

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo Químico-Biológico de *Pyrostegia venusta* (Ker
Gawl.) Miers (Bignoniaceae)**

Thales Del Puppo Altoé

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2014**

Thales Del Puppo Altoé

**Estudo Químico-Biológico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers
(Bignoniaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza
Borges

**VITÓRIA
2014**

Estudo Químico-Biológico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae)

Thales Del Puppo Altoé

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovado(a) em 25/08/2014 por:

Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Pedro Mitsuo Takahashi
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, agosto de 2014

Dedico essa dissertação a minha família, cujo apoio foi imprescindível para todas as conquistas que tive na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele eu não seria nada.

À minha família, em especial aos meus pais, André e Rita, ao quais realizaram muitos sacrifícios ao longo dos anos para que eu pudesse estudar e estiveram ao meu lado nos momentos difíceis me dando força e apoio.

Ao Prof. Dr. Warley de Souza Borges, um exemplo de determinação em alcançar seus objetivos, agradeço pela orientação, conhecimentos transmitidos, otimismo, oportunidades oferecidas e auxílio.

Aos amigos do laboratório de produtos naturais: Eder Lana, Dayane Galvão, Leandra Gobira, Carliani Bessa, Caroline Guerrieri, Olívia Kretli, Amanda Guilherme, Gabriela Tavares, Juliana Vindor e Michelli Santos. Muito obrigado pela ajuda, companheirismo e momentos de descontração.

A todos os meus amigos da graduação, de Pós-Graduação e outros que cultivei ao longo desses anos na UFES: Morgan, Thiago, Flora, Geisa, Roberta, Elizeu, Gustavo, Amanda e outros. Sem dúvida, o caminho teria sido mais difícil sem vocês, espero que essas amizades sejam duradouras.

Aos professores do programa de pós-graduação: Warley, Sandro, Valdemar, Wanderson, Marcos Benedito, Pedro, Josimar, Rosangela, Maria Teresa, Reginaldo; agradeço pelos conhecimentos transmitidos através das disciplinas ministradas e auxílios prestados fora da sala de aula.

Ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFES-NCQP) e a todos os responsáveis pelas análises, em especial ao professor Álvaro Cunha Neto.

Ao laboratório de Cromatografia (UFES-NCQP), em específico ao MSc. Artur Rodrigues Machado e a Dra. Maristela de Araujo Vicente, pela realização das análises por CG-IE-EM.

Ao laboratório de Espectrometria de Massas (UFES-NCQP), em específico ao professor Dr. Wanderson Romão pelas análises realizadas.

À Universidade Federal de São Carlos, pela realização dos ensaios enzimáticos, em especial ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, que também fez várias sugestões ao longo deste trabalho.

À Profa. Dra. Luciana Diaz Thomas e seu aluno Weverson Cavalcante pela identificação da espécie da planta trabalhada.

Aos professores Dr. Pedro Mitsuo Takahashi e Dr. Wanderson Romão pelas sugestões e correções na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Resende kitagawa e seu aluno Augusto Borges pela realização dos testes de atividade antioxidante, em especial ao Dr. Kitagawa pelas sugestões no.

À Profa. Dra. Claudia Masrouah Jamal e seu aluno João Victor Dutra Gomes, pelo auxílio na realização dos testes fitoquímicos preliminares e quantificação de flavonoides.

Ao Msc. Gustavo Modesto de Amorim pela auxílio na realização dos ensaios de viabilidade celular, em especial pela disposição e ajuda prestada, já que muitos dos trabalhos acabaram sendo realizados durante a madrugada no Criobanco do Hospital Santa Rita.

Aos professores Dr. Pedro Mitsuo Takahashi e Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, pela disponibilidade em participar da banca, correções e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realização deste trabalho e formação.

À CAPES, pelas bolsas concedidas no período em que fui bolsista da mesma.

À FAPES, pelas bolsas concedidas no período em que fui bolsista da mesma

Ao CNPQ (552686/2011-5) pelo apoio financeiro.

À todos os membros do projeto Sisbiota. Foi um prazer fazer parte deste grupo no decorrer do projeto.

"Assim, os elementos mudavam suas propriedades entre si, como na harpa os sons mudam de ritmo conservando a mesma tonalidade. É o que se pode verificar perfeitamente quando se consideram esses acontecimentos."

Livro da sabedoria capítulo 19 versículo 18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas da morfina e atropina, encontradas respectivamente em <i>Papaver somniferum</i> e <i>Atropa belladonna</i> .	16
Figura 2: Estruturas do taxol, vincristina, vimblastina, fisostigmina e artemisinina.	17
Figura 3: Substâncias isoladas de plantas da família Bignoniaceae.	20
Figura 4: Desenho dos componentes morfológicos de <i>P. venusta</i> . A- flor em botão, B- seção longitudinal da corola com androceu, estilo e estigma, C- ramo com folhas, D- inflorescência, E- nó de inflorescência, F- seção longitudinal da corola com androceu. Fonte: POOL, 2008.	21
Figura 5: Estrutura de algumas substâncias identificadas em <i>P. venusta</i> .	23
Figura 6: Estruturas de algumas substâncias isoladas de <i>P. venusta</i> .	24
Figura 7: Estruturas de alguns antioxidante sintéticos.	27
Figura 8: Representação esquemática do processo de catálise enzimática.	28
Figura 9: Mecanismo proteolítico das catepsinas. Onde “E” representa a estrutura da enzima com exceção dos resíduos terminais cisteína (Cys) e histidina (His) (LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002).	30
Figura 10: Esquema de aplicação do extrato bruto e fração acetato de etila em placa ELISA.	42
Figura 11: Esquema de aplicação da fração hexano em placa ELISA.	43
Figura 12: Esquema de aplicação dos fármacos em placa ELISA.	43
Figura 13: Esquema geral do teste de viabilidade celular.	44
Figura 14: Fracionamento do extrato bruto (W35) da fração acetato de etila (W35FA)	46
Figura 15: Fracionamento inicial de W35FA 2.	47
Figura 16: Esquema de fracionamento de W35FA 3.	48
Figura 17: Esquema de fracionamento de W35FH.	49
Figura 18: Esquema de interação do bismuto tetraiodo e o alcaloide.	52
Figura 19: Mecanismo proposto por XIONG, WILSON e PANG (2007). A: sulfonação; B: eliminação de H ₂ SO ₃ com formação de insaturação.	53
Figura 20: Esquema generalizado da mudança de coloração. Estrutura de alguns dos componentes identificados em cada etapa por XIONG, WILSON e PANG (2007).	54
Figura 21: Estrutura do ácido glicirrízico (aglicona triterpenoide).	56
Figura 22: Abertura do anel lactônico e isomerização por ação da luz UV.	57
Figura 23: Esquema de radical sendo neutralizado/reduzido por uma cumarina hidroxilada.	58
Figura 24: Estrutura do naftaleno, da julgona (naftoquinona) e do anel <i>para</i> -quinonoídico.	58
Figura 25: Estruturas básicas das subclasses de flavonoides.	59
Figura 26: Estrutura das antocianinas do cloreto de cianidina.	60
Figura 27: Estrutura do anel 1,4-benzopirona.	61
Figura 28: Grupo ceto com hidroxila em posição <i>peri</i> e grupos <i>orto</i> hidroxila.	61

Figura 29: Esquema de radical sendo neutralizado/reduzido por um flavonoide (neste caso uma flavona).	62
Figura 30: Redução (inibição) do radical DPPH por flavonoide (flavona) e cumarina.	63
Figura 31: Estrutura química do antioxidante utilizado como padrão, trolox.	64
Figura 32: Resultados de inibição do radical DPPH para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.	65
Figura 33: Esquema da redução (inibição) do radical ABTS.	66
Figura 34: Resultados de inibição do radical ABTS para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.	68
Figura 35: Curva de calibração obtida utilizando rutina como padrão.	70
Figura 36: Redução do sal de tetrazol (MTT) à formazana.	72
Figura 37: Valores de viabilidade celular (%) para o extrato bruto e frações.	73
Figura 38: Viabilidade celular (%) dos fármacos e das amostras de <i>P. venusta</i> . Todos os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. AAS é o ácido acetilsalicílico.	74
Figura 39: Valores de viabilidade celular (%) dos fármacos.	75
Figura 40: Esquema do teste de hidrólise do substrato Z-FR-MCA.	76
Figura 41: Estrutura química do composto E-64.	77
Figura 42: Esquema das interações entre o inibidor E-64 e a papaína (estruturalmente semelhante às cisteínas) (VARUGHESE, AHMED, CAREY <i>et al.</i> , 1982).	77
Figura 43: Porcentagem de inibição da catepsina V em função da concentração.	78
Figura 44: Porcentagem de inibição da catepsina K em função da concentração.	78
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a W35FA 1 entre 11 e 0 ppm.	80
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a W35FA 2 entre 10,5 e 0 ppm.	82
Figura 47: Estrutura do fitol 1 .	83
Figura 48: Espectro de massas da biblioteca (adquirida do <i>NIST</i>) para o fitol. Espectro de intensidade(%) <i>versus</i> <i>m/z</i> .	83
Figura 49: Espectro de massas obtido para o fitol 1 . Espectro de intensidade(%) <i>versus</i> <i>m/z</i> .	83
Figura 50: Desidratação térmica do fitol 1 , seguido de ionização por IE.	85
Figura 51: Proposta de fragmentação da porção alceno do fitol 1 .	86
Figura 52: Proposta de fragmentação do fitol 1 com formação dos íons <i>m/z</i> 278, 123, 68 e 53.	87
Figura 53: Proposta de fragmentação do fitol 1 , íons formados a partir da segmentação do íon <i>m/z</i> 123.	88
Figura 54: Espectro de massas do fitol 1 obtido da fração W35FA 2.3. Espectro de intensidade(%) <i>versus</i> <i>m/z</i> .	89
Figura 55: Espectro de massas do sitosterol 2 obtido na fração W35FA 3.4.3.3. Espectro de intensidade(%) <i>versus</i> <i>m/z</i> .	89

Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.3.3 entre 5,00 e 5,70 ppm.	90
Figura 57: Esteroides isolados da fração W35FA 3.4.4.1.....	91
Figura 58: Espectro de massas do fitol 1 da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade (%) <i>versus</i> m/z	91
Figura 59: Espectro de massas do fitol 1 da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade (%) <i>versus</i> m/z	91
Figura 60: Espectro de massas do sitosterol 2 da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	92
Figura 61: Espectro de massas do sistosterol 2 da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	92
Figura 62: Espectro de massas do estigmasterol 3 da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	92
Figura 63: Espectro de massas do estigmasterol 3 da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	92
Figura 64: Espectro de massas do campesterol 4 da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	93
Figura 65: Espectro de massas do campesterol 4 da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	93
Figura 66: Proposta de formação dos íons moleculares dos esteroides.	94
Figura 67: Proposta de formação dos íons $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{++}$	95
Figura 68: Proposta de mecanismo generalizado de formação do íon $[\text{M}-(\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3)]^{++}$	96
Figura 69: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do sitosterol (2).	97
Figura 70: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do estigmasterol (3).	98
Figura 71: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do campesterol (4).	98
Figura 72: Proposta de fragmentação com formação do íon de m/z 57.	99
Figura 73: Proposta de fragmentação com formação do íon m/z 105.	99
Figura 74: Proposta de fragmentação com formação dos íons m/z 255 e 273.	100
Figura 75: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.4.1	101
Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.4.1 entre 5,22 e 5,60 ppm.	102
Figura 77: Espectro de massas do diéster do ácido ftálico da fração W35H 2. Espectro de intensidade relativa (%) <i>versus</i> m/z	104
Figura 78: Esquema de fragmentação do ftalato com formação dos íons m/z 167 e 149 (JEILANE, CARDENILO e IBEANUSI, 2011).	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Farmácos baseados em produtos naturais lançados na Europa, EUA e Japão entre 2001 e 2005 (LAM, 2007).....	18
Tabela 2: Espécie de Bignoniacea <i>versus</i> substância identificadas.....	19
Tabela 3: Testes fitoquímicos das folhas de <i>P. venusta</i>	50
Tabela 4: Resultados de inibição do radical DPPH para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.....	64
Tabela 5: Resultados de inibição do radical ABTS para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.....	68
Tabela 6: Valores de IC ₅₀ para as metodologias de redução do radical ABTS e DPPH.	69
Tabela 7: Valores de viabilidade celular (%) para o extrato bruto e frações.	72
Tabela 8: Valores de viabilidade celular (%) dos fármacos.	74
Tabela 9: Tabela comparativa com o íon molecular, a perda de água e a perda de água e metil de cada esteroide.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a – altura

