



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

MICHELLE NAUARA GOMES DO NASCIMENTO

**ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE)
FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V**

CATALÃO – GO

2014

MICHELLE NAUARA GOMES DO NASCIMENTO

**ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE)
FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como requisito para o exame de Defesa Final.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Produtos Naturais e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa G. P. Severino

CATALÃO – GO

2014

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

N244e Nascimento, Michelle Nauara Gomes do.
Estudo Químico de *Erythroxylum suberosum*
(Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V [manuscrito]
/ Michelle Nauara Gomes do Nascimento. - 2014.
104 f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof. Dr^a. Richele Priscila Severino; Co-orientadora: Vanessa Gisele Pasqualotto Severino.


Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Departamento de Química, 2014.

Bibliografia.

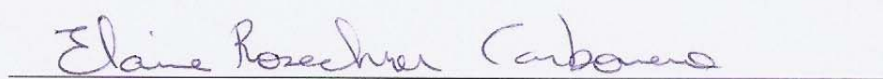
1. Produtos Naturais. 2. Erythroxylaceae. 3. *Erythroxylum suberosum*. 4. Catepsinas. I. Título.

CDU: 547

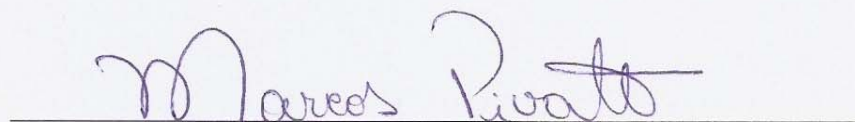
*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de
Dissertação de Mestrado do candidato **Michelle Nauara Gomes do Nascimento**,
realizada em 17 de julho de 2014.*



Profa. Dra. Richele Priscila Severino



Profa. Dra. Elaine Rosehrer Carbonero



Prof. Dr. Marcos Pivatto

Dedico este trabalho...

...À minha amada filha SOFIA.

*Sua chegada me fez querer ser
uma pessoa melhor a cada dia.*

*Obrigada por me fazer
experimentar a mais pura e
bela forma de amor.*

*Ao meu esposo BRUNO, à
minha querida mãe GEISA e
à minha sogra NILDA que
não mediram esforços para que
eu conseguisse chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Richele P. Severino** por todo o apoio, paciência, incentivo e amizade. Seu caráter e profissionalismo são um exemplo a ser seguido. Obrigada por sempre me fazer acreditar na minha capacidade!

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. **Vanessa G. P. Severino** pelo tempo dedicado na realização deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

À Prof^a. Dr^a. **Elaine R. Carbonero** pelo bom convívio ao longo destes anos e por suas contribuições muito enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. **Fernando Petacci** (*in memoriam*), por ter me apresentado a Química de Produtos Naturais, pela qual me apaixonei. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante a graduação.

Ao Prof. Dr. **Paulo Cezar Vieira** por compartilhar sua experiência contribuindo para a finalização deste trabalho e pela realização dos ensaios enzimáticos.

Aos Profs. Drs. **Antônio Gilberto Ferreira**, do Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos e **Luciano Moraes Lião**, do Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

A minha filha **Sofia** e ao meu esposo **Bruno** que souberam compreender minha ausência durante o mestrado. Obrigada por tornarem os meus dias mais leves e me fortalecer a cada manhã.

A melhor mãe do mundo, **Geisa**, por nunca me deixar desistir. Obrigada por estar presente em todos os momentos mais importantes da minha vida.

A minha irmã **Ayla Nauana** pelos momentos de felicidade e cumplicidade partilhada. Obrigada pelo incentivo e amor!

A minha sogra **Nilda**, pelo grande esforço em cuidar da minha filha para que eu pudesse terminar o mestrado. Obrigada por ser uma segunda mãe para mim!

A todos os amigos que fizeram ou ainda fazem parte do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFG – Regional Catalão, pelos bons momentos vividos durante esses anos, pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade. De um modo especial ao **João Gabriel, Leonardo, Michelle Machado, Estefânia e Evandro**. A companhia de vocês tornou os longos dias de trabalho mais prazerosos. Obrigada pela amizade!

À **Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão** e ao **Programa de Pós-Graduação em Química** que oportunizaram a realização deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

A **Deus** por me conceder a vida, iluminar meus caminhos e me permitir viver tudo isso.

*“Mesmo quando tudo parece
desabar, cabe a mim decidir entre
rir ou chorar, ir ou ficar, desistir
ou lutar. Porque descobrir no
caminho incerto da vida, que o mais
importante é o DECIDIR”.*

Cora Coralina

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE)

FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V – O presente trabalho descreve o estudo químico de *E. suberosum*, no intuito de elucidar estruturas de metabólitos secundários presentes nas folhas, caule e raiz, além de avaliar, por meio de teste *in vitro*, a atividade dos extratos, frações e, quando possível das substâncias isoladas, em busca de inibidores de catepsinas utilizando como ferramenta o substrato fluorogênico ZFR-MCA. Estas enzimas, também conhecidas como cisteíno peptidases lisossomais, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, além de estarem associadas a muitas condições patológicas, estando as catepsinas K, L e V, envolvidas no desenvolvimento de doenças como osteoporose, câncer de pele e aterosclerose, respectivamente. Baseado nos processos patológicos em que estas catepsinas estão envolvidas, a busca de inibidores específicos pode ser uma nova abordagem para o tratamento destas doenças. O estudo do extrato etanólico das folhas levou a identificação de quatro flavonoides pertencentes à classe dos flavonois, sendo estes a quercetina e seus derivados 3-O-monoglicosídeos hiperina e isoquercitrina e 3-O-diglicosídeo, ombuina-3-rutinosídeo, todos já relatados para esta espécie. Do extrato etanólico da raiz, foi isolada a mistura dos flavanois catequina e epicatequina, além do éster graxo do β -sitosterol. No caule foram identificados a mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol. Este estudo também sugere a presença dos alcaloides tropanos, tropacocaína e nortropacocaína no extrato etanólico das folhas, sendo estes relatados pela primeira vez na espécie. Nos ensaios frente às catepsinas K, L e V, todos os extratos apresentaram inibição superior a 60% quando avaliados na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Já as frações oriundas da partição líquido-líquido, apresentaram inibição mais expressiva frente às catepsinas V e L, quando avaliadas nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$. O flavonol quercetina apresentou um valor de IC_{50} de $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para a catepsina V e baixa afinidade para as catepsinas K e L quando avaliado na concentração de 100 μM . Este é um resultado importante, uma vez que os

relatos na literatura para flavonoides como inibidores de catepsinas são bastante restritos.

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF *Erythroxyllum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE) AGAINST CATHEPSINS K, L AND V – This work describes the chemical study of *E. suberosum*, aiming to elucidate structures of secondary metabolites in the leaves, stem and roots. Cathepsins assays were used to evaluate *in vitro* activity of extracts, fractions and isolated compounds, using fluorogenic substrate ZFR-MCA. These enzymes, also known as lysosomal cysteine peptidases are involved in many physiological processes, and are associated with many pathological conditions. Cathepsins K, L and V are involved in the development of diseases such as osteoporosis, skin cancer and atherosclerosis, respectively. Based on pathological processes in which cathepsins are involved, the search for specific inhibitors can be a new approach for the treatment these diseases. The study of ethanolic extract from leaves led to the identification of four flavonoids belonging to the flavonol class: quercetin and its derivatives 3-*O*-monoglycosides hyperin and isoquercitrin, and 3-*O*-diglycosides, ombuin-3-rutinoside, all previously reported for this species. The mixture of flavanols, catechin and epicatechin were isolated from ethanolic extract from roots, besides the fatty ester of sitosterol. The mixture of steroids campesterol, stigmasterol and β -sitosterol were identified from the stem extract. This study also suggests the presence of tropane alkaloids, tropacocaine and nortropacocaine, in the ethanolic extract from leaves of *E. suberosum*, reported for the first time in this species. In the evaluation for cathepsins K, L and V, the extracts (concentration of 50 mg/mL), showed significant inhibition of all enzymes with percentage inhibition values above 60%. The fractions showed significant activity against cathepsin V and L when evaluated at concentrations of 5 and 50 mg/mL. The quercetin flavonol showed IC_{50} value of $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ against cathepsin V and low affinity for cathepsins K and L (100 μM). This is an important result since literature reports for flavonoids as inhibitors of cathepsin V are quite limited.

LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS/SÍGLAS

Å	angstrom
a.C	antes de Cristo
CC	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	duplo dubleto
Dic	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
DTE	ditioeritritol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eV	elétron volts
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Glc	glucose
h	altura da fases estacionária
Hz	hertz
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC ₅₀	concentração mínima requerida para 50% de inibição
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>J</i>	constante de acoplamento
LDH	lactato desidrogenase
M	molar
<i>m</i>	multipleto
m/v	razão massa volume
<i>m/z</i>	razão massa carga
MDR	<i>Multiple Drugs Resistance</i>
MeOH	metanol
MHz	mega hertz
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MWD	<i>Multiple Wavelength Detection</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	partes por milhão
Rha	raminose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rut	rutinosídeo
<i>s</i>	singleto
SDH	succinato desidrogenase
SDS	dodecil sulfato de sódio
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
TFA	ácido trifluoracético
t _R	tempo de retenção
ZFR-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 da coluna cromatográfica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Novas substâncias ativas aprovadas pelo FDA no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (Total = 1355)	02
FIGURA 1.2 – Algumas das novas substâncias ativas aprovadas no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 pelo FDA.....	04
FIGURA 1.3 – Mapa do Bioma Cerrado, contendo a distribuição espacial das áreas com vegetação nativa (verde), áreas de supressão acumulada até 2010 (ciano) e corpos d'água (azul).....	07
FIGURA 1.4 – Alguns alcaloides tropanos isolados de diferentes espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	13
FIGURA 1.5 – Alguns metabólitos secundários isolados de diferentes espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	14
FIGURA 1.6 – Foto da espécie <i>E. suberosum</i> (A) e sua distribuição geográfica nos estados de Goiás e Tocantins (B)	16
FIGURA 1.7 – Metabólitos secundários relatados para a espécie <i>E. suberosum</i>	17
FIGURA 1.8 – Estrutura do lanosterol e obtenção de cortisona a partir da diosgenina	18
FIGURA 1.9 – Estrutura básica do esqueleto tropano	21
FIGURA 3.1 – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas	40
FIGURA 4.1 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, acetona- d_6) da mistura das substâncias I, II e III	45
FIGURA 4.2 – Cromatograma obtido por CG-EM da mistura das substâncias I, II e III	46
FIGURA 4.3 – Espectro de massas (70 eV) das substâncias I (A), II (B) e III (C)	46
FIGURA 4.4 – Proposta de fragmentação para o esteroide III.....	48
FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância IV	45
FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias V e VI.....	54
FIGURA 4.7 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias V e VI.	55
FIGURA 4.8 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias V e VI.	56
FIGURA 4.9 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância VII.	59

FIGURA 4.10 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância VIII	63
FIGURA 4.11 – Mapa de contorno HSQC para a substância VIII	64
FIGURA 4.12 – Mapa de contorno HMBC para a substância VIII	65
FIGURA 4.13 – Expansão do mapa de contorno HMBC para a substância VIII	66
FIGURA 4.14 – Relação entre os valores das constantes de acoplamento 3J e o ângulo diedro Φ de átomos de hidrogênios vicinais	67
FIGURA 4.15 – Correlação significativa observada no mapa de contorno HMBC da substância VIII	68
FIGURA 4.16 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação do acetato de alditol (B) obtido após derivatização química (acetilação) da substância VIII	69
FIGURA 4.17 – Propostas de fragmentação para a galactose	70
FIGURA 4.18 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância IX	73
FIGURA 4.19 – Mapa de contorno HSQC para a substância IX	74
FIGURA 4.20 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação da raminose (B) e glucose (C) obtidos após derivatização química (acetilação) da substância IX	75
FIGURA 4.21 – Propostas de fragmentação para a raminose	77
FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância X	80
FIGURA 4.23 – Mapa de contorno HSQC para a substância X	81
FIGURA 4.24 – Mapa de contorno HMBC para a substância X	82
FIGURA 4.25 – Expansão do mapa de contorno HMBC para a substância X	83
FIGURA 4.26 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação da glucose (B) obtidos após derivatização química (acetilação) da substância X	86
FIGURA 4.27 – Correlação significativa observada no mapa de contorno HMBC da substância X	86
FIGURA 4.28 – Cromatograma obtido por CG-EM da fração alcaloídica	88
FIGURA 4.29 – Espectros de massas (70 eV) dos alcaloides tropacocaína (XI) e nortropacocaína (XII).....	89
FIGURA 4.30 – Propostas de fragmentação para os alcaloides tropacocaína (XI) e nortropacocaína (XII).....	90
FIGURA 4.31 – Porcentagem de inibição dos extratos (50 $\mu\text{g/mL}$) etanólicos de <i>E. suberosum</i> frente às catepsinas K, L e V	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies pertencentes ao Cerrado.....	08
TABELA 1.2 – Observações etnobotânicas de Erythroxylaceae.....	11
TABELA 1.3 – Porcentagem de inibição de alguns flavonoides e alcaloides testados frente às catepsinas K, L e V na concentração de 25 µM.....	22
TABELA 3.1 – Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidos após partição líquido-líquido.....	30
TABELA 3.2 – Fracionamento do extrato EEF de <i>E. suberosum</i>	33
TABELA 4.1 – Dados de RMN de ¹ H (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆) da substância IV	49
TABELA 4.2 – Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância V em comparação com dados da literatura.....	52
TABELA 4.3 – Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância VI em comparação com dados da literatura.....	53
TABELA 4.4 – Dados de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância VII em comparação com dados da literatura.....	58
TABELA 4.5 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos via HSQC e HMBC (500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância VIII em comparação com dados da literatura.....	61
TABELA 4.6 – Correlações observadas no HSQC e HMBC para a substância VIII	62
TABELA 4.7 – Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos via HSQC (500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância IX em comparação com dados da literatura.....	72
TABELA 4.8 – Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da substância X em comparação com dados da literatura.....	84
TABELA 4.9 – Correlações observadas no HSQC e HMBC para a substância X	85
TABELA 4.10 – Fragmentação e tempos de retenção da fração alcaloídica de <i>E. suberosum</i>	88
TABELA 4.11 – Porcentagem de inibição das frações de <i>E. suberosum</i> frente as catepsinas K, L e V.....	92

FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1 – Fracionamento da fração FAC	31
FLUXOGRAMA 3.2 – Fracionamento da fração FAR	32
FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento da fração EEF 5	34
FLUXOGRAMA 3.4 – Continuação do fracionamento da fração EEF 5	35
FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento da fração EEF 4	37
FLUXOGRAMA 3.6 – Extração ácido-base, dirigida à obtenção de frações ricas em alcaloides	38

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – O PAPEL DOS PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE MEDICAMENTOS	1
1.2 – BIODIVERSIDADE E POTENCIALIDADES DO BIOMA CERRADO	5
1.3 – A FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE.....	10
1.4 – O GÊNERO <i>Erythroxyllum</i>	12
1.5 – A ESPÉCIE <i>Erythroxyllum suberosum</i>	16
1.6 – CONSIDERAÇÕES SOBRE AS CLASSES DE COMPOSTOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>E. suberosum</i>	18
1.6.1 – Esteroides	18
1.6.2 – Flavonoides	19
1.6.3 – Alcaloides tropano e nortropano.....	20
1.7 – AS CATEPSINAS	21
1.7.1 – Catepsinas Estudadas.....	23
1.7.1.1 – Catepsina K	23
1.7.1.2 – Catepsina L	23
1.7.1.3 – Catepsina V	24
2 – OBJETIVOS.....	25
2.1 – OBJETIVO GERAL	25
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1.1 – Reagentes	26
3.1.2 – Solventes.....	26
3.1.3 – Fases Estacionárias	27
3.1.4 – Equipamentos	27
3.2 – METODOLOGIA.....	29
3.2.1 – Coleta do Material Vegetal	29
3.2.2 – Preparo dos Extratos e Partições	29
3.2.3 – Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila do Caule (FAC) de <i>E. suberosum</i>	30

3.2.4 – Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila da Raiz (FAR) de <i>E. suberosum</i>	32
3.2.5 – Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico das Folhas (EEF)	33
3.2.6 - Fracionamento Cromatográfico da Fração EEF 5.....	33
3.2.6.1 – Identificação dos componentes monossacarídicos	36
3.2.7 – Fracionamento Cromatográfico da Fração EEF 4	36
3.2.8 – Metodologia Para Extração e Análise de Alcaloides	31
3.2.8.1 – Análise CG-EM.....	39
3.2.9 – Metodologia dos Ensaio Enzimáticos	39
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 – CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>E. SUBEROSUM</i>	41
4.2 – IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS ESTEROIDES ISOLADOS DE <i>E. suberosum</i>	44
4.2.1 – Identificação da Mistura dos Esteroides I, II e III	44
4.2.2 – Identificação da Substância IV	49
4.3 – IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE <i>E. suberosum</i>	51
4.3.1 – Identificação das Catequinas V e VI.....	51
4.3.2 – Identificação do Flavonoide VII	57
4.3.3 – Identificação do Flavonoide VIII	60
4.3.4 – Identificação do Flavonoide IX	71
4.3.5 – Identificação do Flavonoide X	78
4.4 – ALCALOIDES TROPANO E NORTROPANO DE <i>E. suberosum</i>	87
4.4.1 – Identificação dos Alcaloides tropacocaína (XI) e nortropacocaína (XII) 87	
4.5 – RESULTADOS BIOLÓGICOS.....	91
4.5.1 – Atividade Enzimática Frente às Catepsinas K, L e V	91
5 – CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS.....	94

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O PAPEL DOS PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE MEDICAMENTOS

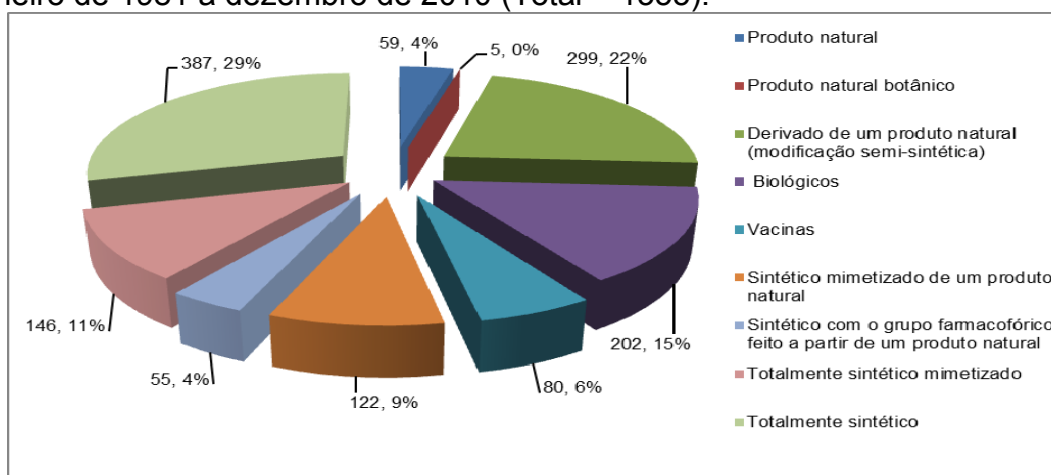
Durante toda a história, o Homem procurou na natureza, principalmente nas plantas, produtos para o tratamento de suas doenças. A admirável diversidade biológica dos seres vivos, oportunizando a descoberta de estruturas químicas singulares capazes de exercerem os mais variados efeitos biológicos e a existência de vários fármacos de origem natural, faz com que a extração de produtos naturais para a busca de fármacos continue atraindo a atenção de pesquisadores até os dias de hoje (MONTANARI, GAUDIO, 2011).

Os primeiros registros do uso medicinal de plantas datam de 2600 a.C. na Mesopotâmia, onde relatam o uso de espécies de *Cedrus* spp. (cedro) e *Commiphora* spp. (mirra), *Cupressus sempervirens* (Cipreste), *Glicyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), sendo estas utilizadas até os dias atuais para tratar tosses, resfriados, infecções parasitárias e inflamações. A medicina egípcia relata a utilização da espécie *Ammi majus* (flor do bispo) para o tratamento de vitiligo e mais recentemente foi produzido a partir desta espécie um fármaco (β -metoxipsoraleno) para o tratamento de psoríase e outras doenças de pele (GURIB-FAKIM, 2006).

Ao longo dos séculos os produtos naturais passaram a representar as maiores fontes de substâncias ativas, os quais devido a enorme diversidade química têm conduzido a importantes descobertas farmacêuticas. O fenômeno que proporciona esta biodiversidade são as interações entre os organismos e seu ambiente que favorecem a formação de diversas e complexas substâncias químicas, aumentando assim a sobrevivência e competitividade das espécies. Inúmeras áreas terapêuticas se beneficiam com estas numerosas classes de substâncias, capazes de interagir com muitos alvos específicos dentro e fora das células, e de fato há muitos anos têm sido fundamentais na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (MISHRA,

TIWARI, 2011). Tal fato pode ser evidenciado, quando analisamos os percentuais das novas substâncias ativas aprovadas no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010, estando os produtos naturais envolvidos em aproximadamente 50% das novas entidades químicas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sendo 4% produto natural na sua forma original, 22% derivados de produtos naturais (semi-síntese) e 24% realizados por síntese total, mas considerando os produtos naturais como protótipos (Figura 1.1) (NEWMAN, CRAGG, 2012).

FIGURA 1.1 – Novas substâncias ativas aprovadas pelo FDA no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (Total = 1355).



Entre o ano de 2005 a 2010 foram aprovados para comercialização em todo o mundo, um total de 10 medicamentos à base de produtos naturais (MISHRA, TIWARI, 2011). Entre estes está o VeregenTM, que contém uma mescla de diferentes compostos polifenólicos, entre os quais se destacam as catequinas, ((-)-epigallocatequina (1), (-)-epicatequina-3-galato (2), (-)-epigallocatequina-3-galato (3) e (-)-epicatequina (4)) (Figura 1.2, p. 4), obtidas do chá verde (*Camellia sinensis*) (PINTO, CUDÓS, 2014), que foi desenvolvido pela MediGene AG e lançado nos Estados Unidos em dezembro de 2007 para uso tópico contra verrugas genitais (MISHRA, TIWARI, 2011).

Sativex[®] foi derivado de linhagens da planta *Cannabis sativa* L. que foram desenvolvidas para a produção de rendimentos elevados e reprodutíveis dos principais canabinoides, Δ -9-tetraidrocanabinol (5) e canabidiol (6) (Figura 1.2, p. 4). Este medicamento foi lançado no Canadá em 2005 para o alívio da dor neuropática na esclerose múltipla, sendo também

aprovado em 2007 como um analgésico para aliviar a dor em pacientes com câncer em estágio avançado, reduzindo a necessidade dos medicamentos opioides (JOHNSON et al., 2010; MISHRA, TIWARI, 2011).

A tigeciclina (**7**), substância presente no Tygacil[®], faz parte de uma nova geração de antibióticos chamados glicilciclinas e possui estrutura semelhante à das tetraciclinas. Foi aprovada em 2005 pelo FDA para o tratamento de infecções complicadas da pele causadas por micro-organismos e infecções intra-abdominais (Figura 1.2, p. 5) (MISHRA, TIWARI, 2011).

Capsaicina (**8**) (*trans*-8-metil-*N*-vanilil-6-nonenamida) (Figura 1.2, p. 5) é um alcaloide que ocorre naturalmente em plantas do gênero *Capsicum* (SHARMA, VIJ, SHARMA, 2013). A capsaicina e compostos relacionados formam um grupo químico denominado capsaicinoides, os quais conferem às pimentas sua ardência característica e têm atraído grande atenção devido às suas extensas propriedades farmacológicas, como as atividades de analgesia, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante e antiobesidade (LUO, PENG, LI, 2011). Em novembro de 2009 Qutenza[®] (adesivo transdérmico contendo capsaicina) ganhou a aprovação do FDA para o tratamento de dor neuropática (MISHRA, TIWARI, 2011).

Yondeles[®] é composto majoritariamente por trabectedina (**9**) (Figura 1.2, p. 5), um agente anticancerígeno, cuja estrutura química é caracterizada por três anéis tetrahydroisoquinolínicos fundidos, que é registrado na Europa e em vários outros países para o tratamento de sarcomas de tecidos moles e em combinação com doxorrubicina lipossomal para o tratamento de câncer de ovário recorrente. Atualmente está em ensaios de Fase II contra sarcomas pediátricos, mama e câncer de próstata (MISHRA, TIWARI, 2011; ZANGARINI et al., 2014). Trabectedina foi originalmente extraída a partir de um organismo marinho, o tunicado *Ecteinascidia turbinata*, e agora é produzido sinteticamente (ZANGARINI et al., 2014).

Ziconotida (**10**) (Figura 1.2, p. 5), comercializada como Prialt[®], é um novo fármaco não opioide indicado para o tratamento de dor crônica grave. É uma versão sintética de um peptídeo extraído de uma toxina paralisante produzida pelo caracol aquático *Conus magus*. Este peptídeo age bloqueando de forma seletiva os canais de cálcio de tipo N, os quais são responsáveis por transmitir um sinal de dor de um nervo para outro, causando, assim, o alívio da

dor. Ziconotida foi aprovado em 2004 pelo FDA, quando administrado como uma infusão usando uma bomba intratecal no líquido espinhal (MISHRA, TIWARI, 2011).

Os exemplos supracitados confirmam que os produtos naturais têm um papel importante na saúde mundial e apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, eles continuam sendo uma fonte relevante de protótipos e de possíveis fármacos.

FIGURA 1.2 – Algumas das novas substâncias ativas aprovadas no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 pelo FDA.

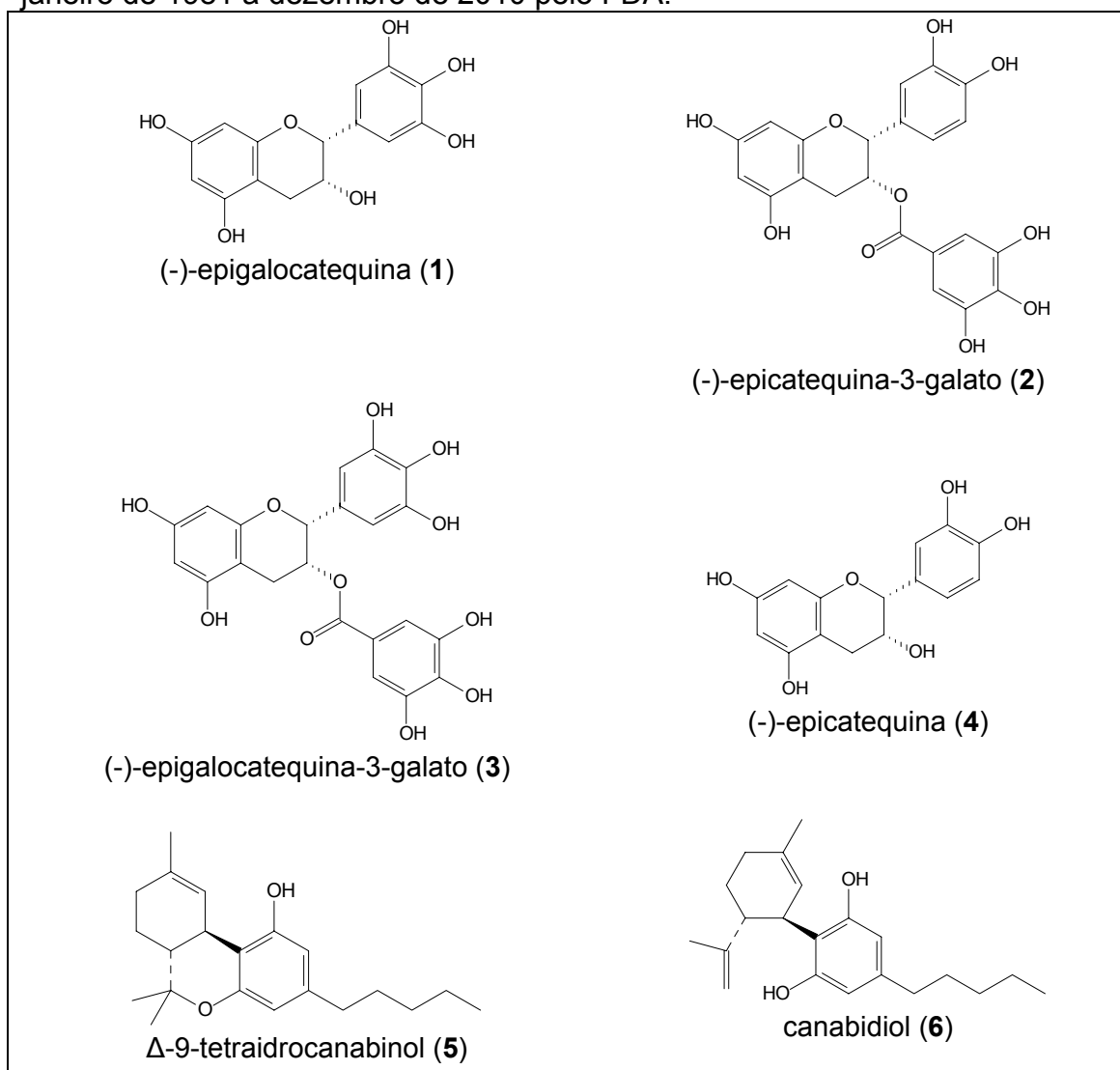
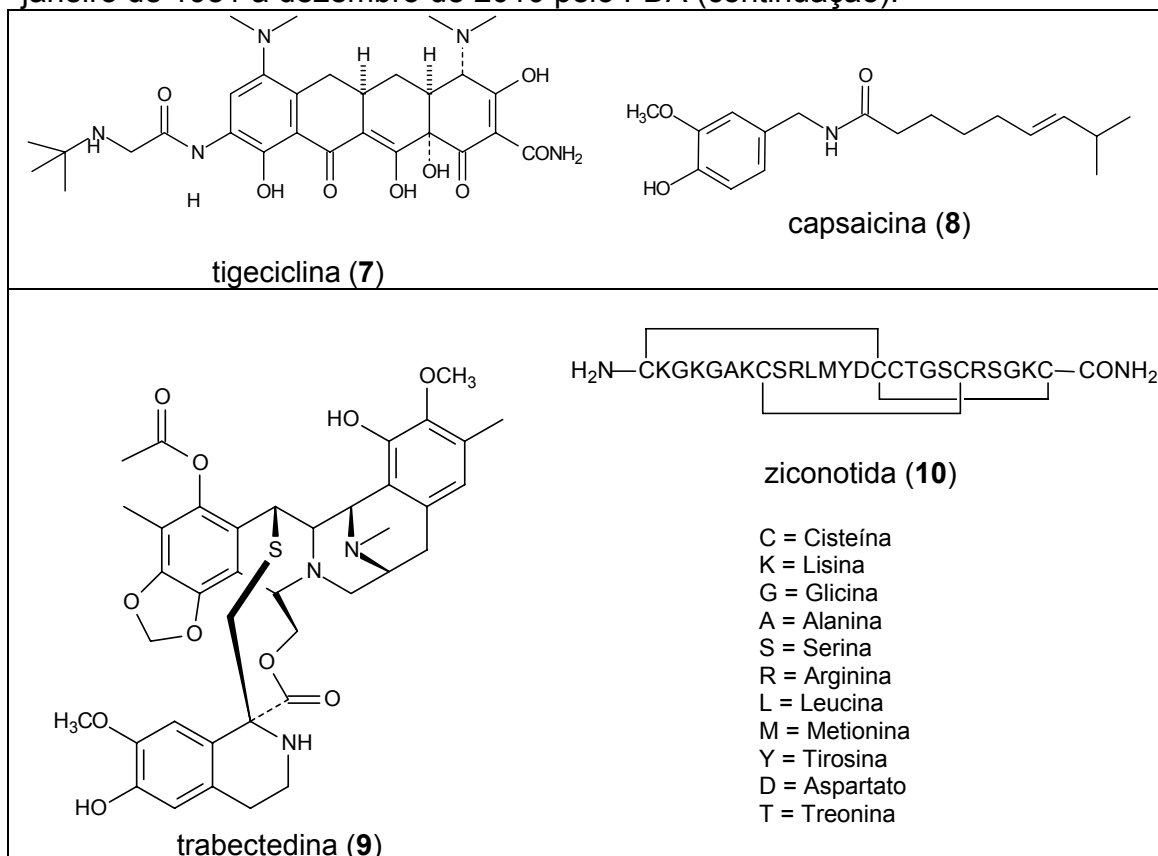


FIGURA 1.2 – Algumas das novas substâncias ativas aprovadas no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 pelo FDA (continuação).



1.2 – BIODIVERSIDADE E POTENCIALIDADES DO BIOMA CERRADO

Entende-se por biodiversidade, a variedade existente entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativamente desigual dos seus componentes no espaço geográfico, o que significa que a abundância de espécies é variável em um determinado ambiente (GUERRA, NODARI, 2003). A biodiversidade abriga também uma grande diversidade química, representada por milhares de metabólitos secundários, de diversas classes que apresentam uma variedade de estruturas moleculares que podem ser utilizadas como modelos para a química medicinal e como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos (BOLZANI, FLAUSINO, VALLI, 2012).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do mundo, contando com um número estimado entre 10 e 20% do número total de espécies do

planeta. É o país com a maior diversidade genética vegetal, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1995). No entanto, essa riqueza molecular encontra-se ameaçada, devido ao ritmo preocupante com que seus biomas vêm sendo devastados. Devido aos diversos processos de urbanização, industrialização e desmatamento para a ocupação agropecuária, muitas espécies correm o risco de extinção. Este fato faz com que muitas espécies desapareçam sem ao menos serem exploradas do ponto de vista químico, perdendo-se assim, informações valiosas sobre várias espécies de uso medicinal e, conseqüentemente a perda de inúmeros produtos naturais, de classes distintas e tipos estruturais completamente desconhecidos, muitos dos quais poderiam servir de modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (BOLZANI, FLAUSINO, VALLI, 2012).

Inserido neste contexto, encontra-se o bioma Cerrado; considerado a savana tropical mais diversificada do mundo, abriga mais de 11.000 espécies de plantas nativas em seus vários ecossistemas (MENDONÇA, FELFILI, WALTER, 2008), das quais 4.400 são endêmicas (MYERS et al., 2000).

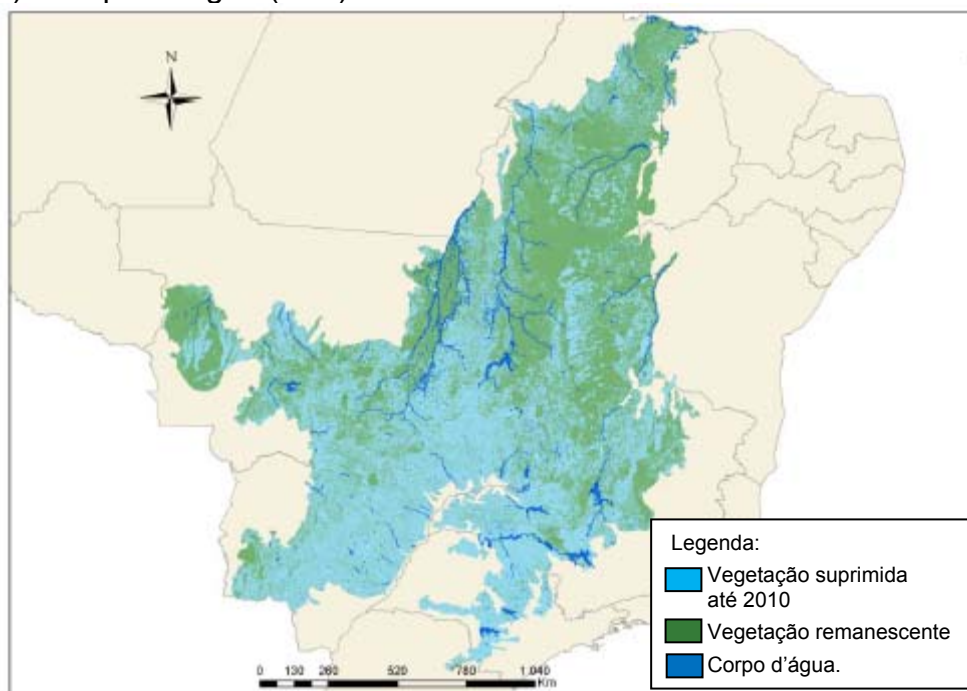
O Cerrado nativo era o segundo maior bioma brasileiro, ocupava uma área de aproximadamente 2 milhões de km², cerca de 23% do território brasileiro, abrangendo os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Distrito Federal, Tocantins e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, São Paulo, Paraná e Rondônia. Ocorria também em pequenas áreas nos estados de Roraima, Pará, Amapá e Amazonas (DURIGAN et al., 2004).

Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana. Com a crescente pressão para a abertura de novas áreas, visando incrementar a produção de carne e grãos para exportação, tem havido um progressivo esgotamento dos recursos naturais da região (MMA/IBAMA, 2011). Além disso, durante as décadas de 1970 e 1980 o rápido deslocamento da fronteira agrícola com base em desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, resultou em 67% de áreas do Cerrado “altamente modificadas”, restando

atualmente apenas 20% de área conservada, o que fez com essa região fosse incluída na lista dos *hotspots* de biodiversidade (MYERS et al., 2000).

