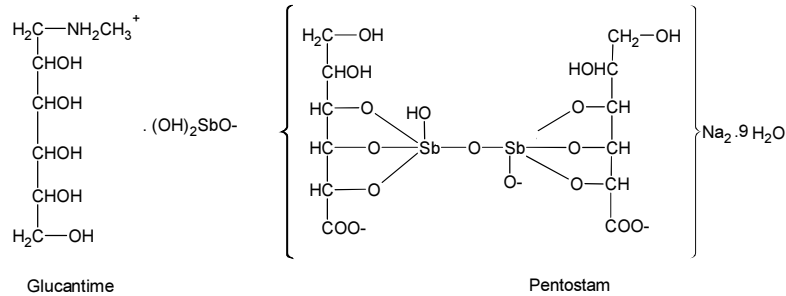


FIGURA 12 – Antimoniais comercializados. Estrutura proposta por Raht et al, 2003.

O tratamento de segunda linha das leishmanioses é feito com anfotericina B e pentamidina. Esses fármacos são caracterizados por sua alta eficácia, mas são relativamente caros e possuem severos efeitos adversos (Davis & Kedzierski, 2005).

O modo de ação da pentamidina ainda é desconhecido. Como o fármaco é inibidor competitivo do transportador de arginina, a atividade leishmanicida possivelmente é mediada pela interferência na biossíntese de poliaminas e no potencial de membrana das mitocôndrias. O que limita a utilização dessa substância é seu custo relativamente elevado e o fato de causar diabetes dependente de insulina e até mesmo a morte (Sundar & Chatterjee, 2006).

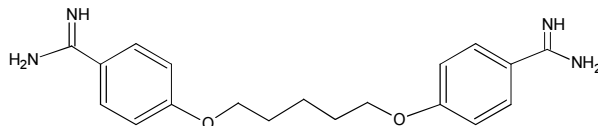


FIGURA 13 – Estrutura da pentamidina

O antibiótico anfotericina B tem apresentado resultados expressivos como fármaco de segunda escolha quando ocorre falha dos antimoniais. A atividade leishmanicida da anfotericina B foi descoberta em 1960, a qual foi atribuída pela afinidade pelo ergosterol (esteróide do parasito). A maior limitação ao uso dessa substância é a ocorrência de efeitos adversos: febre alta, tremores, tromboflebite, miocardite, hipocalcemia, disfunção renal, entre outros, o que pode levar à morte. Novas formulações estão sendo desenvolvidas para diminuir os efeitos tóxicos, entretanto, o custo dessas formulações torna-se um obstáculo à ampla utilização (Sundar & Chatterjee, 2006).

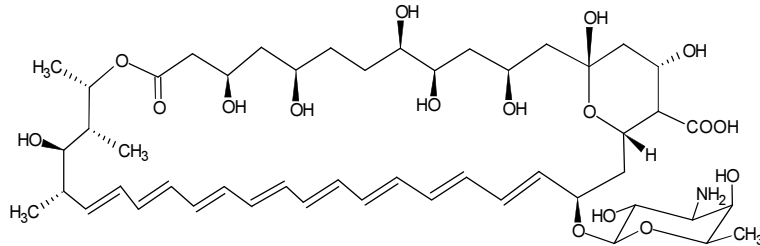


FIGURA 14 – Estrutura da anfotericina B

Talvez o avanço mais significativo dos últimos tempos tenha sido a utilização de miltefosina oral para o tratamento de leishmaniose visceral. Entretanto, a teratogenicidade desse fármaco exclui sua utilização por mulheres grávidas ou em idade fértil (Davis & Kedzierski, 2005; Sundar & Chatterjee, 2006). A utilização da miltefosina no tratamento de leishmaniose canina está sendo considerada. O tratamento efetivo dos cães beneficia não apenas a saúde dos animais, mas também reduz um importante reservatório da doença (Croft & Coombs, 2003).

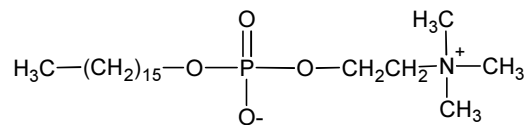


FIGURA 15 – Estrutura da miltefosina

Existem outros fármacos potenciais para o tratamento das leishmanioses que se encontram em desenvolvimento. A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, foi identificado como leishmanicida na década de 60 e tem sido submetida à fase

três de estudos clínicos para as leishmanioses visceral e cutânea (Croft & Coombs, 2003; Davis & Kedzierski, 2005; Sundar & Chatterjee, 2006).

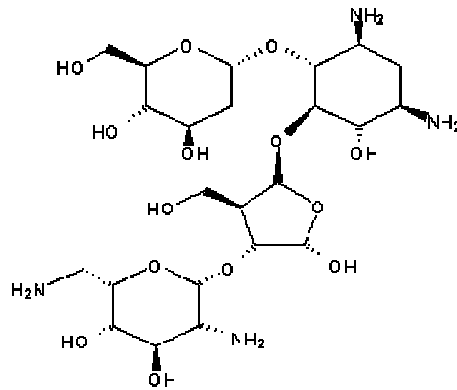


FIGURA 16 – Estrutura da paramomicina

O tratamento das leishmanioses enfrenta sérios problemas: o aumento da prevalência de resistência aos antimoniais; a necessidade de medicamentos alternativos com menor custo e toxicidade, além dos conhecidos obstáculos ao desenvolvimento de novas drogas para doenças negligenciadas (Davis et al, 2004). Por isso é necessário que novas drogas leishmanicidas sejam descobertas e que políticas sejam tomadas a fim de desenvolver medicamentos que não atraem o investimento de grandes empresas, mas que são vitais para a saúde de milhares de pessoas.

Os produtos naturais constituem uma fonte de substâncias muito utilizadas no desenvolvimento de fármacos antiparasitários. Segundo Newman & Cragg (2007) dos 14 novos antiparasitários lançados no mercado farmacêutico entre 1981 e 2006, 71,5% eram produtos naturais ou derivados deles.

Na busca por novos fármacos para o tratamento das leishmanioses alguns produtos naturais potencialmente ativos e seus derivados têm sido descritos, incluindo chalconas presente em *Glycyrrhiza glabra* L. e *Piper aduncum* L. e quercetina presente em *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Aveniente et al., 2007). Tanaka e colaboradores (2007) investigaram a atividade de alcalóides indólicos de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg e constataram que as ramiflorinas A e B mostraram bons resultados nos ensaios com formas promastigotas. As concentrações letais de 50% (CL_{50%}) foram 16,3±1,6 e 4,9±0,9 µg/mL,

respectivamente. As duas substâncias se mostraram mais ativas que a pentamidina, utilizada como controle e que apresenta $CL_{50\%}$ de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, podendo servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

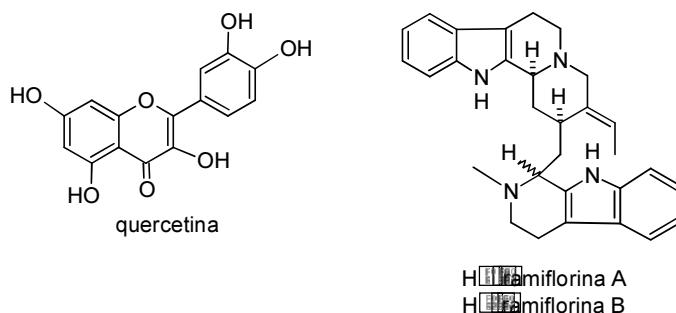


FIGURA 17 – Produtos naturais com atividade leishmanicida

Muitas espécies vegetais têm sido investigadas visando o isolamento de substâncias leishmanicidas. Em revisão realizada por Rocha e colaboradores (2005) foram citadas 102 espécies vegetais que mostram atividade para parasitos do gênero *Leishmania*, as espécies originárias do Brasil citadas foram *Peschiera australis* (Muell.Arg.) Miers., *Bryophyllum pinnatum* Lam., *Periandra mediterrânea* (Vell.) Taub. e *Piper aduncum* L. Os mesmos autores também fizeram uma revisão dos produtos naturais ativos, sendo citados: alcalóides, terpenóides, iridóides, lactonas, lignanas, flavonóides, cumarinas, esteróides, entre outros.

O tratamento medicamentoso das leishmanioses precisa ser melhorado e os produtos naturais têm demonstrado um grande potencial no desenvolvimento de fármacos antiparasitários, devendo ser mais explorado para permitir a identificação de novas substâncias, que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de um agente leishmanicida mais ativo e menos tóxico.

2.5. *Pittosporum undulatum* Vent.

A família *Pittosporaceae* é formada por três gêneros *Hymenosporum*, *Pittosporum* e *Sollya*. O gênero *Pittosporum* é formado por 20 espécies de arbustos (USDA, 2008a). Em pesquisa no banco de dados Napralert (2007) foi verificada a grande utilização etnofarmacológica de espécies do gênero *Pittosporum*. Entre as indicações estão: bronquite crônica, hemorragia, malária, doenças do fígado, angina,

diabetes, reumatismo, hipertensão arterial, entre outras. O mesmo banco de dados mostra que extratos de espécies desse gênero têm sido avaliados em ensaios biológicos, apresentando atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, citotóxica, antidiabética, imunossupressora, moluscicida, ente outras.

Pittosporum undulatum Vent. (Fig.18) é conhecida no Brasil como pau-incenso devido ao cheiro característico liberado pelas folhas e frutos. A planta é uma árvore que pode alcançar 12 m de altura em seu habitat natural, mas quando cultivada se limita à altura de 7 a 10 metros. As flores, encontradas na primavera e no início do verão, são brancas, pequenas e ocorrem em botões terminais. Os frutos, que aparecem no outono e persistem por vários meses, são cápsulas alaranjadas com 1 cm de diâmetro. A espécie é nativa da Austrália e Nova Zelândia, e também é encontrada como planta cultivada (principalmente com fins ornamentais) em outras regiões tropicais, como no Brasil (Medeiros et al., 2003; Lago et al., 2006).



FIGURA 18 – Fotos da espécie *P. undulatum* coletada na RPPN Santuário do Caraça. (A) Planta inteira; (B) Frutos; (C) Frutos abertos mostrando sementes.

QUADRO 1 – Classificação botânica da *Pittosporum undulatum*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Apiales
Família	Pittosporaceae
Gênero	Pittosporum
Espécie	Pittosporum undulatum

Fonte: <http://tolweb.org>

O óleo essencial de várias espécies de *Pittosporum* tem sido descrito, sendo os mono e sesquiterpenos seus constituintes majoritários. O mircênio, α -cadineno e β -cadinol são os terpenóides mais encontrados (Fig.19) (Lago et al., 2006). A análise do óleo essencial da *P. undulatum* mostrou que o calameneno (41,4%) e o farnesol (10,9%) são seus constituintes principais (Medeiros et al., 2003; Lago et al., 2006).

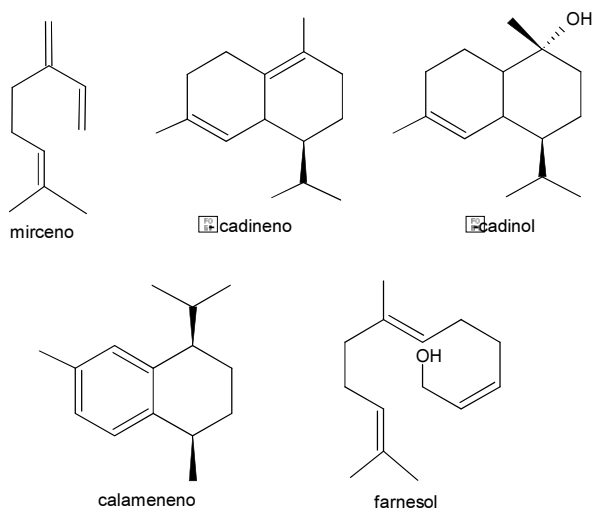


FIGURA 19 – Terpenóides mais comuns nos óleos essenciais de *Pittosporum* spp.

Segundo Medeiros e colaboradores (2003) o óleo essencial extraído das folhas da espécie *P. undulatum* não mostrou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas mostrou elevada atividade antitrombótica em relação ao padrão heparina.

A composição química dos frutos e folhas de *P. undulatum* tem sido investigada e vários derivados de terpenóides já foram descritos, principalmente saponinas triterpênicas (Cornforth & Earl, 1939; Higuchi et al., 1983a; Higuchi et al., 1983b). Higuchi e colaboradores (1983a) isolaram três sapogeninas aciladas do extrato das folhas de *P. undulatum*, identificadas como 22-O-(2-metilbutiloíla) e 22-O-(3,3-dimetilacrilóila)-A1-barrigenol (1 e 2) e 16-O-acetilcamelliagenina A (3). No mesmo ano, os autores isolaram saponinas monodesmosídicas (4 a 7), com cadeias de três e quatro açúcares, tendo como núcleo as geninas 1 e 2 (Fig.20). As saponinas foram denominadas 22-O-(2-metilbutiloíla) e 22-O-(3,3-dimetilacrilóila)-A1-barrigenol 3-O- β -D-glicopiranosil- (1 β 2)- β -D-galactopiranosil-(1 β 3)- β -D-ácido glicopiranosidicurônico e 3-O- β -D-glicopiranosil- (1 β 2)- β -D-arabinopiranosil-(1 β 3)- β -L-arabinopiranosil-(1 β 4)- β -D-ácido glicopiranosidicurônico (Higuchi et al., 1983b).

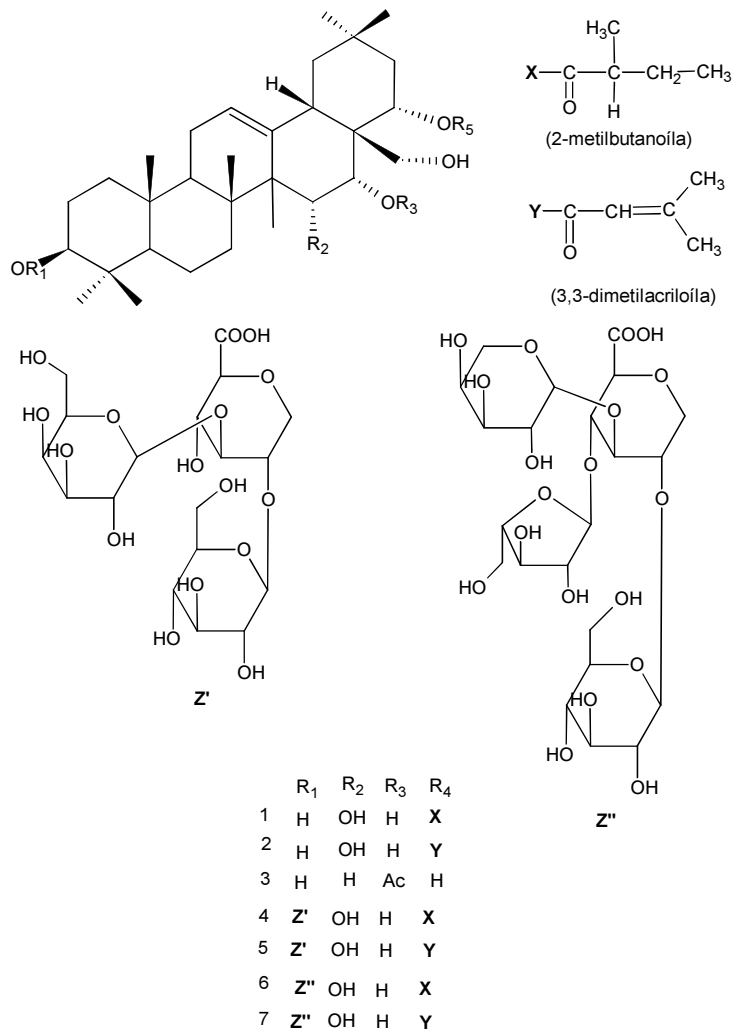


FIGURA 20 – Saponinas e saponinas isoladas das folhas de *P. undulatum*

Saponinas triterpênicas também foram isoladas das espécies *P. tobira* Ait., *P. phylliraeoides* D.C., *P. pentaurum* e *P. viridiflorum* Sims, desta vez tendo como genina o R1-barrigenol (Fig.21) (D'Acquarica et al., 2002; Éparvier et al., 2007).

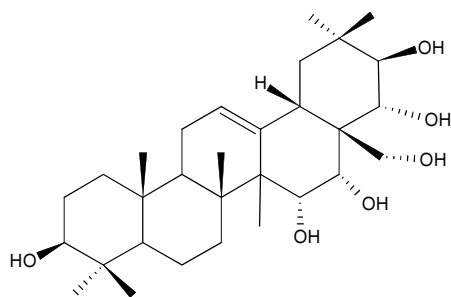


FIGURA 21 – Estrutura do R₁-barrigenol

Outros produtos naturais também são encontrados com frequência em espécies desse gênero. Vários carotenóides já foram isolados de *P. tobira* Ait. (Fujiwara et al., 2001; Fujiwara et al., 2002; Maoka et al., 2006). Glicosídeos sesquiterpênicos foram isolados de *P. pentandrum* (Blanco) Merr. (Ragasa et al., 1997) e glicosídeos farnesílicos foram isolados de *P. pancheri* Brongn. & Gris (Éparvier et al., 2007).

2.6. *Piptadenia adiantoides* (Spreng.) J. F. Macbr.

A família Fabaceae é uma das mais numerosas famílias botânicas, composta por 236 gêneros. As espécies do gênero *Piptadenia* são nativas do Peru e do Brasil. No Brasil foram descritas 31 espécies, encontradas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Yamasato et al., 1972; USDA, 2008).

As espécies *Piptadenia* spp. têm sido utilizadas por índios de vários países da América Latina como fonte de drogas mágicas e medicinais. Índios da Amazônia usam o pó dos frutos de *P. peregrina* no preparo do rapé, que é utilizado pelo pajé nos rituais da tribo (Iacobucci, 1964; Yamasato et al., 1972).

Stromberg isolou a bufotenina (Fig.22) dos frutos de *P. peregrina* (L.) Benth., e a essa substância foi atribuída a atividade alucinógena observada quando se inala o pó dos frutos, atividade exercida pela mimetização da ação da serotonina no cérebro. A bufotenina, o óxido de bufotenina e o óxido de N,N-dimetiltriptamina foram isolados dos frutos de *P. peregrina* e *P. macrocarpa* Benth. As sementes de várias espécies do gênero *Piptadenia* foram investigadas e a bufotenina e muitas

bases indólicas (derivados de triptamina) foram encontrados (Fish et al., 1955; Iacobucci G, 1964; Felolows & Bell, 1971; Yamasato et al., 1972, NAPRALERT, 2007).

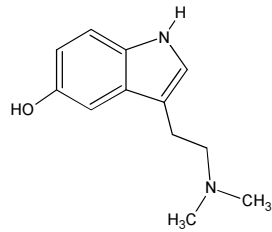


FIGURA 22 – Estrutura da Bufotenina

Da espécie *P. gonoacantha*, espécie da mata atlântica conhecida com 'pau-jacaré', foram isolados flavonóides: apigenina (1), 5-metoxi-apigenina (2), 7,4'-diidroxí-3',5-dimetoxiflavona (3), isovitexina (4) e vitexina (5); além do galato de metila, sitosterol, 3-O-βD-glicopiranosil-sitosterol, estigmasterol e o éster N-benzoilfenilalaninato de 2-benzoilamida-3-fenil-propila (6) (Carvalho et al., 2007).

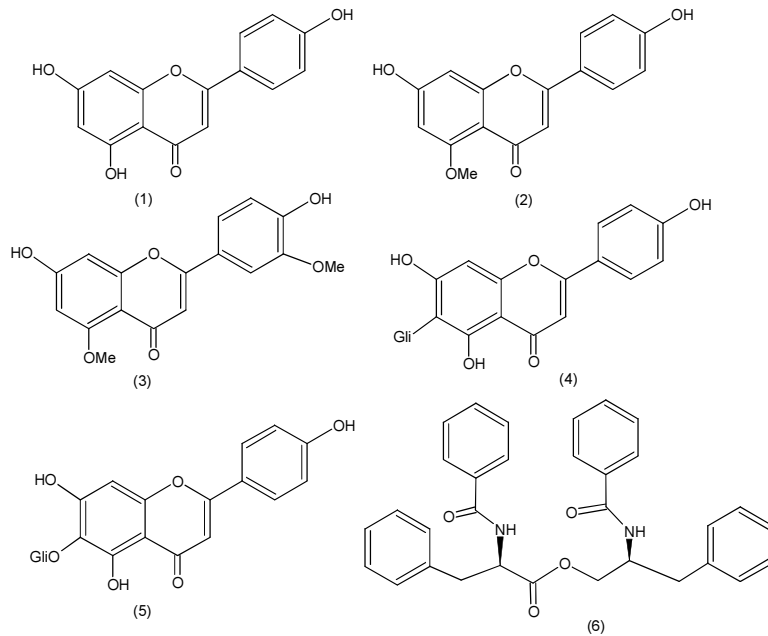


FIGURA 23 – Substâncias isoladas de *P. gonoacantha*

Em busca no banco de dados NAPRALERT (2007) não foi encontrado nenhum estudo químico ou farmacológico da espécie *Piptadenia adiantoides*. Entretanto já foram descritas: a atividade moluscicida da raiz e galhos de *P. biuncifera* Benth., das cascas e frutos de *P. macrocarpa*, galhos de *P. moniliformis* Benth.; atividade citotóxica de *P. obliqua* (Pers.) Macbr. e atividade antibacteriana de *P. stipulacea* Ducke.

QUADRO 2 – Classificação botânica da *Piptadenia adiantoides*

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Piptadenia</i>
Espécie	<i>Piptadenia adiantoides</i>

Fonte: Rede de sementes do Cerrado (2006) e <http://tolweb.org>



FIGURA 24 - Fotos da espécie *P. adiantoides* coletada na RPPN Santuário do Caraça. (A) Folhas e vagens (B) Inflorescência.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a flora local para identificar espécies contendo substâncias citotóxicas e leishmanicidas.

3.2. Objetivos específicos

Constituem objetivos específicos deste trabalho:

1. Realizar o estudo químico biomonitorado das espécies *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae) e *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae) visando obter substâncias tóxicas para linhagens de células tumorais humanas e para amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
2. Identificar as substâncias isoladas mediante análise de dados espectrais;
3. Determinar a potência dos produtos naturais bioativos nos ensaios empregados mediante a determinação de curvas dose-resposta.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo de extrato vegetal

O material vegetal (frutos da *Pittosporum undulatum* e caule da *Piptadenia adiantoides*) foi coletado na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santuário do Caraça – MG nos dias 13 e 14 de abril de 2004. As exsiccatas para identificação das espécies foram depositadas com os códigos BHCB 80341 (*P. undulatum*) e BHCB 80331 (*P. adiantoides*) no Herbário do Departamento de Botânica da UFMG.

O material vegetal foi seco em estufa a 40°C e moído. Foram obtidos 495 g de pó dos frutos de *P. undulatum* e 186 g de pó do caule de *P. adiantoides*, que foram extraídos exaustivamente por maceração em etanol destilado, ao abrigo da luz. Após a extração, o material vegetal foi filtrado em papel de filtro e o extrato foi parcialmente concentrado em rotavapor R-114 Buchi. Em seguida o extrato foi transferido para frasco de vidro tarado e foi concentrado até a secura em centrífuga a vácuo (speed-vac) modelo SC250, ThermoSavant.

Os extratos foram depositados com os códigos EX2933 para *P. undulatum* e EX2903 para *P. adiantoides* na Coleção *ex situ* do LQPN. A extratoteca tem seu funcionamento autorizado pela Deliberação Nº 161 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente, publicada no D.O.U. 17 de Outubro de 2006.

4.2. Registro de dados

Os experimentos executados foram registrados segundo as normas do Sistema da Qualidade implantado no IRR. Todas as frações e substâncias oriundas de *P. undulatum* foram codificadas por “AL” seguido do número da página do caderno de registro. O mesmo procedimento foi realizado com *P. adiantoides* para a qual se empregou o código “AF”. Esta codificação será empregada no restante desta dissertação.

4.3. Detecção de classes de produtos naturais

Seguindo a metodologia descrita por Wagner & Bladt (1996) os extratos brutos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel F₂₅₄ (Merck[®]) empregando-se os seguintes eluentes.

☐ DCM:MeOH (95:5)

☐ Tol:AcOEt (93:7)

☐ AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10)

As placas foram então borrifadas com diferentes reagentes a fim de se determinar a presença ou ausência de algumas classes de produtos naturais:

☐ Dragendorff: detecção de alcalóides;

☐ Natural Products/Polietilenoglico (NP/PEG): detecção de flavonóides;

☐ Hidróxido de Potássio (KOH): detecção de cumarinas;

☐ Vanilina/Ácido sulfúrico: detecção de compostos terpenóides (coloração arroxeadada);

4.4. Partição dos extratos entre solventes

4.4.1. Extratos brutos

Cada extrato (36 g de EX2933 e 14,5 g de EX2903) foi solubilizado em mistura de MeOH/H₂O (1:1) e extraídos em funil de separação com DCM. As frações foram recolhidas separadamente e concentradas em rotavapor e speed-vac.

QUADRO 3 - Código das amostras iniciais

Extrato	Solvente	Código
EX2933	DCM	ALD
	MeOH	ALM
EX2903	DCM	AFD
	MeOH	AFM

4.4.2. Fração ALM

A fração ALM (7,0 g) foi solubilizada em 100 mL de água e submetida à partição com 100 mL de butanol. A mistura bifásica foi separada em funil de separação fornecendo uma fração butanólica (ALB) e uma fração aquosa (ALA), que foram concentradas em rotavapor e secas em speed-vac.

Os extratos e as frações obtidas foram encaminhados para os ensaios biológicos para determinação de atividade leishmanicida e de avaliação da toxicidade para células tumorais humanas (item 4.12).

4.5. Métodos cromatográficos utilizados no fracionamento

4.5.1. Cromatografia por contracorrente de alta velocidade (CCCAV)

As amostras foram fracionadas por CCCAV em cromatógrafo modelo HSCCC-1000 Pharma-Tech Research Corp., utilizando-se bomba Shimadzu LC 8A.

Para ALM (1,2 g) utilizou-se coluna de 850 mL, fluxo de 5 mL/min, rotação 1000 rpm, loop de 20 mL, pressão de 20 psi e injeção na direção cabeça-cauda. Foi utilizada a fase inferior da mistura bifásica BuOH:AcOEt:H₂O (4,5:0,5:5,0) como fase móvel no fracionamento, recolhendo-se frações a cada 3 minutos (cerca de 15 mL).

Uma alíquota (1,5 g) de ALB foi fracionada nas mesmas condições descritas acima, utilizando a fase inferior da mistura bifásica AcOEt:BuOH:EtOH:H₂O 0,05%TFA (5:10:2:20) como fase móvel, recolhendo-se, a cada três minutos, frações de aproximadamente 15 mL.

Para AFD (500 mg) utilizou-se coluna de 350 mL, fluxo de 2 mL/min, rotação 1000 rpm, loop de 10 mL, pressão de 20 psi e injeção na direção cabeça-cauda. Foi utilizada a fase superior da mistura bifásica HE:AcOEt:MeOH:H₂O (1,4:0,6:1,0:1,0) como fase móvel no fracionamento recolhendo-se, a cada 2 minutos, frações de aproximadamente 4 mL.

Para AFM (1,59 g) utilizou-se coluna de 850 mL e fluxo de 5 mL/min. Foi utilizada a fase inferior da mistura bifásica CHCl₃:MeOH:BuOH:H₂O (7:6:3:4.) como fase móvel no fracionamento, recolhendo-se, a cada 3 minutos, frações de aproximadamente 15 mL.

As frações obtidas foram analisadas por CCD (sílica gel F₂₅₄ Merck[®]), utilizando eluentes e reveladores adequados para posterior agrupamento. As frações finais obtidas foram secas, submetidas aos ensaios biológicos e armazenadas a 4°C.

4.5.2. Cromatografia por co-corrente

Outra alíquota de 900 mg de AFD foi fracionada no mesmo aparelho descrito na seção 4.5.1., utilizando-se bombas P-500 (Pharmacia), empregando-se a técnica

de cromatografia em co-corrente. As duas fases da mistura bifásica DCM:MeOH:H₂O (5:6:4) foram bombeadas pela coluna (simultaneamente), em fluxos de 1 mL/min (fase diclorometânica) e 2 mL/min (fase aquosa). As frações foram recolhidas a cada 3 minutos (9 mL). Depois de 55 frações recolhidas, a rotação das colunas foi interrompida e começou-se a bombear a fase aquosa em fluxo de 3 mL/min, recolhendo-se mais 23 frações. Após análise por CCD (sílica gel F₂₅₄ Merck[®]) as frações foram reunidas, secas e submetidas aos ensaios biológicos.

4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações obtidas nas partições e processos de fracionamento foram analisadas em cromatógrafo Shimadzu (Princeton, NJ, USA), bomba LC10A, detector com fotodiodo SPD-M10A, CBM 10A, utilizando-se diferentes fases estacionárias, diversas misturas de solventes como eluente e diferentes comprimentos de onda (L₁). Após a determinação das melhores condições de separação (fase estacionária, L₂ tempo de análise e eluente), as amostras foram refractionadas no cromatógrafo Shimadzu, bomba LC 6AD, detector no UV SPD-10A em dois L₃ utilizando coluna semi-preparativa Shim-pack ODS (5 L₄, 20 x 250 mm). As frações foram coletadas por pico e por volume, de modo que cada pico foi recolhido separadamente. As frações obtidas foram analisadas por CCD e submetidas aos ensaios biológicos.

4.5.4. Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)

A fração em AcOEt obtida após a hidrólise ácida de ALM foi fracionada por CLPM em fase reversa ODS utilizando-se bomba Shimadzu LC 8A, coluna Büchi (230 x 49 mm), fluxo de 5 mL/min e loop de 10 mL. Foi utilizada a seguinte seqüência eluotrópica:


- L₁ 750 mL de ACN 20%
- L₂ 2000 mL de ACN 60%
- L₃ 750 mL de ACN 80%
- L₄ 1000 mL de ACN 100%
- L₅ 2000 mL de MeOH 100%

Foram obtidas 252 frações que foram analisadas por CCD e posteriormente agrupadas em 46 frações.

4.5.5. Cromatografia centrífuga radial (CCR)

As frações AL 37 a AL 39, obtidas na CLMP, foram agrupadas (138 mg) e o material solubilizado em 3 mL de uma mistura HE/AcOEt (9:1) e aplicado em placa radial de 1 mm de espessura preparada utilizando-se sílica gel PF-254 contendo gesso (Merck[®]). Para o fracionamento utilizou-se Chromatotron modelo 7924T Harrison Research. A eluição foi feita em etapas, com fluxo de eluente de 4 mL/min e fluxo de nitrogênio de 5 mL/min, utilizando como eluente:

 200 mL da mistura HE:AcOEt (9:1)

 150 mL da mistura HE:AcOEt (8:2)

 250 mL da mistura HE:AcOEt (6:4)



 200 mL da mistura HE:AcOEt (1:1)

 150 mL de AcOEt 100%

 100 mL de AcOEt:MeOH (9:1)

 100 mL de AcOEt:MeOH (7:3)

 100 mL de MeOH 100%

Durante a eluição foram detectadas manchas utilizando-se lâmpada de ultravioleta ( 254 e  366 nm). Foram obtidas 94 frações de 5,0 mL, que posteriormente foram analisadas por CLAE em fase reversa e CCD de fase normal e reversa para agrupamento em 12 frações

4.5.6. Cromatografia de exclusão

As substâncias isoladas foram filtradas em Sephadex LH 20 (Amersham Biosciences) eluída com MeOH, ACN ou misturas desses solventes com água; analisadas por CCD, concentradas em speed-vac e enviadas para o Departamento de Química/ICEx da UFMG para obtenção de espectros de RMN.

Para as saponinas foi utilizada mistura de ACN:H₂O (1:1) e para os flavonóides foi utilizado MeOH.

4.6. Hidrólise ácida

Alíquotas de uma fração rica em saponinas leishmanicidas e citotóxicas (AL ativa) e de ALM foram submetidas à hidrólise ácida. As alíquotas foram colocadas em balão de fundo redondo e, em seguida, adicionou-se solução de HCl (1 mol/L). O

balão foi acoplado a um condensador reto e deixado sob refluxo por 4 h em banho de óleo a 100°C. Após resfriamento a mistura reagente foi neutralizada com solução de NaOH 1 mol/L. A solução neutralizada foi extraída três vezes com volumes iguais de AcOEt e, no caso de ALM, também com BuOH. As frações em acetato, butanol e aquosa foram analisadas por CCD, secas em speed-vac e armazenadas a 4°C.

