



UFG

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

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES *Byrsonima
coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) E *Eugenia malaccensis* L.
(MYRTACEAE)**

MARCOS HENRIQUE FALEIROS SANTOS

CATALÃO - GO

2013

MARCOS HENRIQUE FALEIROS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) E *Eugenia malaccensis* L. (MYRTACEAE)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, *Campus Catalão*, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientadora: Profa. Dra. Richele P. Severino
Co-Orientadora: Profa. Dra. Vanessa G. P. Severino

CATALÃO - GO
2013

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

S237e Santos, Marcos Henrique Faleiros.
Estudo químico e avaliação biológica das espécies *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae) e *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) [manuscrito] / Marcos Henrique Faleiros Santos. - 2013.
XV, 108 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dra. Richele Priscila Severino; Co-orientadora: Prof^a Dra. Vanessa G. Pasqualotto Severino.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, Departamento de Química, 2013.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndice.

1. *Byrsonima coccolobifolia*. 2. *Eugenia malaccensis*. 3. Cerrado. 4. Catepsinas. I. Título.

CDU: 581.5

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de
Dissertação de Mestrado do candidato **Marcos Henrique Faleiros Santos**, realizada
em 26 de julho de 2013.*

Richele Severino

Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Lucília Kato

Profa. Dra. Lucília Kato

Paulo César Vieira

Prof. Dr. Paulo César Vieira

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Alcíl e Aparecida, que com toda simplicidade sempre foram meus exemplos de amor, perseverança, força de vontade, compreensão e carinho.

A minha irmã Doriene, que sempre esteve ao meu lado.

A todos meus amigos e familiares que sempre me incentivaram na busca por este sonho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Richele Priscila Severino** pela orientação e ensinamentos transmitidos sempre com muita ética e profissionalismo, sendo sem dúvidas um exemplo a seguir. Já se vão 4 anos de convivência desde quando você me apresentou a Química de Produtos Naturais. Aprendi muito com você! Obrigado pela amizade, paciência, apoio, estímulo e carinho.

À Profa. Dra. **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino** pela co-orientação, conhecimentos transmitidos, amizade, carinho, confiança e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa.

Ao Prof. Dr. **Paulo Cezar Vieira** (UFSCar) por todas suas contribuições e suportes na realização desse trabalho, pelo seu apoio e incentivo ao crescimento do grupo de pesquisa em Produtos Naturais UFG/CAC e por sua colaboração na realização dos ensaios enzimáticos.

Aos professores Dr. **Antônio Gilberto Ferreira** (UFSCar) e Dr. **Luciano Morais Lião** (UFG), pela colaboração na realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos professores Dr. **Helder Nagai Consolaro** (UFG/CAC) e Dra. **Lucília Kato** (UFG) pelas contribuições dadas na execução deste trabalho.

Aos professores do departamento de Química da UFG/CAC, em especial a Profa. Dra. **Elaine Rosehrer Carbonero** pela convivência e apoio incalculável.

Aos funcionários e técnicos do departamento de química UFG/CAC, em especial a Tec. **Márcia Mendes**, pelo seu apoio e dedicação, e acima de tudo por sua amizade constante me incentivando a realizar este sonho.

À aluna **Marina Mesquita Ferreira**, pela contribuição na execução deste trabalho, por sua dedicação e pela amizade.

A todos os meus amigos do laboratório de Produtos Naturais da UFG/CAC, desde aqueles que ficaram aqui por pouco tempo até aqueles que foram até o fim. Cada um teve sua importância, seja nos momentos de estudos, troca de conhecimentos, ou mesmo nos momentos de descontração. De um modo especial à **Michelle Nauara, João Gabriel, Karla, Jordana, Leonardo, Afif e Gracy**. MUITO OBRIGADO!

Aos meus dois primeiros companheiros de bancada, **Taynara Lopes e Hugo Brasil**, que mesmo em um pequeno espaço e com pouca infraestrutura, conseguimos iniciar nossas pesquisas em produtos naturais, podendo partilhar dos conhecimentos, experiências, improvisos, sorrisos, abraços... meu eterno agradecimento.

Aos meus pais, **Alcil e Aparecida**, que com toda humildade e simplicidade, nunca mediram esforços para me ver chegar até aqui. Mesmo não tendo reais conhecimentos do que seria o Mestrado, sempre me deram forças para concluir esta etapa... Proporcionaram-me momentos de alegria, carinho, apoio e incentivo constante.

À minha irmã, **Doriene**, pelo carinho, atenção e companheirismo. Talvez a minha ausência tenha nos aproximado ainda mais. Obrigado minha irmã!

À toda minha família pelo apoio, amor, carinho, compreensão, orações e por entenderem minha ausência. Em especial às minhas primas **Juliene** e **Lauriene**, que me receberam de braços abertos em sua residência. Valeu pela torcida!

A todos meus amigos pelo apoio, carinho, incentivo, sorrisos e abraços. Obrigado pela torcida! Impossível nomeá-los sem esquecer alguém. Sintam-se todos agradecidos...
MUITO OBRIGADO!

A Deus pela minha existência e por estar sempre me iluminando, proporcionando-me esta experiência.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Aos órgãos de fomento FAPEG e CNPQ pelo suporte financeiro.

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS ESPÉCIES *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) E *Eugenia malaccensis* L. (MYRTACEAE) - O estudo descrito neste trabalho contribui para o conhecimento químico e biológico das espécies *B. coccolobifolia* e *E. malaccensis*, conhecidas popularmente como “murici” e “jambo-vermelho”, respectivamente. Estas espécies são encontradas em diversas regiões do Brasil, principalmente nas áreas do Cerrado, e são largamente apreciadas pelos frutos comestíveis. Diversas aplicações na medicina popular estão relacionadas a estas espécies, como atividade antibacteriana, antidiarreica, anti-inflamatória e no controle de diabetes. O estudo do extrato etanólico das raízes de *B. coccolobifolia* levou à identificação da mistura dos triterpenos α e β -amirina, mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, ácido oleanólico (triterpeno do tipo oleaneno) e glochidonol (triterpeno do tipo lupano), relatado pela primeira vez no gênero *Byrsonima*. Do extrato etanólico das folhas de *E. malaccensis* foi possível isolar dois flavonoides pertencentes à classe dos flavonois, mearnsetina e mearnsitrina. As substâncias foram identificadas com base nos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e/ou CG/EM, em comparação com a literatura. Foi também verificado o potencial de inibição dos extratos e suas frações, frente às catepsinas K, V e L. Essas enzimas são encontradas majoritariamente nos lisossomos e podem participar de processos celulares bastante especializados levando ao desenvolvimento de diversas patologias como doenças cardiovasculares, osteoporose, aterosclerose, tumores malignos, pancreatite, entre outras. Os extratos e a maioria das partições mostraram atividade inibitória significativa frente a estas enzimas, quando avaliados nas concentrações de 125 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo os melhores resultados observados para a catepsina V. Os flavonoides mearnsetina e mearnsitrina não apresentaram atividade quando avaliados nas catepsinas K e V, na concentração de 25 μM .

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SPECIES *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) AND *Eugenia malaccensis* L. (MYRTACEAE) - The study described in this work contributed to the chemical and biological knowledge of species *B. coccolobifolia* and *E. malaccensis*, known popularly as "murici" and "jambo-vermelho", respectively. These species are found in various regions of Brazil, especially in Cerrado areas, and are widely appreciated by edible fruit. Several applications in folk medicine are related to these species, such as antibacterial activity, antidiarrheal, anti-inflammatory and on control diabetes (antidiabetic). The study of roots ethanolic extract of *B. coccolobifolia* led to the identification of mixture of triterpenes α -amiryn and β -amiryn, mixture of steroids campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, oleanolic acid (olenene-type triterpene) and glochidonol (lupane-type triterpene), reported for the first time in the *Byrsonima* genus. Of the leaves ethanolic extract of *E. malaccensis* was possible to isolate two flavonoids, mearnsetin and mearnsitrin, both of flavonol class. The structural identification was carried out on the basis of 1D- and 2D-NMR experiments, GC/MS and comparison with literature data. It was also measured the inhibition potential of extracts and your fractions of these plants against cathepsins K, V and L. These enzymes are found mainly in lysosomes and may also involved in selective and controlled pathological processes, such as cardiovascular diseases, osteoporosis, atherosclerosis, malignant, pancreatitis, many others. The extracts and most partitions showed considerable inhibition against cathepsins (concentration of 125 and 50 $\mu\text{g/mL}$), and the best results are observed for cathepsin V. The flavonoids mearnsetin and mearnsitrin have not presented activity when evaluated in cathepsins K and V (concentration of 25 μM).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estruturas de alguns produtos naturais utilizados como fármacos.....	02
FIGURA 1.2: Fonte de NAS aprovadas pelo FDA.....	04
FIGURA 1.3: Número de novos fármacos aprovados por ano.....	05
FIGURA 1.4: (a) Total de Novas Substâncias Ativas (NSAs). (b) Porcentagem de N/NB/ND aprovados por ano (período 1981 – 2010).....	05
FIGURA 1.5: Representação geográfica dos biomas brasileiros.....	07
FIGURA 1.6: Alguns frutos do Cerrado que são comercializados.....	09
FIGURA 1.7: Áreas consideradas <i>hotspots</i> mundiais.....	10
FIGURA 1.8: Flavonoides e outros compostos isolados do gênero <i>Byrsonima</i>	14
FIGURA 1.9: Terpenoides isolados do gênero <i>Byrsonima</i>	15
FIGURA 1.10: Derivados do ácido gálico e ácido quínico, e outras substâncias isoladas do gênero <i>Byrsonima</i>	16
FIGURA 1.11: Folhas, flores e frutos da espécie <i>B. coccolobifolia</i>	17
FIGURA 1.12: Flavonoides, cromonas e derivados aromáticos isolados em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	22
FIGURA 1.13: Taninos e outros derivados aromáticos isolados em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	23
FIGURA 1.14: Terpenoides isolados em espécies do gênero <i>Eugenia</i>	24
FIGURA 1.15: Árvore, flores e frutos da espécie <i>E. malaccensis</i>	25
FIGURA 3.1: Esquema geral dos ensaios enzimáticos.....	44
FIGURA 4.1: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da mistura das substâncias I e II.....	50
FIGURA 4.2: Cromatograma obtido para a mistura das substâncias I e II...	51
FIGURA 4.3: Espectros de massas (70 eV) para as substâncias I e II.....	52
FIGURA 4.4: Proposta de fragmentação para as substâncias I e II.....	52
FIGURA 4.5: Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC.....	54

FIGURA 4.6: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) para a substância III	57
FIGURA 4.7: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) para a substância III	58
FIGURA 4.8: Mapa de contorno HSQC para a substância III	59
FIGURA 4.9: Mapa de contorno HMBC para a substância III	61
FIGURA 4.10: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) para a mistura das substâncias IV , V e VI	64
FIGURA 4.11: Cromatograma obtido para a mistura das substâncias IV , V e VI	65
FIGURA 4.12: Espectro de massa (70 eV) da substância IV	65
FIGURA 4.13: Espectro de massas (70 eV) da substância V	66
FIGURA 4.14: Espectro de massas (70 eV) da substância VI	66
FIGURA 4.15: Proposta de fragmentação para esteroides IV , V e VI	67
FIGURA 4.16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância VII	70
FIGURA 4.17: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) para a substância IX	73
FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) para a substância IX	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Substâncias isoladas em espécies do gênero <i>Byrsonima</i> ...	12
TABELA 1.2: Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Eugenia</i>	20
TABELA 1.3: Relação de sinónimas para a espécie <i>E. malaccensis</i>	25
TABELA 3.1: Massa do material vegetal seco e dos extratos.....	32
TABELA 3.2: Massa obtida para as partições dos diferentes extratos.....	32
TABELA 3.3: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição BCRH	34
TABELA 3.4: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição BCRA para as frações 1 e 2.....	37
TABELA 3.5: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição EMFA	40
TABELA 3.6: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição EMFA	42
TABELA 4.1 - Dados de RMN de ^1H da mistura dos terpenoides I e II	49
TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância III	55
TABELA 4.3: Correlações observadas entre átomos de C e H nos experimentos de HSQC e HMBC para a substância III	56
TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H para a mistura das substâncias IV , V e VI	63
TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H para a substância VII	69
TABELA 4.6: Dados de RMN de ^1H para a substância VIII	72
TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H para a substância IX	75
TABELA 4.8: Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas V, K e L.....	79
TABELA 4.9: Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas V, K e L, para os flavonoides isolados VIII e IX	79

FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1: Esquema de fracionamento de BCRH	34
FLUXOGRAMA 3.2: Esquema de fracionamento da partição BCRA	35
FLUXOGRAMA 3.3: Continuação do esquema de fracionamento da partição BCRA	36
FLUXOGRAMA 3.4: Esquema de fracionamento da partição EMFA	39
FLUXOGRAMA 3.5: continuação do esquema de fracionamento da fração EMFA	41

LISTA DE ABREVIATURAS/SIMBOLOS/SIGLAS

°C	graus Celsius
ACN	acetonitrila
CC	Cromatografia de absorção em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	dubleto ou duplete
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
Dic	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
E-64	<i>L</i> -3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamino(4-guanino)butano
eV	elétrons volts
h	altura
Hex	hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	hertz
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MeOH	metanol
MHz	mega hertz
min	minutos

mL	mililitros
mM	milimolar
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
RDA	Retro-Diels-Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto ou simpleto
<i>t</i>	triplete
TMS	tetrametilsilano
Z-FR-MCA	carbобенzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
δ	deslocamento químico em partes por milhão
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
φ	diâmetro

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 - Histórico dos Produtos Naturais.....	01
1.2 - Aspectos Gerais e a Química das Plantas Medicinais.....	03
1.3 - A Biodiversidade Brasileira.....	06
1.3.1 - O bioma Cerrado.....	08
1.4 - Família Malpighiaceae e o Gênero <i>Byrsonima</i>	10
1.5 - Família Myrtaceae e o Gênero <i>Eugenia</i>	17
1.6 - Enzimas como Alvos Terapêuticos.....	26
2 – OBJETIVOS	28
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 - Materiais.....	29
3.1.1 - Solventes.....	29
3.1.2 - Suporte para cromatografia.....	29
3.1.3 - Reveladores empregados.....	29
3.2 - Equipamentos.....	29
3.2.1 - Evaporador Rotativo.....	29
3.2.2 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.....	30
3.2.3 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear.....	30
3.2.4 - Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas.....	30
3.3 - Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais.....	31
3.4 - Preparação dos extratos vegetais e partições.....	31
3.5 - Metodologia do estudo de <i>B. coccolobifolia</i>	33
3.5.1 - Fracionamento das partições em hexano (BCRH) e acetato de etila (BCRA).....	33
3.6 - Metodologia do estudo de <i>E. malaccensis</i>	38
3.6.1 - Fracionamento da partição EMFA	38

3.7 - Metodologia para os ensaios de inibição enzimática (Catepsinas K, V e L).....	44
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
4.1 - Substâncias Isoladas.....	45
4.2 - Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Byrsonima coccolobifolia</i>	47
4.2.1 - Mistura dos terpenoides α -amirina (I) e β -amirina (II).....	47
4.2.2 - Terpenoide glochidonol (III).....	53
4.2.3 - Mistura dos esteroides campesterol (IV), estigmasterol (V) e β -sitosterol (VI).....	61
4.2.4 - Terpenoide ácido oleanólico (VII).....	68
4.3 - Determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Eugenia malaccensis</i> ..	71
4.3.1 - Flavonoide mearnsetina (VIII).....	71
4.3.2 - Flavonoide mearnsitrina (IX).....	74
4.4 – Resultados Biológicos de inibição das Catepsinas K, V e L.....	77
5 - CONCLUSÕES.....	80
6 – REFERÊNCIAS.....	81

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico dos Produtos Naturais

Desde seus primórdios, o homem utiliza recursos naturais para as mais diversas finalidades, sejam na forma de alimentos, cosméticos, inseticidas, defensivos agrícolas e medicamentos (PALMA & PALMA, 2012), sendo a história das plantas medicinais datadas desde a origem da civilização humana na terra (MUKHTAR, *et al.*, 2008).

As plantas têm formado a base da medicina tradicional, sendo que os primeiros registros datam cerca de 2600 a.C., documentando o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, incluindo os óleos de espécies de *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), sendo que algumas são utilizadas até os dias de hoje para o tratamento de doenças que vão desde tosses e resfriados à infecções parasitárias e inflamação (CRAGG & NEWMAN, 2013).

Diversas substâncias foram isoladas ou desenvolvidas a partir de produtos naturais para serem utilizadas no tratamento de diversas doenças, podendo relatar como exemplos: a galegine **(1)** de *Galega officinalis* L., que foi o modelo para a síntese de metformina **(2)** e outros fármacos antidiabéticos; a quinina **(3)**, isolada da casca de espécies *Cinchona* (por exemplo, *C. officinalis*), a qual formou a base para a síntese dos fármacos antimaláricos mais utilizados, cloroquina **(4)** e mefloquina **(5)**; a efedrina **(6)**, isolada de *Ephedra sinica*, sendo a base para a síntese dos agentes anti-asmáticos salbutamol **(7)** e salmeterol **(8)**; o anticancerígeno, paclitaxel® **(9)** e seus derivados, isolados de espécies *Taxus*. Tem-se também, a descoberta acidental da penicilina – e derivados **(10)** – a partir do fungo *Penicillium notatum*, marcando o início de uma nova era na medicina, "a Idade do Ouro de antibióticos"; e as avermectinas **(11)**, anti-helmínticos e antiparasitários, isolados de espécies de *Streptomyces* (FIGURA 1.1) (CRAGG & NEWMAN, 2013).

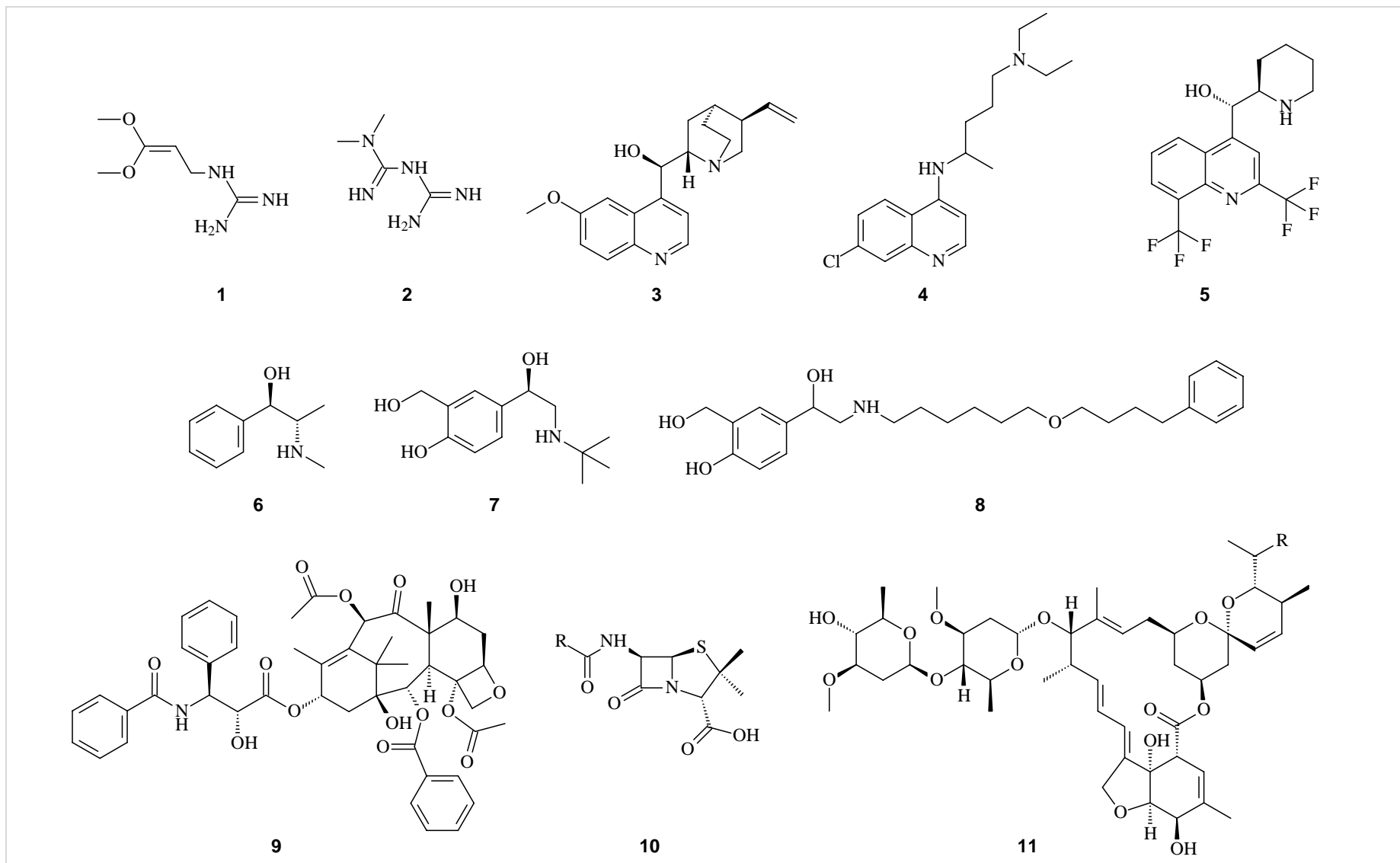


FIGURA 1.1: Estruturas de alguns produtos naturais utilizados como fármacos.

1.2 - Aspectos Gerais e a Química das Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas por diferentes populações, desempenhando um papel essencial nos cuidados de saúde, principalmente nos países mais pobres (ZHANG, *et al.*, 2013), onde a ingestão de ervas e folhas na busca pelo alívio e cura de doenças se torna cada vez mais comum (VIEGAS-JUNIOR, *et al.*, 2006). A valorização das plantas medicinais ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre a segurança e eficácia terapêutica destas plantas, incentivando as pesquisas na área (SILVA, *et al.*, 2010; NIERO, *et al.*, 2003).

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de diversidade química para iniciar a condução de descobertas terapêuticas ao longo do último século. Historicamente, as companhias farmacêuticas têm utilizado extratos brutos de plantas para produzir formulações terapêuticas, porém no século XX, com o avanço das técnicas de isolamento e purificação, formulações de fármacos com compostos bastante purificados tornaram-se mais típicas (TIWARI & MISHRA, 2011).

De acordo com os dados do FDA (*Food and Drug Administration*), do total de novas substâncias ativas (NAS – *New Active Substances*, conhecidas também por NCEs – *New Chemical Entities*) registradas nos últimos 30 anos (de 01/01/1981 a 31/12/2010), cerca de 6% são produtos naturais. Na FIGURA 1.2, é possível observar que os produtos naturais ainda são ou estão envolvidos em aproximadamente 50% das NAS aprovadas pelo FDA (NEWMAN & CRAGG, 2012).

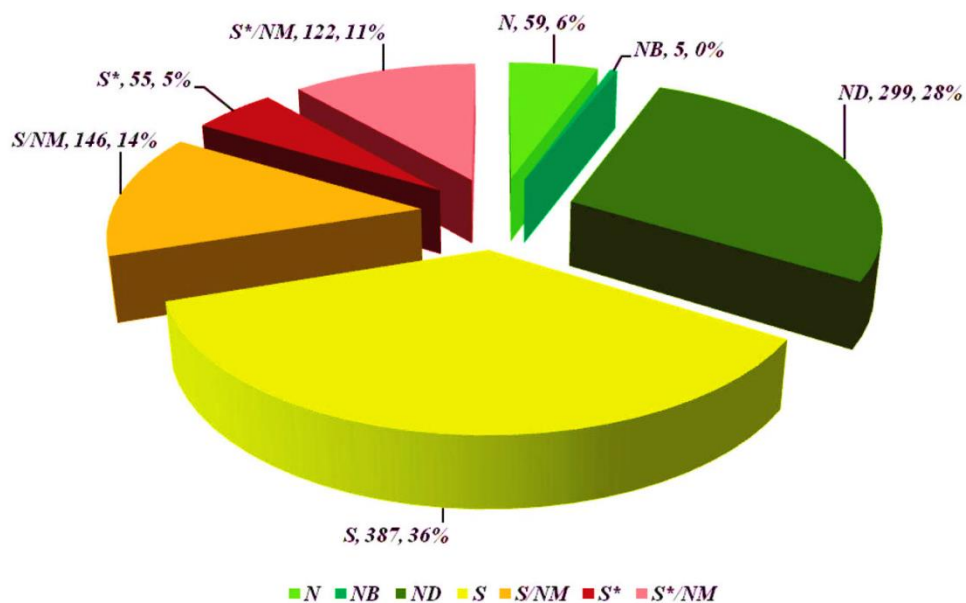


FIGURA 1.2: Fonte de NAS aprovadas pelo FDA (total=1355)

N: produtos naturais; NB: produtos naturais “botânicos” (no geral estes têm sido aprovados recentemente); ND: derivado de um produto natural e é usualmente uma modificação semissintética; S: fármaco totalmente sintético, geralmente baseado por *screening*/modificação de um agente existente; S*: criado por síntese total, mas de farmacofórico ou imitação de um produto natural; NM: produto natural mimetizado.

Fonte: (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Dados mostram que os produtos naturais e estruturas derivadas desempenharam e ainda desempenham um grande papel no desenvolvimento do arsenal terapêutico médico, mostrando assim a importância do incentivo às pesquisas para descoberta de novos fármacos (FIGURA 1.3). Embora se tenha um grande avanço tecnológico, tem-se também uma maior rigidez nas normas e legislações para a aprovação e liberação de um novo fármaco no mercado, tornando os atuais números de novos fármacos menores que no passado. Entretanto, um ponto motivador para a química de produtos naturais, é que no ano de 2010, das 20 NASs aprovadas, metade (50%) estava inserida na categoria dos produtos naturais (FIGURA 1.4), incluindo a maioria dos agentes antitumorais (NEWMAN & CRAGG, 2012).

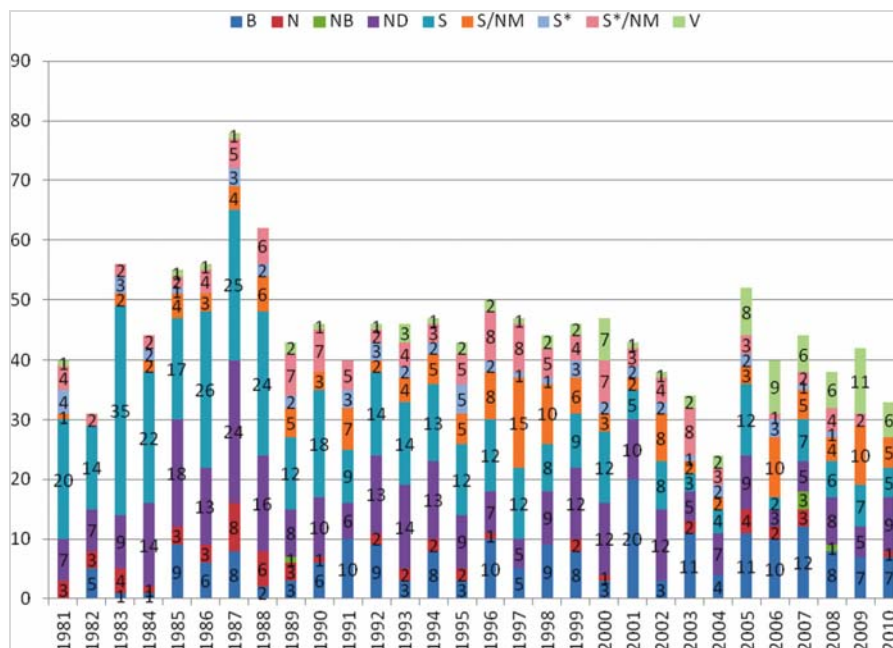


FIGURA 1.3: Número de novos fármacos aprovados por ano.

Fonte: (NEWMAN & CRAGG, 2012)

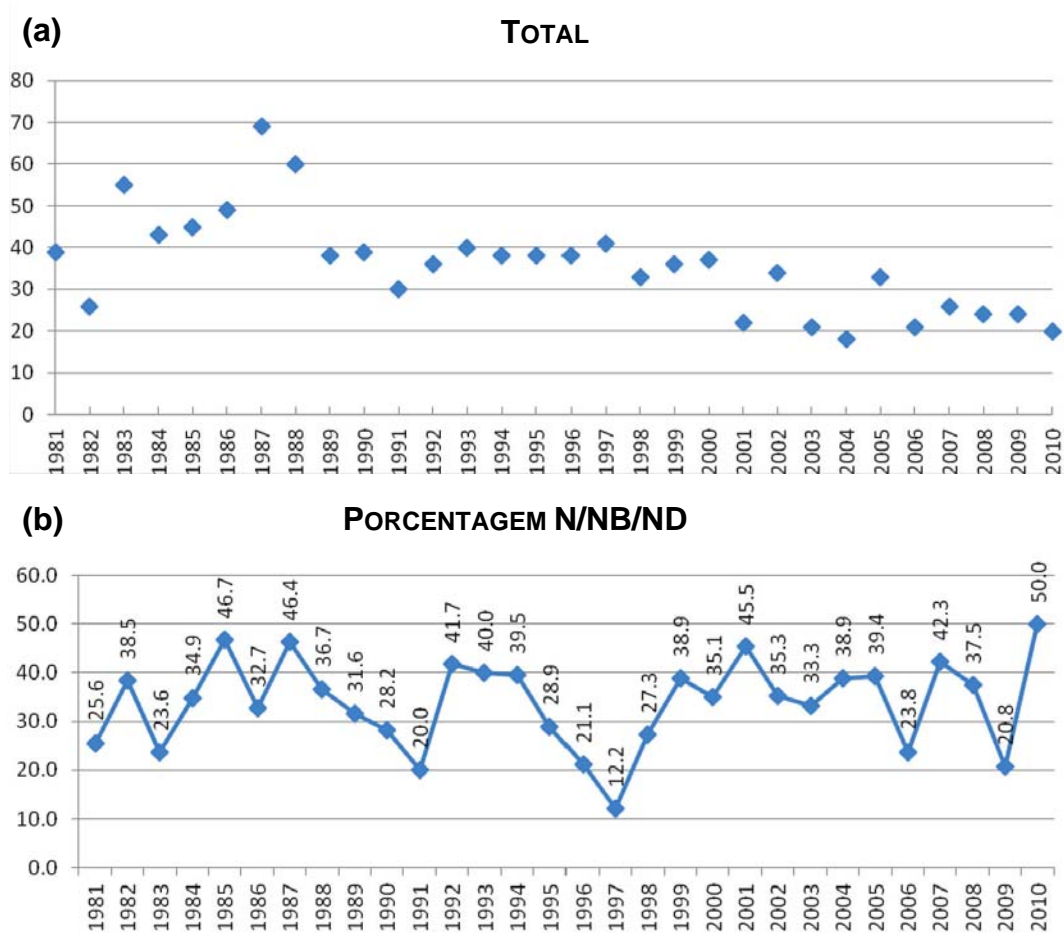


FIGURA 1.4: (a) Total de Novas Substâncias Ativas (NSAs). (b) Porcentagem de N/NB/ND aprovados por ano (período 1981 – 2010).