Em um estudo recente realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) juntamente com o IBAMA, o qual visa o monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por meio de satélites, observou-se a distribuição das áreas antropizadas e respectivos remanescentes florestais até o ano de 2010 (Figura 1.3). No tocante ao desmatamento, o Cerrado teve a sua cobertura vegetal nativa suprimida, entre 2009 a 2010 em 6.469 km² (MMA/IBAMA, 2011.).

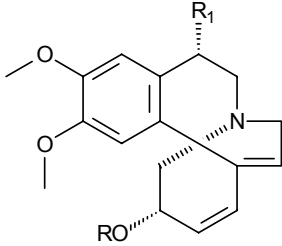
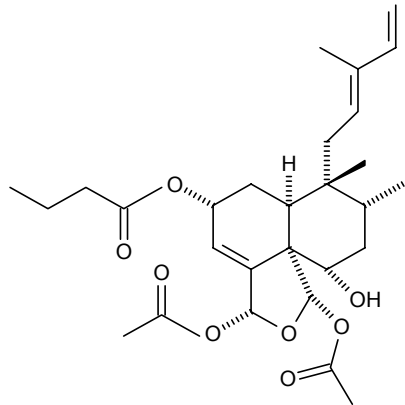
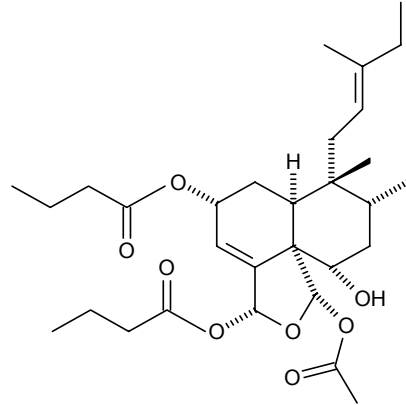
FIGURA 1.3 – Mapa do Bioma Cerrado, contendo a distribuição espacial das áreas com vegetação nativa (verde), áreas de supressão acumulada até 2010 (ciano) e corpos d’água (azul).



Fonte: MMA/IBAMA – Programa de Monitoramento do desmatamento nos Biomas brasileiros por satélite, 2011.

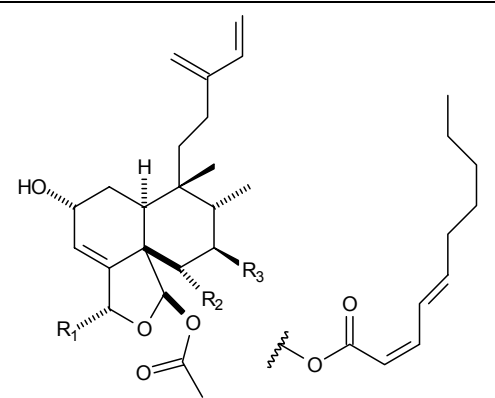
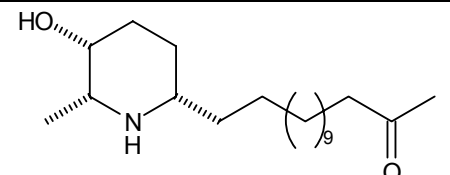
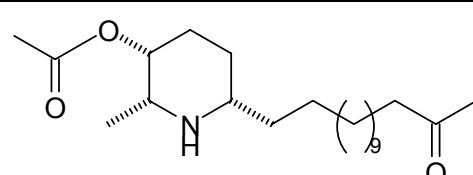
Em relação à diversidade fitoquímica, as plantas do Cerrado oferecem abundante fonte de metabólitos secundários sendo estes das mais variadas classes e que, no entanto, até hoje ainda foram pouco exploradas do ponto de vista químico e farmacológico. Dos estudos realizados com espécies pertencentes ao Cerrado, já foram isoladas inúmeras classes de metabólitos secundários muitos dos quais com atividade biológica considerável (Tabela 1.1, p. 8 e 9).

TABELA 1.1 – Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies pertencentes ao Cerrado.

Espécie	Uso popular	Substâncias isoladas	Atividade biológica	Referência
<i>Erythrina mulungu</i>	Calmante	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">R</div> <div style="text-align: center;">R₁</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: center;">(+)-α-hidroxierisotrina H</div> <div style="text-align: center;">OH</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: center;">(+)-11-α-hidroxieritravina CH₃</div> <div style="text-align: center;">OH</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: center;">eritravina H</div> <div style="text-align: center;">H</div> </div>	Atividade ansiolítica	FLAUSINO et al., 2007
<i>Casearia sylvestris</i>	Tratamento de picadas de cobras, ferimentos, antipirético, antisséptico e antiulcerogênico	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>caseargrewiina F</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>casearina X</p> </div> </div>	caseargrewiina F em baixas concentrações tem efeito protetor do DNA. casearina X possui forte citotoxicidade em algumas linhagens de células.	OLIVEIRA et al., 2009 SANTOS et al., 2010

(continua)

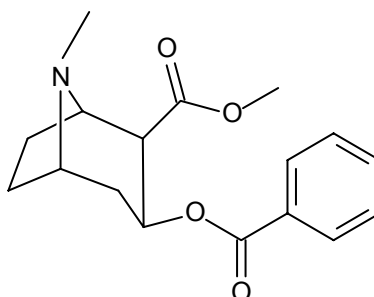
(conclusão)

Espécie	Uso popular	Substâncias isoladas	Atividade biológica	Referência			
<i>Casearia rupestris</i>	-		casearinas A, B e D apresentaram citotoxicidade superior ao padrão doxorubicina	BOLZANI, FLAUSINO, VALLI, 2012			
					R_1	R_2	R_3
		casearupestrina A			OCOCH ₃	2Z,4E-decadienoato	OH
		casearupestrina B			OCOCH ₃	OH	2Z,4E-decadienoato
		casearupestrina C			OCH ₃	OH	2Z,4E-decadienoato
casearupestrina D	OCOCH ₃	OCOCH ₃	2Z,4E-decadienoato				
<i>Cassia spectabilis</i>	-		Atividade anticolinesterásica	BOLZANI, FLAUSINO, VALLI, 2012			
		(-)-espectralina				(-)-3-O-acetilespectralina	

1.3 - A FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE

A família Erythroxylaceae é composta por árvores, arbustos e subarbustos de distribuição tipicamente tropical. Dos quatro gêneros pertencentes a esta família, ocorre no Brasil apenas o gênero *Erythroxylum* P. Browne, ao qual pertence à maioria das espécies (BARBOSA, AMARAL, 2001). Em relação aos outros três gêneros: *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonca, estes possuem poucas espécies e ocorrem exclusivamente na África (LOIOLA et al., 2007).

A espécie mais importante do ponto de vista socioeconômico dessa família é *Erythroxylum coca* Lam., de cujas folhas é extraída a cocaína (11). Originária do Peru tinha suas folhas mascadas por trabalhadores locais de campos e minas para a redução de fome e cansaço. Registros arqueológicos estabelecem que a mastigação das folhas de coca datam de 3000 a.C. e sua utilização como anestésico local é de 1879 (BARBOSA, AMARAL, 2001).



cocaína (11)

De acordo com BROCK et al. (2005), a cocaína é produzida em quantidade apenas em *E. coca* e *E. novogranatense* e ocorre em traços em algumas outras espécies; não podendo ser, portanto, um marcador químico da família.

Muitas espécies pertencentes à família Erythroxylaceae, possuem a madeira mais ou menos dura e resistente, o cerne é geralmente de cor escura e as tonalidades de vermelho ocorrem com frequência. Madeiras são usadas para diversas finalidades: construção de casas e barcos, na carpintaria, marcenaria e escultura. Além disso, muitas espécies encontram aplicação na

medicina tradicional. A Tabela 1.2 resume alguns usos locais de espécies de Erythroxylaceae (HEGNAUER, 1981).

TABELA 1.2 - Observações etnobotânicas de Erythroxylaceae.

Local	Espécie	Utilização
Angola	<i>E. dekindtii</i> (Engl.) O. Schulz	Decocção das folhas e raízes é usada como antipirético.
Serra Leoa	<i>E. mannii</i> Oliv.	Decocção de folhas e caule como antipirético; a casca do caule é usada juntamente com limão e sementes de pimenta malagueta para preparar um linimento contra pleurisia.
Sul da África	<i>E. pictum</i> E. Mey ex. Sond.	Produz madeira para escultura; os frutos são consumidos pelo povo Zulu.
	<i>Nectaropetalum capense</i> (H. Bol.)	A madeira dura e avermelhada é usada em carpintaria e na fabricação de varas.
Madagascar	<i>E. ferrugineum</i> Cav.	A madeira é utilizada em carpintaria e para fabricar postes e varas; a decocção das folhas é utilizada como um antidiarreico.
	<i>E. myrtoides</i> Boj.	Decocção e infusão de folhas são utilizadas como carminativo e como diurético.
	<i>E. retusum</i> Baill. ex. O.E. Schulz	Decocção de folhas como vermífugo.
Ilhas Mascarenhas	<i>E. hypericifolium</i> Lamk.	Os frutos são utilizados na preparação de um xarope depurativo e diurético.
	<i>E. laurifolium</i> Lamk.	As folhas têm propriedades adstringentes e diuréticas e o suco dos frutos tem ação laxante.
Austrália	<i>E. australe</i> F.v. Muell.	A madeira vermelha é usada na marcenaria e as cascas como corante para algodão e lã.

1.4 - O GÊNERO *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum*, mais conhecido pela espécie *E. coca* L. de onde é extraída a cocaína, é o maior entre os quatro gêneros pertencentes à família Erythroxylaceae, compreende cerca de 97% de suas espécies e estão distribuídas por regiões tropicais e subtropicais (PLOWMAN, HENSOLD, 2004).

Algumas espécies deste gênero têm sido utilizadas na medicina popular para diversos fins terapêuticos, tais como anti-helmíntico, antipirético, antidiarreico, carminativo, diurético, tônico, como inalantes para asma, no tratamento de amenorréia, hemorragia, gripe, sinusite, dores de estômago, e como estimulantes (HEGNAUER 1981; OLIVEIRA et al., 2010). No entanto, com exceção das espécies que produzem cocaína, este gênero é pouco estudado e a composição química de espécies desta família utilizadas na medicina tradicional permanece desconhecida (BRACHET et al., 1997).

Este gênero é bem conhecido pela ocorrência de alcaloides do tipo tropano os quais apresentam propriedades farmacológicas relevantes (RIBEIRO et al., 2013), e vários representantes desta classe têm sido isolados de diferentes espécies, sendo alguns destes expostos na Figura 1.4 (p.13). Da espécie *E. rimosum* foi isolado o 7 β -acetoxi-3 β ,6 β -dibenzoiloxitropano (**12**), inibidor da enzima acetilcolinesterase (RIBEIRO et al., 2013). Já os alcaloides pervileina B (**13**) e pervileina C (**14**) obtidos do extrato clorofórmio das raízes de *E. pervillei*, foram capazes de reverter a resistência a múltiplas drogas (MDR), usando a cultura de células KB-V1 (carcinoma epidermóide oral, resistente a vimblastina) (MI et al., 2002). A partir do caule de *E. lucidum*, foram identificados 13 alcaloides, sendo a maioria destes, conhecidos precursores na biossíntese de alcaloides tropano, por exemplo, higrina (**15**), tropinona (**16**) e tropina (**17**) (BRACHET et al., 1997). Da espécie *E. moonii*, foram isolados os alcaloides tropanos diméricos mooniina A (**18**) e mooniina B (**19**) (RAHMAN et al., 1998). A partir das folhas *E. novogranatense* var. *novogranatense* também foi isolado o alcaloide 1-hidroxitropacocaina (**20**) (MOORE et al., 1994).

Outras classes de compostos foram isoladas de espécies de *Erythroxylum* como diterpenos do tipo abietano, *ent*-kaurano, rianodanos, labdanos, entre outros, além de triterpenos, taninos e flavonoides (Figura 1.5,

p. 14 e 15) (ANSELI, PEGEU, TAYLOR, 1993; BARREIROS et al., 2007; CHÁVEZ et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2012).

FIGURA 1.4 – Alguns alcaloides tropanos isolados de diferentes espécies do gênero *Erythroxylum*.

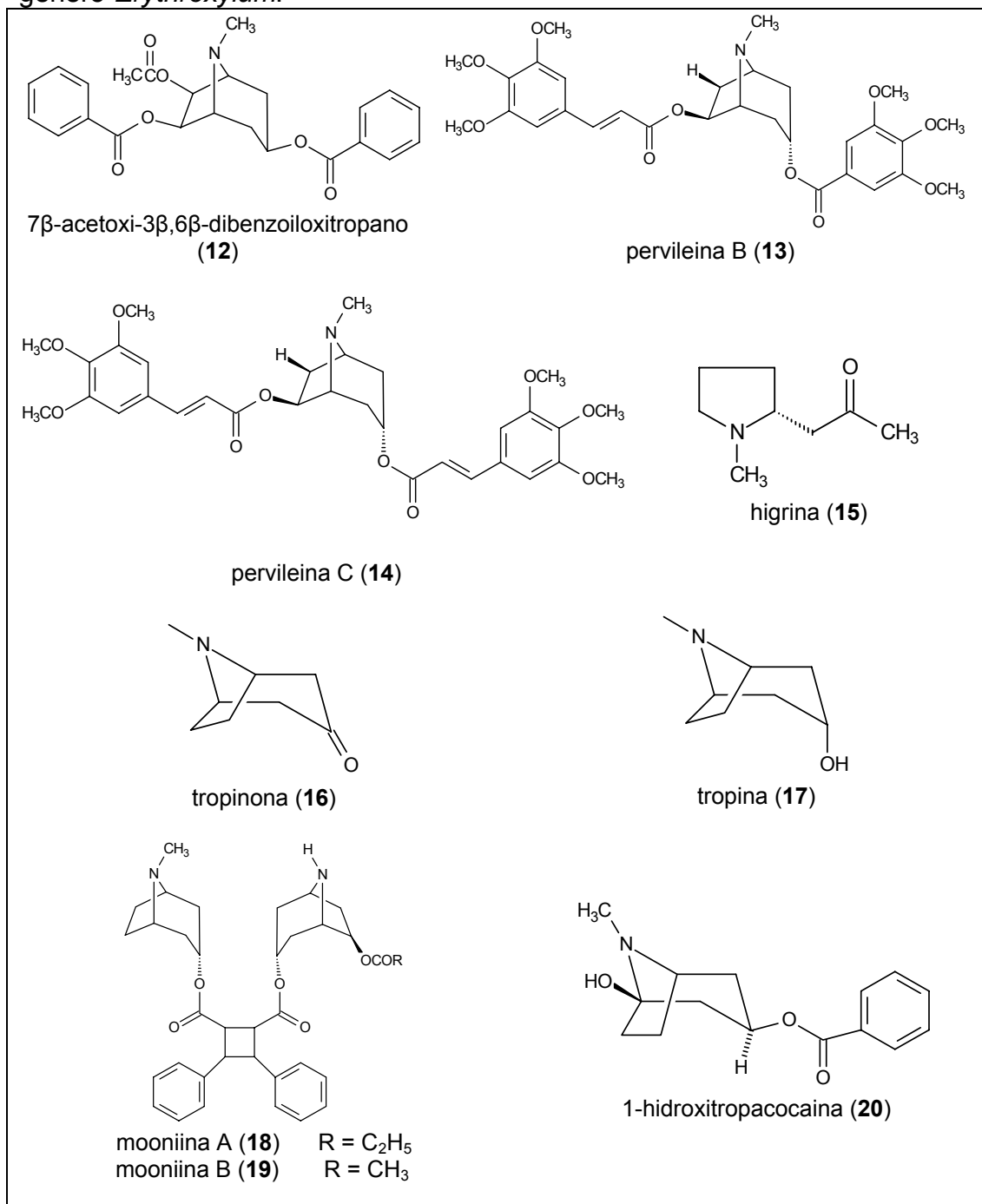


FIGURA 1.5 – Alguns metabólitos secundários isolados de diferentes espécies do gênero *Erythroxylum*.

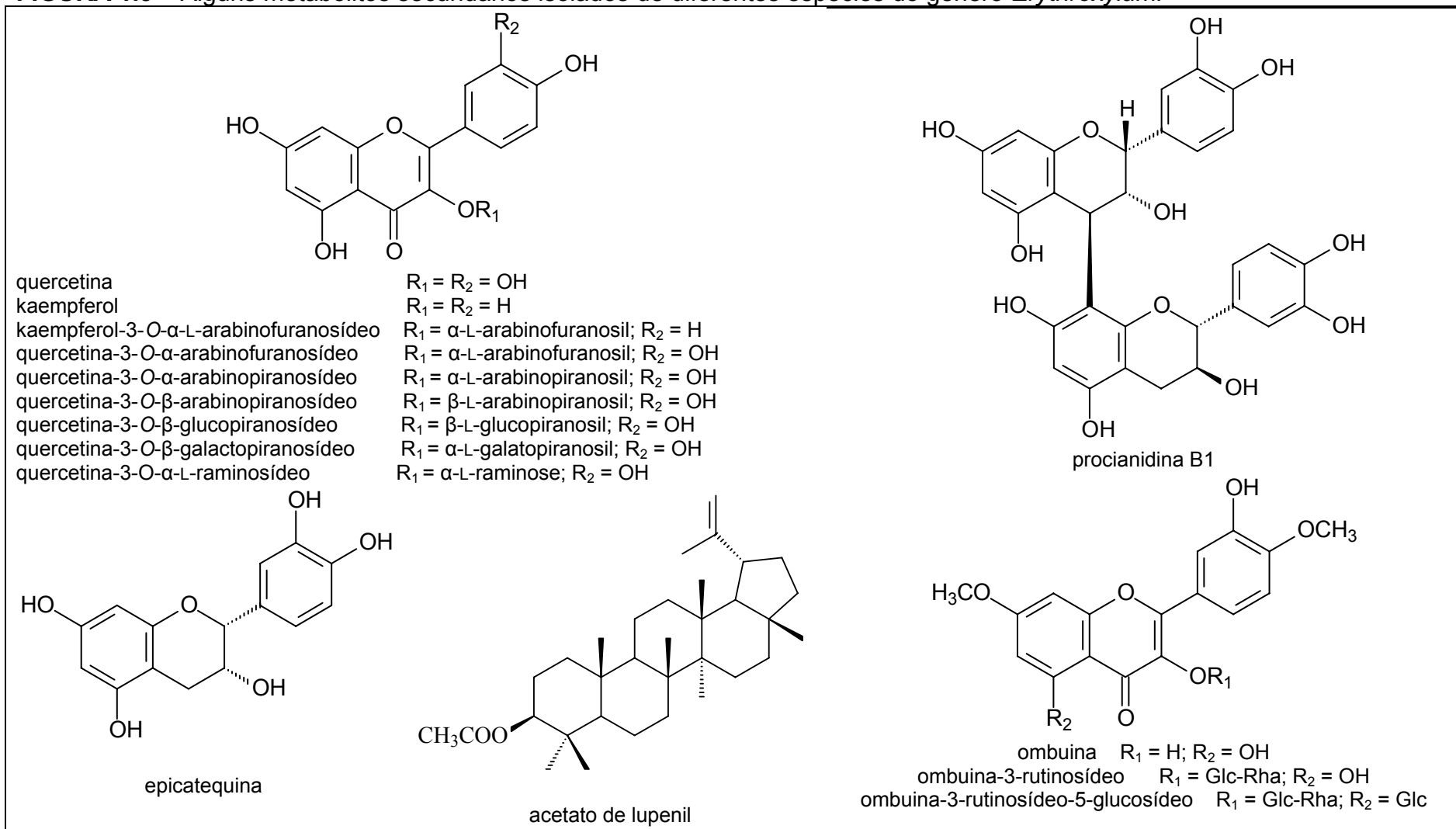
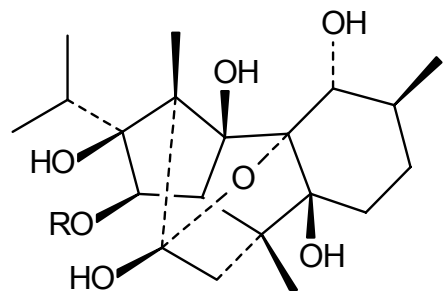
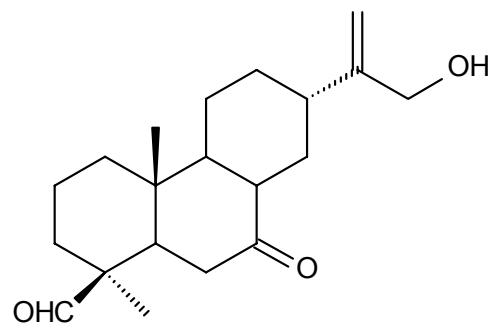


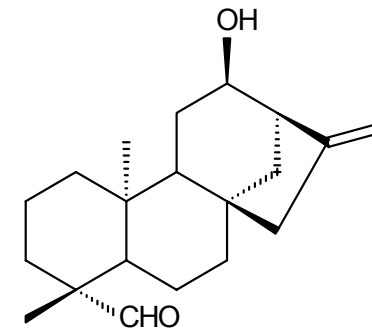
FIGURA 1.5 – Alguns metabólitos secundários isolados de diferentes espécies o gênero *Erythroxylum* (continuação).



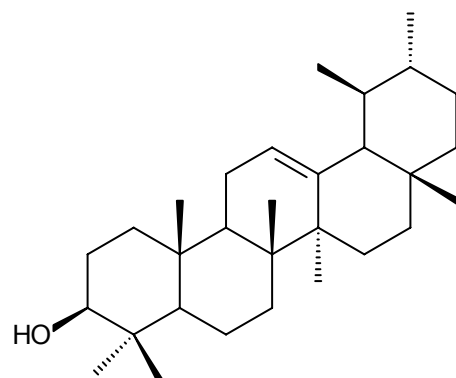
14-O-metil rianodanol R = CH₃
rianodanol R = H



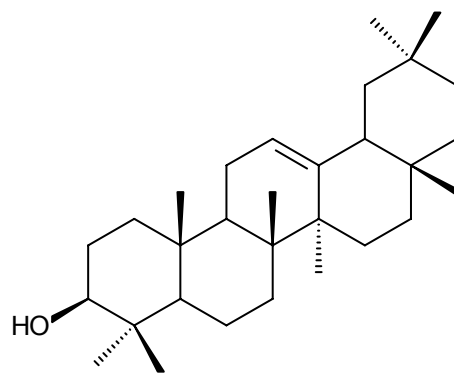
7-oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al



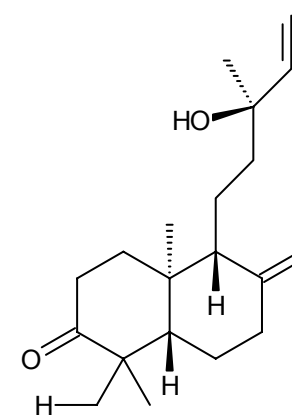
ent-12α-hidroxi-kaur-16-en-19-al



α-amirina



β-amirina



3-oxo-mano

1.5 - A ESPÉCIE *Erythroxylum suberosum*

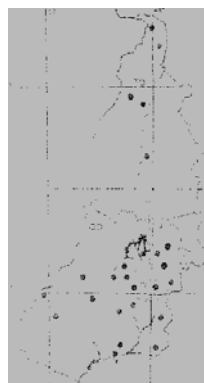
E. suberosum A. St.-Hil, pertencente a família Erythroxylaceae, é um subarbusto que ocorre em países como Bolívia, Guiana Francesa, Paraguai e Venezuela. No Brasil, é encontrado principalmente em áreas abertas de Cerrado, com ampla distribuição nos estados de Goiás e Tocantins (Figura 1.6), sendo também encontrado nos estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima e São Paulo (BARBOSA, AMARAL, 2001; PLOWMAN, HENSOLD, 2004).

FIGURA 1.6 – Foto da espécie *E. suberosum* (A) e sua distribuição geográfica nos estados de Goiás e Tocantins (B)

(A)



(B)

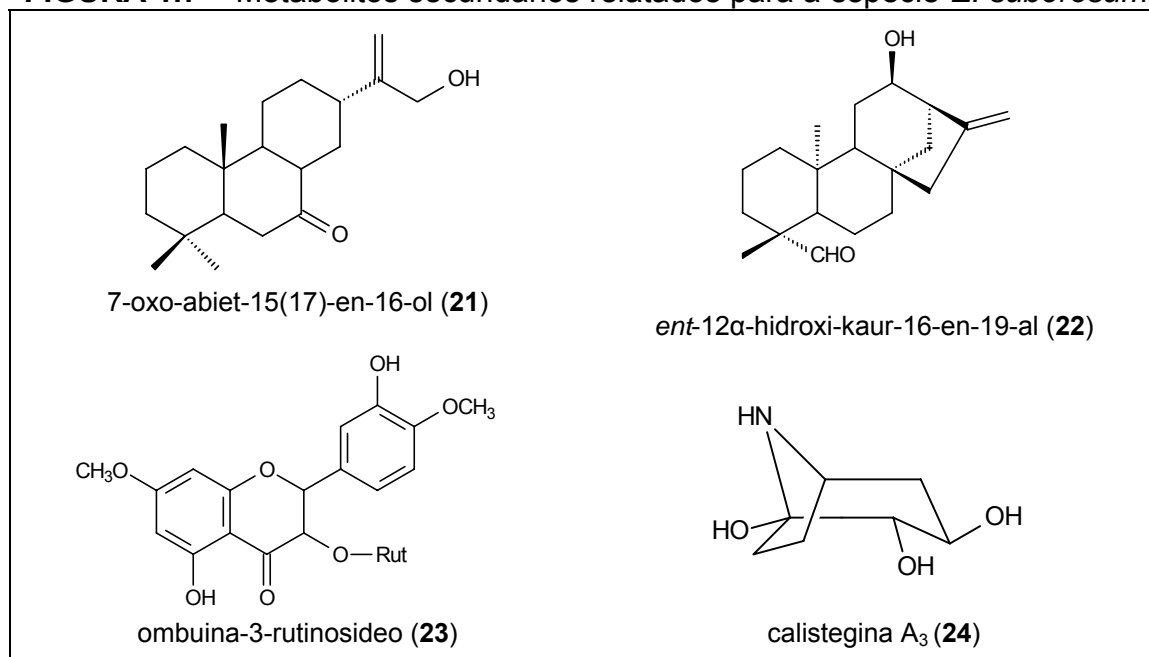


Fonte: (A) Fonte própria. (B) BARBOSA, AMARAL, 2001.

Conhecida popularmente como cabelo-de-negro, mercúrio do campo e galinha-choca, esta espécie é utilizada na medicina popular como abortivo e no tratamento de processos inflamatórios (VIOLANTE et al., 2012).

Do ponto de vista químico, a espécie *E. suberosum* foi pouco explorada, sendo relatado até o presente momento, metabólitos secundários como diterpenos com esqueletos do tipo abietano e *ent*-kaurano como 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (**21**) e o *ent*-12 α -hidroxi-kaur-16-en-19-al (**22**), flavonoides como ombuina-3-rutinosideo (**23**) (NASCIMENTO et al., 2012), e alcaloides como calistegina A₃ (**24**) (BROCK et al., 2005) (Figura 1.7, p. 17).

FIGURA 1.7 – Metabólitos secundários relatados para a espécie *E. suberosum*.



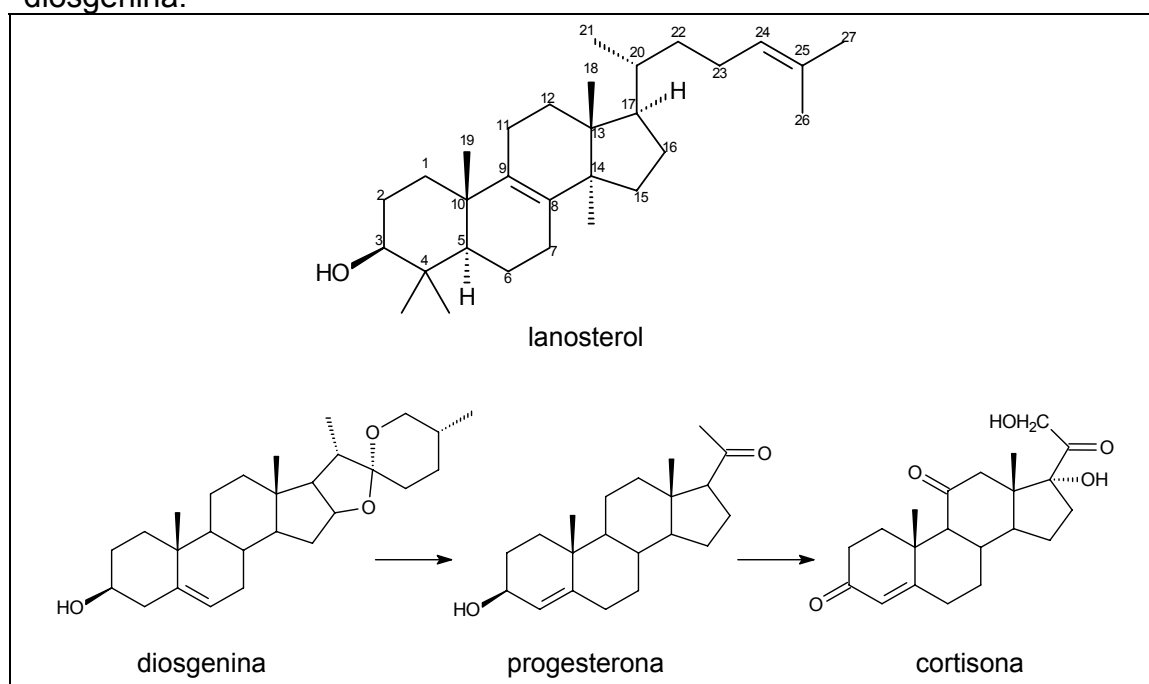
Em relação à atividade biológica, *E. suberosum* mostrou atividade antibacteriana frente a linhagem *Staphylococcus aureus* e significativa atividade antifúngica contra as cepas *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei* e *C. glabrata*, em um estudo realizado por VIOLANTE et al. (2012) para investigar as propriedades antifúngicas e antibacterianas de algumas plantas medicinais do Cerrado. Neste mesmo estudo, ao avaliar a toxicidade dos extratos e frações frente à *Artemia salina*, a espécie *E. suberosum* apresentou elevada toxicidade, sendo o uso medicinal desta espécie não é recomendado até que estudos de segurança sejam realizados. Em contrapartida, o teste de letalidade de *Artemia salina*, tem demonstrado boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos, e por este motivo, tem sido amplamente utilizado no fracionamento bioguiado de compostos citotóxicos em extratos vegetais. Assim, *E. suberosum* pode ser uma fonte importante de potenciais agentes antitumorais, sendo considerada uma espécie promissora para investigações fitoquímicas (VIOLANTE et al., 2012).

1.6 – CONSIDERAÇÕES SOBRE AS CLASSES DE COMPOSTOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *E. suberosum*.

1.6.1 – Esteroides

Os esteroides, componentes vitais das membranas de muitos organismos, são triterpenoides modificados contendo o sistema de anel tetracíclico do lanosterol (Figura 1.8), porém sem os dois grupos metil em C-4 e um em C-14. Por possuírem diversas atividades biológicas, muitos esteroides naturais, e um considerável número de compostos esteroidais sintéticos e semissintéticos, são rotineiramente empregados na medicina (DEWICK, 2002). Como exemplo têm-se as saponinas esteroidais, isoladas de espécies do gênero *Dioscorea* (Dioscoreaceae), as quais, por uma hidrólise ácida simples, liberam uma aglicona principal – a diosgenina, que, através de diversas etapas sintéticas é transformada em progesterona e esta em cortisona, que é utilizada para o tratamento de artrite (Figura 1.8) (HOSTETTMANN, QUEIROZ, VIEIRA, 2003).

FIGURA 1.8 – Estrutura do lanosterol e obtenção de cortisona a partir da diosgenina.



Dentre os esteroides comumente encontrados, está o β -sitosterol, amplamente distribuído em todo o reino vegetal sendo conhecido por estar envolvido na estabilização de membranas celulares. Este fitoesteroide é uma matéria-prima alternativa na produção de androstenodiona, um intermediário importante para a síntese de esteroides. Estreitamente relacionado com o β -sitosterol está o estigmasterol, que possui uma insaturação adicional na cadeia lateral da molécula, uma característica vista em muitos esteroides vegetais. (KONGDUANG, WUNGSINTAWEEKUL, DE-EKNAMKUL, 2008).

1.6.2 – Flavonoides

Os flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de distribuição ampla na natureza. Encontrados em plantas, principalmente na forma de glicosídeos, são os pigmentos amarelos, laranjas, azuis e vermelhos das flores, responsáveis também pela coloração amarela das mesmas no outono. Sua presença está relacionada às funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica e antibacteriana) e de atração de polinizadores. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal, representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES et al., 2003).

São constituintes importantes da dieta humana, apesar de não serem considerados nutrientes. Ocorrem naturalmente em frutas, legumes e em bebidas, como no chá e no vinho (COOK, SAMMAN, 1996). Têm sido bem relatados por exibirem diversos efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidante, cardioprotetora, vasoprotetora (COOK, SAMMAN, 1996) e antitrombótica (NAVARRO-NÚÑES et al., 2010), efeitos anticancerígenos e quimiopreventivos (CAI, RAHN, ZHANG, 1997), e ação antiviral (SAVI et al., 2010). Por sua natureza fenólica, atuam como quelantes e captadores de radicais livres (MUSCHIETTI, MARTINO, 2012).

HEGNAUER (1981) ao resumir a pesquisa dos primeiros investigadores do gênero *Erythroxylum*, concluiu que os flavonoides eram os flavonoides prevalentes na família Erythroxylaceae e a maioria deles

ocorrem como 3-O-monoglicosídeos com glucose, galactose, arabinose, xilose e raminose, e como 3-O-diglicosídeos com várias combinações destes açúcares. Kaempferol, quercetina e ombuina são os principais flavonóis agliconas do gênero *Erythroxylum* (BOHM et al., 1988).

Alguns flavonoides têm sido relatados para o gênero *Erythroxylum*. Em 1988 foram isolados da espécie *E. suberosum* o flavonol aglicona quercetina, além de vários derivados 3-O-monoglicosídeos e 3-O-diglicosídeos (BOHM et al., 1988). Em 2012 foram isolados desta mesma espécie os flavonoides ombuina-3-rutinosídeo e rutina (quercetina-3-rutinosídeo) (NASCIMENTO et al., 2012).

Catequinas (ou flavanois) estão incluídas entre uma das principais classes de flavonoides, sendo os componentes predominantes no chá verde (LAMARÃO, FIALHO, 2009). Eles apresentam ação antioxidante comprovada, além de importantes propriedades biológicas, farmacológicas e medicinais (IACOPINI et al., 2008). MIURA e colaboradores (2000) mostraram em seu trabalho que catequinas presentes no chá verde impedem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade em seres humanos.

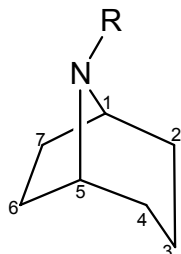
Apesar de serem flavonoides bastante comuns, são poucos os relatos a respeito da ocorrência destes em espécies de *Erythroxylum*. Estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero levaram ao isolamento da epicatequina a partir da espécie *E. leal costae* (CHÁVEZ et al., 1996), e (+)-catequina-3-raminosídeo de *E. novogranatense* (BONEFELD, FRIEDRICH, KOLODZIEJ, 1986).

1.6.3 – Alcaloides tropano e nortropano

São conhecidos mais 200 alcaloides tropanos obtidos a partir de fontes naturais. Eles têm sido isolados de várias espécies das famílias Convolvulaceae, Dioscoreaceae, Erythroxylaceae, Solanaceae, Proteaceae e Rhizophoraceae (DRÄGER, 2002). Estes apresentam em comum uma estrutura bicíclica, denominada tropano 8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano, com

o anel tropano constituído formalmente pelos anéis pirrolidina e piperidina (Figura 1.9) (BACCHI, 2003).

FIGURA 1.9 - Estrutura básica do esqueleto tropano.



Alcaloides da classe tropano são um grupo bem estabelecido com propriedades farmacológicas relevantes. O representante mais familiar é escopolamina que é largamente utilizado como midriático em oftalmologia, para suprimir enjoo, como sedativo e pré-anestésico e para prevenir espasmos musculares. Escopolamina e alcaloides relacionados ocorrem em plantas da família Solanaceae e apresentam um substituinte metil no átomo de nitrogênio. Em contraste, alcaloides nortropano (aqueles que não possuem o grupo N-metil) têm sido isolados raramente, ocorrendo ocasionalmente como constituintes minoritários em plantas contendo os familiares alcaloides tropanos (MOLYNEUX, NASH, ASANO, 2005).