4.7. Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

Foi utilizado um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray com quadrupolo e armadilha de íons, modelo LCQ Advantage, Thermo-Finningar (San Jose, CA, USA). Os espectros de massa foram obtidos nos modos positivo e negativo, na faixa de m/z 100-2000 Da. Os parâmetros utilizados foram: solução das amostras 500 µg/mL; temperatura do capilar 200° C; voltagem do capilar 10 V; corrente do spray 1 µA; voltagem do spray 4,5 kV no modo positivo e 3,0 kV no modo negativo; fluxo de nitrogênio de 20 L/h; energia de colisão 20-50%; fluxo da infusão 2,5 µL/min.

Para a análise de CLAE-EM foi utilizado cromatógrafo Shimadzu com detector UV-VIS e sistema eluente constituído de 30% ACN/H₂O com 0,1% de ácido fórmico em 40 min. O sistema foi acoplado ao espectrômetro de massas descrito acima, utilizando método HPLC_automs3 desenvolvido no laboratório. Nesse método o espectro de massas foi registrado, sendo os picos com intensidade superior a 10⁵ aprisionados na armadilha de íons e fragmentados para obtenção de espectros de MS/MS até no máximo MS⁵. As soluções das amostras foram preparadas a 5 mg/mL, injetando-se 20 µL. Foram obtidos espectros nos modos positivo e negativo.

4.8. Espectrometria no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8400 em pastilhas de KBr contendo 1% m/m da amostra.

4.9. Espectrometria no Ultravioleta

Foi utilizado espectrofotômetro Beckman DU[®] Série 600. Foram preparadas soluções dos flavonóides obtidos a 1% m/v em MeOH grau espectroscópico.

Os reagentes para deslocamento foram preparados conforme proposto por Mabry e colaboradores (1970).

☐☐ NaOMe 2,5 g de sódio metálico foi adicionado cautelosamente em 100 mL de MeOH.

☐☐ AlCl₃: 5 g de AlCl₃ anidro (amarelo-esverdeado) foram adicionadas aos poucos a 100 mL de MeOH. Aguardou-se 24 h para utilização.

☐☐ HCl: 50 mL de HCl concentrado foram adicionados lentamente a 100 mL de água destilada.

☐☐ NaOAc: utilizou-se o pó anidro.

☐☐ H₃BO₃: procedimento I – utilizou-se pó anidro, procedimento II – utilizou-se 100 mL de MeOH espectroscópico seco saturado com H₃BO₃.

As etapas de análise de análise foram realizadas também conforme proposto por Mabry e colaboradores (1970).





1. Ajustou-se a transmitância para 0% na ausência de amostra e para 100% na presença exclusiva do solvente (MeOH);
2. A absorvância da solução da amostra (flavonóide) foi ajustada para que o pico mais intenso entre $\lambda_{250}^{P_0}$ e $\lambda_{400}^{P_0}$ nm tenha uma densidade óptica entre 0,6 e 0,8.
3. O espectro de metanol foi obtido fazendo-se uma varredura de 200 a 400 nm com velocidade de 120 nm/min.
4. Adicionou-se 3 gotas da solução de NaOMe à cubeta da amostra e imediatamente registrou-se o espectro. Depois de 5 min, novo espectro foi obtido para verificar decomposição da amostra. Descartou-se o líquido da cubeta.
5. Foi colocada nova solução da amostra na cubeta e adicionadas 6 gotas da solução de AlCl₃, obtendo-se imediatamente o espectro.
6. À cubeta da etapa 5 foram adicionadas 3 gotas da solução de HCl e obteve o espectro. O conteúdo da cubeta foi descartado.
7. Adicionou-se o pó anidro de NaOAc a agitou-se até a formação de uma camada de 2 mm de pó na borda da cubeta preenchida com a solução da amostra. Os espectros foram obtidos após 2 e 10 min do preparo.

8. (a) Se não for observada decomposição da amostra na etapa 7, a cubeta foi saturada com H_3BO_3 , agitada, o espectro obtido e a solução descartada; (b) se for observada decomposição na etapa 7, foi colocada nova solução da amostra na cubeta, adicionadas 5 gotas da solução de H_3BO_3 e pó de NaOAc até saturação. O espectro foi obtido imediatamente após a adição do acetato.

4.10. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados no Departamento de Química-ICEx, na UFMG em espectrômetro Bruker DX-400 linha AVANCE, operando a 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), empregado como referência interna. Os solventes utilizados para obtenção dos espectros foram piridina- D_5 para as sapogeninas e CDCl_3 e $\text{DMSO-} \text{D}_6$ para os flavonóides.

As seqüências de pulsos (listadas abaixo) e de processamentos foram obtidas por programas padrão.

-  DEPT 135: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
-  $^1\text{H-}^1\text{H}$ -COSY: Homonuclear Correlated Spectroscopy
-  HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
-  HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

4.11. Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos para monitoramento do fracionamento dos extratos foram realizados pela equipe técnica do LQPN. Para isso as amostras a serem testadas foram colocadas em placa de 96 poços, em quantidade suficiente que cada ensaio fosse feito em triplicata e na concentração final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os técnicos do LQPN foram responsáveis pela diluição das amostras em solução de DMSO 1% em água e transferência do volume correto para a placa de ensaio, emitindo um laudo ao final do teste. Todo o procedimento foi realizado por técnicos treinados utilizando equipamentos de proteção individual adequados, em ambiente estéril com cabine de proteção biológica. O ensaio com amastigotas-axênicas foi coordenado pela Dra. Ana Rabello do Laboratório de Pesquisas Clínicas do IRR, conforme acordo firmado

com o Dr. Carlos Zani na implantação do projeto de Bioprospecção. O ensaio com células tumorais foi realizado no LQPN e coordenado pelo Dr. Carlos Zani.

4.11.1. Ensaio de toxicidade para células tumorais humanas

O efeito dos extratos sobre a proliferação celular foi avaliado utilizando-se as linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), TK-10 (tumor renal) e MCF-7 (tumor de mama). De acordo com dados do NCI (informação oral), estas linhagens seriam capazes de detectar 95% dos extratos que contém substâncias antitumorais.

O protocolo utilizado para avaliação da atividade antineoplásica foi descrito por Monks e colaboradores (1991). Este procedimento está registrado no Sistema da qualidade do IRR no Procedimento Operacional Padrão (POP) LQPN-09.

4.11.1.1. Preparo da suspensão de células

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas de 25 cm² em meio de cultura em estufa de CO² a 37⁰C. Para o repique celular, o meio de cultura foi retirado por sucção e as camadas de células aderidas às garrafas foram lavadas da seguinte forma: adicionou-se 500 μ l de solução Hanks ou PBS e agitou-se cuidadosamente por 10 vezes. A solução Hanks ou PBS foi retirada por sucção e adicionou-se 500 μ l de tripsina. Após fechar as garrafas estas foram mantidas em estufa de CO² a 37⁰C durante um minuto, observando neste tempo o momento em que a monocamada de células começava a se desprender da garrafa. Em seguida as células foram ressuspensas, adicionando-se 5 mL de meio de cultura contendo 5 mL de SFB inativado (5%) + 250 μ l de sulfato de gentamicina (solução aquosa de 20 mg/mL) e RPMI-1640 q.s.p.100mL), e homogeneizadas por sucção utilizando pipetas sorológicas.

A concentração da suspensão celular foi determinada em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). Para isto, 10 μ l da suspensão celular foram diluídos em 70 μ l de solução salina de Hanks e 20 μ l de azul de tripan (0,04% em solução de Hanks). A contagem das células viáveis e mortas foi feita nos 4 quadrantes externos da Câmara de Neubauer. A média das contagens de células viáveis e mortas dos quatro quadrantes foi calculada e multiplicada pelo fator de diluição e por 10⁴ (fator de correção da câmara de Neubauer) para obtenção da densidade de células viáveis (DCV = número células viáveis/mL) e a densidade de células mortas (DCM = número

células mortas/mL) na cultura. O índice de viabilidade celular (IVC) foi calculado usando a fórmula a seguir:

$$IVC = \frac{DCV}{DCV + DCM} 100$$

(Obs: Para que a cultura possa ser usada no ensaio, o IVC deve ser maior ou igual a 90%).

As suspensões celulares usadas no ensaio tinham concentração do inóculo (CI) definida da seguinte forma: UACC-62 = 10.000 cél/mL; TK-10 = 15.000 cél/mL; MCF-7 = 10.000 cél/mL.

4.11.1.2. Plaqueamento das células

A suspensão celular a ser utilizada, já na concentração desejada, foi homogeneizada cuidadosamente por sucção utilizando pipetas sorológicas. O conteúdo foi despejado suavemente em um reservatório e novamente homogeneizado por sucção utilizando pipeta multicanal. A suspensão celular foi distribuída (100 μ L/poço) em todas as fileiras de uma placa de 96 poços (Placa A) e nas quatro primeiras fileiras de outra placa de 96 poços (Placa B), utilizando uma pipeta multicanal. As placas foram incubadas em estufa de CO² a 37°C, 100% de umidade e 5% de CO² por 24h.

4.11.1.3. Plaqueamento das amostras

Após 24h de incubação das linhagens de células tumorais foram adicionados na Placa A 80 μ L de meio de cultura descrito no item 1. Os extratos, frações, substâncias puras a serem testados foram dissolvidos em DMSO (1% aquoso v/v) atingindo a concentração de 200 μ g/mL. Desta solução foram adicionados 20 μ L a cada poço das colunas de 2 a 11, perfazendo um volume final de 200 μ L/poço. Portanto, a concentração final das amostras testadas foi de 20 μ g/mL.

4.11.1.4. Controles

Células: Nos quatro primeiros poços da coluna 1 da Placa A foram adicionados 100 μ L/poço de meio de cultura.

DMSO: Nos quatro últimos poços da coluna 1 da Placa A foram adicionados 20 μ L de DMSO (1% aquoso v/v).

Drogas de referências: Nos quatro primeiros poços da última coluna foram adicionados 20 μL /poço de uma solução de colchicina a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em DMSO 1% aquoso v/v. Nos quatro últimos poços da última coluna foram adicionados 20 μL /poço de uma solução de etoposídeo a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em DMSO 1% aquoso v/v.

Determinação de T_0 : Após 24 h de incubação, foram adicionados nos poços da Placa B, 100 μL /poço do meio de cultura descrito no item 1. O número inicial de células, T_0 , foi determinado da forma a seguir.

As células foram fixadas adicionando-se 50 μL /poço de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (p/v em água) e incubando-se a placa a 4° C por 1 h. Após este tempo, o meio de cultura e o ácido foram removidos por sucção e foram adicionados 200 μL de água. A água foi removida por sucção e este procedimento foi repetido por mais quatro vezes.

As placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37° C, 100% de umidade e 5% de CO_2 , por mais 48 h. Decorridos 48 h, as células foram fixadas conforme o procedimento descrito para o controle T_0 , entretanto foi utilizada água não estéril. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 24 h.

4.11.1.5. Contagem colorimétrica e interpretação dos resultados

Sulfarrodamina B (SRB) na concentração de 0,4% em ácido acético aq 1%, foi acrescentada a todos os poços da placa (50 μL /poço). Em seguida, a placa foi incubada em geladeira (2-8° C), por 30 min. Depois desse período, foi lavada 5 vezes com ácido acético 1%. Após a lavagem, retirou-se o excesso de líquido batendo a placa cuidadosamente contra um papel toalha e deixou-se secar a temperatura ambiente. Depois de seca, foram adicionados 150 μL /poço de tampão Tris para a solubilização da SRB e foi feita a leitura no comprimento de 515 nm, em leitor de microplacas (VERSAMAX microplate reader – tunable) utilizando o programa SOFTmax 4.0 e a programação para experimentos tumorais.

A sulfarrodamina B é um corante que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células e pode ser utilizado para quantificar a proliferação das células tumorais. Portanto, quanto menos células, menor é a ligação do corante e menor é a absorção medida (Houghton et al., 2007). Valores de 0 a 100% representaram atividade citostática. A atividade citostática é aquela exercida por substâncias que são capazes de inibir a proliferação das células presentes no inóculo inicial em

relação ao controle sem droga. Valores de 100 a 200% representaram atividade citocida, ou seja, as substâncias testadas foram capazes de matar as células presentes no inóculo inicial.

As substâncias que foram isoladas no processo biomonitorado com atividade citostática ou citocida foram avaliadas empregando-se diluições seriadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0,781; 0,391; 0,195 µg/mL) para fins de cálculo da concentração inibitória 50% (CI₅₀), concentração letal 50%(CL₅₀) ou Concentração de Inibição Total do Crescimento (CIT).

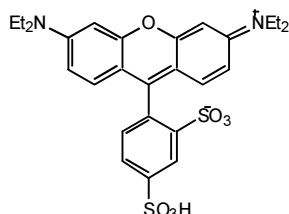


FIGURA 25 – Estrutura da Sulfarrodamina B

4.11.2. Ensaio para avaliação de atividade leishmanicida para formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Para realização deste ensaio foi utilizado o protocolo descrito por Callahan e colaboradores (1997) com algumas modificações conforme descrito no POP LQPN-16. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram retiradas de lesão de hamsters, cultivadas em meio Schneider's e estocadas em freezer -70°C. Para transformação em formas amastigotas-axênicas, alíquotas do cultivo foram descongeladas e cultivadas em meio Schneider's pH 7,2 a 26°C por 7 dias. Depois desse período a cultura foi centrifugada e ressuspensa em meio Schneider's pH 6,0 e incubada a 32°C por 7 dias.

4.11.2.1. Preparo da suspensão de amastigotas-axênicas

A cultura em transformação foi retirada da estufa BOD 32°C, homogeneizada e transferida para tubo cônico de 50 mL esterilizado. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1000 RCF a 27°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensa em 10 mL de Schneider's pH 6,0 .

A determinação da concentração de amastigotas da suspensão, foi feita em Câmara de Neubauer. Para isto 10 μ L da suspensão foram diluídos em 490 μ L de

PBS. Com a lamínula colocada sobre a Câmara de Neubauer, adicionou-se, por capilaridade, um volume de aproximadamente 20 μL da diluição feita acima e contou-se as amastigotas no quadrante central da Câmara de Neubauer (Carvalho, 1994). As amastigotas presentes foram contadas e multiplicadas pelo fator de diluição e por 10^4 (fator de correção da câmara de Neubauer) para determinação da densidade de amastigotas (número amastigotas/mL) na cultura. A suspensão de amastigotas usada no ensaio tinha concentração do inóculo (CI) de 10^8 amastigotas/mL.

4.11.2.2. Plaqueamento das amastigotas e amostras na placa teste

Homogeneizou-se a suspensão de amastigotas em agitador tipo “vortex” e em passagem por seringa, e esta foi distribuída na placa teste.

Aos poços de controle das placas foram adicionados 10 μL dos controles, Anfotericina B (AMB) e DMSO e aos poços teste 10 μL das amostras (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água *Milli-Q* contendo 1% de DMSO). As placas foram seladas com parafilme e incubadas em estufa BOD a 32°C, por 72 h.

4.11.2.3. Contagem colorimétrica e interpretação dos resultados

Decorridas 72 h, adicionou-se 10 μL de MTT aos poços das placas, incubou-se por mais 4 h e após esse período, foram adicionados 100 μL de SDS (dodecilsulfato de sódio) em isopropanol. Homogeneizou-se e depois de 30 minutos foi realizada a leitura no comprimento de ondas de 570 nm, em leitor de microplacas (VERSAMAX microplate reader – tunable) utilizando o programa SOFTmax pro 4.0 e a programação para experimentos *Leishmania*.

O método colorimétrico do MTT baseia-se na redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial. O formazan, um produto da redução do MTT, é formado por células viáveis. Com isso o crescimento parasitário é diretamente proporcional à quantidade de formazan formado. A ilustração abaixo mostra o esquema da redução do MTT a formazan.

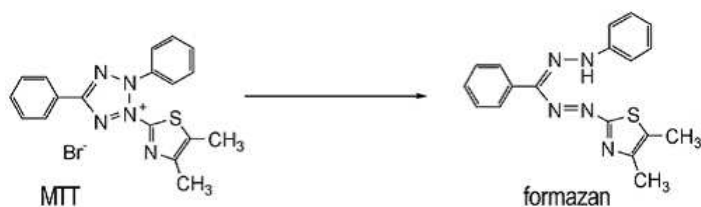


FIGURA 26 – Esquema da redução do MTT

A forma reduzida absorve a luz ultravioleta em 570 nm, permitindo a quantificação dos parasitos. A comparação da absorvância das frações com a absorvância do controle permite a expressão do percentual de morte dos parasitos (Houghton et al., 2007).

Os resultados foram expressos como porcentagem de morte após 72 h de incubação. O cálculo da porcentagem de morte foi realizado com base na fórmula abaixo onde Abs é a média das densidades ópticas, Cn é controle e Ex representa o extrato e/ou fração testada:

$$\% \text{ morte} = [(Abs \text{ Cn} - Abs \text{ Ex}) / Abs \text{ Cn}] \times 100.$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *PITTOSPORUM UNDULATUM* VENT.

A espécie *P. undulatum* Vent. foi inicialmente coletada na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça – MG (RPPN – Santuário do Caraça) como parte do projeto de 'Bioprospecção da Biodiversidade Mineira como Fonte de Novas Drogas'. Os frutos coletados deram origem ao extrato EX2005. Para o fracionamento biomonitorado proposto foi necessário a coleta para a preparação de quantidades maiores de extrato. O material vegetal foi então coletado do mesmo indivíduo na RPPN – Santuário do Caraça e processado, obtendo-se 495 g de pó seco. Após a extração com EtOH foi obtido o extrato codificado por EX2933, cujo rendimento foi de 11,3% (56 g). Os extratos EX2005 e Ex2933 foram avaliados quanto às atividades leishmanicida e citotóxica (Tab. 2).

TABELA 2 – Avaliação biológica *in vitro* dos extratos de *P. undulatum*

Ensaio biológico	% de Atividade	
	EX2005 (20 µg/mL)	EX2933 (20 µg/mL)
Toxicidade para células MCF-7 ¹	29	48
Toxicidade para células TK-10 ¹	0	150
Toxicidade para células UACC-62 ¹	62	124
Atividade leishmanicida ²	85	nd

¹ Resultados de 0 a 100% atividade citostática, de 101 a 200% atividade citocida.

² Formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*

nd: não determinado

MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma).

Valores <80% foram classificados como inativos.

Os resultados dos testes iniciais mostraram que EX2005 apresentava moderada atividade citotóxica para uma das linhagens celulares (UACC-62, melanoma) e potencial atividade leishmanicida (>80%). Essas potenciais atividades biológicas juntamente com a ausência de dados na literatura relacionando a atividade antiprotozoária com as substâncias já isoladas desta espécie vegetal levaram à escolha desta planta para estudo químico biomonitorado, visando o isolamento e a identificação das substâncias responsáveis pelas atividades apresentadas.

O extrato EX2933 apresentou alteração na atividade biológica. Essa alteração de atividade biológica pode ser resultado de uma alteração de produtos naturais

presentes no extrato ou por alteração na concentração destes, resultado de mudanças no habitat da espécie durante o período entre as duas coletas. Essa alteração de resultados não é devida aos ensaios biológicos visto que os controles positivos (por exemplo, etoposídeo e colchicina no ensaio com células tumorais) validaram os procedimentos empregados. Além disso, o extrato testado na triagem (EX2005) foi reavaliado e continuou a exibir as atividades que levaram à sua seleção. Como o novo extrato (EX2933) se mostrou ativo no ensaio com células tumorais foi dada continuidade ao seu estudo químico biomonitorado.

O extrato EX2933 (36 g) foi submetido então à partição entre solventes miscíveis, levando a uma fração diclorometânica (ALD, 4 g, 11%), constituída por substâncias de baixa e média polaridade, e uma fração hidrometanólica (ALM, 32 g, 89%).

A avaliação da atividade biológica das duas frações mostrou que a atividade do extrato é devida à presença de substâncias polares, uma vez que foi a fração ALM que se mostrou ativa no ensaio com as células tumorais (Tab.3). Não foi observada atividade leishmanicida em nenhuma das frações obtidas na partição.

TABELA 3 – Avaliação da atividade antineoplásica e leishmanicida das frações obtidas na partição do extrato EX2933

Frações (20 µg/mL)	Ensaio			% de morte de <i>L. (L.) amazonensis</i> ²
	% de inibição da proliferação celular ¹ MCF-7	TK-10	UACC-62	
ALD	63	18	28	17
ALM	150	109	152	20

¹ Resultados de 0 a 100% atividade citostática, de 101 a 200% atividade citocida.

² Formas amastigotas axênicas

MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma).

Valores <80% foram classificados como inativos.

A análise de ALM por cromatografia em camada delgada (CCD) de fase normal revelou a presença de compostos de origem terpênica (coloração arroxeada após utilização de vanilina sulfúrica e aquecimento). A busca na literatura revelou que o gênero *Pittosporum* é rico em saponinas triterpênicas com esqueleto do tipo oleanano. São encontrados os esqueletos básicos de A₁-barrigenol em saponinas isoladas das folhas de *P. undulatum* (Higuchi et al., 1983b) e R₁-barrigenol em saponinas isoladas de *P. tobira* e *P. viridiflorum* (D'Acquarica et al., 2002; Seo et al., 2002). A presença de saponinas em ALM foi evidenciada pela formação de espuma persistente quando a solução da fração em água foi fortemente agitada.

Saponinas são moléculas complexas formadas por uma aglicona ligada a unidades de açúcar. A combinação de porção apolar (aglicona) e polar (açúcares) explica o comportamento tipo detergente (formação de espuma) observado em soluções aquosas. As agliconas, denominadas sapogeninas, podem ser estruturalmente de dois tipos: esteroidais ou triterpênicas (Fig.27). As sapogeninas, em geral, possuem muitos substituintes, como grupos carboxila, metila e hidroxila. A porção açúcar pode estar ligada a um, dois ou três sítios diferentes. Além disso, partes diferentes de uma mesma espécie podem produzir diferentes saponinas. Dessa forma, o número de substituintes, os diferentes açúcares e as diferentes posições de ligação do açúcar, levam a uma grande diversidade estrutural nessa classe de produtos naturais (Oleszek & Bialy, 2006; Vincken et al., 2007).

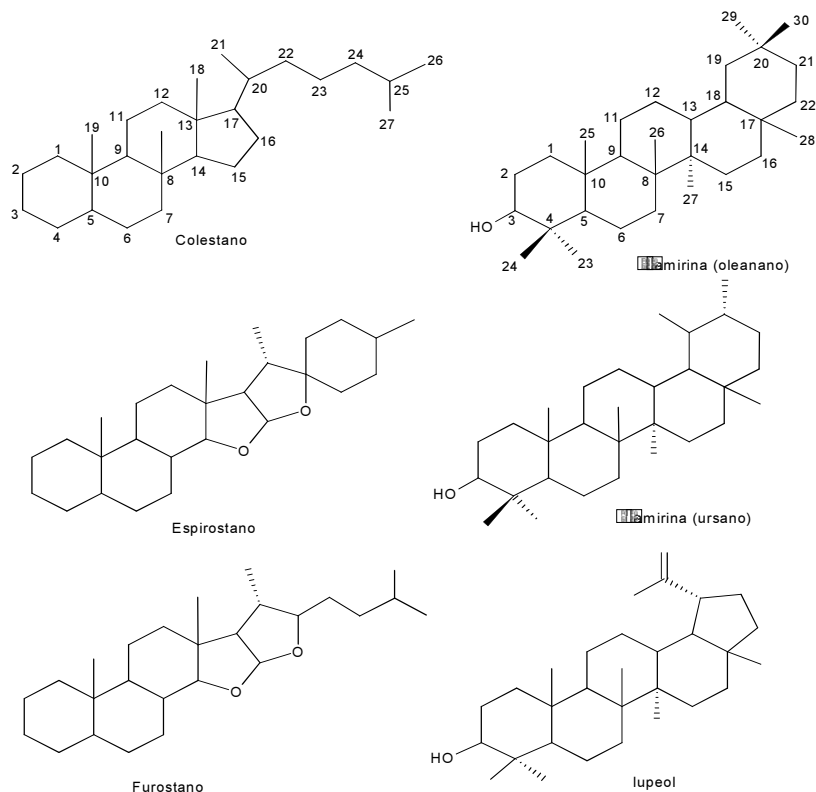


FIGURA 27 – Esqueletos básicos de sapogeninas: esteroidais (coluna à esquerda) e triterpênicas (coluna à direita).

5.1.1. Obtenção de saponinas

Foi obtida uma fração rica em saponinas (ver 5.1.3), e essa fração apresentou toxicidade para as células tumorais e também para as formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. Uma alíquota de 10 mg da fração ativa (AL ativa) foi hidrolisada com HCl para obtenção das geninas, as quais foram extraídas com acetato de etila (AL-Ac). A fração em acetato de etila não apresentou nenhuma atividade e a análise de AL-Ac por CCD mostrou que mais de uma genina (manchas de coloração roxa) eram encontradas na fração ativa. Esse resultado permite concluir que a AL ativa é quimicamente complexa e que as saponinas presentes não se diferenciam apenas pela posição, número e tipo de açúcar, mas também pela presença de diferentes geninas.

Uma técnica muito utilizada na elucidação estrutural de compostos orgânicos é a espectrometria no infravermelho. A radiação infravermelha com frequência na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} quando é absorvida converte-se em energia de vibração molecular. O espectro vibracional aparece como uma série de bandas, correspondendo cada mudança de energia vibracional a uma série de mudanças de energia rotacional. São essas bandas de vibração-rotação, principalmente as que ocorrem entre 4000 e 400 cm^{-1} , que são utilizadas na análise dos compostos orgânicos. A frequência ou comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (Silverstein & Webster, 1998). Essa relação entre estrutura e faixa de absorção permite caracterizar grupos funcionais e, dessa forma, auxiliar o processo de elucidação estrutural das substâncias.

As duas áreas mais importantes para o exame preliminar dos espectros são as regiões de 4000 a 1.300 cm^{-1} (2,5-7,7 μm) e de 900 a 650 cm^{-1} (11,0-15,4 μm). A faixa de menor número de onda (alta frequência) do espectro é chamada de região dos grupamentos funcionais, ocorrendo nesta região absorção correspondente a importantes grupos funcionais, como OH, NH e C=O. A ausência de absorção nas regiões características dos vários grupos funcionais é habitualmente usada como evidência para a inexistência desses grupos na estrutura. A região intermediária do espectro, entre 1300 e 900 cm^{-1} é conhecida como a região de "impressão digital", sendo muito importante para a determinação da estrutura (Silverstein & Webster, 1998).

Foi obtido o espectro de IV da amostra hidrolisada (Fig. 28), verificando-se banda referente à deformação axial da carbonila do éster ($\nu_{\text{C=O}}$ 1720), além das bandas de deformação axial de OH (ν_{OH} 3444), C-H de alcano ($\nu_{\text{C-H}}$ 2927) e C-O de éster ($\nu_{\text{C-O}}$ 1257). Os dados mostram que o grupo éster está diretamente ligado às sapogeninas.

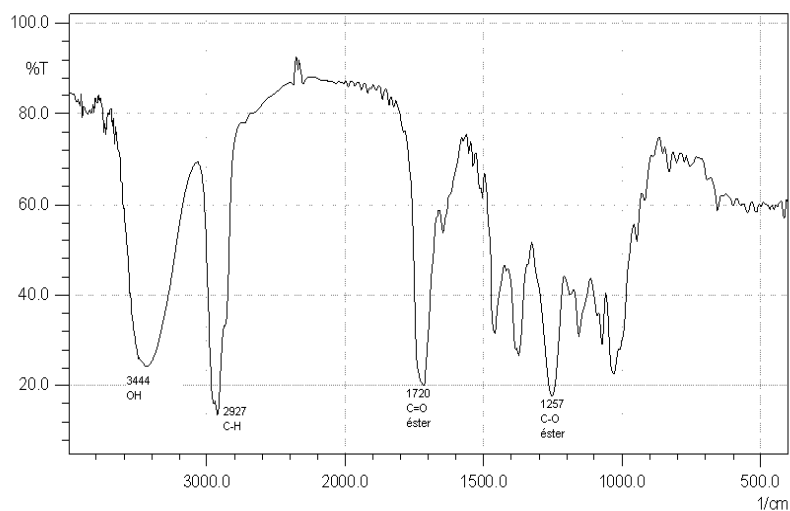


FIGURA 28 – Espectro no IV de AL-Ac (KBr, cm^{-1}).

A fim de obter uma maior quantidade dessas geninas, foi realizada uma hidrólise ácida de 6,0 g de ALM. A fração em acetato de etila obtida (AL-Ac¹) foi fracionada por CLMP em fase reversa ODS, resultando em 46 frações que foram comparadas com AL-Ac para detecção de qual delas apresentava as mesmas geninas encontradas na hidrólise da fração ativa. As frações 37, 38 e 39 se mostraram semelhantes à AL-Ac e foram agrupadas e fracionadas por CCR em fase normal resultando em 94 frações. Essas frações foram analisadas por CCD (fase normal e reversa) e CLAE (fase reversa ODS) porque algumas frações com apenas uma mancha na placa de sílica apresentaram dois ou mais picos no cromatograma, como demonstrado com a fração 60 (Fig.29).

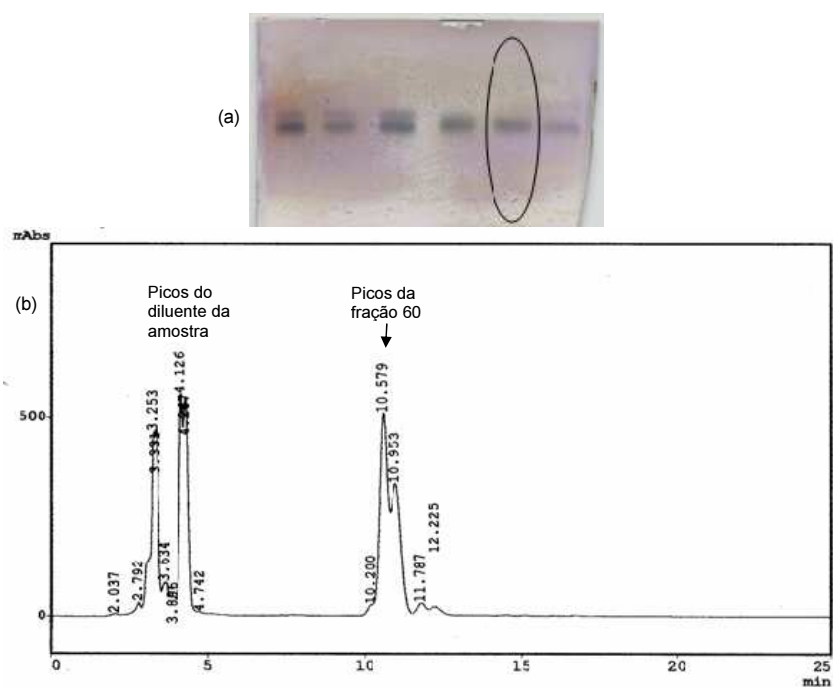
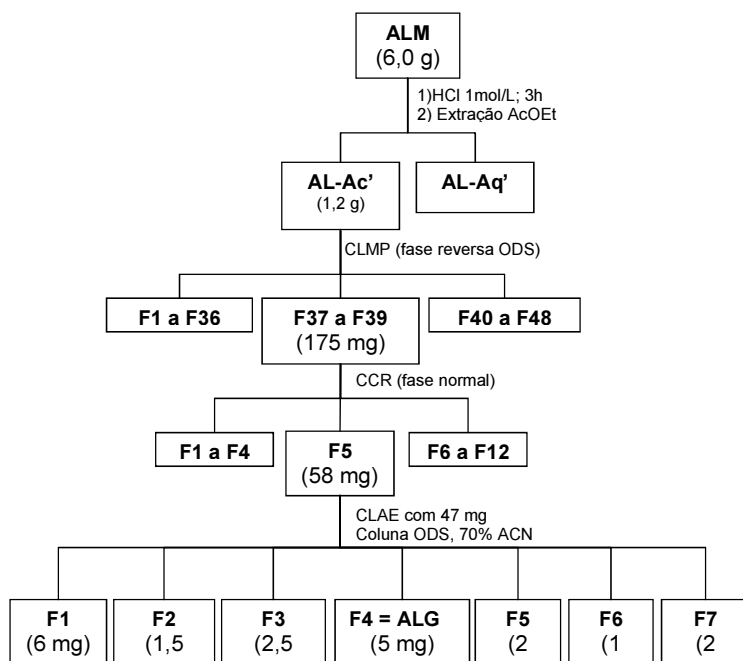


FIGURA 29 – (a) Imagem digitalizada da placa de CCD ODS revelada com vanilina sulfúrica, das frações obtidas por CCR. Fração 60 marcada com círculo. (b) Cromatograma da fração 60: coluna ODS, λ_{240} nm, 70% ACN por 25 min.

