

**Cíntia Alves de Matos Silva**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
BIOLÓGICO DE *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.)  
Baehni (Sapotaceae)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Universidade de Brasília  
Brasília  
2007**

**Cíntia Alves de Matos Silva**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E  
BIOLÓGICO DE *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.)  
Baehni (Sapotaceae)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.**

**Universidade de Brasília  
Brasília  
2007**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Termo de Aprovação**

**“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)”**

**Cíntia Alves de Matos Silva**

Dissertação aprovada pelos membros da Banca Examinadora constituída pelos professores:

---

**Dra. Dâmaris Silveira (Orientadora)**  
**Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília**

---

**Dra. Maria Lucília dos Santos**  
**Instituto de Química da Universidade de Brasília**

---

**Dr. Carlos Frederico de Souza Castro**  
**Curso de Química da Universidade Católica de Brasília**

---

**Dra. Inês Sabioni Resck**  
**Instituto de Química da Universidade de Brasília**

**Brasília, 05 de junho de 2007**

O trabalho descrito nesta dissertação  
foi realizado sob orientação da Professora  
Dâmaris Silveira.

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu noivo por tudo o que eles representam na minha vida.

É preciso reviver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar.  
É necessário abrir os olhos e perceber  
que as coisas boas estão dentro de nós:  
onde os sentimentos não precisam de motivos,  
nem os desejos de razão.  
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração.

(Gabriel Garcia Márquez)

## AGRADECIMENTOS

Foram longos momentos de desafios e provações, porém momentos de intenso aprendizado e de prazer. Pude compartilhar esses momentos com várias pessoas e para algumas delas apresento meus agradecimentos e carinho:

Aos meus pais Antônio Alves da Silva e Madalena Alves de Matos Silva, por todo amor, por todos ensinamentos, por toda dedicação, por estarem comigo sempre, por serem a minha base e minha força em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Hugo e Igor pelos momentos de alegria, compreensão, apoio e por todos os momentos que foram compartilhados em família.

Meu agradecimento e respeito à Professora Dâmaris Silveira, pela excelente orientação e por todos os momentos de aprendizado que passamos juntas.

Ao meu noivo Wendel Ribeiro, pelo seu companheirismo, por sua amizade intensa e verdadeira, por todos os momentos, difíceis ou não, em que passamos juntos durante esse desafio e por tudo o que ele representa na minha vida.

Aos meus eternos amigos Karine Figueiredo e Jonatas Gomes, que nunca mediram esforços para me ajudar, me acolher e me ouvir. Por tudo o que vivemos juntos desde a graduação até hoje, amigos verdadeiros que quero pra sempre em minha vida.

Ao meu grande amigo e Professor Carlos Frederico de Souza Castro, que me ajudou a dar o primeiro passo para que esse sonho virasse realidade. Pela amizade e compreensão, por seus ensinamentos e por todos os momentos que eu precisei e que ele sempre me ajudou.

Aos meus amigos que conquistei nessa caminhada: Andressa, Anelise, Letícia, Cecília, Jaqueline, Rilva, Júlia, Cristina Simeoni, Tatiane e todos os outros que conheci durante esse estágio da minha vida e que me deram apoio e alegria.

À minha amiga Marta Soares que foi o meu apoio psicológico nesse momento tão importante da minha vida.

Aos professores da pós-graduação: Luiz Simeoni, Inês Resck, Maria Lucilia Santos e Damaris Silveira por todo apoio, amizade e dedicação.

Aos funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, com destaque para Carlos Antônio Ribeiro (técnico de laboratório) que em diversos momentos me socorreu em meus experimentos e para Edigrês Alves (Secretária da Pós-graduação) pela constante ajuda administrativa.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ismael e Ivelone por vários momentos que passamos juntos e que compartilhamos aprendizados e experiências.

E principalmente a Deus, por me capacitar, me dar forças, ser o meu refúgio, por me dar saúde, pela minha família e por ter me possibilitado conhecer pessoas tão incríveis que estarão pra sempre em meu coração.

Muito Obrigado a todos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- ❖ Aos meus pais por tudo o que representam na minha vida, à minha família e ao meu noivo.
- ❖ À Universidade de Brasília (UnB).
- ❖ À Faculdade de Ciências da Saúde e à Coordenação da Pós-graduação.
- ❖ Ao CNPq, FINEP, FINATEC e CAPES pelo suporte financeiro.
- ❖ À professora Maria Lucília dos Santos, Instituto de Química (UnB), cuja orientação foi essencial para a conclusão deste trabalho.
- ❖ À professora Inês Sabioni Resck, Instituto de Química, pelas análises espectrométricas.
- ❖ Aos Professores Carlos Frederico, Luiz Kanzaki, Luiz Simeoni e aos colegas, Ana Lúcia, Amabel pelos ensaios biológicos.
- ❖ À Cláudia pelas análises de espectrometria de massas.
- ❖ Ao professor José Elias de Paula, Instituto de biologia, pela coleta e identificação da espécie.
- ❖ Aos alunos de PIBIC e estágio: Ricardo de Oliveira, Viviane Lima, Sofia Feres, Carolina Perdigão, Juliana Camilo e Stephanie que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho.
- ❖ Aos Professores Luiz Alberto Simeoni e Francisco de Assis da Rocha Neves, do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL/UnB), por permitir a utilização do laboratório.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FLUXOGRAMA</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.2 Constituintes químicos e atividades biológicas do gênero <i>Pouteria</i>	10
1.3 Compostos isoprênicos de esqueleto C <sub>30</sub> e seus derivados: ocorrência e atividade biológica	17
<b>RELEVÂNCIA E OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>2.1 MÉTODOS GERAIS</b>	<b>31</b>
<b>2.1.1 Cromatografia em Camada Delgada</b>	<b>31</b>
2.1.1.1 Fase estacionária	31
2.1.1.2 Eluentes	31
2.1.1.3 Reveladores	31
<b>2.1.2 Cromatografia em Coluna</b>	<b>33</b>
2.1.2.1 Cromatografia líquida	33
<b>2.1.2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas</b>	<b>33</b>
<b>2.1.3 Análises Espectrométricas</b>	<b>34</b>
2.1.3.1 Espectrometria no Infravermelho	34
2.1.3.2 Ressonância Magnética Nuclear	34
<b>2.1.4 – Testes biológicos</b>	<b>34</b>
<b>2.1.4.1 Toxicidade em larvas de <i>Artemia salina</i></b>	<b>34</b>
<b>2.1.4.2 Atividade fotoprotetora</b>	<b>35</b>
<b>2.1.4.3 Atividade Antioxidante</b>	<b>35</b>
2.1.4.3.1 Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio	35
2.1.4.3.2 Atividade sequestradora do radical DPPH	36
<b>2.1.4.4 Atividade antimicrobiana</b>	<b>37</b>

<b>2.1.4.4.1 Atividade antibacteriana</b>	<b>37</b>
2.1.4.4.1.1 Método de difusão em ágar	37
<b>2.1.4.4.2 Atividade antifúngica</b>	<b>38</b>
2.1.4.4.2.1 Método de difusão em ágar	38
<b>2.1.4.5 Teste de inibição de proliferação celular</b>	<b>39</b>
2.1.4.5.1 Ensaio de proliferação celular MTT	39
<b>2.2 PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
<b>2.2.1 Descrição botânica</b>	<b>41</b>
<b>2.2.2 Obtenção do material botânico</b>	<b>41</b>
<b>2.2.3 Obtenção dos extratos brutos</b>	<b>41</b>
2.2.3.1 Extrato hexânico (EH) e extrato etanólico (EE)	41
2.2.3.2 Extrato aquoso (EA)	41
<b>2.2.4 Isolamento e identificação de constituintes químicos das folhas de <i>Pouteria gardnerii</i></b>	<b>43</b>
<b>2.2.4.1 Fitoquímica do extrato hexânico de <i>Pouteria gardnerii</i> (EH)</b>	<b>43</b>
2.2.4.1.1 Elaboração da fração hexânica EHH	43
2.2.4.1.1.1 Estudo farmacognóstico da fração hexânica EHH	44
2.2.4.1.2 Elaboração da fração Hexano: AcOEt 1:1 (EHHA)	45
2.2.4.1.2.1 Estudo farmacognóstico da fração Hex: AcOEt (1:1) EHHA	46
<b>2.2.4.2 Fitoquímica do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>P. gardnerii</i></b>	<b>47</b>
2.2.4.2.1 Elaboração da fração Hex: AcOEt 1:1EEHA	48
2.2.4.2.1.1 Estudo farmacognóstico da fração EEHA	49
2.2.4.2.2. Partição trifásica do extrato etanólico (EE) de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	49
2.2.4.2.2.1 Elaboração da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (ETMC): Primeira Coluna	50
2.2.4.2.2.2 Elaboração da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (ETMC) : Segunda Coluna	51
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Identificação de substâncias presentes no extrato hexânico</b>	<b>54</b>
3.1.1 Mistura de hidrocarbonetos (PG01)	54
3.1.2 Mistura de triterpenos e ésteres graxos (PG02)	57
3.1.2.1 Análise do CG-EM no tempo de retenção 48,89 min	61
3.1.2.2 Análise do CG-EM no tempo de retenção 49,19 min	62
3.1.2.3 Análise do CG-EM no tempo de retenção 50,26 min	63
3.1.2.4 Análise do CG-EM no tempo de retenção 49,36 min	66

3.1.2.5 Análise do CG-EM no tempo de retenção 50,45 min e 52,77 min	67
<b>3.2 Identificação de substâncias presentes no extrato etanólico</b>	<b>75</b>
3.2.1 Mistura de ésteres de cadeia longa (PG3)	79
3.2.2 acetato de $\alpha$ -amirina (PG4)	78
3.2.3 Mistura de álcoois de cadeia longa (PG5)	78
3.2.4 Mistura de triterpenos (PG6)	80
<b>CAPÍTULO 4: ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TRITERPENOS PRESENTES NAS FOLHAS DE <i>Pouteria gardnerii</i></b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 5: ENSAIOS BIOLÓGICOS</b>	<b>106</b>
<b>5 Avaliação da atividade biológica de <i>Pouteria gardnerii</i></b>	<b>107</b>
<b>5.1 Atividade citotóxica</b>	<b>107</b>
5.1.1 Modelo da toxicidade em larvas de <i>Artemia salina</i>	107
5.1.2. Teste de inibição de proliferação celular	109
<b>5.2 Atividade fotoprotetora</b>	<b>111</b>
<b>5.3 Atividade Antioxidante</b>	<b>113</b>
5.3.1 Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio	114
5.3.2 Método do seqüestro do radical livre DPPH	115
<b>5.4 Atividade antimicrobiana</b>	<b>116</b>
5.4.1 Método do disco	116
5.4.1.1 Atividade antibacteriana	117
5.4.1.2 Atividade antifúngica	118
<b>CAPÍTULO 6: DADOS ESPECTROMÉTRICOS</b>	<b>119</b>
6.1 Mistura de hidrocarbonetos (PG1)	120
6.2 Mistura de triterpenos: $\alpha$ -e $\beta$ -amirina, acetatos de $\alpha$ -amirina e lupeíla (PG2)	120
6.3 Mistura de ésteres de cadeia longa (PG3)	121
6.4 Acetato de $\alpha$ -amirina (PG4)	122
6.5 Mistura de álcoois de cadeia longa (PG5)	122
6.6 Mistura de triterpenos: ácido ursólico e ácido oleanólico (PG6)	122
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>161</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1:</b> Esquema da rota biossintética para formação dos terpenóides	18
<b>FIGURA 1.2:</b> Formação do esqualeno por meio do acoplamento cauda-cauda de duas unidades de pirofosfato de farnesila	19
<b>FIGURA 1.3:</b> Esquema da ciclização do esqualeno	21
<b>FIGURA 1.4:</b> Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno e alguns exemplos de triterpenos e saponinas de plantas	23
<b>FIGURA 1.5:</b> Exemplo de ciclização do cátion damarenil para a formação de alguns triterpenos pentacíclicos	24
<b>FIGURA 1.6:</b> Exemplo de ciclização do cátion protosteril para a formação de alguns triterpenos pentacíclicos	24
<b>FIGURA 1.7:</b> Exemplo de ciclização do esqualeno e do óxido de esqualeno pela enzima tetraimanolsintase	25
<b>FIGURA 1.8:</b> <i>Pouteria gardnerii</i> (Mart. & Miq.) Baehni.	27
<b>FIGURA 3.1:</b> Espectro na região do Infravermelho de PG1 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	55
<b>FIGURA 3.2:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG1 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	55
<b>FIGURA 3.3:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG1 – Expansão da região entre $\delta 0,5$ - $\delta 1,0$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	56
<b>FIGURA 3.4:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PG1 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	56
<b>FIGURA 3.5:</b> Espectro na região do Infravermelho de PG2 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	57
<b>FIGURA 3.6:</b> Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de PG02 (IE, 70 eV).	60
<b>FIGURA 3.7:</b> Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=48,89\text{min.}$	61
<b>FIGURA 3.8:</b> Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=49,19\text{min.}$	62
<b>FIGURA 3.9:</b> Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=50,26\text{min.}$	63
<b>FIGURA 3.10:</b> Comparação entre os espectros de massas dos derivados de ursanos e devivados de oleanos.	64
<b>FIGURA 3.11:</b> Fragmentação característica de triterpenos pentacíclicos com dupla ligação na posição C12, via Retro-Diels-Alder (RDA)	65
<b>FIGURA 3.12:</b> Proposta de fragmentação de $\alpha$ -amirina (série ursano) por mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)	65
<b>FIGURA 3.13:</b> Proposta de fragmentação de $\beta$ -amirina (série oleano) por	

mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)	66
<b>FIGURA 3.14:</b> Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=49,36\text{min}$	67
<b>FIGURA 3.15:</b> Proposta de fragmentação do germanicol (série oleano) por mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)	67
<b>FIGURA 3.15:</b> Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=50,26\text{min}$	68
<b>FIGURA 3.16:</b> Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=50,45\text{min}$	68
<b>FIGURA 3.17:</b> Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao $T_R=52,77\text{min}$ .	68
<b>FIGURA 3.18:</b> Proposta de fragmentação de acetato de lupeíla (série lupano) por mecanismo envolvendo clivagem sigma e rearranjos	69
<b>FIGURA 3.19:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG2 – Expansão da região entre $\delta 4,0-$ $\delta 5,5$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	71
<b>FIGURA 3.20:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG2 – Expansão da região entre $\delta 0,8-$ $\delta 2,4$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	71
<b>FIGURA 3.21:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PG2 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	72
<b>FIGURA 3.22:</b> Espectro na região do Infravermelho de PG3 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	76
<b>FIGURA 3.23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG3 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ )	76
<b>FIGURA 3.24:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG3 - Expansão da região entre $\delta 1,0 - \delta 4,5$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ )	77
<b>FIGURA 3.25:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de PG3 ( 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	77
<b>FIGURA 3.26.:</b> Espectro na região do Infravermelho de PG5. (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	78
<b>FIGURA 3.27:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG5 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	79
<b>FIGURA 3.28:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ de PG5 ( 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	80
<b>FIGURA 3.29:</b> Espectro na região do Infravermelho de PG6 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	81
<b>FIGURA 3.30:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG6 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	82
<b>FIGURA 3.31:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de PG6 - Expansão da região entre $\delta 2,4 - \delta 5,6$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	82
<b>FIGURA 3.32:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ de PG6 ( 75MHz, $\text{CDCl}_3$ )	83
<b>FIGURA 5.1:</b> Efeito dos extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i> células CALU	109
<b>FIGURA 5.2:</b> Efeito dos extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i> em células A427	110
<b>FIGURA 5.3:</b> Absorbância média na faixa de 290-320 nm (UVB) de PABA em diferentes concentrações	112

**FIGURA 5.4:** Comparação entre a absorbância, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. gardinerii* e PABA

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 2.1:</b> Frações obtidas na elaboração da fração hexânica (EHH) do extrato hexânico (EH) das folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	44
<b>TABELA 2.2:</b> Estudo farmacognóstico da fração hexânica (EHH).	44
<b>TABELA 2.3:</b> Frações obtidas na elaboração da fração Hex:AcOEt (EHHA) do extrato hexânico (EH) das folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	46
<b>TABELA 2.4:</b> Estudo farmacognóstico da fração Hex:ACOEt (EHHA)	47
<b>TABELA 2.5:</b> Frações obtidas na elaboração da fração Hex:AcOEt (EEHA) do extrato etanólico (EE) das folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	48
<b>TABELA 2.6:</b> Estudo farmacognóstico da fração Hex:AcOEt (EEHA)	49
<b>TABELA 2.7:</b> Frações obtidas na elaboração da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (ETMC1) do extrato etanólico (EE) das folhas <i>Pouteria gardnerii</i>	51
<b>TABELA 2.8:</b> Frações obtidas na elaboração da fração MeCN:CHCl <sub>3</sub> (ETMC2) do extrato etanólico (EE) das folhas <i>Pouteria gardnerii</i>	52
<b>TABELA 3.1:</b> Dados da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de PG2	59
<b>TABELA 3.2:</b> Fragmentações mais relevantes em alguns triterpenos.	69
<b>TABELA 3.3:</b> Atribuição dos deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) dos carbonos de PG2, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) (SOLICHIN, 1980; MAHATO & KUNDU, 1994).	73
<b>TABELA 3.4:</b> Atribuição dos deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) dos carbonos de PG2, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz)	74
<b>TABELA 3.5:</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz) dos carbonos de PG6, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl <sub>3</sub> , 75MHz)	84
<b>TABELA 4.1:</b> Espécies vegetais dos quais os triterpenos $\alpha$ - e $\beta$ - amirina, acetato de lupeíla, ácidos ursólico e oleanólico foram isolados	99
<b>TABELA 5.1</b> Avaliação citotóxica frente às larvas de <i>Artemia salina</i> .	108

<b>TABELA 5.2</b> Atividade Antioxidante, pelo método de varredura pelo peróxido de hidrogênio, dos extratos etanólico e aquoso de <i>Pouteria gardnerii</i> .	115
<b>TABELA 5.3</b> Atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical livre DPPH de extratos brutos de <i>Pouteria gardnerii</i>	116
<b>TABELA 5.4:</b> Atividade antibacteriana de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	117

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>FLUXOGRAMA 2.1:</b> Obtenção do extrato hexânico (EH) e etanólico (EE) de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	42
<b>FLUXOGRAMA 2.2:</b> Obtenção do extrato aquoso bruto (EA) de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	42
<b>FLUXOGRAMA 2.3:</b> Fracionamento do extrato hexânico bruto (EH) das folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	43
<b>FLUXOGRAMA 2.4:</b> Fracionamento do extrato etanólico bruto (EE) de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	47
<b>FLUXOGRAMA 2.5:</b> Partição trifásica do extrato etanólico bruto (EE) de folhas de <i>Pouteria gardnerii</i>	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

<b>AAS</b>	Ácido acetil salicílico
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APT</b>	Approach Proton Test
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BHT</b>	Butil hidroxi toluento
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCP</b>	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração Efetiva Mediana
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal Mediana
<b>cm</b>	Centímetro
<b><i>d</i></b>	duplete
<b><i>dd</i></b>	duplete duplo
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose mínima letal para 50% dos indivíduos
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOU</b>	Diário Oficial da União
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilidrazila
<b>EA</b>	Extrato aquoso
<b>EE</b>	Extrato Etanólico
<b>EEA</b>	Fração acetato de etila do extrato etanólico
<b>EEAM</b>	Fração acetato de etilametanol (11) do extrato etanólico
<b>EEH</b>	Fração hexânica do extrato etanólico
<b>EEHA</b>	Fração hexanoacetato de etila (11) do extrato etanólico
<b>EEM</b>	Fração metanólica do extrato etanólico
<b>EH</b>	Extrato Hexânico
<b>EHA</b>	Fração acetato de etila do extrato hexânico
<b>EHAM</b>	Fração acetato de etilametanol (11) do extrato hexânico
<b>EHH</b>	Fração hexânica do extrato hexânico

<b>EHHA</b>	Fração hexanoacetato de etila (11) do extrato hexânico
<b>EHM</b>	Fração metanólica do extrato hexânico
<b>ER</b>	Estrogen receptor (Receptor de estrogênio)
<b>ERO</b>	Espécie Reativa de Oxigênio
<b>ETMC</b>	Fração acetonitrilaclorofórmio do extrato etanólico
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>eV</b>	eletronVolt
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FE</b>	Fase estacionária
<b>FM</b>	Fase Móvel
<b>Glc</b>	Glicose
<b>Hex</b>	Hexano
<b>HFA</b>	Hospital das Forças Armadas
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency vírus
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IE</b>	Impacto eletrônico
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>J</b>	Constante de acoplamento de <sup>1</sup> H
<b>m/z</b>	relação massa/carga
<b>MeCN</b>	Acetonitrila
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	MegaHertz
<b>min.</b>	minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>MTT</b>	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NSCLC</b>	Non-small cell lung câncer/ Células de Câncer não Pequenas

<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>ODC</b>	Ornitinadecarboxilase
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P&amp;D</b>	Pesquisa e Desenvolvimento
<b>PABA</b>	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PGC</b>	<i>Pouteria gardnerii</i>
<b>PN</b>	Produtos Naturais
<b>p.o</b>	<i>per oral</i>
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>QPN</b>	Química de Produtos Naturais
<b>RDA</b>	Retro-Diels-Alder
<b>RDC</b>	Resolução de Diretoria Colegiada
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>s</b>	Simpleto
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>t<sub>R</sub></b>	Tempo de retenção
<b>UANL</b>	Universidad Autonoma de Nueva Leon
<b>UCDB</b>	Universidade Católica Dom Bosco
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de Colônias
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δ</b>	Deslocamento químico
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>TPA</b>	Tetradecanoilforbol
<b>µg</b>	Micrograma

## RESUMO

A presente dissertação descreve o estudo químico e a atividade biológica das folhas de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni, espécie pertencente à família Sapotaceae, comum no bioma do Cerrado do Distrito Federal e conhecida popularmente como frutinha-de-veado, cabritão, sapotinha, leiteiro-da-folha-miúda, aguai-guacú ou marmelinho.

Do extrato hexânico foram obtidos uma mistura de hidrocarbonetos e uma mistura de  $\alpha$ -e  $\beta$ -amirina, acetatos de  $\alpha$ -amirina e de lupeíla. Do extrato etanólico foram obtidos: uma mistura de ésteres de cadeia longa, acetato de  $\alpha$ -amirina, mistura de álcoois de cadeia longa e uma mistura dos ácidos ursólico e oleanólico.

Os extratos e frações de *P. gardnerii* foram submetidos a ensaios para avaliar sua atividade biológica. Em teste de citotoxicidade, utilizando como modelo a toxicidade às larvas de *Artemia salina*, o extrato aquoso ( $DL_{50} = 491,64$  ppm), a fração acetato de etila do extrato hexânico ( $DL_{50} = 528,28$  ppm) e a fração Hex:AcOEt (1:1) do extrato etanólico ( $DL_{50} = 320,48$  ppm) apresentaram atividade. Esse resultado foi corroborado por ensaio, no qual os extratos etanólico e aquoso inibiram a atividade mitocondrial das células de câncer pulmonar não pequenas (NSCLC) da linhagem CALU (2 mg/mL). O extrato etanólico também diminuiu a viabilidade celular de outra linhagem, a A427.

No teste da atividade fotoprotetora, o extrato etanólico apresentou absorção da radiação ultravioleta na faixa de UVB e UVA, nas concentrações de 50 mg/mL, 150 mg/mL e 300 mg/mL sendo esta última sendo mais evidenciada.

No teste da atividade antioxidante pelo método de varredura do peróxido de hidrogênio, o extrato etanólico ( $CE_{50} = 44,88$   $\mu$ g/mL) e o extrato aquoso ( $CE_{50} = 28,39$   $\mu$ g/mL) apresentaram uma atividade antioxidante superior àquela apresentada pelo controle positivo (ácido ascórbico,  $CE_{50} = 84,87$   $\mu$ g/mL).

Por fim, no teste de atividade antibacteriana, utilizando a técnica das microdiluições, o extrato aquoso apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*.

É a primeira vez que essa espécie é investigada quanto à sua composição química e sua atividade biológica. E é o primeiro relato da presença de ácido oleanólico no gênero *Pouteria*.

**Palavras-chave:** *Pouteria gardnerii*; plantas medicinais; Cerrado; triterpenos

## ABSTRACT

The present dissertation describes the chemical study and the biological activities of leaves of *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni, Sapotaceae, usually found at biome Cerrado around Distrito Federal and popularly called frutinha-de-veado, cabritão, sapotinha, leiteiro-da-folha-miúda, aguai-guacú or marmelinho.

From the hexane crude extract were isolated mixtures of hydrocarbons and a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin,  $\alpha$ -amyrin acetate and lupeol acetate. From the ethanol crude extract were obtained a mixture of fatty esters,  $\alpha$ -amyrin acetate, mixture of alcohols, as well as a mixture of ursolic and oleanolic acids.

Extracts and fractions of *P. gardnerii* were evaluated for biological activities. Crude aqueous extract and fractions of ethanol extract presented cytotoxicity on BST model. This result was corroborated by another assay in which the ethanol and aqueous extract inhibited the mitochondrial activity of non-small cell lung cancer (NSCLC) of the CALU (2mg/mL) cell lines. The ethanol extract also diminished the cell viability of another cell lines, A427.

On a model assay to evaluate photo protection activity, the ethanol extract showed dose dependent absorption of the ultraviolet radiation in the UVB and UVA range with 50 mg/mL, 150 mg/mL and 300 mg/mL concentrations, respectively. In addition, ethanol extract as well as aqueous extract were able to scavenging hydrogen peroxide free radicals in a higher degree than ascorbic acid.

Finally, the ethanol extract from leaves of *P. gardnerii* presented activity against *Staphylococcus aureus*.

As far we know it is the first time that the chemistry and biological activity of *Pouteria gardnerii* are investigated. In addition, it is the first report about the occurrence of oleanolic acid in the *Pouteria* genus.

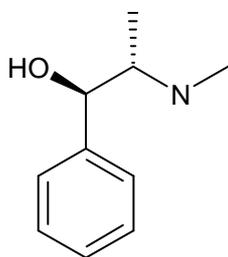
**Keywords:** *Pouteria gardnerii*; medicinal plants; Cerrado; triterpenes

## **CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

A evolução do homem, entre outras coisas, tem sido acompanhada por um valioso conhecimento sobre as plantas. Nos primórdios, as civilizações transmitiam aos seus descendentes um discernimento empírico que ia desde as plantas que podiam ser comestíveis até aquelas que apresentavam toxicidade ou mesmo um potencial curativo. Tal informação no início foi passada oralmente para as gerações posteriores e, depois com o surgimento da escrita, foi armazenada em papiros ou escrituras (CUNHA, 2007).

As evidências da utilização de plantas medicinais, tanto no Ocidente quanto no Oriente, remontam a cerca de 60.000 anos.



1

Um dos primeiros documentos escritos que se tem informação, refere-se à farmacopéia do imperador chinês Shen Nung. Escrita por volta dos anos 2730-3000 a.C, que descreve o uso medicinal de várias espécies tais como a efedra, (*Ephedra sinica* Stapf, ou Ma Huang, pela medicina chinesa), que tem como composto ativo o alcalóide efedrina (**I**) e é conhecida por promover perda de peso, aumentar energia, tratar problemas respiratórios e como antitussígeno. (BRIAN *et. al.*, 2003).

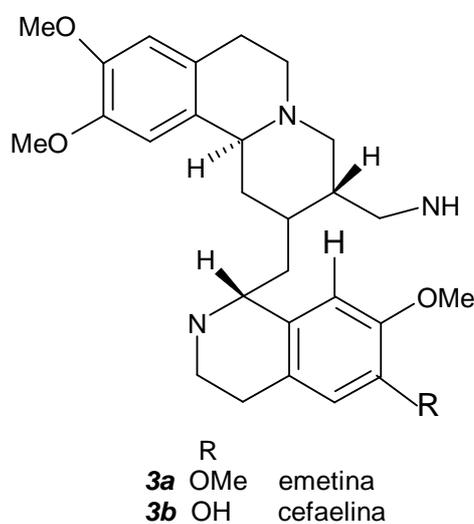
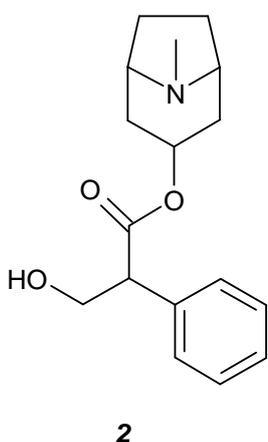
O papiro de Ebers, decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido e foi escrito em torno de 1500 a.C.. Parte de seu texto se destina a tratamento de doenças e indicações sobre os medicamentos a serem empregados para tal (GOSSEL-WILLIAMS *et al.*, 2006).

Uma das mais importantes contribuições para o conhecimento atual sobre medicina natural partiu de Hipócrates, que nasceu na ilha de Cós e viveu até a segunda metade do século V a.C. (RIBEIRO, 2003). Ele é considerado como “o pai da medicina”, graças às suas pesquisas e a uma vasta obra composta por 53 livros que foram reunidos em Alexandria por Baccheio no século III a.C., denominados *Corpus Hippocraticum*. Esta obra é considerada a mais clara e completa da antiguidade já que faz referência não só a plantas medicinais, mas, também as bases das ciências médicas em sua totalidade (DIAS, 2007).

Por volta de 1800, os químicos e os médicos que estudavam plantas medicinais, cujos recursos experimentais eram extremamente limitados, se dedicaram especialmente, a isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas

conhecidas e experimentadas pelo uso popular ao longo do tempo, e geralmente, incorporadas nas farmacopéias da época. (YUNES & CALIXTO, 2001).

Apesar disso, alguns fármacos potentes, foram descobertos e muitos deles ainda são usados na terapêutica atual. Apenas para citar alguns exemplos, pode ser mencionada a *Atropa belladonna* L., espécie conhecida desde o início do século XVI, mas acredita-se que seu uso com finalidades terapêuticas iniciou-se muito antes (YUNES & CALIXTO, 2001). Um dos seus constituintes ativos foi determinado como sendo o alcalóide atropina (**2**) isolado pela primeira vez por Mein em 1831. e seus efeitos foram estudados principalmente durante a segunda metade do século XIX (CANAES, 2006).



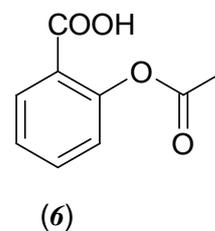
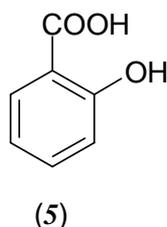
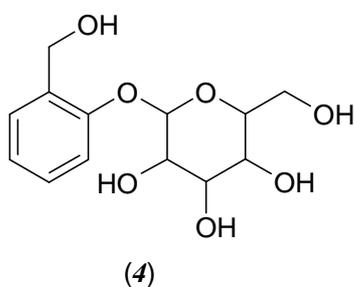
O *Hyoscyamus niger* L., conhecido popularmente como meimendro, já era utilizado pelos povos antigos. A espécie era empregada contra dores do trato gastrointestinal na antiga Babilônia e figura no papiro de Ebers. Foi utilizado na Inglaterra, na Idade Média e depois de um período de esquecimento, no século XVIII a espécie foi reintroduzida na *London Pharmacopéia*, de 1809 (SIMÕES *et al.*, 2000).

A *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard, descrita por G. Le Pois em sua obra *De Medicina Brasiliensis* em 1648, foi introduzida na Europa em 1672, sendo que desta espécie foram isolados os alcalóides emetina (**3a**) e cefaelina (**3b**) (YUNES & CALIXTO, 2001). A espécie é utilizada desde o século XVII como emético e expectorante (ATSUKO *et al.*, 1999).

Por fim, pode ser salientado o caso da *Salix alba* L., cujas cascas foram usadas durante milênios na Europa, Ásia e África para combater dor e febre, mas que somente em 1763 foi estudada cientificamente pelo reverendo E. Stone, da Inglaterra, que

publicou seu trabalho de observação clínica, mostrando o efeito analgésico das cascas dessa planta (YUNES & CALIXTO, 2001).

A substância ativa e bastante conhecida desta espécie é a salicilina (4) isolada pela primeira em 1829 pelo farmacêutico francês H. Leurox. Em 1838 o químico italiano Raffaele Piria obteve o ácido salicílico (5) semi-sintético, através da hidrólise oxidativa da salicilina e, posteriormente, Kolbe e Dresden em 1859, sintetizaram os salicilatos. E em 1897, incentivado pelo caso de seu pai que sofria de reumatismo crônico e não tolerava o efeito colateral dos salicilatos, o químico alemão Felix Hofman concluiu a síntese do ácido acetilsalicílico (AAS) (6), um composto de caráter menos ácido e que ainda hoje é o analgésico mais consumido e vendido no mundo (MENEGATTI *et al.*, 2001).



Assim, na busca por substâncias ativas em plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações oriundas da medicina popular. A seleção de espécies vegetais para pesquisa, baseada na alegação de um dado efeito terapêutico em humanos, pode se constituir num valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, já que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica humana, mesmo que posteriormente através das pesquisas essa atividade não seja comprovada (ELIZABETSKY, 2000).

Diversos registros da OMS (Organização Mundial de Saúde) revelam que, aproximadamente 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta com finalidade terapêutica. Dentro dessa porcentagem, no mínimo 30% dessas pessoas utilizam plantas medicinais por indicação médica (CAMPOS *et al.*, 2005).

A OMS estima que as vendas totais de ervas medicinais alcançaram a cifra de US\$ 400 milhões no Brasil em 2001 (SOYAMA, 2007). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de modelos ou diretamente de fontes naturais, sendo as plantas responsáveis por 25% desse total (CALIXTO, 2003; SOYAMA, 2007). Somente no período entre 1983 e 1994, dos 520

novos fármacos aprovados pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CRAGG *et al.*, 1997; SHU *et al.*, 1998). E ainda, quando se fala de câncer ou doenças infecciosas, entre 60% e 75% dos medicamentos disponíveis são de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003)

Porém muito ainda está para ser pesquisado. Das 365.000 espécies catalogadas, apenas 1.100 foram estudadas em suas propriedades medicinais (FERREIRA, 2006) e o Brasil, que possui cerca de 30% de toda a flora mundial conhecida, tem pouco mais que 1% dessas estudadas química e/ou farmacologicamente. (YUNES & CALIXTO, 2001).

O Brasil poderia contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos oriundos de espécies dos seus vários biomas. Porém, entre 2003 e 2004, por exemplo, foram desmatados 26.130 km<sup>2</sup> de floresta na Amazônia Brasileira, que hoje representa 5% do espaço terrestre da América Latina (AMAZÔNIA, 2007). Com isso, várias espécies desapareceram sem que o homem tenha sequer sido capaz de conhecer toda a sua magnificência, principalmente a relacionada às características medicinais.

Por outro lado, existem problemas que dificultam o aproveitamento de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos, como por exemplo, a grande complexidade das moléculas naturais isoladas, que às vezes dificulta sua utilização como modelo para síntese; o tempo necessário para a descoberta de moléculas líderes, que usualmente é longo; freqüentemente, moléculas já conhecidas de pouco interesse, são isoladas de fontes naturais; e, por fim, a relutância de muitos químicos, especialistas em síntese, em trabalhar com produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Além disso, no Brasil, as pesquisas com plantas ainda estão muito inseridas no contexto de Universidades e Institutos de Pesquisa. Mesmo assim, já existem vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios bioativos de plantas (MONTANARI & BOLJANI, 2001).

A pesquisa por novas entidades químicas bioativas pelos laboratórios de pesquisa industriais tem adotado novas técnicas, como o uso da química combinatória para se obter maior número de substâncias com atividades farmacológicas em um menor tempo. Essa técnica teve seu tempo áureo na indústria farmacêutica na década de 90 (MULLIN, 2007), quando foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente milhares de compostos, e alguns estimam que milhões, como uma forma de obtenção de novos fármacos.

A idéia de que a avaliação rápida de um grande número de candidatos a fármacos seria mais fácil e mais eficiente que o processo clássico e usualmente demorado de obtenção e teste de compostos um a um envolveu o investimento de grande capital e de recurso humano especializado. Entretanto, o uso da química combinatória mostrou-se desapontador, pois além da produção de uma grande quantidade de fragmentos sem qualquer utilidade, a constatação de que nem sempre tais compostos projetados eram compatíveis com sistemas biológicos levou a poucos resultados tangíveis (BORMAN, 2006).

Uma estratégia para busca de novos fármacos chamada “Diversity-oriented synthesis” – DOS – foi desenvolvida para tentar resolver o problema da biocompatibilidade. É uma técnica para criar um banco de compostos de estrutura semelhante a produtos naturais compartilhado entre diversos centros de pesquisa. Uma vez identificado o protótipo, este será “melhorado” e posteriormente submetido a ensaios clínicos (BORMAN, 2006).

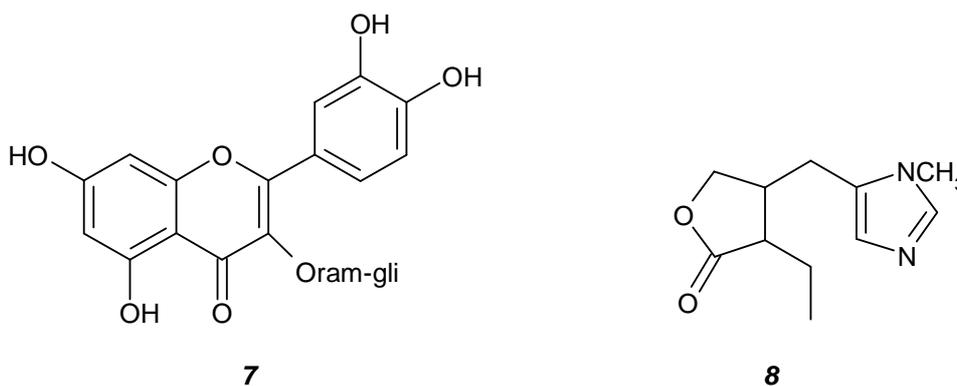
A introdução de novas tecnologias tornou a química medicinal mais ampla em sua concepção, ampliando seu caráter interdisciplinar (HILEMAN, 2006). Em uma visão moderna, a química medicinal dedica-se à compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzam em propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, portanto, representem um novo composto-protótipo, candidato efetivo a novo fármaco (VIEGAS *et al.*, 2006)

Assim, apesar dos avanços tecnológicos observados nesse período para a pesquisa de novas entidades químicas, a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não tem aumentado proporcionalmente. Efetivamente, a indústria farmacêutica que pesquisa novos fármacos afirma que o montante gasto em pesquisa e desenvolvimento no setor, em 2004, atingiu valores de 33 bilhões de dólares americanos, representando um crescimento real nos investimentos feitos, ano a ano, não correspondendo, entretanto, um aumento proporcional nas descobertas inovadoras. (VIEGAS *et al.*, 2006).

Define-se como fitofármaco a substância isolada de extratos de plantas (FERREIRA, 2006) como a rutina (7) extensamente encontrada na natureza e a pilocarpina (8), extraída das folhas do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius*), e utilizada para o tratamento do glaucoma (SIMÕES *et al.*, 2000). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por sua vez, define fitofármaco como “princípio ativo”, que

corresponde a uma substância ou grupo dessas, quimicamente caracterizadas, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do produto fitoterápico.

E o medicamento fitoterápico, também segundo a ANVISA, caracteriza-se pelo emprego exclusivo de matérias-primas vegetais ativas, cuja eficácia e riscos de seu uso sejam conhecidos, assim como a reprodutibilidade e constância de sua qualidade.



O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e é um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a botânica, a etnobotânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia até a tecnologia farmacêutica (TOLEDO *et al.*, 2003)

A pesquisa tem início no levantamento bibliográfico em literatura científica e catálogos internacionais nas áreas específicas do referido conhecimento, seguindo em paralelo a pesquisa etnobotânica, que pode ser definida como a disciplina que abrange do estudo e conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal – engloba a maneira como um grupo social classifica as plantas (MACIEL *et al.*, 2002).

Uma outra abordagem de seleção de uma espécie a ser utilizada como medicinal é a pesquisa quimiotaxonômica, onde o aspecto morfológico pode revelar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica (SHORT, 2007).

Por fim, a busca de novas espécies farmacologicamente úteis pode se dar de forma aleatória, onde amostras das espécies presentes em determinada área geográfica são coletadas e avaliadas química e biologicamente.

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes da planta, principalmente

de substâncias originárias do metabolismo secundário responsáveis, ou não, pela ação biológica (MACIEL *et al.*, 2002).

A avaliação da atividade biológica constitui a próxima etapa para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. Essa etapa inclui a avaliação farmacológica e toxicológica da substância isolada. O conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é requisito essencial para a transformação da planta medicinal em produto fitoterápico.

Vários fatores devem ser considerados por ocasião da seleção do modelo biológico adequado ao estudo de uma determinada planta. Alguns desses parâmetros devem ser analisados criteriosamente antes de fazer tal escolha, como por exemplo, a seletividade e a reprodutibilidade do teste; ou a quantidade de material vegetal disponível para a realização do estudo, que pode ser um fator limitante quando se trata de compostos puros (YUNES & CALIXTO, 2001). Por exemplo, para serem obtidos 50 mg de um composto puro, encontrado em um percentual de rendimento de 0,001 %, é necessária a utilização de 5 Kg de planta seca, em média; e para a obtenção de 1 Kg de planta seca são necessários até 10 Kg de planta fresca (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

Quanto aos testes biológicos, a escolha do modelo deve levar em consideração o alvo a ser atingido no estudo e as informações etnofarmacológicas (YUNES & CALIXTO, 2001).

Os testes clínicos constituem uma das últimas etapas antes da produção de um medicamento fitoterápico. Nessa etapa é verificada a validade da proposta de ação farmacológica em organismos humanos (ELIZABETSKY, 2000).

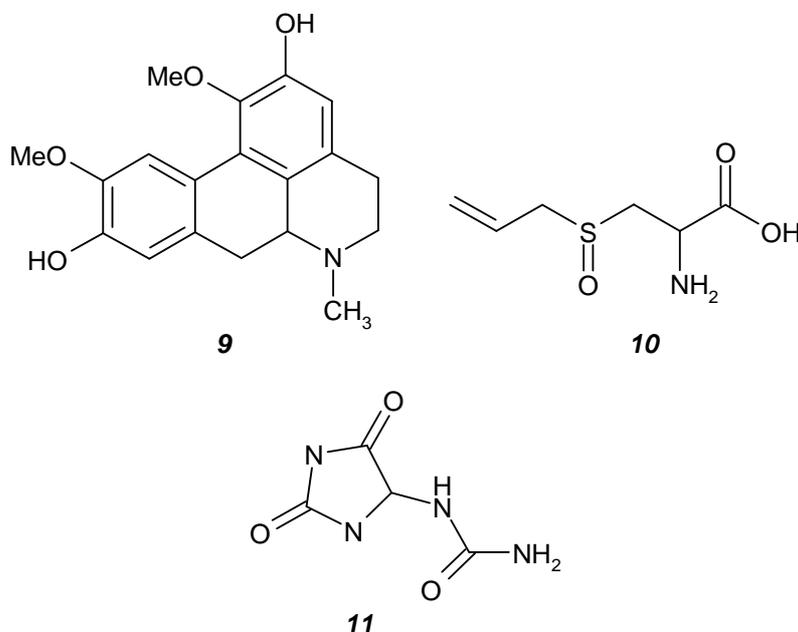
A ANVISA disponibiliza uma lista com 34 plantas para as quais são dispensáveis comprovações adicionais de eficácia e segurança, no ato de protocolo do registro do medicamento fitoterápico, devido à existência de dados clínicos e etnofarmacológicos satisfatórios que validam o emprego destas plantas (ANVISA, 2004).

Como exemplo, a espécie *Peumus boldus* Molina, conhecido popularmente como boldo, é usada no tratamento de distúrbios hepáticos e gastrointestinais. O princípio ativo responsável por essa ação farmacológica é a boldina (**9**) (FERREIRA, 2006).

O *Allium sativum* L., mais conhecido como alho e utilizado como tempero na culinária, tem como princípio ativo a aliína (**10**). Suas ações terapêuticas conhecidas

são, coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial leve, e prevenção da arteriosclerose (FERREIRA, 2006).

Como um último exemplo, pode ser citado o confrei (*Symphytum officinale* L.), cujo princípio ativo, a alantoína (**II**), é responsável pela conhecida ação cicatrizante da planta (FERREIRA, 2006).



Dessa forma, a busca de produtos naturais bioativos de origem vegetal ainda se constitui uma via interessante sob o ponto de vista científico, tecnológico e econômico.

A família Sapotaceae possui aproximadamente 75 gêneros e 800 espécies. Alguns gêneros conhecidos são: *Butyrospermum*, *Chrysophyllum*, *Madhuca*, *Manilkara*, *Mimusops*, *Pouteria* (*Lucuma*) e *Sideroxylon* (WATSON & DALLWITZ, 1992).

Poucas referências quanto às atividades farmacológicas ou aos metabólitos secundários do gênero *Pouteria* (Sapotaceae) são encontradas, apesar de várias espécies produzirem frutos comestíveis, como por exemplo, *P. caimito* (abiu), *P. macrocarpa* (cutito), *P. macrophyla* (caimo), *P. sapota* (sapota)

Uma classe de substâncias muito comum na família Sapotaceae são os triterpenos para os quais várias atividades biológicas são relatadas, tais como antiinflamatória, anti-helmíntica, antitumoral e estrogênica, inibição enzimática ( $\alpha$ -glicosidase, transcriptase reversa do HIV). Desta forma, considerando as atividades biológicas que espécies do gênero *Pouteria* presentes no bioma Cerrado podem apresentar, o estudo dessas espécies torna-se relevante para incremento do arsenal terapêutico.

*Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (FIGURA 1.8, página 27) foi selecionada a partir do projeto “Estudo químico e atividades biológicas de espécies do gênero *Pouteria*”, atualmente desenvolvido na Faculdade de Ciências da Saúde, por pesquisadores do grupo “Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos”. Essa espécie conhecida popularmente por frutinha-de-veado, cabritão, sapotinha, leiteiro-da-folha-miúda, aguai-guacú ou marmelinho (COÊLHO, 2006; MESQUITA *et al.*, 2005; CENTURION *et al.*, 1996). Relatos encontrados na literatura mostram que a espécie em questão, foi testada apenas contra as formas amastigota do *Trypanosoma cruzi* e contra as larvas de *Aedes aegypti*, porém não apresentou atividade (COÊLHO, 2006 e MESQUITA *et al.*, 2005). Entretanto, não foi encontrado relato quanto à sua composição micromolecular.

Como outras espécies do gênero apresentam atividades biológicas relevantes, torna-se interessante buscar informações sobre *P. gardnerii*.

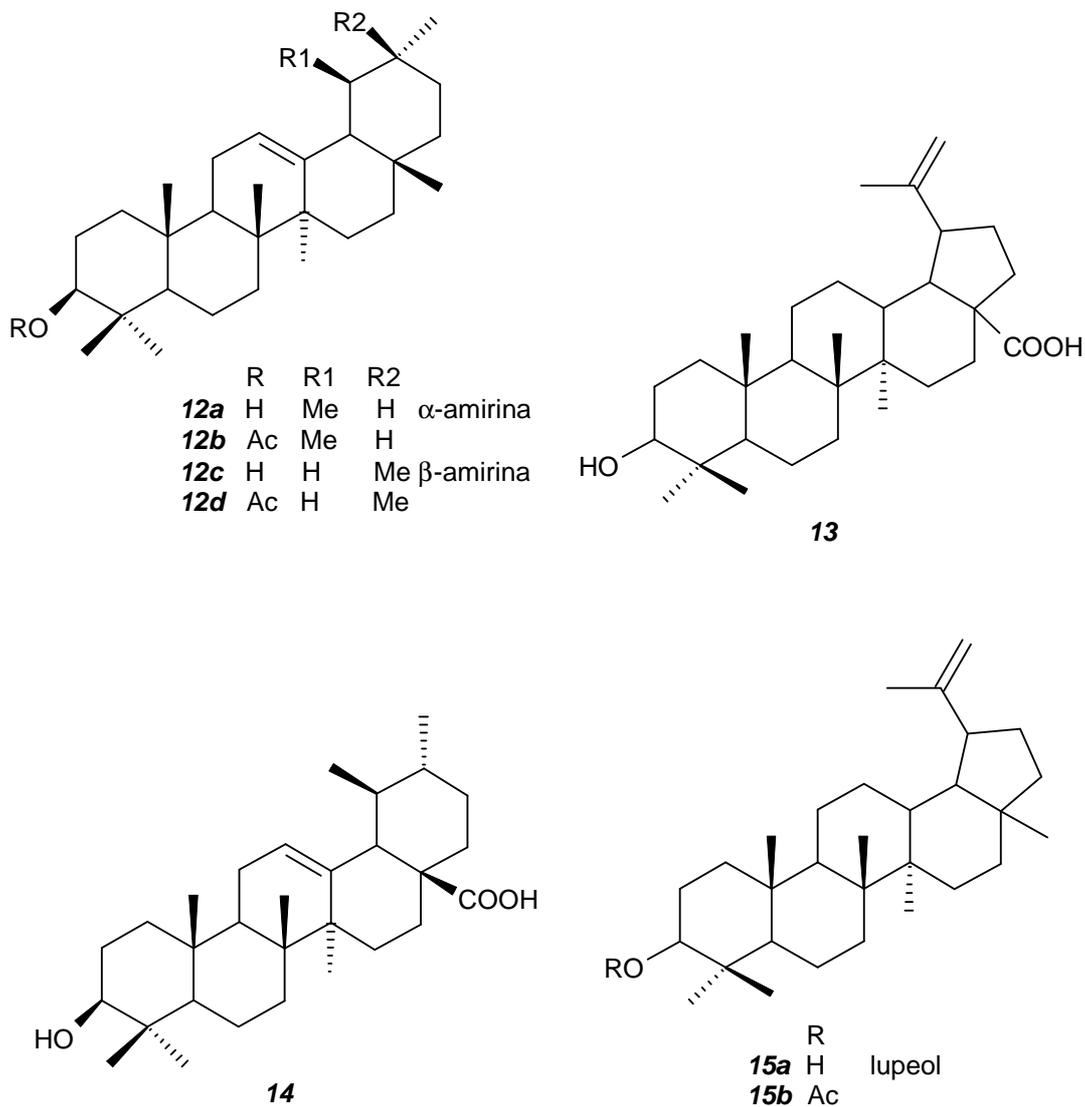
## 1.2 – Constituintes químicos e atividades biológicas do gênero *Pouteria*

No planalto central brasileiro encontra-se parte do bioma cerrado, considerado o segundo maior do Brasil, com uma flora vegetal estimada em, aproximadamente, sete mil espécies (VILA VERDE *et al.*, 2003). A utilização popular de plantas medicinais faz parte da tradição e costume das comunidades que vivem nessa região. No entanto, as plantas utilizadas na medicina popular pelos habitantes locais não têm ainda despertado de forma significativa, o interesse da comunidade científica, se comparadas com aquelas das demais regiões, o que pode ser observado a partir da falta de dados disponíveis sobre as características biológicas de plantas medicinais do Cerrado, que possibilitem a sua utilização sustentável (LOPEZ *et al.*, 2005).

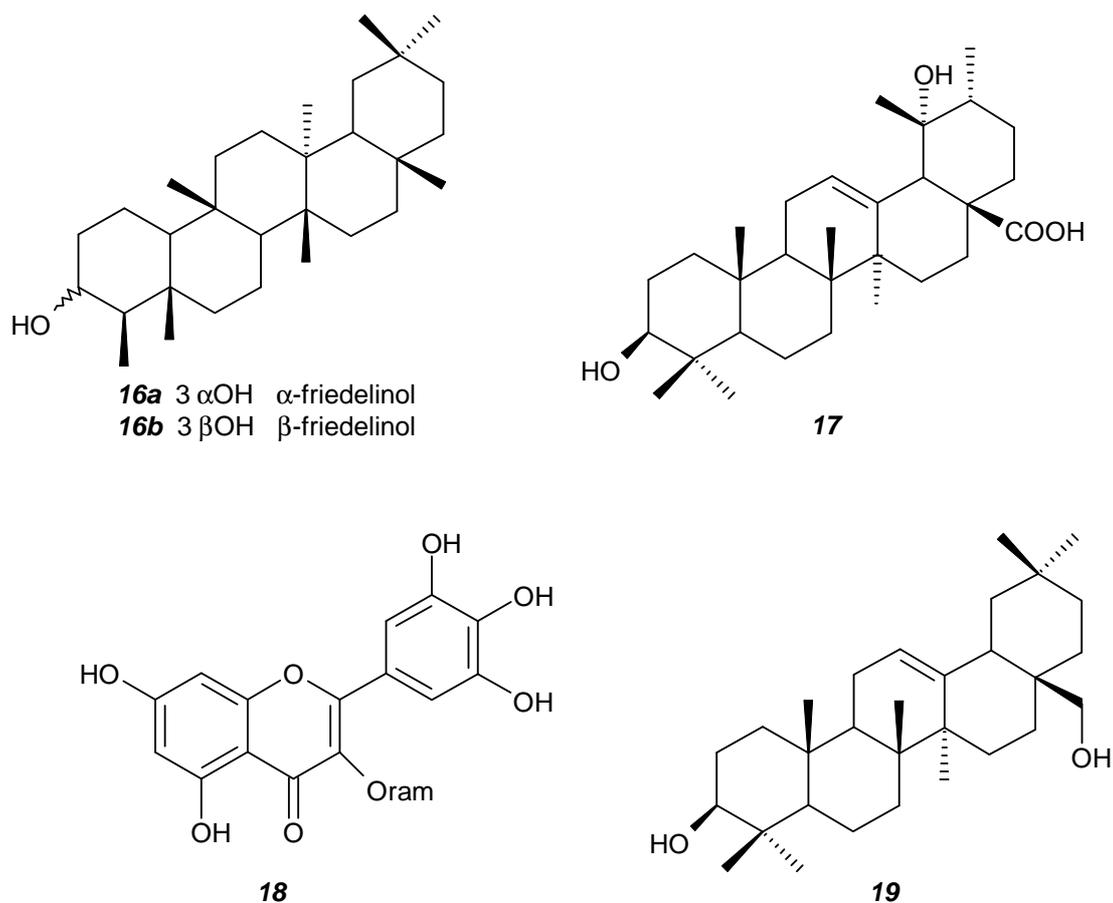
Espécies do gênero *Pouteria* – Sapotaceae, são encontradas nesse bioma e embora corresponda a 435 ou mais espécies, a informação quanto à fitoquímica e quanto à atividade biológica correspondentes a este táxon é relativamente limitada (CHE *et al.*, 1980).

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico das ramas de *P. torta* mostraram a presença de triterpenos como acetato de  $\alpha$ -amirina (**12b**), acetato de  $\beta$ -amirina (**12c**), ácido betulínico (**13**) e ácido ursólico (**14**) (CHE *et al.*, 1980). Dos extratos hexânico e diclorometilênico de flores e frutos foram isolados ácidos graxos,

poliisoprenóides, triglicerídeos, hidrocarbonetos normais e ramificados, esteróides e triterpenos penta- e tetracíclicos (DAVID, 1993).

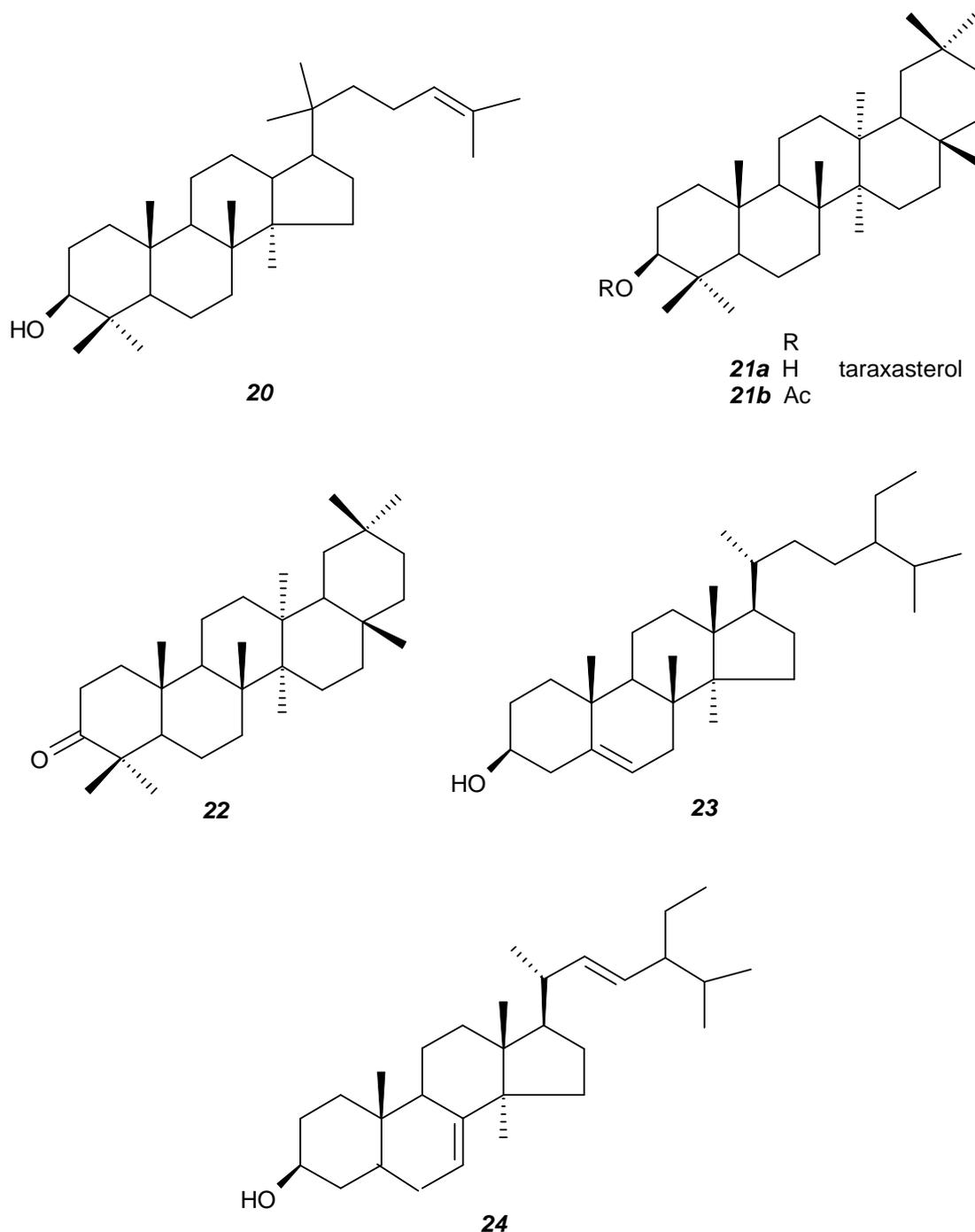


Ainda do extrato hexânico das folhas desta planta foram isolados hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa e acetato de lupeíla (**15b**), e da fração acetonitrila:clorofórmio, do extrato etanólico bruto, foram obtidas misturas de triterpenos contendo  $\alpha$ - e  $\beta$ -friedelinol (**16a** e **16b**) e  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (**12a** e **12c**), além do ácido 12,13-dihidropomólico (**17**) (LOPEZ *et al.*, 2005). E da fração aquosa do extrato etanólico desta planta foi obtido o flavonóide miricitrina (**18**) (SILVA *et al.*, 2006).