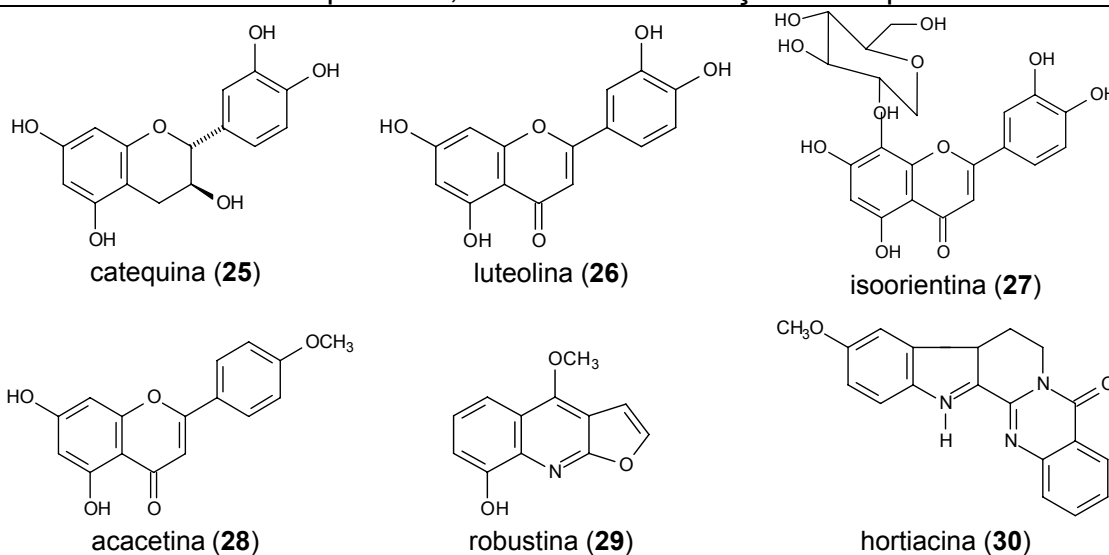
1.7 – AS CATEPSINAS

Catepsinas, também conhecidas como cisteíno peptidases lisossomais, compreendem uma numerosa e importante família de enzimas similares à papaína (do inglês papain-like) (SEVERINO et al., 2011). Estas enzimas estão envolvidas em numerosos processos fisiológicos e também desempenham papéis na rotatividade de proteínas intracelulares nos lisossomos e no processamento/ativação de outras proteínas, incluindo proteases (TURK, TURK, 2008). No entanto desequilíbrios na regulação da atividade proteolítica podem conduzir a uma ampla gama de doenças

humanas, incluindo aterosclerose, artrite reumatoide, osteoporose e vários cânceres (KUESTER et al., 2008).

SEVERINO (2008) mostrou, em um trabalho baseado em produtos naturais, que entre as diversas classes de compostos testados (derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico, cumarinas, limonoides, triterpenos, ácidos e derivados, lignanas, flavonoides e alcaloides), os resultados mais promissores frente às catepsinas foram obtidos para os alcaloides, flavonoides e seus derivados (Tabela 1.3).

TABELA 1.3 – Porcentagem de inibição de alguns flavonoides e alcaloides testados frente às catepsinas K, L e V na concentração de 25 μ M.



Compostos	% Inibição CatK	% Inibição CatL	% Inibição CatV
25	0	26	83
26	0	37	89
27	0	20	61
28	0	16	63
29	0	51	0
30	25	90	98

Fonte: SEVERINO, 2008

A importância em utilizar as catepsinas como o alvo biológico neste estudo está baseada no fato, destas estarem envolvidas em diversos processos patológicos e pela dificuldade de se encontrar inibidores específicos, devido a similaridade estrutural que elas apresentam entre si (SEVERINO, 2008).

1.7.1 – Catepsinas Estudadas

1.7.1.1 – Catepsina K

A catepsina K possui uma sequência de aminoácidos que se assemelha em cerca de 60% com a catepsina L, porém é bem distinguida pelo seu perfil de expressão nos tecidos e pela especificidade do substrato. Catepsina K é encontrada predominantemente em osteoclastos, e em níveis mais baixos, também é expressa no ovário, coração, músculo esquelético, pulmão, placenta, testículo, intestino delgado e cólon (YASUDA, KALETA, BRÖMME, 2005).

É considerada a principal enzima responsável pela degradação da matriz orgânica óssea e a deficiência completa na sua atividade leva a picnodisostose, uma rara displasia esquelética autossômica recessiva. Por outro lado, a superexpressão de catepsina K em osteoclastos, está associada ao desenvolvimento de osteoporose. Por este fato, esta enzima tornou-se alvo terapêutico no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de osteoporose e de outras doenças associadas com a remodelação óssea elevada, tais como osteoartrite e doença óssea metastática (RODAN, DUONG, 2008).

1.7.1.2 – Catepsina L

A sequência de aminoácidos da catepsina L mostra uma elevada semelhança com as catepsinas B e H. Além de humanos, foi encontrada em várias espécies, tais como rato, porco, pombo, rã, carpa, e *Euglena gracilis* (mas não em levedura e em *E. coli*), e em vários órgãos, tais como o fígado, rim, baço, pulmão, cérebro, músculo, estômago, pâncreas e em muitas células tumorais (BOHLEY, SEGLEN, 1992).

A catepsina L, assim como a catepsina B e D, é capaz de degradar moléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, proteoglicanos e elastina, assim como componentes das membranas basais, incluindo o colágeno tipo IV e laminina. Além disso está envolvida nos processos de diferenciação dos queratinócitos, nas funções do coração e reprodução (KUESTER et al., 2008). Estudos sobre a expressão de catepsinas revelou aumento da expressão das catepsinas B e L em melanomas e carcinomas de mama, pulmão, cólon e próstata. Tem sido demonstrado que as células de melanoma não-metastáticas são convertidas em células metastáticas sobre expressão de catepsina L (MARQUES, et al., 2012)

1.7.1.3 – Catepsina V

A catepsina V foi identificada pela primeira vez no timo e testículo, e está associada com miastenia grave, diabetes tipo 1 e doenças neurológicas (NIWA et al., 2012). A enzima também é expressa em carcinomas da mama e colorretal e apresenta semelhança em cerca de 78% com a catepsina L, que se relaciona com a progressão do câncer (NIWA et al., 2012). Acredita-se que a catepsina V desempenha um papel importante na progressão do câncer, tornando-se assim um alvo importante no desenvolvimento de medicamentos para a oncologia (SEVERINO et al., 2011). Além disso, esta enzima apresenta a atividade elastiolítica mais potente dentre as enzimas proteolíticas conhecidas. Essa capacidade de degradar a elastina tem sido associada, juntamente com a catepsina K e S, ao processo de desenvolvimento da aterosclerose (SEVERINO, 2008).

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo químico da espécie *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae), visando avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às catepsinas K, L e V.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo químico do extrato etanólico das folhas, do caule e da raiz de *E. suberosum*, a fim de isolar e caracterizar os metabólitos secundários;
- Avaliar, por meio de teste *in vitro*, a atividade dos extratos, frações e, quando possível, das substâncias isoladas, em busca de inibidores seletivos de catepsinas, utilizando como ferramenta o substrato fluorogênico ZFR-MCA.

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 – Reagentes

- Reveladores:
 - Solução ácida de vanilina, preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvida em solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado;
 - Solução de Dragendorff, preparada a partir de 1 mL de solução estoque do reagente com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada.
- Reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos:
 - Inibidor irreversível específico de cisteína peptidase E-64 [L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] e DTE (ditioeritritol) foram obtidos da Sigma-Aldrich;
 - Substrato fluorogênico Z-FR-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) foram adquiridos da empresa Bachem Inc e Sigma-Aldrich.
- Enzimas estudadas (recombinantes humanas):
 - 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.

3.1.2 – Solventes

- Eluentes para cromatografia:
 - Solventes grau P.A. (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, e metanol), de diversas marcas;

- Solventes grau CLAE (metanol, diclorometano e acetonitrila), marcas Panreac e Tedia J.T.Baker;
- Solventes utilizados para a obtenção dos espectros de RMN:
 - Deuterados (clorofórmio, metanol e acetona), marcas Sigma-Aldrich e Merck.

3.1.3 – Fases Estacionárias

- Cromatografia em coluna aberta (CC):
 - *Sephadex* LH-20, Amershan Pharmacia Biotech®;
 - Sílica gel 60 (70-230 *mesh*), denominada sílica comum, marca Macherey-Nagel;
 - Sílica gel 60 (230-400 *mesh*), denominada sílica do tipo *flash*, marca Macherey-Nagel.
- Cromatografia em camada delgada (CCD):
 - Sílica gel 60 com F254 ($\Phi = 0,2$ mm), em folhas de alumínio das marcas Whatman e Fluka.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):
 - Phenomenex C18 Luna (100 Å e 10 μ m) – 15 x 0,46 cm;
 - Phenomenex C18 Luna (100 Å e 10 μ m) – 25 x 0,70 cm;

3.1.4 – Equipamentos

- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm;
- 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.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE):
 - Sistema Analítico: Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), 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), injetor manual e software *Chem Station*.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM):
 - 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 elétrons (70 eV).
- Espectrofluorímetro com leitor de placa de Leitor de placa de ELISA Molecular Devices, modelo SpectraMax M3: Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos – SP.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:
 - Bruker, modelos Avance III – 14,1 e 9,4 Tesla (600 e 400 MHz para frequência do hidrogênio; 150 e 100 MHz para o carbono). Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos – SP.
 - Bruker, modelo Avance III - 11,75 Tesla (500 MHz para frequência do hidrogênio e 125 MHz para o carbono). Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

3.2 – METODOLOGIA

3.2.1 - Coleta do Material Vegetal

A espécie *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae) foi coletada no cerrado do centro-oeste brasileiro, na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA - Gama/DF) em 14 de dezembro de 2010. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS) foram armazenados para coletas futuras. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Departamento de Ciências Biológicas, UFG, Regional Catalão), o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), sob o número ABS 324.

3.2.2 - Preparo dos Extratos e Partições

As diferentes partes do vegetal (folhas, caule e raiz) foram secas em estufa de circulação a 40 °C por 4 dias, posteriormente trituradas em moinho de facas e submetidas separadamente à maceração com etanol, a temperatura ambiente, durante três dias. Após os primeiros três dias de extração o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à baixa pressão, obtendo-se o extrato etanólico das folhas (EEF), do caule (EEC) e da raiz (EER). Este procedimento foi repetido três vezes. Amostras dos extratos foram enviadas para avaliação biológica em enzimas (cisteíno peptidases).

Depois de preparado, 1,5 g do extrato das folhas (EEF) foi solubilizado em 100 mL de MeOH/H₂O (3:7 v:v) e submetido a extração líquido-líquido com hexano (30 mL) e acetato de etila (30 mL), sendo realizado em triplicata. Os solventes foram evaporados, obtendo-se as frações hexano (H), acetato de etila (A) e hidroalcóolica (MA). Os extratos etanólicos dos caules

(EEC) e das raízes (EER), 41,8 g e 25,4 g respectivamente, também foram submetidos a extração líquido-líquido seguindo o mesmo procedimento. Alíquotas das frações (H, A e MA) foram enviadas para avaliação biológica. As massas das partes vegetais, dos extratos e das frações estão descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidos após partição líquido-líquido.

Parte vegetal	Material seco (g)	Extrato etanólico (g)	Rendimento (%)	Frações obtidas (g)		
				H	A	MA
Folha	786,20	49,00	6,23	0,006*	0,16*	0,57*
Caule	1.772,00	45,80	2,60	1,47	11,82	27,11
Raiz	542,00	28,30	5,22	1,44	6,31	Congelada*

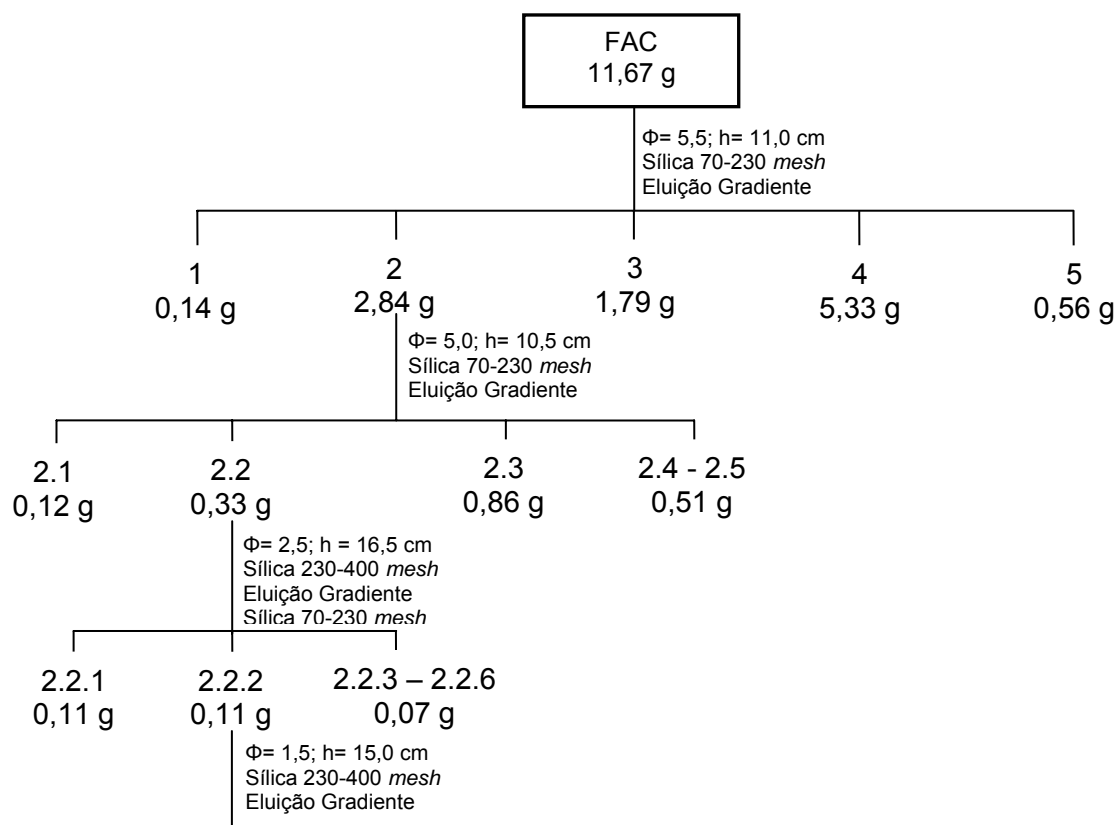
H: hexano; **A:** acetato de etila; **MA:** metanol/água

*extração líquido-líquido feita com 1,5 g do extrato etanólico das folhas (EEF) para realização dos ensaios enzimáticos.

3.2.3 – Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila do Caule (FAC) de *E. suberosum*.

A fração FAC (11,67 g), foi submetida a CC utilizando diferentes fases estacionárias e sistemas de eluição variados. Após cada fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD e posteriormente agrupadas de acordo com a semelhança dos valores de R_f . (Fluxograma 3.1, p. 31). Após sucessivos fracionamentos, as amostras que apresentaram maior grau de pureza, evidenciado através da CCD, foram caracterizadas por RMN de ^1H , sendo que na fração FAC 2.2.2 identificou-se a mistura das substâncias I – III.

FLUXOGRAMA 3.1 – Fracionamento da fração FAC.



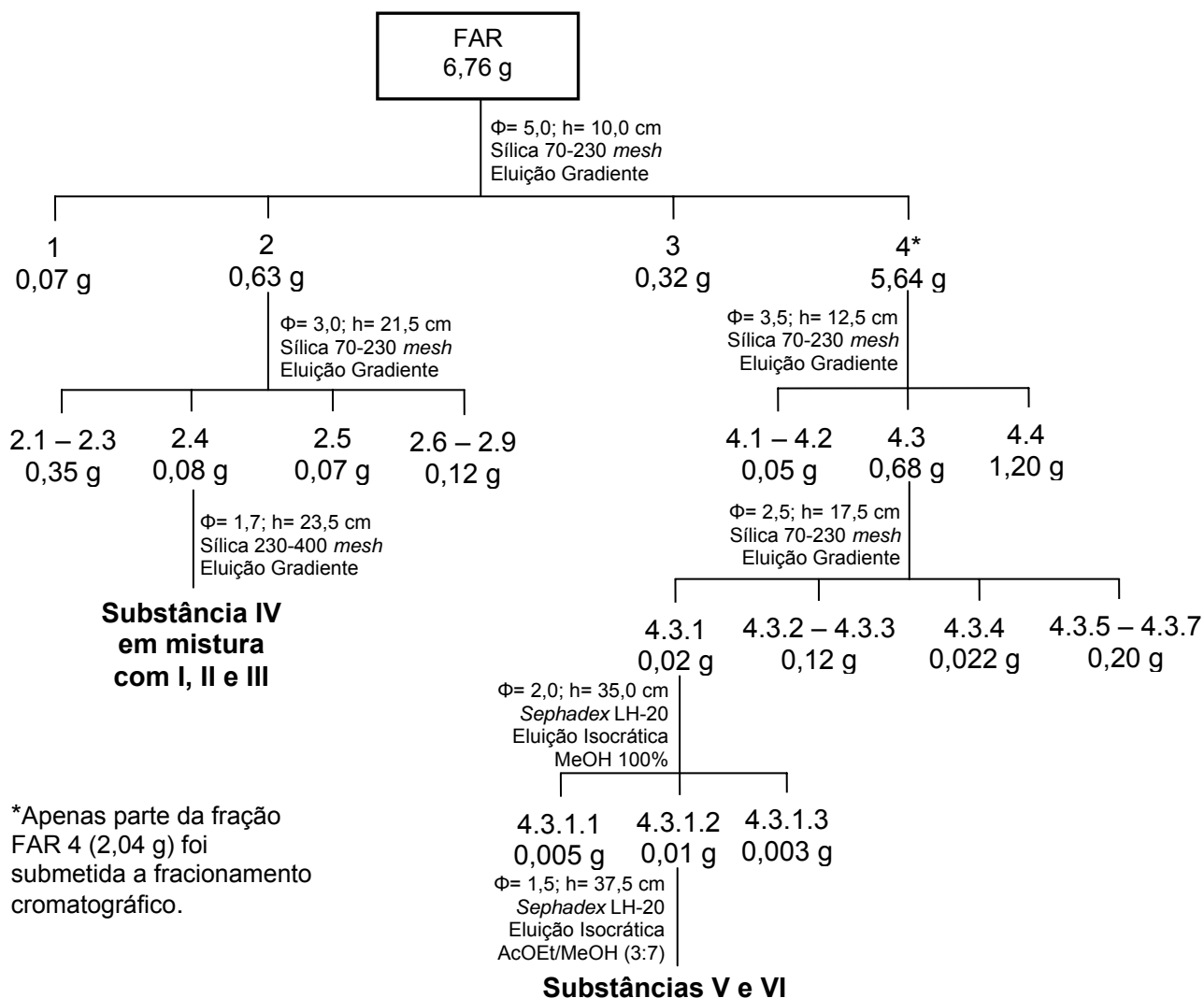
Substâncias I - III

Para confirmar a identificação das substâncias, a mistura foi submetida a CG/EM, utilizando as seguintes condições: 150 °C por 1 min com o aumento de 10 °C/min até 250 °C, permanecendo por 4 min. Posteriormente, aumentou-se 10 °C/min até 280 °C, deixando nesta temperatura por 20 min. Hélio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com vazão constante de 1 mL min⁻¹, modo *split* e volume de injeção de 1 µL. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 280 °C, respectivamente.

3.2.4 – Fracionamento Cromatográfico da Fração Acetato de Etila da Raiz (FAR) de *E. suberosum*.

A fração FAR (6,16 g), foi submetida a CC utilizando diferentes fases estacionárias e sistemas de eluição variados. Após cada fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD e posteriormente agrupadas de acordo com a semelhança dos valores de R_f . Após sucessivos fracionamentos, as amostras que apresentaram maior grau de pureza, evidenciados por CCD, foram caracterizadas por RMN de ^1H . Na fração FAR 2.4 identificou-se a substância **IV** (em mistura com **I**, **II** e **III**) e na fração FAR 4.3.1.2 a mistura das substâncias **V** e **VI** (Fluxograma 3.2).

FLUXOGRAMA 3.2 – Fracionamento da fração FAR.



3.2.5 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico das Folhas (EEF)

O extrato EEF (46,40 g) foi submetido a CC, utilizando sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol e metanol. Após fracionamento, as amostras foram analisadas por CCD, utilizando três diferentes sistemas de solvente: a) Hex/AcOEt (9:1); b) Hex/AcOEt (6:4) e c) AcOEt/MeOH (9:1) e reveladas com solução ácida de vanilina e Dragendorff. O resultado do fracionamento está representado na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 - Fracionamento do extrato EEF de *E. suberosum*.

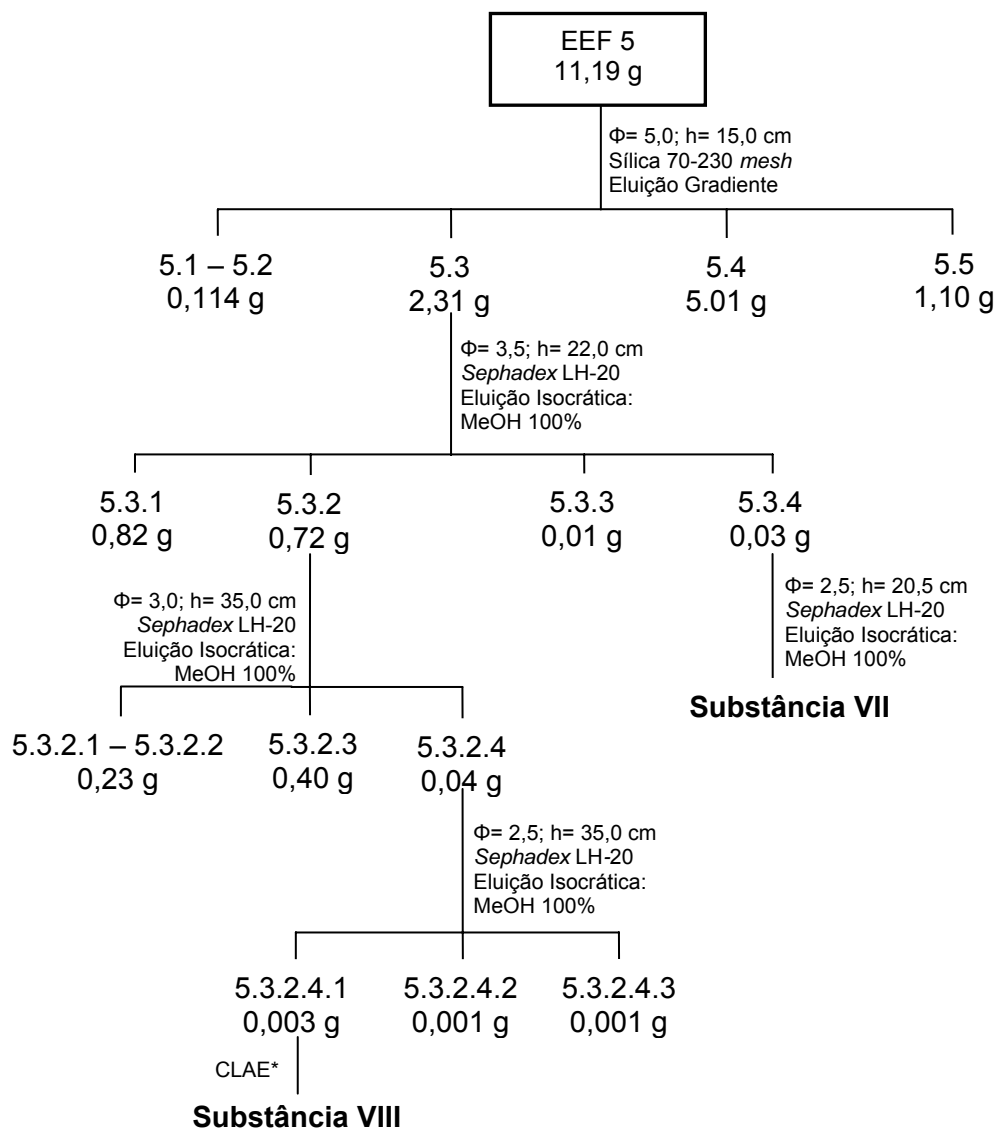
Frações	Eluente	Proporção da mistura de eluentes	Massa (g)
EEF 1	Hexano	100%	0,10
EEF 2	Hex/AcOEt	1:1	3,05
EEF 3	AcOEt	100%	0,52
EEF 4	AcOEt/MeOH	1:1	12,95
EEF 5	MeOH	100%	11,19

3.2.6 - Fracionamento Cromatográfico da Fração EEF 5

A fração EEF 5 (11,19 g) foi submetida a CC utilizando sílica (70-230 *mesh*) como fase estacionária e modo gradiente de eluição a partir de hexano 100% até MeOH 100%. Após análise por CCD, a fração EEF 5.3 e EEF 5.4 foram refracionadas por CC, utilizando a técnica de permeação em gel com *Sephadex* LH-20 e modo isocrático de eluição. As frações resultantes foram analisadas por CCD e posteriormente agrupadas de acordo com as semelhanças dos R_{fs} . Após sucessivos refracionamentos foram isolados os compostos **VII** (Fluxograma 3.3, p. 34) e **IX** (Fluxograma 3.4, p. 35), sendo a fração EEF 5.3.2.4.1 submetida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de onde foi isolado o composto **VIII** (Fluxograma 3.3, p. 34). A

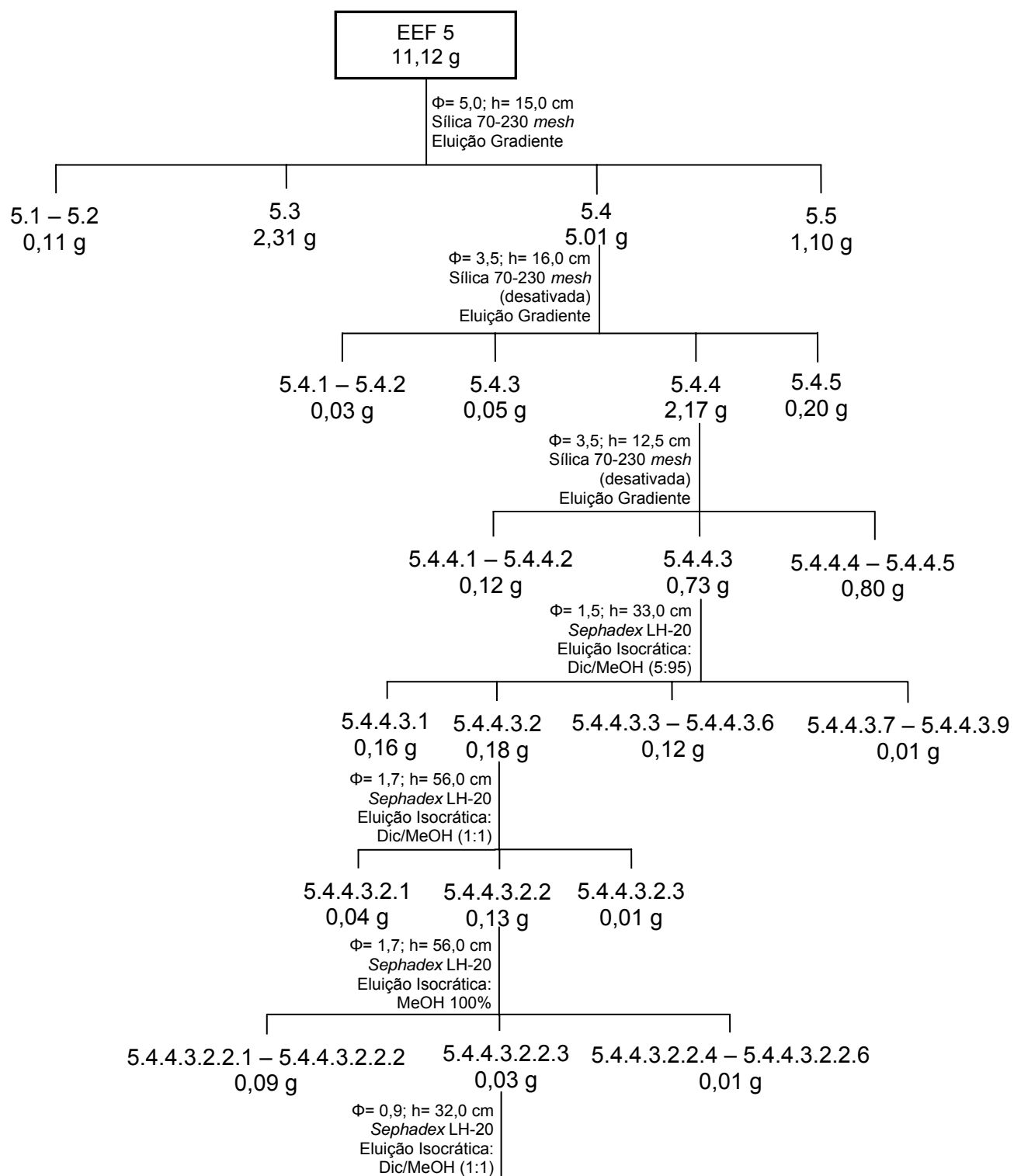
determinação da porção monossacarídica de **VIII** e **IX** foi realizada em CG-EM, após hidrólise, redução e acetilação de acordo com o item 3.2.6.1 (p. 36). A identificação estrutural foi realizada através da análise dos espectros de RMN de ^1H e adicionalmente, no caso das substâncias **VIII** e **IX**, pelas análises dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC.

FLUXOGRAMA 3.3 – Fracionamento da fração EEF 5.



*Coluna semi-preparativa Phenomenex C18 Luna (100 Å e 10 μm) – 25 x 0,7 cm. Loop: 200 μL . Fase móvel: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 97:3 (Solvente A) e CH_3OH (Solvente B). Gradiente: 0 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min); 10 min 10% B (fluxo: 1,0 mL/min); 40 min 70% B (vazão: 1,0 mL/min); 44 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min); 47 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min) (CHEN, ZUO, DENG, 2001).

FLUXOGRAMA 3.4 – Continuação do fracionamento da fração EEF 5.



Substância IX

3.2.6.1 – Identificação dos componentes monossacarídicos

Uma alíquota (1,0 mg) dos flavonoides glicosilados **VIII**, **IX** e **X** foi tratada com 1,0 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M, durante 8 horas, a 100°C, seguida por evaporação até *secura*. Em seguida, o produto hidrolisado foi reduzido com NaBH₄ (borohidreto de sódio) em temperatura ambiente, pH 9-10, por aproximadamente 12 horas. Após este período, o material foi neutralizado (pH 7,0) com resina catiônica (forma H⁺), filtrado em algodão e seco na capela. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila (WOLFROM, THOMPSON, 1963a).

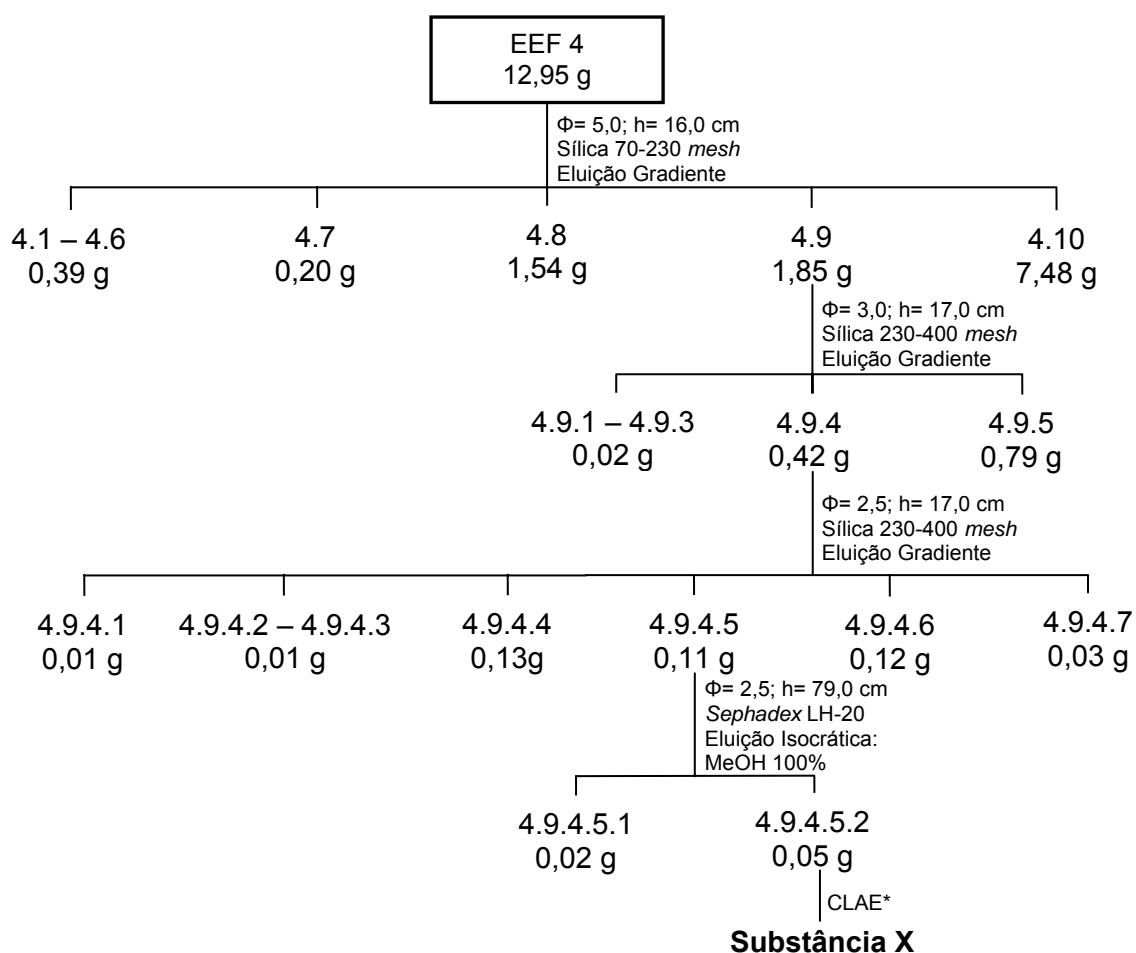
Para tornar o produto volátil a fim de realizar análise por CG-EM, este foi acetilado com uma mistura de anidrido acético (Ac₂O)/piridina (1:1, v/v, 2 mL) em temperatura ambiente por 12 horas e em seguida extraído com clorofórmio. A piridina residual foi removida por complexação com sulfato de cobre 5% (m/v) (WOLFROM, THOMPSON, 1963b). Após completa remoção da piridina, o clorofórmio foi evaporado e o produto analisado por CG-EM. A temperatura do forno do CG foi programada da seguinte forma: 75 °C por 1 min com gradiente de 35 °C/min até 100 °C, permanecendo por 5 min. Posteriormente elevou-se 45 °C/min até 150 °C por 5 min e 55 °C/min até 200 °C, permanecendo por 15 min. Hélio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com vazão constante de 1 mL min⁻¹ com *split* e volume de injeção de 1 µL. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 280 °C, respectivamente.

3.2.7 – Fracionamento Cromatográfico da Fração EEF 4

A fração EEF 4 (12,95 g) foi submetida a sucessivos fracionamentos via CC utilizando fase estacionária sílica gel (70-230 e 230-400 *mesh*) e eluição com um sistema gradiente de solventes de polaridade crescente: Hex 100% → Hex/AcOEt → AcOEt 100% → AcOEt/MeOH → até

MeOH 100%. Após análise por CCD, a fração EEF 4.9.4.5 foi refracionada por CC utilizando como fase estacionária *Sephadex* LH-20 e modo isocrático de eluição (MeOH 100%). As frações resultantes foram analisadas por CCD, sendo a fração EEF 4.9.4.5.2 purificada por CLAE, que levou ao isolamento da substância **X** (Fluxograma 3.5). Em seguida, a substância **X** foi submetida ao procedimento de hidrólise, redução e acetilação de acordo com o item 3.2.6.1 p. 36) para determinação da porção monossacarídica via análise em CG-EM. A identificação estrutural foi realizada através das técnicas de RMN uni e bidimensionais em comparação com dados da literatura.

FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento da Fração EEF 4.



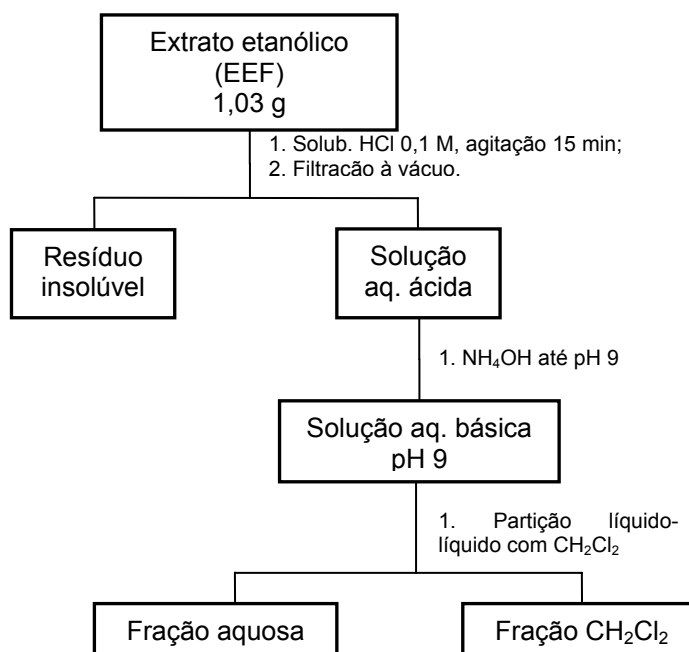
*Coluna semi-preparativa Phenomenex C18 Luna (100 Å e 10 µm) – 25 x 0,7 cm. Loop: 200 µL. Fase móvel: H₂O/CH₃COOH 97:3 (Solvente A) e CH₃OH (Solvente B). Gradiente: 0 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min); 10 min 10% B (fluxo: 1,0 mL/min); 40 min 70% B (vazão: 1,0 mL/min); 44 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min); 47 min 0% B (fluxo: 0,9 mL/min) (CHEN, ZUO, DENG, 2001).