Ao final da análise por CLAE e CCD foram obtidas 12 frações do fracionamento em CCR. A fração 5 foi obtida em maior quantidade (58 mg) e com cromatograma mais simples, apresentando um menor número de picos. Essa fração (47 mg) foi re-fracionada por CLAE em fase reversa ODS, obtendo-se 7 frações. Entretanto, a massa da amostra não foi totalmente recuperada da coluna. A fração 4, pó branco amorfo denominada fração sapogenina (ALG), foi obtida em maior quantidade (5 mg), enviada para o Departamento de Química da UFMG para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de ^1H , ^{13}C e analisada por IES-EM para auxílio na determinação da estrutura química.

ESQUEMA 1 – Obtenção de sapogeninas



5.1.2. Elucidação estrutural das sapogeninas

ALG, fração com sapogeninas, foi obtida depois de hidrólise ácida e vários fracionamentos cromatográficos. O perfil da amostra no ultravioleta do cromatógrafo mostrava que mais de uma substância estava presente na fração, uma vez que o pico se mostrava alargado e com pequeno ombro. Como vários métodos de isolamento já haviam sido empregados foi decidido obter dados espectrais da mistura e elucidar as estruturas sem o isolamento das mesmas, o que foi realizado, por exemplo, por Koike e colaboradores (1999). A busca da literatura revelou a presença de saponinas triterpênicas no gênero *Pittosporum* e as geninas descritas na literatura foram utilizadas como ponto de partida para a análise dos resultados obtidos nessa dissertação.

O espectro de RMN de ^1H de ALG (anexos 1 a 5) apresentou 14 simpletos entre 0,73 e 2,19 ppm. Destes sinais, quatro (1,00; 1,09; 1,26 e 1,86 Hz) foram

obtidos com dupla intensidade em relação aos outros simpletos, indicando a presença de 19 metilas ligadas a carbonos não hidrogenados. O tripleto em δ 0,73 ($J = 7,3$ Hz) e o duplete em δ 1,11 ($J = 7,0$ Hz) foram relacionados às metilas (Me-36 e Me-37, respectivamente) do substituinte 2-metilbutanoíla (SG1), um dos grupos encontrado com frequência em sapogeninas e que se enquadra no perfil descrito acima. Esse grupo foi encontrado em uma das sapogeninas isoladas das folhas de *P. undulatum* (Higuchi et al., 1983a).

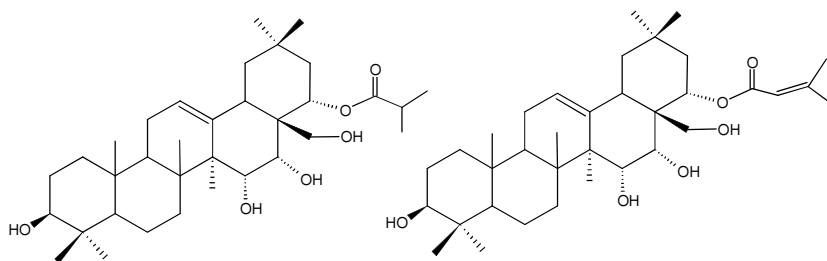


FIGURA 30 – Sapogeninas isoladas das folhas de *P. undulatum* por Higuchi et al. (1983a)

Os sinais (duplo dupletos) de H-15 (δ 4,23, *dd*, $J = 4,6; 9,6$ Hz) e (δ 4,27, *dd*, $J = 4,6; 9,6$ Hz) e H-16 (δ 4,39, *dd*, $J = 4,9$ Hz) e (δ 4,42, *dd*, $J = 5,1$ Hz), característicos de hidrogênios ligados a carbono oxigenado, foram atribuídos após análise das integrais no espectro de RMN de ^1H e dos espectros de HSQC e HMBC. Os grupos hidroxila em C-15 e C-16 foram determinados como 15 e 16- β -orientados pela comparação com os dados de RMN de ^1H da literatura (Higuchi et al., 1983b; D'Acquarica et al., 2002; Seo et al., 2002; Tang et al., 2002).

E os dupletos em δ 6,26 ($J = 10,1$ Hz) e 6,56 ($J = 10,1$ Hz) com dupla intensidade em relação aos outros sinais de hidrogênios metínicos, foram atribuídos a H-22 e H-21, respectivamente, após análise dos espectros de RMN de ^1H , HSQC e HMBC. Os dupletos indicaram que os carbonos C-21 e C-22 são os locais da esterificação da sapogenina, indicando que as geninas isoladas não eram derivadas do A₁-barrigenol (sapogeninas previamente isoladas da espécie) e sim do R₁-barrigenol (Fig. 31), triterpeno hexaidroxilado. Além disso, o valor da constante de acoplamento (10,1 Hz) é coerente com a configuração *trans*-axial dos hidrogênios H21 e H-22.

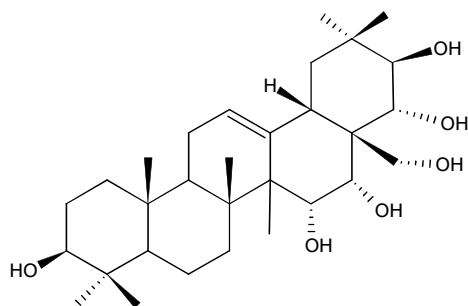


FIGURA 31 – Estrutura do R₁-barrigenol

No espectro de RMN de ^{13}C (anexos 6 a 10) foram obtidos 58 sinais de carbono, indicando que alguns sinais foram coincidentes. Os sinais característicos de triterpenos com esqueleto do tipo oleanano foram observados: os carbonos hidrogenados (C-12) das duas substâncias em 125,85 e os carbonos olefínicos (C-13) em 144,08. Os hidrogênios H-12 das duas sapogeninas (15,59, t , $J = 3,8$ Hz) e (15,61, t , $J = 3,4$ Hz) foram determinados pela análise do espectro de HSQC e confirmados pelo espectro ^1H - ^1H COSY. Os valores encontrados estão de acordo com a literatura para oleananos (Herlt et al., 2002; Seo et al., 2002; D'Acquarica et al., 2002)

A análise do subespectro DEPT 135 (anexos 11 a 13) permitiu a separação e quantificação dos tipos de carbono presente na amostra: 15 sinais de carbonos metílicos (CH_3) na faixa de 12,23 a 29,76 ppm; 11 sinais de carbonos metilênicos (CH_2) na faixa de 19,52 a 63,35 ppm; 16 sinais de carbonos metínicos (CH) na faixa de 41,34 a 125,85 ppm (147,69 Hz correspondente aos C-9 das duas substâncias). Os carbonos não hidrogenados não são registrados no DEPT e são quantificados pela diferença entre o número de carbonos totais registrados no espectro de ^{13}C e os carbonos do subespectro DEPT 135. Na amostra ALG foram encontrados 16 carbonos não ligados a hidrogênio. Pelo número de sinais observados percebe-se que vários sinais de carbonos das duas sapogeninas foram coincidentes.

Os grupos $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos e seus derivados absorvem na faixa de 150 a 185 ppm (Silverstein & Webster, 1998). Os sinais registrados no espectro de ^{13}C em 177,04; 171,30; 171,26 e 167,13 ppm (anexos 6 e 7) correspondem às carbonilas das cadeias laterais ligadas às geninas. O número de quatro carbonilas

confirmou a esterificação de mais de uma hidroxila da genina. Entre os substituintes mais encontrados em sapogeninas estão vários ésteres conjugados, como o grupo angeloíla, cinamoíla, ente outros. O sinal em 156,83 ppm foi atribuído a um carbono de dupla ligação conjugada à carbonila, mostrando que uma das cadeias laterais era formada por um éster conjugado.

Foram observados 10 sinais de carbonos ligados a oxigênios entre 63,18 e 79,90 ppm. Desses sinais apenas 63,18 correspondia a um carbono metilênico (C-28) (anexos 8 e 11). Os C-3 das sapogeninas de ALG absorveram em 78,42 e seus respectivos hidrogênios (H-3) em 3,52 (*dd*, $J = 5,6$ e $10,6$ Hz). A análise dos espectros de RMN com experimentos em duas dimensões, HMBC (acoplamento 2J C-3 com H_{ax}-2, e 3J com H-23 e H-24) e COSY (acoplamento com H-2), confirmou a atribuição, bem como a configuração beta para a hidroxila de C-3. A genina R₁-barrigenol e seus derivados esterificados em C-21 e C-22 apresentam deslocamento do sinal de C-3 próximo à 80 Hz, confirmando o valor atribuído. (Seo, et al., 2002; Tange et al., 2004).

Os carbonos em 79,63 e 79,90 foram atribuídos pela análise do mapa de contorno HSQC aos C-21 das sapogeninas (SG1 e SG2), e os com 73,47 e 73,57 foram atribuídos aos C-22 de SG1 e SG2. O acoplamento de H-21 das duas sapogeninas com os carbonos C-31 (71,30 para SG1 e 71,26 para SG2), e destes carbonos com as metilas 32 de cada substância, indicaram que a cadeia lateral de C-21 era o grupo acetila. Essa atribuição está de acordo com o citado na literatura por Matsushita e colaboradores (2004) e D'Acquarica e colaboradores (2003). O acoplamento de H-22 das duas sapogeninas com os carbonos C-33 (177,04 para SG1 e 167,13 para SG2) mostrou que a diferença estrutural das sapogeninas estava no éster ligado ao C-22.

O mapa de contorno HSQC (anexos 14 a 16) mostrou que o carbono metínico (C-34, 116,86) de SG2 está ligado a H-34 (5,37) e este carbono mostrou acoplamento a longa distância (HMBC) com dois simpletos, as metilas Me-36 (2,19) e Me-37 (1,59). Esses dados sugeriram que a cadeia lateral de C-22 de uma das geninas era o acrilato. O grupo acrilóila é o substituinte do C-22 de uma das sapogeninas monoesterificadas isoladas de *P. undulatum* (Higuchi et al., 1983a). O grupo acrilóila é isômero do grupo angeloíla, éster mais comum em saponinas, encontrado em *Barringtonia asiática* (Herlt et al., 2002), *Eryngium*

campestre (Kartal et al., 2005), *Maesa japonica* (Koike et al., 1999) e *Pittosporum tobira* (D'Acquarica et al., 2003).

A análise dos espectros de RMN permitiu a caracterização da estrutura do R₁-barrigenol como aglicona fundamental, o qual é substituído em C-21 (δ 79,90 e 79,63) por um grupo acetila em ambas as geninas (SG1 e SG2); e em C-22 (δ 73,57 e 72,94) por um grupo 2-metil butanoíla em SG1 e por um grupo acríloíla em SG2 (Fig.32). As duas agliconas são encontradas em saponinas de espécies da família Apocinaceae: SG1 isolada de *Hacquetia epipactis* (Burczyk et al., 1995) e SG2 isolada de *Eryngium campestre* (Kartal et al., 2005).

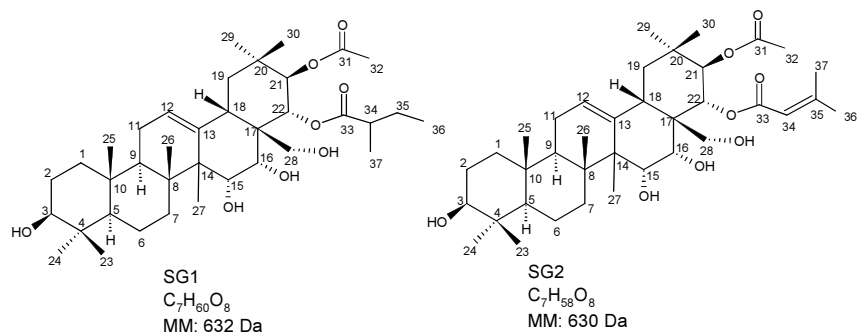


FIGURA 32 – Estruturas das sageninas isoladas do extrato etanólico dos frutos de *P. undulatum*

A atribuição dos sinais de carbono e hidrogênios restantes foi realizada pela análise dos espectros de mapa de contorno HSQC, HMBC e ¹H-¹H COSY (anexos 14 a 22). As tabelas 4 e 5 mostram as atribuições dos carbonos e hidrogênios das saponinas SG1 e SG2 respectivamente.

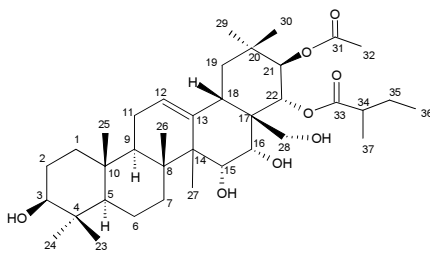


TABELA 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da saponigenina 1 (SG1) em piridina

Mult.	$^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$	$^1\text{H}/^1\text{J} (^1\text{H} - ^{13}\text{C}) - \text{HSQC}$		$^{2,3}\text{J} (^{13}\text{C} - ^1\text{H})$	$^1\text{H}-^1\text{H} - \text{COSY}$
	C	H	H	HMBC	
C	C-4: 39,74	-	-	H-2, Me-23, Me-24	-
	C-8: 41,91	-	-	H-7, Me-27	-
	C-10: 37,82	-	-	H-9, H-11, Me-25	-
	C-13: 144,08	-	-	H _{ax} -19, Me-27	-
	C-14: 48,25	-	-	H-9, H-12, H-18, Me-26, Me-27	-
	C-17: 48,92	-	-	H-12, H-18, H _{eq} -19, H-22	-
	C-20: 36,54	-	-	H _{eq} -19, H-21, Me-29, Me-30	-
	C-31: 171,30	-	-	H-21, Me-32	-
C-33: 177,04	-	-	H-22, H-34, H-35, Me-37	-	
CHOH	C-3: 78,42	H-3: 3,52 (<i>dd</i> , $J = 5,6; 10,6$)	-	H-1, H _{ax} -2; Me-23; Me-24	H-2
	C-15: 68,00	H-15: 4,27 (<i>dd</i> , $J = 4,6; 9,6$)	-	H-16, Me-27	H-16
	C-16: 73,36	H-16: 4,42 (<i>dd</i> , $J = 5,1$)	-	H-18, H-22	H-15
CH-O-	C-21: 79,90	H-21: 6,56 (<i>d</i> , $J = 10,1$)	-	H _{eq} -19, H-22, Me-29; Me-30	H-22
	C-22: 73,57	H-22: 6,26 (<i>d</i> , $J = 10,1$)	-	H-21	H-21
CH ₂ OH	C-28: 63,18	H-28a: 3,53 (<i>dd</i> , $J = 4,8; 10,4$) H-28b: 3,82 (<i>dd</i> , $J = 4,9; 10,5$)	-	H-18, H-22	-
	CH	C-5: 56,00	H-5: 0,98 (<i>m</i>)	-	H _{ax} -1, Me-23, Me-24, Me-25
C-9: 47,73		H-9: 1,81 (<i>dd</i> , $J = 6,1; 10,6$)	-	H _{ax} -1, H _{ax} -6, H-12, Me-25, Me-26, Me-27	H-11, Me-27
C-12: 125,85		H-12: 5,59 (<i>t</i> , $J = 3,8$)	-	H-9, H-11, H _{ax} -19	H-11, Me-27
C-18: 41,91		H-18: 3,12 (<i>m</i>)	-	H _{ax} -19, Me-27, Me-29, Me-30	H-19
C-34: 41,88		H-34: 2,14 (<i>d</i> , $J = 7,3$)	-	H-35, Me-36, Me-37	H-35, Me-37
CH ₂	C-1: 39,69	H _{eq} -1: 1,10 (<i>m</i>) H _{ax} -1: 1,64 (<i>m</i>)	-	Me-25	H-2
	C-2: 28,59	H-2: 1,90 (<i>m</i>)	-	H _{eq} -1, H-3	H-1, H-3
	C-6: 19,53	H _{eq} -6: 1,49 (<i>m</i>) H _{ax} -6: 1,68 (<i>m</i>)	-	-	H-5, H-7
	C-7: 37,19	H _{eq} -7: 2,14 (<i>m</i>) H _{ax} -7: 2,24 (<i>m</i>)	-	-	H-6
	C-11: 24,44	H _{eq} -11: 1,83 (<i>m</i>) H _{ax} -11: 1,99 (<i>m</i>)	-	H _{eq} -7, Me-27	Me-27
	C-19: 47,22	H _{eq} -19: 1,47 (<i>dd</i> , $J = 7,6$) H _{ax} -19: 3,12 (<i>m</i>)	-	H-12, H-18, Me-30	H-18
	C-35: 27,25	H-35a: 1,29 (<i>dd</i> , $J = 7,4$) H-35b: 1,64 (<i>dd</i> , $J = 5,1; 7,3$)	-	Me-36, Me-37	Me-36
CH ₃	C-23: 29,10	Me-23: 1,26 (<i>s</i>)	-	H-3, H-5, H _{eq} -6, Me-24	-
	C-24: 17,00	Me-24: 1,08 (<i>s</i>)	-	H-3, H-5, Me-23	H _{eq} -7, Me-23
	C-25: 16,32	Me-25: 1,00 (<i>s</i>)	-	H-1, H-9	H-1, H-11
	C-26: 18,04	Me-26: 1,11 (<i>s</i>)	-	H _{eq} -7, H-9	H-12
	C-27: 21,38	Me-27: 1,86 (<i>s</i>)	-	-	H-11
	C-29: 29,73	Me-29: 1,09 (<i>s</i>)	-	H-19, H-21, Me-30	Me-30
	C-30: 20,36	Me-30: 1,35 (<i>s</i>)	-	H-19, H-21, Me-29	H-19, Me-29
	C-32: 21,43	Me-32: 2,11 (<i>s</i>)	-	-	-
	C-36: 12,24	Me-36: 0,73 (<i>t</i> , $J = 7,3$)	-	H-34, H-35	H-35
	C-37: 17,22	Me-37: 1,11 (<i>d</i> , $J = 7,0$)	-	H-34, H-35b	H-34

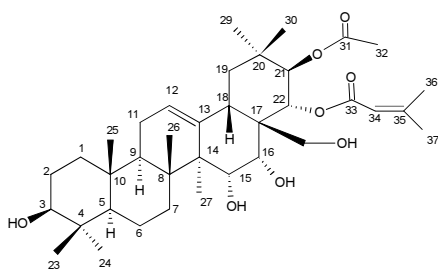


TABELA 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da sapogenina 2 (SG2) em piridina

Mult.	$^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$	$^1\text{J} (^1\text{H} - ^{13}\text{C})$ - HSQC	$^{2,3}\text{J} (^{13}\text{C} - ^1\text{H})$ HMBC	$^1\text{H}-^1\text{H}$ - COSY
	δ_{C}	δ_{H}		
C	C-4: 39,74	-	H-2, H-6 _{eq} , Me-23, Me-24	-
	C-8: 41,26	-	H-5, H-12, Me-27	-
	C-10: 37,82	-	H-1 _{eq} , H-5, H-9, Me-25	-
	C-13: 144,08	-	H-11, H-19 _{ax} , Me-27	-
	C-14: 48,22	-	H-12, H-18, Me-27	-
	C-17: 48,91	-	H-18, H-19 _{eq} , H-22	-
	C-20: 36,62	-	H-21, Me-29, Me-30	-
	C-31: 171,26	-	H-21, Me-32	-
	C-33: 167,13	-	H-21, H-22	-
C-35: 156,83	-	H-34, Me-36, Me-37	-	
CHOH	C-3: 78,42	H-3: 3,52 (<i>dd</i> , $J = 5,6; 10,6$ Hz)	H _{ax} -2; Me-23; Me-24	H-2
	C-15: 68,00	H-15: 4,23 (<i>dd</i> , $J = 4,6; 9,6$ Hz)	Me-27	H-16
	C-16: 73,47	H-16: 4,38 (<i>dd</i> , $J = 4,9$ Hz)	H _{ax} -19, H-21, H-22	H-15
CH-O-	C-21: 79,63	H-21: 6,56 (<i>d</i> , $J = 10,1$)	H _{eq} -19, H-22, Me-29; Me-30	H-22
	C-22: 72,94	H-22: 6,26 (<i>d</i> , $J = 10,1$)	H-21	H-21
CH ₂ OH	C-28: 63,37	H-28a: 3,47 (<i>dd</i> , $J = 4,8; 10,9$) H-28b: 3,76 (<i>dd</i> , $J = 4,8; 10,9$)	H-16, H-22	-
	C-5: 56,00	H-5: 0,88 (<i>m</i>)	Me-23, Me-24, Me-25	Me-23, Me-25, Me-26
CH	C-9: 47,70	H-9: 1,81 (<i>dd</i> , $J = 6,1; 10,6$)	H _{ax} -1, H-11, H-12	H-11
	C-12: 125,85	H-12: 5,59 (<i>t</i> , $J = 3,4$)	H-9, H-11, H _{ax} -19	Me-27
	C-18: 41,35	H-18: 3,12 (<i>m</i>)	H _{ax} -19, Me-27, Me-29, Me-30	H-19
	C-34: 116,86	H-34: 5,37 (<i>sl</i>)	Me-36, Me-37	Me-36, Me-37
CH ₂	C-1: 39,69	H _{eq} -1: 1,10 (<i>m</i>) H _{ax} -1: 1,65 (<i>m</i>)	Me-25	H-2
	C-2: 28,59	H-2: 1,89 (<i>m</i>)	H-3	H-1
	C-6: 19,53	H _{eq} -6: 1,53 (<i>m</i>) H _{ax} -6: 1,74 (<i>m</i>)	-	H-7
	C-7: 37,23	H _{eq} -7: 2,14 (<i>m</i>) H _{ax} -7: 2,24 (<i>m</i>)	-	H-6
	C-11: 24,44	H _{eq} -11: 1,94 (<i>m</i>) H _{ax} -11: 2,03 (<i>m</i>)	H _{eq} -7, H-9, Me-27	Me-27
	C-19: 47,30	H _{eq} -19: 1,47 (<i>dd</i> , $J = 7,6$) H _{ax} -19: 3,12 (<i>m</i>)	Me-30	H _{eq} -19, Me-29
CH ₃	C-23: 29,10	Me-23: 1,26 (<i>s</i>)	H-3, Me-24	Me-24
	C-24: 17,00	Me-24: 1,09 (<i>s</i>)	H-5, Me-23	Me-23
	C-25: 16,32	Me-25: 1,00 (<i>s</i>)	H-9	H-11
	C-26: 18,04	Me-26: 1,13 (<i>s</i>)	H _{eq} -7, H-9	H-11, Me-27
	C-27: 21,40	Me-27: 1,86 (<i>s</i>)	H _{eq} -6	H-12
	C-29: 29,76	Me-29: 1,10 (<i>s</i>)	H-21, Me-30	Me-30
	C-30: 20,33	Me-30: 1,32 (<i>s</i>)	H-19, H-21, Me-29	H-19, Me-29
	C-32: 21,55	Me-32: 2,16 (<i>s</i>)	H-21, H-22	-
	C-36: 20,34	Me-36: 2,19 (<i>s</i>)	H-34, Me-37	H-34, Me-37
C-37: 27,27	Me-37: 1,59 (<i>s</i>)	H-34, Me-36	H-34	

A amostra ALG foi analisada por espectrometria de massa com ionização por eletrospray, no modo positivo com varredura de 100 a 2000 m/z para obtenção das massas das geninas. Observou-se a formação dos adutos $[M+Na]^+$ e $[2M+Na]^+$ para as duas geninas. O íon de 1287 Da foi aprisionado e fragmentado por colisão, gerando o íon de 655 Da, correspondente a massa de uma das geninas mais um átomo de sódio ($632 + 23$ Da). A fragmentação deste íon gerou o íon de 595 Da, correspondente à genina menos uma molécula de ácido acético. Esses dados estão de acordo com o esperado para a genina 1 (SG1), com o 2-metilbutanoíla como substituinte.

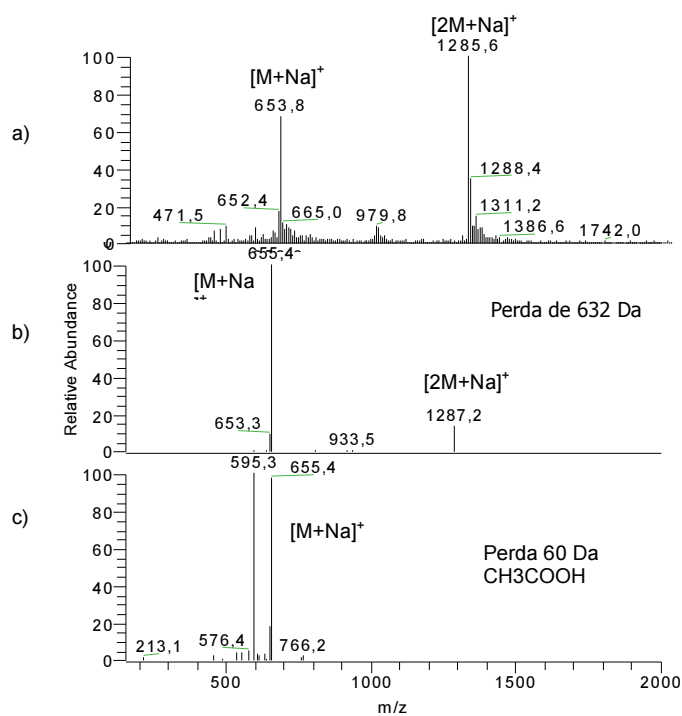


FIGURA 33 – Espectro de IES-EM de SG1 (a) Espectro de ALG de 100 a 2000 m/z ; (b) aprisionamento do íon 655 m/z ; (c) fragmentação do íon 655 (CID 23%) com perda de 60 Da (ácido acético).

O íon de 1283 Da também foi aprisionado e fragmentado por colisão, gerando o íon de 653 Da, correspondente a massa da segunda genina mais um átomo de sódio (630 + 23 Da). A diferença de 2 unidades de massa em relação a genina 1 (SG1) confirmou uma insaturação a mais na estrutura da molécula. A fragmentação de íon 653 deu origem aos íons de 593 Da, correspondente à genina menos uma molécula de ácido acético e o de 493 Da, correspondente à perda de uma molécula de ácido acrílico. Esses dados estão de acordo com o esperado para a genina 2 (SG2), com o grupo acrilóila como substituinte.

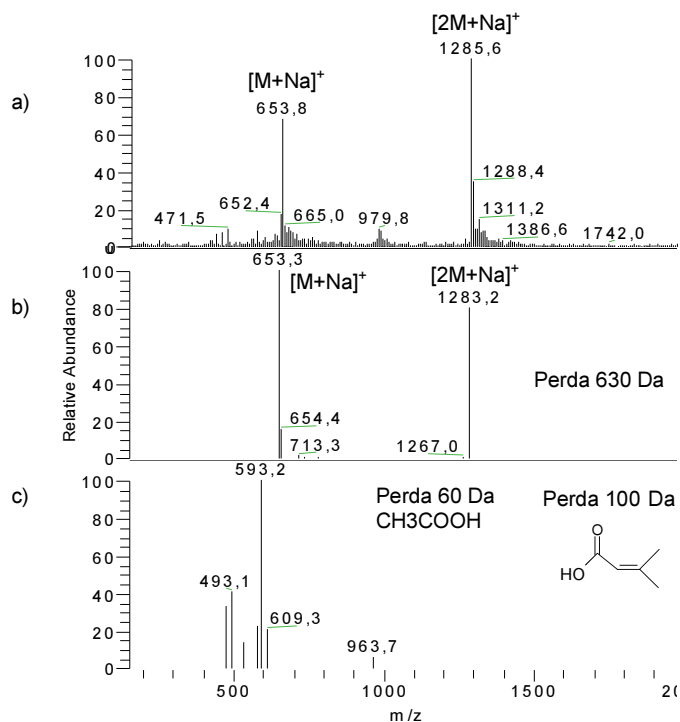


FIGURA 34 – Espectro de IES-EM de SG2 (a) Espectro de ALG de 100 a 2000 m/z ; (b) aprisionamento do íon 653 m/z ; (c) fragmentação do íon 653 (CID 23%) com perda de 60 Da (ácido acético) seguida de perda de 100 Da (ácido acrílico).

Desta forma confirmou-se que as geninas possuíam dois ésteres e que esses ésteres estão ligados de tal forma, que cada acetil presente nos espectros de RMN

estava ligado à diferentes geninas e, conseqüentemente, o grupo 2-metilbutanoíla está ligado em SG1 e o grupo aciloíla em SG2.

As sapogeninas não foram submetidas aos ensaios de toxicidade para células tumorais e para formas axênicas de *L. (L.) amazonensis* uma vez que a fração AL-Ac' (da qual elas foram isoladas) não foi ativa. Entretanto, Chan (2007), avaliou o potencial da acilação dupla nas posições 21 e 22 de saponinas triterpênicas e concluiu que a hidrólise dos açúcares diminui a atividade antitumoral das saponinas, mas a remoção dos grupos acila em 21 e 22 extingue essa atividade. O autor avaliou apenas saponinas substituídas com grupos angeloíla nas posições citadas e não se pode extrapolar os resultados para outros conjuntos de substituintes. A hipótese que se formula com esses dados é que a dupla acilação das saponinas de *P. undulatum* estejam contribuindo para a atividade observada.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento de sapogeninas triterpênicas aciladas na posição C-21 para a espécie *P. undulatum*.

5.1.3. Tentativa de purificação das saponinas

As saponinas, geralmente, ocorrem nas plantas como uma mistura complexa de substâncias estruturalmente muito próximas, apresentando polaridade muito similar, o que torna difícil o processo de isolamento das mesmas. Por isso é muito comum que várias técnicas de separação sejam efetuadas para a obtenção de saponinas puras, o que permite a elucidação da estrutura e determinação da atividade biológica (Oleszek & Bialy, 2006). Entretanto, tendo em vista a dificuldade de separação dessas substâncias, como relatado por Higuchi e colaboradores (1983b) e Koike e colaboradores (1999) é comum que saponinas sejam caracterizadas em mistura.

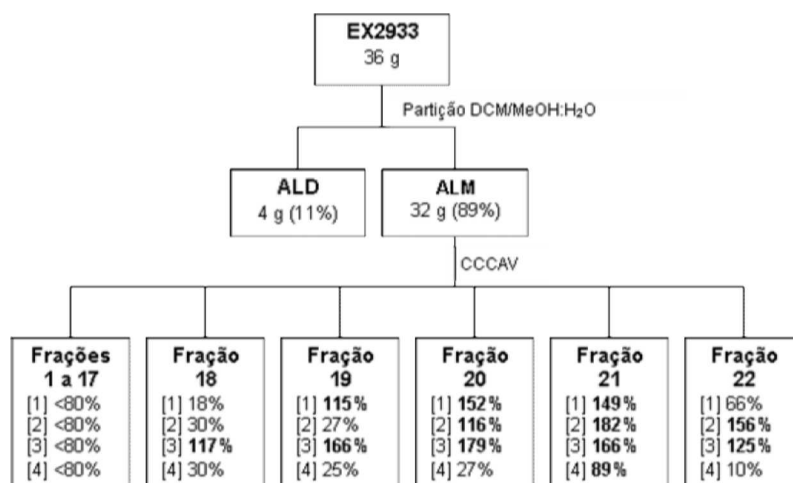
O esqueleto oleanano (ver Fig. 27) é o esqueleto mais encontrado no reino vegetal. O padrão de número e posição de grupos hidroxila é bem variado nas saponinas. As hidroxilas em C-21 e C-22 podem estar ligadas a muitos substituintes diferentes, dos quais podem ser citados os grupos benzoíla, angeloíla, cinamoíla, ente outros. Ocorre também grande variedade quanto ao número, posição e tipo de monossacarídeos ligados à sapogenina. Em geral as cadeias glicosídicas estão ligadas aos átomos C-3 e C-17 e possuem uma extensão que varia de 1 a 8 monômeros. As saponinas são, em geral, mono ou bidesmosídicas, o que quer dizer

que possuem 1 ou 2 cadeias glicosídicas ligadas em posições diferentes. As cadeias mais encontradas em saponinas do tipo oleanano contêm unidades de glicose, arabinose, raminose, xilose e ácido glicurônico (Vincken et al., 2007).