Abs – absorbância

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-IE-EM – cromatografia gasosa, com ionização por elétron acoplada à espectrometria de massas

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COX – ciclooxigenase

d – dubleto

d – diâmetro

Da – Daltons

DMEM – dulbecco's modified eagle medium

ERO's – espécies reativas de oxigênio

e.V. – elétron volt

FDA – Food and Drug Administration

HTS – High Throughput Screening

i.s. – índice de similaridade

J – constante de acoplamento

m/z – razão massa/carga

MHz – mega hertz

NIST – National Institute of Standards and Technology

Obs. – observação

ORAC – oxygen radical absorbance capacity

p.a. – pro analysis

PBS – phosphate buffered saline

PN – produto natural

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN de ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SFB – soro fetal bovino

t.r. – tempo de retenção

tq – triplo quadrupeto

USDA – *united states department of agriculture*

UV-Vis – ultravioleta – visível

VC – viabilidade celular

LISTA DE COMPOSTOS

AAS – ácido acetilsalicílico

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AcOAc – anidrido acético

AcOEt – acetato de etila

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CH₂Cl₂ – diclorometano

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

DTE – ditioeritritol

E-64 – L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EtOH – etanol

Hex – hexano

HOAc – ácido acético

Mg – magnésio

MTT– 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol brometo

Z-FR-MCA – carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

Zn – zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

β – beta

δ – deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

λ – comprimento de onda

λ_{em} – comprimento de onda de emissão

λ_{ex} – comprimento de onda de excitação

e^- – elétron

RESUMO

Este trabalho descreve a investigação química e biológica do extrato bruto e das partições hexano e acetato de etila, das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, popularmente conhecida como “cipó de São João”. *P. venusta* é classificada botanicamente como uma liana de porte mediano, tendo como característica uma exuberante floração vermelha, e por isso, sendo utilizada como planta ornamental. Essa planta possui uma larga utilização na medicina popular, sendo utilizada no tratamento de vitiligo, diarreia, bronquite, resfriado, icterícia e infecções. Os objetivos deste trabalho foram identificar as classes de metabólitos secundários presentes, avaliar o potencial antioxidante das amostras de *P. venusta* (extrato bruto, frações acetato de etila e hexano), quantificar o teor de flavonoides no extrato bruto, verificar a segurança do uso dessa planta, em termos de viabilidade celular (VC) frente à macrófagos murinos (RAW 264.7) (ensaio de imunotoxicidade). Adicionalmente os resultados de viabilidade celular foram comparados com quatro compostos anti-inflamatórios comerciais (ácido acetilsalicílico, indometacina, betametasona e piroxicam), e testar o extrato bruto quanto à inibição de catepsinas K e V. Os testes de identificação fitoquímica confirmaram a presença de flavonoides, cumarinas e esteroides nas amostras. A metodologia cromatográfica associada à análises por espectrometria de massas, levou a identificação dos compostos: fitol (1), sitosterol (2), estigmasterol (3) e campesterol (4). O extrato bruto demonstrou ter atividade inibitória frente as duas catepsinas testadas (K e V). A fração acetato de etila foi a que apresentou maior atividade antioxidante nas metodologias de inibição do radical DPPH (IC₅₀ 38,62 µg/mL) e radical ABTS (IC₅₀ 27,58 µg/mL). O teor de flavonoides total para o extrato bruto foi de 148,5±7,65 µg/mg (14,85 % (m/m)), o que justifica a observada atividade antioxidante, já que estes possuem atividade antioxidante. As amostras de *P. venusta* obtiveram valores de VC maiores do que os anti-inflamatórios comerciais, estes apresentaram VC abaixo do controle negativo, assim como o extrato bruto e a fração acetato de etila, a fração hexano obteve valores acima do controle negativo, sendo estes os maiores resultados de VC entre as amostras de *P. venusta*.

Palavras-chave: *Pyrostegia venusta*. Folhas. Atividade Antioxidante. Catepsinas. Viabilidade celular.

ABSTRACT

This paper describes the chemical and biological investigation of the crude extract and the hexane and ethyl acetate partitions, of the leaves of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, popularly known as "cipó de São João". *Pyrostegia venusta* is classified botanically as a median size vine, having a characteristically exuberant red flowering and so, being used as an ornamental plant. This plant has a wide use in folk medicine, being used in the treatment of vitiligo, diarrhea, bronchitis, flu, icterus and infections. The objectives of this work were to identify the classes of secondary metabolites present, identify secondary metabolites of this species, evaluate the antioxidant potential of samples of *P. venusta* (crude extract, ethyl acetate and hexane fractions), to quantify the amount of flavonoids in the crude extract, verify safety use of this plant in terms of cell viability (CV) front of murine macrophages (RAW 264.7) (immuno assay). Additionally, the viability results were compared with four commercial anti-inflammatory compounds (acetylsalicylic acid, indometacin, piroxicam and betamethasone), and test crude extracts for inhibition of cathepsins K and V. The identification tests confirmed the presence of flavonoids, coumarins and steroids in the samples. The chromatographic method associated to mass spectrometry analysis, led to the identification of compounds: phytol (**1**), sitosterol (**2**), stigmasterol (**3**) and campesterol (**4**). The crude extract had inhibitory activity against both tested cathepsins (K e V). The ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity in the methodologies of DPPH inhibition (IC₅₀ 38.62 mg/mL) and ABTS radical (IC₅₀ 27.58 mg/mL). The total flavonoids content in the crude extract was 148.5 ± 7.65 mg / mg (14.85% (w/w)), which explains the observed antioxidant activity, since these have antioxidant activity. Samples of *P. venusta* had CV values greater than the commercial anti-inflammatory, which showed CV below the negative control, as well as the crude extract and the ethyl acetate fraction, the hexane fraction obtained values above the negative control, being these larger VC results between samples of *P. venusta*.

Keyword: *Pyrostegia venusta*. Leaves. Antioxidant. Cathepsins. Cell viability.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	Produtos naturais	15
1.2.	Família Bignoniaceae e a espécie <i>Pyrostegia venusta</i>	19
1.3.	Busca por Atividades Biológicas	25
1.3.1.	Atividades antioxidantes e afins.....	25
1.3.2.	Catepsinas.....	28
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivos gerais.....	32
2.2.	Objetivos específicos	32
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.1.	Materiais.....	33
3.1.1.	Solventes.....	33
3.1.2.	Fases estacionárias.....	33
3.1.3.	Reagentes	33
3.1.4.	Viabilidade celular.....	34
3.2.	Equipamentos	34
3.2.1.	CLAE	34
3.2.2.	Técnicas espectroscópicas.....	34
3.2.3.	RMN	35
3.2.4.	CG-IE-EM	35
3.3.	Coleta do material vegetal.....	35
3.4.	Preparo do extrato e frações.....	35
3.5.	Análise fitoquímica preliminar.....	36
3.5.1.	Alcaloides (teste de Dragendorff)	36
3.5.2.	Esteroides e triterpenoides (teste de Liebermann-Burchard)	36
3.5.3.	Taninos (teste da gelatina)	37
3.5.4.	Saponinas (teste da espuma)	37
3.5.5.	Cumarinas	37
3.5.6.	Naftoquinonas (reação de Borntraeger)	37
3.5.7.	Flavonoides	38

3.6.	Estimativa do teor de flavonoides no extrato bruto.....	38
3.6.1.	Curva de calibração.....	38
3.6.2.	Quantificação da amostra.....	39
3.7.	Atividade antioxidante	39
3.7.1.	Atividade antioxidante: inibição do radical DPPH	39
3.7.2.	Atividade antioxidante: inibição do radical ABTS.....	40
3.8.	Cultura e viabilidade celular	41
3.8.1.	Cultura celular.....	41
3.8.2.	Viabilidade celular por ensaio MTT.....	41
3.9.	Inibição das catepsinas K e V	44
3.10.	Metodologia CLAE	45
3.11.	Fracionamento do extrato bruto	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1.	Análise fitoquímica preliminar.....	50
4.2.	Atividade antioxidante	62
4.2.1.	Inibição do radical DPPH.....	63
4.2.2.	Inibição do radical ABTS.....	66
4.3.	Estimativa do teor de flavonoides no extrato bruto.....	69
4.4.	Imunotoxicidade e Viabilidade celular	71
4.5.	Inibição das catepsinas	75
4.6.	Estudo químico de <i>P. venusta</i>	79
5.	CONCLUSÕES	106
6.	REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

Os produtos naturais (PN's) são utilizados há vários séculos pela humanidade como corantes, alucinógenos, repelentes, no combate a enfermidades entre outras aplicações. Os povos primitivos preparavam extratos, decoctos, chás, infusões entre outras formas de extração, principalmente de plantas, como fonte defesa contra doenças e outros males que os atingiam, talvez uma das formas mais antigas seja a ingestão de folhas. O uso desses metabólitos secundários (PN's) como "fármacos" se desenvolveu com sucesso ao longo da história da humanidade em várias regiões do globo, um exemplo é a medicina tradicional chinesa, muitos dos seus preparados vegetais são até hoje alvo de estudos que buscam identificar as substâncias responsáveis por seus efeitos biológicos (VEIGA, PINTO e MACIEL, 2005; VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Portanto, os relatos do uso de PN's na história da humanidade advêm de muito tempo e uma das mais famosas utilizações descritas relaciona-se ao alcaloide atropina (figura 1). Tal substância estava contida nos frutos de beladona (*Atropa belladonna*), cuja denominação *belladonna* (belas mulheres), tem origem no uso do sumo dos frutos pelas mulheres da idade média para dilatar a pupila, o que era considerado sinônimo de beleza. O uso desse alcaloide também se estendia às práticas de bruxaria, estando presente na composição da "fórmula de voo", que era passada sobre certas partes do corpo pelas bruxas e causava a sensação de voo (MARTINEZ, ALMEIDA e PINTO, 2009).