3.2.8 – Metodologia Para Extração e Análise de Alcaloides

A presença do átomo de nitrogênio contendo um par de elétrons não compartilhado faz dos alcaloides substâncias com caráter básico. Tendo esse caráter de base fraca, estes compostos são convertidos na forma de sal em soluções aquosas ácidas, e quando tratados com soluções alcalinas, o nitrogênio libera um íon hidrogênio formando uma amina livre. Essas propriedades facilitam a sua extração e isolamento de outros constituintes vegetais (SIMÕES et al., 2003).

Tendo em vista o supracitado, o extrato etanólico das folhas de *E. suberosum* foi submetido à extração ácido-base, direcionada para a obtenção de frações ricas em alcaloides, segundo o procedimento descrito por ZUANAZZI et al. (2001). (Fluxograma 3.6). As folhas secas e moídas de *E. suberosum* (169,0 g) foram submetidas à maceração com etanol à temperatura ambiente, conforme descrito no item 3.2.2 (p. 29). Uma alíquota do extrato etanólico concentrado (1,03 g) foi diluída em HCl (0,1 M) e após separação, a solução aquosa ácida foi alcalinizada com NH₄OH concentrado até pH 9 e em seguida submetida a partição líquido-líquido com CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca na capela gerando a fração alcaloídica.

FLUXOGRAMA 3.6 – Extração ácido-base, dirigida à obtenção de frações ricas em alcaloides.



3.2.8.1 – Análise CG-EM

A fração obtida após extração ácido-base foi dissolvida em acetato de etila e analisada por CG-EM. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 150 °C por 2 min, com gradiente de 20 °C/min até 280 °C. Hélio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com vazão constante de 1 mL min⁻¹ com *split* e volume de injeção de 1 µL. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 280 °C, respectivamente. Nesta fração foram identificadas as substâncias **XI** e **XII**.

3.2.9 - Metodologia dos Ensaio Enzimáticos

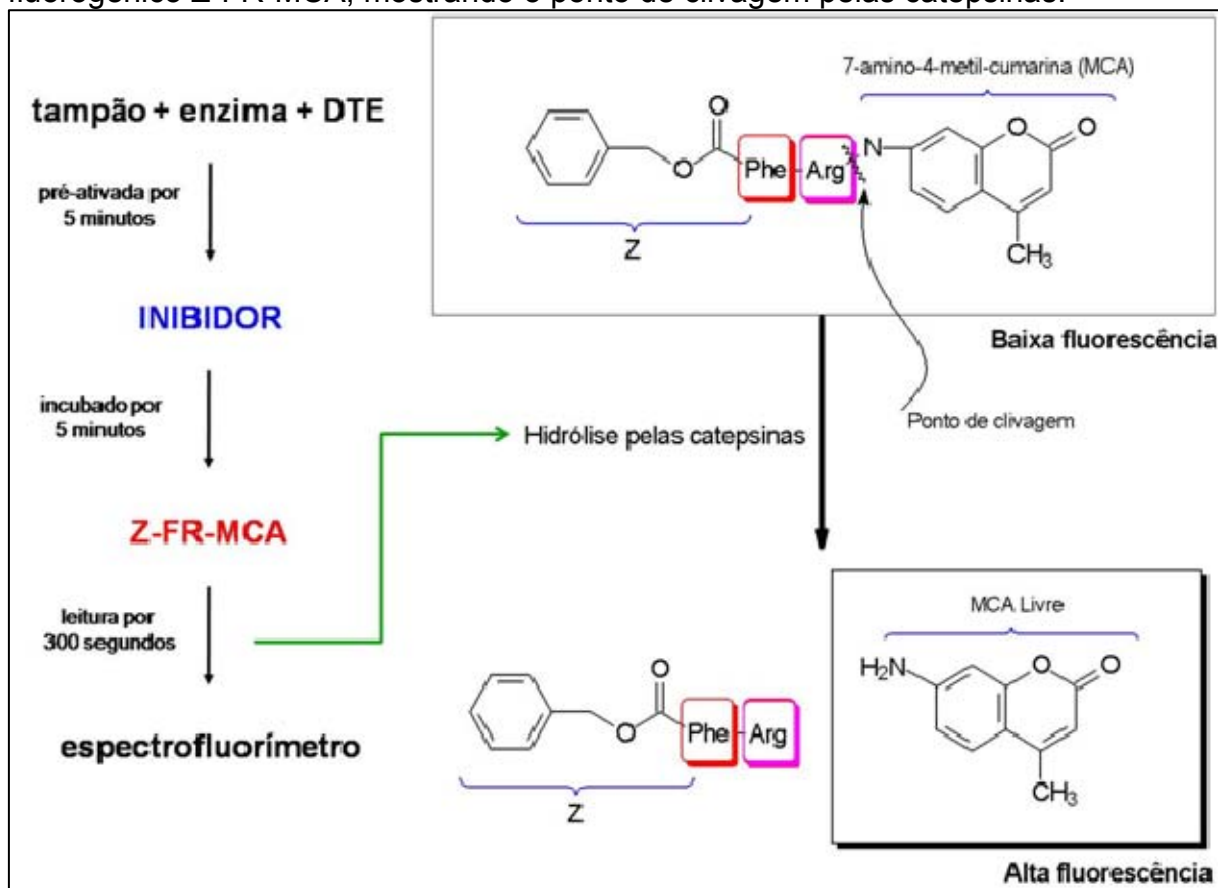
Os ensaios de inibição enzimática frente às catepsinas K, L e V foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

O procedimento utilizado foi descrito por SEVERINO, 2008, onde a determinação da atividade enzimática é baseada no aumento da fluorescência em função do tempo de reação, através da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA. Este experimento foi realizado em espectrofluorímetro com placa de ELISA de 96 poços, com volume final de 200 µL/poço, com temperatura de 27 °C, nos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460 nm.

As enzimas (1-5 nM) foram pré-ativadas em tampão acetato de sódio 100 mM, 5 mM EDTA e 5 mM de DTE, em pH 5,5. Posteriormente os possíveis inibidores (amostras dissolvidas em DMSO) foram pré-incubados no meio reacional por mais 5 minutos, sendo a determinação da atividade enzimática realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA (10 µM) por 300 segundos. A Figura 3.1(p. 40) ilustra esquematicamente a metodologia do ensaio biológico. Os extratos e frações foram ensaiados nas concentrações de 125 e 50 µg/mL.

Como controle negativo utilizou-se DMSO e como controle positivo E-64 (inibidor irreversível de cisteíno peptidases) dissolvido em DMSO (10 µM).

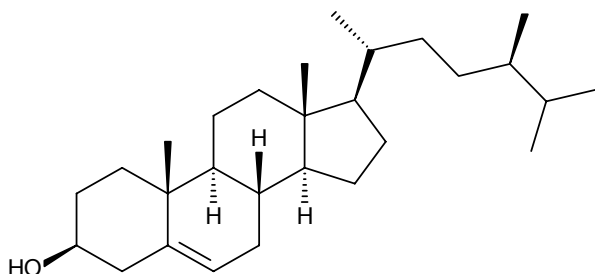
FIGURA 3.1 – Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.



Fonte: Severino, 2008.

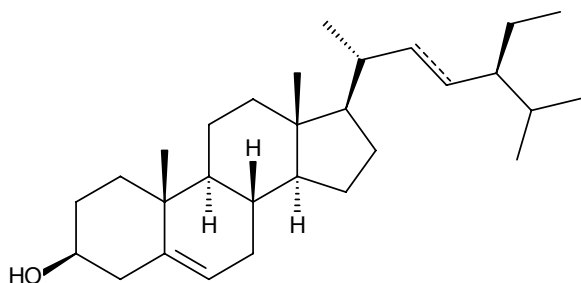
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *E. SUBEROSUM*



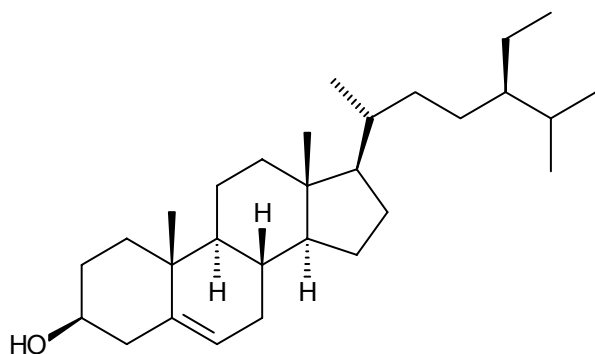
campesterol (I)

Origem: FAC
Isolamento: p. 30 e 31
Identificação estrutural:
p. 44-48



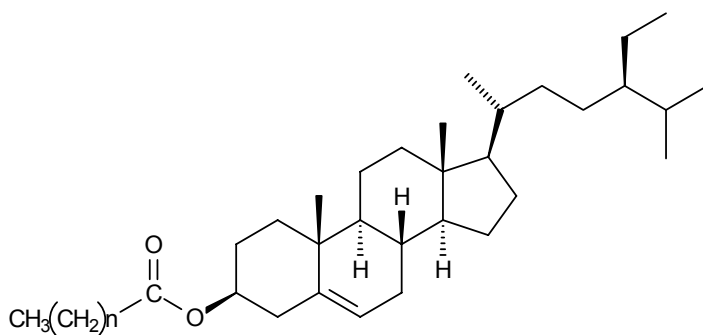
stigmasterol (II)

Origem: FAC
Isolamento: p. 30 e 31
Identificação estrutural:
p. 44-48



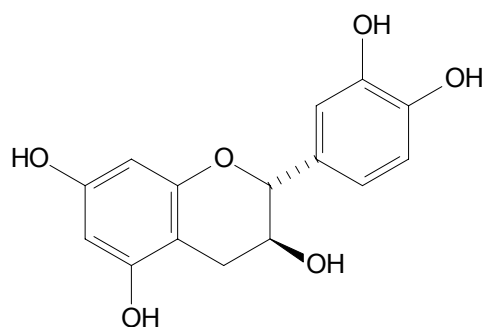
β-sitosterol (III)

Origem: FAC
Isolamento: p. 30 e 31
Identificação estrutural:
p. 44-48



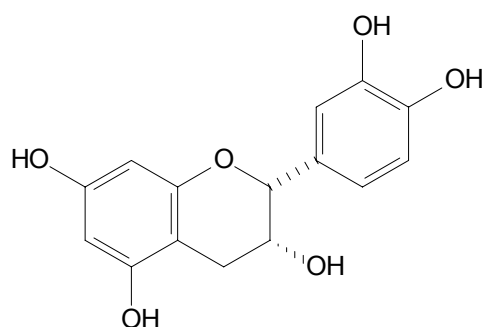
éster graxo do sitosterol (IV)

Origem: FAR
Isolamento: p. 31 e 32
Identificação estrutural:
p. 49 e 50



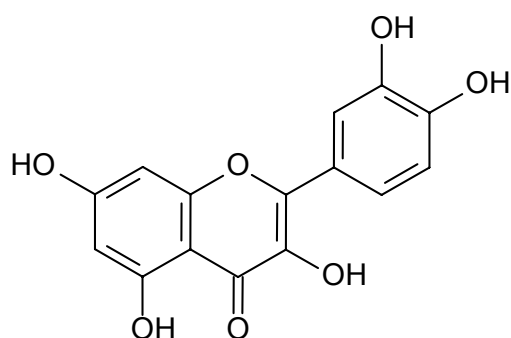
catequina (V)

Origem: FAR
 Isolamento: p. 31 e 32
 Identificação estrutural:
 p. 51-56



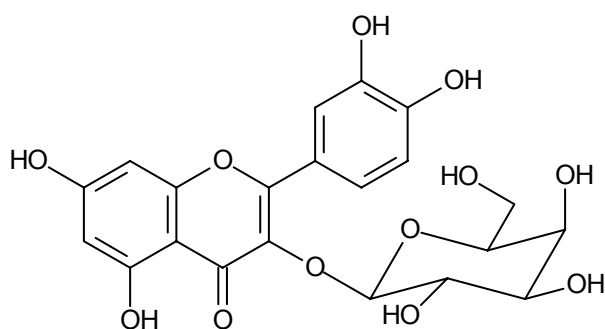
epicatequina (VI)

Origem: FAR
 Isolamento: p. 31 e 32
 Identificação estrutural:
 p. 51-56



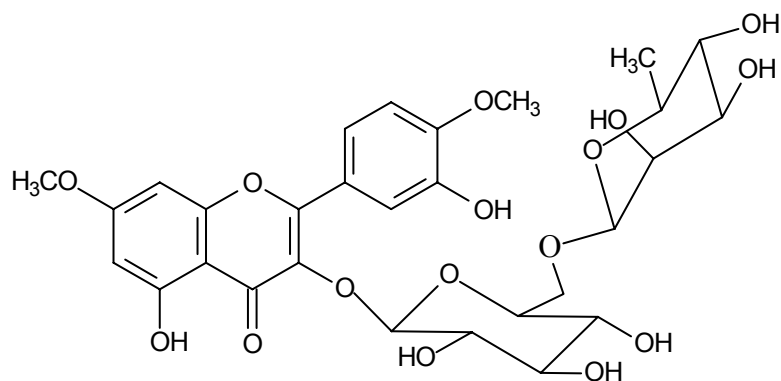
quercetina (VII)

Origem: EEF 5
 Isolamento: p. 33 e 34
 Identificação estrutural:
 p. 57-59



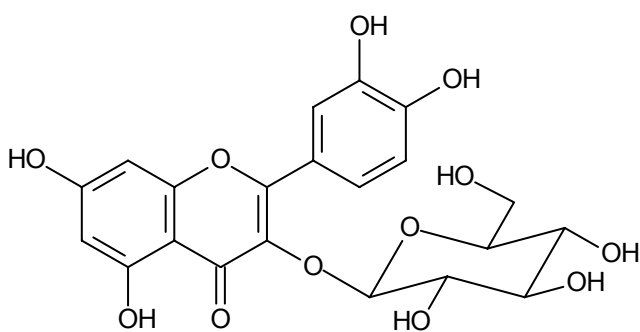
hiperina (VIII)

Origem: EEF 5
 Isolamento: p. 33 e 34
 Identificação estrutural:
 p. 60-70



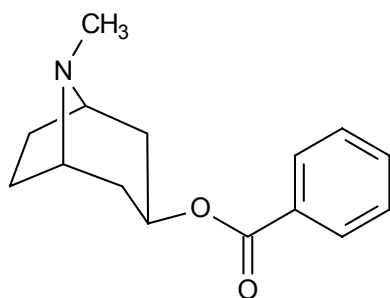
ombuina-3-rutinosídeo (IX)

Origem: EEF 5
 Isolamento: p. 33 - 35
 Identificação estrutural:
 p. 71-77



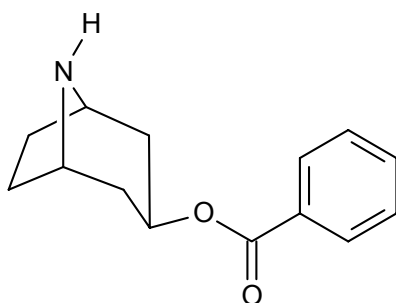
isoquercitrina (X)

Origem: EEF 4
Isolamento: p. 36 e 37
Identificação estrutural:
p. 78-86



tropacocaina (XI)

Origem: Fração CH₂Cl₂
Isolamento: pg 38 e 39
Identificação: p. 87-90



nortropacocaina (XII)

Origem: Fração CH₂Cl₂
Isolamento: pg 38 e 39
Identificação: p. 87-90

4.2 – IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS ESTEROIDES ISOLADOS DE *E. suberosum*

4.2.1 – Identificação da Mistura dos Esteroides I, II e III.

A mistura dos esteroides campesterol (I), estigmasterol (II) e β -sitosterol (III), foi isolada da fração FAC do extrato etanólico do caule. Estes compostos foram caracterizados através de experimentos de RMN de ^1H e CG-EM, em comparação com dados da literatura (ANDRADE, 2003).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, acetona- d_6) (Figura 4.1, p. 45), a presença da mistura dos esteroides I, II e III é caracterizada pela presença dos sinais em δ_{H} 5,31 (*d*, $J = 5,3$ Hz) e δ_{H} 3,38 (*m*) relativos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente, e um grande número de sinais intensos na região de δ_{H} 0,72-2,86, atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. Pelo fato dos três compostos apresentarem estruturas semelhantes, os sinais resultantes são coincidentes. As diferenças espectrais restringem-se essencialmente à cadeia lateral, pela presença da ligação dupla entre C-22 e C-23 no estigmasterol (II), e são notadas pelos sinais em δ_{H} 5,08 (*dd*, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz, H-22) e δ_{H} 5,21 (*dd*, $J = 8,6$ e $15,1$ Hz, H-23), referentes aos hidrogênios vinílicos.

O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM (Figura 4.2, p. 46) apresentou três picos com tempos de retenção 25,0; 25,8 e 27,3 min. A comparação do espectro de massas de cada pico com os da biblioteca NIST/EPA/NIH, disponível no equipamento, sugeriu tratar-se dos esteroides campesterol (I), estigmasterol (II) e β -sitosterol (III). Os espectros de massas dos picos (Figura 4.3 (A), (B) e (C), p. 46 e 47), apresentaram íons moleculares com razão m/z iguais a 400, 412 e 414 Daltons, estando compatíveis com as fórmulas moleculares $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ do campesterol, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ do estigmasterol e $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ do β -sitosterol, respectivamente. A Figura 4.4 (p. 48), apresenta propostas de fragmentação para o sitosterol (adaptado de SIMOTE, 2006).

FIGURA 4.1 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, acetona- d_6) da mistura das substâncias I, II e III.

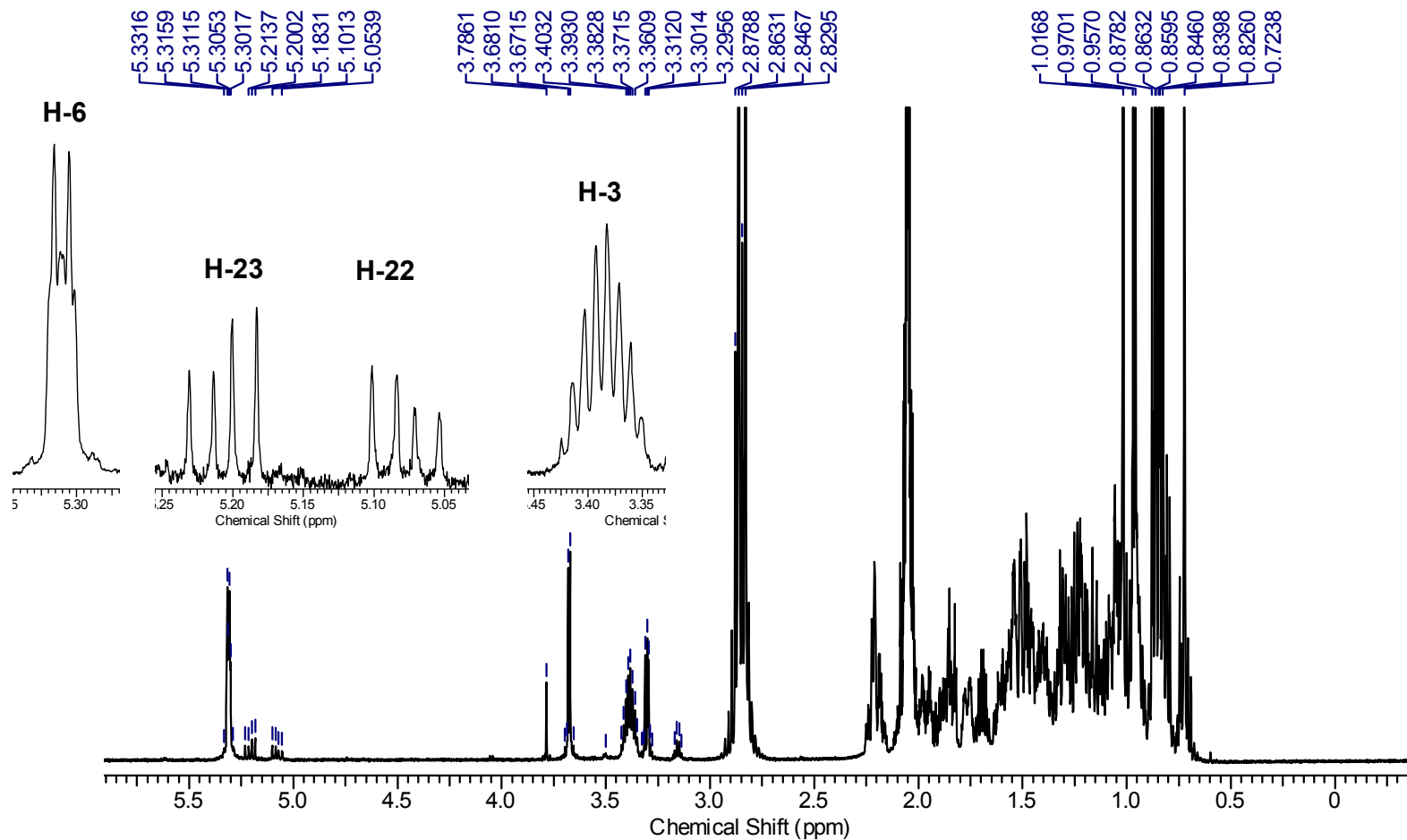


FIGURA 4.2 - Cromatograma obtido por CG-EM da mistura das substâncias I, II e III.

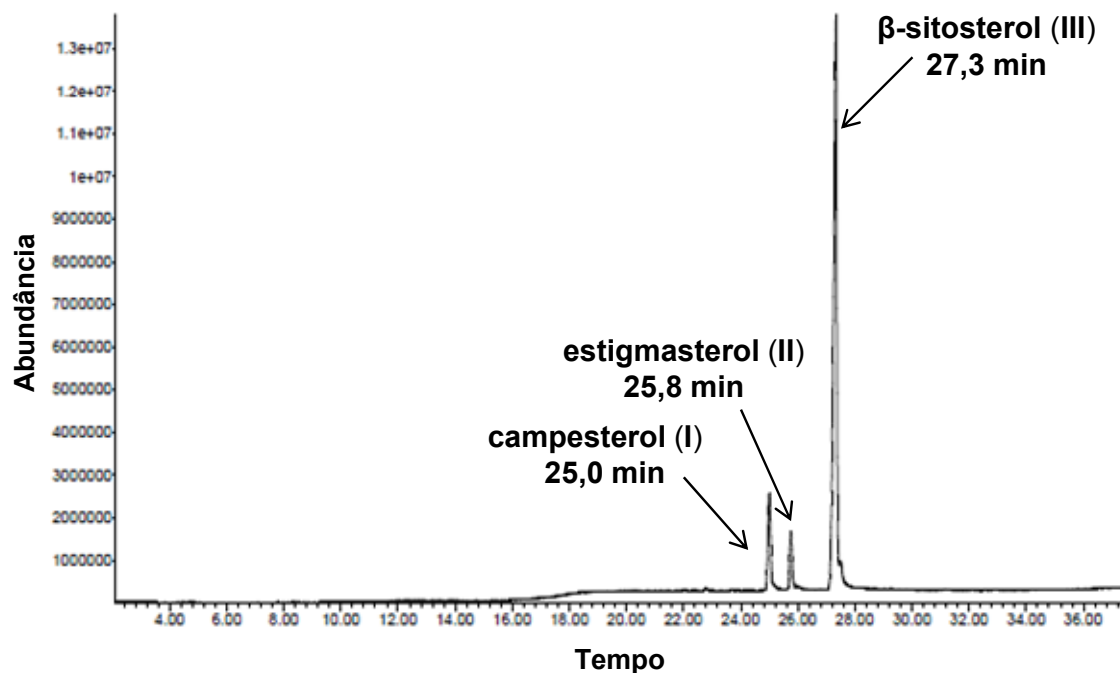
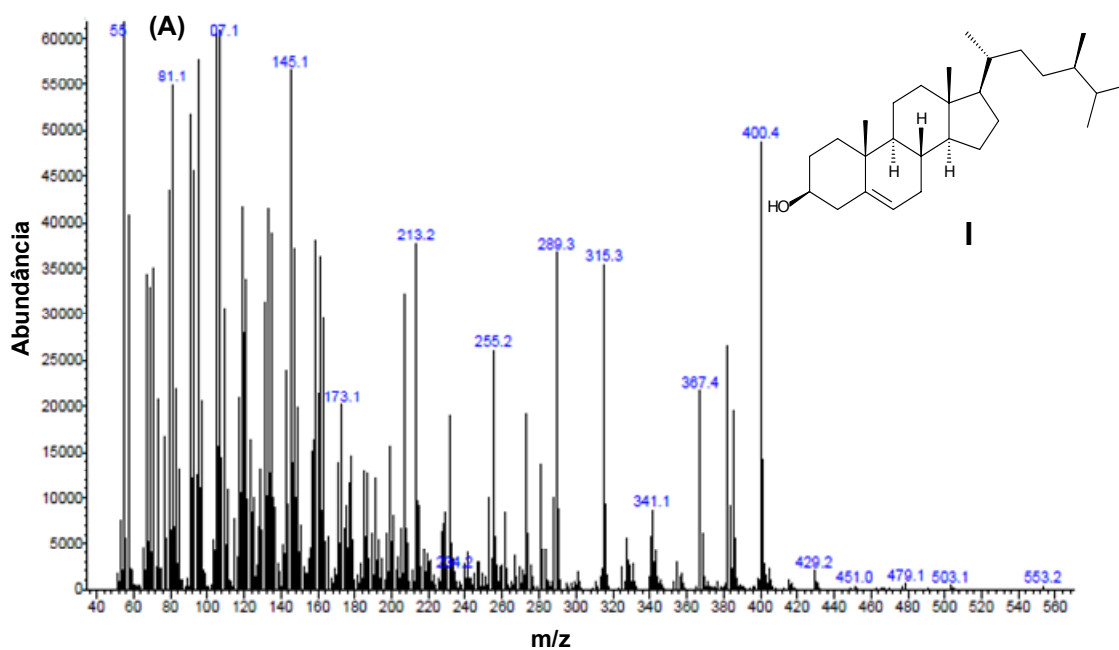


FIGURA 4.3 – Espectros de massas com ionização por elétrons (70 eV) das substâncias I (A), II (B) e III (C).



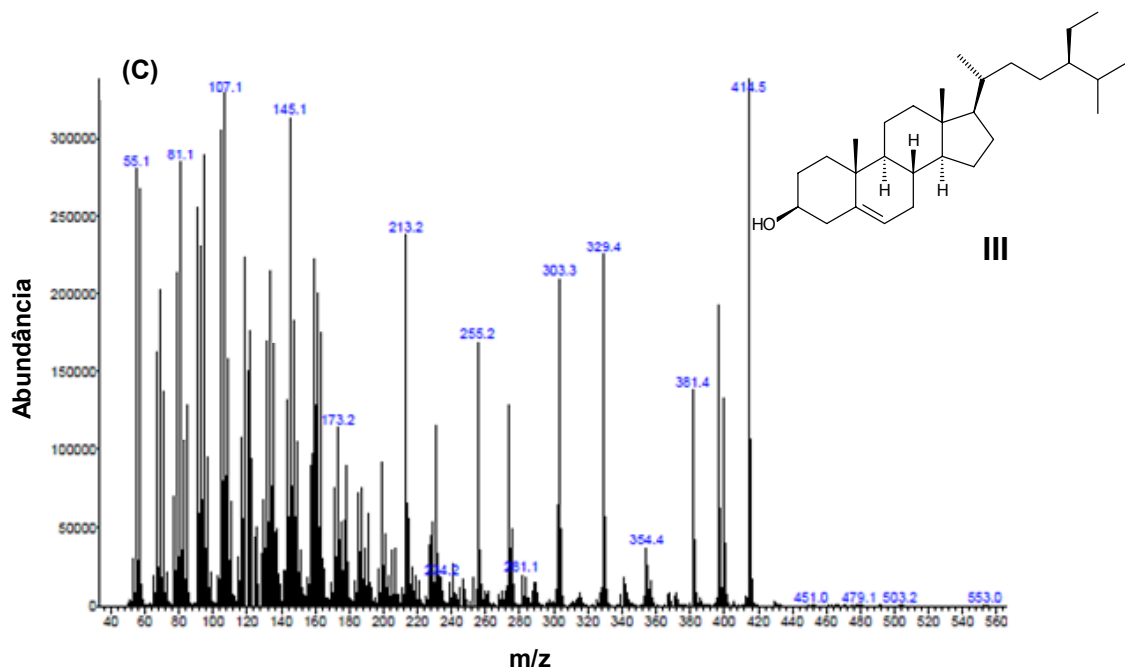
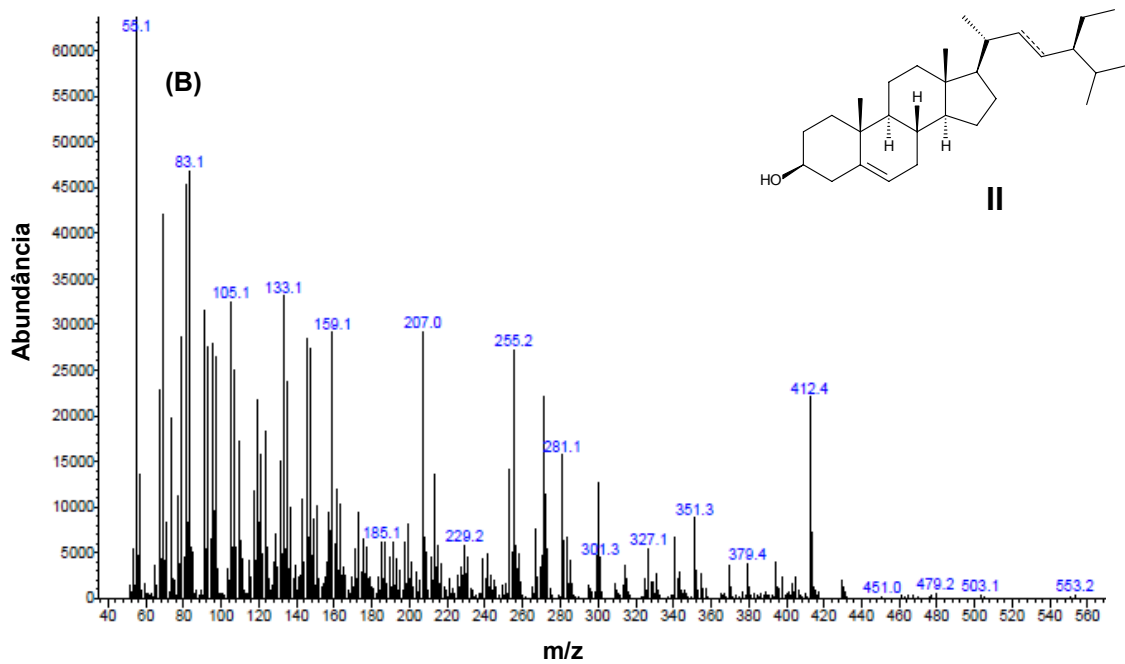
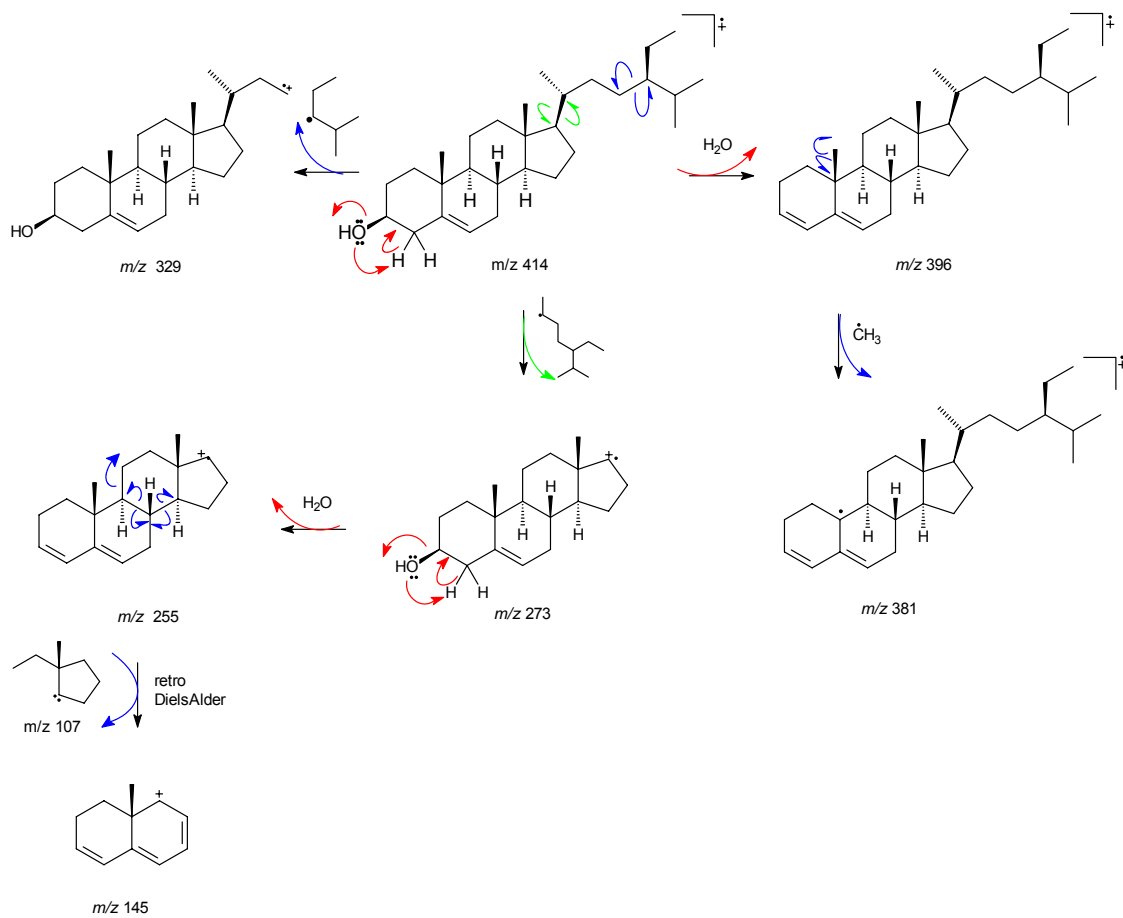


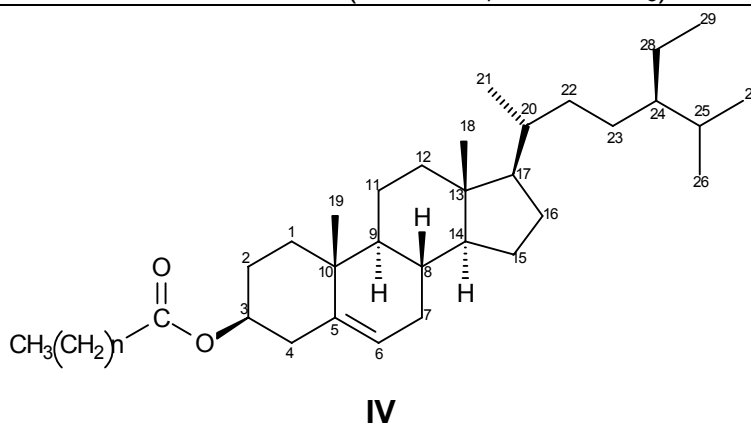
FIGURA 4.4 – Proposta de fragmentação para o esteroide III.



