



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO BIOLÓGICO
DAS FOLHAS E FLORES DE *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae)**

Afif Felix Monteiro

Catalão - GO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO BIOLÓGICO
DAS FOLHAS E FLORES DE *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, para obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Afif Felix Monteiro

Orientadora: Profa. Dra Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

Catalão

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
(GPT/BSCAC/UFG)**

Monteiro, Afif Felix.
M775e Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *hymenaea stigonocarpa ex hayne* (fabaceae) [manuscrito] / Afif Felix Monteiro. - 2014.
xv, 157 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Pasqualotto Severino.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Departamento de Química, 2014.
Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Cerrado. 2. *Hymenaea stigonocarpa*. 3. Produtos naturais. 4. Atividade biológica. I. Título.

CDU:581.145.1



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Campus Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de dissertação de mestrado do candidato Afif Felix Monteiro, realizada em 31 de março de 2014.

Prof. Dr. Warley de Souza Borges

Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino

Orientadora

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Goiás
Regional Catalão - Avenida Dr. Lamartine P. de Avelar, 1120, Setor Universitário - 75.704-020
Fone: (64) 3441-5334; Fax: (64) 3441-5336

Dedico este trabalho...

Aos meus pais e irmãos que, com muito esforço, compreensão e dedicação, sempre me incentivaram e apoiaram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cirene e Adélcio, e aos meus irmãos, Renata, Regina, Alencar, Adolfo e Alejandro, que sempre estiveram ao meu lado, nunca mediram esforços para me apoiar e sempre me incentivaram a seguir em frente diante das dificuldades.

À profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino por ter aceito me orientar desde a iniciação científica, me introduzindo na área de Produtos Naturais. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade ao longo desse tempo.

À profa. Dra. Richele Priscila Severino pelos ensinamentos e pelo suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, bem como por ter me orientado durante a monitoria da disciplina de química orgânica, despertando meu interesse pela área, e por me apresentar à profa. Vanessa.

Ao prof. Dr. Paulo Cezar Vieira do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, pela realização dos ensaios enzimáticos, bem como pelas grandes sugestões e contribuições dadas ao trabalho e, sobretudo, pela confiança depositada.

Aos professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos, e Dr. Luciano Morais Lião, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos experimentos de RMN uni e bidimensionais.

À profa. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos ensaios de avaliação da citotoxicidade.

À aluna de IC Fábria Monique, pela determinação dos valores de IC₅₀ das substâncias isoladas, frente às catepsinas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Regional Catalão da Universidade Federal de Goiás, por oportunizar a realização do trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEG, pelo suporte financeiro concedido.

À CAPES pela bolsa concedida.

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

À profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero, pelas conversas em que pude compartilhar de sua experiência na vida acadêmica e pelas contribuições ao trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório: Estefânia, Luciana, Leonardo, Michelle Nauara, Jordana, Marcos Henrique, João Gabriel, Michelle Machado e Renan.

Aos técnicos da UFG, em especial à Márcia, pela disposição.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização do trabalho.

O ferro enferruja pela falta de uso, a água estagnada perde a sua pureza e no frio fica congelada. Do mesmo modo, a ociosidade exaure a vitalidade da mente.

Leonardo da Vinci

RESUMO

O Cerrado brasileiro, rico em espécies vegetais, torna-se promissor para estudos de produtos naturais (PNs) que possam atuar como fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, como agentes quimioterapêuticos e quimiopreventivos, e inibidores de enzimas, tais como as catepsinas, proteases lisossomais com funções benéficas, porém atuando em processos patológicos (câncer, artrite, osteoporose, desordens imunológicas e infecções virais). Embora tais enzimas tenham sido estudadas como alvos para o desenvolvimento de fármacos, poucos inibidores baseados em PNs foram descritos na literatura. Assim, neste trabalho foi realizado o estudo químico-biológico de *Hymenaea stigonocarpa*, em busca de metabólitos secundários potenciais em inibir a atividade das catepsinas K, L e V, bem como a viabilidade celular das linhagens de células tumorais S-180 e Ehrlich. Através de técnicas cromatográficas, do extrato das folhas foram isoladas 5 substâncias, ainda não relatadas para *H. stigonocarpa*: ácido labd-7,13-dien-15-oico (**I**), ácido labd-7-en-15-oico (**II**), ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico (**III**), 4',5,7-trihidroxi-3',5-dimetoxiflavona (**IV**) e ácido *p*-hidroxibenzoico (**V**); e uma substância do extrato das flores, a qual ainda não está descrita na literatura: ácido 18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico (**VI**). Portanto, este estudo contribuiu para enriquecer o conhecimento sobre os PNs produzidos por esta espécie. Os diterpenoides **I** e **III** foram avaliados quanto aos seus potenciais citotóxicos, demonstrando valores de IC₅₀ não satisfatórios. No entanto, estudos demonstraram que diterpenoides labdano e halimano possuem efeito citotóxico e consideraram a substância **IV**, isolada neste trabalho, como detentora de atividade anticâncer, tornando esta espécie promissora na busca por compostos capazes de inibir a viabilidade de células tumorais. Os compostos **I**, **III**, **III*** (éster de metila de **III**), **IV**, **V** e **VI** foram ensaiados frente às catepsinas K, L e V, sendo os resultados mais expressivos para os compostos **I**, **IV**, **V** e **VI** frente à catepsina V; **I** e **V** frente à catepsina L e **I** frente à catepsina K. Essas substâncias foram avaliadas quanto à potência inibitória, sendo os resultados mais significativos para o composto **IV** (IC₅₀= 2,9 e 36,9 μ M), frente às catepsinas V e L, respectivamente. Dados da literatura reportam atividades inibitórias para flavonoides frente à catepsina K, evidenciando, juntamente com os resultados obtidos, a necessidade de continuação dos estudos de *H. stigonocarpa* na busca por inibidores de cisteíno proteases.

Palavras-chave: Cerrado, *Hymenaea stigonocarpa*, produtos naturais, atividade biológica.

ABSTRACT

The Brazilian Savannah is rich in plant species, and that is why it is promising to study natural products (NPs) which can act as sources for the development of new drugs, such as chemotherapeutic and chemopreventive agents, and inhibitors of enzymes such as cathepsins, which are lysosomal proteases with beneficial functions but are also involved in pathological processes (cancer, arthritis, osteoporosis, immune disorders and viral infections). Although these enzymes have been studied as targets for drug development, few inhibitors based on NPs have been described in the literature. In this work the chemical-biological study of *Hymenaea stigonocarpa* was carried out in the search for potential secondary metabolites capable of inhibiting the activity of cathepsins K, L and V as well as the viability of tumor cells S-180 and Ehrlich. By means of chromatographic techniques, 5 substances were isolated from the leaf extract, which have not been previously reported to *H. stigonocarpa*: labd-7,13-dien-15-oic acid (**I**), labd-7-en-15-oic acid (**II**), *ent*- $\Delta^{13,14}$ -labd-8- β -ol-15-oic acid (**III**), 4',5,7-trihydroxy-3',5-dimethoxyflavone (**IV**) and *p*-hydroxybenzoic acid (**V**), along with one substance obtained from the flower extract, which has not been described in the literature: 18-hydroxy-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oic acid (**VI**). Therefore, this study has contributed to enrich the knowledge of NPs produced by this species. The diterpenoids **I** and **III** were assayed for their cytotoxic potential, showing unsatisfactory IC₅₀ values. However, studies have shown that labdane and halimane diterpenoids possess potent cytotoxic effect and that substance **IV**, isolated in this work, can be considered to have pronounced anticancer activity, making this species promising in the search for compounds capable of inhibiting tumor cells viability. Compounds **I**, **III**, **III*** (methyl ester of **III**), **IV**, **V** and **VI** were tested against cathepsins K, L and V. The most significant results were observed for compounds **I**, **IV**, **V** and **VI** against cathepsin **V**; **I** and **V** against the cathepsin L and **I** against cathepsin K. The inhibitory potency values of these compounds were determined and the most significant results were observed for compound **IV** (IC₅₀ = 2.9 and 36.9 mM) against cathepsins **V** and **L**, respectively. Literature data have reported significant inhibitory activities for flavonoids against cathepsin K, indicating, together with the results obtained in this work, the need for further studies of *H. stigonocarpa* in the search for cysteine proteases inhibitors.

Keywords: Cerrado, *Hymenaea stigonocarpa*, natural products, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estruturas químicas de alguns produtos naturais oriundos de plantas.	1
FIGURA 1.2: Fontes de fármacos lançados entre 01/1981 e 12/2010.	3
FIGURA 1.3: Agentes anticâncer derivados de plantas.	5
FIGURA 1.4: Resíduos do sítio ativo das cisteíno proteases.	10
FIGURA 1.5: Estado de transição para a hidrólise de ligações peptídicas por cisteíno proteases.	10
FIGURA 1.6: Mecanismo de hidrólise de peptídeos por cisteíno peptidases.	11
FIGURA 1.7: Equilíbrio cinético entre enzima e substrato.	12
FIGURA 1.8: Esquema clássico de inibição competitiva.	13
FIGURA 1.9: Esquema clássico de inibição não-competitiva.	13
FIGURA 1.10: Esquema clássico de inibição incompetitiva.	13
FIGURA 1.11: Região do Cerrado Brasileiro	14
FIGURA 1.12: Extensão do domínio do Cerrado no Brasil.	15
FIGURA 1.13: <i>Hotspots</i> de biodiversidade (regiões de 1 - 35) e áreas selvagens de biodiversidade elevada (regiões de 36 - 40).	16
FIGURA 1.14: A espécie <i>H. stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.	18
FIGURA 1.15: Terpenoides isolados de <i>H. courbaril</i>	37
FIGURA 3.1: Cromatograma da fração 3.11.9 obtido por CLAE no modo analítico.	51
FIGURA 3.2: Cromatograma da fração 3.11.9 obtido no modo preparativo.	52
FIGURA 3.3: Esquema geral dos ensaios enzimáticos.	54
FIGURA 3.4: Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases E-64.	55
FIGURA 3.5: Reação de redução do agente MTT em azul de formazan.	57
FIGURA 4.1: Espectro de RMN de ¹ H da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	66
FIGURA 4.2: Espectro de RMN de ¹³ C da substância I (CDCl ₃ , 100 MHz).	67
FIGURA 4.3: Mapa de contorno de HSQC da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	68
FIGURA 4.4: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	69
FIGURA 4.5: Mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	70
FIGURA 4.6: Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	71

FIGURA 4.7: Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl ₃ , 400 MHz).	72
FIGURA 4.8: Espectro de NOESY-2D da substância I (CDCl ₃ , 600 MHz).	73
FIGURA 4.9: Espectro de RMN de ¹ H da substância II (CDCl ₃ , 400 MHz).....	76
FIGURA 4.10: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância 02 (CDCl ₃ , 400 MHz).	77
FIGURA 4.11: Espectro de RMN de ¹ H da substância III (CDCl ₃ , 400 MHz).	81
FIGURA 4.12: Espectro de RMN de ¹³ C da substância III (CDCl ₃ , 100 MHz).	82
FIGURA 4.13: Mapa de contorno de HSQC da substância III (CDCl ₃ , 400 MHz).....	83
FIGURA 4.14: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância III (CDCl ₃ , 400 MHz).	84
FIGURA 4.15: Mapa de contorno de HMBC da substância 3 (CDCl ₃ , 400 MHz).	85
FIGURA 4.16: Mapa de contorno de HMBC da substância III (CDCl ₃ , 400 MHz).	86
FIGURA 4.17: Espectro de NOESY-2D da substância III (CDCl ₃ , 600 MHz).....	87
FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ¹ H da substância IV (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz).	91
FIGURA 4.19: Espectro de RMN de ¹³ C da substância IV (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125 MHz). ...	92
FIGURA 4.20: Mapa de contorno de HSQC da substância IV (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz). 93	
FIGURA 4.21: Mapa de contorno de HMBC da substância IV (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)....	94
FIGURA 4.22: Espectro de RMN de ¹ H da substância V (CD ₃ OD, 400 MHz).	96
FIGURA 4.23: Estrutura química do colesterol.	97
FIGURA 4.24: Estruturas químicas do γ -sitosterol (VII), campesterol (VIII) e estigmasterol (IX).	98
FIGURA 4.25: Espectro de RMN de ¹ H da fração 2.5.11 (CD ₃ OD, 400 MHz).	100
FIGURA 4.26: Expansão do espectro de RMN de ¹ H da fração 2.5.11 (CD ₃ OD, 400 MHz).	101
FIGURA 4.27: Cromatograma da mistura de γ -sitosterol, estigmasterol e campesterol obtido via CG-EM.	102
FIGURA 4.28: Espectros de massas dos componentes da mistura (IE = 70 eV): (a) campesterol; (b) estigmasterol e (c) γ -sitosterol.	103
FIGURA 4.29: Proposta de fragmentação do γ -sitosterol.	104
FIGURA 4.30: Espectro de RMN de ¹ H da substância VI.....	109

FIGURA 4.31: Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz).	110
.....	
FIGURA 4.32: Espectro de RMN de ^{13}C da substância VI (CDCl_3	111
FIGURA 4.33: Mapa de contorno de HSQC da substância VI.....	112
FIGURA 4.34: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substâ.....	113
FIGURA 4.35: Mapa de contorno de HMBC da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz)..	114
FIGURA 4.36: Expansão do Mapa de contorno de HMBC da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz).	115
.....	
FIGURA 4.37: Espectro de NOESY-2D da substância VI (CDCl_3 , 600 MHz).....	116
FIGURA 4.38: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da substância III (a), e do éster de metila (III*) (b) (CDCl_3 , 400 MHz).....	118
FIGURA 4.39: Determinação dos valores de IC_{50} para os compostos (a) I frente à CatV; (b) IV frente à CatV; (c) VI frente à CatV e (d) VII frente à CatL.	123
FIGURA 4.40: Estruturas químicas das substâncias IV (tricina) e 66 (luteolina).	124
FIGURA 4.41: Estrutura química do ácido ursólico.	124
FIGURA 4.42: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral Sarcoma-180 frente ao tratamento com: (a) ER; (b) EC; (c) FHC e (d) FAC (concentrações: 0,1, 1,0, 10, 100, 1000), com tempo de exposição de 48 h.	126
FIGURA 4.43: Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células normais L-929 frente ao tratamento com extratos e frações (concentrações: 0,1, 1,0, 10, 100, 1000), com tempo de exposição de 48 h.....	127
FIGURA 4.44: Estruturas químicas dos compostos I e II.	129

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Citotoxicidade <i>in vitro</i> de extratos de plantas frente à quatro linhagens de células tumorais pelo teste do MTT.	6
TABELA 1.2: Diterpenoides isolados de <i>Hymenaea spp.</i>	20
TABELA 1.3: Sesquiterpenoides isolados de <i>Hymenaea spp.</i>	27
TABELA 1.4: Ácidos graxos identificados do gênero <i>Hymenaea</i>	32
TABELA 1.5: Flavonoides isolados do gênero <i>Hymenaea</i>	33
TABELA 3.1: Massa obtida de material vegetal e extratos.	41
TABELA 3.2: Programa de eluição gradiente.....	49
TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância I e comparação com a literatura.	65
TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H da substância II e comparação com a literatura. .	75
TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância III e comparação com a literatura.	80
TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância IV e comparação com a literatura.....	90
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da substância V e comparação com a literatura..	95
TABELA 4.6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VI.	108
TABELA 4.7: Percentuais de inibição enzimática dos extratos etanólicos de <i>H. stigonocarpa</i>	119
TABELA 4.8: Percentuais de inibição enzimática das frações do extrato EF.	120
TABELA 4.9: Percentuais de inibição enzimática das frações do extrato EL.	120
TABELA 4.10: Percentuais de inibição enzimática de substâncias isoladas (a 25 μM)....	121
TABELA 4.11: Valores de potência inibitória dos compostos I, IV, V e VI frente às catepsinas K, L e V.....	122
TABELA 4.12: Determinação dos valores de IC_{50} : concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos/frações que inibe 50% da viabilidade celular de células tumorais tratadas por 48h nas concentrações de 0,1 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	125
TABELA 4.13: Percentuais citotóxicos das substâncias I e III.....	128

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Os produtos naturais e a descoberta de fármacos	1
1.2 - Produtos naturais antitumorais	4
1.3 - Cisteíno peptidases lisossomais como alvos terapêuticos	7
1.3.1 - As catepsinas K, L e V	8
1.3.2 - Aspectos estruturais e mecanismo de ação das catepsinas.....	9
1.4 - O Cerrado brasileiro e suas potencialidades	14
1.5 - A família Fabaceae	17
1.6 - O gênero <i>Hymenaea</i> e a espécie <i>H. stigonocarpa</i>	17
1.7 - Estudos químicos de <i>H. Stigonocarpa</i>	19
1.8 - Aplicações de <i>H. stigonocarpa</i> na medicina popular e estudos biológicos	34
1.8.1 - Ação gastroprotetora e anti-inflamatória intestinal de <i>H. stigonocarpa</i>	35
1.8.2 - Atividade anti-inflamatória de terpenoides isolados de <i>H. Courbaril</i>	36
2 - OBJETIVOS	38
2.1 - Objetivos gerais	38
2.2 - Objetivos específicos	38
3 - PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1 - Materiais	38
3.1.1 - Solventes	38
3.1.2 - Fases estacionárias para cromatografia	39
3.2 - Equipamentos	39
3.3 - Estudo químico dos extratos etanólicos das folhas e das flores de <i>H. stigonocarpa</i>	40
3.3.1 - Identificação e coleta das folhas.....	40
3.3.2 - Identificação e coleta das flores	40
3.3.3 - Preparo do extrato etanólico das folhas.....	41
3.3.4 - Preparo do extrato etanólico das flores	41
3.3.5 - Fracionamento do extrato etanólico das folhas	42
3.3.6 - Fracionamento do extrato etanólico das flores.....	52
3.4 - Metilação do ácido $\Delta^{13,14}$-<i>ent</i>-labd-8-β-ol-15-oico (III)	53
3.5 - Metodologia dos ensaios enzimáticos	54
3.6 - Ensaios de citotoxicidade	56

3.6.1 - Metodologia dos ensaios com extratos e frações oriundas da partição líquido-líquido.....	56
3.6.2 - Metodologia dos ensaios com compostos puros isolados das frações	58
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 - Substâncias isoladas	59
4.2 - Elucidação estrutural.....	60
4.2.1 - Elucidação estrutural dos diterpenoides isolados de <i>H. stigonocarpa</i>	60
4.2.2 - Identificação estrutural da 4',5,7-tri-hidroxi-3',5-dimetoxiflavona – substância IV	88
4.2.3 - Identificação estrutural do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico – substância V	95
4.2.4 - Esteroides	97
4.2.5 - Determinação estrutural do ácido 18-hidroxi- <i>ent</i> -halima-1(10),13- <i>E</i> -dien-15-oico – substância VI	105
4.3 - Confirmação da obtenção do éster de metila da substância III.....	117
4.4 - Resultados dos ensaios enzimáticos	119
4.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade	125
5 - CONCLUSÕES	138
6 - REFERÊNCIAS	138

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

ϕ	diâmetro
δ	deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Cat	catepsina
CCD	cromatografia em camada delgada
CA	cromatografia por adsorção
CE	cromatografia por exclusão
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	^1H - ^1H <i>correlation spectroscopy</i>
d	dubleto
DAD	detector de arranjo de fotodiodos
DMSO	dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DTE	ditioeritritol
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EI	complexo enzima-inibidor
eV	elétron-volt
HMBC	<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
Hz	hertz
IC ₅₀	potência inibitória
IE	impacto eletrônico
J	constante de acoplamento
M	molar
m	multiplete
m/z	razão massa/carga
MCA	7-amino-4-metilcumarina

MHz	mega hertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
pH	potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RPMI	Rosweel Park Memorial Institute <i>medium</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
<i>s</i>	singleto
<i>t</i>	triplete
UV-vis	região ultravioleta e visível
Z-FR-MCA	carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

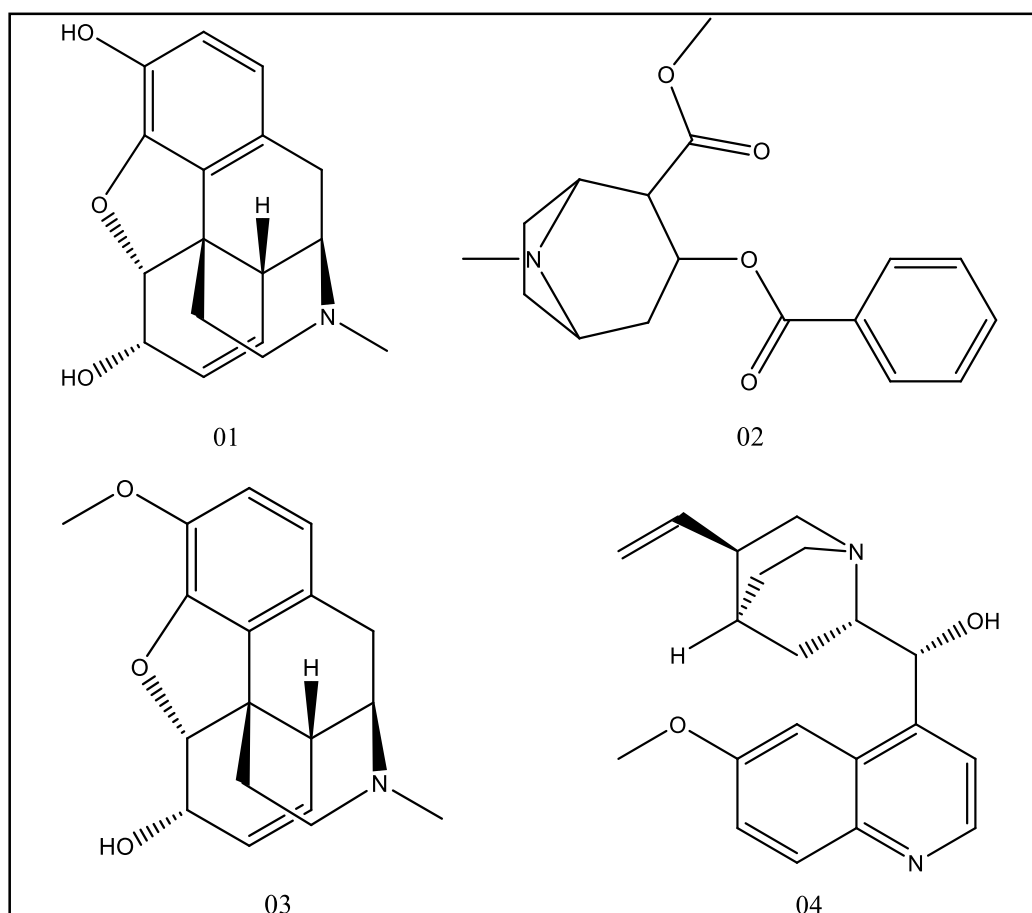
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Os produtos naturais e a descoberta de fármacos

Desde os primórdios o homem tem contado com a natureza como fonte de remédios para o tratamento de várias doenças. As plantas, em particular, formaram a base dos sistemas tradicionais de medicina, com os primeiros registros datando de cerca de 2600 a.C., documentando o uso de aproximadamente 1000 misturas de substâncias oriundas de plantas, na Mesopotâmia (CRAGG & NEWMAN, 2013).

No início do século XIX, o uso de plantas medicinais resultou no isolamento de compostos ativos, começando com a morfina (**01**) (FIGURA 1.1, p. 1) isolada do ópio. Além da morfina, o processo de descoberta de fármacos a partir de plantas resultou no isolamento de fármacos como cocaína (**02**), codeína (**03**) e quinina (**04**), alguns dos quais ainda continuam em uso (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

FIGURA 1.1: Estruturas químicas de alguns produtos naturais oriundos de plantas.



Os metabólitos produzidos por plantas, animais e micro-organismos são definidos como produtos naturais e constituem uma fonte ampla de diversidade química (SAHA & KHUDA-BUKHSH, 2013). Diversos métodos têm sido usados para obtenção de compostos no processo de descoberta de fármacos, incluindo isolamento de moléculas de origens naturais, química sintética e modelagem molecular. Porém, apesar do interesse nestes métodos por companhias farmacêuticas e agências financiadoras, os produtos naturais e, particularmente, as plantas medicinais permanecem uma fonte importante de novos fármacos, novos compostos líderes e novas entidades químicas (NEQs) (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Tanto as moléculas de origem natural quanto as sintéticas compartilham de diversidade química elevada, especificidade bioquímica, massa molecular, números de estereocentros e flexibilidade molecular apropriados para aplicações farmacêuticas. Porém, se comparados com agentes medicinais sintéticos, os produtos naturais contêm maior número de átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e menos de nitrogênio e outros elementos. Além disso, a rigidez molecular é maior em moléculas naturais e muitas destas apresentam polaridade elevada, rendendo-lhes maior solubilidade em água, um aspecto importante para manter as diretrizes farmacocinéticas de administração oral, em termos de melhor adsorção, distribuição, metabolismo e eliminação do corpo (SAHA & KHUDA-BUKHSH, 2013).

As estruturas naturais foram selecionadas evolutivamente para interagir com uma variedade de proteínas e outros alvos biológicos, com propósitos específicos. A habilidade dessas substâncias interagirem com diversos domínios de proteínas as levam a modular ou inibir interações proteína-proteína, tornando-as moduladores efetivos de processos celulares tais como respostas imunológicas, transdução de sinais, mitose e apoptose (SAHA & KHUDA-BUKHSH, 2013).

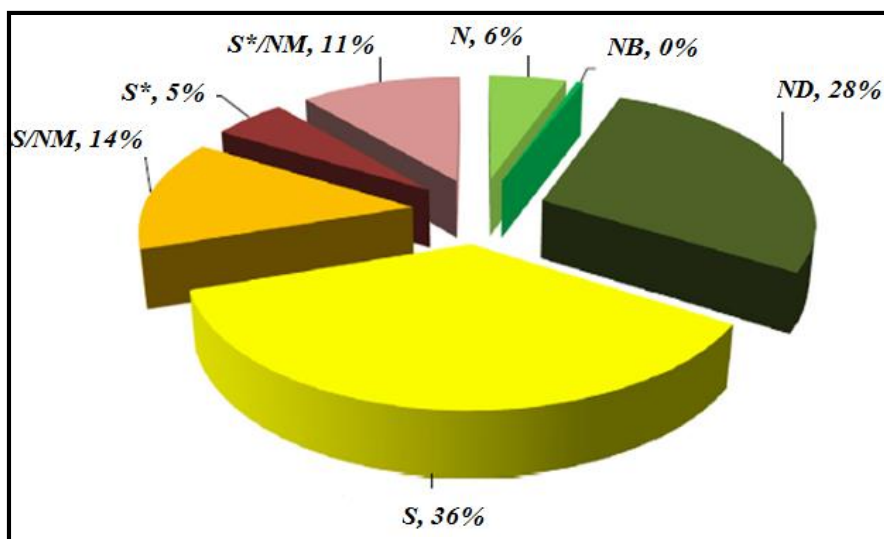
Para evidenciar a importância dos produtos naturais para a descoberta e desenvolvimento de fármacos, CRAIG & NEWMAN (2013) analisaram as fontes de novos fármacos descobertos no período de 01/1981 a 12/2010 e classificaram um total de 1073 moléculas em diferentes classes, de acordo com suas origens (FIGURA 1.2, p. 3).

A análise indica que, enquanto 66% das 1.073 moléculas (novas entidades químicas - NEQs) são formalmente sintéticas, 17% corresponde a moléculas sintéticas contendo farmacóforos derivados diretamente de produtos naturais, classificados como

S* e **S*/NM**. Além disso, 14% são modelados sobre um produto natural inibidor do alvo molecular de interesse, ou mimetiza (isto é, inibe competitivamente) o substrato endógeno do sítio ativo, tal como o ATP (**S/NM**). Portanto, apenas 36% das 1.073 NEQs podem ser classificados como de origem puramente sintética (**S**), isto é, sem nenhum tipo de “inspiração” natural.

FIGURA 1.2: Fontes de fármacos lançados entre 01/1981 e 12/2010.

Fonte: CRAGG & NEWMAN, 2013.



N = produto natural não modificado; **NB** = produto natural botânico; **ND** = produto natural modificado; **S** = composto sintético sem nenhuma concepção de produto natural; **S***, **S*/NM** = composto sintético contendo um farmacóforo derivado de produto natural; **S/NM** = composto sintético modelado com base em um inibidor natural ou mímico do substrato endógeno do sítio ativo.

Portanto, todos esses critérios demonstram que os produtos naturais são capazes de desempenhar um papel significativo na seleção e design de fármacos mais efetivos para aplicações específicas. Nesse sentido, a flora brasileira, considerada a mais rica do mundo em biodiversidade, contendo cerca de 25% das espécies vegetais existentes no planeta (BATALHA & MING, 2003), torna-se uma fonte promissora para identificação de plantas com potencial terapêutico e econômico, o que requer uma abordagem interdisciplinar de estudo químico-biológico e que possibilite o uso sustentável desses recursos naturais.

1.2 - Produtos naturais antitumorais

O câncer é uma doença que afeta cerca de 200 tipos de células. A principal característica é a falta de controle da proliferação, diferenciação e morte celular, invadindo órgãos e tecidos. Há muitas dificuldades no tratamento, sendo as mais frequentes a resistência, toxicidade e baixa especificidade dos fármacos (DE MESQUITA *et al.*, 2009).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), uma entidade especializada da Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou que 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer ocorreram em 2012, comparados com 12,7 e 7,6 milhões, respectivamente, em 2008. Além disso, estimou que há 32,2 milhões de pessoas vivas (acima de 15 anos) que já tiveram câncer diagnosticado, nos últimos cinco anos (IARC, 2013).

Os tipos mais frequentes de câncer diagnosticados mundialmente são o de pulmão (1,8 milhões, 13,0% do total), mama (1,7 milhões, 11,9%) e cólon (1,4 milhão, 9,7%). As causas mais comuns de morte foram provocadas pelos cânceres de pulmão (1,6 milhões, 19,4% do total), fígado (0,8 milhão, 9,1%) e estômago (0,7 milhão, 8,8%) (IARC, 2013).

As projeções baseadas nas estimativas de 2012 preveem um aumento substantivo para 19,3 milhões de novos casos para o ano de 2025, devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial. Mais da metade de todos os casos (56,8%) e de mortes por câncer (64,9%), em 2012, ocorreram em regiões menos desenvolvidas do mundo e essas proporções poderão aumentar ainda mais em 2025 (IARC, 2013).

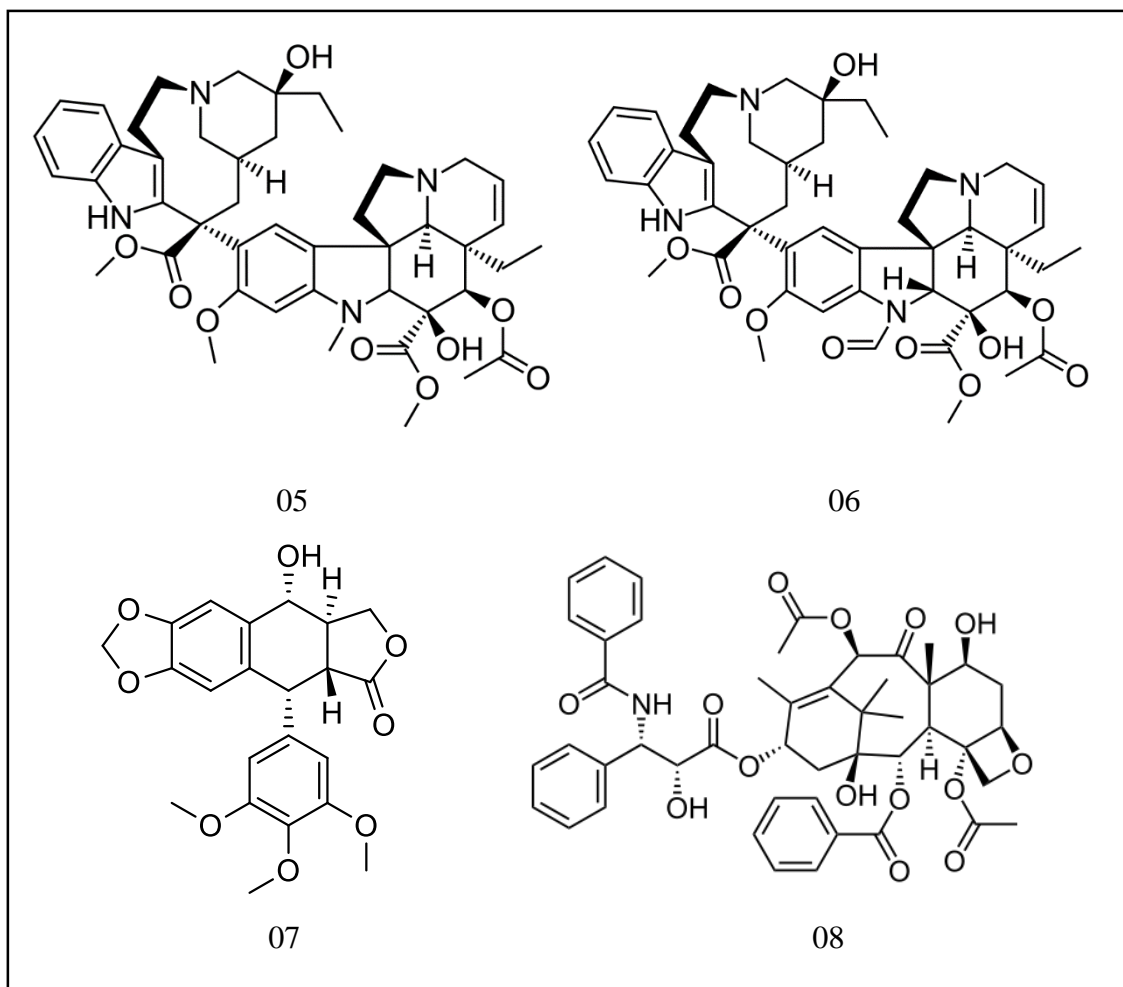
As novas terapias em oncologia estão mudando de agentes puramente citotóxicos e citostáticos para inibidores enzimáticos, alvejando vias de sinalização e agentes que são preferencialmente absorvidos por células cancerígenas ou influenciam a vascularização e adesão ou penetração do tecido (HURYN & WIPF, 2008). Nesse contexto, os produtos naturais continuam despertando o interesse como agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos devido aos seus perfis de toxicidade potencialmente baixa e efetividade elevada (GREENLEE, 2012).

Dos fármacos anticâncer derivados de plantas em uso, destacam-se os alcaloides vimblastina (**05**) e vincristina (**06**), isolados de *Catharantus roseus* (vinca), juntamente com os dois agentes clinicamente ativos, denominados etoposídeo e

teniposídeo, que são derivados semissintéticos do produto natural podofilitoxina (**07**). Paclitaxel (Taxol[®]) (**08**), o agente anticâncer derivado de plantas de maior destaque nos últimos anos, ocorre, juntamente com vários precursores, nas folhas de diversas espécies de *Taxus* (FIGURA 1.3, p. 5) (CRAGG & NEWMAN, 2013).

FIGURA 1.3: Agentes anticâncer derivados de plantas.

Fonte: CRAGG & NEWMAN, 2013.



DE MESQUITA *et al.* (2009) investigou o potencial citotóxico de 412 extratos de 50 plantas do Cerrado, pertencentes a 21 famílias, frente a linhagens de células tumorais de carcinoma do cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435), cérebro (SF-295) e leucemia (HL-60) humanos, relatando que numerosos compostos ativos têm sido estudados com resultados promissores.

As diferentes espécies das famílias Alismataceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Magnoliaceae, Malphiaceae, Meliaceae, Mimosaceae, Monimiaceae, Rubiaceae, Solanaceae, e Vochysiaceae não mostraram atividade

citotóxica significativa na triagem, enquanto os extratos de diferentes partes de plantas da Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Flacourtiaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Simaroubaceae e Zingiberaceae foram ativas. As atividades citotóxicas mais expressivas, baseadas no critério de que extratos com valores de IC₅₀ menores que 30 µg/mL podem ser considerados promissores (SUFNESS & PEZZUTO, 1990), foram detectadas para as espécies *Casearia sylvestres* var. *língua* (Flacourtiaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e *Schinus terebinthifolius* var. *raddianus* (Anacardiaceae), cujos extratos mostrados na TABELA 1.1 (p. 6) apresentaram valores de IC₅₀ menores que 5 µg/mL (DE MESQUITA *et al.*, 2009).

TABELA 1.1: Citotoxicidade *in vitro* de extratos de plantas frente à quatro linhagens de células tumorais pelo teste do MTT.

Espécie de planta	Extrato	Linhagem celular, IC ₅₀ (5 µg/mL)			
		SF-295	HCT-8	MDA-MB-435	HL-60
<i>Casearia sylvestris</i>	hexano das folhas	1,7	3,2	2,1	1,4
	hexano da casca do caule	0,9	0,1	1,2	1,3
	hexano da madeira do caule	0,9	1,3	0,5	2,1
	hexano da madeira da raiz	1,6	1,7	1,1	3,3
<i>Schinus terebinthifolius</i>	hexano das folhas	28,9	5,4	1,9	1,1
	diclorometano das folhas	41,8	4,2	2,3	1,1
<i>Simarouba versicolor</i>	etanólico da raiz	0,1	0,1	0,5	0,2

Fonte: DE MESQUITA *et al.*, 2009.

Ao realizar o fracionamento bioguiado do extrato hexano da casca da raiz de *S. versicolor*, isolou-se o produto natural glaucarubinona, o qual apresentou atividade pronunciada frente às quatro linhagens celulares, com valores de IC₅₀ de 0,07 µg/mL (HL-

60), 0,31 µg/mL (MDA-MB-435), 0,15 µg/mL (HCT-8) e 0,24 µg/mL (SF-295) (DE MESQUITA *et al.*, 2009). Os estudos realizados por (GHOSH *et al.*, 1977) e (ARRIAGA *et al.*, 2002) revelaram a presença de quassinoides, triterpenoides, esteroides e de um derivado do esqualeno no extrato acetona das raízes desta planta. Os esteroides e o derivado do esqualeno isolados da raiz também foram identificados no extrato etanólico do caule e do fruto, respectivamente.

As flores, hastes e folhas de *S. terebenthifolius* são usadas na medicina tradicional para tratamento de tumores e lepra (SCHMOURLO *et al.*, 2005), mostrando que os resultados citotóxicos estão de acordo com o uso medicinal desta espécie.

A população indígena da América do Sul usa *C. sylvestris* para curar doenças como o câncer, diarreias, gripes, lepra tópica e picada de cobras (SILVA *et al.*, 2008). Vários diterpenoides clerodano citotóxicos foram isolados dos extratos das flores e ramos (SHEN *et al.*, 2004) e raízes de *C. membranacea* (CHEN *et al.*, 2008); das folhas e flores de *C. nigrescens* (WILLIAMS *et al.*, 2007); e dos frutos de *C. grewiifolia* (KANOKMEDHAKUL *et al.*, 2005).

Assim, baseado no estudo supracitado, observa-se que a busca de agentes antitumorais em espécies vegetais do Cerrado é de relevância considerável.

1.3 - Cisteíno peptidases lisossomais como alvos terapêuticos

Os dois sistemas principais de degradação intracelular de proteínas existentes são o lisossomal e o ubiquitina-proteasoma. O sistema endolisossomal/lisossomal possui inúmeras funções em processos normais e patológicos e a degradação de proteínas é um resultado da ação de várias proteases (também denominadas peptidases ou enzimas proteolíticas) (TURK *et al.*, 2012).

A fim de atingir eficientemente a degradação de macromoléculas biológicas endolisossomais, os lisossomos contêm diversas hidrolases, incluindo proteases, amilases, lipases e nucleases. Dentre, aproximadamente, cinquenta proteases lisossomais conhecidas, as aspartil, serino e cisteíno proteases apresentam importância particular (TURK *et al.*, 2012).

As cisteíno peptidases (cisteíno - catepsinas) são membros de uma família de enzimas similares a papaína, a maior e mais bem caracterizada família de cisteíno

peptidases. Existem onze catepsinas humanas, as catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W (BARRETT, RAWLINGS, WOESSNER, 2004).

A maioria das catepsinas são expressas em tecidos humanos, tais como as catepsinas L e V, e seus perfis de expressão indicam que estas enzimas estão envolvidas nos processos normais de degradação de proteínas celulares. Já a catepsina K mostrou localização celular mais restrita, indicando funções mais específicas (SALMINEN-MANKONEN, MORKO & VUORIO, 2007).

Tais evidências são suficientes para que as funções fisiológicas possam ser, ao menos parcialmente, atribuídas às suas diferentes localizações dentro e fora das células, o que é consistente com o conceito novo de que proteases são moléculas sinalizadoras importantes, envolvidas nos mecanismos de controle de muitos processos normais e patológicos. Com base na compreensão do papel destas catepsinas em várias doenças, tais como o câncer, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares e doenças parasíticas, terapias novas estão se desenvolvendo com grande probabilidade de serem incorporadas à ensaios clínicos (TURK *et al.*, 2012).

Deste modo, as catepsinas tornam-se alvos terapêuticos importantes nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos para o tratamento de diversas patologias.

1.3.1 - As catepsinas K, L e V

A catepsina K (CatK) é um alvo novo em potencial contra a osteoporose. Esta protease está localizada nos osteoclastos e é a enzima chave envolvida na remodelagem óssea. É altamente expressa durante a reabsorção dos osteoclastos (LECAILLE, BROMME & LALMANACH, 2008).

Muitas matrizes ósseas podem ser decompostas pela CatK, incluindo os colágenos do tipo I e II, osteopontina e osteonectina. Osteoporose é caracterizada como a perda persistente de massa e diminuição da densidade óssea devido ao aumento direto ou indireto da reabsorção óssea pelos osteoblastos sob formação (SHI, LIU & WU, 2011).

Os osteoclastos liberam protease lisossomal nos intervalos entre a membrana celular e a matriz óssea para o processo de reabsorção, na qual a CatK pode ser a protease mais importante, uma vez que ela é expressa durante todo o processo de

diferenciação de osteoclastos. Deste modo, CatK é um biomarcador altamente sensível e específico para esta doença (SHI, LIU & WU, 2011).

A catepsina L (CatL), juntamente com a B, está envolvida no desenvolvimento de processos neoplásicos em humanos. A secreção dessa catepsina por células tumorais resulta na degradação da matriz extracelular e na lise da membrana basal, as quais são indispensáveis para a progressão de tumores. A habilidade de células tumorais de secretar proteases correlaciona-se com seu potencial invasivo e metastático. O aumento da expressão das catepsinas B, L e D foi observado em carcinomas da mama, cânceres de pulmão, estômago e melanomas (KHALIKOVA *et al.*, 2005). A CatL também foi associada a processos de diferenciação queratinocita, funções reprodutivas e cardíacas (MARQUES *et al.*, 2012).

A catepsina V (CatV) é uma elastase altamente efetiva, cuja expressão é restrita ao timo e aos testículos, e está implicada na degradação fisiológica e patológica da matriz extracelular. Em condições patológicas essa enzima foi considerada um marcador em potencial para o diagnóstico de tumores do cólon e é expressa em carcinomas da mama e do reto, mas não no cólon ou tecido da mama normais. Acredita-se que a Cat. V desempenha um papel na progressão do câncer, tornando-se portanto, um alvo valioso para oncologia (DU *et al.*, 2013).

A CatV também foi identificada como tendo a atividade elastolítica mais potente expressa em macrófagos ativados e, juntamente com as catepsinas L, K e S, está envolvida na aterosclerose (WILDER *et al.*, 2011).

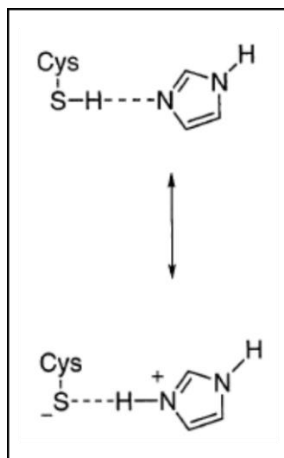
1.3.2 - Aspectos estruturais e mecanismo de ação das catepsinas

As proteases catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas, a qual se trata de uma reação energeticamente favorável, mas extremamente lenta na ausência de um catalisador (POWERS *et al.*, 2002).

A atividade proteolítica das catepsinas se deve a três resíduos: Cys25, His159 e Asn175 (numeração da papaína). Portanto, esta enzima possui um sítio ativo nucleofílico e um resíduo básico que também pode atuar como ácido no mecanismo catalítico, conforme mostrado na FIGURA 1.4 (p. 10) (POWERS *et al.*, 2002).

FIGURA 1.4: Resíduos do sítio ativo das cisteíno proteases.

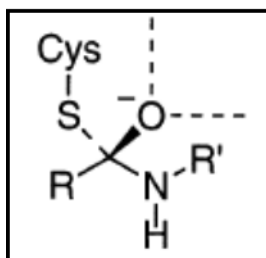
Fonte: POWERS *et al.*, 2002.



Os estados de transição para as cisteíno proteases envolve a formação de um intermediário tetraédrico, mostrado na FIGURA 1.5 (p. 10). O oxianion do intermediário formado é estabilizado pelas interações com vários grupos através de ligações de hidrogênio.

FIGURA 1.5: Estado de transição para a hidrólise de ligações peptídicas por cisteíno proteases.

Fonte: POWERS *et al.*, 2002.

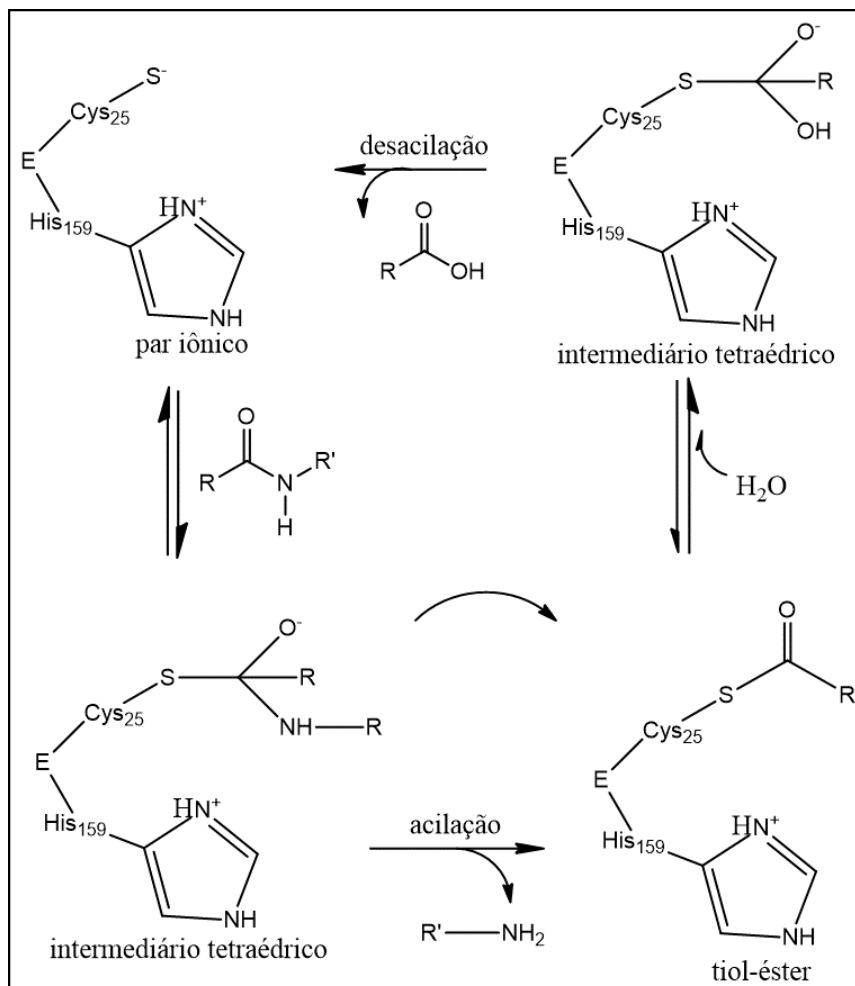


De maneira mais específica, Cys25 e His159 formam um par iônico que é estabilizado por ligação de hidrogênio pelo resíduo Asn175. O resíduo nucleofílico (Cys25) deve ser pré-ativado para ficar ionizado e, assim, reagir com o substrato. Durante a hidrólise do peptídeo, o nucleófilo (S^-) ataca o carbono do grupo carbonila da ligação peptídica pertencente ao substrato, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Em seguida, por um processo de acilação, este intermediário libera a porção C-terminal do substrato, deixando a enzima acilada (E-S-tiol-éster). Uma hidrólise forma um segundo intermediário tetraédrico e este, por sua vez, sofre uma reação de desacilação,

liberando a porção N-terminal e a enzima livre ao meio (FIGURA 1.6, p. 11) (LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002).