Fonte: (NEWMAN & CRAGG, 2012)

Muitas das atividades biológicas de uma planta estão relacionadas aos seus metabólitos constituintes, sendo eles primários e secundários. Os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos em seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas têm funções importantes na defesa e sinalização da planta, ou servem como pigmentos ou fragrâncias. Estes podem variar de espécie para espécie e compreendem um conjunto diversificado de estruturas químicas complexas (MARIENHAGEN & BOTT, 2013).

Considerando que a diversidade molecular está diretamente relacionada a cada espécie vegetal, as plantas podem ser consideradas fontes promissoras na busca de novos fármacos mais eficazes e específicos. Como o Brasil é um país com uma grande biodiversidade, e poucas das espécies foram estudadas, o fortalecimento da pesquisa em química de produtos naturais se torna inevitável (NIERO, *et al.*, 2003).

1.3- A Biodiversidade Brasileira

O Brasil é um país de proporção continental, ocupando quase a metade do território da América do Sul, o que equivale a 8,5 milhões km². Apresenta diferentes zonas climáticas, como: trópico úmido no Norte, semi-árido no Nordeste e áreas temperadas no Sul. Conseqüentemente, toda essa variação climática faz do Brasil um país com grandes variações ecológicas, formando distintos biomas (FIGURA 1.5), sendo eles: Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Pampas e Mata Atlântica. Além disso, o Brasil possui uma costa marinha de 3,5 milhões km², que inclui ecossistemas como recifes de corais, dunas, manguezais, lagoas, estuários e pântanos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

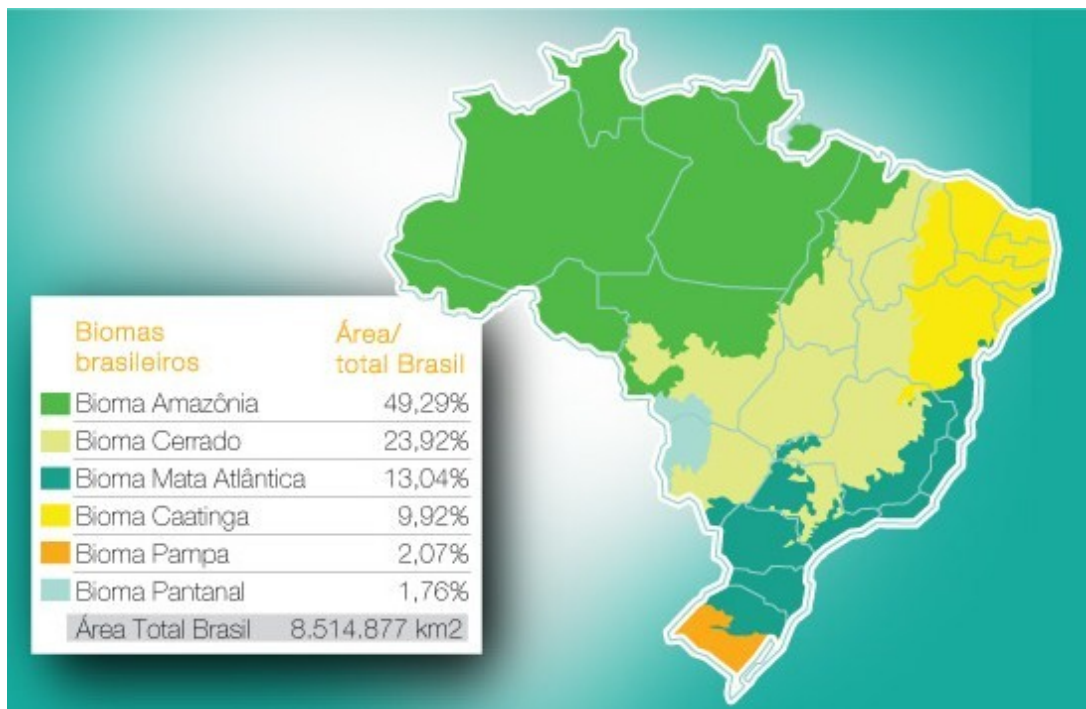


FIGURA 1.5: Representação geográfica dos biomas brasileiros.

(Fonte: <http://www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/geografia>)

Edu Lobo, Augusto Boal e Gianfrancesco Guarnieri, já traduziam nos versos da canção “*Embolada das dádivas da natureza*”, a grande riqueza em biodiversidade de nosso país (BERLINCK, 2012):

*De toda forma e qualidade tem
oi tem pindoba, embiriba e sapucaia
tem titara, catulé, ouricuri
tem sucupira, sapucais, putumujú
teu pau-de-santo, tem pau d'arco, tem tatajubá
sapucarana, canzenzé, maçaranduba
tem louro paraíba e tem pininga*

*Pare meu irmão
de falar em tanta mata
com tanta planta eu não sei o que fazer
mas diga lá se tem bicho pra comer
se tem bicho pra comer. se tem bicho pra comer
(...)*

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, traduzindo em aproximadamente 20% do número total de espécies da Terra (COSTA, *et al.*, 2012; OLIVEIRA, *et al.*, 2012). Isso se reflete na grande variedade de biomas, os quais possuem uma enorme riqueza de fauna e flora, apresentando muitas espécies endêmicas e diversas plantas de importância econômica mundial (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

1.3.1 - O bioma Cerrado

Representando o segundo maior bioma brasileiro (RIBEIRO, *et al.*, 2011), o Cerrado ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km² (SANTOS, *et al.*, 2012; BATALHA, *et al.*, 2011), cerca de 22% do território nacional. A sua área contínua abrange diversos estados brasileiros, como Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

Constituído por uma vegetação heterogênea, o Cerrado se divide em diferentes fisionomias, variando desde campos (formados por pastagens), ao típico cerrado *sensu stricto* (constituído por gramas, sub-bosque, árvores e arbustos com 8 a 10 metros de altura) e ao Cerradão (formação florestal com árvores de até 20 metros de altura) (ABREU, *et al.*, 2011; RIBEIRO, *et al.*, 2011).

Esse bioma é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, abrigando cerca de 12 mil espécies de plantas nativas já catalogadas e apresentando extrema abundância de espécies endêmicas (ABREU, *et al.*, 2011). Além dos aspectos ambientais, o Cerrado tem grande importância social, onde muitas comunidades locais sobrevivem de seus recursos naturais, especialmente utilizando espécies vegetais com finalidade medicinal para tratamento de várias doenças (ALBERNAZ, *et al.*, 2010).

Muitos de seus frutos são comestíveis, onde alguns são regularmente consumidos e comercializados nos centros urbanos, como os frutos do pequi (*Caryocar brasiliense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), bacupari (*Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do barú (*Dipteryx alata*) (FIGURA 1.6) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).



FIGURA 1.6: Alguns frutos do Cerrado que são comercializados.

(Google Images – <https://www.google.com.br/imghp?hl=en&tab=wi>)

Porém, devido a uma série de fatores, o Cerrado vem sofrendo excepcional perda de habitat, causando risco de extinção para inúmeras espécies de plantas e animais. Estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não ocorram em áreas protegidas. Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana, sendo alvo de desmatamentos, queimadas e exploração ilegal (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

Apesar do reconhecimento de sua importância biológica, esses fatores mencionados anteriormente listam o Cerrado como um *hotspot* de biodiversidade mundial (FIGURA 1.7), ou seja, um reservatório regional construído com a intenção de conservar as espécies endêmicas (AID-N, 2013). Apenas 2,9% de sua área encontram-se sobre status de proteção integral (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013), e 48,4% de sua área original já foi desmatada (IBGE, 2010).



FIGURA 1.7: Áreas consideradas *hotspots* mundiais.

(Fonte: <http://www.aid-n.com/common-definition-of-biodiversity-hotspot/>)

1.4 - Família Malpighiaceae e o Gênero *Byrsonima*

A família Malpighiaceae é considerada uma das predominantes na flora dos cerrados (SOUTO & OLIVEIRA, 2005), compreendendo 71 gêneros e 1.250 espécies, composta por árvores, arbustos e lianas (VALLILO, *et al.*, 2007) e que se distribuem em regiões tropicais e subtropicais. Diversas espécies dessa família são utilizadas pelas populações de vários países com fins medicinais (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011).

Como exemplo, as espécies do gênero *Banisteriopsis*, de ampla ocorrência na região amazônica, são bastante utilizadas em rituais indígenas devido aos efeitos alucinógenos e narcóticos causados pela presença de alcaloides carbolínicos (MENDES, *et al.*, 1999). Outras espécies muito utilizadas são aquelas pertencentes ao gênero *Malpighia*, as quais produzem frutos saborosos apreciados pela culinária brasileira, sendo altamente consumidos devido ao valor nutricional e riqueza em ácido ascórbico (Vitamina C) (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011).

A constituição química da família Malpighiaceae compreende metabólitos que variam entre alcaloides carbolínicos, bases indólicas simples, fenilpropanoides, flavonoides, triterpenos e polissacarídeos (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011).

O gênero *Byrsonima*, pertencente à família Malpighiaceae, é amplamente distribuído na América tropical (ORLANDI, *et al.*, 2011), sendo um dos maiores e também o mais estudado dentro da família, totalizando aproximadamente 150 espécies (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011). No Brasil, encontram-se cerca de 50% das espécies distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Central, e em áreas de cerrado da região Sudeste do Brasil (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011; MICHELIN, *et al.*, 2008).

As espécies do gênero são conhecidas popularmente como “muricis” e “fruta de jacu” (VALLILO, *et al.*, 2007), sendo diferenciadas pela cor de seus frutos e flores, ou pelo local de ocorrência. Assim, são conhecidos como “murici branco”, “murici amarelo”, “murici vermelho”, “murici da chapada”, “murici do brejo”, “murici da mata”, entre outros. Seus frutos são apreciados para o preparo de doces e bebidas e sua madeira é bastante utilizada na construção civil, sendo que já foi muito empregada no tingimento de tecidos por apresentar riqueza em taninos (SANNOMIYA, 2005).

Em diversas regiões do país espécies deste gênero possuem utilização popular como medicamento, o que levou a investigações que mostraram resultados positivos para ações contra micro-organismos, bactérias, protozoários e fungos implicados na etiologia de doenças gastrointestinais e de pele (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011; MICHELIN, *et al.*, 2008; SANNOMIYA, *et al.*, 2007; SANNOMIYA, *et al.*, 2005). Há relatos de outras atividades biológicas como antiespasmogênica, imunoestimuladora, antiinflamatória, anti-hemorrágica, antiglicemiante, anti-hiperlipidêmica, antidiarreica e antioxidante (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011; MICHELIN, *et al.*, 2008).

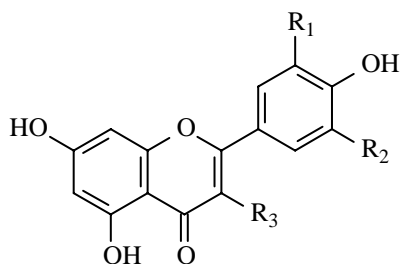
A investigação química de espécies pertencentes a este gênero resultou no isolamento de esteroides, triterpenos, sulfonoglicolipídios (MICHELIN, *et al.*, 2008; SANNOMIYA, *et al.*, 2007), flavonoides, destacando seus heterosídeos, flavanonas, biflavonoides, catequinas, epicatequinas, proantocianidinas, além de derivados do ácido gálico e ácido quínico, e aminoácidos (SIMPLICIO & PEREIRA, 2011). O artigo de revisão de *Simplicio e Pereira* (2011), mostra um panorama das substâncias isoladas em espécies do gênero *Byrsonima* (TABELA 1.1 – FIGURAS 1.8, 1.9 e 1.10).

TABELA 1.1: Substâncias isoladas em espécies do gênero *Byrsonima*.

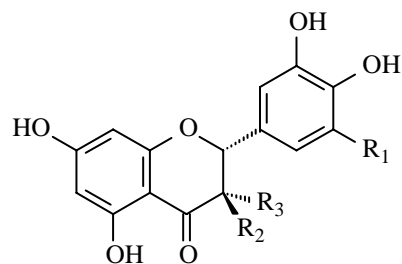
Espécie	Substâncias isoladas
<i>B. coccolobifolia</i> *	quercetina (12) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranosídeo (13) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β - <i>D</i> -galactopiranosídeo (14) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , kaempferol (16) , kaempferol-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ramnopiranosídeo (17) , (+)-catequina (18) , (-)-epicatequina (19) , ácido gálico (20) , galato de metila (21) , 2,7-diidroxixantona (22) .
<i>B. basibola</i>	quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , (+)-catequina (18) .
<i>B. crassa</i>	quercetina (12) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , (+)-catequina (18) , galato de (-)-epigalocatequina (23) , friedelina (24) , ácido 3- <i>O</i> -galoil-quínico (25) , ácido 3,4- <i>O</i> -digaloil-quínico (26) , ácido 1,3,4,5- <i>O</i> -tetragaloil-quínico (27) .
<i>B. crassifolia</i>	quercetina (12) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , (+)-catequina (18) , 3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina (28) , (+)-epicatequina-[4 α \rightarrow 8]-(+)-epicatequina (29) , 3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina-[4 α \rightarrow 8]-3- <i>O</i> -galoil-(+)-epicatequina-[4 α \rightarrow 8]-(+)-epicatequina (30) , (+)-epicatequina-[4 α \rightarrow 6]-(+)-epicatequina (31) , ursanaldeído (32) , ácido 2- α -hidroxi-oleanólico (33) , 2- β -hidroxi-lupeol (34) , betulina (35) , β -sitosterol (36) , 1,2-di- <i>O</i> -tetradecanoil-3- <i>O</i> -(6-sulfo- α - <i>D</i> -quinovopiranosil)-glicerol (37) , 1,2-di- <i>O</i> -(8-hexadecenoil)-3- <i>O</i> -(β - <i>D</i> -glicopiranosil)-glicerol (38) .
<i>B. intermedia</i>	quercetina (12) , quercetina-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , ácido gálico (20) , amentoflavona (39) , 1,2-benzenodiol (catecol, pirocatecol, pirocatequina) (40) , ácido (3 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,7-diacetoxi-docosanoico (ácido birsônico) (41) .

<i>B. verbascifolia</i>	quercetina (12) , quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) (15) , friedelina (24) , β -sitosterol (36) , ácido ursólico (42) , ácido 3-O-acetil-oleanólico (43) .
<i>B. microphylla</i>	quercetina (12) , betulina (35) , (2S,3S)-3'-hidroxi-5,7,4'-trimetoxi-flavan-3-ol (44) , Δ^1 -lupenona (45) , estearato de 24-hidroxi-urs-12-enila (46) , estearato de 24-hidroxi-olean-12-enila (47) , ácido 3 β ,2 α -di-hidroxi-urs-12-en-28-oico (48) , 3,7-di-hidroxi-2-metoxi-8,8,10-trimetil-7,8-di-hidro-6H-antraceno-1,4,5-triona (49) , 3-hidroxi-2-metoxi-8,8,10-trimetil-8H-antraceno-1,4,5-triona (50) , (2S*,10 α R*)-2,8-di-hidroxi-6-metoxi-1,1,7-trimetil-2,3,10,10 α -tetra-hidro-1-H-fenatreno-9-ona (51) .
<i>B. variabilis</i>	3-O- β -D-glucopiranosil-3',4',5,7 – tetra-hidroxiflavanona (52) , 3',4',5,7-tetra-hidroxiflavanona (53) .
<i>B. fagifolia</i>	ácido gálico (20) , ácido 3-O-galoil-quínico (25) , ácido 3,4-O-digaloil-quínico (26) , ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico (27) , dotriacontano (54) .
<i>B. bucidaefolia</i>	<i>m</i> -trigalato de metila (55) .

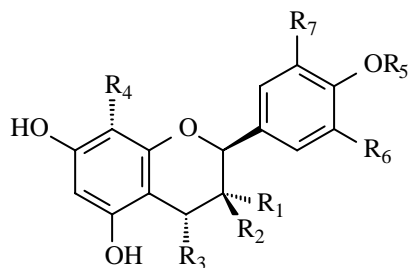
*LORENZI, *et al.*, 2006; LORENZI, *et al.*, 2007.



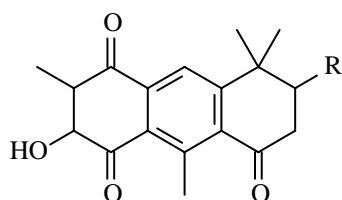
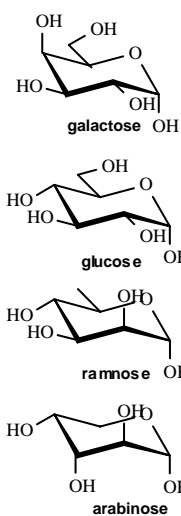
- 12: R₁ = R₃ = OH; R₂ = H
 13: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = *O*- α -L-Ramp
 14: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = *O*- α -L-Ramp[1 \rightarrow 6] β -D-Galp
 15: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = *O*- α -L-Arap
 16: R₁ = R₂ = H; R₃ = OH
 17: R₁ = R₂ = H; R₃ = *O*- α -L-Ramp
 52: R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = *O*- β -D-Glup



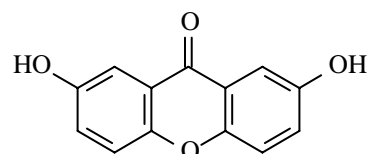
- 18: R₁ = H; R₂ = H; R₃ = OH
 19: R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = H
 23: R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = *O*-galoil



- 28: R₁ = R₃ = R₄ = R₆ = H; R₂ = *O*-galoil; R₅ = H; R₇ = OH
 29: R₁ = R₃ = R₆ = H; R₂ = R₇ = OH; R₄ = (+)-epicatequina; R₅ = H
 30: R₁ = R₆ = R₅ = H; R₂ = *O*-galoil; R₃ = (+)-epicatequina; R₄ = 3-*O*-galoil-(+)-epicatequina; R₇ = OH
 31: R₁ = R₄ = R₆ = H; R₂ = R₇ = OH; R₃ = (+)-epicatequina; R₅ = H
 44: R₁ = R₄ = R₆ = H; R₂ = R₇ = OH; R₃ = H; R₅ = CH₃
 53: R₁ = R₄ = R₅ = R₇ = H; R₂ = R₆ = OH; R₃ = =O

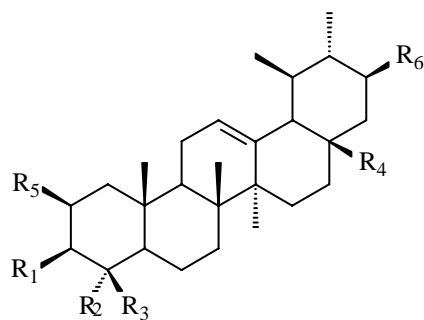


- 49: R = OH
 50: R = H



22

FIGURA 1.8: Flavonoides e outros compostos isolados do gênero *Byrsonima*.

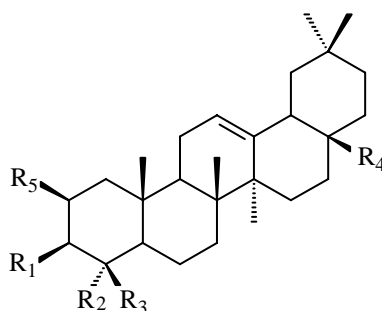


32: R₁ = OH; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = COH; R₅ = R₆ = H

42: R₁ = OH; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = COOH; R₅ = R₆ = H

47: R₁ = OCO(CH₂)₁₈CH₃; R₂ = R₄ = CH₃; R₃ = CH₂OH; R₅ = R₆ = H

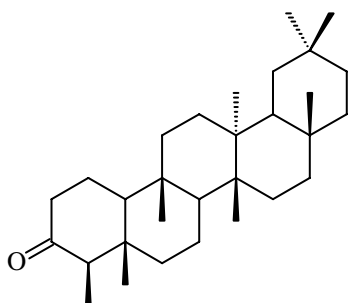
48: R₁ = R₆ = OH; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = COOH; R₅ = H



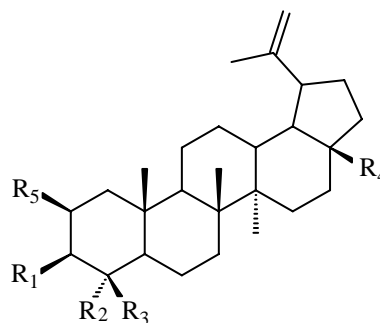
33: R₁ = R₅ = OH; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = COOH

43: R₁ = OCOCH₃; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = COOH; R₅ = H

46: R₁ = OCO(CH₂)₁₆CH₃; R₂ = R₄ = CH₃; R₃ = CH₂OH; R₅ = H

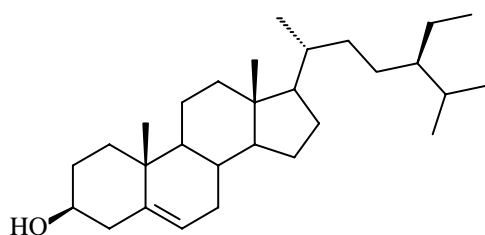


24

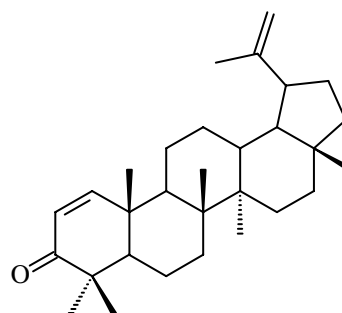


34: R₁ = R₅ = OH; R₂ = R₃ = R₄ = CH₃

35: R₁ = OH; R₂ = R₃ = CH₃; R₄ = CH₂OH; R₅ = H

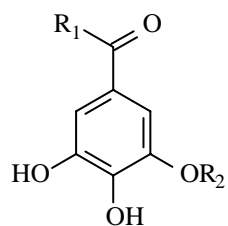


36

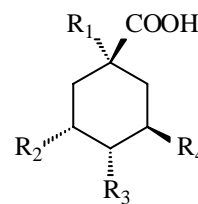


45

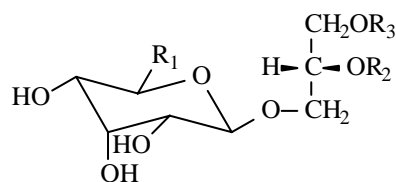
FIGURA 1.9: Terpenoides e esteroide isolados do gênero *Byrsonima*.



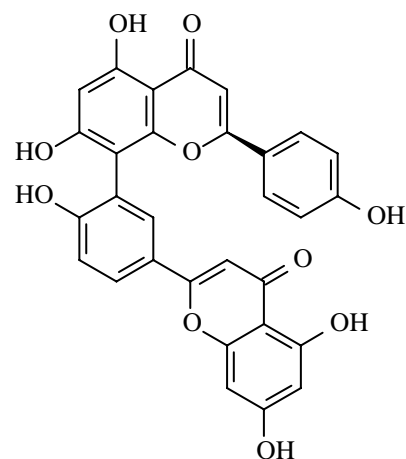
20: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$
21: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$



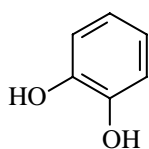
25: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{O-galoil}$
26: $R_1 = R_2 = \text{OH}$; $R_3 = R_4 = \text{O-galoil}$
27: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{O-galoil}$



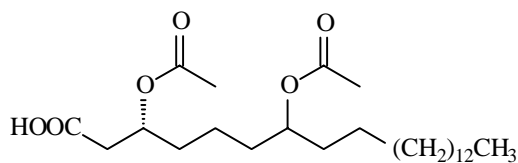
37: $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $R_2 = R_3 = (\text{CH}_2)_{14}\text{OH}$
38: $R_1 = \text{CH}_2\text{SO}_2\text{OH}$; $R_2 = R_3 = (\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{OH}$



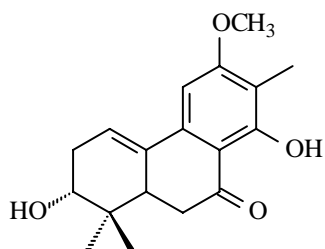
39



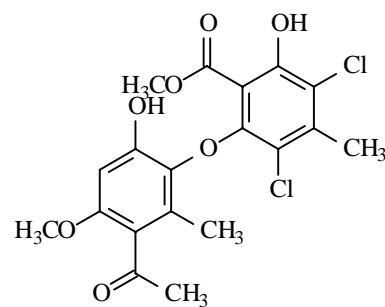
40



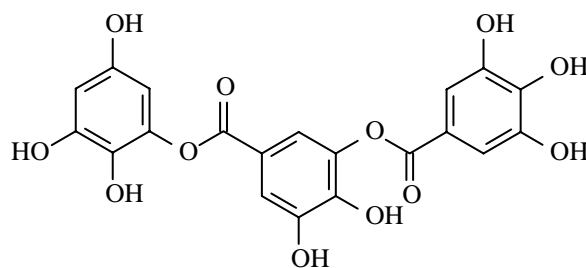
41



51



54



55

FIGURA 1.10: Derivados do ácido gálico e ácido quínico, e outras substâncias isoladas do gênero *Byrsonima*.

A espécie *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (FIGURA 1.11) ocorre frequentemente em áreas de vegetação aberta da América do Sul, havendo registros de sua ocorrência na Bolívia, Venezuela, República Cooperativa da Guiana e em diversas regiões do Brasil (BENEZAR & PESSONI, 2006; MAMEDE, 2013).



FIGURA 1.11: Folhas, flores e frutos da espécie *B. coccolobifolia*.

(Fonte: <http://foter.com/f/photo/8187283469/fb11566126/> e <http://frutosatrativosdocerrado.bio.br/especies/Byrsonima%20coccolobifolia.html>)

Existem relatos de que o extrato das folhas de *B. coccolobifolia* apresenta atividades biológicas como antibacteriana frente à *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e atividade moluscicida frente à *Biomphalaria glabrata* (ALVES, *et al.*, 2000). Há também registros de seu uso no tratamento de diarreia. Do ponto de vista químico, são encontrados nessa espécie, metabólitos da classe dos flavonoides, terpenoides, cumarinas, saponinas e taninos (TABELA 1.1) (CECÍLIO, *et al.*, 2012).

1.5 - Família Myrtaceae e o Gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais (STEFANELLO, *et al.*, 2011), sendo divididas em duas subfamílias: Myrtoidea, de ampla ocorrência na América tropical, que inclui gêneros como *Myrtus* (murta), *Psidium* (goiaba), *Pimenta* (malagueta), *Eugenia* (cagaita, jambo), *Pseudocaryophyllus*, *Campomanesia* (guabiroba), *Syzygium* (cravo-da-Índia), entre outros; e Leptospermoideae, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia, abrangendo gêneros como *Eucalyptus*

(eucalipto), *Leptospermum* (urze-de-jardim) e *Melaleuca* (mirto-de-mel), (VIEIRA, *et al.*, 2004; VALLILO, *et al.*, 2006).

Essa família possui cerca de 140 gêneros e aproximadamente 6 mil espécies (LAGO, *et al.*, 2011; BIFFIN, *et al.*, 2010), sendo que cerca de mil espécies podem ser encontradas no Brasil (GILIOLI, 2010). É uma das mais importantes famílias, produzindo frutos com aromas agradáveis e sabores raros, como exemplos goiaba, araçá, guabiroba, pitanga e jabuticaba.

Vários membros dessa família são utilizados na medicina popular no tratamento de diarreia e outras desordens intestinais (STEFANELLO, *et al.*, 2011), infecções estomacais e na garganta (ISHIKAWA, *et al.*, 2008), e diabetes (HU, *et al.*, 2012). Há relatos de outras atividades como antimicrobiana, antioxidante, antirreumática e anti-inflamatória. Quanto à composição química descreve-se a presença de terpenoides, flavonoides, taninos, derivados fenólicos e óleos essenciais (LAGO, *et al.*, 2011).

O gênero *Eugenia*, um dos mais importantes da família Myrtaceae, abrange cerca de 500 espécies, das quais 400 encontram-se distribuídas pelo Brasil (OLIVEIRA, *et al.*, 2005). Está difundido pela América do Sul e Central, desempenhando importantes papéis ecológicos em florestas tropicais. (NAKAMURA, *et al.*, 2010). É um gênero rico em óleos essenciais, os quais apresentam diversas atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e citotóxica. Os óleos apresentam majoritariamente compostos das classes dos sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanoides (LAGO, *et al.*, 2011).

No geral, as espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade hipoglicemiante, anti-hiperlipidêmica (QI, *et al.*, 2010; SHARMA, *et al.*, 2006; PEPATO, *et al.*, 2005), antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antifúngica. São utilizadas no tratamento de úlcera (SINGH, *et al.*, 2012), artrite (COLLA, *et al.*, 2012) e reumatismo (KALA, *et al.*, 2012). Algumas espécies também são empregadas no tratamento dentário como antisséptico e analgésico, onde o óleo é aplicado sobre a gengiva para tratar dores de dentes (HALDER, *et al.*, 2012).

Menos de 10 % das espécies desse gênero foram estudadas quimicamente e biologicamente (GILIOLI, *et al.*, 2010), sendo que os compostos que mais se destacam nas espécies são flavonoides, terpenoides,

ácidos fenólicos e elagiotaninos (REYNERTSON, *et al.*, 2008). A TABELA 1.2 e as FIGURA 1.12, 1.13 e 1.14 mostram algumas substâncias isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

TABELA 1.2: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Eugenia*.