Por sua vez, o ópio, extraído do bulbo de *Papaver somniferum*, tem o uso datado desde os sumérios (4000 a.C.). Este tem como componente majoritário a morfina (figura 1), a qual foi isolada na França por Armand Séquin em 1804, sendo conhecido devido às suas propriedades soporíferas e analgésicas (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

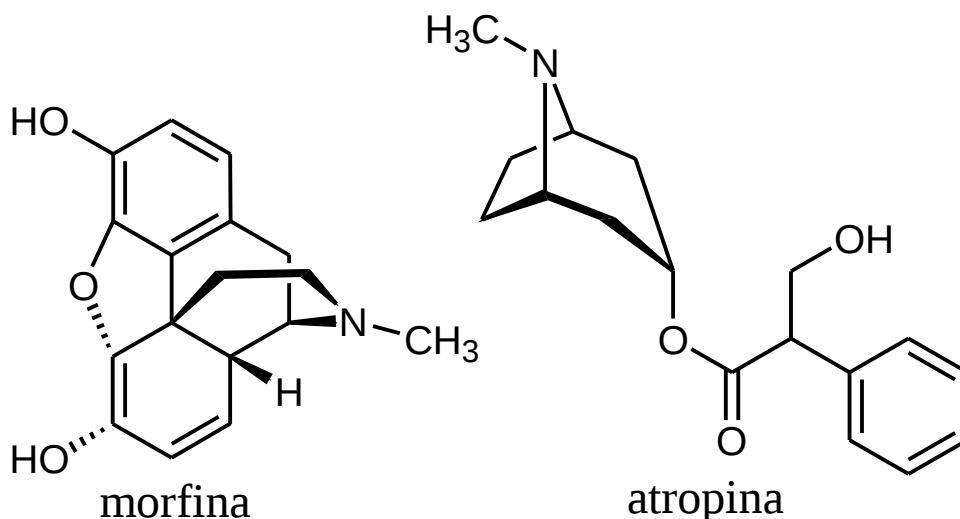


Figura 1: Estruturas da morfina e atropina, encontradas respectivamente em *Papaver somniferum* e *Atropa belladonna*.

Outro exemplo marcante da utilização de PN's, especialmente como fonte de fármacos, é o taxol. Proveniente da espécie *Taxus brevifolia* e utilizado no tratamento de câncer, seu potencial anticancerígeno foi descoberto em 1966 (VIEGAS, BOLZANI E BARREIRO 2006). Adicionalmente, várias outras moléculas são utilizadas na terapêutica atual (figura 2): vincristina e vimblastina, extraídas de *Catharantus roseus* e também aplicadas no tratamento de câncer (MA e WANG, 2009); a fisostigmina, advinda de sementes de *Physostigma venenosum* é usada contra glaucoma (ZHAO, MOOCHHALA e THAM, 2004) e a artemisinina, um antimalárico extraída de *Artemisia annua* (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

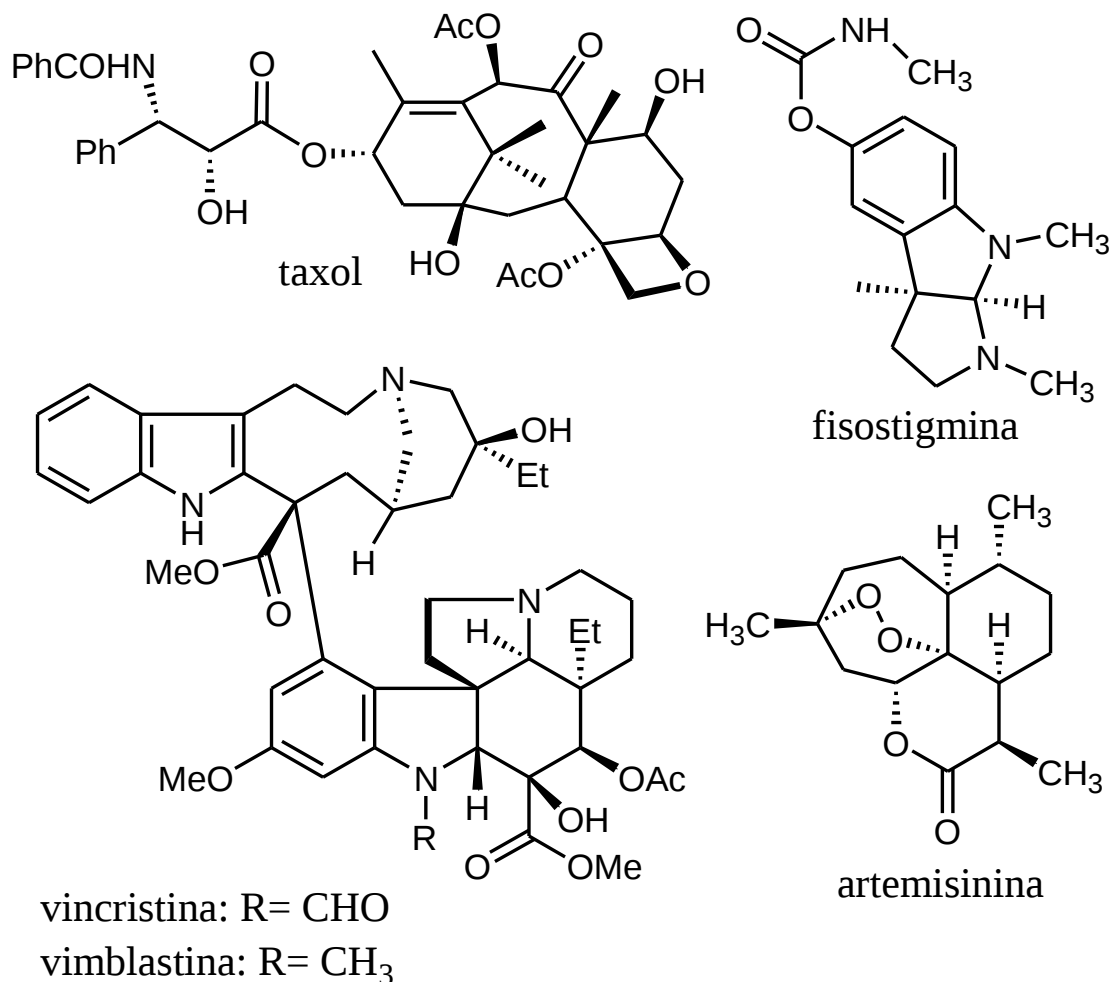


Figura 2: Estruturas do taxol, vincristina, vimblastina, fisostigmina e artemisinina.

Sendo assim, a dimensão da importância dos PN's na indústria farmacêutica pode ser compreendida a partir dos relatos de NEWMAN e CRAGG (2012), os quais demonstram que mais de 50% dos fármacos aprovados pela *FDA* (*Food and Drug Administration*), em 2010, são PN's, derivados, baseados ou inspirados em PN's (miméticos). Considerando o período de 2001 a 2005, tem-se que 23 fármacos baseados em produtos naturais foram lançados no mercado para o tratamento de enfermidades causadas por fungos ou bactérias, dermatites, doença de Alzheimer, doença de Gaucher, câncer, dislipidemia, tirosinemia, analgésicos, imunossupressão, diabetes (tabela 1) (LAM, 2007).

Tabela 1: Fármacos baseados em produtos naturais lançados na Europa, EUA e Japão entre 2001 e 2005 (LAM, 2007).

Nome comum* (nome comercial)	Produto natural base	Indicação
caspofungina (Cancidas®)	pneumocandina B	antifúngico
pimecrolimo (Elidel®)	ascomicina	dermatite atópica
telitromicina (Ketek®)	eritromicina	antibiótico
cloridrato anrubicina (Calsed®)	doxorubicina	anticâncer
biapeném (Omegacin®)	tienamicina	antibiótico
ertapeném (Invanzâ®)	tienamicina	antibiótico
fulvestranto (Faslodex®)	estradiol	anticâncer
galantamina (Reminyl®)	galantamina	doença de Alzheimer
micafungina (Funguard®)	FR901379	antifúngico
nitisinona (Orfadin®)	leptospermona	antitirosinemia
daptomicina (Cubicinâ®)	daptomicina	antibiótico
miglustate (Zavesca®)	1-desoxinojirimicina	doença de Gaucher (tipo 1)
micofenolato de sódio (Myfortic®)	ácido micofenólico	imunossupressão
pitavastatina (Livalo®)	mevastatina	dislipidemia
rosuvastatina (Crestor®)	mevastatina	dislipidemia
everolimo (Certicanâ®)	sirolimus	imunossupressão
talaporfina sódica (Laserphyrin®)	clorofila e ácido L-aspartico	anticâncer
doripeném (Finibax®)	carbapenema	antibiótico
exenatida (Byetta®)	incretina	antidiabético
paclitaxel em nanopartículas (Abraxane®)	taxol	anticâncer
acetato de pranlintida (Symlin®)	amilina	antidiabético
tigeciclina (Tigacil®)	tetraciclina	antibiótico
ziconotida (Prialtâ®)	MVIA	analgésico

* traduções segundo PEREIRA, 2013.

Visto que os PN's possuem uma grande diversidade estrutural, frente a compostos sintéticos (HARVEY, 2000), a procura por novos fármacos a partir de PN's é constante e, associando informações de Etnofarmacologia com uma ampla variedade de extratos e testes biológicos em larga escala (*HTS – High Throughput Screening*), torna-se possível à realização de buscas sistemáticas por compostos bioativos (BOISCLAIRE, EGA, HUBERMAN, 2004; HARVEY, 2008).

1.2. Família Bignoniaceae e a espécie *Pyrostegia venusta*

A família Bignoniaceae é composta por cerca de 82 gêneros e 827 espécies, estando amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, porém sem muitos representantes em locais de clima temperado. Está presente na América Central, Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado brasileiro e savanas da Argentina, Bolívia e Paraguai, tendo alguns poucos representantes na África e Ásia. Possui desde árvores de grande porte, a exemplo do gênero *Jacaranda*, até lianas (trepadeiras) (LOHMANN, 2006; OLMSTEAD, ZJHRA, LOHMANN, 2009).

Quanto ao aspecto fitoquímico, a família Bignoniaceae é extremamente rica, sendo descritas na literatura diversas classes de metabólitos secundários como: saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, naftoquinonas, esteroides, terpenoides e outros (CHOUDHURY, DATTA, TALUKDAR *et al.* 2011). A tabela 2 e a figura 3 apresentam algumas substâncias identificadas de plantas da família e as respectivas estruturas químicas (CHOUDHURY, DATTA, TALUKDAR *et al.* 2011; CHI, NAKAMURA e ZHAO, 2005; OLIVEIRA, RASLAN, MIRAGLIA, MESQUITA, ZANI, FERREIRA E MAIA, 1990; RANI, RAGHU, NAIR e PADMAKUMARI, 2014).

Tabela 2: Espécie de Bignoniaceae versus substância identificadas.