FIGURA 1.6: Mecanismo de hidrólise de peptídeos por cisteíno peptidases.

Fonte: LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002.



Cabe ressaltar que a busca por inibidores específicos das catepsinas K, L e V (ou seja, compostos capazes de inibir a atividade de apenas uma delas) consiste em um grande desafio, diante da similaridade estrutural que estas enzimas apresentam.

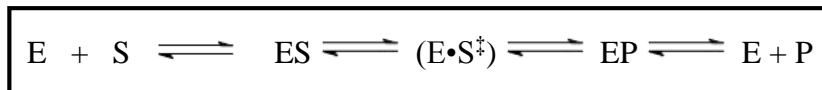
1.3.3 - Inibidores naturais

Embora as catepsinas tenham sido intensivamente estudadas como alvos promissores para a descoberta e desenvolvimento de fármacos, poucos inibidores baseados em produtos naturais foram descritos na literatura (MARQUES *et al.*, 2012).

Os inibidores enzimáticos podem ser classificados em inibidores reversíveis, os quais associam-se à enzima através de ligações intermoleculares não-covalentes (E•I), e irreversíveis, cuja associação se dá covalentemente (E-I). Os irreversíveis causam inativação enzimática, enquanto os reversíveis podem se ligar a várias espécies de enzima em equilíbrio e não provocam modificações estruturais na mesma, de modo que a atividade pode ser recuperada com a remoção do inibidor (EL-METWALLY & EL-SENOSI, 2010).

Esses compostos são capazes de reduzir as velocidades de reações catalisadas por enzimas, as quais ocorrem, geralmente, através da associação de uma enzima (E) ao seu substrato (S), levando à formação de um complexo denominado complexo enzima-substrato (E•S), o qual em sequência, passa rapidamente por um estado de transição ($E\cdot S^\ddagger$), formando o complexo enzima-produto (E•P), que se dissocia prontamente liberando a enzima (E) inalterada e o produto (P) (FIGURA 1.7, p. .12) (COPELAND, 2000).

FIGURA 1.7: Equilíbrio cinético entre enzima e substrato.

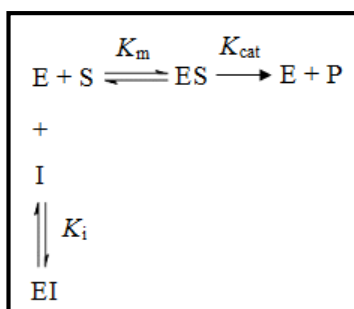


O planejamento racional de fármacos através de inibição enzimática requer que os candidatos a inibidores sejam capazes de ligar-se a enzima de forma rápida e reversível, não promovendo alterações estruturais na mesma e permitindo assim a formação do complexo enzima-inibidor (E•I).

Os inibidores reversíveis são classificados em:

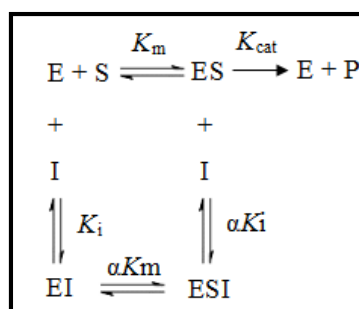
- competitivo: compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima, resultando na formação da espécie E•S ou E•I. Trata-se de um tipo de inibidor que possui estrutura semelhante a do substrato natural da enzima, fazendo com o mesmo seja reconhecido. Porém, como apresenta diferenças estruturais, não sofre reação e portanto, não leva a formação do produto (NELSON & COX, 2008), conforme mostrado na FIGURA 1.8 (p. 13).

FIGURA 1.8: Esquema clássico de inibição competitiva.



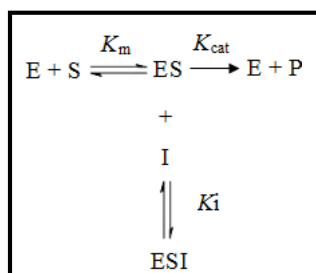
- Não-competitivo: é capaz de se ligar à enzima livre para formar o complexo E•I ou, ainda, ao complexo E•S, para formar o complexo E•S•I, ambos cataliticamente inativos; liga-se ao sítio alostérico da enzima, induzindo mudanças conformacionais no sítio ativo da mesma, o que impede a interação efetiva com o substrato natural (FIGURA 1.9, p. 13) (NELSON & COX, 2008).

FIGURA 1.9: Esquema clássico de inibição não-competitiva.



- incompetitivo: liga-se apenas ao complexo E•S, alterando a atividade catalítica da enzima sem, no entanto, alterar a interação com o substrato (FIGURA 1.10, p. 13) (NELSON & COX, 2008).

FIGURA 1.10: Esquema clássico de inibição incompetitiva.



Os inibidores candidatos à fármacos podem ser reversíveis (competitivos, não-competitivos ou incompetitivos) ou irreversíveis, embora este último tenha aplicação terapêutica limitada (SHARMA, 2012).

1.4 - O Cerrado brasileiro e suas potencialidades

O Cerrado (savana brasileira) é um domínio fitogeográfico em que a fisionomia de savana predomina, mas este ambiente também contém floresta ripariana, floresta sazonal semi-decídua, floresta sazonal decídua, campo úmido, entre outros (FIGURA 1.11, p. 14) (NOVAES *et al.*, 2013).

FIGURA 1.11: Região do Cerrado Brasileiro

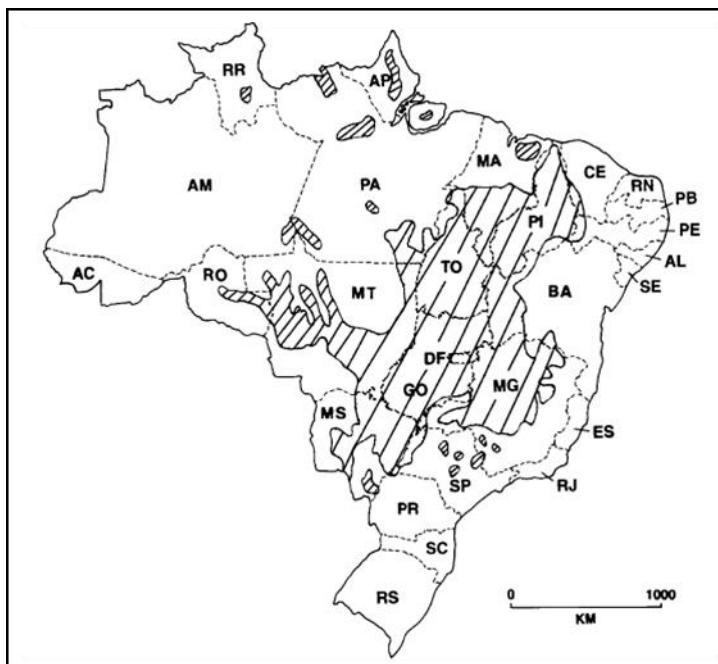
(Disponível em: <http://www.sciencemag.org/>. Acessado em 04/01/2014)



Esse ambiente estende-se pelos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Tocantins e São Paulo (NOVAES *et al.*, 2013) (FIGURA 1.12, p. 15). A área original total de Cerrado era de 205 milhões de hectares (IBGE, 2014), constituindo a segunda maior formação vegetal brasileira, superada apenas pela Floresta Amazônica (FORZZA *et al.*, 2010).

FIGURA 1.12: Extensão do domínio do Cerrado no Brasil.

Fonte: NOVAES *et al.*, 2013.



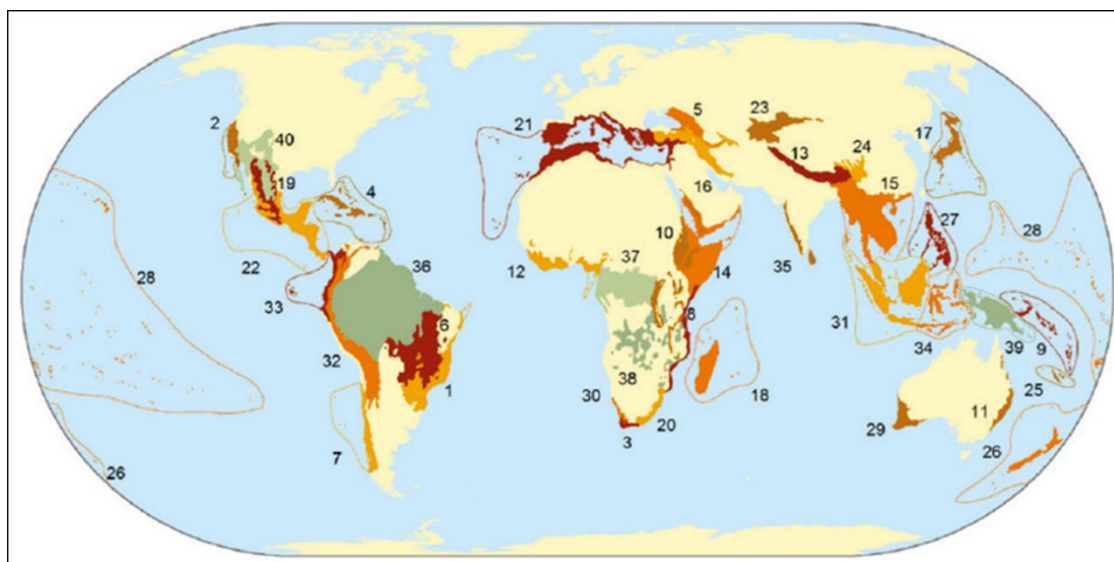
O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana tropical mais rica do planeta, com mais de 12.000 espécies de plantas, das quais pelo menos 30% são endêmicas. As famílias de angiospermas de maior predominância são: Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae, Poaceae, Eriocaulaceae, Melastomataceae e Rubiaceae (FORZZA *et al.*, 2010).

Porém, de acordo com SANO *et al.* (2008), esse domínio é o mais fragmentado do Brasil, restando apenas cerca de 20% de vegetação nativa. As ameaças mais graves à sua conservação são o desmatamento e sua fragmentação, a degradação do solo, e dispersão de espécies exóticas de culturas e pastagens, como soja e grama africana (CARMO, VASCONCELOS & ARAÚJO, 2011). Esta situação compromete a aquisição de informações sobre muitas espécies, que estão sob o risco de serem extintas antes mesmo de estudadas.

O conceito de *hotspots* de biodiversidade foi definido inicialmente por MEYERS (1988), como áreas com concentrações excepcionais de espécies endêmicas e perda excepcional de habitat. Essa definição surgiu da necessidade de identificar áreas prioritárias, uma vez que o número de espécies ameaçadas supera os recursos de conservação. Desta forma, ao concentrar esforços nas áreas onde a necessidade é maior e o retorno também poderia ser, e a conservação seria mais efetiva.

De acordo com GORENFLO *et al.* (2012), existem trinta e cinco *hotspots* de biodiversidade na Terra (FIGURA 1.13, p. 16), os quais abrangem 2,3% da superfície e contêm mais de metade das espécies de plantas do mundo e 43% das espécies de vertebrados terrestres da Terra. Além disso, existem cinco áreas selvagens de biodiversidade elevada, as quais também são ricas em espécies endêmicas e são regiões amplas (de no mínimo 10.000 km²), com impacto humano relativamente baixo, apresentando perda de 30% ou menos de seu habitat natural.

FIGURA 1.13: *Hotspots* de biodiversidade (regiões de 1 - 35) e áreas selvagens de biodiversidade elevada (regiões de 36 - 40). Fonte: GORENFLO *et al.*, 2012.



1: Mata Atlântica; 2: Província Florística da Califórnia; 3: Região Florística do Cabo; 4: Ilhas do Caribe; 5: Caucasus; 6: Cerrado; 7: Floresta Chilena Chuvosa de Inverno de Valdivian; 8: Florestas Costeiras do Leste da África; 9: Ilhas da Melanésia do Norte; 10: Afromontana do Leste; 11: Florestas do Leste da Austrália; 12: Florestas da Guiné da África Ocidental; 13: Himalaia; 14: Chifre da África; 15: Indo-Birmânia; 16: Irano-Anatoliano; 17: Japão; 18: Ilhas de Madagascar e do Oceano Índico; 19: Florestas de Pinho-Carvalho de Madrean; 20: Maputalandia - Pondolandia - Albania; 21: Bacia Mediterrânea; 22: Mesoamérica; 23: Montanhas da Ásia Central; 24: Montanhas do Sudoeste da China; 25: Nova Caledônia; 26: Nova Zelândia; 27: Filipinas; 28: Polinésia-Micronésia; 29: Sudoeste da Austrália; 30: Karoo Suculento; 31: Sundalândia; 32: Andes Tropicais; 33: Tumbes - Chocó - Madalena; 34: Wallacea; 35: Ghats Ocidentais e Sri Lanka; 36: Amazonia; 37: Florestas do Congo; 38: Florestas Miombo-Mopano e Savanas; 39: Nova Guiné; 40: Desertos Norte Americanos.

Apesar de sua grande importância e diversidade, o Cerrado ainda permanece pouco explorado do ponto de vista químico-biológico, pois mesmo com o crescimento do número de prospecções, resta uma enorme quantidade de espécies a ser estudada. E, embora as plantas medicinais representem um mercado importante dos

pontos de vista terapêutico e econômico no Brasil, os conhecimentos acerca de bioprospecção ainda são muito limitados, despertando interesse especial para sua conservação e para o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem o uso racional de seus recursos (HANAZAKI *et al.*, 2000).

Por esses aspectos, esse ambiente constitui uma fonte promissora de substâncias bioativas e, neste contexto, estudos de caráter químico biológico de espécies desse domínio contribuem para aquisição de informações de grande utilidade para ecologia química, quimiotaxonomia e descoberta de fármacos.

1.5 - A família Fabaceae

A Fabaceae constitui a terceira maior família entre as Angiospermas, sendo formada por 36 tribos, 727 gêneros e 19.325 espécies, distribuídas por todos os continentes, exceto pela Antártica (LEWIS *et al.*, 2005; WINK & MOHAMED, 2003).

Segundo DUTRA, MESSIAS & GARCIA (2005), no Brasil há cerca de 2.100 espécies reunidas em 188 gêneros, distribuídos pela Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Floresta Amazônica.

A principal característica que une as espécies desta família é o fruto (FARIA, SANO & COSTA, 2006), e as plantas constituintes se apresentam desde de árvores gigantescas até pequenas ervas (RAVEN, EVERT & EICHHORN, 1996).

As espécies pertencentes à Fabaceae apresentam grande importância econômica para o homem, visto que muitas fornecem grãos comestíveis como soja, amendoim e ervilha (SOSULSKI & SOSULSKI, 2006), madeira como jacarandá e sucupira (LORENZI, 2002) e propriedades medicinais, como a copaíba (TAMBE *et al.*, 1996).

1.6 - O gênero *Hymenaea* e a espécie *H. stigonocarpa*

O nome *Hymenaea* é proveniente da palavra “*hymen*” que significa “deus das uniões” devido às duas folhas unidas (folíolos), características das espécies que compõem o gênero (BARROSO, 1991), o qual pertencente à tribo Detarieae, e é formado por catorze espécies, cinco delas apresentando variedades. Sua ocorrência se dá em clima

tropical e subtropical, principalmente na África e América do Sul. No Brasil, é encontrado em todo o território nacional (LEE & LANGENHEIM, 1975).

A espécie *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne (FIGURA 1.14, p. 18) está distribuída nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, e Tocantins (DE ALMEIDA, 1998).

As árvores desta espécie são de pequeno a médio porte, variando de 3 a 10 m de altura, e apresentam copa frondosa e tronco de 30 a 50 cm de diâmetro (LORENZI, 1998). As flores (produzidas de janeiro a março, durante a estação chuvosa) são consideradas as maiores do gênero (GIBBS, OLIVEIRA & BIANCHI, 1999). O fruto é robusto (10 a 20 cm de comprimento e 4 a 6 cm de largura), com polpa farinácea, adocicada e comestível pelo homem e por espécies da fauna (ROCHA *et al.*, 1994). A farinha, por ser rica em nutrientes, é usada para preparação de bolos, pães, biscoitos e cereais (RODRIGUES ORSI *et al.*, 2012).

FIGURA 1.14: A espécie *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne.



O jatobá-do-cerrado, como é conhecida popularmente esta planta, é uma árvore ornamental e, por isso, é muito usada em reflorestamento de áreas degradadas para recomposição da vegetação arbórea (LORENZI, 1998). Sua madeira é pesada, dura, resistente e durável sob exposição a intempéries (CORRÊA, 1984) e por isso é muito empregada na construção civil e também naval (DE ALMEIDA, 1998), apresentando assim, importância econômica para o homem.

1.7 - Estudos químicos de *H. stigonocarpa*

A prospecção química de plantas endêmicas brasileiras, principalmente daquelas que possuem relatos de aplicações na medicina popular, é extremamente importante para o país, visto que grupos de pesquisa de outras nações podem patentear o uso destas espécies, apoderando-se da riqueza nacional. Além disso, muitas destas espécies encontram-se ameaçadas de extinção e podem deixar de existir antes mesmo de serem estudadas.

As espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas por conterem, principalmente, diterpenoides do tipo *enantio*-labdanoico na resina do tronco e no extrato das cascas, e diterpenoides *ent*-halimano na resina da semente (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Além desta classe de substâncias, alguns estudos químicos demonstraram a presença de sesquiterpenoides (LANGENHEIM & HALL, 1983; AGUIAR *et al.*, 2010), ácidos graxos (MATUDA & MARIA NETTO, 2005) e flavonoides (MARANHÃO *et al.*, 2013) em diferentes partes de plantas deste gênero.

Os dados obtidos através de uma revisão bibliográfica sobre as substâncias isoladas de *Hymenaea* estão compilados nas TABELAS 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6 (p. 20 - 34).

TABELA 1.2: Diterpenoides isolados de *Hymenaea spp.*

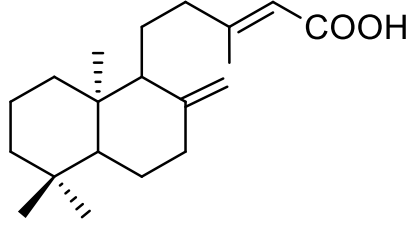
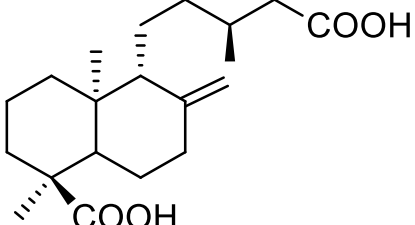
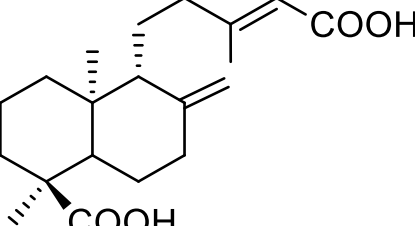
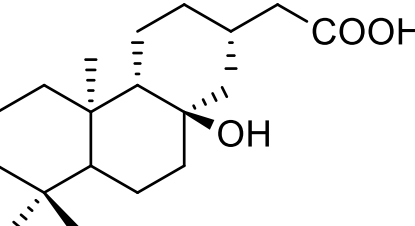
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">09 ácido copálico</p>	Resina comercial	NAKANO & DJERASSI, 1961
<i>H. oblongifolia</i>	 <p style="text-align: center;">10 ácido <i>ent</i>-labd-8(20)-en-15,18-dioico</p>	Resina do tronco	CUNNINGHAM, MARTIN & LANGENHEIM, 1973
	 <p style="text-align: center;">11 ácido <i>ent</i>-labd-8(20), 13-dien-15,18-dioico</p>		
<i>H. parvifolia</i>	 <p style="text-align: center;">12 ácido <i>ent</i>-13-epilabdânico</p>	Resina do tronco	

TABELA 1.2 (continuação)

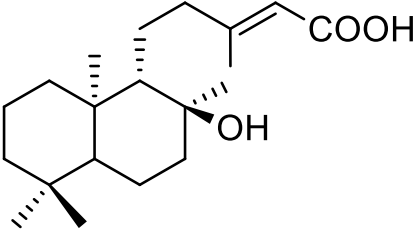
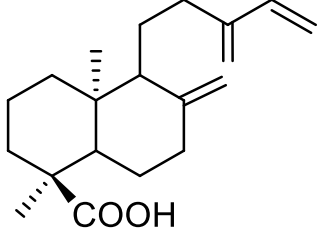
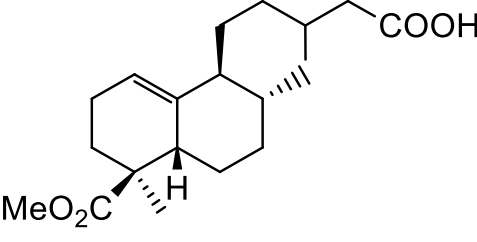
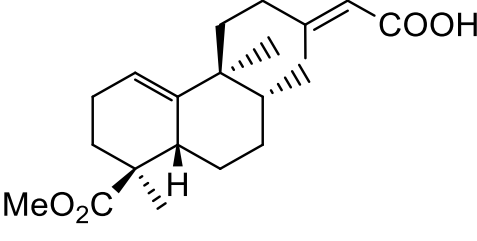
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">13 ácido lab-13-en-8β-ol-15-oico</p>	Resina do tronco	CUNNINGHAM, MARTIN & LANGENHEIM, 1973
<i>H. verrucosa</i>	 <p style="text-align: center;">14 ácido <i>ent</i>-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico</p>	Resina do tronco	MARTIN & LANGENHEIM, 1974
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">15 <i>ent</i>-halima-1(10)-en-15,18-dioato de metila</p>	Resina da casca do fruto	KHOO, OEHLSHLAGER & OURISSON, 1973
	 <p style="text-align: center;">16 <i>ent</i>-halima-1(10),13-dien-15,18-dioato de metila</p>		

TABELA 1.2 (continuação)

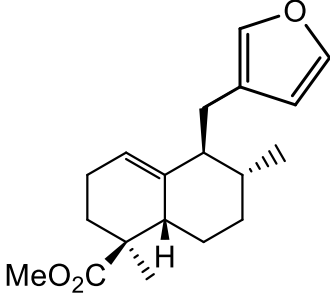
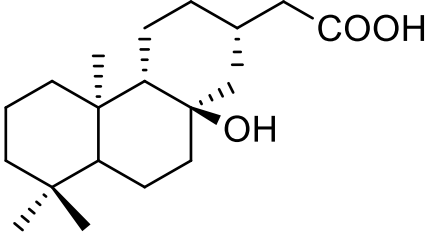
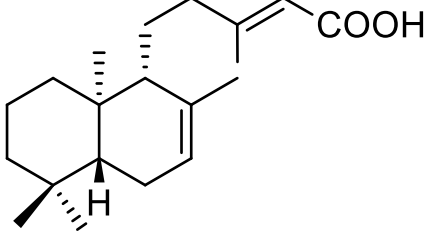
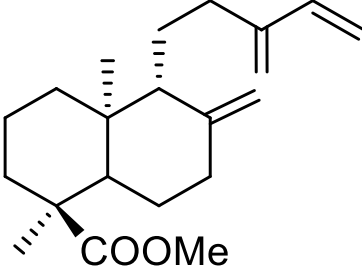
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">17 <i>ent</i>-(8<i>R</i>)-8-metildaniela-1(10)-en-18-oato de metila</p>	Resina da casca do fruto	KHOO, OEHLSHLAGER & OURISSON, 1973
	 <p style="text-align: center;">18 Ácido labdan-8β-ol-15-oico</p>	Resina do tronco	MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO, 1975
	 <p style="text-align: center;">19 ácido <i>ent</i>-labd-7,13(<i>E</i>)-dien-15-oico</p>		
<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	 <p style="text-align: center;">20 ozato de metila</p>	Casca do fruto	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001

TABELA 1.2 (continuação)

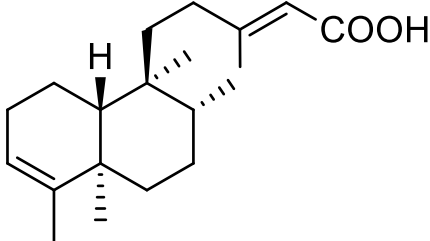
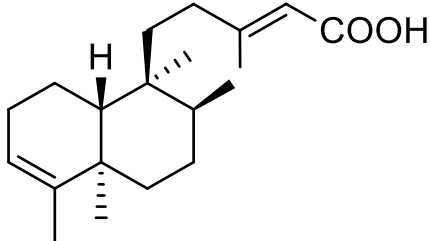
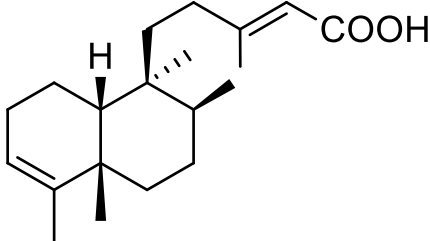
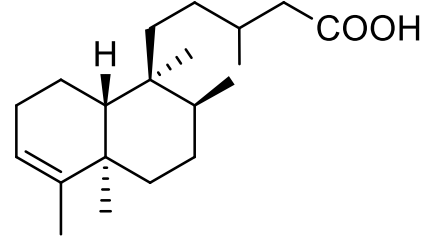
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	 <p style="text-align: center;">21 ácido colavênico</p>	Casca do fruto	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001
	 <p style="text-align: center;">22 ácido <i>ent</i>-(5<i>R</i>, 8<i>S</i>, 9<i>S</i>, 10<i>R</i>)-cleroda-3,13(<i>E</i>)-dien-15-oico</p>		
	 <p style="text-align: center;">23 ácido <i>ent</i>-(5<i>S</i>, 8<i>S</i>, 9<i>S</i>, 10<i>R</i>)-cleroda-3,13(<i>E</i>)-dien-15-oico</p>		
<i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i>	 <p style="text-align: center;">24 ácido <i>ent</i>-(5<i>R</i>, 8<i>S</i>, 9<i>S</i>, 10<i>R</i>)-cleroda-3-en-15-oato de metila</p>	Casca do tronco	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002

TABELA 1.2 (continuação)

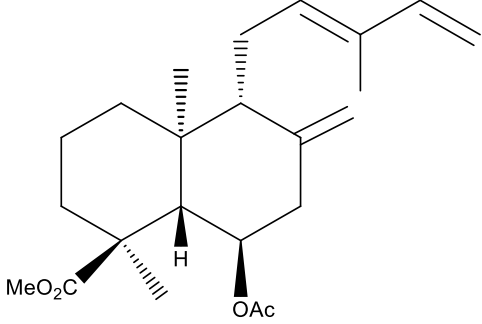
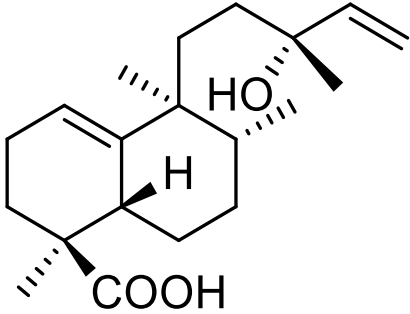
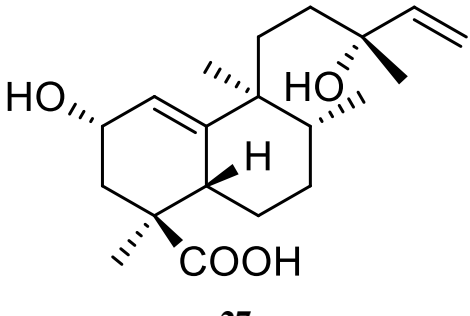
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<p><i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i></p>	 <p style="text-align: center;">25 zanzibarato de metila</p>	<p>Casca do fruto</p>	<p>NOGUEIRA <i>et al.</i>, 2002</p>
<p><i>H. courbaril</i></p>	 <p style="text-align: center;">26 ácido <i>ent</i>-(13<i>R</i>)-13-hidroxi- 1(10),14-halimadien-18-oico</p>  <p style="text-align: center;">27 ácido <i>ent</i>-(2<i>S</i>, 13<i>R</i>)-2,13-diidroxi- 1(10),14-halimadien-18-oico</p>	<p>Folhas, tronco e galhos</p>	<p>ABDEL- KADER <i>et al.</i>, 2001</p>

TABELA 1.2 (continuação)

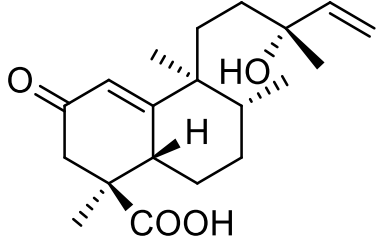
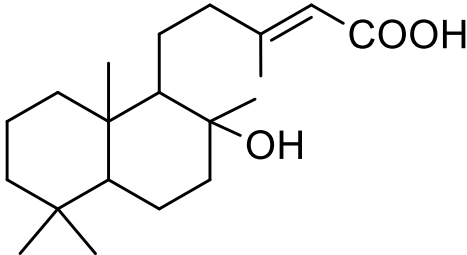
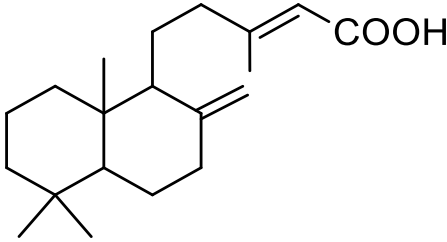
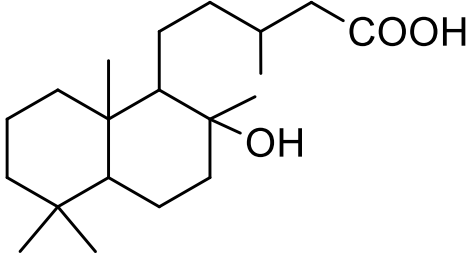
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">28</p> <p style="text-align: center;">ácido <i>ent</i>-(13<i>R</i>)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-halimadien-18-oico</p>	Folhas, tronco e galhos	ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 2001
	 <p style="text-align: center;">29</p> <p style="text-align: center;">ácido labd-13(<i>E</i>)-en-8-ol-15-oico</p>		
	 <p style="text-align: center;">30</p> <p style="text-align: center;">ácido labd-8(17),13(<i>E</i>)-dien-15-oico</p>	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007
	 <p style="text-align: center;">31</p> <p style="text-align: center;">ácido labdanolico</p>		

TABELA 1.2 (continuação)

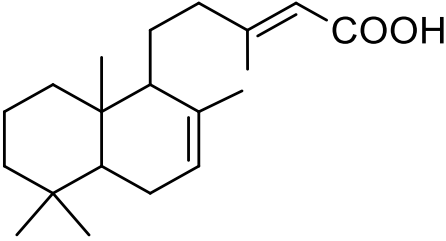
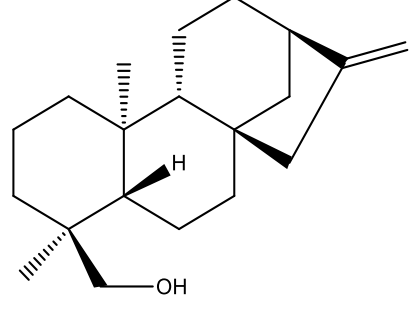
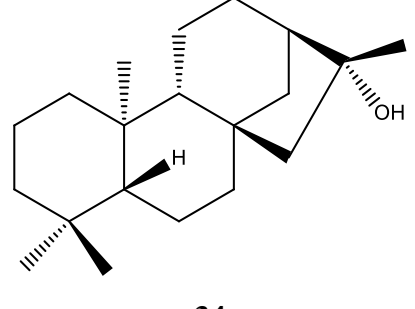
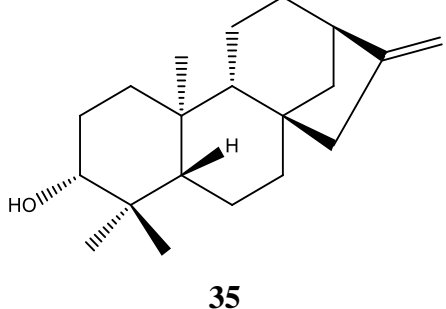
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">32 ácido labd-7,13(E)-dien-15-oico</p>	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007
<i>H. stigonocarpa</i>	 <p style="text-align: center;">33 caur-16-en-18-ol</p>	Epicarpo do fruto	ANDREÃO, 2010
	 <p style="text-align: center;">34 cauran-16α-ol</p>		
	 <p style="text-align: center;">35 caur-16-en-3α-ol</p>		ANDREÃO, 2010

TABELA 1.2 (conclusão)

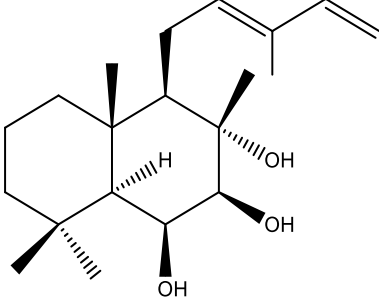
Espécie	Diterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p data-bbox="574 694 742 772">36 crotomaclina</p>	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007

TABELA 1.3: Sesquiterpenoides isolados de *Hymenaea spp.*

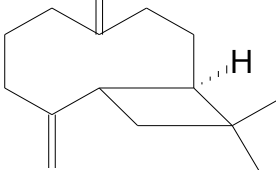
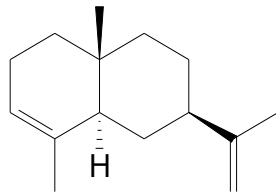
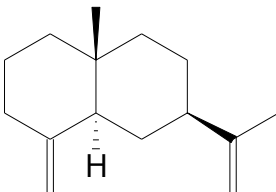
Espécie	Sesquiterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p data-bbox="582 1198 726 1288">37 cariofileno</p>	Folhas	MARTIN, LANGENHEIM & ZAVARIN, 1972
	 <p data-bbox="582 1556 726 1646">38 α-selineno</p>		
	 <p data-bbox="582 1915 726 2004">39 β-selineno</p>		

TABELA 1.3 (continuação)

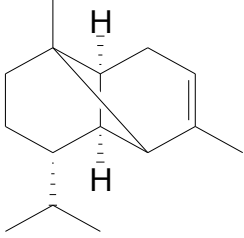
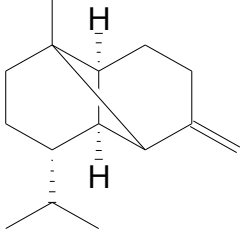
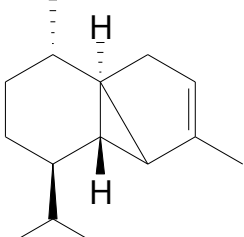
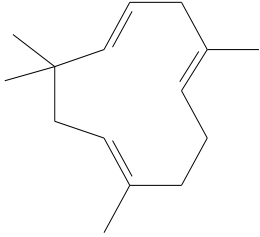
Espécie	Sesquiterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p data-bbox="635 593 673 627">40</p> <p data-bbox="587 660 721 694">α-copaeno</p>	Folhas	MARTIN, LANGENHEIM & ZAVARIN, 1972
	 <p data-bbox="635 1008 673 1041">41</p> <p data-bbox="587 1075 721 1108">β-copaeno</p>		
	 <p data-bbox="635 1433 673 1467">42</p> <p data-bbox="587 1500 721 1534">α-cubebeno</p>		
	 <p data-bbox="635 1848 673 1881">43</p> <p data-bbox="587 1915 721 1948">α-humuleno</p>		

TABELA 1.3 (continuação)

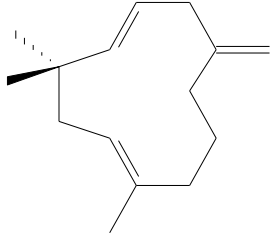
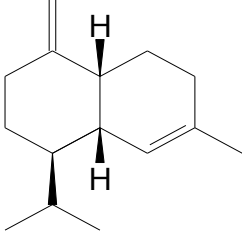
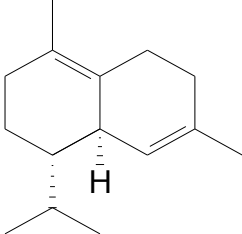
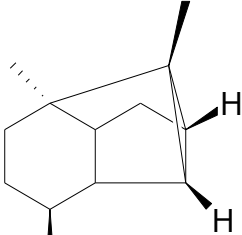
Espécie	Sesquiterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p data-bbox="639 591 676 618">44</p> <p data-bbox="580 647 735 680"><i>β</i>-humuleno</p>	Folhas	MARTIN, LANGENHEIM & ZAVARIN, 1972
	 <p data-bbox="639 990 676 1016">45</p> <p data-bbox="580 1046 735 1079"><i>γ</i>-muuroloeno</p>		
	 <p data-bbox="639 1384 676 1411">46</p> <p data-bbox="580 1440 730 1473"><i>δ</i>-cadineno</p>		
	 <p data-bbox="639 1841 676 1868">47</p> <p data-bbox="580 1897 740 1930">ciclosativeno</p>	Casca do fruto	KHOO, OEHLISHLAGER & OURISSON, 1973

TABELA 1.3 (continuação)

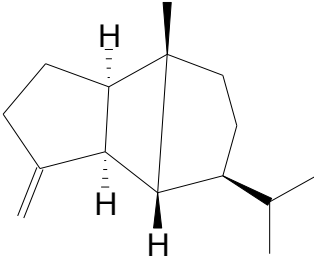
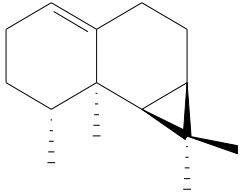
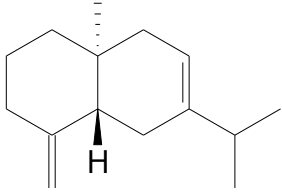
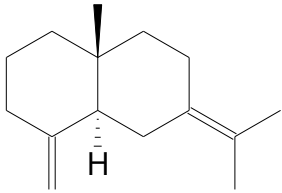
Espécie	Sesquiterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">48 <i>β</i>-bourboneno</p>	Casca do fruto	<p style="text-align: center;">KHOO, OEHLSHLAGER & OURISSON, 1973</p>
	 <p style="text-align: center;">49 calareno</p>		
	 <p style="text-align: center;">50 selina-4(15)-7-dieno</p>		
	 <p style="text-align: center;">51 selina-4(15), 7(11)- dieno</p>		

TABELA 1.3 (conclusão)

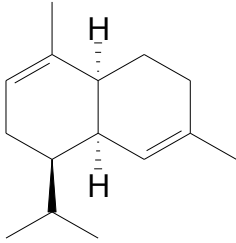
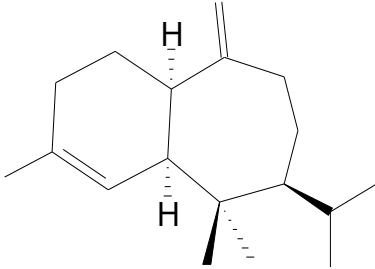
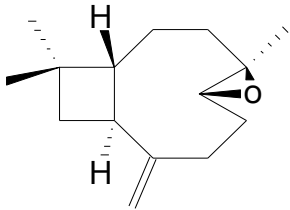
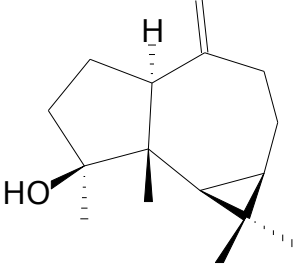
Espécie	Sesquiterpenoide	Parte da planta	Referência
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">52 α-muuroleno</p>	Casca do fruto	KHOO, OEHLSHLAGER & OURISSON, 1973
	 <p style="text-align: center;">53 α-himacaleno</p>		
<i>H. courbaril</i> var. <i>altissima</i>	 <p style="text-align: center;">54 óxido de cariofileno</p>	Casca do fruto	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002
<i>H. courbaril</i>	 <p style="text-align: center;">55 espatulenol</p>	Casca do fruto	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007

TABELA 1.4: Ácidos graxos identificados do gênero *Hymenaea*.

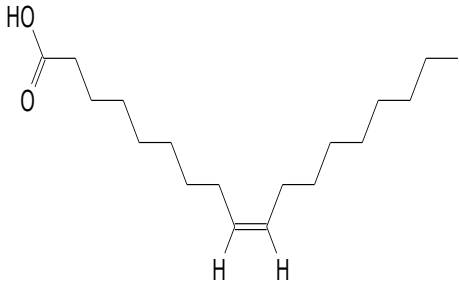
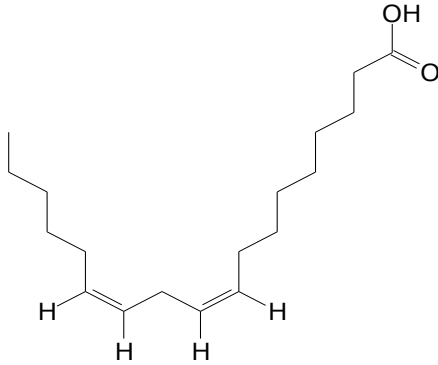
Espécie	Ácido graxo	Parte da planta	Referência
<i>H. stigonocarpa</i>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ 56 ácido palmítico	Semente	MATUDA & MARIA NETTO, 2005
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ 57 ácido esteárico		
	 58 ácido oleico		
	 59 ácido linoleico		

TABELA 1.4 (conclusão)

Espécie	Ácido graxo	Parte da planta	Referência
<i>H. stigonocarpa</i>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ 60 ácido eicosanoico	Semente	MATUDA & MARIA NETTO, 2005

TABELA 1.5: Flavonoides isolados do gênero *Hymenaea*.

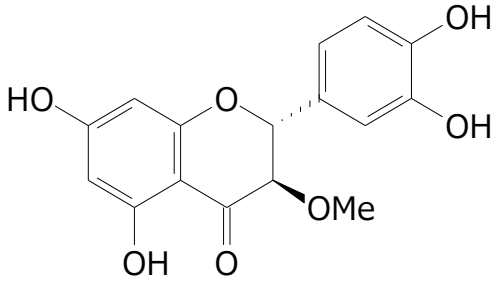
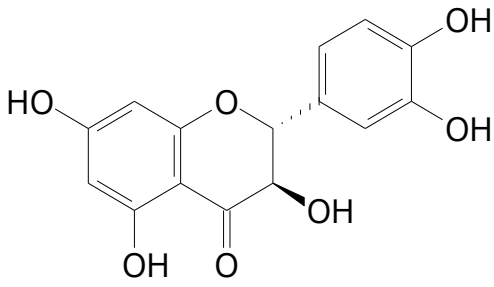
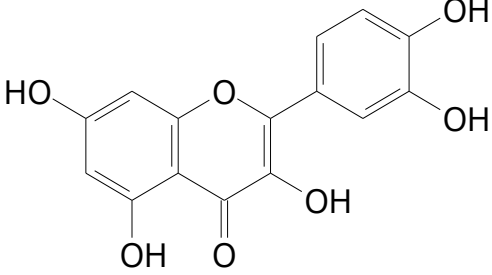
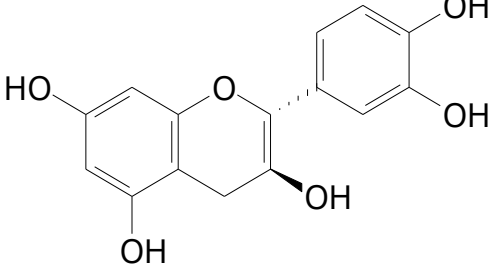
Espécie	Flavonoides	Parte da planta	Referência
<i>H. stigonocarpa</i>	 61 hultenina	Cerne	MARANHÃO <i>et al.</i> , 2013
	 62 taxifolina		

TABELA 1.5 (conclusão)

Espécie	Flavonoides	Parte da planta	Referência
<i>H. stigonocarpa</i>	 <p style="text-align: center;">63 quercetina</p>	Cerne	MARANHÃO <i>et al.</i> , 2013
	 <p style="text-align: center;">64 7-metoxicatequina</p>		

Nesse contexto, o estudo químico de *H. stigonocarpa* é relevante para a caracterização química desta espécie, uma vez que ampliará o conhecimento das classes de metabólitos secundários produzidos pela mesma, bem como para avaliação da atividade biológica dos compostos isolados, frente aos alvos selecionados.

1.8 - Aplicações de *H. stigonocarpa* na medicina popular e estudos biológicos

Existem diversos relatos de utilização de *H. stigonocarpa* na medicina popular brasileira para diferentes tratamentos. Segundo GUARIM NETO & MORAIS (2003), as cascas em infusão são usadas no combate de febres; a resina fervida é empregada no tratamento de problemas respiratórios, como vermífugo e para aliviar dores no estômago, no peito e nas costas. Além disso, PANIZZA (1998) relata que um

preparado a partir do chá das cascas dos galhos picadas e mel pode ser utilizado no tratamento de problemas como tosse, bronquite, catarro, asma e fraqueza pulmonar, diarreia, disenteria e cólica intestinal. Já a casca em cozimento é indicada para combater hemoptises e hematúria (BONTEMPO, 2000).

Outros relatos indicam o emprego da casca do caule e do fruto para tratar dores gástricas, úlcera, diarreia e como anti-inflamatório (GRANDI *et al.*, 1989). Com base nas indicações etnofarmacológicas e na falta de evidências científicas comprovando esses efeitos, RODRIGUES ORSI *et al.* (2012) investigou a ação do extrato metanólico da casca e da polpa dos frutos de *H. stigonocarpa* em úlceras gástrica e duodenal e JAYAPRAKASAM *et al.* (2007) avaliou a atividade anti-inflamatória dos constituintes isolados da espécie *H. courbaril* frente às enzimas ciclooxigenase-1 e -2. Os resultados desses estudos são apresentados nas seções subsequentes (1.8.1 e 1.8.2).

1.8.1 - Ação gastroprotetora e anti-inflamatória intestinal de *H. stigonocarpa*

Segundo os ensaios realizados por RODRIGUES ORSI *et al.* (2012), o extrato metanólico das cascas desta planta desempenha ação gastroprotetora contra vários agentes ulcerogênicos; e que os extratos metanólicos das cascas do caule e da polpa dos frutos de jatobá possuem atividade anti-inflamatória intestinal (ORSI, SEITO & DI STASI, 2014).

O efeito gastroprotetor, o qual está relacionado com o envolvimento do óxido nítrico, foi acompanhado pela prevenção da depleção de GSH (glutathiona) e inibição da atividade da mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica e duodenal. Esses efeitos podem ser atribuídos ao efeito antioxidante que se deve à presença de taninos condensados e flavonoides no extrato (RODRIGUES ORSI *et al.*, 2012).

A ação protetora dos extratos contra inflamação induzida pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em ratos está relacionado com propriedades antioxidantes, como evidenciado pela contra-ação da depleção de GSH, inibição das atividades de MPO e alcalinofosfatase (AP), redução do conteúdo de malondialdeído (MDA) do cólon e inibição da peroxidação lipídica em membranas. Os efeitos observados podem estar relacionados com a presença de classes de compostos antioxidantes, tais como taninos condensados e terpenoides presentes nos extratos das cascas e dos frutos, respectivamente (ORSI, SEITO & DI STASI, 2014).