Espécie	Substâncias isoladas	Referências
<i>E. axillaris</i>		
<i>E. choapamensis</i>	miricetina (56), quercetina (57), kaempferol (58), isoramnetina (59).	HARON, <i>et al.</i> , 1992
<i>E. papillosa</i>		
<i>E. uniflora</i>		
	ramnetina (60), eugenina (61), eugenitina (62), isobiflorina (63), biflorina (64),	SINGH, <i>et al.</i> , 2012
<i>E. caryophyllata</i>	ácido oleanólico (65), ácido ursólico (66), stigmasterol (67), campesterol (68), ácido betulínico (69), ácido galotânico (70).	AISHA, <i>et al.</i> , 2012 ZHANG & CHEN, 1997
<i>E. brasiliensis</i>	kaempferol (58), cianidina 3-glucosideo (71), delphinidina 3-glucosideo (72).	REYNERTSON, <i>et al.</i> , 2008
		SHODH GANGA, 2013
<i>E. jambos</i>	miricetina (56), mearnsetina (73), mearnsitrina (74), miricitrina (75), quercetina-3-O- β -D-xilopiranosil (76), miricetina-3-O- β -D-xilopiranosil (77), ácido gálico (78), 1-O-galoil castalagina (79), casuarinina (80), rutina (81), ácido cinâmico (82).	YANG <i>et al.</i> , 2000 GILIOLI, 2010 REYNERTSON, <i>et al.</i> , 2008
<i>E. jambolana</i>	miricetina (56), quercetina (57), kaempferol (58), miricitrina (75), ácido oleanólico (65), ácido gálico (78), antocianina (83), petunidina (84), malvidina (85), delphinidina (86), β -amirina (87), ácido cafeico (88), ácido ferúlico (89), ácido elágico (90).	BALIGA, <i>et al.</i> , 2011
<i>E. aquea</i>	cianidina-3-glucosideo (72), miricitrina (75), europetin-3-O- α -L-ramnosideo (91), 4-hidroxibenzaldeido (92), floretina (93), mirigalona-G (94), mirigalona-B (95).	MANAHARAN, <i>et al.</i> , 2013 LOWRY, 1976

<i>E. sandwicensis</i>	ácido betulínico (69) , ácido 3 β - <i>cis-p</i> -cumaroiloxi-2 α ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico (96) , ácido 3 β - <i>trans-p</i> -coumaroiloxi-2 α ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico (97) , ácido 23- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-2 α ,3 β -diidroxiolean-12-en-28-óico (98) , hederagenina (99) , ácido maslínico (100) , ácido alfitólico (101) , ácido 2 α ,3 α -diidroxilup-20(29)-en-28-óico (102) , ácido 3 β ,23-diidroxilup-20(29)-en-28-óico (103) , β -sitosteril 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosídeo (104) .	GU <i>et al.</i> , 2001
<i>E. umbelliflora</i>	ácido betulínico (69) , cianidina-3-glucosídeo (71) , delfinidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (72) , beta-amirina (87) , petunidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (105) , pelargonidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (106) , peonidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (107) , malvidina-3- <i>O</i> - β -glucopiranosídeo (108) , alfa-amirina (109) , betulina (110) , taraxerol (111) .	KUSKOSKI <i>et al.</i> , 2003 GILIOLI, 2010
<i>E. malaccensis</i>	cianidina 3-glucosídeo (71) , mearnsetina (73) , mearnsitrina (74) , miricitrina (75) , ácido gálico (78) , ácido elágico (90) , malvidina-3,5-diglucosídeo (112) , quercitrina (quercetina 3-ramnosídeo) (113) , (+)-catequina (114) , ácido 3-acetil ursólico (115) , ácido 3- <i>O</i> -metilelagico (116) , ácido 3,3'- <i>O</i> -dimetilelagico (117) .	OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2006 NAIR, <i>et al.</i> , 1999 NOREEN, <i>et al.</i> , 1998 LOWRY, <i>et al.</i> , 1976 LOWRY, 1968 REYNERTSON, <i>et al.</i> , 2008

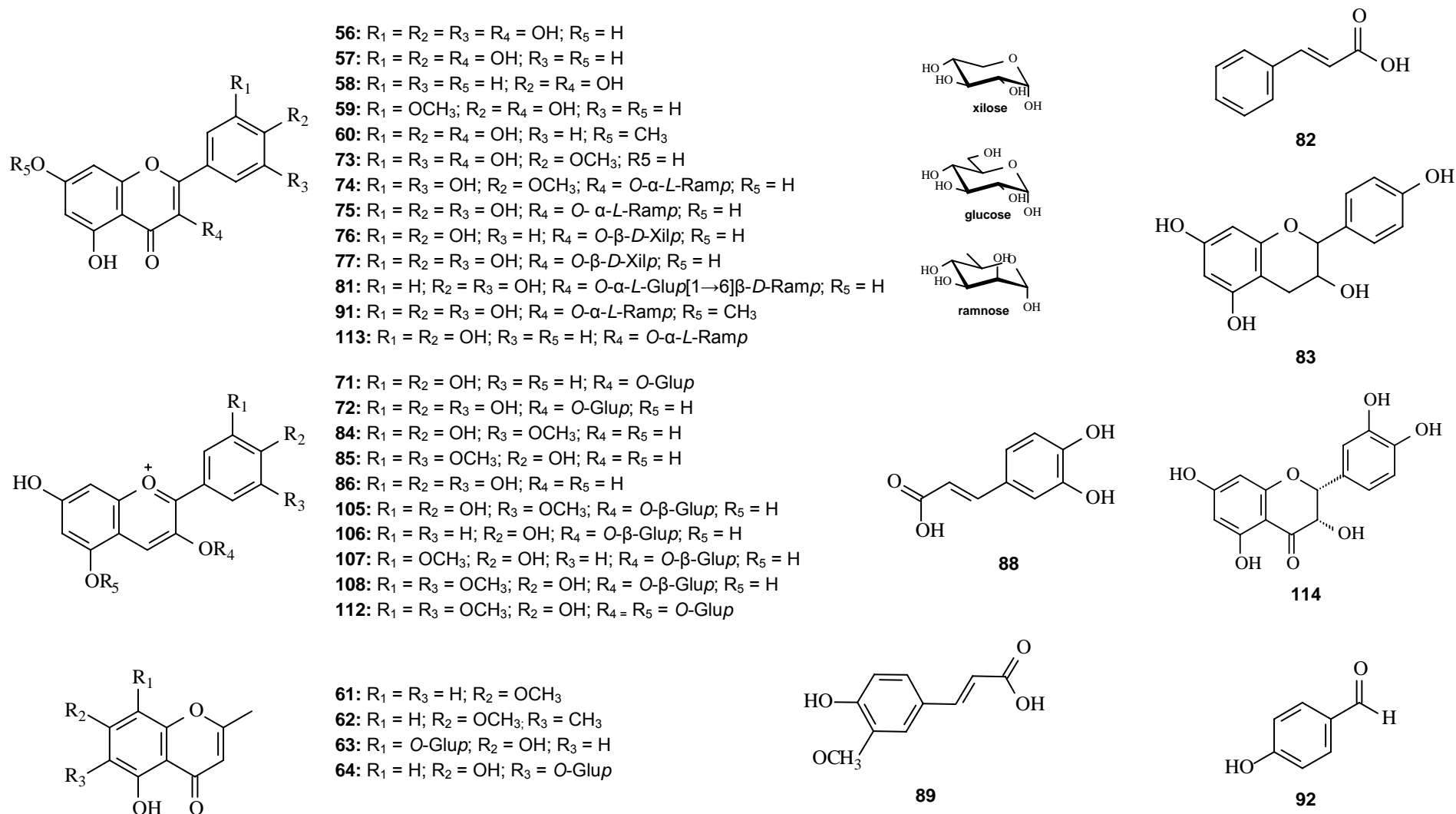


FIGURA 1.12: Flavonoides, cromonas e derivados aromáticos isolados em espécies do gênero *Eugenia*.

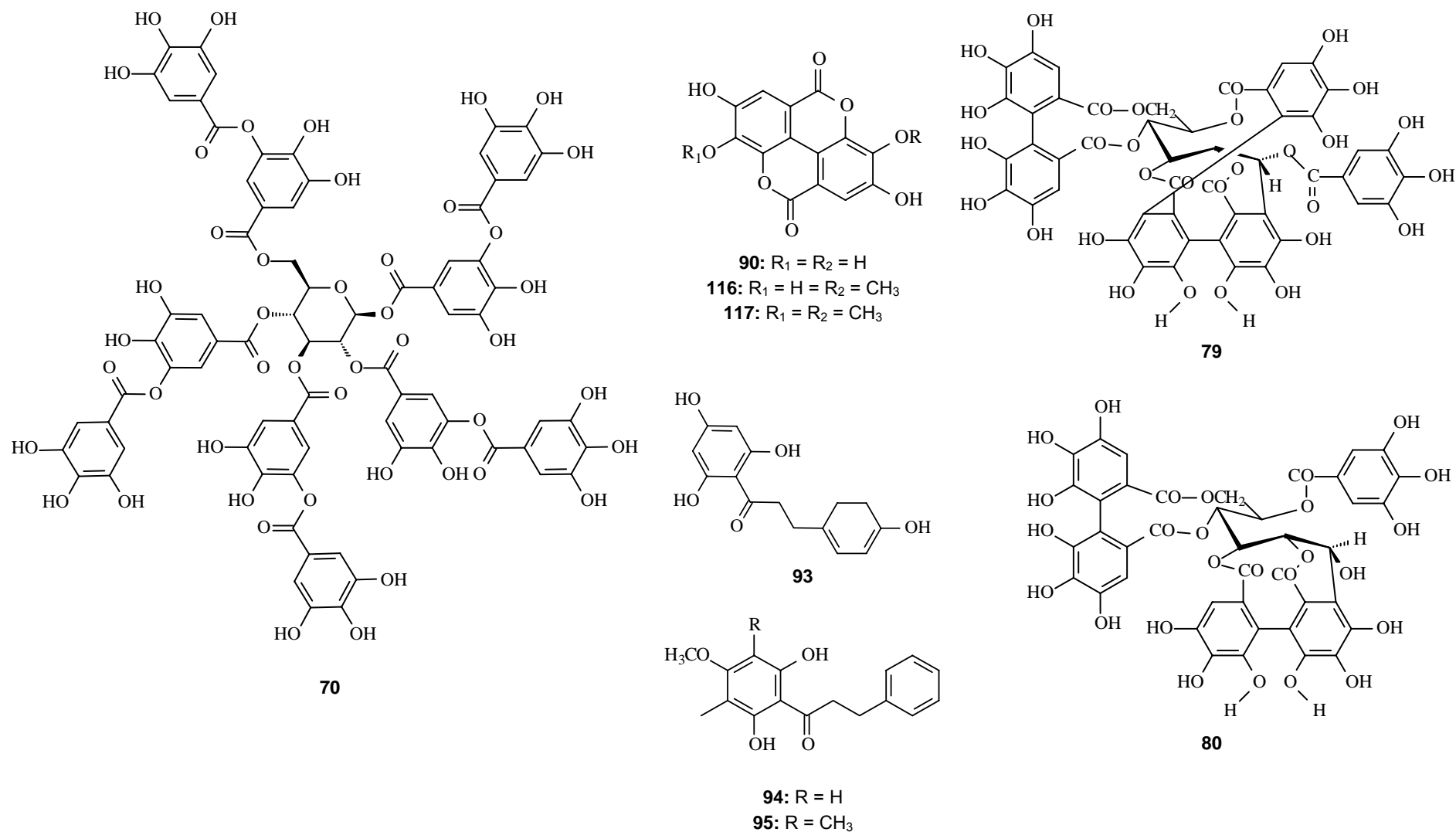


FIGURA 1.13: Taninos e outros derivados aromáticos isolados em espécies do gênero *Eugenia*.

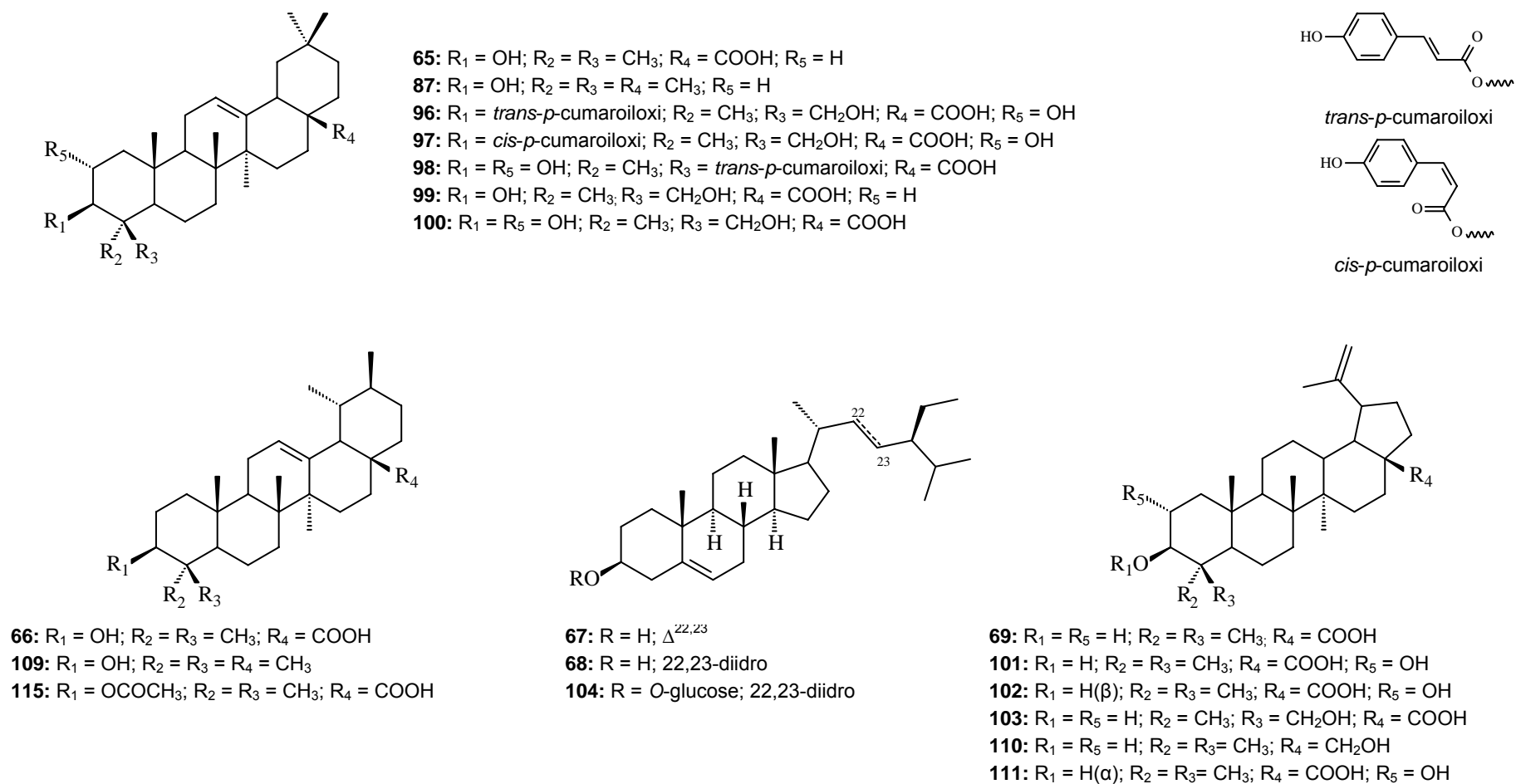


FIGURA 1.14: Terpenoides e esteroides isolados em espécies do gênero *Eugenia*.

Eugenia malaccensis L. (Myrtaceae) é uma espécie de origem sudeste asiática e apresenta diversas sinonímias (LORENZI, 2003), sendo a mais utilizada: *Syzygium malaccense* Merr. & Perry (TABELA 1.3 - FIGURA 1.15). É conhecida popularmente no Brasil como “jambo vermelho”, “jambo encarnado”, “jambroche(a)”, “joão brocha(e)”.



FIGURA 1.15: Árvore, flores e frutos da espécie *E. malaccensis*.

(Fonte: <http://dokmaidogma.wordpress.com/2012/03/13/march-is-the-apple-season/> e <http://floraofsingapore.wordpress.com/category/class-magnoliopsida/superorder-rosanae/order-myrtales/family-myrtaceae/page/2/>)

TABELA 1.3: Relação de sinonímias para a espécie *E. malaccensis*.

Espécie	Sinonímias
<i>Eugenia malaccensis</i> L.	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L. M. Perry <i>Eugenia macropylla</i> Lam. <i>Eugenia purpurea</i> Wight. <i>Jambos malaccensis</i> (L.) DC. <i>Jambosa malaccensis</i> (L.) DC. <i>Jambosa domestica</i> Rumph. <i>Jambosa macrophylla</i> Mayc. <i>Jambosa nigra</i> Rumph. <i>Jambosa purpurascens</i> DC. <i>Myrtus malaccensis</i> Spreng <i>Caryophyllus malaccensis</i> Stokes

Esta espécie é utilizada como planta medicinal, principalmente por populações carentes em diversos países (BRUSTEIN, *et al.*, 2012), sendo suas folhas utilizadas na como adstringentes, estimulantes do apetite, diuréticos e no combate a anemias (BUENZ, *et al.*, 2005; BOURDY, *et al.*, 1992). Diversas partes da espécie *E. malaccensis* são empregadas no tratamento de processos inflamatórios, febre, coceira, diabetes, catarro no

pulmão, dores de cabeça, diurético (OLIVEIRA, *et al.*, 2006), disenteria (ROOSITA, *et al.*, 2008), hipoglicemiante (CETTO, *et al.*, 2008), tosse (OLIVEIRA, *et al.*, 2006; WARURURAI, *et al.*, 2011; PRESCOTT, *et al.*, 2012), dor de garganta, furúnculos, feridas, úlceras de pele e infecções da boca e garganta (DUNSTAN, *et al.*, 1997), doenças venéreas, tuberculose, doenças do aparelho digestivo (LOCHER, *et al.*, 1995), banho em bebês como forma de imunidade (RUYSSCHAERT, *et al.*, 2009), ciguatera (BRADACS, *et al.*, 2011; BOURDY, *et al.*, 1992), doença respiratória (ABBOTT, *et al.*, 1985) e contra o vírus HIV-1 (LOCHER, *et al.*, 1996).

Estudos químicos de *E. malaccensis* relatam o isolamento terpenoides, flavonoides, derivados do ácido gálico, ácido elágico, dentre outros (TABELA 1.2, FIGURAS 1.12, 1.13 e 1.14) (OLIVEIRA, *et al.*, 2006; NAIR, *et al.*, 1999; NOREEN, *et al.*, 1998; LOWRY, *et al.*, 1976; LOWRY, 1968).

1.6 - Enzimas como Alvos Terapêuticos

Com os grandes avanços tecnológicos e científicos em cultura de células, técnicas de extração e identificação estrutural, processos de triagem, genética, bioquímica de proteínas, biologia estrutural e química sintética, há uma convergência para se criar um futuro promissor entre química e o desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta de novos agentes terapêuticos inicia-se pela busca de uma molécula que apresente uma propriedade biológica: composto bioativo. O uso de receptores específicos como enzimas alvo, através de ensaios bioquímicos, representa uma ótima estratégia na identificação de substâncias bioativas, como inibidores enzimáticos (ROUHI, 2003).

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, devido principalmente ao seu papel essencial em inúmeras vias bioquímicas associadas a desordens e doenças em humanos. Outros atrativos são a sua fácil obtenção, adequação para ensaios biológicos e versatilidade na elaboração de coleções dirigida de compostos (COPELAND, 2005).

Completado o genoma humano, 11 catepsinas foram descritas e estão relativamente bem caracterizadas: B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W (TURK, *et al.*, 2012). Além da função normal de degradar aleatoriamente proteínas dentro do lisossomo, estas enzimas estão envolvidas em processos seletivamente controlados e foram associadas a diferentes processos patológicos, despertando grande interesse das indústrias farmacêuticas (KUESTER *et al.*, 2008; COLBERT, *et al.*, 2009). Ficou demonstrado que muitas destas enzimas não são estritamente encontradas nos lisossomos, podendo acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados levando a processos patológicos como, progressão de tumores malignos (SLOANE *et al.*, 1994; KOS & LAH, 1998; REPNIK, *et al.*, 2012; KIM, *et al.*, 2013), distrofia muscular (KOMINAMI *et al.*, 1997), doença de Alzheimer (CATALDO & NIXON, 1990), osteoporose (YASUDA *et al.*, 2005), processos inflamatórios, como periodontia, aterosclerose, artrite reumatóide, pancreatite e gastrite (KUESTER *et al.*, 2008; NOVINEC, *et al.*, 2012).

As catepsinas K e V apresentam uma potente atividade elastolítica (YASUDA *et al.*, 2004) estando associadas a formação de placas ateroscleróticas (SEVERINO, *et al.*, 2011; QIN, *et al.*, 2011; LAFARGE, *et al.*, 2010; LUTGENS *et al.*, 2007). Em articulações com artrite reumatoide é observado na maioria das células epiteliais e nos fibroblastos sinoviais uma alta expressão de catepsina K (TURK, *et al.*, 2012). Por apresentar uma função específica na reabsorção óssea, foi demonstrado que a deficiência da catepsina K leva a picnodisostose, uma displasia óssea caracterizada pelo endurecimento e fragilidade dos ossos (BRIX, *et al.*, 2008; LUTGENS *et al.*, 2007; GELB *et al.*, 1996). Outros estudos revelaram aumento da expressão da catepsina L em diferentes tipos de câncer humano, incluindo melanoma e carcinomas de pulmão, cólon, próstata e mama (KUESTER, *et al.*, 2008). Estudos *in vivo* sugerem que devido à catepsina L estar ligada a manutenção do sistema nervoso central, sua distribuição anormal e autofagia, podem ser responsáveis pela ativação de uma cascata de eventos patógenos levando assim ao desenvolvimento da doença de Parkinson (LI, *et al.*, 2011).

Assim, diante do importante papel desempenhado por essas enzimas, as catepsinas K, V e L foram selecionadas como alvo biológico para a possível identificação de inibidores isolados de plantas.

2 - OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo o estudo químico de alguns extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae) e *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae), visando à avaliação biológica das espécies estudadas frente à catepsinas. Como objetivos específicos:

- Realizar o estudo químico dos extratos etanólicos de *B. coccolobifolia* (raízes) e *E. malaccensis* (folhas);
- Isolar e identificar metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais;
- Avaliar o potencial de inibição enzimática dos extratos etanólicos e partições de *E. malaccensis* e *B. coccolobifolia* frente as catepsinas K, V e L;
- Avaliar alguns dos metabólitos isolados frente às catepsinas K, V e L.

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais

3.1.1 - Solventes

- **Grau PA:** hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, de diversas marcas;
- **Grau HPLC:** metanol e acetonitrila, marcas Panreac, Tedia J.T.Baker;
- **Deuterados:** clorofórmio, metanol e acetona, marcas Sigma Aldrich e Merck.

3.1.2 - Suporte para cromatografia

- **Cromatografia em Coluna (CC):** *Sephadex* LH-20, marca Sigma e sílica gel (70-230 *mesh* e 230-400 *mesh*, denominadas respectivamente sílica comum e sílica *flash*), marca Macherey-Nagel.
- **Cromatografia em camada delgada (CCD):** sílica gel com F245, $\varphi = 0,2$ mm em folhas de alumínio (20 x 20 cm), das marcas Whatman e Fluka.

3.1.3 - Reveladores empregados

- Solução de vanilina em ácido sulfúrico preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvidas em solução contendo 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ (concentrado);
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm.

3.2 - Equipamentos

3.2.1 - Evaporador Rotativo

- Marca IKA, modelo RV 05 Basic, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de vácuo da marca Vacuubrand, modelo ME-1C.

3.2.2 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

- **Sistema Analítico:** Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), equipado com coluna LUNA C-18 (100 Å e 10 µm – 150 x 4,6 mm), injetor manual e software *EZChrom Edition*.
- **Sistema Preparativo/Semi-Preparativo:** Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba preparativa com extensão gradiente, com detector de múltiplos comprimentos de onda (MWD), equipado com coluna LUNA C-18 (100 Å e 10 µm – 250 x 7,0 mm), injetor manual e software *Chem Station*.

3.2.3 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

- **Bruker, DRX 400:** Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos – SP.
- **Bruker, Avance III 500:** Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

3.2.4 - Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas

- Agilent, modelo 7820 A – Series MSD 5975, equipado com coluna HP-5 MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm) e ionização por impacto eletrônico (70 eV).

3.3 - Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais

A espécie *B. coccolobifolia* foi coletada no Cerrado do centro-oeste brasileiro, na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA – Gama/DF) no dia 14 de dezembro de 2010. A espécie *E. malaccensis* foi coletada nas dependências da Universidade Federal de Goiás, *Campus Catalão* (UFG/CAC), no município de Catalão – GO (S18°09'14.5"; W47°55'47.4"), em 20 de novembro de 2011. Os dados de localização e as coordenadas do GPS foram armazenados para coletas futuras. Esta parte do trabalho foi auxiliada pelo Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro, do Departamento de Ciências Biológicas – UFG/CAC, o qual realizou a identificação e a catalogação das espécies. A exsicata de *B. coccolobifolia* foi depositada no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), sob o número BW 6029 e *E. malaccensis* no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, sob o número 47918.

3.4 - Preparação dos extratos vegetais e partições

As diversas partes dos vegetais (raiz, folha, caule e flor) foram secas em estufa de circulação a 40 °C por 4 dias, posteriormente trituradas em moinho e submetidas separadamente à percolação com etanol, durante três dias. Passados os três dias, o material foi filtrado e novamente percolado com etanol por mais três dias. Esse processo foi repetido três vezes. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo de baixa pressão obtendo-se o extrato etanólico bruto de cada parte do vegetal. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos estão descritas na TABELA 3.1.

Depois de preparados, cada extrato vegetal foi solubilizado em MeOH/H₂O (3:7) e submetido a extração líquido-líquido com hexano e acetato de etila, repetindo o processo por três vezes. Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo de baixa pressão, obtendo-se as partições em hexano, acetato de etila e hidroalcóolica. A TABELA 3.2 mostra as massas de cada partição para os diferentes extratos.

TABELA 3.1: Massa do material vegetal seco e dos extratos obtidos.

Espécie	Parte vegetal	Código do extrato	Massa material seco (g)	Massa extrato bruto (g)	Rendimento (%)
<i>B. coccolobifolia</i>	Raiz	BCR	650	65	10
	Caule	BCC	950	88	9
	Folhas	BCF	1.600	215	13
<i>E. malaccensis</i>	Folhas	EMF	2.000	282	14
	Flores	EML	2.200	68	3
	Caule	EMC	1.400	50	4

TABELA 3.2: Massa obtida para as partições dos diferentes extratos.

Espécie	Parte vegetal	Partição	Código	Massa partição (g)
<i>B. coccolobifolia</i>	Raiz	Hex	BCRH	2,45
		AcEOt	BCRA	24,10
		MeOH/H ₂ O	BCRW	congelado*
	Caule	Hex	BCCH	4,0*
		AcOEt	BCCA	5,8*
		MeOH/H ₂ O	BCCW	congelado*
	Folhas	Hex	BCFH	3,7*
		AcOEt	BCFA	6,2*
		MeOH/H ₂ O	BCFW	congelado*
<i>E. malaccensis</i>	Folhas	Hex	EMFH	43,00
		AcEOt	EMFA	100,25
		MeOH/H ₂ O	EMFW	congelado*
	Flores	Hex	EMLH	2,30
		AcEOt	EMLA	11,80
		MeOH/H ₂ O	EMLW	congelado*
	Caule	Hex	EMCH	6,50*
		AcEOt	EMCA	7,95*
		MeOH/H ₂ O	EMCW	congelado*

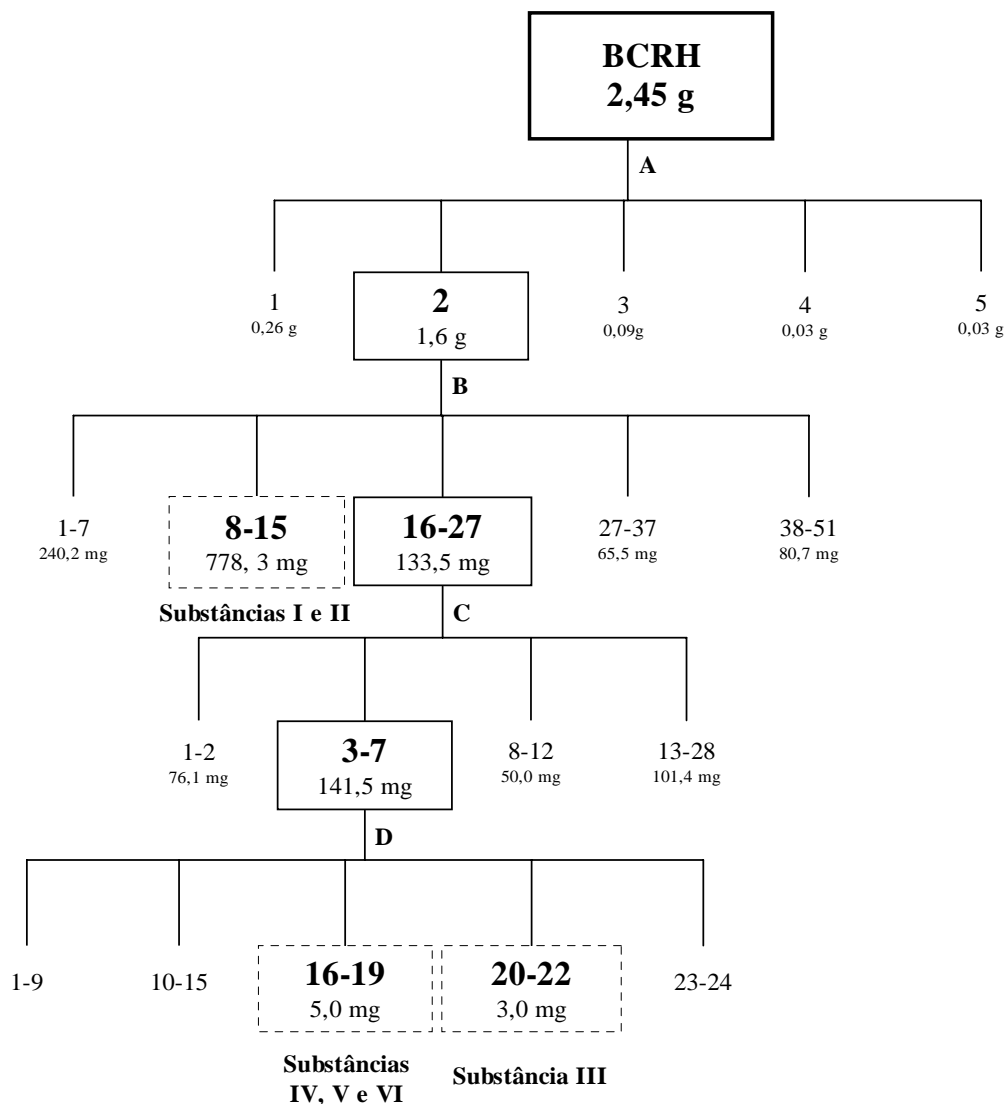
* extração líquido-líquido feita com parte do extrato para realização de ensaios de avaliação biológica.

3.5 - Metodologia do estudo de *B. coccolobifolia*

Neste trabalho foi realizado o estudo químico do extrato etanólico das raízes de *B. coccolobifolia*, através do estudo das partições líquido-líquido em hexano e acetato de etila.

3.5.1 - Fracionamento das partições em hexano (BCRH) e acetato de etila (BCRA)

As partições **BCRH** e **BCRA** foram fracionadas em CC utilizando diferentes fases estacionárias e sistemas de eluentes variados. Após cada coluna, as frações foram submetidas à CCD e posteriormente foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil químico apresentado (FLUXOGRAMAS 3.1, 3.2 e 3.3; TABELAS 3.3 e 3.4). Após a realização de sucessivos fracionamentos, as amostras que apresentaram maior grau de pureza foram analisadas e caracterizadas por RMN de ^1H , sendo que nestas partições foi possível caracterizar algumas substâncias ainda em mistura (I-VI). Para confirmar a identificação das substâncias, as misturas foram submetidas a CG/EM, utilizando as seguintes condições: (i) Rampa: 120 °C (2 min), 10 °C/min até 250 °C, 2 °C/min até 275 °C, 35 °C/min até 310 °C (10 min); volume de injeção: 10 µL, modo: *split* (20:1); fluxo: 1mL/min (XU, *et al.*, 2012); (ii) Rampa: 150 °C (1 min), 10 °C/min até 250 °C (4 min), 10 °C/min até 280 °C (20 min); volume de injeção: 10 µL, modo: *split* (20:1), fluxo: 1mL/min.