Espécie	Substancia (classe)
<i>Oroxylum indicum</i>	Crisina (flavonoide)
<i>Icarvillea sinensis</i>	incarvillateina (alcaloide)
<i>Icarvillea sinensis</i>	incarvina (alcaloide)
<i>Tabebuia ochracea</i>	lapachol (naftoquinona)
<i>Stereospermum colais</i>	β -sitosterol (esteroide)
<i>Stereospermum acuminatissimum</i>	ácido elágico

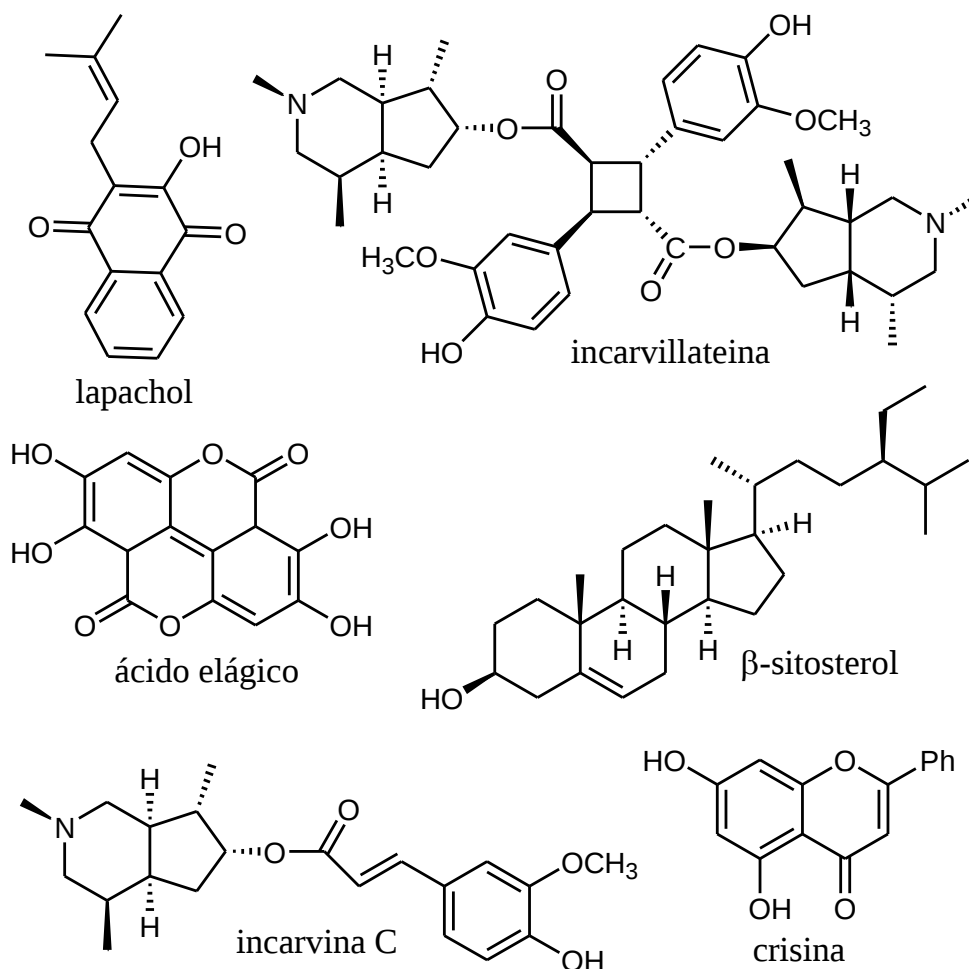


Figura 3: Substâncias isoladas de plantas da família Bignoniaceae.

Dentre os vários gêneros, *Tabebuia* é um dos maiores da família, com cerca de 100 espécies, variando entre plantas arbustivas e árvores de grande porte. Há também outros gêneros com grande número de espécies, como *Arrabidaea*, que exibe cerca de 70, e *Jacaranda*, com 40 espécies. Por outro lado, *Pyrostegia* possui apenas quatro representantes, sendo todas lianas; onde se encaixa a espécie de estudo *Pyrostegia venusta*. (LOHMANN, 2006; OLMSTEAD, ZJHRA, LOHMANN, 2009; POOL, 2008).

P. venusta é, então, classificada como uma liana de porte médio, a qual tem como uma de suas características principais a presença de floração avermelhada que ostenta beleza exuberante. Citada por MENNINGER *et al.* (1970) em sua lista de flores mais bonitas do mundo (*apud* POOL 2008), é normalmente cultivada como planta ornamental.

A espécie não é endêmica do Brasil. Está presente também no Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina. Tal planta distribui-se em altitudes de 70 a 1300 metros de elevação, sendo geralmente encontrada abaixo dos 1000 metros. No Brasil, localiza-se usualmente na Mata Atlântica secundária e no Cerrado (LOHMANN, 2006; POOL, 2008; ROY, ANDEKAR, KUMAR *et al.*, 2012,). A figura 4 mostra as principais partes morfológicas de *P. venusta* (POOL, 2008).

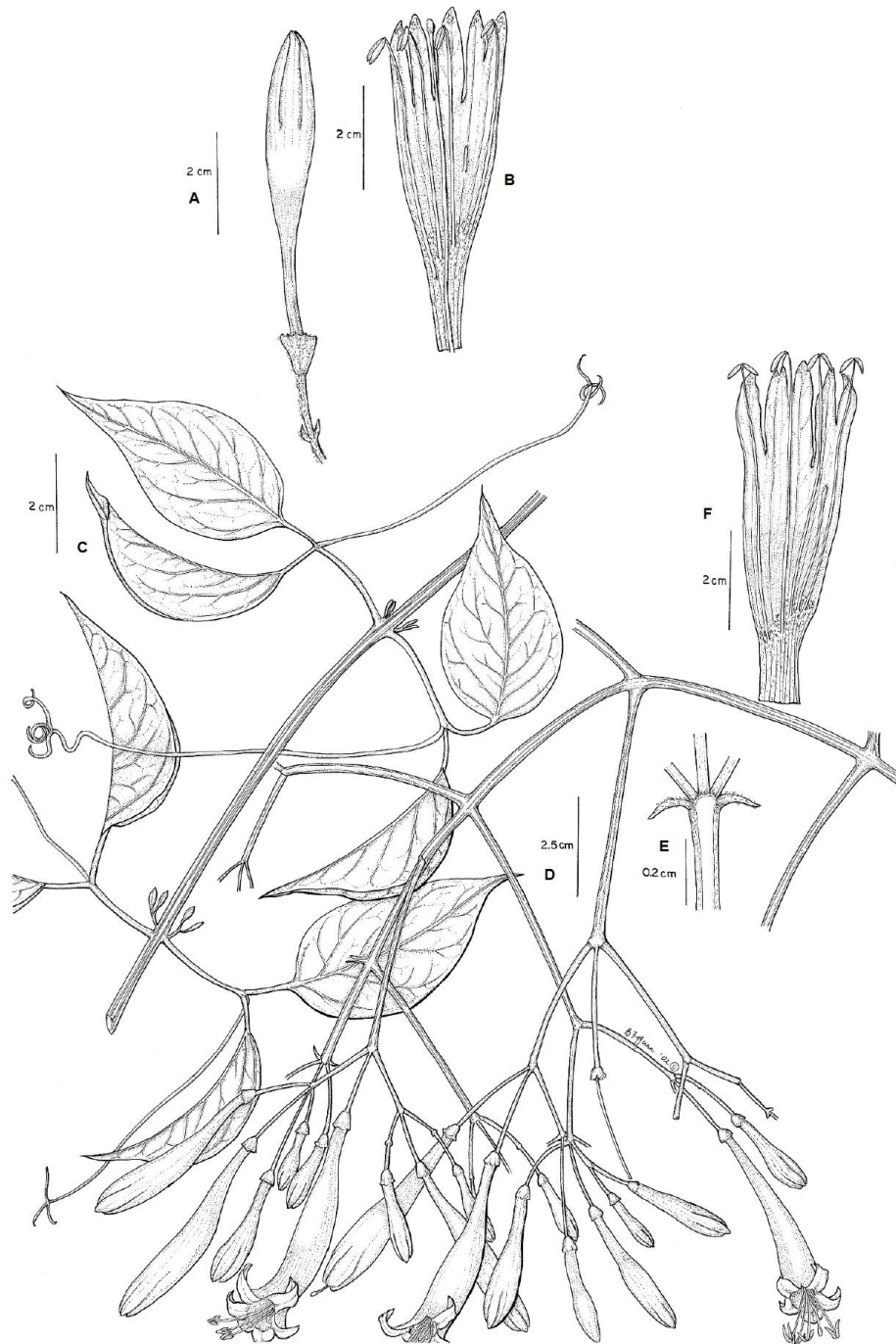


Figura 4: Desenho dos componentes morfológicos de *P. venusta*. A- flor em botão, B- seção longitudinal da corola com androceu, estilo e estigma, C- ramo com folhas, D- inflorescência, E- nó de inflorescência, F- seção longitudinal da corola com androceu. Fonte: POOL, 2008.

Na medicina popular brasileira, a mesma é conhecida como Cipó de São João, ou Flor de São João, (POOL, 2008; VELOSO, BITENCOURT, CABRAL *et al.*, 2010) e possui variada aplicação. Das partes aéreas, por exemplo, são preparadas infusões ou decoctos, os quais são utilizados como tônicos ou no tratamento de diarreia, vitiligo, tosses e doenças relacionadas a infecções do sistema respiratório (bronquite, resfriado e gripe) (VELOSO, BITENCOURT, CABRAL *et al.*, 2010). Além disso, a infusão preparada da casca e raízes é amplamente direcionada ao tratamento de erisipela, icterícia, hiperbilirrubinemia e infecções do útero e vagina (SENS, 2002).

Adicionalmente, os extratos brutos de várias partes de *P. venusta* já foram alvos de estudos biológicos. Atividade anti-inflamatória e efeitos antinoceptivos (redução da capacidade de sentir dor, ou, analgesia) do extrato hidroetanólico das flores de *P. venusta* foram observados em ratos (VELOSO, CABRAL, BITENCOURT *et al.* 2012), além de ser descrito por ROY, ANDEKAR, KUMAR *et al.* (2012) à capacidade de cicatrização de feridas e atividade antimicrobiana moderada contra diversos micro-organismos do extrato metanólico das flores.

Em contrapartida, outros trabalhos, como o de FERNANDES, RIBEIRO, RUFINO *et al.* (2011), relataram que o extrato etanólico das folhas de *P. venusta* não exibe atividade antimicrobiana frente à diversos microorganismos (*Bacillus cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*), em todas concentrações testadas (72,6 e 145,2 mg/mL). No mesmo estudo, descreve-se também a ausência de efeitos sobre o crescimento e diferenciação celular de *H. samuelpeessoai* e de efeitos clastogênico e/ou aneugênico (anomalias cromossômicas) em camundongos (*Swiss albinus*) após tratamentos via gavagem (técnica de alimentação forçada) (técnica de alimentação forçada) (1.000-2.000mg/kg) (FERNANDES, RIBEIRO, RUFINO *et al.*, 2011).

Outros trabalhos como de FERNANDES, RIBEIRO, RUFINO *et al.* (2011), em que se confirmou a inexistência de potencial carcinogênico e mutagênico do extrato

hidroalcoólico das folhas, e de MAGALHÃES, SILVA, CAMPOS *et al.* (2008), o qual, por sua vez, não verificou a presença de atividade genotóxica dos extratos etanólicos das flores, colaboram para a segurança do uso dos extratos de *P. venusta*.

Na literatura já estão descritos alguns estudos fitoquímicos mais detalhados para as flores e raízes desta representante da família Bignoniaceae. Investigações prévias das flores e raízes resultaram no isolamento das substâncias: hentriacontano, mesoinositol (figura 5), β -sitosterol e 7-O- β -D-glicopiranosil-acacetina (CARDOZO, PARREIRA, ALVES *et al.*, 2009; FERREIRA, ALVARE, HOUGHTON *et al.*, 2000; KRISHNA, SHARMA, PAREEK *et al.*, 2002). Adicionalmente da flor foram identificados os compostos: ácido linoleico, ácido oleico, ácido propanoico, estigmasterol, diazoprogesterona, arabipiranosose e acetofenona (figura 5) (ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011). Das raízes, houve isolamento de compostos como a alantoína (figura 5), β -sitosterol, 3- β -O- β -D-glicopiranosilsitosterol e hesperidina (FERREIRA, ALVARE, HOUGHTON *et al.*, 2000).

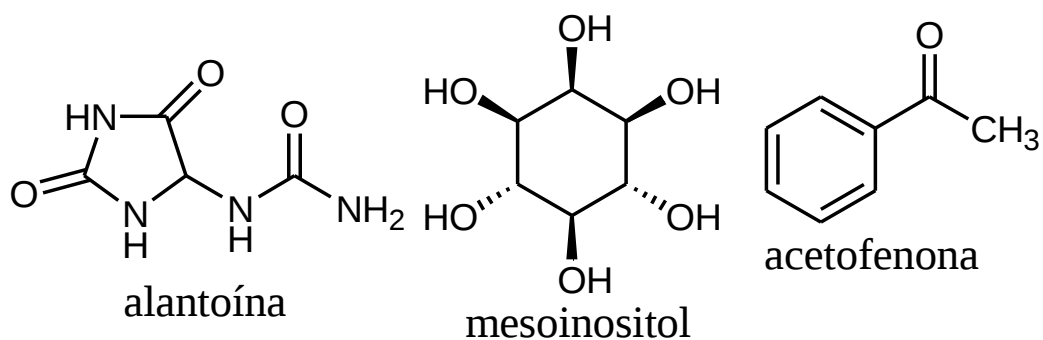


Figura 5: Estrutura de algumas substâncias identificadas em *P. venusta*.