1.8.2 - Atividade anti-inflamatória de terpenoides isolados de *H. Courbaril*

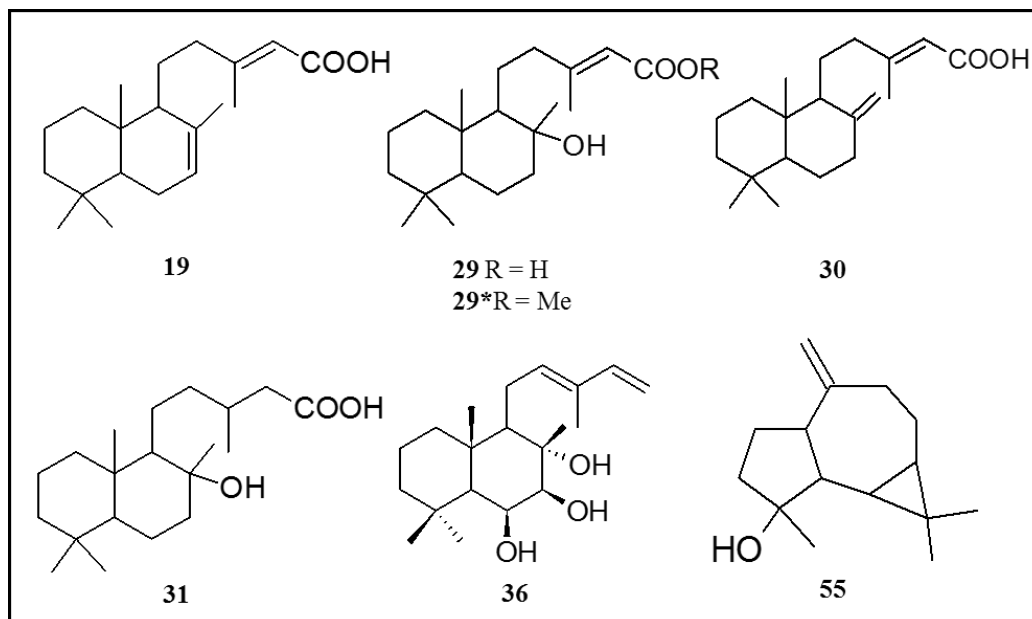
A atividade inflamatória de sete terpenoides isolados da espécie *H. courbaril* foi investigada por JAYAPRAKASAM *et al.* (2007), utilizando as enzimas Ciclooxigenase-1 (COX-1) e Ciclooxigenase-2 (COX-2), as quais desempenham um papel crítico em desordens inflamatórias e têm sido alvos no planejamento de fármacos para o tratamento desses processos. Ambas catalisam a etapa limitante da velocidade da síntese de prostaglandinas. A COX-1 é expressa nas células da mucosa gastrointestinal, mantendo sua integridade, enquanto a COX-2 é induzida pelo estímulo externo. Vários estudos demonstram que a COX-2 é superexpressa em várias condições patológicas como câncer, diabetes e mal de Alzheimer (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

A inibição dessas enzimas pelos terpenoides **19**, **29**, **29***, **30**, **31**, **36** e **55** (FIGURA 1.15, p. 37) foi avaliada na concentração de 100 µg/mL. Os percentuais de inibição enzimática desempenhados pelos compostos foram calculados com base no controle com DMSO. Os controles positivos ácido acetil salicílico, ibuprofeno e rofecoxib foram testados em 180, 2,1 e 1,67 µg/mL, respectivamente.

A crotomaclina (**36**) inibiu a enzima COX-1 por 29% e a COX-2 por 15%. Os compostos **29*** e **31** inibiram a COX-2 seletivamente por 40% e 43%, respectivamente. O sesquiterpenoide **55** também mostrou maior inibição da enzima COX-2 (54%) quando comparado à COX-1 (15%). O ácido labd-13*E*-en-8-ol-15-oico (**29**) mostrou 30% de inibição da COX-2, enquanto o ácido (13*E*)-labda-7,13-dien-15-oico (**19**) inibiu a COX-1 e -2 por 33% e 53%, respectivamente. Os controles positivos, ácido acetil salicílico e ibuprofeno, mostraram 61% e 53% de inibição da COX-1, e 24% e 59% de inibição da COX-2, respectivamente, na concentração de 180 e 2,1 µg/mL (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

FIGURA 1.15: Terpenoides isolados de *H. courbaril*.

Fonte: JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007.



Os mesmos compostos foram testados quanto a suas habilidades de inibir a peroxidação lipídica de acordo com o procedimento estabelecido por (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007), na concentração de 100 µg/mL, empregando-se DMSO como solvente (controle negativo) e hidroxianisól butilado (BHA), hidroxitoluênio butilado (BHT) e *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ) como controles positivos, na concentração de 1 µg/mL. O composto **19** foi o mais ativo dentre os testados, inibindo a peroxidação lipídica em 75%, enquanto os compostos **36** e **29** mostraram 46% e 48% de inibição, respectivamente. Os antioxidantes comerciais BHA, BHT e TBHQ apresentaram inibição de 85%, 91% e 89%, respectivamente (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

Os compostos **19**, **29**, **29***, **30**, **31**, **36** e **55** também foram avaliados contra a proliferação de linhagens de células tumorais humanas MFC-7 (mama), SF-261 (Sistema Nervoso Central), NCI-H460 (pulmão), HCT-116 (cólon) e AGS (gástrica), sendo inativos na concentração de 100 µg/mL (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

Com base nos estudos supracitados, nota-se que *H. stigonocarpa* pode produzir substâncias capazes de inibir enzimas associadas à várias condições patológicas, tais como o câncer, uma vez que tratam-se de espécies pertencentes ao mesmo gênero. Deste modo, o estudo químico desta planta em busca de compostos que inibam as catepsinas K, L e V, bem como que apresentem atividade citotóxica frente à linhagens de

células tumorais é de grande importância, visto que a necessidade de se descobrir novos inibidores enzimáticos e agentes terapêuticos anticâncer é crescente.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo químico do extrato etanólico das folhas e das flores de *H. stigonocarpa*, na perspectiva de isolar e elucidar estruturalmente os metabólitos secundários, com a finalidade de avaliar a atividade citotóxica dos mesmos frente às linhagens celulares normal (L-929) e tumoral (Sarcoma 180), bem como investigar o seu potencial inibitório frente às catepsinas K, L e V.

2.2 - Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

1. Fracionar os extratos etanólicos das folhas e das flores de *H. stigonocarpa* através de técnicas cromatográficas convencionais;
2. Elucidar estruturalmente as substâncias isoladas, empregando-se técnicas de RMN uni e bidimensionais;
3. Avaliar o potencial citotóxico dos extratos, frações obtidas por partição líquido-líquido, e compostos isolados frente às linhagens celulares L-929 e S-180, bem como investigar a atividade inibitória dos mesmos frente às catepsinas K, L e V.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais

3.1.1 - Solventes

- **Solventes P.A.:** foram utilizados solventes comerciais (hexano, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol) de diversas marcas;

- **Solventes grau HPLC:** Solventes comerciais (diclorometano, acetonitrila, metanol e isopropanol), marca Sigma Aldrich;
- **Solventes deuterados para RMN:** CDCl₃, CD₃OD, DMSO-d₆, (CD₃)₂CO e D₂O, marca Sigma Aldrich.

3.1.2 - Fases estacionárias para cromatografia

- Sílica gel 60 (70-230 mesh), marca Merk;
- Sílica flash (230 - 400 mesh), marca Merk;
- Sephadex LH-20, Amershan Pharmacia Biotech AB;
- C₁₈ Luna (100 Å e 10 µm; 25 cm x 0,7 cm), preparada no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE da UFSCar;
- Cromatoplasmas de sílica gel em alumínio 60 F₂₅₄, φ = 0,2 mm, Sigma Aldrich.

3.2 - Equipamentos

- **Evaporador rotativo:** o solvente empregado no estudo químico, incluindo o preparo dos extratos, foi evaporado em evaporador rotativo IKA, modelo RV 05 Basic, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de hidrovácuo da marca Quimis.
- **Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência:**
 - **Analítico:** equipamento de marca Agilent, com sistema de quatro bombas, detector DAD e *software* Izichrom.
 - **Preparativo:** equipamento de marca Agilent, com sistema de duas bombas, detector MWD e *software* Chemstation.
- **CG-EM:** cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas, marca Agilent, modelo 5975 Series MSD, equipado com coluna capilar HP-5 e ionização por impacto eletrônico.
- **coluna capilar HP-5 MS** (5% fenil-95% metilpolisiloxano, 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25 µm);
- **Espectrômetro de RMN:** as análises de RMN de ¹H e de ¹³C foram realizadas em um equipamento Bruker (400 MHz para ¹H) modelo DRX 400 (9,4 Tesla), instalado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos,

sob supervisão do prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira. Também foi utilizado o equipamento Bruker (500 MHz para ^1H) modelo DRX 500 (9,4 Tesla), instalado no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão do prof. Dr. Luciano Morais Lião;

- **Espectrofotômetros:** a quantificação de densidade óptica (ensaios de citotoxicidade) foi medida em um equipamento Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100), pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão da profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda;
- **Espectrofluorímetro:** o monitoramento da hidrólise de substratos pelas catepsinas (ensaios enzimáticos) foi realizado em um leitor de placa de ELISA - Molecular Devices Corporation – Spectra MAX GEMINI XS, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de São, sob a supervisão do prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

3.3 - Estudo químico dos extratos etanólicos das folhas e das flores de *H. stigonocarpa*

3.3.1 - Identificação e coleta das folhas

As folhas de *H. stigonocarpa* foram coletadas no Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA - Gama/DF), em 14 de dezembro de 2010. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS) foram armazenados para coletas futuras. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Departamento de Ciências Biológicas – UFG/CAC), o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN – Brasília - DF), sob o número GD 046.

3.3.2 - Identificação e coleta das flores

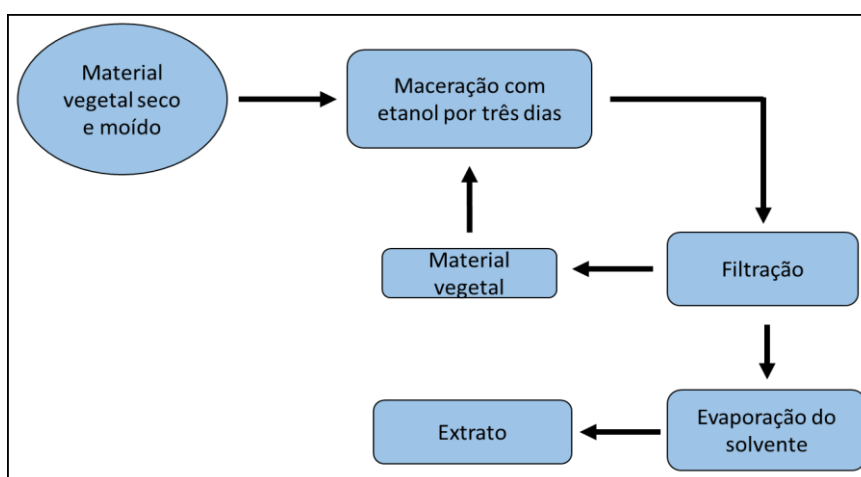
As flores de *H. stigonocarpa* foram coletadas no Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, na região do município de Davinópolis - GO, em 13 de fevereiro de 2013.

3.3.3 - Preparo do extrato etanólico das folhas

As folhas de *H. stigonocarpa* foram secas em estufa a 45° C e moídas. O material moído foi então submetido à maceração com etanol, em repouso e à temperatura ambiente, para extração dos metabólitos secundários. O período de extração foi de nove dias, realizando-se a troca do solvente a cada três dias, conforme representado no FLUXOGRAMA 1 (p. 41).

As massas obtidas de material vegetal, bem como de extrato são mostradas na TABELA 3.1 (p. 41).

FLUXOGRAMA 1: Metodologia de preparo do extrato etanólico.



3.3.4 – Preparo do extrato etanólico das flores

As flores de *H. stigonocarpa* foram trituradas e o material foi submetido à maceração com etanol, em repouso à temperatura ambiente, por nove dias, realizando-se a troca do solvente a cada três dias. A massa de material vegetal coletado, bem como de extrato obtido são apresentadas na TABELA 3.1

TABELA 3.1: Massa obtida de material vegetal e extratos.

Material Vegetal	Massa de Vegetal (g)	Massa de Extrato (g)
Folhas	1.514	190
Flores frescas	1.214	177

3.3.5 - Fracionamento do extrato etanólico das folhas

Inicialmente, 10 g do extrato etanólico das folhas foram submetidos à cromatografia líquida em coluna (CLC) ($\phi = 5$ cm; h x 9,5 cm) utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e eluição em ordem crescente de polaridade, com os seguintes sistemas: hexano/acetato de etila/metanol, visando à separação dos constituintes químicos em grupos, de acordo com suas polaridades. Foram coletadas quatro frações, consideradas distintas, de acordo com as análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), as quais foram denominadas frações 1, 2, 3 e 4 de acordo com a sequência de eluição (FLUXOGRAMA 2, p. 43).

3.3.5.1 - Fracionamento da fração 1

A fração 1 foi analisada por CCD e apresentou manchas roxas características de classes de produtos naturais. Por esse motivo, esta fração foi submetida ao fracionamento por CLC ($\phi = 2,2$ cm e h = 36 cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente de polaridade (hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol) (FLUXOGRAMA 2). O fracionamento rendeu doze frações, as quais foram agrupadas em seis junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nos perfis de eluição de seus constituintes químicos, as frações 1.8 e 1.9 foram selecionadas para fracionamento.

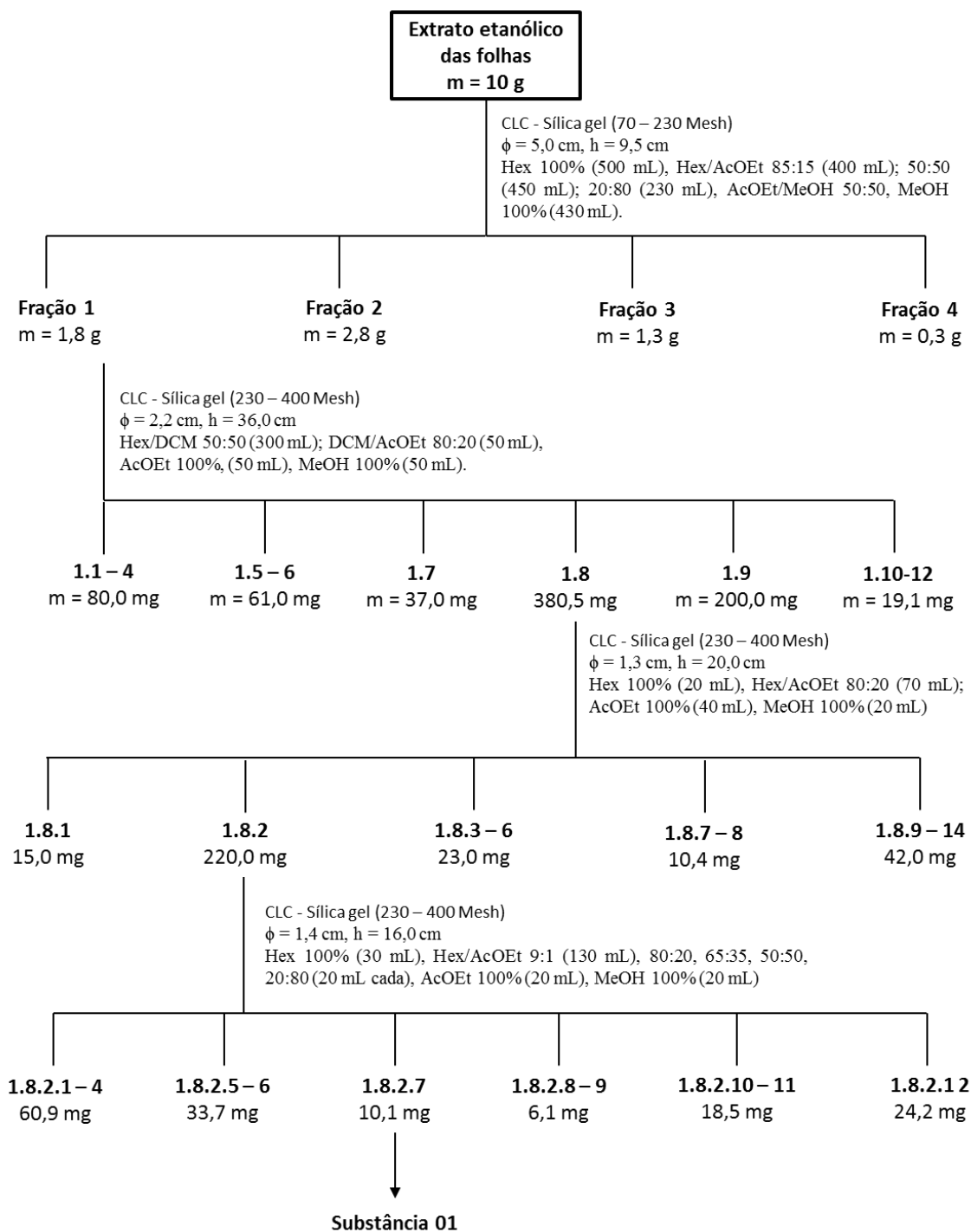
3.3.5.1.1 – Fracionamento da fração 1.8

O fracionamento da fração 1.8 rendeu catorze frações, as quais foram agrupadas em cinco junções devido às similaridades químicas observadas por CCD. Os constituintes da fração 1.8.2 apresentaram valores de R_f (fatores de retenção) adequados, ou seja, entre 0,4 e 0,7, o que fez com que a mesma fosse escolhida para fracionamento.

3.3.5.1.2 – Fracionamento da fração 1.8.2

A fração 1.8.2 foi fracionada por CLC (sílica gel; $\phi = 1,4$ cm e $h = 16,5$ cm; eluição gradiente: hexano/acetato de etila/metanol) originando doze frações, sendo isolada a substância I da fração 1.8.2.7 (FLUXOGRAMA 2).

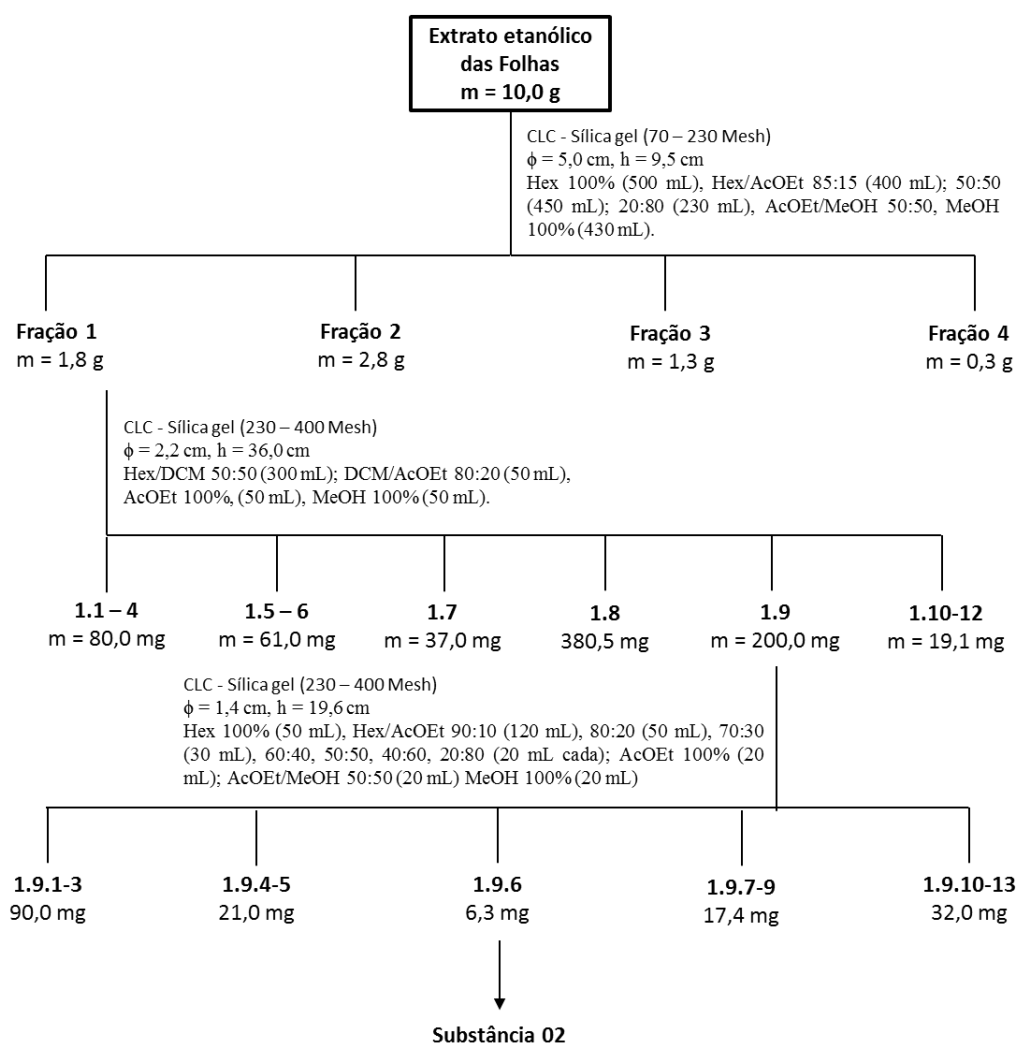
FLUXOGRAMA 2: Isolamento da substância I.



3.3.5.2 - Fracionamento da fração 1.9

A fração 1.9 foi submetida à CLC (sílica gel; $\phi = 1,4$ cm e $h = 19,6$ cm; eluição: hexano/acetato de etila/metanol) rendendo treze frações, as quais foram agrupadas conforme suas similaridades químicas. Deste modo, isolou-se a substância II da fração 1.9.6 (FLUXOGRAMA 3, p. 44). Das demais frações, por apresentarem valores de R_f muito próximos, não foi possível a separação dos constituintes por CLC, sendo as mesmas reservadas para estudo via CLAE posteriormente. Deste modo, iniciou-se o fracionamento da fração 2.

FLUXOGRAMA 3: Isolamento da substância II.



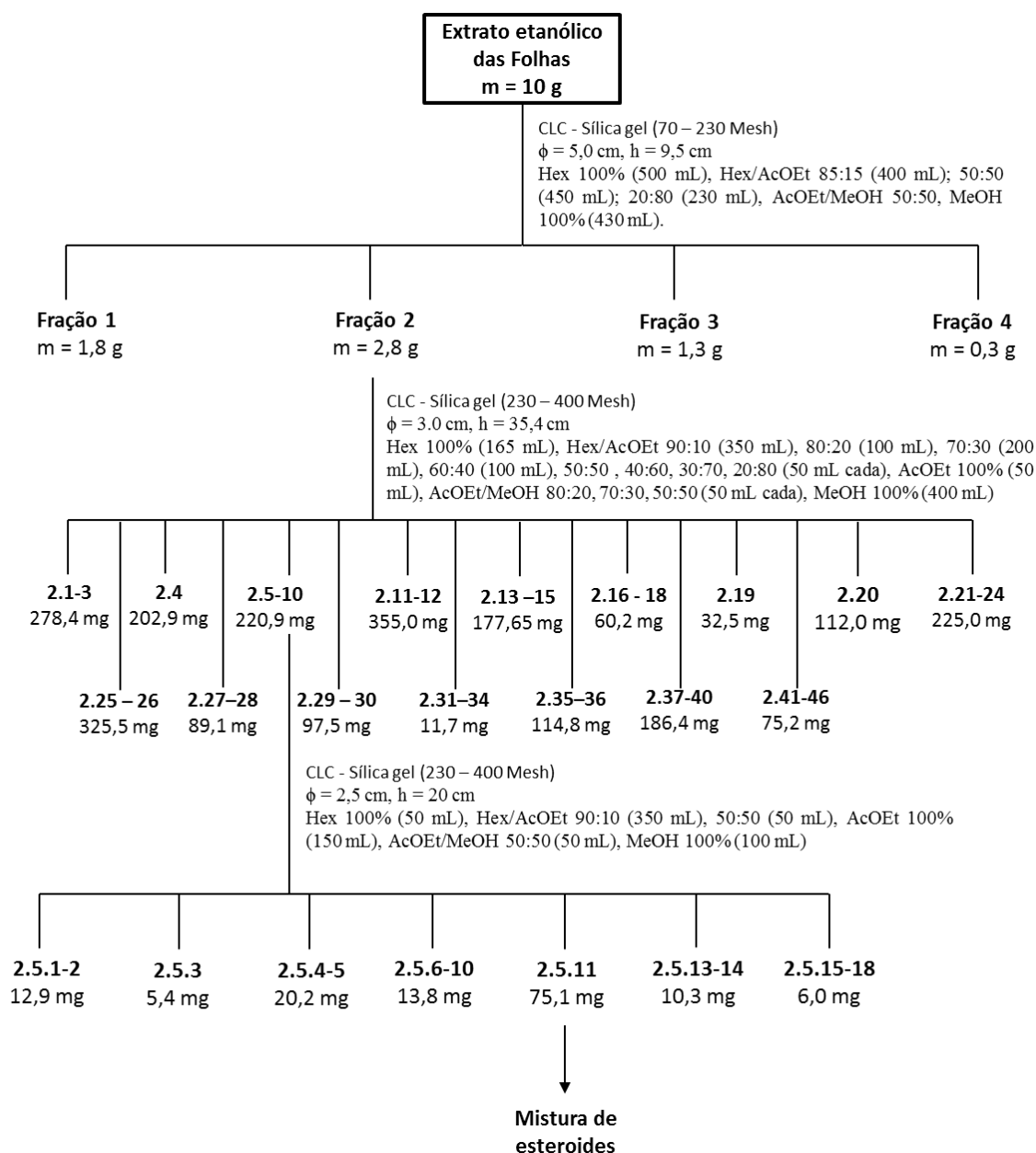
3.3.5.3 - Fracionamento da fração 2

A fração 2 apresentou diversas manchas características de classes de substâncias naturais via análise por CCD e foi fracionada por CLC (sílica gel; $\phi = 3,0$ cm e $h = 35,4$ cm; eluição com hexano/acetato de etila/metanol) (FLUXOGRAMA 4). O fracionamento resultou em quarenta e seis frações, as quais foram agrupadas em dezesseis junções, de acordo com as similaridades químicas observadas por CCD. Destas, a junção 2.5-10 apresentou manchas roxas intensas e foi selecionada para fracionamento, com a finalidade de remoção dos pigmentos presentes e separação dos constituintes químicos de interesse.

3.3.5.3.1 - Fracionamento da junção 2.5-10

A fração 2.5 (junção 2.5-10) foi submetida a CLC (sílica gel; $\phi = 2,5$ cm e $h = 20$ cm; eluição com hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu dezoito frações, as quais foram agrupadas em sete junções (FLUXOGRAMA 4, p. 46) de acordo com as similaridades químicas observadas por CCD. Destas, a fração 2.5-11 apresentou-se como um sólido branco e foi submetida à análise por CG-EM, sendo identificada como uma mistura de três esteroides.

FLUXOGRAMA 4: Obtenção da mistura de esteroides.

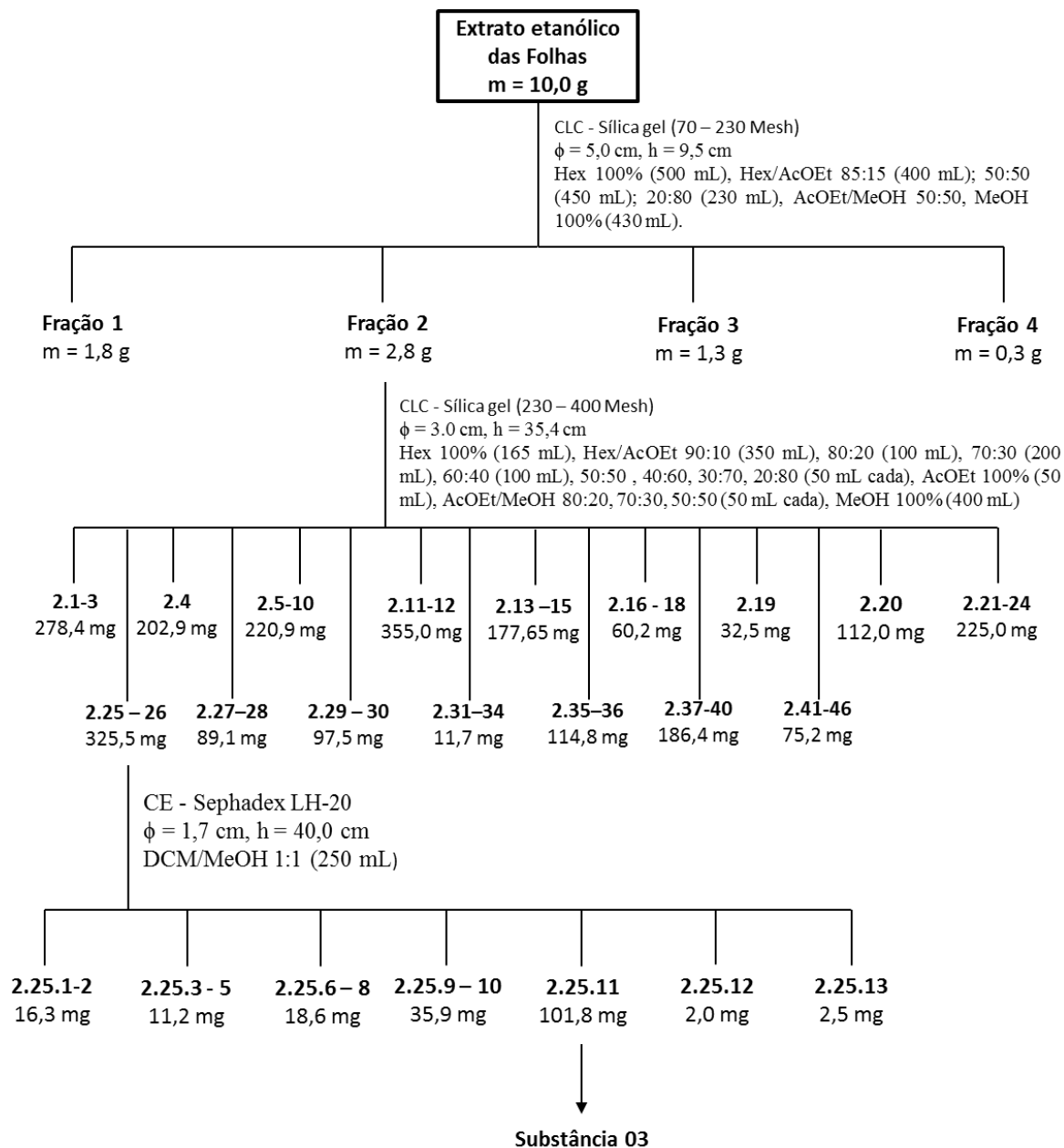


3.3.5.3.3 - Fracionamento da fração 2.25

A junção 2.25-26 (fração 2.25) apresentou-se como uma mistura contendo uma mancha de coloração roxa forte e manchas verdes características de pigmentos, e portanto, foi selecionada para fracionamento, através de CE ($\phi = 1,7$ cm e $h = 40$ cm) com fase estacionária Sephadex LH-20 e eluição em modo isocrático de polaridade, empregando-se metanol/diclorometano (1:1) (FLUXOGRAMA 5, p. 47). Foram coletadas treze frações, as quais foram agrupadas em sete junções devido às similaridades

químicas apresentadas via CCD, permitindo assim a obtenção da substância III, a partir da fração 2.25.11.

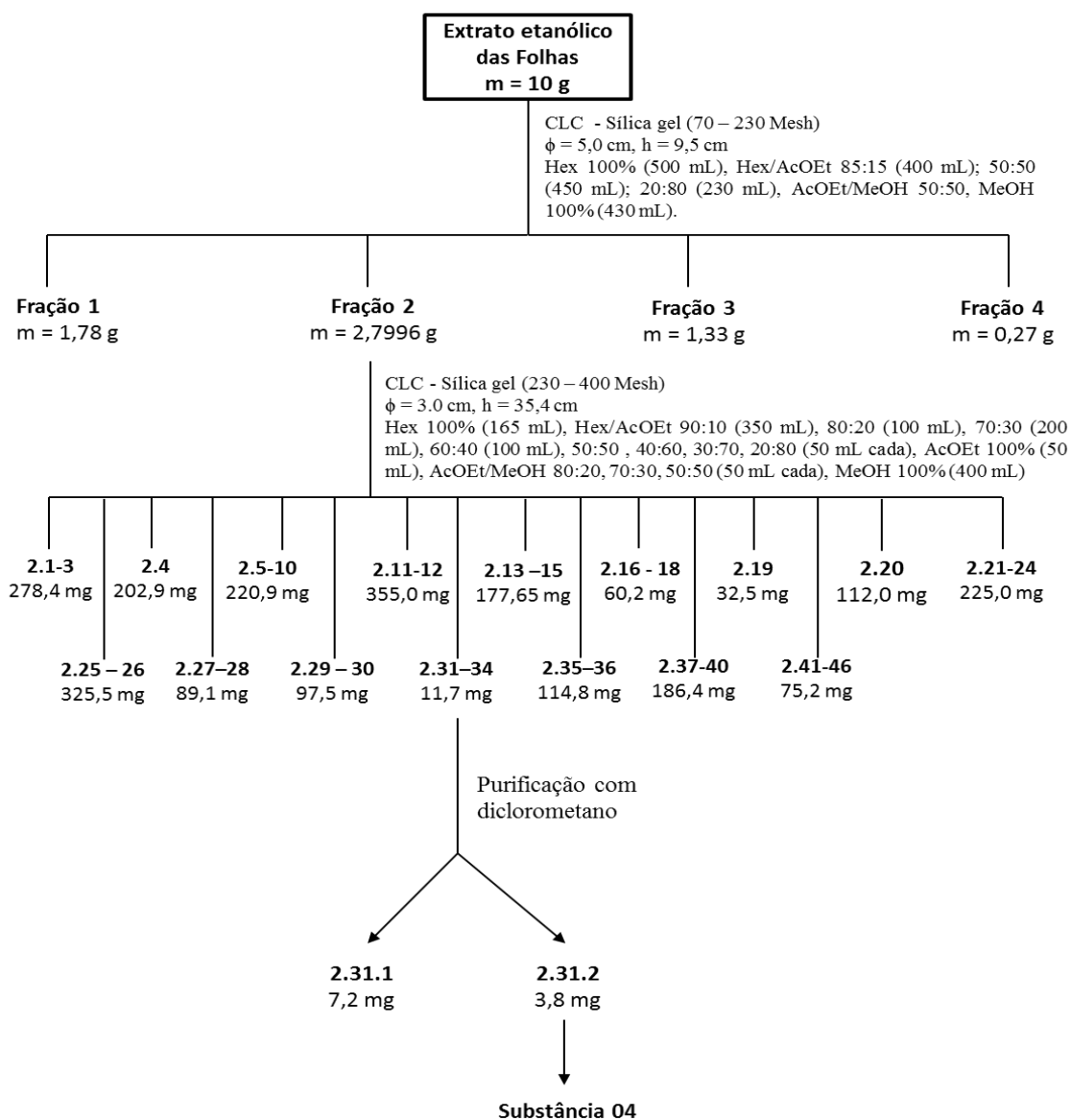
FLUXOGRAMA 5: Isolamento da substância III.



3.3.5.3.4 - Fracionamento da junção 2.31-34

As frações 2.31-34 foram agrupadas por apresentarem perfis similares na análise por CCD, sendo visualizada uma mancha amarela e uma mancha verde escuro. Esta fração foi, portanto, submetida a um processo de purificação com diclorometano, originando as frações 2.31.1 (fração solúvel em DCM) e 2.31.2 (porção insolúvel). Desta forma, isolou-se a substância IV, da fração 2.31.2 (FLUXOGRAMA 6, p. 48). Diversas frações oriundas da fração 2 foram identificadas, no entanto com quantidades pequenas de massa, e foram reservadas. Deste modo, iniciou-se o fracionamento da fração 3.

FLUXOGRAMA 6: Isolamento da substância IV.



3.3.5.4. Fracionamento da fração 3

A fração 3 foi submetida à CLC ($\phi = 3,0$ cm e $h = 2,1$ cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente de polaridade (hexano/acetato de etila/metanol) (FLUXOGRAMA 7, p. 50). O fracionamento rendeu quinze frações, das quais as frações 3.11 - 3.14 apresentaram similaridades químicas quando analisadas por CCD. Estas foram, então, agrupadas e submetidas a fracionamento em coluna Sephadex LH-20 ($m = 0,3315$ g), para remoção de pigmentos presentes na amostra, e eluição com acetato de etila/metanol (3:7), originando dez frações.

A fração 3.11.9 foi analisada por RMN de ^1H , constatando-se a presença de uma mistura contendo sinais referentes a várias substâncias diferentes, uma vez que o espectro apresentou diversos sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos. Esta fração foi submetida à CLAE no modo analítico e, posteriormente, à separação por CLAE no modo preparativo.

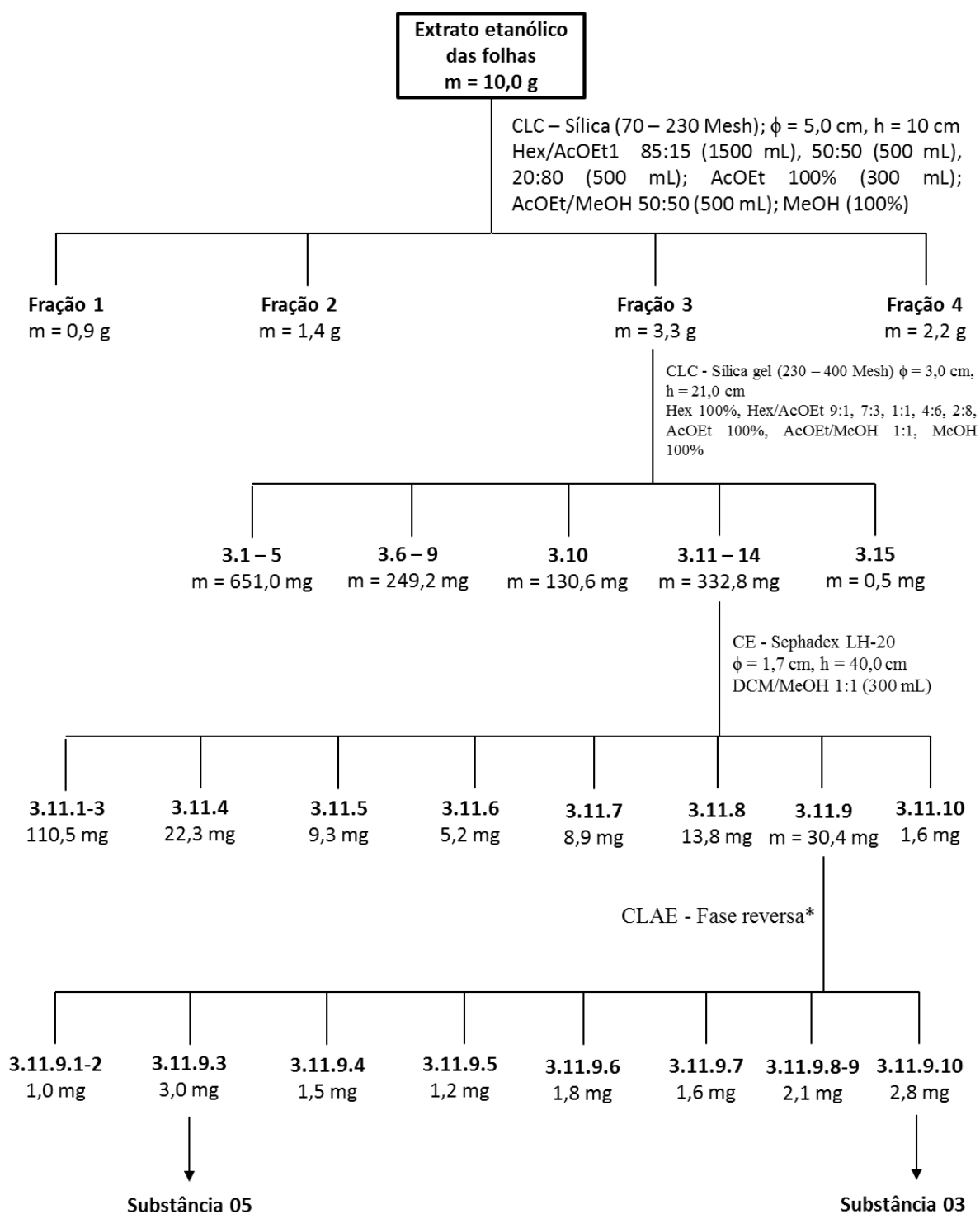
Para realizar a análise cromatográfica preparativa, foi utilizada a coluna de C_{18} (Luna; $h = 15,0$ cm; $\phi = 0,46$ cm) com gradiente de eluição (água:ácido acético (97:3); metanol) (v/v) e detector DAD na região de 264 nm e 360 nm. O procedimento cromatográfico com gradiente exploratório foi o mesmo do método desenvolvido por CHEN, ZUO & DENG (2001) para separação de flavonoides e outros compostos fenólicos, no qual utiliza-se fase reversa e mistura de água: ácido acético (solvente A) e metanol como solvente orgânico (solvente B), como componentes da fase móvel. A variação da proporção de B em um intervalo de 47 minutos, sob vazão constante de 1 mL/min se deu de acordo com o programa da TABELA 3.2 (p. 49).

TABELA 3.2: Programa de eluição gradiente.

Tempo (min)	água:ác. acético (97:3) (v/v)	metanol	Vazão (mL/min)
0	100	0	1,00
10	90	10	1,00
40	30	70	1,00
44	100	0	1,00
47	100	0	1,00

Fonte: CHEN, ZUO & DENG, 2001.

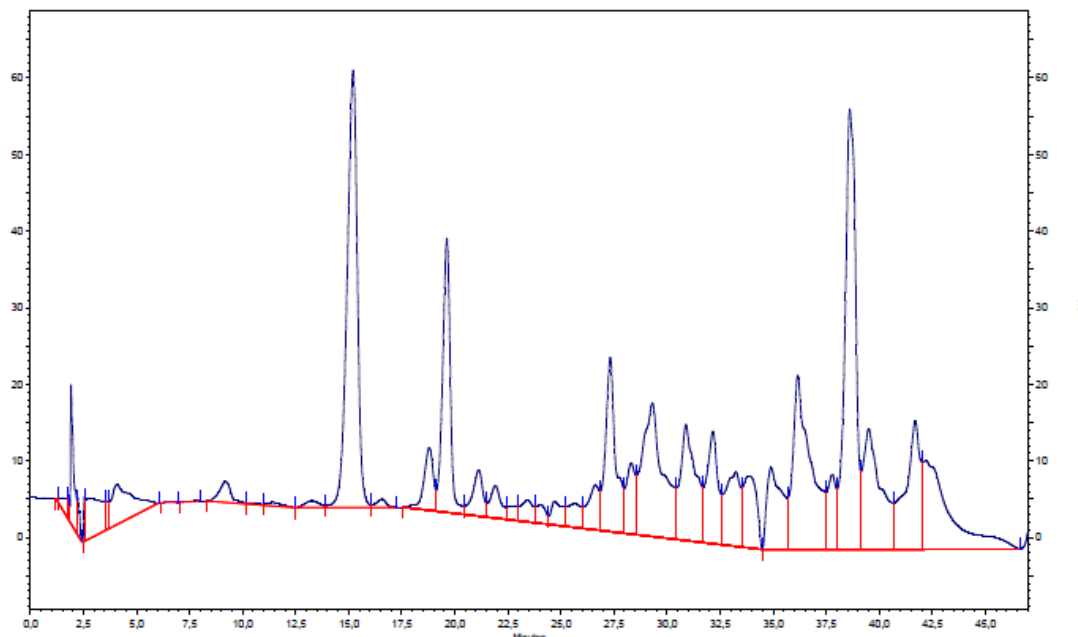
FLUXOGRAMA 7: Isolamento das substâncias III e V.



*Coluna C₁₈ Luna (h = 25,0 cm x ϕ = 0,7 cm, partícula 10 μ m); loop: 500 μ L; fase móvel: água/ácido acético (97:3)/metanol; faixa de detecção: 264 e 360 nm; fluxo: 4 mL/min

O cromatograma de análise obtido via CLAE no modo analítico é mostrado na FIGURA 3.1 (p. 51), sendo possível observar a presença de dois picos com intensidade elevada e diversos picos menos intensos.

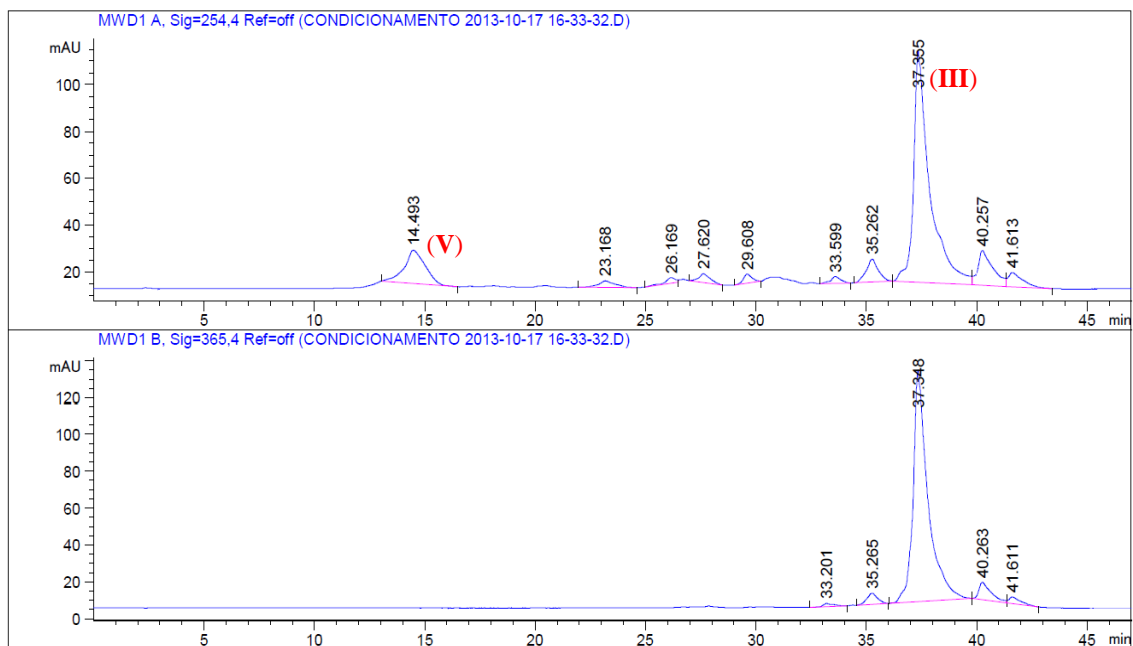
FIGURA 3.1: Cromatograma da fração 3.11.9 obtido por CLAE no modo analítico.



Condições cromatográficas: C₁₈, 15,0 cm x 0,46 cm, 10 µm; detecção: 264 e 360 nm; eluição gradiente: água/ácido acético (97:3)/metanol; vazão: 1,0 mL/min; V_i = 50 µL.

Com a finalidade de realizar a separação dos compostos majoritários, utilizou-se uma coluna C₁₈ (Luna; ϕ = 25,0 cm; h = 0,70 cm), vazão constante de 4 mL/min e detecção em 264 nm e 360 nm. A solubilização de 30,4 mg de amostra foi realizada com 0,5 mL de MeOH. Para injeção, empregou-se 200 µL da solução da amostra. O cromatograma obtido é mostrado na Figura 3.2 (p. 52). Deste modo, isolou-se a substância V, correspondente ao pico com tempo de retenção de 14,5 min (fração 3.11.9.3) (FLUXOGRAMA 7). A fração 3.11.9.10, correspondente ao pico majoritário do cromatograma (37,4 min), foi identificada como a substância III.

FIGURA 3.2: Cromatograma da fração 3.11.9 obtido no modo preparativo.



Condições cromatográficas: C₁₈, 25,0 cm x 0,70 cm, 10 µm; detecção: 264 e 360 nm; eluição gradiente: água/ácido acético (97:3)/metanol; vazão: 4,0 mL/min; V_i = 200 µL.