A fração ativa (ALM) foi então fracionada por cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV) para obtenção das saponinas. A CCCAV foi escolhida por ser uma técnica reproduzível e que tem como grande vantagem a recuperação de toda a massa da amostra injetada, uma vez que não ocorre perda devido à adsorção irreversível de moléculas pela fase estacionária. O esvaziamento da coluna, que é preenchida por uma fase líquida, promove a recuperação das substâncias que têm maior afinidade pela fase estacionária e não são eluídas pela fase móvel.

Após agrupamento, as 22 frações obtidas foram submetidas aos ensaios de atividade leishmanicida e de citotoxicidade para células tumorais visando a detecção das frações ativas (Esq.2). A atividade biológica ficou concentrada nas frações que foram coletadas no esvaziamento da coluna, ou seja, que tiveram mais afinidade pela fase butanólica. Com o fracionamento de ALM foi possível detectar a atividade leishmanicida, indicando que ocorreu concentração das substâncias ativas em uma fração.

ESQUEMA 2 – Fracionamento químico do extrato EX2933 e resultados dos ensaios biológicos de atividade antineoplásica e leishmanicida com amostras na concentração de 20 µg/mL.



[1] MCF-7 (tumor de mama); [2] TK-10 (tumor renal); [3] UACC-62 (melanoma); [4] amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. De [1] a [3] valores de 0-100% atividade citostática e de 101-200% atividade citotóxica. Para [4] valor representa % de morte. Valores <80% foram considerados como negativo.

A análise das 22 frações por CCD revelou a presença de terpenóides (coloração arroxeada) nas frações ativas. Estes terpenóides eram provavelmente saponinas devido à formação de espuma quando em solução aquosa. Além disso, as substâncias ativas ficaram retidas na fase butanólica e as saponinas são reconhecidamente muito solúveis em BuOH, aumentando os indícios de que as substâncias ativas pertenciam a essa classe de produtos naturais.

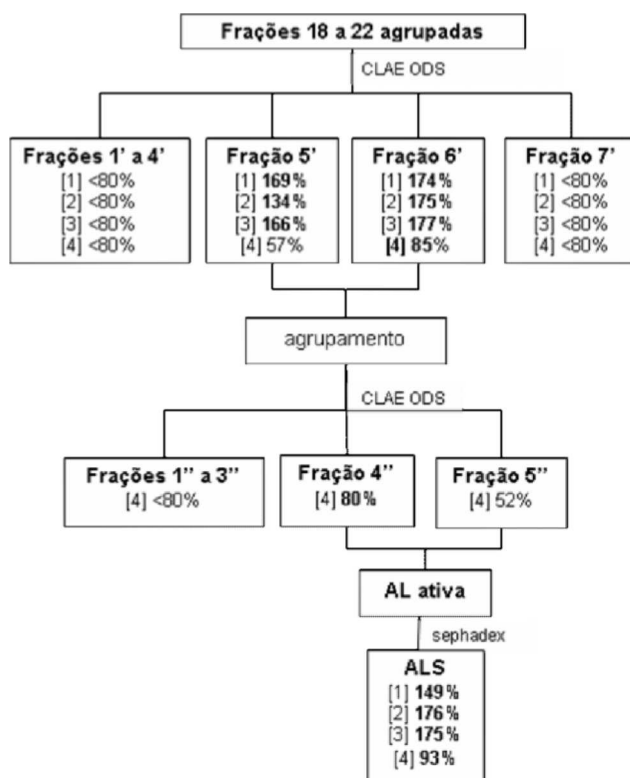
O fracionamento de ALM levou à concentração das substâncias ativas, o que permitiu a detecção da atividade leishmanicida na fração 21. As substâncias leishmanicidas sempre estiveram presentes na amostra, entretanto são substâncias minoritárias, tendo o seu efeito mascarado pelas demais substâncias.

As frações ativas (18 a 22) foram analisadas por CLAE em coluna de fase reversa (ODS). O comprimento de onda (240 nm) foi escolhido após varredura em detector com arranjo de diodos, mostrando-se o melhor para monitoramento do

processo cromatográfico. A ausência de cromóforos nos esqueletos básicos das saponinas e dos terpenóides exige que sejam utilizados comprimentos de onda menores e, portanto, mais energéticos para sua detecção, sendo os comprimentos de onda mais utilizados os que variam de 200 a 210 nm (Oleszek & Bialy, 2006).

Os perfis obtidos por CLAE para as frações ativas foram muito semelhantes, apresentando vários picos no λ_{210} nm. Em virtude do comportamento cromatográfico semelhante, as frações 18 a 22 foram reunidas e refractionadas por CLAE semi-preparativa, utilizando coluna de fase reversa (ODS). As sete frações obtidas nesse fracionamento foram avaliadas nos ensaios de toxicidade para células tumorais e de atividade leishmanicida e as duas frações com atividade foram novamente analisadas por CLAE mostrando-se ainda complexas e muito semelhantes. Essas duas frações foram agrupadas e refractionadas por CLAE semi-preparativa com coluna ODS. Novamente foram obtidas duas frações ativas (apenas ensaio de atividade leishmanicida) de perfil em CLAE e em CCD muito semelhantes. Essas frações foram agrupadas (AL ativa), filtradas em sephadex e analisadas em CCD com vanilina sulfúrica. A fração (com manchas arroxeadas) que foi obtida recebeu o nome ALS (fração rica em saponinas).

ESQUEMA 3 – Fracionamento biomonitorado das saponinas e resultados dos ensaios biológicos de atividade antineoplásica e leishmanicida com amostras na concentração de 20 µg/mL.



[1] MCF-7 (tumor de mama); [2] TK-10 (tumor renal); [3] UACC-62 (melanoma); [4] amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. De [1] a [3] valores de 0-100% atividade citostática e de 101-200% atividade citocida. Para [4] valor representa % de morte. Valores <80% foram considerados como negativo.

Foram obtidos apenas 20 mg da fração ALS foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-IES). Vários picos foram obtidos no cromatograma (Fig.35a) e o espectro de massas mostrou sinais com relação m/z variando de 1155 a 1315 Da (Fig.35b). A técnica de eletrospray permite a detecção de íons *quasi*-moleculares, portanto os sinais com m/z observados correspondem a adutos formados entre as moléculas e, em geral,

átomos de hidrogênio e sódio, ou seja, $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Portanto, a massa das saponinas pode variar de 1132 a 1292 Da.

Esse valor de massa molecular é considerado um valor elevado para produtos naturais (massa das sapogeninas isoladas nesse trabalho foram 630 e 632 Da), sendo encontrado em heterosídeos, como é o caso de saponinas. As saponinas que já foram isoladas das folhas de *P. undulatum* têm massa molecular variando de 1071 a 1203 Da, apresentando cadeias glicosídicas com três ou quatro açúcares respectivamente (ver Fig.20). Os resultados obtidos sugerem, portanto, que as saponinas encontradas nos frutos de *P. undulatum* são diferentes das que já foram isoladas das folhas, podendo se diferenciar quanto à genina e/ou quanto à porção glicosídica.

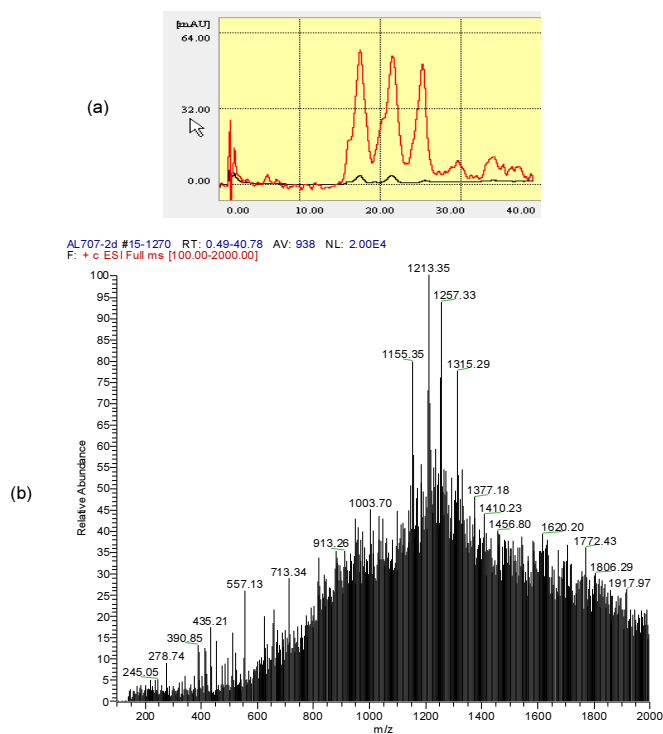


FIGURA 35 – (a) Cromatograma: coluna ODS, fluxo 1 mL/min, detecção λ_{210} nm (vermelho) e λ_{244} nm (preto), eluição isocrática 30% ACN (0,1% ácido fórmico) por 40 min. (b) Espectro de massas com IES: modo positivo, varredura de 100 a 2000 m/z.

Para propor com mais segurança as massas das saponinas presentes na amostra ALS foi obtido o espectro de massas da amostra por infusão direta utilizando o método de IES. A análise foi realizada no modo positivo e negativo, permitindo sugerir a massa molecular das substâncias majoritárias.

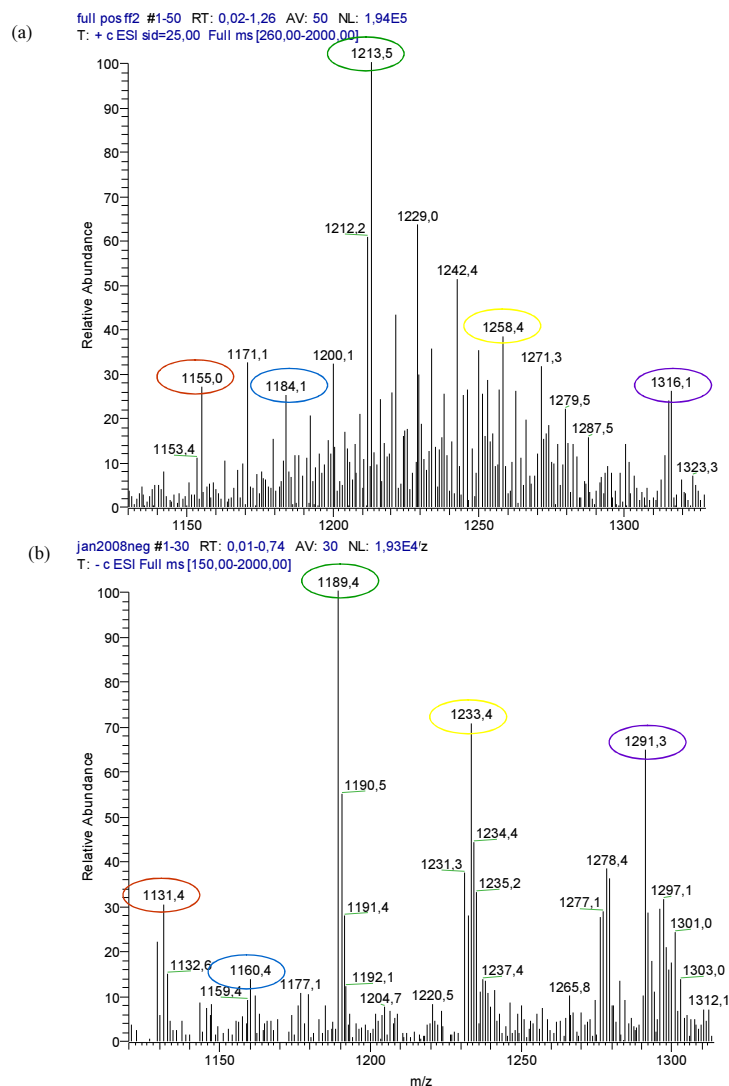


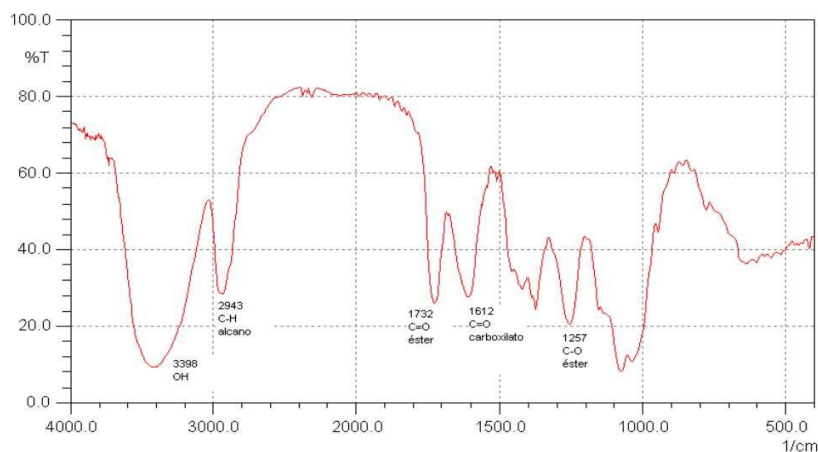
FIGURA 36 – Espectros de massas com IES obtidos por infusão direta. (a) modo positivo (b) modo negativo.

TABELA 6 – Análise da massa dos íons principais da amostra ALS nos modos positivo e negativo e proposta de massa molecular para as substâncias presentes.

Modo Positivo [M+Na] ⁺	Modo Negativo [M-H] ⁻	Massa da substância (Da)
1155,4	1131,4	1132
1184,1	1160,4	1161
1213,5	1189,4	1190
1258,4	1233,4	1234
1315,1	1291,3	1292

A análise dos dados obtidos mostrou que as saponinas presentes na amostra tinham massa de 1132, 1161, 1190, 1234 e 1292 Da, confirmando que as massas dessas substâncias eram maiores do que as massas das saponinas isoladas das folhas dessa espécie e indicando que eram estruturas diferentes.

O espectro de infravermelho de ALS foi obtido (Fig.37) e sua análise permitiu a identificação dos grupos funcionais: OH, C=O (éster), C-O (éster), C=O (COO⁻), e C-H (alcano). A banda de carbonila de ester já havia sido detectada na genina, mostrando que esta é esterificada. A banda de carbonila de carboxilato visualizada no espectro indica que um dos açúcares da cadeia glicosídica seja o ácido glicurônico, como acontece em várias saponinas isoladas de *Pittosporum* spp. A ionização do ácido da saponina pode estar ocorrendo no momento de obtenção da pastilha de KBr, fazendo que com a carbonila absorva em um número de onda mais baixo.

**FIGURA 37** – Espectro no IV de ALS (KBr, cm-1).

As saponinas isoladas do gênero *Pittosporum* são, geralmente, esterificadas na posição 22 e algumas vezes na posição 21. Os ésteres mais encontrados são o acetato, o acrilato, e o 2-metilbutirato. A hidroxila da posição 3, geralmente, é glicosilada, sendo o substituinte mais comum o ácido glicurônico, no qual outros açúcares estão ligados em cadeia ou com ramificação, entre eles a glicose e a arabinose (Cornforth & Earl, 1939; Higuchi et al., 1983a; Higuchi et al., 1983b; D'Acquarica et al., 2002; Éparvier et al., 2007). Os dados de IV obtidos mostraram que as saponinas dos frutos de *P. undulatum* são esterificadas e que existe um grupo ácido na estrutura da molécula. Como a literatura mostra que o ácido glicurônico é o açúcar mais comumente ligado à hidroxila de C-3, sugere-se que a cadeia glicosídica dessas substâncias esteja ligada a esse átomo de carbono, sendo o ácido glicurônico um de seus resíduos.

A literatura mostra que são encontrados nas saponinas: glicose, galactose, arabinose, xilose e ácido glicurônico, sendo que este último é, geralmente, o açúcar ligado na posição C-3. É observado também que mais de uma hidroxila do ácido é substituída, ou seja, a cadeia glicosídica frequentemente é bastante ramificada. A literatura mostra também que as cadeias glicosídicas são, predominantemente, constituídas por 3 ou 4 unidades de açúcar (Koile et al., 1999; Kerlt et al., 2002; D'Acquarica et al., 2002; Matsushita et al., 2004; Kartal et al., 2005; Chan, 2007).

A análise dos espectros de massas de ALS permitiu propor massas de 1132, 1161, 1190, 1234 e 1292 Da para algumas das saponinas presentes. O isolamento dos íons *quasi*-moleculares em armadilha de íons e o bombardeamento dos mesmos com hélio permitiu verificar o padrão e fragmentação das substâncias, como exemplificado pela figura 32 abaixo, que mostra a fragmentação do íon *quasi*-molecular 1291.

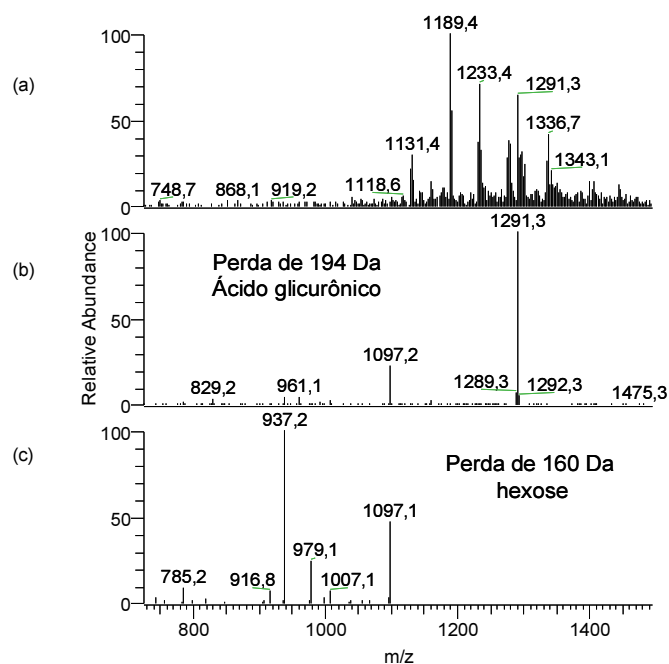


FIGURA 38 – IES-EM (modo negativo): fragmentação de m/z 1291 por CID

Baseando-se nas geninas já isoladas de *P. undulatum*, nas massas encontradas por IES-EM, nos fragmentos observados e nos açúcares mais comumente encontrados em saponinas foram propostas estruturas para as saponinas de ALS (Fig.39). É importante ressaltar que a fragmentação observada levou à proposição de estruturas com unidades de ácido glicurônico terminais, tendo em vista a perda de 194 Da na primeira fragmentação, o que difere da literatura.

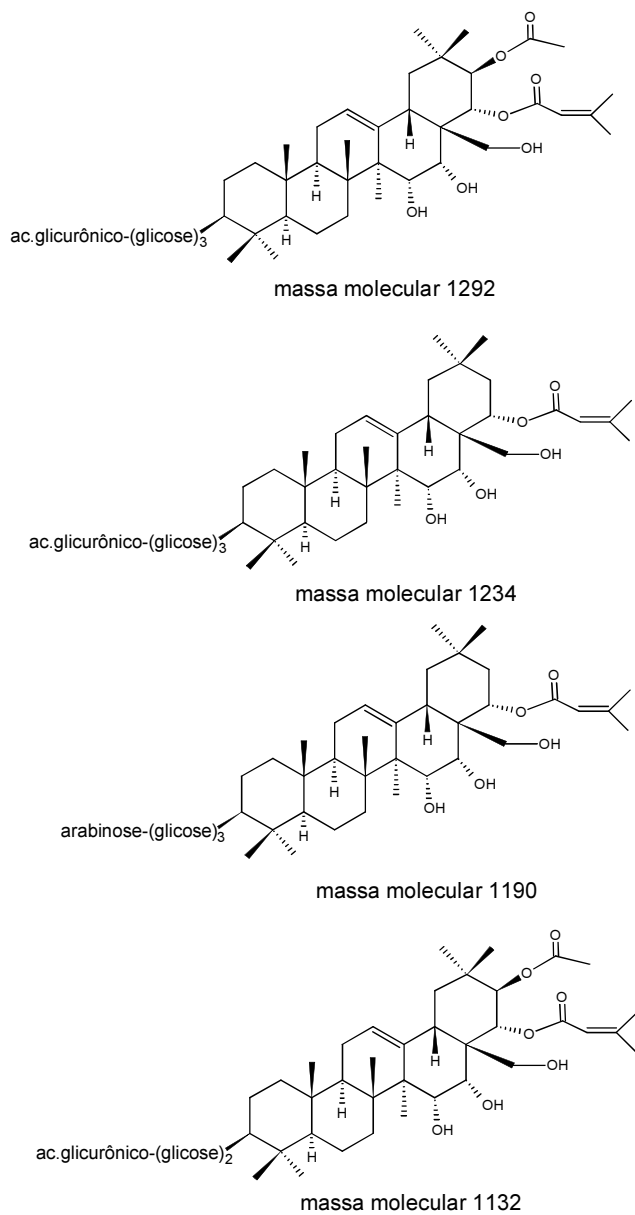


FIGURA 39 – Proposta de estruturas para as saponinas de ALS

A elucidação estrutural completa e inequívoca das saponinas deste extrato exigirá o isolamento das mesmas em quantidades suficientes para se obter os dados espectrais e para as diversas reações de derivatização que são necessárias, especialmente para a elucidação da porção glicosídica. Isto exigiria a coleta de grandes quantidades de material vegetal e um novo fracionamento. Estas atividades não seriam possíveis dentro do prazo estipulado para a elaboração desta dissertação de mestrado e, por isto, serão objeto de trabalhos futuros.

5.1.4. Determinação da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (CI₅₀) da fração ALS

As saponinas são consideradas os constituintes majoritários de muitas drogas vegetais e plantas utilizadas na medicina tradicional, sendo consideradas responsáveis por várias propriedades farmacológicas (Estrada et al., 2000). Já foram descritas atividades moluscicida, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiparasitária e antitumoral (Sparg et al., 2004). As saponinas isoladas de *Hedera helix* L. mostraram forte atividade antiproliferativa para formas amastigotas e promastigotas da espécie *Leishmania infantum* (Delmas et al., 2000). O pittoviridosídeo, isolado de *P. viridifolium* por fracionamento biomonitorado, mostrou atividade citotóxica para células de câncer de ovário humano (Seo et al., 2002). Misturas de saponinas também têm mostrado citotoxicidade. Marquina e colaboradores (2001) mostraram a elevada atividade de uma mistura de saponinas monodesmosídicas para células de câncer de cólon, as quais isoladamente não eram citotóxicas. A mistura de saponinas isolada dos frutos de *P. tobira* também mostrou atividade antiproliferativa e efeito apoptótico em linhagens de células humanas de adenocarcinoma de cólon, melanoma, carcinoma de mama, adenocarcinoma de pâncreas, neuroblastoma e meduloblastoma (D'Acquarica et al., 2002).

A atividade citotóxica e leishmanicida das saponinas presentes nos frutos de *P. undulatum* foi determinada. Observou-se elevada atividade citocida no ensaio com células tumorais e alto percentual de morte de formas amastigotas axênicas quando a amostra era avaliada.

Foi determinada a concentração de inibição de 50% do crescimento (CI₅₀) de uma das linhagens de células tumorais (TK-10, tumor renal) para a fração ALS. A

determinação de CI_{50} para as linhagens MCF-7 (mama) e UACC-62 (melanoma) e para formas amastigotas axênicas será realizada em breve, não estando os resultados disponíveis no momento de redação desta dissertação. A figura 40 mostra o gráfico obtido, no qual o eixo da coordenada representa % de atividade (inibição do crescimento) e o eixo da abscissa representa a concentração em $\mu\text{g/mL}$. Valores de 0 a 100% representam atividade citostática e de 0 a -100% representam atividade citocida. A CI_{50} obtida para a amostra foi de 1,7 $\mu\text{g/mL}$. Os controles utilizados, etoposídeo e colchicina, foram testados a 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram atividade citostática de 89 e 75% respectivamente. Oliveira e colaboradores (2006) determinaram a CI_{50} do etoposídeo para células TK-10, o valor encontrado foi de $(20,4 \pm 2,3) \mu\text{mol/L}$ ou 12 $\mu\text{g/mL}$. Considerando que ALS é uma mistura de substâncias, é provável que a substância ativa tenha uma CI_{50} ainda menor, indicando a potencial atividade antineoplásica da amostra.

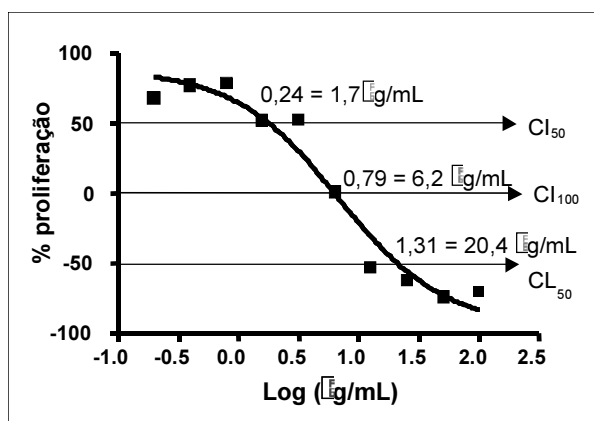


FIGURA 40 – Curva dose-resposta da amostra ALS para células tumorais renais (TK-10). Valores de -100 a 0% de proliferação: atividade citocida, de 0-100%: atividade citostática. CI (concentração de inibição da proliferação), CL (concentração letal).

Com uma concentração de 20,4 $\mu\text{g/mL}$ a fração ALS é capaz de matar 50% das células. A utilização das substâncias ativas deverá ser feita depois de estudos de toxicidade para células normais. Se um extrato ou substância não interfere na proliferação dessas células, pode-se propor que sua atividade seja seletiva e que sua utilização cause menos efeitos tóxicos.

5.2. PIPTADENIA ADIANTOIDES (SPRENG.) J. F. MACBR.

5.2.1. Fracionamento biomonitorado de EX2903

A espécie *P. adiantoides* (Spreng.) J. F. Macbr. também foi coletada na RPPN – Santuário do Caraça como parte do projeto de 'Bioprospecção da Biodiversidade Mineira como Fonte de Novas Drogas'. Os caules coletados deram origem ao extrato EX2068. Esse extrato foi submetido ao ensaio com células tumorais.

Os resultados dos testes iniciais mostraram que EX2068 apresentava atividade citotóxica para uma das linhagens celulares (UACC-62, melanoma). Esse resultado sugeriu que as substâncias ativas do extrato poderiam apresentavam atividade seletiva para um tipo de células transformadas (tumorais) e, conseqüentemente seriam menos tóxicas. Essa potencial atividade antineoplásica em conjunto com a ausência de dados na literatura sobre a espécie levou à escolha desta planta para estudo químico biomonitorado, visando o isolamento e a identificação das substâncias responsáveis pela atividade apresentada.

O material vegetal foi então recoletado na RPPN – Santuário do Caraça e processado, obtendo-se 186 g de pó seco. Após a extração com EtOH foi obtido o extrato codificado por EX2903, cujo rendimento foi de 10,2% (19 g).

O extrato EX2903 foi submetido aos ensaios com células tumorais e de atividade leishmanicida. Entretanto, não foram observadas atividade leishmanicida e citotóxica para células tumorais. Essa alteração da atividade citotóxica pode ser resultado de uma alteração de produtos naturais presentes no extrato ou por alteração na concentração destes, resultado de mudanças no habitat da espécie durante o período entre as duas coletas. Essa alteração de resultados não é devida aos ensaios biológicos visto que os controles positivos (etoposídeo e colchicina) validaram os procedimentos empregados.

Foi verificado que com o extrato de *Pittosporum undulatum* a partição era uma etapa eficiente para a concentração de substâncias ativas e detecção de atividade. Assim, foi realizada também para *Piptadenia adiantoides* a partição do extrato EX2903 (13 g), obtendo-se uma fração diclorometânica (AFD) e uma hidrometanólica (AFM). Essas frações foram submetidas ao ensaio com as células tumorais e a atividade biológica ficou concentrada na fração diclorometânica, mostrando que as substâncias ativas são de média polaridade.

TABELA 7 – Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas na partição do extrato EX2903

Frações (20 µg/mL)	% de inibição da proliferação celular ¹		
	MCF-7	TK-10	UACC-62
AFD	111	0	59
AFM	65	0	27

¹ Resultados de 0 a 100% atividade citostática, de 101 a 200% atividade citocida. MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma). Valores <80% foram considerados como negativo.

A avaliação do extrato EX2903 e das frações obtidas por partição por CCD em fase normal mostrou que terpenóides e flavonóides são seus constituintes principais. Não foram encontrados estudos químicos de *P. adiantoides*, entretanto, de outras espécies do gênero foram isolados alcalóides indólicos (principalmente bufotenina) e, também, flavonóides.

A família Fabaceae também é conhecida como Leguminosae e é reconhecidamente uma fonte de flavonóides, os quais são utilizados também em classificação quimiotaxonômica das espécies dessa família (Hegnauer & Grayer-Barkmeijer, 1993; Rijke et al., 2004). Flavonóides são a maior classe de metabólitos secundários em plantas. Geralmente, são encontrados como glicosídeos, com unidades de galactose, ramnose, glicose, entre outros monossacarídeos. A substituição do açúcar no esqueleto flavônico ocorre em grupos hidroxila, no caso de O-glicosídeos, ou diretamente em átomos de carbono no anel A, no caso de C-glicosídeos (Rijke et al., 2004).

A fração AFD apresentou em CCD de sílica, utilizando o reagente NP/PEG como revelador, vários flavonóides. Visando o isolamento desses flavonóides a fração AFD foi fracionada por CCCAV resultando em 13 frações que foram analisadas por CCD (sílica) e submetidas ao ensaio com as células tumorais.

TABELA 8 - Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas no fracionamento de AFD por CCCAV

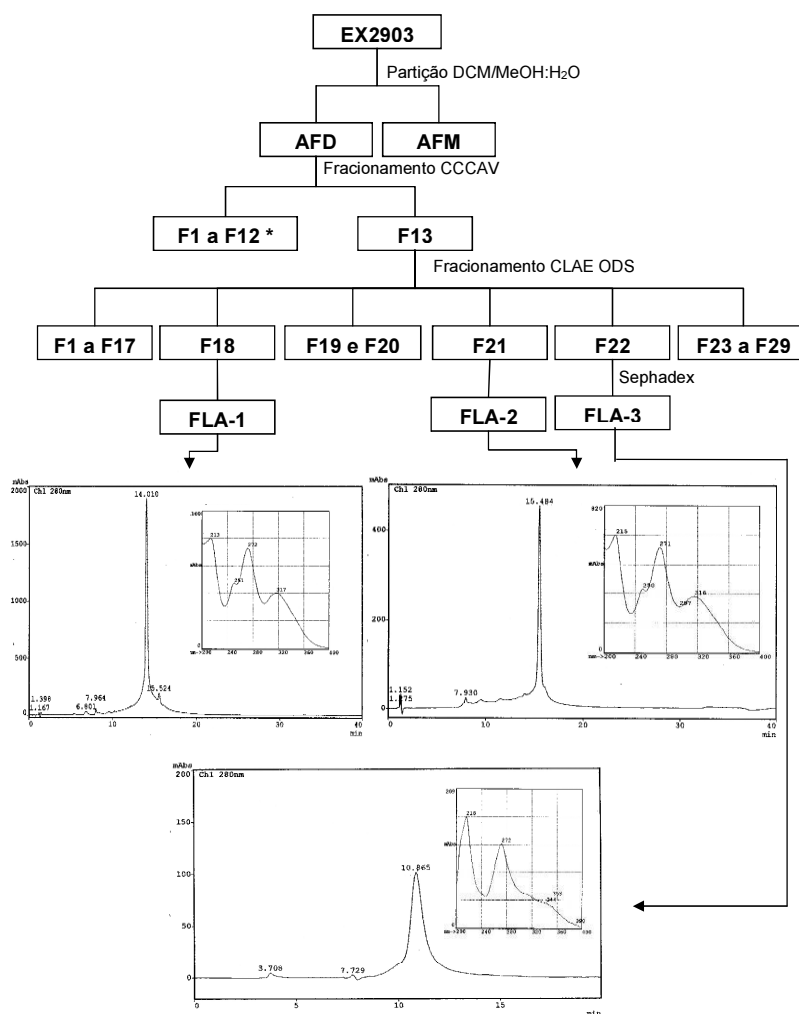
Frações (20 µg/mL)	% de inibição da proliferação celular ¹		
	MCF-7	TK-10	UACC-62
AFD	111	0	59
AFM	65	0	27
F1	3	0	0
F2	0	0	0
F3	18	0	0
F4	99	0	15
F5	142	148	179
F6	11	0	3
F7	0	0	0
F8	137	26	89
F9	36	0	0
F10	0	0	0
F11	12	0	0
F12	111	0	28
F13	98	126	140

¹ Resultados de 0 a 100% atividade citostática, de 101 a 200% atividade citocida. MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma). Valores <80% foram considerados como negativo.