De outras partes aéreas foram isolados o acetato de lupeol, estigmasterol, β -sitosterol, betulina, β -amirina, lupeol e ácido oleanólico (KRISHNA, SHARMA, PAREEK *et al.*, 2002). Há relatos também de carotenoides (HARBONE, 1967) e rutina (figura 6) (BLATT, SANTOS E SALATINO, 1998) presentes nas folhas. Além disso, das cascas, foram isolados lupeol (figura 6), ácido betulínico e cloridrato de colina (DINDA, BHATTACHARYA, ARIMA *et al.*, 2002).

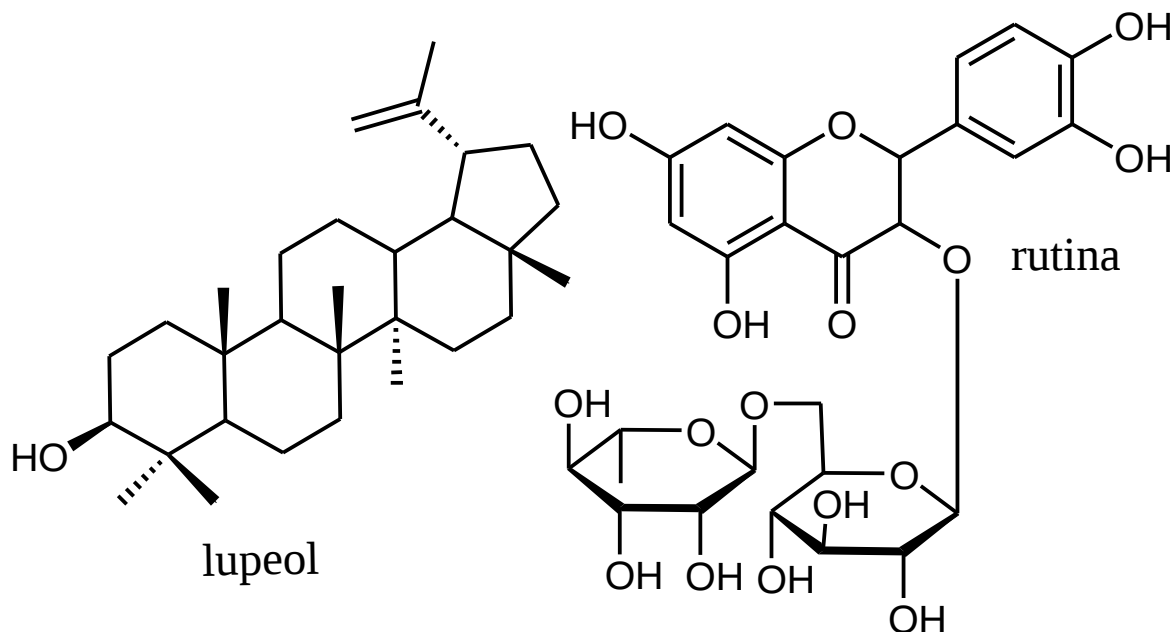


Figura 6: Estruturas de algumas substâncias isoladas de *P. venusta*.

Além disso, estudos sugerem que *P. venusta* é uma fonte natural de antioxidantes, visto que vários compostos isolados tem essa atividade, tanto provenientes das flores (ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011) quanto das raízes (FERREIRA, ALVARE, HOUGHTON *et al.*, 2000), no entanto, as folhas são descritas possuindo um teor total baixo de flavonoides e fenóis, que são os metabólitos em parte responsáveis por tal atividade (SANTOS e BLATT, 1998).

De acordo com a literatura, *P. venusta* apresenta-se como uma fonte de fitocompostos e possui um grande potencial em termos de atividade biológica (CHOUDHURY, DATTA, TALUKDAR *et al.* 2011; ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011; ROY, ANDEKAR, KUMAR *et al.*, 2012). Contudo não há nenhum estudo fitoquímico publicado com detalhes sobre as folhas dessa espécie, sendo por consequência, um potencial para descoberta de moléculas novas e/ou bioativas.

1.3. Busca por Atividades Biológicas

O estudo de PN's, de forma geral, tem por vezes como finalidade o isolamento e a identificação de componentes químicos no material de estudo (extrato bruto e suas frações), e a busca por um potencial biológico para os mesmos. Este trabalho encontra-se integrado na rede do Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – SISBIOTA Brasil (Edital MCT/CNPq/MMA/MEC/CAPES/FNDCT - Ação Transversal/FAPs Nº 47/2010), a qual é composta por: Universidade Federal do Espírito Santo (*Campus* Goiabeiras), Universidade Federal de São Carlos (*Campus* São Carlos), Universidade Federal de Goiás (Regional Catalão) e Universidade Federal de São Paulo (*Campus* Diadema). O objetivo caracteriza-se pelo estudo de espécies advindas da Mata Atlântica e do Cerrado brasileiro. Como previsto pelo projeto em questão, *P. venusta* teve avaliado seu potencial frente à inibição das catepsinas K e V.

A literatura reporta diversas utilizações de *P. venusta* na medicina popular, além de ressaltar o potencial como fonte de agentes antioxidantes. Portanto, de forma complementar e objetivando verificar essas afirmações, realizou-se experimentos de viabilidade celular, no intuito de avaliar a segurança quanto ao uso do extrato bruto e frações dessa espécie; testes fitoquímicos, visando analisar sua composição em termo de classes de metabólitos presentes; e também testes relacionados à atividade antioxidante.

1.3.1. Atividades antioxidantes e afins

O oxigênio é essencial para vários processos biológicos envolvendo transferência de elétrons, como a produção de energia em seres heterótrofos (ciclo de Krebs) (ALVES, DAVID, M, DAVID, P, 2010; BAE, SEO, KWON *et al.*, 1999; ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011). Durante esses eventos, são gerados radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO's), sendo que, naturalmente o organismo consegue neutralizá-los (ALVES, DAVID, M., DAVID, P., 2010). Entretanto, o desequilíbrio entre a produção e a neutralização dos ERO's pode induzir à danos nas biomoléculas, que é, conhecido como *stress* oxidativo (FEKI,

KOUBA, DAMAK, 2014; HAZRA, BISWAS E MANDAL, 2008; JIMENEZ E CALIXTO, 2005; ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011).

Várias doenças, como câncer, diabetes mellitus, problemas cardiovasculares, processos degenerativos, artroses e inflamações em geral, estão associadas a esse desequilíbrio de radicais livres e ERO's (DI MATTEO e ESPOSITO, 2003; ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011; GEBER, RUAAULT, HERCBERG *et al.*, 2002; SERAFINI, BELLOCCO, WOLK *et al.*, 2002). Além disso, durante processos inflamatórios, o organismo pode gerar um *stress* oxidativo para a sua própria defesa, sendo, nesse caso, conhecido como explosão respiratória (ou *burst* respiratório) (BOGLIOLO, 2006; BONARCOSI, RADDI, FONSECA *et al.*, 2012).

Os fagócitos (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos), quando ativados por um mediador pró-inflamatório, são a maior fonte conhecida de ERO's. Inicialmente, uma NADPH oxidase catalisa a formação de uma grande quantidade de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e essa espécie reativa é enzimaticamente usada na produção de outras ERO's, como ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), os quais eliminam os patógenos e as células adjacentes (BOGLIOLO, 2006; BONARCOSI, RADDI, FONSECA *et al.*, 2012; CONNER e GRISHAM, 1996; MANDAL, MISRA e GHOSAL, 2009). Apesar de ser resultado do processo de defesa do organismo, a inflamação pode resultar em danos sérios aos tecidos e, como prevenção ao acúmulo de tais espécies nocivas (ERO's) e no intuito de diminuir ou mesmo retardar os danos, indica-se o uso de suplementos anti-inflamatórios e antioxidantes (BOGLIOLO, 2006; CONNER e GRISHAM, 1996).

Muitos desses suplementos sintéticos são altamente efetivos, porém possuem certos efeitos colaterais indesejados (ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.*, 2011). Alguns dos antioxidantes mais comuns são: o propil galato, dodecil galato, octilgalato, terc-butil-hidroquinona, butil-hidroxil-anisol, butil-hidroxil-tolueno (figura 7). Os antioxidantes sintéticos podem causar efeitos colaterais como hipertrofia do fígado, tireoide, glândulas suprarrenais e pulmões, câncer, indução de anormalidades cromossômicas e espermáticas, inibição de agregação plaquetária, interferência na síntese de prostaglandinas e resposta imunológica (GULCIN, BURSAL, SEHITOGLU *et al.*, 2010; PAL, GIRHEPUNKE, SHIRIVASTAV *et al.* 2011; SOOD e VENKATESH, 2011).

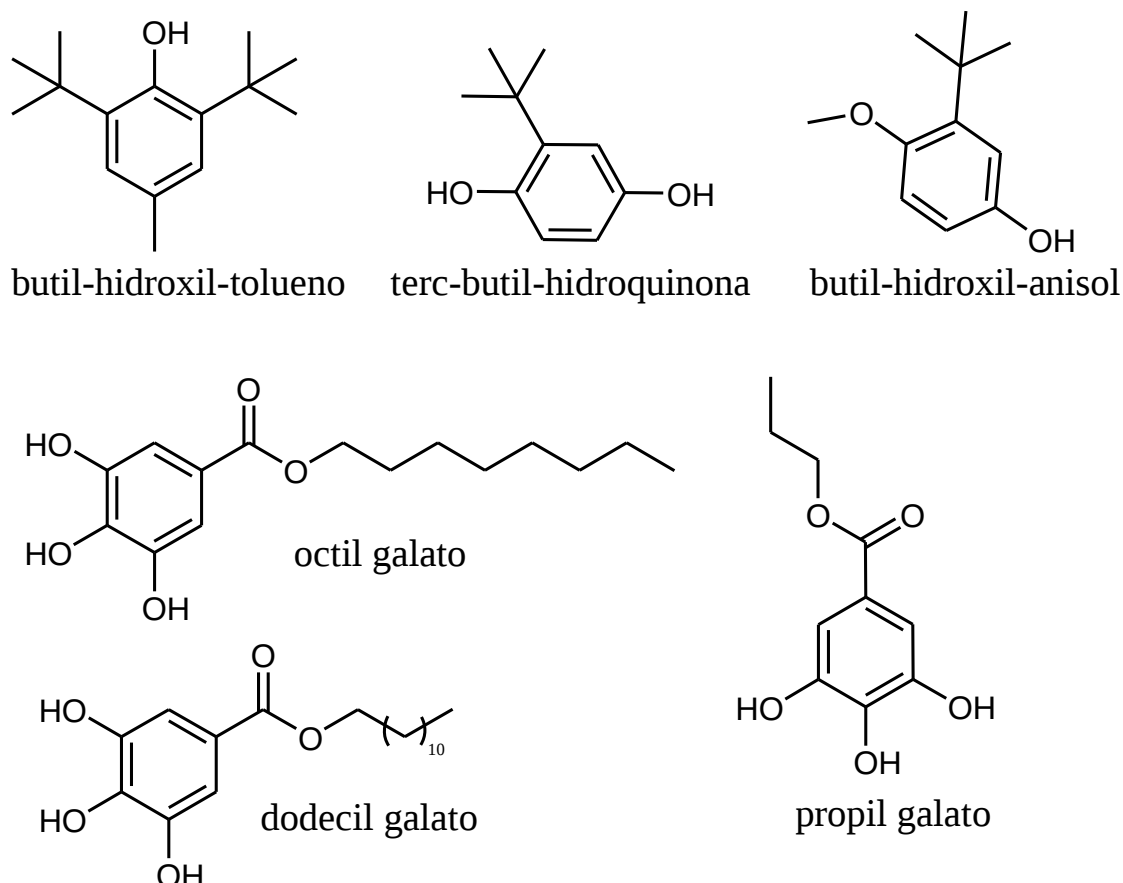


Figura 7: Estruturas de alguns antioxidante sintéticos.