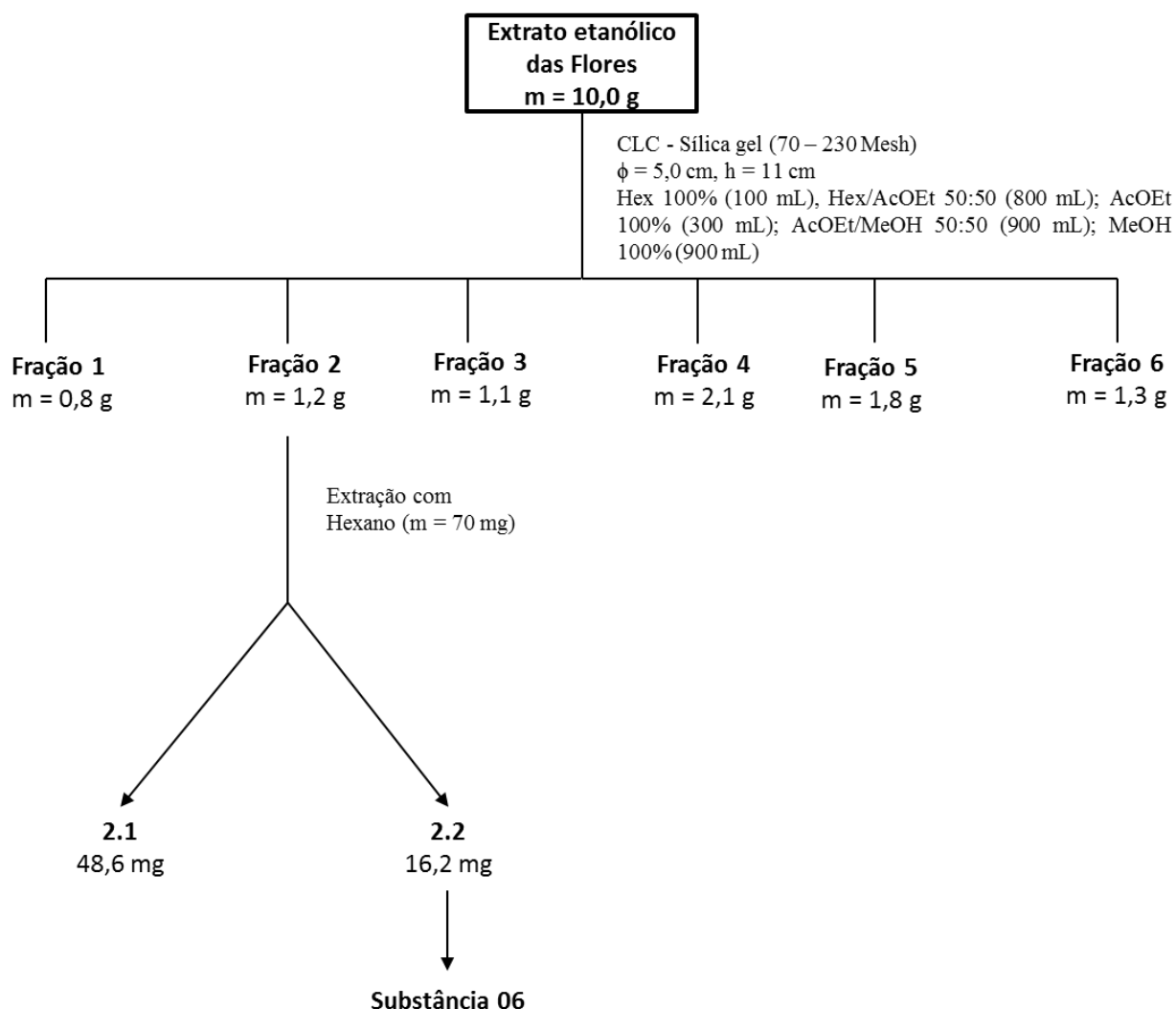
3.3.6 - Fracionamento do extrato etanólico das flores

O extrato das flores (m = 10 g) foi submetido à CLC ($\phi = 5,0$ cm; 11,0 cm), utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e eluição em ordem crescente de polaridade, com os seguintes sistemas: hexano/acetato de etila/metanol. Foram coletadas seis frações, distintas de acordo com o perfil das análises por CCD, as quais foram denominadas como frações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, de acordo com a ordem de eluição (FLUXOGRAMA 8, p. 53).

3.3.6.1 - Purificação da fração 2

A fração 2 apresentou manchas roxas e verdes, características de terpenoides e pigmentos, na análise por CCD, sendo submetida à uma extração com hexano, na perspectiva de remover as impurezas. Este procedimento originou duas frações, sendo que da fração 2.2 foi isolada a substância VI. As demais frações promissoras foram fracionadas, porém não levaram ao isolamento de substâncias.

FLUXOGRAMA 8: Isolamento da substância VI.



3.4 - Metilação do ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico (III)

A substância **III** foi submetida à uma reação de metilação com diazometano, na perspectiva de se obter o éster $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oato de metila (**III***) e, subsequentemente, avaliar sua atividade inibitória frente às catepsinas K, L e V e comparar com a atividade da substância **III**. Diazoalcenos, tais como o diazometano, são empregados frequentemente para derivatização de ácidos carboxílicos, os quais são convertidos em ésteres de metila com rendimento elevado.

A solução de diazometano foi preparada dissolvendo-se 2,1 g de *p*-toluilsulfonilmetilnitrosamida em 30 mL de éter etílico. Esta solução foi resfriada em banho de gelo e transferida para um balão de destilação, juntando-se uma solução de 0,4 g de NaOH em 10 mL de etanol 96%. O sistema foi mantido em repouso por 5 min em

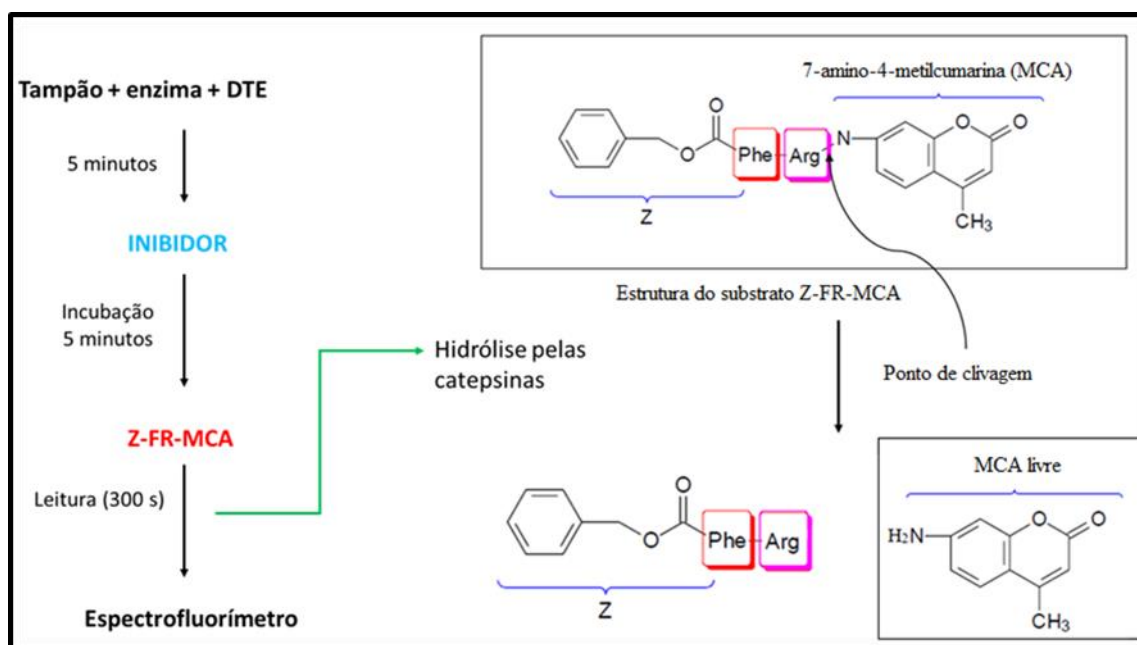
banho de gelo e em seguida iniciou-se a destilação em banho de óleo. Uma alíquota de 3 mL do destilado foi acrescentada à amostra (5,0 mg), deixando-a em repouso até não observar mais a liberação de gás. O diazometano foi eliminado a temperatura ambiente, deixando-se o frasco aberto na capela. Desta forma, foi realizada a metilação da substância III.

3.5 - Metodologia dos ensaios enzimáticos

A determinação da atividade enzimática foi realizada com base no monitoramento da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA, através do acompanhamento da fluorescência em função do tempo de reação. A metodologia geral do ensaio é ilustrada na FIGURA 3.3 (p. 54). Os ensaios foram feitos em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, sob a supervisão do prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

FIGURA 3.3: Esquema geral dos ensaios enzimáticos.

Fonte: SEVERINO, 2008.



Z-FR-MCA => Z: carbobenzoxi, Phe: fenilalanina, Arg: arginina e MCA: 7-amino-4-metil-cumarina.

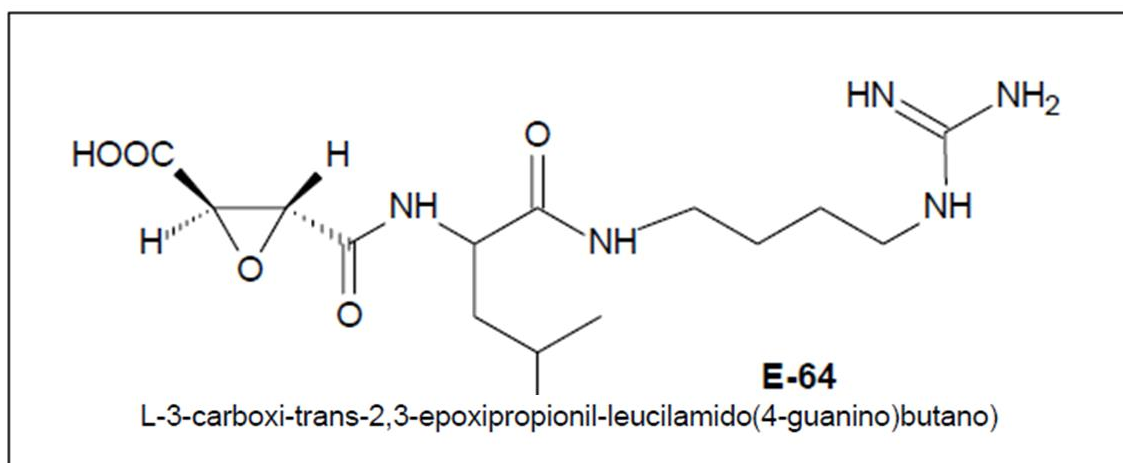
Os experimentos foram realizados empregando-se placas de 96 poços, pretas e com fundo plano, mantidas em compartimento termostaticado, a 27° C. A

fluorescência foi detectada em um espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$.

Foi usado tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA, pH de 5,5. As enzimas foram pré-ativadas com DTE durante 5 minutos e posteriormente, pré-incubadas com as amostras a serem testadas por mais 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de Z-FR-MCA e as medidas foram realizadas.

O controle negativo empregado consistiu na ausência de inibidor e o positivo na presença do inibidor irreversível E-64 (FIGURA 3.4, p. 55). Posteriormente, realizou-se o monitoramento direto e contínuo da hidrólise do substrato durante 300 segundos.

FIGURA 3.4: Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases E-64.



A concentração da enzima foi usada de modo que a hidrólise do substrato não fosse superior a 5% nos 300 s do experimento. Os valores de fluorescência foram convertidos para $\mu\text{M}/\text{min}$, usando uma curva de calibração determinada através da hidrólise total do peptídeo.

A triagem de compostos puros foi realizada em triplicata, em concentração única de $25 \mu\text{M}$. O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática em situações de ausência e presença de inibidores, conforme a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{V_i}{V_0}\right) \times 100$$

Em que: V_i : velocidade obtida na presença de inibidor; V_0 : é a velocidade obtida na ausência do mesmo.

Os compostos que apresentaram inibição igual ou superior a 50% frente às catepsinas foram selecionados para a determinação dos valores de IC_{50} , um parâmetro útil para determinação da potência do inibidor.

A potência de um inibidor (IC_{50}) é definida como a concentração que provoca diminuição de 50% da atividade da enzima. Este valor é uma convenção usada com finalidade de comparar valores de potência entre inibidores.

A determinação dos valores de potência inibitória foi realizada de forma direta, empregando-se o ensaio cinético com substrato fluorogênico. Os percentuais de inibição foram obtidos em diferentes concentrações de inibidor (triplicata), explorando-se uma faixa de inibição de 15% a 90%, obtendo-se uma curva de concentração *versus* resposta. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação dos valores de IC_{50} , pelo método de regressão linear de melhor ajuste, utilizando-se o programa *Sigmaplot 9.0*.

3.6 - Ensaio de citotoxicidade

3.6.1 - Metodologia dos ensaios com extratos e frações oriundas da partição líquido-líquido

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão da profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda.

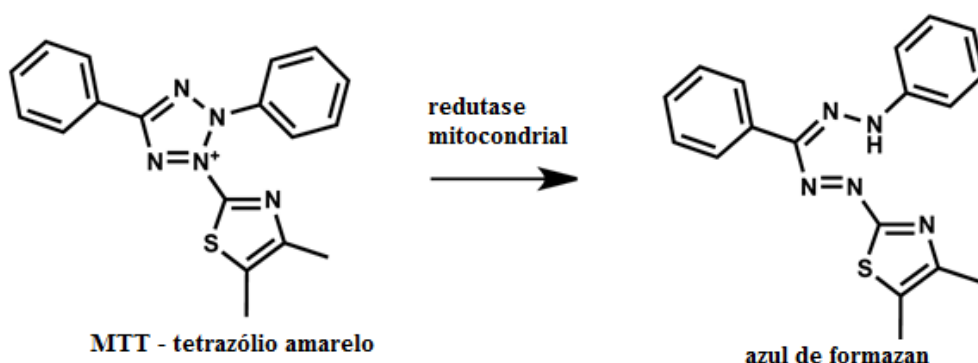
A avaliação da viabilidade celular, para os extratos e frações obtidas via partição líquido-líquido, pelo método de redução do MTT, foi realizada através da dissolução dos mesmos em DMSO 0,1%. A partir desta solução foram feitas diluições, tratando-se as células nas seguintes concentrações: 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Foram empregadas as seguintes linhagens celulares:

1. L-929 - fibroblasto pulmonar de camundongo oriunda de tecido conjuntivo subcutâneo, areolar e adiposo (ATCC: CCL-1);
2. S-180 - tumor intraperitoneal ascítico de camundongo (ATCC TIB-66);

3. células do tumor ascítico de Erlich.

O princípio do método colorimétrico do MTT, descrito por MOSMANN (1983), consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, as quais transformaram o MTT em azul de formazan (FIGURA 3.5, p. 57). Essa modificação na coloração permite avaliar a viabilidade celular no espectrofotômetro. Para o teste, foram semeadas 1×10^5 células de Sarcoma e L-929 em microplacas de 96 poços, na ausência ou presença de extratos e frações, e incubadas em estufa a 37°C , com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular $10 \mu\text{L}$ de solução de MTT na concentração de 5 mg/mL , e após 3 horas de incubação com MTT, foram acrescentados $50 \mu\text{L}$ de SDS (para a solubilização do formazan) a 10%, diluído em $\text{HCl } 0,01 \text{ N}$.

FIGURA 3.5: Reação de redução do agente MTT em azul de formazan.



A quantificação da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofluorímetro e a percentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \left(\frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right) \times 100$$

Os valores de IC_{50} (concentração em $\mu\text{g/mL}$ que inibe 50% da viabilidade celular) foram determinados por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism*[®], versão 5.0 para Windows.

3.6.2 - Metodologia dos ensaios com compostos puros isolados das frações

Os compostos puros também foram avaliados pelo método colorimétrico com MTT, para medir a viabilidade celular das linhagens normal (L-929) e tumoral (Sarcoma 180), dissolvendo os mesmos em 200 μL de DMSO a 0,1% e 800 μL de meio RPMI ou DMEM.

Para realizar a quantificação celular, colocou-se em um eppendorf 10 μL de células e 90 μL de azul de tripano. Desse eppendorf retirou-se então uma alíquota de 10 μL e colocou-a na Câmara de Neubauer para a quantificação. As células S-180 foram quantificadas e plaqueadas em placa com microplacas de 96 poços, com 1×10^5 de célula em cada poço; as células L-929 foram também quantificadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços, com 1×10^4 de célula em cada poço.

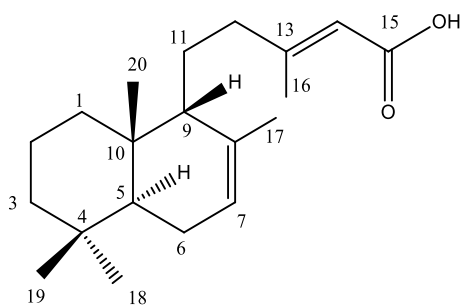
As células de ambas as linhagens foram submetidas ao tratamento com os compostos puros por 48 horas. Posteriormente, foi adicionado o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) e, após 3 horas, o SDS foi adicionado. A leitura das placas foi realizada após 24 horas, empregando um espectrofotômetro com filtro de 550 nm.

Os gráficos foram gerados a partir da análise estatística dos resultados de viabilidade, pelo programa *Graphpad Prism*. O teste utilizado para a comparação foi o *Tukey's Multiple Comparison One way ANOVA* ($P < 0,05$).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo foram isolados seis metabólitos secundários de *H. stigonocarpa*, sendo quatro diterpenoides (substâncias **I** – **III** e **VI**), um flavonoide (substância **IV**) e um ácido carboxílico aromático (substância **V**), bem como uma mistura dos esteroides γ -sitosterol (**VII**), campesterol (**VIII**) e estigmasterol (**IX**). As estruturas químicas são mostradas a seguir:

4.1 - Substâncias isoladas



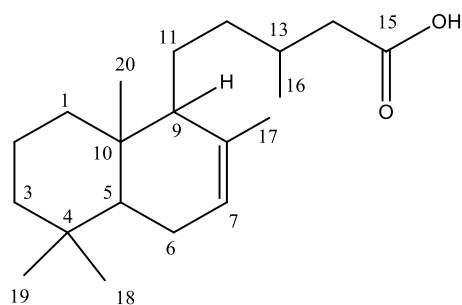
I

ácido labd-7,13-dien-15-oico

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 43

Identificação estrutural: p. 62



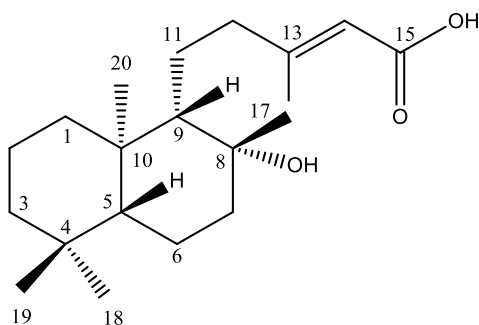
II

ácido labd-7-en-15-oico

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 44

Identificação estrutural: p. 74



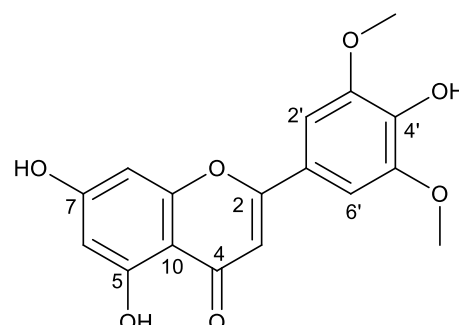
III

ácido $\Delta^{13,14}$ -ent-labd-8 β -ol-15-oico

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 46

Identificação estrutural: p. 78



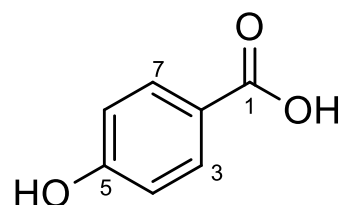
IV

4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 48

Identificação estrutural: p. 87



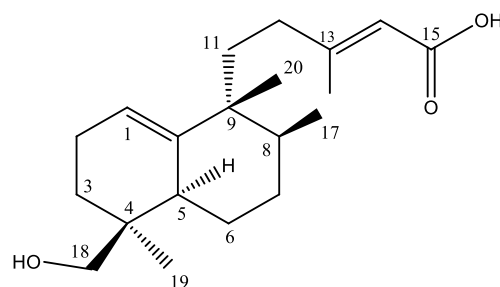
V

ácido *p*-hidroxibenzoico

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 49

Identificação estrutural: p. 95



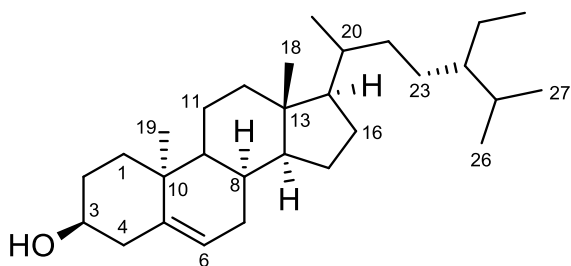
VI

ácido *ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico

Origem: extrato etanólico das flores

Isolamento: p. 52

Identificação estrutural: p. 104



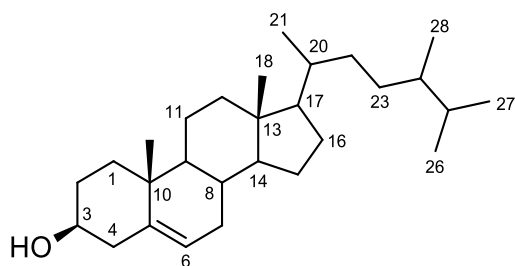
VII

γ -sitosterol

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 45

Identificação estrutural: p. 97



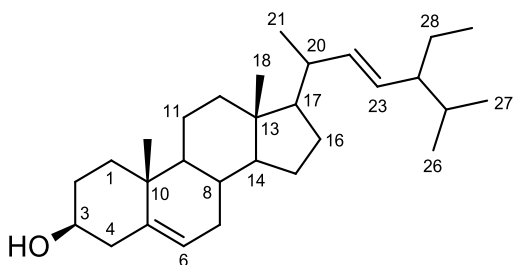
VIII

campesterol

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 45

Identificação estrutural: p. 97



IX

stigmasterol

Origem: extrato etanólico das folhas

Isolamento: p. 45

Identificação estrutural: p. 97

4.2 - Elucidação estrutural

4.2.1 – Elucidação estrutural dos diterpenoides isolados de *H. stigonocarpa*

Os diterpenoides são um grupo amplamente diversificado de compostos, baseados em quatro unidades de isopreno. Apresentam pontos de ebulição elevados, motivo pelo qual não podem ser considerados óleos essenciais. São considerados resinas, ou seja, o material que permanece após a destilação a vapor do extrato da planta.

Diversos diterpenoides de esqueleto labdano têm sido relatados para o gênero *Hymenaea*. O primeiro, denominado de ácido copálico, (estrutura **9**, p. 20), foi isolado de *H. courbaril* em 1961 (NAKANO & DJERASSI, 1961).

Em 1973 foram isolados mais quatro diterpenoides, sendo: o e ácido *ent*-labd-8(20)-en-15,18-dioico (estrutura **10**, p. 20) e o ácido *ent*-labd-8(20), 13-dien-15,18-dioico (estrutura **11**, p. 20) de *H. oblongifolia*; o ácido *ent*-13-epilabdanólico (estrutura **12**, p. 20), de *H. parvifolia*; e o ácido *ent*-labd-13-en-8 β -ol-15-oico (estrutura **13**, p. 21) de *H. courbaril* (CUNNINGHAM, MARTIN & LANGENHEIM, 1973).

O ácido *ent*-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico (estrutura **14**, p. 21) foi isolado de *H. verrucosa* em 1974 (MARTIN & LANGENHEIM, 1974) e, em 1975, relatou-se o isolamento do ácido o *ent*-labd-7,13(*E*)-dien-15-oico (estrutura **19**, p. 22) de *H. courbaril* (MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO, 1975).

Em 2007 foram isolados, de *H. courbaril*, o ácido labd-13(*E*)-en-8-ol-15-oico (estrutura **29**, p. 25), o ácido labd-8(17),13(*E*)-dien-15-oico (estrutura **30**, p. 25), o ácido labdanolico (estrutura **31**, p. 25) e o ácido labd-7,13(*E*)-dien-15-oico (estrutura **32**, p. 26) (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007).

O isolamento de outra classe de diterpenoides, denominada clerodano, foi relatada para *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, destacando-se o ácido colavênico (estrutura **21**, p. 23), o ácido *ent*-(5*R*, 8*S*, 9*S*, 10*R*)-cleroda-3,13(*E*)-dien-15-oico (estrutura **22**, p. 23) e o ácido *ent*-(5*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R*)-cleroda-3,13(*E*)-dien-15-oico (estrutura **23**, p. 23) (NOGUEIRA *et al.*, 2001).

Em 2001, ABDEL-KADER *et al.* (2001) realizou o isolamento de três diterpenoides de esqueleto halimano de *H. courbaril*: o ácido *ent*-(13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-halimadien-18-oico (estrutura **26**, p. 24), o ácido *ent*-(2*S*, 13*R*)-2,13-diidroxi-1(10),14-halimadien-18-oico (estrutura **27**, p. 24) e o ácido *ent*-(13*R*)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-halimadien-18-oico (estrutura **28**, p. 25).

Também foram isolados diterpenoides de esqueleto caurano, os alcoóis caur-16-en-18-ol (estrutura **33**, p. 26), cauran-16 α -ol (estrutura 34, p. **26**) e caur-16-en-3 α -ol (estrutura **35**, p. 26), a partir do epicarpo dos frutos de *H. stigonocarpa* por ANDREÃO (2010).

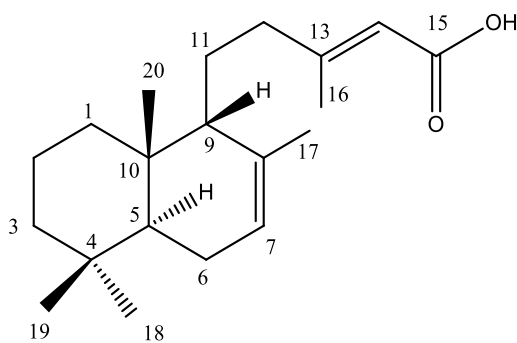
Estes relatos evidenciam a produção de uma ampla gama de diterpenoides de diferentes classes pelas espécies *Hymenaea*.

Neste estudo realizou-se o isolamento de quatro diterpenoides, sendo três de esqueleto labdano: o ácido labd-7,13-dien-15-oico (substância I), isolado anteriormente de *H. courbaril* (MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE

PAIVA CAMPELLO, 1975); o ácido labd-7-en-15-oico (substância II), estrutura ainda não relatada para espécies deste gênero; o ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico (substância III), isolado de *H. courbaril* (CUNNINGHAM, MARTIN & LANGENHEIM, 1973) e um diterpenoide de esqueleto halimano, o ácido *ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico (substância VI), estrutura ainda não relatada na literatura.

4.2.1.1 - Identificação estrutural do ácido labd-7,13-dien-15-oico - substância I

O ácido labd-7,13-dien-15-oico (I) foi isolado da fração 1.8.2.7 (10,1 mg) na forma de cristais brancos e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY, e comparação com dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura (MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO, 1975; IMAMURA *et al.*, 1977).



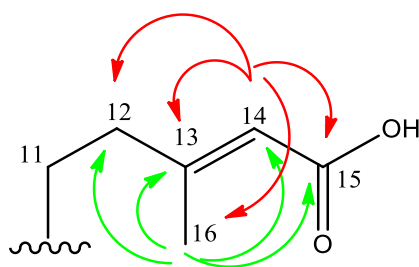
I

Pelo espectro de RMN de ^{13}C observou-se a presença de vinte sinais (FIGURA 4.2, p. 67). O sinal em δ_c 171,9 foi atribuído ao carbono do ácido carboxílico. Os sinais em δ_c 50,1 e 54,4 são característicos dos carbonos C-5 e C-9, respectivamente, de diterpenoides labdanos, com ligação dupla entre C-7 e C-8. Estes por sua vez, foram observados em 122,8 e 134,6 ppm. Os sinais em δ_c 163,6 e 115,0 foram atribuídos aos carbonos C-13 e C-14 da segunda ligação dupla.

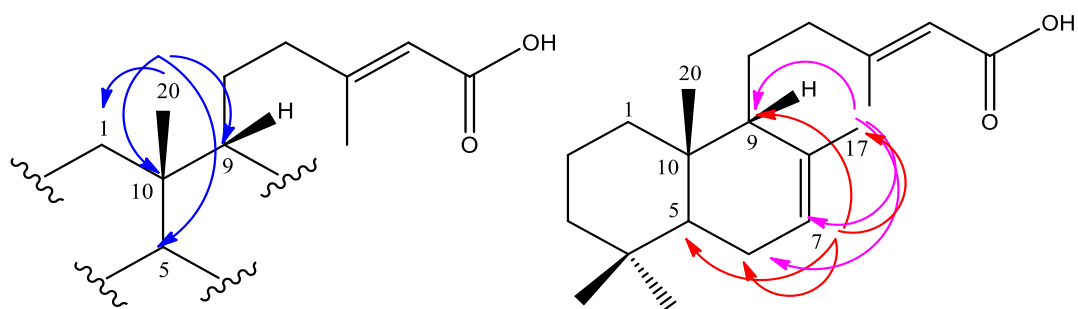
Através do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.1, p. 66), observou-se dois sinais em δ_H 5,71 (*dl*, $J = 0,9$ Hz) e 5,42 (*sl*), atribuídos aos prótons metínicos de ligações duplas (H-14 e H-7, respectivamente), e duas metilas em δ_H 1,71 (*sl* - CH₃-17) e 2,20 (CH₃-16) (*dl*, $J = 0,9$ Hz) que são características de diterpenoides do tipo labdano. Os demais sinais estão listados na TABELA 4.1 (p. 65).

As correlações diretas entre ^1H e ^{13}C foram observadas no espectro de HSQC (FIGURA 4.3, p. 68), as quais estão compiladas na Tabela 4.1. A comparação dos dados de ^{13}C obtidos pela análise espectral, com os dados de ^{13}C da literatura (IMAMURA *et al.*, 1977), levaram à constatação de que os sinais dos carbonos em δ_{C} 25,3 e 22,2, referentes ao grupo metileno da posição 11 (CH_2 -11) e à metila da posição 17 (Me-17), foram atribuídos de maneira invertida, conforme assinalado na FIGURA 4.4 (p. 69).

No espectro de HMBC (FIGURA 4.5, p. 70) observou-se as correlações entre o sinal em δ_{H} 5,71 (H-14) com os sinais em δ_{C} 43,6, atribuído ao C-12, δ_{C} 171,9 e δ_{C} 19,3, confirmando a atribuição feita a C-15 e C-16, respectivamente. O sinal em δ_{H} 2,20 correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 43,6 (C-12), δ_{C} 163,3 (C-13), δ_{C} 115,0 (C-14) e δ_{C} 171,9 (C-15). Essas correlações são mostradas a seguir, confirmando a presença da cadeia lateral do ácido labd-7,13-dien-15-oico.



Observou-se ainda a correlação do sinal em δ_{H} 5,42 (H-7) com os sinais em δ_{C} 50,1 (atribuído a C-5), δ_{C} 23,8 (atribuído a C-6), δ_{C} 54,4 (atribuído a C-9) e δ_{C} 22,2 (C-17). Também observou-se a correlação do sinal em δ_{H} 1,71 com os sinais de C-6 (23,8 ppm), C-7 (que apresentou deslocamento químico de 122,8 ppm), C-8 (134,6 ppm) e C-9 (54,4 ppm). O sinal em δ_{H} 0,77, referente à Me-20, mostrou correlação com os sinais dos carbonos C-1 (cujo deslocamento atribuído foi de 39,2 ppm), C-5, C-9 e C-10. Ambos os sinais em 0,87 ppm (Me-18) e 0,89 ppm (Me-19) correlacionaram-se com o carbono C-5. As principais correlações citadas são mostradas a seguir.



A estereoquímica relativa da substância I foi determinada através do experimento de NOESY-2D. No espectro (Figura 4.8, p. 73), observou-se a correlação entre o sinal referente à Me-20 (δ_H 0,77) com o sinal correspondente ao H-9 (δ_H 1,65), evidenciando que ambos estão na mesma face (face α).

Constatou-se, também, uma correlação do sinal da Me-20 com o sinal pertencente à Me-19 (δ_H 0,89), indicando que este grupo também encontra-se posicionado na face α . Conseqüentemente, a Me-18 está posicionada na face oposta (β).

O sinal da Me-18 (δ_H 0,87), apresentou uma correlação com o sinal de H-5 (δ_H 1,19), sugerindo que este grupo está posicionado na face β , conforme representado abaixo.

Portanto, após a análise dos espectros de RMN e comparação com os dados da literatura (IMAMURA *et al.*, 1977), identificou-se a estrutura como sendo a do ácido labd-7,13-dien-15-oico.

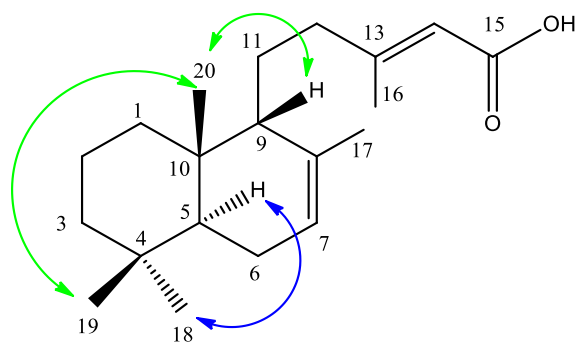


TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância I e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA I (400/100 MHz, CDCl_3)				MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO, 1975 (100 MHz CDCl_3)	IMAMURA <i>et al.</i> , 1977 (25 MHz, CDCl_3)
C/H	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	HMBC	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1a 1b	39,2	1,85 (<i>m</i>) 0,97 (<i>m</i>)			39,2
2a 2b	18,8	1,56 (<i>m</i>) 1,47 (<i>m</i>)			18,8
3a 3b	42,2	1,42 (<i>m</i>) 1,18 (<i>m</i>)			42,3
4	33,0				33,0
5	50,1	1,19 (<i>m</i>)	C-6, C-7, C-9, C-10, C-19, C-20		50,2
6a 6b	23,8	2,00 (<i>m</i>) 1,88 (<i>m</i>)	C5, C10		23,8
7	122,8	5,42 (<i>sl</i>)	C-5, C-6, C-9, C-17	5,36 (<i>m</i>)	122,7
8	134,6				134,4
9	54,4	1,65 (<i>m</i>)			54,5
10	36,8				36,9
11a 11b	25,3	1,63 (<i>m</i>) 1,36 (<i>m</i>)	C-8, C-13		22,1*
12a 12b	43,6	2,40 (<i>m</i>) 2,13 (<i>m</i>)	C-9, C-11, C-13, C- 14, C-16		43,6
13	163,6				163,2
14	115,0	5,71 (<i>dl</i> , $J=0,9$)	C-12, C-15, C-16	5,63 (<i>m</i>)	115,2
15	171,9				172,2
16	19,3	2,20 (<i>dl</i> , $J=0,9$)	C-12, C-13, C-14, C- 15	2,15 (<i>d</i> , $J=1,0$)	19,3
17	22,2	1,71 (<i>sl</i>)	C-6, C-7, C-8, C-9	1,65 (<i>s</i>)	25,3*
18	33,1	0,87 (<i>s</i>)	C-3, C-4, C-5, C-19	0,85 (<i>s</i>)	33,1
19	21,8	0,89 (<i>s</i>)	C-3, C-4, C-5	0,86 (<i>s</i>)	21,8
20	13,6	0,77 (<i>s</i>)	C-1, C-5, C-9, C-10	0,75 (<i>s</i>)	13,6

*Valores de δ_{C} invertidos

FIGURA 4.1: Espectro de RMN de ^1H da substância I (CDCl_3 , 400 MHz).

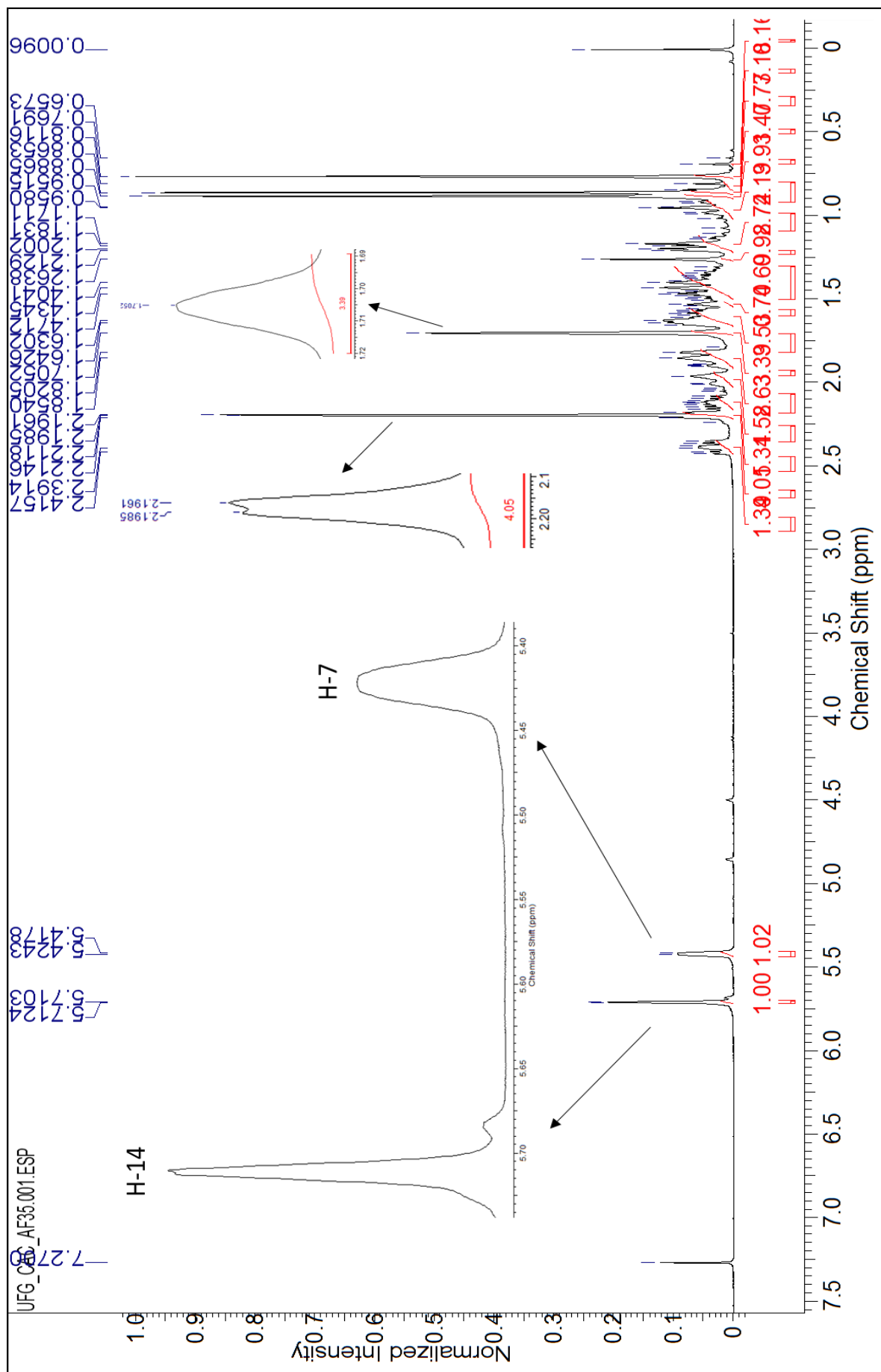


FIGURA 4.2: Espectro de RMN de ^{13}C da substância I (CDCl_3 , 100 MHz).

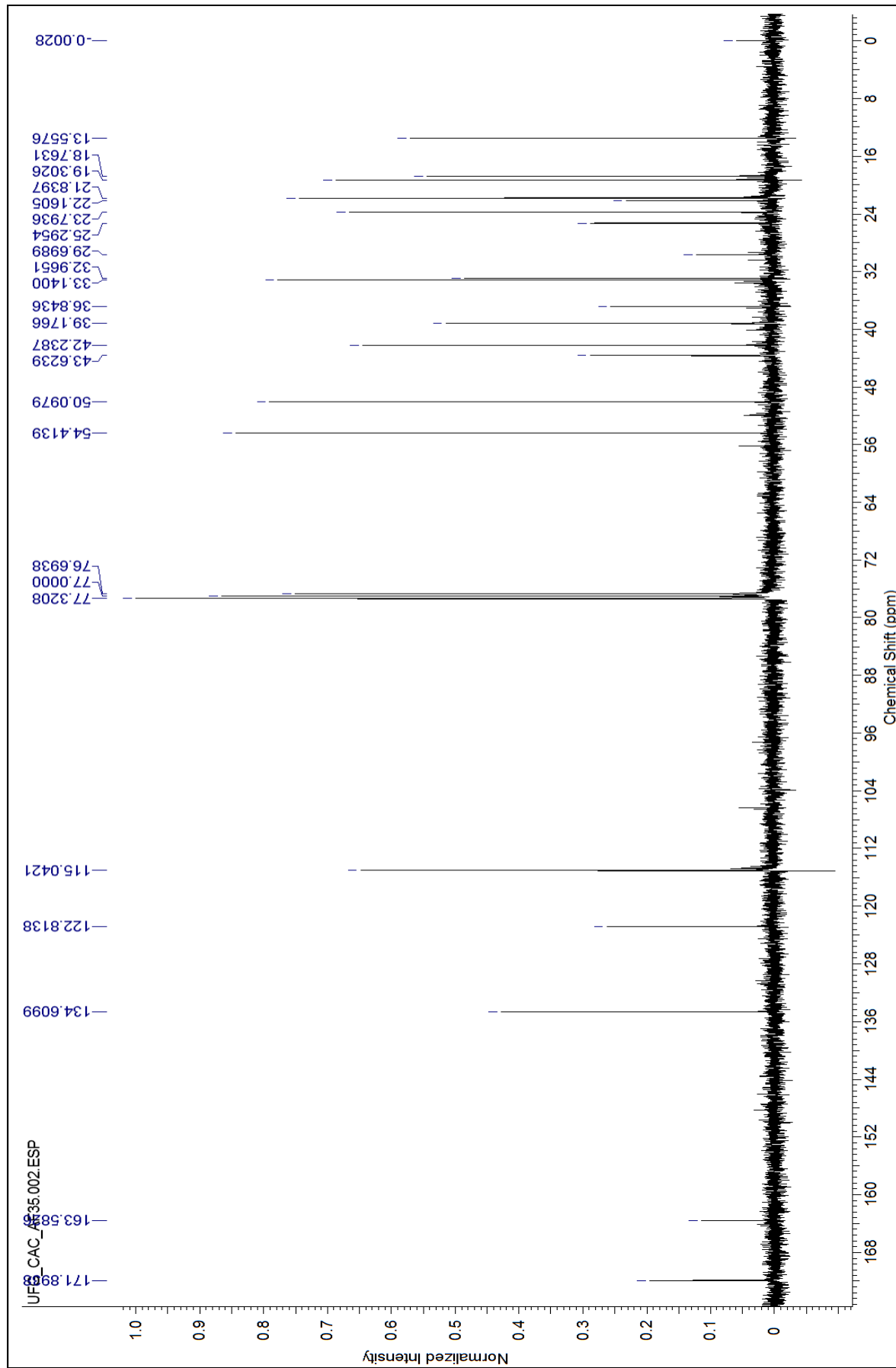


FIGURA 4.3: Mapa de contorno de HSQC da substância I (CDCl₃, 400 MHz).

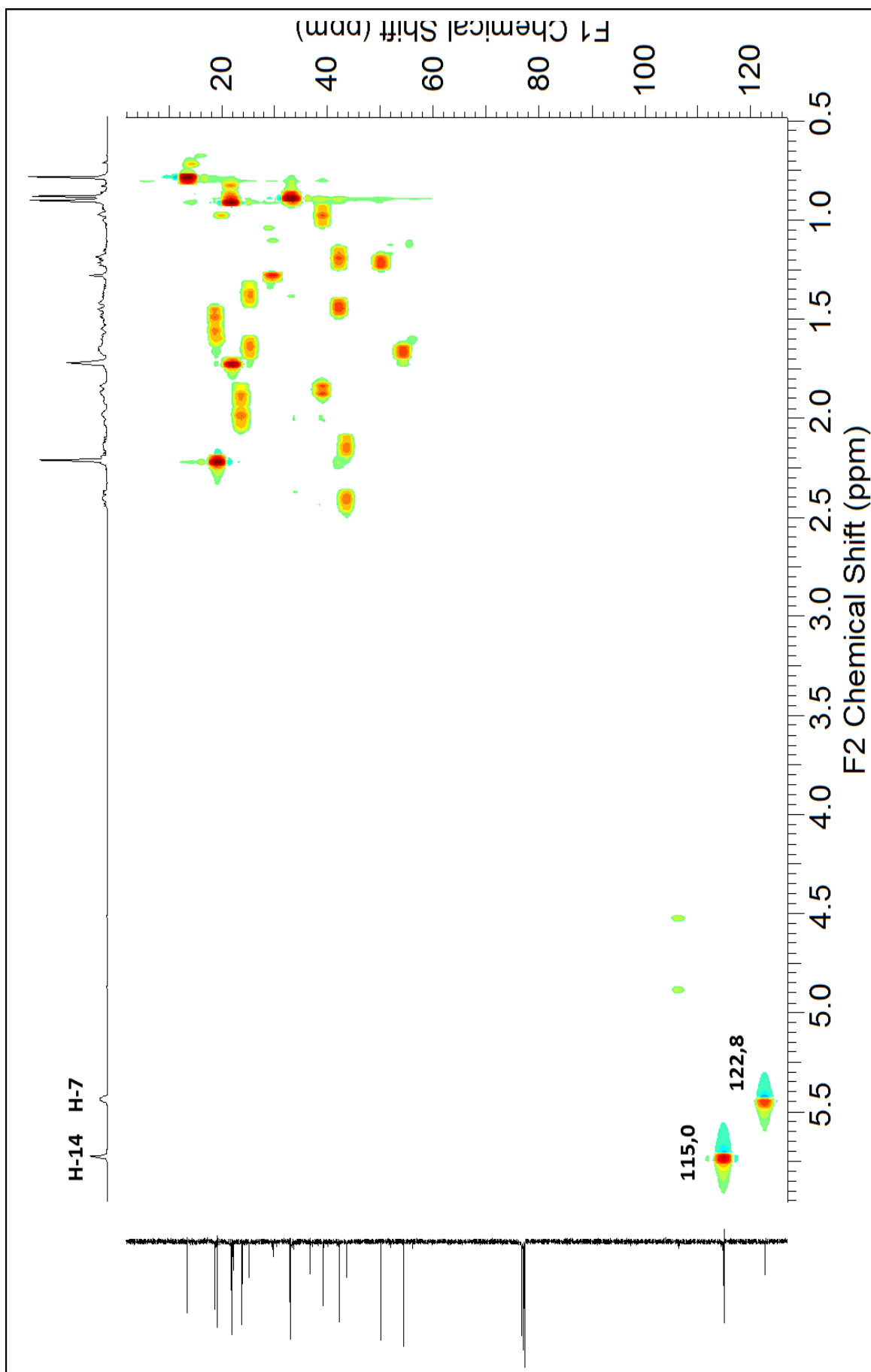


FIGURA 4.4: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância I (CDCl₃, 400 MHz).

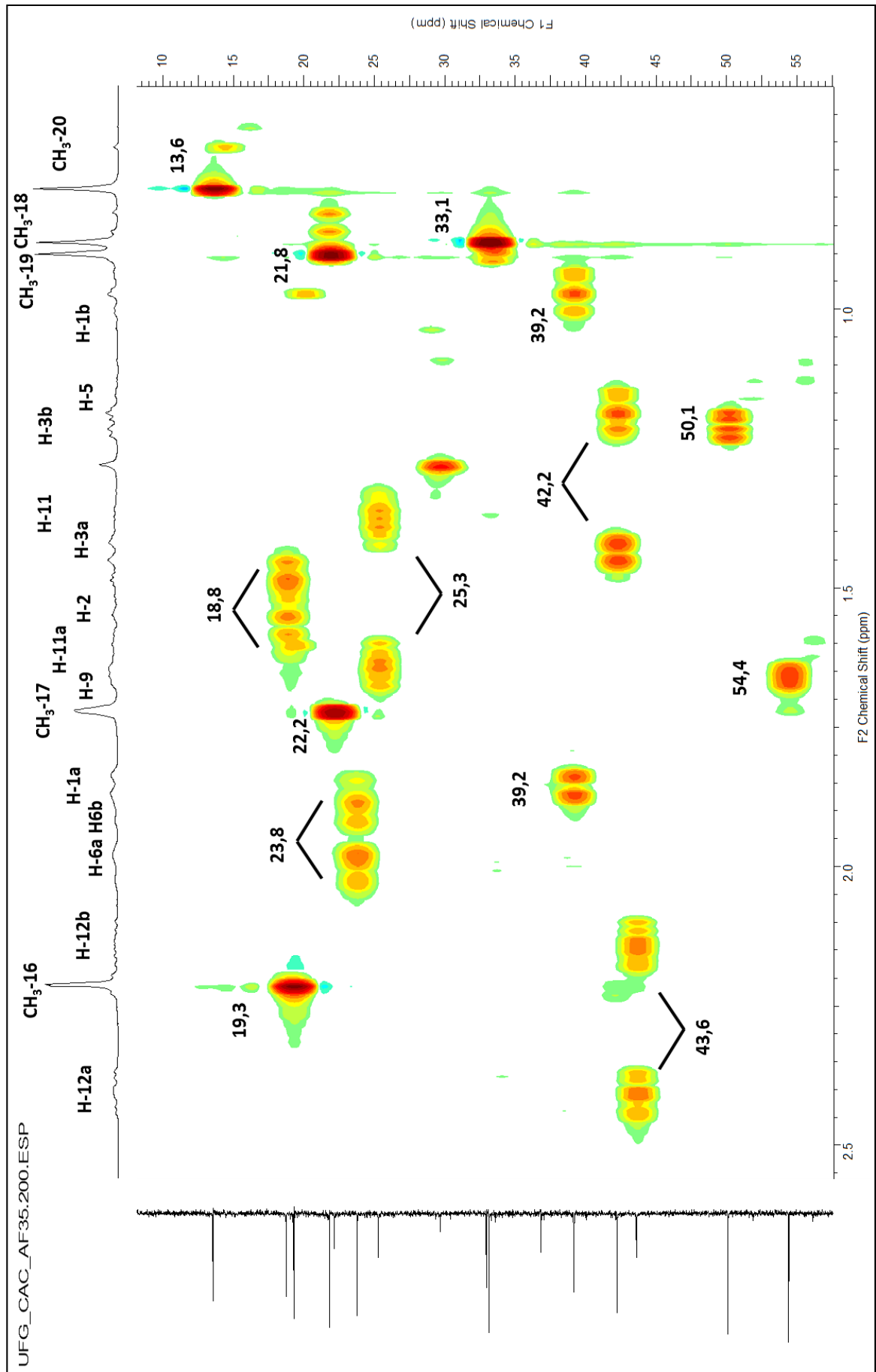


FIGURA 4.5: Mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl₃, 400 MHz).