Pouterina, uma proteína semelhante à lecitina, foi extraída de sementes de *P. torta* e apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Apresentou ainda atividade inseticida contra larvas de *Callosobruchus maculatus* F., uma praga de grãos. Essa proteína também mostrou capacidade de aglutinação de eritrócitos humanos, de coelhos e de ratos (BOLETI *et al.*, 2007).

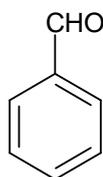
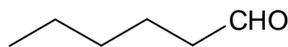
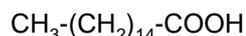
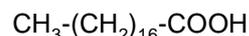
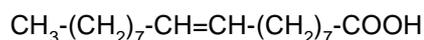
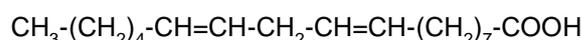
A pesquisa fitoquímica do extrato benzênico da fruta de *Pouteria caimito* revelou a presença de  $\alpha$ - amirina (**12a**), lupeol (**15a**), eritrodíol (**19**), e o damarendíol II (**20**); e das cascas, taraxerol (**21a**) e seu acetato (**21b**), taraxenona (**22**) e  $\beta$ -sitosterol (**23**) (PELLICCIARI *et al.*, 1972). E do extrato hexânico desta planta foi extraído o triterpeno pentacíclico espinasterol (**24**) (FRANÇA *et al.*, 2006), também presente nas folhas de *P. venosa* (MONTENEGRO *et al.*, 2006).



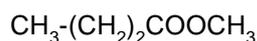
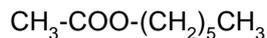
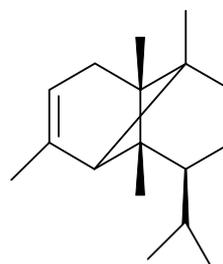
Do córtex de *Pouteria tomentosa* (Roxb.) Baehni foi obtido o acetato de  $\beta$ -amirina (**12d**) (CHE *et al.*, 1980). As folhas de *Pouteria amygdalicarpa*, *P. campechiana*, *P. subrotata* e *P. torta* apresentaram compostos cianogênicos diversos (THOMSEN & BRIMER, 1997)

O estudo do óleo volátil responsável pelo aroma dos frutos de *P. sapota* revelou a presença de 24 compostos, dos quais benzaldeído (**25**), hexanal (**26**) e ácido palmítico (**27**) estão em maior concentração (PINO *et al.*, 2006). A amêndoa dessa espécie

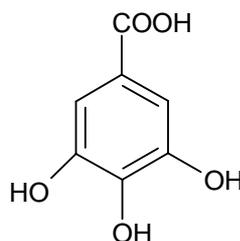
forneceu ácidos graxos dos quais os mais abundantes foram os ácidos palmítico (**27**), esteárico (**28**), oléico (**29**) e linoléico (**30**) (SOLIS-FUENTES & DURAN-DE-BAZÚA, 2003).

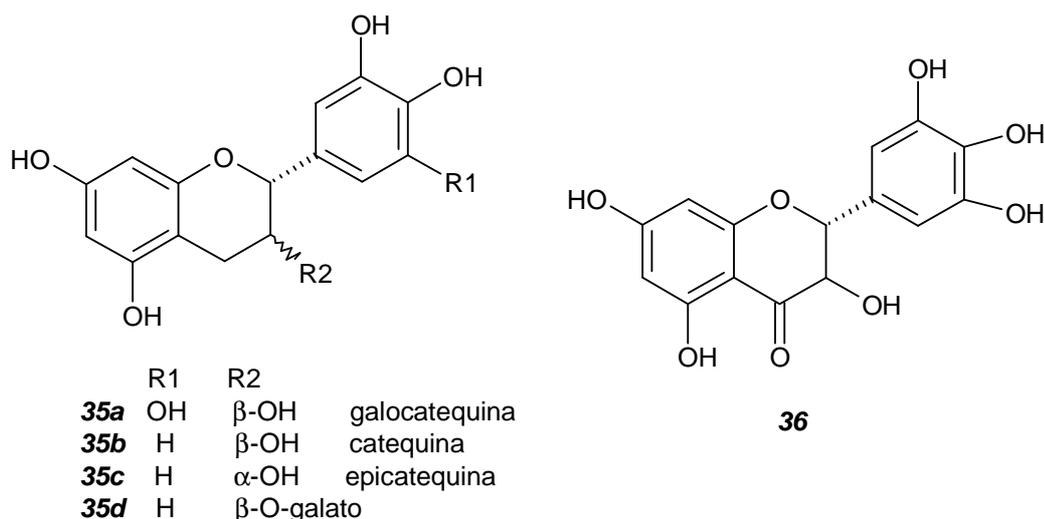
**25****26****27****28****29****30**

A análise do óleo concentrado dos frutos de *P. pariry*, apresentou como componente mais abundante o butanoato de metila (**31**); em *P. caimito*, ácido palmítico (**27**), acetato de hexadecila (**32**),  $\alpha$ -copaeno, (**33**) foram os mais abundantes (MAIA *et al.*, 2003). No óleo das folhas de *P. splendens* foram identificados 34 compostos dos quais ácidos graxos foram os mais abundantes (SOTES *et al.*, 2006).

**31****32****33**

De *Pouteria campechiana*, *P. sapota* e *P. viridis* foram identificados ácido e miricitrina (**18**), gálico (**34**), galocatequina (**35a**), catequina (**35b**), epicatequina (**35c**), galatocatequina (**35d**), e dihidromiricetina (**36**), responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro* apresentada por seus extratos (MA *et al.*, 2004; MAHATTANATAWEE *et al.*, 2006).

**34**



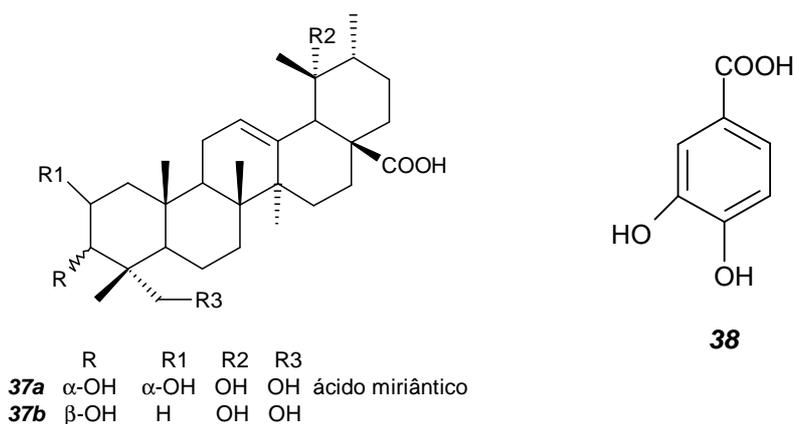
De extratos de *Pouteria venosa* foram isolados ácido ursólico (**14**); taraxerol (**21a**) e os ácidos miriântico (**37a**) e  $19\alpha,23$ -diidroxieursólico (**37b**), sendo que esses dois últimos foram ativos frente ao radical DPPH. Os extratos clorofórmico das folhas, diclorometânico da casca do caule e hexano:acetato de etila do caule, apresentaram resultados positivos em ensaios larvicida e/ou antiradicalar (MONTENEGRO *et al.*, 2006).

Em estudos preliminares, os extratos de *P. torta*, *P. ramiflora* e *P. gardnerii* apresentaram atividades de inibição de  $\alpha$ -amilase em saliva humana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002). O extrato etanólico de *P. ramiflora* apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva *in vivo* (NUNES, 2004; FONTES JUNIOR, 2004; CHAGAS *et al.*, 2003). *Pouteria torta* e *P. ramiflora* apresentaram atividade antimicrobiana (ALVES *et al.*, 2000; RAMALHO *et al.*, 2004).

O extrato bruto etanólico de *P. caimito*, extratos brutos etanólico e aquoso de *P. torta* e o extrato bruto etanólico de *P. ramiflora* apresentam atividade antioxidante (CASTRO *et al.*, 2006).

A fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* apresentou toxicidade a larvas de *Artemia salina* (RAMALHO *et al.*, 2004). Além disso, o extrato aquoso bruto de *P. torta* também apresentou toxicidade a larvas de *Artemia salina* (LOPEZ, 2005).

Os extratos metanólico, acetônico e aquoso de galhos de *P. cambodiana* apresentaram atividade imunomoduladora *in vitro*. Os extratos etanólico e aquoso apresentaram atividade antioxidante que parece ser devida à presença de ácido 3,4-diidroxibenzóico (**38**) (MANOSROI *et al.*, 2005; MANOSROI *et al.*, 2006)

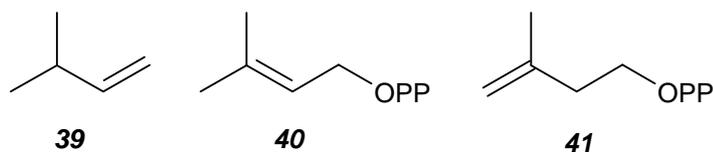


Os extratos hexânico e etanólico de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* foram testados quanto a atividade agonista ou antagonista de receptores nucleares e o extrato hexânico de *Pouteria torta* inibiu a ação do estrogênio nos seus receptores (FRANZOTTI *et al.*, 2004). Os extratos hexânico e etanólico de *P. torta* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e os extratos hexânico, etanólico e aquoso desta mesma espécie foram ativos contra *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o extrato aquoso apresentou atividade contra *Escherichia coli* (LOPEZ, 2005). Os extratos etanólicos de folhas de *P. grandiflora* e *P. psamophila* foram inativos contra *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*. *Pouteria grandiflora* apresentou atividade discreta contra *Cladosporium sphaerospermum*, *P. psamophila* e *C. cladosporioides* (AGRIPINO *et al.*, 2004).

Em estudos preliminares, os extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. torta*, *P. caimito* e *P. ramiflora* apresentaram atividade fotoprotetora contra os raios UVA e UVB (FALEIROS *et al.*, 2006).

### 1.3 – Compostos isoprênicos de esqueleto C<sub>30</sub> e seus derivados: ocorrência e atividade biológica

Os terpenos compõem diversas estruturas comumente encontradas na natureza e são originados da via acetato-malonato, a partir do encadeamento “cabeça-cauda” de unidades isoprênicas (**39**) (DEWICK, 2001 e OLIVEIRA *et al.*, 2003).

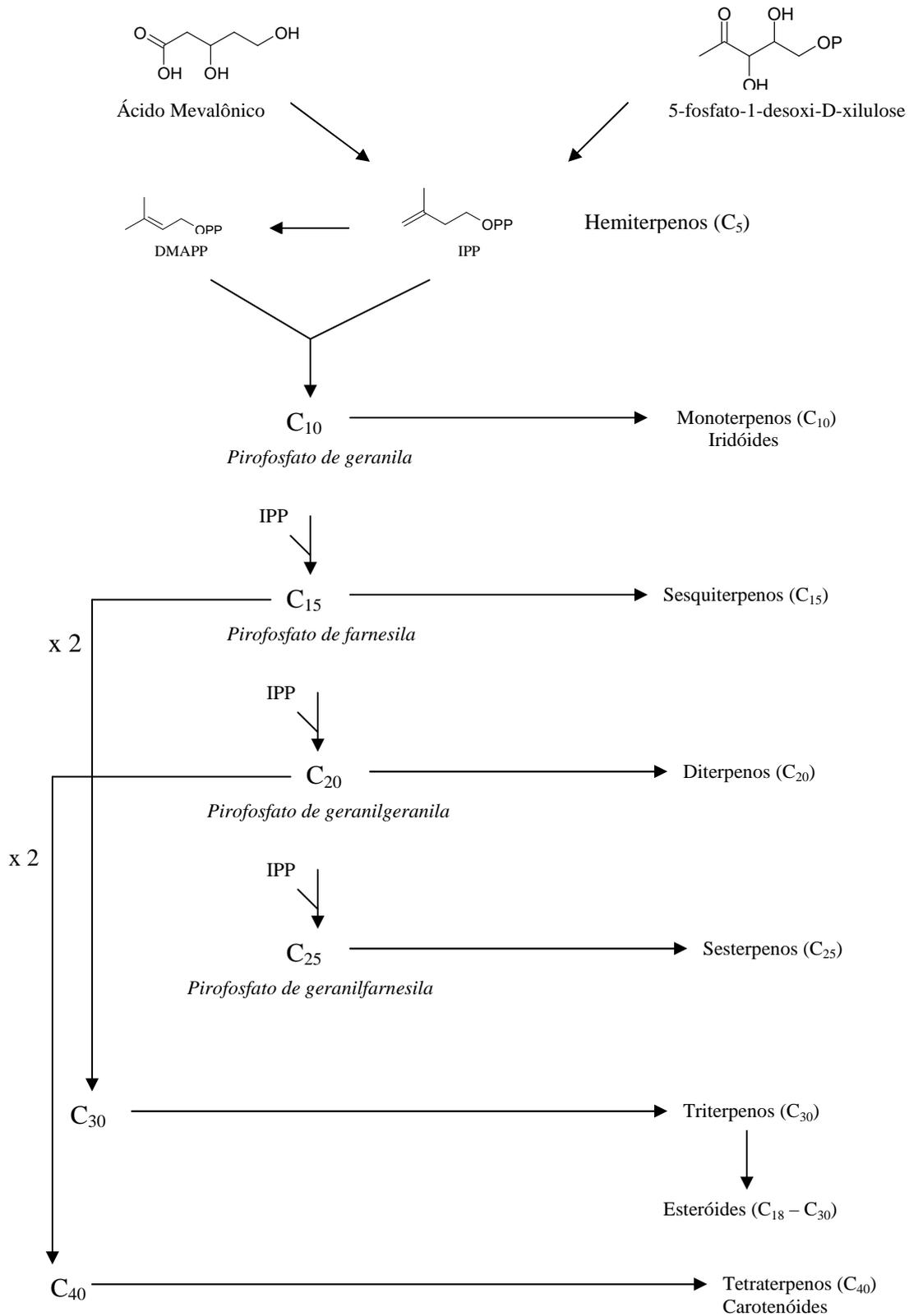


O isopreno é considerado um dos blocos de construção para os “isoprenóides”. As unidades bioquimicamente ativas do isoprenos são conhecidas como pirofosfato de dimetilalila - DMAPP (**40**) e pirofosfato de isopentenila - IPP (**41**) (DEWICK, 2001).

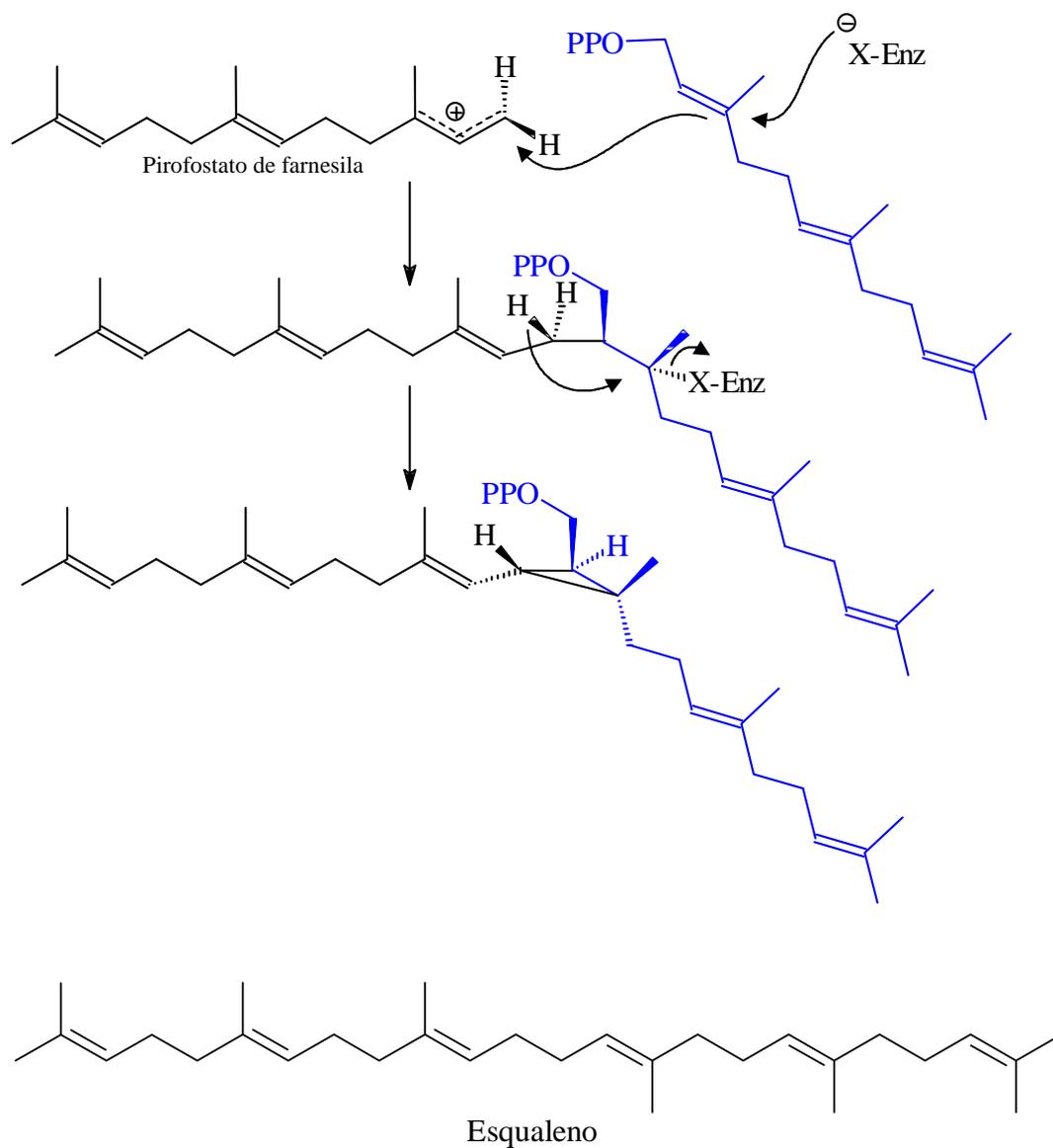
Os terpenos apresentam funções variadas nos vegetais e são de acordo com o número de unidades de isopreno ( $C_n$ ) encadeadas: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ) sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ) triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ).

Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados apresentam uma gama de funções, como de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

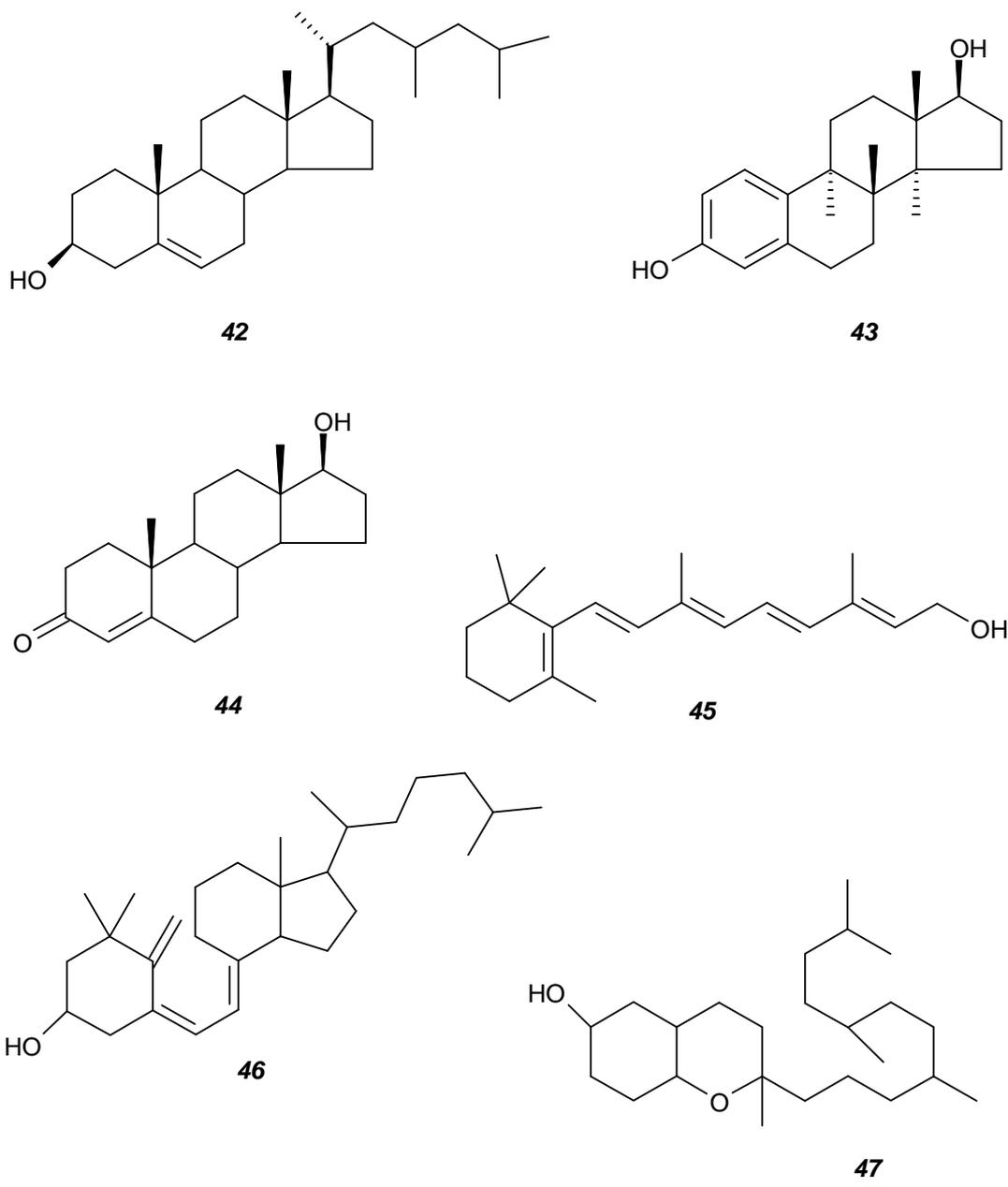
Alguns derivados  $C_{30}$  são de especial importância, como por exemplo, o colesterol (**42**), os hormônios sexuais estradiol (**43**) e testosterona (**44**) as vitaminas A (**45**), D (**46**) e E (**47**). Biossinteticamente, estes metabólitos são formados de uma forma diferente daquela como cresce a maioria das cadeias isoprenóides. Eles derivam da união *cauda-cauda* de duas unidades de pirofosfato de farnesila, formando o esqualeno (FIGURA 1.2), que foi originalmente isolado do óleo do fígado de tubarão (*Squalus* sp) (DEWICK, 2001)



**FIGURA 1.1.** Esquema da rota biossintética para a formação dos terpenóides (DEWICK, 2001)..

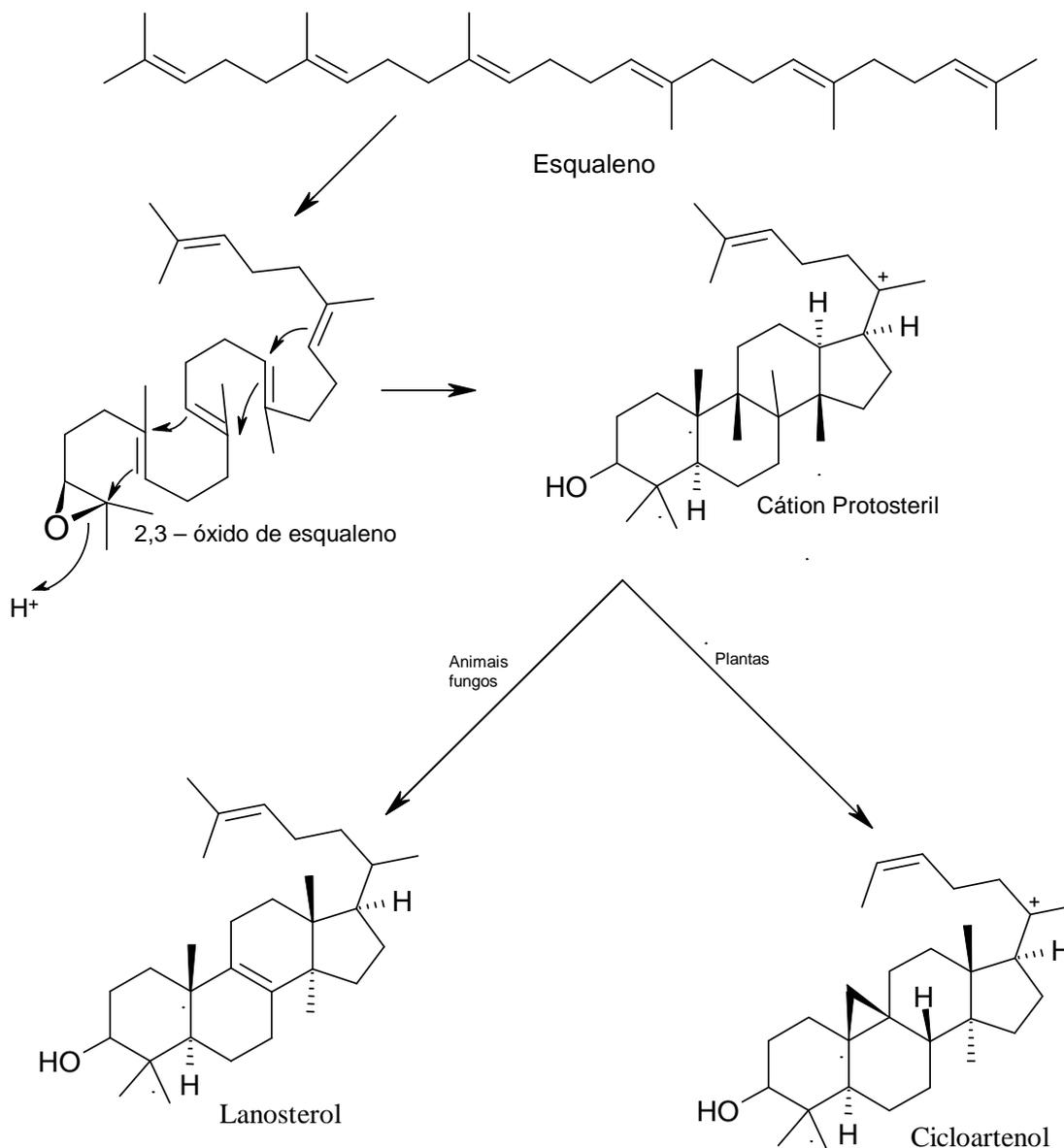


**FIGURA 1.2: Formação do esqualeno por meio do acoplamento cauda-cauda de duas unidades de pirofostato de farnesila.**



Neste grupo estão incluídos os esteróides, que possuem esqueleto  $C_{27}$ - $C_{29}$ , não sendo, portanto verdadeiros triterpenos. No entanto, todos derivam do mesmo precursor - o esqualeno - que possui 30 átomos de carbono, pelo que se prefere manter esta classificação. O esqualeno pode adotar várias conformações (*pseudo*-cadeira ou barco), das quais resultam diferentes estruturas cíclicas, o que explica a diversidade de metabólitos conhecidos (FCT/UNL, 2007).

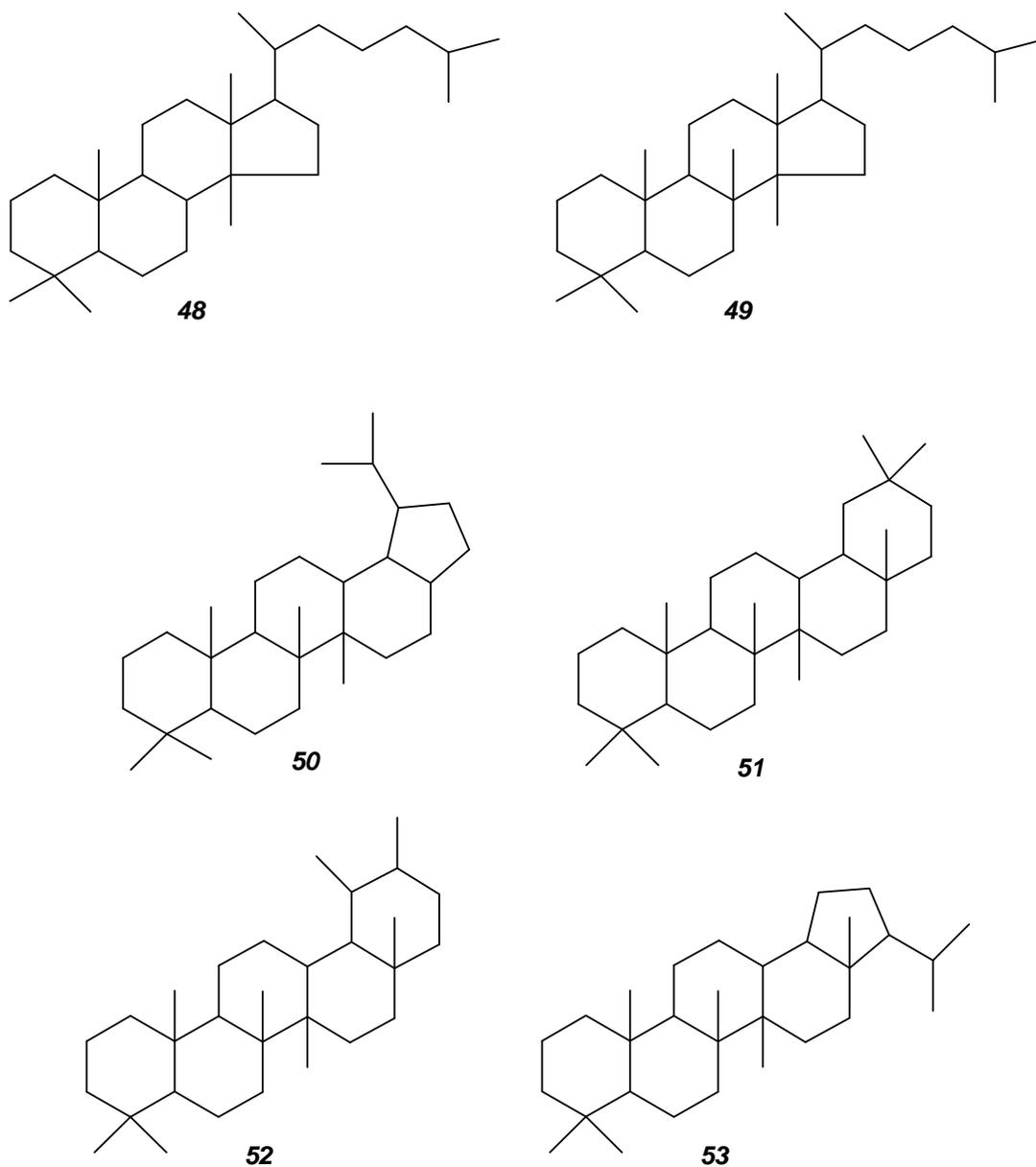
A ciclização do esqualeno está esquematizada na FIGURA 1.3. Praticamente todos os triterpenóides cíclicos derivam do cátion protosterila, e são organizados em famílias de acordo com as estruturas formadas.



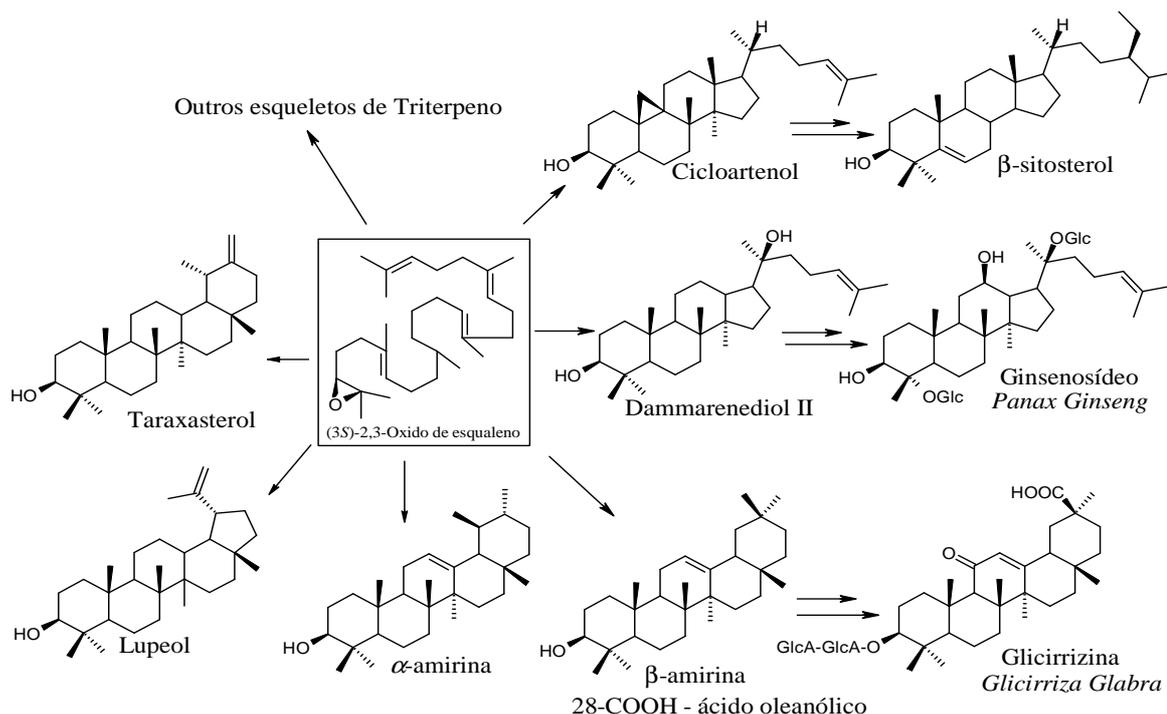
**FIGURA 1.3: Esquema da ciclicação do esqualeno (LOPES, 2007).**

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante dos terpenóides. São conhecidos pelo menos 200 esqueletos diferentes desses compostos, advindos de produtos naturais ou de reações enzimáticas características da ciclicação do esqualeno ou do seu óxido. Os triterpenos e outros compostos oriundos da mesma rota, incluindo os esteróides e as saponinas, são bem caracterizados quanto a suas atividades biológicas (XU *et al.*, 2004).

Os grupos de triterpenos mais importantes são: esqualenos (linear); lanostanos (48); damaranos (tetranortriterpenóides e quassinóides) (49); lupanos (50); oleanos (51); ursanos (52) e hopanos (53) (LOPES, 2007 e DEWICK, 2001)



Os caminhos biossintéticos que conduzem à formação dos esteróides e triterpenos são completamente idênticos até a formação do 2,3-oxiesqualeno (FIGURA 1.4). A partir daí a rota torna-se diversificada em sua etapa de ciclização. A diversidade estrutural dos triterpenos é gerada nesta etapa e é catalizada pelas enzimas triterpenossintase e pode-se dizer que a diversidade dessas sintases reflete a diversidade de espécies de plantas (FIGURA 1.4) (SHYBUYA *et al.*, 1999)

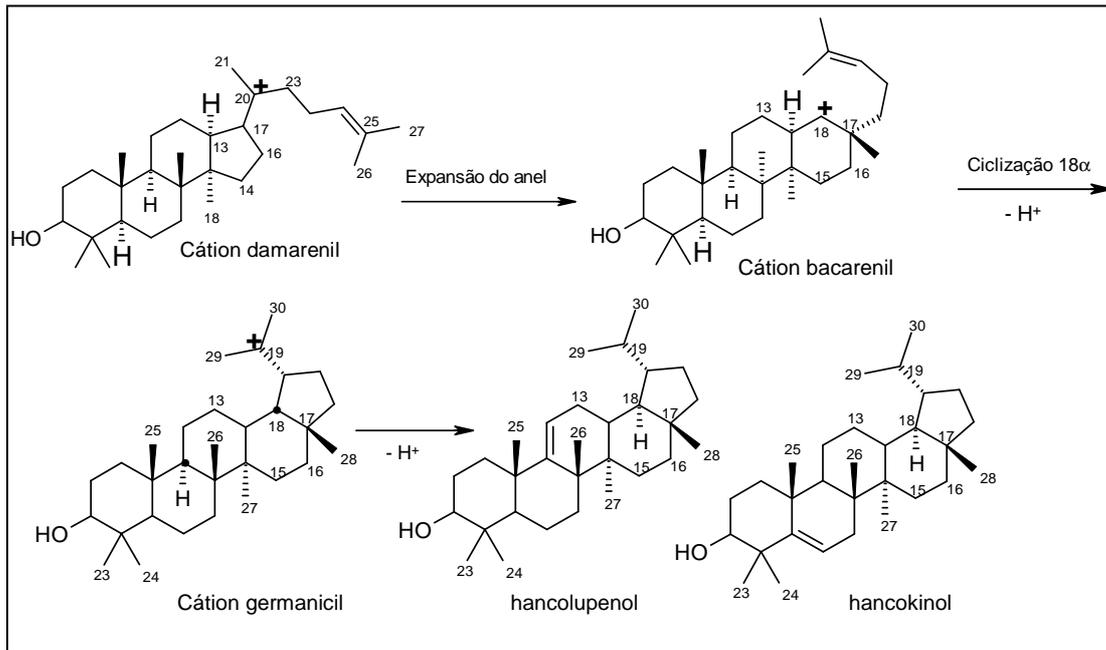


**FIGURA 1.4 - Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno e alguns exemplos de triterpenos e saponinas de plantas (SHYBUYA, *et al.*, 1999)**

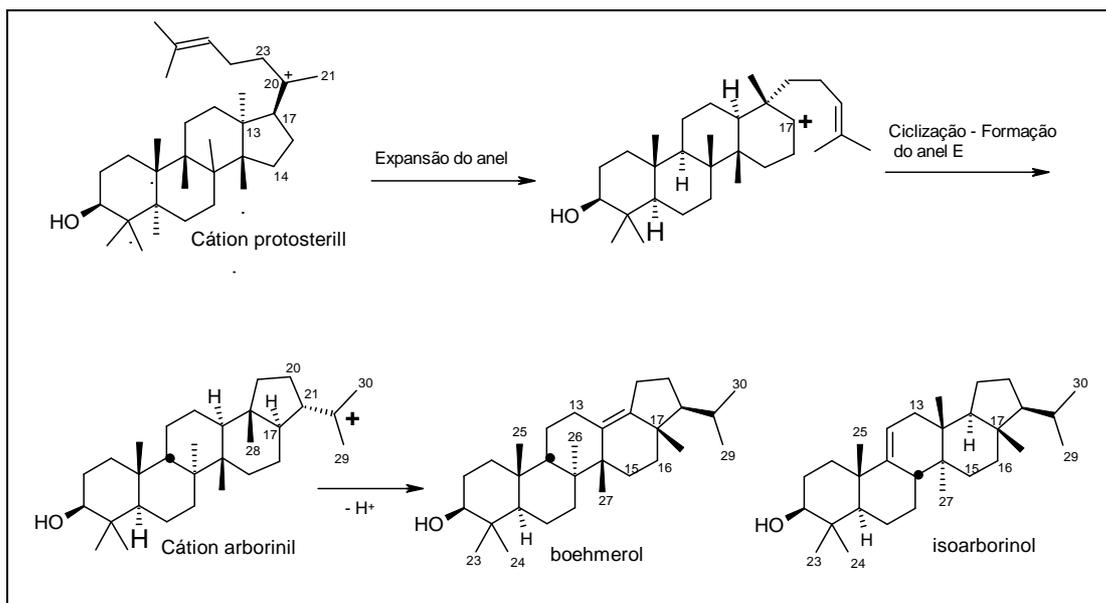
Os triterpenos pentacíclicos derivam do epóxido de esqualeno num arranjo cadeira- cadeira-cadeira-barco, seguido de uma condensação. Esses tipos de compostos são muito comuns e facilmente encontrados em vegetais. A estrutura policíclica pode ter cinco anéis de seis membros (oleanos e ursanos) ou quatro anéis de seis membros e um de cinco membros (lupano) (MENDES, 2004).

Os compostos pentacíclicos compreendem a classe mais numerosa de produtos derivados do óxido de esqualeno, que são catalizados pela enzima oxidoesqualenosintase. A variedade estrutural desses compostos é revelada pelos diversos modos de ciclização do oxido de esqualeno. Tanto o cátion protosteril, quando o cátio damarenil, por exemplo, podem se submeter à expansão e à ciclização do quinto anel (FIGURA 1.5 e 1.6, página 24). Variar a posição e o ataque facial para esta ciclização geram vários cátions isoméricos, que se rearranjam para dar formar a numerosos produtos (XU *et al.*, 2004).

Plantas ricas em triterpenóides são usadas em chás e infusões desde os primórdios da humanidade devido aos seus efeitos curativos. As plantas que os contêm são conhecidas tradicionalmente por possuir propriedades antiinflamatórias e protetoras do sistema vascular, além de atividades antialérgica, analgésica e antipirética, que foram comprovadas ao longo da metade do século XX (LOPES, 2007)



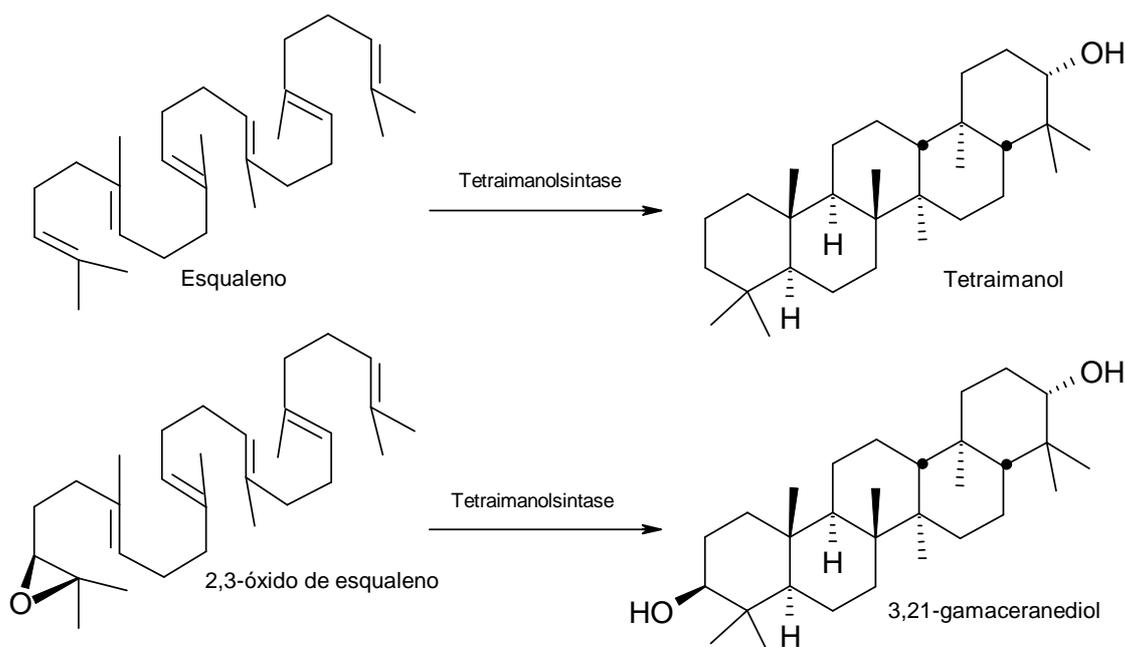
**FIGURA 1.5:** Exemplo de ciclização do cátion damarenil para a formação de alguns triterpenos pentacíclicos (XU *et al.*, 2004).



**FIGURA 1.6:** Exemplo de ciclização do cátion protosteril para a formação de alguns triterpenos pentacíclicos (XU *et al.*, 2004).

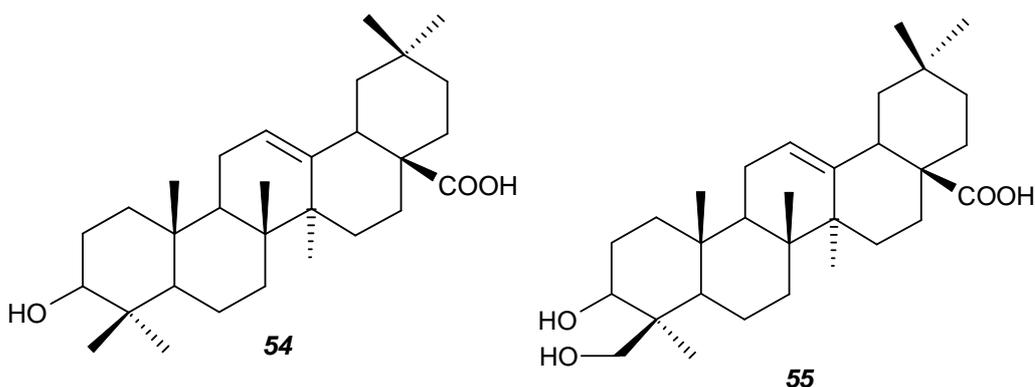
É importante notar que as estruturas atribuídas à ciclização do óxido de esqualeno, podem alternativamente derivar do esqualeno seguido pela oxidação em C3; inversamente aqueles atribuídos aos produtos da ciclização do esqualeno poderiam vir da redução do grupo 3-hidroxil após a ciclização. Além disso, é possível que uma enzima aceite múltiplos substratos. O óxido de esqualeno é mais protonado que o

esqualeno, e a esqualenosintase evolui ao protonado grupo funcional olefínico, que é menos básico do que o grupo epóxi. Conseqüentemente, as esqualenosintases, podem protonar com freqüência e ciclizar o óxido de esqualeno também. Por exemplo, além da ciclização normal do substrato do esqualeno para o tetraimanol, a tetraimanolsintase pode converter o 2,3-óxido de esqualeno em 3,21-gamaceranediol (FIGURA 1.7) (XU *et al.*, 2004).

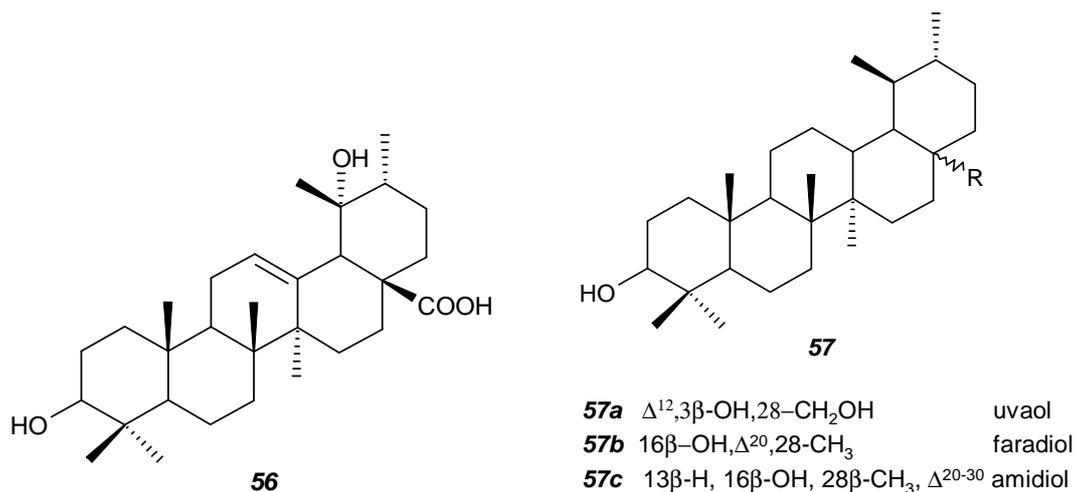


**FIGURA 1.7:** Exemplo da ciclização do esqualeno e do óxido de esqualeno pela enzima tetraimanolsintase (XU *et al.*, 2004).

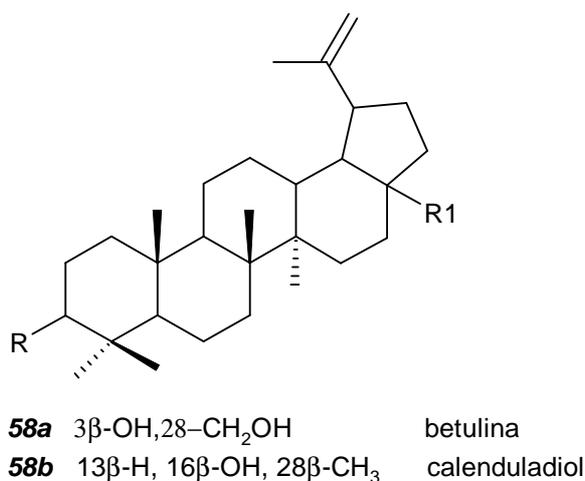
Alguns triterpenos do tipo oleano, por exemplo,  $\beta$ -amirina (**12c**), eritrodio (**19**), ácido oleanólico (**54**), hederagenina (**55**), apresentam alguma atividade biológica, tais como antitumoral (MOREIRA *et al.*, 2003, MENDES, 2004), nematocida (FERRAZ & FREITAS, 2007), antiinflamatória, (CUNHA *et al.*, 2003) e antinociceptiva (LIMA, 2005).

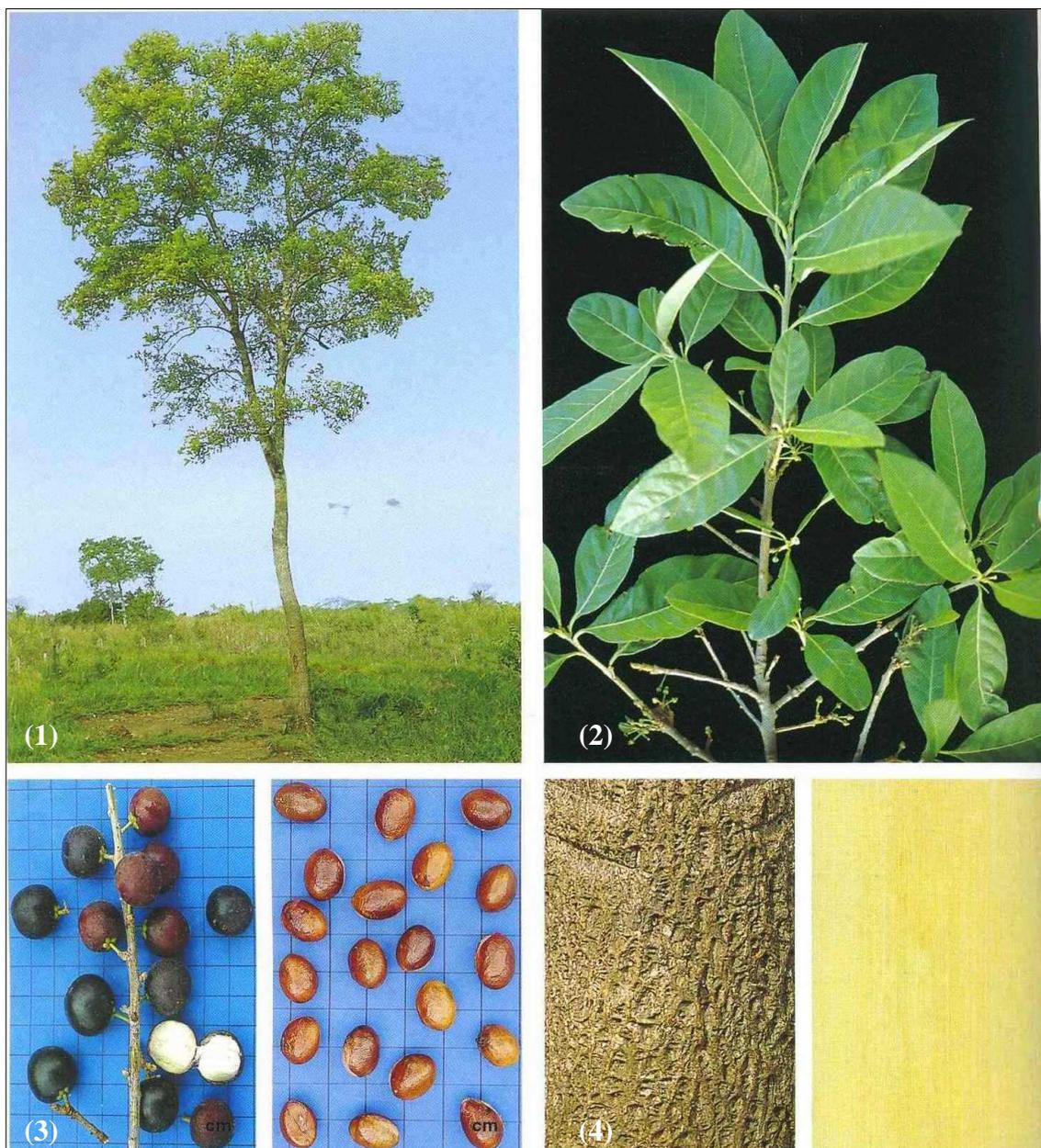


Fazem parte do grupo dos ursanos:  $\alpha$ -amirina (**12a**), ácido ursólico (**14**), ácido tormêntico (**56**), uvaol (**57a**), faradiol (**57b**), amidiol (**57c**) (MENDES, 2004), etc.; e algumas das atividades biológicas atribuídas a esses compostos que podem ser citadas são: antimicrobiana (KATO *et al.*, 2006; LOPES, 2007), antiinflamatória, antitumoral (ES SAADY *et al.*, 1995; LOPES, 2007), antiendematogênica (ZITTERL-EGLESSER *et al.*, 1997) e citotoxicidade (UKIYA *et al.*, 2002).



Na família dos lupanos encontram-se os triterpenos: ácido betulínico (**13**), lupeol (**15a**), betulina (**57a**) e calenduladiol (**58b**) (LOPES, 2007), etc., dos quais foram identificadas atividades biológicas tais como antiinflamatória, anticancerígena, antibiótica, e antimalárica (FREIRE *et al.*, 2004; YASUKAWA *et al.*, 1996; LOPES, 2007).





**FIGURA 1.8:** *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni: (1) árvore; (2) folhas; (3) frutos; (4) caule. (FONTE: LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. vol. 2, 2<sup>a</sup> ed., 2002).

# RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

Considerando que:

- Existe uma necessidade de conhecimento das características químicas e atividades biológicas de espécies vegetais brasileiras.
- Muitas espécies brasileiras são utilizadas como medicinais pela população, sem que haja comprovação das atividades farmacológicas preconizadas ou estudos de sua composição química.
- Pouco se sabe da química e das atividades biológicas da espécie *Pouteria gardnerii*.

Os seguintes objetivos são propostos:

### **Objetivo Geral**

- Determinar a composição molecular de extratos das folhas de *Pouteria gardnerii* - Sapotaceae.

### **Objetivos Específicos**

- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Pouteria gardnerii*.
- Avaliar as possíveis atividades biológicas apresentadas pelos extratos brutos hexânico, etanólico e aquoso, e frações destes.

# CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1. MÉTODOS GERAIS

### 2.1.1- Cromatografia em camada delgada (CCD)

#### 2.1.1.1- Fase Estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica) ativadas a 105 °C;
- Placas de sílica gel 60G (Merck) preparadas em suporte de vidro, com 0,50 mm de espessura (preparativa) ativadas a 105 °C.
- Placas de sílica gel 0,2 mm Kieselgel 60 ALUGRAM SIL G. (MACHEREY-NAGEL).

#### 2.1.1.2. - Eluentes (FM):

FM1: Hexano

FM2: Hexano:AcOEt (9:1)

FM3: Hexano:AcOEt (8:2)

FM4: CCl<sub>4</sub>:AcOEt (14:1)

FM5: Etanol

#### 2.1.1.3 – Reveladores (WAGNER *et al.*, 1984)

##### R1 - Solução ácida de anisaldeído

Reagente para detecção de esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos, micotoxinas.