4.2.2 – Identificação da Substância IV

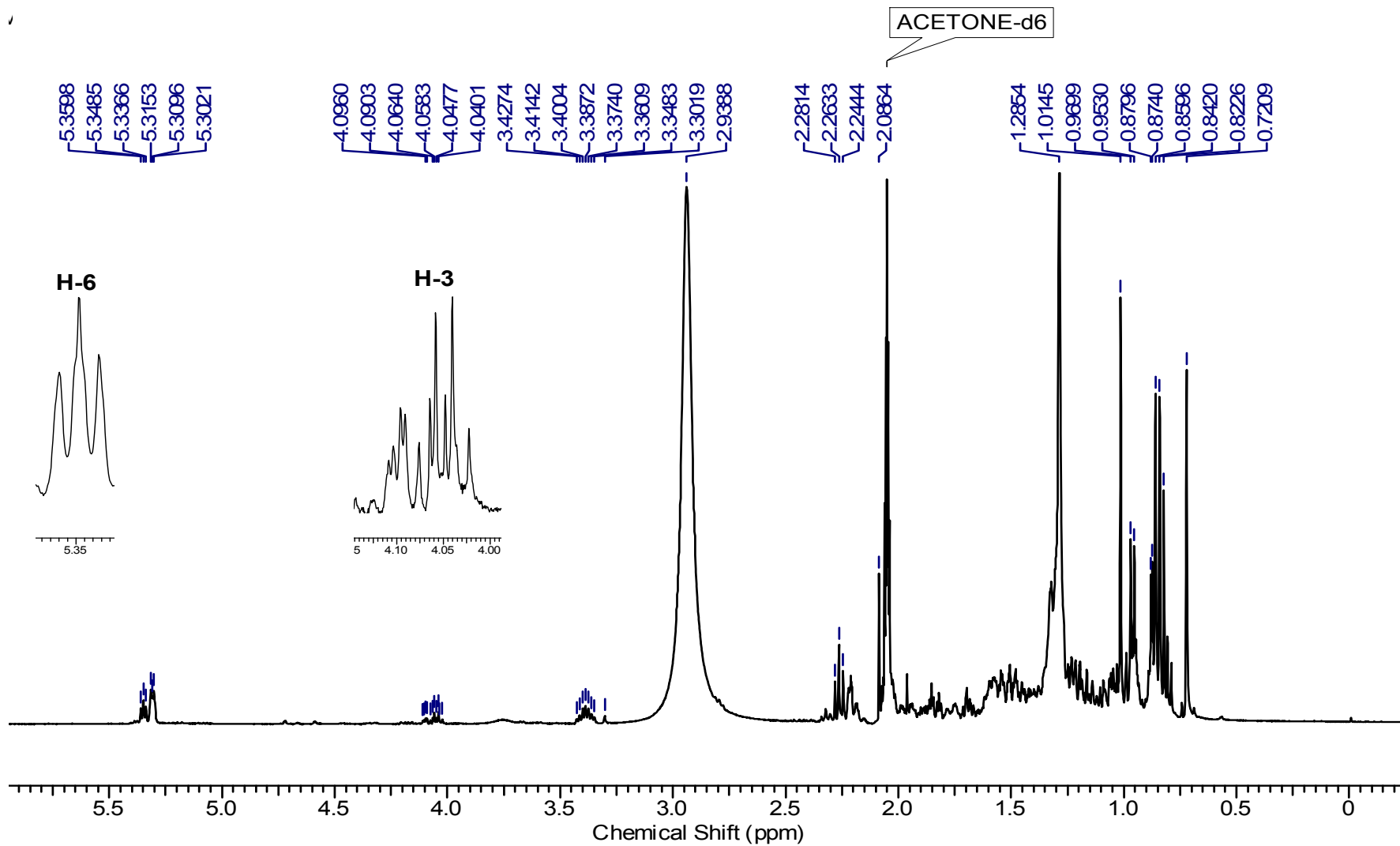
A substância **IV**, isolada da fração FAR da raiz de *E. suberosum* foi identificada em mistura com os esteroides **I**, **II** e **III**. A partir da análise do espectro de RMN de ^1H da mistura (400 MHz, acetona- d_6) (Figura 4.5, p. 50) foi possível identificar seis sinais de grupos metila entre δ_{H} 0,72-1,01 ppm, um sinal em δ_{H} 5,35 ppm (t , $J = 4,6$ Hz), atribuído a um hidrogênio ligado a carbono sp^2 , um multiplete em δ_{H} 4,06 ppm típico de um hidrogênio ligado a carbono adjacente a um grupo éster e um singlete intenso em δ_{H} 1,29 ppm referente aos hidrogênios de vários grupos CH_2 . Os dados de RMN de ^1H (Tabela 4.1) em comparação com a literatura sugerem para **IV** a estrutura de um éster graxo do esteroide sitosterol (ABREU et al., 2001).

TABELA 4.1 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância **IV**.



H	δ (ppm) (400 MHz, acetona-d_6)
3	4,06 (m , 1H)
6	5,35 (t , $J = 4,6$ Hz, 1H)
CH_2	1,29 (s)
CH_3	0,72-1,01 (s , 18H)

FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância IV.



4.3 - IDENTIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE *E. suberosum*

4.3.1 – Identificação das Catequinas **V** e **VI**

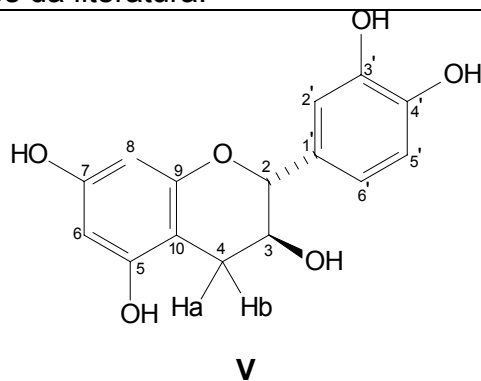
A mistura das substâncias **V** e **VI** foi isolada da fração acetato de etila (FAR) do extrato etanólico da raiz e a identificação estrutural foi realizada através de RMN de ^1H (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, p. 54-56) (Tabelas 4.2 e 4.3, p. 52 e 53 respectivamente) em comparação com os dados da literatura (LÔBO et al., 2008).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura de **V** e **VI** (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, p. 54-56) apresentou um conjunto de sinais típicos do anel C de catequinas que é caracterizado pela presença de um dubleto em δ_{H} 4,56 ($J = 7,6$ Hz) e um singlete largo em δ_{H} 4,82, atribuídos aos H-2 da catequina e epicatequina, respectivamente. Os acoplamentos dos H-2 com os H-3 geram sinais com deslocamentos químicos em δ_{H} 3,99 (m) para a catequina e δ_{H} 4,18 (s) para a epicatequina. A presença dos sinais referentes aos H-2 indica a ausência da ligação dupla entre C-2 e C-3 que é característica de flavanois. A mistura das catequinas também pode ser confirmada pelo conjunto de sinais em δ_{H} 2,88 (m) e δ_{H} 2,51 (dd , $J = 16,2$ e $8,2$ Hz), referente à catequina e os sinais em δ_{H} 2,85 (m) e δ_{H} 2,75 (m), referente à epicatequina, os quais correspondem aos H-4a e H-4b que confirmam a ausência de oxidação no carbono C-4.

Na região dos hidrogênios aromáticos foram observados para a catequina **V** sinais em δ_{H} 6,83 (d , $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,81 (m) e 6,72 (m), atribuídos aos H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Além de dois dubletos com constante típica de acoplamento meta ($J = 2,3$ Hz) em δ_{H} 5,92 e 5,85, atribuídos aos H-6 e H-8, respectivamente. Já para a epicatequina **VI** os sinais atribuídos aos H-2', H-5' e H-6', foram observados em δ_{H} 6,97 (d , $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,75 (m) e 6,79 (m), respectivamente. Além de dois dubletos em δ_{H} 5,94 e 5,91 atribuídos respectivamente a H-6 e H-8, com constante típica de acoplamento meta ($J =$

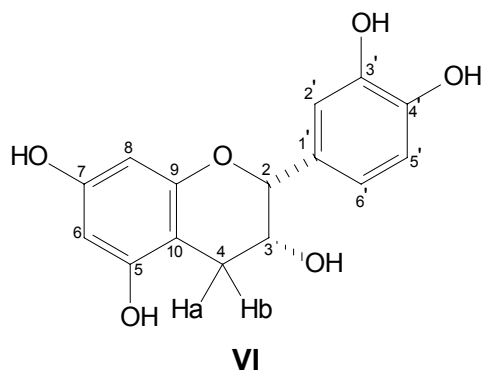
2,4 Hz). Os valores de hidrogênios em comparação com a literatura estão descritos nas Tabelas 4.2 e 4.3, p. 52 e 53 respectivamente.

TABELA 4.2 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **V** em comparação com dados da literatura.



H/C	(500 MHz, CD_3OD)	LÔBO et al., 2008 (300 MHz, CD_3OD)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
2'	6,83 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,83 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
5'	6,81 (<i>m</i>)	6,76 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
6'	6,72 (<i>m</i>)	6,71 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e $1,8$ Hz)
6	5,92 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,93 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
8	5,85 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,85 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
2	4,56 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	4,57 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)
3	3,99 (<i>m</i>)	3,97 (<i>m</i>)
4a	2,88 (<i>m</i>)	2,85 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e $5,5$ Hz)
4b	2,51 (<i>dd</i> , $J = 16,2$ e $8,2$ Hz)	2,51 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e $8,2$ Hz)

TABELA 4.3 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **VI** em comparação com dados da literatura.



H/C	(500 MHz, CD_3OD)	LÔBO et al., 2008 (300 MHz, CD_3OD)
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
2'	6,97 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,97 (<i>d</i> , $J = 1,2$ Hz)
5'	6,75 (<i>m</i>)	6,75 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
6'	6,79 (<i>m</i>)	6,79 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e $1,2$ Hz)
6	5,94 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)	5,93 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
8	5,91 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz)	5,91 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
2	4,82 (<i>s</i>)	4,82 (<i>s</i>)
3	4,18 (<i>m</i>)	4,17 (<i>s</i>)
4a	2,85 (<i>m</i>)	2,85 (<i>dd</i> , $J = 16,8$ e $4,5$ Hz)
4b	2,75 (<i>m</i>)	2,72 (<i>dd</i> , $J = 16,8$ e $2,4$ Hz)

FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias V e VI.

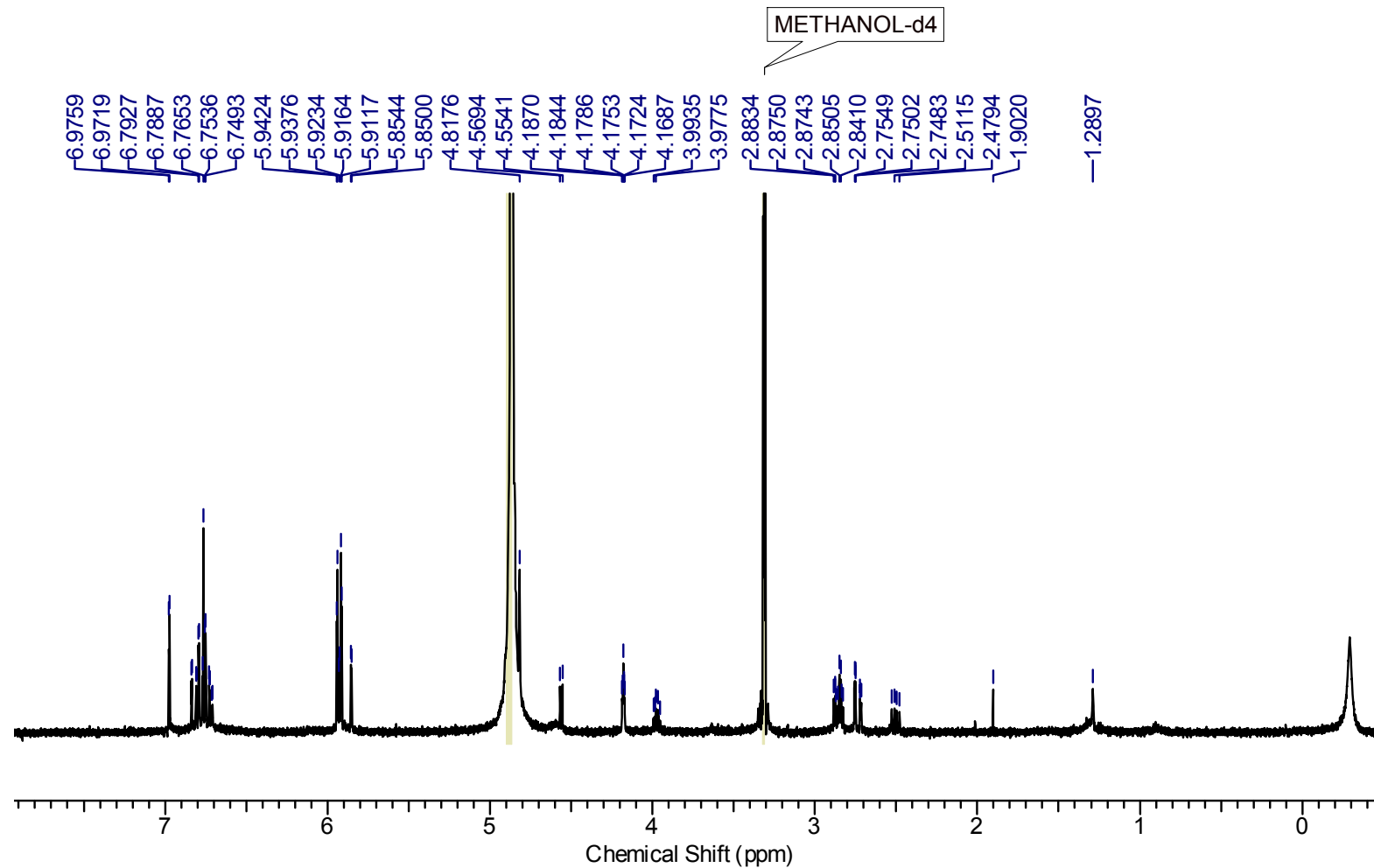


FIGURA 4.7 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias **V** e **VI**.

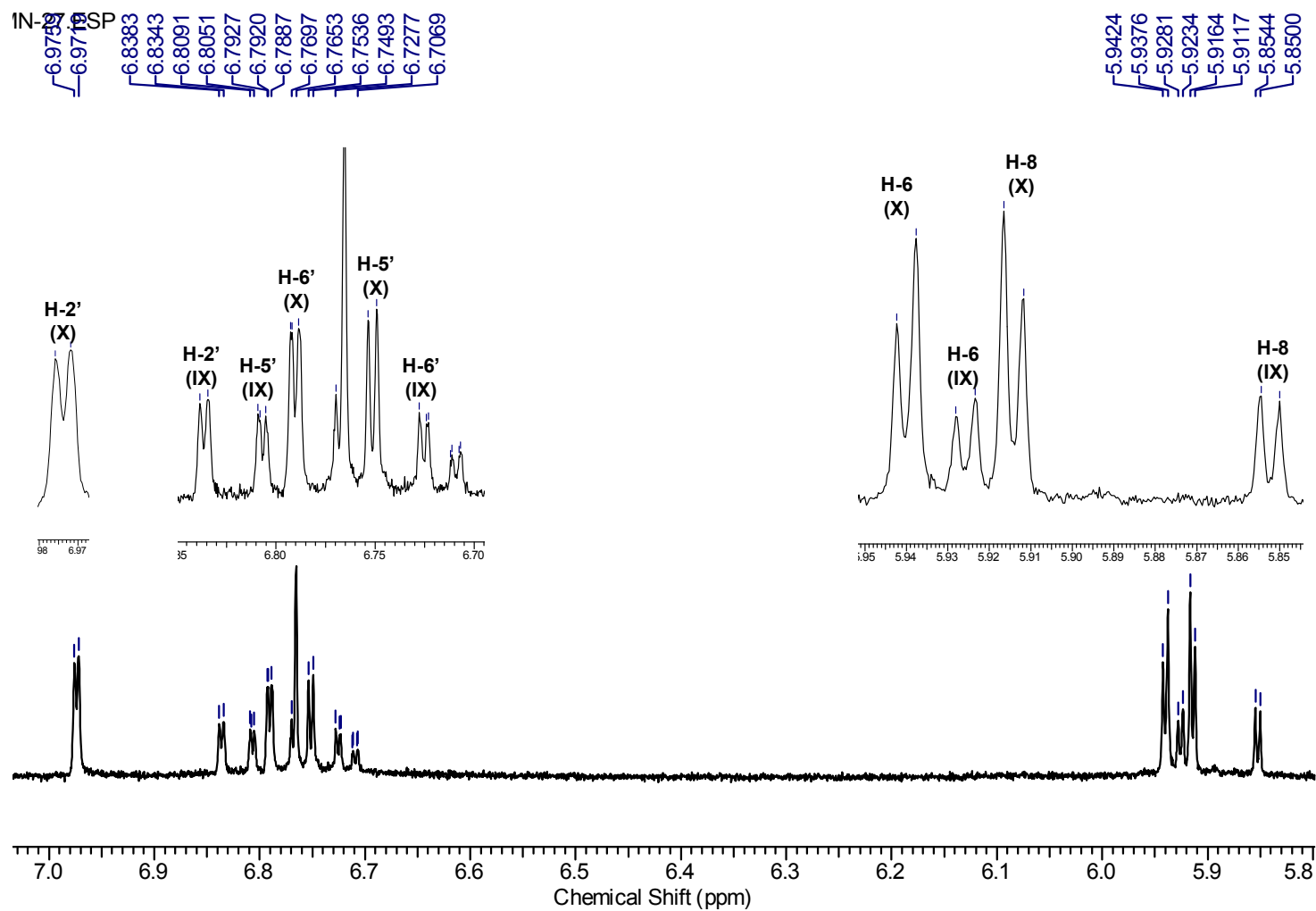
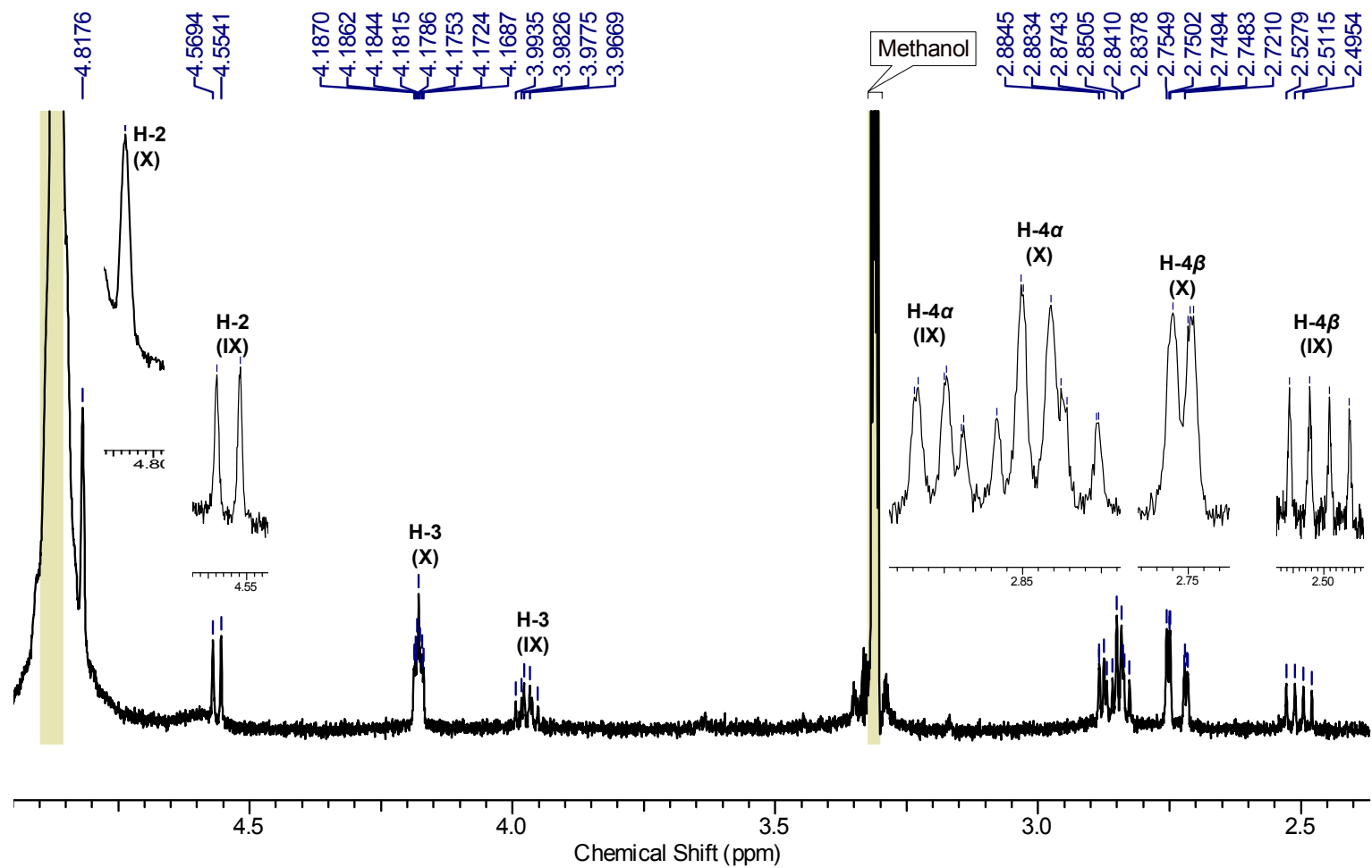


FIGURA 4.8 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da mistura das substâncias **V** e **VI**.



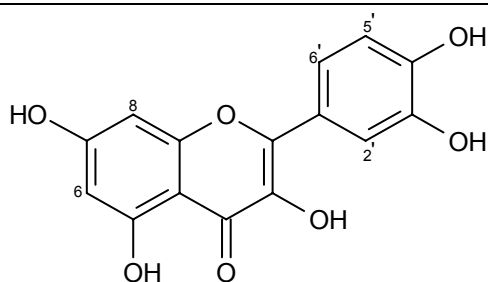
4.3.2 – Identificação do Flavonoide **VII**

A substância (**VII**) foi isolada da fração EEf 5 como um sólido amorfo amarelo, além de identificada em várias outras frações de *E. suberosum*. Este composto foi caracterizado através de RMN de ^1H (Tabela 4.4, p. 58) em comparação com os dados da literatura (ISIDORO et al., 2012; LOPES et al., 2012; NAIDU et al., 2012).

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância **VII** (Figura 4.9, p. 59) apresentou, na região dos hidrogênios aromáticos, dois doubletos em δ_{H} 6,18 e 6,39 ($J = 1,9$ Hz, 1H), característico do acoplamento meta do anel A (H-6 e H-8, respectivamente) de um núcleo flavonoide. Os sinais em δ_{H} 6,89 (d , $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,73 (d , $J = 2,0$ Hz, 1H) e 7,63 (dd , $J = 8,5$ e $2,0$ Hz, 1H), foram atribuídos aos hidrogênios H-5', H-2' e H-6', respectivamente, correspondendo a um sistema de substituição nas posições 3' e 4' do anel B. A análise dos dados espectroscópicos em comparação com os dados da literatura confirmam a identificação da substância como sendo o flavonol quercetina.

Quercetina é um flavonoide bastante comum, sendo isolado de várias espécies do gênero *Erythroxylum* (BOHM et al., 1988), é considerado o principal flavonoide presente na dieta humana. Nas últimas décadas suas propriedades terapêuticas têm sido amplamente estudadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004).

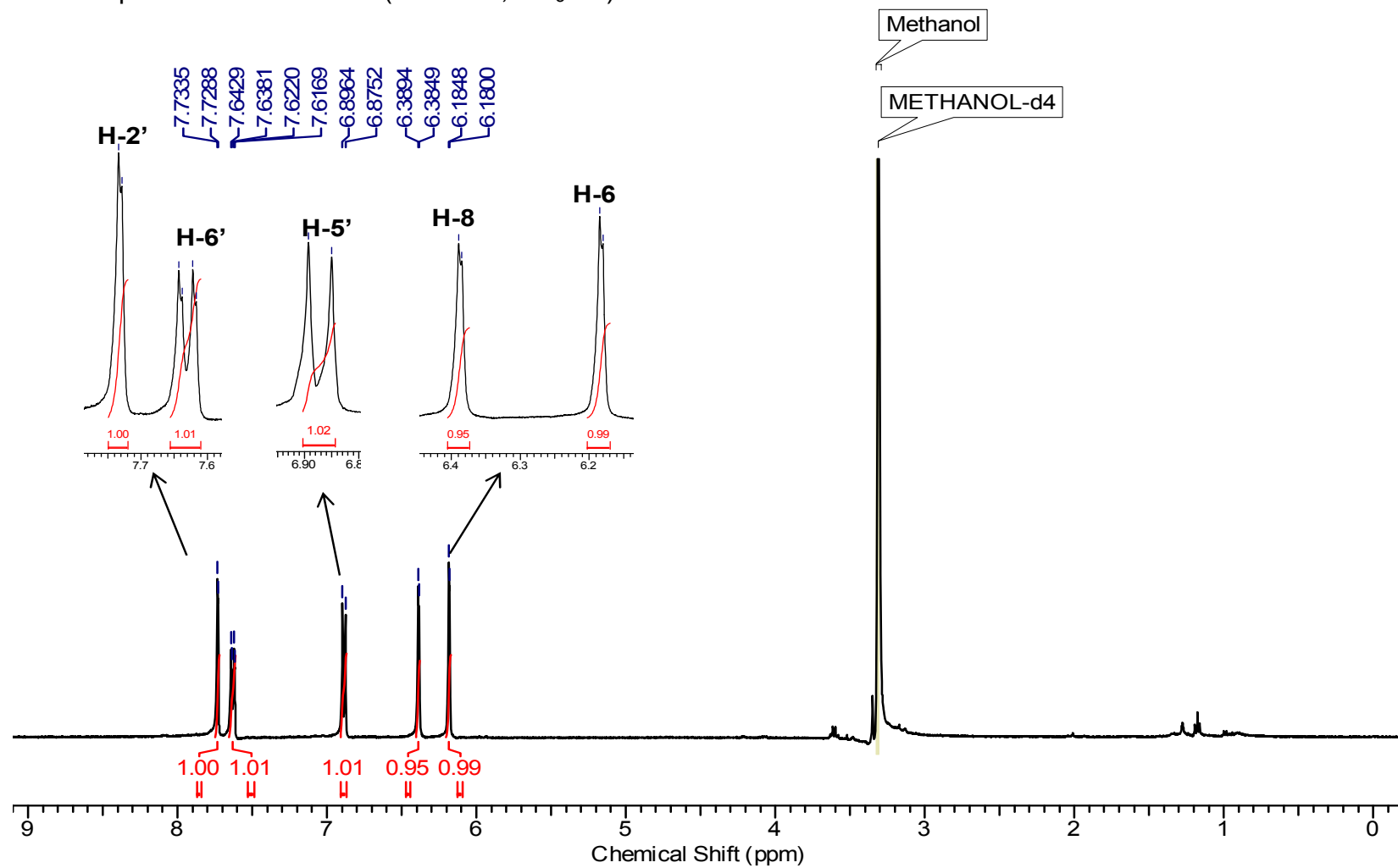
TABELA 4.4 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância **VII** em comparação com dados da literatura.



VII

H	δ (ppm) (400 MHz, CD_3OD)	(200 MHz, CD_3OD) (NAIDU et al., 2012)
6	6,18 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)	6,18 (<i>d</i> , $J = 1,7$ Hz, 1H)
8	6,39 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)	6,40 (<i>d</i> , $J = 1,7$ Hz, 1H)
2'	7,73 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	7,68 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz, 1H)
5'	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz, 1H)
6'	7,63 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e 2,0 Hz, 1H)	7,55 (<i>dd</i> , $J = 8,3$ e 2,4 Hz, 1H)

FIGURA 4.9- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância VII.

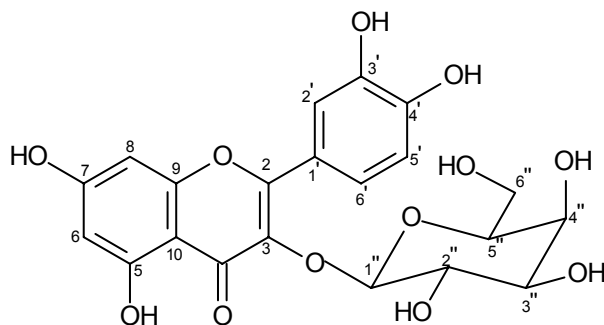


4.3.3 – Identificação do Flavonoide **VIII**

O flavonoide quercetina 3-O- β -D-galactopinosil (**VIII**), também conhecido como hiperina foi isolado da fração EEF 5 do extrato etanólico das folhas de *E. suberosum*. Em 1981 este flavonoide foi isolado nas espécies *E. rufum* e *E. ulei* (BOHM, PHILLIPS, GANDERS, 1981) e em 2013 na espécie *E. rimosum* (RIBEIRO et al., 2013). A caracterização deste composto foi realizada através de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (Tabelas 4.5 e 4.6 p. 61 e 62) (Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13, p. 63-66) em comparação com os dados da literatura (SANTOS, SCHRIPSEMA, KUSTER, 2005)

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **VIII** (Figura 4.10, p. 63) apresentou características espectrais similares às da substância **VII**. Sendo possível atribuir os sinais em δ_{H} 6,20 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,40 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H), aos hidrogênios do anel A do núcleo flavonoide H-6 e H-8, respectivamente. Sinais em δ_{H} 6,87 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 1H), δ_{H} 7,83 (*d*, $J = 2,2$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,59 (*dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz, 1H), aos hidrogênios H-5', H-2' e H-6', respectivamente, referente a um sistema de substituição nas posições 3' e 4' do anel B. A diferença observada nos espectros das substâncias **VII** e **VIII** está relacionada ao anel C, que apresenta para a substância **VIII**, a presença de sinais entre δ_{H} 3,07 e δ_{H} 5,16 o que indica que esta substância está substituída por uma unidade glicosídica. O sinal em δ_{H} 5,16 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1") da molécula de açúcar.

TABELA 4.5- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos via HSQC e HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) da substância **VIII** em comparação com dados da literatura.



VIII

H/C	(500/125 MHz, CD_3OD)		SANTOS, SCHRIPEMA, KUSTER, 2005 (400/100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	157,1	-	156,9
3	-	134,3	-	134,0
4	-	178,0	-	178,0
5	-	161,7	-	161,7
6	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	99,5	6,20 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	99,3
7	-	164,8	-	164,9
8	6,40 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	94,1	6,41(<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	94,0
9	-	-	-	156,7
10	-	104,3	-	104,3
1'	-	121,6	-	121,6
2'	7,83 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, 1H)	117,4	7,54 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	116,5
3'	-	144,5	-	145,4
4'	-	148,6	-	149,0
5'	6,87 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	115,5	6,82 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	115,6
6'	7,59 (<i>dd</i> , $J = 8,4$ e 2,2 Hz, 1H)	122,8	7,66 (<i>dd</i> , $J = 8,8$ e 2,2 Hz)	122,5
1''	5,16 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	104,9	5,37 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	102,4
2''	3,81 <i>m</i>	73,0	3,57 <i>m</i>	71,7
3''	3,56 <i>m</i>	75,0	3,38 <i>m</i>	73,7
4''	3,85 <i>m</i>	70,0	3,66 <i>m</i>	68,5
5''	3,46 <i>m</i>	77,1	3,34 <i>m</i>	76,3
6''	3,64 e 3,54	61,7	3,31 e 3,46 <i>m</i>	60,5

TABELA 4.6 – Correlações observadas no HSQC e HMBC para a substância VIII.

Posição	(500/125 MHz, CD ₃ OD)		Correlações	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	HSQC	HMBC
6	6,20	99,5	C-6	C-5, C-7, C-8, C-10
8	6,40	94,1	C-8	C-2, C-4, C-6, C-7, C-10
2'	7,83	117,4	C-2'	C-1', C-3', C-4', C-2
5'	6,87	115,5	C-5'	C-1', C-3', C-4'
6'	7,59	122,8	C-6'	C-2, C-4', C-5'
1''	5,16	104,0	C-1''	C-3
2''	3,81 <i>m</i>	73,0	C-2''	C-1'', C-3''
3''	3,56 <i>m</i>	75,0	C-3''	C-4'', C-2'', C-5''
4''	3,85 <i>m</i>	70,0	C-4''	C-2'', C-3''
5''	3,46 <i>m</i>	77,1	C-5''	C-6'', C-4'', C-1''
6''	3,64 e 3,54	61,7	C-6''	C-4''

FIGURA 4.10 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância VIII.

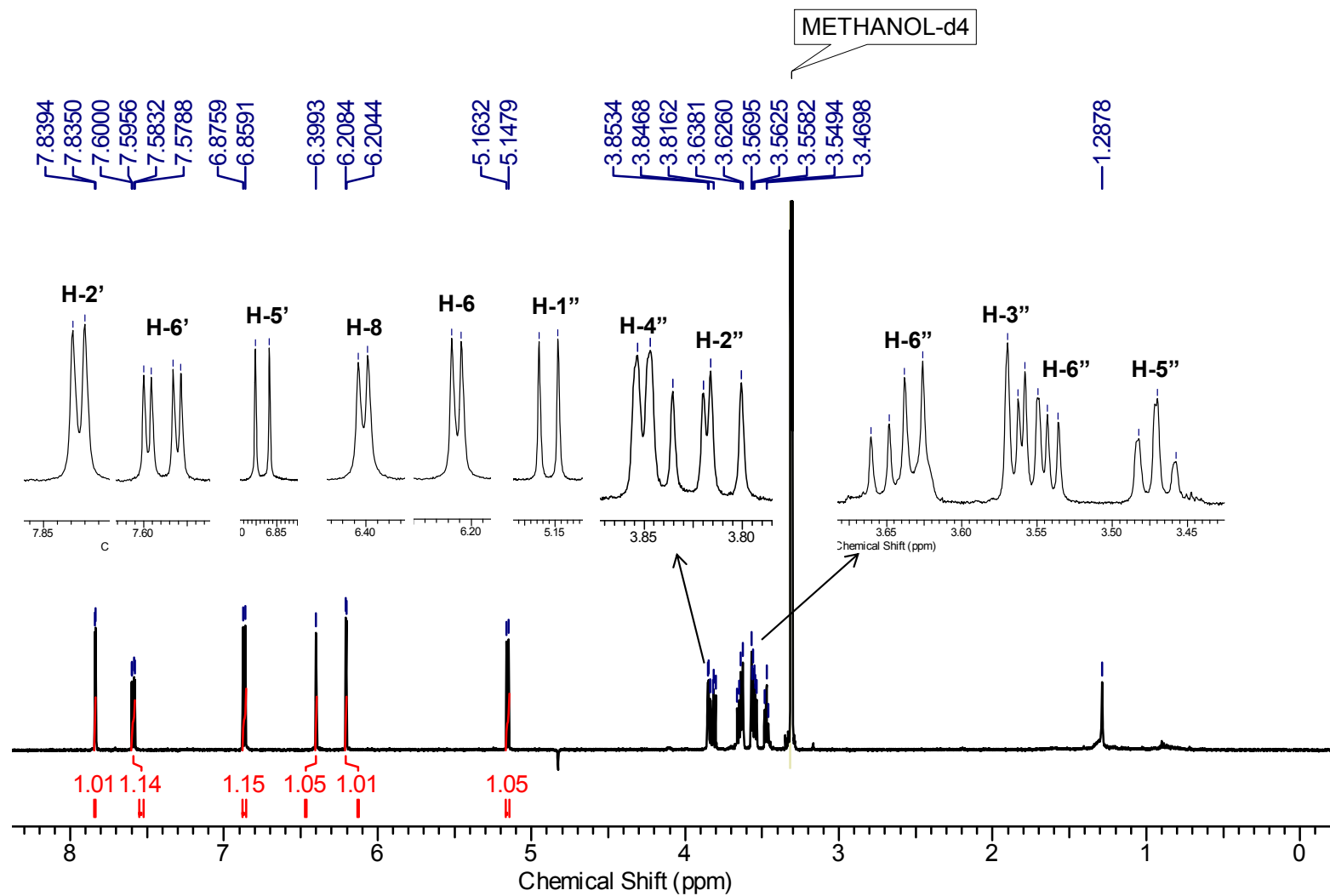


FIGURA 4.11 – Mapa de contorno HSQC para a substância VIII.

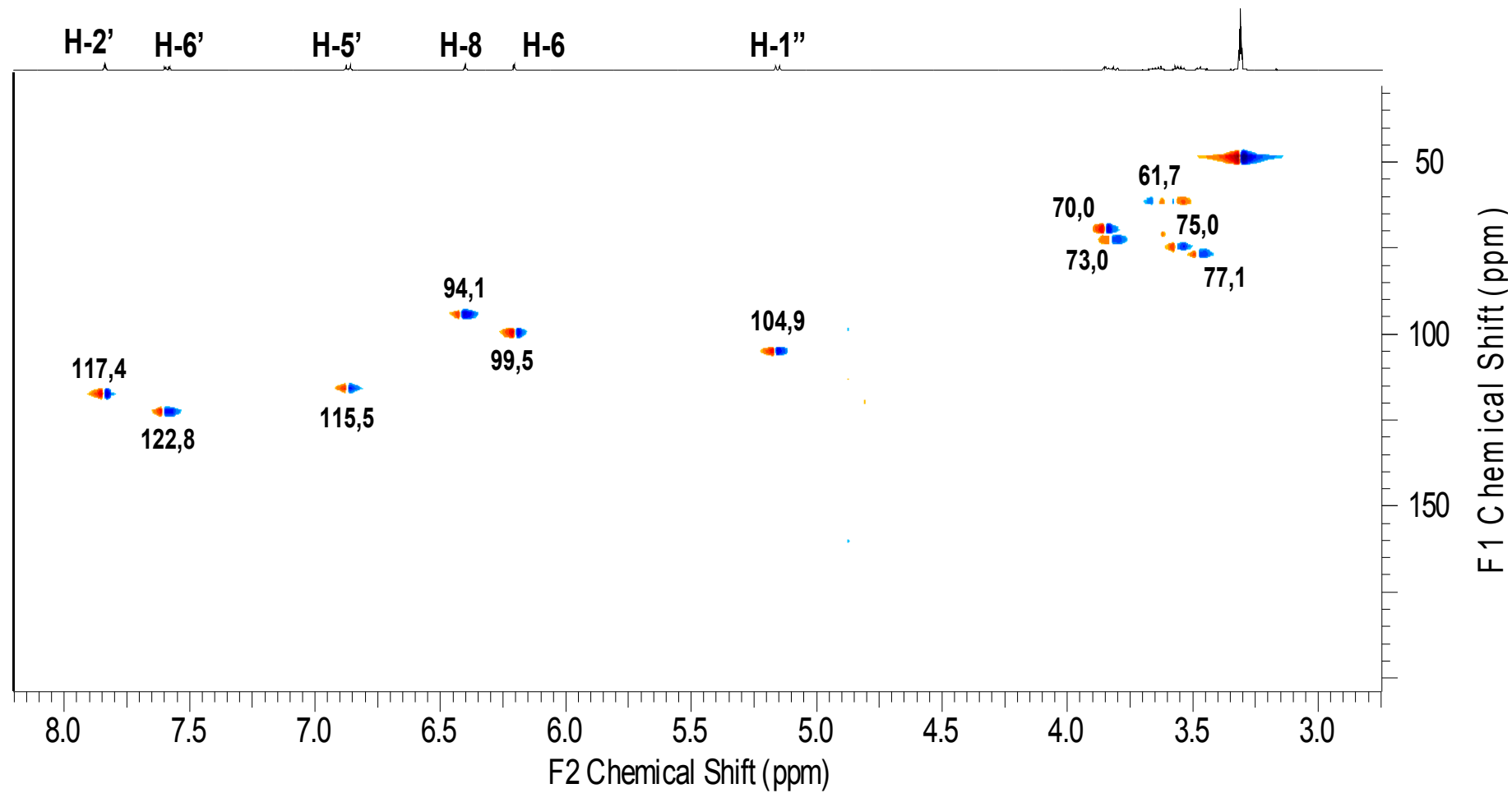


FIGURA 4.12 – Mapa de contorno HMBC para a substância VIII.