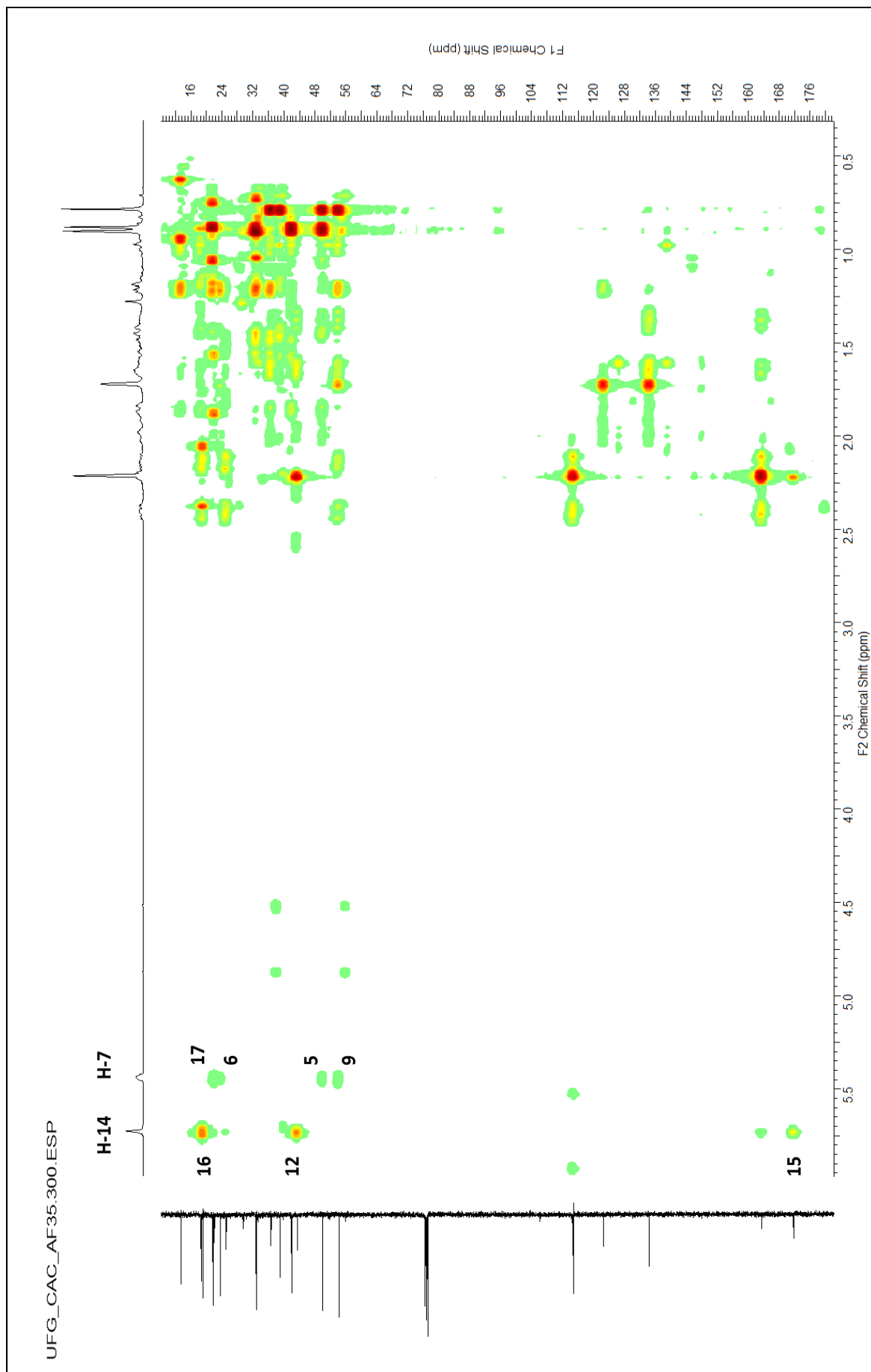


FIGURA 4.6: Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl₃, 400 MHz).

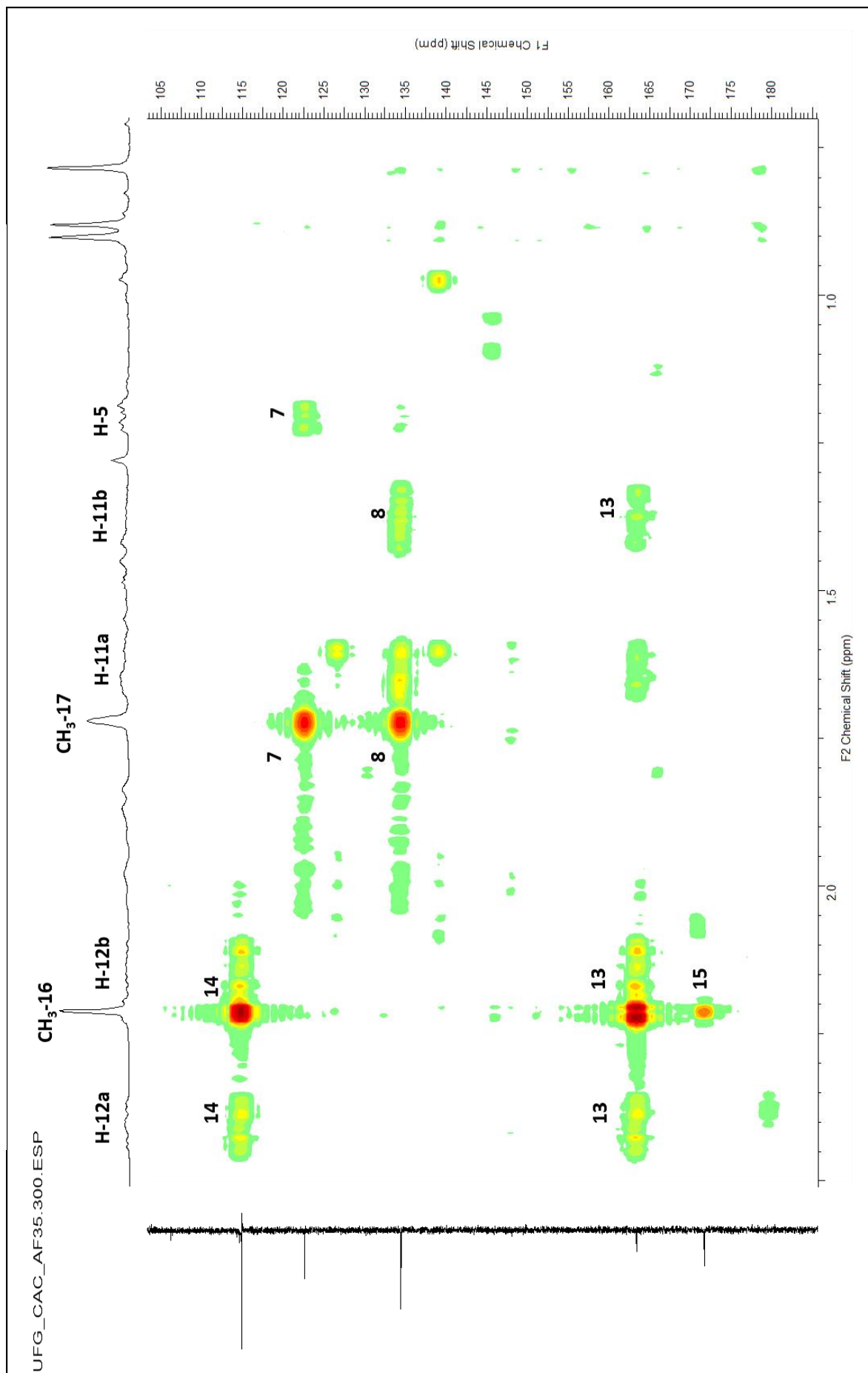


FIGURA 4.7: Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância I (CDCl₃, 400 MHz).

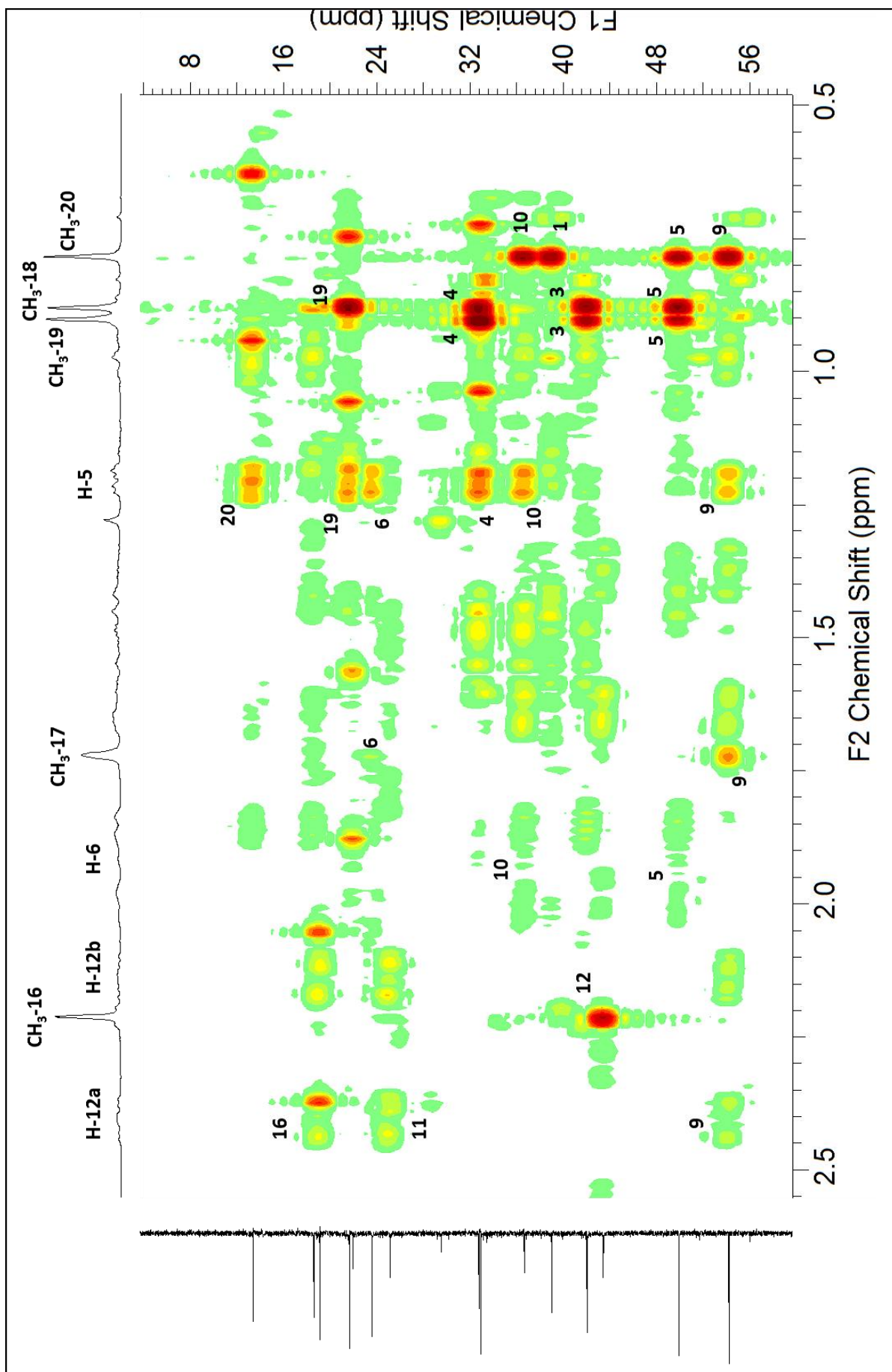
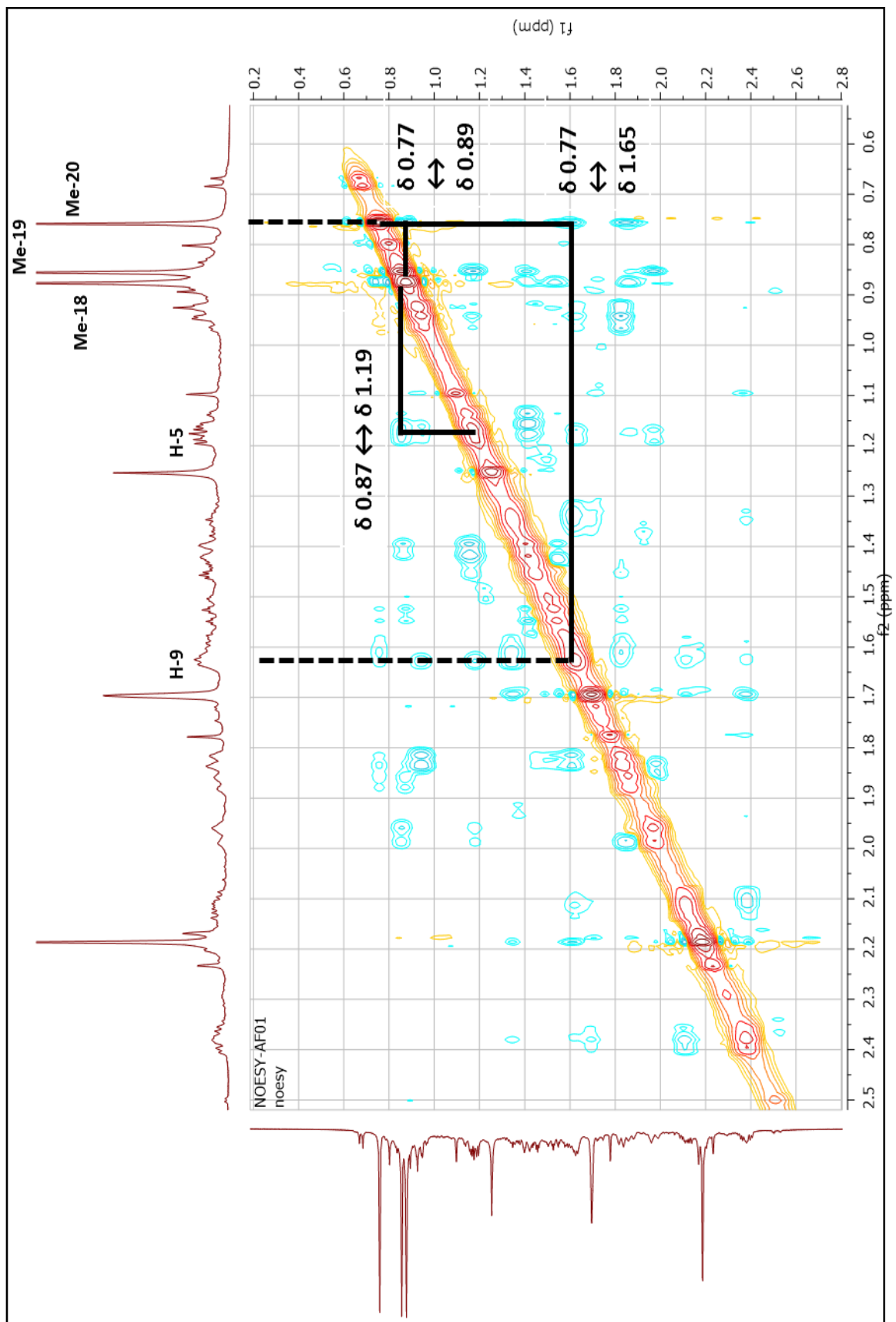
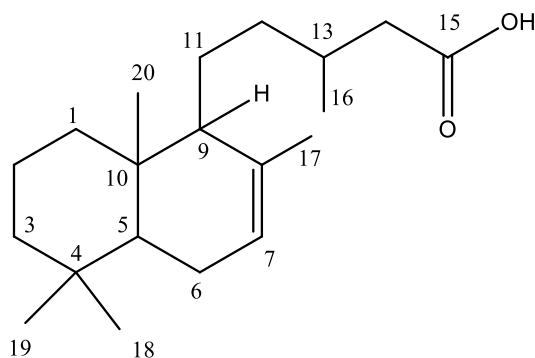


FIGURA 4.8: Espectro de NOESY-2D da substância I (CDCl₃, 600 MHz).



4.2.1.2 - Identificação estrutural do ácido labd-7-en-15-oico - substância II

O ácido labd-7-en-15-oico (substância **II**) foi isolado da fração 1.9.6 (6,3 mg) na forma de cristais brancos, e sua estrutura foi identificada através de experimento de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura (PINTO *et al.*, 2000).



II

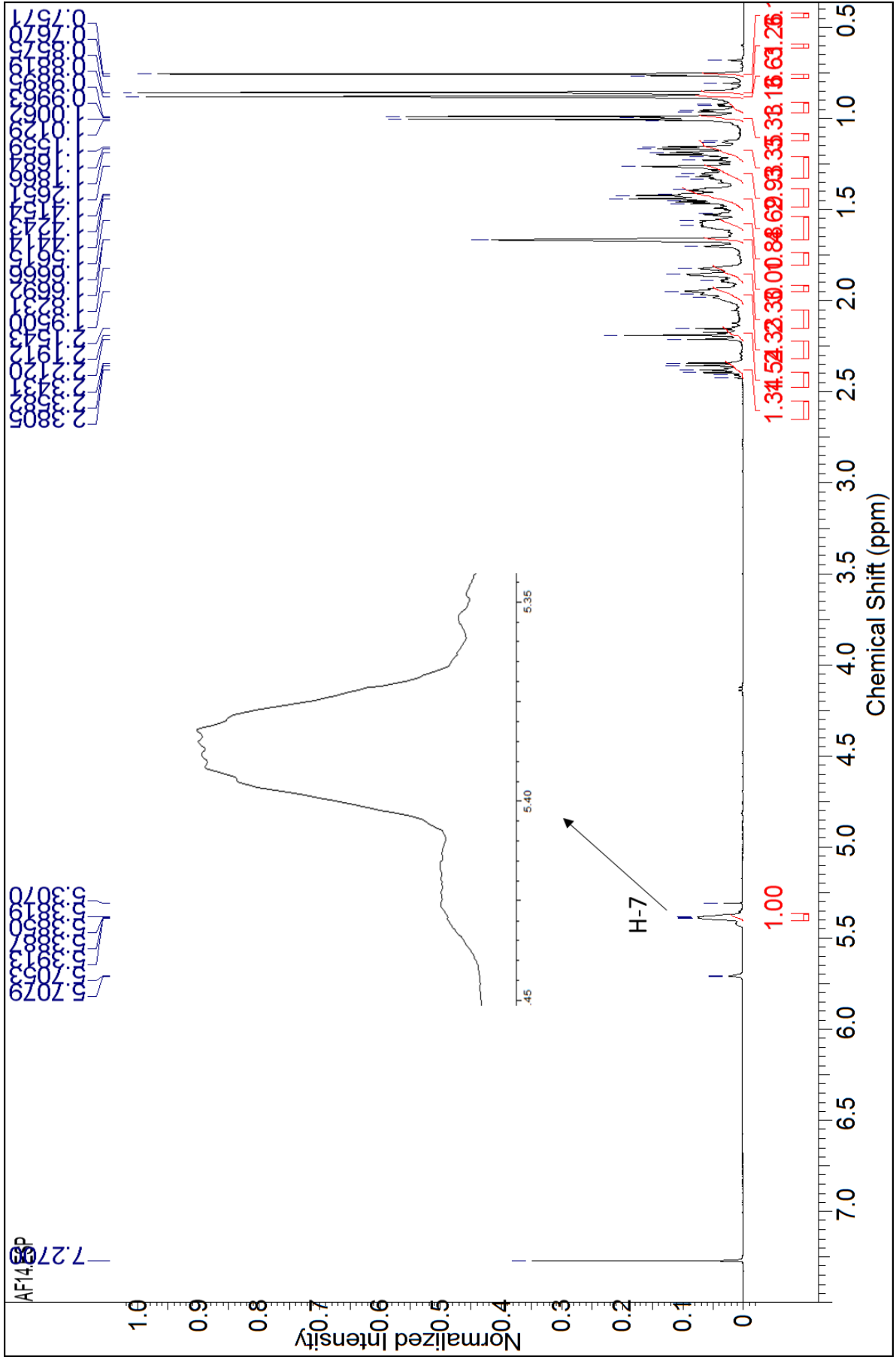
Pelo espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.9, p. 76) e sua expansão (FIGURA 4.10, p. 77), observou-se um sinal em δ_{H} 5,39 (*m*), o qual foi atribuído ao hidrogênio H-7. Observou-se ainda um sinal em δ_{H} 1,00 (*d*, $J= 6,7$ Hz) atribuído a metila CH_3 -16, o qual acopla com H-13 à J^3 (acoplamento vicinal). Também notou-se a presença de um sinal em 1,66 ppm (*m*), o qual foi atribuído à Me-17. Os sinais em δ_{H} 0,86 (*s*), δ_{H} 0,88 (*s*), e δ_{H} 0,76 (*s*) foram atribuídos às metilas Me-18, Me-19 e Me-20, respectivamente.

Portanto, após a análise dos dados espectrais e comparação com os dados da literatura (TABELA 4.2, p. 75), identificou-se a estrutura como sendo a do ácido labd-7-en-15-oico.

TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H da substância II e comparação com a literatura.

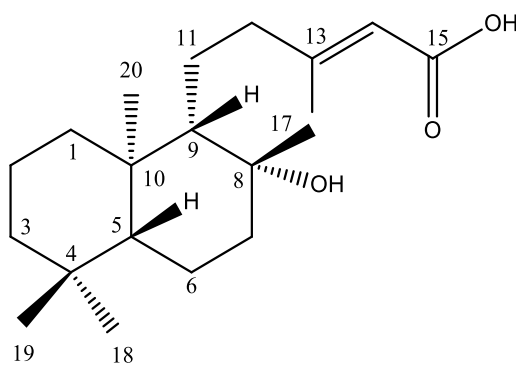
SUBSTÂNCIA II (400 MHz, CDCl_3)		PINTO <i>et al.</i> , 2000 (300 MHz, CDCl_3)
H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	5,39 (<i>m</i>)	5,39 (<i>sl</i>)
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	1,00 (<i>d</i> , $J = 6,6$)	0,97 (<i>d</i> , $J = 6,6$)
17	1,66 (<i>m</i>)	1,68 (<i>s</i>)
18	0,86 (<i>s</i>)	0,81 (<i>s</i>)
19	0,88 (<i>s</i>)	0,84 (<i>s</i>)
20	0,76 (<i>s</i>)	0,78 (<i>s</i>)

FIGURA 4.9: Espectro de RMN de ^1H da substância II (CDCl_3 , 400 MHz).



4.2.1.3 - Identificação estrutural do ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico - substância III

O ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico (III) foi isolado na forma de cristais brancos da fração 2.25.11 (101,8 mg). Sua estrutura foi identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY, e comparação com dados da literatura (IMAMURA *et al.*, 1977).

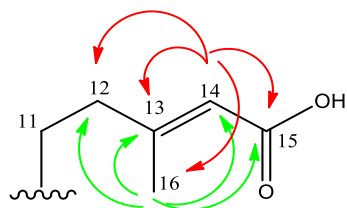


III

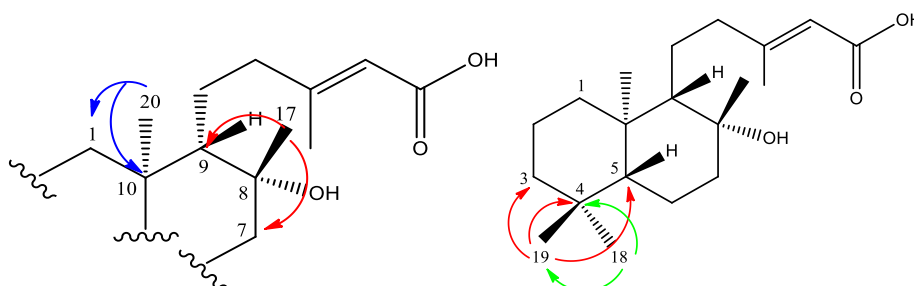
Pelo espectro de RMN de ^{13}C observou-se a presença de vinte sinais (FIGURA 4.12, p. 82). Observou-se a presença de um sinal em δ_c 171,6, o qual foi atribuído ao carbono do ácido carboxílico. Os sinais em δ_c 163,9 e 114,6 foram atribuídos aos carbonos C-13 e C-14, respectivamente. O sinal em δ_c 74,4 indica a presença de um carbono oximetínico e este sinal foi atribuído ao carbono C-8. Os deslocamentos em δ_c 21,5, 33,4 e 15,4 foram atribuídos às metilas C-18, C-19 e C-20, respectivamente. O sinal em δ_c 24,0 foi atribuído à Me-17, enquanto o deslocamento em 19,4 ppm foi atribuído à Me-16.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.11, p. 81), observou-se um singlete largo em δ_H 5,71, atribuído ao próton metínico (H-14) da ligação dupla. Observou-se também os sinais referentes à duas metilas, uma em δ_H 1,17 (Me-17) e a outra em 2,18 (CH₃-16). Os demais sinais estão listados na TABELA 4.3 (p. 80).

No espectro de HSQC foram observadas as correlações diretas entre ^1H e ^{13}C (FIGURA 4.13, p. 83), as quais estão compiladas na TABELA 4.3. No espectro de HMBC (FIGURA 4.15, p. 85), observou-se as correlações entre o sinal em 5,71 (H-14) com os sinais em δ_c 44,5, atribuído ao C-12, 163,9, 171,6 e 19,4, confirmando a atribuição feita aos sinais referentes à C-13, C-15 e C-16, respectivamente. O sinal em δ_H 2,18 (H-16) correlacionou-se com os sinais em δ_c 44,5 (atribuído a C-12), 163,9 (C-13), 114,6 (C-14) e 171,6 (C-15). Essas correlações são apresentadas na sequência.



Também observou-se a correlação do sinal em δ_H 1,17 (Me-17) com os sinais em δ_C 44,6 (atribuído à C-7), δ_C 74,4 (C-8) e em δ_C 61,3 (atribuído à C-9). O sinal em δ_H 0,80 (correspondente à Me-18) mostrou correlação com os sinais em δ_C 41,9, o qual foi atribuído à C-3, δ_C 33,2 (referente a C-4), δ_C 56,1 (C-5) e δ_C 33,4 (C-19). O sinal em 0,88 ppm correlacionou-se com os sinais dos carbonos C-3, C-4 e C-5, enquanto o sinal em δ_H 0,79, referente à Me-20, mostrou correlação com os sinais referentes a C-9 e C-10.



No espectro de NOESY-2D (FIGURA 4.17, pg. 87), observou-se a correlação entre o sinal referente à Me-17 (δ_H 1,17) com o sinal correspondente ao H-9 (δ_H 1,09), indicando que ambos estão na mesma face (face α). Como consequência, o grupo hidroxila está situado na face β .

Observou-se, ainda, uma correlação de H-9 com H-5 (δ_H 0,92), e deste último com Me-17, evidenciando o posicionamento de H-5 na mesma face que esses dois grupos (face α). O sinal da Me-17 também mostrou uma correlação com o da Me-19 (δ_H 0,88). Desta forma, estabeleceu-se a configuração relativa da estrutura conforme mostrado abaixo.

Portanto, através da análise dos espectros de RMN e comparação com a literatura, identificou-se a estrutura como sendo a do ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8 β -ol-15-oico.

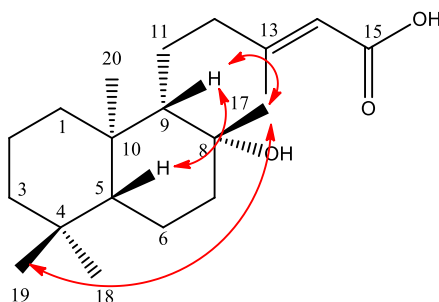


TABELA 4.3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância III e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA III (400 /100 MHz, CDCl_3)				MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO , 1975 (100 MHz CDCl_3)	IMAMURA <i>et al.</i> , 1977 (25 MHz, CDCl_3)
C/H	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	HMBC	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
1a	39,8	1,67 (<i>m</i>)			39,8
1b		0,97 (<i>m</i>)			
2a	18,4	1,63 (<i>m</i>)			18,2
2b		1,46 (<i>m</i>)			
3a	41,9	1,41 (<i>m</i>)			41,9
3b		1,18 (<i>m</i>)			
4	33,2				33,1
5	56,1	0,92 (<i>m</i>)	C-7, C-9, C-10, C-18, C-19, C-20		56,1
6a	23,5	1,61 (<i>m</i>)			23,5
6b		1,44 (<i>m</i>)			
7	44,6	1,90 (<i>m</i>) 1,42 (<i>m</i>)	C-5, C-8, C-9, C-17		44,7
8	74,4				74,4
9	61,3	1,09 (<i>tl</i> , $J= 3,5$)	C-1, C-5, C-7, C-8, C-12, C-17, C-20		61,3
10	39,2				39,2
11a	20,5	1,65 (<i>m</i>)			20,5
11b		1,29 (<i>m</i>)			
12a	44,5	2,33 (<i>m</i>)	C-9, C-13, C-14, C- 16, C-17		44,5
12b		2,24 (<i>m</i>)			
13	163,9				163,9
14	114,6	5,71 (<i>sl</i>)	C-12, C-15, C-16	5,66 (<i>m</i>)	114,7
15	171,6				171,5
16	19,4	2,18 (<i>s</i>)	C-12, C-13, C-14, C- 15	2,16 (<i>d</i> , $J=$ 1,0)	19,4
17	24,0	1,17 (<i>s</i>)	C-7, C-8, C-9	1,13 (<i>s</i>)	24,0
18	21,5	0,80 (<i>s</i>)	C-3, C-4, C-5, C-19	0,86 (<i>s</i>)	21,5
19	33,4	0,88 (<i>s</i>)	C-3, C-4, C-5, C-18	0,95 (<i>s</i>)	33,3
20	15,4	0,79 (<i>s</i>)	C-1, C-5, C-9, C-10	0,83 (<i>s</i>)	15,4

FIGURA 4.11: Espectro de RMN de ^1H da substância III (CDCl_3 , 400 MHz).

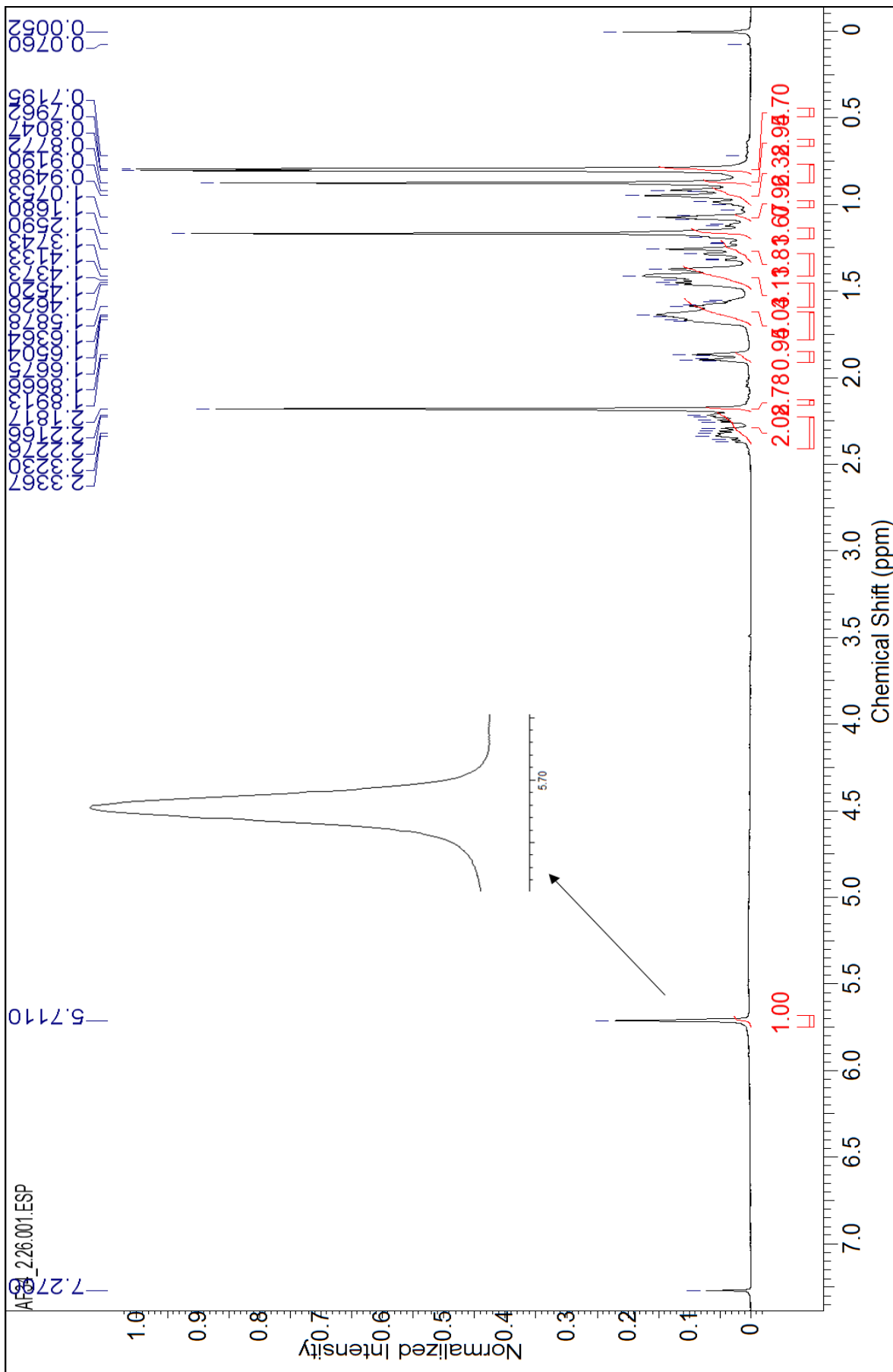


FIGURA 4.12: Espectro de RMN de ^{13}C da substância III (CDCl_3 , 100 MHz).



FIGURA 4.13: Mapa de contorno de HSQC da substância III (CDCl₃, 400 MHz).

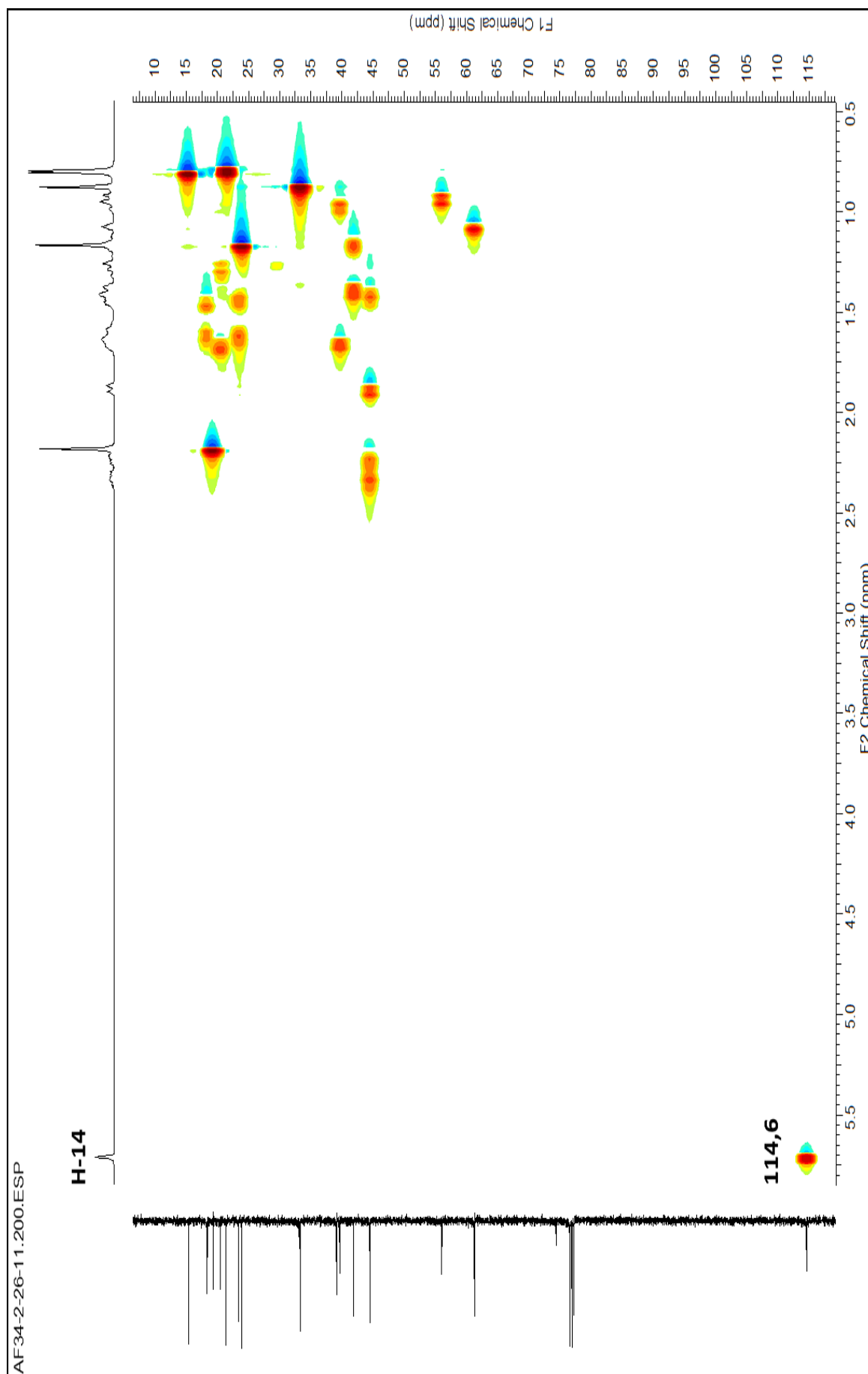


FIGURA 4.14: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância III (CDCl₃, 400 MHz).

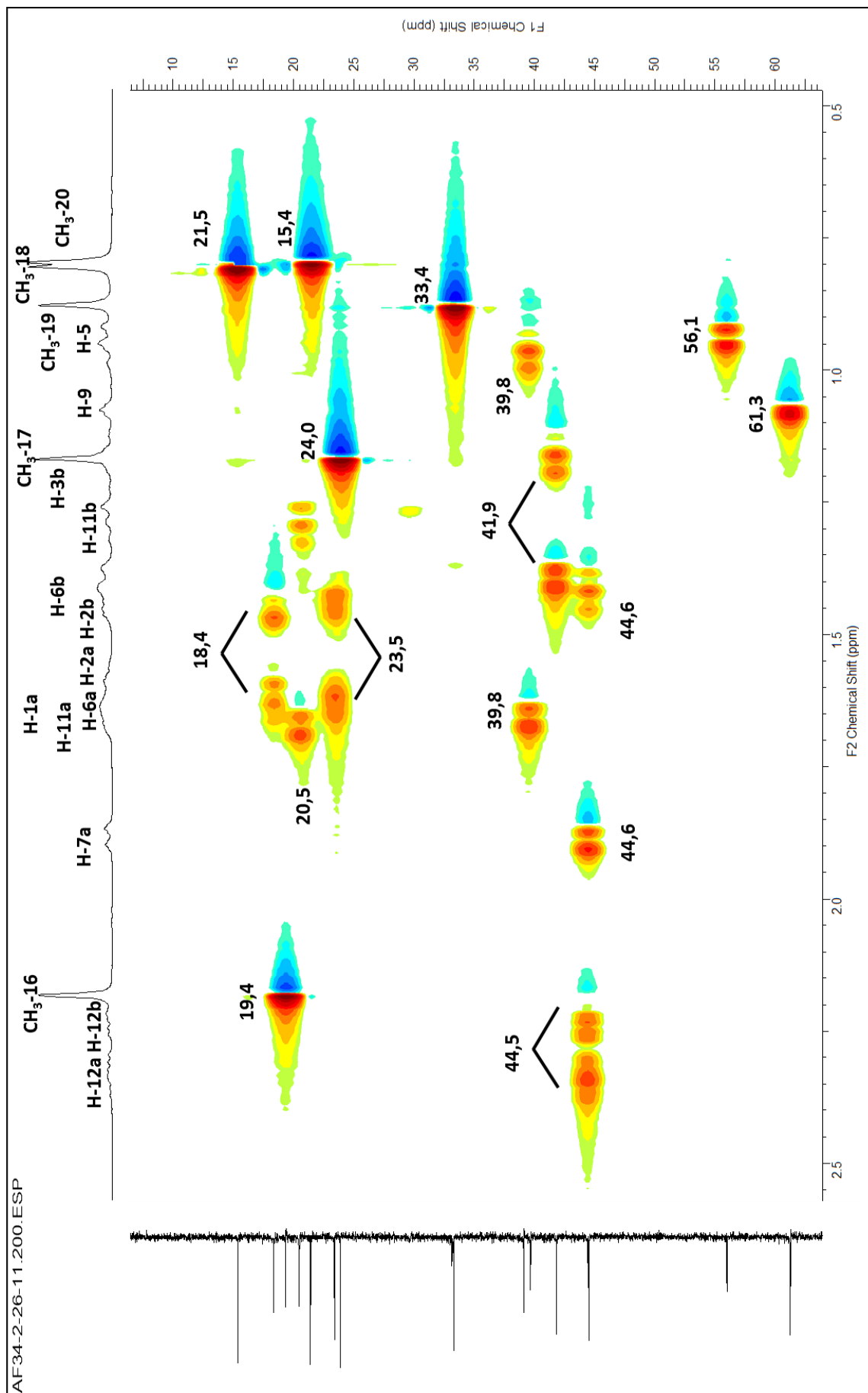


FIGURA 4.15: Mapa de contorno de HMBC da substância 3 (CDCl₃, 400 MHz).

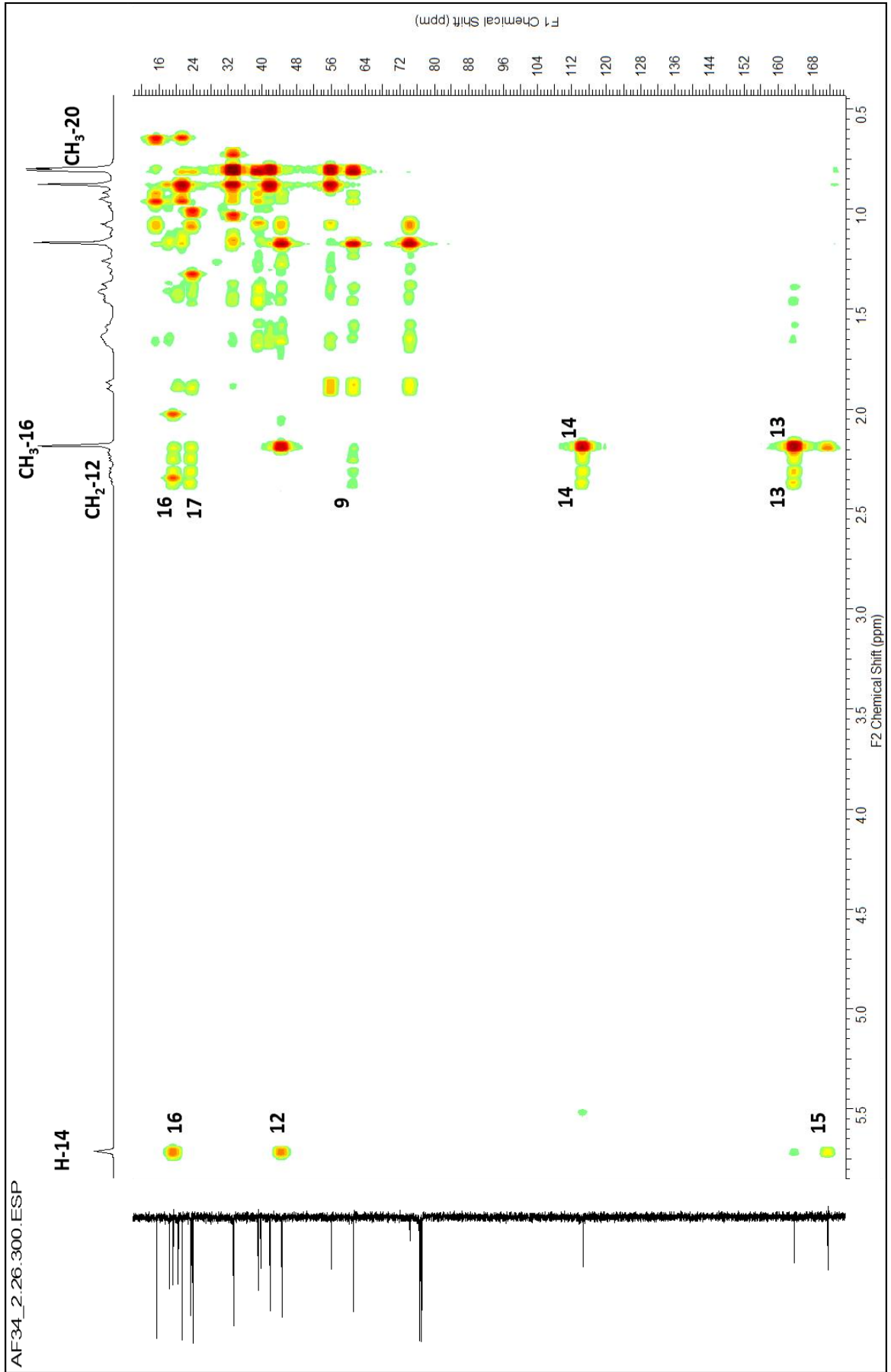


FIGURA 4.16: Mapa de contorno de HMBC da substância III (CDCl₃, 400 MHz).