**Mecanismo:** o mecanismo de reação com esteróides ainda não é bem elucidado. Várias reações não-quantitativas correm simultaneamente. Cátions ciclopentenila têm sido sugeridos como intermediários que condensam com o anisaldeído para fornecer os compostos corados. Provavelmente compostos do tipo trifenilmetano também sejam formados com os compostos aromáticos.

**Solução A:** solução de anisaldeído em ácido acético a 2%

**Solução B:** solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20%

---

A cromatoplaça foi borrifada com solução A e, em seguida, solução B e foi então levada à estufa por cerca de 10 min a 100°C. *Revelador geral.*

### **R2 – Reagente de Dragendorff**

**Solução A:** nitrato básico de bismuto (1,7 g) foi dissolvido em 100 mL solução de ácido acético:água (1:4)

**Solução B:** solução aquosa de iodeto de potássio a 40%

Para borrifação da placa cromatográfica foi preparada uma solução composta de 5,0 mL de A; 5,0 mL de B; 20 mL de ácido acético e 70,0 mL de água. *Detecção de alcalóides e peptídeos, pelo surgimento de mancha amarelo-alaranjada, imediatamente após a borrifação.*

### **R3 – Reagente NP/PEG**

**Solução A:** solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2%

**Solução B:** solução etanólica de polietilenoglicol – 400 a 5 %

A cromatoplaça foi borrifada com solução A e, em seguida com solução B e observada sob luz ultravioleta. *Detecção de flavonóides e outras substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência.*

### **R4 – Reagente de Verde de Bromocresol**

Verde de bromocresol (0,100 g) foi dissolvido em 100 mL de metanol e alcalinizado com solução 1 mol/L de NaOH até que a solução apresentasse cor azul intenso. *Detecção de ácidos carboxílicos pelo surgimento de cor amarela sobre fundo azul, imediatamente após a borrifação.*

### **R5 – Radiação ultravioleta**

A placa foi analisada sob luz ultravioleta ( $\lambda = 365$  nm). *Detecção de substâncias contendo grupos cromóforos.*

## 2.1.2 – Cromatografia em coluna (CC)

### 2.1.2.1 – Cromatografia líquida

A sílica (Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck) foi suspensa com o solvente utilizado inicialmente como fase móvel (usualmente, hexano) e empacotada em coluna de vidro até total decantação da sílica. A amostra foi incorporada com quantidade suficiente de sílica e solvente e então foi aplicada no topo da coluna, sendo posteriormente procedida a eluição, com gradiente em ordem crescente de polaridade.

### 2.1.2.2 – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

**Equipamento: CG:** Cromatógrafo Varian, modelo Star 3400

**CG-EM:** Cromatógrafo Thermo Finnigan modelo TRACE GC acoplado a a espectrômetro de massas Thermo Finnigan modelo Polaris Q (IE, 70eV).

**Banco de dados:** Catálogo de espectro de massas NIST - National Institute of Standards and Technology.

#### **Método:**

Coluna: HP5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) - marca Hewlett Packard

Injetor: 250°C, modo splitless

Injeção: 2 µL de amostra 1 mg/mL em clorofórmio

Hélio: 0,6 mL/min modo fluxo constante

Forno (2 rampas): 60°C 1min, 40°C/min até 140°C, 4°C/min até 300°C em 10min

Linha de Transferência: 280°C

Espectrômetro de Massa: *Fonte de íons:* 250°C;

*Tempo de início:* 5min;

*Polaridade:* positivo;

*Modo de scan:* full scan;

*Intervalo de massa:* 50-600.

### 2.1.3 - Análises Espectrométricas

#### 2.1.3.1 – Espectrometria no Infravermelho (IV)

Os espectros foram obtidos no espectrofotômetro Bomem Hartmann & Braun MB – 100 (Alemanha), com valores expressos em  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram analisadas em pastilhas preparadas com brometo de potássio (KBr) (Instituto de Química – IQ – UnB).

#### 2.1.3.2 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados no espectrômetro Varian Mercury Plus (300MHz, 7,04T, E.U.A), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{MeOD}_4$ , com TMS (tetrametilsilano) como referência interna (Instituto de Química – IQ – UnB).

#### 2.1.4 – Testes biológicos

##### 2.1.4.1 – Toxicidade em larvas de *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982).

- **Preparação da solução salina:** Uma solução de sal marinho (36 g/L) foi preparada e ajustada, com uma solução 0,1 M de NaOH, até pH 8-9. Essa solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *A. salina* e para o preparo das diluições dos extratos hexânico, etanólico e aquoso da *Pouteria gardnerii*.

- **Eclosão dos ovos:** Os ovos de *A. salina* foram postos em solução salina aquosa com aeração constante e expostos à luz diurna por 48 horas para eclodir.

- **Preparação das diluições seriadas:** Os extratos foram solubilizados em 0,2 mL de DMSO e o volume foi completado para 20 mL com a solução salina (1000 ppm). Desta solução foram preparadas diluições (500, 250 e 125 ppm) em triplicata. Em cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*.

- **Controle positivo:** Uma amostra de 2,00 mg dicromato de potássio foi submetida a condições da amostra a ser analisada.

- **Controle negativo:** Tubos contendo 0,2 mL de DMSO e 10 larvas de *A. salina*, nas mesmas condições da amostra a ser analisada.

- **Bioensaio:** Os tubos foram mantidos iluminados e, após de 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas. O cálculo da  $DL_{50}$  foi feito utilizando o programa PROBITOS<sup>®</sup> (MEYER *et al.*, 1982).

#### 2.1.4.2 – Atividade fotoprotetora (SOUZA *et al.*, 2005).

O teste foi realizado no laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela equipe do Prof. Luiz Alberto Simeoni.

**Preparo da amostra:** a amostra e o controle positivo foram dissolvidos em mistura etanol:água (1:1) nas seguintes concentrações: 50, 150 e 300 µg/mL.

**Controles positivos:** ácido *p*-aminobenzóico (PABA) Merck; naringina Sigma.

**Controle negativo:** solução etanol:água (1:1).

A atividade fotoprotetora foi avaliada *in vitro* por meio da medida da absorvância das soluções na região do ultravioleta (200 a 400 nm), utilizando espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601) e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

#### 2.1.4.3 – Atividade Antioxidante

##### 2.1.4.3.1 – Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio (RUCH *et al.*, 1989)

Este experimento foi realizado no laboratório de Análise Instrumental e Laboratório de Testes Biológicos da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), em Campo Grande – MS, pela equipe da Profa. Ana Lúcia Alves de Arruda.

O Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio baseia-se na investigação da habilidade das amostras testadas seqüestrarem os radicais livres de peróxido de hidrogênio. Elevada habilidade em seqüestrar o peróxido de hidrogênio está relacionada à presença de antioxidantes, nas amostras capazes de reagir com radicais livres (RAYMUNDO *et al.*, 2004).

#### **Reagentes e soluções:**

**Reagente:** Solução de peróxido de hidrogênio em que foi preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (40 mM).

**Tampão fosfato:** Solução A:  $KH_2PO_4$  (dihidrogenofosfato de potássio) à 0,1 mol/L

**Solução B:** NaOH (Hidróxido de sódio) à 0,2 mol/L

Colocar em um balão volumétrico 50 mL da solução A e 2,8 mL da solução B, completar o volume para 100 mL. Ajustar o pH para 7,4 com HCl ou NaOH

As amostras foram solubilizadas em MeOH, de forma a serem obtidas diferentes concentrações (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL). A cada amostra foram adicionados 3,4 mL de tampão fosfato 0.1 M pH 7.4 e 0,6 mL de solução de peróxido de hidrogênio 40 mM.

Foi utilizado como padrão o ácido ascórbico nas mesmas condições das amostras. As amostras foram incubadas por 10 minutos e foi feita a leitura a 230 nm em espectrofotômetro Aqua Mate UV/Visível (Thermo Spectronic AQA095109)

**2.1.4.3.2. Atividade seqüestradora do radical DPPH (YILDIRIM *et al.*, 2001 e HUANG *et al.*, 2005).**

Este experimento foi realizado no laboratório do curso de Química da Universidade Católica de Brasília – Brasília/DF, pela equipe do Prof. Carlos Frederico de Souza Castro.

O mesmo se baseia na capacidade dos agentes antioxidantes presentes na amostra em seqüestrar o radical estável DPPH•. A elevada habilidade da amostra em retirar o radical estável do DPPH está relacionada com a atividade antioxidante da amostra (DUARTE-ALMEIDA, 2007).

**Preparo das Soluções: Reagente:** Foram dissolvidos 2,5 mg de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) em 25 mL de etanol. A solução foi mantida em frasco âmbar (solução estoque).

**Amostra:** Foram dissolvidos 0,002 g da amostra em 10 mL de etanol.

**Controle positivo:** Foram dissolvidos 0,002 g de butilhidroxitolueno (BHT) em 10 mL de etanol.

**Controle negativo (branco):** etanol.

Da amostra, preparada conforme descrito acima, foram tomados 4 mL, distribuídos em 2 béqueres, um para o ensaio e outro para o controle negativo. À solução inicial restante, foram adicionados 4 mL de etanol, para a obtenção de uma

solução com 60% da concentração da solução original. O procedimento foi repetido por mais seis vezes, para obtenção de sete soluções com diluições sucessivas em concentrações decrescentes (200 a 10 ppm).

Para cada amostra do ensaio, foi adicionado 1 mL de solução de DPPH. Para cada controle negativo, foi adicionado 1 mL de etanol, de modo a manter a mesma concentração do extrato bruto na amostra e no controle negativo.

Após a adição da solução de DPPH, as soluções foram mantidas em repouso por 30 min. A atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* por meio da medida da absorbância das soluções em 517 nm, utilizando um colorímetro da Micronal, modelo B-542. A porcentagem do DPPH final foi calculada pela seguinte Equação (1):

$$\% DPPH_{\text{restante}} = 100 \left( \frac{Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controle}}} \right)$$

#### **Equação (1)**

A concentração de DPPH (% DPPH<sub>restante</sub>) é proporcional à concentração de substância antioxidante presente na amostra, sendo que a concentração de extrato que causa uma diminuição para a metade da concentração inicial de DPPH (50%) é definida como Concentração Efetiva 50 (CE<sub>50</sub>), e a concentração de extrato que causa uma diminuição de 99% da concentração inicial do DPPH é definida como Concentração Efetiva 99 (CE<sub>99</sub>).

A CE<sub>50</sub> e CE<sub>99</sub> são calculadas por interpolação do gráfico de regressão linear obtido para os valores de %DPPH restante para cada concentração.

#### **2.1.4.4 Atividade antimicrobiana**

##### **2.1.4.4.1 Atividade antibacteriana**

###### **2.1.4.4.1.1. –Método de difusão em ágar (NCCLS, 2003a):**

Este experimento foi realizado no laboratório do Hospital das Forças Armadas (HFA), por Amabel Fernandes Correia

- **Microrganismos:** *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853, *Escherichia coli* - ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213

- **Inóculo bacteriano inicial:** igual a  $1,8 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Quando analisado por espectrometria no comprimento de onda de 600nm, forneceu uma leitura de densidade óptica (OD) igual a 0,5 (controle).

- **Concentrações da amostra:** entre 1400 µg/mL a 500 µg/mL.

- **Meio de cultura:**

-Agar Müller Hinton (Earle)

- **Bioensaio:** Discos de papel de filtro de seis milímetros de diâmetro, previamente autoclavados, foram impregnados com 20 µL de uma solução da amostra, preparada em solvente adequado à completa solubilização (hexano, etanol ou água), para obtenção de uma concentração final de 100 mg/mL. Os discos impregnados foram inseridos no meio de cultura contendo suspensões dos microrganismos supracitados.

As placas foram incubadas a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 horas (para as bactérias). Depois da inoculação, havendo zona de inibição ao redor do disco, esta foi medida. Todas as determinações foram feitas em triplicata. Foi realizada uma leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram  $\text{OD} < 0,5$ .

- **Controles:**

-positivo: solução de amoxicilina nos solventes das amostras

-negativo: solventes utilizados para diluição das amostras

#### 2.1.4.4.2 – Atividade antifúngica

##### 2.1.4.4.2.1 – Método de Difusão em Ágar (SMANIA *et al.*, 1995)

Este experimento foi realizado no laboratório de Análise Instrumental da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), pela equipe da Profa. Ana Lúcia Alves de Arruda.

**Microrganismos:** *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus* sp CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium* sp CCT 2147, *Epidermophyton floccosum* URM 4799, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Candida parapsilosis* CCT 3438 e *Aspergillus fumigatus* CCT 1277.

**Inóculo inicial:** Foram preparadas suspensões dos organismos supracitados, de forma a atingir um número aproximado de células equivalentes a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro), utilizando uma Câmara de Neubauer.

---

**Meio de Cultura:** Ágar Sabouraud (VETEC).

**Bioensaio:** Discos de papel de filtro de seis milímetros de diâmetro, previamente autoclavados, foram impregnados com 20 µL de uma solução da amostra, preparada em solvente adequado à completa solubilização (hexano, metanol, etanol ou água), para obtenção de uma concentração final de 100 mg/mL. Os discos impregnados foram inseridos no meio de cultura contendo suspensões dos microrganismos supra-citados.

As placas foram incubadas a 37°C ( $\pm$  1°C) por 24 horas (para as bactérias) e 28°C por 48 horas (para leveduras). Depois da inoculação, havendo zona de inibição ao redor do disco, que foi medida. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

**Controles:**

- positivo: discos comerciais de nistatina e anfotericina B (ambos da marca CECOM).
- negativo: solvente.

#### 2.1.4.5 - Teste de inibição de proliferação celular

##### 2.1.4.5.1 - Ensaio de proliferação celular MTT (JADA *et al.*, 2007 e CULIOL *et al.*, 2004).

Este teste foi realizado no Laboratório de Imunologia e Virologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidad Autonoma de Nueva Leon (UANL), México, pela equipe do Prof. Pablo Zapata Benavides.

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma) pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. Este produto é acumulado dentro da célula e extraído através da adição de um solvente apropriado.

**Linhagem celular:** células de câncer pulmonar (NSCLC - non-small cell lung câncer) das linhagens CALU e A427, ambas ATCC (American Type Culture Collection).

**Reagente:** brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], marca Sigma.

**Meio:** Meio Mínimo Essencial (Eagle) com 2 mM de L-glutamina e Solução Salina balanceada (Eagle) ajustada para conter 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 10 % de Soro Fetal.Bovino.

---

**Bioensaio:** Em placas de cultivo de 96 poços, foram colocadas 3000 células por poço e após 24 horas, as células que já estavam aderidas foram tratadas com o extrato metanólico das amostras em quatro concentrações diferentes (0,25 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, e 2 mg/mL).

Após 24 horas foi realizado o ensaio de proliferação celular com MTT {brometo de 2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila) tetrazólio} (Sigma, St. Louis, MO USA), ensaio colorimétrico que mede a porcentagem de sobrevivência das células comparado aos controles (JADA, 2007). Os resultados foram lidos em um espectrofotômetro (Microplate Autoreader EL311, BIOTEK Instruments Inc. Winooski, VA, USA) a 570 nm. O resultado foi calculado como viabilidade celular relativa.

**Controles:**

-negativo: 2 mL de metanol.

---

## 2.2 - PARTE EXPERIMENTAL

### 2.2.1 - Descrição botânica

*Pouteria gardnerii* Mart. & Miq. Baheni (FIGURA 1.8, página 27) é uma árvore de até 7 m de altura com copa ampla quase circular, galhos horizontais, tronco com casca moderadamente espesso, áspero; madeira dura; folhas glabras obovado-espauladas, ápice obtuso, 9-15 cm de comprimento, 2,5 a 6,0 cm de largura; pecíolo muito curto; látex branco não copioso; flores de cor bege, pequenas, nas ramas (caulinares); frutos globosos e comestíveis com látex copioso. Mata ciliar ou início desta.

### 2.2.2 – Obtenção do material botânico

As folhas de *P. gardnerii* foram coletadas no Condomínio Rural Solar da Serra - Paranoá, Distrito Federal, no período de floração da espécie, em julho de 2003. A espécie foi identificada pelo professor José Elias de Paula e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade de Brasília (UB) (JElias de Paula 3718). As folhas foram secas à temperatura ambiente e pulverizadas em moinho de facas.

### 2.2.3 – Obtenção dos extratos brutos

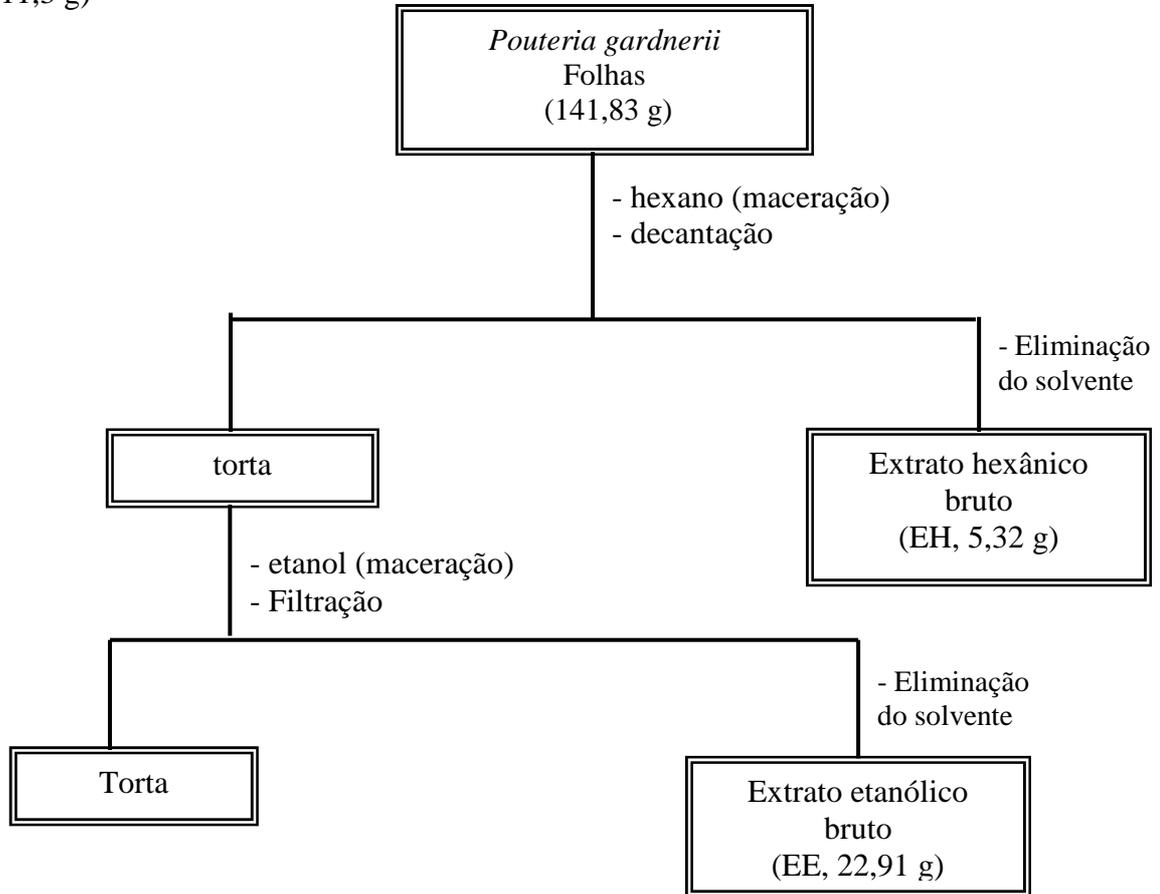
#### 2.2.3.1 – Extrato hexânico (EH) e extrato etanólico (EE)

O material botânico pulverizado (141,8 g) foi submetido à extração por maceração, por três vezes, perdurando sete dias cada, utilizando primeiramente hexano como solvente. Após decantação, as soluções extrativas foram concentradas à secura, sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Com o material resultante, o mesmo processo foi realizado, utilizando etanol 95% como solvente (FLUXOGRAMA 2.1, página 42). O rendimento do extrato hexânico (EH) foi de 4% (5,3g) e do extrato etanólico (EE) foi de 16,15% (22,9 g).

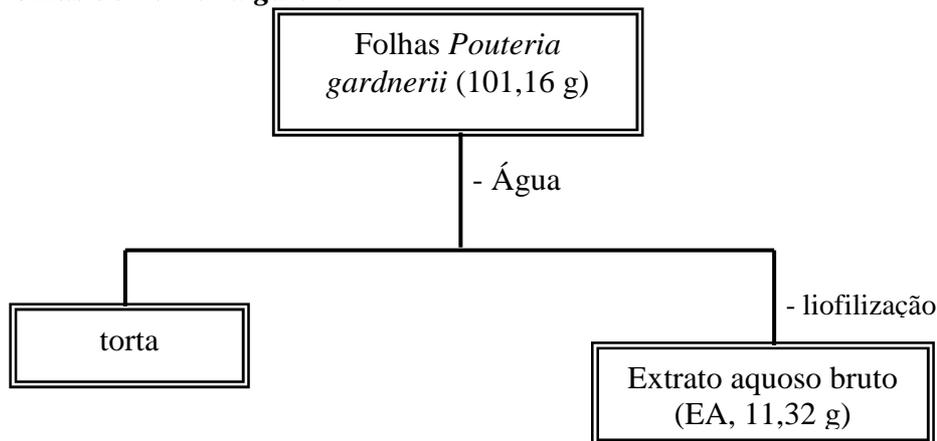
#### 2.2.3.2 – Extrato aquoso (EA)

Parte do material botânico pulverizado (129,0 g) foi submetido à extração por infusão, utilizando água destilada (3,0 L) a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40° C, sendo então submetida à filtração. A

operação foi repetida e as soluções extrativas foram reunidas. Após congelamento, a solução extrativa foi submetida à liofilização, fornecendo o extrato aquoso bruto liofilizado (FLUXOGRAMA 2.2). O rendimento do extrato aquoso (EA) foi de 8,76 % (11,3 g)



**FLUXOGRAMA 2.1. Obtenção do extrato hexânico (EH) e etanólico (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii***

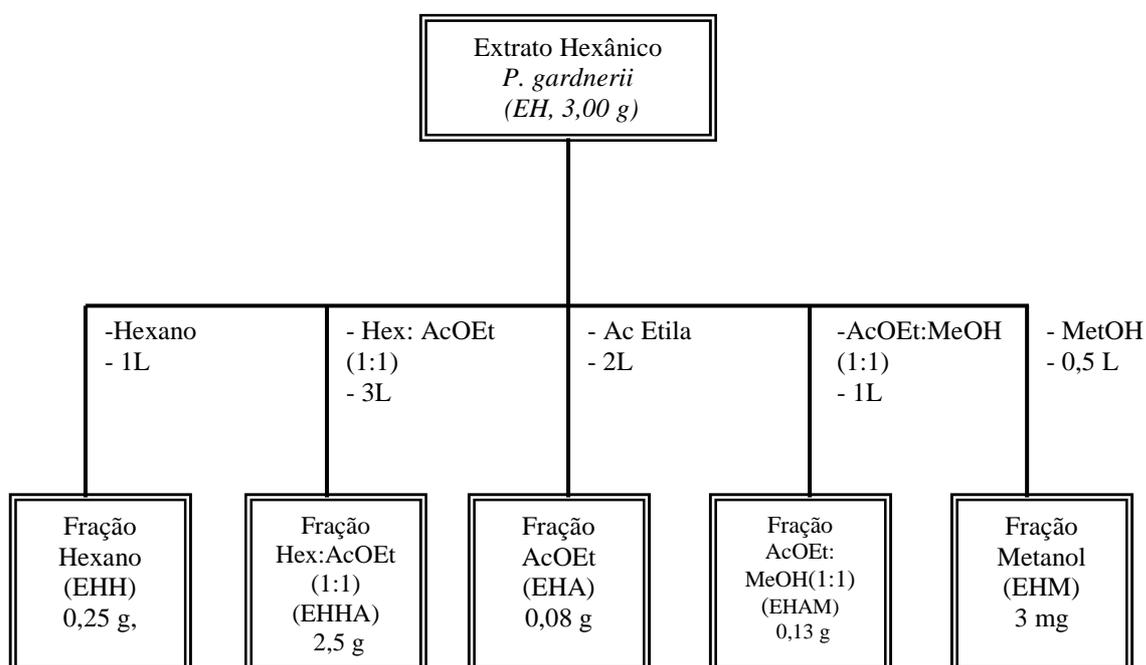


**FLUXOGRAMA 2.2. Obtenção do extrato aquoso bruto (EA) de folhas de *Pouteria gardnerii***

## 2.2.4 - Isolamento e Identificação de constituintes químicos das folhas de *Pouteria gardnerii*.

### 2.2.4.1 – Fitoquímica do extrato hexânico de *Pouteria gardnerii* (EH)

Parte do extrato hexânico (EH, 3,0 g) foi submetida à filtração em sílica gel 60 utilizando um filtro sinterizado (diâmetro 7,5 cm e altura da sílica = 4,0 cm). Foram obtidas cinco frações, conforme o FLUXOGRAMA 2.3.



**FLUXOGRAMA 2.3: Fracionamento do extrato hexânico bruto (EH) das folhas de *Pouteria gardnerii***

#### 2.2.4.1.1 - Elaboração da fração hexânica EHH (FLUXOGRAMA 2.3)

Parte da fração EHH (100 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 23,0 cm; diâmetro= 1,3 cm), utilizando Hexano→Acetato de Etila→Metanol como gradiente, e forneceu um total de 93 frações de 15,0 mL.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 8 grupos, como representado na TABELA 2.1. Os

grupos e frações cujas massas estão especificadas são aqueles que foram trabalhados posteriormente.

**Grupo EHH1 (34,8 mg):** apresentou-se como uma cera de cor esbranquiçada, solúvel em hexano e foi denominada **PG01**. Mostrou relativa pureza quando submetido à cromatografia em camada delgada, (FM1, R1, métodos gerais 2.1.1, página 31) apresentando uma mancha azul violácea.

**TABELA 2.1: Frações obtidas na elaboração da fração hexânica (EHH) do extrato hexânico (EH) das folhas de *Pouteria gardnerii*.**

Grupo EHH	Massa (g)	Eluente
1	0,0348	Hexano
2	0,0050	Hexano
3	0,0047	Hex : AcOEt (9:1)
4	0,0021	Hex : AcOEt (9:1)
5	0,0045	Hex : AcOEt (9:1)
6	0,0068	Hex : AcOEt (8:2)
7	0,0089	Hex : AcOEt (7:3), (6:4) e (1:1)
8	0,0013	AcOEt

#### 2.2.4.1.1.1 – Estudo farmacognóstico da fração hexânica EHH.

As frações obtidas a partir da cromatografia em coluna da fração hexânica de EH foram analisadas quanto à presença de triterpenos, alcalóides, flavonóides, e ácidos de cadeia longa (TABELA 2.2), utilizando R1, R2, R3, R4 e R5 respectivamente, como reveladores (item 2.1.1.3, página 31).

**TABELA 2.2: Estudo farmacognóstico da fração hexânica (EHH) do extrato hexânico (EH) das folhas de *Pouteria gardnerii*.**

Reagente	Resultado
Reagente anisaldeído (R1)	+
Reagente de Dragendorff (R2)	+
Reagente NP/PEG (R3)	-
Reagente de verde de Bromocresol (R4)	+
Radiação ultravioleta (R5)	-

#### 2.2.4.1.2 – Elaboração da fração Hex:AcOEt 1:1 (EHHA) (FLUXOGRAMA 2.3)

Parte da fração EHHA (1,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (altura= 24,0 cm; diâmetro=10,0 cm), utilizando o gradiente: Hexano→Acetato de Etila→Metanol, fornecendo um total de 168 frações de 20,0 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD). A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 17 grupos, como representado na TABELA 2.3. Os grupos e frações cujas massas estão especificadas são aqueles que foram trabalhadas posteriormente.

**Grupo EHHA11** (0,093 g): apresentou-se como sólido amorfo de cor amarelada e foi lavado sucessivas vezes com éter etílico, fornecendo um sobrenadante amarelo e um precipitado branco que foi separado por decantação.

O sólido resultante foi submetido à cromatografia em camada delgada em sílica gel, (FM2; R1, métodos gerais – 2.1.1, página 31). Foi constatada a presença de uma substância majoritária de coloração violácea, que foi purificada por cromatografia em camada preparativa. (item - 2.1.1.1, página 31) utilizando FM1 (item - 2.1.1.2, página 31) e R1 (item -2.1.1.3, página 31). A substância isolada apresentou-se como sólido branco solúvel em clorofórmio e foi denominada **PG02** (33,8mg).

Os outros grupos obtidos apresentaram uma composição complexa não sendo possível purificá-los e analisá-los

**TABELA 2.3: Frações obtidas na elaboração da fração Hex: AcOEt 1:1 (EHHA) do extrato hexânico (EH) das folhas de *Pouteria gardnerii*.**

<b>Grupo EHHA</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Eluente</b>
9	0,0438	Hexano
10	0,0422	Hex : AcOEt (9:1)
<b>11</b>	<b>0,0929</b>	<b>Hex: AcOEt (9:1)</b>
12	0,0640	Hex : AcOEt (9:1)
13	0,0865	Hex : AcOEt (9:1)
14	0,0841	Hex : AcOEt (9:1)
15	0,0721	Hex : AcOEt (9:1)
16	0,0628	Hex : AcOEt (9:1)
17	0,0921	Hex : AcOEt (9:1)
18	0,0691	Hex : AcOEt (8:2)
19	0,0963	Hex : AcOEt (8:2)
20	0,0781	Hex : AcOEt (7:3)
21	0,0284	Hex : AcOEt (7:3)
22	0,0814	Hex : AcOEt (1:1)
23	0,0670	Hex : AcOEt (4:6)
24	0,0781	Acetato de Etila
25	0,2601	Metanol

#### **2.2.4.1.2.1 - Estudo farmacognóstico da fração Hex:AcOEt (1:1) EHHA.**

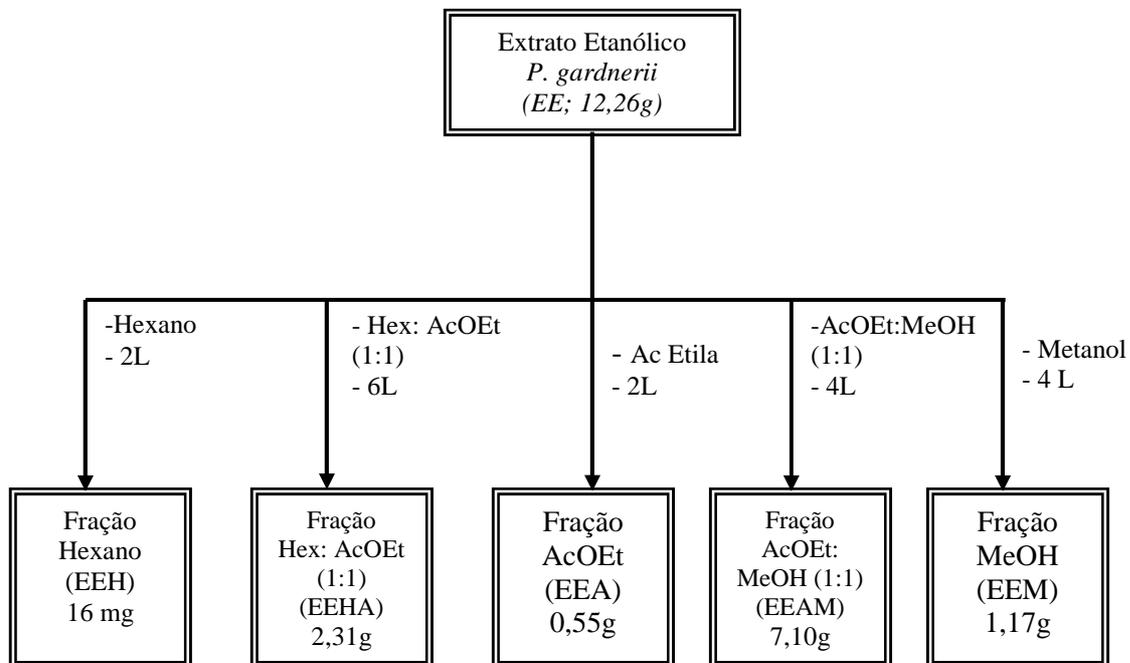
As frações obtidas a partir da cromatografia em coluna da fração Hex:AcOEt (1:1) de EH foram analisadas quanto à presença de triterpenos, alcalóides, flavonóides, e ácidos de cadeia longa (TABELA 2.4), utilizando R1, R2, R3, R4 e R5 respectivamente, como reveladores (item -2.1.1.3, página 31).

**TABELA 2.4:** Estudo farmacognóstico da fração hexânica (EHHA) do extrato hexânico (EH) das folhas de *Pouteria gardnerii*.

Reagente	Resultado
Solução ácida de anisaldeído (R1)	+
Reagente de Dragendorff (R2)	+
Reagente NP/PEG (R3)	-
Reagente de verde de Bromocresol (R4)	+
Radiação ultravioleta (R5)	-

#### 2.2.4.2. Fitoquímica do extrato etanólico (EE) das folhas de *Pouteria gardnerii*

Parte do extrato etanólico (EE, 12,3 g) foi submetida à filtração em sílica gel 60 em um filtro sinterizado (diâmetro 7,5 cm e altura da sílica = 4,0 cm). Foram obtidas cinco frações, conforme o FLUXOGRAMA 2.4, página 46.



**FLUXOGRAMA 2.4 - Fracionamento do extrato etanólico bruto (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii***

### 2.2.4.2.1. Elaboração da fração Hex: AcOEt 1:1 (EEHA) (FLUXOGRAMA 2.4)

Parte da fração Hex; AcOEt 1:1 (0,92 g) foi fracionada em coluna de sílica gel 60 (altura= 22,5 cm; diâmetro= 1,25 cm), utilizando o gradiente Hexano→Acetato de Etila→Metanol, fornecendo 374 frações de 15,0 mL. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por cromatografia em camada delgada de sílica. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 24 grupos, como representados na TABELA 2.5. Os grupos e frações cujas massas estão especificadas são aqueles que foram trabalhados posteriormente.

**Grupo EEHA28** (0,086 g): apresentou-se com aspecto de cera de cor amarelada e foi lavado sucessivas vezes com quantidade mínima de acetona, dando origem a um sobrenadante de cor esverdeada e uma cera de cor amarelada. A cera foi submetida à cromatografia em camada delgada, (FM2, R1, item 2.1.1, página 30) e apresentou uma mancha de cor azulada que foi denominado como **PG03**.

**TABELA 2.5: Frações obtidas na elaboração da fração Hex:ACOEt (EEHA) do extrato etanólico (EE) das folhas de *Pouteria gardnerii***

Grupo EEHA	Massa (g)	Eluente	Grupo EEHA	Massa (g)	Eluente
26	0,0072	Hex	38	0,0241	Hex: AcOEt (7:3)
27	0,0026		39	0,0134	Hex: AcOEt (6:4)
<b>28</b>	<b>0,0858</b>	<b>Hex: AcOEt (9:1)</b>	40	0,0345	
29	0,0246		41	0,0414	
30	0,0239		42	0,0246	Hex: AcOEt ( 3:7)
31	0,0111		43	0,1029	
32	0,0149		44	0,1119	Hex:AcOEt ( 2:8)
33	0,013		45	0,0414	AcOEt
34	0,0124		46	0,0394	AcOEt:MEOH (9:1)
35	0,051	47	0,0213		
36	0,0255	48	0,0092		
37	0,0106	49	0,0367	Metanol	

#### 2.2.4.2.1.1 - Estudo farmacognóstico da fração EEHA.

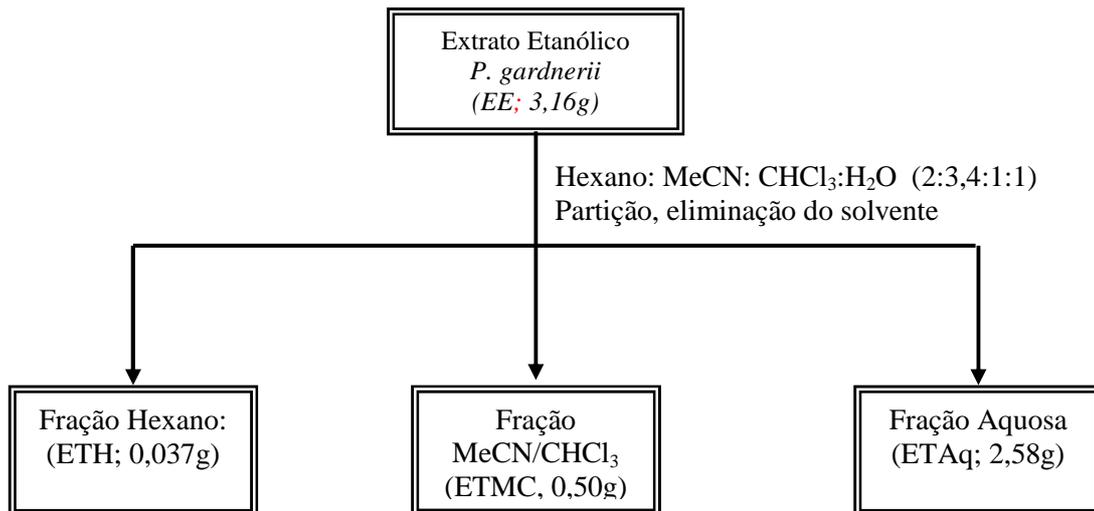
As frações obtidas a partir da cromatografia em coluna da fração Hex:AcOEt (1:1) de EE foram analisadas quanto à presença de triterpenos, alcalóides, flavonóides, e ácidos de cadeia longa (TABELA 2.6), utilizando R1, R2, R3, R4 respectivamente, como reveladores (item 2.1.1.3, página 31).

**TABELA 2.6: Estudo farmacognóstico da fração hexânica (EEHA) do extrato etanólico (EE) das folhas de *Pouteria gardnerii*.**

Revelador	Resultado
Solução ácida de anisaldeído (R1)	+
Reagente de Dragendorff (R2)	+
Reagente NP/PEG (R3)	+
Reagente de verde de Bromocresol (R4)	+
Radiação ultravioleta (R5)	+

**2.2.4.2.2. Partição trifásica do extrato etanólico (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii* (DUARTE *et al.*, 2000).**

Parte do extrato etanólico de folhas de *Pouteria gardnerii* (EE, 3,16g) foi submetida à partição líquida trifásica, utilizando a mistura hexano:clorofórmio:acetonitrila:água (2:1:3,4:1) como solvente (DUARTE *et al.*, 2000) (FLUXOGRAMA 2.5, página 50). Após a partição, foram obtidas três frações: hexânica (ETH; 0,037g, 1,2%), acetonitrila:clorofórmio (ETMC; 0,505g, 15,9%) e aquosa (ETAq, 2,58, 81%).



**FLUXOGRAMA 2.5:** Partição trifásica do extrato etanólico bruto (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii*

#### 2.2.4.2.2.1 – Elaboração da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (ETMC): Primeira Coluna (FLUXOGRAMA 2.5)

Parte da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (100,0 mg) foi submetida à coluna cromatográfica em sílica gel 60 (altura = 30 cm; diâmetro = 1,6 cm), utilizando o gradiente hexano→acetato de etila→metanol, fornecendo 303 frações de 4,0 mL. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por cromatografia de camada delgada de sílica gel 60. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião de frações em 17 grupos, como representado na TABELA 2.7. Os grupos e frações cujas massas estão especificadas são aqueles que foram trabalhados posteriormente.

**ETMC50 (0,022 g)** apresentou-se como um sólido branco amorfo (**PG04**) foi comparado com um padrão de acetato de α-amirina por meio de CCD, (FM4, R1, métodos gerais, 2.1.1, página 31) e, além de apresentar uma mancha violácea, apresentou também o mesmo  $R_f$  (Fator de Retenção) do padrão ( $R_f = 0,8$ ).

**TABELA 2.7: Frações obtidas na elaboração da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (ETMC1) do extrato etanólico (EE) das folhas *Pouteria gardnerii***

Grupo	Massa (g)	Eluente	Grupo	Massa (g)	Eluente
<b>ETMC</b>			<b>ETMC</b>		
50	0,0221	Hex:AcOEt (9:1)	59	0,0023	
51	0,0092		60	0,0015	Hex:AcOEt (4:6)
52	0,0023		61	0,0021	Hex:AcOEt (3:7)
53	0,0039	Hex:AcOEt (8:2)	62	0,0013	
54	0,0011	Hex:AcOEt (7:3)	63	0,0016	Hex:AcOEt (2:8)
55	0,0034	Hex:AcOEt (6:4)	64	0,0029	
57	0,0023		65	0,0016	Hex:AcOEt (1:9)
58	0,0009	Hex:AcOEt (4:6)	66	0,0022	AcOEt:MeOH (4:6)
			67	0,0001	MeOH

#### 2.2.4.2.2.2 - Elaboração da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (ETMC) : segunda coluna (FLUXOGRAMA 2.5)

Parte da fração ETMC (100,0 mg) foi submetida a coluna cromatográfica em sílica gel 60 (altura= 18 cm; diâmetro= 3 cm), utilizando o gradiente Hexano→acetato de Etila→Metanol, fornecendo 306 frações de 40,0 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD.

A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 18 grupos, como representado na TABELA 2.8. Os grupos e frações cujas massas estão especificadas são aqueles que foram trabalhadas posteriormente.

**ETMC70 (0,035g):** foi submetido a CCD (FM3, R1, parte experimental 2.1.1, página 31) na qual pôde ser observada a presença de 3 substâncias que foram isoladas por CCP (item 2.1.1.1, página 31), utilizando como eluente FM3 (item, 2.1.1.2, página 31) e R1 (item 2.1.1.3, página 31). As substâncias isoladas foram denominadas **PG05** (7,9 mg) que na CCD apresentou uma mancha violácea, e **PG06** (8,3 mg) que na CCD apresentou uma mancha azulada.

**TABELA 2.8: Frações obtidas na elaboração da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> (ETMC2), do extrato etanólico das folhas de *Pouteria gardnerii*.**

<b>Grupos ETMC2</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Solvente</b>	<b>Grupos ETMC2</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Solvente</b>
68	0,0036	Hex:AcOEt: 9:1	77	0,0017	AcOEt:MeOH:9:1
69	0,0038		78	0,0023	
<b>70</b>	<b>0,0353</b>		79	0,0066	AcOEt:MeOH 7:3
71	0,0069		80	0,0063	
72	0,0043	Hex:AcOEt: 8:2	81	0,0036	AcOEt:MeOH 7:3
73	0,0025	Hex:AcOEt:7:3	82	0,0014	AcOEt:MeOH 3:7
74	0,0013	Hex:AcOEt:6:4	83	0,0016	
75	0,0084		84	0,0013	AcOEt:MeOH 1:9
76	0,003		85	0,0017	AcOEt:MeOH 9:1

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1 – IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO HEXÂNICO

#### 3.1.1 – Mistura de hidrocarbonetos (PG01)

Em geral, alguns órgãos de plantas, principalmente as folhas, são recobertos externamente por uma camada fina de cera, que desempenha grande importância biológica nas relações entre a planta e o meio ambiente em que esteja inserida. Por definição, ceras epidérmicas são compostos hidrofóbicos da superfície das plantas, que podem ser removidas por uma breve imersão em solvente orgânico, como clorofórmio ou hexano. Elas são misturas complexas de compostos de cadeias longas ( $>C_{18}$ ), tais como ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos alifáticos polinucleares e compostos fenólicos e outros, que podem apresentar massas moleculares altas. (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

**PG01** foi obtido a partir de frações oriundas do fracionamento por cromatografia em coluna da fração hexânica (EHH), oriunda do extrato hexânico das folhas de *Pouteria gardnerii*, conforme descrição na página 44, e apresentou-se como uma cera esbranquiçada (34,8 mg), solúvel em hexano. PG01 foi identificado pela espectrometria de infravermelho e RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  em comparação com os dados da literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

Comparando os sinais da literatura no espectro de infravermelho com os sinais presentes no espectro de **PG01** (KBr,  $cm^{-1}$ ) (FIGURA 3.1, página 55) foram observadas bandas de absorção em 2917 e 2849  $cm^{-1}$ , características de estiramento da ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; absorções entre 1473 e 1462  $cm^{-1}$  atribuídas a deformações angulares de ligação C-H de grupos metilênicos; e em 730 e 719  $cm^{-1}$ , correspondentes à deformação angular assimétrica de ligação C-H de grupamentos metilênicos contendo  $C_{n \geq 4}$ .

O espectro de RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ) de **PG01** (FIGURA 3.2, página 55) apresentou um sinal em  $\delta 0,8$ , melhor observado na expansão da região do espectro (FIGURA 3.3, página 56), atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal; e um sinal  $\delta 1,30$  relativo a hidrogênios metilênicos.

No espectro de RMN de  $^{13}C$  (APT, 75 MHz,  $CDCl_3$ ) de **PG01** (FIGURA 3.4, página 56) foram observados os seguintes sinais:  $\delta 14,1$  (atribuído a carbono de grupo

metila terminal);  $\delta$ 22,7;  $\delta$ 29,3;  $\delta$ 29,7 e  $\delta$ 31,9 (atribuídos a carbonos metilênicos), compatíveis com os deslocamentos químicos descritos para os sinais de carbono de hidrocarbonetos alifáticos.

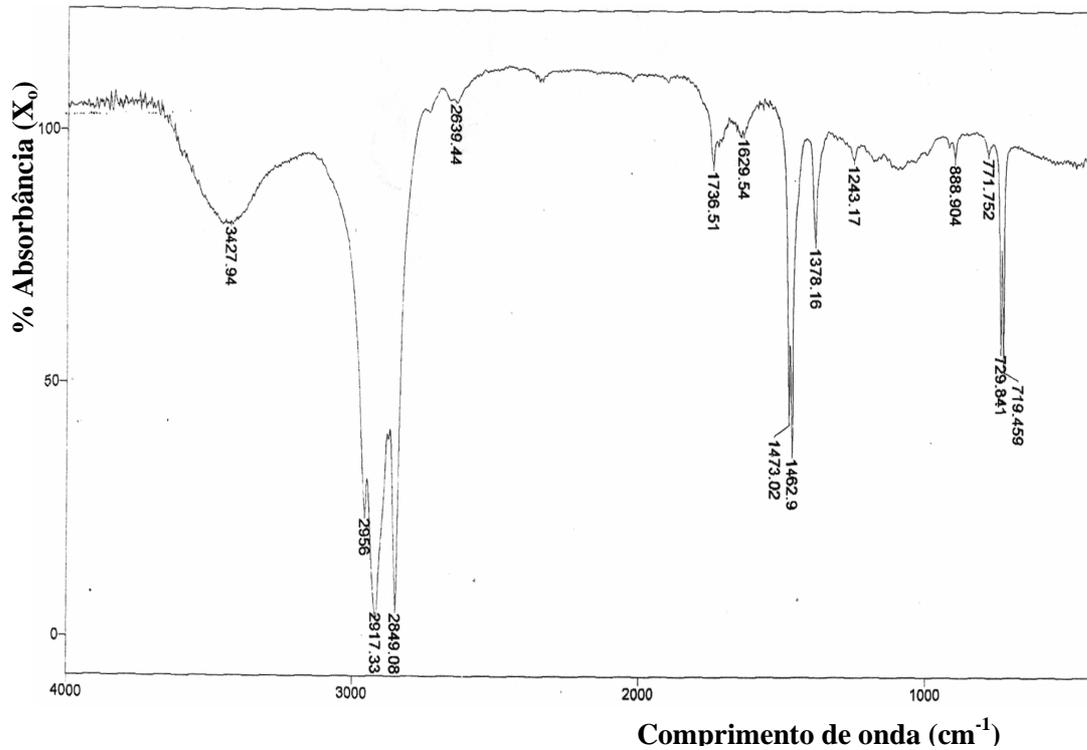


FIGURA 3.1: Espectro na região do Infravermelho (KBr, cm<sup>-1</sup>) de PG01

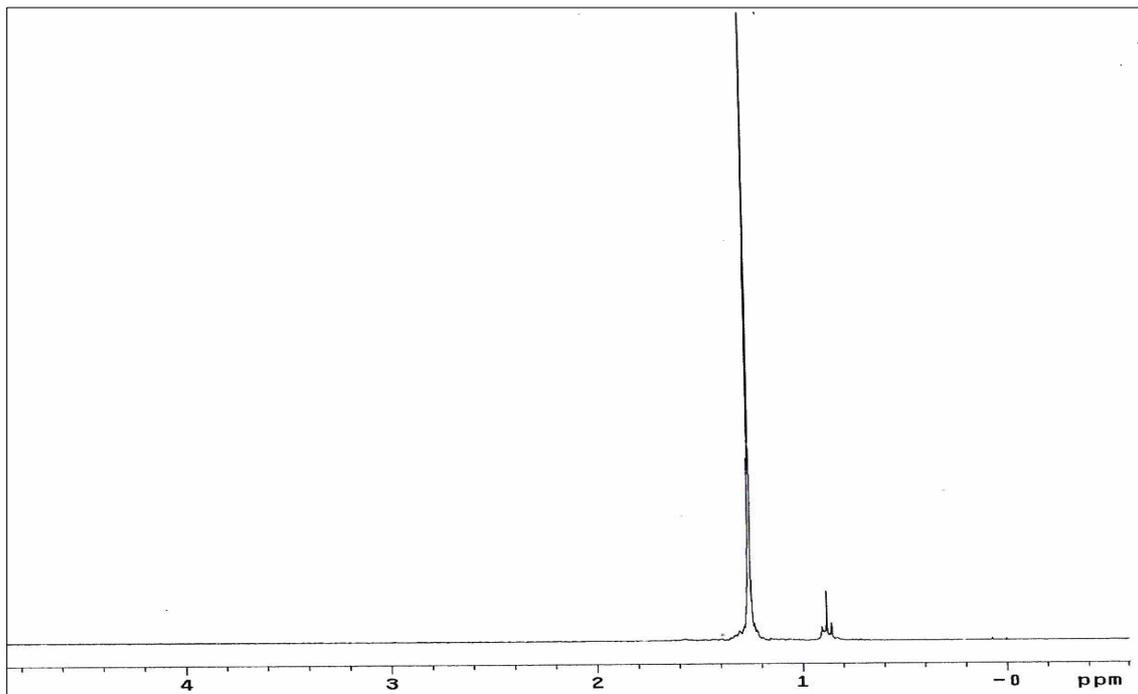


FIGURA 3.2: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de PG01 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

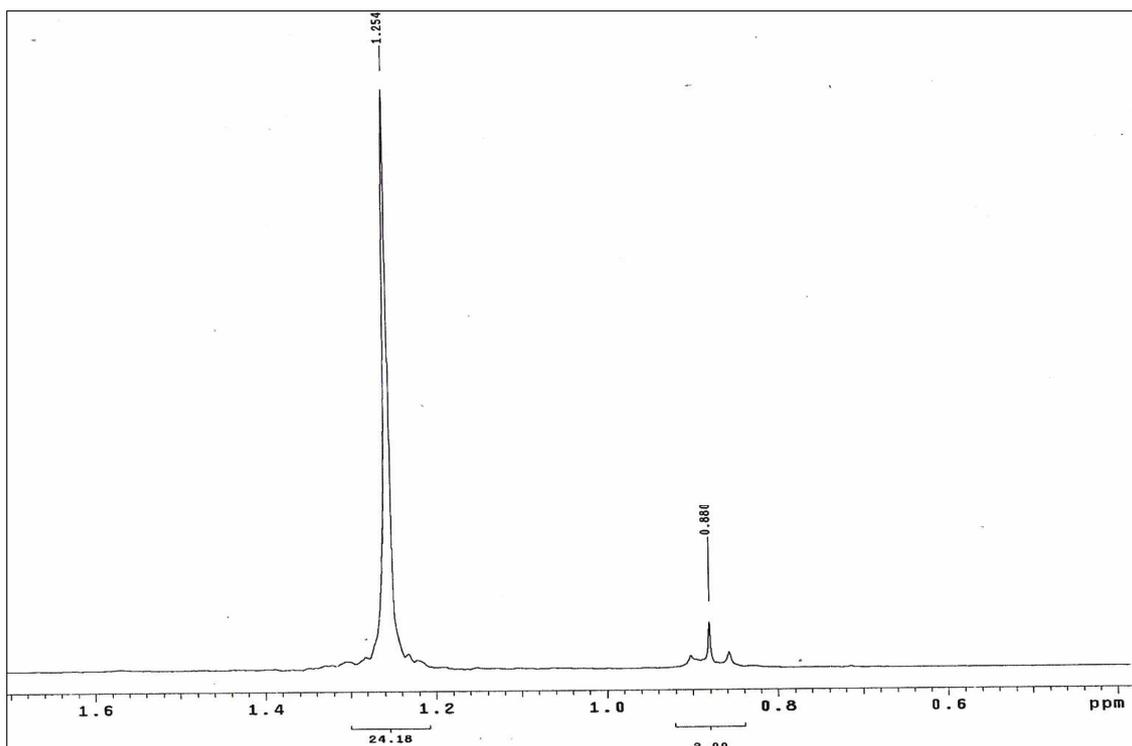


FIGURA 3.3: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG01 – Expansão da região entre  $\delta 0,5$ - $\delta 1,0$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

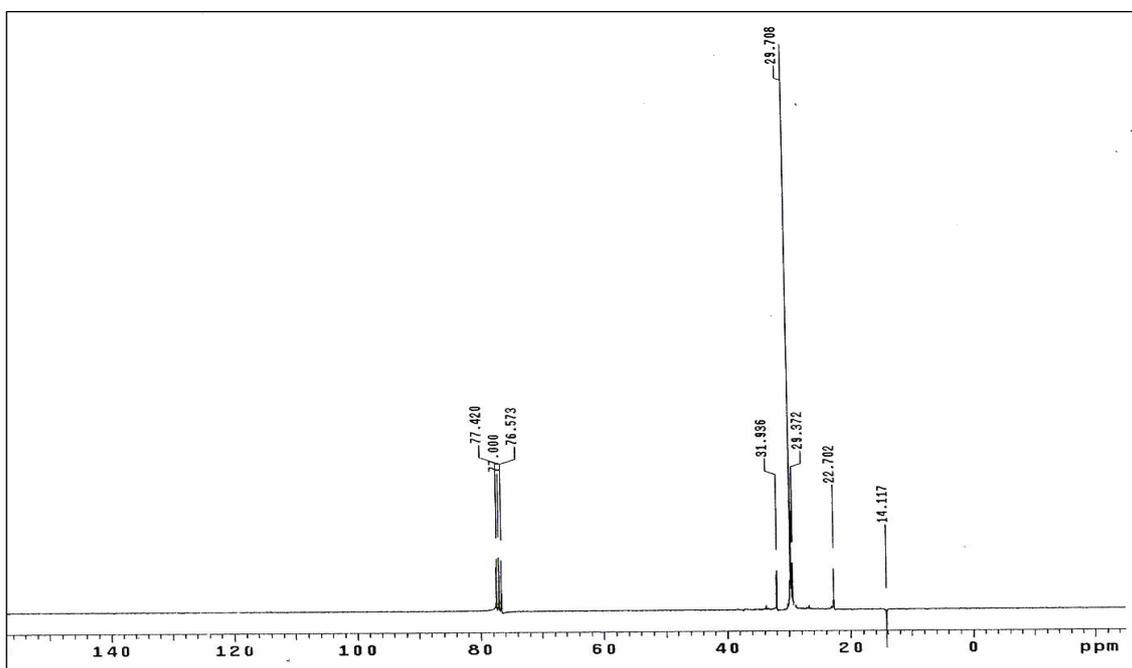


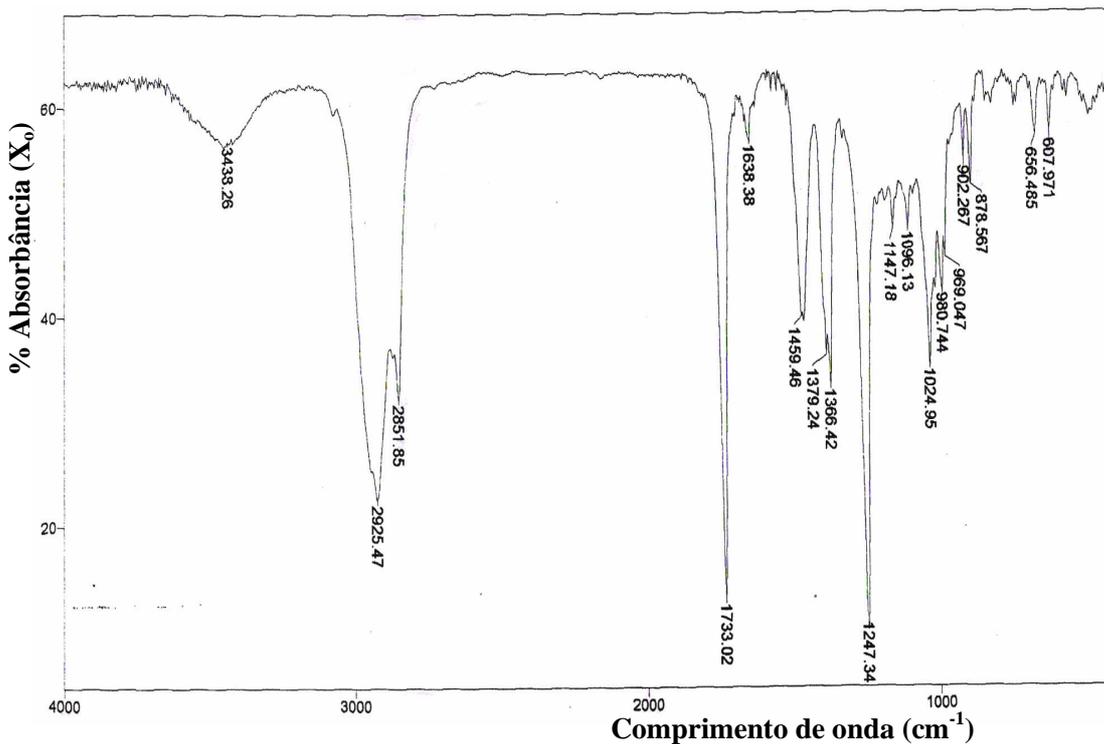
FIGURA 3.4: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PG01 (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas na região do IV e de RMN sugeriram que **PG01** é constituído, principalmente, de **uma mistura de hidrocarbonetos**.