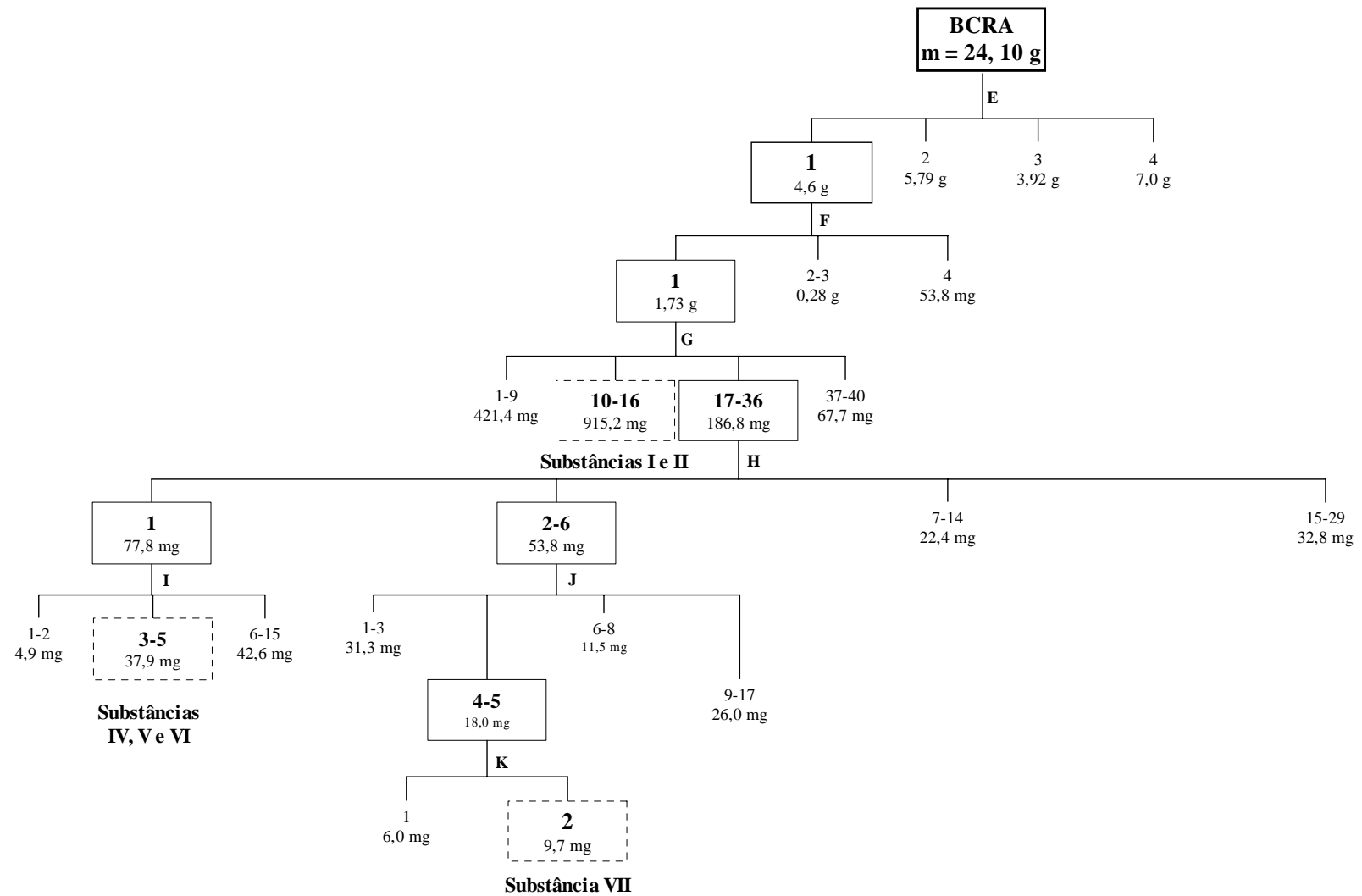


FLUXOGRAMA 3.1: Esquema de fracionamento de **BCRH**.

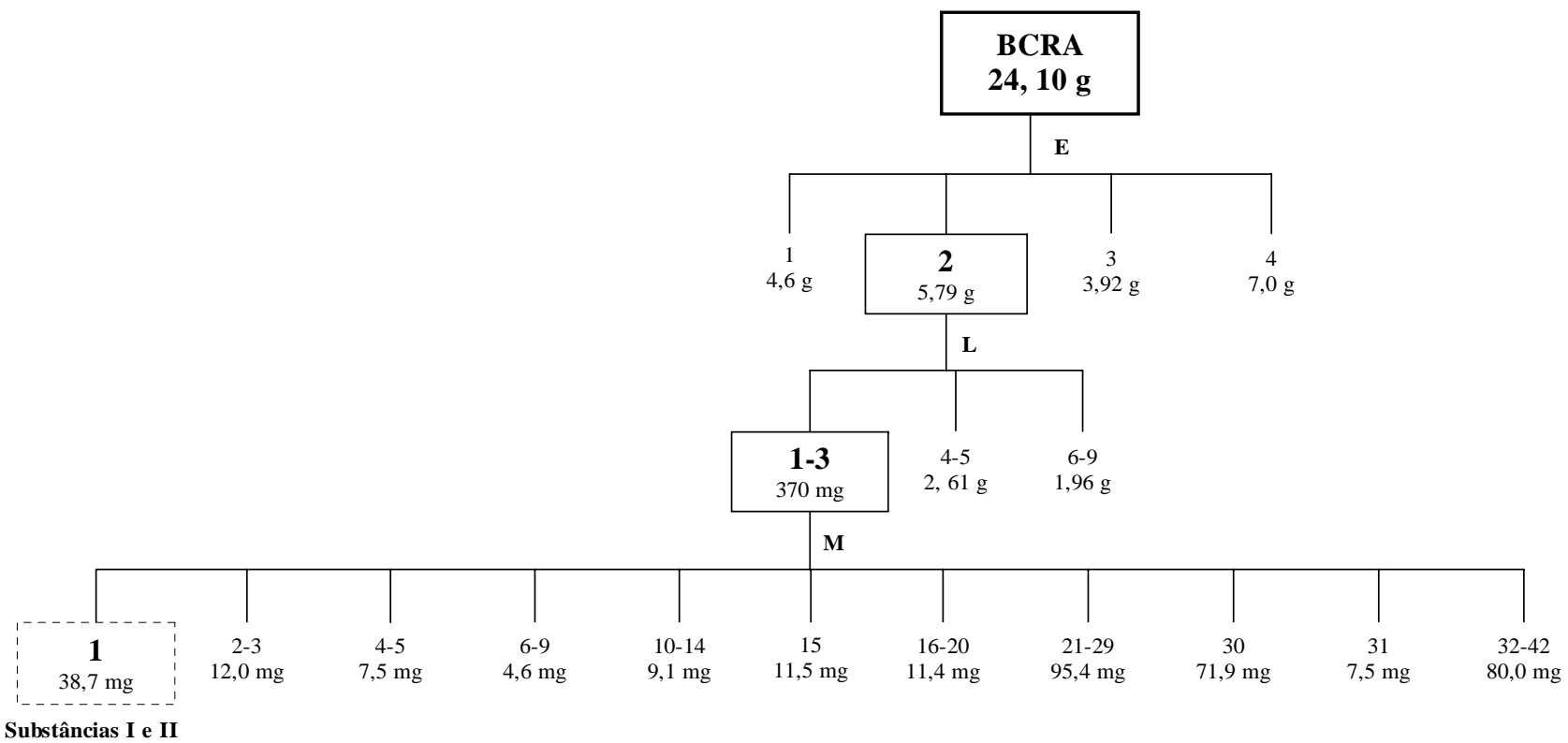
TABELA 3.3: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição **BCRH**.

Condição	F. E.	h (cm)	ϕ (cm)	Sistema eluente
A	Sílica gel (70 – 230 mesh)	11,0	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
B	Sílica gel (70 – 230 mesh)	12,0	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1); AcOEt 100%; MeOH 100%
C	Sílica gel (230 – 400 mesh)	23,0	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8:2), (6:4), (1:1), (4:6), (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
D	Sílica gel (230 – 400 mesh)	30,0	1,7	Gradiente: Hex 100%; Hex/Dic (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (4:6), (2:8); Dic 100%, Dic/AcOEt (4:1), (3:2), (2:3), (1:4); AcOEt 100%

Legenda: F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; ϕ = diâmetro da coluna cromatográfica.



FLUXOGRAMA 3.2: Esquema de fracionamento da partição **BCRA**.



FLUXOGRAMA 3.3: Continuação do esquema de fracionamento da partição **BCRA**.

TABELA 3.4: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição **BCRA** para as frações 1 e 2.

Condição	F. E.	h (cm)	ϕ (cm)	Eluição
E	Sílica gel (70 – 230 mesh)	15,0	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
F	Sílica gel (70 – 230 mesh)	9,0	5,5	Gradiente: Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
G	Sílica gel (70 – 230 mesh)	12,0	5,5	Gradiente: Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (6:4), (1:1); AcOEt 100%; MeOH 100%
H	Sílica gel (230 – 400 mesh)	24,5	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (4:6), (3:7), (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (8:2), (1:1); MeOH 100%
I	Sílica gel (230 – 400 mesh)	21,0	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (1:1); AcOEt 100%; MeOH 100%
J	Sílica gel (230 – 400 mesh)	26,0	1,7	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (2:8); AcOEt/MeOH (4:1); MeOH 100%
K	Sílica gel (230 – 400 mesh)	21,0	1,5	Gradiente: Hex 100%, Hex/AcOEt (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); AcOEt 100%; MeOH 100%
L	Sephadex LH-20	23,0	4,0	Isocrática: MeOH 100%
M	Sílica gel (230 – 400 mesh)	44,0	1,8	Gradiente: Hex/AcOEt (6:4); (1:1); (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (4:1); (3:2); (1:1); MeOH 100%

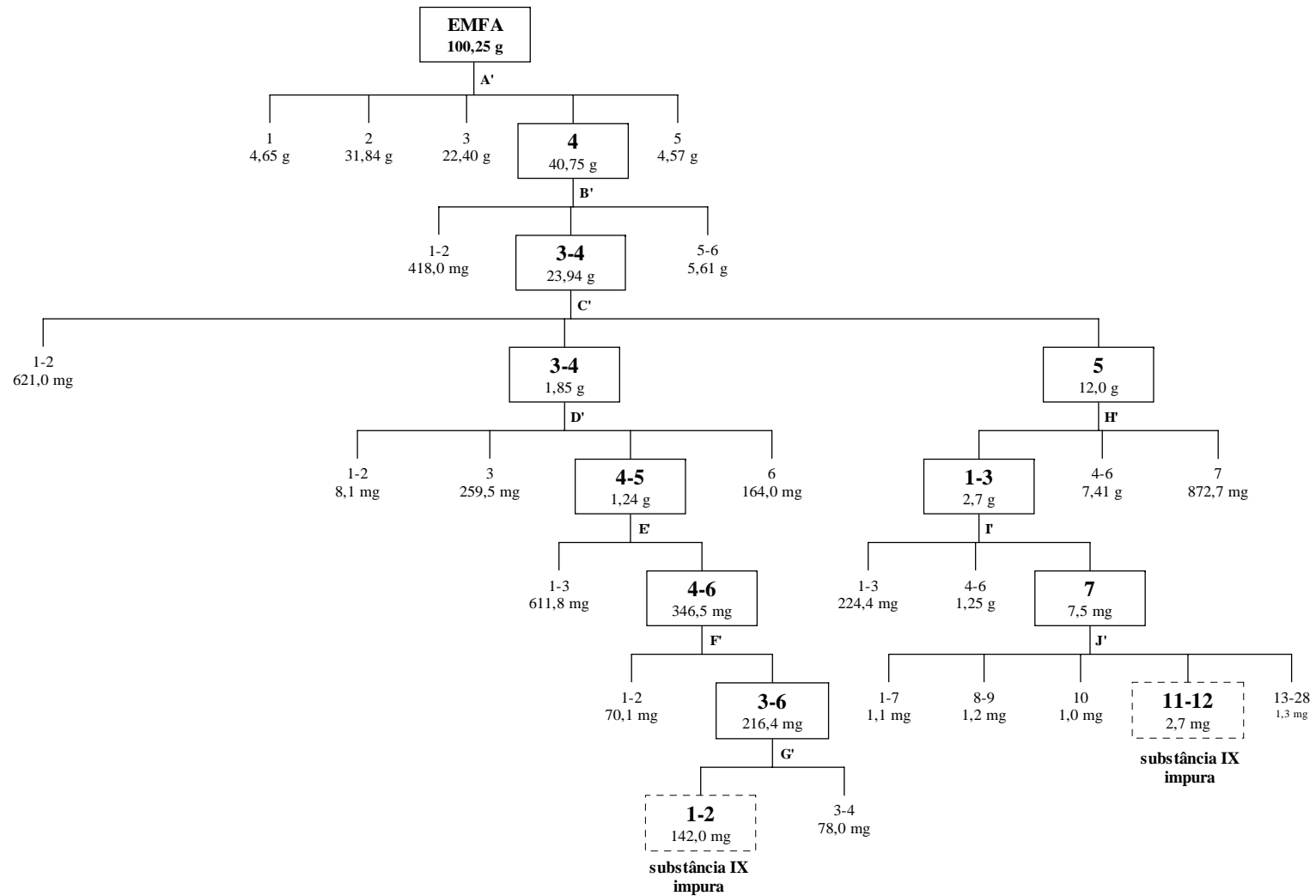
Legenda: F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; ϕ = diâmetro da coluna cromatográfica.

3.6 - Metodologia do estudo de *E. malaccensis*

Realizou-se o estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *E. malaccensis* pelo fracionamento das partição líquido-líquido em hexano (**EMFH**) e acetato de etila (**EMFA**), porém da partição **EMFH** não foi possível isolar nenhuma substância.

3.6.1 - Fracionamento da partição **EMFA**

A partição **EMFA** foi fracionada em CC utilizando sílica gel (70 – 230 *mesh*) como fase estacionária e uma eluição gradiente com hexano, acetato de etila e metanol. Após análise por CCD as frações 4 e 5 foram refracionadas em CC utilizando-se diferentes fases móveis e estacionárias. As frações resultantes foram analisadas em CCD e posteriormente agrupadas de acordo com as semelhanças dos perfis químicos apresentados. Para as frações polares que apresentaram misturas complexas, utilizou-se a técnica de CLAE para separação das substâncias (FLUXOGRAMA 3.4 e 3.5; TABELAS 3.5 e 3.6). Após análise de RMN de ^1H , as frações que possuíam a substância **IX** foram reunidas para purificação em CLAE, utilizando o método descrito por *Chen et al., 2001*: (i) Sistema de eluentes: A = $\text{H}_2\text{O}/\text{ácido acético}$ (97:3) e B = metanol. Programa gradiente: 100% até 90% de A em 10 min com fluxo de 3,6 mL/min; 90% a 30% de A em 30 min com fluxo de 4,0 mL/min; 30% a 100% de A em 4 min com fluxo de 4,0 mL/min, e para o acondicionamento da coluna de 44% a 47% de A em 3 min com fluxo de 3,6 mL/min. Detecção feita em 254 e 365 nm.

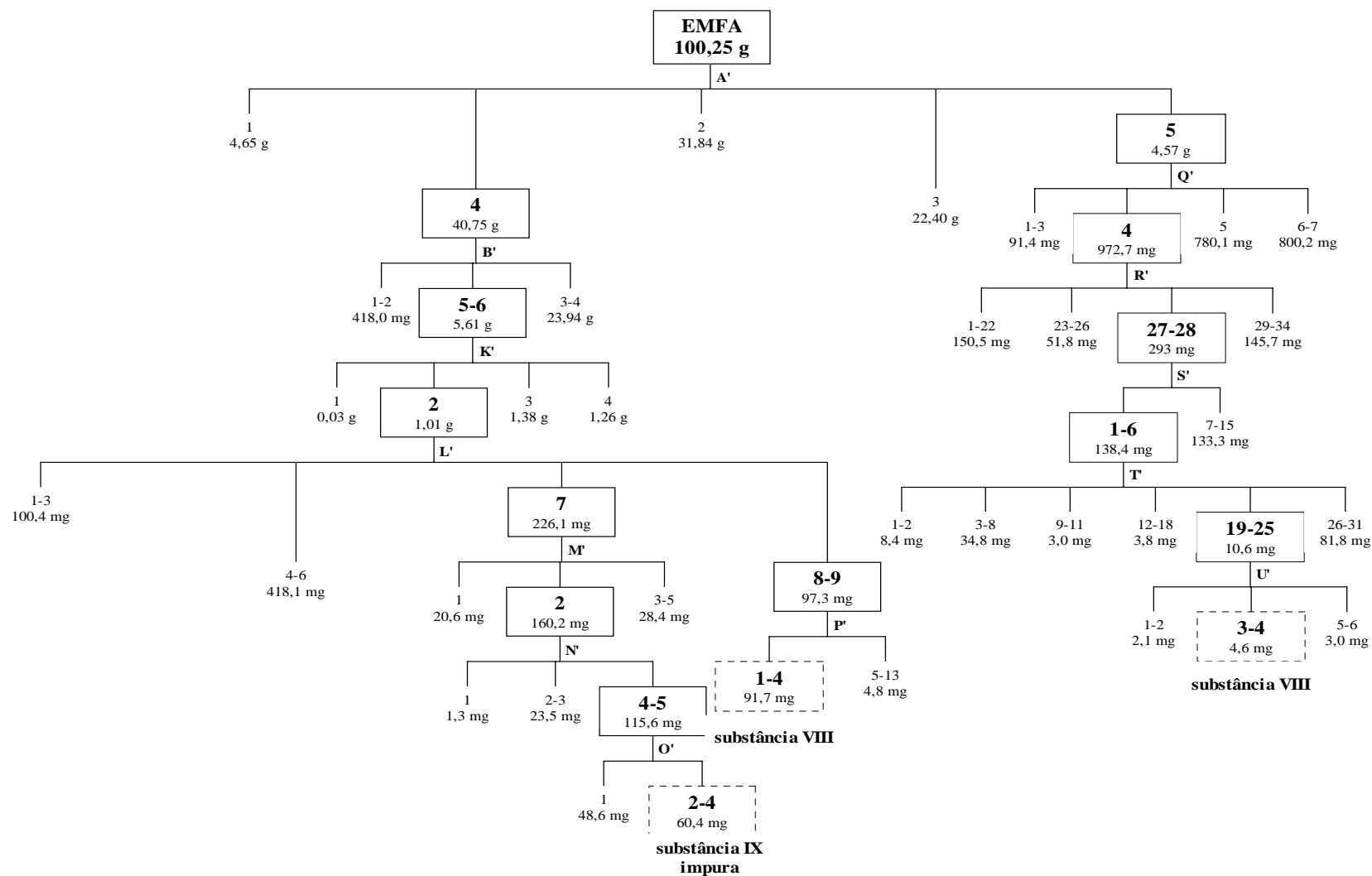


FLUXOGRAMA 3.4: Esquema de fracionamento da partição **EMFA**.

TABELA 3.5: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição **EMFA**.

Condição	F. E.	h (cm)	ϕ (cm)	Eluição
A'	Sílica gel (70 – 230 mesh)	15,0	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (1:1); MeOH 100%
B'	Sílica gel (70 – 230 mesh)	10,0	5,0	Gradiente: Hex 100%, Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
C'	Sílica gel (70 – 230 mesh)	11,5	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; MeOH 100%
D'	Sílica gel (70 – 230 mesh)	9,0	4,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (7:3), (4:6); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3); MeOH 100%
E'	Sephadex LH-20	21,0	2,5	Isocrática: Dic/MeOH (1:9)
F'	Sephadex LH-20	24,0	2,5	Isocrática: AcOEt/MeOH (2:8)
G'	Sephadex LH-20	34,0	1,5	Isocrática: MeOH 100%

Legenda: F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; ϕ = diâmetro da coluna cromatográfica.



FLUXOGRAMA 3.5: continuação do esquema de fracionamento da fração **EMFA**.

TABELA 3.6: Condições cromatográficas utilizadas no estudo da partição **EMFA**.

Condição	F. E.	h (cm)	ϕ (cm)	Eluição
H'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	12,0	5,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8:2), (1:1), (3:7); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (9:1), (7:3), (1:1); MeOH 100%
I'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	50,0	2,5	Isocrática: AcOEt/MeOH (2:8)
J'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	27,0	2,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); MeOH 100%
K'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	10,0	5,0	Gradiente: AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (8:2), (6:4), (4:6); MeOH 100%
L'	<i>Sephadex</i> LH-20	24,0	3,0	Isocrática: Dic/MeOH (2:8)
M'	<i>Sephadex</i> LH-20	26,0	2,5	Isocrática: MeOH 100%
N'	<i>Sephadex</i> LH-20	38,0	1,7	Isocrática: Dic/MeOH (1:9)
O'	<i>Sephadex</i> LH-20	34,0	1,5	Isocrática: MeOH 100%

P'	<i>Sephadex</i> LH-20	30,0	2,5	Isocrática: Dic/MeOH (4:6)
Q'	Sílica gel (70 – 230 <i>mesh</i>)	10,0	5,0	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (1:1); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (7:3), (1:1), (3:7); MeOH 100%
R'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	16,0	3,5	Gradiente: Hex 100%; Hex/AcOEt (8:2), (1:1), (4:6), (2:8); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (8:2), (6:4), (4:6); MeOH 100%
S'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	12,0	3,0	Gradiente: AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), (4:6); MeOH 100%
T'	Sílica gel (230 – 400 <i>mesh</i>)	12,0	3,0	Gradiente: Hex/AcOEt (1:4); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (9:1), (8:2)
U'	<i>Sephadex</i> LH-20	26,0	1,5	Isocrática: MeOH 100%

Legenda: F.E. = fase estacionária; h = altura da F.E.; ϕ = diâmetro da coluna cromatográfica.

3.7 - Metodologia para os ensaios de inibição enzimática (Catepsinas K, V e L)

Os ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas K, V e L foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP. As catepsinas K e V foram cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da *University of British Columbia*, Vancouver, Canadá, e a catepsina L pelo Dr. Marcio Fernando Madureira Alves, da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP.

O procedimento utilizado foi descrito por Severino *et al*, 2011, em que a atividade enzimática foi quantificada utilizando um espectrofluorímetro Molecular Devices SpectraMax M3, onde a fluorescência foi detectada com excitação (λ_{ex}) em 380 nm e emissão (λ_{em}) em 460 nm. Os ensaios foram realizados em uma placa de 96 poços de coloração preta e fundo plano, com volume final de 300 μ L/poço, a uma temperatura de 27 °C. As enzimas (32 nM) foram pré-ativadas por 5 minutos com 5 mM de DTE em tampão acetato de sódio 100 mM, 5 mM EDTA e pH 5,5. Posteriormente foram pré-incubadas por mais 5 minutos com as amostras a serem testadas nas concentrações desejadas. Para os extratos e partições utilizaram-se duas concentrações (125 e 50 μ g/mL). Como controle negativo utilizou-se DMSO (solvente utilizado para dissolver as amostras) e como controle positivo o inibidor E-64, o qual foi dissolvido em DMSO (10 μ M). A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA durante 300 segundos. A FIGURA 3.1 apresenta um esquema geral do ensaio realizado.

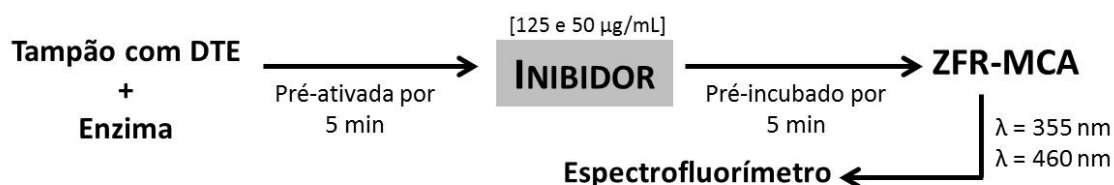
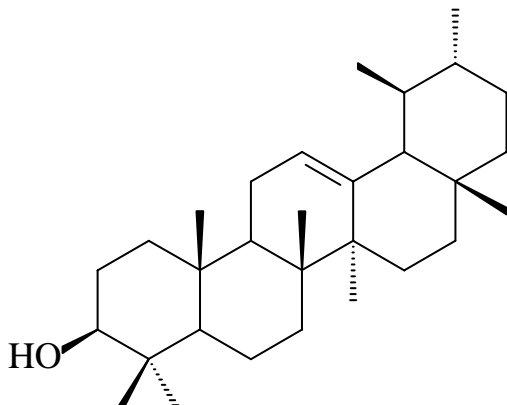


FIGURA 3.1: Esquema geral do ensaio enzimático.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Substâncias Isoladas



α -amirina (I)

Espécie: *B. coccolobifolia*

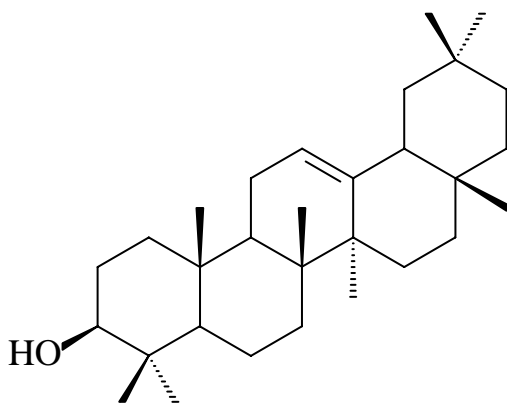
Origem: BCRH e BCRA

Massa: \approx 2,0 g

Observação: identificada em mistura com II

Isolamento: pg 33 - 37

Identificação estrutural: pg 49



β -amirina (II)

Espécie: *B. coccolobifolia*

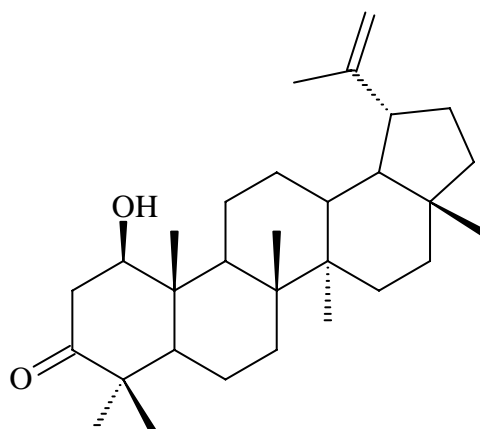
Origem: BCRH e BCRA

Massa: \approx 2,0 g

Observação: identificada em mistura com I

Isolamento: pg 33 - 37

Identificação estrutural: pg 49



glochidonol (III)

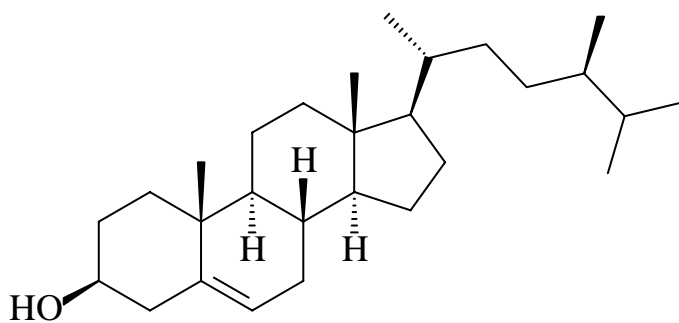
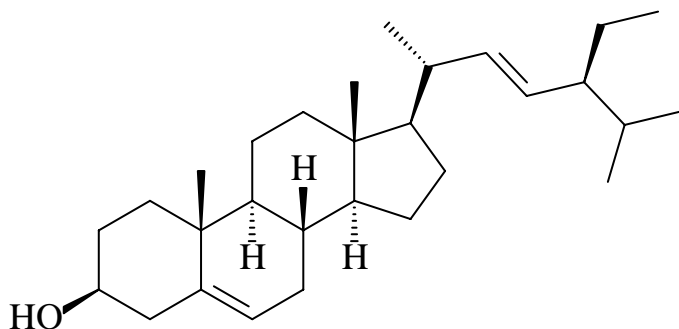
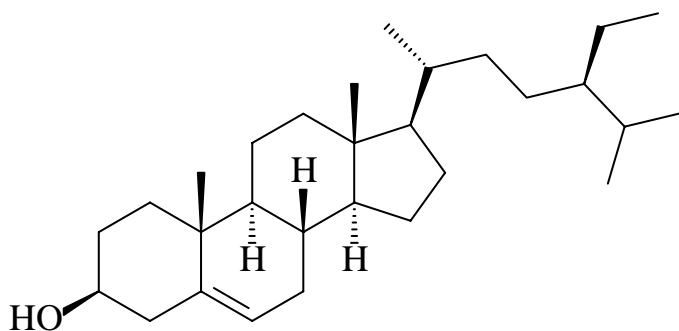
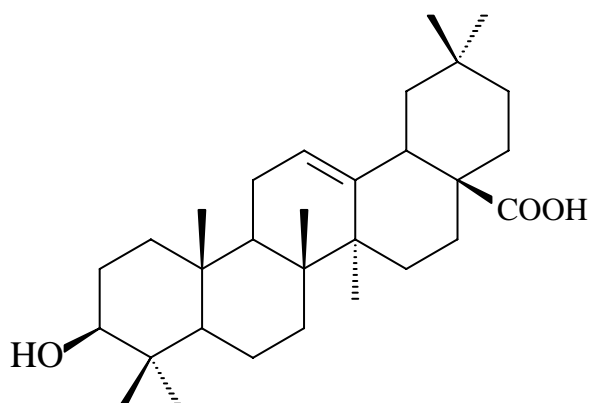
Espécie: *B. coccolobifolia*

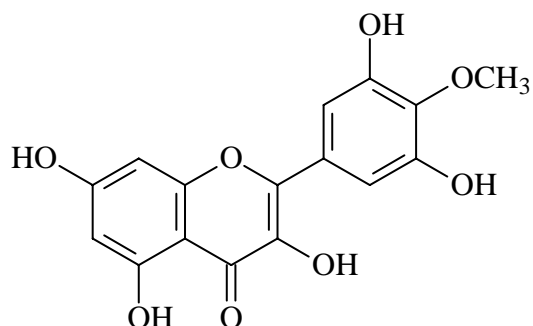
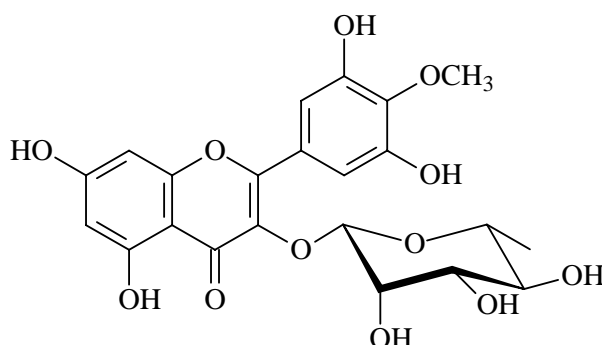
Origem: BCRH e BCRA

Massa: 3,0 mg

Isolamento: pg 33 e 34

Identificação estrutural: pg 55

**campesterol (IV)****Espécie:** *B. coccolobifolia***Origem:** BCRH e BCRA**Massa:** 43,0 mg**Observação:** identificada em mistura com **V** e **VI****Isolamento:** pg 33, 34 e 36**Identificação estrutural:** pg 63**stigmasterol (V)****Espécie:** *B. coccolobifolia***Origem:** BCRH e BCRA**Massa:** 43,0 mg**Observação:** identificada em mistura com **IV** e **VI****Isolamento:** pg 33, 34 e 36**Identificação estrutural:** pg 63 **β -sitosterol (VI)****Espécie:** *B. coccolobifolia***Origem:** BCRH e BCRA**Massa:** 43,0 mg**Observação:** identificada em mistura com **IV** e **V****Isolamento:** pg 33, 34 e 36**Identificação estrutural:** pg 63**ácido oleanólico (VII)****Espécie:** *B. coccolobifolia***Origem:** BCRA**Massa:** 2,0 mg**Isolamento:** pg 33 e 36**Identificação estrutural:** pg 70

**mearnsetina (VIII)****Espécie:** *E. malaccensis***Origem:** BCRA**Massa:** 12,0 mg**Isolamento:** pg 39 e 42**Identificação estrutural:** pg 73**mearnsitrina (IX)****Espécie:** *E. malaccensis***Origem:** BCRA**Massa:** 40,0 mg**Isolamento:** pg 39, 40 e 42**Identificação estrutural:** pg 76

4.2 - Determinação estrutural das substâncias isoladas de *B. coccolobifolia*

4.2.1 - Mistura dos terpenoides α -amirina (I) e β -amirina (II)

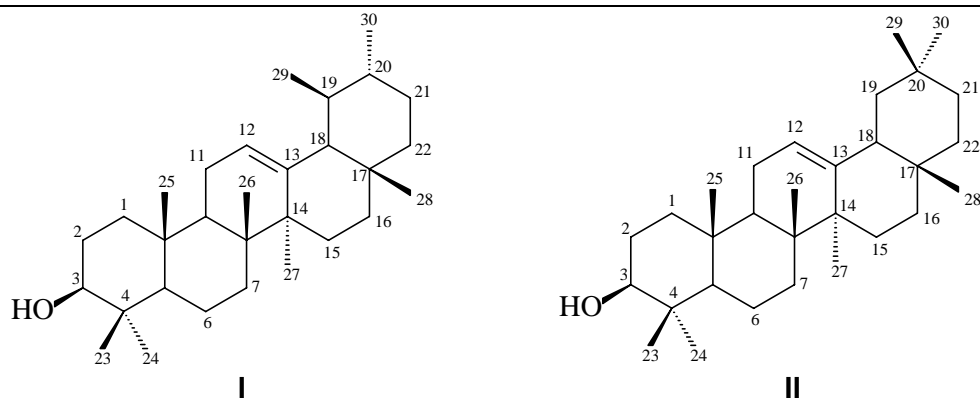
A mistura de 1,9 g dos terpenoides α -amirina (I) e β -amirina (II) foi isolada da espécie *B. coccolobifolia*, tanto da partição em acetato de etila quanto da partição em hexano e apresentou-se na forma de cristais brancos. Em CCD, quando revelada em solução ácida de vanilina, manchas de coloração roxa foram observadas. Esta amostra foi submetida à análise por CG/EM e RMN de ^1H .