O potencial das plantas utilizadas na medicina popular, como fontes naturais de antioxidantes e produção de efeitos anti-inflamatórios, tem gerado grande interesse por estas plantas, sendo descritos na literatura diversos trabalhos que confirmam essas atividades em extratos de plantas, como o de HAZRA, BISWAS e MANDAL (2008) que descrevem a atividade antioxidante do extrato metanólico de *Spondias pinnata*; o de ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.* (2011) que verificaram atividade antioxidante nos extratos metanólicos das flores e raízes de *P. venusta*; o de KIM, PARK, NAM *et al.* 2005, atividades anti-inflamatória do extrato metanólico das raízes de *Morinda officinalis*; e de JANG, JEONG, CHO *et al.* (2014), atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *Psidium guajava*.

Neste trabalho, o extrato bruto e frações (hexano e acetato de etila), das folhas de *P. venusta* tiveram seu potencial como antioxidantes avaliado por duas metodologias: inibição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). De maneira adicional e devido ao fato da segurança quanto ao uso desses extratos ser um fator

muito relevante, a viabilidade celular foi testada frente a uma linhagem celular de macrófagos murinos (RAW 264.7).

1.3.2. Catepsinas

As enzimas são proteínas de extrema importância para a manutenção da vida. Esses componentes biológicos estão envolvidos em processos como a síntese de biomacromoléculas (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos), resposta imunitária, metabolismo e catabolismo, e diversos processos fundamentais no organismo (COPELAND, 2005).

Como biocatalisadores, atuam formando um complexo enzima-substrato (E^*S) através de interações intermoleculares e sem causar modificação química. O complexo formado acelera ou possibilita a transformação do substrato (S) em produto (P), por meio de um estado de transição $(E^*S)^\ddagger$ com energia de ativação mais baixa (figura 8). O complexo formado passa rapidamente a um estado enzima-produto (E^*P) que se dissocia liberando a enzima (E) e o produto (P) no meio (COPELAND, 2005).



Figura 8: Representação esquemática do processo de catálise enzimática.

A atividade catalítica dessas espécies químicas, pode ser interrompida por substâncias químicas (inibidores) capazes de se ligar reversível ou irreversivelmente a elas. Os inibidores ditos reversíveis se ligam à enzima através de ligações não covalentes (ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals), não causam modificações estruturais, sendo possível recuperar a atividade enzimática pela retirada desse inibidor, já os inibidores não reversíveis, se ligam através de ligações covalentes inativando as enzimas.

Visto que essas proteínas estão envolvidas nos mais diversos processos biológicos, desempenhando funções altamente específicas, estas se tornaram alvos

terapêuticos muito atrativos para a indústria farmacêutica (MARQUES, E., 2011; SEVERINO, 2008). A inibição seletiva de enzimas críticas, tanto de micro-organismos infecciosos como de enzimas humanas que se encontrem com atividade anormal, fazem parte da intervenção terapêutica em muitas doenças. Por exemplo, no ano de 2005, mais da metade das substâncias em uso clínico pertenciam à classe dos inibidores enzimáticos (COPELAND, 2005).

Dentre as diversas famílias de enzimas conhecidas, tem-se as cisteíno peptidases lisossomais, uma família importante semelhante à papaína (*papain-like*) (BARRETT, KEMBHAVI, BROW *et al.*, 1982). Essas proteínas são amplamente conhecidas por sua ação primária de degradação aleatória de proteínas nos lisossomos e estão presentes em diversos organismos, incluindo plantas, fungos, bactérias e mamíferos (GALVÃO, 2013).

O mecanismo proteolítico das catepsinas (figura 9) (de quebra das ligações peptídicas) pode ser resumido em algumas etapas: Na primeira, a enzima na sua forma ativa (nucleófilo tiol ionizado) ataca a carbonila da ligação peptídica, formando um intermediário tetraédrico, em sequência, o par de elétrons do oxigênio volta a formar a carbonila, expulsando o grupo amino-terminal (ou N-terminal). A enzima acilada é posteriormente recuperada pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água, a carbonila da ligação peptídica inicial, com posterior desacilação da enzima (LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002; SEVERINO, 2008; FRICKER, 2010; SILVA, J., 2011;).

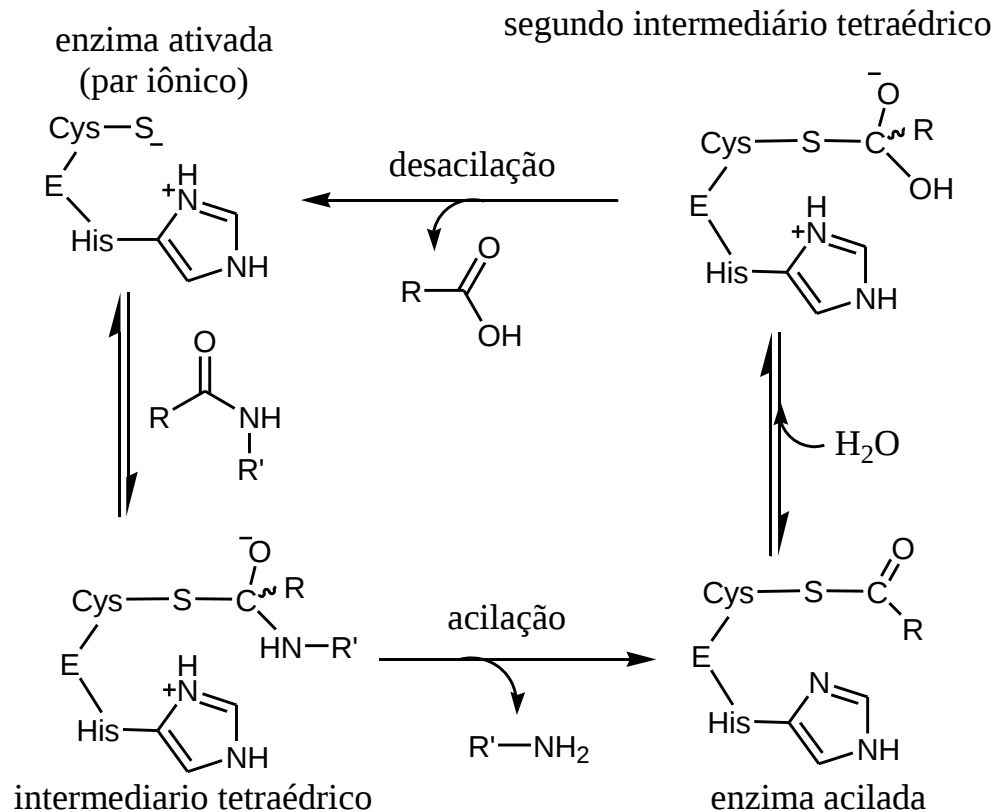


Figura 9: Mecanismo proteolítico das catepsinas. Onde “E” representa a estrutura da enzima com exceção dos resíduos terminais cisteína (Cys) e histidina (His) (LECAILLE, KALETA e BRÖMME, 2002).

Quando presentes nos mamíferos, as cisteínas recebem o nome de catepsinas e são classificadas como aspartil endopeptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G) e cisteíno peptidases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X), estando presente em humanos somente esse último grupo (MARQUES, E., 2011; SEVERINO, 2008). Estudos provaram que estas enzimas não estão presentes exclusivamente nos lisossomos e desempenham outros papéis ligados à sua localização tecidual, além da degradação de proteínas (SEVERINO, 2008). Dessa forma, por estar relacionada à diversificados processos patológicos, essa família de enzimas tornou-se alvo terapêutico de grande interesse (KUESTER, LIPPERT, ROESSNER *et al.*, 2008).

Dentre as duas enzimas estudadas neste trabalho, tem-se a catepsina K a qual é encontrada principalmente nos osteoclastos - células do tecido ósseo, sendo responsável pela degradação de colágeno no processo de remodelamento e estando associada ao desenvolvimento de osteoporose (COSTA, CUSANO, SILVA *et al.*, 2011; SUNA, 2013).

Por sua vez, a catepsina V está correlacionada ao desenvolvimento de tumores de cólon, sendo marcador biológico para diagnóstico desse tumor. Também está presente especificamente no timo, testículos e epitélio corneano (MARQUES, E., 2011; SANTAMARIA, VELASCO, CAZORLA *et al.*, 1998).

Neste trabalho, foram realizados testes de inibição enzimáticos para as catepsinas K e V.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Realizar o estudo químico e biológico do extrato bruto e frações, obtidas da partição líquido-líquido do extrato bruto, das folhas de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae).

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a análise fitoquímica preliminar do extrato bruto e frações, das folhas de *P. venusta*;
- Estimar o teor de flavonoides no extrato bruto;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações, frente às metodologias de inibição dos radicais DPPH e ABTS;
- Avaliar a segurança do uso dos extratos de *P. venusta* frente à linhagens de macrófagos murinos (RAW 264.7) (ensaio de imunotoxicidade);
- Avaliar o potencial de inibição do extrato bruto frente às catepsinas K e V;
- Estudar quimicamente as frações do extrato bruto das folhas de *Pyrostegia venusta*;

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Solventes

- Cromatografia em coluna (CC): solventes comerciais acetato de etila, hexano, diclorometano e metanol;
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): água ultra pura, metanol e isopropanol (Panreac);
- Ressonância magnética nuclear: CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);
- Demais técnicas: solventes grau *p.a.*.

3.1.2. Fases estacionárias

- Cromatografia em coluna (CC): sílica gel 60 (70-230 mesh) e Sephadex LH-20;
- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): coluna C-18 Phenomenex (5 μm , 4,5 x 250 mm, analítica) e coluna XDB C-18 Eclipse (5 μm , 9,4 x 250 mm, semi-preparativa).

3.1.3. Reagentes

- Ensaios enzimáticos de inibição de catepsinas: substrato Z-FR-MCA (DTT Sigma Aldrich), acetato de sódio trihidratado (J. T. Baker), EDTA (J. T. Baker), inibidor irreversível específico de cisteína peptidase E-64 e DMSO;
- Testes de atividade antioxidante: DPPH, trolox, ABTS e persulfato de potássio (SIGMA);
- Análise fitoquímica preliminar e quantificação de flavonoides: KOH, HCl, Na_2CO_3 , HCCl_3 , AcOAc, H_2SO_4 , NH_4OH , AlCl_3 , HOAc (glacial), piridina, Zn metálico em pó, solução de gelatina (2,5% (m/v)) e cloreto

de sódio (10% (m/v)) (Quibasa), reagente de Dragendorff, rutina (Sigma Aldrich).

3.1.4. Viabilidade celular

- Células de macrófagos murinos (RAW 264.7) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro;
- Meio *DMEM* completo, soro fetal bovino (SFB) e tampão fosfato-salino (*PBS-phosphate buffered saline*) (Sigma Aldrich);
- Penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich);
- MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol brometo] (Sigma Aldrich);
- Fármacos: ácido acetilsalicílico (AAS), indometacina, betametasona e piroxicam (Sigma Aldrich).