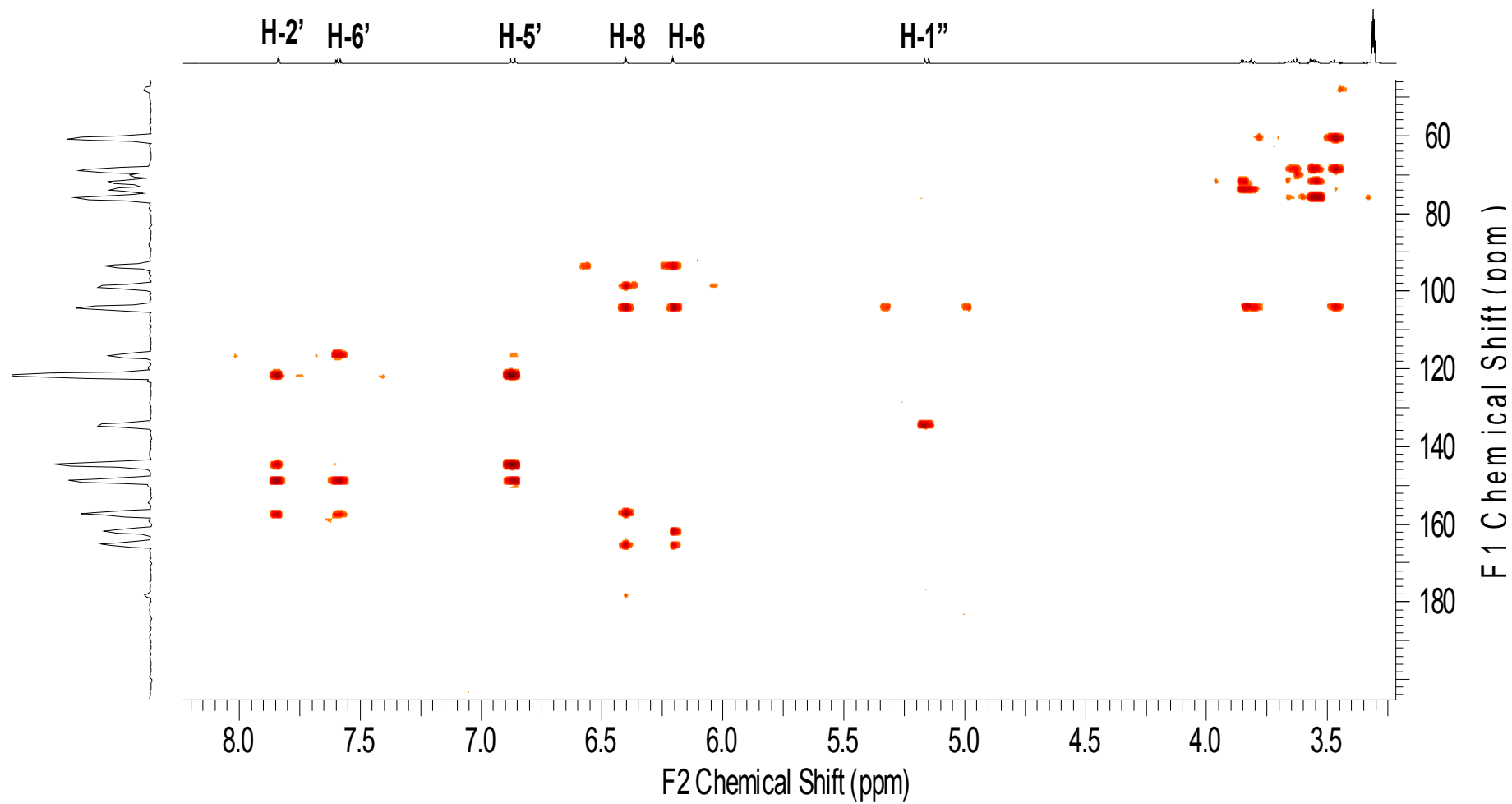
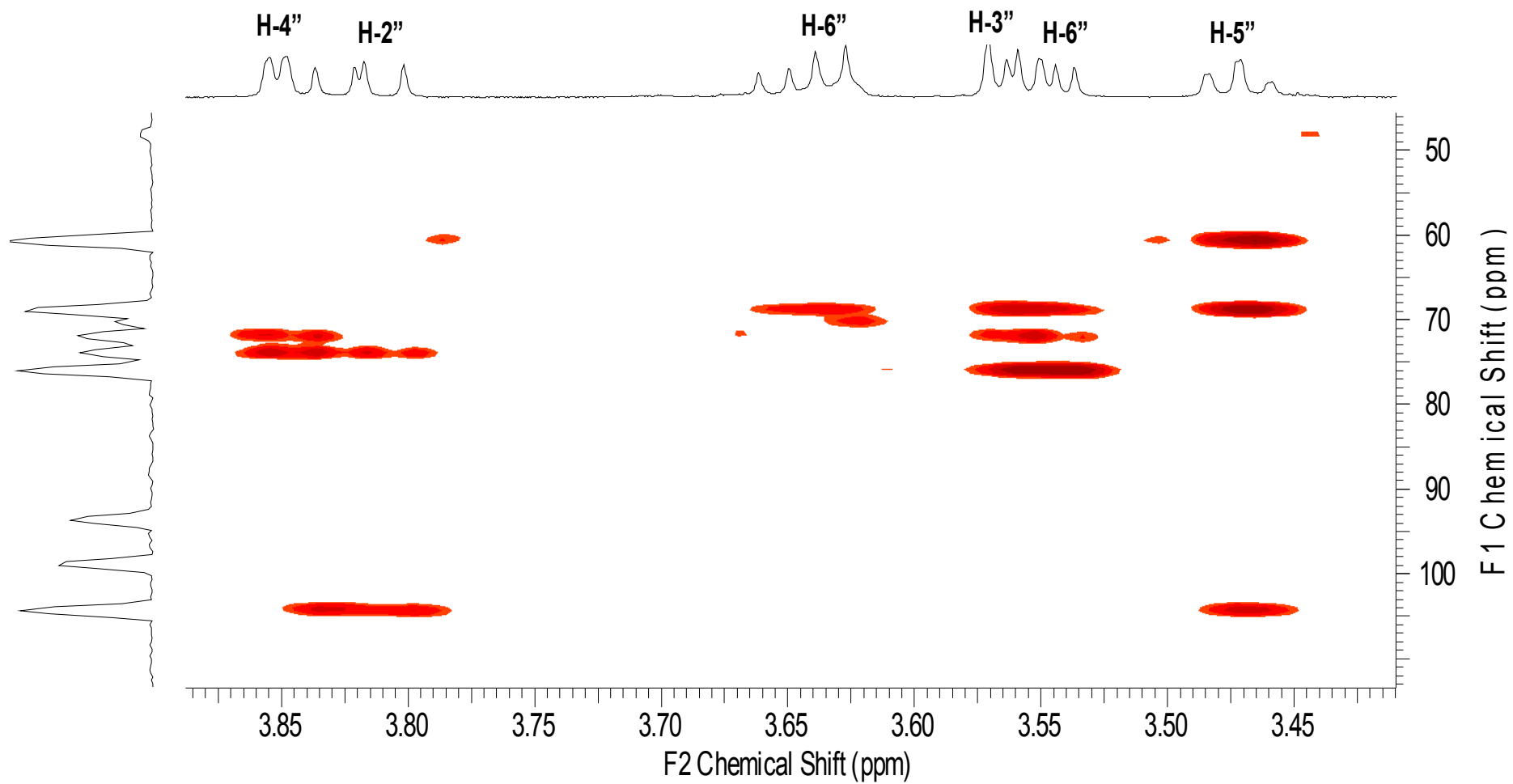
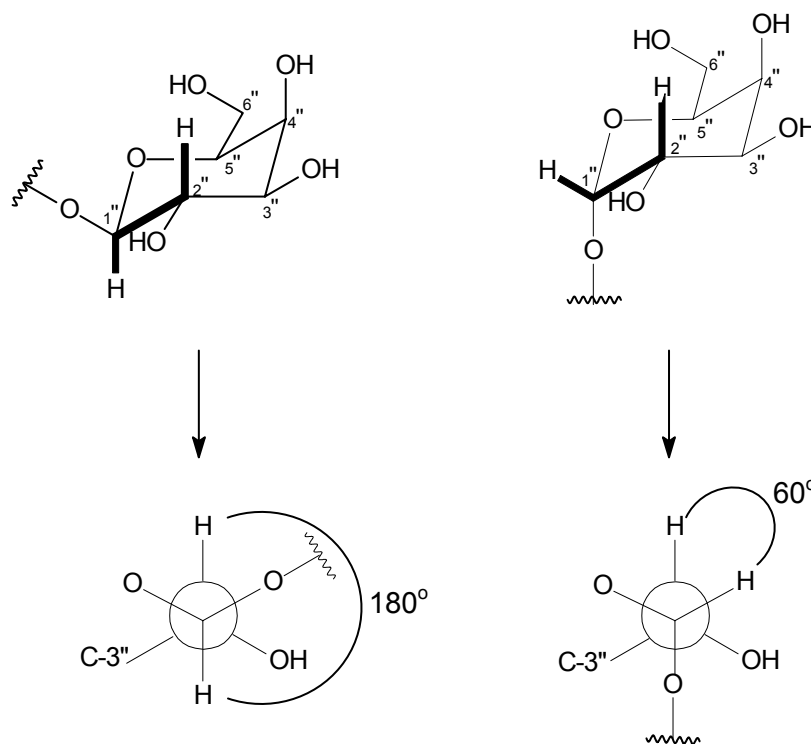


FIGURA 4.13 – Expansão do mapa de contorno HMBC para a substância VIII.



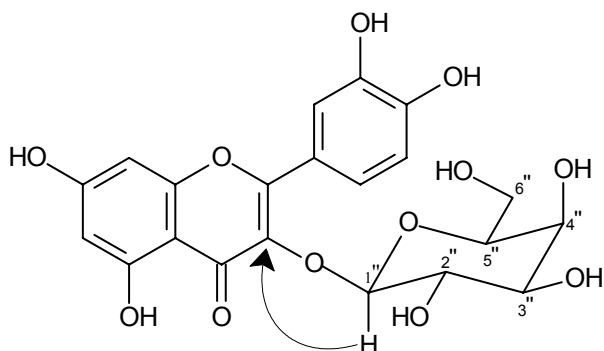
A configuração da unidade de açúcar pode ser determinada a partir do valor da constante de acoplamento ${}^3J_{1'',2''}$, cuja dependência com o ângulo diedro Φ de átomos de hidrogênios vicinais, foi reconhecida pela primeira vez por Karplus. De acordo com Karplus, hidrogênios que apresentam configuração β (*trans*-diaxiais), com $\Phi = 180^\circ$ têm uma constante de acoplamento elevada, enquanto o análogo com configuração α (orientações axial-equatorial e equatorial-equatorial), ambas com $\Phi = 60^\circ$, têm constantes de acoplamento muito menores (Figura 4.14) (LINDHORST, 2007).

FIGURA 4.14 – Relação entre os valores das constantes de acoplamento 3J e o ângulo diedro Φ de átomos de hidrogênios vicinais.



Diante deste contexto, determinou-se a configuração β para o oxigênio ligado ao carbono anomérico C-1'', com valor de $J = 7,6$ Hz (YASUKAWA, TAKIDO, 1987). A posição exata da unidade de açúcar em C-3-O foi determinada com base na correlação observada no espectro de HMBC (Figura 4.12, p. 65) entre o hidrogênio anomérico H-1'' ($\delta_{\text{H}} 5,16$ d, $J = 7,6$ Hz) e o carbono C-3 ($\delta 134,3$) da aglicona (Figura 4.15, p. 68).

FIGURA 4.15 – Correlação significativa observada no mapa de contorno HMBC da substância **VIII**.



A identificação da porção monossacarídica foi efetuada através da análise do tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massas, em comparação com o padrão que foi injetado nas mesmas condições cromatográficas (Apêndice 1, p. 104). O composto **VIII** (1,0 mg) foi submetido à reação de hidrólise e em seguida o açúcar obtido foi submetido à reação de acetilação (Item 3.2.6.1, p. 36). O produto acetilado foi analisado por CG-EM (Figura 4.16, p. 69), sendo que no cromatograma [Figura 4.16 (A), p. 69] foi observado um único pico, com tempo de retenção de 23,4 min, que em comparação com o padrão dos acetatos de alditóis, foi consistente com o acetato da galactose que apresentou mesmo tempo de retenção.

No espectro de massas observou-se os íons m/z 361, 289, 217, 145 e 73, referentes aos fragmentos principais, além dos íons m/z 157, 139, 115 e 97 referentes aos fragmentos secundários [Figura 4.16 (B), p. 69], que em comparação com o perfil de fragmentação do padrão [Apêndice 2 (A), p. 105], são característicos de hexoses. A Figura 4.17 (p. 70), apresenta propostas de fragmentação para o acetato de alditol da galactose, que é semelhante para todas as hexoses.

FIGURA 4.16 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação do acetato de alditol (B) obtido após derivatização química (acetilação) da substância **VIII**.

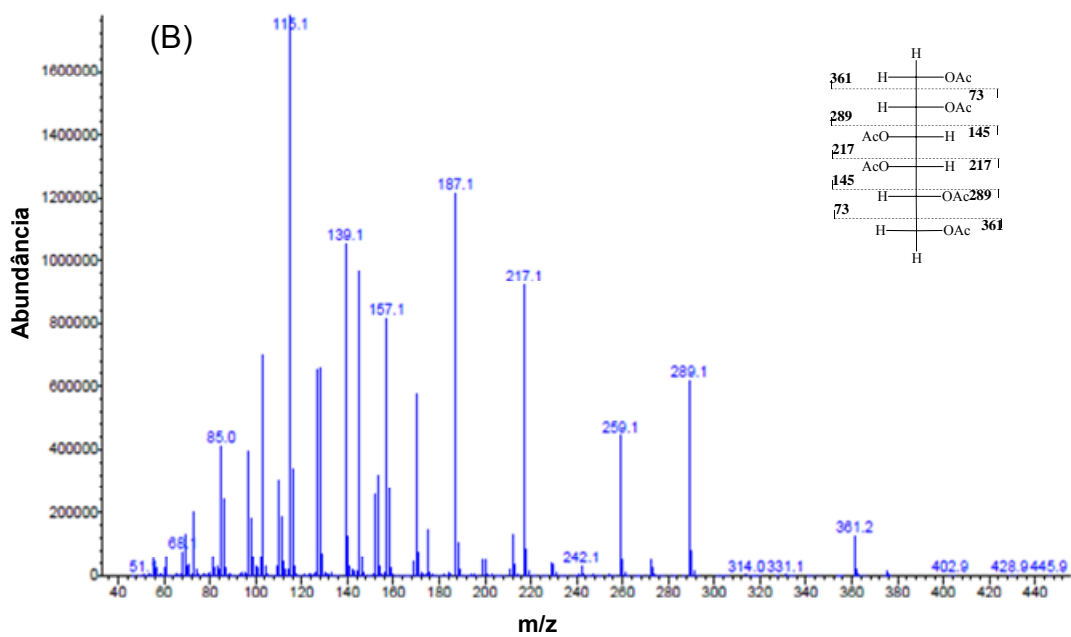
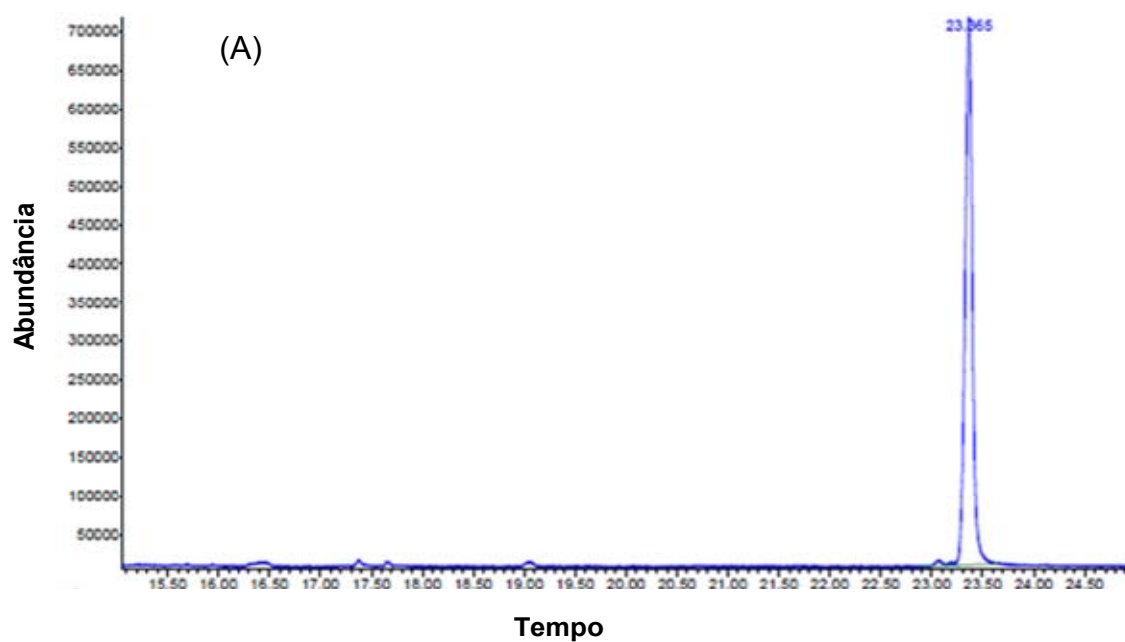
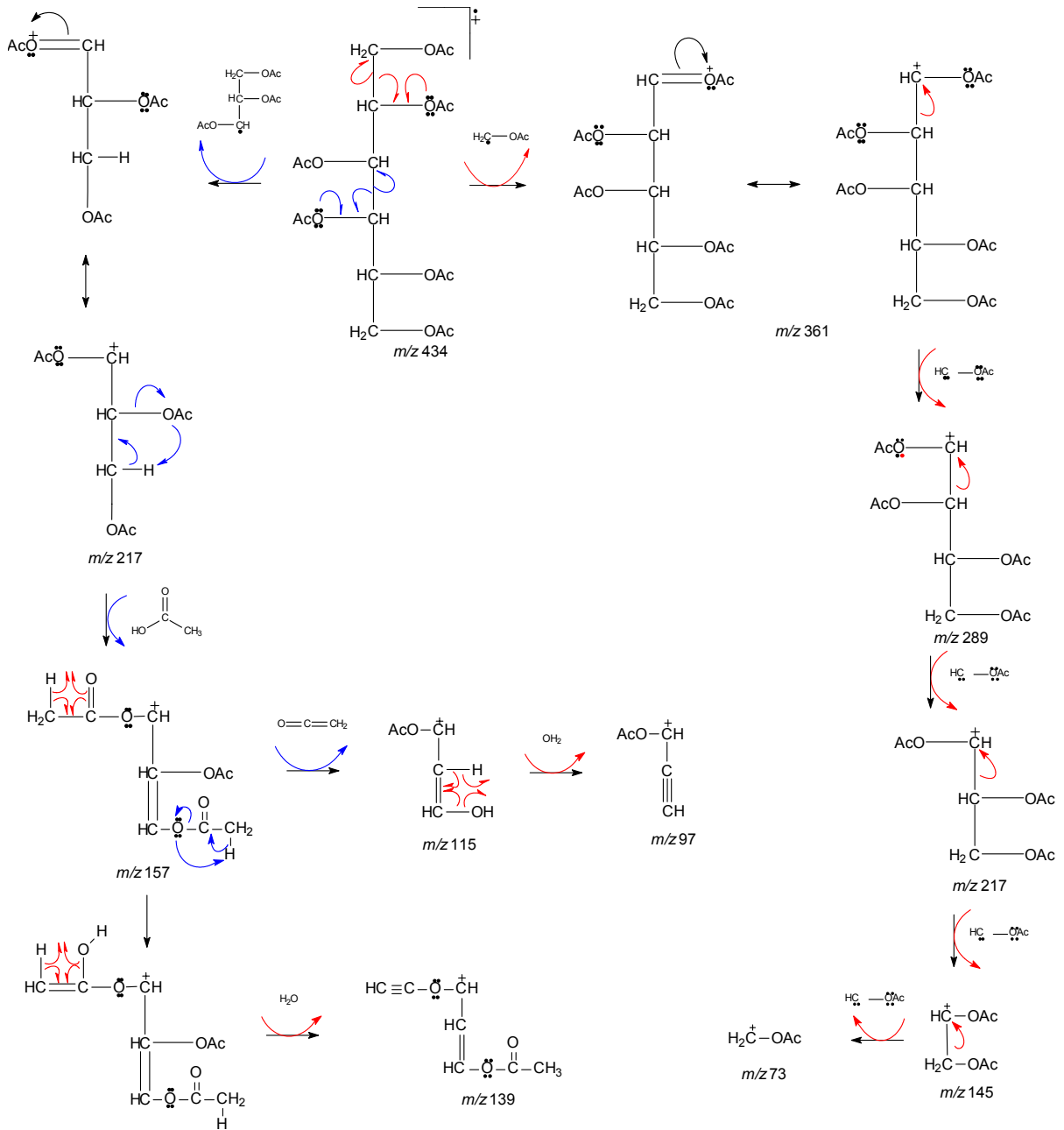


FIGURA 4.17 – Propostas de fragmentação para a galactose.



4.3.4 – Identificação do Flavonoide **IX**

O flavonoide 7,4'-di-O-metilquercetina-3-O- β -rutinosídeo (**IX**), também conhecido como ombuina-3-rutinosídeo, foi relatado anteriormente em 14 espécies do gênero *Erythroxylum* (BOHM et al., 1988; JOHNSON, SCHMIDT, NORMAN, 1998; ALBUQUERQUE et al., 2014; CÓRDOVA et al., 2012).

GONZÁLEZ-GUEVARA e colaboradores (2006), ao investigar a presença deste flavonoide nas espécies *E. minutifolium* Griseb., *E. areolatum* Linn., *E. confusum* Britt., e *E. suave* Lunan., identificou ombuina-3-rutinosídeo em todas elas, confirmando assim resultados anteriores de que ombuina glicosiladas são marcadores quimiotaxonômicos característicos para este gênero.

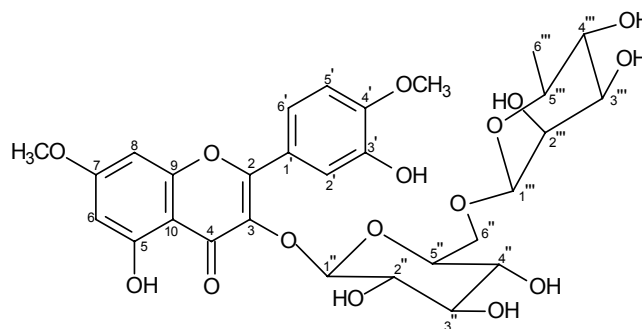
Este flavonoide já foi relatado para *E. suberosum* (NASCIMENTO et al., 2012), sendo neste trabalho isolado do extrato etanólico das folhas. A identificação estrutural foi realizada através de RMN de ^1H e HSQC (Tabela 4.7, p. 72) (Figuras 4.18 e 4.19, p. 73 e 74, respectivamente), em comparação com os dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância **IX** (Figura 4.18, p. 73.) apresentou características espectrais semelhantes à substância **VIII**, sendo possível atribuir os sinais em δ_{H} 7,72 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H), δ_{H} 7,05 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,76 (*dd*, $J = 8,6$ e 2,0 Hz, 1H) aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Os sinais em δ_{H} 6,36 (*d*, $J = 2,3$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,62 (*d*, $J = 2,3$ Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Adicionalmente, observou-se no espectro de RMN de ^1H de **IX**, a presença de duas metoxilas, evidenciadas pelos sinais em δ_{H} 3,89 (*s*, 3H) e δ_{H} 3,95 (*s*, 3H) e δ_{C} 54,7 e δ_{C} 54,9.

A presença de duas unidades monossacarídicas foi evidenciada pelos sinais em δ_{H} 5,21 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 1H) e δ_{H} 4,51 (*d*, $J = 1,6$ Hz, 1H), referentes a dois hidrogênios anoméricos. A presença de um dubleto em δ_{H} 3,74 (*d*, $J = 2,7$ Hz, 2H) e outro em δ_{H} 1,10 (*d*, $J = 6,2$ Hz, 3H) sugeriram hidrogênios metilênicos e metílicos, característicos de glucose ligada a

raminose. Esta sugestão foi reforçada pelo sinal em δ_C 102,4 atribuído ao carbono anomérico da unidade de glucose e pelos sinais em δ_C 16,0 e δ_C 100,4 referentes à metila e ao carbono anomérico da raminose, respectivamente. Um valor de $J = 7,6$ Hz indicou a configuração β para a unidade rutinosídeo.

TABELA 4.7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos via HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) da substância **IX** em comparação com dados da literatura.



IX

H/C	(500/125 MHz, CD_3OD)		GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006 (600/150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
2	-	*	-	156,3
3	-	*	-	135,7
4	-	*	-	177,4
5	-	*	-	160,8
6	6,36 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz, 1H)	97,4	6,36 (<i>d</i> , $J_m = 2,2$ Hz, 1H)	97,7
7	-	*	-	165,0
8	6,62 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz, 1H)	91,4	6,67 (<i>d</i> , $J_m = 2,2$ Hz, 1H)	92,1
9	-	*	-	156,5
10	-	*	-	104,9
OCH ₃	3,95 (s, 3H)	54,7	3,87 s	55,5
OCH ₃	3,89 (s, 3H)	54,9	3,88 s	55,9
1'	-	*	-	122,7
2'	7,72 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	115,4	7,55 (<i>d</i> , $J_m = 2,3$ Hz, 1H)	115,7
3'	-	*	-	145,7
4'	-	*	-	150,0
5'	7,05 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz, 1H)	110,0	7,05 (<i>d</i> , $J_o = 8,7$ Hz, 1H)	111,3
6'	7,76 (<i>dd</i> , $J = 8,5; 2,0$ Hz, 1H)	121,3	7,72 (<i>dd</i> , $J_m = 2,3$ Hz, $J_o = 8,7$ Hz, 1H)	121,3
1''	5,21 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	102,4	5,39 (<i>d</i> , $J_{aa} = 7,3$ Hz, 1H)	101,1
2''	-	*	-	73,9
3''	-	*	3,00-3,50	76,3
4''	3,40-3,88	*	-	69,8
5''	-	*	-	75,7
6''	3,74 (<i>d</i> , $J = 2,7$ Hz, 2H)	*	3,72 (1H)	66,7
1'''	4,51 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz)	100,4	4,41 ($J_{ee} = 1,0$ Hz, 1H)	100,6
2'''	-	*	-	70,2
3'''	-	*	-	70,5
4'''	3,40-3,88	*	3,00-3,50	71,7
5'''	-	*	-	68,0
6'''	1,10 (<i>d</i> , $J = 6,2$ Hz, 3H)	16,0	0,99 (<i>d</i> , $J = 6,3$ Hz, 3H)	17,5

*valores não atribuídos.

FIGURA 4.18 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância IX.

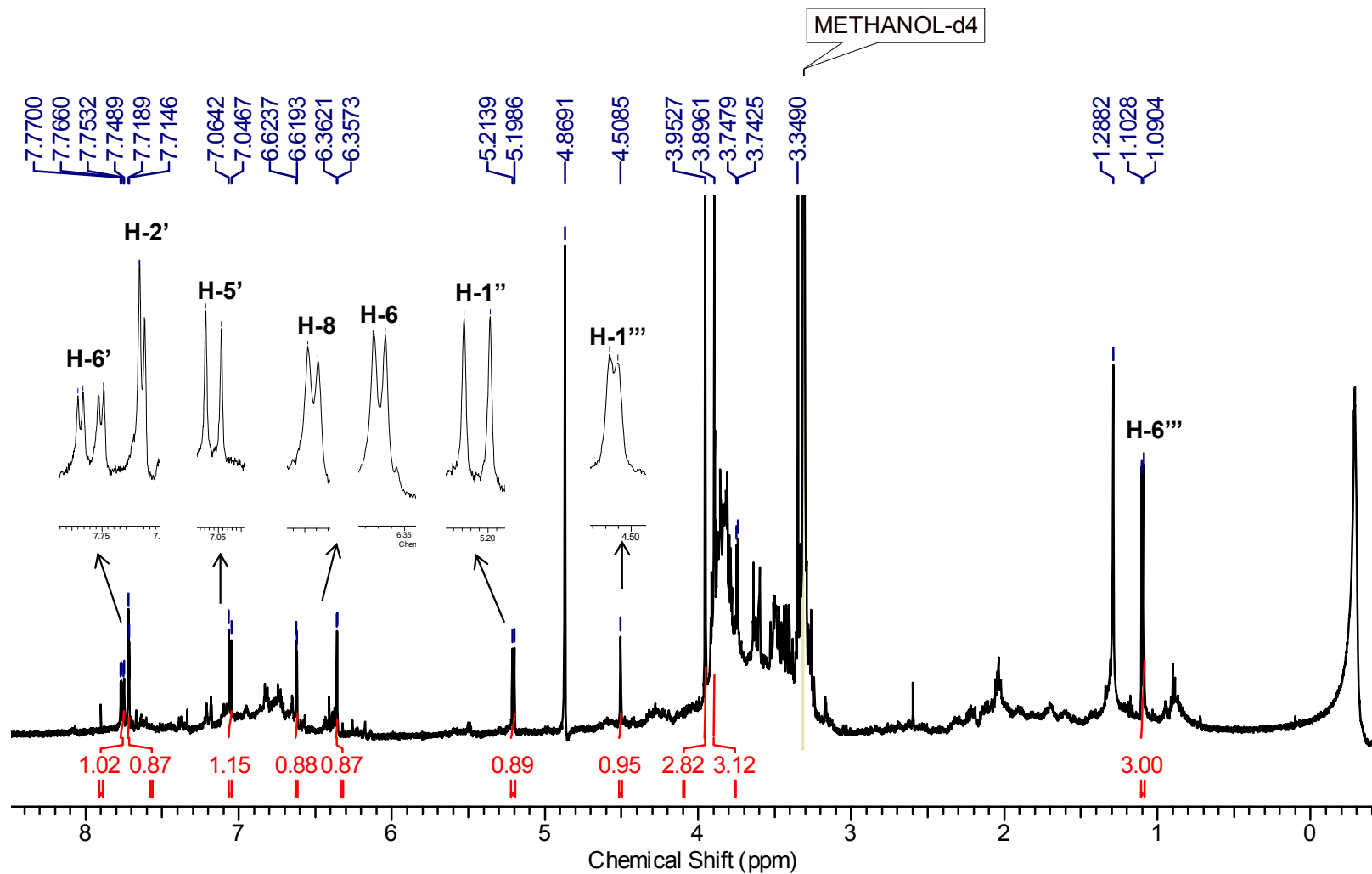
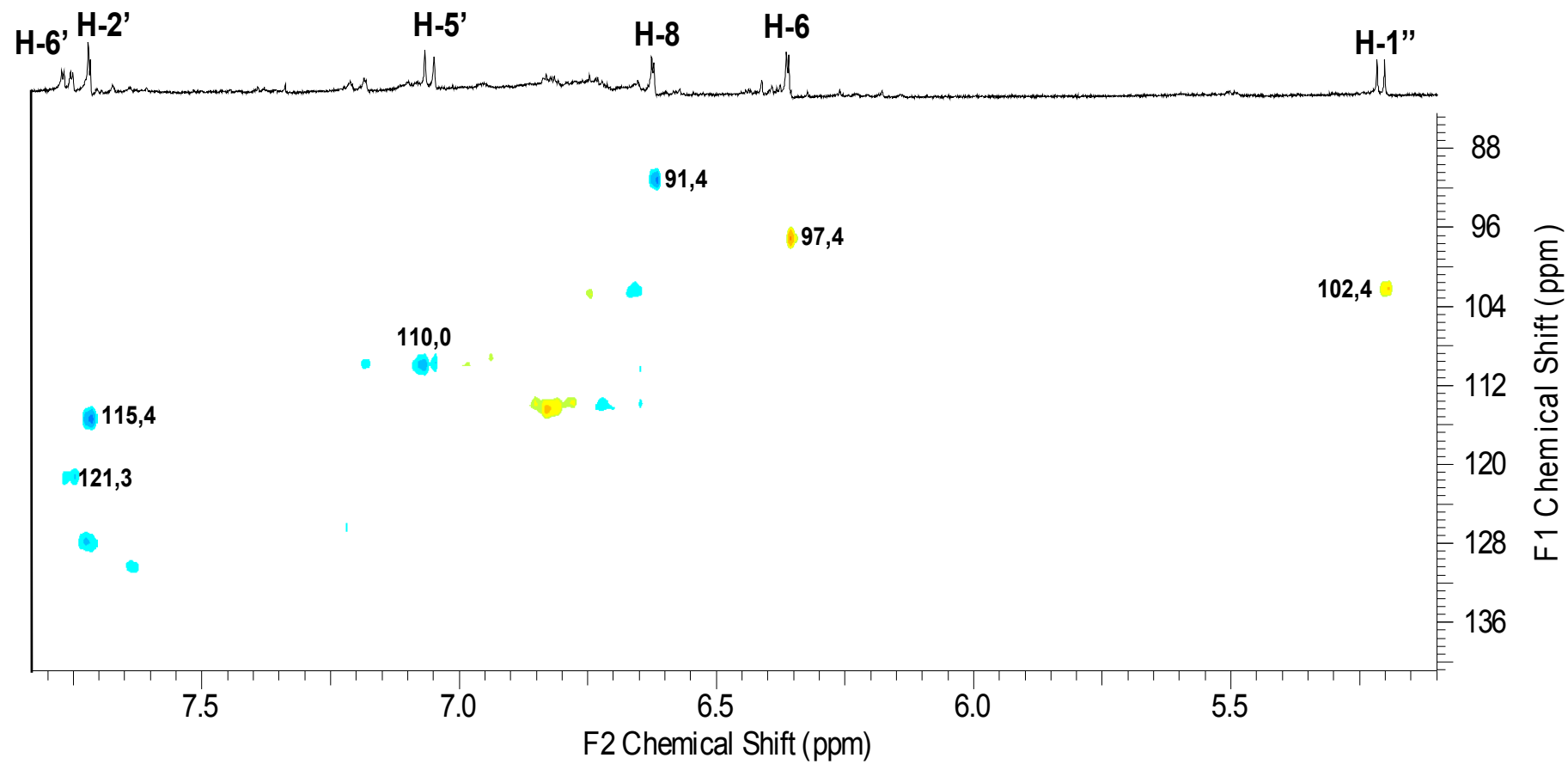


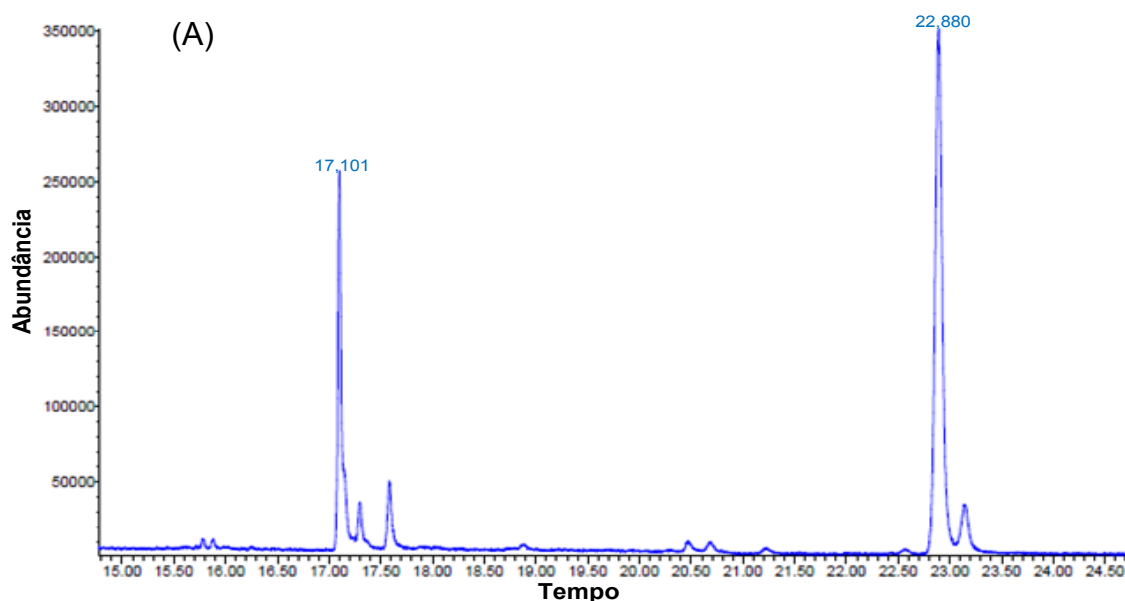
FIGURA 4.19 – Mapa de contorno HSQC para a substância IX.