Os dados de RMN de ^1H (TABELA 4.1; FIGURA 4.1) mostra informações importantes para a identificação desta mistura de triterpenos. No espectro foi observado, a presença de dois tripletos em δ 5,20 (t , $J = 3,5$ Hz) e 5,15 (t , $J = 3,5$ Hz), característicos de hidrogênios olefínicos. Em comparação com a literatura, sugere-se que estes sinais δ 5,20 e 5,15 são característicos dos hidrogênios H-12 em urseno (α -amirina) e oleaneno (β -amirina), respectivamente (VIEIRA-JUNIOR *et al.*, 2005; SOUZA, *et al.*, 2001;

CARVALHO, *et al.*, 1998). Como um dos carbonos que estão envolvidos na dupla ligação (C-13) é quaternário, e com isso não possui hidrogênios diretamente ligados, pode-se confirmar que estes sinais são pertencentes ao hidrogênio na posição 12. Este hidrogênio acopla com os dois hidrogênios H-11, resultando em um tripleto para α -amirina e outro para β -amirina, embora fosse esperada a formação de um duplo dubleto, pois os dois hidrogênios C-11 são diastereotópicos. Esta diferença de deslocamento pode ser explicada pelo efeito exercido sobre H-12, pelo grupamento 19- α -CH₃ (equatorial), afetando estericamente o valor de deslocamento deste hidrogênio. Este efeito está presente na série dos ursan-12-eno, ao contrário dos olean-12-eno, em que esta metila encontra-se no C-20, não aplicando este efeito a H-12 (ZANON, 2006).

Outra característica dessa classe de compostos é o sinal referente a H-3. Segundo dados da literatura, o deslocamento químico de H-3 pode determinar sua conformação, ou seja, quando H-3 está na posição β , seu deslocamento ocorre em δ 3,40 (*m*) (SOUZA, *et al.*, 2001; CARVALHO, *et al.*, 1998). Como o deslocamento observado para H-3 no espectro de RMN de ¹H foi δ 3,25, isto sugere que H-3 esteja em α e portanto OH-3 está na posição β , para os dois isômeros. A multiplicidade observada para este sinal (*dd*, *J* = 4,8 e 11,0 Hz) refere-se ao acoplamento com os dois hidrogênios diastereotópicos na posição 2.

Na região mais blindada do espectro de RMN de ¹H, entre δ 0,7 e 2,2, pode-se observar sinais característicos de hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos de triterpenos pentacíclicos.

TABELA 4.1 - Dados de RMN de ^1H da mistura dos terpenoides I e II.

H	δ_{H} (ppm) (400 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (ppm) ZANON, 2006 (400 MHz, CDCl_3)
3	3,25 (<i>dd</i> , $J = 4,8$ e $11,0$ Hz, 1H)	3,23 (<i>dd</i> , $J = 6,3$ e $9,0$ Hz, 1H)
12 α	5,15 (<i>t</i> , $J = 3,5$ Hz, 1H)	5,14 (<i>t</i> , $J = 3,2$ Hz, 1H)
12 β	5,20 (<i>t</i> , $J = 3,5$ Hz, 1H)	5,19 (<i>t</i> , $J = 3,2$ Hz, 1H)
23	1,15 (<i>s</i> , 3H)*	1,27 (<i>s</i> , 3H)
24	0,99 (<i>s</i> , 3H)*	1,01 (<i>s</i> , 3H)
25	0,89 (<i>s</i> , 3H)*	0,88 (<i>s</i> , 3H)
26	1,02 (<i>s</i> , 3H)*	1,11 (<i>s</i> , 3H)
27	0,96 (<i>s</i> , 3H)*	1,00 (<i>s</i> , 3H)
28	0,89 (<i>s</i> , 3H)*	0,95 (<i>s</i> , 3H)
29	0,85 (<i>s</i> , 3H)*	0,83 (<i>s</i> , 3H)
30	0,81 (<i>s</i> , 3H)*	0,80 (<i>s</i> , 3H)

* Valores intercambiáveis

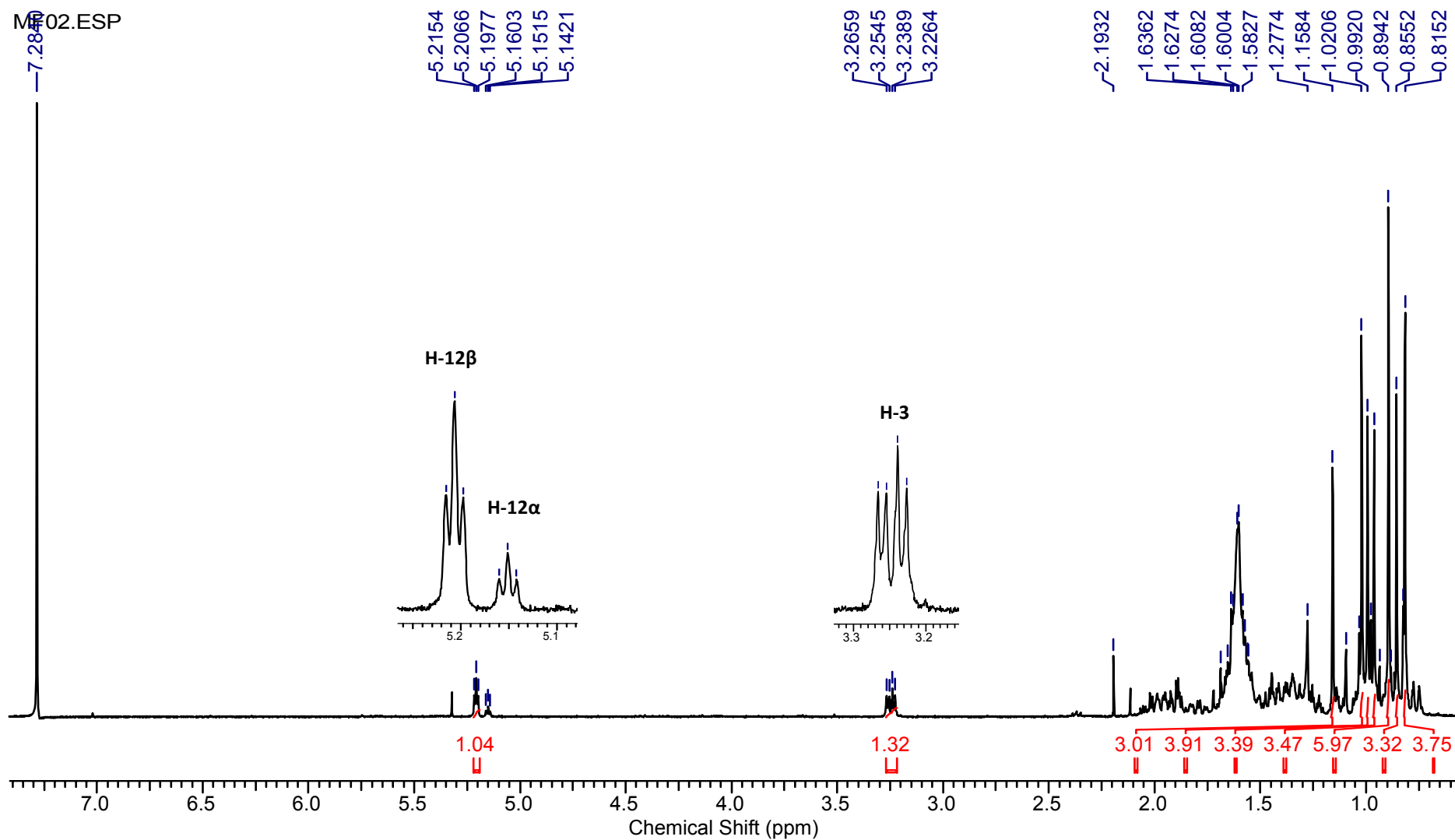


FIGURA 4.1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da mistura das substâncias I e II.

No cromatograma da análise por CG/EM foi possível observar bandas cromatográficas com tempos de retenção 30,75 e 31,31 min (FIGURA 4.2). Os espectros de massas obtidos por impacto eletrônico (70 eV) apresentaram-se muito semelhantes (FIGURA 4.3), ambos com picos m/z 426, correspondendo ao pico dos íons moleculares de α e β -amirina. Outros picos semelhantes e de maiores intensidades, foram os que apresentam m/z 218, 203 e 189. Esses picos são típicos de olean-12-enos e ursan-12-enos, sendo originados da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C (RADOSEVICH, *et al.*, 1985). A formação do pico base com m/z 218 produz um fragmento dieno, que tem a propriedade de estabilizar melhor a carga por ressonância (OGUNKOIA, 1981). A fragmentação desses triterpenos pode ser observada na FIGURA 4.4 (ZANON, 2006).

Os dois terpenoides são isômeros, portanto apresentam a mesma fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e grau de insaturação igual a 6. Através dos dados de RMN de 1H foi possível observar a presença de uma insaturação, conseqüentemente o restante das insaturações confirmam ser uma substância pentacíclica. Portanto, através do conjunto de dados foi possível confirmar que a mistura era constituída pelos terpenoides pentacíclicos α -amirina (I) e β -amirina (II).

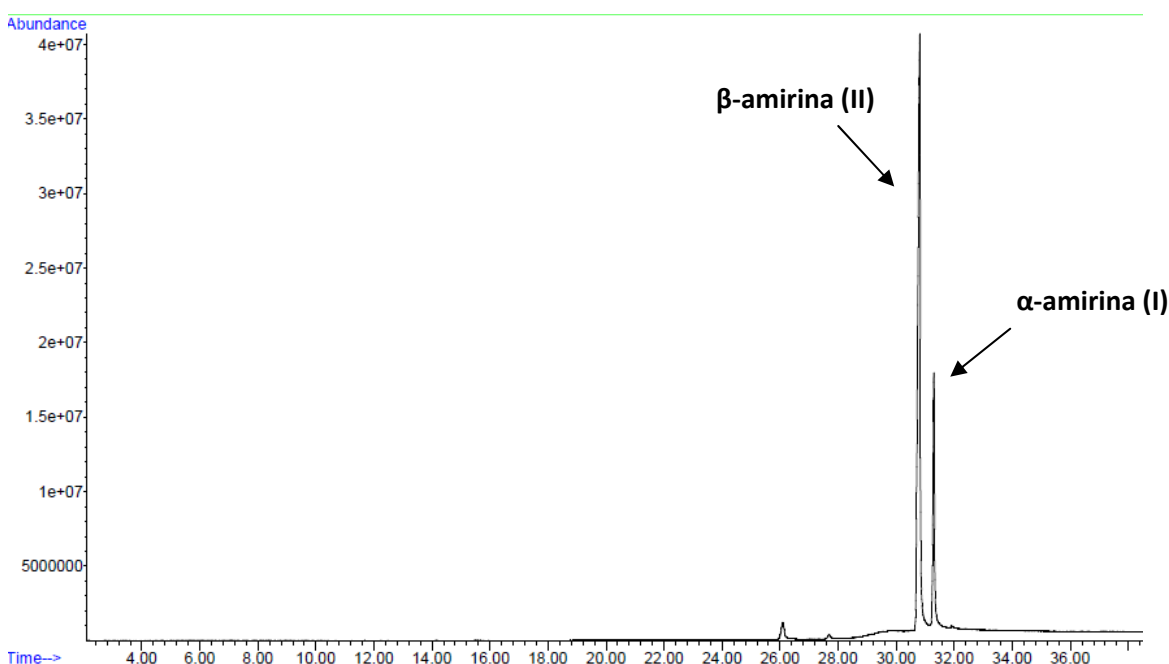


FIGURA 4.2: Cromatograma obtido para a mistura das substâncias I e II.

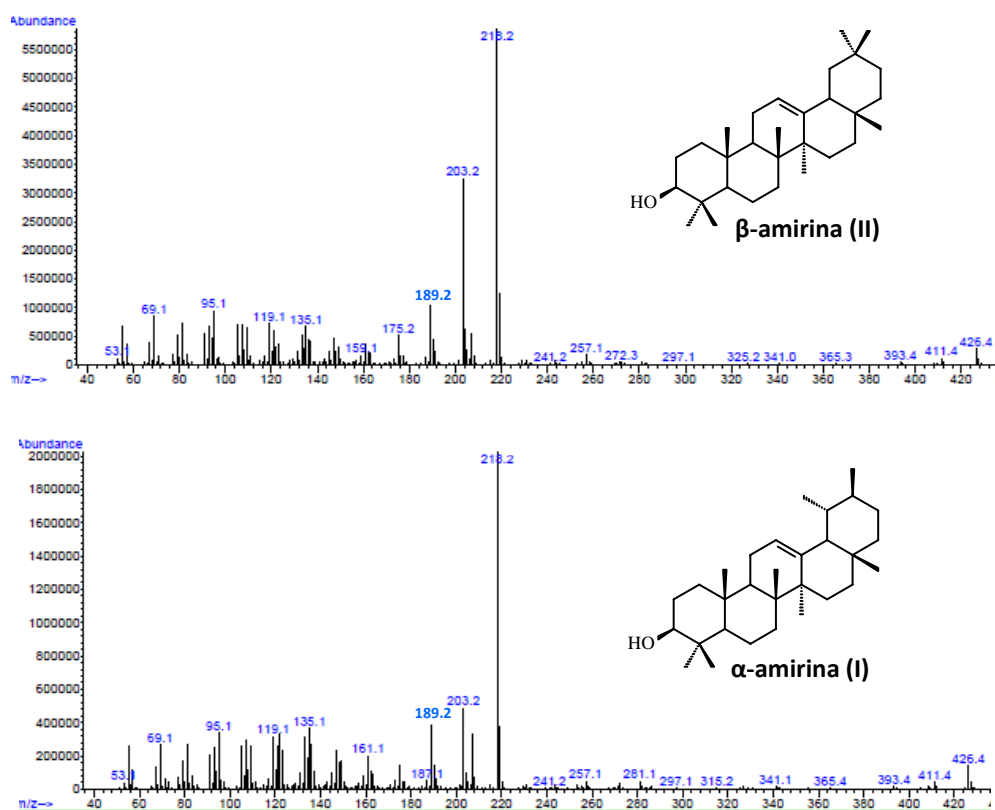


FIGURA 4.3: Espectros de massas (70 eV) para as substâncias II e I.

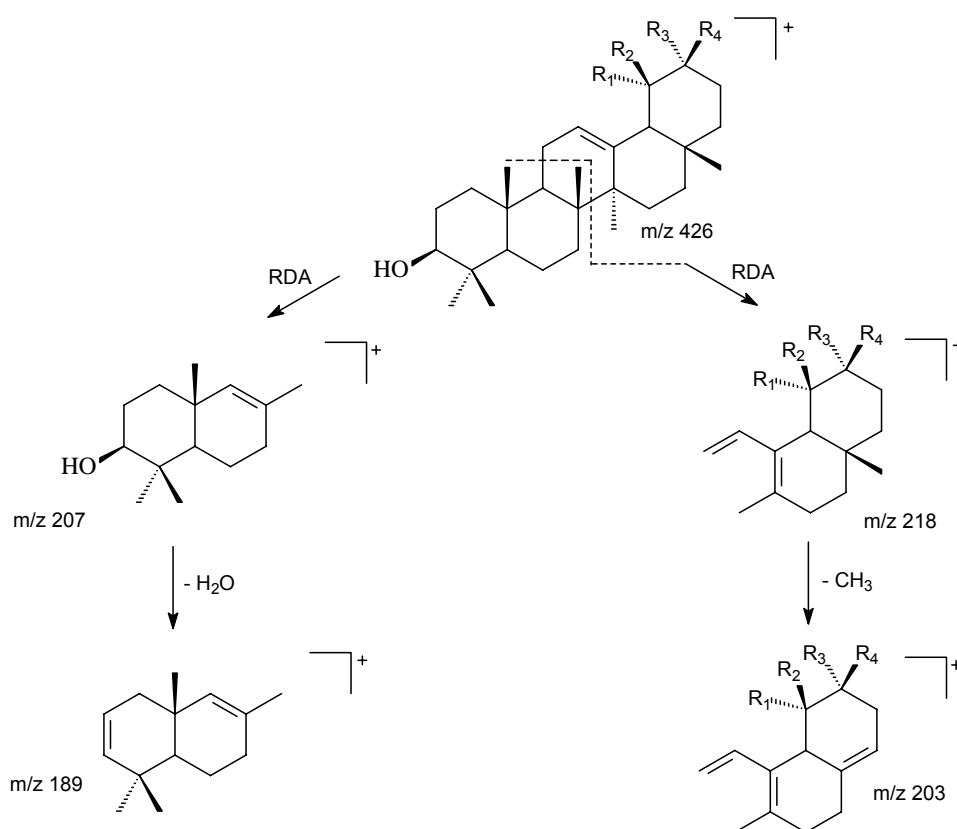


FIGURA 4.4: Proposta de fragmentação para as substâncias I e II.

Para I: R_1 e $R_4 = CH_3$ e $R_2, R_3 = H$; para II: $R_1, R_2 = H$ e $R_3, R_4 = CH_3$.

4.2.2 - Terpenoide glochidonol (III)

O terpenoide glochidonol ou 1β -hidroxilup-20(29)-en-3-ona (III) foi isolado da partição em hexano de *B. coccolobifolia* na forma de cristais incolores. Quando analisado por CCD e revelado com solução ácida de vanilina, apresentou-se como uma mancha azulada. A identificação da estrutura foi baseada nos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , nas correlações observadas pelos experimentos HSQC e HMBC, e em comparação com a literatura.

A análise do espectro de RMN de ^1H (TABELA 4.2; FIGURA 4.5) mostrou sinais característicos de esqueletos lupanos, sendo possível observar um dubleto largo em δ 4,69 (*dl*, $J = 2,4$ Hz) e um duplo dubleto largo em δ 4,57 (*ddl*, $J = 1,3$ e $2,4$ Hz) referentes aos hidrogênios olefínicos (H-29) da ligação dupla terminal do esqueleto lupano. A presença de dois duplos dubletos em δ 3,00 (*dd*, $J = 8,1$ e $14,4$ Hz) e δ 2,23 (*dd*, $J = 3,6$ e $14,4$ Hz) foi atribuída aos H-2 diastereotópicos. Um duplo duplo dubleto δ 2,39 (*ddd*, $J = 5,8$, $10,9$ e $10,9$ Hz) foi atribuído a H-19, sendo referente ao acoplamento com H-18 e aos H-21 diastereotópicos.

Em δ 1,68 foi possível observar a presença de um singlete largo (H-30), integrando para 3 hidrogênios, sendo esta característica de derivados do lup-20(29)-eno (CARPENTER, *et al.*, 1980; HUI & LI, 1976). Entre δ 0,8 – 1,06 foi possível observar outros 5 singletos intensos, onde um integra para 6 hidrogênios, totalizando as 7 metilas presentes na substância III (FIGURA 4.6).

Ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C (TABELA 4.2; FIGURA 4.7), verificou-se em δ 215,7 um deslocamento característico de grupamento carbonila, além dos sinais em δ 150,7 e 109,5 referentes aos deslocamentos de carbonos hidrizados sp^2 , e também em δ 79,6 um deslocamento típico de carbono carbinólico. Na região de δ 11,7 – 51,4 observaram-se sinais com deslocamentos de carbonos metílicos, metínicos e metilênicos.

Pelo mapa de contorno de HSQC (TABELA 4.3; FIGURA 4.8) foi possível correlacionar hidrogênios e carbonos diretamente ligados ($^1J_{\text{CH}}$). Desta forma observou-se a correlação dos H-29 com o carbono em δ 109,48 atribuindo este sinal ao C-29. Outro sinal referente à Csp^2 foi atribuído ao C-20, que por ser quaternário não obteve nenhuma correlação no HSQC. O sinal em

δ 215,69 foi atribuído ao C-3, sugerindo a presença de uma hidroxila em C-1. Também foi possível verificar que os sinais referentes aos H-2 não fazem correlação direta com o carbono em δ 215,69 e que há correlação de δ 3,90 (m, H-1) com δ 79,62, referente à C-1.

No experimento de HMBC (TABELA 4.3; FIGURA 4.9), onde as correlações H-C podem ser observadas a uma distância maior de ligação ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$ ou até $^4J_{CH}$), os hidrogênios olefínicos δ 4,69 e 4,57 (H-29) mostraram correlação com o sinal da Me-30 (δ 19,26) e com C-19 (δ 47,92). Os H-2a e H-2b (δ 3,00 e 2,23) correlacionaram com C-2 (δ 45,13), C-1 (δ 79,62), e H-2b (δ 2,23) com C-4 (δ 41,12). O sinal em δ 1,68 (H-30) mostrou correlação com δ 48,25 (C-18), δ 150,73 (C-20) e δ 109,48 (C-29).

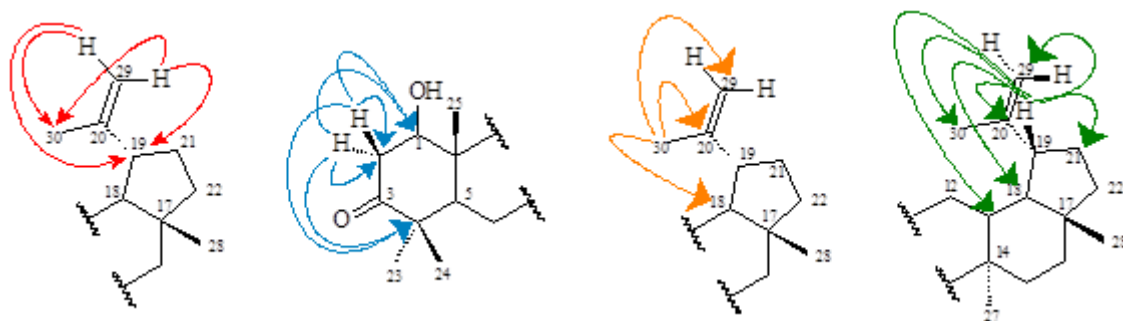
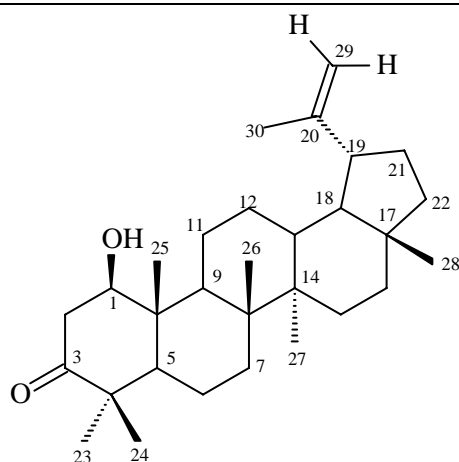


FIGURA 4.5: Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de HMBC.

Portanto, as análises conjuntas dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , dos mapas de contorno de HSQC e HMBC, em comparação com dados da literatura (PUAPAIROJ, *et al.*, 2005), permitiram definir a substância III como sendo a do terpenoide glochinonol.

TABELA 4.2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância III.

III

H/C	(500 e 125 MHz, CDCl_3)		PUAPAIROJ, 2005 (300 e 75 MHz, CDCl_3)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	3,90 (m)	79,62	3,91 (dd, $J = 8,1, 3,4$ Hz, 1H)	79,58
2a	3,00 (dd, $J = 10,0, 18,0$ Hz, 1H)	45,13	3,01 (dd, $J = 14,4, 8,1$ Hz, 1H)	45,07
2b	2,23 (dd, $J = 4,5, 18,0$ Hz, 1H)		2,22 (dd, $J = 3,5, 14,4$ Hz, 1H)	
3		215,69		215,99
4		47,12		47,11
5		51,37		51,26
6		19,84		19,58
7		32,92		32,85
8		47,92		42,86
9		50,69		50,63
10		42,95		42,90
11		23,04		22,96
12		25,15		25,08
13		37,97		37,90
14		41,14		41,08
15		27,49		27,44
16		35,51		35,46
17		42,92		42,86
18		48,25		48,18
19	2,39 (ddd, $J = 5,8, 10,9, 10,9$ Hz, 1H)	47,92	2,39 (ddd, $J = 5,8, 11,0, 11,0$ Hz, 1H)	47,89

20		150,73		150,73
21		29,78		29,72
22		39,96		39,93
23	1,06 (s, 3H)	27,91	1,04 (s, 3H)	27,94
24	1,04 (s, 3H)	19,61	1,06 (s, 3H)	19,58
25	0,83 (s, 3H)	11,78	0,83 (s, 3H)	11,81
26	1,06 (s, 3H)	15,94	1,06 (s, 3H)	15,90
27	0,98 (s, 3H)	14,44	0,98 (s, 3H)	14,00
28	0,81 (s, 3H)	18,02	0,80 (s, 3H)	18,00
29a	4,69 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H)	109,48	4,68 (<i>dl</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz, 1H)	109,47
29b	4,57 (<i>ddl</i> , <i>J</i> = 1,6, 3,0 Hz, 1H)		4,56 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2 e 1,4 Hz, 1H)	
30	1,68 (s, 3H)	19,26	1,68 (s, 3H)	19,24

TABELA 4.3: Correlações observadas entre átomos de C e H nos experimentos de HSQC e HMBC para a substância III.

Posição	δ_{H} 500 MHz, CDCl ₃	δ_{C} 125 MHz, CDCl ₃	Correlações	
			HSQC	HMBC
1	3,90	79,62	C-1	-
2a 2b	3,00 2,23	45,13	C-2	C-1, C-4, C-10
19	2,39	47,92	C-19	C-13, C-18, C-20, C-21, C-29, C-30
23	1,06	27,91	C-23	C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-14
24	1,04	19,61	C-24	C-4, C-5, C-23
25	0,83	11,78	C-25	C-1, C-5, C-8, C-9, C-10
26	1,06	15,94	C-26	C-6, C-7, C-8, C-10, C-14
27	0,98	14,44	C-27	C-8, C-13, C-14, C-15
28	0,81	18,02	C-28	C-16, C-17, C-18, C-22
29a 29b	4,69 4,57	109,48	C-29	C-19, C-30
30	1,68	19,26	C-30	C-18, C-20, C-29

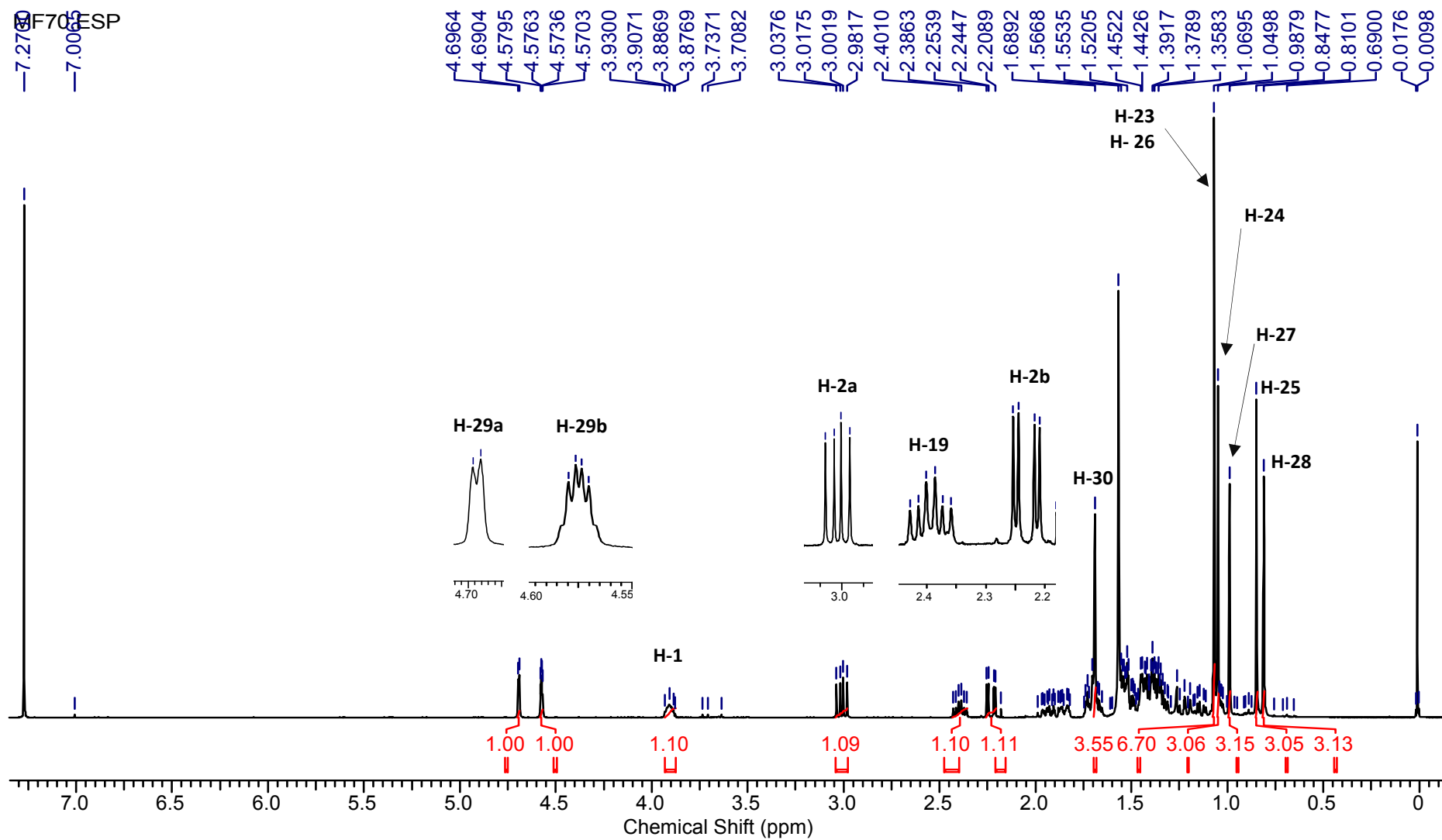


FIGURA 4.6: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) para a substância III.