As frações 4, 5, 8 e 12 foram obtidas em pequena quantidade (massa inferior a 20 mg) e eram frações compostas por várias substâncias, sendo necessárias outras etapas de fracionamento para obtenção das substâncias ativas. Por estas razões essas frações não continuaram a ser investigadas. A fração 13 foi obtida com maior rendimento (307 mg), entretanto o sistema utilizado como mistura bifásica no fracionamento por CCCAV não foi eficiente na separação dos flavonóides, que foram eluídos em conjunto nessa fração. Desta forma outra técnica cromatográfica (CLAE) foi necessária para obtenção das substâncias ativas.

O fracionamento da fração 13 por CLAE fase reversa ODS resultou na obtenção de 29 frações. Duas dessas frações (18 e 21) foram enviadas ao LAREMAR do Departamento de Química (DQ) da UFMG para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C. A fração 22 foi purificada por cromatografia de exclusão (Sephadex LH20), resultando na obtenção do flavonóide 3 (FLA3), ainda impura, que também foi enviada ao LAREMAR DQ-UFMG para obtenção dos espectros.

ESQUEMA 4 – Fracionamento de EX2903 e obtenção de três flavonóides (FLA-1 a FLA-3)



* Frações inativas ou com massa insuficiente para isolamento.

 Cromatograma obtido por CLAE, coluna ODS, e espectro de UV das substâncias

Não foram obtidos espectros de RMN ¹³C para FLA-1, FLA-2 e FLA-3, e os espectros de RMN ¹H obtidos mostraram que as amostras ainda estavam impuras.

Portanto, não foi possível identificar os flavonóides. Entretanto, essas amostras foram analisadas por IES-EM e a análise dos espectros obtidos permitiu propor uma massa de 558 Da para as substâncias, visto que no modo positivo foi detectado o íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ 559 Da e no modo negativo o íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ 557 Da. Os espectros de massa das substâncias mostram também perda de fragmentos de 146 Da ou 164 Da, os quais correspondem à perda de açúcares do tipo desoxi-hexose ou desoxi-hexose+água, respectivamente. Desta forma, propõe-se que os flavonóides sejam glicosilados e que a massa da genina seja de 412 Da. Essa massa é relativamente alta para geninas, mesmo para as tetra-hidroxiladas, como quercetina (302 Da) e luteolina (287 Da) (Tsimogiannis et al., 2007). É possível que as hidroxilas das geninas sejam substituídas por cadeias alcânicas ou que as geninas sejam C-preniladas e, desta forma, tenham uma massa maior. Nos espectros de RMN de 1H foram obtidos sinais em aproximadamente δ 1,0, que podem ser de metilas de isopreno.

Para obter maior massa desses flavonóides puros e conseguir melhores espectros de RMN e também de massas, foi realizado novo fracionamento por CCCAV. Desta vez utilizou-se o método co-corrente para fracionamento, conforme proposto por Berthod & Hassoun (2006). Os autores mostram que o bombeamento lento de fase estacionária no mesmo sentido da fase móvel durante o processo cromatográfico aumenta a velocidade de eluição das substâncias e torna mais ágil o fracionamento. O sistema de solventes escolhido [DCM:MeOH:H₂O (5:6:4 v/v/v)] foi o mesmo descrito por Armbruster e colaboradores (2001), que o elegeram como melhor sistema para fracionamento primário de produtos naturais em misturas complexas, como extratos vegetais (fase diclorometânica como fase estacionária).

Foram obtidas 79 frações que foram analisadas por CCD em fase normal e agrupadas em 25 grupos (Fig.41). A fração de maior massa (F23) foi obtida com o esvaziamento da coluna, entretanto outras frações de maior massa foram obtidas durante o fracionamento, mostrando que o método e o sistema empregado foram eficazes para o fracionamento de AFD.

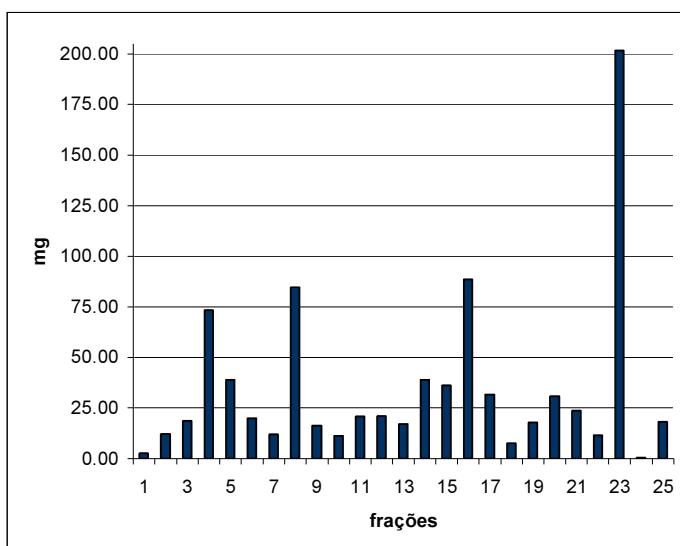


FIGURA 41 – Massa das frações obtidas no fracionamento de AFD por Co-CCC

Essas amostras foram submetidas ao ensaio com as três linhagens de células tumorais, mas apresentaram atividade citostática fraca a moderada. A fração 25 foi a que apresentou melhor resultado, inibindo 71% da proliferação da TK-10. Uma explicação possível para a diminuição da atividade é que as substâncias sejam ativas em conjunto (sinergismo) e que o método empregado tenha separado-as, não permitindo a detecção de atividade citocida apresentada anteriormente.

As amostras majoritárias, com exceção da fração 23, foram analisadas por CLAE em fase reversa ODS utilizando gradiente de ACN:H₂O com 0,5% de TFA. A utilização de ácido na fase móvel é muito comum na análise de compostos que possuem hidrogênios ácidos, como flavonóides, os quais são facilmente ionizados pela água da fase móvel. O sistema de eluição para cada fração será determinado para realização de fracionamento em escala semi-preparativa e obtenção dos flavonóides. Estes, depois de purificados, terão a estrutura elucidada mediante análise de dados espectrais de UV, massas e RMN.

TABELA 9 - Avaliação da atividade antineoplásica das frações obtidas no fracionamento de AFD por Co-CCC

Frações (20 µg/mL)	% de inibição da proliferação celular ¹		
	MCF-7	TK-10	UACC-62
F1	16	14	8
F2	3	11	2
F3	0	0	0
F4	8	4	7
F5	0	20	40
F6	5	25	0
F7	3	0	0
F8	19	22	35
F9	16	15	5
F10	8	2	8
F11	4	6	0
F12	5	2	0
F13	1	27	1
F14	11	25	21
F15	12	16	35
F16	37	4	46
F17	23	1	11
F18	15	0	16
F19	17	3	0
F20	15	10	1
F21	10	9	0
F22	6	15	0
F23	1	18	0
F24	6	15	17
F25	17	71	0

¹ Resultados de 0 a 100% atividade citostática, de 101 a 200% atividade citocida. MCF-7 (tumor de mama); TK-10 (tumor renal); UACC-62 (melanoma). Valores <80% foram considerados como negativo.

Até o momento da escrita desta dissertação não foi possível isolar as substâncias com atividade citotóxica para células tumorais. Entretanto, a metodologia de obtenção de flavonóides foi determinada, frações de maior massa obtidas, de forma que o isolamento e a identificação sejam realizados em breve, contribuindo para o conhecimento químico da espécie e, talvez, para a farmacologia do câncer.

5.2.2. Fracionamento de AFM e isolamento da rutina

A partição do extrato EX2903 entre DCM e a mistura MeOH:H₂O resultou na obtenção de AFD (fração ativa) e AFM (inativa), verificando-se em ambas a presença de flavonóides.

Com a finalidade de contribuir para o conhecimento químico da espécie *P. adiantoides*, a fração inativa também foi fracionada visando o isolamento de substâncias. Cerca de 1,6 g de AFM foram fracionados por CCCAV resultando em 28 frações. As frações 18 e 19 foram agrupadas por apresentarem mesmo perfil em CCD e CLAE, fornecendo uma nova fração (AF18/19) com massa de 81 mg. No fracionamento de AF18/19 por CLAE semi-preparativa em fase reversa ODS foram obtidas 8 frações. A fração 7 apresentou apenas uma mancha na placa de CCD de sílica e seu perfil por CLAE mostrou que a substância estava pura.

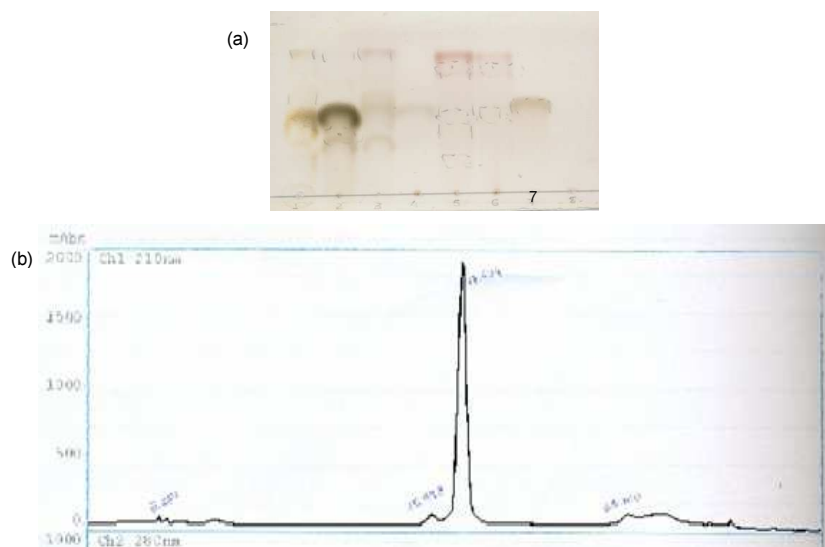
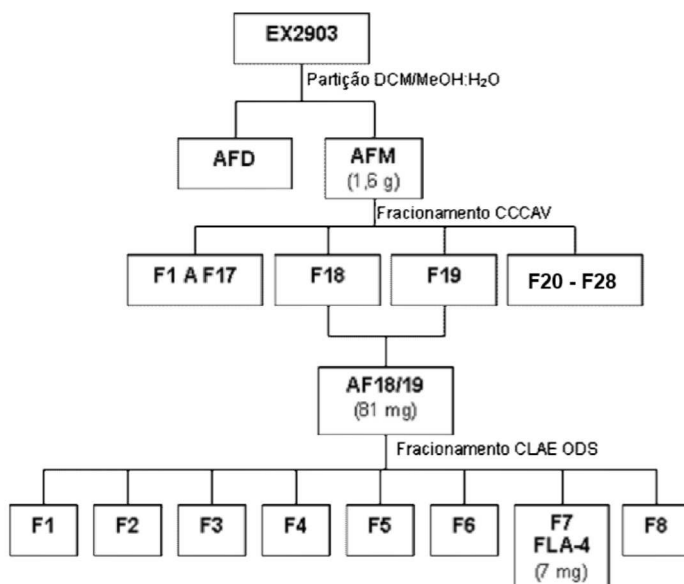
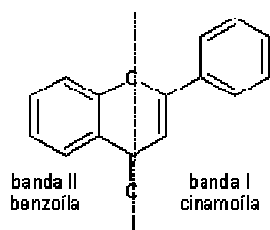


FIGURA 42 – (a) Imagem digitalizada da placa de CCD (sílica): AcOEt:MeOH:H₂O:CH₃COOH (6,5:1,5:1,5:2,0) revelada com vanilina/H₂SO₄, das frações obtidas por CLAE. (b) Cromatograma da fração 7: coluna ODS, 240 nm, 10-35% ACN :0,01% TFA em 20 min + 35-100% em ACN :0,01% TFA 5 min

ESQUEMA 5 – Fracionamento de AFM e obtenção de um flavonóide (FLA-4)**5.2.2.1. Análise dos espectros de UV de FLA-4**

O espectro de UV-VIS de flavonóides inclui duas bandas de absorção. A banda I é encontrada na região de comprimento de onda (λ) que varia de 210 a 350 nm para as flavonas, enquanto nos flavonóis é encontrada entre $\lambda_{350-385}$ nm. A banda II, encontrada na faixa de $\lambda_{250-290}$ nm, é muito semelhante entre os diversos subgrupos de flavonóides. Em isoflavonas e diidroflavonóis, a banda I é reduzida a um ombro que absorve entre $\lambda_{300-330}$ nm, sendo a banda II ($\lambda_{277-295}$ nm) a banda principal (Tsimogiannis et al., 2007). A banda I é característica de absorção devido ao grupo cinamoila enquanto a banda II é característica do grupo benzoíla (Fig.43).

**FIGURA 43 – Localização das bandas de absorção de UV-VIS em flavonas**

O deslocamento das absorções das bandas I e II, causado pela adição de reagentes, é um dos métodos mais utilizados em estudos de flavonóides. O protocolo descrito por Mabry e colaboradores (1970) é utilizado para propor os locais de hidroxilação na genina, sendo uma ferramenta muito útil no processo de elucidação estrutural. A figura 44 mostra o espectro de FLA-4 em MeOH e os espectros obtidos com os reagentes de deslocamento ..

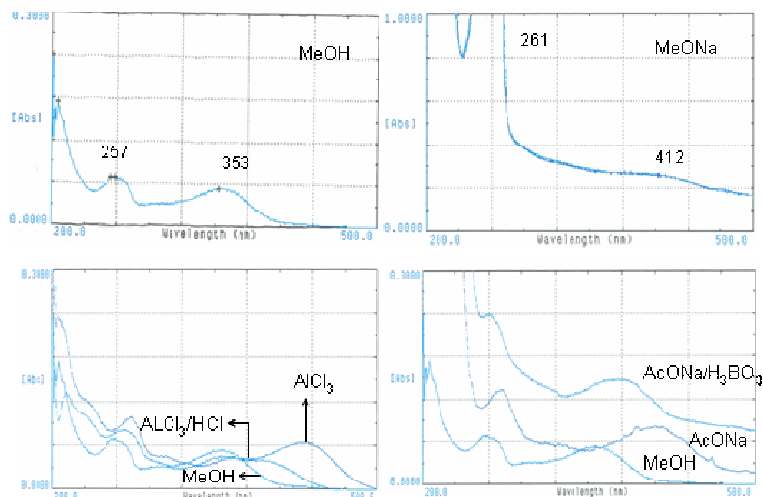


FIGURA 44 – Espectros de UV-VIS de FLA-4, varredura de 200 a 500 nm

TABELA 10 – Dados de UV de FLA-4

	λ_{max} , nm
MeOH	257, 353
MeONa	261, 412
AlCl ₃	273, 434
AlCl ₃ /HCl	267, 364
AcONa	270, 410
AcONa/H ₃ BO ₃	260, 378

O espectro de FLA-4 em MeOH mostrou máximo de absorção da banda I em 353 nm e da banda II em 257 nm. A presença de hidroxilas livres em C-3 e C-4' torna a solução instável após a adição de NaOMe, causando degeneração do espectro em poucos minutos. Como não ocorreu a degeneração do espectro após 5 minutos, foi possível concluir que essa substância era um flavonol 3-O-substituído (Mabry et al., 1970). O deslocamento batocrômico de cerca de 60 nm, sem

diminuição da intensidade da banda, com a adição de MeONa indicou a presença de OH livre na posição 4'.

A adição de AlCl_3 a flavonas e flavonóis que contenham grupos OH em C-3 ou C-5 forma complexos ácidos estáveis. Já em flavonóides com grupos *orto*-diidroxí ocorre a formação de complexos ácidos lábeis. Os complexos formados entre grupos *orto*-diidroxí dos anéis A e B decompõem na presença de ácido. Em contraste, o complexo formado entre AlCl_3 e o grupo ceto em C-4 e os grupos hidroxila em C-3 ou C-5 é estável na presença do mesmo. O deslocamento batocrômico das duas bandas com a adição de AlCl_3 e a parcial recuperação após adição de HCl indicaram a presença de hidroxila quelatogênica em C-5 e de um grupo *orto*-diidroxí no anel B.

O acetato de sódio é uma base mais fraca que NaOMe e ioniza somente hidroxilas mais ácidas, como por exemplo, C-3, C-7 e C-4'. A adição de NaOAc provocou deslocamento batocrômico das duas bandas, indicando hidroxilas livres em C-7 e C-4'. A presença do grupo *orto*-diidroxí no anel B foi reforçada pela observação de deslocamento batocrômico de 25 nm da banda I e deslocamento hipsocrômico da banda II com a adição de ácido bórico.

A comparação desses dados com dados da literatura sugeriram que a substância FLA-4 era a rutina (Mabry et al., 1970). A comparação por CCD e CLAE de FLA-4 e rutina aumentaram a evidência de que eram a mesma substância.

5.2.2.2. Análise dos espectros de RMN de FLA-4 e identificação da rutina

O isolamento de um flavonóide está sendo descrito pela primeira vez para a espécie *P. andiantoides*, espécie da família Fabaceae, que é reconhecidamente fonte dessa classe de produtos naturais.

Os dados de RMN obtidos foram comparados com os dados obtidos para a rutina na tese de Ribeiro (1999). O espectro de RMN de ^{13}C , apesar da pureza da amostra e massa de 7 mg, não foi obtido, portanto, os carbonos não-hidrogenados não puderam ser determinados.

Nos espectros de RMN de ^1H (anexo 23) e mapa de contorno ^1H - ^1H COSY (anexo 28) os dupletos em δ 6,20 e 6,39 Hz, com constante de acoplamento (J 2,0 Hz) característica de posição *meta*, indicaram um padrão de substituição 5,7 para o anel A do flavonóide. O duplete em δ 6,85 (J 8,0 Hz), o duplete duplo em δ 7,54 (J

1,7 e 8,0 Hz), parcialmente superposto por um simpleto em 7,54, definiu o sistema ABX para os três átomos de hidrogênio do anel B, atribuídos a H'-5, H'-6 e H'-2 respectivamente. Assim o padrão de substituição 3,5,7,3',4' identificado, aliado aos dados do espectro de UV, permitiram deduzir que a aglicona da substância é a quercetina.

No espectro de RMN de ^1H e nos mapas de contorno desse glicosídeo foi possível observar duplete em δ 5,35 (J 7,3 Hz) atribuído ao hidrogênio anomérico do açúcar interno (glicose). A constante de acoplamento observada para $J_{1''-2''}$ (cerca de 8 Hz) indicou a configuração β para H-1''. O outro duplete em δ 4,39 (J 1,0 Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade de açúcar terminal (ramnose). A constante de acoplamento de 1 Hz indicou a configuração α para o H-1''' do flavonóide. O duplete correspondente a três átomos de hidrogênio em δ 0,95 (J 6,0 Hz) indicou a presença de ramnose na porção sacarídica da molécula (Mabry et al., 1970)

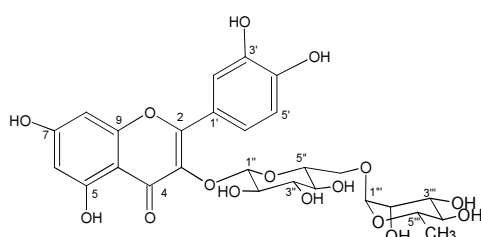


TABELA 11 – Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de FLA-4 e rutina¹

H	RUTINA ¹	FLA-4
	δ (mult., J Hz)	δ (mult., J Hz)
6	6,20 (d, 2,0)	6,20 (d, 2,0)
8	6,39 (d, 2,0)	6,39 (d, 2,0)
2'	7,53 (s)	7,54 (s)
5'	6,84 (d, 8,0)	6,85 (d, 8,0)
6'	7,54 (dd, 2,1 e 8,0)	7,54 (dd, 1,7 e 8,0)
Gli		
1''	5,34 (d, 7,3)	5,35 (d,7,3)
2'' a 6''	3,00-3,30 (m)	3,00-3,60 (m)
Ram		
1'''	4,38 (d, 1,0)	4,39 (d, 1,0)
2''' a 5'''	3,00-3,30 (m)	3,00-3,60 (m)
6'''	0,99 (d, 6,1)	0,95 (d, 6,0)

¹ (Ribeiro, 1999); Glc=glicose; Ram=ramnose

A atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C foram feitas para os carbonos hidrogenados mediante análise do subespectro DEPT 135 (anexos 24 e 25) e mapa de contorno HSQC (anexos 26 e 27), baseando-se nos deslocamentos da literatura.

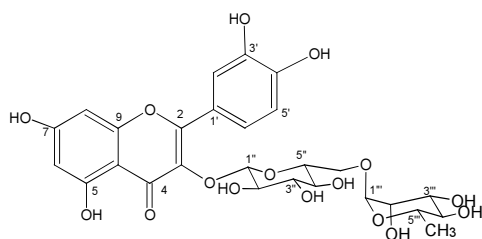


TABELA 12 – Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) de FLA-4 e rutina¹

C	DEPT 135	RUTINA ¹ [ppm]	FLA-4 [ppm]
2	C	156,29	Nd
3	C	133,19	Nd
4	C	177,25	Nd
5	C	161,10	Nd
6	CH	98,59	98,42
7	C	163,95	Nd
8	CH	93,47	93,32
9	C	156,49	Nd
10	C	103,85	Nd
1'	C	121,47	Nd
2'	CH	116,14	115,98
3'	C	144,63	Nd
4'	C	148,30	Nd
5'	CH	115,11	114,96
6'	CH	121,05	121,32
Glc			
1''	CH	101,60	100,93
2''	CH	73,96	73,85
3''	CH	76,33	76,20
4''	CH	71,73	71,57
5''	CH	75,79	75,66
6''	CH ₂	66,87	66,73
Ram			
1'''	CH	100,62	100,48
2'''	CH	70,25	70,28
3'''	CH	69,89	68,00
4'''	CH	70,44	70,28
5'''	CH	68,12	67,98
6'''	CH ₃	17,61	17,46

¹ (Ribeiro, 1999); nd=não determinado; Glc=glucose; Ram=ramnose

5.2.2.3. Análise da rotina por IES-EM

A fração 7 foi analisada por espectrométrica de massas com ionização por eletrospray. No espectro de massas no modo positivo foi possível observar o sinal do íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ 611 *m/z*. Esse íon foi isolado e fragmentado com bombardeamento de hélio originando, entre outros, os íons $[M+H]^+$ 465 e 303 *m/z*, correspondente à perda de fragmentos de 146 e 162 Da respectivamente, equivalente a uma ramnose e a uma glicose. O íon $[M+H]^+$ 465 *m/z* foi isolado e fragmentado, dando origem ao íon $[M+H]^+$ 303 *m/z* (genina, neste caso a quercetina), o que confirmou que a perda da hexose ocorre depois da perda da ramnose. A fragmentação de $[M+H]^+$ 465 *m/z* originou também o íon com *m/z* 447, o que corresponde à perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$. O íon $[M+H]^+$ 303 *m/z* foi aprisionado e, então, fragmentado, originando os íons *m/z* 285, 257 229, correspondentes a perda de 1 molécula de água e duas descarboxilações, respectivamente. O íon *m/z* 165 é formado pela clivagem do anel C. Esse perfil de fragmentação está de acordo com o proposto na literatura por Tsimogiannis e colaboradores (2007).

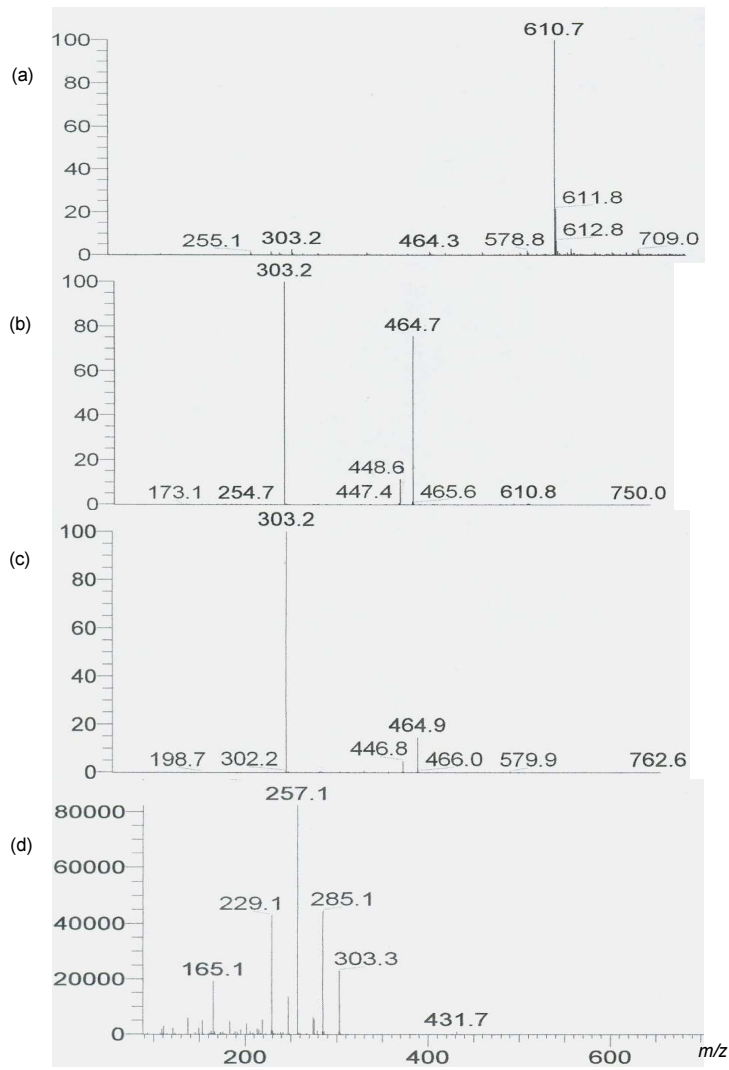


FIGURA 45 – Espectros de IES-EM, modo positivo, da rutina. (a) *full* espectro da rutina; (b) fragmentação de 611 *m/z*; (c) fragmentação de 465 *m/z*; (d) fragmentação de 303 *m/z*

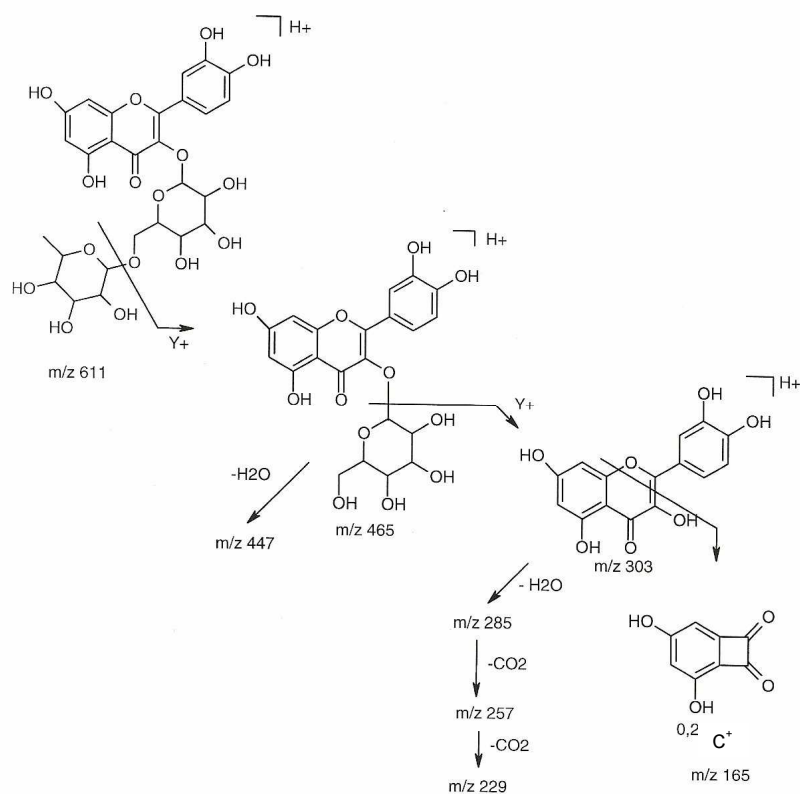


FIGURA 46 – Esquema da fragmentação da rutina por IES-EM (modo positivo)

No espectro de massas no modo negativo foi possível observar o pico do íon *quasi*-molecular [M-H]⁻ 609 m/z. Esse íon se fragmenta dando origem ao íon [M-H]⁻ 591 m/z, correspondente à perda de uma molécula de água. O íon principal formado na fragmentação de [M-H]⁻ é o de 463 m/z, correspondente à perda de uma molécula de ramnose (- 146 Da). O íon [M-H-ram]⁻ foi isolado e fragmentado, dando origem os íons 343, 301, 300 m/z, correspondentes à fragmentação ^{0,2}X⁻ da glicose, à perda da glicose e à formação do ânion radical (Y-H)^{•-}, respectivamente. O sinal em 301 m/z corresponde à genina (quercetina) e sua fragmentação originou os íons 271 e 151 m/z, correspondentes à perda do fragmento CH₂O e à quebra do anel C (^{1,3}C⁻). Esses valores corroboram a proposta de fragmentação no modo positivo,

apresentando íons com duas unidades de massa a menos. Além disso, o perfil de fragmentação da quercetina está muito semelhante ao proposto por Tsimogiannis e colaboradores (2007).

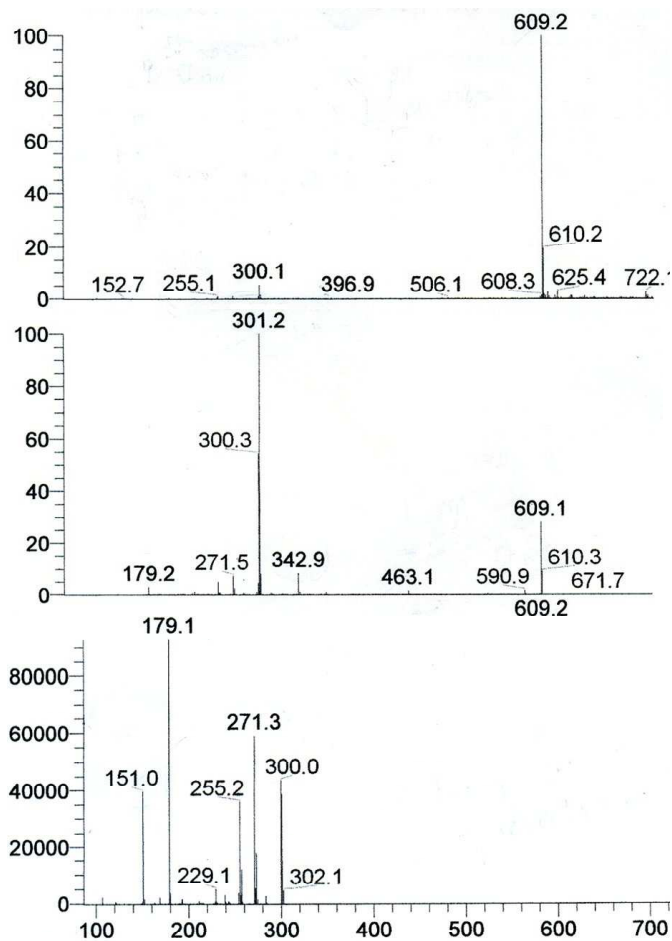


FIGURA 47 – Espectros de IES-EM, modo negativo, da rutina. (a) *full* espectro rutina (b) fragmentação de 609 m/z ; (c) fragmentação de 301 m/z

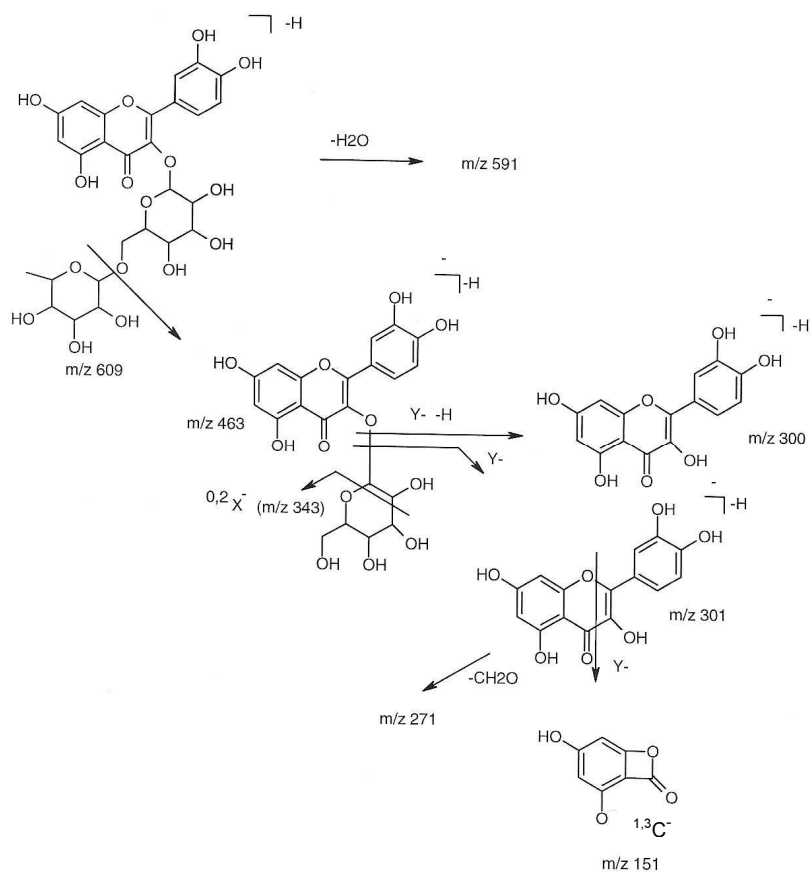


FIGURA 48 – Esquema da fragmentação da rutina por IES-EM (modo negativo)

A comparação dos dados de RMN obtidos para FLA-4 com aqueles obtidos por Ribeiro (1999), bem como a análise dos dados dos espectros obtidos por IES-EM permitiu a identificação da substância como sendo a quercetina-3-O-[O-(1,6)-D-ramnopiranosil]-D-glicopiranosídeo, conhecida como rutina.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O estudo químico das duas espécies vegetais forneceu substâncias ativas a partir dos extratos brutos detectados no programa de Bioprospecção da Flora Mineira e Desenvolvimento de Novas Drogas. Foi demonstrado que para a espécie *Pittosporum undulatum* as saponinas foram responsáveis pela atividade biológica tanto para as três linhagens de células tumorais como também para formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Entretanto, o efeito citotóxico inespecífico de saponinas já é conhecido sendo necessário averiguar a toxicidade potencial das saponinas de *P. undulatum* para células humanas normais. Para a espécie *P. adiantoides* foi demonstrado que os flavonóides menos polares são os responsáveis pelas atividades biológicas observadas uma vez que aquele isolado da fração mais polar (rutina) foi inativo. Por ser uma classe de produtos naturais que apresenta grande diversidade de potencial biológico e pouca toxicidade para células humanas normais, este resultado é potencialmente promissor. Sendo assim urgente a reinvestigação dessa planta objetivando o isolamento e a determinação estrutural desses flavonóides.