### 3.1.2 – Mistura de triterpenos e ésteres de ácidos graxos (PG02)

**PG02** apresentou-se como um sólido esbranquiçado, amorfo (33,8 mg), solúvel em clorofórmio. Foi obtido por fracionamento em coluna cromatográfica da fração Hex :ACOEt (1:1), oriunda do extrato hexânico de *Pouteria gardnerii*, conforme descrito na página 45.

No espectro de infravermelho **PG02** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) (FIGURA 3.5, página 57), foram observadas duas bandas de absorção em 2925 e 2851 $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento da ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; bandas em 1733 $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento de ligação C=O de éster; banda de absorção em 1638  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à ligação dupla C-C; absorções em 1247 e 1024 $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a estiramento de ligação C-O de éster e, ainda, banda em 980 $\text{cm}^{-1}$  característica de deformação de ligação C-H fora do plano (SILVERSTEIN *et al.*, 2000 e NEPLAM, 2007).



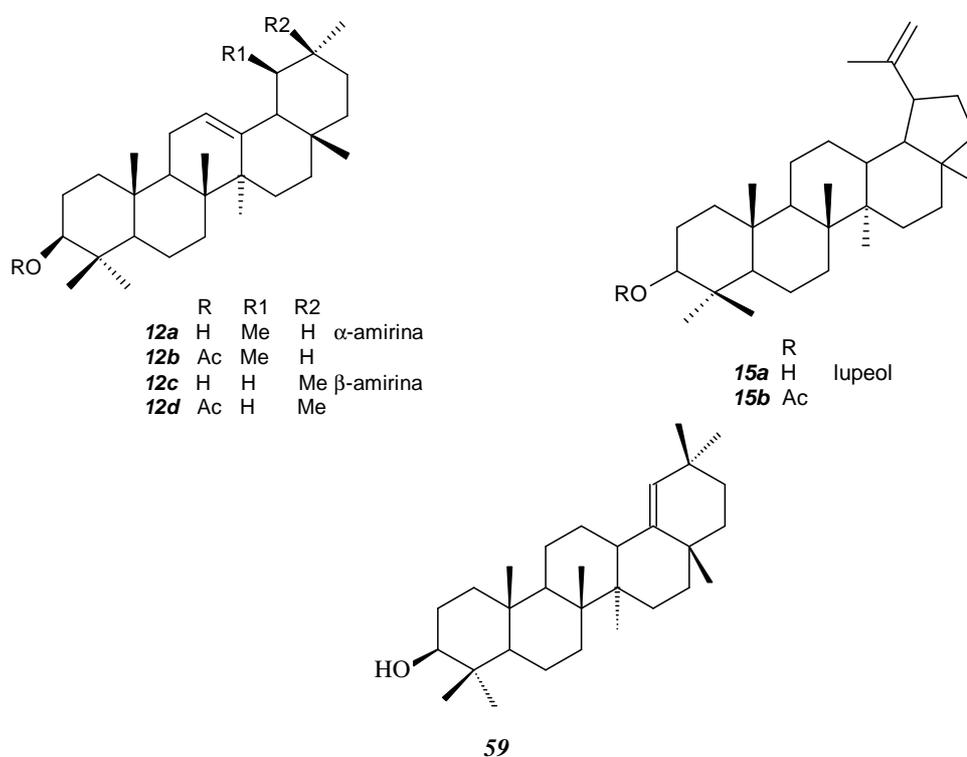
**FIGURA 3.5:** Espectro na região do Infravermelho de PG02 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

Geralmente, a espectrometria de massas, quando utilizada sozinha, é insuficiente para a determinação estrutural de moléculas alvo. Entretanto, no caso de compostos de natureza triterpênica ou esteroidal, principalmente compostos em misturas que por

motivos vários não podem ser isolados de forma apropriada, a interpretação do espectro de massas é muito útil.

**PG02** foi analisado pela Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e o cromatograma é apresentado na FIGURA 3.6, página 60.

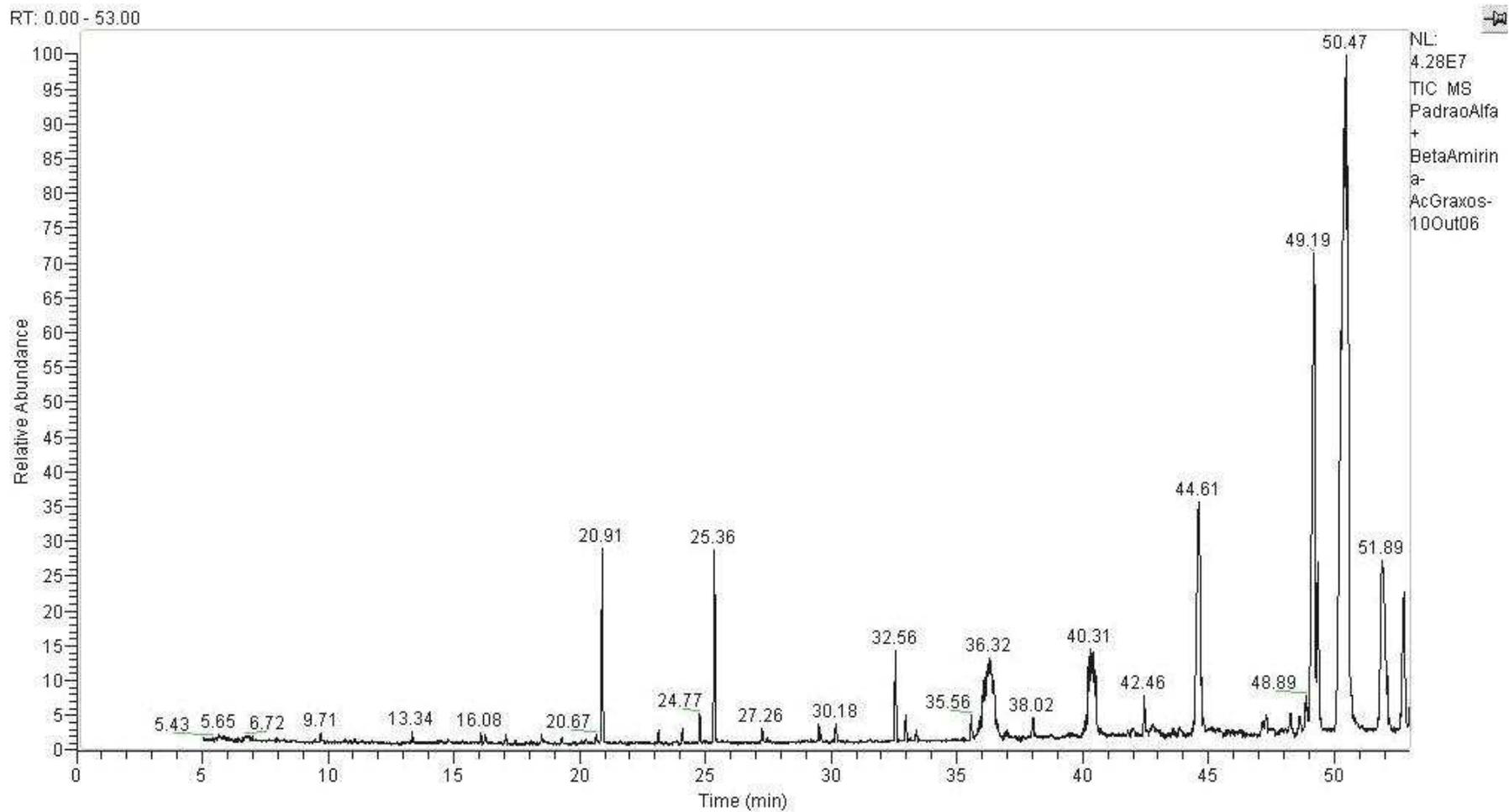
Os dados da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas foram comparados com os do banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology) que sugeriu a presença de 5 triterpenos:  $\alpha$ -amirina (**12a**),  $\beta$ -amirina (**12c**), germanicol (**59**), acetato de  $\alpha$ -amirina (**12b**) e acetato de lupeóla (**15b**). Os compostos sugeridos por este banco de dados estão apresentados na TABELA 3.1, página 59.



**TABELA 3.1 – Dados da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de PG02**

<b>Identificação NIST*</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Abundância relativa (%)</b>
Ácido graxo insaturado 1	298	20,91	
Ácido graxo insaturado 2	298	23,14	
Ácido graxo insaturado 3	264	24,77	
Ácido graxo insaturado 4	312	25,36	
Ácido graxo insaturado 5	326	27,45	
Ácido graxo insaturado 6	340	29,51	
Ácido graxo insaturado 7	368	33,39	
β-amirina	426	48,89	15,54%
α-amirina	426	49,19	32,62%
germanicol	426	49,36	65,66%
Acetato de α-amirina	468	50,26	44,19%
Acetato de lupeíla	468	50,45	68,51%

\*NIST: National Institute of Standards and Technology



**FIGURA 3.6 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PG02 (IE, 70eV)**

### 3.1.2.1. Análise do CG-EM no tempo de retenção 48,89 min.

No espectro de massas referente ao  $T_R=48,89$  min, foi sugerido pelo banco de dados NIST a presença do triterpeno  $\beta$ -amirina.

Comparando os dados a literatura, os sinais de fragmentação mais abundantes, dentre outros,  $m/z$  218;  $m/z$  205,  $m/z$  204 (não assinalado),  $m/z$  203 (não assinalado),  $m/z$  189,  $m/z$  109 e  $m/z$  95, são compatíveis com aqueles característicos de triterpenos do tipo amirina, porém, a presença do fragmento  $m/z$  205, caracteriza os triterpenos  $\delta$ -amirina (**60**) ou  $\beta$ -amirina (**61**) (HE *et al.*, 1998; ERCIL *et al.*, 2004; VILEGAS *et al.*, 1997).

Considerando que derivados ursano apresentam o sinal de fragmentação  $m/z$  189 menos intenso do que  $m/z$  203 e os derivados oleano apresentam essa relação inversa (GIESE, 2005), os dados sugerem que o espectro de massa apresentado na FIGURA 3.7, seja referente à  $\delta$ -amirina (**60**). Além disso os fragmentos  $m/z$  109 e  $m/z$  95, confirmam a presença desse composto da família dos ursanos

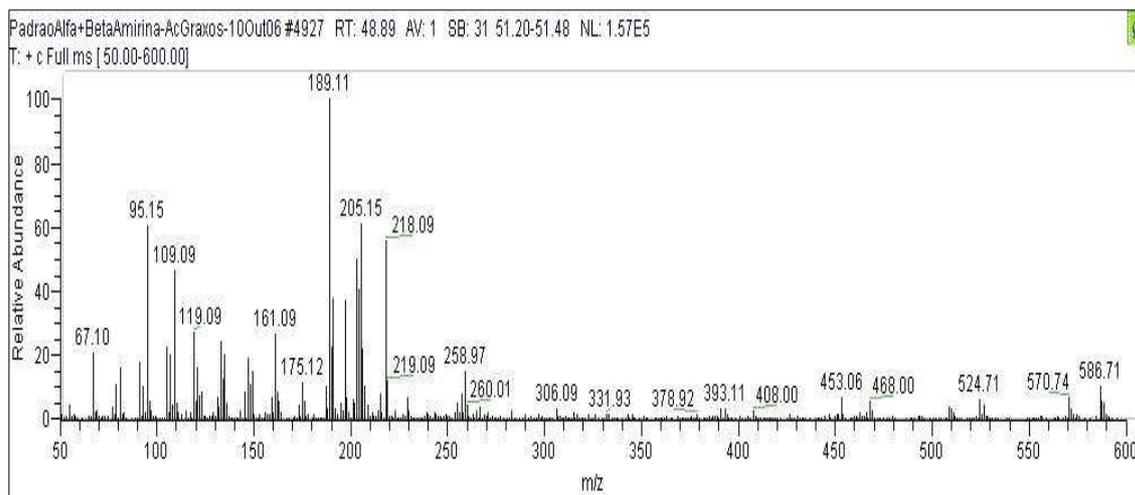
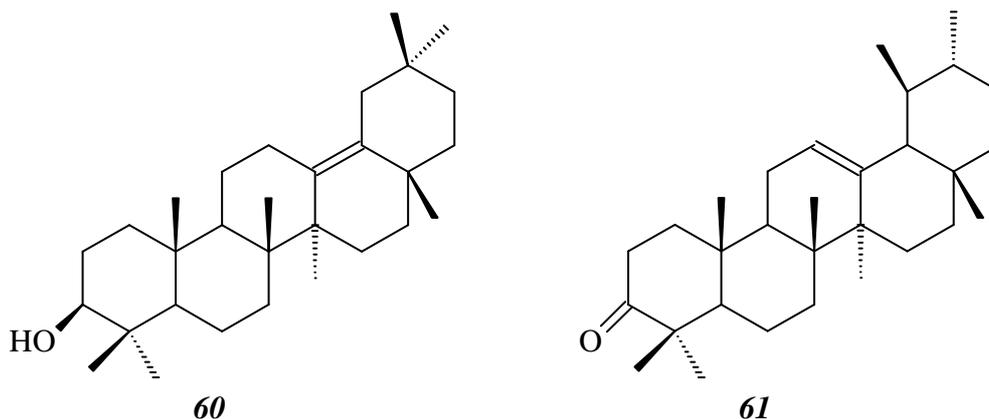


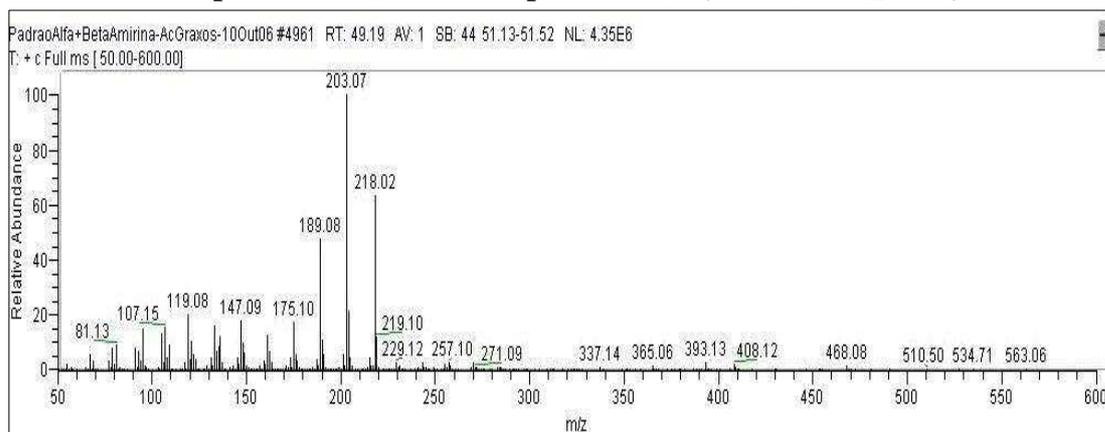
FIGURA 3.7: Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R=48,89$  min



### 3.1.2.2. Análise do CG-EM no tempo de retenção 49,19 min.

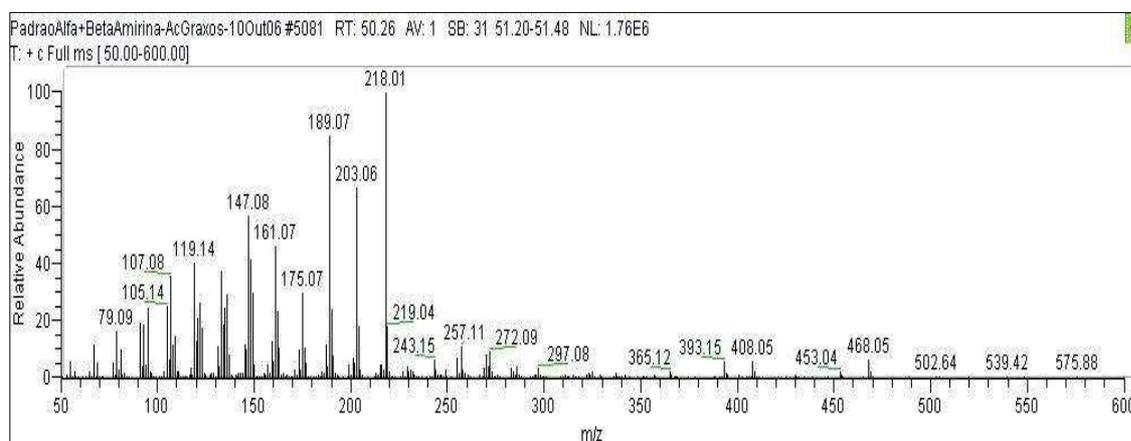
De acordo com o banco de dados NIST, o espectro de massas correspondente ao tempo de retenção ( $T_R$ ) 49,19 min. foi identificado como sendo do triterpeno do tipo amirina (FIGURA 3.8). De fato, a análise do espectro de massas mostra os sinais referentes à fragmentação característica desses compostos. Entretanto, da mesma forma que no espectro de massas referente ao  $T_R = 48,89$  min, o que caracteriza efetivamente  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina é a relação entre os sinais referentes a  $m/z$  189 e  $m/z$  203: como os derivados ursano apresentam sinal referente a  $m/z$  189 menos intenso do que o sinal  $m/z$  203 (FIGURA 3.8) (GIESE, 2005), os dados sugerem que que o espectro de massas apresentado na FIGURA 3.8, seja referente à  $\alpha$ -amirina (**12a**).

**FIGURA 3.8: Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R = 49,19$  min.**



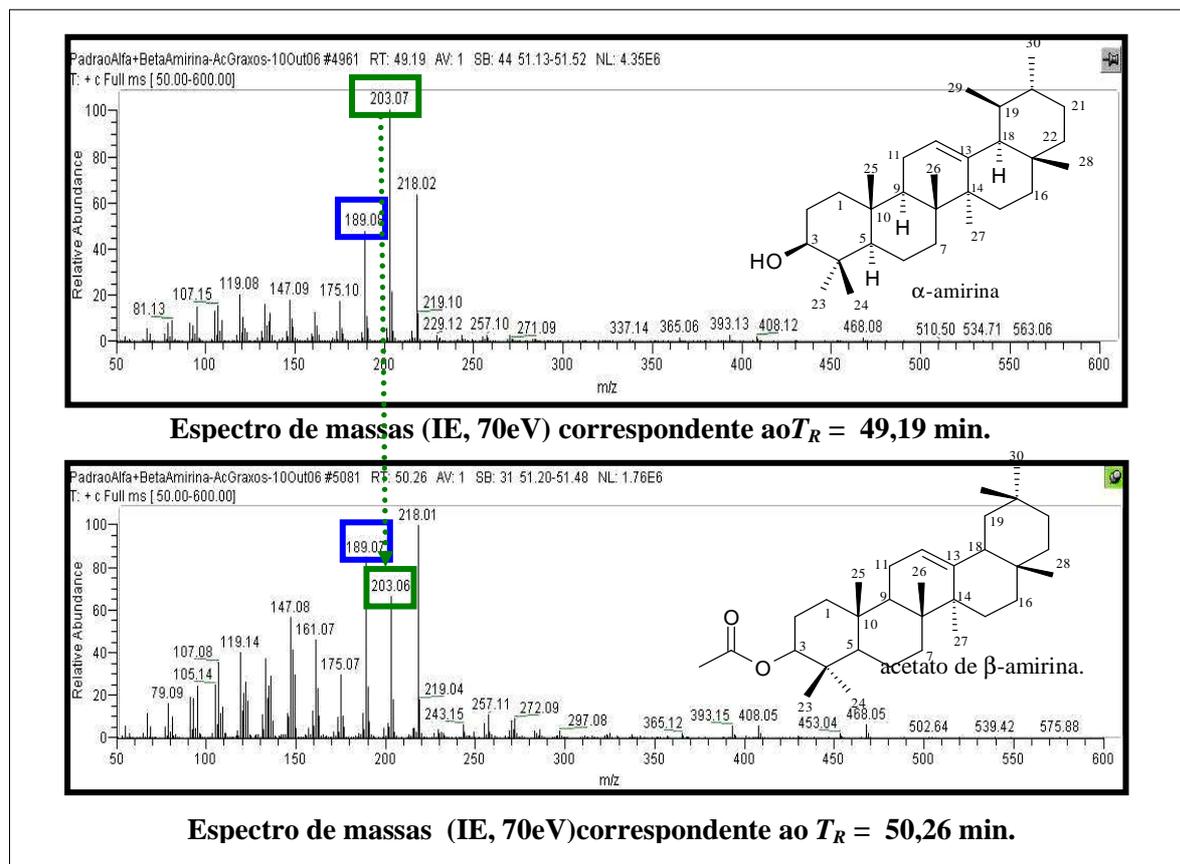
### 3.1.2.3. Análise do CG-EM no tempo de retenção 50,26 min

De acordo com a biblioteca NIST, o espectro de massas referente ao  $T_R = 50,26$  min corresponde ao acetato de amirina. De fato, a comparação do perfil de fragmentação com os dados da literatura, mostra que o espectro de massas apresenta os fragmentos esperados para esse composto (FIGURA 3.9). E o padrão de abundância de fragmentos, que diferencia a série ursano da série oleano (GIESE, 2005), sugere que seja o acetato de  $\beta$ -amirina (*12d*).



**FIGURA 3.9: Espectro de massa correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R = 50,26$  min.**

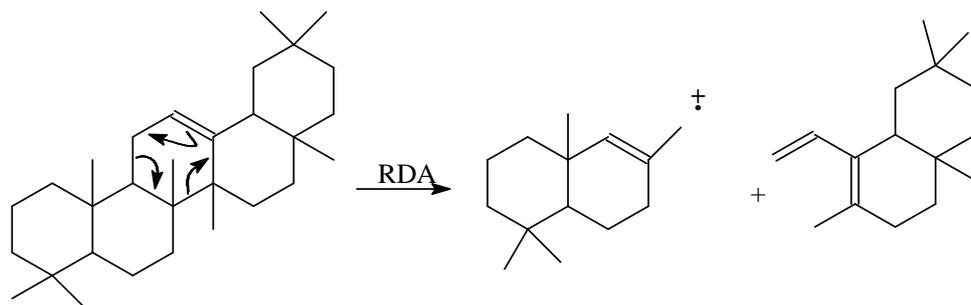
Os espectros de massas de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina apresentam o mesmo padrão de fragmentação, com fragmentos característicos em  $m/z$  189,  $m/z$  203 e  $m/z$  218. A diferença entre os espectros desses dois triterpenos está relacionada à intensidade dos sinais apresentados: o sinal de fragmentação em  $m/z$  203 para  $\alpha$ -amirina apresenta-se mais intenso do que esse sinal para  $\beta$ -amirina (BASAR, 2005), como pode ser observado na FIGURA 3.10, página 64. Outra diferença está relacionada com os fragmentos  $m/z$  189 e  $m/z$  203, pois, derivados ursano apresentam um sinal em  $m/z$  189 menos intenso do que em  $m/z$  203, e derivados oleano apresentam essa relação de forma inversa (GIESE, 2005).



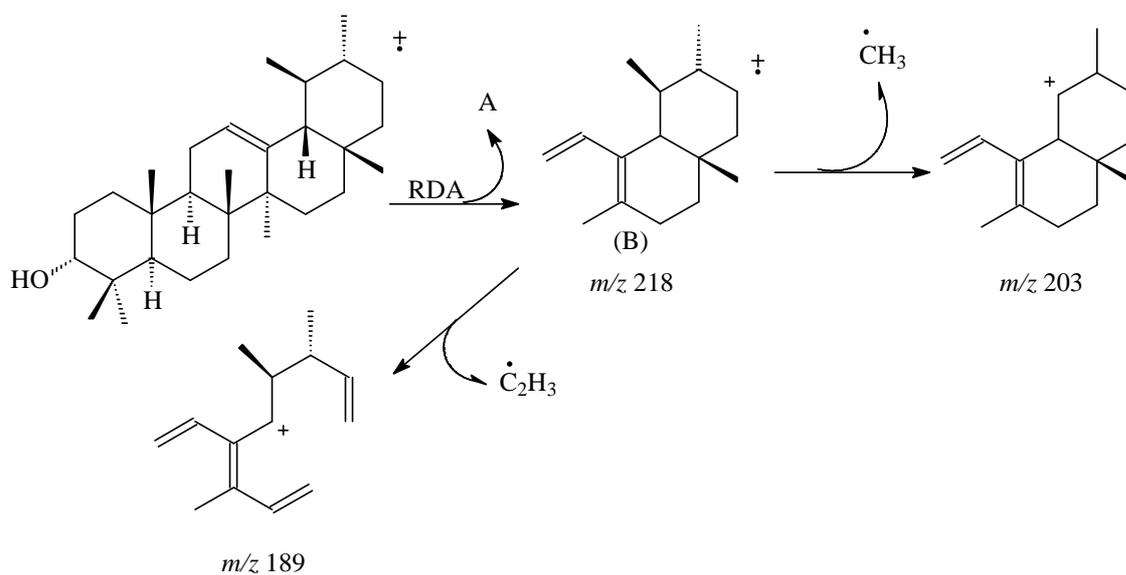
**FIGURA 3.10: Comparação entre os espectros de massas dos derivados ursano e derivados oleano.**

Os estudos sobre o padrão de fragmentação de triterpenos pentacíclicos indicam que se a molécula possui uma ligação dupla na posição C12, a fragmentação mais característica ocorre via uma reação Retro-Diels-Alder (FIGURA 3.11, página 65). Esse padrão aparece com muita frequência em triterpenos das séries ursano e oleano, às quais pertencem, respectivamente,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (**12a** e **12c**) (GIESE *et al.*, 2005).

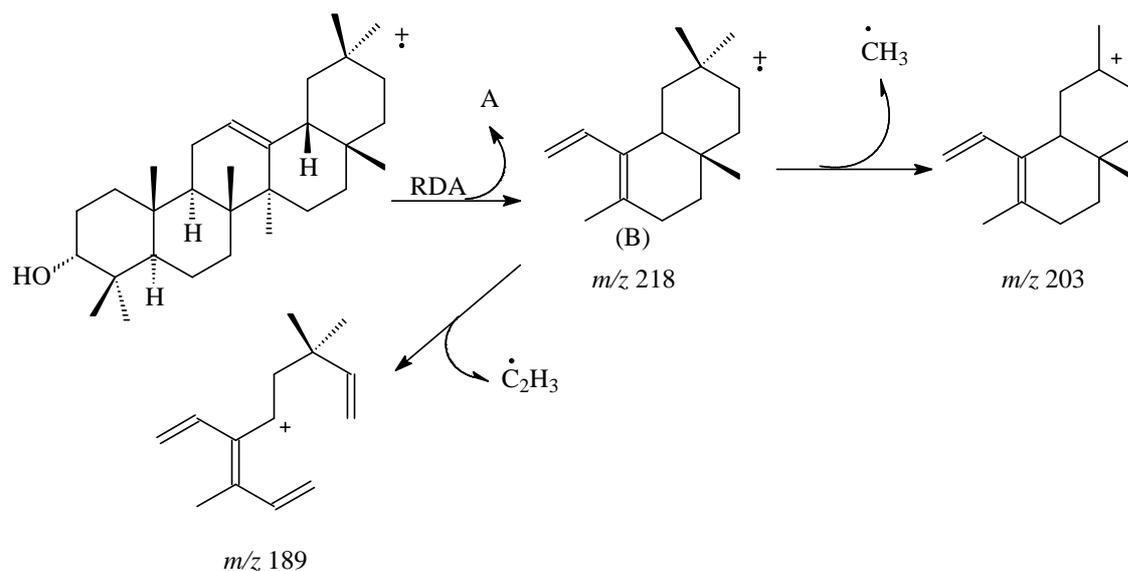
Para esses triterpenos, essa fragmentação fornece sinal correspondente no mesmo valor  $m/z$  218 (FIGURAS 3.12 e 3.13, páginas 65 e 66). Também tem sido observado que o fragmento produzido pela RDA, contendo o sistema anelar C-D-E ( $m/z$  218), perde primeiro, preferencialmente, o grupo funcional na posição C19, para derivados ursano e C20 para derivados oleano (BASAR, 2005).



**FIGURA 3.11:** Fragmentação característica de triterpenos pentacíclicos com dupla ligação na posição C12, via reação Retro-Diels-Alder (RDA).



**FIGURA 3.12:** Proposta de fragmentação de  $\alpha$ -amirina (série ursano) por mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)



**FIGURA 3.13 – Proposta de fragmentação de  $\beta$ -amirina (série oleano) por mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)**

#### 3.1.2.4. Análise do CG-EM no tempo de retenção 49,36 min

De acordo com o banco de dados NIST, o espectro referente ao  $T_R = 49,36$  min refere-se ao germanicol (**59**). De fato, apesar de ser um triterpeno da série oleanano, BAUER (2002) propõe que a ordem de eluição de uma mistura seja:  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina e germanicol, o que corrobora o presente achado. Além disso, no espectro de massas correspondente ao  $T_R = 49,36$  min (FIGURA 3.14, página 67), podem ser observados os sinais referentes à fragmentação desse composto. Entretanto, diferente do que é esperado (BAUER, 2002), o pico base não corresponde ao fragmento  $m/z$  204 (FIGURA 3.15, página 67).

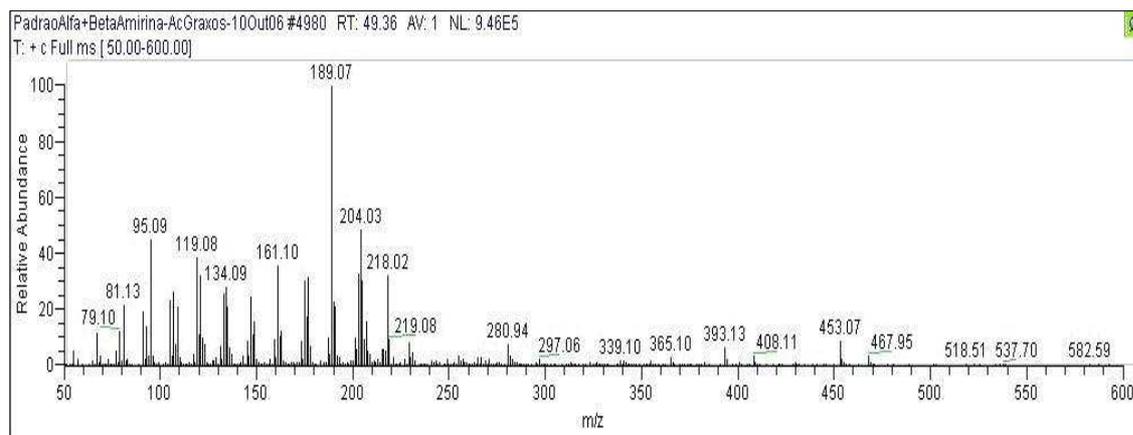


FIGURA 3.14: Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R = 49,36$  min.

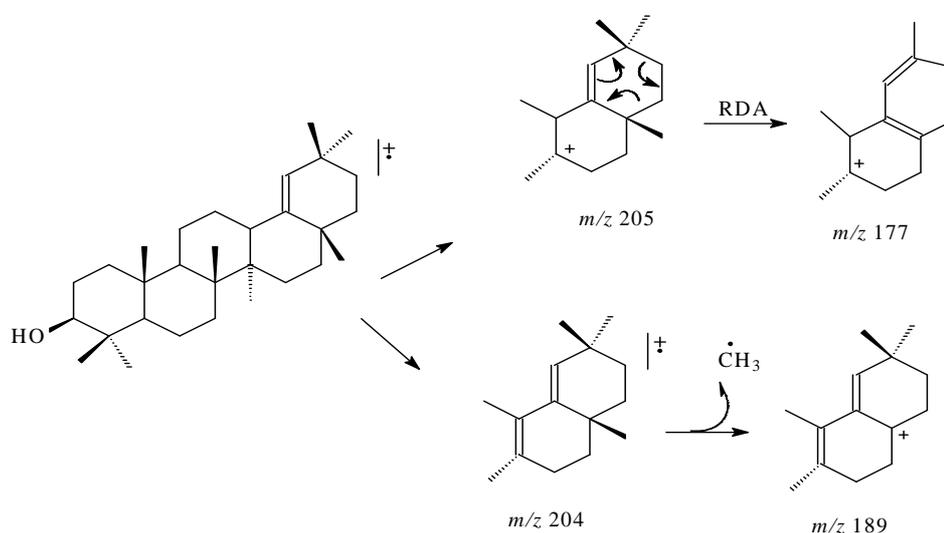
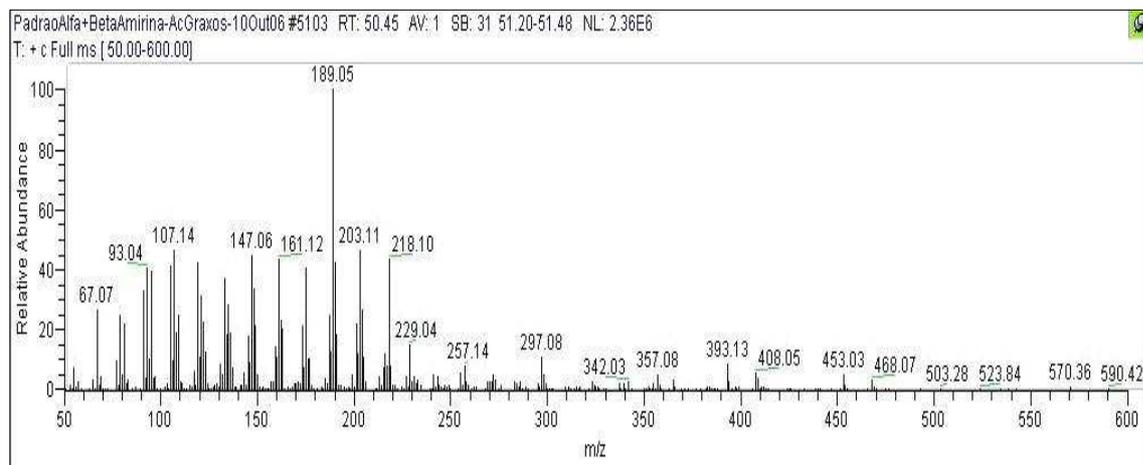


FIGURA 3.15: Proposta de fragmentação do germanicol (série oleano) por mecanismo envolvendo reação Retro-Diels-Alder (RDA)

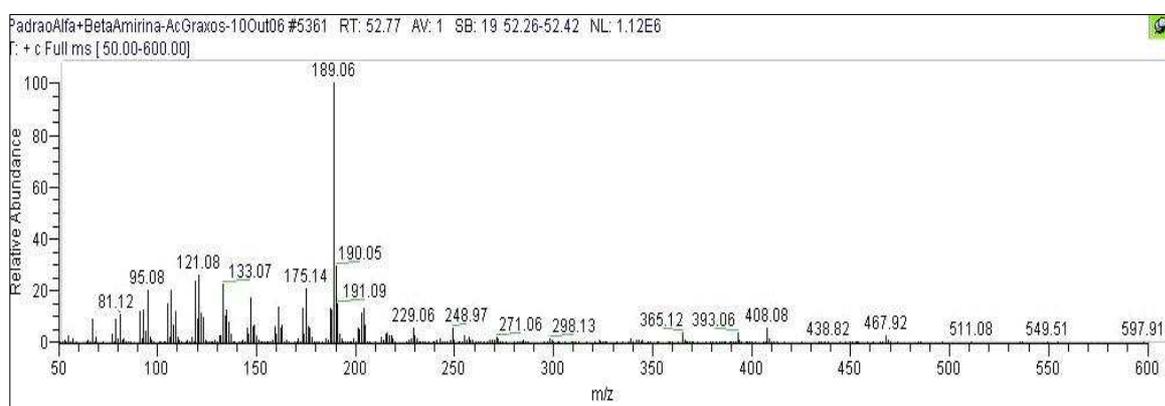
### 3.1.2.5. Análise do CG-EM nos tempos de retenção 50,45 min e 52,77 min

O padrão de fragmentação do espectro de massas referente ao  $T_R=50,45$  min corresponde àquele esperado para o acetato de lupeóla (**15b**) (TABELA 3.2, página 69): fragmento  $m/z$  408, correspondente à perda do grupo acetila;  $m/z$  218 correspondente à clivagem sigma nos carbonos C-8/C14 e C-9/C11 (SILVA, 2004;VILEGAS *et al.*, 1997)

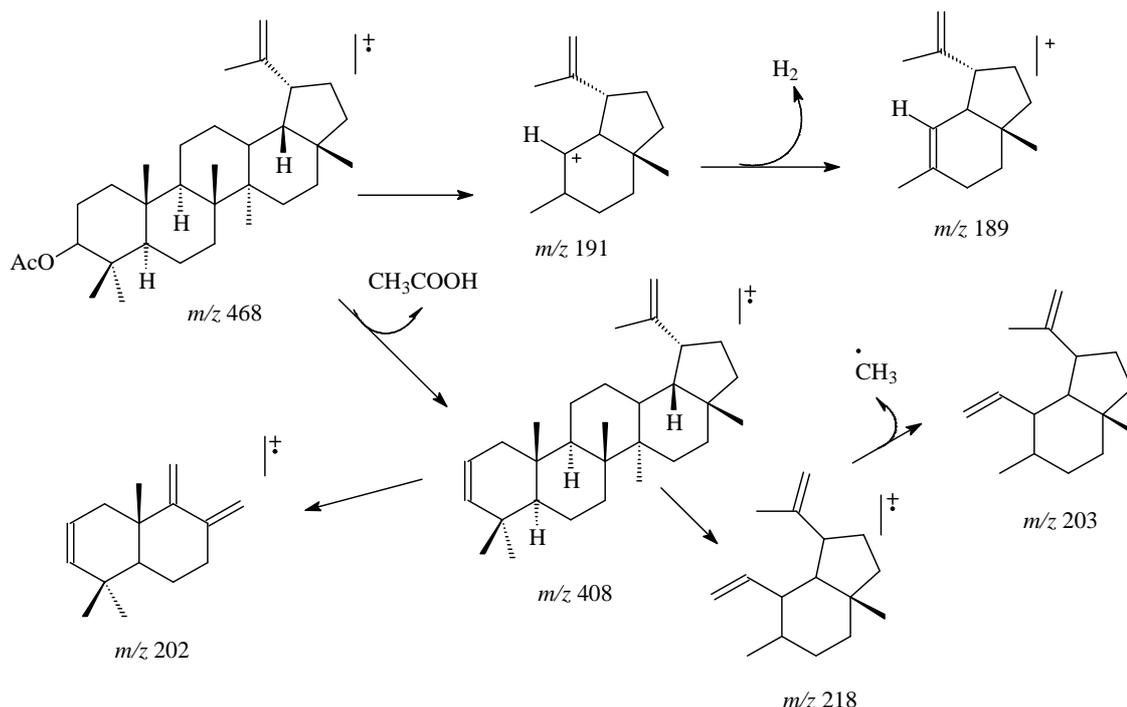
(FIGURA 3.16, página 65). Da mesma forma, no  $T_R = 52,77$  min, o padrão de fragmentação é também semelhante ao lupeol, o que sugere a presença de um isômero desse composto (FIGURA 3.17). A proposta de fragmentação do acetato de lupeíla pode ser observada na FIGURA 3.18, página 69.



**FIGURA 3.16:** Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R = 50,45$  min.



**FIGURA 3.17:** Espectro de massas correspondente (IE, 70eV) ao  $T_R = 52,77$  min.



**FIGURA 3.18 – Proposta de fragmentação de acetato de lupeíla (série lupano) por mecanismo envolvendo clivagem sigma e rearranjos**

A TABELA 3.2 apresenta os sinais de fragmentação mais abundantes em alguns triterpenos.

**TABELA 3.2: Fragmentações mais relevantes em alguns triterpenos**

Triterpeno	Fragmentação ( $m/z$ )
$\alpha$ -amirina	426 (M+), 218 (100%), 207, 203, 189
Acetato de $\alpha$ -amirina	468 (M), 408, 365, 249, 218 (100%), 203, 189
Acetato de $\beta$ -amirina	468 (M), 408, 365, 249, 218 (100%), 203, 189
$\beta$ -amirina	426 (M+); 218 (100%), 207; 203; 189
$\delta$ -amirina	426 (M+); 411; 408; 229; 218; 205; 189; 109 (100%); 95
Lupeol	426 (M+), 234, 219; 207; 189 (100%); 135; 121; 107
Acetato de lupeíla	468 (M+), 408, 365, 218, 189 (100%)
Germanicol	426 (M+); 408; 393; 231; 218; 204 (100%); 189; 177
Acetato de germanicol	468 (M+); 408; 393; 231; 218; 204 (100%); 189; 177

**HE et al., 1998; ERCIL et al., 2004; VILEGAS et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004; LI et al., 2000 .**

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **PG02** mostrou sinais característicos de triterpenos dos esqueletos do tipo oleano, ursano e lupano.

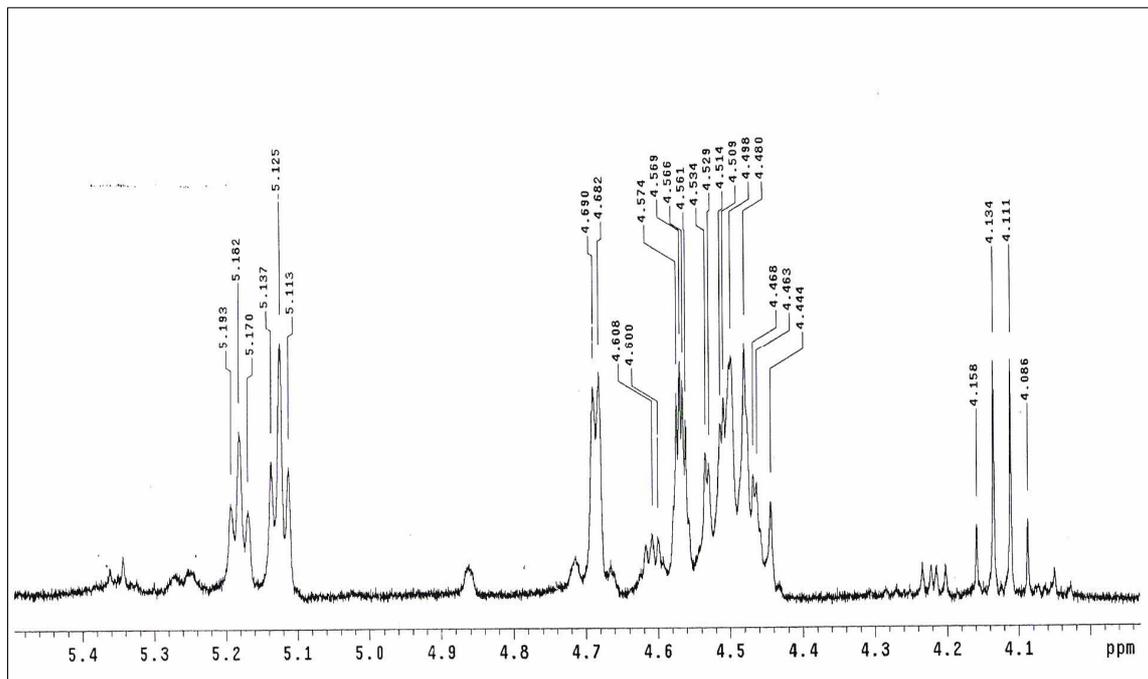
Nos espectros expandidos de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **PG02**, (FIGURAS 3.19 e 3.20, páginas 71) podem ser observados sinais em  $\delta 0,78$  e  $\delta 1,55$  correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos dos esqueletos citados; em  $\delta 1,68$  foi observado um simpleto, atribuído aos hidrogênios do grupo metila em C30 do esqueleto lupano; e além disso, foram observados dupletos em  $\delta 4,68$  ( $J=2,4\text{Hz}$ , 1H) e em  $\delta 4,60$  ( $J= 2,4\text{Hz}$ , 1H), correspondentes aos hidrogênios olefínicos da dupla terminal do esqueleto lupano (BARREIROS, 2000; SILVA *et al.*, 1998; NEPLAM, 2007).

Em  $\delta 5,18$  aparece um tripleto ( $J=3,6\text{Hz}$ , 1H), correspondente ao hidrogênio olefínico em C12 do esqueleto oleano e outro tripleto em  $\delta 5,12$  ( $J=3,6\text{Hz}$ , 1H), correspondente ao hidrogênio olefínico em C12 dos ursano (BARREIROS, 2000; NEPLAM, 2007).

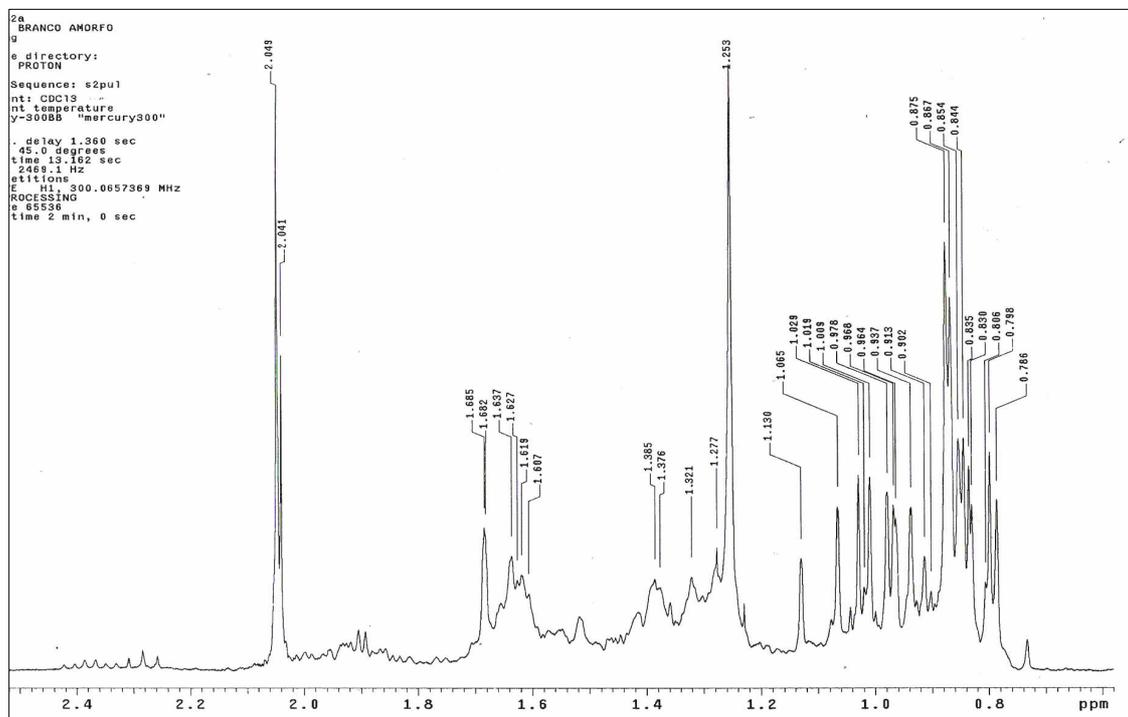
Apesar de a análise de **PG02** por CG-EM ter evidenciado a presença de germanicol (**59**), não foi possível observar os sinais característicos dessa estrutura, tais como um sinal em  $\delta 3,96$  (1H, *dd*,  $J= 11,5$  e  $6,2\text{Hz}$ ) correspondente ao hidrogênio H-3, ou o simpleto em  $\delta 4,86$ , correspondente ao hidrogênio olefínico em C19 (KOUL *et al.*; 2000; MAHATO & KUNDU, 1994). Entretanto foram observados os sinais característicos do acetato de  $\alpha$ -amirina, dentre eles os sinais entre  $\delta 0,79$  e  $\delta 1,07$ , correspondentes aos hidrogênios metilênicos e metílicos; e o sinal em  $\delta 2,05$  (3H, *s*) correspondente aos hidrogênios do grupo acetila (KHINE, 2006).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APT, 75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (FIGURA 3.21, página 72) apresentou sinais do carbono não hidrogenado  $sp^2$  (C20) e o do carbono (C29) do esqueleto dos lupoanos que aparecem em  $\delta 150,9$  e  $\delta 109,3$  respectivamente, e o sinal referente ao grupo metila (C30) ligado ao carbono  $sp^2$  (C20), aparece em  $\delta 19,2$ . Os sinais em  $\delta 170,8$  e  $21,3$  foram atribuídos aos carbonos do grupo acetila.

Os sinais dos carbonos olefínicos de esqueleto ursano e oleano também foram verificados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Os sinais do carbono  $sp^2$  não hidrogenado (C13) e do carbono  $sp^2$  (C12) aparecem em  $\delta 139,6$  e  $\delta 124,2$ , respectivamente para ursano; e em  $\delta 143,1$  e  $\delta 121,7$  para oleano. (CORTEZ, 1993; MAHATO *et al.*, 1992; MAHATO & KUNDU, 1994; BARREIROS, 200 e NEPLAM, 2007). Os sinais correspondentes podem ser acompanhados na TABELA 3.3, página 73.



**FIGURA 3.19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG02 – Expansão da região entre  $\delta$ 4,0-  $\delta$ 5,5(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**FIGURA 3.20:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG02 – Expansão da região entre  $\delta$ 0,8-  $\delta$ 2,4(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A comparação dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  de **PG02** com os dados da literatura para germanicol (MAHATO & KUNDU, 1994), permitiu observar a ausência, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , dos sinais dos carbonos olefínicos C14 e C19, cujos deslocamentos químicos são  $\delta$ 142,8 e  $\delta$ 129,8, respectivamente (TABELA 3.4, página 74). (MAHATO & KUNDU, 1994; SEGURA *et al.*; 2000)

Entretanto, foram encontrados os 32 sinais referentes ao triterpeno acetato de  $\alpha$ -amirina, como por exemplo o sinal do carbono olefínico C12 que aparece em  $\delta$  124,3 e sinais em  $\delta$ 170,8 e 21,3 que foram atribuídos aos carbonos do grupo acetila. Os outros sinais podem ser conferidos na TABELA 3.4, página 74 (BALESTRIN, 2006).

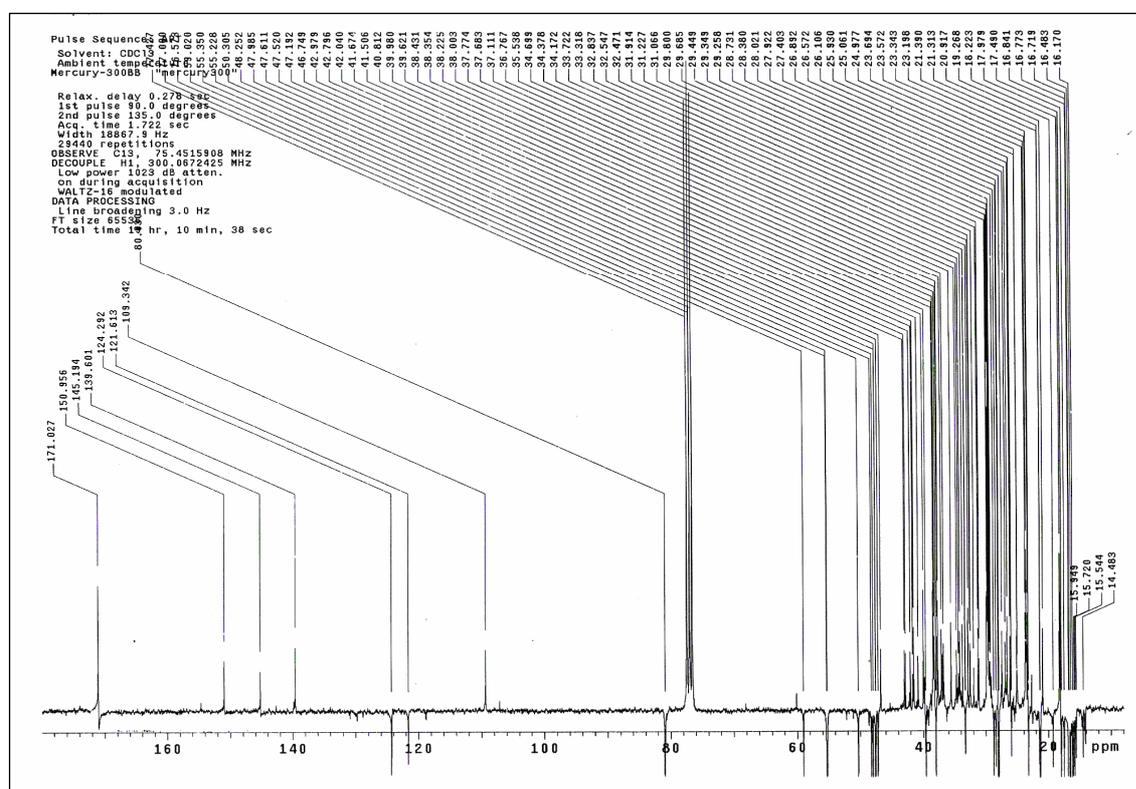


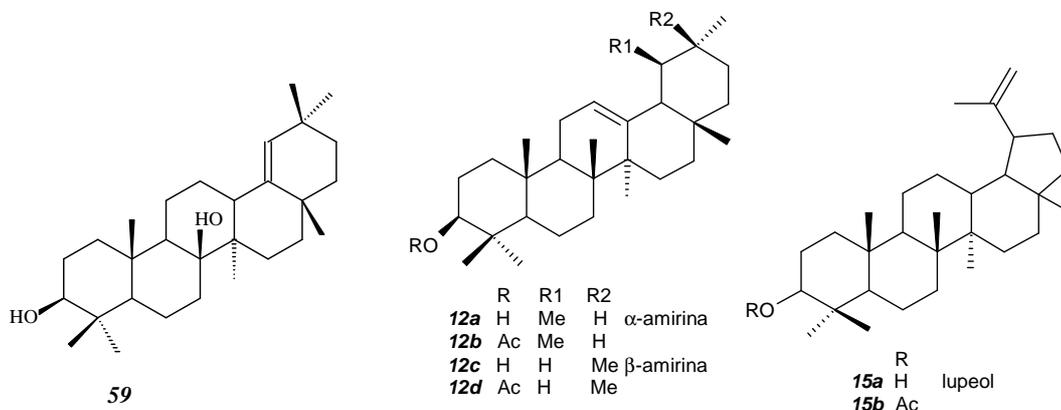
FIGURA 3.21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PG02 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas no IV e de RMN sugeriram que **PG02** é constituído principalmente, de uma mistura dos triterpenos acetato de lupeíla (**15a**),  $\alpha$ -amirina (**12a**),  $\beta$ -amirina (**12c**), e acetato de  $\alpha$ -amirina (**12b**), cujas estruturas encontram-se na página 73.