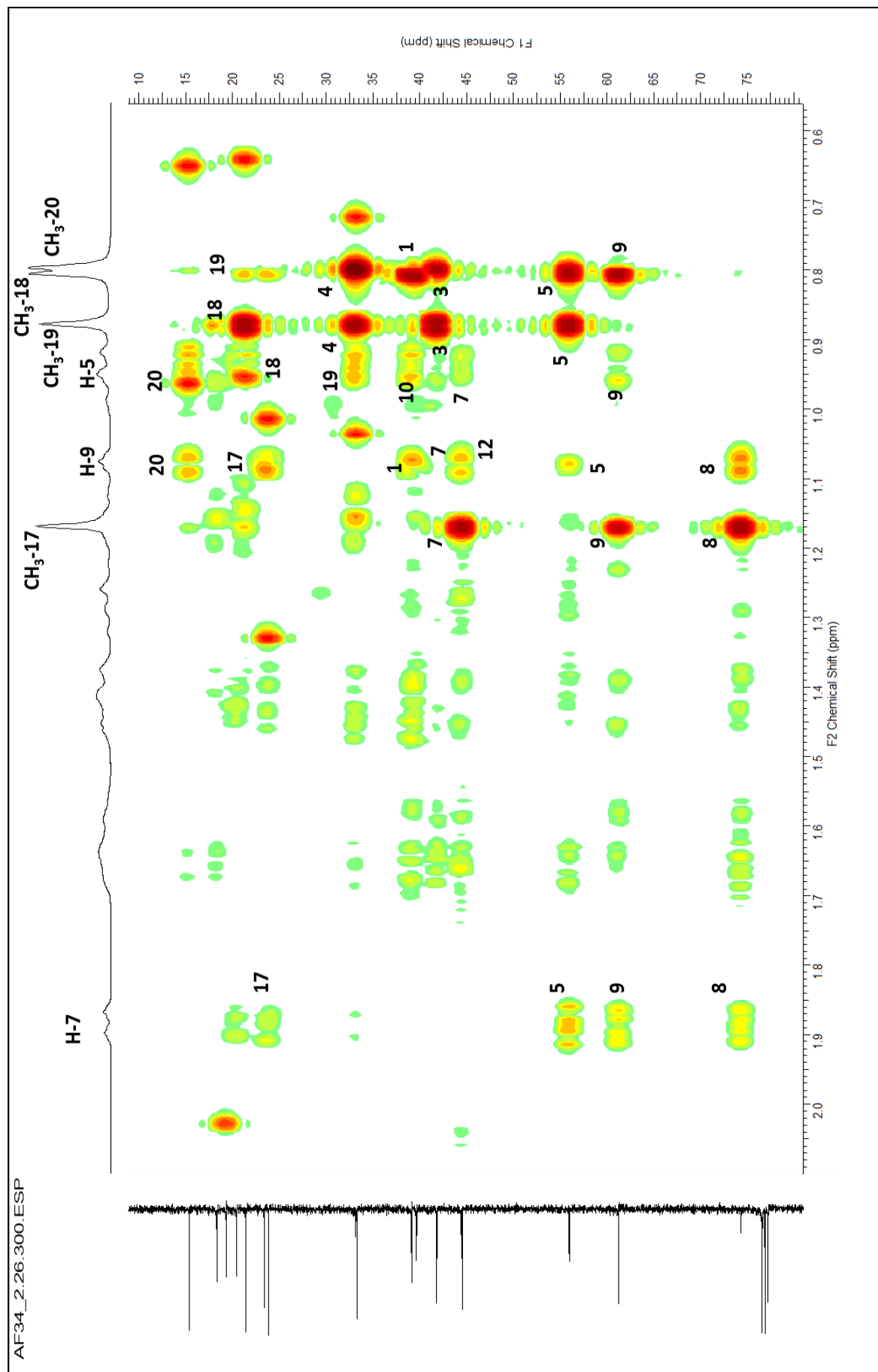
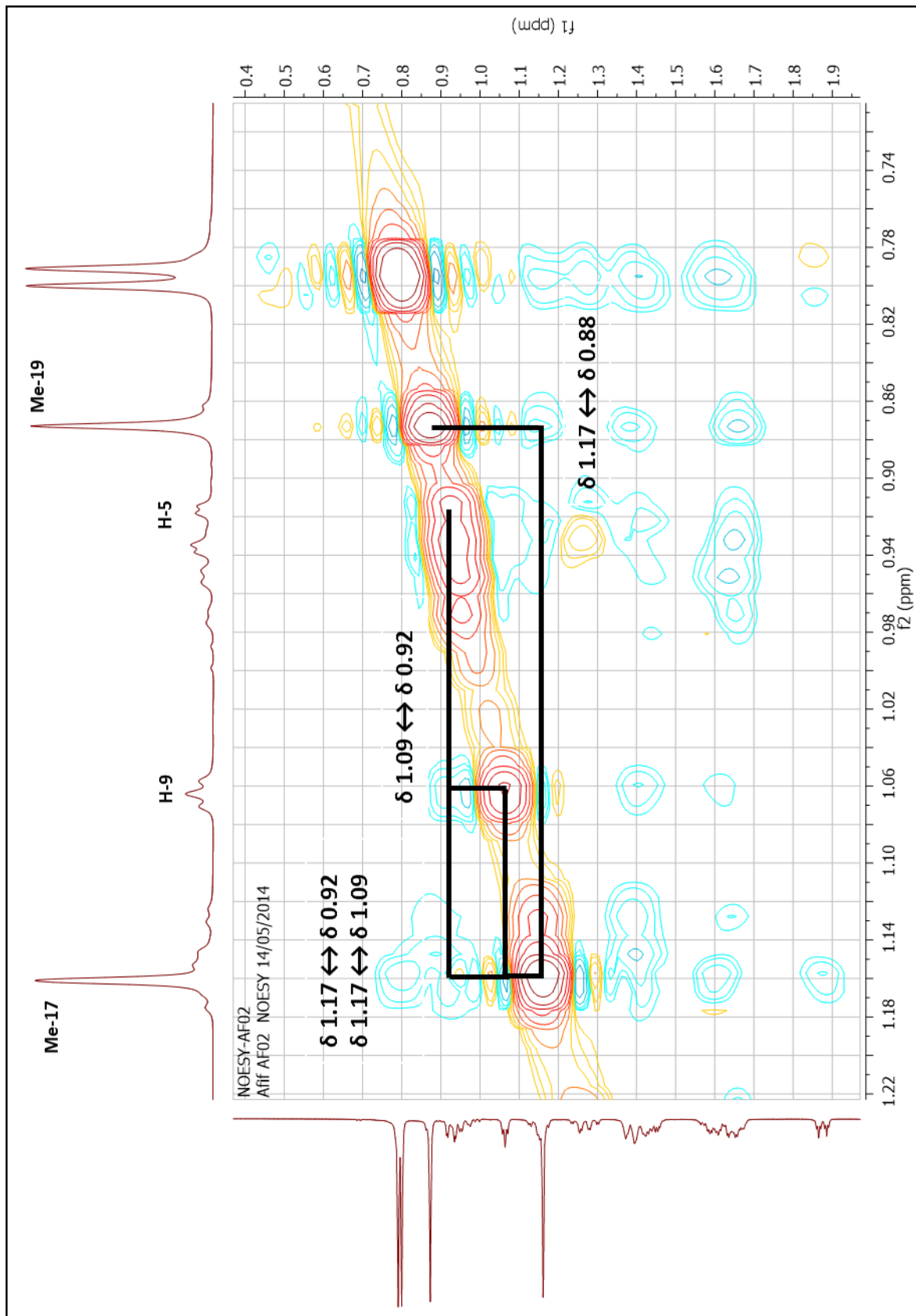


FIGURA 4.17: Espectro de NOESY-2D da substância III (CDCl₃, 600 MHz).



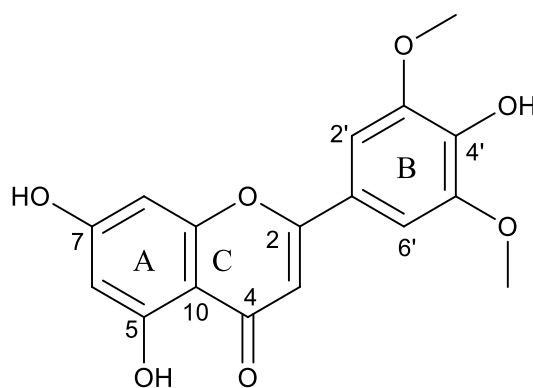
4.2.2 - Identificação estrutural da 4',5,7-tri-hidroxi-3',5-dimetoxiflavona - substância IV

Os flavonoides constituem um grupo amplo de produtos naturais que ocorre em plantas superiores e plantas inferiores, incluindo as algas. Esses metabólitos apresentam dois anéis benzeno separados por uma unidade propano. São compostos geralmente solúveis em água e quanto mais conjugações possuem, mais coloridos são. As classes de flavonoides são distinguidas pelos anéis heterocíclicos contendo oxigênio e grupos hidroxila.

O único relato de isolamento de flavonoides encontrado na literatura para o gênero *Hymenaea* foi referente às substâncias hultenina (estrutura **61**, p. 33), taxifolina (estrutura **62**, p. 33), quercetina (estrutura **63**, p. 34) e 7-metoxicatequina (estrutura 64, pg. 34), isoladas de *H. stigonocarpa* (MARANHÃO *et al.*, 2013).

Neste estudo realizou-se o isolamento de uma isoflavona (substância IV) ainda não relatada para o gênero.

O composto 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (**IV**) foi isolado como um pó amarelo da fração 2.31.2 (3,8 mg) e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC, e comparação com dados da literatura (KUWABARA *et al.*, 2003).



IV

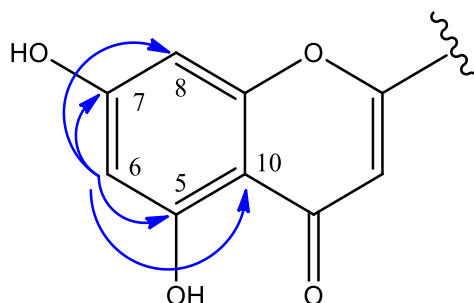
Analisando o espectro de RMN de ^1H de **IV** (FIGURA 4.18, p. 91) observou-se um singlete em δ_{H} 7,31 (2H) referente aos dois hidrogênios H-2' e H-6', os quais são quimicamente equivalentes devido ao plano de simetria existente no anel B. Observou-se, ainda, um sinal de singlete em δ_{H} 6,96 (1H, *s*), o qual foi atribuído ao H-3 e dois sinais de dubletos em δ_{H} 6,17 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) e δ 6,52 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-6 e H-8, os quais acoplam entre si com

constante *meta*, indicando que as posições C-5 e C-7 estão substituídas por hidroxilas. Além disso, observou-se um sinal de singlete intenso em δ_{H} 3,88 (6H, s) referente às metoxilas 3',5'-OCH₃, as quais também são quimicamente equivalentes.

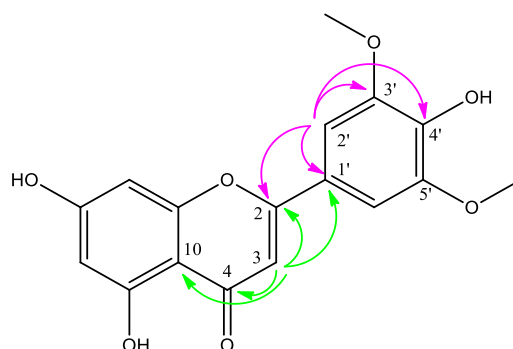
A análise dos espectros de RMN de ¹³C (FIGURA 4.19, p. 92), HSQC (FIGURA 4.20, p. 93) e HMBC (FIGURA 4.21, p. 94) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os átomos do esqueleto carbônico (TABELA 4.4, p. 90).

Pelo espectro de HSQC observou-se que os hidrogênios H-6 e H-8 mostram correlações a J^1 com sinais em δ_{C} 99,0 e δ_{C} 94,3, respectivamente. O sinal em δ_{C} 103,5 foi atribuído ao C-3 e o sinal em 104,4 foi atribuído aos carbonos C-2' e C-6'. Já o sinal em δ_{C} 56,3 foi atribuído aos carbonos das metoxilas ligadas nas posições C-3' e C-5'.

Pelo espectro de HMBC observou-se a correlação entre o sinal de H-6 (δ_{H} 6,17) com C-10 (δ_{C} 103,5), C-5 (δ_{C} 157,4) e com o sinal em C-8 (δ_{C} 94,3). O sinal de H-8 (δ_{H} 6,52) mostrou correlação com C-10 (δ_{C} 103,5), C-5 (δ_{C} 157,4), C-6 (δ_{C} 99,0), e ainda, uma correlação com o sinal em δ_{C} 165,0, o qual foi atribuído ao C-7. Algumas destas correlações são mostradas a seguir.



O sinal de H-3 (δ_{H} 6,96) correlacionou-se com C-10 (δ_{C} 103,5), C-4 (δ_{C} 181,6), C-2 (δ_{C} 163,5) e com o sinal em δ_{C} 120,3 atribuído ao C-1'. O sinal de H-2' e H-6' (δ_{H} 7,31) mostrou correlação com os sinais em δ_{C} 120,3 (C-1'), δ_{C} 163,5 referente ao C-2, δ_{C} 148,2 atribuído aos carbonos C-3' e C-5' e ainda com δ_{C} 140,0, atribuído ao C-4'. O sinal atribuído à 3',5'-OCH₃ mostrou uma correlação com os sinais dos carbonos C-3' e C-5' (δ_{C} 148,2). Estas correlações podem ser visualizadas na sequência.



Desta forma, a estrutura da flavona **IV** foi identificada como sendo a 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona, também conhecida como tricina.

TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **IV** e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA IV (500/125 MHz, DMSO- d_6)		KUWABARA <i>et al.</i> , 2003 (400/100 MHz, DMSO- d_6)		
H/C	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm)
2	-	163,5	-	163,6
3	6,96 (1H, <i>s</i>)	103,5	6,97 (1H, <i>s</i>)	103,5
4	-	181,6	-	181,7
5	-	157,4	-	157,3
6	6,17 (1H, <i>d</i> , $J = 2,1$)	99,0	6,21 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$)	98,8
7	-	165,0	-	165,1
8	6,52 (1H, <i>d</i> , $J = 2,1$)	94,3	6,56 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$)	94,1
9	-	161,4	-	161,3
10	-	103,5	-	103,6
1'	-	120,3	-	120,3
2',6'	7,31 (2H, <i>s</i>)	104,4	7,32 (2H, <i>s</i>)	104,3
3',5'	-	148,2	-	148,1
4'	-	140,0	-	139,8
3',5'-OCH ₃	3,88 (6H, <i>s</i>)	56,3	3,89 (6H, <i>s</i>)	56,3

FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ^1H da substância IV (DMSO- d_6 , 125 MHz).

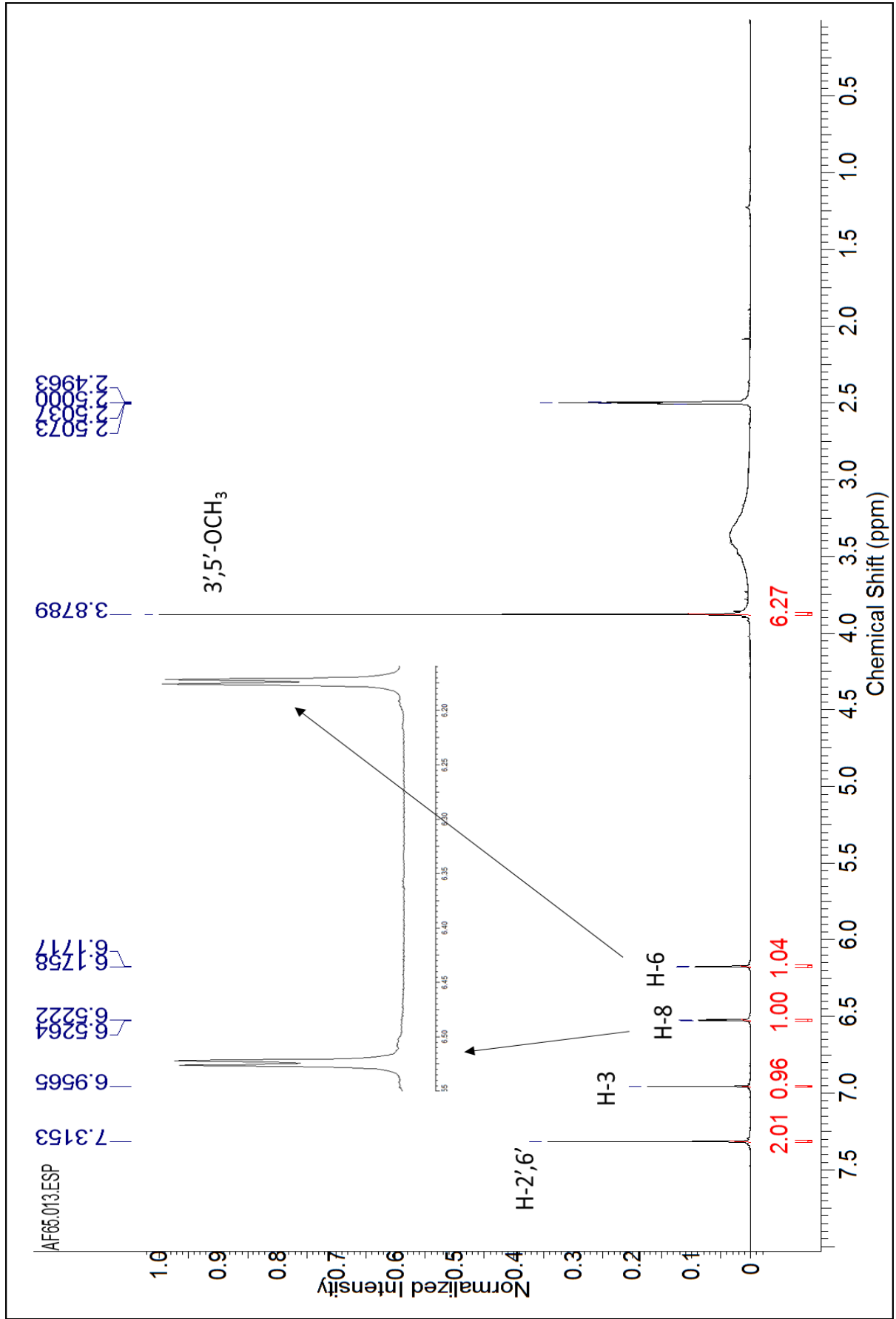


FIGURA 4.19: Espectro de RMN de ^{13}C da substância IV (DMSO- d_6 , 125 MHz).

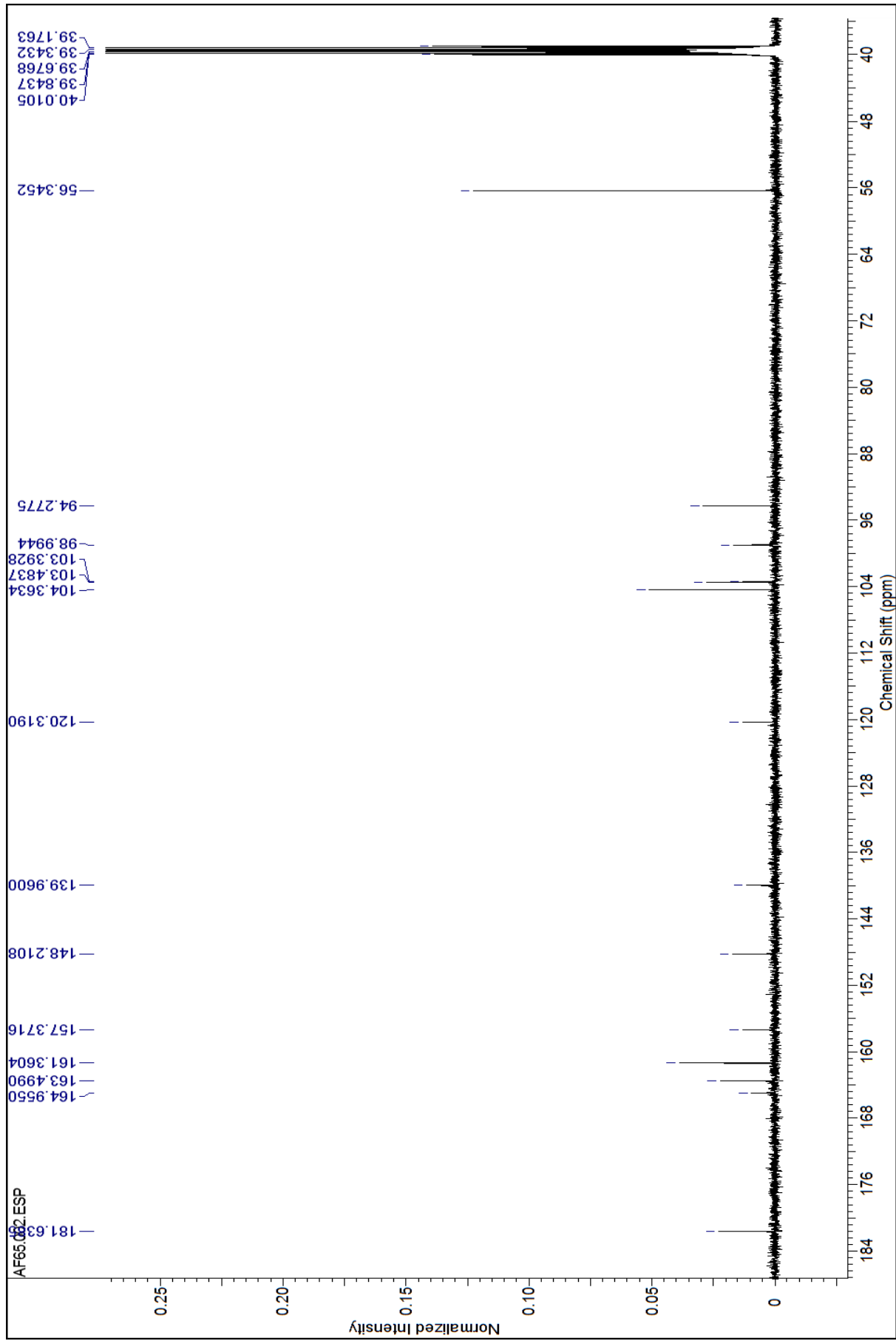


FIGURA 4.20: Mapa de contorno de HSQC da substância IV (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

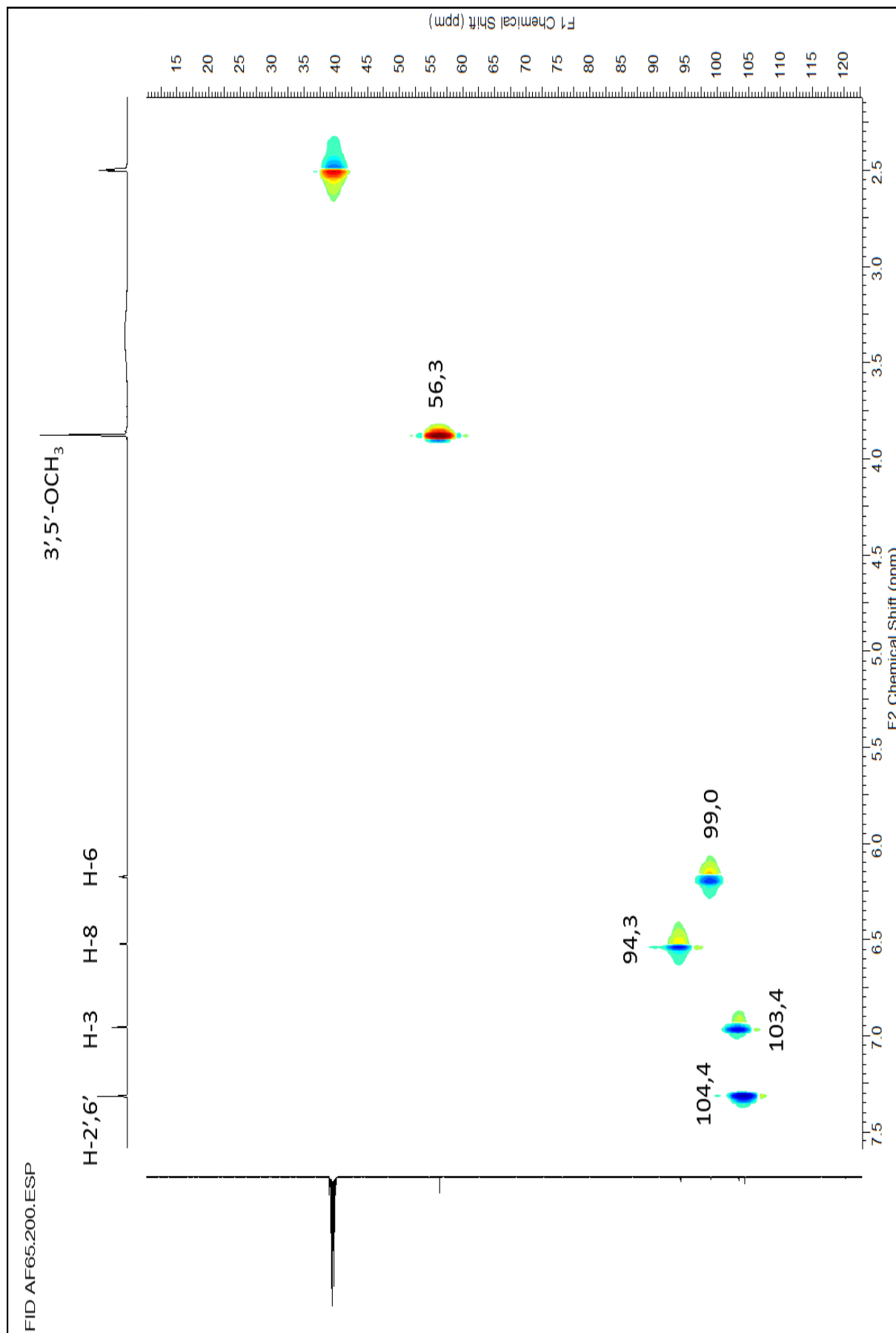
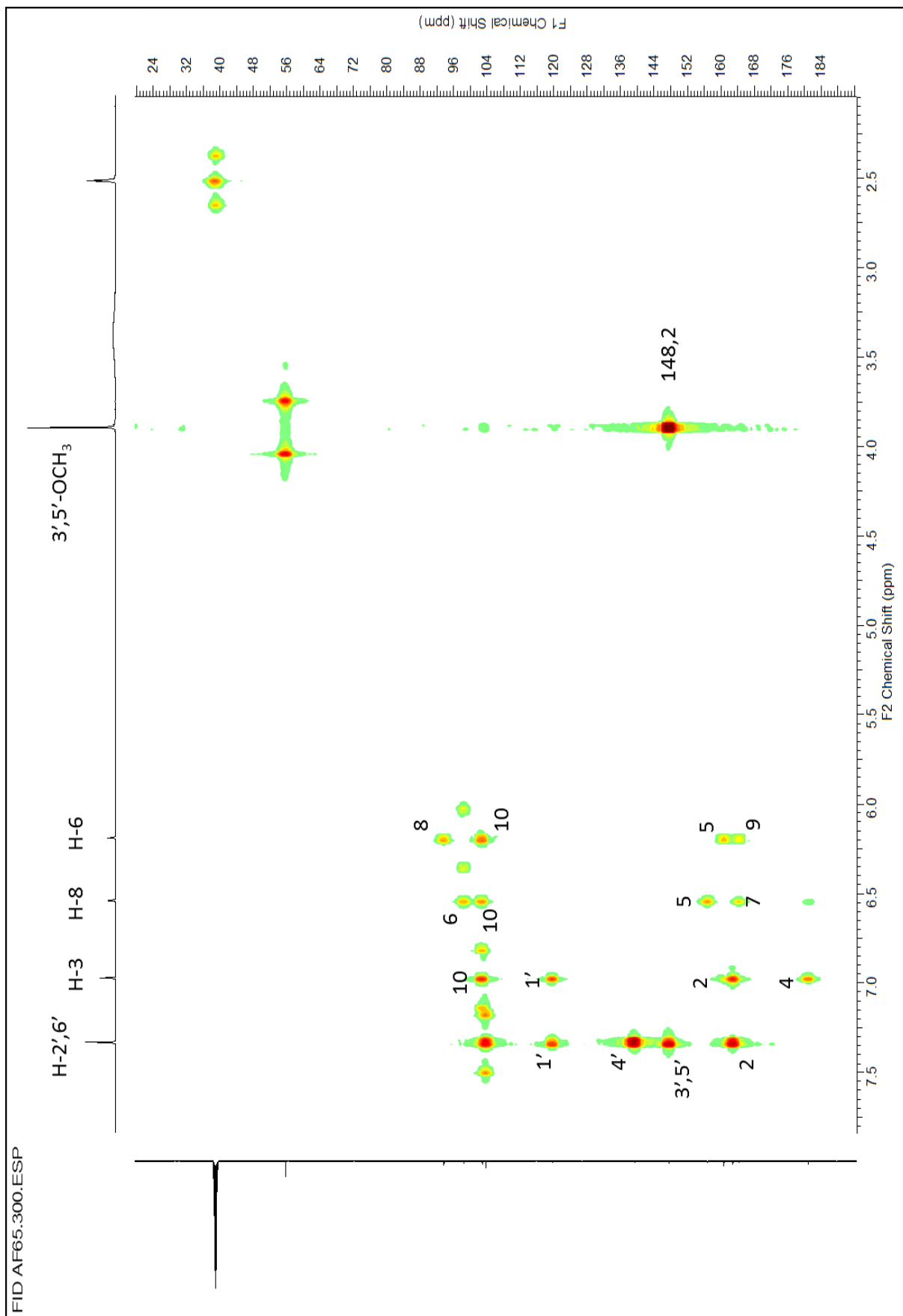


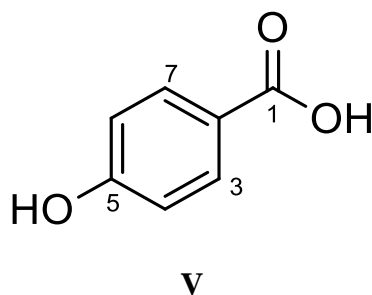
FIGURA 4.21: Mapa de contorno de HMBC da substância IV (DMSO-*d*₆, 500 MHz).



4.2.3 - Identificação estrutural do ácido *p*-hidroxibenzoico – substância V

Não existem relatos na literatura do isolamento de ácidos benzoicos das espécies de *Hymenaea* e, portanto, a substância V isolada neste trabalho ainda não havia sido relatada para *H. stigonocarpa*.

O ácido *p*-hidroxibenzoico (V) foi isolado da fração 3.11.9.3 e sua estrutura foi identificada através de experimento de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura (ZHANG *et al.*, 2012).



Através do espectro de RMN de ^1H da substância V (FIGURA 4.22, p. 96) observou-se a presença de dois dubletos, ambos com constante de acoplamento 8,3 Hz, sendo um deles centrado δ_{H} 7,85 (2H) e o outro em δ_{H} 6,77 (2H), indicando um sistema de anel aromático *para*-dissubstituído. Observou-se também um singlete em δ_{H} 4,84 (1H), o qual foi atribuído a hidroxila fenólica.

Portanto, após a análise dos dados espectrais e comparação com dados da literatura (TABELA 4.5, p. 95), identificou-se a estrutura como sendo a do ácido *p*-hidroxibenzoico.

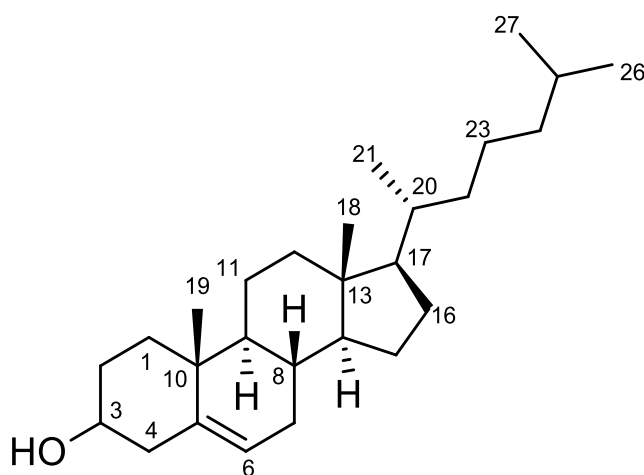
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H da substância V e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA V (400 MHz, CD ₃ OD)		(ZHANG <i>et al.</i> , 2012) (600 MHz, CD ₃ OD)
H	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
1		
2		
3, 7	6,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)	6,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)
4, 6	7,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)	7,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7)
5		
5-OH	4,84 (<i>s</i>)	

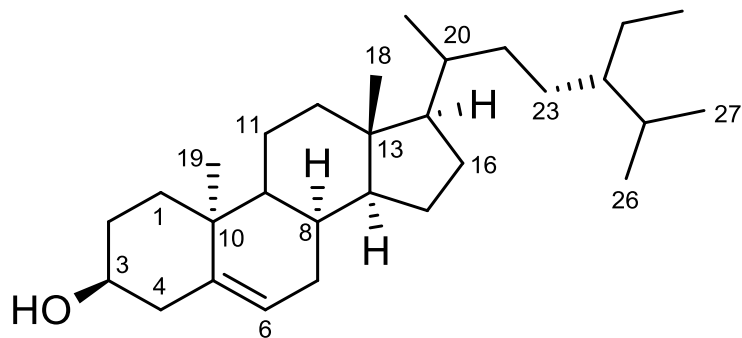
4.2.4 - Esteroides

Os esteroides são triterpenoides modificados contendo o sistema tetracíclico de anéis do lanosterol, porém sem a presença das três metilas nas posições C-4 e C-14. O colesterol (FIGURA 4.23, p. 97) representa a estrutura fundamental, mas modificações, principalmente na cadeia lateral, ajudam a criar uma variedade ampla de produtos naturais biologicamente importantes.

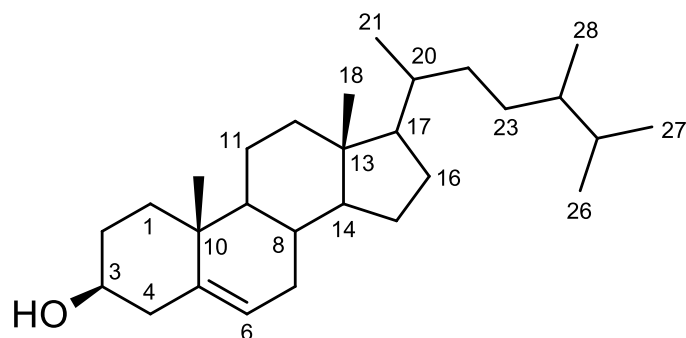
FIGURA 4.23: Estrutura química do colesterol.



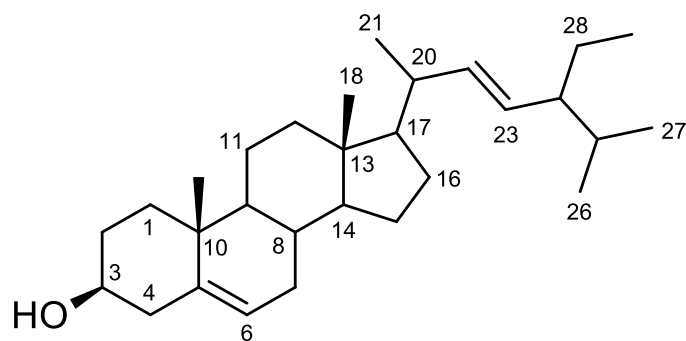
Os esteroides encontrados em plantas, sitosterol (substância VII) e campesterol (substância VIII), são, respectivamente, os análogos 24-etil e 24-metil do colesterol. O estigmasterol (substância IX) contém uma ligação dupla *trans*- Δ^{22} na cadeia lateral, um aspecto visto em muitos esteroides de plantas. A introdução dos grupos metil e etil em C-24 gera um novo centro estereogênico, e os grupos 24-alkil são designados α (DEWICK, 2009). As estruturas químicas destas três substâncias são mostradas na FIGURA 4.24 (p. 98).



VII



VIII



IX

FIGURA 4.24: Estruturas químicas do γ -sitosterol (VII), campesterol (VIII) e estigmasterol (IX).

Geralmente, tais esteroides se encontram em misturas, o que se justifica pelas similaridades estruturais, dificultando assim suas separações. Por esse motivo, a identificação estrutural desses compostos é feita, frequentemente, por CG/EM.

4.2.4.1 - γ -sitosterol (VII), estigmasterol (VIII) e campesterol (IX)

Através do espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 4.25 e 4.26, ps. 100 e 101) da fração 2.5.11, obtida do extrato das folhas, pôde-se observar a presença de um dubleto largo em δ_{H} 5,36 ($J = 4,9$ Hz) e um multipeto em 3,53 ppm, característicos dos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, dos esqueletos esteroidais do γ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Observou-se também, a presença de sinais de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 5,03 (dd , $J = 8,3$ e $15,4$ Hz) e δ_{H} 5,16 (dd , $J = 8,3$ e $15,4$ Hz), atribuídos aos hidrogênios da cadeia lateral do estigmasterol (H-22 e H-23) e, verificou-se ainda, um grande número de sinais na região de δ_{H} 0,69 a 2,32 correspondentes aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal.

O sitosterol e o campesterol possuem cadeias laterais muito parecidas e, deste modo, não é possível diferenciá-los apenas por RMN.

Pela análise do cromatograma, obtido via CG-EM, foram observados três picos (FIGURA 4.27, p. 102), os quais confirmaram a presença das três substâncias: γ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Os picos referentes aos íons moleculares de $m/z = 414$, 412 e 400 (FIGURA 4.28, p. 103) estão de acordo com as fórmulas moleculares $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ e $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$, respectivamente.

FIGURA 4.26: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração 2.5.11 (CD_3OD , 400 MHz).

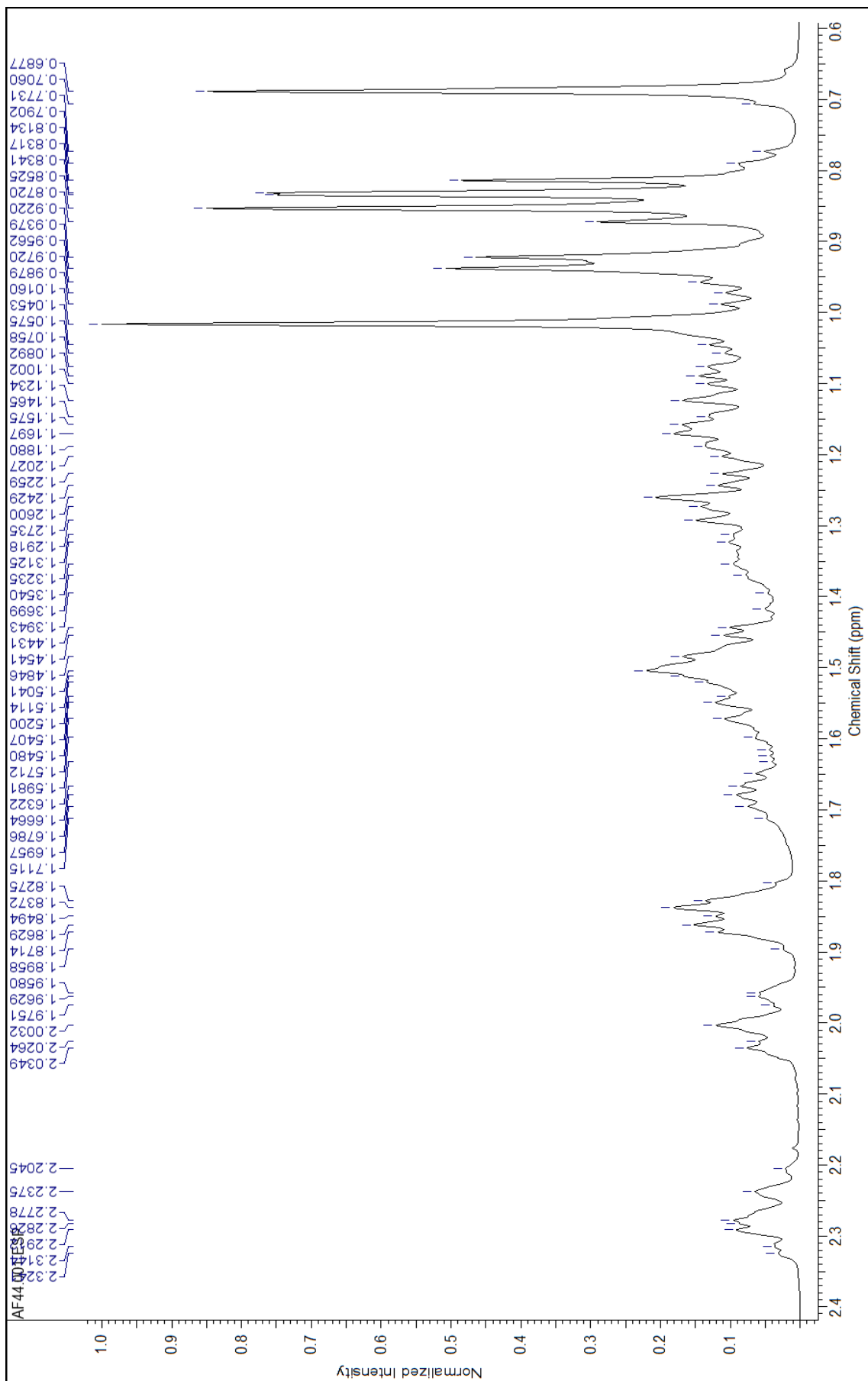
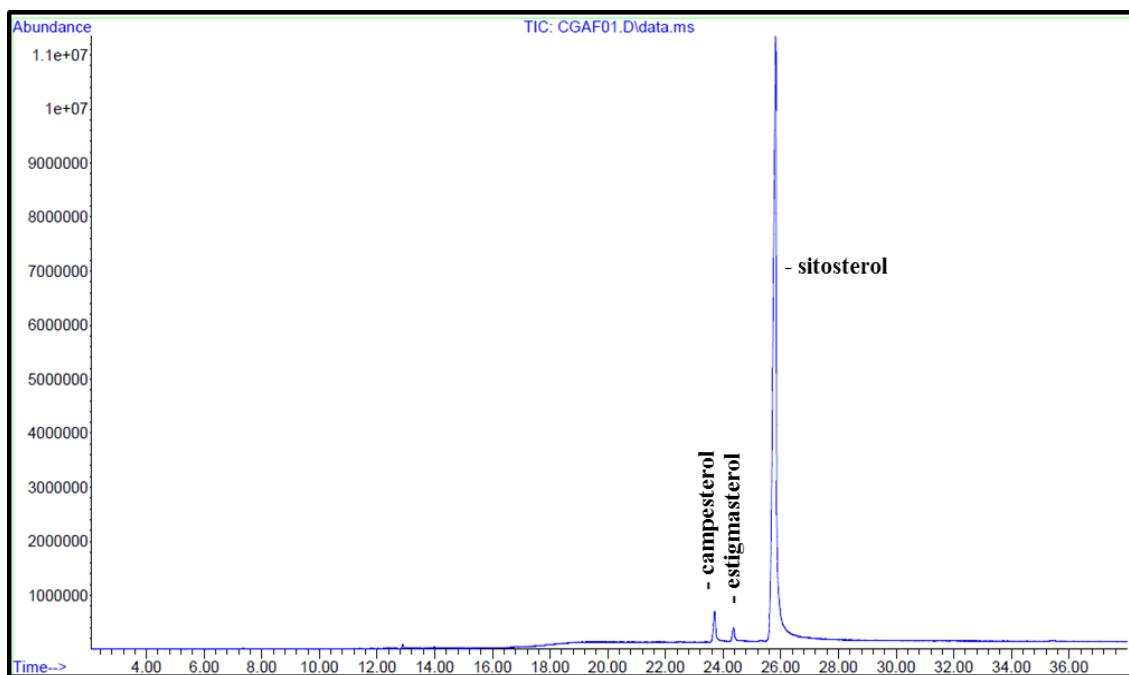


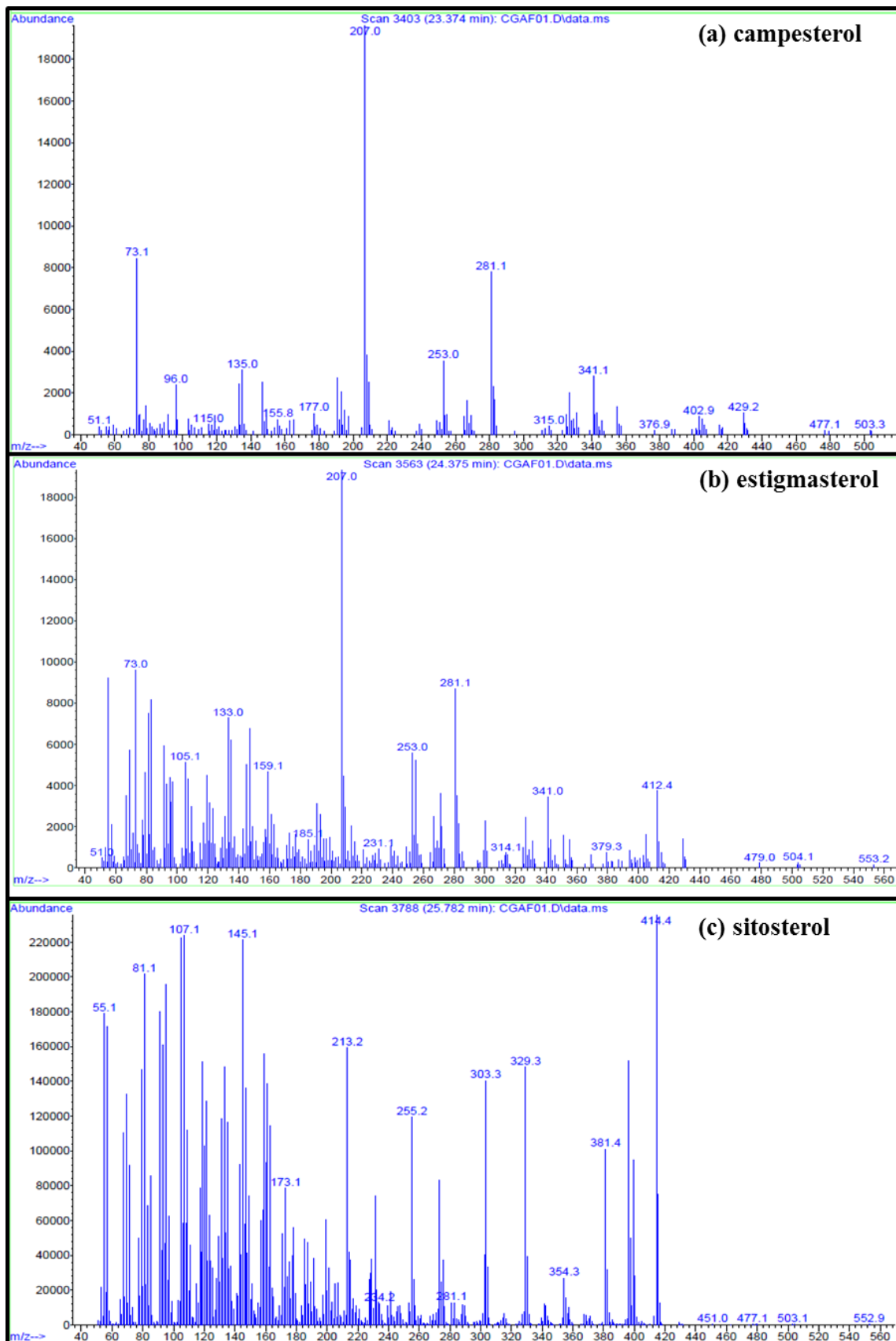
FIGURA 4.27: Cromatograma da mistura de γ -sitosterol, estigmasterol e campesterol obtido via CG-EM.



Condições de análise:

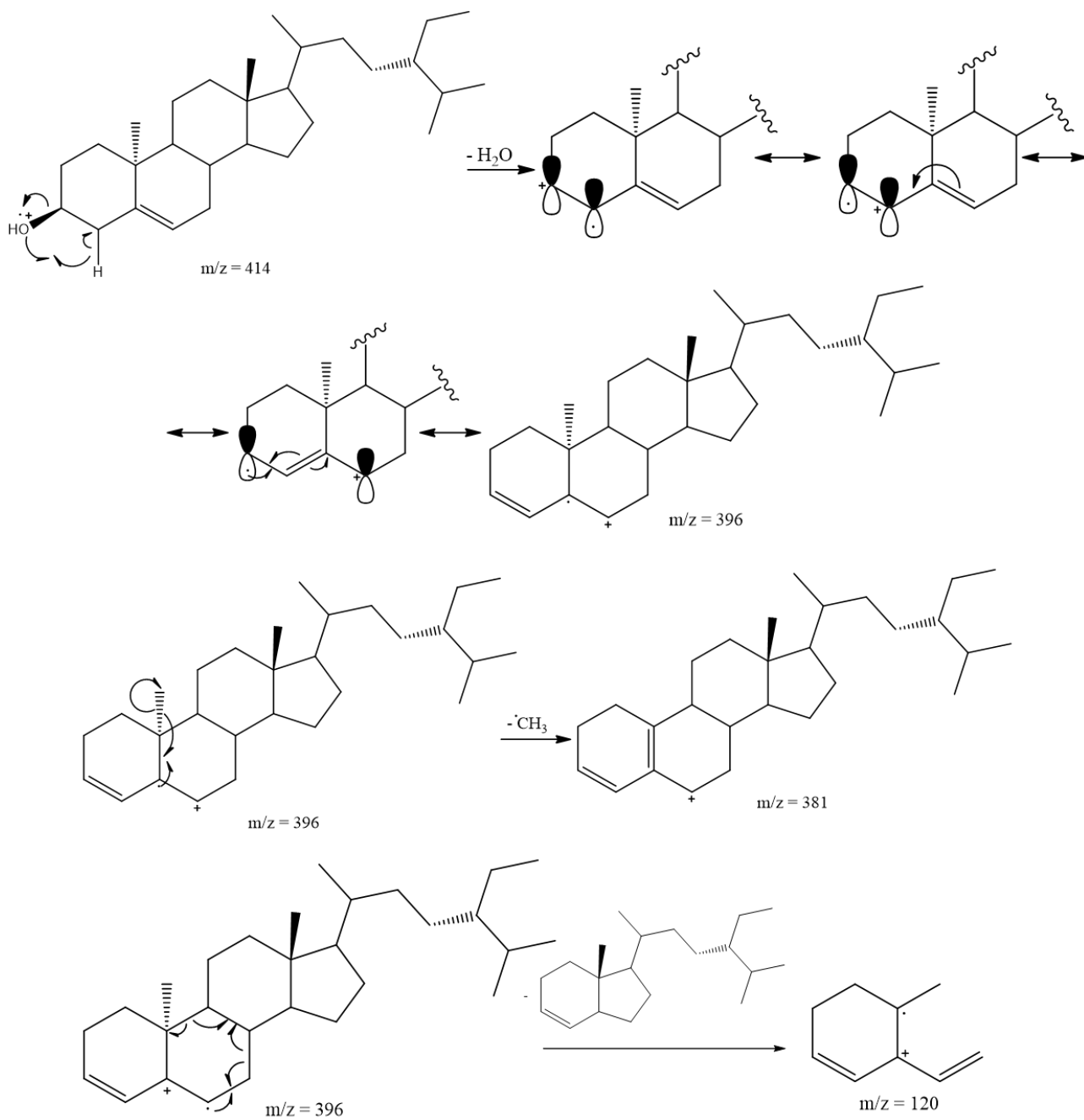
gás de arraste: hélio; temperatura inicial: 100 °C, programada em 8 °C.min⁻¹ até 295 °C, mantida por 8 min, com tempo total de 38 min; temperatura do injetor: 250 °C; split mode: 1:20; fluxo: 1,3 mL.min⁻¹; pressão: fluxo de modo constante.