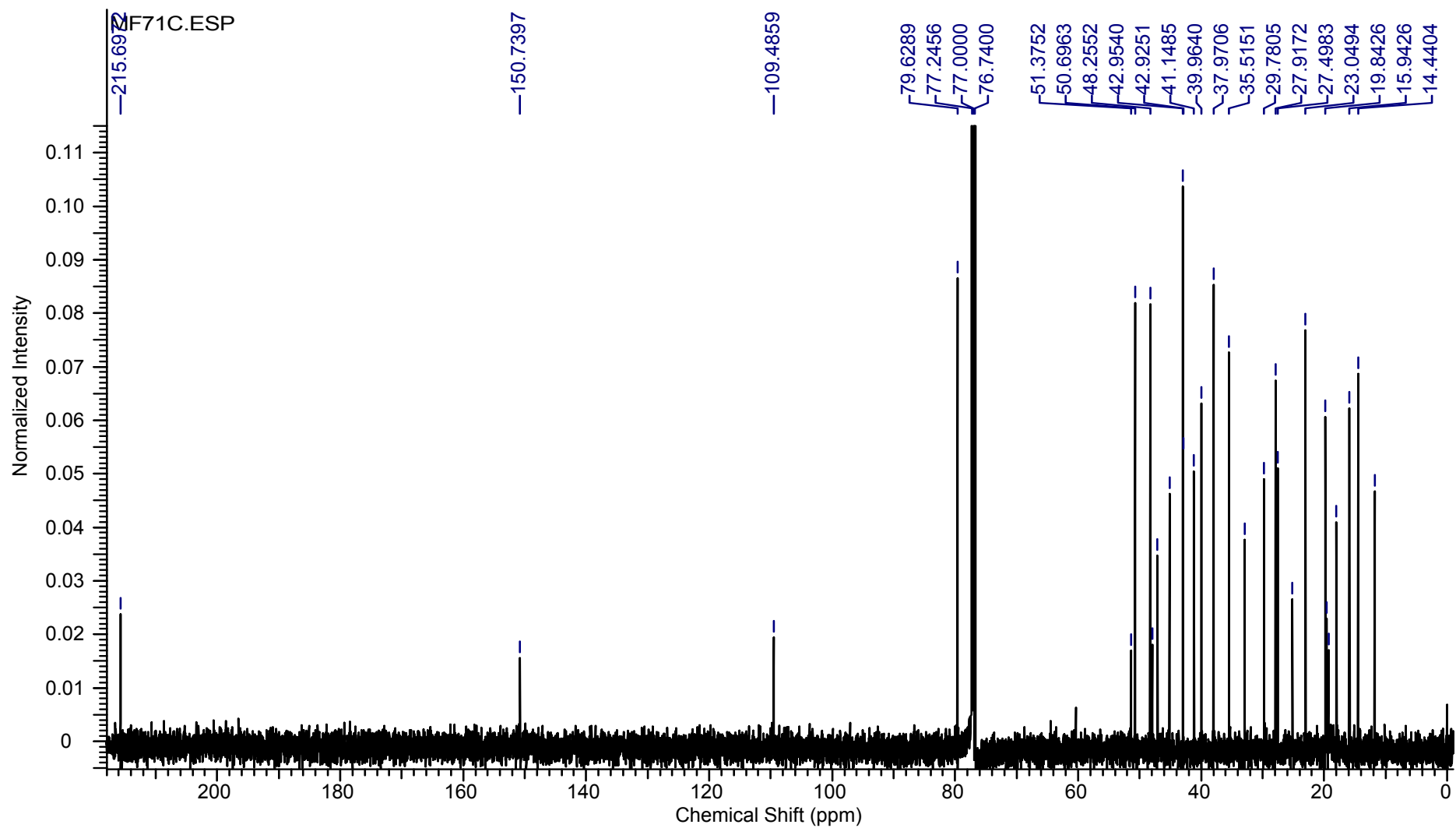


FIGURA 4.7: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) para a substância III.

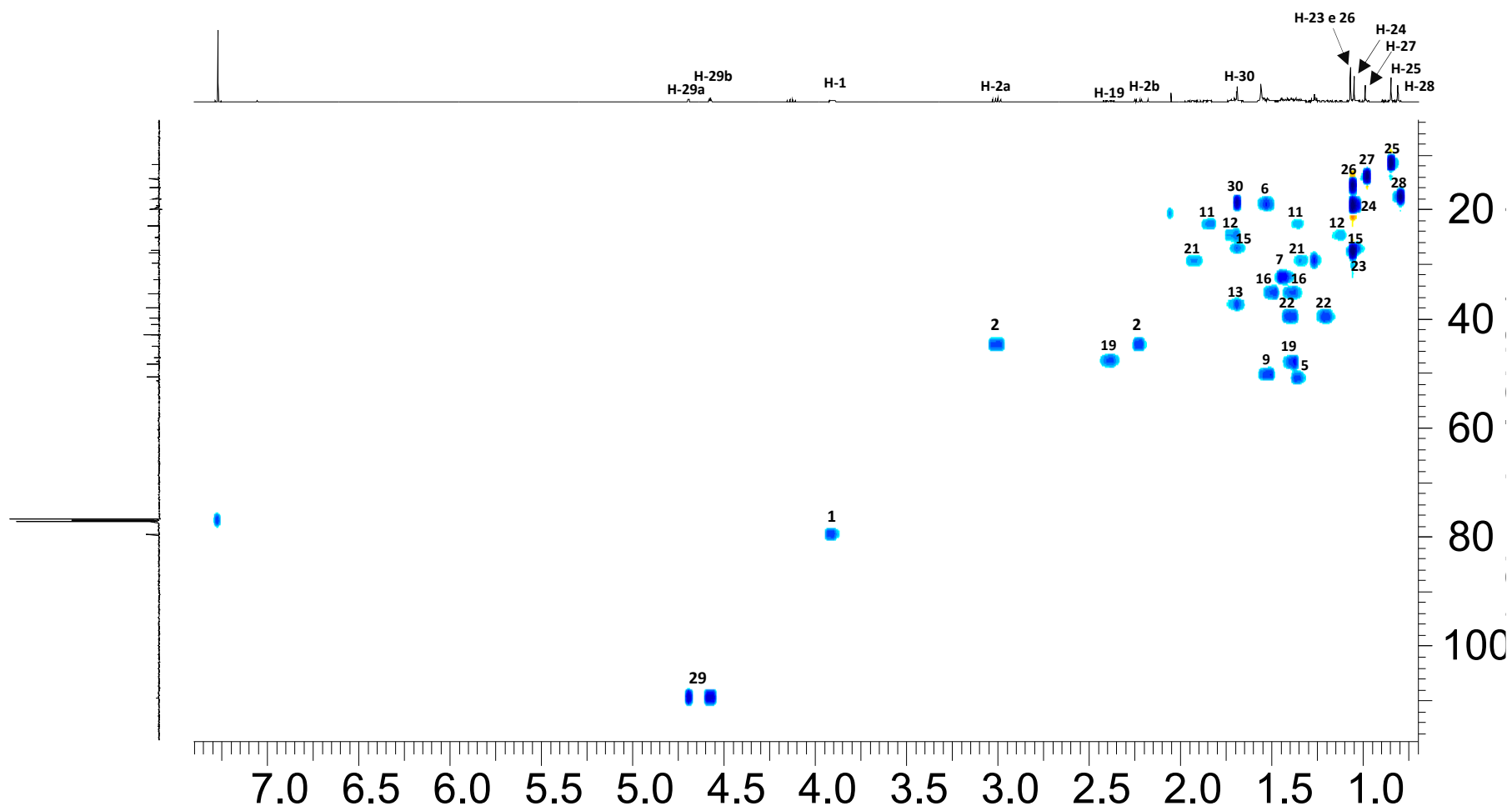


FIGURA 4.8: Mapa de contorno HSQC para a substância III.

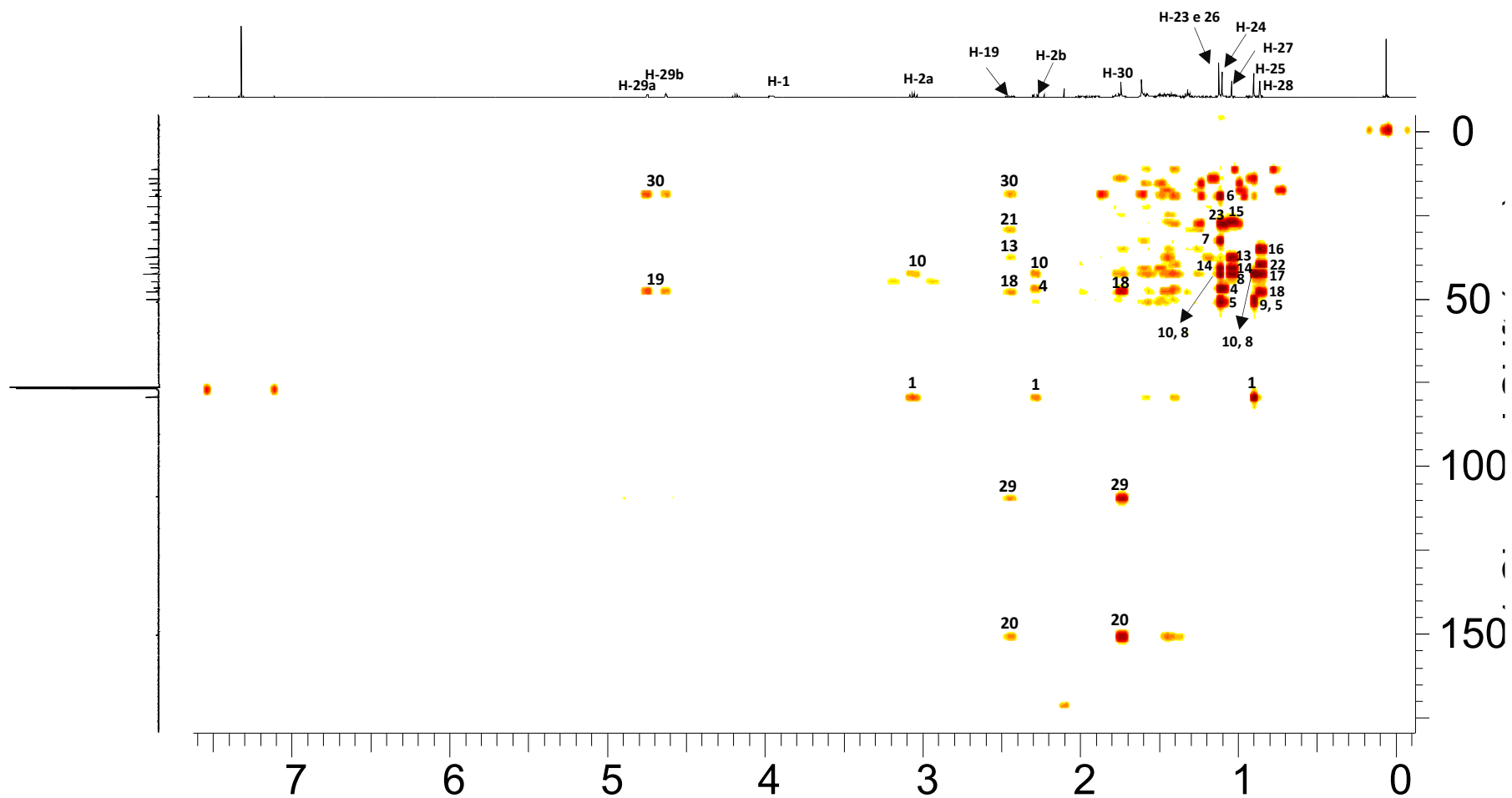


FIGURA 4.9: Mapa de contorno HMBC para a substância III.

4.2.3 - Mistura dos esteroides campesterol (IV), estigmasterol (V) e β -sitosterol (VI)

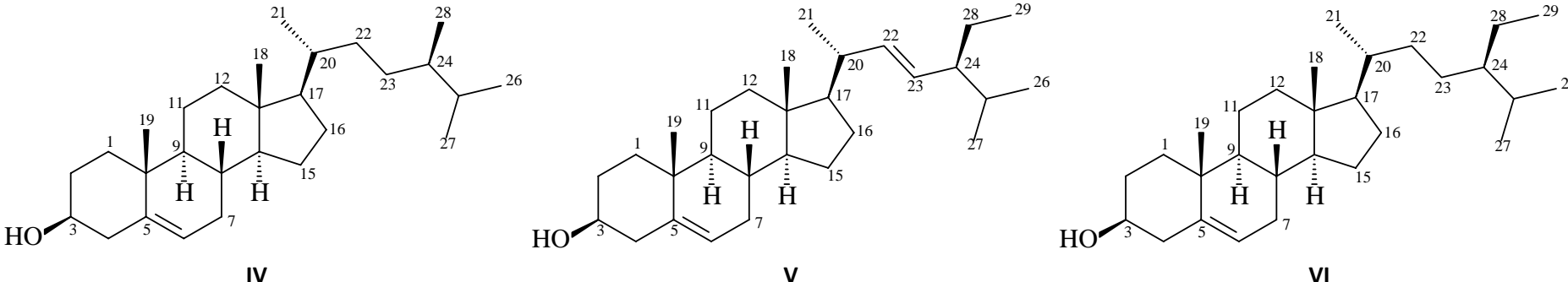
A mistura das substâncias campesterol (IV), estigmasterol (V) e β -sitosterol (VI) foi isolada das partições em hexano e acetato de etila de *B. coccolobifolia*. A mistura apresentou-se em cristais na forma de agulhas e em CCD, quando revelada em solução ácida de vanilina, mostrou uma mancha azulada. A identificação das substâncias foi baseada na análise dos dados de RMN de ^1H e CG/EM.

De acordo com dados já conhecidos na literatura (ANDRADE, 2003; GARG & NES, 1984) e com a análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.10), confirmou-se que se tratava de uma mistura de esteroides. Estes são marcados pela presença dos sinais em δ 5,36 (*d*, $J = 5,1$ Hz) de hidrogênio olefínico (H-6), característica comum para os três compostos, e em δ 3,52 (*m*) referente ao hidrogênio ligado a um carbono carbinólico (H-3). Pelo fato de C-3 estar ligado a um oxigênio, H-3 sofre um efeito de desblindagem, aumentando assim o seu deslocamento. Além disso, acopla com quatro hidrogênios diastereotópicos, H-2 (H-2a e H-2b) e H-4 (H-4a e H-4b), resultando seu sinal em um multipletto. Os sinais entre δ 0,7 – 2,0 são atribuídos aos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos presentes no esqueleto esteroidal. Como as estruturas dos três compostos são semelhantes, os sinais resultantes são coincidentes. Um diferencial entre os esqueletos é que no estigmasterol há uma ligação dupla entre C-22 e C-23, gerando sinais em δ 5,02 (*dd*, $J = 8,6$ e 15,2 Hz) e δ 5,16 (*dd*, $J = 8,6$ e 15,2 Hz), característicos de hidrogênios olefínicos. Por RMN ^1H não é possível diferenciar a cadeia lateral do campesterol e β -sitosterol. Alguns dados de RMN de ^1H referentes a esta mistura estão descritos na TABELA 4.4.

A mistura dos esteroides foi submetida a CG/EM para confirmar as substâncias presentes. O cromatograma obtido mostra a presença dos três componentes da mistura com tempos de retenção 23,69, 24,39 e 25,77 min (FIGURA 4.11). Os espectros de massas (FIGURAS 4.12, 4.13 e 4.14) apresentam como picos dos íons moleculares com m/z 400, 412 e 414, correspondentes às fórmulas moleculares esperadas $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ e $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, confirmando respectivamente a presença de campesterol (IV),

estigmasterol (**V**) e β -sitosterol (**VI**) (JÁCOME, *et al.*, 2004). A FIGURA 4.15 traz uma proposta de fragmentação para a substância **VI**, sendo similar para os esteroides **IV** e **V**.

TABELA 4.4: Dados de RMN de ^1H para a mistura das substâncias **IV**, **V** e **VI**.



H	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 400 MHz)			δ_{H} (ppm)	
	IV	V	VI	(360 MHz, CDCl_3) GARG & NES, 1984	(200 MHz, CDCl_3) ANDRADE, 2003
3	3,52 (m)	3,52 (m)	3,52 (m)	3,50 (m)	3,52 (m)
6	5,36 (d, $J = 5,3$ Hz)	5,36 (d, $J = 5,1$ Hz)	5,36 (d, $J = 5,1$ Hz)	5,30 (s)	5,35 (d, $J = 5,04$ Hz)
22	-	5,16 (dd, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz)	-	5,15 (d, 7,5 Hz)	5,01 (dd, $J = 8,1$ e $15,2$ Hz)
23	-	5,02 (dd, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz)	-	5,01 (d, $J = 7,5$ Hz)	5,16 (dd, $J = 8,1$ e $15,2$ Hz)
18				0,68-0,69*	
19		0,69*	0,85*	0,70-0,80*	
21		0,70*	0,92*	0,79-0,81*	
26		0,81*	1,01*	0,83-0,85*	-
27		0,83*	1,03*	0,91-1,02*	
29				1,02	

* Valores intercambiáveis

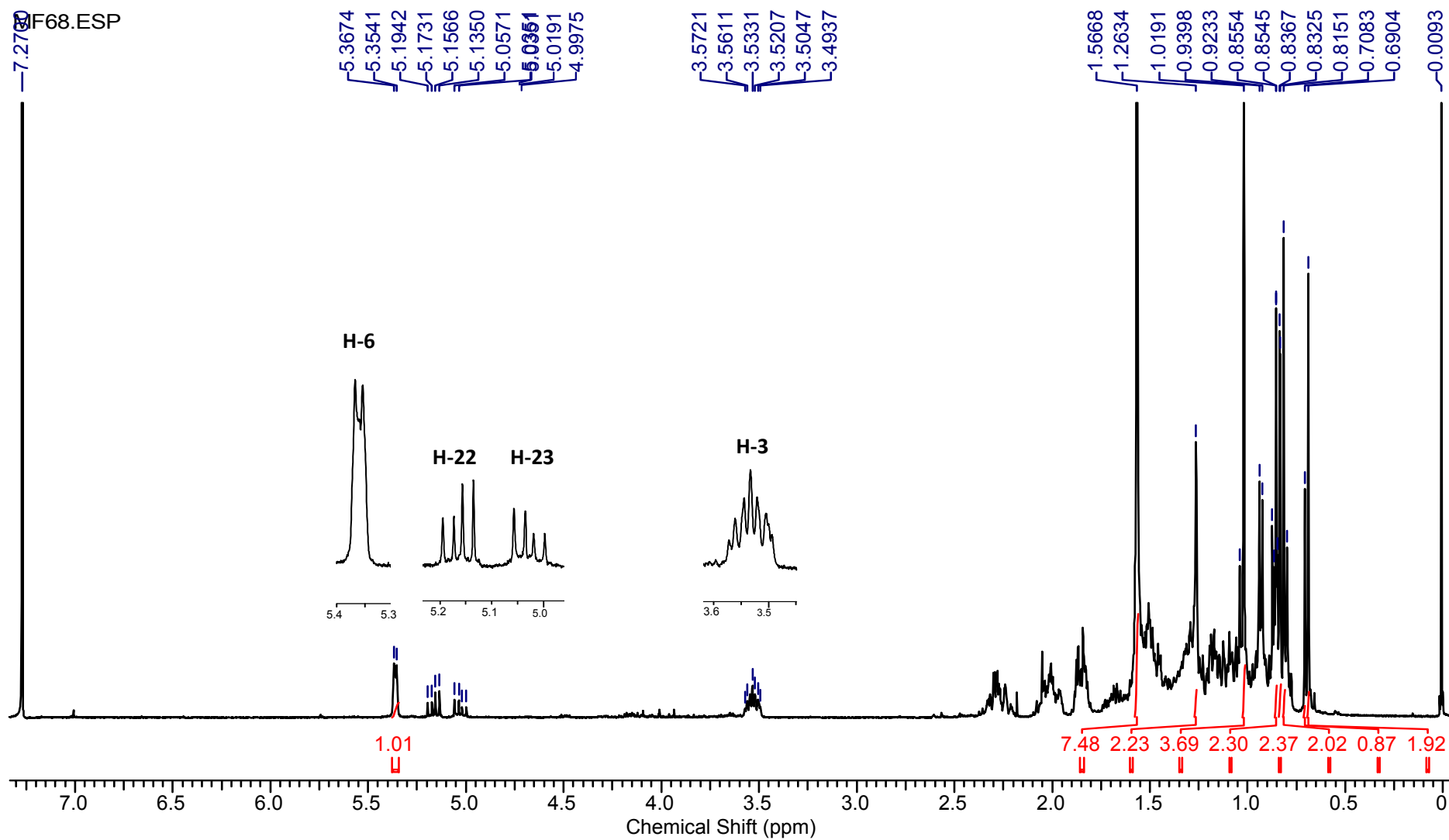


FIGURA 4.10: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) para a mistura das substâncias IV, V e VI.

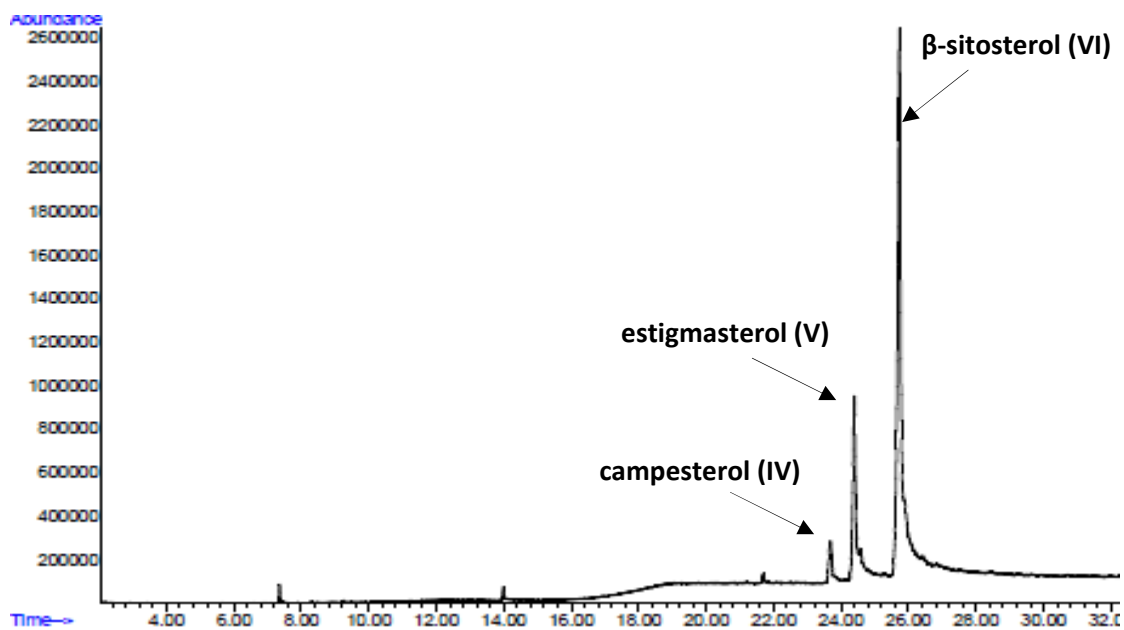


FIGURA 4.11: Cromatograma obtido para a mistura das substâncias IV, V e VI.

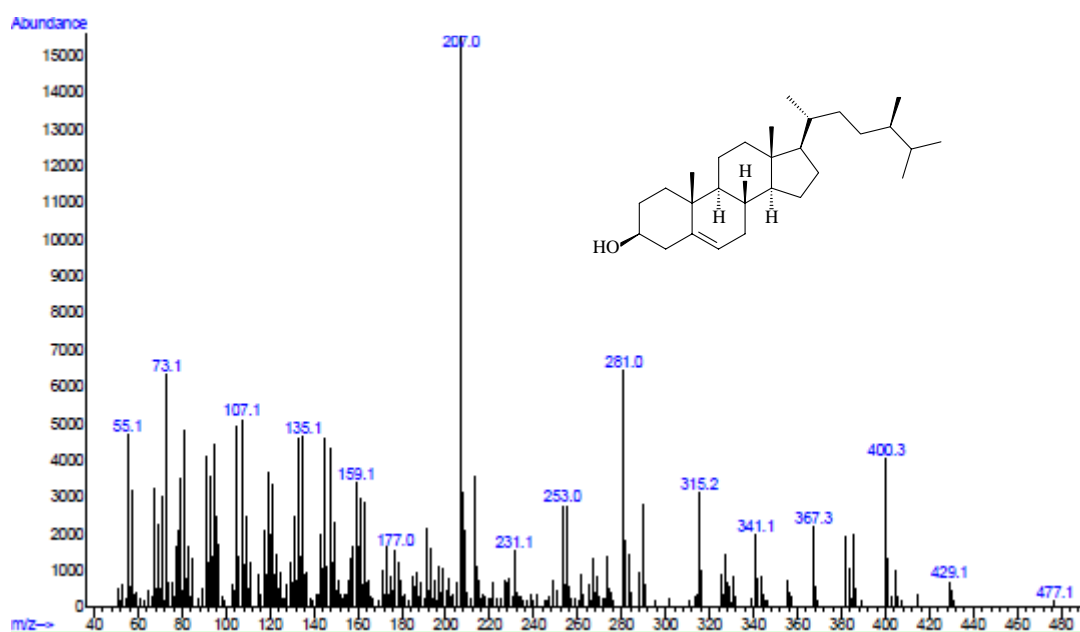


FIGURA 4.12: Espectro de massa (70 eV) da substância IV.

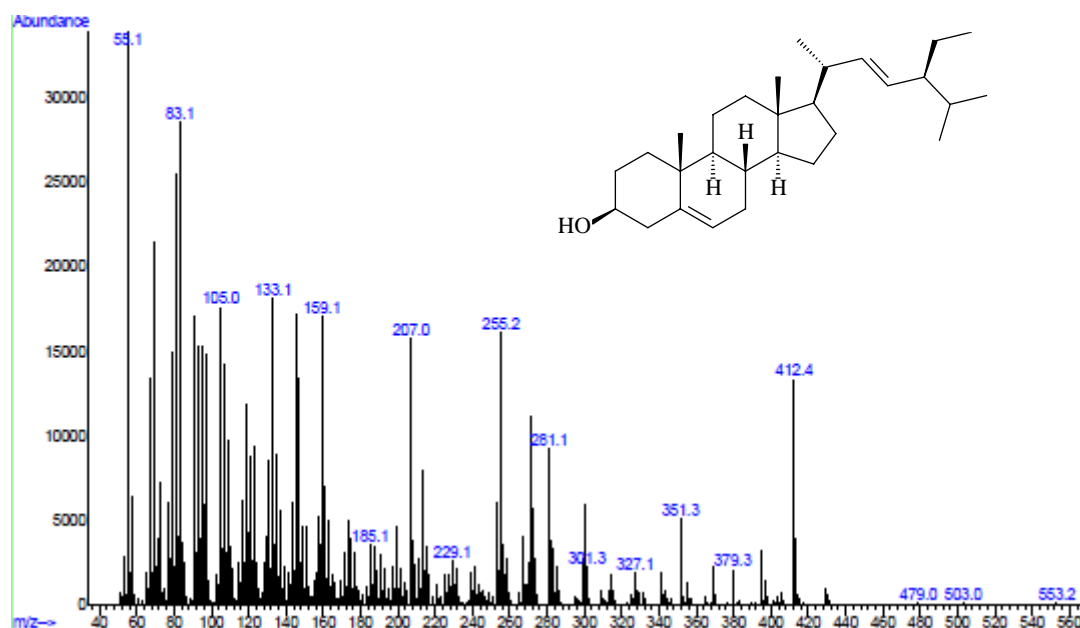


FIGURA 4.13: Espectro de massas (70 eV) da substância V.

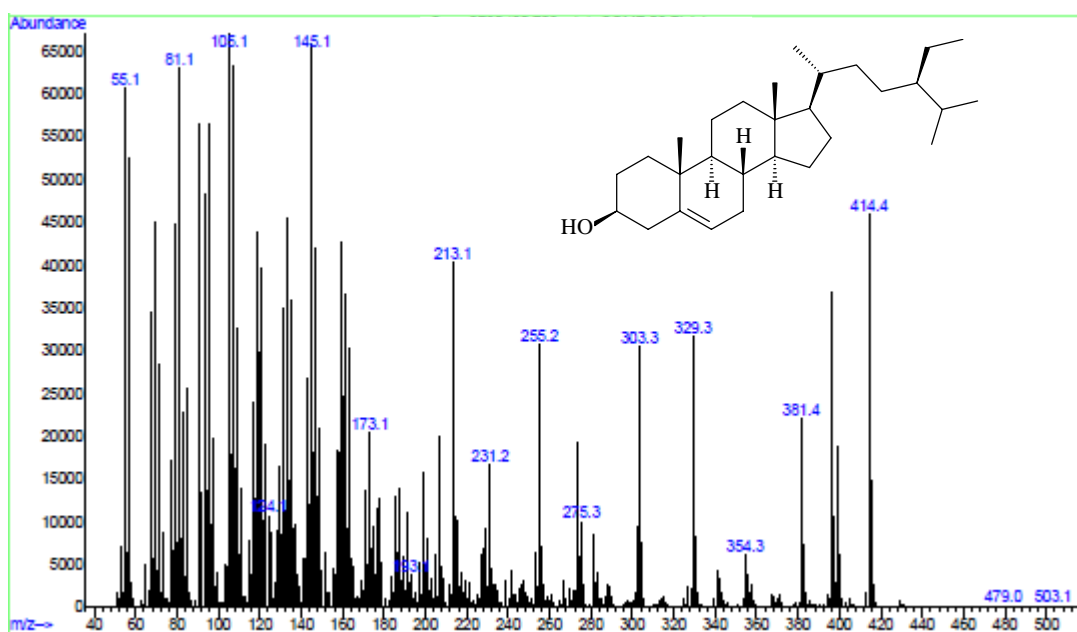


FIGURA 4.14: Espectro de massas (70 eV) da substância VI.