**TABELA 3.3: Atribuição dos deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) dos carbonos de PG02, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) (SOLICHIN, 1980; MAHATO & KUNDU, 1994)**

C	PGC 2 ( $\delta$ )	Acetato de Lupeola <sup>1</sup>	PCG02 ( $\delta$ )	$\alpha$ - amirina <sup>2</sup>	$\beta$ - amirina <sup>2</sup>
1	38,4	38,4	38,4	38,7	38,7
2	23,7	23,7	27,4	27,2	27,3
3	80,9	81,0	80,9	78,3	79,0
4	37,8	37,8	38,4	38,7	38,8
5	55,3	55,4	55,2; 55,3	55,2	55,3
6	18,2	18,2	18,2	18,3	18,5
7	34,3	34,3	32,8	32,9	32,8
8	40,8	40,9	39,9	40,0	38,8
9	50,3	50,4	47,6	47,7	47,7
10	37,1	37,1	36,9; 37,6	36,9	37,6
11	20,9	21,0	23,3; 23,6	23,3	23,6
12	25,0	25,1	124,3; 121,6	124,3	121,8
13	38,0	38,1	139,6; 145,1	139,3	145,1
14	42,9	42,9	42,0; 41,7	42,0	41,8
15	27,4	27,5	28,7; 26,2	28,7	26,2
16	35,5	35,6	26,6; 26,9	26,6	27,0
17	43,0	43,0	33,7; 32,5	33,7	32,5
18	48,2	48,3	59,0; 47,5	58,9	47,4
19	48,0	48,0	39,6; 46,7	39,6	46,9
20	150,9	150,9	39,6; 31,0	39,6	31,1
21	29,8	29,9	31,2; 34,7	31,2	34,8
22	40,0	40,0	41,5; 37,1	41,5	37,2
23	28,0	28,0	28,0	28,1	28,2
24	16,5	16,5	15,5	15,6	15,5
25	16,1	16,2	15,7	15,6	15,6
26	16,0	16,0	16,7; 16,8	16,8	16,9
27	14,5	14,5	23,3; 25,9	23,3	26,0
28	18,0	18,0	28,0; 28,4	28,1	28,4
29	109,3	109,4	17,4; 33,3	17,4	33,3
30	19,2	19,3	21,3; 23,7	21,3	23,7
CH <sub>3</sub> CO	21,3	21,3	-	-	-
CH <sub>3</sub> CO	171,0	170,8	-	-	-

<sup>1</sup>Sholichin (1980); <sup>2</sup>Mahato & Kundu (1994)



**TABELA 3.4: Atribuição dos deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) dos carbonos de PG02, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) (BALESTRIN *et al.*, 2006; MAHATO & KUNDU, 1994).**

C	PGC 2 ( $\delta$ )	Acetato de $\alpha$ -amirina <sup>1</sup>	PG02 ( $\delta$ )	germanicol <sup>2</sup>
1	38,4	38,4	38,6	38,5
2	28,0	28,0	27,4	27,4
3	80,6	80,6	-	79,0
4	38,0	38,0	-	39,0
5	55,2	55,2	55,3	55,7
6	18,2	18,1	18,2	18,3
7	32,8	32,9	34,7	34,7
8	40,0	40,0	40,8	40,8
9	47,5	47,5	-	51,3
10	36,7	36,7	37,1	37,3
11	23,3	23,3	21,3	21,2
12	124,3	124,3	26,1	26,2
13	139,6	139,1	-	39,0
14	42,0	42,05	42,9	43,4
15	28,7	28,7	27,4	27,6
16	26,9	26,9	37,7	37,7
17	33,7	33,7	34,4	34,4
18	59,0	59,0	-	142,8
19	39,6	39,6	-	129,8
20	39,6	39,6	32,4	32,3
21	31,2	31,2	33,3	33,4
22	41,5	41,5	37,1	37,4
23	27,9	27,9	28,0	28,0
24	15,7	15,7	15,5	15,4
25	16,1	16,1	16,1	16,1
26	16,8	16,8	16,7	16,7
27	23,2	23,2	14,5	14,6
28	28,0	28,0	25,0	25,3
29	17,4	17,4	31,2	31,3
30	21,3	21,3	29,2	29,2
CH <sub>3</sub> CO	171,0	170,9	-	-
CH <sub>3</sub> CO	21,3	21,3	-	-

<sup>1</sup>Balestrin *et al.*, (2006); <sup>2</sup>Mahato & Kundu (1994)

## 3.2 – IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO

### 3.2.1 – Mistura de ésteres de cadeia longa (PG03)

**PG03** apresentou-se como cera amarelada (92,9 mg), solúvel em clorofórmio. Foi obtido de frações oriundas da cromatografia em coluna da fração hexano:acetato de etila (1:1) do extrato etanólico de *Pouteria gardnerii*, conforme descrição na página 46.

No espectro na região do infravermelho desta fração (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) (FIGURA 3.22, página 76) foram observadas duas bandas em 2923 e 2852 $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento da ligação C-H em grupos metílicos e metilênicos. O espectro no infravermelho apresentou também absorção em 1738 $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação de C=O de éster, em 1244 e 1031 $\text{cm}^{-1}$ , bandas correspondentes a estiramento de ligação C-O de éster; e em 981 $\text{cm}^{-1}$  banda características de deformação C-H fora do plano. (SILVERSTEIN *et al.*, 2000 SILVÉRIO *et al.*, 2006).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **PG03** e a ampliação da região (FIGURA 3.23, página 76) mostraram um tripleto deformado em  $\delta 0,88$  ( $J=7,2\text{Hz}$ , 2H), atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal; sinais entre  $\delta 1,23$  e  $\delta 1,29$ , sugerindo a presença de hidrogênios de grupos metilênicos de cadeia alifática; em  $\delta 2,28$  (t,  $J=5,4\text{Hz}$ , 2H) atribuído à presença de um grupo metilênico desblindado devido à vizinhança de um grupo acila (FIGURA 3.24, página 77).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHZ,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PG03** (FIGURA 3.25, página 77) foram observados os seguintes sinais: em  $\delta 173,97$ , atribuído a presença de carbonila de éster; em  $\delta 60,14$  característico de carbono metilênico desblindado pelo oxigênio do grupo éster. Apresentou ainda sinais em  $\delta 34,38$ ;  $\delta 31,90$ ;  $\delta 29,67$ ;  $\delta 24,96$  e  $\delta 22,67$ , que foram atribuídos a carbonos metilênicos e metílicos.

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas no IV e de RMN sugeriram que **PG03** é constituído de uma **mistura de ésteres alifáticos**.

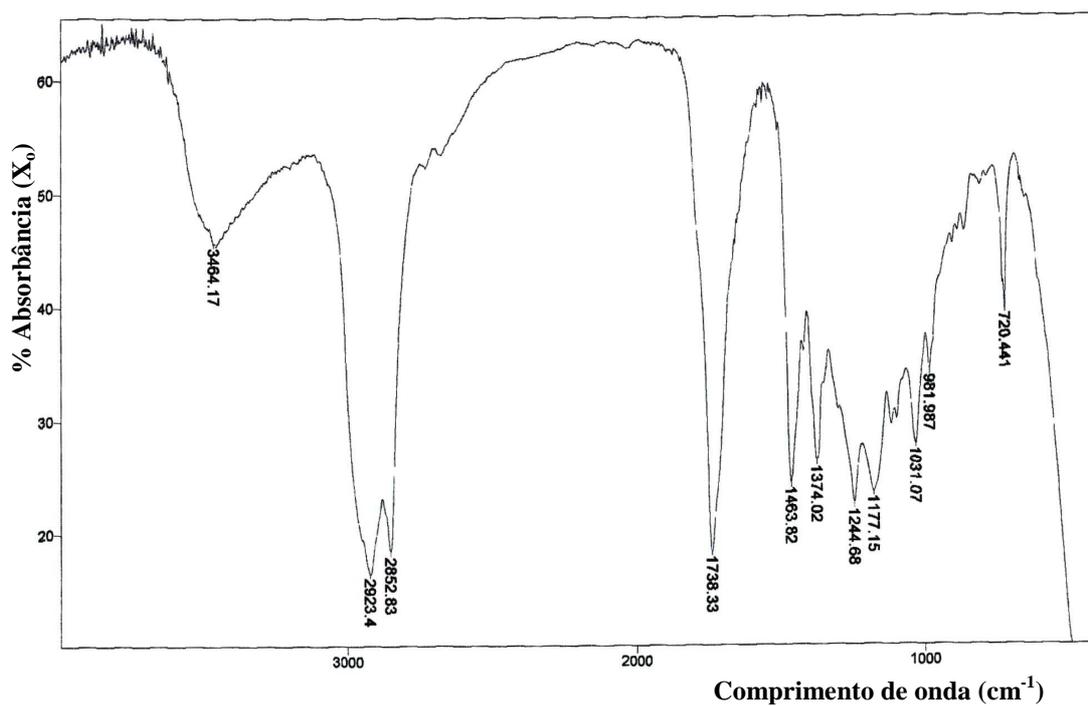


FIGURA 3.22: Espectro na região do Infravermelho de PG03 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

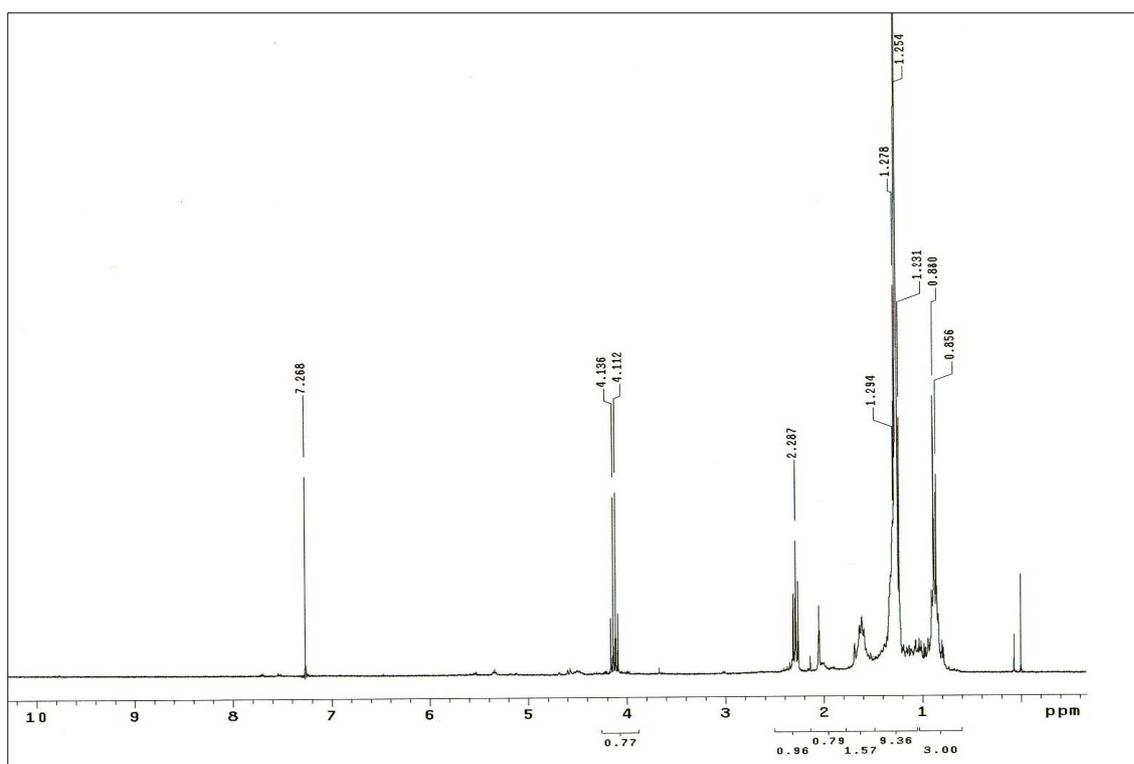


FIGURA 3.23: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG03 (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

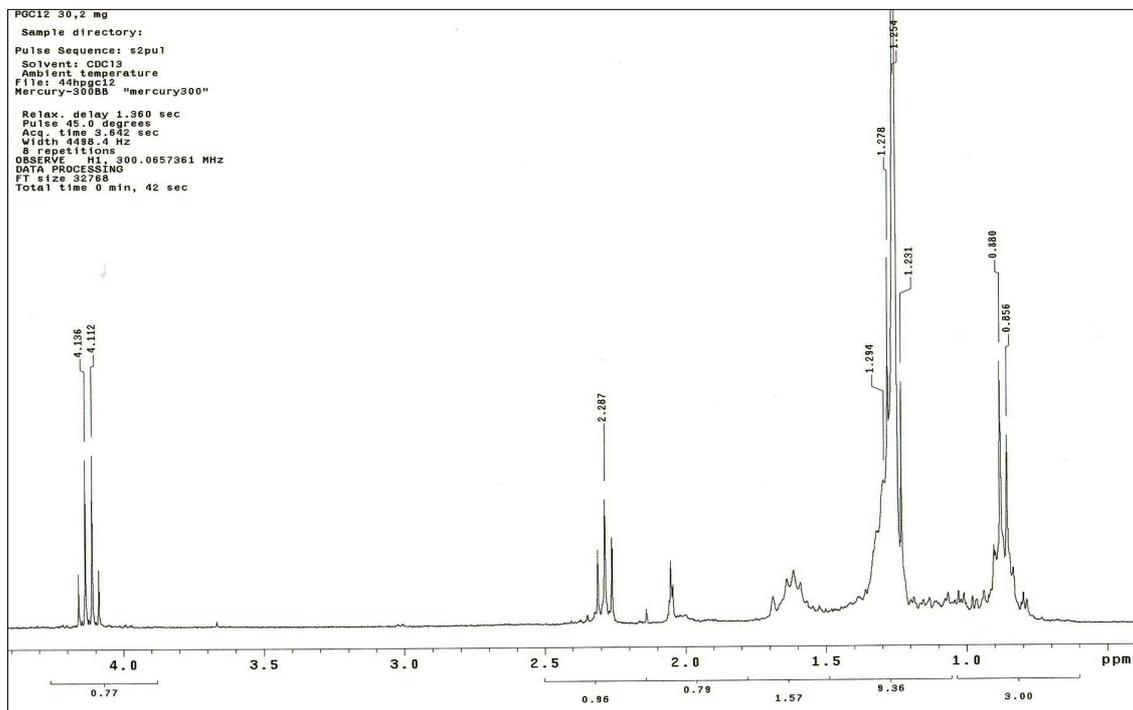


FIGURA 3.24: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG03 - Expansão da região entre  $\delta$  1,0 –  $\delta$ 4,5 (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

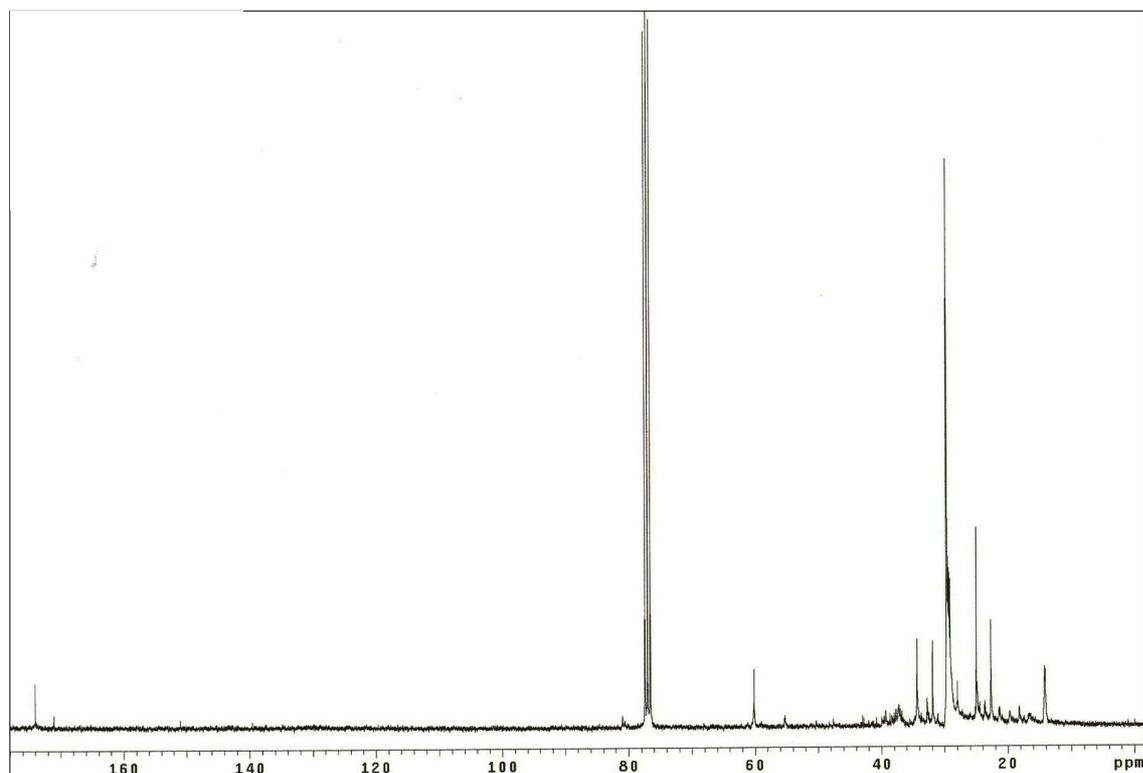


FIGURA 3.25: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PG03 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

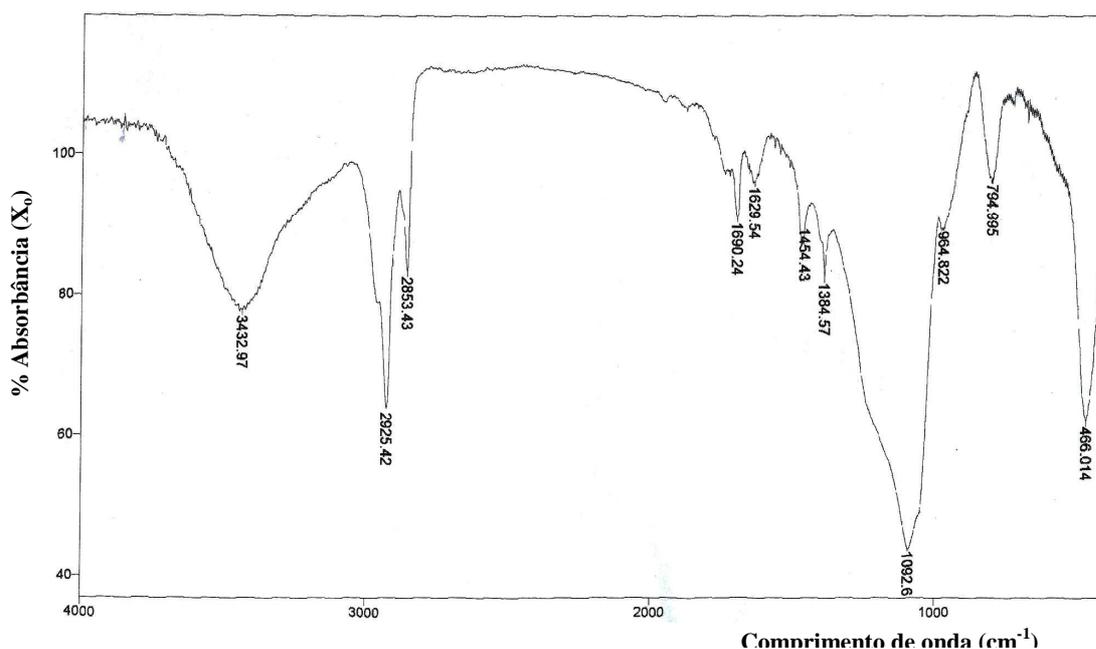
### 3.2.2 – Acetato de $\alpha$ -amirina (PG04)

**PG04** apresentou-se como um sólido branco amorfo (22mg) e foi obtido da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub> do extrato etanólico, conforme descrição na página 50. Foi comparado com uma amostra padrão de acetato de  $\alpha$ -amirina por meio de CCD (FM4, R1, parte experimental, 2.1.1.3, página 31). Após a revelação do cromatograma, apresentou o mesmo  $R_f$  do padrão ( $R_f = 0,8$ ), bem como a mesma cor.

### 3.2.3 – Mistura de álcoois de cadeia longa (PG05)

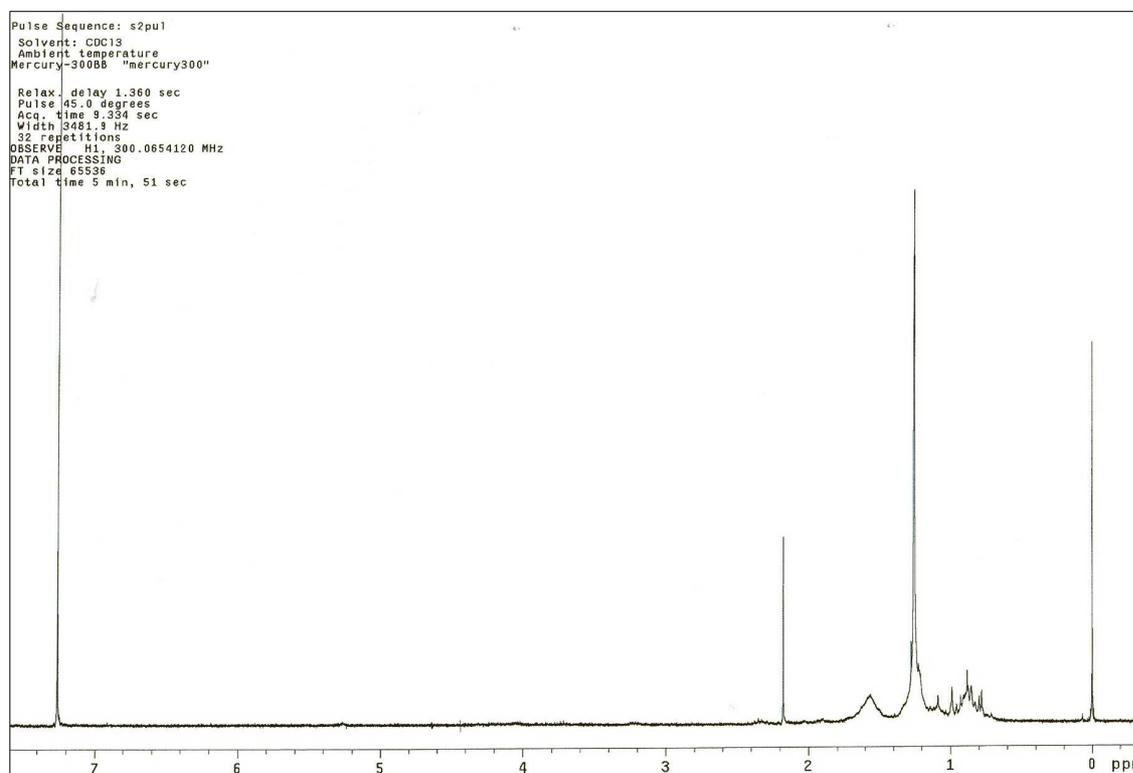
**PG05** apresentou-se como um sólido branco, amorfo (7,3mg), solúvel em hexano e foi obtido a partir de frações oriundas da cromatografia em coluna da fração acetonitrila:clorofórmio do extrato etanólico, conforme descrição na página 51.

O espectro na região do infravermelho (FIGURA 3.26, página 78) dessa fração, apresentou bandas de absorção em 3432cm<sup>-1</sup>, característica do estiramento da ligação O-H; absorções em 2925cm<sup>-1</sup> e 2853cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao estiramento da ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos; bandas de absorção em 1459cm<sup>-1</sup>, atribuídas a deformações de ligação C-H de grupos metilênicos e metílicos e em 1092cm<sup>-1</sup>, atribuída a deformação angular de C-O de álcool.



**FIGURA 3.26:** Espectro na região do Infravermelho de PG05 (KBr, cm<sup>-1</sup>)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **PG05** (FIGURA 3.27, página 79) apresentou sinais entre  $\delta 0,78$  e  $\delta 0,95$  relacionados a hidrogênios de grupos metílicos, os sinais entre  $\delta 1,0$  e  $\delta 1,6$  foram atribuídos a hidrogênios de grupos metilênicos e metílicos (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).



**FIGURA 3.27: espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG05 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **PG05** (FIGURA 3.28, página 80) foram observados os seguintes sinais:  $\delta 31,9$ ,  $\delta 29,70$  e  $\delta 22,6$ , correspondentes a carbonos metilênicos; e o sinal em  $\delta 14,13$  foi atribuído a carbono metílico. (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas no IV e de RMN sugeriram que **PG05** é constituído de uma **mistura de álcoois alifáticos**

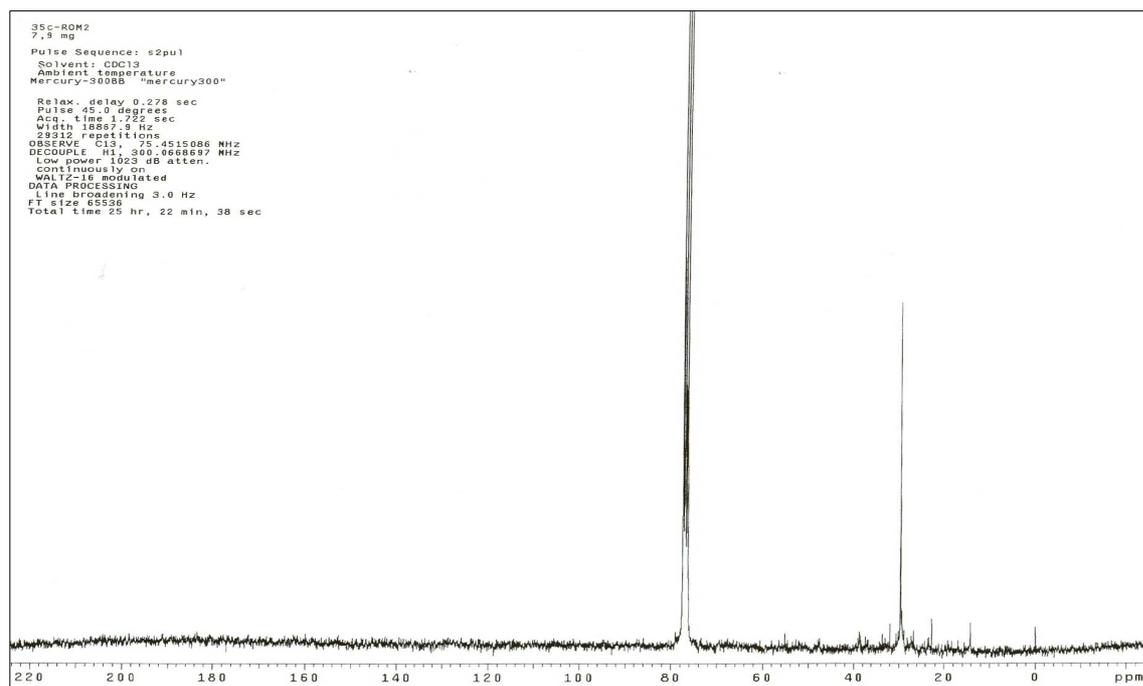


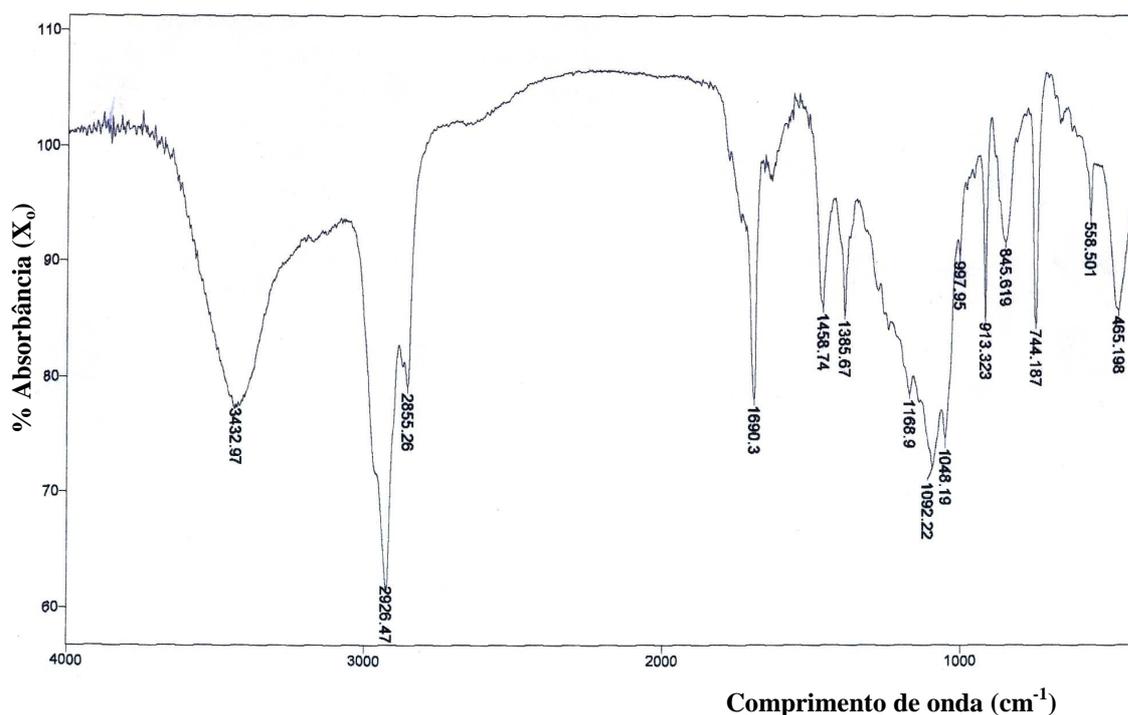
FIGURA 3.28: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PG05 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

### 3.2.4 – Mistura de triterpenos (PG06)

**PG06** apresentou-se como um sólido branco (8,3mg), amorfo, solúvel em clorofórmio. Foi obtido da fração **ETMC132** (35mg), oriunda da cromatografia em coluna da fração MeCN:CHCl<sub>3</sub>, do extrato etanólico, conforme descrição na página 51.

**ETMC132** foi submetida à análise por CCD (FM3, R1, item 2.1.1, página 31), na qual pôde ser observada a presença de 3 substâncias que foram isoladas por CCD preparativa (FM3, R1, item 2.1.1, página 31). **PG06** foi isolada no  $R_f = 0,8$  e apresentou uma mancha azulada quando submetida a CCD.

O espectro na região do infravermelho de **PG06** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) (FIGURA 3.29, página 81) apresentou banda larga em  $343\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação O-H de ácido carboxílico; duas bandas em  $2926$  e  $2855\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento de ligação C-H de carbono  $\text{sp}^3$ . O espectro apresentou ainda uma banda em  $1690\text{cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de grupo acila (C=O), bandas de absorção em  $1092$  e  $1048\text{cm}^{-1}$ , características de deformação da ligação C-O de ésteres, bandas de absorção em  $1458$  e  $1385\text{cm}^{-1}$  devidas a deformações angulares características de ligação C-H em grupos metilênicos e metílicos (BARRETO *et al.*, 1998; SILVERSTEIN *et al.*, 2000).



**FIGURA 3.29:** Espectro na região do Infravermelho de PG06 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )

Os espectros de RMN apresentaram sinais característicos dos esqueletos das séries ursano e oleano. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  **PG06** ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) (FIGURAS 3.30 e 3.31, páginas 82), foi observado um sinal em  $\delta 5,26$ , correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono  $\text{sp}^2$  na posição C12 dos esqueletos ursano e oleano. Em  $\delta 3,23$  ( $d$ ,  $J=4,8\text{Hz}$ , 1H) e  $\delta 3,20$  ( $d$ ,  $J=4,8\text{Hz}$ , 1H), referentes aos hidrogênios carbinólicos da posição C3 dos dois triterpenos da mistura; simpletos entre  $\delta 0,71$  e  $\delta 1,21$ , correspondentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos das estruturas triterpênicas citadas (ALI *et al.*, 2002; FALCÃO, 2003a, BARRETO *et al.*, 1998).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **PG06** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (FIGURA 3.32, página 83) mostrou a presença de 30 sinais (TABELA 3.5, página 84). A comparação com dados da literatura (MAHATO *et al.*, 1994; FALCÃO *et al.*, 2003a) permitiu proceder à seguinte atribuição: os sinais em  $\delta 182,5$  e  $\delta 182,24$  foram atribuídos ao carbonos carboxílicos do grupo carboxila dos ácidos oleanólico e ursólico respectivamente; os sinais em  $\delta 143,5$  e  $\delta 122,1$  e  $\delta 137,8$  e  $\delta 125,8$  foram atribuídos aos carbonos olefínicos C12-C13 dos ácidos ursólico (**14**) e oleanólico (**54**), respectivamente.

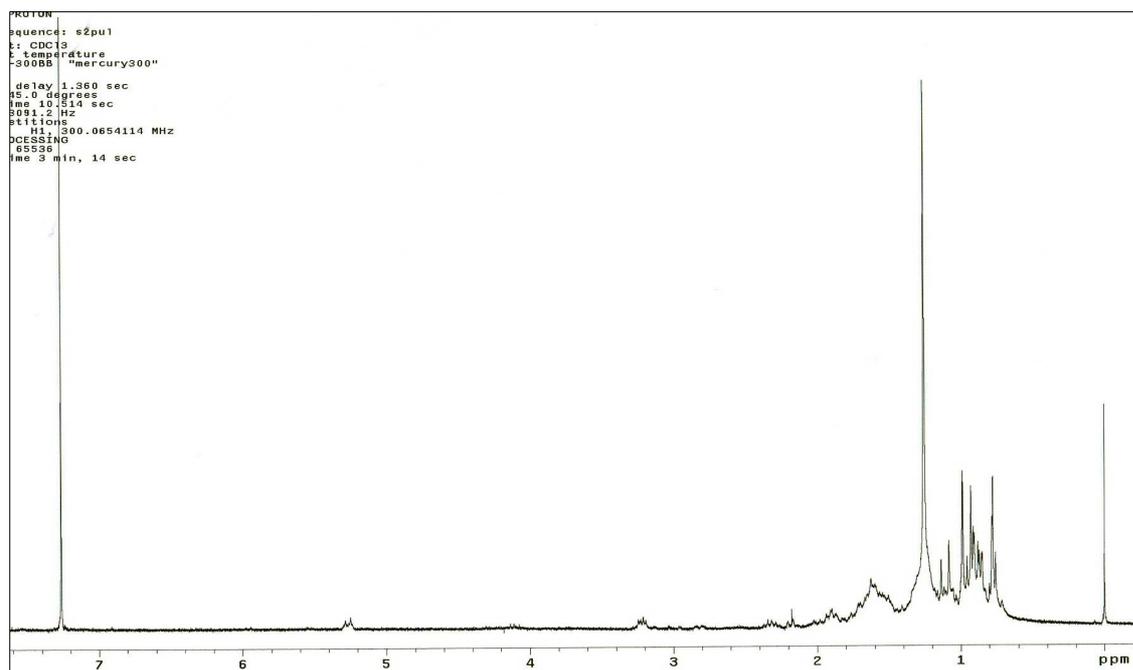


FIGURA 3.30: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG06 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

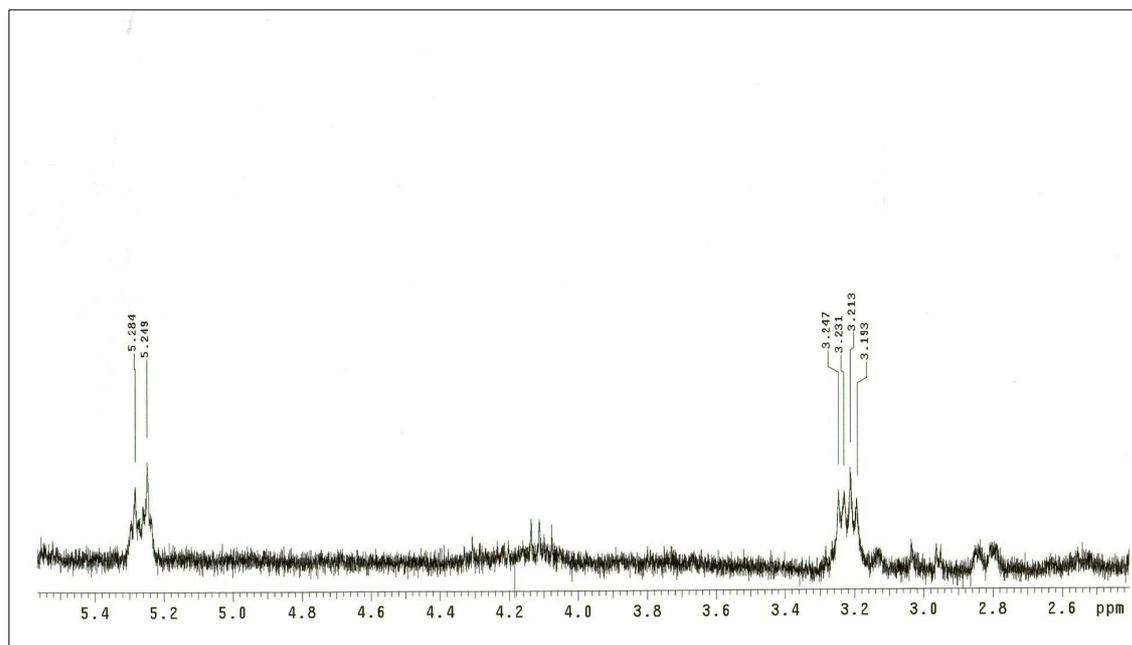


FIGURA 3.31: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PG06 - Expansão da região entre  $\delta$  2,4 - 5,6 (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

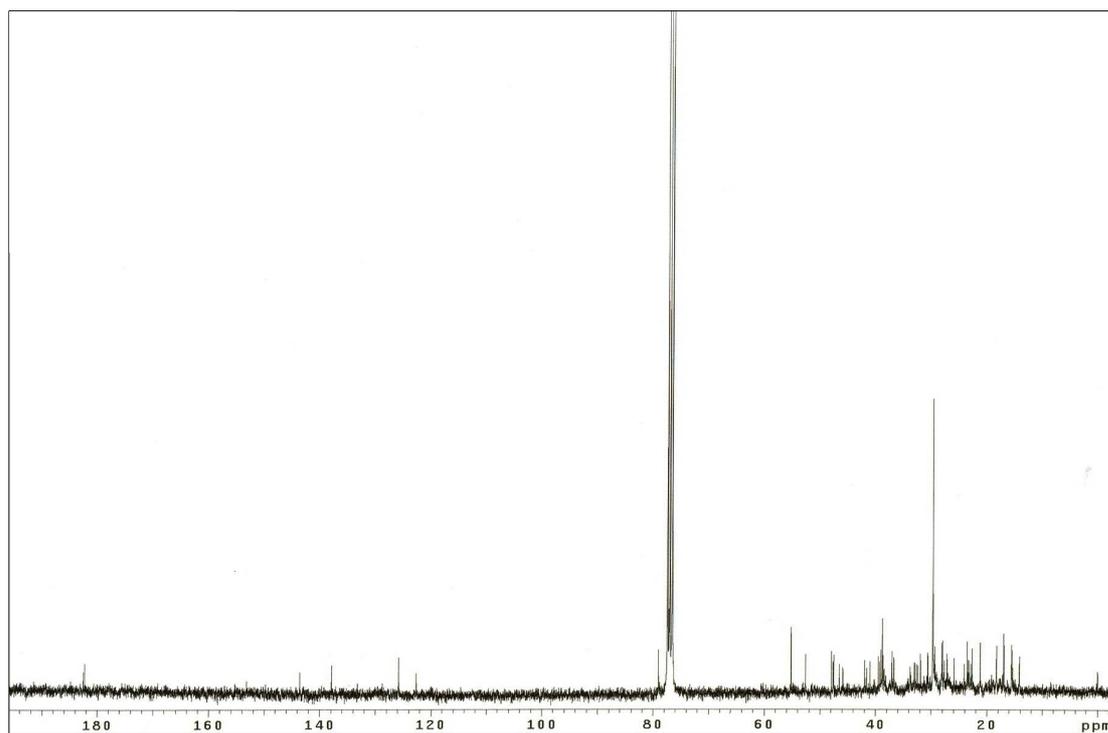
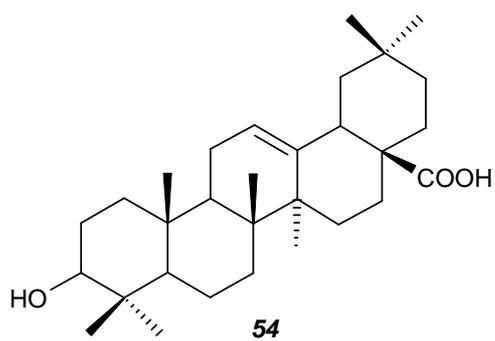
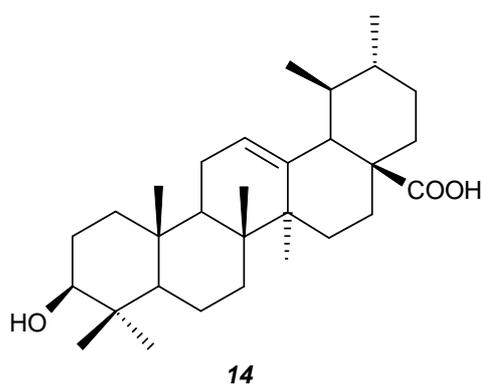


FIGURA 3.32: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PG06 ( 75MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**TABELA 3.5. Deslocamentos químicos ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) dos carbonos de PG06, em comparação com dados da literatura ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) (FALCÃO, 2003a)**

C	PG06 ( $\delta$ )	Ácido ursólico	PG06 ( $\delta$ )	Ácido oleanólico
1	38,7	38,7	38,5	38,6
2	27,1	27,2	27,1	27,1
3	79,0	79,0	79,0	79,0
4	38,7	38,7	38,7	38,6
5	55,2	55,2	55,2	55,1
6	18,2	18,3	18,2	18,2
7	32,9	32,9	32,6	32,3
8	39,4	39,4	39,4	38,9
9	47,5	47,5	47,6	47,5
10	37,0	37,0	37,0	37,0
11	23,3	23,3	23,2	23,2
12	125,8	125,8	122,6	122,5
13	137,8	138,9	143,5	143,5
14	41,9	42,0	41,6	41,8
15	28,1	28,0	27,6	27,7
16	24,1	24,1	23,3	23,2
17	47,9	47,9	45,8	45,8
18	52,6	52,6	40,9	40,9
19	39,0	39,0	45,8	45,8
20	29,7	29,7	30,6	30,6
21	30,6	30,6	33,7	33,6
22	36,6	36,7	32,4	32,3
23	28,10	28,10	28,1	28,0
24	15,5	15,5	15,4	15,4
25	15,6	15,6	15,3	15,3
26	17,0	17,0	16,9	16,9
27	23,6	23,6	25,9	25,9
28	182,2	181,2	182,5	182,7
29	24,10	24,1	33,0	33,1
30	21,1	21,2	23,6	23,5

**CAPÍTULO 4: ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS  
TRITERPENOS PRESENTES NAS FOLHAS DE  
*POUTERIA GARDNERII***

#### **4 - Atividade biológica dos triterpenos presentes em folhas de *Pouteria gardnerii***

Os triterpenos são amplamente encontrados em fontes vegetais e entre eles podem ser destacados acetato de lupeíla,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, que aparecem sozinhos ou em misturas em diversas fontes vegetais (TABELA 3.6, página 99).

Tanto triterpenos isolados quanto misturas desses têm mostrado uma série de atividades biológicas quer em modelos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*.

A mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina apresentou atividade antinociceptiva dose-dependente em camundongos. A dose de 10 mg/kg apresentou atividade significativa, sem, entretanto, induzir à sedação ou alterações motoras (OLIVEIRA, 2005; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2006). Essa mistura também mostrou ser responsável pela atividade gastroprotetora apresentada pela resina de *P. heptaphyllum*. O pré-tratamento de camundongos pela mistura desses dois triterpenos p.o. (100mg/kg) reduziu a intensidade da injúria da mucosa gástrica associada à ingestão de etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina exibiram  $CL_{50}$  similar ao controle positivo dicromato de potássio ( $42,54 \pm 19,96 \mu\text{g/mL}$ ), apresentando uma toxicidade aguda para *Artemia* sp. E a mistura desses triterpenos nas doses de 50, 100 e 200mg/kg e nas doses de 50 e 100mg/kg, reduziu significativamente o prurido induzido pela administração de dextrana T40 e do composto 48/80, respectivamente, em camundongos (OLIVEIRA, 2005a).

O pré-tratamento de ratos com a mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina na dose de 100mg/kg reduziu em 86% a desgranulação de mastócitos *ex vivo*, quando comparado ao controle. E no teste de edema de pata induzido por dextrana ou pelo composto 48/80, o peso das patas (em mg) dos animais foi reduzido em 38, 58 e 62% quando tratados com a mistura desses triterpenos nas doses de 50, 100 e 200mg/kg. Também no teste de edema de pata induzido por histamina houve uma redução de 53 a 83% no peso das patas (mg), quando tratados com a mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina nas doses de 50 e 100mg/kg, respectivamente (OLIVEIRA, 2005a).

Animais tratados com  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina nas doses de 3, 10, 30 e 100mg/kg apresentaram uma inibição significativa (da ordem de 43, 54, 49 e 27%) respectivamente do tempo de reação no teste de edema de pata (tempo em que o animal permaneceu lambendo as patas) (OLIVEIRA, 2005).

O tratamento de camundongos com doses de 50 e 100mg/kg da mistura de triterpenos

antes da indução de dano hepático por acetaminofeno (500mg/kg, p.o.), atenuou o aumento agudo das atividades das enzimas séricas alaninaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST), impediu a redução dos níveis da glutatona hepática (GSH) e reduziu as alterações histopatológicas. Além disso, a mortalidade associada ao acetaminofeno foi completamente suprimida. Também a mistura (50mg/kg) potencializou o sono induzido por pentobarbital, o que sugere uma possível supressão do citocromo P450 hepático. Tais fatos indicam uma ação hepatoprotetora potencial da mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina contra injúria tóxica (OLIVEIRA *et al.*, 2005a)

Em outro estudo, a mistura administrada *via* i.p. e p.o. em camundongos, exibiu antinocicepção dose-dependente em modelos químicos, mas não em modelos térmicos. Também apresentou antihiperalgisia em ratos. A antinocicepção promovida pela mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina parece ser independente da ativação dos sistemas opioidérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (OTUKI *et al.*, 2005). Tanto o extrato etéreo de *P. kleinii*, quanto seu principal constituinte,  $\alpha$ -amirina, promoveram a inibição dose-dependente de edema de orelha em camundongos ( $ID_{50}$ = 0,55mg/Kg e  $ID_{50}$ = 0,31mg/Kg, respectivamente), bem como o influxo de células polimorfonucleares induzido pelo acetato de forbol (TPA), semelhante à atividade da dexametasona (RECIO *et al.*, 1995 e AKIHISA *et al.*, 1996).

Lupeol e  $\alpha$ -amirina inibem a subunidade catalítica (cAK) da proteinaquinase dependente de AMP (PKA) de fígado de ratos, com valores de  $IC_{50}$ =8 e  $5\mu$ M, respectivamente. Os ésteres palmitato e linoleato desses dois triterpenos também inibem a cAK (HASMEDA *et al.*, 1999). Lupeol,  $\alpha$ -amirina e seus derivados esterificados (palmitato e linoleato), isolados da casca da raiz de *Alstonia boonei*, são antiinflamatórios que, além de inibidores da PKA, são inibidores seletivos de protease (RAJIC *et al.*, 2000).

Os triterpenos  $\alpha$ -amirina e seus ésteres palmitato e linoleato, ademais, apresentaram efeito antiinflamatório comparável à indometacina e metotrexato, quando avaliados em modelos de processo artrítico destrutivo e inflamatório. Esses triterpenos apresentaram atividade de inibição de crescimento de células de osteosarcoma de ratos, com  $IC_{50}$ = $14\mu$ M,  $IC_{50}$ < $10\mu$ M e  $IC_{50}$ = $27\mu$ M, respectivamente (KWEIFIO-OKAI *et al.*, 1994). O palmitato de  $\alpha$ -amirina produziu aumento do hialuronato sérico e de granulócitos no sangue para níveis não-artríticos, diminuição da proliferação e invasão de linfócitos nas articulações, redução da infiltração de leucócitos da medula óssea e prevenção e redução da destruição do osso e da

cartilagem. O principal ponto da intervenção antiartrítica desses triterpenos está situado na inibição da destruição da articulação (KWEIFIO-OKAI *et al.* 1994).

Da mesma forma,  $\beta$ -amirina e os acetatos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina apresentam atividade antiartrítica, possivelmente pela inibição da síntese de 5-HETE. De fato, esses triterpenos apresentaram atividade de inibição da 5-lipoxigenase em neutrófilos humanos (KWEIFIO-OKAI & MACRIDES, 1992). Entretanto, em um outro ensaio, a mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina inibiu a atividade da elastase leucocitária humana (HLE) *in vitro*, mas não foi capaz de inibir a atividade da 5-lipoxigenase (SAFAYHI *et al.*, 1997).

O palmitato de  $\beta$ -amirina apresentou atividade dose-dependente sobre o SNC de camundongo: reduziu a atividade motora e antagonizou a atividade locomotora induzida por metanfetamina, parecendo ter efeito sedativo (SUBARNAS *et al.*, 1993a; SUBARNAS *et al.*, 1993b). Outros estudos mostram que esse éster apresenta atividade antidepressora, provavelmente *via* ativação noradrenérgica (SUBARNAS *et al.*, 1993b).

A mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina exibiu atividade analgésica potente, bem como atividade antidiarréica (VILLASEÑOR *et al.*, 2004).  $\beta$ -amirina apresentou atividade antibacteriana (HICHRI *et al.*, 2003), principalmente contra *Escherichia coli* (BALESTRIN, 2006).

Lupeol e seu acetato,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (SAEED & SAFIR, 2003; SAEED & SAFIR, 2002), apresentaram efeito irritante persistente no teste da orelha de rato. E tanto o lupeol quanto o seu acetato indicaram atividade antiinflamatória, anticancerígena, antibiótica e antimalárica (FREIRE *et al.*, 2004).

O tratamento i.p. na dose 10mg/rato/dia de acetato de lupeíla, não apresentou mudança significativa do peso corpóreo dos ratos, mas causou uma significativa redução de peso nos órgãos reprodutores, que foi observada principalmente no epidídimo, na vesícula seminal e na próstata ventral. A quantidade de esperma testicular e epididimal foi diminuída e foi observada uma diminuição da mobilidade dos espermatozóides em comparação com o controle, mostrando uma redução em 100% da fertilidade dos ratos (GUPTA *et al.*, 2005).

Acetato de lupeíla neutralizou significativamente a letalidade, a hemorragia, a desfibrinogenação e o edema induzidos pelo veneno da serpente *Daboia russellii*, bem como a letalidade, a cardiotoxicidade, a neurotoxicidade e alterações respiratórias induzidas em animais pelo veneno da serpente *Naja kouthia*. Também foi capaz de potencializar a ação protetora do antídoto do veneno de *Daboia russellii* em ratos (CHATTERJEE *et al.*, 2006).

Os ácidos ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxiursan-12-en-28-óico) (**14**) e oleanólico (ácido 3 $\beta$ -

hidroxiolean-12-en-28-óico) (**57**), são triterpenos pentacíclicos pertencentes às famílias oleano e ursano, respectivamente. Podem ser encontrados em diversas fontes vegetais (TABELA 3.6, página 99) na forma livre ou como agliconas de saponinas terpênicas e apresentam atividade biológica marcante quer em modelos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo* (RESENDE *et al.*, 2005).

O efeito inibitório dos ácidos oleanólico (60µmol/L) e ursólico (30µmol/L) no crescimento de células de carcinoma do cólon (linha HTC15) foi investigado e os resultados mostraram que durante o período entre 24 a 72h após o tratamento, o número de células mortas e fragmentos de células aumentaram (LI *et al.*, 2002).

O ácido oleanólico (**57**) foi avaliado em relação à atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina*, e apresentou DL<sub>50</sub>=85ppm, um resultado próximo ao controle (dicromato de potássio, DL<sub>50</sub>=20 - 40ppm) (MOREIRA *et al.*, 2003).

A ação hepatoprotetora do ácido oleanólico é conhecida há muito e sabe-se que a atividade de espécies utilizadas na medicina chinesa para o tratamento da hepatite, por exemplo, *Swertia* spp., é devida, ao menos em parte, à presença desse composto (LIU, 1995). Numa avaliação de atividade hepatoprotetora, o tratamento de ratos com **57** antes da administração de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), impediu significativamente o aumento da enzima sérica alaninaaminotransferase, a atividade do lactatodesidrogenase, e a peroxidação lipídica no fígado de maneira dose-dependente (NA-YOUNG *et al.*, 2005).. Em outro experimento, o ácido oleanólico foi avaliado quanto ao efeito hepatoprotetor, em danos induzidos por CCl<sub>4</sub> em ratos machos Sprague-Dawley. Um grupo recebeu apenas CCl<sub>4</sub>, o segundo foi tratado com CCl<sub>4</sub> e ácido oleanólico; e outro grupo foi tratado somente com ácido oleanólico (30mg/kg/dia, p.o.), durante 14 dias. Uma mistura de 0,2mL de CCl<sub>4</sub> em óleo de oliva (1:1 v/v) foi injetada 30 minutos antes da última administração do ácido oleanólico. No grupo tratado somente com CCl<sub>4</sub> foi observada a diminuição na atividade de glutathione, glutathione redutase, glutathione-S-transferase, superoxidodismutase, catalase e glutathione peroxidase. Entretanto, o pré-tratamento com ácido oleanólico reduziu o efeito do CCl<sub>4</sub> e ajudou a manter o nível dessas enzimas. O pré-tratamento com ácido oleanólico resultou numa significativa diminuição do nível das enzimas séricas transaminase, laticodesidrogenase e γ-glutamilttransferase nos grupos tratados com CCl<sub>4</sub>. Também resultou em diminuição significativa da produção de aminopirina-N-desmetilase e anilinaidroxilase (NA-YOUNG *et al.*, 2005).

O efeito desse triterpeno no citocromo P450 (P450)E1, a maior isoenzima envolvida na bioativação do CCl<sub>4</sub>, também foi verificado. O tratamento dos ratos com o ácido oleanólico resultou em uma diminuição significativa da hidroxilação do *p*-nitrofenol e da alanina-P450 em uma maneira dose-dependente. Consistente com essas observações, a expressão da isoenzima P450E1 também foi reduzida. Esses resultados mostraram que o efeito hepatoprotetor do ácido oleanólico pode, pelo menos em parte, ser devido à habilidade desse triterpeno em impedir a bioativação do CCl<sub>4</sub>, principalmente inibindo a expressão e as atividades da isoenzima P450E1 (JEONG, 1999).

O efeito hepatoprotetor de **57** foi observado também em injúrias provocadas pelo acetaminofeno (s.c, 25-100mg/kg, por 3 dias) (LIU *et al.*, 1993; BUCHELI *et al.*, 2007), bem como por cádmio, furosemida, colchicina e outros. Esse triterpeno foi submetido a testes clínicos com resultados satisfatórios em pacientes com hepatite aguda ou crônica, bem como com outras desordens hepáticas (LIU *et al.* 1995).

O ácido oleanólico foi identificado como o princípio antiHIV de diversas plantas, incluindo *Rosa woodsii* (folhas), *Prosopis glandulosa* (folhas e galhos), *Pharadendron juniperinum* (planta inteira), *Syzygium claviflorum* (folhas), *Hyptis capitata* (planta inteira) e *Ternstroemia gymnanthera* (partes aéreas). Esse triterpeno inibiu a replicação de HIV-1 em células H9 com infecção aguda (EC<sub>50</sub>=1,7µg/mL) e o crescimento de células H9 (IC<sub>50</sub>=21,8µg/mL) (KASHIWADA *et al.*, 1998).

O efeito do ácido oleanólico no crescimento de HIV-1 na cultura de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC, sigla em inglês) foi investigado. Esse triterpeno mostrou um potente efeito supressivo na replicação do HIV, nas concentrações 10 e 20nM com uma inibição de 85% a 97%, respectivamente (a zidovudina - AZT, no mesmo experimento, apresentou uma taxa de inibição de 70%). Nas concentrações utilizadas, o ácido oleanólico não teve efeito tóxico na PBMC. Esses resultados estão de acordo com outro estudo que mostraram o efeito inibitório antiretroviral desse triterpeno nas células da linha HT9 (LICHTNER *et al.*, 1999) e a inibição da dimerização da protease do HIV-1 (KELECOM *et al.*, 2002).

Esse ácido diminuiu significativamente a fertilidade de ratos machos, sem alterar de forma significativa o peso do corpo ou dos órgãos reprodutores dos animais. Causou uma redução significativa na conversão de espermatócitos em espermátides e a interrupção no início do estágio da meiose na espermatogênese, promovendo a diminuição da quantidade de

espermatozóides, sem causar qualquer anormalidade nas células espermatogênicas (SAGRAWAT *et al.*, 2006).

Estudos comprovam que o ácido oleanólico inibe as lipases, glicerolfosfatodesidrogenases, DNAligases e Kinases AMP-c dependentes; apresenta atividade anticolesterolêmica, antihepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antibiótica e inibe o crescimento de tumores e de patógenos orais. O ácido oleanólico antagoniza ainda a ação da interleucina 8/CINC, age contra a psoríase, protege a pele da ação da luz, reverte a resistência da leucemia P388 à vimblastina e possui efeito antagonista em choques anafiláticos. (KELECOM *et al.*, 2002).

O ácido oleanólico inibiu a atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>; apresentou também inibição da produção de nitritos em macrófagos murinos RAW267-4, mostrando uma potencial atividade antiinflamatória. As mesmas atividades foram apresentadas pela fração insaponificável do óleo do bagaço da azeitona, na qual esse triterpeno está presente. Esses resultados denotam a importância da oliva em enfermidades como a arteriosclerose e a artrite reumatóide (MARQUEZ *et al.*, 2005).

Foi investigado também o efeito do extrato da casca da azeitona composto principalmente de ácido maslínico (73,25%) e ácido oleanólico (25,75%), na proliferação e apoptose de células HT-29 (epitélio de cólon humano). O estudo mostrou uma atividade antiproliferativa com EC<sub>50</sub>=73,96 +/- 3,19mmol/L de maneira dose-dependente para o ácido maslínico, e EC<sub>50</sub>=26,56 +/- 2,5mmol/L para o ácido oleanólico, sendo confirmada a apoptose. Esses resultados preliminares mostraram a inibição da proliferação dessas células, sem citotoxicidade tanto para o ácido oleanólico quanto para o ácido maslínico presentes no extrato do fruto da azeitona (JUAN *et al.*, 2006).

Este triterpeno demonstrou atividades hipolipidêmica (reduzindo quase 50% do colesterol) e antiaterogênica. Apresentou a capacidade de inibir a HMGCoAredutase. Os mecanismos de inibição propostos incluem a inibição parcial da transcrição do DNA, inibição da tradução do mRNA, degradação da enzima via proteólise, inibição pós-transcricional e degradação da enzima por meio da elevação da concentração de farnesol celular, ou ainda, atuando como homólogo deste (MARTINELLO, 2006).