Para confirmar a identidade das duas unidades monossacarídicas, 1,0 mg da amostra foi submetida à reação de hidrólise e em seguida o açúcar obtido foi submetido à reação de acetilação (Item 3.2.6.1, p. 36). O produto acetilado foi analisado por CG-EM, sendo que no cromatograma [Figura 4.20 (A)] observou-se a presença de dois picos majoritários, com tempos de retenção de 17,1 e 22,9 min, que em comparação com o padrão dos acetatos de alditóis (Apêndice 1, p. 103) injetados sob as mesmas condições, foram atribuídos à raminose e glucose, respectivamente.

No espectro de massas da raminose [Figura 4.20 (B), p. 76], observou-se os íons m/z 303, 289, 231, 217, 159, 145 e 73, referentes aos fragmentos principais, além dos íons referentes aos fragmentos secundários com m/z 187, 170, 157, 128, 115, 103 e 86 que quando comparados com o perfil de fragmentação do padrão (Apêndice 2 (C), p. 104), são característicos de desoxi-hexoses. A Figura 4.21 (p. 77) apresenta propostas de fragmentação para o acetato de alditol da raminose. Já no espectro de massas da glucose [Figura 4.20 (C), p. 76], observou-se os íons m/z 361, 289, 217, 145 e 73, referentes aos fragmentos principais, além dos fragmentos secundários com m/z 157, 139, 115 e 97, que quando comparados com o perfil de fragmentação do padrão (Apêndice 2, p. 104), são característicos de hexoses.

FIGURA 4.20 - Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação da raminose (B) e glucose (C) obtidos após derivatização química (acetilação) da substância IX.



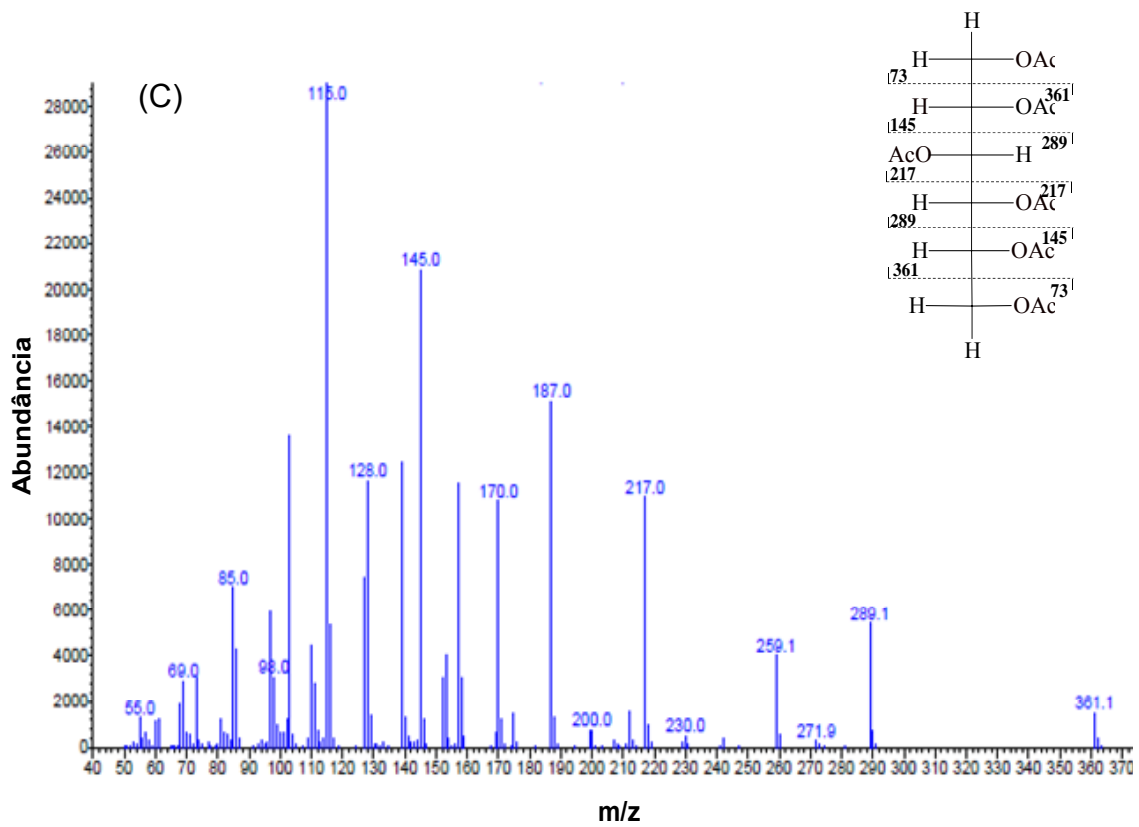
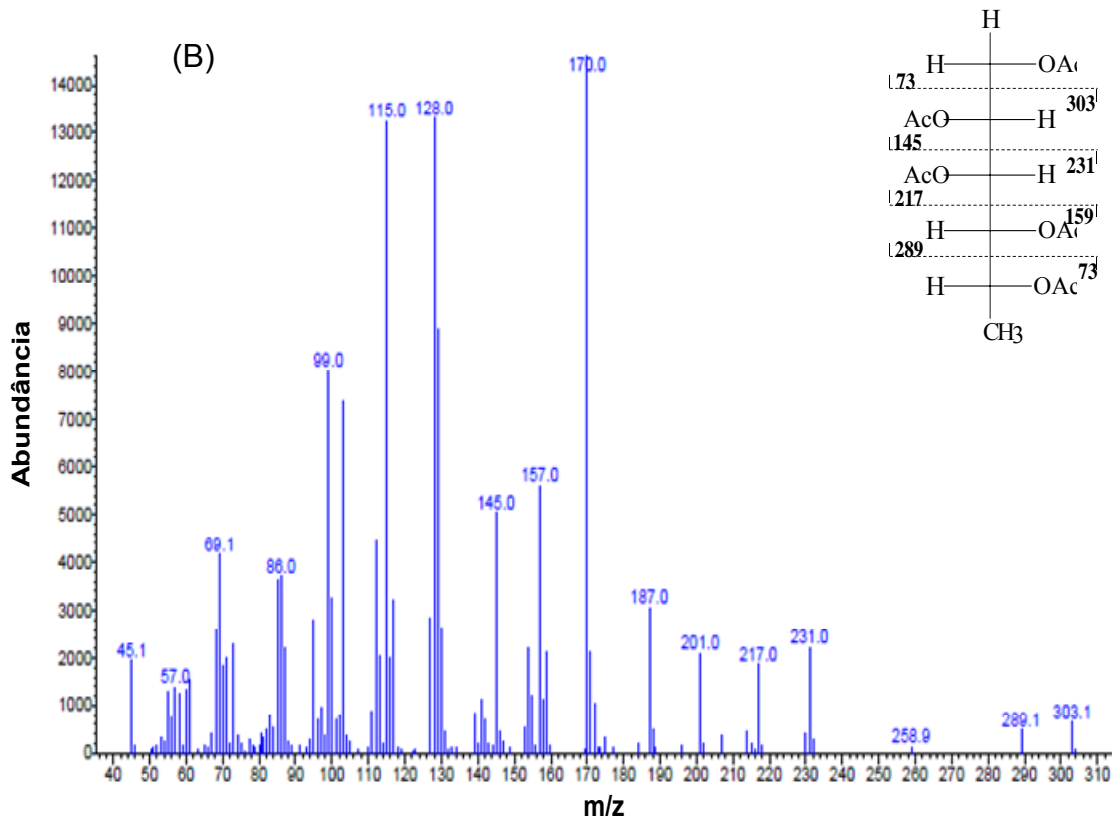
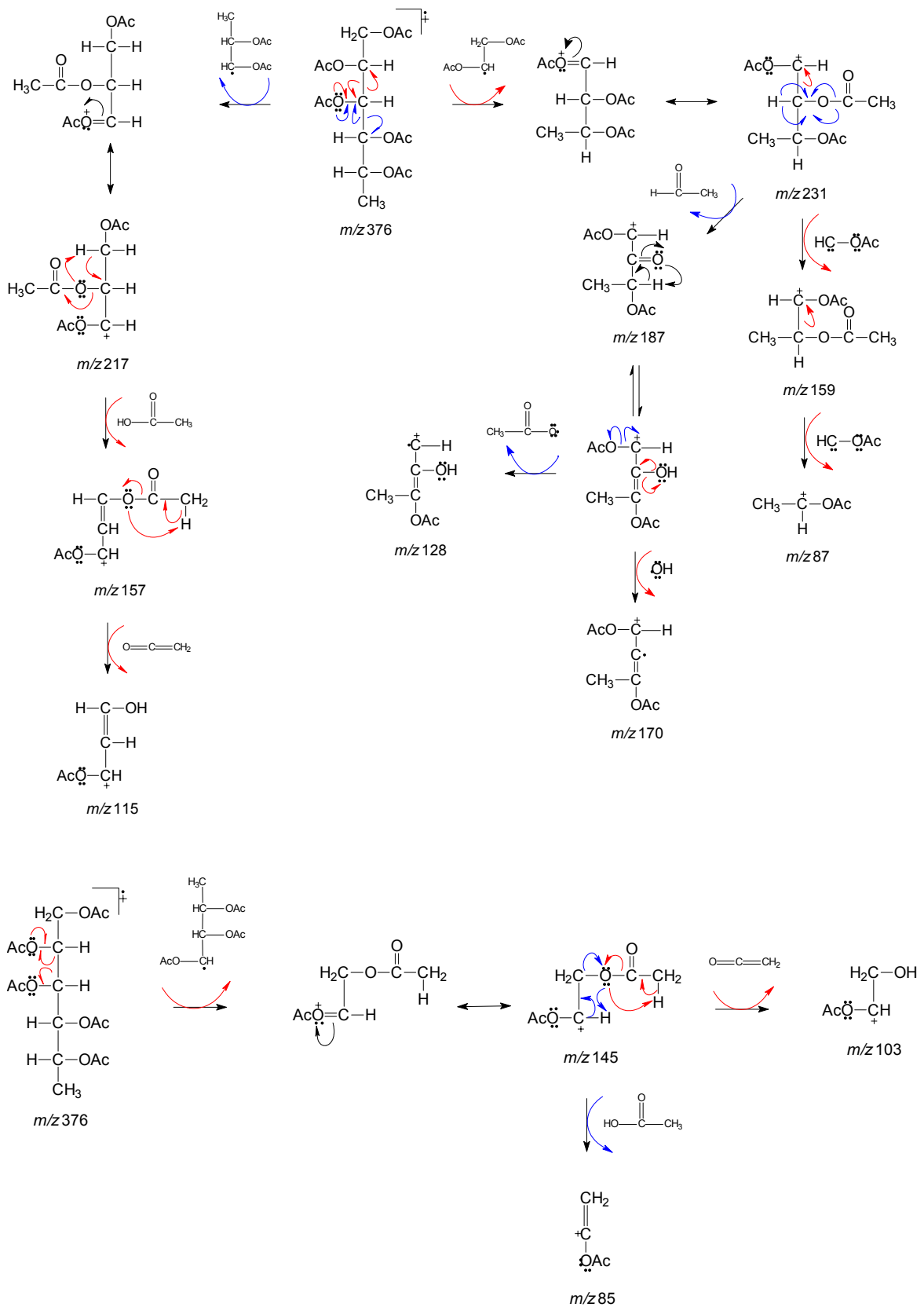


FIGURA 4.21 – Propostas de fragmentação para a raminose.



4.3.5 – Identificação do Flavonoide **X**

O flavonoide quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo (**X**), também conhecido como isoquercitrina foi relatado anteriormente em 13 espécies de *Erythroxyllum*, incluindo a espécie *E. suberosum* (BOHM et al., 1981; BOHM et al., 1988).

A substância **X** apresentou características espectrais similares aquelas das substâncias **VII** e **VIII** com os mesmos sinais referentes ao núcleo comum da aglicona quercetina. Pelos espectros de RMN de ^1H (Figura 4.22, p. 80), HSQC (Figura 4.23, p. 81) e HMBC (Figura 4.24 e 4.25, p. 82 e 83, respectivamente), foi possível atribuir os valores de hidrogênios e carbonos do esqueleto, cujos valores estão descritos na Tabela 4.8 (p. 84). As correlações observadas no HSQC e HMBC estão descritas na Tabela 4.9 (p. 85).

A diferença entre **VII** e **X** está no substituinte glicosídeo ligado à porção aglicona, que foi determinado após hidrólise ácida total, redução e acetilação da substância **X**. No cromatograma, obtido por CG-EM [Figura 4.26 (A), p. 86], observou-se a presença de um pico majoritário com tempo de retenção de 23,2 min, que em comparação com o padrão injetado sob as mesmas condições cromatográficas (Apêndice 1, p. 103), foi atribuído a glucose.

Do espectro de massas [Figura 4.26 (B), p. 86], obteve-se os íons m/z 361, 289, 217, 145 e 73, referentes aos fragmentos principais, além dos íons m/z 157, 139, 115 e 97, que quando comparados com o perfil de fragmentação do padrão [Apêndice 2 (B), p. 104], são característicos de hexoses.

A constante de acoplamento elevada do hidrogênio ligado C-1" ($J = 7,8$ Hz) indicou que a relação deste com o hidrogênio do C-2" é trans-diaxial. Assim o oxigênio do carbono anomérico, que faz a ligação entre a unidade glucosídica e a aglicona, encontra-se na posição β . A ligação da glucose com a aglicona foi atribuída pela correlação observada no espectro de HMBC entre o hidrogênio anomérico H-1" e o carbono C-3 (Figura 4.27, p. 86)

O flavonoide isoquercitrina pode ser obtido por hidrólise enzimática seletiva de rutina, e por isso vem atraindo crescente interesse

comercial. Sua forma solúvel em água, chamada “isoquercitrina enzimaticamente modificada”, foi registrada pelo FDA para uso em alimentos, pois estudos biológicos têm demonstrado que isoquercitrina apresenta atividades quimioprotetoras contra o estresse oxidativo, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e reações alérgicas (VALENTOVÁ et al., 2014).

KIM e colaboradores (2011) ao avaliar o efeito inibitório de flavonoides contra a formação dos produtos da glicação avançada (AGEs - *Advanced Glycation End-products*), que são considerados mediadores patogênicos importantes das complicações diabéticas, observou que isoquercitrina e hiperina apresentam uma forte atividade inibidora contra a formação de AGEs, sendo mais potentes do que o controle positivo (aminoguanidina), sugerindo assim que estes compostos possam ser agentes promissores para o tratamento de doenças associadas à glicação.

FIGURA 4.22 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância X.

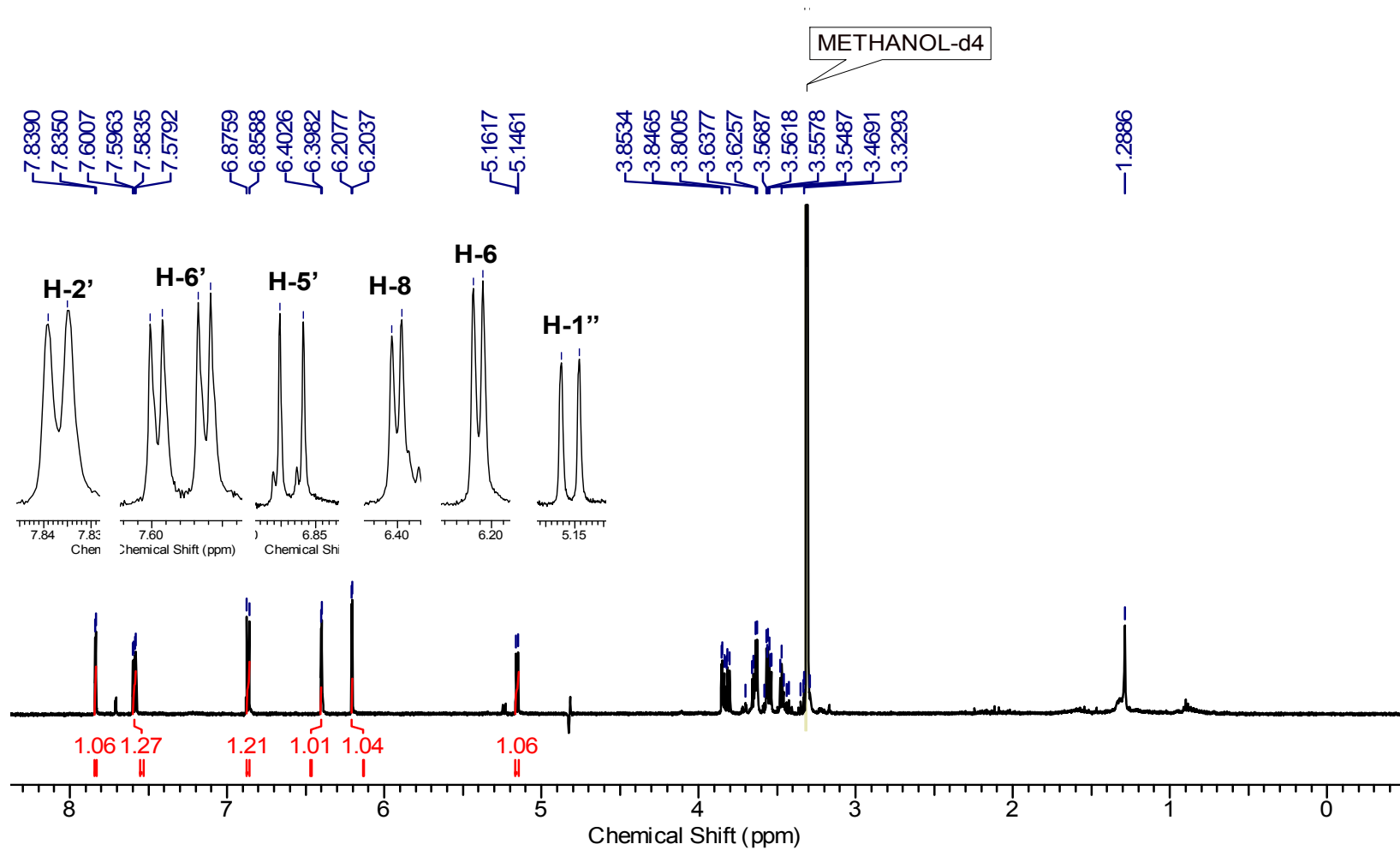


FIGURA 4.23 – Mapa de contorno HSQC para a substância X.

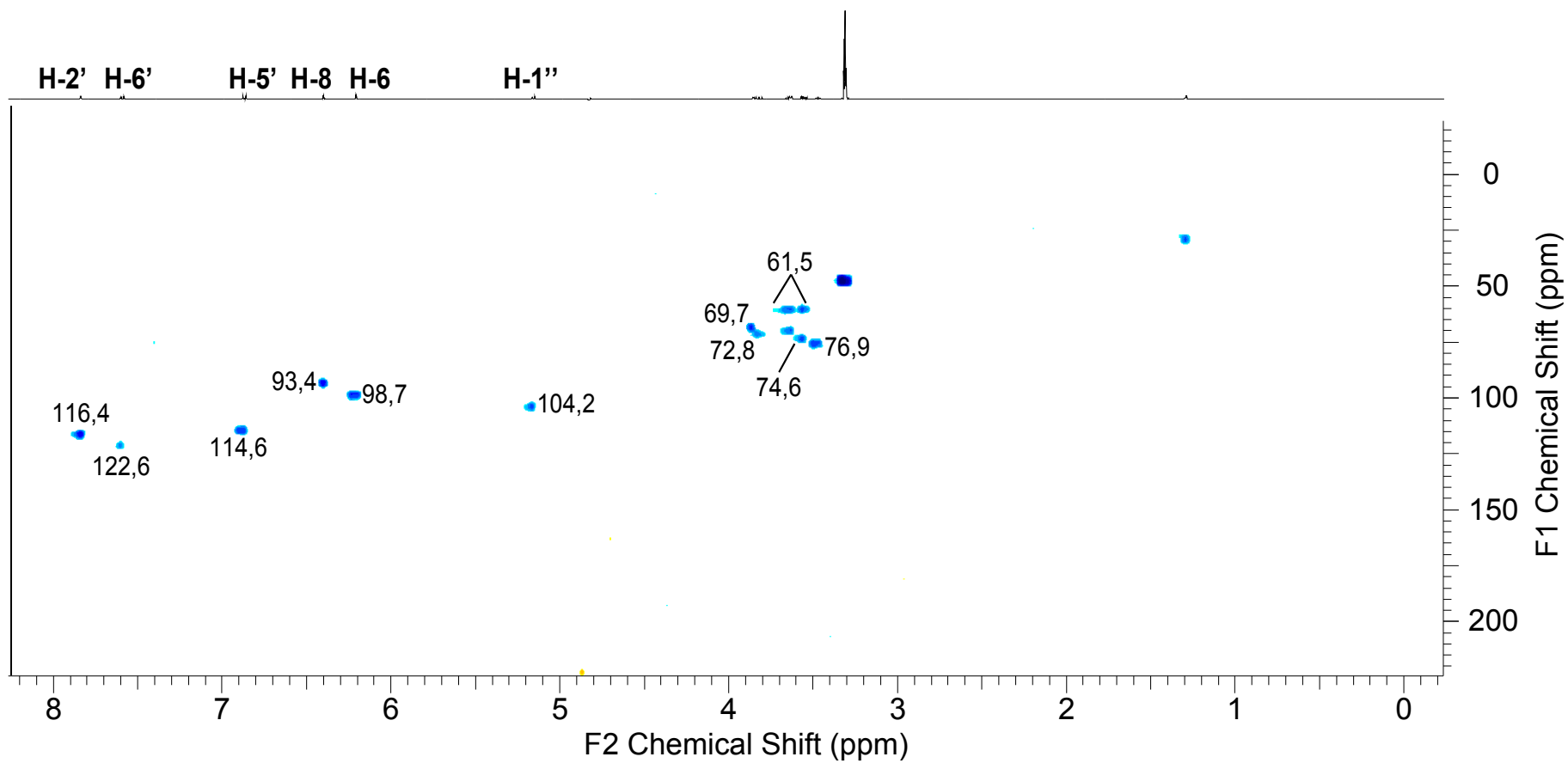


FIGURA 4.24 – Mapa de contorno HMBC para a substância X.

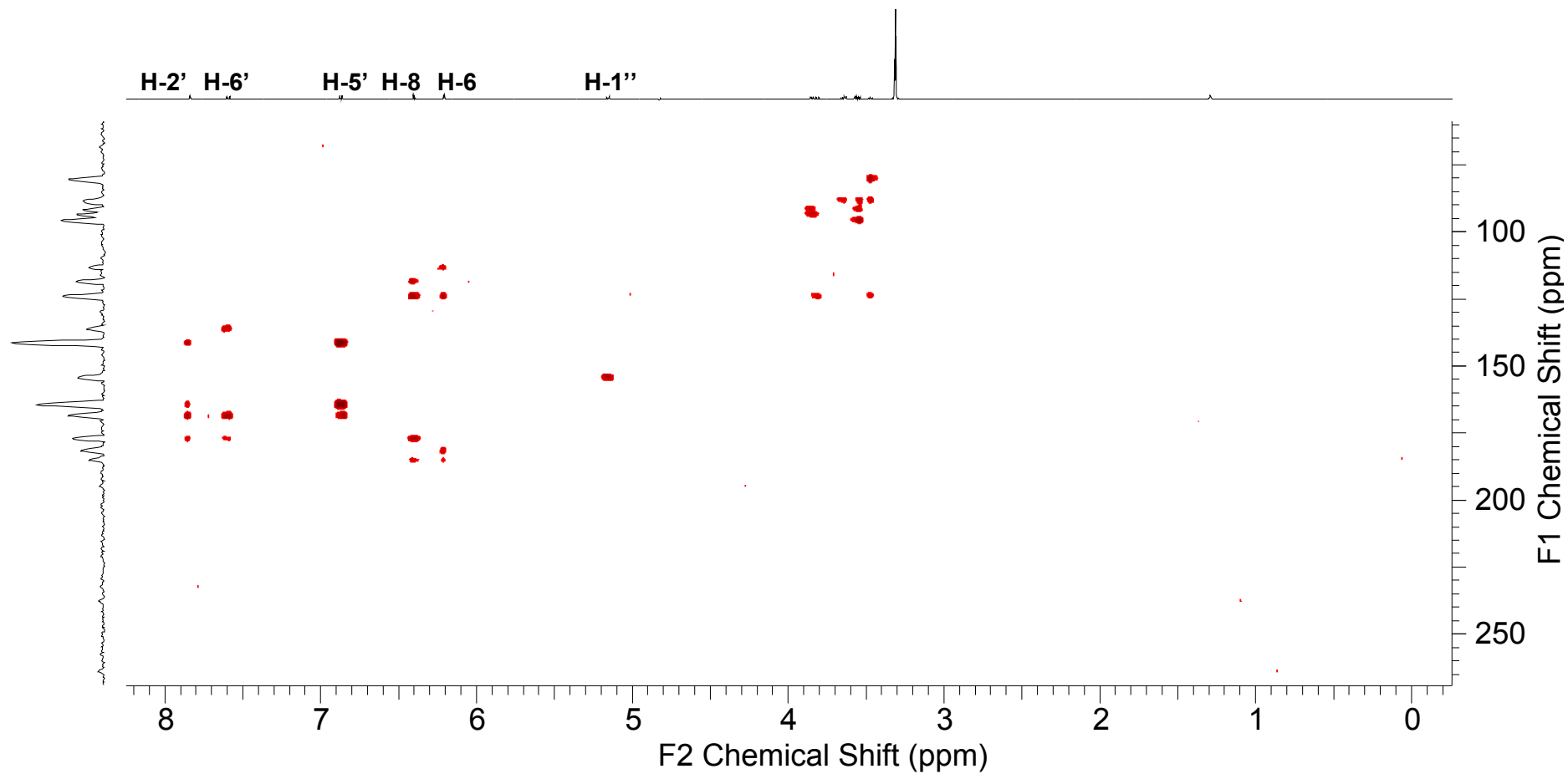


FIGURA 4.25 – Expansão do mapa de contorno HMBC para a substância X.

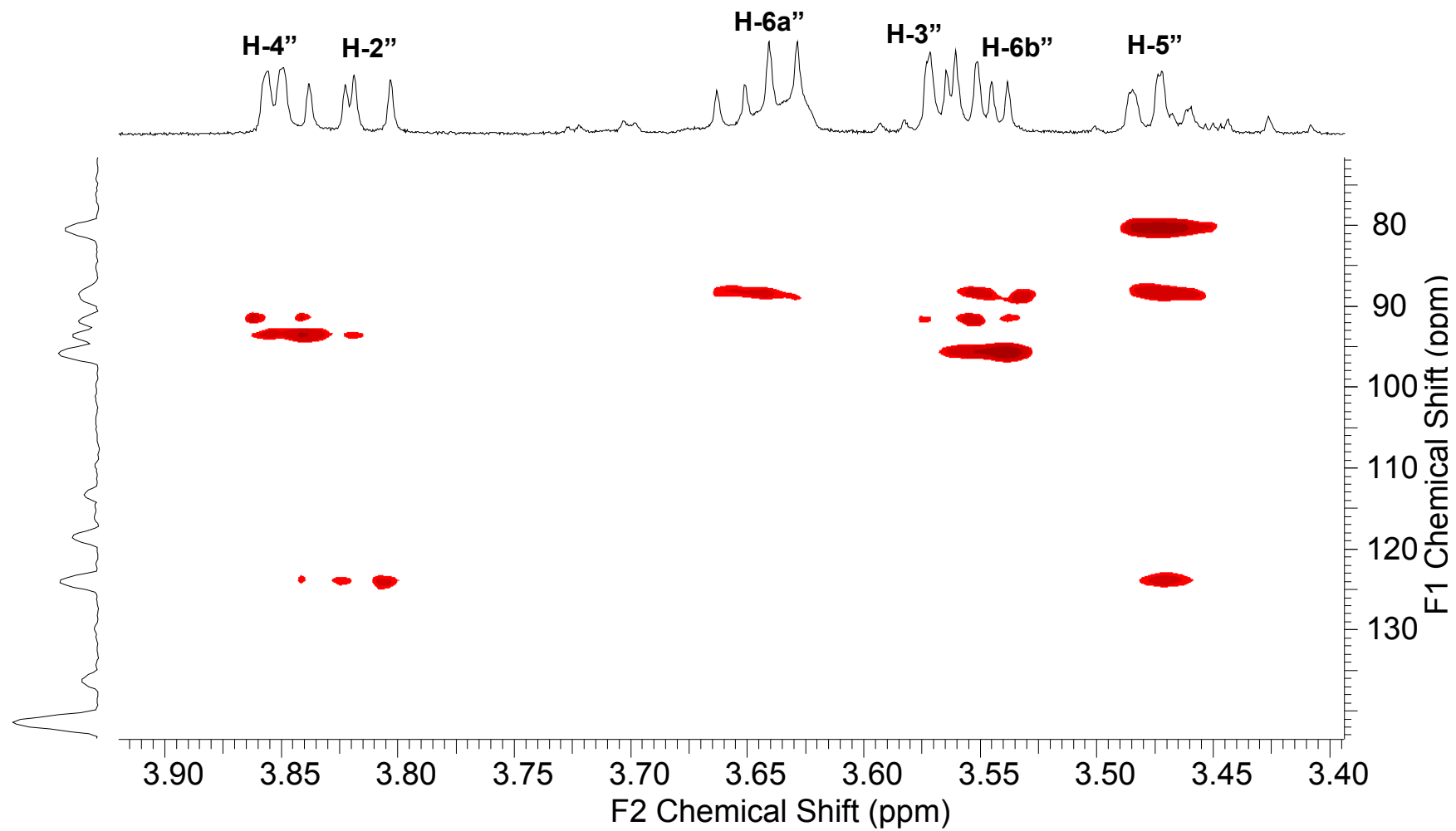
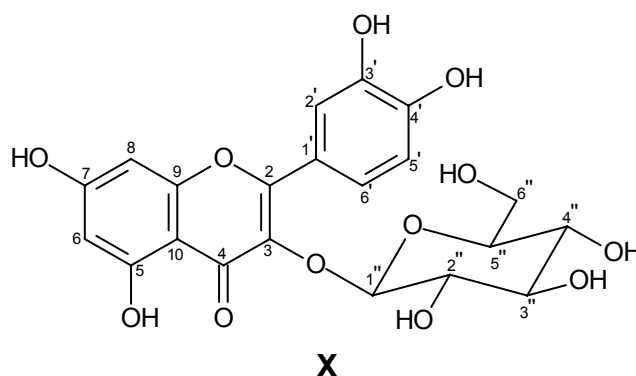


TABELA 4.8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500/125 MHz, CD_3OD) da substância **X** em comparação com dados da literatura.



H/C	(500/125 MHz, CD_3OD)		HAN et al., 2004 (400/100 MHz, CD_3OD)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	-	158,4	-	158,2
3	-	135,5	-	135,4
4	-	-	-	179,2
5	-	162,3	-	162,7
6	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,7	6,17 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	99,8
7	-	166,0	-	165,7
8	6,40 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,4	6,35 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	94,6
9	-	-	-	158,8
10	-	105,0	-	105,5
1'	-	122,6	-	123,1
2'	7,83 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, 1H)	116,4	7,71 (<i>d</i> , $J = 2,4$ Hz, 1H)	115,8
3'	-	145,4	-	145,6
4'	-	149,5	-	149,6
5'	6,86 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, 1H)	114,6	6,85 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz, 1H)	117,4
6'	7,59 (<i>dd</i> , $J = 8,6$ e 2,2 Hz, 1H)	122,6	7,56 (<i>dd</i> , $J = 8,6$ e 2,4 Hz, 1H)	122,8
1''	5,15 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	104,2	5,23 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	104,2
2''	3,82 (<i>m</i> , 1H)	72,8		75,6
3''	3,57 (<i>m</i> , 1H)	74,6		78,2
4''	3,85 (<i>m</i> , 1H)	69,7	3,22-3,51 (<i>m</i> , 4H)	71,1
5''	3,47 (<i>m</i> , 1H)	76,9		77,9
6a''	3,65 (<i>m</i> , 1H)		3,71 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e 2,4 Hz, 1H)	
6b''	3,57 (<i>m</i> , 1H)	61,5	3,58 (<i>dd</i> , $J = 12,0$ e 5,2 Hz, 1H)	62,4

TABELA 4.9 – Correlações observadas no HSQC e HMBC para a substância **X**.

Posição	(500/125 MHz, CD ₃ OD)		Correlações	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	HSQC	HMBC
6	6,20	98,7	C-6	C-5, C-7, C-8, C-10
8	6,40	93,4	C-8	C-2, C-6, C-7, C-10
2'	7,83	116,4	C-2'	C-1', C-3', C-4', C-2
5'	6,86	114,6	C-5'	C-1', C-3', C-4'
6'	7,59	121,2	C-6'	C-2, C-2' C-4',
1''	5,15	104,2	C-1''	C-3''
2''	3,82 <i>m</i>	72,8	C-2''	C-1'', C-3''
3''	3,57 <i>m</i>	74,6	C-3''	C-4'', C-2'', C-5''
4''	3,85 <i>m</i>	69,7	C-4''	C-2'', C-3''
5''	3,47 <i>m</i>	76,9	C-5''	C-6'', C-4'', C-1''
6''	3,65 e 3,57	61,5	C-6''	C-4''

FIGURA 4.26 – Cromatograma obtido por CG-EM (A) e perfil de fragmentação da glucose (B) obtidos após derivatização química (acetilação) da substância X.

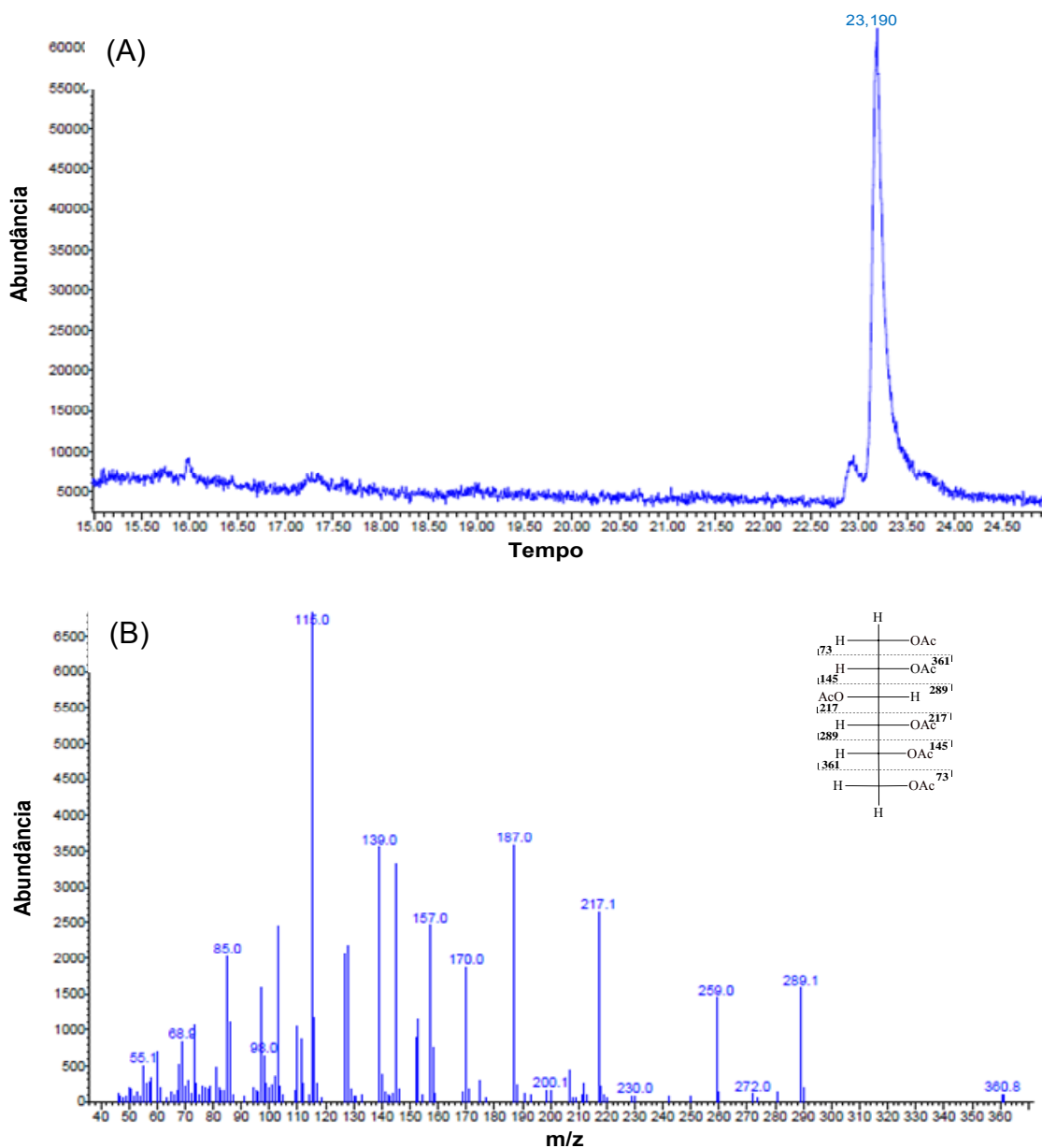
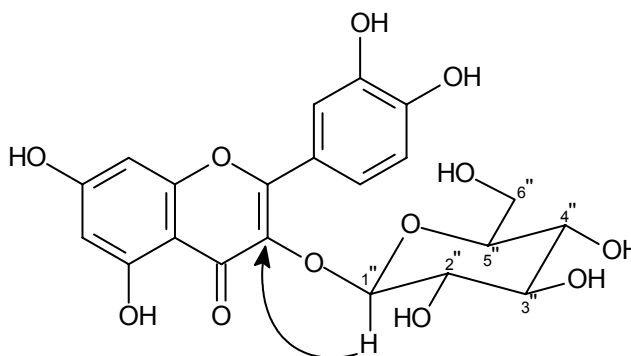


FIGURA 4.27 – Correlação significativa observada no mapa de contorno HMBC da substância X.