Apesar de extremamente complexa, a análise dos dados de espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM) e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C permitiram a elucidação estrutural de duas sapogeninas de uma mistura como sendo o (3 β ,15 β ,16 β ,21 β ,22 β)-21-(acetiloxi)-3, 15, 16, 28-tetraidroiolean-12-en-22-il 2-metilbutanoato e o (3 β ,15 β ,16 β ,21 β ,22 β)-21-(acetiloxi)-3,15,16,28-tetraidroiolean-12-en-22-il 3-metilbut-2-enoato. Além disso, a análise dos dados obtidos por IES-EM permitiu propor diversas estruturas para as saponinas que constituem a mistura bioativa. Entretanto o isolamento de cada uma das substâncias é necessário para a obtenção dos dados de RMN e determinação da seqüência dos açúcares que constituem os glicosídeos.

Esta é a primeira vez que são descritas sapogeninas derivadas de R₁-barrigenol esterificadas em C-21 e C-22 para a espécie *P. undulatum*. Esse é o primeiro trabalho de investigação química e biológica da espécie *P. adiantoides*. O isolamento da rutina vem contribuir para o conhecimento químico da espécie, bem como mostrar nova fonte desse flavonóide. Além disso, a detecção de atividade

citotóxica mostra o potencial farmacológico da espécie, fornecendo subsídio para sua conservação e estudo.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

7.1. Referentes à *Pittosporum undulatum*

- Determinar a porção glicosídica das saponinas ativas de ALS;
- Determinar a CI_{50} e CL_{50} de cada saponina isolada para as linhagens de células tumorais e amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*, respectivamente;
- Elucidar o mecanismo de ação citotóxica das substâncias isoladas para as células tumorais e para o parasito da leishmaniose.

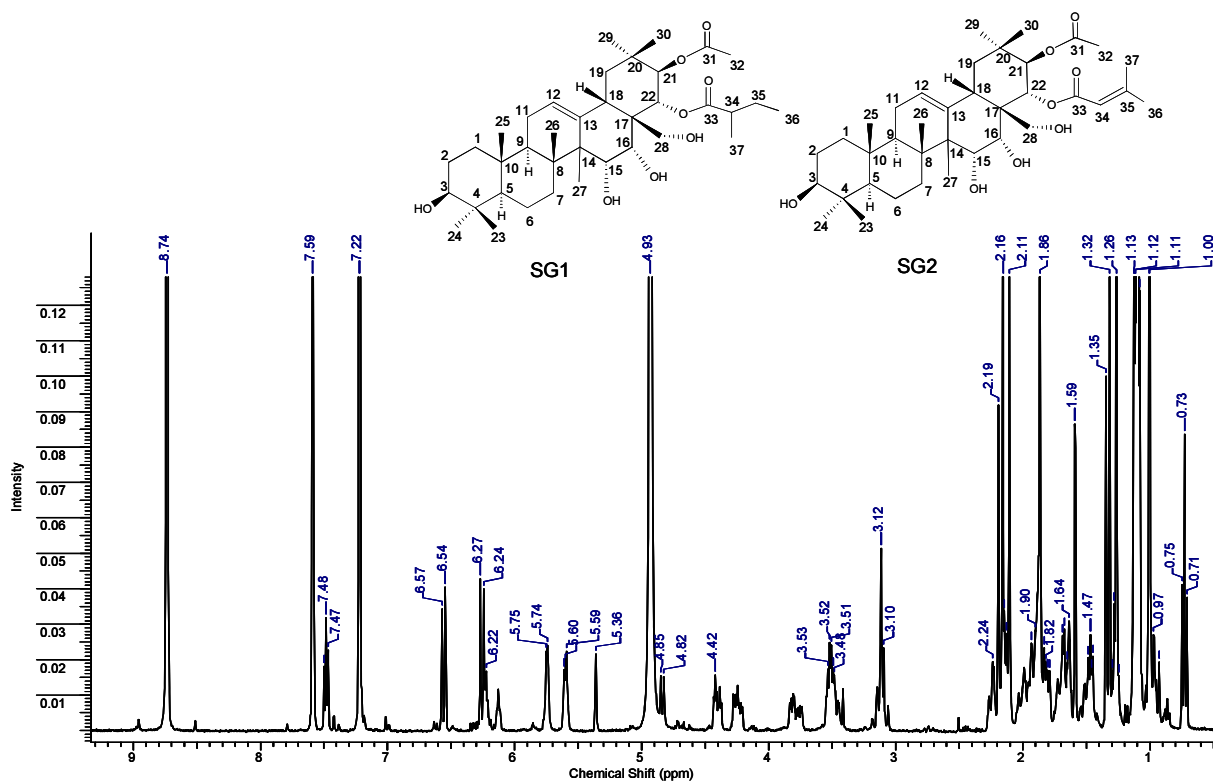
7.2. Referentes à *Piptadenia adiantoides*

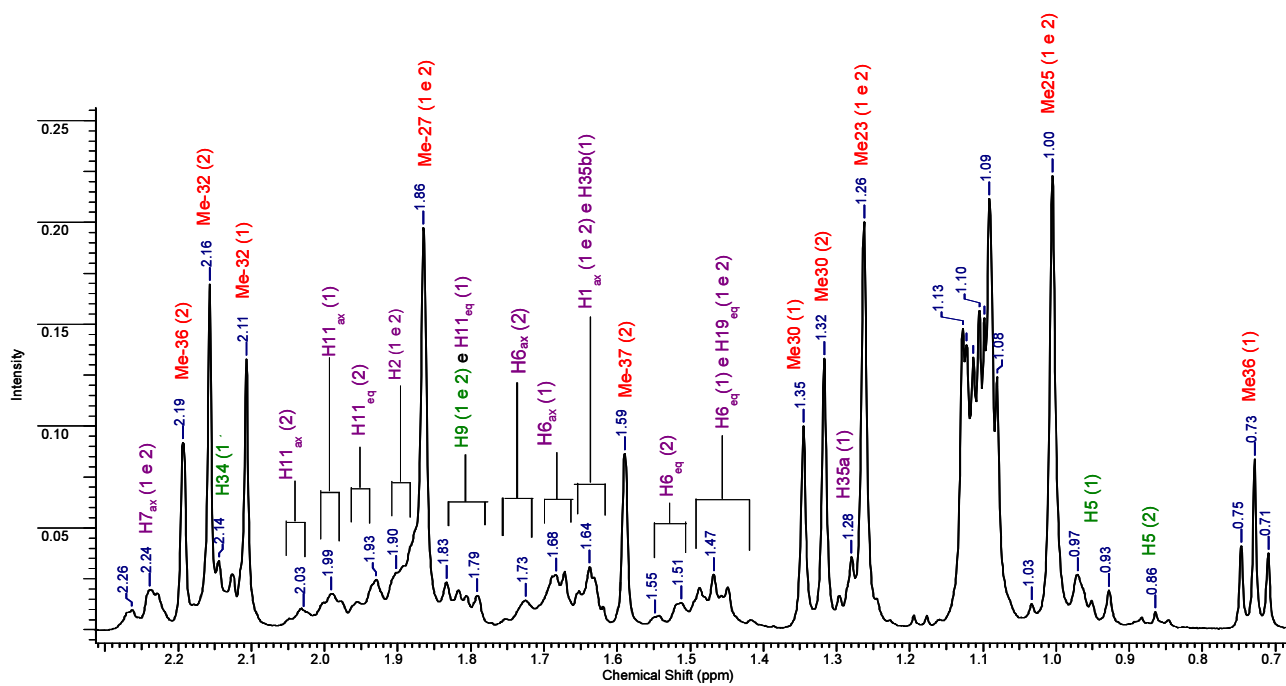
- Isolar em maior quantidade e identificar os flavonóides ativos;
- Determinar a CI_{50} dos flavonóides para as linhagens de células tumorais;
- Elucidar o mecanismo de ação citotóxica das substâncias isoladas para as células tumorais.

7.3. Referente aos demais ensaios biológicos citados

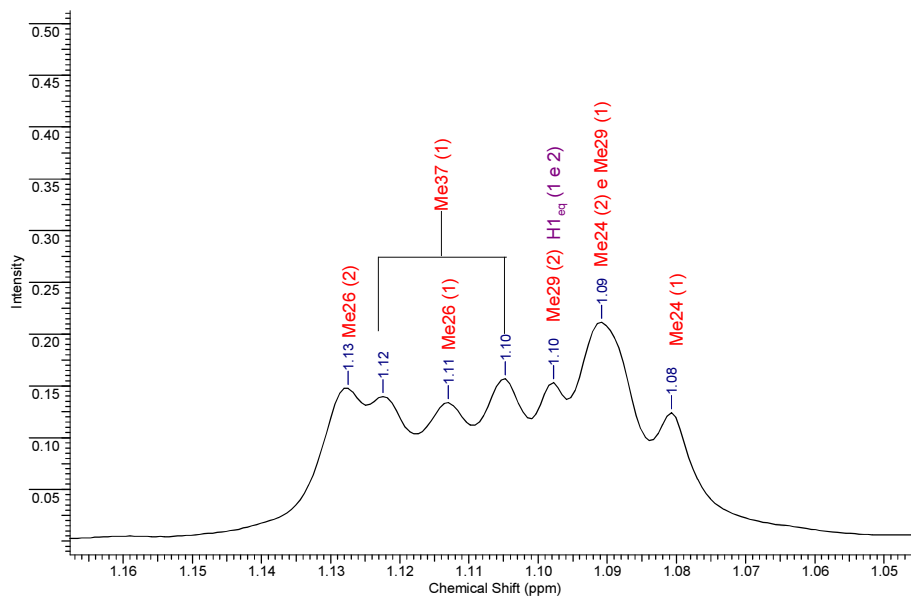
- Submeter todas as substâncias isoladas aos demais ensaios biológicos disponíveis no IRR:
 - Inibição da enzima tripanotiona redutase;
 - Inibição da proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano;
 - Toxicidade para formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

ANEXOS

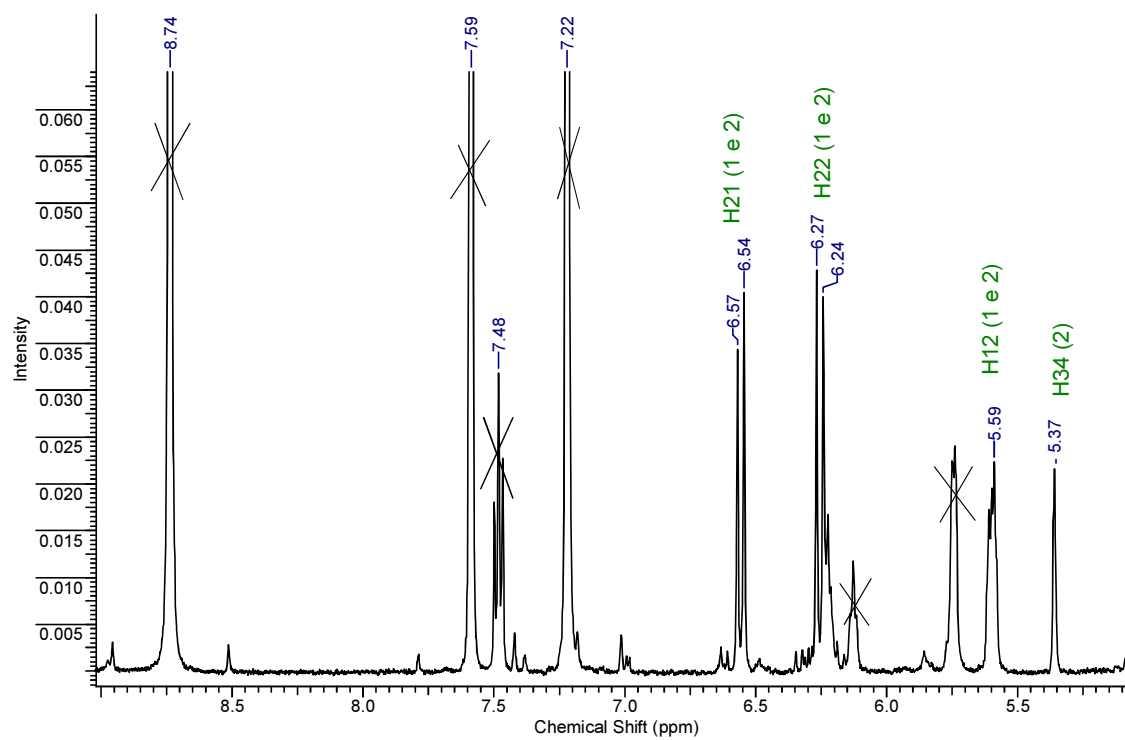
ANEXO 1 – Espectro de RMN de ^1H (piridina, 400 MHz) de ALG



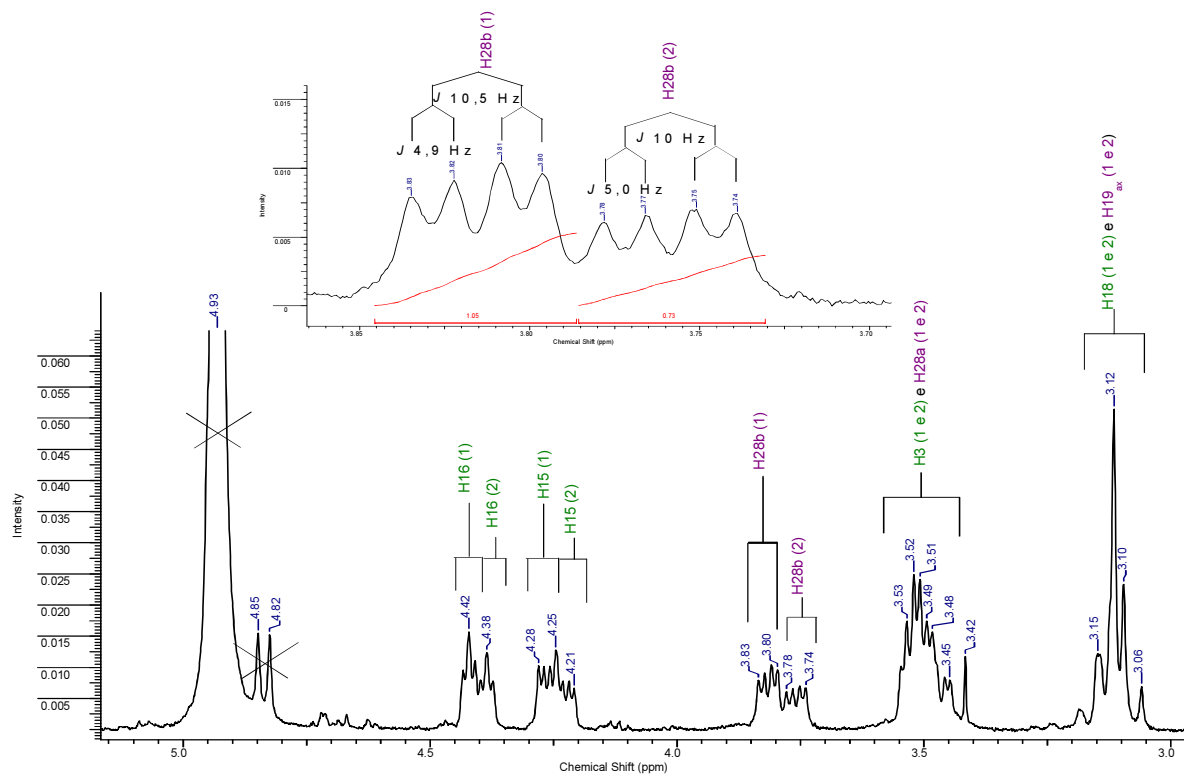
ANEXO 2 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)



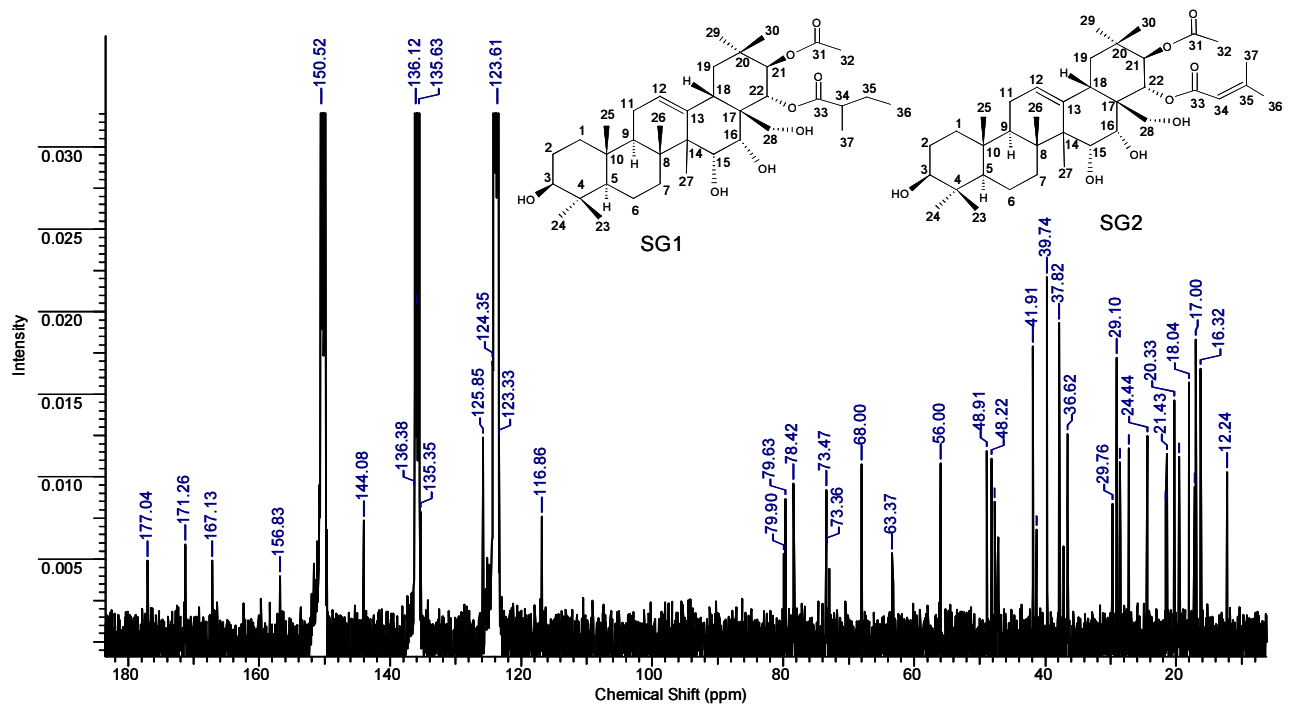
ANEXO 3 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 400 MHz)



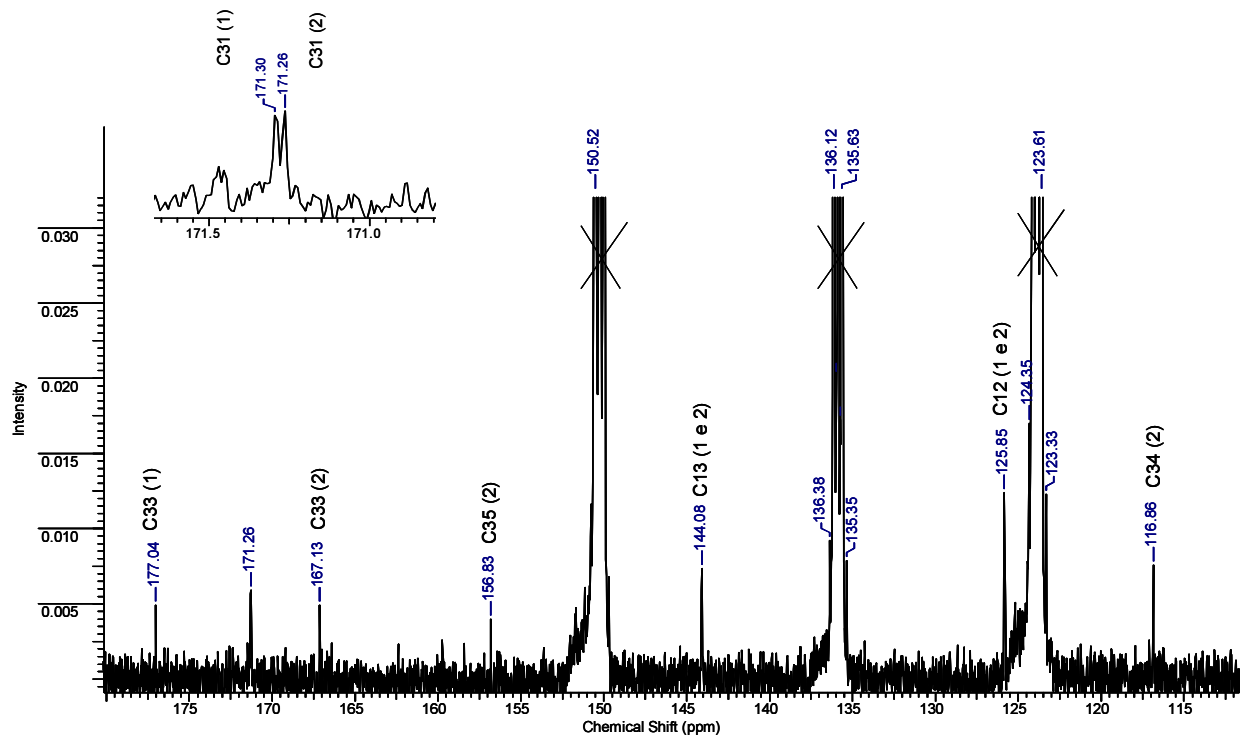
ANEXO 4 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 100 MHz)

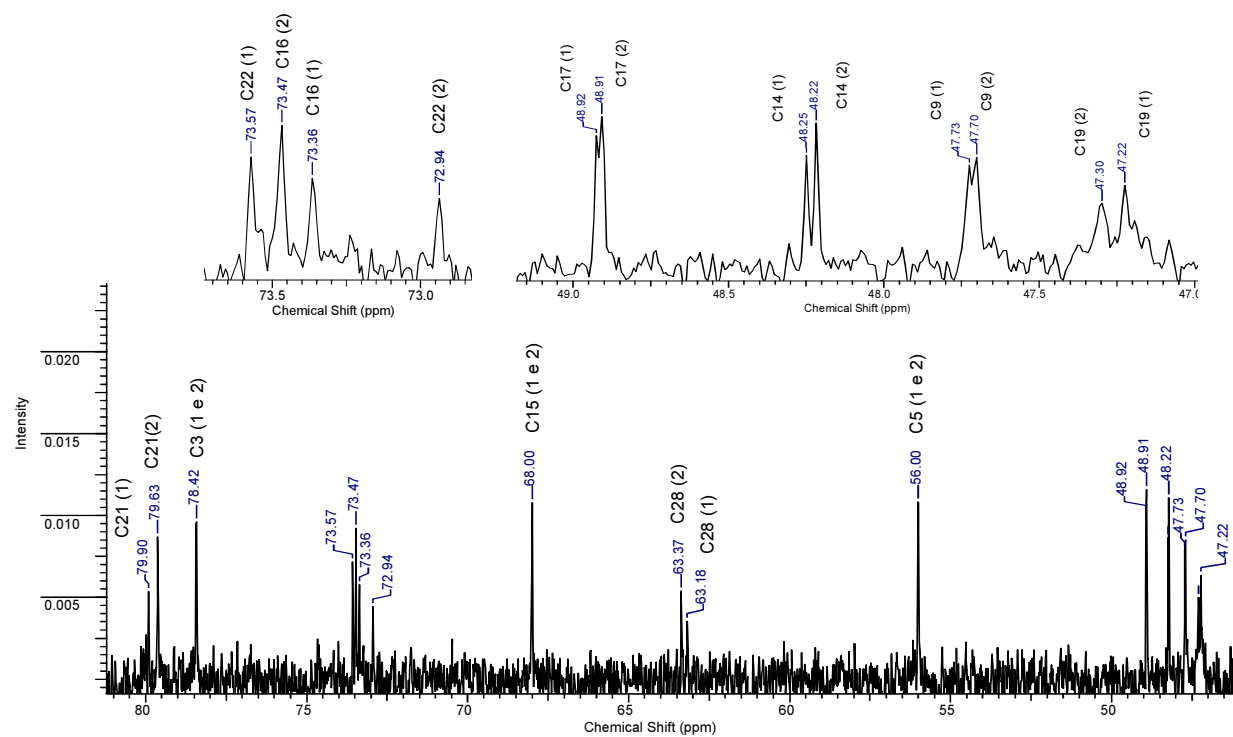


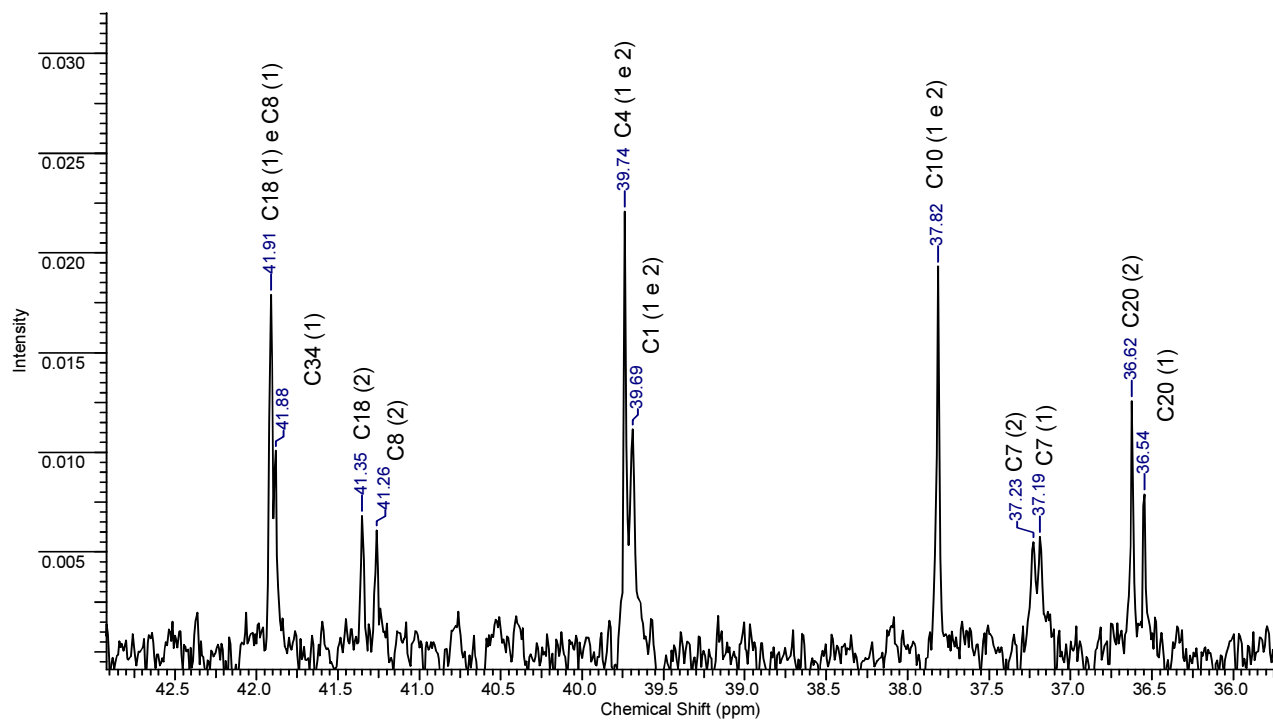
ANEXO 5 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de ALG (piridina, 100 MHz)



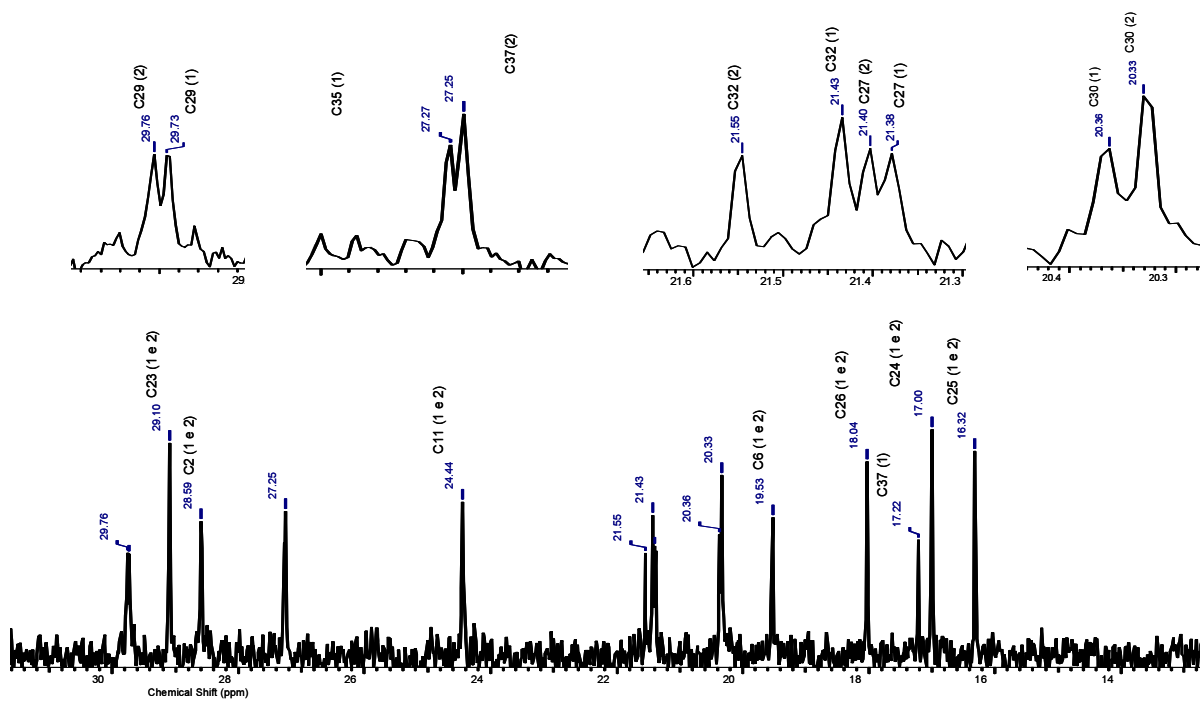
ANEXO 6 – Espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)