FIGURA 4.28: Espectros de massas dos componentes da mistura (IE = 70 eV): (a) campesterol; (b) estigmasterol e (c) γ -sitosterol.



A proposta de fragmentação do γ -sitosterol é mostrada na FIGURA 4.29 (p. 104). Uma vez que as estruturas dos esteroides **VII**, **VIII** e **IX** diferem apenas na cadeia lateral, o padrão de fragmentação das mesmas é muito parecido, justificando assim a apresentação da proposta apenas para **VII**.

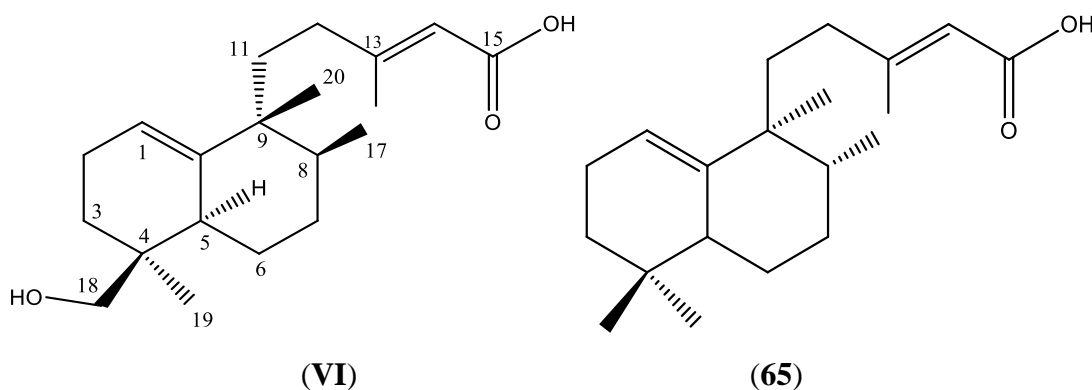
FIGURA 4.29: Proposta de fragmentação do γ -sitosterol.



4.2.5 – Determinação estrutural do ácido 18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico – substância VI

O estudo do extrato das flores resultou no isolamento de um diterpenoide halimano, o ácido 18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico (VI), para o qual não foram encontrados relatos na literatura.

A substância VI foi isolada da fração 2.1 (16,1 mg) na forma de um sólido branco e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e NOESY, e comparação com os dados de RMN de ^{13}C do ácido *ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico (estrutura 65, p. 105) (HARA *et al.*, 1995), devido à similaridade estrutural.

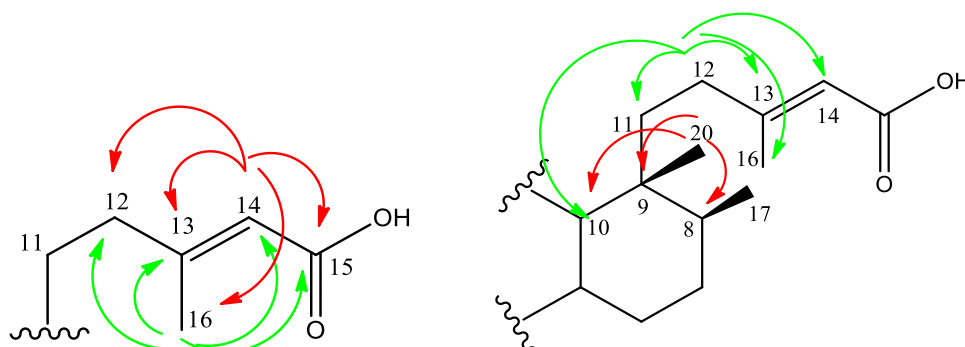


No espectro de RMN de ^{13}C observou-se a presença de vinte sinais (FIGURA 4.32, p. 112). O sinal em δ_c 171,6 foi atribuído ao carbono do ácido carboxílico. Os sinais em δ_c 164,8 e 115,0 são característicos dos carbonos C-13 e C-14, respectivamente, da ligação dupla da cadeia lateral do ácido (VI). Observou-se também a presença de uma ligação dupla trissubstituída entre os carbonos com sinais em δ_c 120,1 (C-1) e 140,7 (C-10). O deslocamento em δ_c 69,9 indicou a presença de um grupo hidroximetileno (C-18).

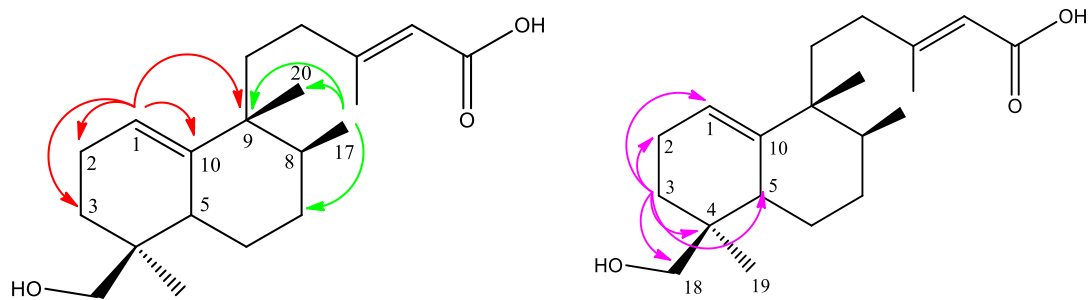
Através do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.30, p. 109) e sua expansão (FIGURA 4.31, p. 110), observou-se o sinal de um próton olefínico em δ_H 5,34 (*t*, 3,8 Hz) e os sinais de três grupos metila (dois singletos, sendo um correspondente à Me-19 em δ_H 0,94 e o outro à Me-20, em δ_H 0,92, e um dubleto referente à Me-17, em δ_H 0,82 ppm), juntamente com os sinais característicos de uma cadeia lateral de ácido 13-*E* em 5,66 (H-14, *d*, $J = 1,5$ Hz) e 2,15 (Me-16, *d*, $J = 1,5$ Hz).

As correlações diretas entre ^1H e ^{13}C foram observadas no espectro de HSQC (FIGURAS 4.33 e 4.34, ps. 112 e 113), as quais estão compiladas na TABELA 4.6 (p. 108). Pelo espectro de HMBC (FIGURAS 4.35 e 4.36, ps. 114 e 115) observou-se as correlações entre o sinal em δ_{H} 5,66 (H-14) com os sinais em δ_{C} 171,6, atribuído a C-15, δ_{C} 164,8 (confirmando a atribuição feita à C-13), δ_{C} 19,3, atribuído a Me-16 e δ_{C} 36,2, o qual foi atribuído a C-12. O sinal em δ_{C} 2,15 (Me-16) correlacionou-se com os sinais em 171,6 (C-15), 164,8 (C-13), 115,0 (confirmando a atribuição a C-14) e 36,2 (C-12).

Observou-se ainda as correlações do sinal em δ_{H} 1,83 (*m*) e 2,10 (*m*), correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico da posição 12, com os sinais em δ_{C} 36,8 (atribuído a C-11), δ_{C} 164,8 (C-13), 115,0 (C-14) e 19,3 (C-16), confirmando assim a presença da cadeia lateral do ácido. O sinal em δ_{H} 0,92 (*s*) correlacionou-se com o sinal em δ_{C} 36,8 (C-11), 39,5 (C-8), 43,1 (C-9) e 140,7 (C-10), sendo, portanto, atribuído à Me-20. As correlações citadas anteriormente são mostradas a seguir.



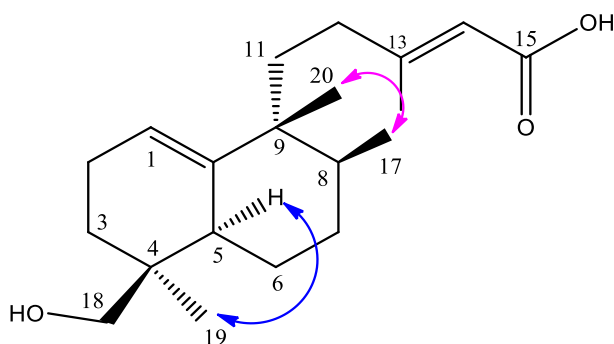
Também observou-se as correlações do sinal em δ_{H} 5,34 (H-1) com os sinais em δ_{C} 22,5 (atribuído ao C-2), δ_{C} 26,5 (C-3), δ_{C} 40,5 (C-5) e δ_{C} 43,1 (C-9). Os sinais em δ_{H} 1,10 (*m*) e 1,34 (*m*), atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-3a e H-3b, respectivamente, correlacionaram-se com os sinais em δ_{C} 22,5 (C-2), δ_{C} 120,1 (C-1), δ_{C} 36,0 (atribuído a C-4), δ_{C} 40,5 (C-5) e δ_{C} 69,9 (atribuído ao C-18). O sinal em δ_{H} 0,82 (*d*, 7,5 Hz) correlacionou-se com os sinais em δ_{C} 29,6 (C-7), δ_{C} 39,5 (C-8), δ_{C} 43,1 (C-9) e δ_{C} 21,9 (C-20), sendo portanto, atribuído à Me-17. Essas correlações são apresentadas a seguir.



Os sinais em δ_H 3,51 (*m*) e 3,34 (*m*), referentes aos hidrogênios H-18a e H-18b, respectivamente, do grupo hidroximetileno da posição 18, correlacionaram-se com os sinais em δ_C 26,5 (C-3), 36,0 (C-4), 40,5 (C-5) e 21,7 (atribuído à C-19). O sinal em δ_H 0,94 correlacionou-se com os sinais em δ_C 26,5 (C-3), 36,0 (C-4), 40,5 (C-5) e 69,9 (C-18), permitindo atribuí-lo à metila da posição 19.

No espectro de NOESY-2D (FIGURA 4.37, pg. 116), observou-se a correlação entre o sinal referente à Me-17 (δ_H 0,82) com o sinal correspondente à Me-20 (δ_H 0,92), indicando que ambas estão na mesma face (face α).

Observou-se, também, uma correlação de H-5 (δ_H 1,80) com a Me-19 (δ_H 0,94). No entanto, não foram observadas correlações desses dois grupos com os sinais referentes às metilas Me-17 e Me-20, o que sugeriu o posicionamento de H-5 e Me-19 na face oposta (β). Como consequência, o grupo metileno hidroxilado, que encontra-se ligado ao mesmo carbono que Me-19, está posicionado na face α . Essas correlações estão representadas abaixo.



Portanto, após a análise dos espectros de RMN, definiu-se a estrutura como sendo a do ácido 18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico.

A estereoquímica absoluta desta substância será determinada através de experimentos de atividade óptica Raman.

TABELA 4.6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância VI.

SUBSTÂNCIA VI (500/125 MHz, CDCl_3)				*HARA <i>et al.</i> , 1995 (125 MHz, CDCl_3)
C/H	δ (ppm)	δ (ppm), J (Hz)	HMBC	δ (ppm)
1	120,1	5,34 (<i>t</i> , $J = 3,8$)	C-2, C-3, C-5, C-9	120,3
2	22,5	2,08 (<i>m</i>)		23,1
3a 3b	26,5	1,34 (<i>m</i>) 1,10 (<i>m</i>)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-18	33,2
4	36,0			31,4
5	40,5	1,80 (<i>m</i>)		43,5
6a 6b	24,0	1,60 (<i>m</i>) 1,30 (<i>m</i>)		23,6
7a 7b	29,6	2,00 (<i>m</i>) 1,37 (<i>m</i>)		29,1
8	39,5	1,56 (<i>m</i>)		39,2
9	43,1			43,0
10	140,7			141,1
11a 11b	36,8	2,15(<i>m</i>) 1,24 (<i>m</i>)		37,2
12a 12b	36,2	2,10 (<i>m</i>) 1,83 (<i>m</i>)	C-11, C-13, C-14, C-16	36,3
13	164,8			164,8
14	115,0	5,66 (<i>d</i> , $J = 1,5$)	C-12, C-13, C-15, C-16	115,1
15	171,6			172,4
16	19,3	2,15 (<i>d</i> , $J = 1,5$)	C-12, C-13, C-14, C-15	19,4
17	15,5	0,82 (<i>d</i> , $J = 7,5$)	C-7, C-8, C-9, C-20	15,6
18a 18b	69,9	3,51 (<i>d</i> , $J = 11,2$) 3,34 (<i>d</i> , $J = 11,2$)	C-3, C-4, C-5, C-19	28,2
19	21,7	0,94 (<i>s</i>)	C-3, C-4, C-5, C-18	26,0
20	21,9	0,92 (<i>s</i>)	C-8, C-9, C-10, C-11	22,3

*Dados de RMN de ^{13}C ácido do *ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico para comparação de similaridades estruturais com o ácido 18-hidroxi-*ent*-halima-1(10),13-*E*-dien-15-oico (**substância VI**).

FIGURA 4.31: Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância VI (CDCl_3 , 500 MHz).

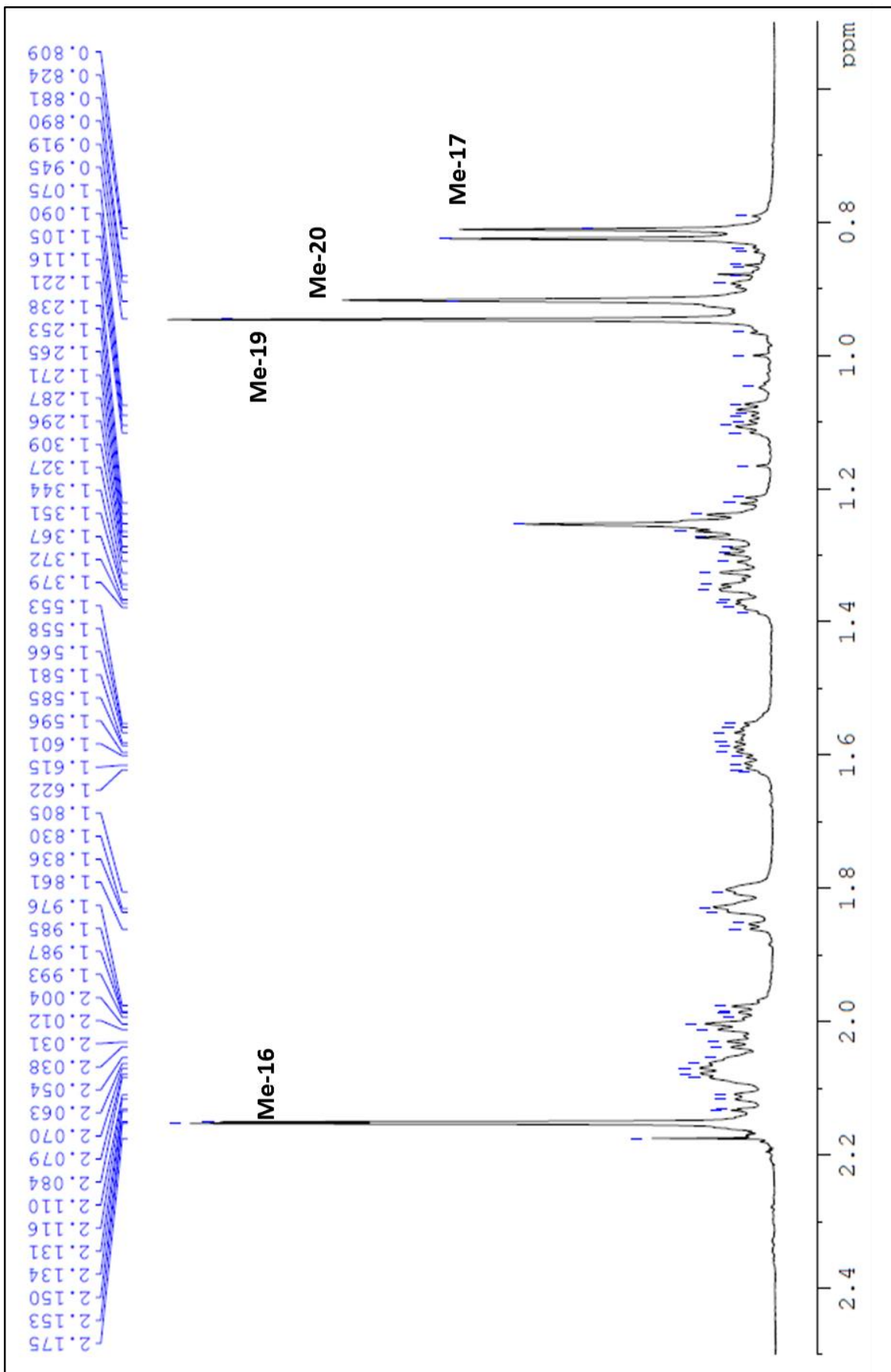


FIGURA 4.32: Espectro de RMN de ^{13}C da substância VI (CDCl_3 , 125 MHz).

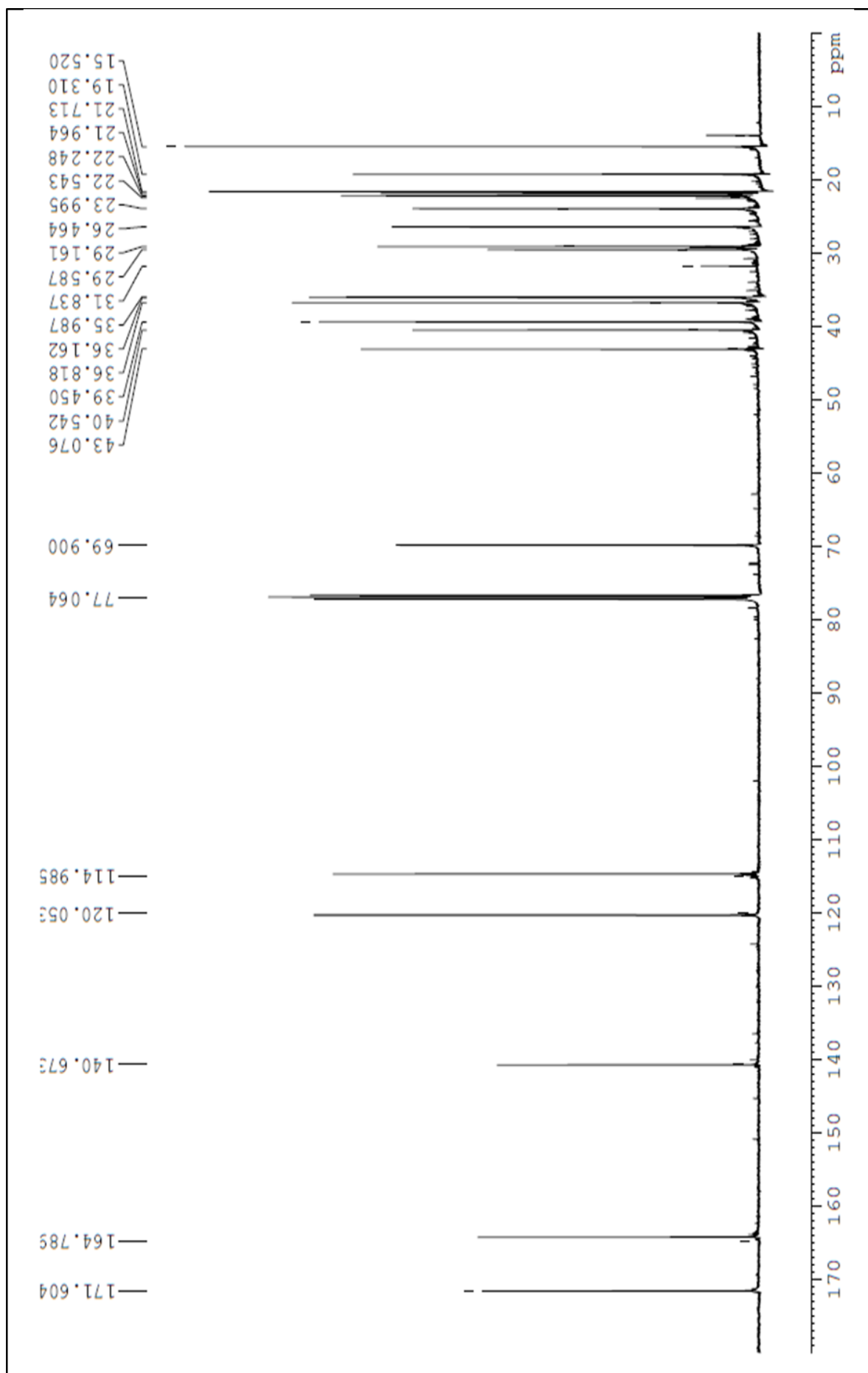


FIGURA 4.33: Mapa de contorno de HSQC da substância VI (CDCl₃, 500 MHz).

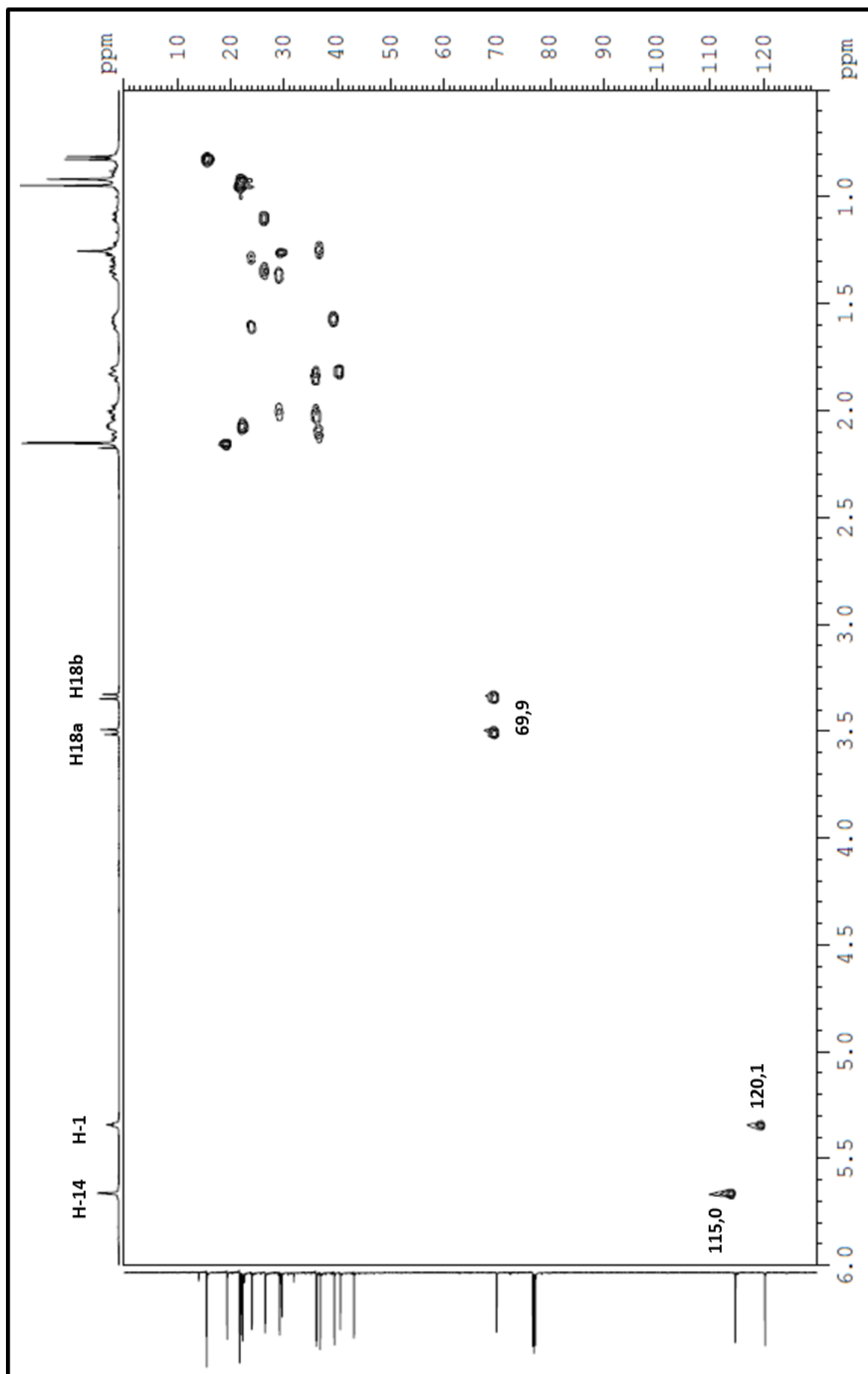


FIGURA 4.34: Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância VI (CDCl₃, 500 MHz).

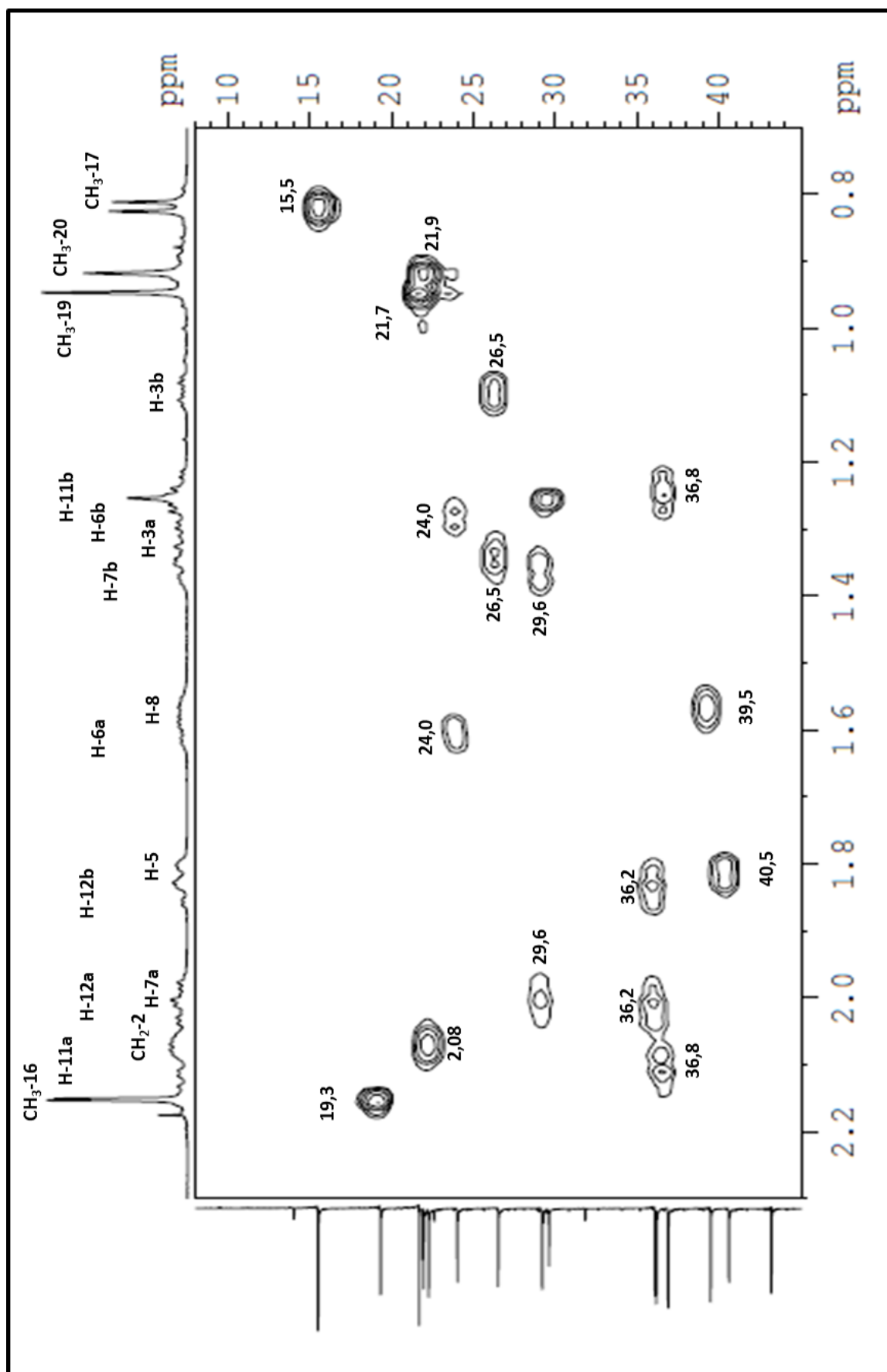


FIGURA 4.35: Mapa de contorno de HMBC da substância VI (CDCl₃, 500 MHz).

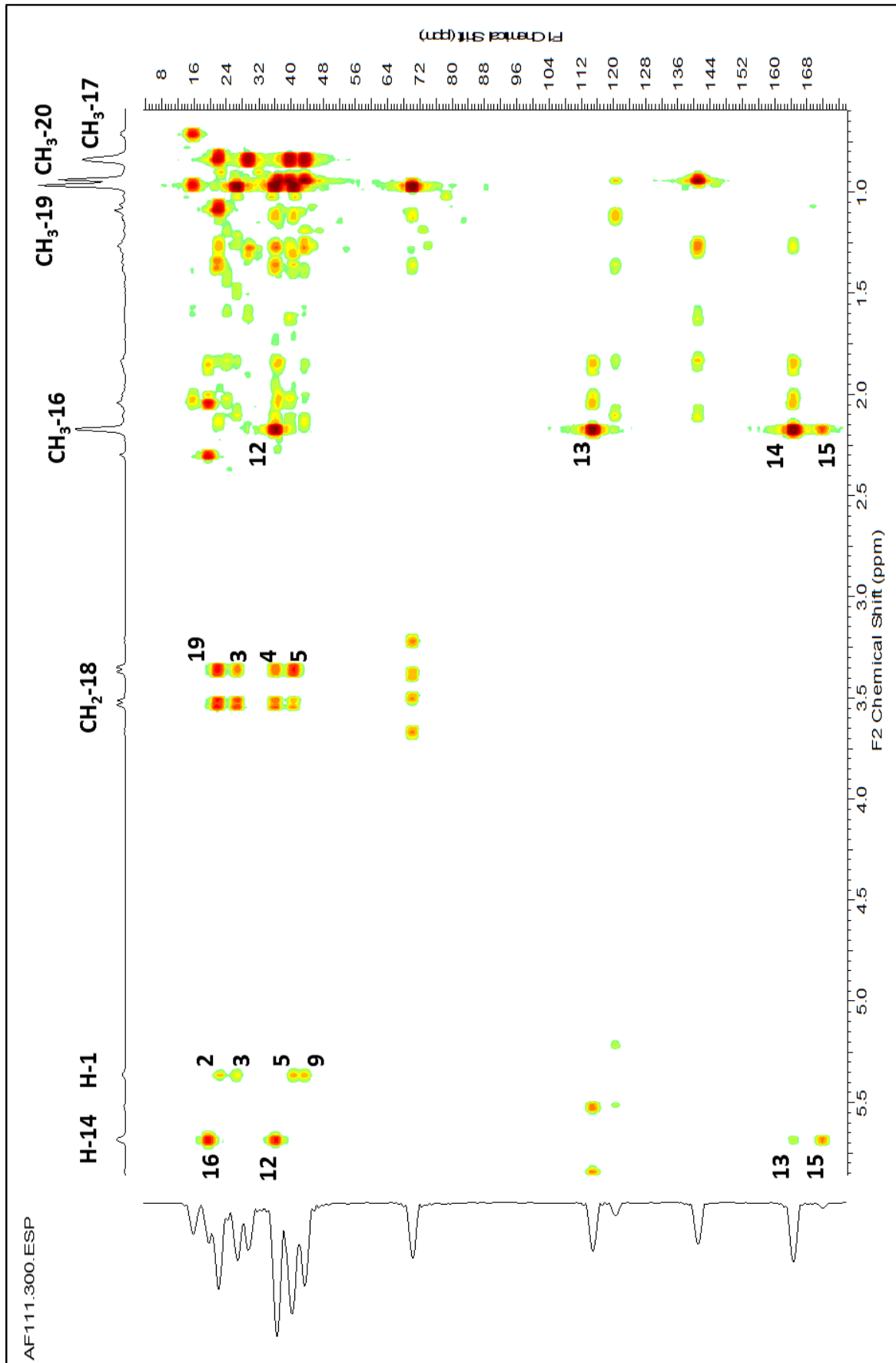


FIGURA 4.36: Expansão do Mapa de contorno de HMBC da substância VI (CDCl₃, 500 MHz).

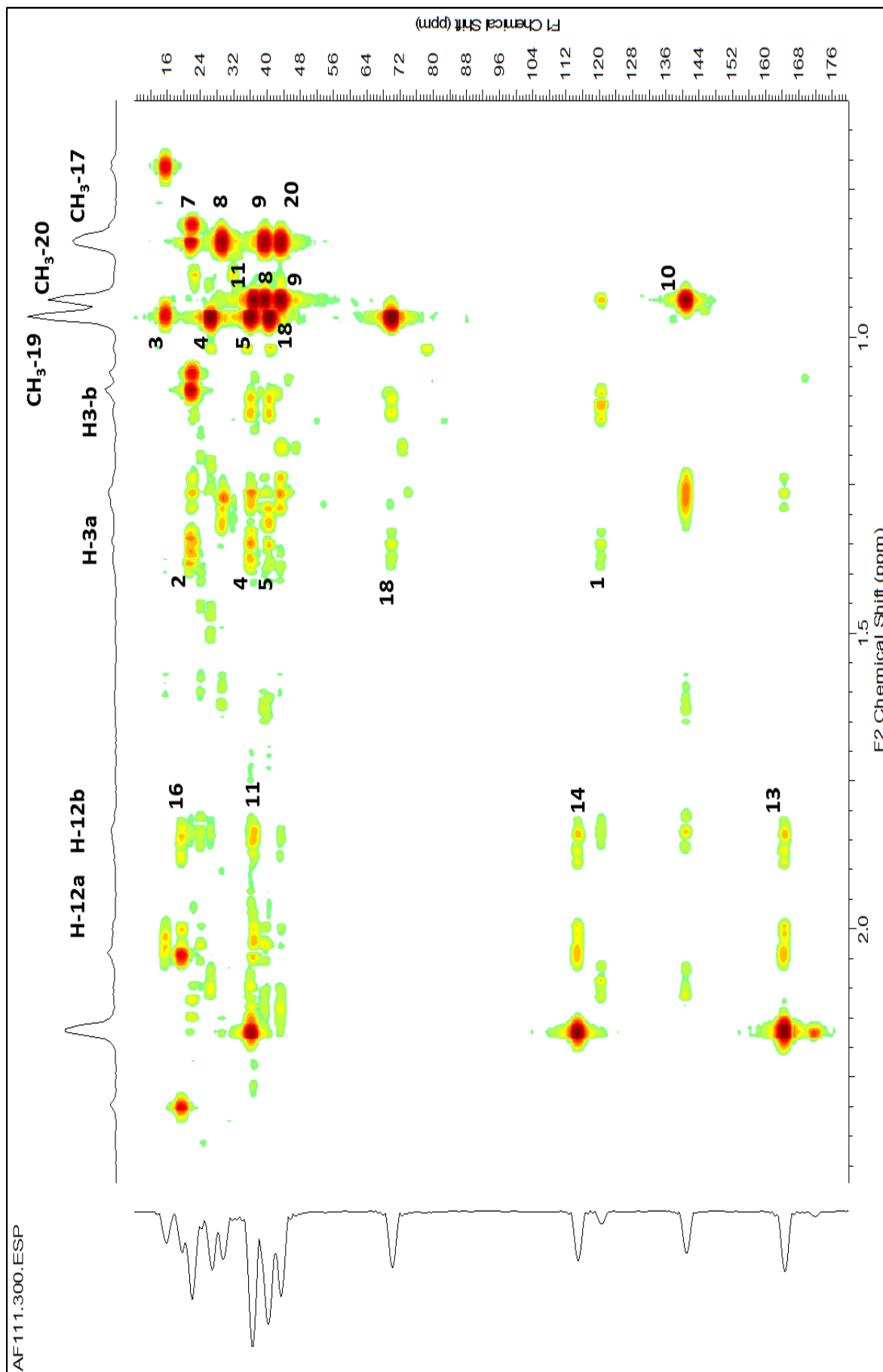
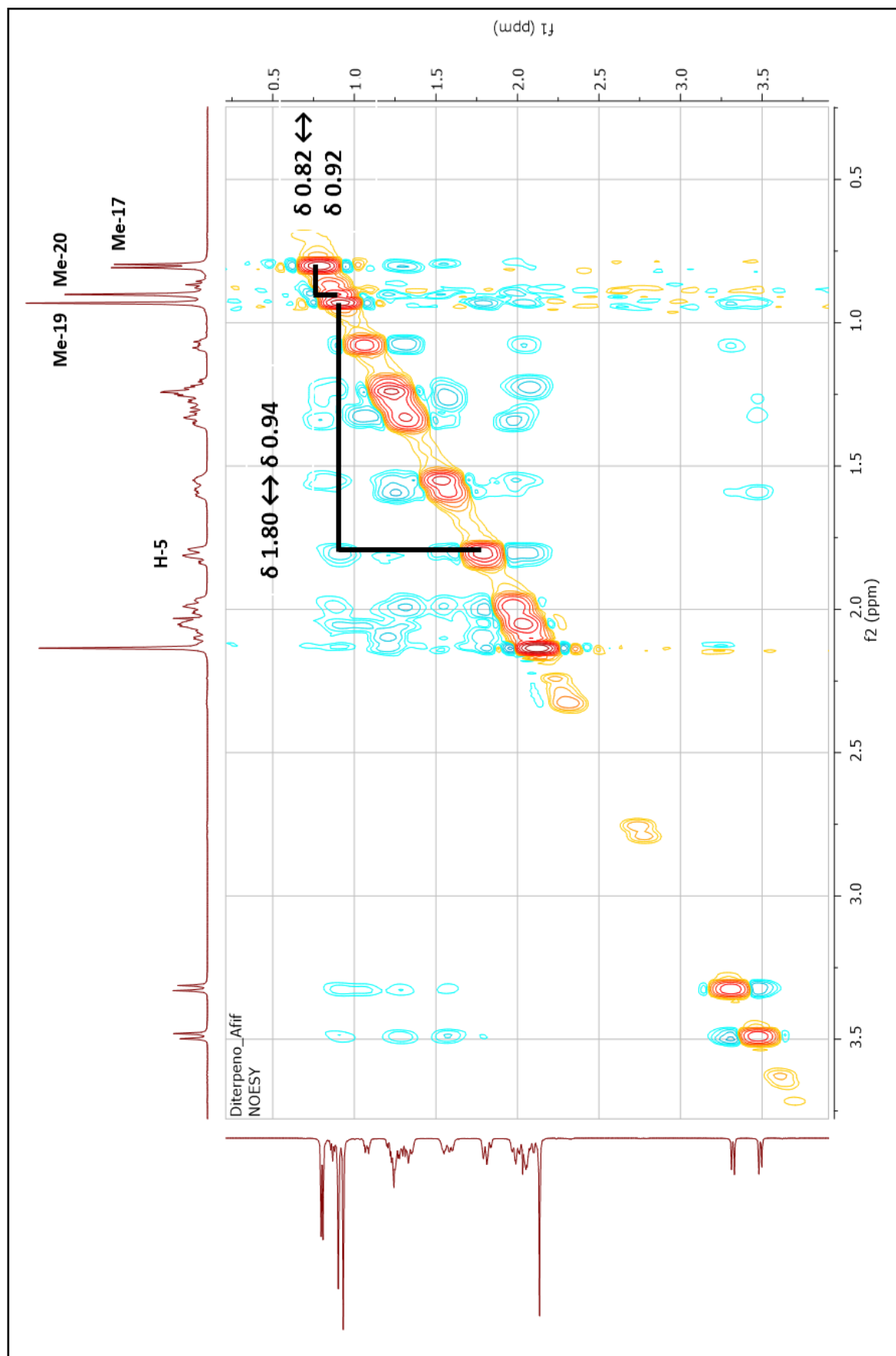


FIGURA 4.37: Espectro de NOESY-2D da substância VI (CDCl₃, 600 MHz).



4.3 - Confirmação da obtenção do éster de metila da substância III

A metilação do ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico (substância III), cujo mecanismo é dado no ESQUEMA 4.1 (p. 117), foi comprovada através de experimento de RMN de ^1H (FIGURA 4.38, p. 118). No espectro observou-se a presença de um singlete intenso em δ_{H} 3,69, referente a metoxila do éster.

ESQUEMA 4.1: Mecanismo de reação do ácido (III) com diazometano.

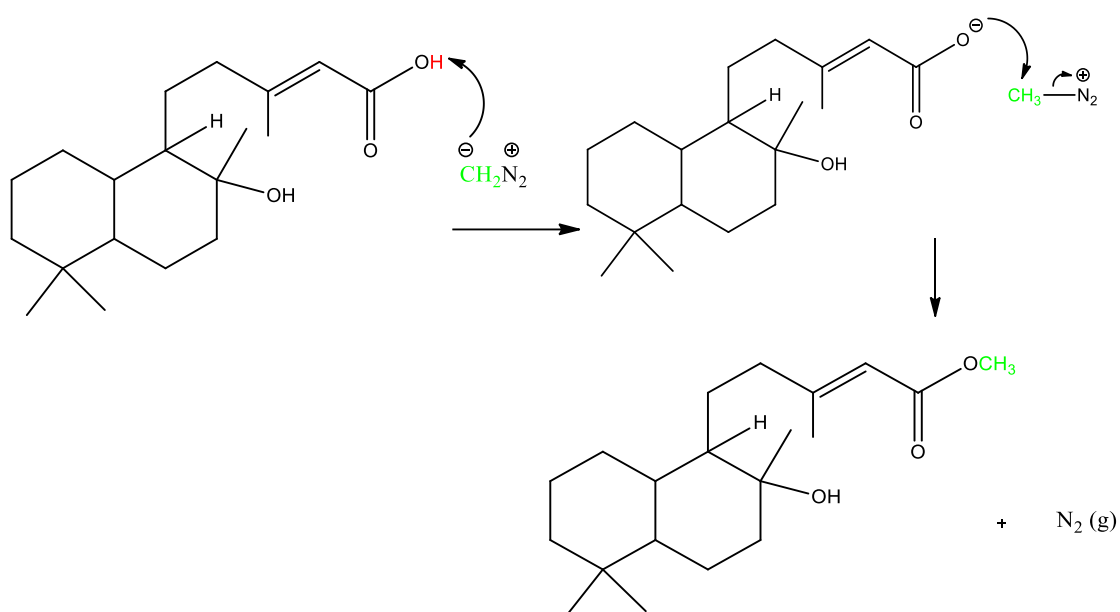
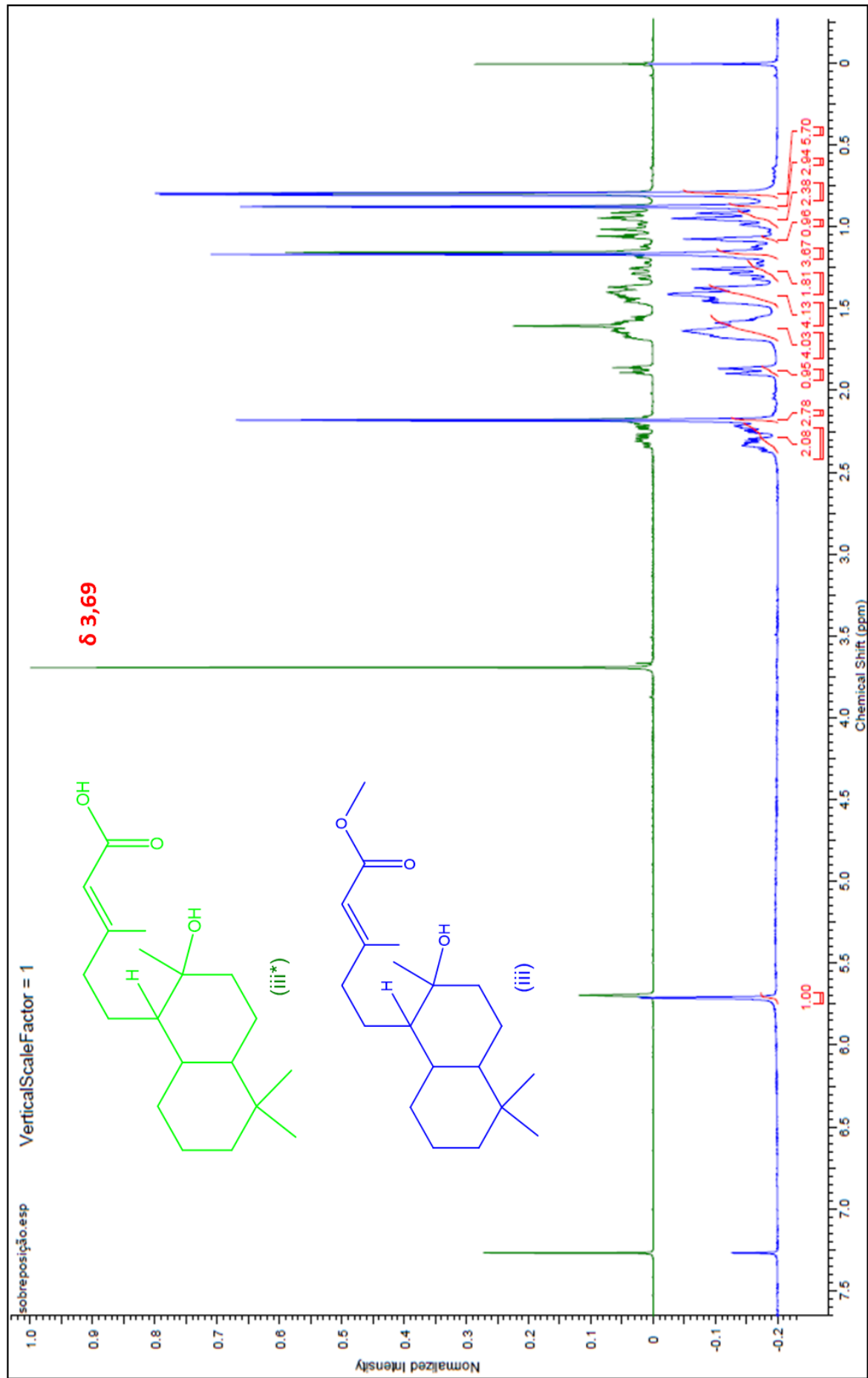


FIGURA 4.38: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da substância III (a), e do éster de metila (III*) (b) (CDCl_3 , 400 MHz).



4.4 - Resultados dos ensaios enzimáticos

De acordo com os resultados mostrados na TABELA 4.7 (p. 119), todos os extratos etanólicos de *H. stigonocarpa* (EF: extrato das folhas; EL: extrato das flores; ER: extrato das raízes; EC: extrato do caule) apresentaram percentuais de inibição elevados frente às catepsinas K, L e V, nas duas concentrações avaliadas.

TABELA 4.7: Percentuais de inibição enzimática dos extratos etanólicos de *H. stigonocarpa*.

Amostra	% Inibição CatK		% Inibição CatL		% Inibição CatV	
	125	50	125	50	125	50
EF	82	79	94	79	98	98
EL	98	96	95	87	99	98
ER	91	79	92	92	97	97
EC	84	80	-	-	97	95

Considerando a CatK, EL foi o extrato mais ativo dentre os quatro testados, apresentando 96% de inibição da atividade desta enzima (a 50 µg/mL). O extrato ER foi o que apresentou melhor inibição da CatL, diminuindo sua atividade em 92%, em ambas as concentrações testadas (125 e 50 µg/mL). A CatV sofreu inibição de 98% pelos extratos EL e EF, ambos na concentração de 50 µg/mL. Deste modo, os dois extratos (EL e EF) apresentaram os potenciais de inibição mais elevados e foram selecionados para avaliação do potencial inibitório de suas frações.

Os percentuais de inibição desempenhados pelas frações hexano (FH) e acetato de etila (FA), oriundas da partição líquido-líquido do extrato das folhas, e pelas frações obtidas pelo fracionamento do extrato das flores, são mostrados nas TABELAS 4.8 (p. 120) e 4.9 (p. 120), respectivamente. A fração FL1 não foi testada devido à indisponibilidade de massa, no entanto, será enviada posteriormente para ensaios.