Esse triterpeno também foi testado quanto à capacidade de inibir o crescimento do tumor da pele de rato, induzido pelo acetato de tetradecanoilforbol (TPA). Nesse estudo foi examinado o efeito do ácido oleanólico na expressão, induzida por TPA, do gene da

ornitina descarboxilase (ODC) e outros (OGURO *et al.*, 1998). O ácido oleanólico (**57**) inibiu a indução da atividade de ODC e do nível do mRNA produzidos por TPA na pele dos ratos fêmeas. A pré-aplicação de **57** (10mmol), no pelo dorsal dos ratos, reduziu em aproximadamente 50% a atividade epidermal e a expressão do gene da ODC induzida por TPA (8nmol). Esses resultados sugerem que o ácido oleanólico inibe a ODC induzida por TPA principalmente no nível transcricional.

Além da ornitina descarboxilase, o acetato de tetradecanoilforbol estimula a expressão do gene metalotioneína (MT) na pele de ratos. O tratamento com **57** (10mmol) depois da aplicação de 8nmol de tetradecanoilforbol também inibiu a expressão dos genes de ODC e MT, sugerindo que o ácido oleanólico não compete com o TPA para o receptor. Esse estudo sugere, assim, que o ácido oleanólico pode ser um inibidor do estímulo da expressão do gene TPA na pele de ratos (OGURO *et al.*, 1998).

Foi avaliado o potencial antinociceptivo do ácido oleanólico, em modelos de nocicepção colônica induzida por óleo de mostarda em ratos, para examinar, nesse mecanismo, a participação do opióide alfa-2-adrenérgico, e o receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV-1). Os ratos foram tratados oralmente com ácido oleanólico (3, 10, 30mg/kg), ou com o veículo; o triterpeno reduziu significativamente os comportamentos nociceptivos induzidos pelo óleo de mostarda de maneira dose-dependente em 10 e 30mg/kg, sendo que a atividade antinociceptiva do ácido oleanólico (30mg/kg) foi significativamente bloqueada pelo antagonista dos opióides, naloxona (2mg/kg, i.p.), enquanto que para o antagonista alfa-2-adrenoceptor, ioimbina (2mg/kg, s.c.), não apresentou efeito. O pré-tratamento com vermelho de rutênio (3mg/kg, s.c.), um antagonista não competitivo TRPV1, causou significativa inibição da nocicepção do óleo de mostarda, mas a co-administração com ácido oleanólico não produziu antagonismo e nem potencializou a antinocicepção do triterpeno. Esses resultados demonstram o potencial antinociceptivo visceral do ácido oleanólico, que envolve um mecanismo opióide e possivelmente uma influência modulatória nos receptores vanilóides (MAIA *et al.*, 2006).

O ensaio com ácido oleanólico (60,91mM) mostrou um efeito significativo na síntese da prostaglandina E2 (PGE2), com porcentagens de inibição similares ao da indometacina (IC<sub>50</sub>= 0,95mM), (DIAZ *et al.*, 2000).

Com relação ao ácido ursólico (**14**), esse triterpeno também apresenta várias atividades biológicas, por exemplo, uma potente atividade inibitória contra HIV-1protease (XU *et al.*, 1996; MA *et al.*, 1999).

Em outro estudo foi avaliada a possível atividade protetora do ácido ursólico contra as alterações nas enzimas de defesa antioxidante *in vivo*, assim como o efeito tóxico *in vitro* induzido pelo CCl<sub>4</sub>. O tratamento dos ratos com **14** reduziu significativamente o nível das enzimas séricas glutamatooxalatotransaminase (TGO) e glutamatopiruvatotransaminase (TGP), que foi aumentado previamente pela administração do CCl<sub>4</sub>. O tratamento com ácido ursólico também reverteu significativamente a diminuição da atividade de superoxidodismutase, catalase, glutationaredutase, glutationa peroxidase e os níveis de glutationa no fígado, à medida que a concentração da glutationa reduzida foi aumentada e o conteúdo de glutationa oxidada diminuiu nos grupos tratados com ácido ursólico. Os níveis da peroxidação lipídica foram mais elevados no grupo que recebeu CCl<sub>4</sub>, mas foi reduzido com o tratamento com o fármaco ( $p < 0,01$  por 1,25 e 5mmol/Kg). Os resultados *in vitro* indicaram que a adição de **14** em meios de cultura ( $p < 0,01$  por 500 $\mu$ M) resultou na redução da atividade de glutamatooxalatotransaminase e lactatodesidrogenase, além de promover uma boa taxa de sobrevivência de ratos intoxicados por CCl<sub>4</sub>. O ácido ursólico também melhorou a peroxidação lipídica nos hepatócitos oriundos de ratos expostos ao CCl<sub>4</sub>, o que foi demonstrado pela redução da produção de malonildialdeído Além disso, o ácido ursólico (50-500pM) mostrou propriedade seqüestradora de radicais livres. (MARTIN *et al.*, 2001).

O efeito antiinflamatório desse triterpeno ( $ID_{50} = 0,14\mu\text{moles/cm}^2$ ) foi duas vezes maior que da indometacina ( $ID_{50} = 0,26 \mu\text{moles/cm}^2$ ), um fármaco não-esteroidal antiinflamatório que foi utilizado como padrão de referência (BARICEVIC *et al.*, 2005).

O ácido ursólico mostrou atividade antiinflamatória e antinociceptiva inibindo o edema induzido por 1% de carragenina e quando foi avaliado pelo teste ácido acético e no teste da placa quente (TAPONDJOU *et al.*, 2003).

A atividade antinociceptiva apresentada pelo extrato diclorometânico das partes aéreas de *Leonurus sibiricus* L. pode estar relacionada com o ácido ursólico (GRANDO *et al.*, 2006). Da mesma forma, a atividade antiinflamatória dos extratos de *Salvia officinalis* L. parece ser devida à presença, nos extratos, do ácido ursólico que apresentou essa atividade em pele de ratos (MANEZ *et al.*, 1997).

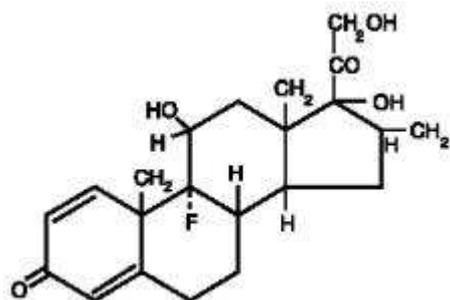
Camundongos submetidos ao tratamento concomitante com ácido ursólico e doxorubicina (DXR) apresentaram uma redução significativa na frequência de micronúcleos quando comparados àqueles tratados apenas com DXR, denotando a atividade antimutagênica do ácido ursólico (RESENDE *et al.*, 2005).

O ácido ursólico apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus leiteus* e *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faealis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerofenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, e várias espécies de *Aspergillus* (AMORIN & SANTOS *et al.*, 2003).

Em um estudo, foi investigado o efeito antibacteriano do ácido ursólico contra bactérias resistentes *Streptococcus mutans* PS-14 e *Actinomyces viscosus* ATCC 19246 pelos métodos da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da inibição da atividade da glicosiltransferase (GTF) *in vitro* e *in vivo*. A CIM do ácido ursólico contra a *S. mutans* foi de 7,5-15mg/mL e contra a *A. viscosus* foi de 15-30 mg/mL. O ácido ursólico inibiu significativamente a síntese da GTF pelo teste Water-insoluble Glucan (WIG). Adicionalmente, esse triterpeno teve um efeito inibitório na adesão das bactérias citadas, quando avaliado pelo teste da cárie *in vivo*. Esses resultados sugerem que o ácido ursólico tem atividade contra as bactérias cariogênicas *S. mutans* e *A. viscosus*. Além disso, esse triterpeno poderia ser utilizado como aditivo preventivo em alimentos contra as cáries dentais (SUZUKI *et al.*, 2007).

Esse ácido foi testado contra as cepas Y e CL de *Trypanossoma cruzi*, e apresentou  $CL_{100} = 0,4\text{mg/mL}$  para cepa Y, e  $CL_{100} = 0,8\text{mg/mL}$  para cepa CL (LEITE *et al.*, 2000)

No fracionamento do extrato metanólico de *Oldenlandia diffusa* (Rubiaceae), monitorado pela atividade citotóxica, foi isolado o ácido ursólico (**14**), como princípio ativo. Esse triterpeno demonstrou inibição significativa da proliferação em cultura de células tumorais, como por exemplo, A549 (de pulmão humano), SK-OV-3 (ovário), SK-MEL-2 (pele), XF498 (cérebro), HTC-15 (côlon), SNU-1 (estômago), L1210 (Leucemia murina) e B16-F<sub>0</sub> (melanona murina). Um aumento de T/C (>200%) marcado também foi observado quando o ácido ursólico foi administrado em ratos que tinham as células sarcoma-180. A análise ao microscópio das células SNU-1 depois de uma contínua exposição ao ácido ursólico por 4 e 24h, mostrou uma mudança morfológica típica nas células, devida ao efeito



(59)

dose-dependente pela adição da nicotinamida, inibidor da polimerase, poli-(ADP-ribose), ou de ácido aurintricarboxílico (ATA), um inibidor da endonuclease. Esses dados refletem que a citotoxicidade do ácido ursólico, ou seu efeito apoptótico, nas células tumorais pode ser relacionada à ativação da enzima endonucleolítica e subsequente à ativação da poli-(ADP-ribose)polimerase nas células tumorais; e esses poderiam, eventualmente, conduzir à lise das células (KIM *et al.*, 1998).

A atividade antiproliferativa observada nos extratos brutos de *Galianthe brasiliensis* pode estar relacionada ao ácido ursólico (MOURA *et al.*, 2006).

Também foi avaliado o efeito do ácido ursólico na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), induzida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), em células mamárias e epiteliais orais humanas. O tratamento com ácido ursólico impediu a indução da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a síntese da prostaglandina-E<sub>2</sub> induzida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Esses dados são importantes para compreender a atividade antitumoral e antiinflamatória do ácido ursólico (SUBBARAMAIAH *et al.*, 2000).

Pelo fato da estrutura do ácido ursólico ser um pouco parecida com a estrutura da dexametasona (59), um glicocorticóide sintético, foi investigada a atividade antiproliferativa e antiviral desse triterpeno e da dexametasona em células humanas de câncer cervical associadas ao papilomavírus (HPV). Foi realizado um ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio para medir a atividade antiproliferativa e também caracterizar a apoptose, caracterizada pela fragmentação do DNA, coloração pelo do 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e pela análise por citometria de fluxo (FACS). Foi investigada a proteína relacionada a apoptose usando o método Western Blots (YIM *et al.*, 2006)

Após o tratamento *in vitro*, foi usada a reação da transcrição reversa da cadeia da polimerase (PCR) para a expressão do gene HPV-E6/E7 e foi observada a atividade antiviral. O ácido ursólico suprimiu o crescimento de células de carcinoma cervical (HeLa, CaSki and SiHa)

apoptótico. O DNA nucleossomal das células HL60 pré-tratadas com ácido ursólico foi clivado em diversos fragmentos oligoméricos típicos devido ao efeito apoptótico.

No entanto, o efeito citotóxico *in vitro* do ácido ursólico em células tumorais foi reduzido de maneira

HPV-positivas de maneira dose-tempo-dependente, mas não suprimiu ascélulas de câncer cervical linha C33A HPV-negativas (YIM *et al.*, 2006)

O tratamento das células HeLa com ácido ursólico promoveu apoptose característica confirmada pela fragmentação do DNA, manchas de DAPI e análise por FACS. A expressão da proteína Faz foi induzida, e as proteínas caspase-8, caspase-3 e poliADP-ribosepolimerase (PARP) foram clivadas depois do tratamento com ácido ursólico. A expressão do gene HPV-18-E6/E7 em células HeLa também diminuiu depois do tratamento com ácido ursólico, mas o nível das proteínas p53 e Rb não mudou(YIM *et al.*, 2006)

Em contraste com esses resultados, a dexametasona, não inibiu a proliferação. Esses resultados sugerem que o ácido ursólico pode ser um fármaco útil no tratamento da neoplasia cervical associada ao HPV (YIM *et al.*, 2006).

Na tentativa de isolar o componente ativo de *Eriobotrya japonica* capaz de inibir a mutagenicidade induzida pela aflatoxina-B1, foi isolado o ácido ursólico, que mostrou atividade antimutagência (YOUNG *et al.*, 1994).

O ácido ursólico é um potente inibidor de células A431 (células de carcinoma epidermóide humano). O ácido ursólico marcado reduziu o crescimento dessas células de maneira dose-tempo-dependente. Foi encontrada uma boa relação entre esses resultados de contagem direta de células e o teste de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} .

Durante um grande período de exposição, o ácido ursólico exibiu atividade citotóxica e citostática. O efeito foi parcialmente reversível pela remoção do fármaco. Uma maior atividade citotóxica foi observada nos testes com azul de tripano (trypan blue) e MTT com 50mM.

Investigações sobre a inibição da atividade da tirosinaquinase foram realizadas através de ensaios bioquímicos nas células A431. O ácido ursólico inibiu a atividade da tirosinaquinase dessas células de maneira dose-dependente, apresentando  $IC_{50}=24mM$ . Quando as células A431 foram pré-tratadas com ácido ursólico por 24, 48 e 168 horas nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 50mM, foram medidos valores menores de  $IC_{50}$  (6,8 $\mu$ M em 24 horas; 5,2 $\mu$ M em 48 horas e 1,4 $\mu$ M em 168 horas) (HOLLOSY *et al.*, 2000). Esse triterpeno também apresentou atividade inibitória da acetilcolinesterase, (CHUNG *et al.*, 2001).

Embora o ácido todo-trans-retinóico (t-RA) seja conhecido por estimular a síntese do colágeno, o mecanismo da ação do t-RA no fotoenvelhecimento ainda não é conhecido. A expressão do mRNA da colagênese induzida por raios UVA foi reduzida quando foram administrados, ao meio de cultura, t-RA e ácido ursólico, antes e depois da irradiação. A possibilidade de inibição da síntese da elastina induzida por UVA, promovida pelo ácido ursólico e t-RA, foi então investigada. Esses fármacos foram administrados em média por 48h antes da irradiação de UVA (20J/cm<sup>2</sup>). No controle, após a radiação de UVA, a expressão do mRNA da elastina foi aumentada e proeminente, a indução sendo detectada entre 12 e 24h pós-irradiação. Quando o ácido ursólico e o t-RA foram administrados, a expressão do mRNA da elastina induzida pelos raios UVA, foi reduzida. Esses resultados sugerem que esse triterpeno e o t-RA podem ter efeitos protetores no fotoenvelhecimento, pela inibição da síntese da elastina induzida pelos raios UVA (SANG *et al.*, 1996).

O ácido ursólico apresentou atividade formicida contra as larvas de *Achea janata* (CHAMDRAMU *et al.*, 2003).

O ácido ursólico mostrou um efeito preventivo significativo *in vitro* na toxicidade induzida por etanol em hepatócitos isolados em ratos. Esse efeito preventivo (12% a 76%) foi dependente da concentração (1-100µg/mL), sugerindo um efeito hepatoprotetor desse triterpeno (SARASWAT *et al.*, 2000; SARASWAT *et al.*, 1996).

Tanto o ácido ursólico quanto o ácido oleanólico possuem atividade anticâncer, mostram efeitos benéficos na hematopoiese imunocompetente em ratos e diminuem os danos indesejáveis do tecido hematopoético após a radioterapia (HSU *et al.*, 1997).

O ácido ursólico apresenta efeito inibitório da proliferação da célula do tumor com a apreensão da célula-ciclo, e esse efeito é maior que aquele apresentado pelo ácido oleanólico (LI *et al.*, 2002).

A atividade citotóxica do ácido oleanólico e do ácido ursólico foi investigada frente as células de carcinoma nasofaríngeo HONE-1, carcinoma epidermóide oral KB, e carcinoma colorretal HT29. Ambos os triterpenos apresentaram atividade citotóxica significativa contra essas células com IC<sub>50</sub> entre 4,0-9,4µM (CHIANG *et al.*, 2005). Esses triterpenos também apresentaram citotoxicidade *in vitro* contra as linhagens A549 (células de câncer pulmonar), SK-OV-3 (ovário), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (sistema nervoso central) e HCT-15 (cólon) ( KIM *et al.*, 2000).

---

Esses dois triterpenos também foram testados contra as formas amastigota de *Leishmania* spp. e apresentaram uma atividade potencial ( $IC_{50}=7-120nM$ ); a atividade contra a forma promastigota , entretanto, foi moderada ( $IC_{50}=51-137nM$ ) (TAN *et al.*, 2002)

**TABELA 4.1: Espécies vegetais das quais os triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, acetato de lupeíla, ácido ursólico e oleanólico foram isolados**

	Espécies	$\alpha$ - amirina	$\beta$ -amirina	Acetato de lupeíla	Ácido ursólico	Ácido oleanólico	Referência bibliográfica
1	<i>Achillea millefolium L.</i>	fl	fl	-	-	-	BAGGIO, 2004
2	<i>Achillea alexandri-regis</i>	NI	NI	-	-	-	LIMA-JÚNIOR, 2005
3	<i>Achillea ligustica ALL</i>	-	flr	-	-	-	CONFORTI <i>et al.</i> , 2005
4	<i>Ajania Fruticulosa</i>	pa	-	-	-	-	MENG, <i>et al.</i> , 2001
5	<i>Alstonia boonei</i>	-	-	cra	-	-	KWEIFIO-OKAI <i>et al.</i> , 2006
6	<i>Alstonia scholaris</i>	-	-	EH	-	-	GUPTA <i>et al.</i> , 2005
7	<i>Arrabidaea samydoides</i>	-	-	-	NI	-	PEREIRA <i>et al.</i> , 2000
8	<i>Arrabidaea triphinervia</i>	-	-	-	fl	-	LEITE <i>et al.</i> , 2000
9	<i>Aspidosperma nitidum</i>	ce	-	-	-	-	PEREIRA <i>et al.</i> , 2006
10	<i>Astianthus viminalis</i>	-	-	-	-	fl; ga	MECKES <i>et al.</i> , 2001
11	<i>Baccharis ligustrina</i>	-	-	-	-	NI	PEREIRA <i>et al.</i> , 2000
12	<i>Baccharis platipuda</i>	-	-	-	-	NI	PEREIRA <i>et al.</i> , 2000
13	<i>Baccharis pseudotenueifolia</i>	-	-	-	-	fl	MOREIRA <i>et al.</i> , 2003
14	<i>Baccharis salicina</i>	-	-	-	-	NI	QUIJANO <i>et al.</i> , 1998
15	<i>Betula davunica</i>	-	-	-	-	fl frescas	FUCHINO <i>et al.</i> , 1998
16	<i>Betula alleghaniensis</i>	-	EL	-	-	-	LAVOIE <i>et al.</i> , 2005
17	<i>Boswellia serrata</i>	-	-	-	-	NI	LIMA-JÚNIOR, 2005
18	<i>Byrsonima microphylla</i>	-	ce	-	fl	-	AGUIAR <i>et al.</i> , 2005; MENDES <i>et al.</i> , 1999
19	<i>Caesalpinia decapetala</i>	-	-	pi	-	-	LI, <i>et al.</i> , 2002
20	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	-	-	flr	-	-	CHIANG <i>et al.</i> , 2003
21	<i>Calophyllum polyanthum</i>	-	-	-	NI	-	NOLDIN <i>et al.</i> , 2006
22	<i>Cesalpinia bonduchella L.</i>	se	se	se	-	-	SAEED <i>et al.</i> , 2003
23	<i>Celastrus hypoleucus</i>	-	tr	-	-	-	WANG <i>et al.</i> , 2005
24	<i>Calendula officinalis</i>	-	pi	-	-	-	VOLPATO, 2005
25	<i>Carmona retusa</i>	NI	NI	-	-	-	LIMA-JUNIOR, 2005
26	<i>Catharanthus roseus</i>	-	-	-	-	fl	SINGH <i>et al.</i> , 2003
27	<i>Cedrelopsis grevei</i>	-	ga	-	-	-	MULLHOLLAND <i>et al.</i> , 2003
28	<i>Celtis philippinensis</i>	-	-	-	ga	-	HUANG <i>et al.</i> , 2003
29	<i>Centaurea ptosimopappaiodes</i>	ra	-	-	-	-	OKSÜZ <i>et al.</i> , 1997

30	<i>Centratus longiflorus</i>	-	-	-	-	flr	DEMIREZER <i>et al.</i> , 1999
31	<i>Chiococca alba</i>	-	-	-	ra	-	GAZDA, 2004
32	<i>Chiococca braquiata</i>	fl	fl	-	fl	fl	LOPES <i>et al.</i> , 2004
33	<i>Chuquiraga ulicina</i>	-	-	pa	-	-	FLAGG <i>et al.</i> , 1999
34	<i>Clematis montevidensis</i> Sprengel	-	-	-	-	pa	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2002
35	<i>Clytistoma rametaceu</i> , Bur	-	-	-	NI	-	ROCHA <i>et al.</i> , 2004
36	<i>Clusia multiflora</i>	crfl	-	-	-	-	MEDINA <i>et al.</i> , 2004
37	<i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	crfl	crfl	-	-	-	EROSA <i>et al.</i> , 2004
38	<i>Costus tonkinensis</i>	pi	pi	-	-	-	BOHME <i>et al.</i> , 1997
39	<i>Cochysia ferruginea</i>	-	-	-	fl	-	ZUCARO <i>et al.</i> , 2000
40	<i>Couroupita amazonica</i>	-	NI	-	-	-	SOWEMIMO <i>et al.</i> , 2006
41	<i>Crataegus monogyma</i> Jacq.	-	-	-	-	flr	GRIFFIHS <i>et al.</i> , 2000
42	<i>Crataegus pinnatifida</i>	-	-	-	NI	-	MIN <i>et al.</i> , 2000
43	<i>Crataegus sinaica</i>	-	-	-	NI	-	SHAHAT <i>et al.</i> , 2002
44	<i>Cressa cretica</i>	-	tr	-	-	-	HUSSAIN <i>et al.</i> , 2005
45	<i>Croton zambesius</i>	fl	-	-	-	-	BLOCK <i>et al.</i> , 2004
46	<i>Cuppea ssp.</i>	-	pi	-	-	-	WAIZEL-BUCAY <i>et al.</i> , 2003
47	<i>Cursonia bancoensis</i>	-	-	-	NI	-	TAPONDJOU <i>et al.</i> , 2003
48	<i>Dacryodes hopkinsii</i>	res	res	-	-	-	LIMA <i>et al.</i> , 2004
49	<i>Dioclea grandiflora</i>	-	cra	-	-	-	JINKINS <i>et al.</i> , 1999
50	<i>Dioclea lasiophylla</i>	-	-	-	-	ga	BARREIROS <i>et al.</i> , 2000
51	<i>Diplectria peccariana</i>	-	-	-	fl	-	JANG <i>et al.</i> , 2004
52	<i>Dortenia heringerii</i>	-	-	pi	-	-	VILLEGAS <i>et al.</i> , 1997
53	<i>Ekebergia pterophylla</i>	-	fl	-	-	fl	MULLHOLLAND <i>et al.</i> , 1998
54	<i>Eriobotrya japonica</i>	-	-	-	NI	-	SENS 2002
55	<i>Eriope blanchetti</i>	-	-	-	pa	pa	DAVID <i>et al.</i> , 2001
56	<i>Erythrina indica</i>	-	-	-	-	cga	NKENGFAK <i>et al.</i> , 2001
57	<i>Erythroxylum leal Costae</i>	-	-	fl	-	-	CHAVEZ <i>et al.</i> , 1996
58	<i>Erythroxylum numularia</i>	fl	fl	-	-	-	LIBÓRIO <i>et al.</i> , 2000
59	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	-	-	-	fl	fl	SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000
60	<i>Eucalyptus cladocalyx</i>	-	-	-	fl	-	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2005
61	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	ce	-	ce	-	SANTOS <i>et al.</i> , 1997
62	<i>Eucalyptus tereticornes</i>	-	-	-	fl	-	SARASWAT <i>et al.</i> , 2000
63	<i>Eugenia brasiliensis.</i>	-	-	-	fl	-	FRIGHETTO <i>et al.</i> , 2005

64	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-	-	-	-	pi	KELECOM <i>et al.</i> , 2002
65	<i>Eugenia repanda.</i>	-	-	-	NI	NI	GRZESIUK <i>et al.</i> , 2003
66	<i>Eupatorium betonicaeforme</i>	pa	pa	-	-	-	ALBURQUEQUE <i>et al.</i> , 2006
67	<i>Euphorbia hirta</i>	-	-	-	-	-	MARTINEZ-VAZQUEZ <i>et al.</i> , 1999
68	<i>Euphorbia stygiana</i>	-	-	fl	-	-	LIMA <i>et al.</i> , 2004
69	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	-	fl	-	-	-	KAJIKAWA <i>et al.</i> , 2005
70	<i>Euphorbia chrysocoma</i>	-	ra	-	-	-	SHI <i>et al.</i> , 2005
71	<i>Eriobotrya japonica</i>	-	-	-	fl	fl	TANIGUCHI <i>et al.</i> , 2002
72	<i>Euterpe precatoria</i> Mart	-	ra e fl	-	-	-	GALOTTA <i>et al.</i> , 2005
73	<i>Ficus carica</i>	-	-	fl	-	-	SAEED <i>et al.</i> , 2002
74	<i>Ficus microcarpa</i>	-	-	-	rae	-	CHIANG <i>et al.</i> , 2005
75	<i>Fortunella japonica</i>	-	cfr	-	-	-	CHO <i>et al.</i> , 2005
76	<i>Galianthe brasiliensis</i>	-	-	-	pa	-	MOURA <i>et al.</i> , 2006
77	<i>Galium Tortumense</i>	-	-	-	-	NI	GUVENALP <i>et al.</i> , 2006
78	<i>Garcinia polyantha</i>	-	-	-	-	cfr	MOHAMED <i>et al.</i> , 2005
79	<i>Garcinia polyantha</i>	-	-	-	-	cga	LANNANG <i>et al.</i> , 2005
80	<i>Garcinia vilersiana</i>	-	ca	-	-	ca	NGUYEN <i>et al.</i> , 2000
81	<i>Gentiana scobra</i>	ra; rz	ra; rz	-	-	-	KAKUDA <i>et al.</i> , 2002
82	<i>Gentiana Siphonantha</i>	-	-	-	-	NI	TIAN <i>et al.</i> , 1997
83	<i>Hamelia patens</i> Jacquin	-	-	-	fl	-	YOLANDA <i>et al.</i> , 2005
84	<i>Haplophyllum acutifolium</i>	-	-	-	-	pi	ALI <i>et al.</i> , 2001
85	<i>Haloxylon salicornicum</i>	-	tr	-	-	-	FERHEEN <i>et al.</i> , 2005
86	<i>Helichrysum kraussii</i>	-	-	-	-	-	PRINSLOO <i>et al.</i> , 2006
87	<i>Hemidesmus indicus</i>	-	-	ra	-	-	CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2006
88	<i>Hieracium plumulosum</i>	-	-	NI	-	-	ARGAY-GY <i>et al.</i> , 1997
89	<i>Himatanthus articulata</i> )	-	-	-	NI	-	GONZAGA <i>et al.</i> , 1998
90	<i>Himatanthus sucuuba</i>	-	-	ra	-	-	SOUZA <i>et al.</i> , 2006
91	<i>Hippocratea excelsa</i>	-	ca	-	-	-	AGUILAR-GONZALEZ <i>et al.</i> , 2005
92	<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	-	ose	-	-	-	THOMAS <i>et al.</i> , 2007
93	<i>Hyptis capitata</i>	-	-	-	pi	pi	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998; FALCÃO <i>et al.</i> , 2003
94	<i>Hyptis albida</i>	-	-	-	NI	NI	FALCÃO <i>et al.</i> , 2003
95	<i>Hyptis oblongifolia</i>	-	-	-	NI	-	FALCÃO <i>et al.</i> , 2003
96	<i>Hyptis platanifolia</i>	-	-	-	ra	-	ARAÚJO <i>et al.</i> , 2005
97	<i>Hyptis rambóides</i>	-	-	-	NI	-	FALCÃO <i>et al.</i> , 2003

98	<i>Hyptis urticoides</i>	-	-	-	NI	-	FALCÃO <i>et al.</i> , 2003
99	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	-	-	-	NI	-	PEREZ 2005
100	<i>Ixora coccinea</i>	-	-	-	flr	-	MONTEATH <i>et al.</i> , 2000
101	<i>Ixora enana</i>	-	-	-	fl	-	MENDEZ-NATERA <i>et al.</i> , 2004
102	<i>Kochia scoparia</i> L.	-	-	-	-	fr	NA-YOUNG <i>et al.</i> , 2005
103	<i>Lactuca sativa</i>	-	-	-	crfl	crfl	BAKKER <i>et al.</i> , 1998
104	<i>Lanchocarpus atropurpureus</i>	-	NI	-	-	-	RUIZ, 1998
105	<i>Lantana camara</i>	-	-	-	-	NI	MISRA <i>et al.</i> , 2007
106	<i>Lavanda officinalis</i> L.	-	-	-	NI	-	PEREZ, 2005
107	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	-	-	-	pa	-	GRANDO <i>et al.</i> , 2006
108	<i>Leonurus cardiaca</i> L.	-	-	-	NI	NI	PEREZ, 2005
109	<i>Ligustrum lucidum</i> Ait	-	-	-	NI	NI	LIU <i>et al.</i> , 2003
110	<i>Macaranga tanarius</i>		cr		-		GUHLING <i>et al.</i> , 2005
111	<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	gl	gl	-	-	-	MENEZES <i>et al.</i> , 1998
112	<i>Mautenus salicifolia</i> Reissek	fl	fl	-	-	-	MIRANDA <i>et al.</i> , 2006
113	<i>Maytenus arbutifolia</i>	-	pa	-	-	-	ORABI <i>et al.</i> , 2001
114	<i>Mentha piperita</i>	-	-	-	NI	-	PEREZ, 2005
115	<i>Melaleuca leucadendron</i>	-	-	-	fl	-	LEE <i>et al.</i> , 1998
116	<i>Miconia fallax</i>	-	-	-	NI	-	RESENDE, 2005
117	<i>Mikania pseudohoffmanianna</i>	pa	pa	pa	-	-	SOUZA <i>et al.</i> , 2005
118	<i>Mirabilis himalaica</i>	-	-	-	ra	ra	ZHANG <i>et al.</i> , 1997
119	<i>Memora peregrina</i>	-	fl; ra	-	-		GRASSI <i>et al.</i> , 2005
120	<i>Moldenhawera nutans</i>	NI	NI	-	-	-	LIMA-JÚNIOR, 2005
121	<i>Myrcia rotundifolia</i>	-	fl	-	-	-	CERQUEIRA, 2002
123	<i>Neoboutonia glabrescens</i>	-	-	-	-	cgl	TCHINDA <i>et al.</i> , 2003
124	<i>Nerium oleander</i> L.	-	-	-	NI	-	PEREZ, 2005
125	<i>Newbouldia laevis</i>	-	-	-	-	ra	OBEN <i>et al.</i> , 2006
126	<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	-	pi	ANANDJIWALA <i>et al.</i> , 2006
127	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	-	-	-	fl	-	FERNANDÉZ <i>et al.</i> , 2005
128	<i>Olea europae</i>	-	-	-	fl	fl	LAZÓN, <i>et al.</i> , 2001
129	<i>Oldenlandia diffusa</i>	-	-	-	NI	-	KIM <i>et al.</i> , 1998
130	<i>Origanum vulgare</i> L.	-	-	-	NI	-	PEREZ, 2005
131	<i>Origanum mahorama</i> L.	-	-	-	NI	-	CHUNG <i>et al.</i> , 2001
132	<i>Ortosihon stamineus</i>	-	-	-	NI	-	PEREZ, 2005

133	<i>Ouratea nitida</i>	-	fl	-	-	-	ESTEAM <i>et al.</i> , 2005
134	<i>palicourea coriacea</i>	-	-	-	fl; ra	-	KATO <i>et al.</i> , 2006
135	<i>parathesis amplifolia</i>		NI		-		SOLIS <i>et al.</i> , 2006
136	<i>paullinia pinnata</i>	-	NI	-	-	-	MIEMANAG <i>et al.</i> , 2006
137	<i>Periplovoca laevigata</i>	-	-	-	-	NI	HICHRI <i>et al.</i> , 2002
138	<i>Pfaffia glomerata</i>	-	-	-	-	pi	MOURA, 2006
138	<i>Pharadendron juniperinum</i>	-	-	-	-	pi	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998
140	<i>Phillyrea latifolia</i> L.	-	-	-	NI	-	DIAZ <i>et al.</i> , 2000
141	<i>Physocarpus intermedius</i>	-	-	-	cgl	-	KIM <i>et al.</i> , 2000
142	<i>Plantago major</i> L.	-	-	-	NI	-	SENS, 2002
143	<i>Polylepis racemosa</i>	-	-	-	Ca; gl	-	NETO <i>et al.</i> , 2000
144	<i>Pouteria torta</i>	-	-	fl	-	-	LOPEZ <i>et al.</i> , 2005
145	<i>Pouteria venosa</i>	-	-	-	fl	-	MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2006
146	<i>Prosopis glandulosa</i>	-	-	-	-	fl; gl	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998
147	<i>Prostanthera melissifolia</i>	-	-	-	pa	-	KISIEL & PIOZZI, 1999
148	<i>Protium heptaphyllum</i>	res	res	-	-	-	LIMA-JÚNIOR, 2005 e OLIVEIRA, 2005
149	<i>Protium Kleinii</i>	NI	NI	-	-	-	OLIVEIRA, 2005a
150	<i>Prunus avium</i>	cfr	-		cfr	cfr	PESCHEL <i>et al.</i> , 2007
151	<i>Prunella vulgaris</i>	-	-	-	NI	-	RYU <i>et al.</i> , 2000
152	<i>Psidium guajava</i> L.	fl; ra; gl	fl, ra, gl	-	fl	-	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2005; SALIX <i>et al.</i> , 2004
153	<i>Punica granatum</i>	-	-	-	-	NI	ALANIS <i>et al.</i> , 2004
154	<i>Ricinus communis</i> L.	crfl	crfl	-	-	-	VERMEER <i>et al.</i> , 2003
155	<i>Romarinus officinalis</i> L.	NI	NI	-	NI	-	PEREZ, 2005
156	<i>Rosa woodsii</i>	-	-	-	-	fl	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998
157	<i>Rubus idaeus</i> L.	-	-	-	flr	flr	GRIFFIHS <i>et al.</i> , 2000
158	<i>Rudgea jasmonoides</i>	-	-	-	fl	fl	LOPES <i>et al.</i> , 1990
159	<i>Salvia chinopeplia</i>	-	-	-	NI	-	AMARO <i>et al.</i> , 1998
160	<i>Salvia ciclicia</i>	-	-	-	ra	-	TAN <i>et al.</i> , 2002
161	<i>Salvia cyanescens</i>	pa	-	pa	-	-	GOKDIL <i>et al.</i> , 1997
162	<i>Salvia gilliessi</i>	-	-	-	-	NI	NIETO <i>et al.</i> , 2000
163	<i>Salvia hypargeia</i>			NI	-	-	ULUBELEN <i>et al.</i> , 1999
164	<i>Salvia macrochlamys</i>	-	-	NI	-	-	TOPÇU <i>et al.</i> , 2007
165	<i>Salvia mexicana</i>	-	-	-	NI	-	DELIRA, <i>et al.</i> , 2003
166	<i>Salvia officinallis</i>	-	-	-	NI	fl	BAVICEVIC <i>et al.</i> , 2005; MAFIA <i>et al.</i> , 2005

167	<i>Salvia Sclarea</i>	ra	-	-	-	-	ULUBELEN <i>et al.</i> , 1997
168	<i>Salvia sousae</i>	-	-	-	-	pa	ESQUIVEL <i>et al.</i> , 1997
169	<i>Sambucus nigra</i> L.	-	-	-	NI	NI	PEREZ,2005
170	<i>Sapindus Saponaria</i>	NI	NI	-	-	-	OLIVEIRA, 2005a
171	<i>Satureja macrostema</i>	-	-	-	pi	-	SERRATO, <i>et al.</i> , 2004
172	<i>Scaphopetalum thonneri</i>	-	-	-	-	cgl	VARDAMIDES <i>et al.</i> , 2003
173	<i>Scinus terebinthifolius</i>	-	-	-	NI	-	AMORIM <i>et al.</i> , 2003
174	<i>Siphoneugena densiflora</i>	fl	fl	-	-	-	GALLO <i>et al.</i> , 2006
175	<i>Sideritis candicans</i>	NI	NI	-	-	-	LIMA-JÚNIOR, 2005
176	<i>Solanum tuberosum</i>	-	crfl	-	-	-	SZAFRANEK <i>et al.</i> , 2006
177	<i>Solenostemma argel</i>	fl	fl	-	-	-	HASSAN <i>et al.</i> , 2001
178	<i>Streblus asper</i>	-	-	cgl	-	-	RASTOGI <i>et al.</i> , 2006
179	<i>Staphylea holocarpa</i>	-	-	-	fl; gl	-	NOVOTNY <i>et al.</i> , 2003
180	<i>Staphylea pinnata</i>	-	-	-	NI	-	LACIKOVÁ <i>et al.</i> , 2006
181	<i>Stirax camporum</i> Pohl	-	-	-	fl	-	PAULETTI <i>et al.</i> , 2003
182	<i>Symphonia globulifera.</i>	-	-	cse	-	cse	NGOUELA <i>et al.</i> , 2006
183	<i>Symplocos racemosa</i>	-	pi	-	-	pi	AHMAD <i>et al.</i> , 2003
184	<i>Syzygium aromatica</i>	-	-	-	-	EH	CHARLES <i>et al.</i> , 1998
185	<i>Syzygium claviflorum</i>	-	-	-	-	fl	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998
186	<i>Syzygium cumini</i> L.	-	-	-	-	fl	OLIVEIRA, 2005
187	<i>Tamarindus indica</i> L.	-	-	-	-	NI	MARTINELO, 2006
188	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	-	-	-	-	pa	KASHIWADA <i>et al.</i> , 1998
189	<i>Terminalia myriocarpa</i>	-	ca	-	-	-	MAJUMDAR <i>et al.</i> , 2005
190	<i>Tetracentron sinense</i>	-	-	-	-	cgl	YI <i>et al.</i> , 2000
191	<i>Thevetia nerifolia</i>	-	-	fl	-	-	SIDDIQUI <i>et al.</i> , 1992
192	<i>Thevetia peruviana</i>	-	-	cgl	-	-	ALI <i>et al.</i> , 2000
193	<i>Thymus serpyllum</i> L.	-	-	-	NI	NI	PEREZ 2005
194	<i>Trattinickia burserifolia</i>	res	res	-	-	-	LIMA <i>et al.</i> , 2004
195	<i>Trichogonia menthaefolia</i>	-	pi	-	-	-	BORGES 2006
196	<i>Ugni molinae</i>	-	-	-	fl	fl	AGUIRRE <i>et al.</i> , 2004
197	<i>Vaccinium ashei</i>	fr	fr	-	fr	fr	KOMATSU <i>et al.</i> , 2004
198	<i>Vernonia Scorpioides</i>	-	-	fl; ra	-	-	FREIRE <i>et al.</i> , 2004
199	<i>Verbena officinalis</i>	-	-	-	pa	-	DEEPAK <i>et al.</i> , 2000
200	<i>Viburnum tinus</i>	-	-	-	-	fl	MOHAMED <i>et al.</i> , 2005

201	<i>Virburnum jucundum</i>	-	-	-	pa	-	RIOS <i>et al.</i> , 2001
202	<i>Viguiera hypargyrea</i>	-	-	-	-	ra	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2003
203	<i>Vitex negundo</i> L.	-	-	-	fl	-	CHAMDRAMU <i>et al.</i> , 2003

**ca** = casca; **ce** = cerne do caule; **cfr** = casca do fruto; **cga** = casca dos galhos; **cr** = cera; **cra** = casca da raiz; **crfl** = cera das folhas; **cse** = casca das sementes; **EH** = extrato hexânico; **EL** = extratos lipofílicos; **EM** = extrato metanólico; **fl** = folhas; **flr** = flores; **fr** = fruto; **ga** = galhos; **NI** = não informado; **ose** = óleo das sementes; **pa** = partes aéreas; **pi** = planta inteira; **ra** = raiz; **rae** = raízes aéreas; **res** = resina; **rz** = rizomas; **se** = sementes; **tr** = tronco.

## **CAPÍTULO 5 – ENSAIOS BIOLÓGICOS**

## **5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *POUTERIA GARDNERII*.**

Em função das informações da literatura quanto à atividade de outras espécies do gênero *Pouteria*, os extratos hexânico, etanólico e aquoso de folhas de *Pouteria gardnerii* foram submetidos a testes com o objetivo de monitorar possíveis atividades biológicas. Os resultados são apresentados a seguir:

### **5.1 – Atividade citotóxica**

#### **5.1.1. Toxicidade em larvas de *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982)**

Os resultados são apresentados na TABELA 5.1 (página 108 ).

Os ensaios de citotoxicidade utilizando como modelo a toxicidade em larvas de *Artemia salina* são considerados como tendo correlação com toxicidade a algumas linhagens de células tumorais, tais como KB, P-388 e L1210 (DE ROSA *et al.*, 1994), bem como com vários outros ensaios biológicos, como por exemplo, atividade tripanossomicida (ZANI *et al.*, 1995) e fototóxica (OJALA *et al.*, 1999). Além disso, é utilizado como teste preliminar na busca de compostos com atividade antioxidante (MATHEWS, 1995).

MEYER e cols. (1982) classificaram extratos brutos como tóxicos quando apresentam  $DL_{50} < 1000 \text{ ppm}$  (1mg/mL), de acordo com os níveis requeridos para letalidade no ensaio de toxicidade a larvas de *Artemia salina*. Nas condições nas quais os experimentos aqui apresentados foram realizados, foi utilizada a classificação de MEYER e cols. para extratos brutos e frações.

Assim, baseando-se nessa classificação, o extrato aquoso (EA), as frações acetato de etila (EHA) do extrato hexânico (EH) e Hex:AcOEt 1:1 (EEHA) do extrato etanólico (EE), apresentaram toxicidade a larvas de *A. salina*. Os resultados obtidos para *Pouteria gardnerii* sugerem a realização de ensaios posteriores.

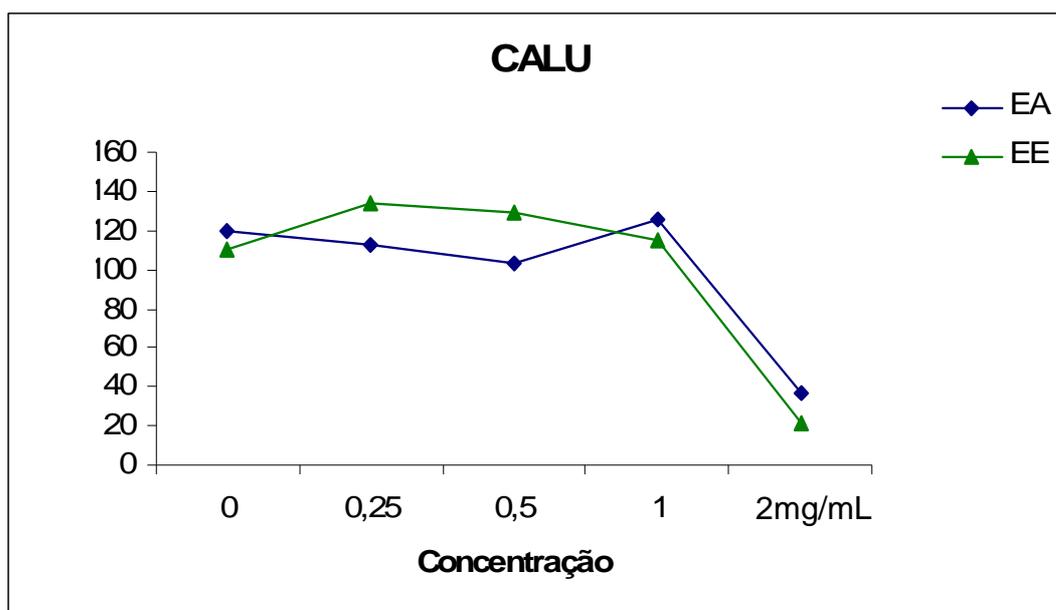
**TABELA 5.1 – Avaliação citotóxica frente às larvas de *Artemia salina***

<b>Amostra</b>	<b>DL<sub>50</sub> ppm</b>	<b>IC (95%) ppm</b>	<b>Atividade</b>
EH	>1000	-	inativo
EE	>1000		inativo
<b>EA</b>	<b>491,64</b>	<b>410,20 – 537,08</b>	<b>ativo</b>
EHH	>1000	-	inativo
EHHA	>1000	-	inativo
<b>EHA</b>	<b>528,28</b>	<b>427,67 – 630,09</b>	<b>ativo</b>
EHAM	>1000	-	inativo
EHM	>1000	-	inativo
EEH	>1000	-	inativo
<b>EEHA</b>	<b>320,48</b>	<b>310,50 – 590,03</b>	<b>ativo</b>
EEA	>1000	-	inativo
EEAM	>1000	-	inativo
EEM	>1000	-	inativo
ETH	>1000	-	inativo
ETMC	>1000	-	inativo
AM	>1000	-	inativo
AIM	>1000	-	inativo
FIE	> 1000	-	inativo
FSE	> 1000	-	inativo

**EH** = Extrato Hexânico; **EE** = Extrato Etanólico; **EA** = Extrato aquoso; **EHH** = Fração Hexânica do extrato Hexânico; **EHHA** = Fração Hex: AcOEt 1:1 do extrato Hexânico; **EHA** = Fração AcOEt do extrato Hexânico; **EHAM**: Fração AcOEt: MeOH 1:1 do Extrato Hexânico; **EHM** = fração Metanólica do extrato Hexânico; **EEH** = Fração Hexânica do Extrato Etanólico; **EEHA** = Fração HEx:AcOEt 1:1 do Extrato Etanólico; **EEA** = fração AcOEt do Extrato Etanólico; **EEAM** = Fração AcOEt: MeOH do Extrato Etanólico; **ETH** = Fração Hexânica da Partição trifásica do Extrato Etanólico; **ETMC** = Fração MeCN: CHCl<sub>3</sub> da Partição trifásica do Extrato Etanólico; **AM** = Fração Metanólica do Extrato Aquoso; **AIM** = Fração Insolúvel em Metanol do Extrato Aquoso; **FIE** = Fração Insolúvel em Etanol, da fração Metanólica do extrato Aquoso; **FSE** = Fração Solúvel em Etanol, da fração Metanólica do extrato Aquoso.

### 5.1.2. Teste de inibição de proliferação celular – Ensaio de proliferação celular (JADA *et al.*, 2007 CULIOL *et al.*, 2004)

Esse teste permite avaliar a capacidade de uma dada amostra em inibir a proliferação celular e a citotoxicidade, através de um sistema de oxi-redução mitocondrial. Baseia-se na capacidade que a enzima succinatodesidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) tem de converter o sal de tetrazólio (dimetiltiazol difeniltetrazólio) ou MTT, que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade, que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüentemente, a viabilidade celular (TAKAMORI, 2004). A função mitocondrial das células viáveis correspondentes a cada concentração do extrato foi calculada em relação ao grupo controle (ausência de extrato), considerado 100%.



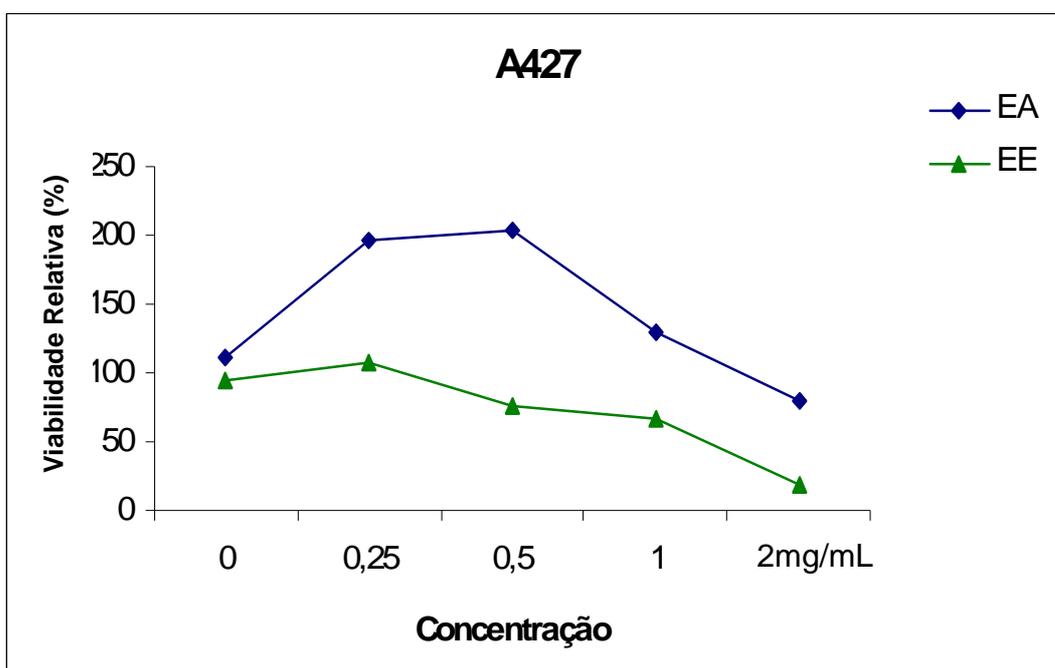
**FIGURA 5.1:** Representação gráfica do efeito dos extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii* no número de células (CALU). Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata.

As células de câncer pulmonar não pequenas<sup>1</sup> (NSCLC) da linhagem CALU (ATCC) foram submetidas ao tratamento com diferentes diluições de EE e EA (FIGURA 5.1, página

<sup>1</sup> O tumor de células não-pequenas corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e distintos: carcinoma epidermóide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, ocorrendo em

109), durante 24h. As células tratadas com os extratos apresentaram redução em sua função mitocondrial, na concentração de 2 mg/mL.

Da mesma forma, as células de câncer pulmonar não pequenas (NSCLC) da linhagem A427 (ATCC) foram submetidas ao tratamento com diferentes diluições de EE e EA (FIGURA 5.2, página 110), durante 24h. Analisando a redução do MTT em função da concentração do extrato foi possível verificar que o perfil da curva é semelhante ao da FIGURA 5.1 (página 109). As células tratadas com os extratos apresentaram redução em sua função mitocondrial, na concentração de 2mg/mL.



**FIGURA 5.2:** Representação gráfica do efeito dos extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) de folhas de *Pouteria gardnerii* no número de células (A427). Os resultados estão expressos em porcentagem relativa ao controle (sem extrato), considerado como 100%. Os pontos experimentais representam a média de dois experimentos independentes em triplicata.

Por outro lado, analisando a redução do MTT em função da concentração do extrato foi possível verificar que o extrato EA, nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL, resultou no incremento de 100% da capacidade mitocondrial de reduzir o MTT.

Entretanto, o tratamento das células com o extrato em concentrações maiores, não alterou a viabilidade celular relativa.

O extrato EE, na concentração de 2mg/mL resultou na diminuição em cerca de 90% da capacidade mitocondrial de reduzir o MTT, coerente com a redução no número de células.

## 5.2 – Atividade fotoprotetora

A avaliação preliminar da atividade fotoprotetora dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) das folhas de *Pouteria gardnerii* baseou-se na capacidade dessas amostras de absorverem a radiação ultravioleta (item 1 2.1.4.2, página 35).

A radiação UV é dividida em três diferentes faixas de comprimento de onda: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm) (HO *et al.* 2005). A radiação UVB é responsável por danos agudos à pele, tais como queimaduras (eritematogênica), bronzeamento tardio e de longa duração, bem como promove a síntese de vitamina D. Além disso, essa radiação também provoca danos crônicos, dos quais os mais evidentes são o fotoenvelhecimento, a imunossupressão e a fotocarcinogênese (SOUZA *et al.* 2005, KULLAVANIJAYA & LIM 2005).

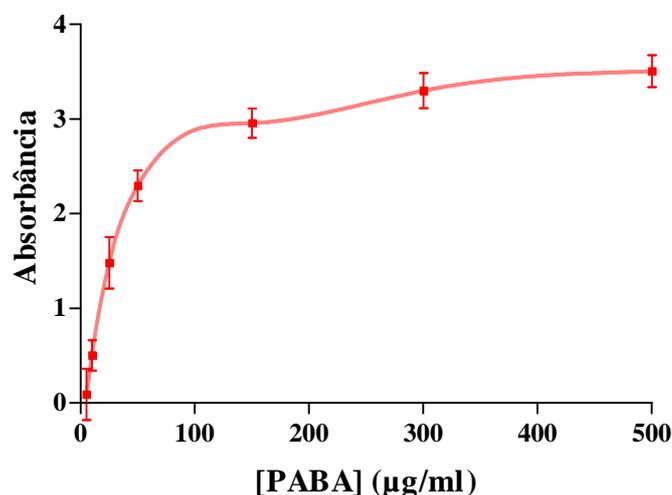
Já a radiação UVA caracteriza-se por causar danos mais leves e crônicos; é responsável pelo bronzeamento imediato e de curta duração (pigmentogênica). A exposição a essa radiação tem sido considerada a principal causa de fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese, sendo mais efetiva que a UVB na indução do dano peroxidativo (DAMIANI *et al.* 2006).

A camada de ozônio absorve a radiação UVC, grande parte da UVB, mas não absorve a UVA. A depleção dessa camada nos últimos tempos provocou um aumento na incidência de UVB na atmosfera (FERNANDEZ *et al.* 1998) e, conseqüentemente, o aumento das enfermidades relacionadas à exposição prolongada a tal radiação.

O ácido *p*-aminobenzóico (PABA) foi utilizado como controle positivo, pois apresenta uma boa capacidade de absorção da radiação UV. Ele foi um dos primeiros ingredientes orgânicos de protetores solares, sendo patentado em 1943. No entanto, apresenta a inconveniência de manchar as roupas quando em contato com ele, além de causar reações alérgicas, o que torna seu uso limitado em formulações fotoprotetoras (KULLAVANIJAYA & LIM, 2003).

O PABA apresenta comprimento de onda de máxima absorção em 283nm (KULLAVANIJAYA & LIM, 2003), na faixa de UVB e esta absorção é dose-dependente, como mostra a FIGURA 5.3. No entanto, nas condições nas quais foi realizado o

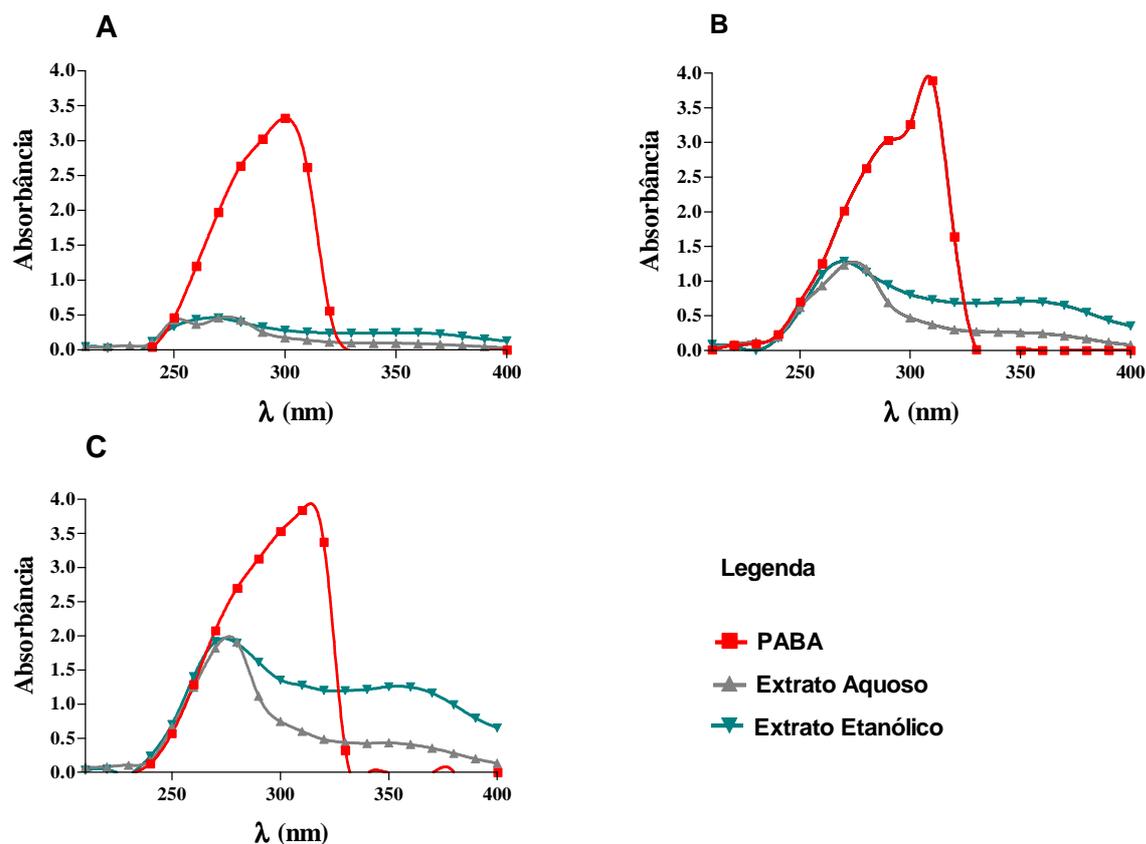
experimento, foi observado que nas concentrações de 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$  (B e C, respectivamente), esse composto apresenta absorção máxima no comprimento de onda 310nm, enquanto que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$  (A), o máximo de absorção ocorre em 300nm.