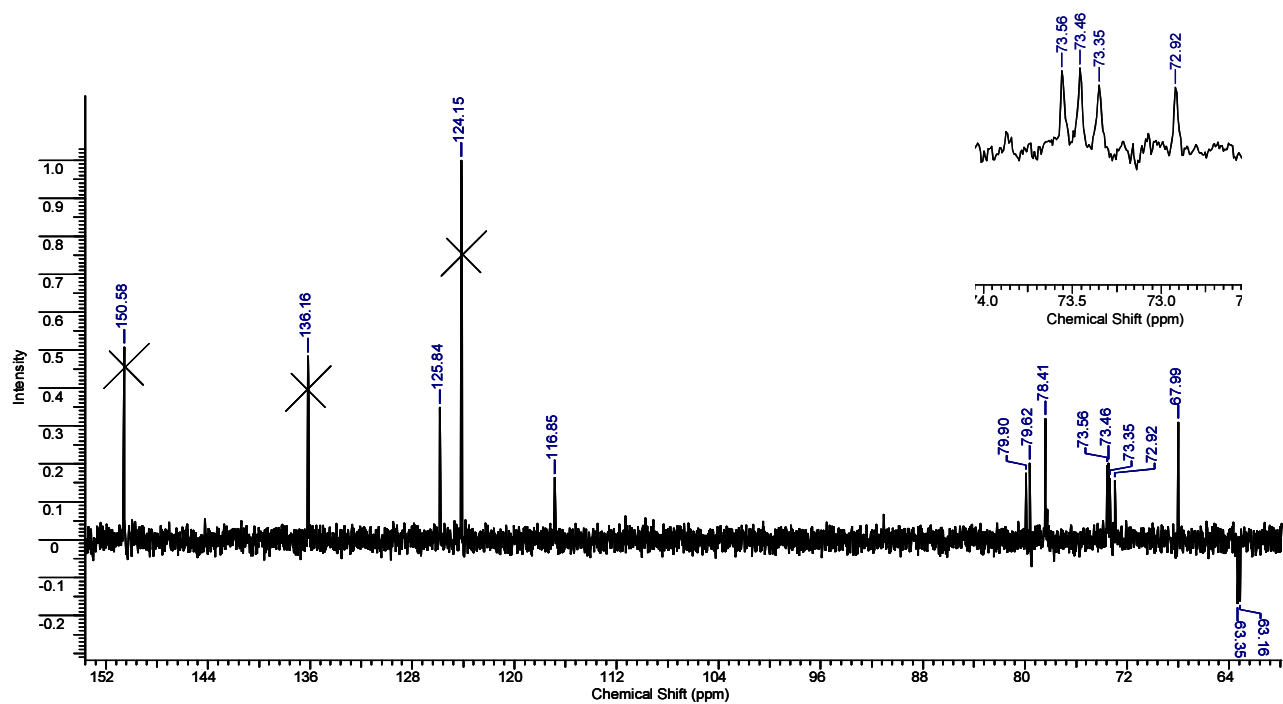
ANEXO 7 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz z)

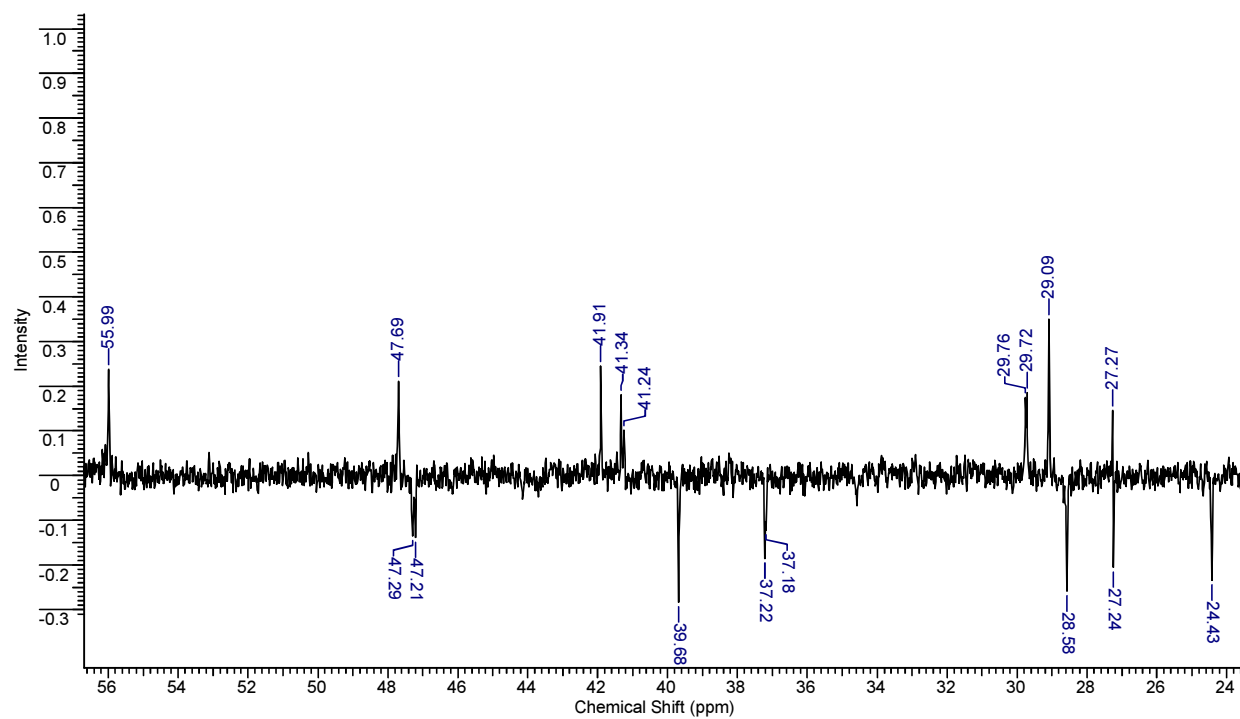
ANEXO 8 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MHz)



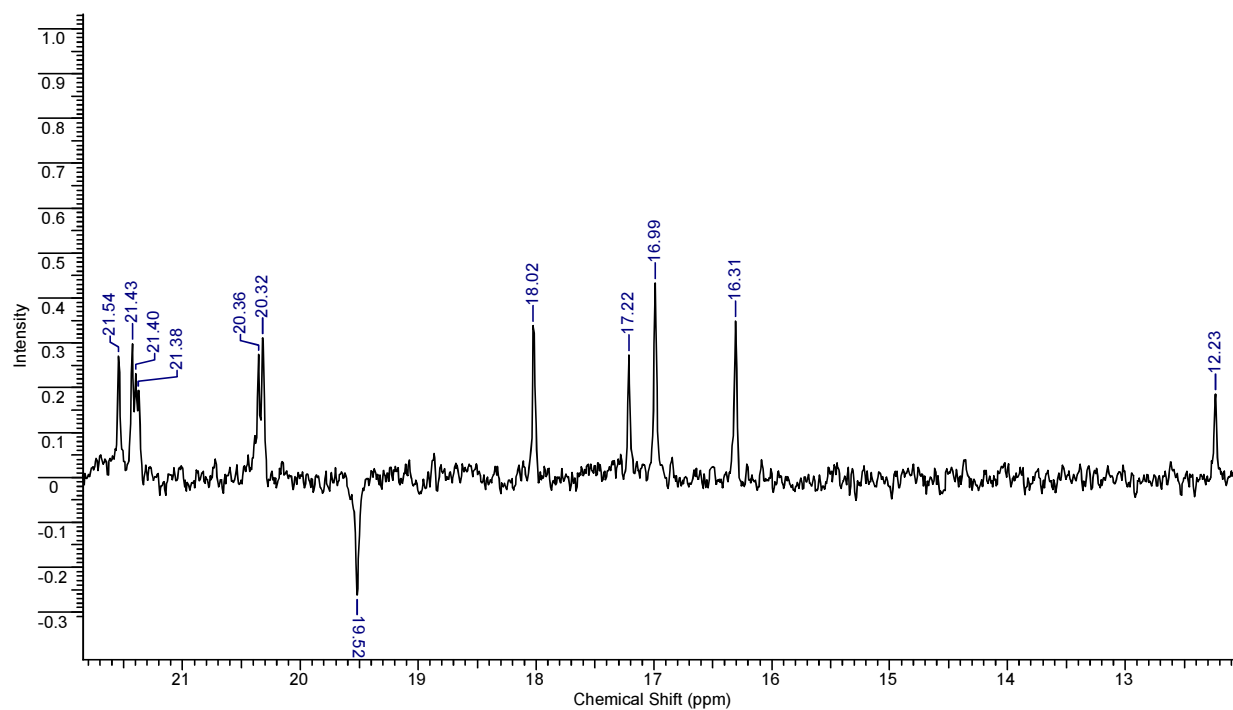
ANEXO 9 – Expansão do espectro de RMN de ¹³C de ALG (piridina, 100 MHz)

ANEXO 10 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de ALG (piridina, 100 MH z)

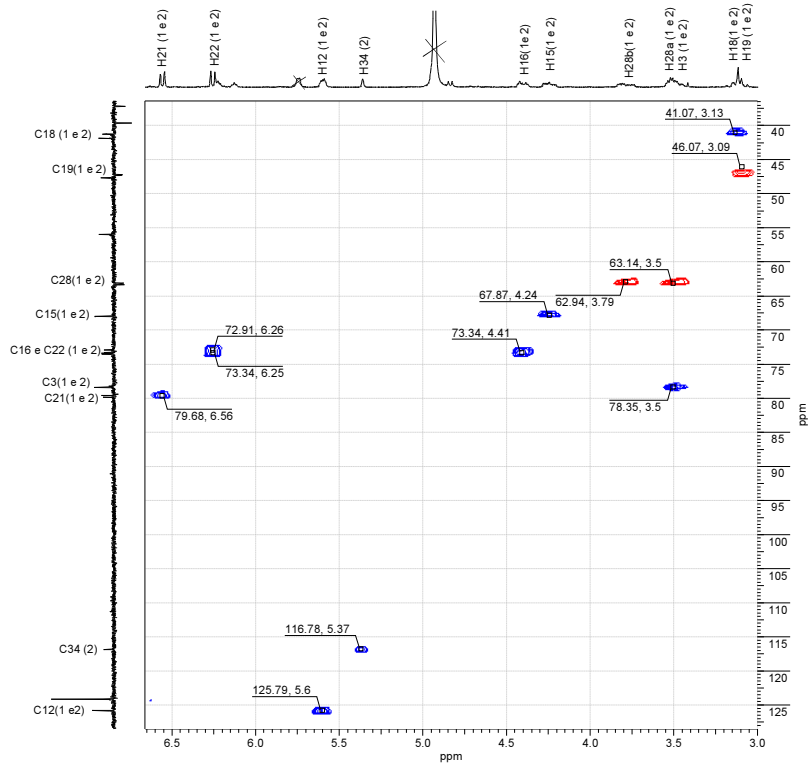
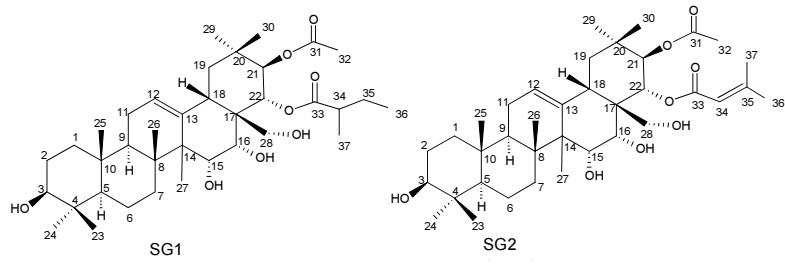
ANEXO 11 – Espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)



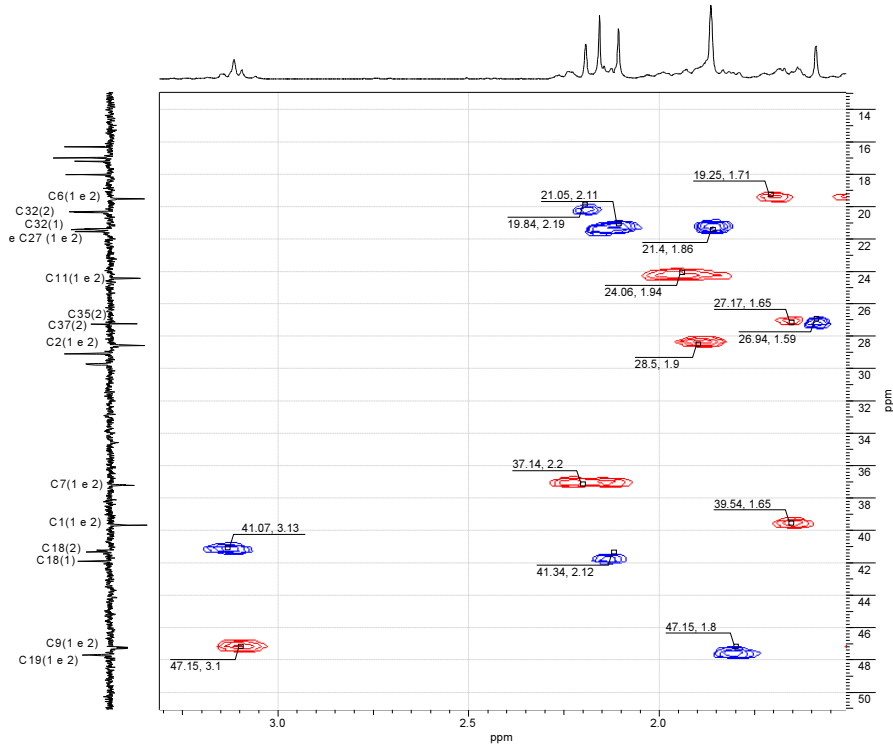
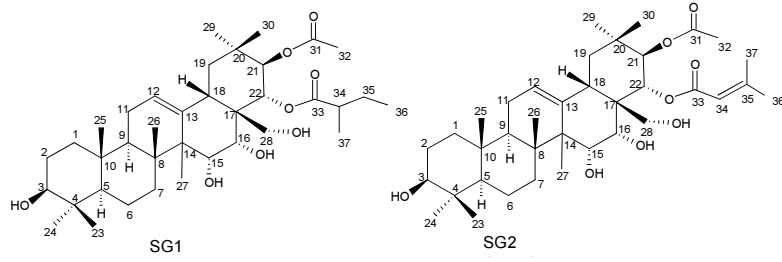
ANEXO 12 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)



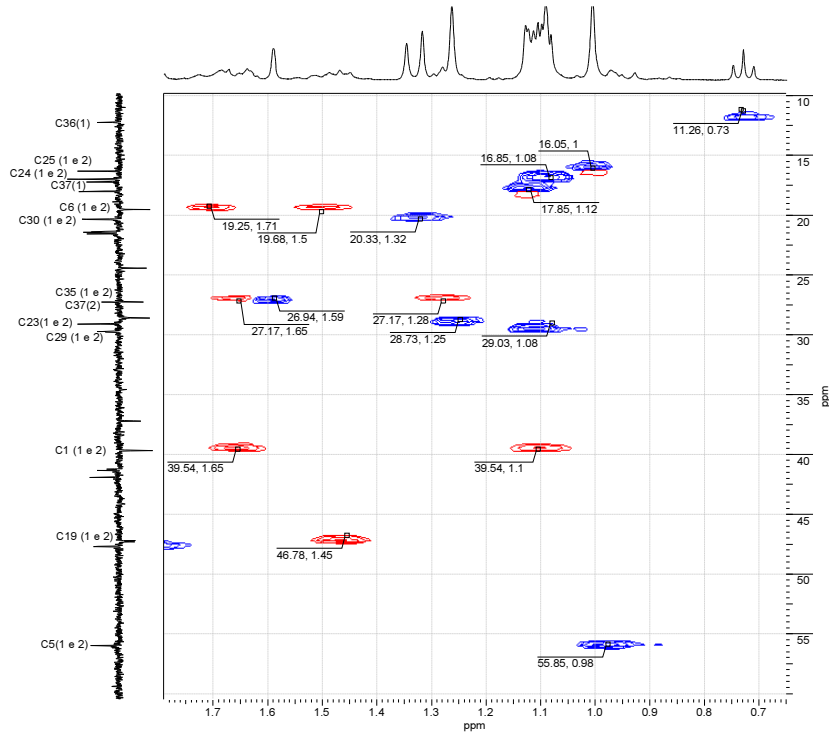
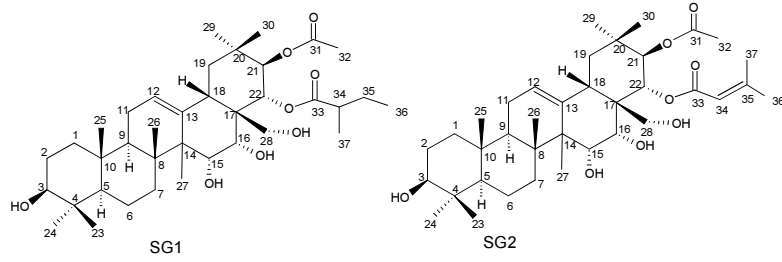
ANEXO 13 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (Dept) de ALG (piridina, 100 MHz)



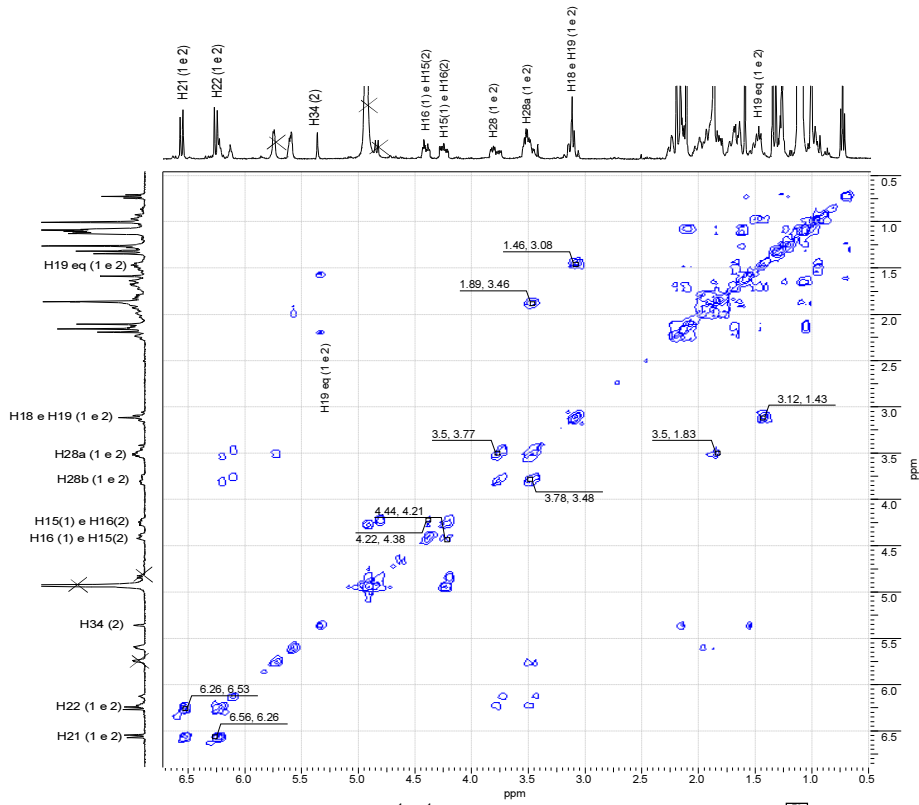
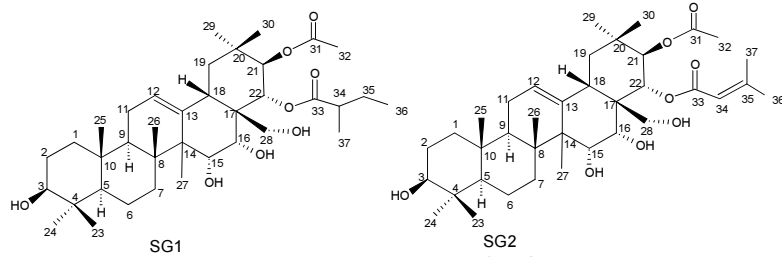
ANEXO 14 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).



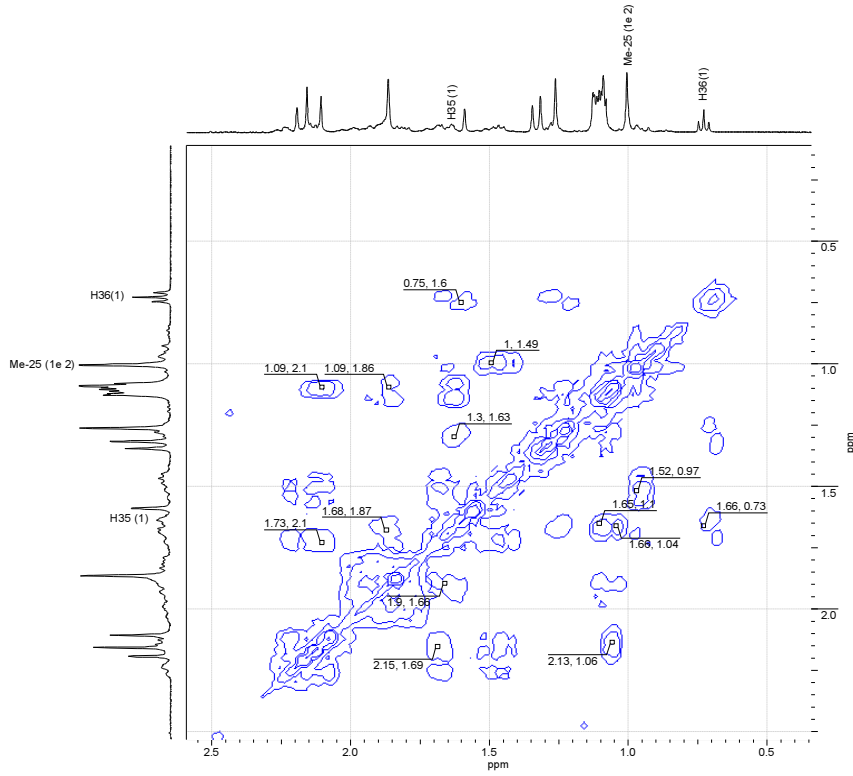
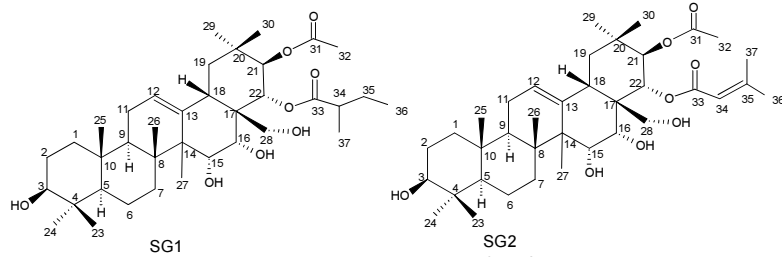
ANEXO 15 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).




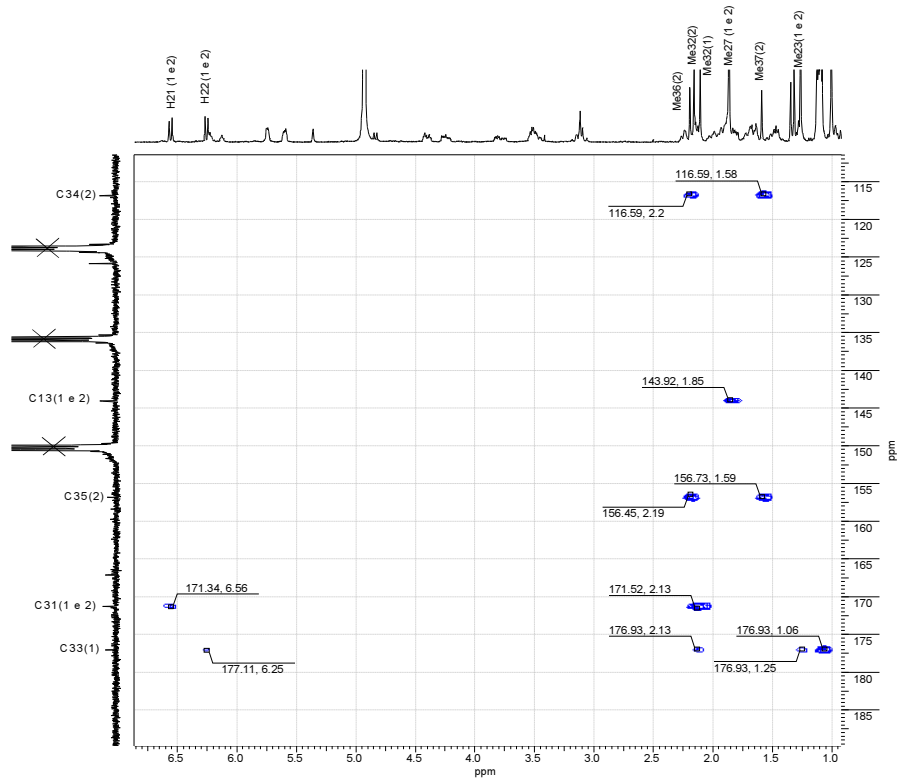
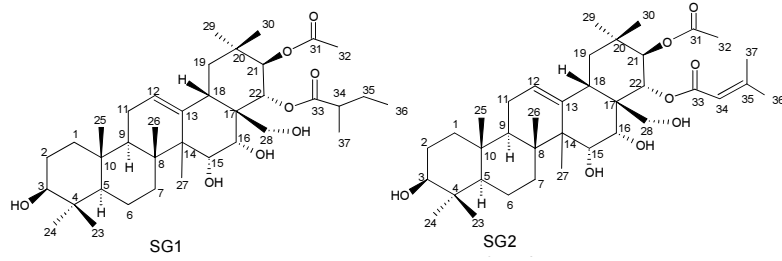
ANEXO 16 – Mapa de contorno HSQC de ALG (piridina, 400 MHz ¹H e 100 MHz ¹³C).



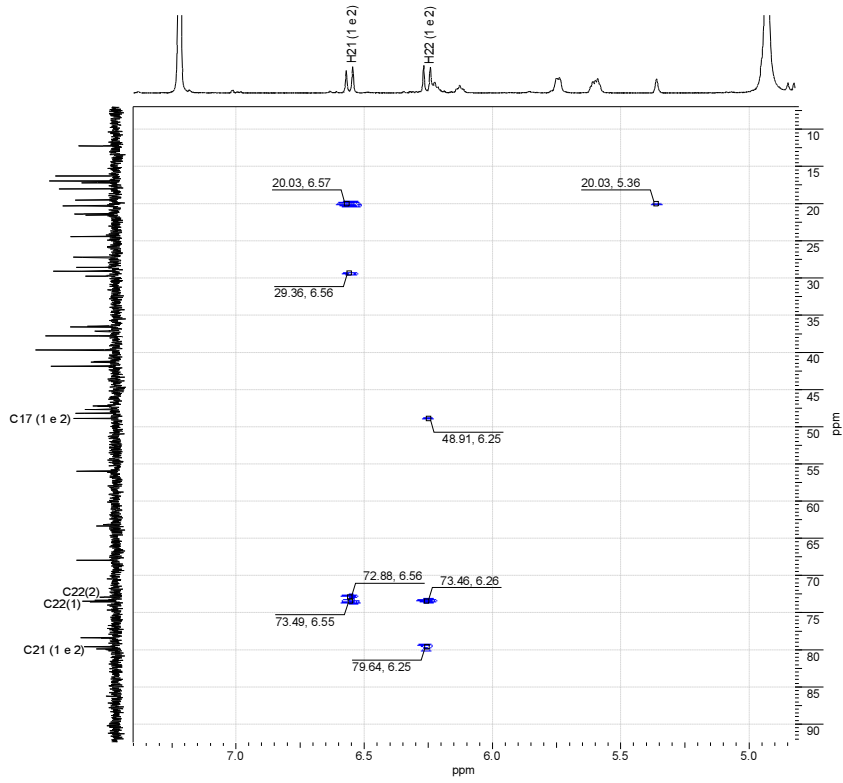
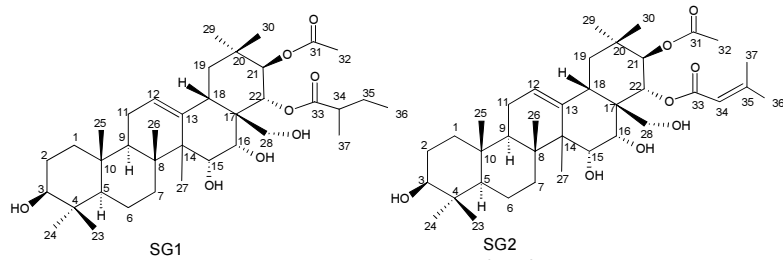
ANEXO 17 – Mapa e contorno (^1H - ^1H COSY) de ALG (piridina, 400 MHz). ^1H



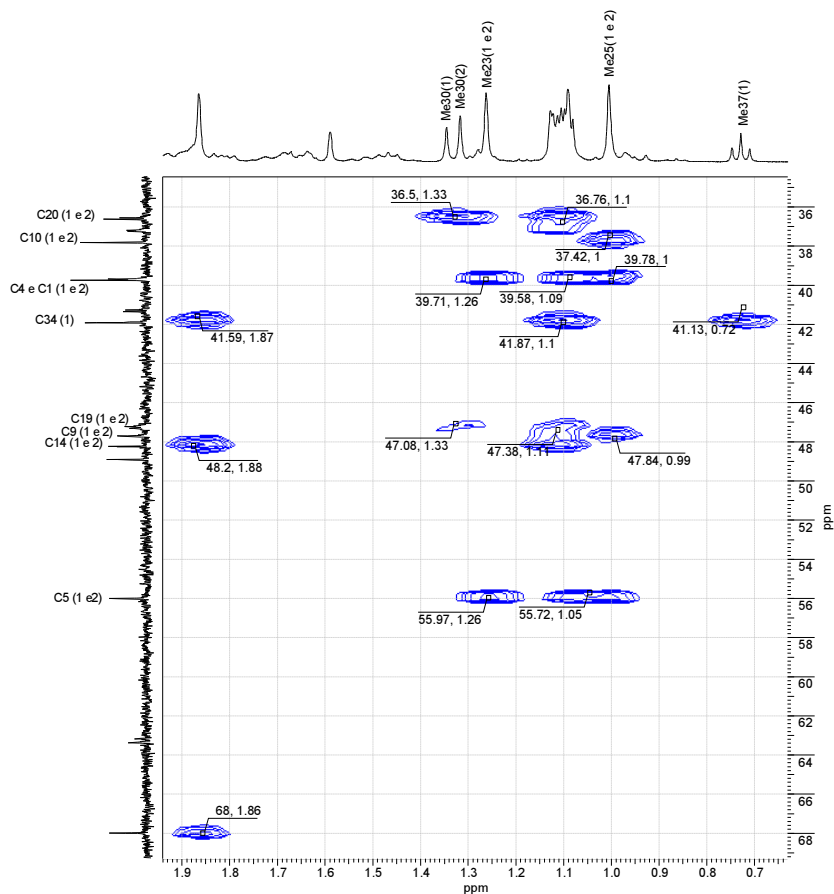
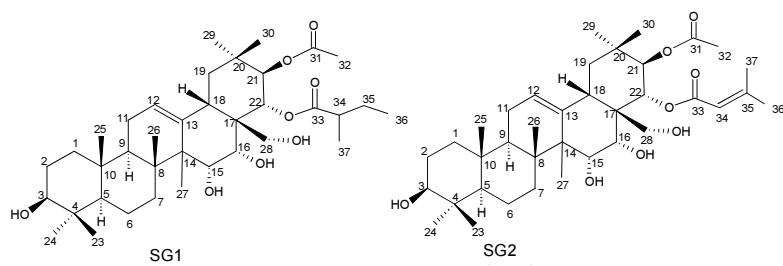
ANEXO 18 – Expansão do mapa de contorno (^1H - ^1H COSY) de ALG (piridina, 400 MHz). 