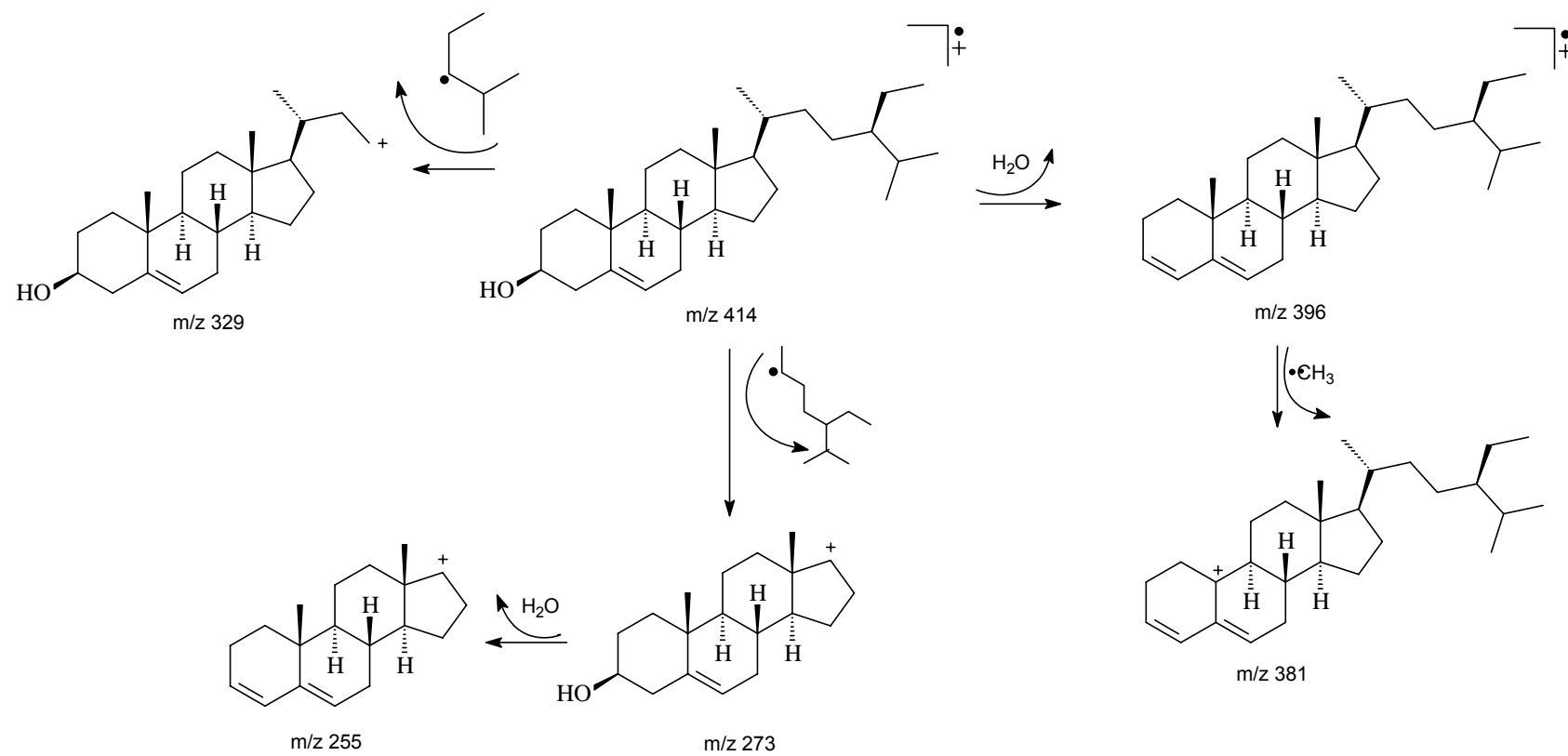
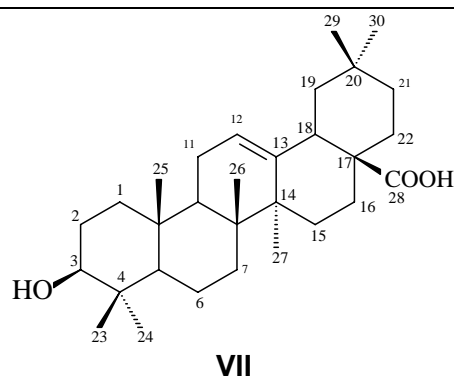


FIGURA 4.15: Proposta de fragmentação para o esteroide VI.

4.2.4 - Terpenoide ácido oleanólico (VII)

O ácido oleanólico ou ácido 3 β -hidróxi-olea-12-en-28-óico (VII), foi isolado da partição acetato de etila da espécie *B. coccolobifolia*, na forma de sólido branco e amorfo. Quando analisado por CCD e revelada em solução ácida de vanilina, apresentou uma mancha de coloração azulada. A substância foi identificada com base nos dados de RMN de ^1H em comparação com dados da literatura (VANDRESEN, 2005).

Os dados de RMN de ^1H (TABELA 4.5; FIGURA 4.16) mostram um tripleto em δ 5,24 (*t*, $J = 3,8$ Hz) referente a H-12. Como C-13 é quaternário, este sinal foi atribuído a H-12, sendo característica dos esqueletos dos olean-12-eno (VIEIRA-JUNIOR *et al.*, 2005; SOUZA, *et al.*, 2001). Para H-3 tem-se um multiplete em δ 3,14 (*m*) que confirma a posição α para o hidrogênio e β para a hidroxila ligada ao C-3, pois quando H-3 está na posição β , seu deslocamento ocorre em δ 3,40 (*m*) (SOUZA, *et al.*, 2001, CARVALHO, *et al.*, 1998). Um duplo dubleto foi observado em δ 2,86 (*dd*, $J = 4,3$ e 14,0 Hz) referente à H-18, que é vizinho a dois hidrogênios diastereotópicos (H-19a e H-19b), portanto acopla com os mesmos resultando em um duplo dubleto. Entre δ 0,7 – 1,6 têm-se os sinais referentes aos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Dentre os 6 sinais mais intensos, foi possível observar um deles que integra para 6 hidrogênios, totalizando assim as 7 metilas presentes na estrutura do ácido oleanólico (VII).

TABELA 4.5: Dados de RMN de ^1H para a substância **VII**.


H	δ_{H} (ppm) (400 MHz, CD_3OD)	δ_{H} (ppm) (300 MHz, CDCl_3) VANDRESEN, 2005
3	3,14 (<i>m</i> , 1H)	3,22 (<i>dd</i> , $J = 4,5$ e $10,2$ Hz, 1H)
12	5,24 (<i>t</i> , $J = 3,6$ Hz, 1H)	5,30 (<i>t</i> , $J = 3,6$ Hz, 1H)
18	2,85 (<i>dd</i> , $J = 4,3$ e $14,0$ Hz, 1H)	2,82 (<i>dd</i> , $J = 3,9$ e $12,9$ Hz, 1H)
23	0,97(<i>s</i> , 3H)	0,99 (<i>s</i> , 3H)
24	0,81(<i>s</i> , 3H)	0,78 (<i>s</i> , 3H)
25	0,91(<i>s</i> , 3H)	0,90 (<i>s</i> , 3H)
26	0,77 (<i>s</i> , 3H)	0,77 (<i>s</i> , 3H)
27	1,16 (<i>s</i> , 3H)	1,14 (<i>s</i> , 3H)
29	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,93 (<i>s</i> , 3H)
30	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,91 (<i>s</i> , 3H)

MF65.ESP

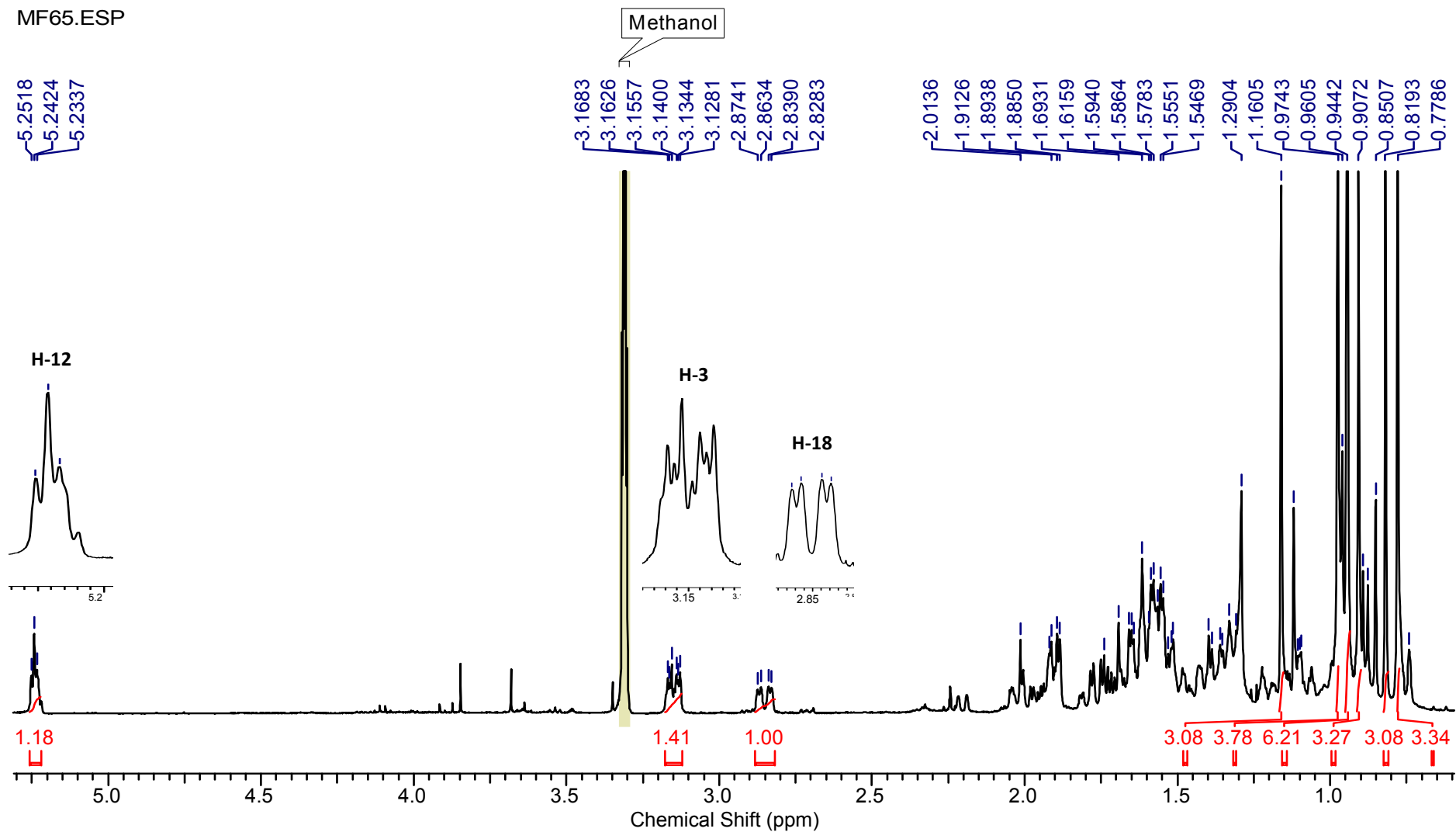


FIGURA 4.16: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância **VII**.

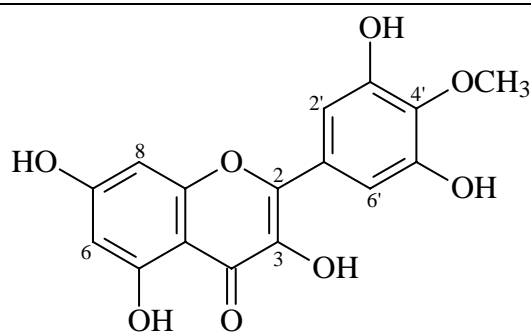
4.3 - Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *E. malaccensis*

4.3.1 - Flavonoide mearnsetina (VIII)

Da partição acetato de etila de *E. malaccensis* foi isolado o flavonoide mearnsetina ou 5,7,3',5'-tetra-hidroxi-4'-metoxiflavonol (VIII), que apresentou-se como um sólido amorfo e amarelo. Quando analisado em CCD e revelado em solução ácida de vanilina, mostrou uma macha amarela. A identificação foi feita com base nos dados de RMN de ^1H (TABELA 4.6) e em comparação com a literatura (ABBAS, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Analisando o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.17), observou-se a existência de sinais próximos a 7 ppm, sugerindo que os hidrogênios estivessem presentes em um sistema aromático. Esse comportamento se deve a fato dos hidrogênios do anel aromático ficarem fora da chamada "corrente de anel", deixando-os desblindados (SILVERSTEIN, 2007; PAVIA, 2001).

Os hidrogênios com deslocamento em δ 6,38 (*d*, $J = 2,0$ Hz) e δ 6,18 (*d*, $J = 2,0$ Hz) indicam acoplamento meta de um anel aromático, sendo referentes a H-8 e H-6, os quais correspondem ao anel A do flavonoide do tipo 5,7-diidroxilados (ISIDORO, *et al.*, 2012; LOPES, *et al.*, 2012; KALEGARI, 2009; FONSECA, *et al.*, 2007; MANGURO, *et al.*, 2005; ZHANG, *et al.*, 2005). O singlete observado em δ 3,88 (s), integrando para três hidrogênios, refere-se a hidrogênios de metoxila (LOPES, *et al.*, 2012; LI, *et al.*, 2012; MAGURO, *et al.*, 2005; MOREIRA, *et al.*, 2003) e o singlete em δ 7,31 (s) integrando para dois hidrogênios, são característicos de substituições no anel B (FONSECA *et al.*, 2007). Como o sinal em δ 7,31 é referente a dois hidrogênio, sugere-se que a molécula tenha uma simetria neste anel (B), logo estes sinais são atribuídos a H-2' e H-6', e a metoxila encontra-se ligada a C-4'. A ausência de um singlete entre δ 6,39 e 6,94, característico de H-3 de 5,7-diidroxiflavonas confirmou o padrão de substituição de um flavonol (SILVA, *et al.*, 2005), sendo esta substância identificada como mearnsetina (VIII).

TABELA 4.6: Dados de RMN de ^1H para a substância **VIII**.**VIII**

H	δ_{H} (ppm) (400 MHz, CD_3OD)	δ_{H} (ppm) (400 MHz, CDCl_3) OLIVEIRA, 2006	δ_{H} (ppm) (500 MHz, CD_3OD) ABBAS, 2007
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,37 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,17 (<i>d</i> , $J = 2,5$ Hz)
8	6,38 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,56 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,5$ Hz)
2' e 6'	7,31 (<i>s</i> , 2H)	7,49 (<i>s</i> , 2H)	7,30 (<i>s</i>)
4'-OCH₃	3,88 (<i>s</i> , 3H)	4,05 (<i>s</i> , 3H)	3,87 (<i>s</i>)

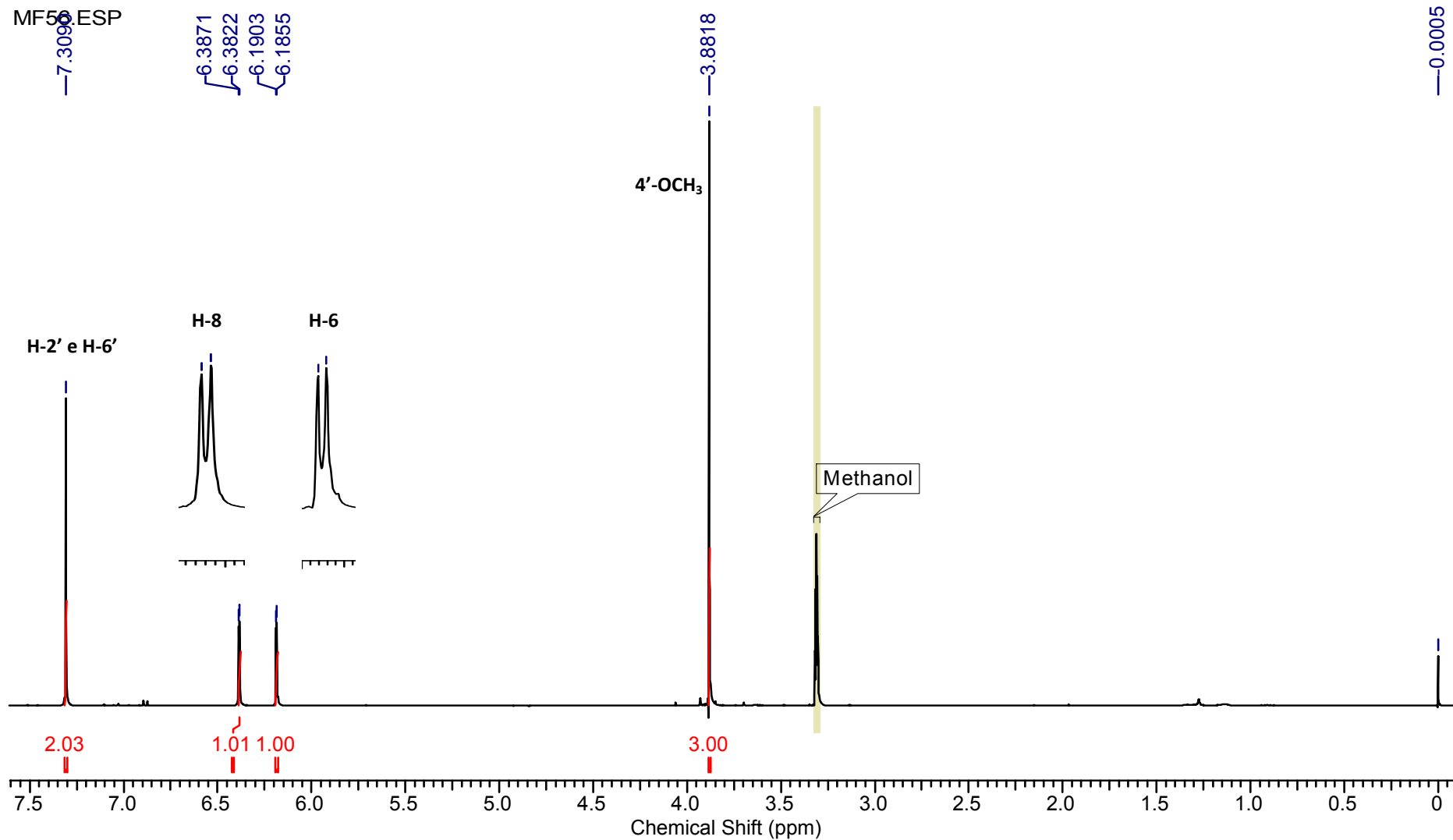


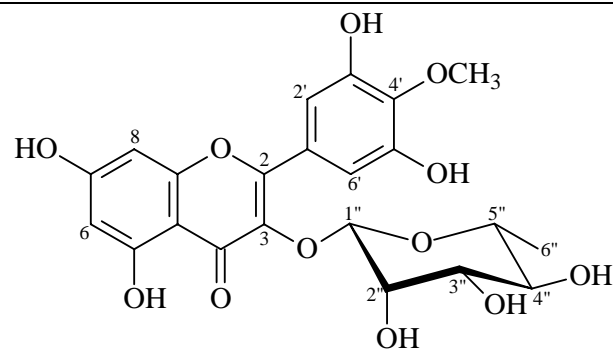
FIGURA 4.17: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) para a substância VIII.

4.3.2 - Flavonoide mearnsitrina (IX)

A substância mearnsitrina ou mearnsetina 3-ramnosídeo (IX) foi isolada da partição acetato de etila de *E. malaccensis* como um sólido amorfo e amarelo. Em CCD apresentou uma mancha amarela quando revelada em solução de vanilina. A identificação desta substância foi baseada nos dados de RMN de ^1H (TABELA 4.7) em comparação com a literatura (SINGAB, *et al.*, 2011; GLUCHOFF-FIASSON, *et al.*, 2001; BRACA, *et al.*, 2001; NOREEN, *et al.*, 1998; NAIR *et al.*, 1999).

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.18) da substância (IX) apresentou sinais semelhantes aos da substância (VIII), porém com alguns sinais na região δ 3,5 – 4,0 característicos de flavonoides com resíduo de monossacarídeo (VALENTÃO, 2002). A presença de um dubleto em δ 5,31 (*d*, $J = 1,6$ Hz), referente ao hidrogênio anomérico, e um dubleto em δ 0,95 (*d*, $J = 5,5$ Hz) sugerem a ligação de um heterosídeo do tipo ramnose (FONSECA, *et al.*, 2007; MOREIRA, *et al.*, 2003). Estes sinais, juntamente com dois duplos dubletos em δ 3,75 (*dd*, $J = 3,3$ e 9,0 Hz) e 4,23 (*dd*, $J = 1,6$ e 3,3 Hz), comparados com dados da literatura, destacam a presença de uma ramnose ligada ao flavonoide (NOREEN, *et al.*, 1998; NAIR *et al.*, 1999). A posição da ligação pode ser confirmada pelo valor dos carbonos anoméricos e metílico da ramnose. Valores acima de δ 1,20 para hidrogênios metílicos e entre δ 5,22 – 5,75 para hidrogênios ligados a carbono anomérico, indicam ligação na posição 7, enquanto que valores próximos de δ 0,90 e entre δ 4,96 – 5,36 para referidos hidrogênios, indicam ligação na posição 3 (SILVA, *et al.*, 2005). Logo, conclui-se que a ramnose está ligada em C-3.

Os sinais em δ 6,36 (*d*, $J = 1,5$ Hz) e δ 6,21 (*d*, $J = 1,5$ Hz) são referentes ao acoplamento meta de H-8 e H-6, os quais correspondem ao anel A do flavonoide do tipo 5,7-diidroxilados (ISIDORO, *et al.*, 2012; LOPES, *et al.*, 2012). O singleto observado em δ 3,88 (*s*) foi atribuído a metoxila em C-4' (LI, *et al.*, 2012) e o singleto em δ 6,88 (*s*), integrando para dois hidrogênios, a H-2' e H-6'. A comparação dos dados de RMN de ^1H com a literatura confirmam a identificação da substância como sendo o flavonol glicosilado mearnsitrina (IX).

TABELA 4.7: Dados de RMN de ^1H para a substância IX.

IX

H	δ (ppm) (400 MHz, CD_3OD)	(500 MHz, DMSO) GLUCHOFF-FIASSON, 2001	(500 MHz, DMSO) SINGAB, 2011
6	6,36 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz, 1H)	6,23 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	6,10 (<i>d</i> , $J = 2,5$ Hz, 1H)
8	6,21 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz, 1H)	6,40 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	6,30 (<i>d</i> , $J = 2,5$ Hz, 1H)
2' e 6'	6,88 (<i>s</i> , 2H)	6,80 (<i>d</i> , $J = 0,9$ Hz)	6,80 (<i>s</i> , 2H)
4'	3,88 (<i>s</i> , 3H)	3,74 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i> , 3H)
1''	5,31 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz, 1H)	5,10 (<i>d</i> , $J = 1,0$ Hz)	5,10 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz, 1H)
2''	4,23 (<i>dd</i> , $J = 1,5$ e 3,1 Hz, 1H)	4,05 (<i>dl</i>)	3,1-3,7 (<i>m</i> , 4H)
3''	3,75 (<i>dd</i> , $J = 3,1$ e 9,0 Hz, 1H)	3,76 (<i>dd</i> , $J = 3,2$ e 9,7 Hz)	3,1-3,7 (<i>m</i> , 4H)
4'' e 5''	3,34 (<i>m</i> , 2H)*	3,70 (<i>dd</i> , $J = 9,7$ e 9,8 Hz) 3,30 (<i>dd</i> , $J = 6,1$ e 9,8 Hz)	3,1-3,7 (<i>m</i> , 4H) 3,1-3,7 (<i>m</i> , 4H)
6''	0,95 (<i>d</i> , $J = 5,5$ Hz, 3H)	0,80 (<i>d</i> , $J = 6,1$ Hz)	0,79 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz, 3H)

*sinal coincidente com o sinal solvente

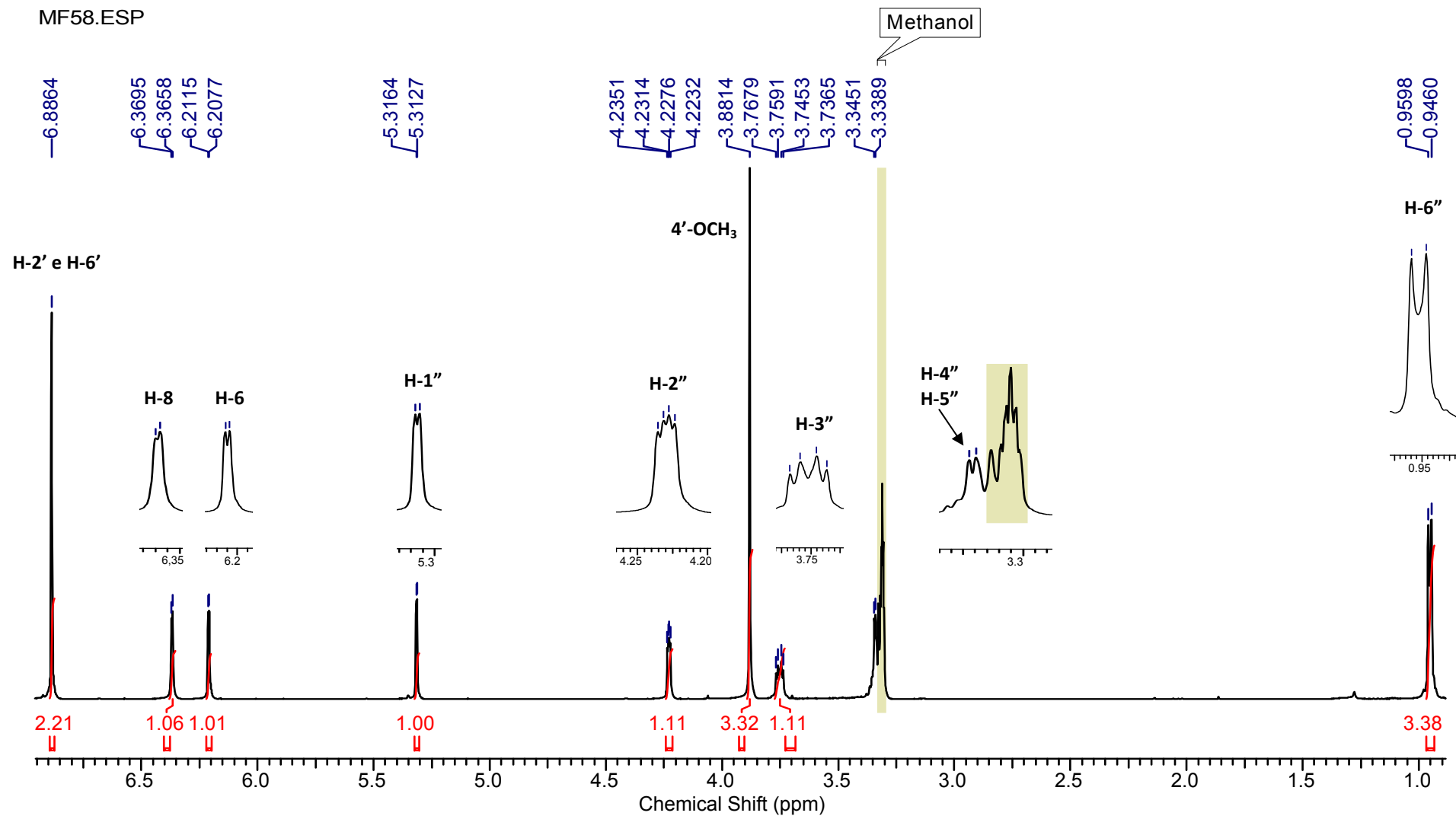


FIGURA 4.18: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) para a substância IX.

4.4 - Resultados Biológicos de inibição das Catepsinas K, V e L

Na busca por potentes inibidores das catepsinas, recentes avanços foram feitos chegando a inibidores bem caracterizados farmacologicamente *in vitro* e *in vivo*, e que avançaram para ensaios clínicos no tratamento da osteoporose, osteoartrite, doenças metastáticas associadas com a mama e próstata. Nos últimos anos o interesse das empresas farmacêuticas evoluiu na concepção e desenvolvimento de eficientes compostos seletivos e seguros, com avanços significativos para potentes inibidores peptídicos frente à catepsina K (BRÖMME & LECAILLE, 2011).

A maioria dos inibidores descritos na literatura interage com as cisteíno peptidases através de resíduos de aminoácidos em subsítios específicos que facilitam a ação dos grupos funcionais reativos com o centro ativo das enzimas. Baseado nesse mecanismo de ação, inúmeros inibidores peptídicos e não peptídicos estão sendo investigados na tentativa de inibir seletivamente a ação dessas enzimas (CHEN, *et al.*, 2012; EHMKE, *et al.*, 2012; BRÖMME & LECAILLE, 2011; SEVERINO, *et al.*, 2011; ALVIM, *et al.*, 2010; YASUDA, *et al.*, 2005; SCHIRMEISTER & KAEPLER, 2003; BRÖMME & KALETA, 2002).

Estudos baseados em produtos naturais mostram que alcalóides acridônicos isolados de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae) são potentes inibidores da catepsina V, com valores de IC₅₀ no intervalo de 1,2 - 3,9 µM, sendo o alcalóide citibrasine um inibidor do tipo competitivo com K_i de 0,2 µM (SEVERINO, *et al.* 2011). Coleções combinatórias de chalconas e flavonas, assim como acridonas e 4-quinolinonas sintéticas foram avaliadas como inibidores das catepsinas L e V, apresentando diferentes mecanismos de inibição (MARQUES, *et al.*, 2012; ALVIM *et al.*, 2010). Recentemente relatou-se que icariine, um flavonol glicosilado isolado de *Herba epimedii* (erva utilizada na medicinal tradicional chinesa no tratamento de artrite), inibiu *in vitro* a atividade da catepsina K e mostrou-se eficiente no tratamento de modelos de camundongos com artrite, sugerindo que este metabólito pode ser promissor no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (SUN, *et al.*, 2013).

Diante do panorama apresentado, torna-se evidente a necessidade e o desafio que representa a busca por inibidores de catepsinas,

podendo as plantas ser consideradas promissoras na busca de um potencial inibidor para essas enzimas.