3.2. Equipamentos

3.2.1. CLAE

Utilizou-se o equipamento da marca Agilent, modelo: G1311C-1260, composto de bomba quaternária e detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), *software* Agilent OpenLAB Control Panel versão A.01.04 (1.3.18.46). As separações cromatográficas semi-preparativas foram realizadas após obtenção de perfil cromatográfico no modo analítico.

3.2.2. Técnicas espectroscópicas

Os ensaios enzimáticos foram realizados em fluorímetro com leitor de placa com 96 poços, Corporation – Spectra, modelo MAX GEMINI XS (DQ-UFSCar).

Os ensaios de viabilidade celular foram analisados em leitor de placa ELISA da BioClin, modelo BIOLISA reader microplate.

O procedimento de quantificação de flavonoides e os ensaios antioxidantes (DPPH e ABTS) foram realizados em espectrofotômetro, modelo SP 2000, Bel Photonics® 2000 UV, utilizando cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm.

3.2.3. RMN

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos na UFES (*campus* Goiabeiras) utilizando espectrômetro Varian 400 MHz (DQUI), sonda 5 mm Broadband, com deslocamentos químicos relatados em ppm, sob supervisão do Prof. Dr. Alvaro Cunha Neto.

3.2.4. CG-IE-EM

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo GCMS_QP5000, equipado com coluna apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm), ionização via impacto de elétrons (70 eV), *software* GCMS Solution versão 1.21. As condições operacionais de análises foram: pressão interna da coluna de 100 kPa (4 min.), 4,8 kPa/min. até 189, razão de *split* de 1:18; fluxo de gás na coluna de 1,5 mL/min.; temperatura no injetor: 150 °C; temperatura no detector: 250 °C; modo de análise positivo; programação da coluna: 70 °C (4 min.), 10°C/min. até 250 °C.

3.3. Coleta do material vegetal

Cerca de três quilos de folhas de *P. venusta* foram coletados em Altinópolis-SP, em agosto de 2012, pelo Prof. Dr. Warley de Souza Borges. As folhas foram inicialmente secas ao sol e, de forma posterior, levadas à estufa do herbário (VIES) do Departamento de Biologia – UFES. A identificação da espécie e confecção da exsicata, depositada no herbário VIES sob o número 32837, foi realizada pela Prof. Dr. Luciana Diaz Thomas e o aluno de graduação Weverson Cavalcante.

3.4. Preparo do extrato e frações

As folhas secas (3,105 kg) foram trituradas e direcionadas para maceração em etanol (96% v/v), com repouso de 72h. Após filtração, o sólido resultante foi novamente macerado com o mesmo solvente e repetiu-se o procedimento por três vezes com etanol, e outras três vezes, utilizando acetato de etila. Os volumes dos seis extratos foram agrupados e concentrados utilizando-se um evaporador rotatório (213,3 g). O material foi ressuspensionado em MeOH:Água (1:3) (v/v) e particionado com hexano e acetato de etila. As frações resultantes da partição líquido-líquido foram então concentradas com auxílio de um evaporador rotatório, sendo que a fração hidroalcóolica (W35FHA) foi armazenada.

A fração acetato (W35FA) resultou em 102,5 g e a fração hexano (W35FH) resultou em 89,5 g. Parte do extrato bruto foi reservada (7 g) para realização da análises químicas e biológicas.

3.5. Análise fitoquímica preliminar

Todas as análises fitoquímicas foram realizadas seguindo metodologias descritas por COSTA (1982, 1986) e WAGNER (1984).

Inicialmente, foram preparadas soluções etanólicas e clorofórmicas de cada uma das amostras: extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.

Sob orientação da Prof. Dra. Claudia M. Jamal e auxílio de seu orientando João Victor D. Gomes, foram realizados os seguintes testes para cada amostra:

3.5.1. Alcaloides (teste de Dragendorff)

Um mL de solução etanólica de amostra foi misturado a um mL de HCl (*p.a.*) e, posteriormente, tratado com algumas gotas de reagente de Dragendorff (solução de K(BiI₄) em ácido nítrico diluído). A formação de um precipitado laranja indica a presença de alcaloide.

3.5.2. Esteroides e triterpenoides (teste de Liebermann-Burchard)

Um mL de solução clorofórmica de amostra foi misturado com dois mL de anidrido acético e depois tratado com algumas gotas de H₂SO₄ (*p.a.*). A mudança de

coloração para verde indica a presença de esteroides e, para marrom avermelhado, demonstra triterpenoides.

3.5.3. Taninos (teste da gelatina)

O teste da gelatina foi usado para checar a presença desses metabólitos. Dois mL de solução etanólica de amostra foram misturados com cinco mL de solução de gelatina (2,5% (m/v)) e cloreto de sódio (10% (m/v)). A formação de precipitado indica a presença de taninos.

3.5.4. Saponinas (teste da espuma)

A presença de saponinas foi avaliada pelo teste da espuma. Vinte mL de solução etanólica de amostra foram misturados a 15 mL de água destilada e um mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo a solução final aquecida em bico de Bunsen até a fervura. Dois mL dessa solução foram filtrados e transferidos para uma proveta de 100 mL com tampa, completou-se o volume com 98 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente por cerca de um minuto. A formação de espuma estável e persistente indica a presença de saponinas.

3.5.5. Cumarinas

Em um papel de filtro, aplicou-se uma gota de extrato etanólico de amostra. Após a secagem, o papel foi exposto à luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) para observação de fluorescência e, na sequência, foi gotejada solução 10% de KOH sob a mancha da amostra e, novamente, observou-se sob luz ultravioleta. A fluorescência e o seu aumento, com a adição de KOH, indicam a existência de cumarinas.

3.5.6. Naftoquinonas (reação de Borntraeger)

Um mL de solução clorofórmica de extrato foi misturado com dois mL de solução de NH_4OH (10% (v/v)) e agitado vigorosamente. A formação de um halo vermelho na fase superior revela a presença de naftoquinonas.

3.5.7. Flavonoides

A identificação é composta por dois testes fitoquímicos, cujos resultados são complementares, ou seja, somente a indicação da classe de compostos nos dois testes é o que indica a presença dos compostos na amostra.

- Reação de Shinoda (ou reação de cianidina): 1 mL de solução etanólica de extrato foi misturado com 1 mL de HCl (*p.a.*) e adicionou-se zinco metálico (Mg no caso da reação de cianidina) em pó. Após o fim da reação, observou-se a solução, de forma que: a mudança de cor para vermelho demonstra a presença de flavonol, a mudança para a coloração amarela indica a existência de flavona, a mudança de cor para violeta indica a presença de flavanona e a não formação de cor revela a presença de isoflavona/chalcona.
- Reação com AlCl_3 : em uma cápsula de porcelana, foi adicionado 1 mL de solução etanólica de extrato e algumas gotas de solução metanólica de AlCl_3 . A cápsula foi aquecida até eliminar o solvente. O precipitado foi observado sob luz ultravioleta, sendo que a cor amarela indica à presença de flavona/flavonol/chalcona, a cor violeta indica chalcona e a ausência de cor indica flavanona.

3.6. Estimativa do teor de flavonoides no extrato bruto

A quantidade de flavonoides no extrato bruto de *P. venusta* foi mensurada sob a forma de equivalentes de rutina, utilizando metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira (1988) e por MARQUES, G., MONTEIRO, LEÃO *et al.* (2012), também sob orientação da Prof. Dra. Claudia M. Jamal.

3.6.1. Curva de calibração

Foram solubilizados 25,0 mg de rutina em metanol e a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume, de modo a obter uma concentração final de 0,5 mg/mL. Desta solução, foram retiradas 5 alíquotas (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL) e colocadas, separadamente, em balões volumétricos de 25,0 mL. Cada um desses volumes foi completado para 2,0 mL com metanol e,

em seguida, foram acrescentados, em cada balão volumétrico, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina e água (20:80 (v/v)) e 2,5 mL de solução a 6,5% (m/v) de cloreto de alumínio em metanol. Posteriormente, completaram-se os volumes de cada um para 25,0 mL com água destilada. Decorridos 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se para o controle negativo todos os reagentes anteriores (exceto rutina e cloreto de alumínio).

3.6.2. Quantificação da amostra

A amostra vegetal (25,0 mg) foi solubilizada em 15 mL de metanol, posteriormente foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume. Dessa solução, foram preparadas triplicatas da seguinte maneira: retirou-se uma alíquota de 1000,0 µL que foi vertida em um balão de 25,0 mL, completando-se o volume para 2,0 mL com metanol. Na sequência, foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina e água (20:80 (v/v)), e 2,5 mL de solução a 6,5% (m/v) de cloreto de alumínio em metanol. Completou-se o volume para 25,0 mL com água destilada. Após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando-se como padrão negativo todos os reagentes anteriores (exceto rutina e cloreto de alumínio).

3.7. Atividade antioxidante

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo R. Kitagawa e auxílio de seu orientando Augusto Borges.

3.7.1. Atividade antioxidante: inibição do radical DPPH

A atividade de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada utilizando metodologia descrita por Rufino *et al.* (RUFINO, ALVES, BRITO *et al.*, 2007a). Cada uma das amostras (extrato bruto, frações acetato de etila e hexano) foi solubilizada em EtOH e preparou-se, por diluição seriada, 4 mL de soluções nas concentrações de 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,375 µg/mL para cada amostra.

Em duplicata, um mililitro de cada diluição de amostra foi misturado com 2 mL de solução 0,0004% (m/v) de DPPH em etanol (concentração final 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL). Para o controle negativo (Neg.) 1 mL de cada concentração de amostra foi misturado com 2 mL de EtOH, como controle positivo (Cont.) foi utilizado 2 mL de solução 0,0004% (m/v) de DPPH em etanol e como padrão foi utilizado trolox nas mesmas concentrações das amostras. As soluções teste foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 30 min. Decorrido esse tempo, mensurou-se a absorbância (Abs) em $\lambda=512$ nm.

A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) - \text{Abs}_{\text{Neg.}}}{\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Neg.}}} \right] * 100$$

3.7.2. Atividade antioxidante: inibição do radical ABTS

A atividade de captura do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi determinada usando a metodologia descrita por Rufino *et al.* (RUFINO, ALVES, BRITO *et al.*, 2007b).

Como no método anterior, preparou-se, por diluição seriada, as soluções (1 mL) etanólicas nas concentrações de 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,375 µg/mL para cada amostra (extrato bruto, fração acetato de etila e fração hexano).

A solução de radical ABTS (ABTS^{•+}) foi preparada misturando-se uma solução aquosa 7 mmol/L de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) com solução aquosa 140mmol/L de persulfato de potássio e incubando-se a mistura por 16 h, no escuro e a temperatura ambiente. A solução resultante foi então diluída em EtOH até a obtenção da absorbância em aproximadamente 70% (0,7), mensurada em $\lambda=734$ nm.

Em duplicata, 30 µL de cada concentração de diluição de amostra foi misturado com 1 mL de solução de radical ABTS (concentração final 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL), o controle negativo (Neg) foi preparado misturando-se 30 µL de cada concentração de amostra com 1 mL de EtOH e o controle positivo (Cont.) foi preparado misturando 30 µL de EtOH com 1 mL de solução de radical ABTS. Como padrão foi utilizado trolox nas mesmas concentrações dos extratos. A

absorbância foi mensurada em $\lambda=734$ nm, logo após a mistura das amostras com a solução de radical.

A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{inibição} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) - \text{Abs}_{\text{Neg.}}}{\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Neg.}}} \right] * 100$$

3.8. Cultura e viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade foram realizados sob orientação e auxílio do Msc. Gustavo Modesto de Amorim, em colaboração com o Criobanco e Hospital Santa Rita que cederam parte dos recursos e espaço físico laboratorial.