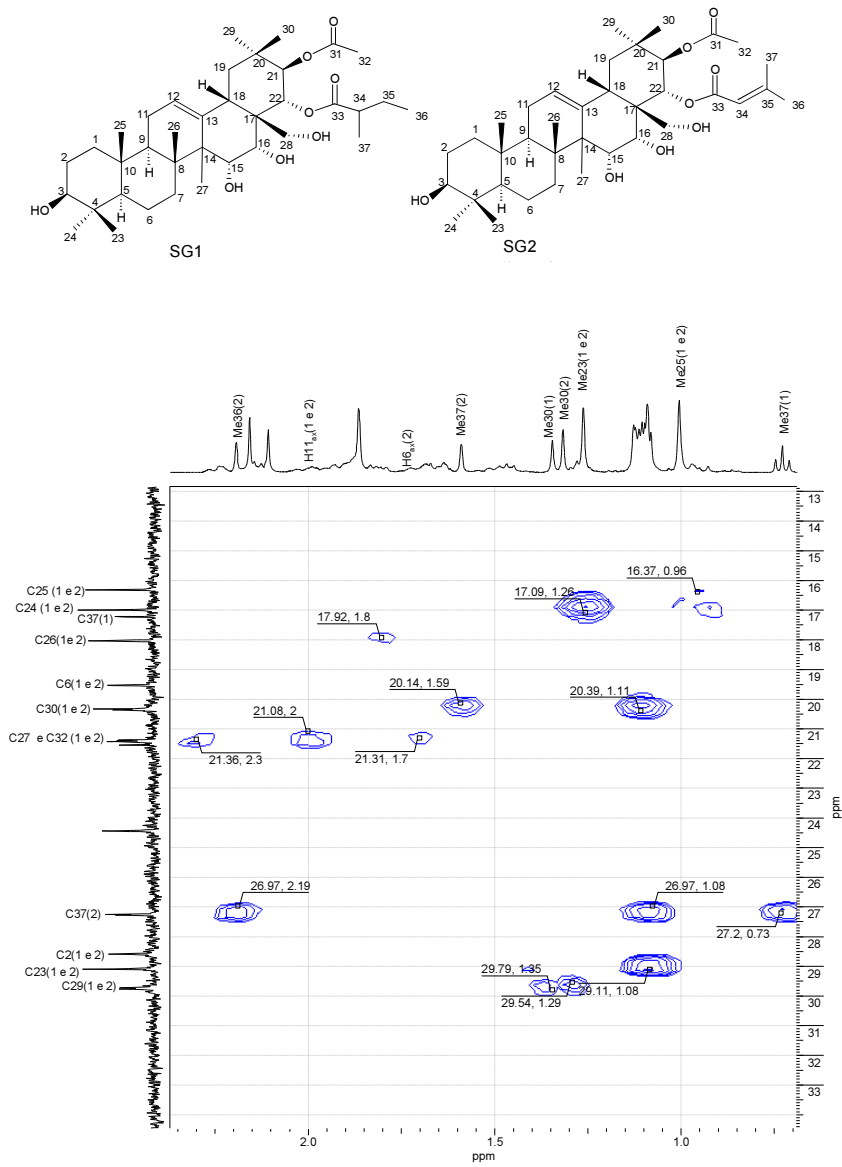
ANEXO 19 – Mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ¹H e 100 MHz ¹³C).




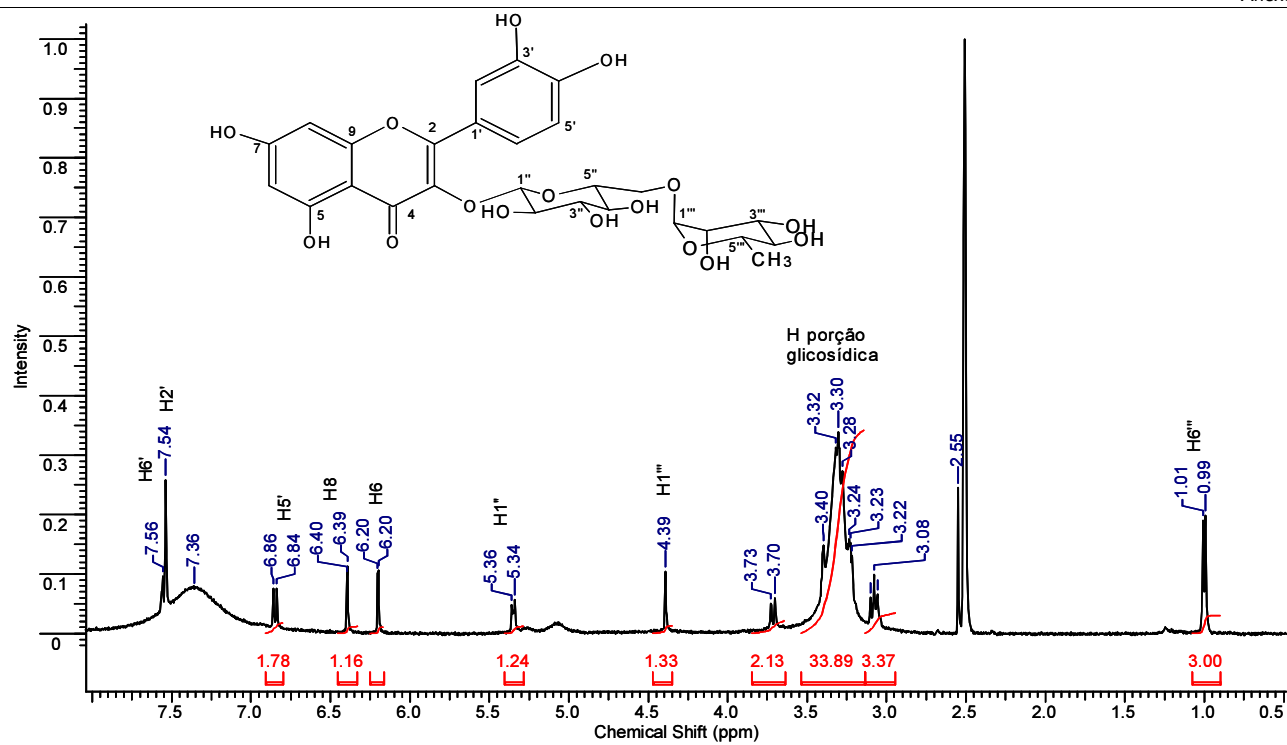
ANEXO 20 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).



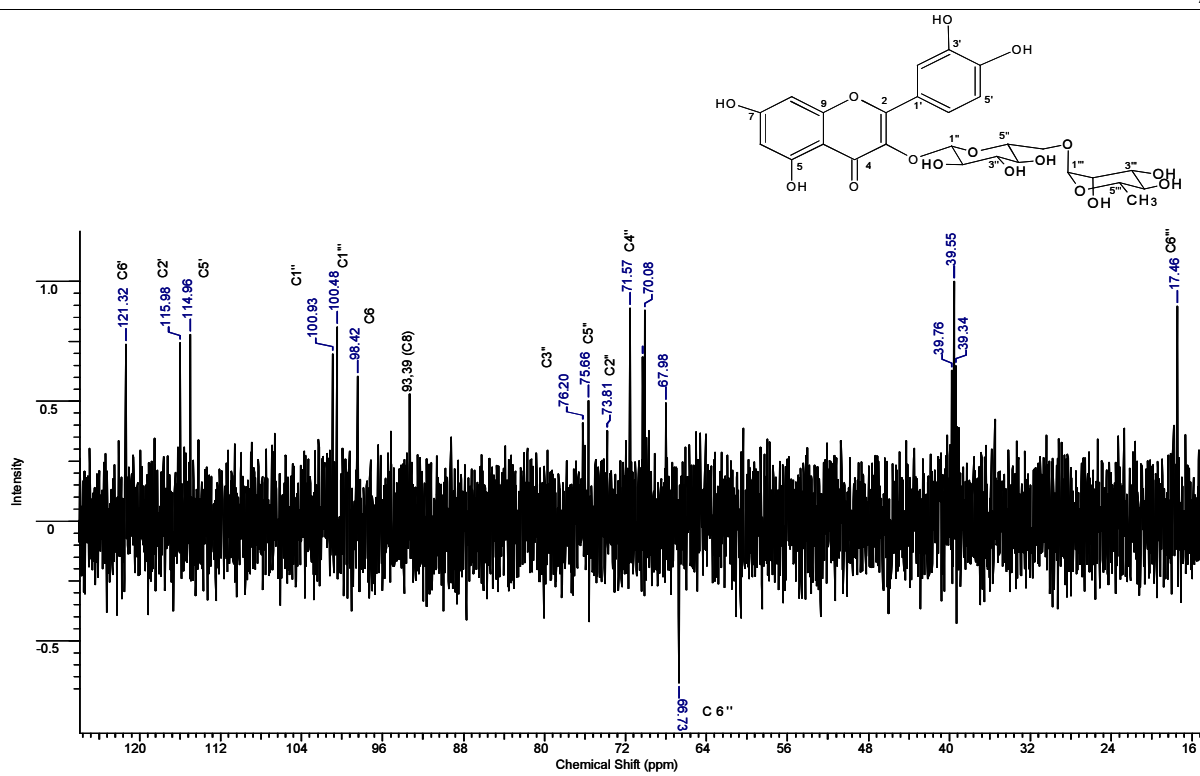
ANEXO 21 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ¹H e 100 MHz ¹³C).



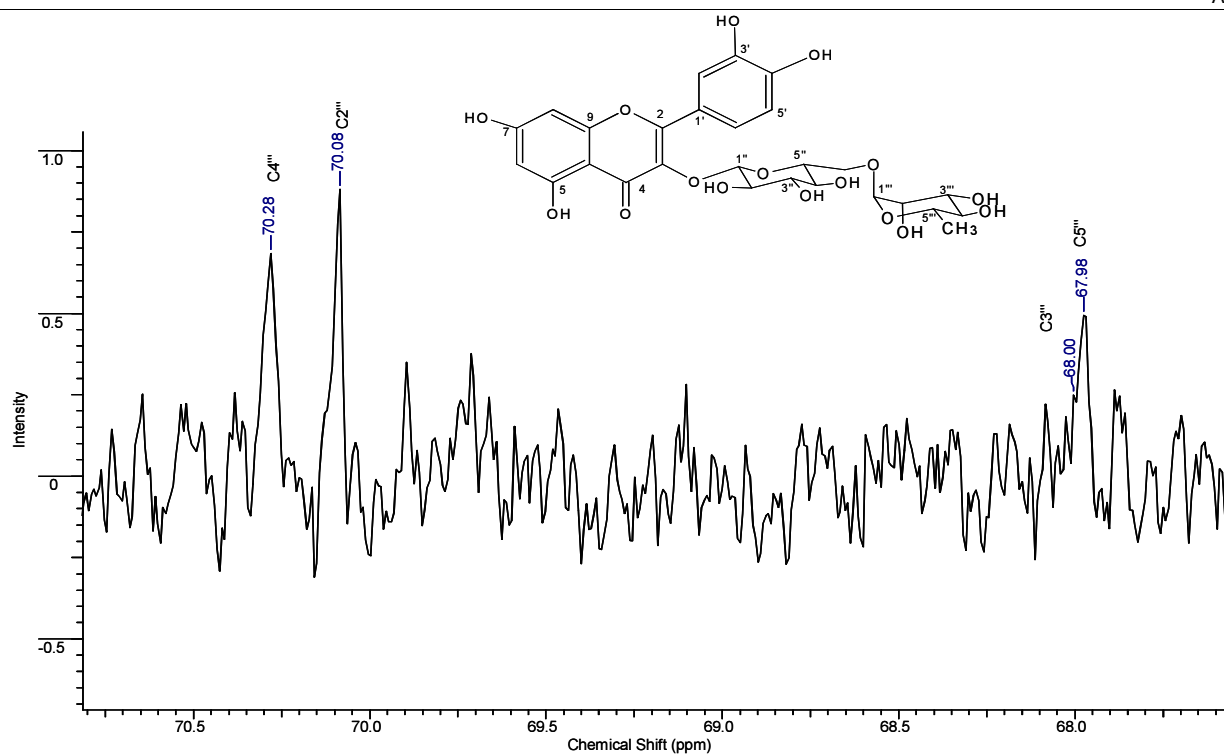
ANEXO 22 – Expansão do mapa de contorno HMBC de ALG (piridina, 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C). 



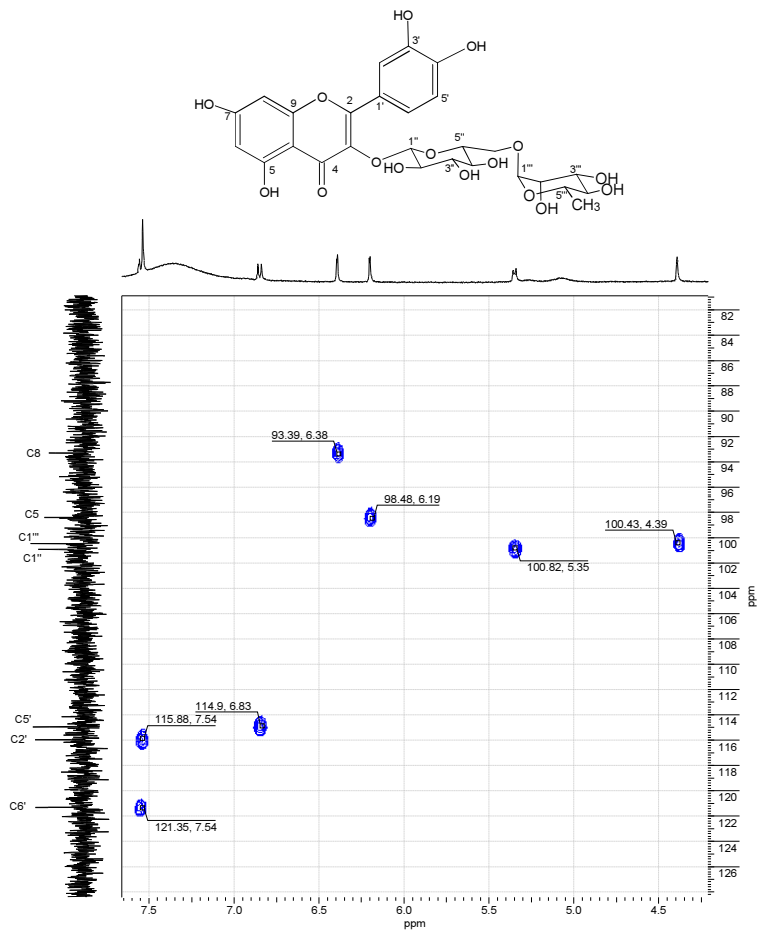
ANEXO 23 – Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da rutina



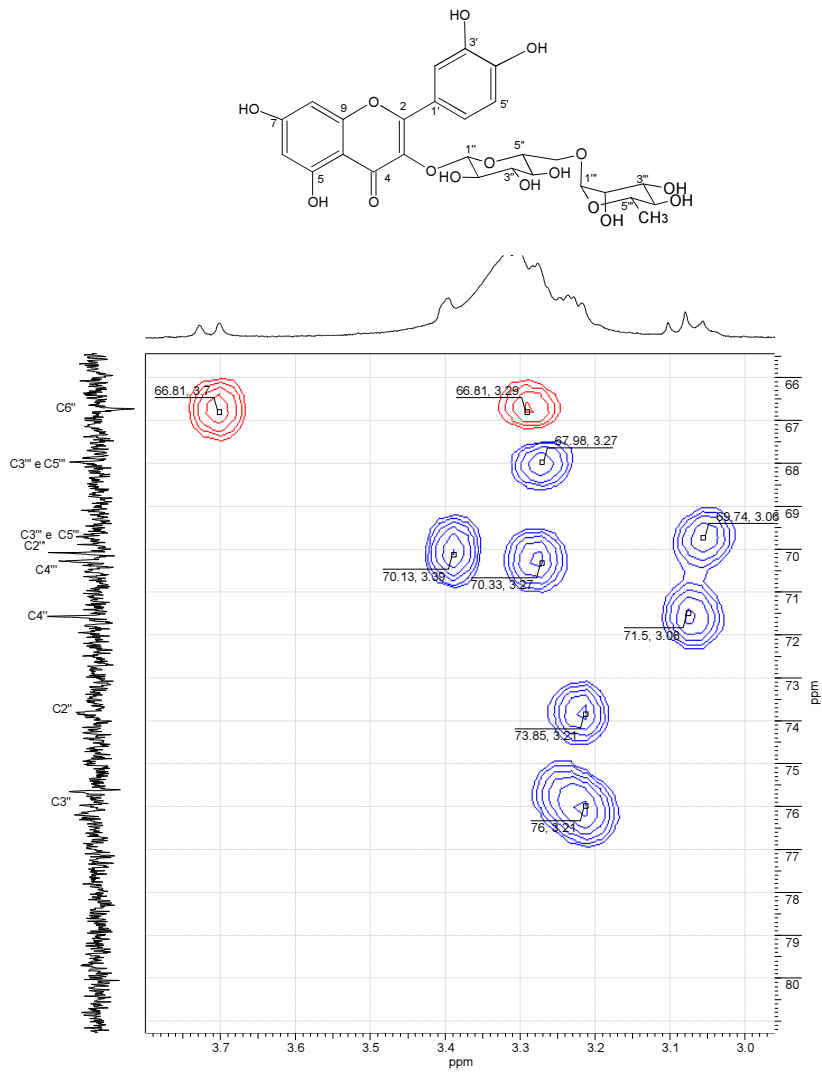
ANEXO 24 – Subespectro de RMN de ^{13}C , DEPT (DMSO-d_6 , 100 MHz) da rutina



ANEXO 25 – Expansão do subspectro de RMN de ^{13}C , DEPT (DMSO-d_6 , 100 MHz) da rutina

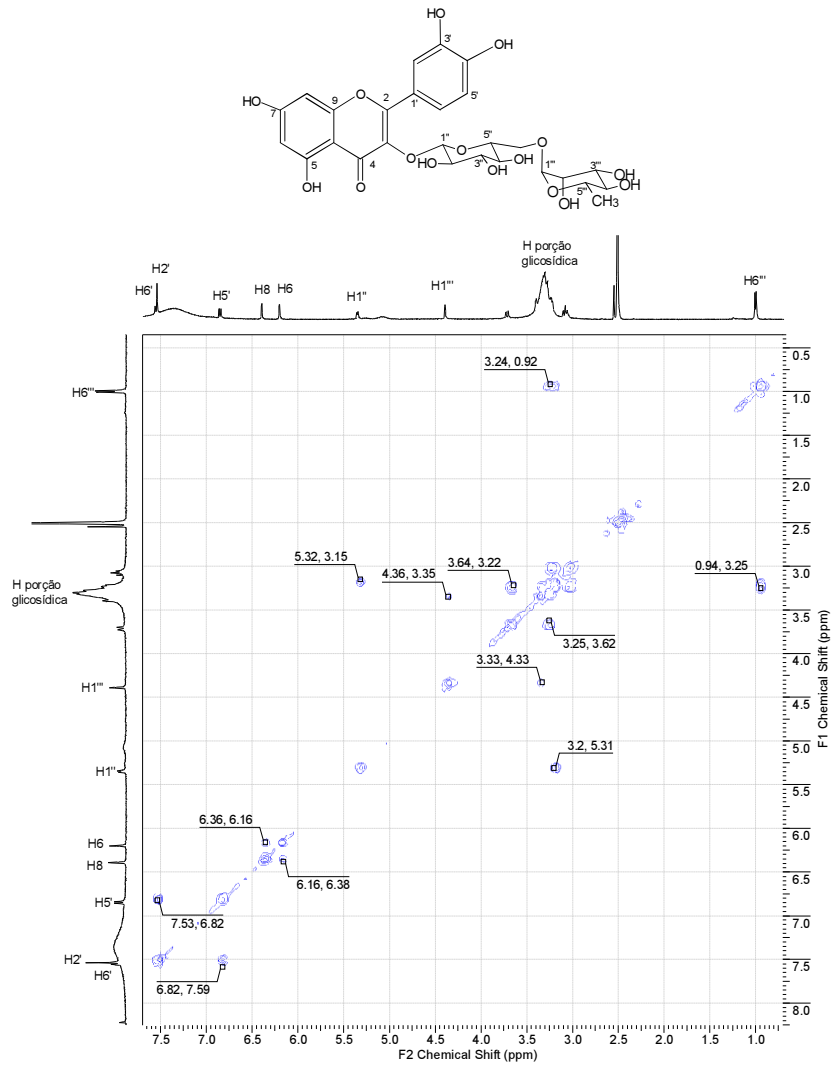


ANEXO 26 – Mapa de contorno HSQC de rutina (DMSO- d_6 , 400 MHz ^1H e 100 MHz ^{13}C).



ANEXO 27 – Mapa de contorno HSQC de rutina (DMSO-d₆, 400 MHz ¹H e 100 MHz ¹³C)

¹³C, ¹H



ANEXO 28 – Mapa de contorno (^1H - ^1H COSY) de rutina (DMSO- d_6 , 400 MHz). ^1H

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS

Armbruster JA, Borris RP, Jimenez Q, Zamora N, Tamayo-Castillo G, Harris GH. Separation of crude plant extracts with high speed CCC for primary screening in drug discovery. *J Liq Chrom & Rel Technol*. 2001, 24 (11&12) 1827-1840.

Aveniente M, Pinto EF, Santos LS, Rossi-Bergmann B, Barata LES. Structure-activity relationship of antileishmanials neolignan analogues. *Bioorg Med Chem*. 2007,15: 3737-3743.

Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug Discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005, 78: 431-441.

Berthod A, Hassoun M. Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography: IV – the cocurrent CCC method. *J Chromatogr A*. 2006, 1116: 143-8.

Borstnik K, Paik I, Shapiro TA, Posner GH. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *Int J Parasitol*. 2002, 32(13): 1661-67.

BRASIL. Ministério da Saúde. Inca. Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Local: INCA, 2008. Disponível em < http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1 > . Acesso em 28 de janeiro de 2008.


BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade. Local: MMA, 2008b. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/capa/index.html> > . Acesso em 15 de janeiro de 2008.

Burczyk J, Reznicek G, Baumgarten S, Hugh-Bloch M, Jurenitsch J, Schröder H, et al. Saponins from *Hacquetia epipactis*. *Phytochemistry*. 1995, 39(1): 195-8.

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* 2004; 67: 2141-2153.

- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(4): 818-822.
- Carvalho MG, Cardozo MAR, Carvalho AG. Outros constituintes químicos isolados de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae), "Pau jacaré". In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2007, Águas de Lindóia [resumo eletrônico].
- Carvalho, WF. Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia. 6ª ed. Belo Horizonte: COOPMED. Ed., 1994.
- Chan PK. Acylation with diangeloyl groups at C21-22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical Pharmacology.* 2007, 73: 341-350.
- Cordell GA. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry.* 2000, 55: 463-480.
- Cornforth JW, Earl JC. A chemical examination of the fruit of *Pittosporum undulatum*. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales.* 1939, 72: 249-254.
- Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure Appl Chem.* 2005a, 77 (1): 7-24.
- Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.* 2005b, 100: 72-9.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003, 19(11): 502-8.
- D'Acquarica I, Giovanni MC, Gasparrini F, Misiti D, D'Arrigo C, Fagnano N et al. Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* Ait. *Tetrahedron.* 2002, 58: 10127-10136.

- Davis AJ, Kedzierski L. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005, 6(2): 163-9.
- Davis AJ, Murray HW, Handman E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol*. 2004, 20(2): 73-76.
- Delmas F, Di Giorgio C, Elias R, Gasquet M, Azas, Mshvildadze V, et al. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, *Hederin*, *Hederin* and *hederacolchiside A₁*, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med*. 2000, 66: 343-7. In Sparg SG, Light ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plants saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004, 94: 219-243.
- Desjeux P. Leishmaniosis. *Nat Rev: Microbiol*. 2004, 2: 692-693.
- Éparvier V, Thoison O, Bousserouel H, Guéritte F, Sévenet T, Litaudon M. cytotoxic farnesyl glycosides from *Pittosporum pancheri*. *Phytochemistry*. 2007, 68: 604-8.
- Estrada A, Katselis GS, Laarveld B, Barl B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comparative immunology. Microbiology and infectious diseases*. 2000, 23: 27-43. In Sparg SG, Light ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plants saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004, 94: 219-243.
- Fellows LE, Bell EA. Indole metabolism in *Piptadenia peregrine*. *Phytochemistry*. 1971, 10: 2083-2091.
- Fish MS, Johnson NM, Horning EC. Piptadenia alkaloids. Indole bases of *Piptadenia peregrina* (L) Benth and related species. *J Am Chem Soc*. 1955, 77: 5892-95.
- Fujiwara Y, Hashimoto K, Manabe K, Maoka T. Structures of tobiroxanthins A1, A2, A3, B, C and D, new carotenoids from seeds of *Pittosporum tobira*. *Tetrahedron Lett* 2002, 43:4385-8.

- Fujiwara Y, Maruwaka H, Toki F, Hashimoto K, Maoka T. Structure of three new carotenoids with a 3-methoxy-5-keto-5,6-seco-4,6-cyclo-end group from seeds of *Pittosporum tobira*. Chem Pharm Bull. 2001, 48(8): 985-7.
- Giulietti AM, Harley RM, Queiroz LP, Wanderley MGL, Van den Berg C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. Megadiversidade. 2005, 1(1): 52-61.
- Gramiccia M, Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmanises and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005, 35: 1169-1180.
- Hartman T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry. 2007; 68: 2831-2846.
- Harvey AL. Natural products as a screening resource. Curr Opin Chem Biol. 2007, 11: 480-84.
- Hegnauer R, Grayer-Barkmeijer RJ. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: a chemotaxonomic approach. Phytochemistry. 1993, 34(1): 3-16.
- Hert AJ, Mander LN, Pongoh E, Rumampuk RJ, Tarigan P. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae. J Nat Prod. 2002, 65: 115-120.
- Higuchi R, Fujioka T, Iwamoto M, Komori T, Kawasaki T, Lassak EV. Triterpenoid saponins from leaves of *Pittosporum undulatum*. Phytochemistry. 1983b, 22(11): 1265-9.
- Higuchi R, Komori T, Kawasaki T, Lassak EV. Triterpenoid sapogenins from leaves of *Pittosporum undulatum*. Phytochemistry. 1983a, 22(5): 1235-7.
- Houghton P, Fang R, techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and

- derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007, 42: 377-387.
- Ismael GFV, Rosa DD, Mano MS, Awada A. Novel cytotoxic drugs: old challenges, new solutions. *Cancer Treat Rev*. In Press, 2007.
- Kartal M, Mitaine-Offer AC, Abu-Asaker M, Miyamoto T, Calis I, Wagner H, et al. Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chem Pharm Bull*. 2005, 53(10): 1318-1320.
- Kinghorn AD, Balandrin MF (Eds). Human medicinal agents from plants. ACS, Washington: ACS Symposium Series, 534, 1993. In Phillipson JD. *Phytochemistry and Pharmacognosy*. *Phytochemistry*. 2007, 68: 2960-2972.
- Koehn FE, Carter G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005, 4: 206-220.
- Koike K, Kudo M, Jia Z, Nikaido T, Ide Y, Sakura T. New triterpenoid Saponins from *Maesa japonica*. *J Nat Prod*. 1999, 62: 228-232.
- Lago JHG, Fávero AO, Romoff P. Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. leaves. *J Braz Chem Soc*. 2006, 17(7): 1334-8.
- Leitão A, Montanari CA, Donnici CL. Sobre o uso de métodos quimiométricos em química combinatória. *Quim Nova*. 2000, 23(2): 178-184.
- Mabry TJ, Markman KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer-Verlag, 1970.
- Makhubu L. Bioprospecting in African context. *Science*. 1998, 282:41-42.
- Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Akimoto N. 5-Hydroxy-seco-carotenoids from *Pittosporum tobira*. *Phytochemistry*. 2006, 67:2120-5.

Marquina S, Maldonado N, Garduño-Ramírez ML, Aranda E, Villarreal ML, Navarro V, et al. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera deurrens*. *Phytochemistry*. 2001, 56: 93-7. In Sparg SG, Light ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*. 2004, 94: 219-243.

Marston A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2785-2797.

Matsushita A, Sasaki Y, Warashina T, Miyase T, Noguchi H, Vander Velde D. Hydrocotylosides I-VII, new oleanane saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *J Nat Prod*. 2004, 67: 384-8.

McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007), 68: 2015-2022.

Medeiros JR, Campos LB, Mendonça SC, Davin LB, Lewis NG. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*. 2003, 64: 561-5.

Mesia GK, Tona GL, Nanga TH, Cimanga RK, Apers S, Cos P, et al. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*. 2008, 115: 409-415.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(11): 757-766.

NAPRALERT. (Org) Natural Products Database. Chicago. Disponível em: <http://www.stninternational.de/stndatabases/databases/napraller.html>. Acesso em 11 de junho de 2007.

Newman DJ; Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003, 66 (7): 1022-1037.

- Newman DJ; Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007, 70 (3): 461-477.
- Oleszek W, Bialy Z. Chromatographic determination of plant saponins- An update (2002-2005). *J Chromatogr A.* 2006, 1112: 78-91.
- Oliveira RB, Souza-Fagundes EM, Siqueira HAJ, Leite RS, Donnici CL, Zani CL. Synthesis and evaluation of cytotoxic activity of arylfurans. *Eur J Med Chem.* 2006, 41: 756-760.
- Phillipson JD. Phytochemistry and Pharmacognosy. *Phytochemistry.* 2007, 68: 2960-2972.
- Ragasa CY, Rideout JA, Tierra DS, Coll JC. Sesquiterpene glycosides from *Pittosporum pentandrum*. *Phytochemistry.* 1997, 45(3): 545-7.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jésus MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova.* 2003, 26(4): 550-5.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther.* 2003, 99: 1-13.
- Rede de Sementes do Cerrado. Disponível em: http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Leguminosae_3904/Piptadenia/adiantoides_3421/index.html. Acesso em 31 de janeiro de 2008.
- Remme JHF, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PMP, Engers HD, Kanyok TP, et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol.* 2002, 18(10): 421-6.
- Ribeiro A. Substâncias tripanosomicidas de *Tixis vauthieri* DC. (Asteraceae). Isolamento e identificação do trixol, um macrolídeo inédito. [tese]. Belo Horizonte: Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da UFMG, 1999.

Rijke E, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Flavonoids in leguminosae: analysis of extracts of *T. pretense* L., *T. dubium* L., *T. repensi* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem.* 2004, 378: 995-1006.

Rocha LG, Almeida JRGS, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 2005, 12: 514-535.

Seo Y, Berger JM, Hoch J, Neddermann KM, Bursucker I, Mamber SW et al. A new triterpene saponin from *Pittosporum viridiflorum* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod.* 2002, 65: 65-68.

Sereno D, Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaissi. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int.* 2007, 56: 3-7.

Silverstein RM, Webster FX. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.; 1998.

Sparg SG, Light ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plants saponins. *J Ethnopharmacol.* 2004, 94: 219-243.

Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. *Indian J Med Res.* 2006, 123: 345-352.

Tanaka JCA, Silva CC, Ferreira ICP, Machado GMC, Leon LL, Oliveira AJB. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine.* 2007, 14: 377-380.

Tang M, Shen D, hu, Y, Gao Song, Yu S. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Symplocos chinensis*. *J Nat Prod.* 2004, 64: 1969-1974.

The Tree of Life Web Project. 2008. Disponível em <http://tolweb.org>. Acesso em 05 de março de 2008.

- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G e Oreopoulou V. Characterization of flavonoids subgroups and hidroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*. 2007, 12: 593-606.
- USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 2008b. Disponível em <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?437199>. Acesso em 13 de fevereiro de 2008b.
- USDA. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Plants Database. 2008a. Disponível em <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Pittosporaceae>. Acesso em 21 de fevereiro de 2008a.
- Viegas Jr C, Bolzani VS. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova*. 2006, 29(2): 326-337.
- Vincken JP, Heng L, Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007, 68: 275-297.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2ª ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- WHO - World Health Organization. Traditional and alternative medicine. Fact sheet. 2002. In: McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. *Plant natural products: back to the future or into extinction?* *Phytochemistry*. 2007, 68: 2015-2022.
- WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2008. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>. Acesso em 20 de fevereiro de 2008.
- Yamasato S, Kawanisui K, Kato A, Hashimoto Y. Organic bases from Brazilian *Piptadenia* species. *Phytochemistry*. 1972, 11: 737-9.