4.4 - ALCALOIDES TROPANO E NORTROPANO DE *E. suberosum*

4.4.1 - Identificação dos Alcaloides tropacocaína (**XI**) e nortropacocaína (**XII**)

A fração alcaloídica obtida a partir da extração ácido-base, do extrato etanólico das folhas (Item 3.2.8, p. 38) foi analisada por CG-EM. A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca NIST/EPA/NIH, disponível no equipamento.

No cromatograma, obtido por CG-EM (Figura 4.28, p. 88), observou-se a presença de diversos compostos. A comparação do espectro de massas dos picos com tempos de retenção 7,28 e 7,33 min com os da biblioteca NIST/EPA/NIH, sugeriu tratar-se dos alcaloides nortropacocaina e tropacocaina, respectivamente. O espectro de massas de **XI** obtido por CG-EM [Figura 4.29 (A), p. 89] exibiu um padrão de fragmentação de um tropano 3-substituído. O espectro apresentou pico do íon molecular $[M]^+$ em m/z 245, pico base em m/z 124, e outros íons, correspondentes ao anel tropano 3-substituído com a fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO_2$. A presença do íon m/z 82, referente ao anel de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio e os íons m/z 77 e 105, são consistentes com os fragmentos fenil e benzoiloxi característicos da tropacocaína. A Figura 4.30, p. 90, apresenta propostas de fragmentação para a substância **XI**.

O espectro de massas de **XII** [Figura 4.29 (B), p. 89] apresentou pico do íon molecular $[M]^+$ em m/z 231, compatível com fórmula molecular $C_{14}H_{17}NO_2$. O pico base m/z 110 e o íon m/z 68 (14 uma a menos que o íon equivalente da tropacocaína) sugere a ausência do substituinte metil no átomo de nitrogênio em **XII** e os íons m/z 77 e 105 corroboram com a estrutura da nortropacocaína.

TABELA 4.10 – Fragmentação e tempos de retenção da fração alcaloídica de *E. suberosum*.

Alcaloide	CG-EM t_R	m/z
tropacocaína	7,33 min	245, 124, 105, 94, 82, 77
nortropacocaína	7,28 min	231, 110, 105, 80, 68, 77

FIGURA 4.28 – Cromatograma obtido por CG-EM da fração alcaloídica.

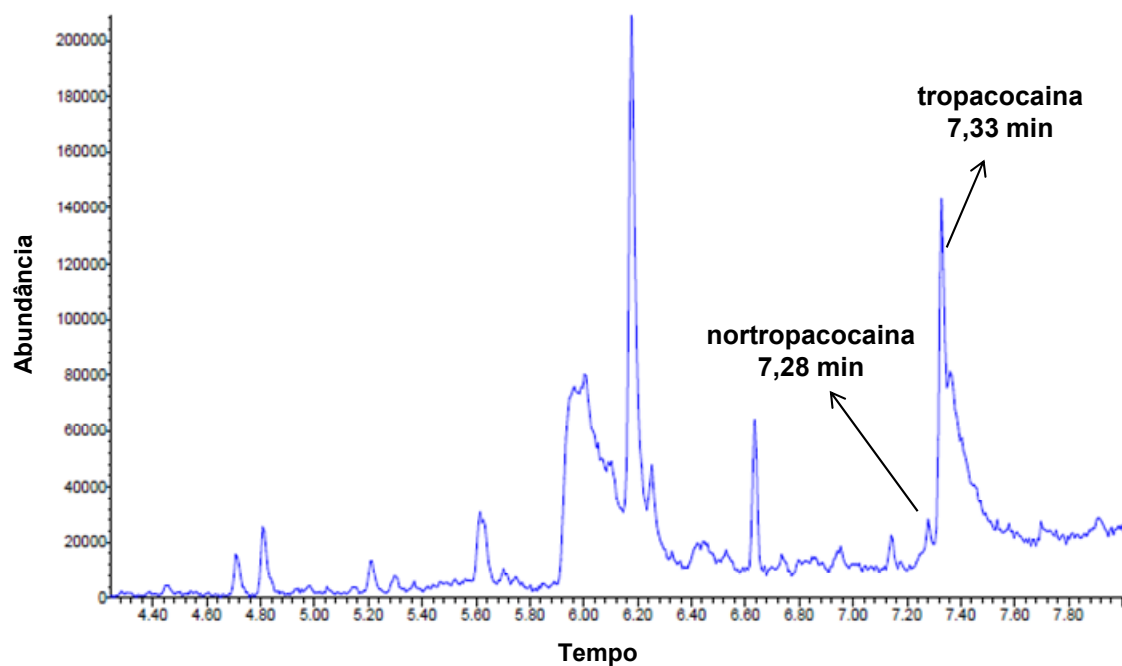


FIGURA 4.29 - Espectros de massas (70 eV) dos alcaloides tropacocaína (**XI**) e nortropacocaína (**XII**).

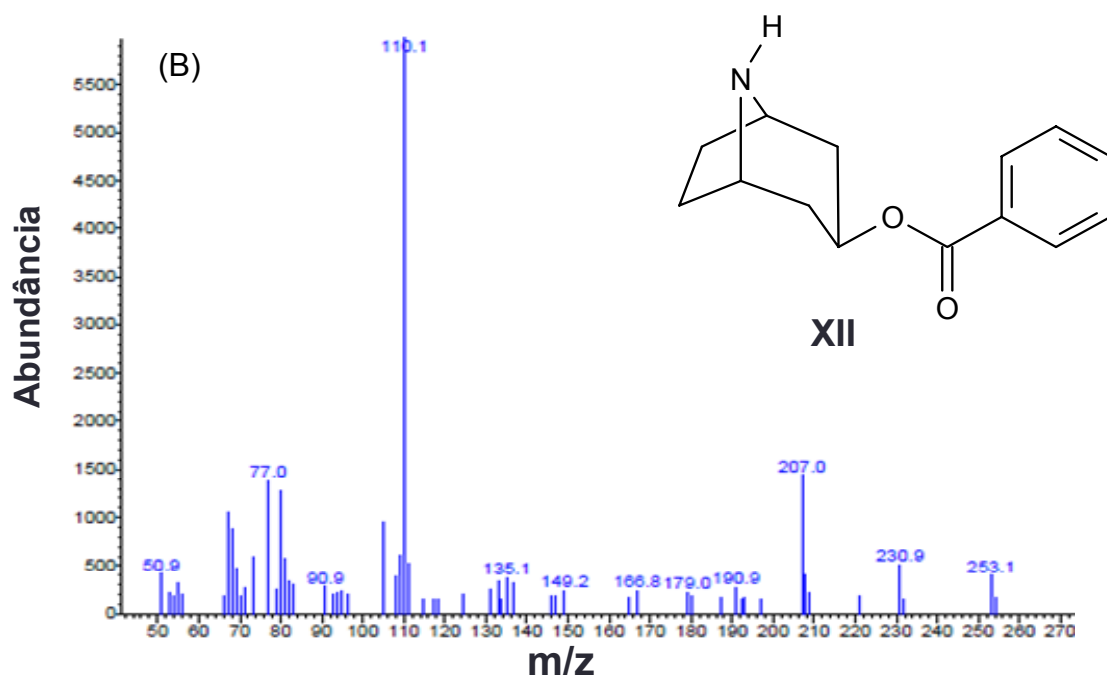
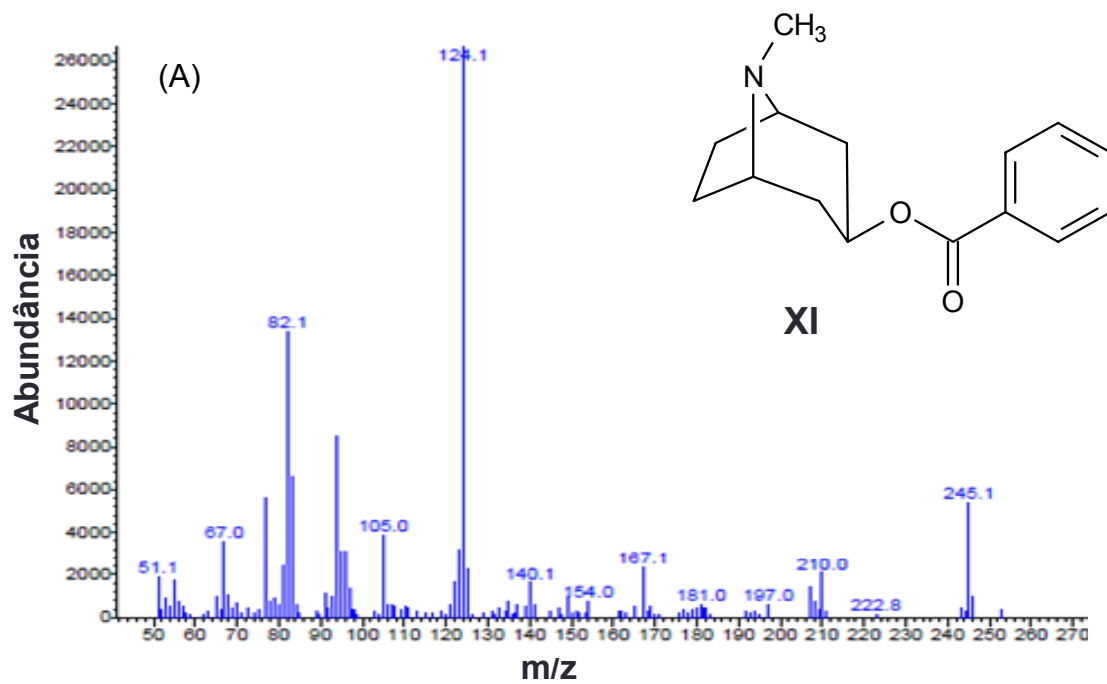
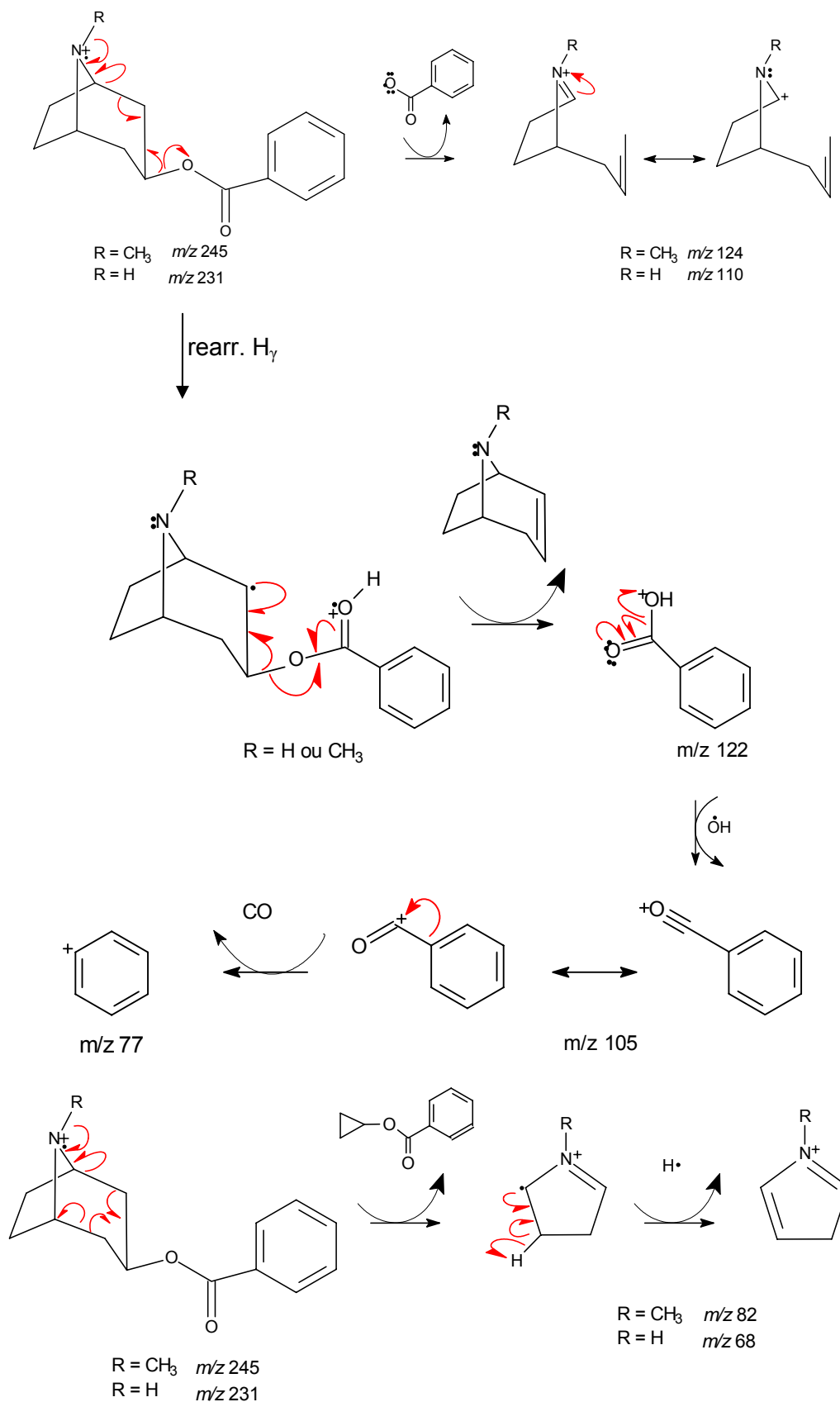


FIGURA 4.30 – Propostas de fragmentação para os alcaloides tropacocaína (XI) e nortropacocaína (XII).



4.5 - RESULTADOS BIOLÓGICOS

4.5.1 - Atividade Enzimática Frente às Catepsinas K, L e V.

Diante da importância dos produtos naturais e dos resultados já descritos na literatura para catepsinas, os extratos e frações de *E. suberosum* foram avaliados *in vitro* frente às catepsinas K, V e L. Os extratos brutos, quando avaliados na concentração de 50 µg/mL (Figura 4.31), apresentaram inibição de todas as enzimas estudadas, com porcentagem de inibição superior a 60%, sendo a atividade inibitória mais expressiva para a catepsina V (97% de inibição).

As frações de *E. suberosum*, obtidas da partição líquido-líquido, foram avaliadas nas concentrações de 5 e 50 µg/mL. Dentre as mesmas, a variação entre os valores de porcentagem de inibição encontrados está entre 0 e 79% para a catepsina K, entre 23 e 97% para a catepsina L e entre 18 e 99% para a catepsina V (Tabela 4.11, p. 92).

FIGURA 4.31 – Porcentagem de inibição dos extratos etanólicos de *E. suberosum* frente às catepsinas K, L e V.

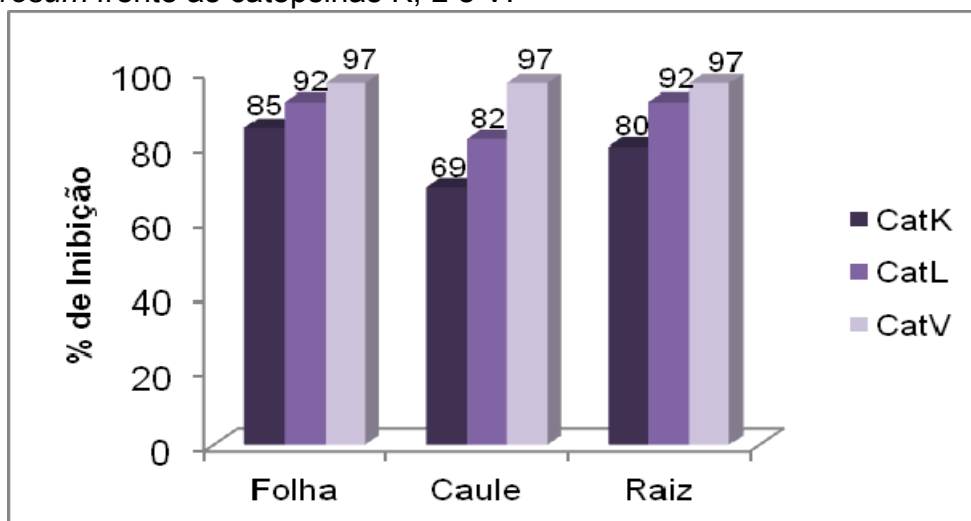


TABELA 4.11 – Porcentagem de inibição das frações de *E. suberosum* frente as catepsinas K, L e V.

Amostras	% Inibição CatK		% Inibição CatL		% Inibição CatV	
	5 µg/mL	50 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL
EEFH	*	42	*	75	*	98
EEFA	50	76	67	88	87	98
EEFMA	48	74	70	97	78	95
EECH	0	13	23	40	18	80
EECA	22	10	26	81	66	91
EEMA	22	40	63	81	84	93
EERH	19	40	42	96	61	95
EERA	47	67	77	96	84	99
EERMA	66	79	87	96	96	97

EEF: extrato etanólico das folhas; **EEC**: extrato etanólico do caule; **EER**: extrato etanólico da raiz; **H**: hexano; **A**: acetato de etila; **MA**: metanol:água. *Não testado.

A quercetina (**VII**) quando testada na concentração de 100 µM mostrou significativa inibição da catepsina V (94%), além de elevada seletividade, uma vez que não apresentou efeito sobre as catepsinas K e L. Quando avaliada a potência, este flavonoide demonstrou ser um inibidor potente, com valor de IC₅₀ de 2,2 ± 0,2 µM. A literatura descreve flavonoides sintéticos com considerável atividade frente à catepsina V (com valores de IC₅₀ entre 0,5 e 2,0 µM), e a luteolina (**26**) (Tabela 1.3, p. 22) (flavonoide natural isolado da espécie *Vitex polygana* - Verbenaceae) com IC₅₀ de 2,5 µM (ALVIN et al., 2010). Vale ressaltar que a diferença entre o flavonoide luteolina (**26**) e a quercetina (**VII**) é apenas o substituinte na posição 3, que neste caso, não causa diferença significativa na atividade frente à catepsina V.

5 – CONCLUSÕES

O estudo químico de *E. suberosum* levou ao isolamento de seis flavonoides, sendo estes o flavonol quercetina (V) e seus derivados 3-O-monoglicosídeos hiperina (VI) e isoquercitrina (VIII) e 3-O-diglicosídeo ombuina-3-rutinosídeo (VII), todos já relatados para esta espécie. A mistura dos flavonóis catequina (IX) e epicatequina (X) está sendo relatada pela primeira vez em *E. suberosum*. Além disso, foi possível identificar a mistura dos esteroides campesterol (I), estigmasterol (II), sitosterol (III) e o éster graxo do sitosterol (IV), que são metabólitos de grande abundância no reino vegetal.

A análise via CG-EM da fração alcaloídica, obtida após extração ácido-base do extrato etanólico das folhas, sugere a presença dos alcaloides tropacocaína (XI) e nortropacocaína (XII) nesta espécie. Estes foram identificados através da comparação dos seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca NIST/EPA/NIH. Além da análise dos padrões de fragmentação observados, que foram consistentes com o padrão de fragmentação de um núcleo tropano 3-substituído. O gênero *Erythroxylum* é bastante conhecido pela presença dos alcaloides tropanos porém, este é o primeiro relato da ocorrência destes metabólitos na espécie *E. suberosum*.

Através dos resultados biológicos foi possível averiguar a potencialidade de *E. suberosum* na busca de inibidores específicos de cisteíno peptidases (catepsinas), tendo o flavonol quercetina (VII) apresentado o valor de IC₅₀ de 2,2 ± 0,2 µM frente à catepsina V, além de elevada seletividade, uma vez que não apresentou atividade sobre as catepsinas K e L.

O estudo da composição química de *E. suberosum* contribuiu para o conhecimento químico desta espécie, uma vez que são poucos os relatos descritos na literatura. Em trabalhos futuros, será importante realizar a identificação estrutural dos alcaloides através, principalmente, das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e outras complementares, a fim de confirmar a ocorrência destes na espécie.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. "Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *croton pullei* var. *glabrior* (euphorbiaceae)". *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*, 1: 8, **2001**.
- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F. & SILVA, M. S. "Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). *Quím. Nova*, 37: 1-4, **2014**.
- ALVIN Jr., J.; SEVERINO, R. P.; MARQUES, E. F.; MARTINELLE, A. M.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. & CORRÊA, A. G. "Solution phase synthesis os a combinatorial library of chalcones and flavones as potente cathepsin V inhibitors". *J. Comb. Chem.*, 12: 687-695, **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.
- ANSELI, S. M.; PEGEL, K. H. & TAYLOR, D. A. H. "Diterpenes from the timber of *Erythroxylum pitum*". *Phytochemistry*, 32: 945-952, **1993**.
- BACCHI, E. M. "Alcaloides tropânicos". IN: Farmacognosia da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Porto Alegre, Editora da UFSC, 2003. p.13-28.
- BARBOSA, A. V. G. & AMARAL Jr., A. Flora dos estados de Goiás e Tocantins: Erythroxylaceae. Editora da UFG. Goiânia. 2001. 73p.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIRÓZ, L. P. & SANT'ANA, A. E. G. "Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species". *Phytochemistry*, 68: 1735-1739, **2007**.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G. & BIANCHI, M. L. P. "Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas". *Alim. Nutr.*, 15: 285, **2004**

BOHLEY, P. & SEGLEN P. O. "Proteases and proteolysis in the lysosome". *Experientia*, 48: 153, **1992**.

BOHM, B. A.; LOO, T.; NICHOLLS, K. W. & PLOWMAN, T. "Flavonoid variation in *Erythroxylum*". *Phytochemistry*, 27: 833-837, **1988**.

BOHM, B. A.; PHILLIPS, D.W. & GANDERS, F. R. "Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*". *J. Nat. Prod.*, 44: 677, **1981**.

BOLZANI, V. S.; FLAUSINO, O. & VALLI, M. "Biodiversidade brasileira: uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada". IN: Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. YUNES, R. A. & CECHINEL FILHO, V. (org). Itajaí, Universidade do Vale do Itajaí, 2012. p. 353-383.

BONEFELD, M.; FRIEDRICH, H. & KOLODZIEJ, H. "(+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*". *Phytochemistry*, 25: 1205, **1986**.

BRACHET, A.; MUÑOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J. & CHRISTEN, P. "Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark". *Phytochemistry*, 46: 1439-1442, **1997**.

BROCK, A.; BIERI, S.; CHRISTEN, P.; DRÄGER, B. "Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species". *Phytochemistry*, 66: 1231-1240, **2005**.

CAI, Q.; RAHN, R. O. & ZHANG, R. "Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals". *Cancer Lett.*, 119: 99, **1997**.

CHÁVEZ, J. P.; SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G. & DAVID, J. M. "Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*". *Phytochemistry*, 41: 941-943, **1996**.

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: 387-395, **2001**.

COOK, N.C. & SAMMAN, S. "Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources". *J. Nutr. Biochem.*, 7: 66-76, **1996**.

CÓRDOVA, W. H. P.; MATOS, M. G.; TABART, J.; SIPEL, A. KEVERS, C.; DOMMES, J. "In vitro characterization of antioxidant properties of cuban endemic varieties of *Erythroxylum alaternifolium* A. Rich. Isolation of two flavonol glycosides". *J. Chil. Chem. Soc.*, 57: 1340-1343, **2012**.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2a ed. John Wiley & Sons. England. 2002. p. 232.

DIAS, B. F. S. "A implementação da convenção sobre biodiversidade biológica no Brasil: desafio e oportunidades". Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 1995, p. 7.

DRÄGER, B. "Analysis of tropane and related alkaloids". *J. Chromatogr. A*, 978: 1-35, **2002**.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C. & SIQUEIRA, M. F. Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. Editora Páginas & Letras. São Paulo. 2004. 475p.

FLAUSINO, O. A.; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S. & NUNES-DE-SOUZA R. L. "Effects of Erythrinian Alkaloids Isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in Mice Submitted to Animal Models of Anxiety". *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 375-378, **2007**.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. "Flavonoid glycosides from cuban *Erythroxylum* species" *Biochem. Syst. Ecol.*, 34: 539-542, **2006**.

GUERRA, M. P. & NODARI, R. O. "Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos". IN: Farmacognosia da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Porto Alegre, Editora da UFSC, 2003. p.13-28.

GURIB-FAKIM, A. "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow". *Mol. Aspects. Med.*, 27: 3, **2006**.

HAN, J. T.; BANG, M. H.; CHUN, O. K.; KIM, D. O.; LEE, C. Y. & BAEK, N.I. "Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities". *Arch. Pharm. Res.*, 27: 390-395, **2004**.

HEGNAUER, R. "Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on old word species)". *J. Ethnopharmacol.*, 3: 282, **1981**.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. EdUFSCar. São Carlos. 2003. 152p.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. "Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidante activity and interactions". *J. Food Compos. Anal.*, 21: 589-598, **2008**.

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

JOHNSON, E. L.; SCHMIDT, W. F.; NORMAN, H. A. "Flavonoids as markers for *Erythroxylum* taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*". *Biochem. Syst. Ecol.*, 26: 743-759, **1998**.

JOHNSON, J. R.; BURNELL-NUGENT, M.; LOSSIGNOL, D.; GANAE-MOTAN, E. D.; POTTS, R. & FALLON, M.T. "Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract e THC extract in patients with intractable cancer-related pain". *J. Pain. Symptom. Manage.*, 39: 168, **2010**.

KIM, H. Y.; LEE, J. M.; YOKOZAWA, T.; SAKATA, K. & LEE, S. "Protective activity of flavonoid and flavonoid glycosides against glucose-mediated protein damage". *Food Chem.*, 126: 892-895, **2011**.

KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J. & DE-EKNAMKUL W. "Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*". *Tetrahedron Lett.*, 49: 4067-4072, **2008**.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A. & KRUEGER, S. "The cathepsin family and their role in colorectal cancer." *Pathol. Res. Pract.*, 204: 491-500, **2008**.

LAMARÃO, R. C. & FIALHO, E. "Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal". *Rev. Nutr.*, 22: 257, **2009**.

LINDHORST, T. K. Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 3a ed. Editora WILEY-VCH. Weinheim. 2007. 317p.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S.; SILVA, ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, A. S. & FILHO, A. P. S. S. "Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae)". *Quím. Nova*, 31: 493-497, **2008**.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. & QUEIROZ, R. T. "Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunt". *Acta Bot. Bras.*, 21: 473-487, **2007**.

LUO, X.; PENG, J. & LI, Y. "Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids". *Eur. J. Pharmacol.*, 650: 2, **2011**.

MARQUES, E. F.; BUENO, M. A.; DUARTE, P. D.; SILVA, L. R. S. P.; MARTINELLI, A. M.; SANTOS, C. Y.; SEVERINO, R. P. BRÖMME, D.; VIEIRA, P. C. & CORRÊA, A. G. "Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potente inhibitors of cathepsins L and V". *Eur. J. Med. Chem.*, 54: 10, **2012**.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. "Flora vascular do Bioma Cerrado". IN: Cerrado: Ecologia e Flora. SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. & RIBEIRO, J. F. Brasília, Embrapa Cerrados, 2008. p. 156.

MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; KINGHORN, A. D. & PEZZUTO, J. M. "Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay." *Cancer Lett.*, 184: 13, **2002**.

MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. "Natural products: an evolving role in future drug discovery". *Eur. J. Med. Chem.*, 46: 4769-4807, **2011**.

MIURA, Y.; CHIBA, T.; MIURA, S.; TOMITA, I.; UMEGAKI, K.; IKEDA, M. & TOMITA, T. "Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans". *J. Nutr. Biochem.*, 11: 216, **2000**.

MMA/IBAMA – Programa de Monitoramento do desmatamento nos Biomas brasileiros por satélite, 2011.

<http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatoriofinal_cerrado_2010_final_72_1.pdf>. Acesso em: 15 de março 2014.

MOLYNEUX, R. J.; NASH, R. J. & ASANO, N. "The chemistry and biological activity of calystegines and related nortropane alkaloids". IN: Alkaloids: chemical & biological perspectives. Oxford, Pergamon, 2005. p. 303-343.

MONTANARI, C. A. & GAUDIO, A. C. "Estratégias e princípios do planejamento molecular de fármacos". IN: Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. MONTANARI, C. A. (Org.). 1ed. São Paulo, EDUSP, 2011. p. 292-311.

MOORE, J. M.; HAYS, P. A.; COOPER, D. A.; CASALE J. F. & LYDON, J. "1-hydroxytropacocaine: an abundant alkaloid of *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* and var. *truxillens*". *Phytochemistry*, 36: 357-360, **1994**.

MUSCHIETTI, L. V. & MARTINO, V. S. "Atividades biológicas dos flavonoides naturais". IN: Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. YUNES, R. A. & CECHINEL-FILHO, V. (Orgs.). Itajaí, Univale, 2012. p. 193-226.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. "Biodiversity hotspots for conservation priorities". *Nature*, 403: 853-858, **2000**.

NAIDU, P.V.S.; KINTHADA, P.M.M.S.; KALYANI, P.; MURALIDHAR, P. "Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anti cancer drugs". *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.*, 3: 25, **2012**.

NASCIMENTO C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. "Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*". *Phytochem. Lett.*, 5: 401-406, **2012**.

NAVARRO-NÚÑEZ, L.; LOZANO, M. L.; MARTÍNEZ, C.; VICENTE, V. & RIVERA, J. "Effect of quercetin on platelet spreading on collagen and fibrinogen and on multiple platelet kinases". *Fitoterapia*, 81: 76, **2010**.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010". *J. Nat. Prod.*, 75: 311-335, **2012**.

NIWA, Y.; SUZUKI, T.; DOHMAE, N.; UMEZAWA, K. & SIMIZU, S. "Determination of cathepsin V activity and intracellular trafficking by N-glycosylation". *FEBS Letters*, 586: 3601, **2012**.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; SENA-FILHO, J. G.; LUCENA, H. F. S.; ROMERO, M. A. V. & BARBOSA-FILHO, J. M. "Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data". *Chem. Biodivers.*, 7: 303, **2010**.

OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, A. G.; SANTOS, R. A.; CSIPAK, A. R.; OLIVATO, C.; SILVA, I. C.; FREITAS, M. B.; BASSI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S. & SOARES, C. P. "Ethanol extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells". *Mutagenesis*. 24: 501, **2009**.

PINTO, P. H. & CUDÓS, E. S. "Sincatequinas em el tratamiento de la infección genital por el virus del papiloma humano". *Piel (barc)*, 29: 204, **2014**.

PLOWMAN, T. & HENSOLD, N. "Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae)". *Brittonia*, 56: 1-53, **2004**.

RAHMAN, A. U.; KHATTAK, K. F.; NIGHAT, F.; SHABBIR, M.; HEMALAL, K. D.; & TILLEKERATNE, L. M. "Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*". *Phytochemistry*, 48: 377-383, **1998**.

RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M. X. & DAVID, J. P. "A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae)". *Phytochem Lett.*, 6: 232-235, **2013**.

RODAN, S. B. & DUONG, L. T. "Cathepsin K – A new molecular target of osteoporosis". *IBMS BoneKEy*, 5: 16, **2008**.

SAVI, L. A.; CAON, T.; OLIVEIRA, A. P.; SOBOTTKA, A. M.; WERNER, W.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M. & SIMÕES, C. M. O. "Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids." *Fitoterapia*, 81: 1142, **2010**.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. Ó. & CAVALHEIRO, A. J. "Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: Evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells". *Chem. Biodivers.*, 7: 210, **2010**.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J. & KUSTER, R. M. “Flavonoides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hil. (Euphorbiaceae)”. *Rev. Bras. Farmacog.*, 15: 324, **2005**.

SEVERINO, R. P. Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 248 p.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D. & VIEIRA, P. C. “Acridone alkaloids as potente inhibitors of cathepsin V”. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 1477 e 1479, **2011**.

SHARMA, S. K.; VIJ, A. S. & SHARMA, M. “Mechanisms and clinical uses of capsaicin”. *Eur. J. Pharmacol.*, 720: 56, **2013**.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5a ed. Editora da UFSC. Porto Alegre. 2003. 1102p.

SIMOTE, S. Y. Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos visando o controle de formigas cortadeiras. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Tese de Doutorado, 232p.

TURK, V. & TURK, B. “Lysosomal cysteine proteases and their protein Inhibitors: recent developments”. *Acta Chim. Slov.*, 55: 727–738, **2008**.

VALENTOVÁ, K.; VRBA, J.; BANCÍŘOVÁ, M.; ULRICHOVÁ, J. & KŘEN, V. “Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolismo”. *Food Chem. Toxicol.*, 68: 267-282, **2014**.

VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; GARCEZ, F. R. “Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central-western region of Brazil”. *Braz. J. Microbiol.*, 1302-1308, **2012**.

WOLFROM, M. L. & THOMPSON, A. “Reduction with sodium borohydride”. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 2: 65, **1963a**.

WOLFROM, M. L. & THOMPSON, A. "Acetylation". *Meth. Carbohydr. Chem.*, 2: 211, **1963b**.

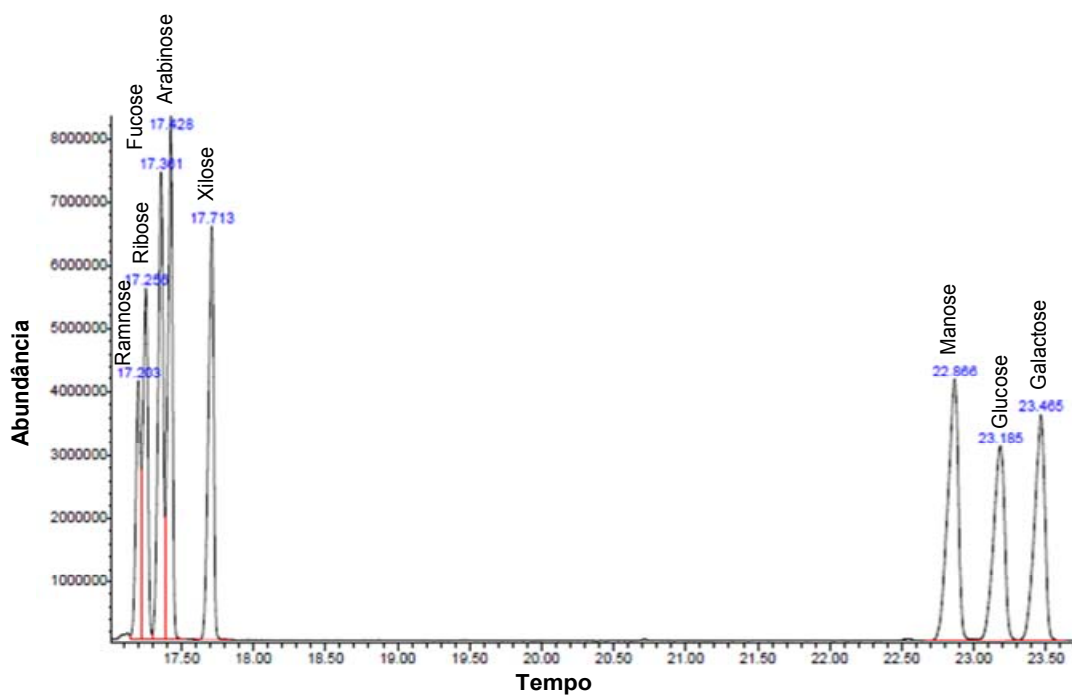
YASUDA, Y.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the desing of new therapeutics". *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 981, **2005**.

YASUKAWA, K. & TAKIDO, M. "A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*". *Phytochemistry*, 26: 1225, **1987**.

ZANGARINI, M.; CERIANI, L.; SALA, F.; MARANGON, E.; BAGNATI, R.; D'INCALCI, M.; GROSSO, F. & ZUCCHETTI, M. "Quantification of trabectedin in human plasma: validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method and its application in a clinical pharmacokinetic study". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 95: 107, **2014**.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V. LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. & HENRIQUES, A. T. "Alkaloids of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) species from Southern Brazil". *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 819-825, **2001**.

APÊNDICE 1 – Cromatograma obtido por CG-EM do padrão dos acetatos de alditóis.



APÊNDICE 2 – Espectro de massas padrão da galactose (A), glucose (B) e raminose (C).