Neste contexto os extratos etanólicos e partições de *B. coccolobifolia* e *E. malaccensis* foram avaliados *in vitro* frente às catepsinas V, K e L, nas concentrações de 125 e 50 µg/mL, mostrando inibição superior a 50% na maioria dos testes (TABELA 4.8). No caso de *B. coccolobifolia* apenas a partição **BCFH** (50 µg/mL) mostrou baixa inibição para as catepsinas K e L. Já *E. malaccensis* mostrou resultados mais heterogêneos, apresentando atividade inibitória mais expressiva para a catepsina V. Das substâncias isoladas apenas as substâncias **VIII** e **IX** puderam ser ensaiadas frente às catepsinas K e V, não apresentando resultado biológico significativo na concentração de 25 µM (TABELA 4.9).

TABELA 4.8: Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas V, K e L.

Amostras	% DE INIBIÇÃO					
	Catepsina V		Catepsina K		Catepsina L	
	125 µg/mL	50 µg/mL	125 µg/mL	50 µg/mL	125 µg/mL	50 µg/mL
EMF	96	96	83	56	93	93
EMFH	95	82	41	41	0	0
EMFA	99	94	82	35	37	4
EMFW	95	95	80	74	94	94
EML	97	97	97	95	98	98
EMLH	92	87	100	91	98	98
EMLA	97	97	97	80	96	80
EMLW	94	94	63	37	60	53
EMC	95	93	56	6	46	43
EMCH	100	90	55	19	38	24
EMCA	97	94	62	13	62	52
EMCW	96	93	43	22	48	43
BCC	99	97	91	90	97	96
BCCH	*	*	*	*	*	*
BCCA	*	*	*	*	*	*
BCCW	*	*	*	*	*	*
BCF	99	99	92	90	100	98
BCFH	99	89	92	22	83	35
BCFA	100	98	98	68	98	90
BCFW	*	*	*	*	*	*
BCR	99	99	93	92	99	97
BCRH	92	98	92	63	98	86
BCRA	99	100	98	92	99	99
BCRW	99	98	95	88	98	98

* Não realizados. Legenda: BC = *B. coccolobifolia*; EM = *E. malaccensis*; F = folha; C = caule; L = flores; R = raiz; H = partição em hexano; A = partição em acetato de etila; W = partição hidroalcoólica.

TABELA 4.9: Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas V, K e L, para os flavonoides isolados VIII e IX.

Amostras	% DE INIBIÇÃO (25 µg/mL)		
	Catepsina V	Catepsina K	Catepsina L
Substância VIII	20	0	16
Substância IX	18	0	12

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento químico das espécies *B. coccolobifolia* (Malpighiaceae) e *E. malaccensis* (Myrtaceae) e deixa evidente o potencial dessas plantas na busca por inibidores de catepsinas.

Até o presente momento foi possível identificar sete substâncias do extrato etanólico das raízes de *B. coccolobifolia*, todas pertencentes à classe dos terpenoides. Os compostos majoritários isolados deste extrato foram os triterpenos α -amirina (I) e β -amirina (II), identificados em mistura (cerca de 2 g). Além disso, pode-se identificar a mistura dos esteroides campesterol (III), estigmasterol (IV) e β -sitosterol (V), metabólitos secundários de grande abundância no reino vegetal. Também foram isolados dois triterpenos pentacíclicos, sendo o ácido oleanólico (VI) do tipo oleaneno e glochidonol (VII) do tipo lupano, este último relatado pela primeira vez no gênero *Byrsonima*.

Da espécie *E. malaccensis*, foram isolados e identificados dois flavonoides do tipo flavonol, sendo estes mearnsetina (VIII) e mearnsitrina (IX), ambos já relatados para esta espécie (SINGAB, 2011; ABBAS, 2007; OLIVEIRA, *et al.*, 2006; GLUCHOFF-FIASSON, 2001; BRACA, *et al.*, 2001; NAIR, *et al.*, 1999; NOREEN, *et al.*, 1998).

A avaliação biológica dos extratos e frações (125 e 50 $\mu\text{g/mL}$) frente às catepsinas K, V e L mostraram resultados promissores, pois em todos os casos observou-se inibição superior a 50%, o que motivou o estudo químico dessas duas espécies. De um modo geral os extratos das folhas, flores e caule da espécie *E. malaccensis* mostraram-se mais ativos frente à catepsina V. Já os extratos etanólicos e as partições de *B. coccolobifolia* mostraram resultados significativos frente as três catepsinas, com exceção da partição em hexano do extrato das folhas que teve um decréscimo significativo de inibição para a catepsina L a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Embora não foi possível obter nenhuma substância ativa frente ao modelo biológico utilizado, os resultados obtidos com os extratos e frações mostram que estas duas espécies podem ser promissoras na busca por inibidores de catepsinas.

6 - REFERÊNCIAS

- ABBAS, F.A.; AL-MASSARANY, S.M.; KHAN, S.; AL-HOWIRINY, T.A.; MOSSA, J.S. & ABOURASHED, E.A. "Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L." *Nat. Prod. Resear.*, 21: 383, **2007**.
- ABREU, R.C.R.; ASSIS, G.B.; FRISON, S.; AGUIRRE, A. & DURIGAN, G. "Can native vegetation recover after slash pine cultivation in the Brazilian Savanna". *For. Ecol. Manage.*, 262: 1452, **2011**.
- ABOOTT, I.A. & SHIMAZU, C. "The geographic origin of the plants most commonly used for medicine by Hawaiians". *J. Ethnopharmacol.*, 14: 213, **1985**.
- AID-N.com, Educational Technology Research and Development. Common Definition of Biodiversity Hotspot. 2012. <<http://www.aid-n.com/common-definition-of-biodiversity-hotspot/>> Acesso em: 17 de julho de 2013.
- AISHA, A.F.A.; SALAH, K.M.A.; ALROKAYAN, A.A.; SIDDIQUI, M.J.; ISMAIL, Z. & MAJID, A.M.S.A. "Syzygium aromaticum extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast cancer". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22: 335, **2012**.
- ALBERNAZ, L.C.; PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L. & ESPINDOLA, L.S. "Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts". *J. Ethnopharmacol.*, 131: 116, **2010**.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; JUNIOR, A.S. & ZANI, C.L. "Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 367, **2000**.
- ALVIM, J.JR.; SEVERINO, R.P.; MARQUES, E.F.; MARTINELLI, A.M.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F. & CORREA, A.G. "Solution Phase Synthesis of a Combinatorial Library of Chalcones and Flavones as Potent Cathepsin V Inhibitors". *J. Comb. Chem.*, 12: 687, **2010**.
- ANDRADE, M. R. Alcaloides de Rutaceae: Química e Atividade Biológica. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 216 p.
- BALIGA, M.S.; BHAT, H.P.; BALIGA, B.R.V.; WILSON, R. & PALATY, P.L. "Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review". *Food Res. Int.*, 44: 1776, **2011**.
- BATALHA, M.A.; SILVA, I.A.; CIANCIARUSO, M.V.; FRANÇA, H. & CARVALHO, G.H. "Phylogeny, traits, environment, and space in cerrado plant communities at Emas National Park (Brazil)". *Flora*, 206: 949, **2011**.
- BRACA, A.; BILIA, A.R.; MENDEZ, J. & MORELLI, I. "Myricetin glycosides from *Licania densiflora*". *Rev. Fitoter.*, 72: 182, **2001**.
- BENEZAR, R.M.C & PESSONI, L.A. "Biologia floral e sistema reprodutivo de *Byrsonima coccolobifolia* (Kunth) em uma savana amazônica". *Acta Amazon.*, 36: 159, **2006**.
- BERLINCK, R.G.S. "Bioprospecção no Brasil: um breve histórico". *Ciência e Cultura*, 64: 2012.

- <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000300010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 de julho de 2013.
- BIFFIN, E.; LUCAS, E. J.; CRAVEN, L.A.; COSTA, I.R.; HARRINGTON, M.G. & CRISP, M.D. "Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae". *Ann. Bot.*, 106: 79, **2010**.
- BIX, K.; DUNKHORST, A.; MAYER, K. & JORDANS, S. "Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions". *Biochimie*, 90: 194, **2008**.
- BOURDY, G.; CABALION, P.; AMADE, P. & LAURENT, D. "Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning". *J. Ethnopharmacol.*, 36: 163, **1992**.
- BRADACS, G.; HEILMANN, J. & WECKERLE, C.S. "Medicinal plant use in Vanuatu: A comparative ethnobotanical study of three Islands". *J. Ethnopharmacol.*, 137: 434, **2011**.
- BRUSTEIN, V.P.; SOUZA-ARAÚJO, F.V.; VAZ, A.F.M.; ARAÚJO, R.V.S.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. & CORREIA, M.T.S. "A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that simulates cutaneous healing in mice model". *Inflammopharmacol.*, 20: 315, **2012**.
- BRÖMME, D. & KALETA, J. "Thiol-Dependent Cathepsins: Pathophysiological Implications and Recent Advances in Inhibitor Design". *Curr. Pharm. Des.*, 8: 99, **2002**.
- BRÖMME, D. & LECAILLE, F. "Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects". *Expert Opin. Investig. Drugs*, 18: 585, **2011**.
- BUENZ, E.J.; JOHNSON, H.E.; BEEKMAN, E.M.; MOTLEY, T. & BAUER, B.A. "Bioprospecting Rumphius's Ambonese Herbal: Volume I". *J. Ethnopharmacol.*, 96: 57, **2005**.
- CARPENTER, R.C.; SOTHEESWARAN, S.; SULTANBAWA, M.U.S. & BALASUBRAMANIAM, S. "Triterpenes of five Euphorbiaceae species of Sri Lanka". *Phytochem.*, 19: 1171, **1980**.
- CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F. & BEZERRA, F.B. "Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae)". *Quim. Nova*, 21: 740, **1998**.
- CATALDO, A.M. & NIXON, R.A. "Enzymatically activity lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 3861, **1990**.
- CECÍLIO, A.B.; FARIA, D.B.; OLIVEIRA, P.C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M.E.G.; DUARTE, M.G.R.; MOREIRA, C.P.S.; SILVA, C.G. & ALMEIDA, V.L. "Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus". *J. Ethnopharmacol.*, 141: 975, **2012**.
- CETTO, A.A.; JIMÉNEZ, J.B. & VÁZQUEZ, R.C. "Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes". *J. Ethnopharmacol.*, 116: 27, **2008**.
- CHEN, K.L.; CHANG, W.S.W.; CHEUNG, C.H.A.; LIN, C.C.; HUANG, C.C.; YANG, Y.N, KUO, C.P.; KUO, C.C.; CHANG, Y.H.; LIU, K.J.; WUF, C.M. &

- CHANG, J.Y. "Targeting cathepsin S induces tumor cell autophagy via the EGFR-ERK signaling pathway". *Cancer Lett.*, 317: 89, **2012**.
- CHEN, H.; ZUO, Y. & DENG, Y. "Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, 913: 387, **2001**.
- COLBERT, J.D.; MATTHEWS, S.P.; MILLER, G. & WATTS, C. "Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response". *Eur. J. Immunol.*, 39: 2955, **2009**.
- COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.A.; BRIGHENTE, I.M.C. & RODRIGUES, A.L.S. "Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice". *J. Ethnopharmacol.*, 143: 720, **2012**.
- COPELAND, R.A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey, Wiley, 2005.
- COSTA, G.F.M.; NOCCHI, S.R.; CEOLE, L.F.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; TEMPONI, L.G. & NAKAMURA, T.U. "Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil". *J. Ethnopharmacol.*, 143: 631, **2012**.
- CRAGG, G.M. & NEWMAN, D.J. "Natural products: A continuing source of novel drug leads". *Biochim. Biophys. Acta*, 1830: 3670, **2013**.
- DE-EKNAMKUL, W. & POTDUANG, B. "Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units". *Phytochem.*, 62: 389, **2003**.
- DUNSTAN, C.A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P.A.; PERERA, P. & BOHLIN, L. "Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays". *J. Ethnopharmacol.*, 57: 35, **1997**.
- EHMKE, V.; QUINSAAT, J.E.Q.; RIVERA-FUENTES, P.; HEINDL, C.; FREYMOND, C.; ROTTMANN, M.; BRUN, R.; SCHIRMEISTER, T. & DIEDERICH, F. "Tuning and predicting biological affinity: aryl nitriles as cysteine protease inhibitors". *Org. Biomol. Chem.*, 10: 5764, **2012**.
- FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M. & DUARTE, L.P. "Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinoceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto". *Quim. Nova*, 30: 842, **2007**.
- GARG, V.K. & NES, W.R. "Codisterol and other Δ^5 -sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*". *Phytochem.*, 23, 2925, **1984**.
- GELB, B.D.; SHI, G.P.; CHAPMAN, H.A. & DESNICK, R.J. "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency". *Science*, 273: 1236, **1996**.
- GILIOLI, A. Análise fitoquímica e atividade biológica de *Eugenia umbelliflora*. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSC, 2010. Dissertação de mestrado, 103 p.

GLUCHOPP-FIASSON, K.; FENET, B.; LECLERC, J.C.; REYNAUD, J.; LUSSIGNOL, M. & JAY, M. "Three New Flavonol Malonylrhamnosides from *Ribes alpinum*". *Chem. Pharm. Bull.*, 49:768, **2001**.

GU, J.Q.; PARK, E.J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M.E.; MEHTA, R.G.; FARNSWORTH, N.R.; PEZZUTO, J.M. & KINGHORN, A.D. "Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity". *Phytochem.*, 58: 121, **2001**.

HALDER, S.; MEHTA, A.K.; MEDIRATTA, P.K. & SHARMA, K.K. "Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 385: 587, **2012**.

HARON, N.W.; MOORE, D.M. & HARBORNE, J.B. "Distribution and Taxonomic Significance of Flavonoids in the Genus *Eugenia* (Myrtaceae)". *Biochem. Systemad. Ecol.*, 20: 266, **1992**.

HU, Y.C.; LUO, Y.D.; LI, L.; JOSHI, M.K. & LU, Y.H. "In Vitro Investigation of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone for Glycemic Control". *J. Agric. Food Chem.*, 60: 10683, **2012**.

HUI, W.H. & LI, M.M. "Lupene triterpenoids from *Glochidion eriocarpum*". *Phytochem.*, 15: 561, **1976**.

IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Brasil, 2010. <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2013.

ISHIKAWA, T.; DANATINI, R.S.; DIAZ, I.E.C.; YOSHIDA, M.; BACCHI, E.M. & KATO, E.T.M. "Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats". *J. Ethnopharmacol.*, 118: 527, **2008**.

ISIDORO, M.M.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; ARRUDA, A.C. & SILVA, S.C. "Fitoquímica e Quimiossistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)". *Quim. Nova*, 35: 2119, **2012**.

JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S. & WAGNER, H. "Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("PAUPEREIRA")". *Quim. Nova*, 27: 897, **2004**.

KALA, M.J.; SORIS, T. & MOHAN, V.R. "GC-MS determination of bioactive components of *Eugenia floccosa* BEDD. (Myrtaceae)". *Int. J Pharm. Bio. Sci.*, 3: 277, **2012**.

KALEGARI, M. Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Rourea induta* PLANCH, CONNARACEAE. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR, 2009. Dissertação de Mestrado, 120 p.

KIM, S.H.; LEE, E.; BAEK, K.H.; KNOW, H.B.; WOO, H.; LEE, E.S.; KNOW, Y. & NA, Y. "Chalcones, inhibitors for topoisomerase I and cathepsin B and L, as potential anti-cancer agents". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23: 3320, **2013**.

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

- KOS, J. & LAH, T.T. "Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer". *Oncol. Rep.*, 5: 1349, **1998**.
- KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S. "The cathepsin family and their role in colorectal cancer". *Pathol. Res. Pract.*, 204: 491, **2008**.
- KUSKOSKI, E.M.; VEGA, J.M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M. & ASUERO, A.G. "Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacüu (*Eugenia umbelliflora* Berg)". *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5450, **2003**.
- LAFARGE, J.C.; NAOUR, N.; CLÉMENT, K. & MILLO, M.G. "Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity". *Biochimie*, 92: 1580, **2010**.
- LAGO, J.H.G.; SOUZA, E.D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M.A.; MARTINS, R.C.C.; BAROLI, A.A.; CARVALHO, B.A.; SOARES, M.G.; SANTOS, R.T.; & SARTORELLI, P. "Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel". *Molecules*, 16: 9827, **2011**.
- LI, H.Z.; SONG, H.J.; LI, H.M.; PAN, Y.Y. & LI, R.T. "Characterization of Phenolic Compounds from *Rhododendron alutaceum*". *Arch. Pharm. Res.*, 35: 1887, **2012**.
- LI, L.; WANG, X.; FEI, X.; XIA, L.; QIN, Z. & LIANG, Z. "Parkinson's disease involves autophagy and abnormal distribution of cathepsin L". *Neurosci. Lett.*, 489: 62, **2011**.
- LOCHER, C.P.; WITVROUW, M.; PIERRE DE BÉTHUNE, M.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; DAVIS, H.; LASURE, A.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E. & VLIETINCK, A.J. "Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)". *Phytomedicine*, 2: 259, **1996**.
- LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; POEL, B.V.; LASURE, A.; BERGHE, D.A.V. & VLIETINCK, A.J. "Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants". *J. Ethnopharmacol.*, 49: 23, **1995**.
- LOPES, E.L.; NETO, M.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. & BRAZ-FILHO, R. "Flavonoides e Sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth". *Quim. Nova*, 35: 2169, **2012**.
- LORENZI, K.C.; RODRIGUES, C.M.; SANNOMIYA, M.; RINALDO, D.; BRITO, A.R.M.S. & VILEGAS, W. "Constituintes das folhas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae)". Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (30ª SBQ), Águas de Lindóia – SP, 2007. <<https://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1677-1.pdf>> Acesso em 19 de julho de 2013.
- LORENZI, K. C, RODRIGUES, C. M, SANNOMIYA, M, ALMEIDA, L. F. R, BRITO, A. R. M. S, VILEGAS, W. "Estudo químico das folhas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae)". Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (29ª SBQ), Águas de Lindóia – SP, 2006. <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0789-1.pdf>> Acesso em 19 de julho de 2013.

- LORENZI, H. ÁRVORES exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium de Estudos da Flora, **2003**. 367 p.
- LOWRY, J.B. "Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families". *Phytochem.*, 15: 513, **1976**.
- LOWRY, J.B. "The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids". *Phytochem.*, 7: 1803, **1968**.
- LUTGENS, S.P.M.; CLEUTJENS, K.B.J.M.; DAEMEN, M.J.A.P. & HEENEMEN, S. "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease". *The FASEB Journal*, 21: 3029, **2007**.
- MAMEDE, M.C.H. 2013. *Byrsonima* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8831>> Acesso em 18 de julho de 2013.
- MANAHARAN, T.; MING, C.H. & PALANISAMY, U.D. "Syzygium aqueum leaf extract and its bioactive compounds enhances pre-adipocyte differentiation and 2-NBDG uptake in 3T3-L1 cells". *Food Chem.*, 136: 354, **2013**.
- MAGURO, L.O.A.; UGI, I. & LEMMEN, P. "Flavonol Glycosides from the Leaves of *Embelia keniensis*". *J. Chin. Chem. Soc.*, 52: 201, **2005**.
- MARIENHAGEN, J & BOTT, M. "Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products". *J. Biotechnology*, 163: 166, **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.; BÖMME, D.; VIEIRA, P.C. & CORRÊA, A.G. "Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V". *Eur. J. Med. Chem.*, 54: 10, **2012**.
- MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P. & DAVID, J.P. "Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*". *Quim. Nova*, 22, **1999**.
- MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M.E.; RINALDO, D.; SANTOS, L.C.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. & SALGADO, H.R.N. "Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18: 690, **2008**.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biodiversidade Brasileira. Brasília, 2013. <www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: 07 de junho de 2013.
- MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C. & PIZZOLATTI, M.G. "Flavonoides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*". *Quim. Nova*, 26: 309, **2003**.
- MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R.J.; WIGDAHL, B. & PARVEEN, Z. "Antiviral potentials of medicinal plants". *Virus Res.*, 131: 111, **2008**.

NAKAMURA, M.J.; MONTEIRO, S.S.; BIZARRI, C.H.B.; SIANI, A.C. & RAMOS, M.F.S. "Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast". *Biochem. System. Ecol.*, 38: 1170, **2010**.

NAIR, A.G.R.; KRISHNAN, S.; RAVIKRISHNA, C. & MADHUSUDANAN, K.P. "New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*". *Rev. Fitoter.*, 70: 148, **1999**.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 new years from 1981 to 2010". *J. Nat. Prod.*, 75: 311, **2012**.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N. & FILHO, V.C. "Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos" IN: CIÊNCIAS FARMACEUTICAS: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. BRESOLIN, T. M. B & FILHO, V. C. Editora Univali, Itajaí, **2003**. p. 11 – 56.

NORREN, Y.; SERRANO, G.; PERERA, P. & BOHLIN, L. "Flavan-3-ols Isolated from Some Medicinal Plants Inhibiting COX-1 and COX-2 Catalysed Prostaglandin Biosynthesis". *Planta Med.*, 64: 520, **1998**.

NOVINEC, M.; PAVŠIČ, M. & LENARČIČ, B. "A simple and efficient protocol for the production of recombinant cathepsin V and other cysteine cathepsins in soluble form in *Escherichia coli*". *Protein Expr. Purif.*, 82: 1, **2012**.

OGUNKOYA, L. Application of Mass Spectrometry in structural problems in triterpenes". *Phytochem.*, 20: 121, **1981**.

OLIVEIRA, V.B.; YAMADA, L.T.; FAGG, C.W. & BRANDÃO, M.G.L. "Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds". *Food Res. Int.*, 48: 170, **2012**.

OLIVEIRA, A.M.; HUMBERTO, M.M.S.; SILVA, J.M.; ROCHA, R.F.A. & SANT'ANA, A.E.G. "Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16: 618, **2006**.

OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M. & CÂMARA, C.A.G. "Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 15: 39, **2005**.

ORLANDI, L.; VILELA, F.C.; CECÍLIA, F.V.S.; DIAS, D.F.; SILVA, G.A. & PAIVA, A.G. "Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss". *J. Ethnopharmacol.*, 137: 1469, **2011**.

PALMA, C.M. & PALMA, M.S. "Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos". *Cienc. Cult.*, 64: 22, **2012**.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M. & KRIZ, G.S. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3a ed. Melbourne: Thomson Learning, **2001**. 579 p.

PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R. C. & BRUNETTI, I.L. "Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes". *J. Ethnopharmacol.*, 96: 43, **2005**.

- PRESCOTT, T.A.K.; KIAPRANIS, R. & MACIVER, S.K. "Comparative ethnobotany and in-the-field antibacterial testing of medicinal plants used by the Bulu and inland Kaulong of Papua New Guinea". *J. Ethnopharmacol.*, 139: 497, **2012**.
- PUAPAIROJ, P.; NAENGCHOMNONG, W.; KIJJOA, A.; PINTO, M.M.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M.S.J.; SILVA, A.M.S. & HERZ, W. "Citotoxic Activity of Lupane-Type from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* Two of which Induce Apoptosis". *Planta Med.*, 71: 208, **2005**.
- QI, L.W.; LIU, E.H.; CHU, C.; PENG, Y.B.; CAI, H.X. & LI, P. "Anti-Diabetic Agents from Natural Products—An Update from 2004 to 2009". *Curr. Top. Med. Chem.*, 10: 434, **2010**.
- QIN, Y. & SHI, G.P. "Cysteinyl cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases". *Pharmacol. Ther.*, 131: 338, **2011**.
- Burnouf-Radosevich, M.; Delfel, N.E. & England, R. "Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane- and ursane-type triterpanes—application to *Chenopodium quinoa* triterpenes". *Phytochem.*, 24: 2063, **1985**.
- REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J. & KENNELLY, E.J. "Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits". *Food Chem.*, 109: 883, **2008**.
- REPNIK, U.; STOKA, V.; TURK, V. & TURK, B. "Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death". *Biochim. Biophys. Acta.*, 1824: 22, **2012**.
- RIBEIRO, S.C.; FEHRMANN, L.; SOARES, C.P.B.; JACOVINE, L.A.G.; KLEINN, C. & GASPAR, R.O. "Above- and belowground biomass in a Brazilian Cerrado". *For. Ecol. Manage.*, 262: 491, **2011**.
- ROOSITA, K.; KUSHARTO, C.M.; SEKIYAMA, M.; FACHRUROZI, Y. & OHTSUKA, R. "Medicinal plants used by the villagers of a Sundanese community in West Java, Indonesia". *J. Ethnopharmacol.*, 115: 72, **2008**.
- ROUHI, A.M. "Rediscovering natural products". *Chem. Engin. News.*, 13: 77, **2003**.
- RUYSSCHAERT, S.; ANDEL, T.V.; PUTTE, K.V. & DAMME, P.V. "Bathe the baby to make it strong and healthy: Plant use and child care among Saramaccan Maroons in Suriname". *J. Ethnopharmacol.*, 121: 148, **2009**.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, L.C.; LIMA, C.A.H.; BRITO, A.R.M.S. & VELEGAS, W. "Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts". *J. Ethnopharmacol.*, 97: 1, **2005**.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C.R.P.; FIGUEIREDO, M.E.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SANTOS, F.V.; SERPELONI, J.M.; CÓLUS, I.M.S.; VILEGAS, W. & VARANDA, E.A. "Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts". *J. Ethnopharmacol.*, 112: 319, **2007**.
- SANTOS, T.R.R.; PINTO, J.R.R. & LENZA, E. "Floristic relationships of the woody component in rocky outcrops savanna áreas in Central Brazil". *Flora*, 207: 541, **2012**.

SCHIRMEISTER, T. & KAEPLER, U. "Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases". *Mini Rev. Med. Chem.*, 3: 361, **2003**.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R.V.C.; MARQUES, E.F.; BROMME, D.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; ANDRICOPULO, A.D & VIEIRA, P.C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V". *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 1477, **2011**.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M. & MURTHY, P.S. "Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus". *J. Ethnopharmacol.*, 104: 367, **2006**.

SHODH GANGA. Chapter V: Phytochemical examination of *Syzygium jambos*. <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/961/10/10_chapter%205.pdf> Acesso em: 24 de junho de 2013.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A. & CONCEIÇÃO, G.M. "Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão". *Scientia Plena*, 6: 1, **2010**.

SILVA, D.A.; COSTA, D.A.; SILVA, D.F.; SOUZA, M.F.V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. & BRAZ-FILHO, R. "Flavonoides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizichy (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosideo". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 15: 23, **2005**.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. & KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7a ed., Rio de Janeiro: LTC, **2007**. 490 p.

SIMPLICIO, F.G. & PEREIRA, M.M. "Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae)". *Quim. Nova*, 34: 1032, **2011**.

SINGH, J.; BAGHOTIA, A. & GOEL, S.P. "*Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review". *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.*, 3: 1469, **2012**.

SINGAB, A.N.B.; EL-AHMADY, S.H.; LABIB, R.M. & FEKRY, S.S. "Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, Family Crassulaceae". *Bull. Facul. Pharm. Cairo Univ.*, 49: 1, **2011**.

SLOANE, B.F.; MOIN, K. & LAH, T. "Biochemical and molecular aspects of selected cancers". *Acad. Press. San Diego*, p 411-466, **1994**.

SOUTO, L.S. & OLIVEIRA, D.M.T. "Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)". *Revista Brasil. Bot.*, 28: 697, **2005**.

SOUZA, A.D.L.; ROCHA, A.F.I.; PINHEIRO, M.L.B.; ANDRADE, C.H.S.; GALOTTA, A.L.A.Q. & SANTOS, M.P.S.S. "Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae)". *Quim. Nova*, 24: 439, **2001**.

STEFANELLO, M.E.A.; PASCOAL, A.C.R.F. & SALVADOR, M.J. "Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties". *Chem. Biodivers.*, 8: 73, **2011**.

SUN, P.; LIU, Y.; DENG, X.; YU, C.; DAI, N.; YUAN, X.; CHEN, L.; YU, S.; SI, W.; WANG, X.; WU, D.; LIU, S. & PANG, H. "An inhibitor of cathepsin K, icariin

suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis". *Phytomedicine*, Disponível online em 7 de Junho de **2013**.

TIWARI, V.K & MISHRA, B.B. "Natural products: An evolving role in future drug discovery". *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 4769, **2011**.

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: 68, **2012**.

VALENTÃO, P.C.R. LIMONETE, HIPERICÃO-DO-GERÊS, CARDO-DO-COALHO, FEL-DA-TERRA: Metodologias de controlo de qualidade com base na fracção fenólica Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Porto, Pós-Graduação em Farmacia - Universidade do Porto, **2002**. Tese Doutorado.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V. & AGUIAR, O.T. "Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae". *Rev. Inst. Flor.*, 18: 15, **2006**.

VALLILO, M.I.; PASTORE, J.A.; ESTON, M.R.; GARBELOTTI, M.L. & OLIVEIRA, E. "Caracterização química e valor nutricional dos frutos de *Byrsonima myricifolia* Griseb (MALPIGHIACEAE) – Alimentos de aves silvestres". *Rev. Inst. Flor.*, 19: 39, **2007**.

VANDRESEN, F. Constituição Química, Atividade Antibacteriana, Antiedematogênica e Toxicidade frente à *Artemia salina* da espécie vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (VERBENACEAE). Maringá, Programa de Pós-graduação em Química Aplicada – UEM, **2005**. Dissertação de Mestrado. 182 p.

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; PAULA, V.F. & NASCIMENTO, E.A. "Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae)". *Quim. Nova*, 27: 536, **2004**.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V.S. & BARREIRO, E.J. "Os produtos naturais e a Química Medicinal Moderna". *Quim. Nova*, 29: 326, **2006**.

VIEIRA-JUNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L. & CHAVES, M.H. "Resina de *Protium heptaphyllum*: Isolamento, Caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas". *Quim. Nova*, 28: 183, **2005**.

WARURUAI, J.; SIPANA, B.; KOCH, M.; BARROWS, L.R.; MATAINAHU, T.K. & RAI, P.P. "An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Siwai and Buin districts of the Autonomous Region of Bougainville". *J. Ethnopharmacol.*, 138: 546, **2011**.

XU, X.; GAO, Y. & SUN. "Free and esterified triterpene alcohol composition of bee pollen from different botanical origins". *Food Res. Int.*, 48: 650, **2012**.

YANG, L.L.; LEE, C.Y. & YEN, K.Y. "Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells". *Cancer Lett.*, 157: 65, **2000**.

YASUDA, Y.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 973, **2005**.

YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGBO, M.; WEBER, E. & BROMME, D. "Cathepsin V, a novel and potente elastolytic activity expressed in activated macrophages". *J. Biol. Chem.*, 279: 36761, **2004**.

ZANON, R. B. Metabólitos Secundários em *Vernonia Tweedieana* Baker. Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFSM, **2006**. Dissertação de Mestrado. 180 p.

ZHANG, A.; SUN, H. & WANG, X. "Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases". *Eur. J. Med. Chem.*, 63: 570, **2013**.

ZANG, P.; FENG, Z. & WANG, Y. "Flavonoids, including an unusual flavonoid-Mg²⁺ salt, from roots of *Cudrania cochinchinensis*". *Phytochem.*, 66: 2759, **2005**.

ZHANG, Y. & CHEN, Y. "Isobiflorin, A chromone C-Glucoside from cloves (*Eugenia caryophyllata*). *Phytochem.*, 45: 401, **1997**.