**FIGURA 5.3:** Absorbância média na faixa de 290-320 nm (UVB) de soluções de PABA em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50, 150, 300 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão de, no mínimo, três experimentos.

Os gráficos apresentados na FIGURA 5.4 (página 113) mostram que os extratos de *P. gardnerii*, principalmente o extrato etanólico, apresentam absorção na faixa de UVB e UVA, esta última sendo mais evidente nos gráficos que representam os ensaios nas concentrações mais altas (B e C). Considerando que nos dois extratos avaliados foi constatada a presença de flavonóides e que esta classe de compostos apresenta dois picos máximos de absorção da radiação ultravioleta, um entre 240-280nm e outro a 300-550nm (SOUZA *et al.* 2005), tal fato pode justificar os resultados obtidos.

Os resultados indicam que essas amostras parecem ser potencialmente interessantes como fontes de substâncias alternativas aos ativos fotoprotetores atualmente utilizados, pois diferente do controle (PABA), apresentam absorção na faixa de UVA, o que pode significar uma fotoproteção mais ampla.



**FIGURA 5.4** – Comparação entre a absorvância, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400nm, dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. gardinerii* e PABA. A) 50mg/mL, B) 150mg/mL e C) 300mg/mL

### 5.3 - Atividade Antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO), radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), ânion radicalar superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) e radical hidroperoxila ( $\text{ROO}\bullet$ ), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os ERO atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, iniciando o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares a partir da abstração de um hidrogênio do grupo metileno bis-alílico. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação (SOUSA *et al.*, 2007).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena (por ex., superoxidodismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Em outras palavras, possuem a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação.

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos. O interesse pelos antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas devido à constatação dos efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT (butiliidroxitolueno), BHA (butiliidroxianisol) e T-BHQ (*t*-butiliidroquinona), utilizados como agentes antioxidantes em alimentos e cosméticos, sobre o peso do fígado e com marcado aumento do retículo endoplasmático, entre outros (DEGÁSPARI *et al.*, 2004).

### **5.3.1 - Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio (RUCH *et al.*, 1989).**

Os extratos brutos hexânico (EH), etanólico (EE) e aquoso (EA) de *P. gardnerii*, foram avaliados quanto à habilidade em seqüestrar os radicais livres de peróxido de hidrogênio em comparação com o controle positivo (ácido ascórbico) (item 2.1.4.3.1, página 35)

Os resultados são os encontrados na TABELA 5.2, página 115.

O extrato hexânico (EH) de *Pouteria gardnerii* foi o único que não apresentou atividade antioxidante nas condições do ensaio. Por outro lado, EE e EA apresentaram uma atividade antioxidante relevante, com CE<sub>50</sub> cerca de 2 e 3 vezes menores que aquela apresentada pelo controle positivo (ácido ascórbico).

A efetividade antioxidante de fontes naturais foi relacionada por diversos autores aos compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (HAYASE & KATO, 1984). Seriam esses compostos os principais responsáveis pela atividade antioxidante de plantas, desempenhando papel fundamental na inibição da autoxidação em óleos (RAMARATHNAM *et al.*, 1986).

**TABELA 5.2 – Atividade Antioxidante pelo Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio, dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de *Pouteria gardnerii***

Extratos	CE <sub>50</sub>		Correlação Linear
	extrato	ácido ascórbico	
EH	ND	84,87 µg/mL	ND
EE	44,88 µg/mL	84,87 µg/mL	0,97
EA	28,39 µg/mL	84,87 µg/mL	0,99

ND= não determinado

### 5.3.2 - Método do seqüestro do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Dos vários métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), de cor púrpura (absorve a 515nm). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenilpicrilhidrazina, de cor amarela, e essa reação pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio de reação pode ser determinada. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a concentração eficiente (CE<sub>50</sub>) também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Os extratos brutos hexânico (EH), etanólico (EE) e aquoso (EA) de *P. gardnerii*, foram testados quanto à capacidade em seqüestrar o radical estável DPPH em comparação com o controle positivo BHT (butilidroxitolueno) (item 2.1.4.3.2, página 36) (RUCH *et al.*, 1989). Os resultados são os encontrados na TABELA 5.3, página 116.

Nas condições experimentais, nenhum extrato apresentou atividade antioxidante significativa quando comparados com o controle BHT. Porém considerando que o extrato aquoso (CE<sub>50</sub>= 46,5µg/mL) apresentou atividade antioxidante numa concentração cerca de 3 vezes maior que o BHT (15,0µg/mL), que é um antioxidante sintético, torna-se relevante a busca do composto responsável por essa atividade no extrato aquoso.

**TABELA 5.3 – Atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical livre DPPH de extratos brutos de *Pouteria gardnerii***

Extratos	CE <sub>50</sub> do extrato	CE <sub>50</sub> do BHT
Hexânico (EH)	181,0 µg/mL	15,0 µg/mL
Etanólico (EE)	95,8 µg/mL	15,0 µg/mL
Aquoso (EA)	46,5 µg/mL	15,0 µg/mL

#### 5.4.– Atividade antimicrobiana

##### 5.4.1 – Método do disco (NCCLS, 2003a)

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (NCCLS, 2003a).

Os testes de difusão em disco, baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de difusão em disco que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2003a).

O diâmetro do halo de inibição é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano presente no disco, à solubilidade do agente, ao coeficiente de difusão no meio de cultura sólido e à eficácia global do agente antimicrobiano (GCB–IST, 2007).

##### 5.4.1.1 – atividade antibacteriana (NCCLS, 2003b)

Foi avaliada a sensibilidade de bactérias frente aos extratos brutos hexânico (EH), etanólico (EE) e aquoso (EA), utilizando como controle positivo ciprofloxacina (CIPRO) (item 2.1.4.4.1, página 37). A atividade antibacteriana foi avaliada pela medida do tamanho do halo de inibição formado em colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados são apresentados na TABELA 5.4.

Após incubação (24-48h) foi medido o diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco, comparando com o halo inibição formado pelo controle positivo.

Comparando os níveis de atividade antimicrobiana dos três extratos, apresentados na TABELA 5.4, o extrato aquoso de *Pouteria gardnerii* (EA) foi a única amostra eficiente, mesmo apresentando um halo de inibição com a metade do diâmetro daquele apresentado pela ciprofloxacina, inibindo *Staphylococcus aureus*.

**TABELA 5.4: Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Pouteria gardnerii***

Amostras	<i>Sa</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>
	Diâmetro (mm)		
EA	12,3	0	0
EE	0	0	0
EH	0	0	0
CIPRO/água	24,3	16	16
CIPRO/etanol	25,6	20	20
CIPRO/hexano	24,6	30	30
Água	0	0	0
Etanol	0	0	0
Hexano	0	0	0

**Ec** = *Escherichia coli* - ATCC 25922; **Pa** = *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853; **Sa** = *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213. EH = extrato hexânico; EE = extrato etanólico; EA = extrato aquoso. CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), aplicação 20 $\mu\text{L}$ : extratos: 2000; CIPRO = ciprofloxacina, 2000.

Os agentes antimicrobianos podem influenciar a parede celular e/ou membrana celular sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou síntese de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microorganismos (RANG *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 1999).

*Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos da família do Micrococaceae, catalase positivos. São amplamente encontrados na natureza e fazem parte da microbiota natural da pele e da mucosa. O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas delas causadoras de infecções de caráter oportunista em seres

humanos e animais, como *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*. Um marcador de patogenia destes microorganismos é a capacidade de coagular o plasma (SARTORI, 2005). As infecções causadas por *S. aureus* apresentam morbidade e mortalidades elevadas sendo responsáveis por 20% das infecções bacterianas humanas. O surgimento nos últimos anos de cepas *S. aureus* multiresistentes constitui um dos problemas mais relevantes no controle de infecções e na terapêutica antimicrobiana. (CATÃO *et al.*, 2006).

Assim a atividade antimicrobiana demonstrada pelo extrato aquoso contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, torna-se de extrema relevância e sugere a busca do composto ativo.

#### 5.4.1.2 Atividade antifúngica (SMANIA *et al.*, 1995).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos. A procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, é intensa devido à crescente resistência dos microorganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos. (PASSOS *et al.*, 2002; AMARAL & BARA, 2005)

Diante disso, foi avaliada a sensibilidade das cepas *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus sp* CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium sp* CCT 2147, *Epidermophyton floccosum* URM 4799, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 *Candida parapsilosis* CCT 3438 e *Aspergillus fumigatus* CCT 1277 frente aos extratos EH, EE e EA e aos controles positivos de nistatina e anfotericina B (item 2.1.4.4.2, página 38).

A atividade antifúngica dos extratos e dos controles foi avaliada a partir do tamanho do halo de inibição formados, em comparação com os controles positivos anfotericina B e nistatina.

Não houve a formação do halo de inibição para qualquer concentração dos extratos avaliados. Quanto aos controles, o tamanho do halo de inibição variou de 9mm-25mm para a nistatina e de 9mm-15mm, para a Anfotericina B.

## **CAPÍTULO 6 – DATOS ESPECTROMÉTRICOS**

**6.1 – MISTURA DE HIDROCARBONETOS (PG01)**

**Características:** cera esbranquiçada solúvel em hexano.

**IV (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 2917; 2849; 1473; 1462; 730 e 719

**RMN  $^1\text{H}$ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 0,88(*s*) e 1,25 (*s*).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,1; 22,7; 29,3; 29,7; 31,9

**6.2 MISTURA DE TRITERPENOS:  $\alpha$ -AMIRINA,  $\beta$ -AMIRINA, ACETATO DE  $\alpha$ -AMIRINA E ACETATO DE LUPEÍLA (PG02).**

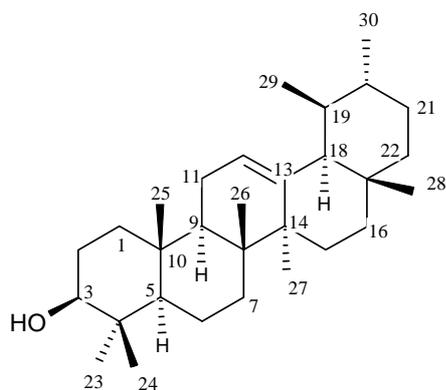
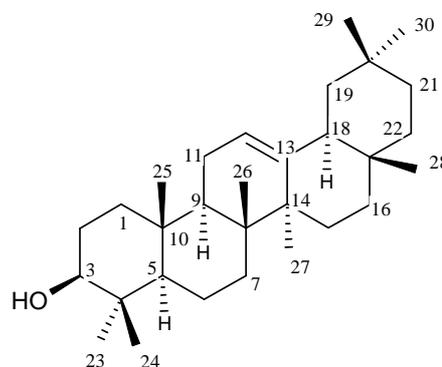
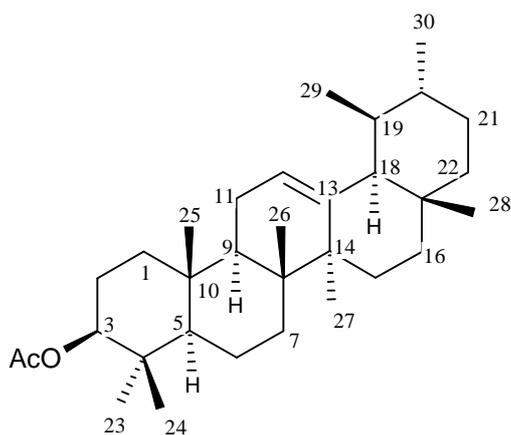
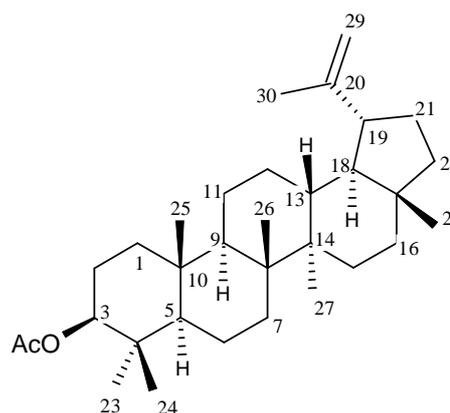
**Características:** Sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio

**IV (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3438; 2925; 2851; 1733; 1638; 1247; 1024 e 980

**CG-EM (70 eV,  $m/z$ ):**  $\alpha$ -amirina: 426 ( $\text{M}^+$ ); 218 (100%); 207; 203; 189.;  $\beta$ -amirina: 426 ( $\text{M}^+$ ); 218; 207; 203; 189. acetato de  $\alpha$ -amirina: 468 ( $\text{M}$ ); 408; 365; 249; 218 (100%); 203; 219; acetato de lupeíla: 468 ( $\text{M}^+$ ); 408; 365; 218; 189 (100%)

**RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :**  $\alpha$ -amirina: 5,12 (1H, *t*,  $J= 3,6$  Hz); 4,50 (*s*); 1,55 (*s*) - 0,78 (*s*). acetato de  $\alpha$ -amirina: 5,12 (1H, *t*,  $J= 3,6$  Hz); 4,50 (*s*); 1,55 (*s*) - 0,78 (*s*);  $\text{CH}_3\text{CO}$ : 2,05 (3H, *s*).  $\beta$ -amirina: 5,18 (1H, *t*,  $J= 3,6$  Hz); 4,50 (*s*); 1,55 (*s*) - 0,78 (*s*); acetato de lupeíla: 4,68 (1H, *d*,  $J= 2,4$  Hz); 4,60 (1H, *t*,  $J= 3,6$  Hz); 1,68 (*s*); 1,55 (*s*) - 0,78 (*s*),  $\text{CH}_3\text{CO}= 2,04$  (3H, *s*)

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :**  $\alpha$ -amirina: 38,7; 27,7; 80,9; 38,4; 55,2; 18,2; 32,8; 39,9; 47,6; 36,9; 23,3; 124,3; 139,6; 42,0; 28,7; 26,6; 33,7; 59,0; 39,6; 39,6; 31,2; 41,5; 28,0; 15,5; 15,7; 16,7; 23,3; 28,0; 17,4; 21,3;  $\beta$ -amirina: 38,4; 27,4; 80,9; 38,4; 53,3; 18,2; 32,8; 39,9; 47,6; 37,6; 23,6; 121,6; 145,1; 41,7; 26,2; 26,9; 32,5; 47,5; 46,7; 31,0; 34,7; 37,1; 28,0; 15,5; 15,7; 16,8; 25,9; 28,4; 33,3; 23,7. acetato de  $\alpha$ -amirina: 38,4; 28,0; 80,6; 38,0; 55,2; 18,2; 32,8; 40,0; 47,5; 36,7; 23,3; 124,3; 139,6; 42,0; 28,7; 26,9; 33,7; 59,0; 39,6; 36,6; 31,2; 41,5; 27,9; 15,7; 16,1; 16,8; 23,2; 28,0; 17,4; 21,3;  $\text{CH}_3\text{CO}$  171,0;  $\text{CH}_3\text{CO}$  21,3. acetato de lupeíla: 38,4; 23,7; 80,9; 37,8; 55,3; 18,2; 34,3; 40,8; 50,3; 37,1; 20,9; 25,0; 38,0; 42,9; 27,4; 35,5; 43,0; 48,2; 48,0; 150,9; 29,8; 40,0; 28,0; 16,5; 16,1; 16,0; 14,5; 18,0; 109,3;  $\text{CH}_3\text{CO}$  21,3;  $\text{CH}_3\text{CO}$  171,0.


 $\alpha$ -amirina

 $\beta$ -amirina

 acetato de  $\alpha$ -amirina


acetato de lupefól

### 6.3 – MISTURA DE ÉSTERES DE CADEIA LONGA (PG03)

**Características:** cera amarelada, solúvel em clorofórmio

**IV (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3646, 2923, 2852, 1738, 1244, 1031, 981

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 4,1 (3H, *q*,  $J=7,2\text{Hz}$ ), 2,28 (2H, *t*,  $J=5,4\text{Hz}$ ), 1,23 (*s*), 1,29 (*s*), 0,88 (2H, *d*,  $J=7,2\text{Hz}$ ).

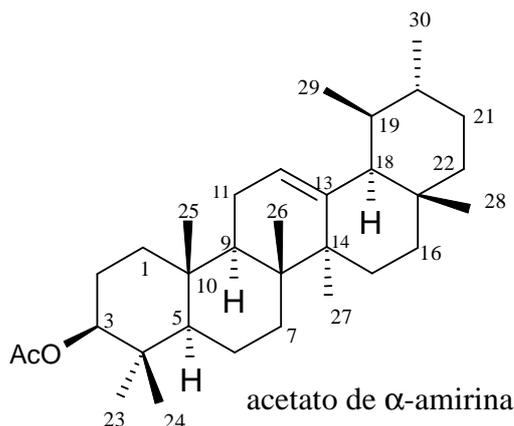
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 173,9; 60,1; 34,38; 31,9; 29,6; 24,9 e  $\delta$ 22,67



#### 6.4 – ACETATO DE $\alpha$ -AMIRINA (PG04)

**Características:** sólido branco e amorfo, solúvel em clorofórmio

**Rf:** 0,8



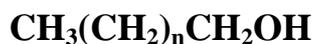
#### 6.5 – MISTURA DE ÁLCOOIS DE CADEIA LONGA (PG05)

**Características:** Sólido branco amorfo, solúvel em hexano

**IV (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 3432, 2925, 2853, 1459.

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 2,17 (s); 1,6 (s); 1,0 (s); 0,95 (s) e 0,78 (s).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 14,13; 31,9; 29,7 e 22,6



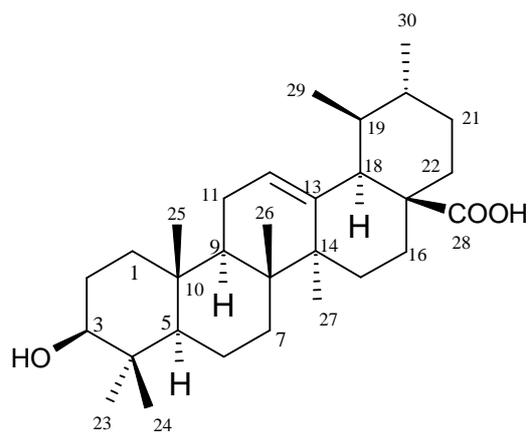
#### 6.6 – MISTURA DE TRITERPENOS: ÁCIDO URSÓLICO E ÁCIDO OLEANÓLICO (PG06)

**Características:** sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio

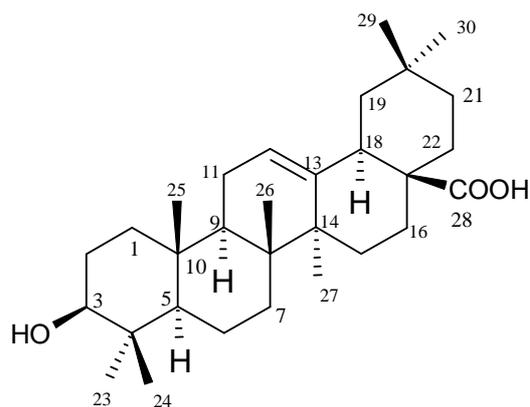
**IV (KBr)  $\nu_{\text{máx.}}$   $\text{cm}^{-1}$ :** 343; 2926; 2855; 1690; 1458; 1385

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 5,26 (s); 3,23 (1H, *d*,  $J=4,8\text{Hz}$ ); 3,20 (1H, *d*,  $J=4,8\text{Hz}$ ), 0,71 (s) - 1,21 (s).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** ácido ursólico: 38,7; 27,1; 79,0; 38,7; 55,2; 18,2; 32,9; 39,4; 47,5; 37,0; 23,3; 125,8; 137,8; 41,9; 28,1; 24,1; 47,9; 52,6; 39,0; 29,7; 30,6; 36,6; 28,1; 15,5; 15,6; 17,0; 23,6; 182,2; 24,10; 21,10. ácido oleanólico: 38,5; 27,1; 79,0; 38,7; 55,2; 18,2; 32,6; 39,4; 47,6; 37,0; 23,2; 122,6; 143,5; 41,6; 27,6; 23,3; 45,8; 40,9; 45,8; 40,9; 45,8; 30,6; 33,7; 32,4; 28,1; 15,4; 15,3; 16,9; 25,9; 182,5; 33,0; 23,6.



ácido ursólico



ácido oleanólico

# **CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

A química de produtos naturais tem uma grande importância na geração de novos conhecimentos, pela elucidação de novas estruturas moleculares e a avaliação de sua atividade biológica.

Ao final desse trabalho os seguintes resultados foram obtidos:

Do extrato hexânico foram isolados:

mistura de hidrocarbonetos (**PG01**)

mistura dos triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, acetato de  $\alpha$ -amirina e acetato de lupeíla (**PG02**)

mistura de ésteres de cadeia longa (**PG03**)

Do extrato etanólico foram obtidos

acetato de  $\alpha$ -amirina (**PG04**)

Mistura de álcoois de cadeia longa (**PG05**)

Mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (**PG06**)

❖ O extrato aquoso, a fração acetato de etila do extrato hexânico e a fração hexano:acetato de etila do extrato etanólico apresentaram atividade citotóxica quando avaliados pelo modelo de toxicidade às larvas de *Artemia salina*.

Os extratos etanólico e aquoso inibiram a atividade mitocondrial das células câncer pulmonar não pequenas (NSCLC) da linhagem CALU. O extrato etanólico também diminui a viabilidade celular de outra linhagem celular, a A427, corroborando a atividade citotóxica desses extratos, observada no experimento com *A. salina*.

❖ O extrato etanólico apresentou a capacidade de absorção de radiação ultravioleta tanto na faixa UVA, quanto UVB, o que indica um potencial para a utilização como protetor solar.

❖ Os extratos etanólico e aquoso apresentaram atividade sequestradora de radicais livres (gerados via peróxido de hidrogênio) em uma concentração, respectivamente, uma e duas vezes menor que o ácido ascórbico, o que significa um alto potencial antioxidante. Essa atividade parece ser seletiva, pois em uma avaliação quanto à capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), nenhum dos extratos apresentou atividade significativa, em comparação com o butilhidróxitolueno.

❖ O extrato aquoso apresentou atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Entretanto, nenhum dos extratos brutos apresentou atividade contra as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

❖ Nenhum extrato apresentou atividade antifúngica contra as cepas *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus sp* CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium sp* CCT 2147, *Epidermophyton floccosum* URM 4799, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 *Candida parapsilosis* CCT 3438 e *Aspergillus fumigatus* CCT 1277.

Extratos de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas (BRONDI *et al.*, 2004).

A atividade antioxidante de fontes naturais foi relacionada por diversos autores aos compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (HAYASE & KATO, 1984). De fato, foi possível detectar a presença de flavonóides nos extratos aquoso e etanólico. Entretanto, a elucidação estrutural não foi realizada.

É importante ressaltar que, em geral, os antioxidantes naturais não são tão eficientes na desativação de radicais livres em testes *in vitro*, quanto os sintéticos. Assim, os resultados obtidos são de extrema relevância.

Outro aspecto importante a ser destacado é que é a primeira vez que essa espécie é investigada quanto à sua composição micromolecular e sua atividade biológica potencial.

Além disso, é o primeiro relato da presença de ácido oleanóico em uma espécie do gênero *Pouteria*. Assim, o estudo das folhas da espécie *Pouteria gardnerii* – Sapotaceae vem acrescentar subsídios às informações sobre a química e atividade biológica desse gênero.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NAGÃO, T.; KIMPIO, J.; OKABE, H.; HIGO, H.; AKAHANE, H. Ursolic acid as trypanocidal constituents in Rosemary. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 25, n. 11, pp. 1485, 2002.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry*, vol 66, n. 19, pp. 2388-2392, 2005.

AGUILAR-GONZALEZ A.R.; MENA-REJON, G. J.; PADILLA-MONTANO N.; TOSCANO A. ; QUIJANO L. ; Triterpenoids from *Hippocratea excelsa*. The crystal structure of 29-hydroxytaraxerol. *Z. Nat.forsch., B J. Chem. Sci.* vol. 60, n. 5, pp. 577-584, 2005.

AGUIRRE, M. C.; DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; ERAZO, S. & NEGRETE, R. estudo químico y farmacológico de las hojas de *Ugni molinae*. In: VIII Simpósio Argentino y XI Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2004, Buenos Aires, Argentina. Livro de Resumos, 2004.

AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I. YOUNG, M. C. M.; MORENO, P. R. H. Screening of Brazilian Plant for antimicrobial and DNA-Dmaming Activities. Atlantic rain forest-ecological station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica*, v. 4, n. 2, 2004.

AHMAD, V. U.; MUHAMMAD, A. A.; HUSSAIN, H.; AKHTAR, M. N.; FAROOQ, U.; FÁTIMA, N.; CHOUDHARY, M. I. Phenolic glycosides from *Symplocos racemosa*: Natural inhibitors of phosphoesterase I. *Phytochemistry*, vol. 63, n. 2, pp. 219-220, 2003.

AKIHISA, T., YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, n. 43, pp.1255-1260, 1996.

ALANIS, A. D.; CALZADA, F. ; CEBALLOS, G. Evaluación de *Punica granatum* contra bacterias causantes de diarrea. In: XXVII congreso Nacional de Farmacologia da Associação Mexicana de Farmacologia, 2004, México. Livro de Resumos, pag. 81 (Ma-13), 2004.

ALBUQUERQUE, C. L.; BORTOLINI, Jr, M. A.; QUESQUTA, M. L.; SILVEIRA, D.; PAULA, J. E. ESPINOLA, L. S.. Inibição da atividade de alfa-amilase da saliva humana por extratos de planta. XVII simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002, Cuibá. Livro de resumos do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PIRES, A.M. L.; PESSOA O. D. L., SILVEIRA, E. R. Terpenoids, flavonoids and other constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* , vol. 17, n. 1, pp. 68-72, 2006.

ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. *Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus*. Journal of Ethnopharmacology. Reino Unido. 2006.

ALI, M. S.; JAHANGIR, M.; ULHUSSAN, S. S.; CHOUDHARY, M. I., Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivates. *Phytochemistry*, vol. 60, n. 3, p. 295 – 299, 2002.

ALI, M., RAVINDER E., RAMACHANDRAM R. New ursane-type triterpenic esters from the stem bark of *Thevetia peruviana*. *Pharmazie*. vol. 55, n.5, pp.385-389, 2000.

ALI MS, PERVEZ MK, SALEEM M, TAREEN RB. Haplophytin-A and B: the alkaloidal constituents of *Haplophyllum acutifolium*. *Phytochemistry*. vol. 57, n. 8, pp.1277-1280, 2001.

ALVAREZ, L.; ZAMILPA, A.; MARQUINA, S.; GONZALEZ, M.; Two New Oleanolic acid saponins from the roors of *Viguiera hypargurea*. *Revista de la Sociedad Química de México*, vol. 47, n. 2, pp. 173-177, 2003.

ALVAREZ, M. E., ROTELLI, A. E., PELZER, L. E., SAAD J. R.; Actividad irritante de *Clematis montevidensis* Sprengel (Ranunculaceae). Trabajo de investigación original. *Dermatologia Peruana*, vol. 12, n.1, 2002.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M., GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 95, n. 3, pp 367-373, 2000.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento* vol 2 (2), 5- 8, 2005.

AMARO, L.J.M.; HERREGA, J.R.; LUIS, J. G. Abietane diterpenoids from *Salvia chinopeplica*. *Phytochemistry*, vol. 47, n. 5, pp. 895-897, 1998.

ANANDJIWALA, S.; KALOLA, J., RAJANI, M. Quantification of Eugenol, luteolin, ursolic acid and oleanolic acid em Balck (*krishna tulasi*) and green (*Sritulasi*) varieties of *Ocimum sanctum* Linn. Using high-performance thin layer chromatography. *Journal of AOAC Internacional*, vol. 89, n. 6, pp. 1467-1476, 2006.

ANVISA; Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução RDC Nº 48, de 16 de março de 2004.

AMAZÔNIA, disponível em: < <http://www.amazonia.org.br/>> Acesso em 01/02/2007.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento de vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Shinus terebinthifolius* Raddi). Ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, vol. 25, n. 2, pp. 95-182, 2003.

ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; NUNES, E. P.; *et al.* Abietane diterpenes from *Hyptis platanifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 16, n. 6b, pp. 1336-1341, 2005.

ARGAY-GY; KALMAN, A.; KAPOR, A.; RIBAR, B.; PETROVIC, S.; GORUNOVIC, M.; Crystal structure of a mixture of lupeol-acetate tautomers isolated from *Hieracium plumulosum* A. Kerner, Asteraceae. *Journal of Molecular Structure*, vol. 435, n. 2, pp. 169-179, 1997.

ATSUKO, I.; YUKI, I.; YOSHIKAZU, B.; TAKAO, T.; NAOTAKA N.; Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*, *Phytochemistry*, v. 52, pp.1169-1176, 1999.

BAGGIO, C. H. Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Achillea Millefolium* L. Curitiba: Setor de Ciências Biológicas do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. Tese de Mestrado, 2004. 150p.

BAKKER, M. I.; BAAS, W. J.; SUM, D. T. H., M.; KOLLOFFEL, C. Leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*. *Phytochemistry*, vol. 47, n. 8, pp. 1489-1493, 1998.

BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B.; AHMAD, S.F.; SURI, K.A.; GUPTA, B.D.; SATTI, N.K.; QAZI, G.N. *Suppression of T lymphocyte activity by lupeol from Crataeva religiosa*. *Phytotherapy research*. Índia. Abril, 2006.

BAPTISTELLA, L. H. Constituintes químicos de *Gnaphalium spatulatum* L. e análises espectrais de derivados do glutinano. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas. Tese de doutorado, 1981, 249p.

BAKKER M.I.; BAAS W.J.; SIJM D.T.H.M.; KOLLOFFEL C. Leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*. *Phytochemistry*, vol. 47, n. 8, pp. 1489-1493, 1998.

BALESTRIN L. estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas, antibacterianas e atioxidante de *Dorstenia multififormis* Miquel, Moraceae. Curitiba: Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado, 2006, 111p

BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMNOVSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinallis* L. Leaves. The relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 75 n. 2-3, pp. 125-132, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dioclea lasiophylla*. Salvador: Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Dissertação de Mestrado, 2000, 142p.

BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G.; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.* vol. 9, n. 5, pp. 430-434, 1998.

BASAR, S. *Phytochemical investigation on Boswellia species*; Hamburg, 2005

BAUER, S. Die Zusammensetzung der Oberflächenwaxse von Tomaten, Paprika und Auberginen. Faculdade de Matemática científica da Westfäli William university Münster. Tese de doutorado. 2002

BEDIR, E.; KIRMIZIPEKMEZ, H., STICHER, O. SALIS, I., Triterpene saponnins from the fruits *Heclera helix*. *Phytochemistry*, n. 53, 2000.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LION, F. QUINTANA, J. MATIAS, L. HERNANDEZ, J. C.; ESTÉVEZ, F.; BERMEJO, J.; Cladocalol, a pentacyclc 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with citotoxic activity. *Phytochemistry*, vol. 66, n. 6, pp. 627-632, 2005.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; ROZENBERG, R. ; JIWAN, J. L. H. LLABRÈS, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, vol. 65, n. 8, pp. 1165-1171, 2004.

BOHME, F.; SCHMIDT, J.; SUNG, T. V.; ADAM, G. 24-Methylpollinastanone, related triterpenoids and sterols from *Costus tonkinensis*. *Phytochemistry*, vol. 45, n. 5, pp. 1041 – 1044, 1997.

BOLETI, A. P.; FREIRE, M. D.; COELHO, M . B.; SILVA, W. D.; BALDASSO, P. A.; GOMES, V. M. MARAGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L.; Insecticidal and antifugal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 55, n. 7, pp. 2653 – 2658, 2007.

BORGES, E. M. Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae). Ribeirão Preto: Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e letras de Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado. 2006, 98p.

BORMAN S., Improving Efficiency: to eliminate R&D bottlenecks, drug companies are evaluating all phases of discovery and development and are using novel approaches to speed them up. *Chemical & Engineering News*. vol. 84, n. 25, pp. 56-78, 2006.

BRIAN, S. T.;CROCKETT, S. BEDIR, E. KHAN, I. A. The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra, *Phytochemistry*, vol. 62, n. 6, pp. 911-918, 2003.

BRINGE, K. SHUMACHER, C. F. A.; SHMITZ, E. M.; STEINER, V. OERK, E. C. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of a daxial apples leaves surface. *Phytochemistry*, vol. 67, n. 16, pp. 1832-1837, 2006.

BRONDI, R. A. ; PERFEITO, J. P. ; SILVEIRA, D. ; FERREZ, S. J.; RAMALHO, L. S.; PAULA, J. E.; SANTOS, M. L. ; SCHWARTZ, E. N. F.; LÓPEZ, K. S. E.; Atividade antimicrobiana de extratos das folhas de espécies de *Pouteria*, Sapotaceae; Livro de Resumos do XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil.; 2004; XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil.; Manaus;

BUCHELI, J. C.; ESTEVÉZ, M. C.; ROJAS, P. P. A.; Analgésicos usados em el manejo del dolor dental: acetoaminofen, inhibidores de la COX-2 ketorolaco y nimesulida. *Artículos de Revision*. Faculdade de odontologia, Pontificia Universidade Javeriana. Disponível em: <[http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i\\_a\\_revision34.html](http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revision34.html)> acesso em 21/03/2007

CAMPOS, K.E., BALBA, P. C.; ALVES, M. J. Q. F.; Efeitos do extrato aquoso de cebola (*Allium cepa* L.) sobre a função renal e a pressão arterial em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n.1, pp. 24-29, 2005

CANAES, L. S., FILHO, F. O.; Determinação turbidimétrica de metilbrometo de hematropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, vol. 29, n. 6, pp. 1237-1240, 2006

CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência & cultura*, v. 55 n. 3, pp. 37-39, 2003.

CASTRO, C. F. S.; SILVA, C. A. M.; PERFEITO, J. P. ; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. In: 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, p. PN250, 2006.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. M. P; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V; HIGINO, J. S.; ALVES, J. A.; PASSOS, M.G.V.M. & SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum linn.* (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *RBAC*, vol. 38, n. 2, pp. 111-114, 2006

CERQUEIRA, M. D., Estudo fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (berg.) legrand. (myrtaceae). Salvador: Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Dissertação de Mestrado. 2002.

CHAGAS, F. L.; BITTENCOURT, A. L. M. L.; BISPO, C. I.; ESPINDOLA-DARVENNE, L. S.; SILVEIRA, D; MESQUITA, M. L. F.; FERREIRA, V. M. M.; PAULA, J. E. Avaliação antinociceptiva de *Pouteria*. In: XVIII Reunião Anual da FESBE 2003, Curitiba, RS, Anais da XVIII Reunião Anual da FESBE, 2003.

CHAMDRAMU, C.; MANOHAR, R. D.; KRUPADANAM, D. G. L.; DASHAVANTHA, R. V. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L.. *Phytochemistry Research*, vol. 17, n. 2, pp. 12-134, 2003

CHARLES, R.; GARG., S. N.; KUMAR, S. An orsellinic acid glucoside from *syzygium aromatica*. *Phytochemistry*, vol. 49, n. 5, pp- 1375-1376, 1998

CHATTERJEE, I.; CHAKRAVARTY, A.K.; GOMES, A. *Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R.Br. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. 106, n. 1, pp. 38-43, 2006.

CHATURVEDULA, V.S.; ZHOU, B.N.; GAO, Z.; THOMAS, S.J.; HECHT, S.M.; KINGSTON, D.G. *New lupine triterpenoids from Solidago Canadensis that inhibit the lyase activity of DNA polymerase beta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Estados Unidos. Dezembro, 2004.

CHAVES, J. P.; SANTOS, I. D. S.; CRUZ, F. G.; DAVID, I. M.; Flavonoides and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal* Costae. *Phytochemistry*, vol. 41, n. 3, pp. 941-943, 1996.

CHE, C.T., KOIKE, K., CORDELL, G. A., FONG, H.H.S. & DOBBERSTEIN, R. H., Triterpenes of *Pouteria torta* (Sapotaceae). *Planta Médica*, v. 43, n. 3, p. 420 – 421, 1980.

CHIANG, C. Y.; CHANG, J. Y.; RUO, C. C.; CHANG, C. Y.; HUO, Y. H. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, vol. 66, n. 4, pp. 495-501, 2005.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; LIU, M. C.; LIN, C. C. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 52, pp. 194-198, 2003.

CHUNG, Y. K.; HEO, H. J.; KIM, E. K.; KIM, H. K.; HUH, T. L.; LIM, Y.; KIM, S. K.; SHIN, D. H. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Molecules and Cells*, vol. 11, n. 2, pp. 137-143, 2001.

COÊLHO, A. A. M., Análise inseticida de extratos de plantas do bioma Cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegyptis*. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado. 2006. 104p.

CENTURION, T. R.; KRALJEVIC, I. J; Las plantas utiles de Lomerio, *Belfor herbario (UCZ) ciclo*. Santa Cruz, Bolivia, 1996.

CERQUEIRA, M. D., Estudo fitoquímico de *Myrcia rotundifolia* (berg.) legrand. (myrtaceae). Salvador: Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Dissertação de Mestrado. 2002.

CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico de *Trichilia stipulata* e *Trichilia hirta* (Meliaceae). São Carlos, p 1-254. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, 1993.

CONFORTI F, LOIZZO MR, STATTI GA, MENICHINI F. Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* ALL. *Biol Pharm Bull*. vol. 28, n.9, pp.1791-1794, 2005

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, n. 60, pp. 52-60, 1997.

CULIOL, G., ORTALO-MAGNÉ, A., DAOUDI, M., THOMAS, GUYON, H., VALLS, R., PIOVETTI, L. Trihidroxilated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, n. 65, p. 2063-2069, 2004.

CUNHA, A. P.; Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. Disponível em: <<http://antoniopcunha.com.sapo.pt/ahspmscaf.htm>> Acesso em 31/01/2007.

CUNHA, W.R., SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C. C., FERREIRA, D. S. E BETARELLO, L. H.; Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustróides* (Melastonataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n.84 (2), 2003.

DAMIANI E., ROSATI L., CASTAGNA R., CARLONI P., GRECI L. Changes in ultravioleta absorbance na hence in protective efficacy against peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. *J Photochem Photobil B.*, vol. 82, pp. 204-213, 2006.

DAVID, V., Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores frutos e xilopódio de *Pouteria torta*. São Carlos, dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 1993.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetti*. *Química Nova*, vol. 24 n. 6, 2001.

DAVID, J. P.; SANTOS, E. O.; MIRANDA, M. S.; BARREIROS, A. L. B. S.; SANTOS, I. D.; DAVID, J. M.; Atividade antioxidante da epicatequina ( $2\beta \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$ ) epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, supl. pp. 05-06, 2002.

DEEPAK, M.; HANDA, S. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinallis*. *Phytoterapy Research*, vol. 14, n. 6, pp. 463-465, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, vol. 5, n. 2, 2004.

DE ROSA S, DE GIULIO A, IODICE C. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine-shrimp, and fish lethality assays. *J Nat Prod*, vol.57, pp. 1711-1716, 1994.

DELIRA, R. A.; PARRA-DELGADO, H.; APAN, M. T. R.; CAMACHO, A. N.; MARTINEZ-VÁSQUEZ, M.. Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. Var. Minor Benth. *Journal of the Mexican Chemical Society*, ano/vol. 47, n. 002, pp. 167-172, 2003.

DEWICK, P. M., Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 2ed, New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

DIAZ, A. M.; ABAD, M. J.; FERNANDEZ, L.; RECUERO, C.; VILLAESCURA, L.; SILVAM A. M.; VERMEJO, P. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol. Pharm. Bull.*, vol, 11, pp. 1307-1313, 2000.

DIAS, J. P. S., A Farmácia e a História – Uma introdução à história da Farmácia, da Farmacologia e da Terapêutica. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia. Disponível em: < <http://www.ff.ul.pt/paginas/jpsdias/Farmacia-e-Historia> > acesso em 30/01/2007

DUARTE, D. S., Estudo biomonitorado de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) e de *Macfadyena unguis-cati* L.A. Gentry (bignoniaceae) Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de doutorado, 1999, 164p

DUARTE D. S., DOLABELA MF, SALAS CE, RASLAN DS, OLIVEIRA AB, NENNINGER A, WIEDEMANN B, WAGNER H, LOMBARDI J, LOPES M.T., Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *J Pharm Pharmacol* 52: 347-352, 2000.

DUARTE –ALMEIDA, J. M.; SANTOS R.J.; FENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.26(2), pp. 446-452, 2006.

ELIZABETSKY, E., Etnofarmacologia como fundamento na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O., Farmacognosia da planta ao medicamento, 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS, 2000.

ESQUIVEL, B. : CALDERON, J.S. : SANCHEZ, A.A. : ZARATE, M. : SANCHEZ, L. Neoclerodane and languidulane diterpenoids from *Salvia sousae* and *S. karwinskii*. *Phytochemistry-Oxford*. vol. 45, n. 4, pp. 781-783, 1997.

ERCIL, D.; SAKAR, M. K.; DEL OMO, E.; SAN FELCIANO, A. Chemical constituents of *Linaria aucheri*. *Turk. J. Chem.*, vol. 28, pp. 133-139, 2004

ERSOA, F. E.; CAMPOS, I. O.; TABLA, V. P. RODRIGUES, L. M. P. Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnodoscolus aconitifolius*. *Revista de la Sociedad de Química de México*, vol. 48, n. 001, pp. 24-25, 2005.

ES SAADY, D.; DELAGE, C. SIMON, A.; CHULIA, A. J., Anti-proliferative effects of uvaol. *Fitoterapia*, vol. 66, n 4, pp. 366-369, 1995.

ESTEVAM, C. S., OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. F. C. O.; BARROS, E. C. P.; BARROS, A. C. P.; ROHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A.; Constituintes químicos e avaliação de *Ouratea nítida* Aubl. (ochnaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, n.3, pp. 195-198, 2005.

FALCÃO, D. Q. Estudo químico e farmacológico de quatro espécies de *Hyptis* do estado do Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. 2003a, 148p.

FALCÃO, D. Q., FERNANDES, S.B.O., MENEZES, F.S., Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13 s. 1 p. 0,81– 0,83, 2003b.

FALCÃO, D. Q. & MENEZES, F. S.; Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 84, n. 3, pp.69-74, 2003c.

FALEIROS, A. C. P. ; SILVA, C. A. M. ; PAULA, J. E., SANTOS, M. L., PERFEITO, J. P., RESENDE, L. C. M., FRANÇA, C. V.; SILVA, J. C. B. ; SILVEIRA, D.; SIMEONI, L. A. Avaliação de extratos de espécies do cerrado quanto ao potencial fotoprotetor. In: XII Congresso de Iniciação Científica da UnB e 3º Congresso de Iniciação Científica do DF, 2006, Brasília. Livro de Resumos, 2006.

FCT/UNL, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Departamento de Química. Disponível em < <http://www.dq.fct.unl.pt/goa/biossin/2i.html> > acesso em: 22/02/2007.

FCUL, Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, Disponível em < [http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44361/aulas/aula\\_13\\_11\\_06.doc](http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44361/aulas/aula_13_11_06.doc)> acesso em : 15/02/2007.

FERHEEN, S. AHMED, E. AFZA, N. MALIK, A. Phytochemical Studies on *Haloxylon salicornicum*. Chemical Society of Pakistan, vol. 27; n. 2, pp.219-222, 2005,

FERNANDEZ E, REYES A, HIDALGO ME, QUILHOT W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. J Photochem Photobiol B. vol.42, n.3, pp. 195-201, 1998.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. O controle fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais; Universidade Federal de Viçosa, Disponível em < <http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>> acesso em 23/02/2007

FERREIRA, S. H., Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil, Disponível em < <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf> > acesso em 03/01/2007

FERREIRA, A. A., Estudo biomonitorado de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet. (convolvulaceae). Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de doutorado, 2006, 231 p.

FLAGG, M. L.; VALCIC, S.; MONTENEGRO, F.; GONVEZ. M.; TIMMERMANN, N. Pentacyclic triterpene from *Chuiquiraga ulicina* Phytochemistry, vol. 52, n. 7, pp. 1345-1350, 1999.

FONTES-JÚNIOR, E. A.; SILVEIRA, D.; SANTOS, A. R. S.; COSTA, A. M. R.; BASTOS, G. N. T., SANTOS, S. N.; NASCIMENTO, J. L. M. ; ESPÍNDOLA, L. S.; MORAES, V. M.; estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Pouteria ramiflora*. In: XIX Reunião anual da FESBE. 2004, Águas de Lindóia, SP, Livro de Resumos, 2004a.

FONSECA, E. P.; JOHANN, I.; ALEGRETH, A. P. Interferência do consumo de chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário. *RBAC*, vol. 38, n. 3, pp. 163-165, 2006

FONTES-JÚNIOR, E. A. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Pouteria ramiflora* Radlk. Belém: Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Dissertação de Mestrado. 2004, 73p.

FRANÇA, C.V.; CASTRO, C.F.S.; PERFEITO, J. P.; RESCK, I. S.; SILVEIRA, D., SIMEONI, L.A.; Fitoquímica do Extrato hexânico de *Pouteria caimito*. In: XII Congresso de Iniciação Científica da UnB e 3º congresso de Iniciação Científica do DF, 2006, Brasília, Livro de Resumos, 2006.

FRANZOTTI, E. M.; LOPEZ, K. S. E.; MELO, S. R. O.; PERFEITO, J. P. S.; RAMALHO, L. S.; PAULA, J. E.; NEVES, F. A. R.; SILVEIRA, D.; SANTOS, M. L.; SIMEONI, L. A. Atividade de extratos de *Pouteria ssp.* (Sapotaceae) em receptores nucleares. In: Congresso Ibero-americano de Plantas Medicinais. III Jornada de Fitoterapia do Rio de Janeiro, 2004, Angra dos Reis. Livro de Resumos, 2004.

FREDES, M. L. & VERMUGO, G. Caracterización estacional de principios antioxidantes de Romero (*Rosmarinus officinalis*) em Quillota. *Simiente*, vol. 72, n. 4, p. 164, 2002

FREIRE, R. B., FREIRE, M. F. I., BERBARA, R. L., Elisa de captura com IgY para quantificação de acetato de lupeol em *Vernonia scorpioides* Lam. Pers (asteraceae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, pp. 1069 – 1074, 2004.

FRIGHETTO, N.; WILENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, n. 4, pp. 338-343, 2005.

FUCHINO, H. SATOH, T. SHIMIZU, M. TANAKA, N.; Chemical Evaluation of *Bétula* Species in Japan IV. Constituintes de *Bétula davurica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 46, n. 1, pp. 166-168, 1998.

GALLO, M. B. C., SILVA, F. C., VIEIRA, P.C. *et al.* New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.17, no.2, p.279-288, 2006.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.. Chemical constituents from roots and leaf stalks of açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). *Química. Nova*. vol. 28, no. 4 pp. 610-613, 2005.

GAZDA, V. E.; aAbordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae). Rio de Janeiro: Pós-graduação em ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, 2004, 141p.

GCB – IST, Grupo de Ciências Biológicas do IST ( Universidade Técnica de Lisboa)  
Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=368>> acesso em 11/05/2007.

GIESE, S. O., Estudo da Composição Química dos Óleos Florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae). Curitiba: Pós graduação em Química da Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado, 2005, 67p.

GRASSI, R. F. RESENDE, U. M. DA SILVA, W. MACEDO, M. L. R. BUTERA, A. P. DE OTULLI, E. SAFFRAN, F. P. DE SIQUEIRA, J. M. Estudo Fitoquímico e Avaliação Alelopática de *Memora peregrina* - "Ciganinha" - Bignoniaceae, uma espécie Invasora de Pastagens em Mato Grosso do Sul. *Química Nova*. vol. 28; n. 2, pp 199-203, 2005

GRIFFITHS, D. W.; ROBERTSON, G. W.; SHEPHERD, T.; BIRCH, A. N. E.; GORDON, S. C.; WOODFORD; J. A. T. A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq) flowers. *Phytochemistry*, vol. 55, n. 2, pp. 111-116, 2000.

GOKDIL, G.; TOPCU, G.; SONMEZ, U.; ULUBELEN, A. Terpenoids and flavonoids from *Salvia cyanescens*. *Phytochemistry*, vol. 46, n. 4 pp. 799-800, 1997.

GONZAGA, L. & KAPLAN, M. A. C.; Chemical constituents from *Himatanthus articulate*. *Journal Braz. Chem. Soc.* vol. 9, n. 5, pp. 430-434, 1998

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R. de M.B. Natural products research in Brazil. *Ciência e Cultura*, v. 49, n. 5-6, p. 315 – 320, 1997.

GRANDO, R.; SILVA, R. F. R.; MINAMO, M, M,; FIGUEIRA, G. M.; FOGERO, M. A.; LOPES, L. C. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato diclorometano da espécie *Leonurus sibiricus* L. In: 58º Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC, 2006. Livro de Resumos, 2006.

GRZESIUK, V. L., ORLET, M. R.; MEDINA, J. C.M.; VIDOTTI, G. J.; Alcalóides da espécie vegetal *Eugênia repanda* Berg. (Myrtaceae). In: XI Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de Química (XI SBQSUL), Pelotas, 2003. Livro de Resumos, p. Q0303).

GUHLING, O.; KINZLER C.; DREYER M. ; BRINGMANN G. ; JETTER R. Surface composition of myrmecophilic plants : Cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. *Journal of chemical ecology* vol. 31, n.10, pp. 2323-2341, 2005.

GUPTA,R.S.; BHATNAGER, A.K.; JOSHI,Y.C.; SHARMA, R.; SHARMA, A. Suppression of fertility in male albino rats following  $\alpha$ -amyrin acetate administration. *Pharmaceutical biology*, 42 (2): 98-104, 2004.

GUPTA, R.S.; BHATNAGER, A.K.; JOSHI, Y.C.; SHARMA, M.C.; KHUSHALANI, V.; KACHHAWA, J.B. Induction of antifertility with lupeol acetate in male albino rats. *Pharmacology*. Vol 75, n.2, pp. 57-62, 2005.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B.N. *Lipoxygenase inhibition by anaganthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of Anadenanthera colubrina*. *Planta Medica*. Estados Unidos. Março, 2004.

GUVENALP, Z.; KILIÇ, N.; KAZAZ, C.; KAYA, Y.; DEMIREZER, O. L. Chemical constituents of *Galium tortumense*. *Turk J. Chem.* vol. 30, pp 515-523, 2006.

HARAGUCHI, M., BRAGGIO, M. M., MIMAKI, Y.; SANTIAGO, W.O.; YOKOSUKA, A.; SAHIDA, Y. Saponinas do tipo oleanoglucuronídeo nas folhas da Forradeira *Sebania sesban* In: 23ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. Livro de Resumos, p. PN053.

HASMEDA, M.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; Gideon M. Polyselective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med*; vol. 65, pp. 014-018, 1999

HASSAN, H. A.; HAMED, A. I.; EL-EMARY, N. A.; SPINGUEL, I. V.; MITONE, H. MIYAOKA, H. Pregnene derivatives from *solenostemma argel* leaves. *Phytochemistry*, vol 57, n. 4, pp. 507-511, 2001.

HAYASE, F.; KATO, H. Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.30, pp.37-46, 1984.

HE, A.; WANG, M.; HAO, HO, H.; ZHANG, D.; LEE, K.H. Hepatoprotective triterpenos from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry*, vol. 49, n. 8, pp. 2607-2610, 1998.

HICHRI, F.; HAMMOUDA, O. JANNET, H. B.; MIGHRI, Z.; ABREU, P. M.; Phytochemistry of tunisian plant terpenoids from the fruit barks of *Periplovoca laevigata* growing in tunisi. *Soc. Chim. Tun.* vol. 4, n. 1565, 2002.

HILEMAN, B. Drug discovery and development to succeed in the pharmaceutical industry: chemists must have special skills and work across disciplines. *Chemical & Engineering News*. vol. 84, .n. 47, pp. 97-100, 2006.

HO, J. N.; LEE, Y.H.; PARK, J. S.; JUN, W. J. ; KIM, H. K.; HONG, B. S.; SHIN, D. H.; CHO, H.Y. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biol. pharm. Bull.*, vol. 28, n7, pp. 1244-1248, 2005.

HOLLOSY, F.; MESZAROS, G.; BOKONYI, G.; IDEI, M.; SEPRODI, A.; SZENDE, B.; KERI, G. Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. *Anticancer Research*, vol. 20, n. 6B, pp. 4563-4570, 2000.

HSU, H. YANG, J. J.; LIN, C. C.; Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer lett*, vol 1, n. 111(1-2), pp. 7-13, 1997.

HUANG D., OU B.,PRIOR R.,L The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, n.53: (6), pp.1841-1856, 2005.

HUANG, B. Y.; CHAI, H. B.; KARDONO, L. B. S.; RIWAN, S.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZOUTTO, J. M.; KINGHORN, A. P. Citotoxic triterpenos from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry*, vol. 62, n. 2, pp. 197-201, 2003.

HUSSAIN, S.; E. AHMAD, A. MALIK, A. JABBAR Phytochemical studies on *Cressa cretica*, *J. Chem. Soc.* pp. 296 , 2005.

IM, K.R.; JEONG, T.S.; KWON, B.M.; BAEK, N.I.; KIM, S.H.; KIM, D.K. *Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors from *Ilex macropoda**. *Archive of Pharmacal Research.*, 2006.

JADA, S. R.; SUBUR, G. S.; MATTHEWS, C., HAMZAH, A. S., LAJIS, N. H., SAAD, M. S., STEVENS, M. F. G., STANLAS, J. Semisynthesis and *in vitro* anticancer activities of andrographolide analogues. *Phytochemistry*, 2007

JAMAL, C. M., Estudo Fitoquímico de *Casearia Sylvestris* SW. Mart., e de *Abatia tomentosa* (Flacourtiaceae). Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de Doutorado, 2002, 186p.

JANG, D. S.; SU, B. N.; PAULUS, A. D. KANG, Y. A.; KARDONO, L. B. S.; RISWAN, S.; AFRIASTINI, J. J.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Beccaridiol na unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. *Phytochemistry*, vol. 67, n. 16, pp. 1832-1837, 2006.

JEONG, H. G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicology Letters*, vol 105, n. 3, pp. 215-222, 1999.

JINKINS, T.; BHATTACHARYYA, J. MAJETICH, G.; Flavonoides from the root-bark of *Dioclea grandifolia*. *Phytochemistry*, vol 52, n. 4, pp. 723-790, 1999.

JUAN, M. E.; WENZEL, U.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; DANIEL, H.; PLANAS, J. M.; Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Journal of Nutrition*, vol. 136, pp. 2553-2557, 2006.

KAJIKAWA, M.; YAMATO, K. T.; FIUKUZAWA, H.; SAKAI, Y.; UCHIDA, H.; OHYAMA, K. Cloning and characterization of a cDNA encoding  $\beta$ -amyrin synthase from petroleum plant *Euphrasia tirucalli* L. *Phytochemistry*, vol. 66, n. 15, pp. 1759-1766, 2005.

KAKUDA, R.; LIJIMA, T.; YAOITA, Y.; MACHIDA, K.; KIKUCHI, M. Triterpenoids from *Gentiana scabra*. *Phytochemistry*, vol. 59, n. 8, pp. 791-794, 2002.

KASHIWADA, Y.; WANG, H.; NAGAO, T., KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L. M.; KOZUKA, M. K.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.; YEH, E.; LEE, K. H.; Anti-AIDS agents 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products*, vol. 61(9), pp. 1090-1095, 1998.

KATO, L. OLIVEIRA, C. M. A., NASCIMENTO, C. A., LIÃO, L. M., Atividade antimicrobiana de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Shum. In: 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindoia. Livro de Resumos, 2006.

KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 12 supl. 1, pp. 70-71, 2002.

KHINE, M. M. Isolation and characterization of phytoconstituents from Myanmar Medicinal Plants. 2006

KIM; S.H.; AHN, B.; RYU, S. Y.; Antitumour effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa*. *Phytotherapy Research*, vol. 12, n. 8, pág. 553-556, 1998.

KIM, Y. K.; YOON, S. K.; KYU, S. Y. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.*, vol. 66, pp. 485-486, 2000.

KISIEL, W. & PIOZZI, F. Phenylethanoid glycosides from *Prostanthera melissifolia*. *Phytochemistry*, vol. 51, n. 8, pp. 1083-1085, 1999.

KOMATSU, H., ITO, Y., KOBAYASHI, H., NOHARA, T., ONO, M., IGOSHI, K., KOTO, M. Cytotoxic triterpenes and sterol from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). *Food Science and Technology Research*, vol. 10, n. 1, pp. 56-59, 2004.

KULLAVANIJAYA, P., LIM H.W. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* vol. 52, n. 6, pp. 937-58, 2005.

KWEIFIO-OKAI, G.; CARROLL, A. R. Antiarthritic effect of lupeol acetate. *Phytotherapy Research*, vol. 7, n. 2, pp. 213-215, 2006.