TABELA 4.8: Percentuais de inibição enzimática das frações do extrato EF.

% de inibição (50 µg/mL)			
Amostra	CatK	CatL	CatV
FH	32	36	91
FA	59	66	96

Os melhores percentuais foram observados para FH e FA frente a CatV, as quais inibiram a atividade desta enzima em 91 e 96%, respectivamente. O percentual de 66% apresentado pela FA, sobre a CatL, pode ser considerado moderado.

TABELA 4.9: Percentuais de inibição enzimática das frações do extrato EL.

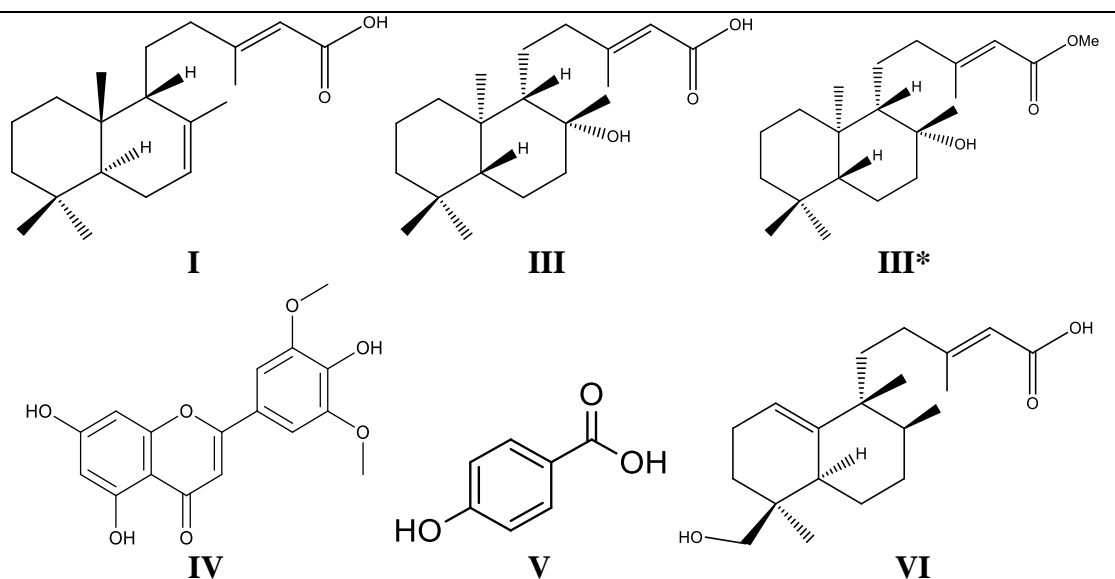
Fração	% inibição - CatK		% inibição - CatL		% inibição - CatV	
	125 µg/mL	50 µg/mL	125 µg/mL	50 µg/mL	125 µg/mL	50 µg/mL
FL2	96	82	93	57	99	98
FL3	92	80	95	86	99	97
FL4	75	27	36	07	97	83
FL5	60	37	96	94	97	96

FL2 = fração hex/AcOEt 1:1; FL3 = fração AcOEt 100%; FL4 = fração AcOEt/MeOH 1:1; FL5 = fração MeOH 100%.

A fração FL2, dentre as quatro frações testadas, foi a que apresentou o percentual inibitório mais significativo frente à CatK (82%), na concentração de 50 µg/mL. Por sua vez, FL5 foi a fração mais ativa sobre a CatL, inibindo sua atividade em 94% (em 50 µg/mL). O maior percentual de inibição frente à CatV (98%) foi desempenhado por FL2, seguido pelas frações FL3 (97%) e FL5 (96%), todas na concentração de 50 µg/mL. Esses resultados indicaram a possível presença de metabólitos que podem ser ativos frente a esses alvos, tanto nos extratos quanto nas frações, visto que as mesmas mantêm bons percentuais de inibição.

Das seis substâncias isoladas dos extratos EF e EL, cinco tiveram seu potencial inibitório avaliado, assim como o éster de metila do ácido $\Delta^{13,14}$ -*ent*-labd-8- β -ol-15-oico. Os resultados são apresentados na TABELA 4.10 (p. 121).

TABELA 4.10: Percentuais de inibição enzimática de substâncias isoladas (a 25 μ M).



Composto	% Inibição - CatK	% Inibição - CatL	% Inibição - CatV
I	65	43	91
III	12	47	0
III*	0	0	0
IV	2	33	88
V	12	57	95
VI	21	03	71

As substâncias mostraram percentuais de inibição elevados e preferencial para CatV, sendo o ácido benzoico **5** (95%), o diterpeno labdano **I** (91%) e a flavona **IV** (88%) as mais ativas.

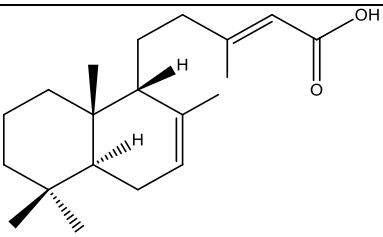
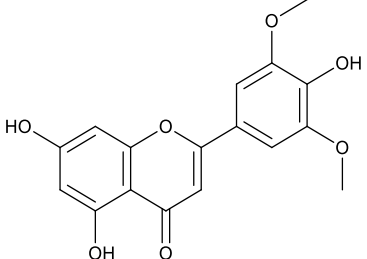
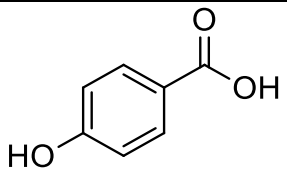
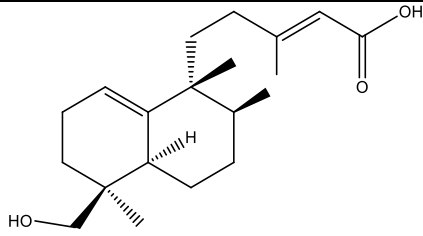
Já os compostos **VI** e **I** apresentaram inibição moderada para as catepsinas V (71%) e K (65%), respectivamente. As substâncias **I**, **III** e **V** mostraram valores de inibição de aproximadamente 50% frente à CatL, sendo portanto, considerados percentuais moderados.

Analisando-se o efeito da similaridade estrutural entre as substâncias **III** e **III***, observou-se que **III** inibiu a atividade da CatK em 12% e a da CatL em 47%, porém a atividade de **III*** foi nula frente à ambos os alvos. A inatividade de **III*** sugeriu que a carboxila do diterpenoide ácido pode ser uma parte da molécula importante para a atividade inibitória, a qual se perde com a inserção da metila nesta molécula.

Após a avaliação dos potenciais inibitórios, as substâncias selecionadas para determinação dos valores de IC₅₀ foram os compostos **I**, **IV**, **V** e **VI** frente à CatV, os compostos **I**, **III** e **V** frente à CatL e o composto **I** frente à CatK. Os experimentos referentes à determinação da potência inibitória de **III** ainda estão em andamento.

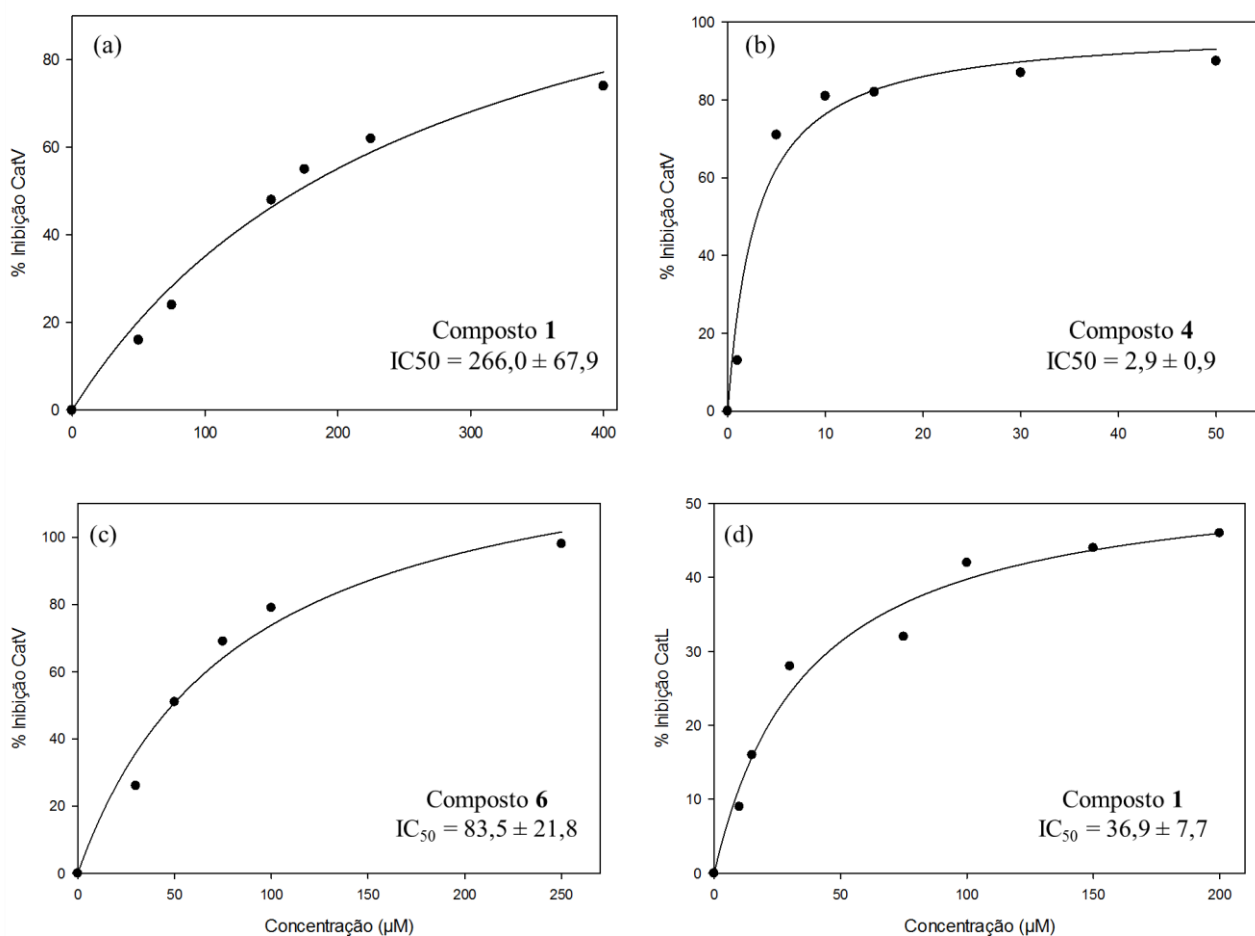
Os valores de IC₅₀ são mostrados na TABELA 4.11 (p. 122) e os gráficos estão ilustrados na FIGURA 4.39 (p. 123).

TABELA 4.11: Valores de potência inibitória dos compostos I, IV, V e VI frente às catepsinas K, L e V.

Composto	IC ₅₀ CatK	IC ₅₀ CatL	IC ₅₀ CatV
 <p style="text-align: center;">I</p>	*	*	266,0 ± 67,9
 <p style="text-align: center;">IV</p>	**	36,9 ± 7,7	2,9 ± 0,9
 <p style="text-align: center;">V</p>	*	*	> 600
 <p style="text-align: center;">VI</p>	*	> 600	83,5 ± 21,8

* Sem atividade significativa; ** Não testado.

FIGURA 4.39: Determinação dos valores de IC_{50} para os compostos (a) **I** frente à CatV; (b) **IV** frente à CatV; (c) **VI** frente à CatV e (d) **VII** frente à CatL.



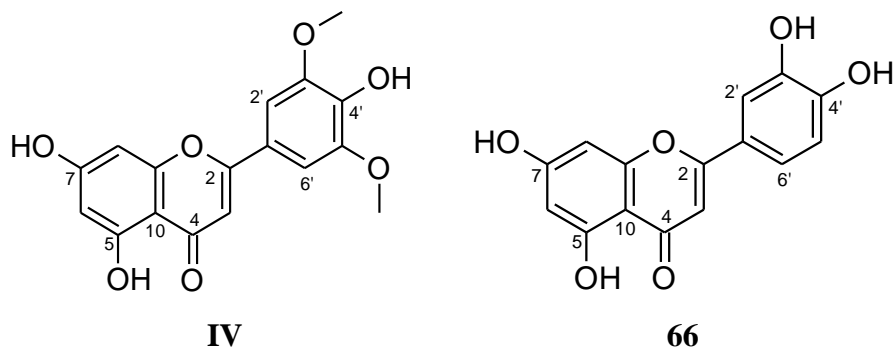
O composto mais potente frente à CatV foi o **IV**, com IC_{50} de $2,9 \mu\text{M}$. A substância **VI** apresentou baixa potência inibitória ($IC_{50} = 83,5 \mu\text{M}$) e os compostos **V** e **VI** não mostraram valores de IC_{50} significativos, frente à esta enzima.

A maior potência de inibição à CatL também foi mostrada pelo composto **IV** ($IC_{50} = 36,9 \mu\text{M}$). Os demais compostos testados (**I**, **V** e **VI**) não apresentaram inibição significativa da mesma. Nenhum dos compostos testados demonstraram atividade frente à CatK. Portanto, os resultados mais promissores foram obtidos para o composto **IV**, frente às catepsinas V e L.

A potência de **IV**, se comparada com a da substância luteolina (estrutura 66 - FIGURA 4.40, p. 124), isolada de *Vitex polyana* (Verbenaceaea), a qual apresentou IC_{50} de $2,5 \mu\text{M}$ frente à catepsina V (SEVERINO, 2008), é praticamente a mesma. A diferença estrutural entre esses compostos está na presença de duas metoxilas, localizadas

nas posições 3' e 5' do anel B da substância **V**, além da ausência da hidroxila na posição 3'.

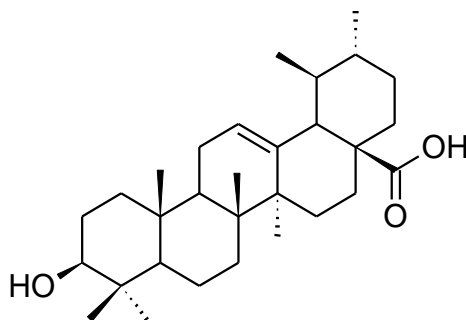
FIGURA 4.40: Estruturas químicas das substâncias **IV** (tricina) e **66** (luteolina).



Os resultados de inibição expressiva da CatK, na faixa de 100 a 840 nM, foram relatados para três flavonoides isolados do extrato metanólico da espécie de esponja *Artocarpus altilis* (Moraceae) (PATIL *et al.*, 2002), evidenciando ainda mais o fato de que essa classe de metabólitos pode ser considerada promissora para o planejamento de inibidores de cisteína proteases.

Os dados da literatura não reportam estudos referentes à potência inibitória de diterpenoides frente às catepsinas estudadas. No entanto, estudos mostraram que o triterpenoide ácido ursólico (estrutura 67 - FIGURA 4.41, p. 124) inibiu 90% do crescimento de células de carcinoma, após 96 horas de tratamento e induziu a apoptose de 60% destas células, após 48 horas. Esta atividade foi associada à ativação proteolítica da caspase-3 e de outras caspases similares (cisteína peptidases), indicando que terpenoides podem ser considerados uma classe de substâncias promissora para o planejamento de inibidores de cisteína proteases (HOLLOSY *et al.*, 2001).

FIGURA 4.41: Estrutura química do ácido ursólico.



4.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade

Os potenciais citotóxicos dos extratos testados, expressos como viabilidade celular, frente à linhagem S-180, são mostrados na TABELA 4.12 (p. 125).

TABELA 4.12: Determinação dos valores de IC₅₀: concentração (µg/mL) dos extratos/frações que inibe 50% da viabilidade celular de células tumorais tratadas por 48h nas concentrações de 0,1 - 1000 µg/mL.

Extratos/Frações	S-180	L-929
EC	20,2 ± 0,0	1.220,0 ± 1
FHC	225,8 ± 1,6	842,6± 4,7
FAC	132,0 ± 1,2	55,6 ± 1,5
ER	87,8 ± 0,1	855,3 ± 1,4
EL	-	73,1 ± 0,5
EF	-	965,4 ± 2,0
FHF	-	41,3 ± 0,1
FAF	-	11,3 ± 0,1
FMF	-	172,1 ± 0,0

EC = Extrato do caule; FHC = Fração hexano do caule; FAC = Fração acetato do caule; ER = Extrato da raiz; EL = Extrato das flores; EF = Extrato das folhas; FHF = Fração hexano das folhas; FAF = Fração acetato das folhas; FMF = Fração metanol das folhas.

Os valores de IC₅₀ foram determinados de acordo com o gráfico do percentual de inibição da viabilidade celular *versus* concentração de cada inibidor (fração/extrato), conforme ilustrado na FIGURA 4.42 (p. 126)

De acordo com o critério adotado pelo Instituto Nacional do Câncer Americano, um extrato bruto pode ser considerado promissor para purificação desde que apresente valor de IC₅₀ menor que 30 µg/mL (SUFFNESS & PEZZUTTO, 1990). Desse modo, EC foi o extrato mais citotóxico, pois inibiu a viabilidade celular do tumor de Sarcoma com IC₅₀ estimado em 20,2 µg/mL (FIGURA 4.42). O extrato da raiz apresentou valor de IC₅₀ (87,8 µg/mL) cerca de quatro vezes maior, e por isso foi considerado não promissor.

As frações FHC e FAC apresentaram valores de IC_{50} de 225,8 $\mu\text{g/mL}$ e 132,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, os quais foram 11,2 e 6,5 vezes maiores do que o valor mostrado pelo extrato, caracterizando assim diminuição significativa da atividade citotóxica com o fracionamento.

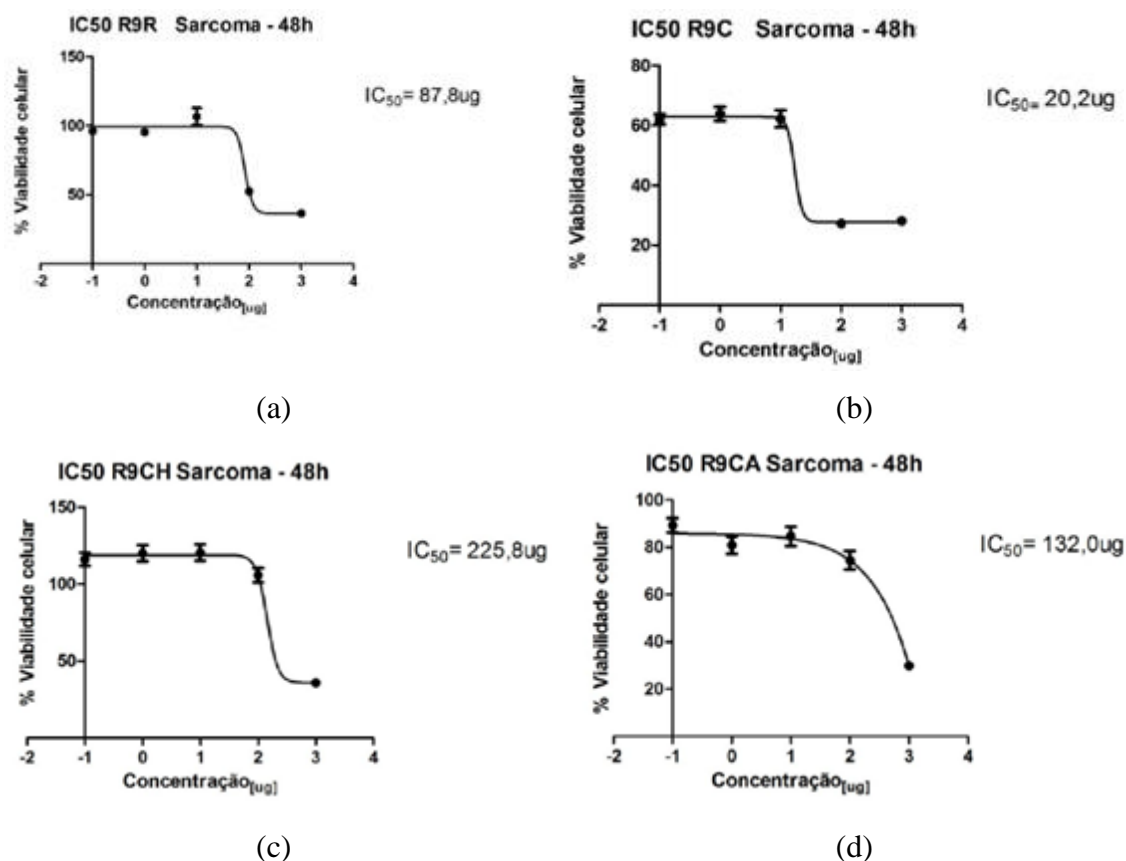


FIGURA 4.42: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral Sarcoma-180 frente ao tratamento com: (a) ER; (b) EC; (c) FHC e (d) FAC (concentrações: 0,1, 1,0, 10, 100, 1000), com tempo de exposição de 48 h.

Frente à linhagem de células sadia L-929 (FIGURA 4.43, p. 127), EC apresentou valor de IC_{50} estimado em 1.220,0 $\mu\text{g/mL}$ (TABELA 4.12), cerca de 60 vezes maior que o valor de IC_{50} para células tumorais, o que demonstrou alta seletividade e citotoxicidade para as células de sarcoma. Para que um extrato possa ser considerado promissor, o mesmo deve apresentar potência citotóxica elevada frente às células tumorais (isto é, um valor de IC_{50} menor que 30 $\mu\text{g/mL}$), e baixa frente às células normais (ou seja, um valor de IC_{50} muito superior à este valor).

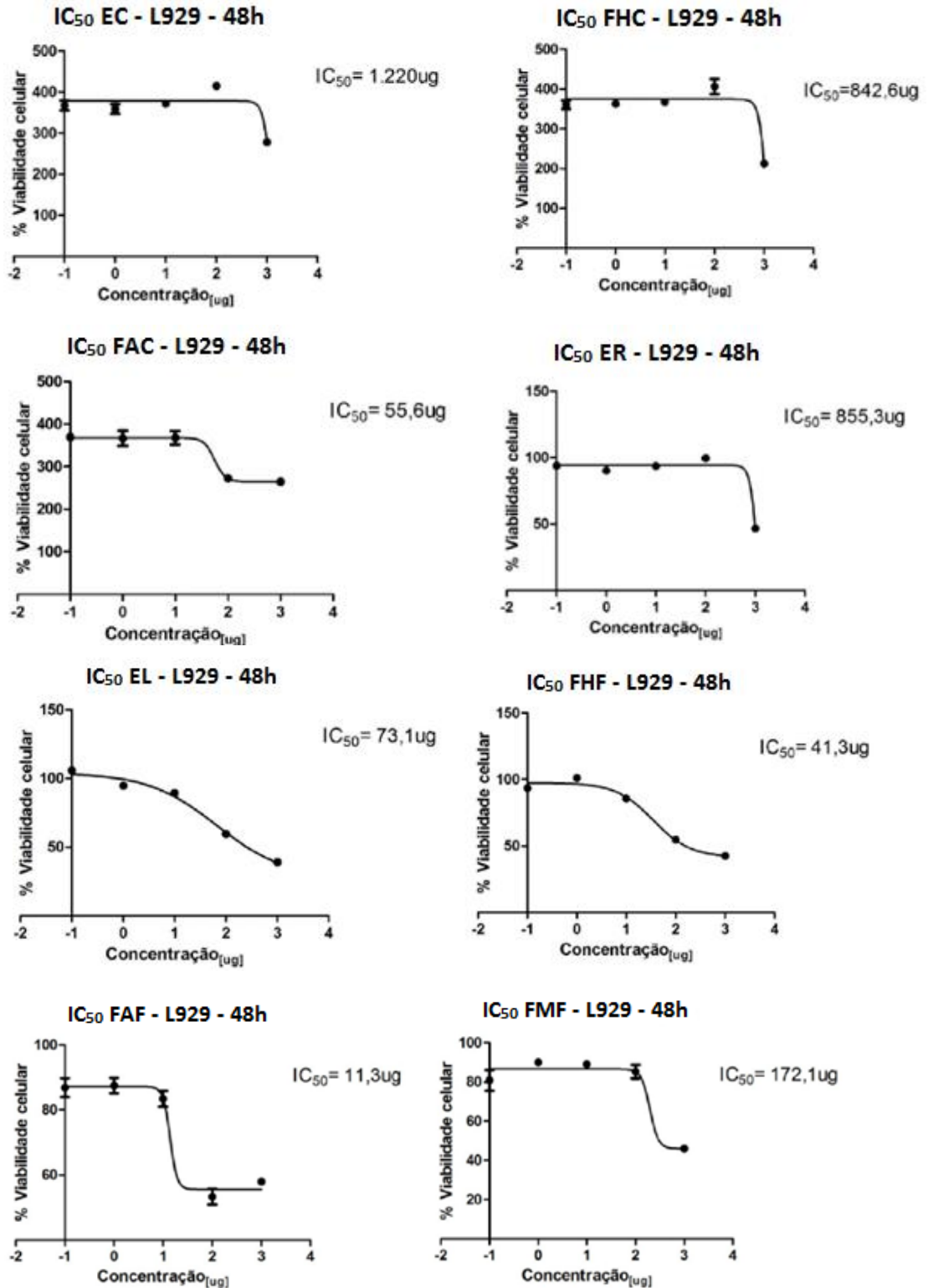


FIGURA 4.43: Avaliação da viabilidade celular da linhagem de células normais L-929 frente ao tratamento com extratos e frações (concentrações: 0,1, 1,0, 10, 100, 1000), com tempo de exposição de 48 h.

A fração FHC também demonstrou um valor de IC₅₀ relativamente elevado (842,6 µg/mL), porém FAC apresentou um valor de 55,6 µg/mL, sendo considerado portanto, moderadamente citotóxico para células normais.

O extrato ER apresentou um valor de 855,3 µg/mL, superior em quase 10 vezes ao valor de IC₅₀ para as células de sarcoma, enquanto que o EL demonstrou um valor de IC₅₀ de 73,1 µg/mL, podendo ser considerado moderadamente citotóxico para células normais. O extrato EF apresentou valor de IC₅₀ relativamente elevado (965,4 µg/mL), porém os valores de suas frações diminuíram consideravelmente: FHF = 41,3 µg/mL; FAF = 11,3 µg/mL e FMF = 172,1 µg/mL.

Os resultados de citotoxicidade demonstrados pelos compostos **I** e **III** frente às linhagens celulares L-929, S-180 e ERLICH são apresentados na TABELA 4.13 (p. 128).

TABELA 4.13: Percentuais citotóxicos das substâncias I e III.

Composto	L-929	S-180	Ehrlich
I	106,7	930,7	108,5
III	170,6	99,30	-

Para que um composto seja considerado promissor como agente citotóxico frente à S-180, o mesmo deve ser capaz de inibir a viabilidade celular desta linhagem em baixa concentração, e requerer uma concentração elevada para inibir o crescimento das células normais, apresentando assim potência e seletividade em relação às células tumorais.

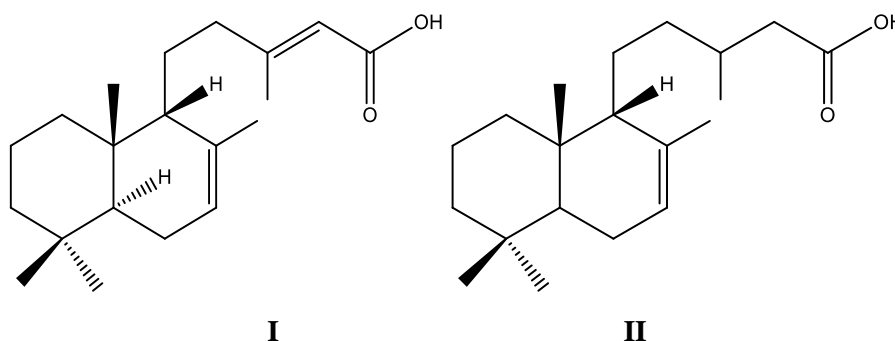
O composto **I** inibiu a viabilidade das células L-929 com IC₅₀ estimado em 106,7 µg/mL (TABELA 4.12). Por outro lado, apresentou valor de IC₅₀ de 930,7 µg/mL para a linhagem tumoral S-180 e em 108,5 para a linhagem do tumor de Ehrlich. Deste modo, esta substância pode ser considerada não citotóxica para as células normais e nem

para o tumor de Ehlich e células S-180, uma vez que requer uma elevada concentração desta substância para inibir sua proliferação.

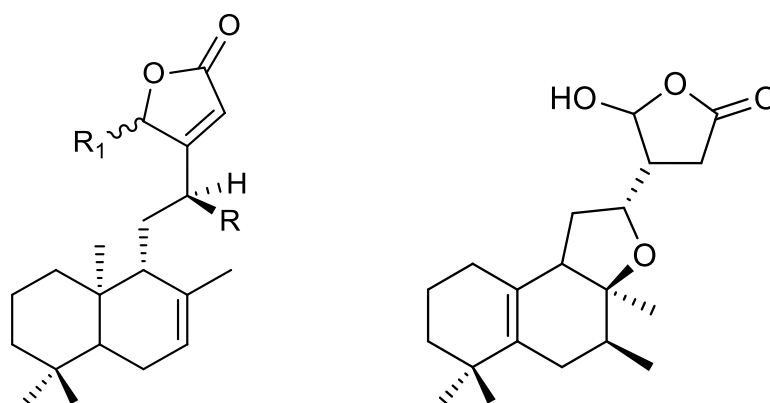
A substância **III** demonstrou valor de IC_{50} de 170,6 $\mu\text{g/mL}$ para as células normais e 99,30 $\mu\text{g/mL}$ para as de sarcoma, indicando assim baixo potencial citotóxico frente as células de sarcoma e células normais.

MIZUSHINA *et al.*, 2009, investigou a atividade inibitória do crescimento de células de leucemia humana (HL-60) dos compostos **I** e **II** (FIGURA 4.44, p. 129). Os percentuais inibitórios não foram expressivos visto que o composto **1** inibiu o crescimento celular em 82% na concentração de 100,7 μM , porém inibiu em apenas 20% quando essa concentração diminuiu para 50 μM . O composto **II**, inibiu o crescimento em 58% em 100 μM e em apenas 2% em 50 μM . Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos para estas substâncias frente às linhagens de sarcoma e Erlich.

FIGURA 4.44: Estruturas químicas dos compostos I e II.



Estudos mostraram que diterpenoides labdano e halimano, tais como as substâncias **68** a **71** (FIGURA 45, p. 130), isoladas de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) foram ativos frente às linhagens de células de câncer humano, mostrando atividade potente contra a linhagem de células Lu1 (câncer de pulmão humano). O composto **68** mostrou-se como o mais ativo, apresentando valor de dose efetiva de inibição da proliferação celular (ED_{50}) de 0,3 $\mu\text{g/mL}$. As demais substâncias apresentaram ED_{50} superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, a classe destes diterpenoides se mostrou promissora na busca por agentes citotóxicos (SCIO *et al.*, 2003).



68: R = R₁ = OH
69: R = H, R₁ = OH
70: R = OH, R₁ = H

71

A substância **IV**, isolada neste trabalho, não foi avaliada frente às linhagens celulares S-180 e L-929, porém este composto foi descrito como detentor de um grande potencial como agente anticâncer, devido à sua atividade quimiopreventiva. A tricina mostrou-se um inibidor potente e seletivo de duas linhagens de células cancerígenas do fígado e do pâncreas e não apresentou efeitos colaterais sobre células normais, podendo ser considerado como um candidato em potencial para testes pré-clínicos como agente quimiopreventivo (MOHEB *et al.*, 2013). Esta substância também foi descrita como um agente anti-clonogênico de células tumorais da mama humana (MDA MB 468) e de carcinoma do cóllon (SW480). Esta propriedade foi atribuída à sua habilidade de inibir a atividade da ciclooxigenase e sua interferência com a carcinogênese em ratos (CAI, STEWARD & GESCHER, 2005).

5. CONCLUSÕES

O estudo químico do extrato etanólico das folhas e das flores de *H. stigonocarpa* levou ao isolamento e à elucidação estrutural de seis substâncias, sendo quatro diterpenoides (substâncias **I**, **II**, **III** e **VI**), uma flavona (substância **IV**) e um ácido carboxílico aromático (substância **V**).

As substâncias **I** e **III** (diterpenoides labdano) já haviam sido isoladas da espécie *H. courbaril* em trabalhos realizados por (MARSAIOLI, DE FREITAS LEITÃO FILHO & DE PAIVA CAMPELLO, 1975) e (CUNNINGHAM, MARTIN &

LANGENHEIM, 1973). Porém não foram encontrados relatos da substância **II** para o gênero *Hymenaea*.

A substância **VI** foi descrita pela primeira vez na literatura e o isolamento de três diterpenoides halimano de *H. courbaril* (ABDEL-KADER *et al.*, 2001) indica que esta espécie e *H. stigonocarpa* são produtoras de diterpenoides halimano e labdano, confirmando os relatos literários (NOGUEIRA *et al.*, 2001).

Não existem relatos do isolamento da flavona **IV** para este gênero, porém quatro flavonoides já foram isolados de *H. stigonocarpa* (MARANHÃO *et al.*, 2013). A substância **V** também ainda não foi descrita para este gênero, mesmo tendo sido realizados estudos para determinar o teor da composição fenólica de *H. stigonocarpa* (MATUDA & MARIA NETTO, 2005).

Portanto, este estudo contribuiu para a caracterização química de *H. stigonocarpa* e, conseqüentemente, do gênero ao qual pertence, enriquecendo o conhecimento químico acerca das classes de metabólitos secundários produzidos por esta espécie.

Os resultados dos ensaios enzimáticos mostraram que as substâncias produzidas por *H. stigonocarpa* são promissoras na busca por inibidores específicos da catepsina V, uma vez que os compostos **I**, **IV** e **V** desempenharam níveis elevados de inibição desta cisteíno protease e a substância **VI** desempenhou um percentual inibitório moderado deste alvo. Portanto, afim de se investigar a potência desses compostos, faz-se necessária a conclusão dos experimentos de determinação dos valores de IC₅₀ destas substâncias. Os dados obtidos neste trabalho podem ser usados para a realização de estudos de Relação Estrutura Atividade (REA) com a finalidade de compreender a atividade desses compostos frente às catepsinas V, K e L.

Com relação aos ensaios de citotoxicidade, os compostos **I** e **III** não apresentaram atividade apreciável frente às linhagens de células S-180. No entanto, estudos demonstraram que os diterpenoides halimano e labdano são considerados agentes citotóxicos potentes frente à linhagens de células cancerígenas humanas (SCIO *et al.*, 2003) e apontaram o flavonoide tricina como um potente agente anticâncer (MOHEB *et al.*, 2013). Deste modo, o isolamento desta substância de *H. stigonocarpa*, bem como de diterpenoides labdano e halimano, indicam que esta espécie pode ser uma fonte promissora de substâncias potencialmente citotóxicas às células tumorais humanas, enfatizando a necessidade da continuação dos seus estudos químicos e biológicos.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J. M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J. H.; WERKHOVEN, M. C. M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D. G. I., Isolation and Absolute Configuration of ent-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest1. *J Nat Prod*, 65 (1), 11, **2001**.

AGUIAR, J. C.; SANTIAGO, G. M.; LAVOR, P. L.; VERAS, H. N.; FERREIRA, Y. S.; LIMA, M. A.; ARRIAGA, A. M.; LEMOS, T. L.; LIMA, J. Q.; DE JESUS, H. C.; ALVES, P. B.; BRAZ-FILHO, R., Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Nat Prod Commun*, 5 (12), 1977, **2010**.

ANDREÃO, P. S. A. Estudo fitoquímico e avaliação da bioatividade de substâncias isoladas e derivatizadas de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae). Campos dos Goytacazes, Centro de Ciência e Tecnologia - UENF, 2010. Tese de doutorado, 311 p.

ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C. D.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A. D.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G. D.; SIQUEIRA, J. A. D. E.; ALEGRIO, L. V.; BRAZ-FILHO, R., Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74, 415, **2002**.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D., Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78 (5), 431-441, **2005**.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F., Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Ed, Elsevier, Amsterdam, 2004.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1991. v.2, 377 p.

BATALHA, M. O. & MING, L. C. "Plantas medicinais e aromáticas: um estudo de competitividade no estado de São Paulo, SEBRAE – São Paulo, GEPAI – São Carlos, UNESP – Botucatu, SP, **2003**.

BONTEMPO, M. "Medicina natural". São Paulo, Nova Cultural, 2000, 584 p.

CAI, H.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J., Determination of the putative cancer chemopreventive flavone tricetin in plasma and tissues of mice by HPLC with UV-visible detection. *Biomed Chromatogr*, 19 (7), 518, **2005**.

CARMO, A. B.; VASCONCELOS, H. L.; ARAÚJO, G. M., Estrutura da comunidade de plantas lenhosas em fragmentos de cerrado: relação com o tamanho do fragmento e seu nível de perturbação. *Brazilian Journal of Botany*, 34, 31, **2011**.

CHEN, C. Y.; CHENG, Y. B.; CHEN, S. Y.; CHIEN, C. T.; KUO, Y. H.; GUH, J. H.; KHALIL, A. T.; SHEN, Y. C., New bioactive clerodane diterpenoids from the roots of *Casearia membranacea*. *Chem Biodivers*, 5 (1), 162, **2008**.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y., Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913 (1–2), 387, **2001**.

COPELAND, R. A. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York, Wiley, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J., Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830 (6), 3670, **2013**.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H., Resin acids from two amazonian species of Hymenaea. *Phytochemistry*, 12 (3), 633, **1973**.

DE ALMEIDA, S. P., *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento: 1998.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S., Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123 (3), 439, **2009**.

DEWICK, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley: 2009.

DU, X.; CHEN, N. L.; WONG, A.; CRAIK, C. S.; BROMME, D., Elastin degradation by cathepsin V requires two exosites. *J Biol Chem*, 288 (48), 34871, **2013**.

DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P. Papilionoideae (Leguminosae) nos campos ferruginosos do Parque Estadual do Itacoloni, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. *Revista Brasileira de Botânica*, 28 (3): 493, **2005**.

EL-METWALLY, T.H. & EL-SENOSI, Y. "Enzyme inhibition". Medical Enzymology: Simplified approach, Chapter 6, Nova Publishers, NY, 2010, p. 57-77.

FARIA, J. P.; SANO, S. M.; COSTA, T. S. A. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Eds) "Frutas nativas do Centro-Oeste do Brasil. Brasília, Embrapa, 2006, p. 174-188.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA A.; CARVALHO, A. A. Jr.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

GHOSH, P. C.; LARRAHONDO, J. E.; LEQUESNE, P. W.; RAFFAUF, R. F., Antitumor plants. IV. Constituents of Simarouba versicolor. *Lloydia*, 40, 364-369, **1977**.

GIBBS, P. E.; OLIVEIRA, P. E.; BIANCHI, M. B., Postzygotic Control of Selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae-Caesalpinioideae), a Bat-Pollinated Tree of the Brazilian Cerrados. *International Journal of Plant Sciences*, 160 (1), 72, **1999**.

GORENFLO, L. J.; ROMAINE, S.; MITTERMEIER, R. A.; WALKER-PAINEMILLA, K., Co-occurrence of linguistic and biological diversity in biodiversity hotspots and high biodiversity wilderness areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 8032, **2012**.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A. d.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C., Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 3, 185, **1989**.

GREENLEE, H. "Natural products for câncer chemoprevention". *Seminars in Oncology*, 28: 29, **2012**.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. d., Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, 17, 561, **2003**.

HANAZAKI, N.; TAMASHIRO, J.; LEITÃO-FILHO, H.; BEGOSSI, A., Diversity of plant uses in two Caçara communities from the Atlantic Forest coast, Brazil. *Biodiversity & Conservation*, 9 (5), 597, **2000**,

HARA, N.; ASAKI, H.; FUJIMOTO, Y.; GUPTA, Y. K.; SINGH, A. K.; SAHAI, M., Clerodane and ent-halimane diterpenes from *polyalthia longifolia*. *Phytochemistry*, 38 (1), 189, **1995**.

HOLLOSY, F.; IDEI, M.; CSORBA, G.; SZABO, E.; BOKONYI, G.; SEPRODI, A.; MESZAROS, G.; SZENDE, B.; KERI, G., Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 21 (5), 3485, **2001**.

IARC "Latest world cancer statistics". World Health Organization, Press release N° 223, **2013**. <http://globocan.iarc.fr>. Cited in 20 jan 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA "Mapa de biomas do Brasil". IBGE, Rio de Janeiro. ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos_mapas_murais/biomas.pdf. Cited in 20 jan 2014.

HURYN, D. M.; WIPF, P., Chapter 5 - Natural product chemistry and anticancer drug discovery. In *Cancer Drug Design and Discovery*, Neidle, S., Ed. Academic Press: New York, p 107-130, 2008.

IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J.; BARATA, L. E. S.; RÚVEDA, E. A., ¹³C NMR spectral analysis of eperuane diterpenes. *Phytochemistry*, 16 (11), 1842, **1977**.

JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G., Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chemistry*, 105 (2), 485, **2007**.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANARSA, T.; BUAYAIRAKSA, M., New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*. *J Nat Prod*, 68 (2), 183, **2005**.

KHALIKOVA, T. A.; ZHANAIEVA, S. Y.; KOROLENKO, T. A.; KALEDIN, V. I.; KOGAN, G., Regulation of activity of cathepsins B, L, and D in murine lymphosarcoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide. *Cancer Lett*, 223 (1), 77, **2005**.

KHOO, S. F.; OEHLISCHLAGER, A. C.; OURISSON, G., Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. *Tetrahedron*, 29 (21), 3379, **1973**.

KUWABARA, H.; MOURI, K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K., Tricin from a malagasy connaraceous plant with potent antihistaminic activity. *J Nat Prod*, 66 (9), 1273, **2003**.

LANGENHEIM, J. H.; HALL, G. D. Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneola*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil. *Biochemical Systematics Ecology*, 11(1), 29, **1983**.

LECAILLE, F.; BROMME, D.; LALMANACH, G., Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*, 90 (2), 208, **2008**.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*, 102: 4459, **2002**.

LEE, Y. T.; LANGENHEIM, J. H. "A Systematics revision of the genus *Hymenaea*. University of California". *Publications in Botany*, 69 (1): 109, **1975**.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. "Legumes of the world". Kew: Royal Botanic Gardens, 2005, 577 p.

LORENZI, H. "Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil". Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998, 368 p.

LORENZI, H. "Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil". Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2002, 384 p.

MARANHÃO, C. A.; PINHEIRO, I. O.; SANTANA, A. L. B. D.; OLIVEIRA, L. S.; NASCIMENTO, M. S.; BIEBER, L. W., Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79 (0), 9, **2013**.

MARQUES, E. F.; BUENO, M. A.; DUARTE, P. D.; SILVA, L. R. S. P.; MARTINELLI, A. M.; DOS SANTOS, C. Y.; SEVERINO, R. P.; BRÖMME, D.; VIEIRA, P. C.; CORRÊA, A. G., Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent

inhibitors of cathepsins L and V. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (0), 10, , **2012**.

MARSAIOLI, A. J.; DE FREITAS LEITÃO FILHO, H.; DE PAIVA CAMPHELLO, J., Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, 14 (8), 1882, **1975**.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H., Enantio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oic acid from trunk resin of kenyan *Hymenaea verrucosa*. *Phytochemistry* **1974**, 13 (2), 523-525.

MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H.; ZAVARIN, E., Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* **1972**, 11 (10), 3049-3051.

MATUDA, T. G.; MARIA NETTO, F., Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). *Food Science and Technology (Campinas)*, 25, 353-357, **2005**.

MIZUSHINA, Y.; MANITA, D.; TAKEUCHI, T.; SUGAWARA, F.; KUMAMOTO-YONEZAWA, Y.; MATSUI, Y.; TAKEMURA, M.; SASAKI, M.; YOSHIDA, H.; TAKIKAWA, H., The inhibitory action of kohamaic acid A derivatives on mammalian DNA polymerase beta. In *Molecules*, Switzerland, 2009; Vol. 14, pp 102-21.

MEYERS, N. "Threatened biotas: 'hotspots' in tropical forests". *Environmentalist*, 8, 187, **1988**.

MOHEB, A.; GRONDIN, M.; IBRAHIM, R. K.; ROY, R.; SARHAN, F., Winter wheat hull (husk) is a valuable source for tricin, a potential selective cytotoxic agent. *Food Chemistry*, 138 (2-3), 931, **2013**.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55, **1983**.

NAKANO, T.; DJERASSI, C., Terpenoids. XLVI.1 Copalic Acid². *The Journal of Organic Chemistry*, 26 (1), 167, **1961**.

NELSON, D. L.; COX, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman: 2008.

NOGUEIRA, R. T.; GIACOMINI, R. A.; SHEPHERD, G. J.; IMAMURA, P. M., A New *ent*-Clerodane Diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2002**, 13, 389, **2002**.

NOGUEIRA, R. T.; SHEPHERD, G. J.; LAVERDE JR, A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M., Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry*, 58 (8), 1157, **2001**.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. G.; VARELA, R.; MACÍAS, F., Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. *Phytochemistry Reviews*, 12 (4), 839, **2013**.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C., *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (1), 380, **2014**.

RODRIGUES ORSI, P.; BONAMN, F.; APARECIDA SEVERI, J.; CÁSSIA SANTOS, R.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; STASI, L. C. D., *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (1), 81, **2012**.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K., A new dimeric dihydrochalcone and a new prenylated flavone from the bud covers of *Artocarpus altilis*: potent inhibitors of cathepsin K. *J Nat Prod*, United States, 65, 624, **2002**.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA JR, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C., Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* huber ex ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11, 355, **2000**.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E., Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev*, 102 (12), 4639, **2002**.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. "Biologia vegetal". 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 857 p., 1996.

ROCHA. M. R.; BORGES, J. D.; NAVES, R. V. & VIDAL, V. L. Estudos sobre a emergência de plântulas de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.; Caesalpinaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 14, 61, **1994**.

SAHA, S. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R., Molecular approaches towards development of purified natural products and their structurally known derivatives as efficient anti-cancer drugs: Current trends. *European Journal of Pharmacology*, 714 (1–3), 239, **2013**.

SALMINEN-MANKONEN, H. J.; MORKO, J.; VUORIO, E., Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets*, 8 (2), 315, **2007**.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G., Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 153, **2008**.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S., Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 (3), 563, **2005**.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T. M. A.; ROMANHA, A. J.; DE SOUZA FILHO, J. D.; CORDELL, G. A.; ZANI, C. L., Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. *Phytochemistry*, 64 (6), 1125, **2003**.

SEVERINO, R. P. Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2008. Tese de doutorado, 248 p.

SHARMA, R. "Enzyme inhibition: mechanisms and scope" In: Enzyme inhibition and bioapplications. Sharma Rakesh (Ed). Intech, 2012, p. 3 -36.

SHEN, Y. C.; WANG, L. T.; WANG, C. H.; KHALIL, A. T.; GUH, J. H., Two new cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 52 (1), 108, **2004**.

SHI, X. L.; LIU, K.; WU, L. G., Interventional value of total flavonoids from *Rhizoma Drynariae* on Cathepsin K, a potential target of osteoporosis. *Chin J Integr Med*, 17 (7), 556, **2011**.

SILVA, S. L. d.; CHAAR, J. d. S.; FIGUEIREDO, P. d. M. S.; YANO, T., Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica* 38, 107, **2008**.

SOSULSKI, F. W.& SOSULSKI, K.; Legumes: horticulture, properties and processing. In: HUI, Y. H. (Ed), *Handbook of food Science, technology and engineering*. Nova York, CRC Press, 1: 18.1 – 18.2, **2006**.

SUFFNESS, M. & PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, k. (Ed.), *Methods in plant biochemistry: Assays for biochemistry*, 6. Academic press, London, pp. 71-133, 1990.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S., Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. *Planta Med*, 62 (5), 469, **1996**.

TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B.; TURK, D., Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, 1824 (1), 68, **2012**.

WILDER, C. L.; PARK, K.-Y.; KEEGAN, P. M.; PLATT, M. O., Manipulating substrate and pH in zymography protocols selectively distinguishes cathepsins K, L, S, and V activity in cells and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516 (1), 52, **2011**.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G., Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. *J Nat Prod*, 70 (2), 206, **2007**.

WINK, M. & MOHAMED, G. I. A. "Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distributions patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene". *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (8): 897-917, **2003**.

ZHANG, H.; CONTE, M. M.; HUANG, X.-C.; KHALIL, Z.; CAPON, R. J., A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pyrrolidones, furanones and

pyrroles from a southern Australian marine sponge, *Ianthella* sp. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10 (13), 2656, **2012**.