KWEIFIO-OKAI G., DE MUNK F., RUMBLE B.A., MACRIDES T.A., CROPLEY. M. Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* vol. 85, n.1, pp. 45-55, 1994.

KWEIFIO-OKAI G., MACRIDES T. A. Antilipoxygenase activity of amyirin triterpenes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* vol.78, n.3, pp.367-72, 1992

LACIKOVÁ, L.; MASTEROVÁ, I.; GANCAI, D.; Constituents of the genus *Staphylea* L. *Acta Facult, Pharm. Univ. Comeniannae*, vol 53, pp. 22-30, 2006.

LANNANG, A. M.; KOMGUEM, J.; NGNINZEKO, F. N.; TANGMOUO, J. G.; LONTSI, D.; AJAZ, A.; CHOUDHARY, M. I.; RANJIT, R.; DEVKOTA, K. P.; SONDEGAM, B. L. Bangangxanthone A and B, two xanthones from the stean bark of *Garcina polyantha* (Oliv.). *Phytochemistry*, vol. 66, n. 19, pp. 2351 – 2355, 2005.

LAVOIE J. M.; STEVANOVIC T.; Variation of chemical composition of the lipophilic extracts from yellow birch (*Betula alleghaniensis*) foliage. *J. Agric. Food Chem.* vol. 53, n.12, pp. 4747-4756, 2005

LAZÓN, A.; GUINDA, A.; ALBI, T, Procedimento de obtención y determinación de ácidos terpénicos de la hoja del olivo (*Olea europaea*). *Grasas y aceites*, vol 52, n. 5, pp. 275-278, 2001.

LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 11, n. 2, pp. 77-87, 2000.

LEE, C. K. Ursane triterpenoids from leaves of *Melaleuca leucadendron*. *Phytochemistry*, vol. 49, n. 4, pp. 1119-1122, 1998.

LI, J.; HO, C. T.; LI, H.; TAO, H.; LIU, L. Separation of sterols and triterpene alcohols from unsaponifiable fractions of three plant seed oils. *Journal of Food Lipids* 2000.

LI, J., GUO, W. J.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT 15. *Wold J. Gastroenterol*, vol. 8(3) pp. 493-495, 2002.

LIBÓRIO, M. V.; DAVID, J. P.; OLIVEIRA, T. A.; DAVID, J. M.; GUIDES, M. L. S.; QUEIROZ, L. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos de espécies do gênero *Erythroxilum*. In.: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas – MG. Livro de Resumos p.0567, 2000.

LICHTNER, M.; MENGONI, F.; MASTROIANNI, C. M., VULLA, V. Anti-HIV activity of Oleanolic acid on infected human mononuclear cells. *National Library of Medicine*, vol. 39; 318, pp. 26-29 (abstract n. 933), 1999.

LIMA, E. M. C.; MEDEIROS, J. M. R.; DAVIN, L. B Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana* . *Phytochemistry*, vol. 63, n. 4, pp. 421-425, 2003.

LIMA F.V., MALHEIROS A., OTUKI M.F., CALIXTO J.B., YUNES R.A., CECHINEL V., DELLE MONACHE F., Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity, *Journal of the Brazilian Chemical Society* vol.16 (3B), pp. 578-582, 2005.

LIMA, M. P.; BRAGA, P. A. C.; MACEDO, M. L. Phytochemistry of *Trattinickia burserifolia*, *T. rhoidifolia* and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *Journal of the Brazilian Chemistry society*, vol. 15, n. 3, p. 385-394, 2004.

LIMA-JUNIOR, R. C. P., Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina em modelos de nocicepção visceral. Ceará: Departamento de Fisiologia e farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Dissertação de Mestrado, 2005, 93p.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J. M.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. A.; VALE, C. A. L.; SILVA, R. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A Attenuation of visceral nociception by  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Méd.*, vol. 72; pp. 34-39, 2006.

LIU, H; SHI, Y. WANG, D.; YANG, G.; YU, A.; ZHANG, H. MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lcidum* Ait. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses*. Vol 14, n. 32(3), pp. 473-485, 2003.

LIU, J, LIU, YP, PARKINSON, A, KLAASSEN, CD. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. *J. Pharmacol. Exp.* vol. 275, n. 2, pp. 768-774,1995.

LIU, J. MADHU, C. KLASSEN, C. D.; Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice *American society for pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 266, n. 3, pp. 1607 – 16313, 1993.

LOPES, M. N.; MAZZA, F. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; Complete assignments of  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the 3,4-seco-triterpene canaric acid isolated from *Rudgea jasminoides*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 10, n. 3, pp. 237-240, 1990.

LOPES, M. N.; OLIVEIRA, A. C.; YOUNG, M. C., M. BOLZANI, V.S. Ácido oleanólico como mistura de triterpenos em *Chiococca braquiata* (Rubiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 15, n. 4, pp. 468-471, 2004.

LOPES, J.; Triterpenóides com atividade anti-cancerígena, Cadeira de documentação e informação, Química Aplicada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2007.

LOPEZ, K. S. E. Estudo Químico e Atividade Biológica de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk (Sapotaceae). Brasília: faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Dissertação de mestrado, 2005.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. vol. 2, 2ª ed., 2002

- MA, C.; NAKAMURA, M.; MUJASHIRO, A.; HATTORI, M.; SHIMOTOHMO, K. Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivative on HIV-1 protease. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 47, n. 2, pp. 141-145, 1999.
- MA, J.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidant from the fruits of the three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food Chemistry*, vol. 52, n. 19, pp. 5873-5878, 2004.
- MACIEL, M. A. P., PINTO, A. C., JÚNIOR, V. F. V. GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A., Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, vol. 25, n. 3, pp. 429 – 438, 2002.
- MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A.; LUZIO, G.; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, pp. 7355-7363, 2006.
- MAHATO S. B. & KUNDU, A. P. Review article number 98 <sup>13</sup> CNMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517 – 1575, 1994.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Volatiles from fruits of *Pouteria pariry* (Ducke) Baheni and *Pouteria Caimito* (Ruiz and Pavon Rdlkl.) *Journal of essential oil-bearing plants*. vol. 6, n. 2, pp. 127-129, 2003.
- MAIA, J. L.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Oleanolic Acid, a pentacyclic triterpene attenuates the mustard oil-induced colonic nociception in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, n. 182, pp. 82 – 85, 2006.
- MAJUMDAR K.; MAYA, B. S.; SOM U. K.; DAS, S. Chemical constituents of the bark of *Terminalia myriocarpa*. *Journal of the Indian Chemical Society*. vol. 82, n. 7, pp. 673-674, 2005.
- MAHATO S. B., NANDY, A, K, & ROY, G. Review article number 67 triterpenoids. *Phytochemistry*, v. 31, n.7, p. 2199-2249, 1992.
- MANEZ, S. REGGIO, M. C.; GINER, R. M.; RIOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, vol 334, n. 1, pp. 103-105, 1997.
- MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. MANOSROI, J. *In vitro* immunomodulatory effects of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baheni extract. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, n. 1-3, pp. 90-94, 2005.
- MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. MANOSROI, J. Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on *in vitro* immunomodulatory activity of mouse immune system. *Fitoterapia*, vol. 77, n. 3, pp. 189-193, 2006.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; APAN, T. O. R.; LOZCANO, M. E.; BYE, R. Anti-inflammatory active compounds from the n-hexane extract of *Euphorbia hirta*. *Revista de la sociedad Química de México*, vol 43, n 3,4, pp. 103 -105, 1999.

MARQUEZ, M. A., FERNANDEZ, A. M. A., DE LA PUERTA, V. R.; RUIZ, G. V. Efecto antiinflamatorio de compuestos triterpénicos presentes en la fracción insaponificable del aceite de orujo de oliva. *Nutricion Hospitalaria*, vol. XX Supl. 1, 2005.

MARTIN, A. S.; DE LAS HERAS, B.; SANCHES, R. M. I.; BENEDI, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 53, n. 2-3, pp. 199-206, 2001.

MARTINELLO, F. Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e carcinogênese coloretal em hamster. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Tese de doutorado. 2006, 148p.

MATTHEWS RS. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radic Biol Med*. vol. 18, n. 5, pp.919-22, 1995

MATIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; VENTURA, G. M.; FERREIRA, E. M.; NEVES, I. F.; VANETTI, C. A.; SILVA, C. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causadas por *Rhizoctomia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, vol. 30, pp. 302-306, 2005

MATOS, F. J. A.; Introdução à fitoquímica experimental, Fortaleza: EUFC, 126p, 1988.

MCLAFFERTY, F. W.; SATAUFER, D. B. The wiley/NBS registry of mass spectral data. New York, ed. Wiley Interscience Pub; v. IV, p. 704-5108, 1989.

MEDINA, E.; AGUIAR, G.; GOMES, M.; MEDINA, J. D.; Patterns of leaf epicuticular wax in species of *Clusia* implications., *INCI*, vol. 29, n.10, pp. 579-582, 2004.

MENDES, C. L. A., Triterpenóides e sua actividade anti-inflamatória, Faculdade de Ciências e tecnologia do Departamento de Química, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2004.

MENDES, C. C., CRUZ, F. G., DAVID, J. M. *et al.*, Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonia mycrophylla*. *Química Nova*, vol., 22, n. 2, pp. 185-188, 1999.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO E. J.; A importância da síntese de fármacos. *Cadernos temáticos de Química Nova na escola*, n. 3, 2001.

MENEZES, F. S.; BORSATTO, A. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; KAPLAN, M. A. C., Chmaedrydiol and ursane triterpene from *Marsypianthes chamaedrys*. *Phytochemistry*, vol. 48, n. 2 pp. 323-328, 1998.

- MENG, J. C.; HU, Y. F.; CHEN, J. H.; TAN, R. X. Antifungal highly oxygenated guaianolides and other constituents from *Ajania fruticulosa*. *Phytochemistry*, vol. 58, n. 7, pp. 1141-1145, 2001.
- MERCKES, M.; GARDUÑO-RAMIREZ, M. L.; MARQUINA, S. ALVARES, L. Iridóides adicionales de la planta medicinal *Astianthus viminales* y su actividad hipoglucemiante y antihiperoglucemiante. *Revista de la Sociedad Química de México*. Vol. 45, n. 4, pp. 194 – 199, 2001.
- MESQUITA, M. L., DESRIVOT, J., BORRIES, C., FOURNET, A., PAULA, J. E., GRELLIER, P., ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 100(7): 783-787, 2005
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E.; MCLAUGHEIN, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Médica*, vol. 45, pp; 31 – 34, 1982.
- MENDEZ-NATERA, J. R.; GRNTON, R.J.S.; DAUTANT, M. A.; GUERRA, N. A.; LAYNEZ, J. Efeito del médio de enraizamento, número de hojas por estaca y lesionado de lãs estacas de *Ixora enana* (*Ixora coccinea* L.) com Hormojardin Nro 4. *Revista UDO agrícola*, vol. 4, n. 1, pp.31-35, 2004.
- MIEMANANG, S. R.; KROHN K.; HUSSAIN H.; DONGO E. Paullinoside A and paullinomide A: A new cerebroside and a new ceramide from leaves of *Paullinia pinnata*. *Zeitschrift für Naturforschung. B, A journal of chemical sciences*. vol. 61, n. 9, pp. 1123-1127, 2006.
- MIN, B. S.; KIM, Y. H.; LEE, S. M.; JUNG, H. J.; LEE, J. S.; NA, M. K.; LEE, C. O.; LEE, J. B.; BAEK. Cytotoxic triterpene from *Crataegus pinmatifida*. *Arch. Pharm. Res.*, vol. 23, n. 2, pp. 155-158, 2000
- MIRANDA, R. R. S.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA-FILHO, S. A. Folhas de *Maytenus salicifolia* Reissek: Estudo Fitoquímico. In.: 29ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de lindóia – SP. Livro de Resumos, p. T0986-2, 2006.
- MISRA, NAMITA; SHARMA, M.; RAJ, K.; DANGI, A.; SRIVASTAVA, S.; Misra-Bhattacharya, S. Chemical constituents and antifilarial activity of *Lantana camara* against human lymphatic filariid *Brugia malayi* and rodent filariid *Acanthocheilonema viteae* maintained in rodent hosts. *Parasitology Research*, vol. 100, n. 3, pp. 439-448, 2007.
- MOGHADDAM, F. M.; FARMANI, M. M.; SALAHVARZI, S.; AMIN, G. Chemical constituents of Dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistamica*. *Evid based complement. Alternat Med.*, vol, 4, n. 1, pp. 95-98, 2007
- MOHAMED, M. A.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL SAYED, M. M.; BAIUOMY, A. R.; Phytochemical constituents and hepatoprotective activity of *Vibunum tinus*. *Phytochemistry*, vol. 66, n. 23, pp. 2780 – 2786, 2005.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI V. S., Planejamento de novos fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n. 1, pp. 105 – 111, 2001.

MONTEATH, S. A.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; ECHEVARRIA, A.; MACIEL, M.A. M. Constituintes químicos das flores de *Ixora coccinea*. In 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas 2000. Livro de resumos, p. 1147.

MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHAM E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M. TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae) *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 16 (Supl.), pp. 611-617, 2006.

MOREIRA, F. P. M., COUTINHO, V. MONTANHER, A. B. P., CARO, M. S. B., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G.; Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v.26, n.3, 2003.

MOURA, C. L.; Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubiginosa* e *Pfaffia glomerata* em microorganismos da cavidade bucal. Universidade de Franca. Dissertação de Mestrado 2006. 71p.

MULLIN, R. Breaking Down Barriers: Drugmakers are paving the way to more streamlined manufacturing via culture change in R&D. *Chemical & Engineering News*. vol. 85, n. 04, pp. 11-17, 2007.

MPRJ – Ministério Público do Rio de Janeiro, Justiça terapêutica - **Quais os tipos de drogas que existem?** Disponível em: <[http://www.mp.rj.gov.br/portal/page?\\_pageid=577,3857055&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://www.mp.rj.gov.br/portal/page?_pageid=577,3857055&_dad=portal&_schema=PORTAL)> Acesso em 30/01/2007.

MULLHOLLAND, D. A.; NAIDOO, D.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; CHEPLOGOI, P. K.; COOMBES, P. H. Secondary metabolites from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochemistry*, vol. 64, n. 2, pp. 631-635, 2003.

MULLHOLLAND, D. A.; IOURINE, S. E.; TAYLOS, D. A. H.; DEAN, F. M. Coumarins from *Ekebergia pterophylla*. *Phytochemistry*, vol. 47, n. 8, pp. 1641-1644, 1998.

NA-YOUNG, K.; LEE, M.; PARK, M.; KIN, S.; PARK, H.; CHOI, J.; KIM, S.; CHO, S.; LEE, J.; Momordin Ic and oleanolic acid from *Kochiae fructus* reduce carbon tetrachloride-Induced hepatotoxicity rats. *Journal of Medicinal Food*, vol. 8 n. 2 pp. 177-183, 2005.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Norma: M2-A8, 2003a vol. 23, n. 1, 58p.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards., Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição Norma: M7-A6, 2003b, vol. 23, n. 2, 81p.

NEPLAM, Núcleo de estudos de Plantas Mediciniais – Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em <<http://zeus.qui.ufmg.br/~neplam/triterpenos/triter.htm>> Acesso em 16/04/2007.

NETO, C. C.; VAISBERG, A. J.; ZHOU, B. N.; KINGSTON, D. G. I.; HAMMOUND, G. B. Cytotoxic triterpene acids from Peruvian medicinal plant *Pelyopsis racemosa*. *Planta Med.*, vol. 63, n.; 483-484, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002, *J. Nat. Prod.*, 66, 1022-1037, 2003.

NGOUELA, S.; LENTA, B.N., NOUNGOUE, D. T.; NGOUPAYO, J.; BOYOM, F.F.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CONNOLLY, J. D. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*, vol.67, n. 3, pp.302-306, 2006.

NGUYEN, L. H. D.; HARRISON, L. J. Triterpenoids from the bark of *Garcinia vilersiana*. *Phytochemistry*, vol 53, n. 1, pp. 111-114, 2000.

NIETO, M.; GARCIA, E. E.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; Icetexane and abietane diterpenoids from *Salvia gilliessi*. *Phytochemistry*, vol.53, pp. 911-915, 2000.

NICOLAS, R. EGIDO, J. CABRERO, J. G.; GUTIERREZ, C. El ácido ursólico inhibe a migración de células de músculo liso vascular y la hiperplasia neointimal desues de angioplastia. *Inmunología*, vol. 2, Supl. 1, pp. 156-157, 2003.

NOLDIN, U. F.; ISAÍAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Caluphyllum*: importância química e farmacológica. *Química Nova*, vol. 29, nº 3, pp. 549-554, 2006.

NOVOTNY, L.; ABDEL-HAMID, M. E.; HAMZA, H.; MASTEROVA, I.; GRANCDI, D. Development of LC-MS method for determination of ursolic acid: application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* Hemsl. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 31, n. 5, pp. 961-968, 2003.

NUNES, M. M.; Atividade Antiinflamatória do Extrato Etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae. Brasília: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado, 2004.

OBEN, E. K.; KARSTEN, K.; HIDAYAT, H. Newbouldiaquinone and Newbouldiamide: A New Naphthoquinone-Anthraquinone Coupled Pigment and a New Ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, vol.53; n. 6; pp.616-619, 2005.

OGURO, T.; LIU, J.; KLAASSEN, C. D.; YASHIDA, T. Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. *Toxicological Sciences*, vol. 45, n. 1, pp. 83-88, 1998.

OHIGASHI, H.; TAKAMURA, H.; ROSHIMIZU, K. TOKUDA, H.; ITO, Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett.*, vol 30, n. 2, pp. 143-151, 1986.

OJALA T., VUORELA P., KIVIRANTA J., VUORELA H., HILTUNEN R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Med*, vol. 65, pp.715-718, 1999.

OKSÜZ, S.; SERIN, S. Triterpenes of *Centaurea Ptosimopappoides*. *Phytochemistry*, vol. 46, n. 3, pp. 545-548, 1997.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. Plantas tóxicas. Conhecimento e prevenção de acidentes, Ribeirão Preto: ed. Holos, 2003, 64p.

OLIVEIRA F. A., VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H., ALMEIDA, F. R. C.; SANTOS, K. A., MARTINS, F. S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N., Gastroprotective Effect of the Mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons *Planta Med*; vol. 70, pp. 780-782, 2004

OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (aubl. )march. E de seus principais constituintes, mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina. Ceará: Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará. Tese de Doutorado, 2005, 241p.

OLIVEIRA F.A., COSTA C.L., CHAVES M.H., ALMEIDA F. R., CAVALCANTE I. J., LIMA A. F., LIMA R. C. J. R, SILVA R. M, CAMPOS A.R., SANTOS F.A., Links Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyryn, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Rao VS. Life Sci.* Vol. 77, n.23, pp.2942-52, 2005a.

OLIVEIRA, G. F.; Avaliação da atividade antimicrobiana, *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão). São Paulo: Universidade de Franca, Dissertação de Mestrado. 2005b.

OLIVEIRA, T. B.; CURY, P. M. Câncer de Pulmão. *HB cient.* vol. 9, n.1, pp. 25-38, 2002.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyryn and beta-amyryn triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther.*, 313(1), pp.310-318, 2005.

ORABI, K. Y.; AL-QASOUMI, S. I.; EL-OLEMY, M.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. *Phytochemistry*, vol. 58, n. 3, pp. 475-480, 2001.

PASSOS, X. S. ; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. *et al.* Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 35 n.6, pp.623-627, 2002.

PAULETTI, P. M.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; Triterpenos de *Styrax camporum* (Styracaceae). *Química Nova*, vol. 25, n. 3, p. 349 – 352, 2003.

PELLICCIARI, R., ARDON, A., BELLAVITA, V. Triterpene from *Pouteria caimito*, *Planta Médica*, v. 22, p. 196 – 200, 1972.

PEREIRA, M. M.; SOUZA-JÚNIOR, S. N.; ALCANTRA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae) *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 8, n. 3, p 1- 8, 2006.

PEREIRA, W. S.; MOREIRA, F. P. M.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; Ocorrência de flavonóides e atividade antimicrobiana em três espécies de *Baccharis*. In: 23ª Reunião anula da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. Livro de Resumos, p. PN1505.

PEREZ, P. R. Vademécum de fitoterapia, 2005, disponível em: < <http://users.servicios.retecal.es/pdelrio/VF.pdf> > acesso em 17/04/2007.

PESCHEL, S.; FRANKE, R.; SHREIBER, L.; KNOCHE, M.; Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry*, n. 68, pp. 1017 -1025, 2007.

PINHEIRO, M. L. B.; ROCHAM A. F. I.; FERNANDES, M. A. N.; MONTE, F. J. Q.; VILLAR, J. D. F.; CRUZ, R. R. Lignanias de *Strychnos guianensis* (AUBLET) MART. *Química Nova*, vol. 27, n. 2, pp. 188-192, 2004.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; SAURI, E.; ZUMARRAGA, C. Volatile components of sapote [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. moore et stern ] fruit. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 18, n. 1, pp. 22-23, 2006.

POZO, M.; CASTILLA, V. GUTIERREZ, C.; DE NICOLÁS, R. EGIDO, J. CABRERO, J. G. Ursolic acid inhibits neointima formation in the rat carotid artery injury model. *Atherosclerosis*. vol. 184, pp. 53-62, 2006.

PRINSLOO, G.; & MEYER, J.J.M.; *In vitro* production of phytoalexins by *Helichrysum kraussii*. *South African Journal of Botany*, vol. 72, n. 3, pp. 482-483, 2006.

QUIJANO L., RIOS, T. FRONCZEK, F.R. & FICHER, N. H., The molecular structure of maniladiol from *Baccharis salicina*. *Phytochemistry*, vol 49 n. 7 pp 2065-2068, 1998.

RAJIC A.; KWEIFIO-OKAI G.; MACRIDES T. ; SANDEMAN R. M.; CHANDLER D. S.; POLYA G. M. ; Antiarthritic mechanisms of amyirin triterpenes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. vol. 85, n. 1, pp.45-55, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 3ed, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1997, 692p.

RAMALHO, L. S.; PERFEITO, J. P.; LOPEZ, K. E.; PAULA, J. E.; FERNANDEZ, I. M.; SOUZA, R. S.; ELIZABETH, N. F.; SANTOS, M. L. SILVEIRA, D. Avaliação da atividade citotóxica e antimicrobiana de extratos de *Pouteria ssp* (Sapotaceae). Congresso Ibero-americano de Plantas Mediciniais. III Jornada de Fitoterapia do Rio de Janeiro, 2004, Angra dos Reis. Livro de Resumos, 2004.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relationship between antioxidative activity of rice hull and germination ability of rice seeds. *J. Sci. Food Agric.*, v.37, p.719-726, 1986.

RAMIREZ, A., PEREZ-CASTORENA, A.L.; DE VIVAR, A.R. *Anti-inflammatory constituents of Mortonia greggii Gray*. *Journal of Biosciences*. México. março – abril, 2004.

RASTOGI, S.; KULSHRESHTHA, D. K.; RAWAT, A. K. S. *Streblus asper* Lour. (Shakhotaka): A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. *Evid Based Complement Alternat Med*. vol. 3(2), pp. 217–222, 2006.

RAYMUNDO; M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Cholorophyta) do litoral Catarinense (Brasil). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 40, n. 4, pp. 495 – 503. 2004.

REYES, A. R. A.; FUENTES, J. A. S.; BAZÚA, C. D.; Coeficientes de difusidad aparente durante la estración de aceite de almendras de *Zapote mamey* (*Pouteria sapota*). *Tecnologia, Ciência y Educacion*, ano/vol, 16, n. 001, pp. 20-27, 2001

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J.L. Structural Requirements for the Anti-Inflammatory Activity of Natural Triterpenoids. *Planta Med*, n. 61, pp.182-185, 1995.

RESENDE, F. A. Ácido ursólico reduz a frequência de eritrócitos micronucleados induzidos por doxorubicina. São Paulo: Relatório de pesquisa. Curso de Medicina, Universidade de Franca. 2005, 15p.

RIOS, M. I.; MORALES, A. G.; VILARREAL, M. A. Sterols, triterpenes, and biflavonoids of *Viburnum juncundum* an cytotoxic activity of ursolic acid. *Planta med.*, vol. 67, pp. 683-684, 2001.

RIBEIRO, Jr, W. A., Apectos reais e lendários da biografia de Hipócrates, o “pai da medicina”. *Jornal Brasileiro de História da Medicina*, v. 6, n.2, p. 8-10, 2003.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PEREIRA, P.; BOHLIN, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* vol. 61, n. 10; pp. 1212-1215, 1998.

RUCH, K.J.; CHENG, S.J.; KLAINING, J.E.; Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, v. 10, p. 1003-1008, 1989.

RUIZ, A. L. T. G. Estudo fitoquímico de *Poecilanthus parvifolia* Benth. e *Lanchoarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae) isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. Campinas – SP: Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Tese de Mestrado. 1998, 143p.

RUSZKOWSKI, D.; UNIEWIECZ, K.; AUGUSCINSKA, E.; JANISZOWKA, W. The allelopathic properties of oleanolic acid 3-o-monoglucoside secreted by roots of *Calendula officinalis* to the soil. *Second European Allelopathy Symposium*. Disponível em <<http://seas.iung.pulawy.pl/pdf/str101.pdf>> acesso em 21/03/2007.

RYU, S.Y.; OAK, M. H.; YOON, S. K.; CHO, D. I.; YOO, G. S.; KIM, T. S.; KIM, K. M. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herbs of *Prunella vulgaris*. *Planta med.*, vol.66, pp. 358-360, 2000.

SAEED, M.A.; SABIR, A.W. Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming. *Journal of Asian Natural Products Research*; v. 5, n.1 pp. 35-41, 2003.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Irritant potential of triterpenoids from *Ficus carica* leaves. *Fitoterapia*, vol. 73, n. 5, pp. 417 – 420, 2002.

SAFAYHI H. E SAILER E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* vol.63, pp. 487-493, 1997

SALIX, C. E. E.; & RODRIGUEZ, F. J. M; Tintura de folhas de *Psidium guajava* L. em pacientes com diarreia aguda simples. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 9, n. 3, 2004.

SANCHES, N. R.; GARCIA, D. A. C.; SHIAVINI, M. S. An evaluation of antibacterial activity of *Psidium guajava* L. *Brazilian archives of biology and technology*, vol. 48, n. 3, pp. 429-436, 2005.

SANG, T. K.; KEE, S. S.; YONG, S. C. The effects of ursolic acid and all-trans retinoic acid on ultraviolet A radiation induced elastin mRNA expression in cultured dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, vol. 12, n. 2, pp. 208, 1996.

SANTIAGO, G. M. P, VIANA, F. A., PESSOA, O. D. L., SANTOS, R. P., POULIQUEN, A. M. C., ARRIAGA, M., ANDRADE-NETO, R., BRAZ-FILHO. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze

(Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 15(3), pp. 187-190, 2005.

SAGRAWAT, H.. MANN, A. S., KARYA, M. D.; PHCOG MAG.: Review Article Pharmacological potential of *Eugenia jambolana*: A review. *Pharmacognosy Magazine*, vol 2, n.6, 2006.

SANTOS, G. G.; ALVES, J. C. N.; RODILLA, J. M. L., DUARTE, A. P.; LITHGOW, A. M., URONES, J. G. Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, vol. 44, n. 7, pp. 1297 – 1299, 1997.

SARASWAT, B.; VISEN, P. K. S. AGARUSAL, A. P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytotherapy Research*, vol. 14, n. 3, pp. 163-166, 2000.

SARASWAT, B., VISEN, P.K.S., DAYAL R., *et al.* Protective action of ursolic acid against chemical induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol*, vol. 28 n. 4, pp.232-239, 1996

SARTORI, M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* (Spreng) (Wedelia paludosa) Asteraceae. Itajaí.. Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, 2005. 71p.

SEGURA M. J. R.; MEYER, M. M.; MATSUDA, S. P. T. *Arabidopsis thaliana* LUP1 Converts Oxidosqualene to Multiple Triterpene Alcohols and a Triterpene Diol. Vol. 2, No. 15, pp. 2257-2259, 2000

SENS, S. L. Alternativas para a auto-sustentabilidade federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC: Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado. 2002, 387p.

SERRATO, B.B.E.; BELLO, G. M. A.; DEL-RIOS, R. E.; CALDERÓN, M. J. C.; SALGADO, G.; Evaluación biológica y dilucidación estructural de un principio ativo de *Satureja microstema* (Benth) Briq. In: XIII Congresso Ítalo-latino Amercano di etnomedicina, Roma, 2004 Livro de Resumos, 2004.

SHAHAT, A. A.; COS, P.; BRUYNE, T. D. *et al.*, Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaca*. *Planta med.* Vol. 68, pp. 539-541, 2002.

SHI, H.M.; LONG, B.S.; CUI, X. M.; MIN, Z. D. A new bisabolane sesquiterpenoid from *Euphorbia chrysocoma*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* vol. 7, n.6, pp. 857-60, 2005.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M. L., saponinas. In: SIMÕES, C. M. O., Farmacognosia da planta ao medicamento, 2ed. Porto Alegre/florianópolis: Ed. Universidade /UFRGS, 2000.

SHIBUYA, M.; ZHANG, H.; ENDO, A.; SHISHIKURA, K.; KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur. J. Biochem.* 266, pp. 302-307, 1999.

SHOLICHIN M, YAMASAKI K, KASAI R, TANAKA O., <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes Lupeol, betulinic acid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 28:1006-1008, 1980.

SHORT, P. L. Brushing up on plant Riches: Phytochemicals get boost from advanced chemical analysis, synthesis. *Chemical & Engineering News*. Vol. 85, n. 09, pp. 27-29, 2007.

SHU, Y. Z., Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, n. 61, pp. 1053 – 1071, 1998.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; ADIL, Q.; BEGUM, S. Cardenolides and triterpenoids of the leaves of *Thevetia neriifolia*. *Phytochemistry*, vol. 31, n. 10, pp. 3541-3546, 1992.

SIDDIQUI, B. S.; SULTANG, I.; BEGUM, S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus carnaldulensis* var obtusa leaves. *Phytochemistry*, vol. 54, n. 8, pp. 861-865, 2000.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C., PINHEIRO, M. L. B. P.; CORDEIRO, M. C. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sukuuba* (SPRUCE) WOODSON. *Química Nova*, vol. 21, n. 6, pp. 702-704, 1998.

SILVA, A. S. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* MART et ZUCC. (Tiliaceae). Maringá: Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, 2004. 137p.

SILVA, J. C. B, RESCK, I. S., PAULA J. E., SANTOS, M. L., SILVEIRA D., Obtenção de fração flavonoídica do extrato etanólico de *Pouteria torta*. In: XII Congresso de Iniciação Científica da UnB e 3º congresso de Iniciação Científica do DF, 2006, Brasília, Livro de Resumos, 2006.

SILVEIRA D.;WAGNER, H.; CHIARI, E.; LOMBARDI, J.A.; ASSUNÇÃO, A.C.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, n. 4, pp. 294-297, 2005

SILVÉRIO, F.; O.; LUIZ, C. A. B.; GONMIDE, J. L.; REIS, F. P.; PILÓ-VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. *Revista Árvore*, vol. 30, n. 6, pp. 1009-1016, 2006.

SILVERSTEIN, R., BASSLER, C.; MORRIL, T. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos; Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SHIENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia da planta ao medicamento, 5ed, Florianópolis: Editora da UFRGS/editora da UFSC, 821p, 2000.

SINGH, D.; MEHTA, S. S.; NEOLIYA, N. K.; SHUKLA, Y. N.; MESHRA, M. New possible insect growth regulators from *Catharanthus roseus*. *Current Science*, Vol. 84, n. 9, 2003.

SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; AQUINO, N. F. R. ; CABRAL, J. A.; FERREIRA, C. A. C. SIMONEIT, B. R. T.; ELIAS, V. O. Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. *Química Nova*, vol. 26, n. 5,; 633-640, 2003.

SOLICHIN, M.; YAMASAKI, K.; KASAI, R. & TANAKA, O. <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance of lupine-type triterpenos. Lupeol, betlinic acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, n. 3, pp. 1006-1008, 1980.

SOLÍS-FUENTES, J. A., DURÁN-DE-BAZÚA, C. Characterization of eutectic mixtures in different natural fat blends by thermal analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*. vol. 105, n. 12 , Pages 742 – 748, 2003.

SOLIS, P. N.; NAKAMURA N.; OLMEDO, D.; HATTORI, M.; GUPTA, M. P.; Parathesilactones and parathesiquinones from branches of *Parathesis amplifolia*. *Pharmaceutical biology*, vol. 44, n. 5, pp. 328-335, 2006.

SOMOVA, L.; SHODI, F. O.; RAMNAMAN, P.; NADAR, A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europea*, subspécie Africana leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 84, n. 2-3, pp. 299-305, 2003.

SOTES, G. J.; URZUA, A.; SEBASTIAN, B. Chemical of *Pouteria splendens* and its ecological situation. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol 34, n 4, pp. 338-340, 2006.

SOUZA, J. M.; TALEB-CONTINI, S. H., OLIVEIRA, P. C. R.; Phytochemistry study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W. C. Holmes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, 2006.

SOUZA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. F. O. M.; SIANI, A. C.; Inhibition of nitric oxid and interferon- $\gamma$  production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. *Pharmacognosy magazine*, vol. 2, n. 8, 2006.

SOUZA, T. M.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; RANGEL, V. L. B. I.; Avaliação da atividade fotoproteora da *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15(1), pp.36-38, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, vol.30, n.2, 2007.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. *Ciência e Cultura*, v. 59, n. 1, 2007.

SOWEMIMO, B. O.; SEGELMAN, F. H.; TIN-WA, M. WAGNER, H., PERSIONS, G. J., FARNSWORTH, N. R. Isolation of b-aminirna and ellagic acid from *Couroupita amazônica*. *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 62, n. 8, pp. 1358-1359, 2006.

SMANIA, A.; DELLE, M. F., SMANIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activiry of substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Merr. *Journal Ethopharmacology* vol. 45, 177p, 1995.

SUBBARAMAIAH, K.; MICHALUART, P.; SPOIN, M. B.; DANNENBERG, A. J. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase – 2 transcription in human mammary ephithelial cells. *Cancer research*, vol 60, pp. 2399-2404, 2000

SUDHARSAN, P.T.; MYTHILI, Y.; SUDHAHAR, V.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced hyperlipidaemic cardiomyopathy in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Índia. Novembro, 2005.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S.A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences*. Índia. Fevereiro, 2006.

SUBARNAS A, TADANO T, OSHIMA Y, KISARA K, OHIZUMI Y. Pharmacological properties of beta-amyrin palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves. *J Pharm Pharmacol*. vol.6, pp. 545-50, 1993a.

SUBARNAS A, TADANO T, NAKAHATA N, ARAI Y, KINEMUCHI H, OSHIMA Y, KISARA K, OHIZUMI Y. A possible mechanism of antidepressant activity of beta-amyrin palmitate isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test. *Life Sci*.;vol. 52, n.3, pp.289-96, 1993 (b)

SUBARNAS A, TADANO T, KISARA K, OHIZUMI Y. An alpha-adrenoceptor-mediated mechanism of hypoactivity induced by beta-amyrin palmitate. *J Pharm Pharmacol*. vol. 45, n.11, pp.1006-8, 1993c

SUZUKI, H. KONISHI, M.; KIMURA, M.; IKEMI, T. Antibacterial effects of ursolic acid against cariogenic bacteria. Disponível em <[http://iadr.confex.com/iadr/2007orleans/techprogram/abstract\\_90701.htm](http://iadr.confex.com/iadr/2007orleans/techprogram/abstract_90701.htm)> acesso em 20/04/2007.

SZAFRANEK, B. M.; SUNAK, E. E. Cuticular waxes from potato (*solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry*, vol. 67, n. 1, pp. 80-90, 2006.

TAKAMORI, E. R. Estudo *in vitro* da compatibilidade do osso bovino misto quimicamente tratado. Campinas: SP- Instituto de biologia da Universidade Federal de Campinas. Dissertação de Mestrado. 2004, 69p.

TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 25, n. 2, pp. 205-211, 2004.

TAN, N.; KALOGA, M.; RADTKE, O. A.; KIDERLEN, A. A.; ÖKÜZ, S.; ULUBELEN, A.; KOLODZIEJ, H. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, vol. 61, n. 8, pp. 881-884, 2002.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y. KOBAYASHI, E. ; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, I.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenos by *Eryobotrya japonica* Calli. *Phytochemistry*, vol. 59, n. 3, pp. 315-323, 2002.

TAPONDJOU, L.; LONTRI, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K. T.; JUNG, A. J.; PARK, H. J. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 26, n.2, pp. 143-146, 2003.

TCHINDA A.T.; TSOPMO A.; TENE M.; KAMNAING P.; NGNOKAM D.; TANE P.; AYAFOR J.F.; CONNOLLY J.D.; FARRUGIA L.J. Diterpenoids from *Neoboutonia glabrescens* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, vol. 64, n. 2, pp. 575-581, 2003.

TOLEDO, A. C. O., HIRATA, L. L., BUFFON, M. C., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, v. 21, n.1/2, p. 7 – 13, 2003.

THOMAS S.C. L., THOMAS H.J. B.; JOHN C.G. D. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, vol. 101, n. 4, pp.1633-1639, 2007.

THOMSEN K.; BRIMER L. Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 124, n. 3, pp. 273-294,1997.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. G.; CANDEIAS, J. A.N. *Microbiologia*, 3ed. São Paulo, Atheneu, 1999.

TOPÇU, G.; ERTA, A., KOLAKB, U.; ÖZTÜRK, M. AYHAN U., Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *ARKIVOC*, (vii) 195-208, 2007.

UKIYA, M., AKIHISA, T. TOKUDA, H, SUZUKI, H., MUKUINAKA, T., ICHIISHI, E., YASUKAWA, K. KASAHARA, Y., NISHINO, H. Constituintes of compositae plants III. Antitumor promoting effects and citotoxic activity against human câncer cell lines of triterpene diols and triols from *Edible crysantemum* flowers. *Cancer Lett.* 177(1), p. 7 – 12, 2002.

ULUBELEN, A.; SONMEZ, U. TOPCU, G. Diterpenoids from the roots of *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, vol. 44, n. 7, pp. 1297-1299, 1997.

VALDES, H. L.; GARCIA, R. P.; *Callendula officinales*. Artículos de Revisión. *Revista Cubana Farm.*, n. 33 (3), pp. 188-194, 1999.

VARDAMIDES JC, AZEBAZE AG, NKENGFACK AE, VAN HEERDEN FR, FOMUM ZT, NGANDO TM, CONRAD J, VOGLER B, KRAUS W. Scaphopetalone and scaphopetalumate, a lignan and a triterpene ester from *Scaphopetalum thonneri*. *Phytochemistry*, vol. 62, n.4, pp.647-50, 2003.

VERMEER, C. P.; NASTOLD, P.; JEFFER, R. Homologous very-long-chain 1,3-alkanediols and 3-hidroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. *Phytochemistry*, vol. 62, n. 3, pp. 433-438, 2003.

VIEGAS, C.J., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E. J., Os produtos naturais e a química medicinal moderna, *Química Nova*, vol. 29, n. 2, 2006.

VILA VERDE, G. M., PAULAM J. R., CARNEIRO, D. M., Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13 supl., p 64 – 66, 2003.

VILLASEÑOR, I. M., CANLAS, A. P., FAUSTINO, K. M., PLANA, K.G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 92, n1, pp. 53-56, 2004.

VILLEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; BILEGAS, W. POZETTI, G. L. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia genus* (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 8, n. 5, pp., 529 -538, 1997.

VOLPATO, A. M. M. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Callendula officinalles* (Arastaceae) pra seu emprego como fitoterápico. Curitiba: Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado, 2005, 137p.

WAGNER, H.; BLADT, S. & ZGAINSKI, E. M., *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer Verlag. 1984.

WAIZEL-BUCAI, J.; PORCAYO, G. M.; ORTEGA, M. L. V.; CORTES, D. A.; CASTAÑEDA, A. P. Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico de la actividade citotóxica y antimicrobiana de *cuphea aequipetala* cav. (lythraceae). *Polibotánica*, n. 15, pp. 99-108, 2003.

WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. (1992) The families of flowering plants: descriptions, ilustrations, identifications and information retrieval. Version: (14th, December 2000). Disponível em <<http://biodiversity.uno.edu/delta/>>.

XU, H. X.; ZENG, F. Q.; WAN, M.; SIM, K. Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal Nat. prod.*, vol. 59, n. 7, pp.643-645, 1996;

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. D. T.; On the origins of triterpenoids skeletal diversity. Rewiew. *Phytochemistry*, vol. 65, pp. 261-291, 2004.

YASUKAWA, K., AKIHISA, T. OINUMA, H., KASAHARA, Y., KIMURA, Y. YAMANOUDRI, S., KUMAKI, K., TAMURA, T., TAKIDO, M., Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenos from the flowes of compositae and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammmantion in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 19, n. 10, pp. 1329-1331, 1996.

YI, J H : ZHANG, G L : LI, B G : CHEN, Y Z. Two glycosides from the stem bark of *Tetracentron sinense*. *Phytochemistry*, vol. 53, n. 8, pp.1001-1003, 2000.

YILDIRIM, A., MAVI, A. AND KARA, A. A., Determiration of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (8): 4083 – 4089. 2001.

YIM, E. K.; LEE, M. J.; LEE, K. H.; PARK, J. S. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in carcinoma cell lines. *International Journal of gynecological cancer*, vol. 16, n. 6, pp. 2023, 2006.

YOU, Y.J.; NAM, N.H.; KIM, Y.; BAE, K.H.; AHN, B.Z. *Antiangiogenic activity of lupeol from Bombax ceiba*. *Phytotherapy Research*. Coréia. Abril, 2003.

YOLANDA, M; & BERENICE, A. G. A. Alcalóides indólicos, terpenos, esterols y flavonoides de lãs hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 11, n. 1, 2005.

YUNES, R.A., CALIXTO, J.B., Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna, 1ed. Santa Catarina: Editora Universitária: UNOESC/Argos, 500p, 2001.

YOUNG, H. S.; CHUNG, H. Y.; LU, C. K.; PARK, R. Y.; YOKOZAWA, T.; OURA, H. Ursolic acid inhibits aflatoxin B1-induced mutagenicity in *Salmonella* assay system. *Biol & Pharm. Bulletin*, vol. 17, n. 7, pp. 990-992, 1994.

ZANI, C.L.; CHAVES, P.P.G.; QUEIROZ, R.; MENDES, N.M.; OLIVEIRA, A.B.; CARDOSO, J.E.; ANJOS A.M.G.; GRANDI, T.S. Brine shrimp lethality assay as a pre-screening system for anti-*Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*. Vol.2, pp. 47-50, 1995.

ZIEGLER, H.L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M.D.; BAGHERZADEH, K.; HAGERSTRAND, H.; STARERK, D.; JAROSZEWSKI, J.W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Dinamarca. Janeiro, 2004.

ZITTERL-EGLSEER, K., SOSA, S. JURENITSCH, J. SHUBERT-ZSILAVEXZ, M. DEEL LOGGIA, R., TUBARO, A., BERTOLDE, M., FRANZ, C. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol ester of Marigol (*Calendula officinalis* L.), *Journal Ethnopharmacol*, n 57(2), p. 139-144, 1997.

ZHANG, G. L.; XING, Q. Y.; ZHANG, M. Z. Glycolipids from *Mirabilis himalaica*. *Phytochemistry*, vol. 45, n. 6, pp. 1213-1215, 1997.

ZUCARO, Y. L. COMPAGNONE, R. S.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D. 6 $\beta$ -hidroxymaslinic acid, a triterpene from *Chusia ferruginea*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 11, n. 3, pp. 241-244, 2000.

# **ANEXO 1**

## Avaliação da Atividade Antioxidante de Algumas Espécies de *Pouteria*

Carlos F. de S. Castro<sup>1\*</sup> (PQ), Cíntia A. de M. Silva<sup>2</sup> (PG), João P. S. Perfeito<sup>2</sup> (IC), Maria L. dos Santos<sup>3</sup> (PQ), Inês S. Resck<sup>3</sup> (PQ), José E. de Paula<sup>4</sup> (PQ) e Dâmaris Silveira<sup>2</sup> (PQ)

fred@ucb.br

<sup>1</sup>Curso de Química, CCEH, Universidade Católica de Brasília, 71966-700, Taguatinga, DF, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, <sup>3</sup>Instituto de Química, <sup>4</sup>Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

Palavras Chave: *Pouteria*, antioxidante DPPH.

### Introdução

O gênero *Pouteria* pertence à família Sapotaceae e compreende cerca de 430 espécies. *Pouteria ramiflora* e *P. gardnerii* podem ser encontradas no Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Pouteria torta* (Mart.) Radlk e *P. caimito* (Ruiz & Pav) Radlk podem ser encontradas em todo o Brasil. Ainda que não exista uma política de exploração comercial dos frutos de *P. torta*, *P. caimito* e *P. ramiflora*, as populações residentes no Cerrado usam tais espécies como alimentos e remédio caseiro. A casca da árvore *P. torta*, comumente chamada de “guapeva”, “curiola”, “acá ferro”, “abiu do cerrado” e “grão de galo”, é utilizada como remédio contra desintéria. As raízes e a casca de *P. ramiflora*, chamada de “grão de galo”, “massaranduba” ou “pitomba de leite”, também são usadas como remédios contra desintéria, bem como vermífugo. *Pouteria caimito*, conhecida como abiu, também é útil em desintéria, além de afecções pulmonares e contra malária.

Dando seguimento aos esforços de pesquisa da possível atividade biológica das espécies de *Pouteria*, a atividade antioxidante dos extratos brutos de folhas de *P. caimito*, *P. gardnerii*, *P. ramiflora* e *P. torta* foi avaliada.

A atividade seqüestrante de radical (antioxidante) dos extratos brutos de *Pouteria* foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Blois, com pequenas modificações<sup>1</sup>, em presença do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

O hidroxitolueno butilado (BHT) foi usado como controle positivo e sua CE<sub>50</sub> usada para comparação com os valores obtidos para os extratos brutos das espécies de *Pouteria*.

### Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores de CE<sub>50</sub> determinado pelo ensaio com DPPH para as quatro espécies de *Pouteria* avaliadas. Os extratos brutos obtidos apresentaram atividade antioxidante significativa, com a exceção dos extratos hexânicos. Ensaio preliminares indicam a presença, nos extratos mais polares, de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. Considerando que essa classe de substância tem sido referida como potencialmente antioxidante, sua presença pode justificar os resultados obtidos.

**Tabela 1.** Atividade antioxidante de extratos brutos de *Pouteria*.

Espécie	Solvente	CE50 (µg.mL <sup>-1</sup> )
<i>Pouteria caimito</i>	Hexano	1570,0
	Etanol	20,2
	Água	72,9
<i>Pouteria gardnerii</i>	Hexano	181,0
	Etanol	95,8
	Água	46,5

---

<i>Pouteria ramiflora</i>	Hexano	291,0
	Etanol	6,3
	Água	37,5
<i>Pouteria torta</i>	Hexano	2000,0
	Etanol	10,1
	Água	5,9
BHT	-	15,0

---

### Conclusões

A comparação dos dados apresentados mostra que os extratos brutos etanólico e aquoso de *P. torta* e o extrato bruto etanólico de *P. ramiflora* apresentam atividade antioxidante superior ao controle positivo (BHT). A investigação fitoquímica destes extratos ativos está sendo realizada pelo nosso grupo de pesquisa.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Católica de Brasília, FUNPE-UnB, Projeto CT-Infra 970/2001, Finatec e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

<sup>1</sup> Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (8): 4083 –4089.

## **ANEXO II**

**Antioxidant Activity of Some Species of *Pouteria* from the Brazilian Savannah**

Carlos F. de S. Castro\*

Curso de Química, CCEH, Universidade Católica de Brasília, Taguatinga, DF, 71966-700

Sarila R. Ribeiro

Curso de Ciências Farmacêuticas, CCV, Universidade Católica de Brasília, Taguatinga, DF,  
71966-700

Maria L. Santos

Inês S. Resck

Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil

João E. Paula

Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil

Cíntia A.M. Silva

João P.S. Perfeito,

Sofia J. Feres,

Dâmaris Silveira

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brasil

## Antioxidant Activity of Some Species of *Pouteria* from the Brazilian Savannah

### ABSTRACT:

Crude extracts obtained from leaves of three species of *Pouteria* (*P. gardnerii*, *P. ramiflora* and *P. torta*) had their antioxidant activities assayed by the Blois method (DPPH). Aqueous extract of *P. torta* and ethanolic extract of *P. ramiflora* presented comparable antioxidant activity (14.8 and 15.3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively) to the positive control, BHT (14.9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The results indicate the existence of highly active antioxidant compounds in the crude extracts of *P. torta* and *P. ramiflora*, suggesting these species as natural sources of these active materials.

**Keywords:** *Pouteria*, Sapotaceae, antioxidant

## INTRODUCTION

The genus *Pouteria* belongs to Sapotaceae family and comprises about 430 species. *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, *P. ramiflora*, and *P. gardnerii* can be found at the Cerrado around Distrito Federal, Brazil. Despite of an inexistent policy of commercial exploration of the edible fruits from *P. torta* and *P. ramiflora*, people living at Cerrado eat them and use these species as remedies. The barks of *P. torta* tree, commonly called “guapeva”, “curiola”, “acá-ferro”, “abiu-do-cerrado”, and “grão-de-galo”, are used as dysenteric medicine; the roots and barks of *P. ramiflora* tree, also named “grão-de-galo”, and “massaranduba” or “pitombade-leite” likewise are used as dysenteric medicine as well as vermifuge. In relation to the ethnomedicinal utilization of *P. gardnerii* was not found any report.

Hexanic and ethanolic extracts from leaves of *P. torta* present antimicrobial activity against both *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosae*. The aqueous extract showed antimicrobial activity against *P. aeruginosae* and *Escherichia coli*<sup>1</sup> as well as cytotoxicity by BST assay<sup>2</sup>. The ethanol extract from leaves of *P. ramiflora* presented anti-inflammatory and anti-nociceptive activities *in vivo*<sup>3,4</sup>.

Continuing the efforts around this genus, the phytochemical study of the ethanolic and aqueous extracts from the tree species of *Pouteria* is being carried out by our research group. To assess potential bioactivity of *Pouteria* species, the antioxidant activity of crude extracts from leaves of *Pouteria torta*, *P. ramiflora*, and *P. gardnerii* was evaluated at this time.

In view of the fact that the daily intake of antioxidants compounds present in fruits and vegetables is claimed to be effective in the prevention of oxidative stress diseases, antioxidants are a current and interesting subject matter. Therefore it is especially attractive for researchers to have a convenient and effortless methodology to measure both quantity and power of antioxidant materials. Although, it seems to be unrealistic to presume that a one single method can be used, the DPPH assay appears as a manner that comprises most of the desired characteristics and it has been used for several research groups to assess the antioxidant activity of a various number of plant extracts<sup>5</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### General

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and butylated hydroxytoluene (BHT) were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). A Micronal B-542 model colorimeter was used to obtain absorbance data.

### Plant Material

Leaves of *Pouteria torta* and *P. ramiflora* were collected on campus of the Universidade de Brasília in July, 2003. *Pouteria gardnerii* leaves were collected on Condomínio Solar – Distrito Federal - in July, 2003. Exsiccates were deposited in the Herbarium of Universidade de Brasília (UnB) and the species were identified by Professor J. E. de Paula (voucher numbers JElías de Paula 3674, 3671 and 3672, respectively).

### Extraction and Isolation

The plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. Part of this material was macerated at room temperature for seven days (repeated for three times), firstly by hexane, followed by ethanol. After filtration, the solvents were removed under reduced pressure, at temperature below 40 °C.

The aqueous extract was obtained by infusion of the powdered material using distilled water (3 L). After filtration, water was removed by lyophilization technique to furnish crude aqueous extract. The yields of crude extracts and fractions are presented at Table 1.

All the extracts were submitted to the pharmacognostic screening<sup>6</sup>.

### DPPH assay

The free radical scavenging activity (antioxidant) of the plant extracts and standards were assessed based on Blois' method with slight modification<sup>7</sup>, using the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. Butylated hydroxytoluene (BHT), a well-known and widely used synthetic antioxidant, was used as positive control. DPPH ( $2.5 \times 10^3$   $\mu\text{g}$ ) was dissolved in ethanol (25 mL) to obtain a final concentration ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). This solution was preserved in a dark flask at room temperature.

DPPH solution daily prepared (1 mL) was added to 2 mL of each extract or BHT solution (from  $300$  to  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and placed in the dark at room temperature. After incubation for 30 min the absorbance of each solution was measured at 517 nm.

To avoid the misunderstand due to the pigments from the crude extracts, a negative control was prepared from each sample using 2 mL of the solution previously obtained from both extract and 1 mL of ethanol. Absorbance values of the solutions were measured and subtracted from that obtained with DPPH.

Data were used to calculate the necessary concentration to consume one-half of the initial amounts of DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ). Each of the measurements described above was carried out at

least in three replicate experiments and the results are reported as mean and standard deviation. The results were expressed in  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **Statistical Analysis**

Student's t test for unpaired observations (ANOVA) with a post-hoc Newmann-Keuls multiple test was used for the statistical evaluation of differences of means and a p value below 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using the GraphPad Prism v4 for Windows statistical package.

## RESULTS

Table 1 presents the EC<sub>50</sub> determined by the DPPH assay for the three species of *Pouteria* used in the present work. All crude extracts presented significant antioxidant activity, with the exception of the hexanic ones.

**(Insert Table 1 here)**

The DPPH method to assess the radical-scavenging capacity of a sample is considered one of the most effective methods for evaluating the concentration of radical-scavenging materials by a chain-breaking mechanism<sup>8</sup>. EC<sub>50</sub> value, defined as the concentration of antioxidant required for 50% scavenging of DPPH radicals, is a parameter widely used to measure antioxidant activity. Thus a smaller EC<sub>50</sub> value corresponds to a higher antioxidant activity of the plant extract.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Concerning to the chemical composition, preliminary pharmacognostic screening of hexanic extracts obtained from the three species showed that the major components are triterpenes, present also in ethanol extracts. On the other hand, flavonoids are the mainly class of compounds present in the crude aqueous extract. In fact, phytochemical study of hexanic extracts from all the three species presented, besides others compounds, a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin, as well as lupeol acetate. It is the first time such triterpenes are reported to *P. ramiflora* and *P. gardnerii* (forthcoming paper).

The presence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin can explain the previously reported *in vivo* anti-nociceptive activity of *P. ramiflora*<sup>9</sup>.

Comparing different crude extracts for the same species, hexanic extracts always displayed smaller antioxidant activity than ethanol or aqueous ones. These results are consistent with the chemical composition of these extracts and indicate that antioxidant natural compounds were extracted by more polar solvents, such as ethanol and water. In fact, the chemical study of ethanolic and aqueous extracts revealed the presence of important quantities of flavonoids (forthcoming paper), well known by their antioxidant activities<sup>10</sup>. Such findings are supported by statistical analysis which indicates that aqueous and ethanolic crude extracts do not present significant difference of antioxidant activity from the BHT control. It seems that they represent potential sources of antioxidant compounds.

As far as we know, this is the first study concerning the free radical-scavenging capacity of these three species of *Pouteria*.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Universidade Católica de Brasília, Universidade de Brasília, Finatec and CNPq for the financial support.

## REFERENCES

1. Lopez, K.S.E.; Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2005
2. Perfeito, J.P.; Santos, M.L.S.; Lopez, K.S.E.; Paula, J.E.; Silveira, D.; *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2005**, 15, 183
3. Fontes-Junior, E.A.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Brasil, 2004
4. Nunes, M.M.; Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2004
5. Huang, D; Ou, B; Prior, R.L.; *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 1841
6. Wagner, H.; Blatt, S.; In *Plant Drug Analysis*. Springer- Verlag: Berlin, 1996.
7. Yildirim, A.; Mavi, A.; Kara, A.A.; *J. Agric. Food Chem*, **2001**, 49, 4083
8. Niki, E.; *Chemistry and Physics of Lipids*, **1987**, 44, 227
9. Otuki, M.F.; Ferreira, J.; Lima, F.V.; Meyre-Silva, C.; Malheiros, A.; Muller, L.A.; Cani, G.S.; Santos, A.R.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B.; *J. Pharmacol. Exp. Ther* , **2004**, 313, 310
10. Wang, L.; Tu, Y.C.; Lian, T.W.; Hung, J.T. ; Yen, J.H.; Wu, M.J.; *J Agric Food Chem*, **2006**, 54, 9798

**Table 1. Antioxidant Activity of Crude Extracts from several species of *Pouteria***

Species	Solvent	Extract yield (%)	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
<i>Pouteria gardnerii</i>	Hexane	1.1	301 ± 181 b
	Ethanol	4.5	30.3 ± 4.4 a
	Water	8.8	30.3 ± 13.5 a
<i>Pouteria ramiflora</i>	Hexane	2.8	271 ± 53 b
	Ethanol	5.6	15.3 ± 3.2 a
	Water	7.7	29.9 ± 4.4 a
<i>Pouteria torta</i>	Hexane	5.1	307 ± 23 b
	Ethanol	11.3	49.0 ± 11.6 a
	Water	11.2	14.8 ± 4.7 α
BHT	-		14.9 ± 2.2 α

Values are means ± standard deviation of three separate determinations. Small letters represent analysis of the results obtained in Newmann-Keuls test at 5% of significance in comparison with BHT control. Equal letters do not statistically differ.