3.8.1. Cultura celular

As células de macrófagos murinos (RAW 264.7) foram incubadas à 37°C, em estufa com atmosfera de CO₂ a 5%, com meio *DMEM* completo e suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 µg/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL).

Os macrófagos murinos são células imunitárias retiradas de camundongos, amplamente utilizadas como modelo em ensaios de inflamação, as quais se fixam na superfície do local onde estão sendo cultivadas, permitindo que o descarte e troca de meio ocorram sem perda de células.

3.8.2. Viabilidade celular por ensaio MTT

As células RAW 264.7 foram distribuídas na quantidade de 2×10^5 células/poço em placa 96 poços (ELISA). Adicionou-se, então, 100 µL de *DMEM* suplementado a cada poço e incubou-se a placa por duas horas (SYAHIDA, ISRAF, PERMANA *et al.*, 2006).

O extrato bruto e as frações acetato de etila e hexano foram solubilizados em DMSO nas concentrações de 10,0; 7,5, 5,0; 2,5 mg/mL (KIM, PARK, NAM *et al.*, 2005) e os fármacos foram solubilizados, em DMSO, nas concentrações: ácido acetil salicílico (25,222, 50,444, 75,666 e 100,888 µg/mL), indometacina (1, 2, 3 e 4 µg/mL), betametasona (0,00039, 0,00981, 0,01962 e 0,03925 µg/mL) e piroxicam

(100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$) (CHIONG, YONG, AHMAD, 2013; MAHMOOD, ZUBERI e ASHFAQ, 2001; VOLLMER, STOCKHAUSEN e ZHANG, 2012).

O extrato bruto e frações foram testados em quadruplicata, enquanto os fármacos foram testados em triplicata. As figuras 10, 11 e 12 apresentam os esquemas de aplicação das amostras nas placas ELISA.

Obs.: os ensaios foram divididos em três etapas (três placas), devido à disponibilidade de células no dia da realização de cada ensaio.

	extrato bruto				fração acetato de etila							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
controle positivo	A											
controle negativo	B											
2500 $\mu\text{g/mL}$	C											
5000 $\mu\text{g/mL}$	D											
7500 $\mu\text{g/mL}$	E											
10000 $\mu\text{g/mL}$	F											
	G											
	H											

Figura 10: Esquema de aplicação do extrato bruto e fração acetato de etila em placa ELISA.

		fração hexano											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
controle positivo	A												
controle negativo	B												
2500 ug/mL	C												
5000 ug/mL	D												
7500 ug/mL	E												
10000 ug/mL	F												
	G												
	H												

Figura 11: Esquema de aplicação da fração hexano em placa ELISA.

		ácido salicílico			indometacina			betametasona			piroxicam		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
controle positivo	A												
controle negativo	B												
concentração 1	C												
concentração 2	D												
concentração 3	E												
concentração 4	F												
	G												
	H												

Figura 12: Esquema de aplicação dos fármacos em placa ELISA.

Após as duas horas de incubação, o meio foi descartado. Adicionou-se 90 μ L de meio *DMEM* suplementado a cada poço e, em sequência, as amostras (fármacos, extratos bruto e frações, nas quatro diferentes concentrações) foram

adicionadas aos poços, em um volume de 10 μL por poço. O controle positivo foi preparado completando-se o volume de meio para 100 μL (adição de 10 μL *DMEM*), sendo o negativo por adição de 10 μL de DMSO. Após a adição de todas as amostras, as placas foram encubadas por 24h.

Em seguida, o meio foi descartado e adicionou-se 15 μL de MTT (5mg/mL em solução de *PBS*) a cada poço, incubando-se novamente por 4 h em estufa de CO_2 . Após a incubação, adicionou-se DMSO (100 μL) para solubilizar os cristais de formazam formados e a absorbância foi mensurada em $\lambda=540$ nm (figura 13) (KIM, PARK, NAM *et al.*, 2005).

O calculo da viabilidade celular foi feito pela fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle positivo}}$$

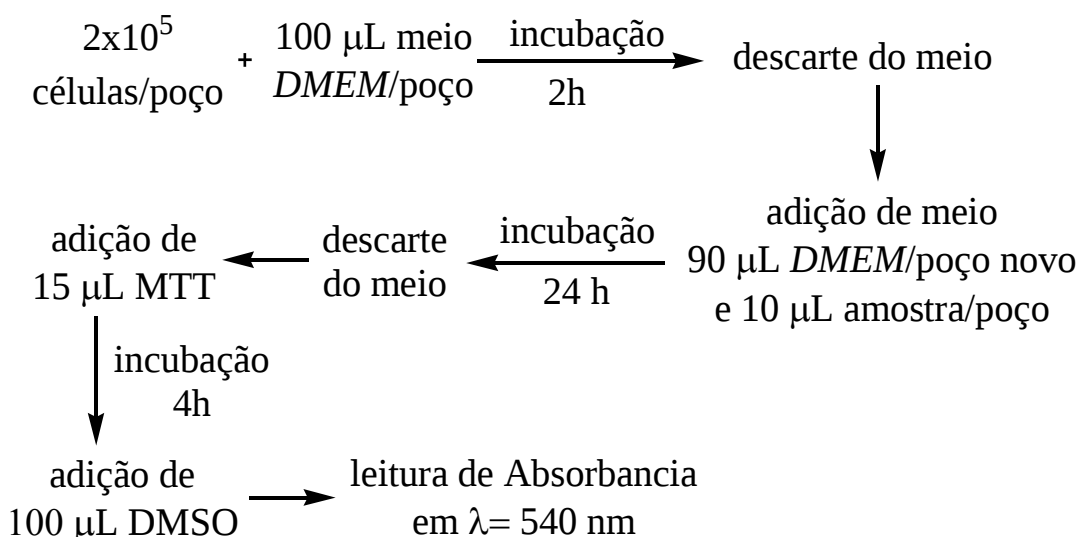


Figura 13: Esquema geral do teste de viabilidade celular.

3.9. Inibição das catepsinas K e V

Os ensaios fluorimétricos foram realizados na UFSCar, segundo a metodologia descrita por SEVERINO (2008), sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

Monitorou-se a hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA em placas ELISA (300 μL /poço), mantidas em compartimento à 27°C, em espectrofluorímetro com comprimento de onda de excitação $\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm e de emissão $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm.

Para os ensaios foi utilizado tampão acetato de sódio 100 mmol/L, com 5 mmol/L de EDTA (pH=5,5) e a concentração estimada das enzimas foi de 3 nmol/L.

As enzimas foram pré-ativadas com DTE 5 mmol/L durante 5 min, em sequência, incubadas por mais 5 minutos com as amostras, dissolvidas em DMSO. Após a incubação, foi adicionado o substrato fluorogênico (Z-FR-MCA) (10 µmol/L), como controle positivo utilizou-se o inibidor irreversível E-64 (10 µmol/L em DMSO), enquanto que o controle negativo foi feito com o próprio solvente. A determinação da atividade das catepsinas foi realizada por meio do monitoramento contínuo da hidrólise do substrato fluorogênico por 5 min.

Foram testadas as concentrações de 50 e 125 µg/mL de extrato bruto. Os resultados são descritos sob a forma de porcentagem de inibição a partir da equação:

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

Sendo V_i a velocidade de reação na presença de inibidor e V_0 a velocidade observada na ausência do inibidor (controle negativo).

3.10. Metodologia CLAE

As técnicas de CLAE, tanto analítica quanto semi-preparativa, foram realizadas utilizando eluição gradiente com os solventes H₂O (ultra pura) e MeOH, empregando o seguinte método: iniciando em H₂O:MeOH 9:1, chegando em 100% de MeOH aos 40 minutos e retornando a proporção inicial aos 46 min, mantendo-a até 50 minutos, utilizando coluna C-18 Phenomenex (5 µm, 4,5 x 250 mm, vazão = 1mL/min modo analítico) e XDB C-18 Eclipse (5 µm, 9,4 x 250 mm, vazão = 4mL/min modo semi-preparativo).

3.11. Fracionamento do extrato bruto

Devido a grande quantidade de massa da fração acetato de etila (102,5 g), iniciou-se o fracionamento através de uma CLV (coluna líquida à vácuo), utilizando gradiente de hexano, acetato de etila e metanol. Após análise por CCD, as amostras foram agrupadas em 12 subfrações (figura 14).

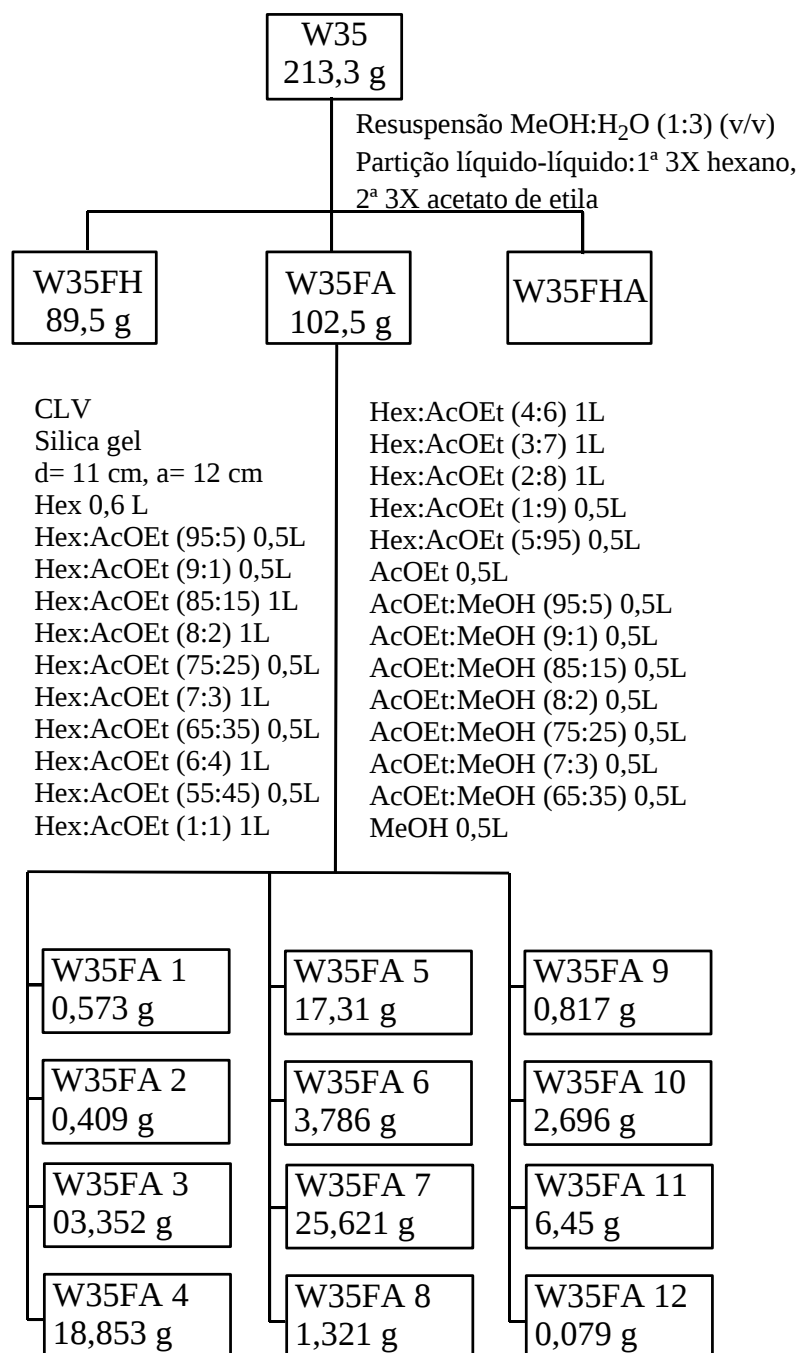
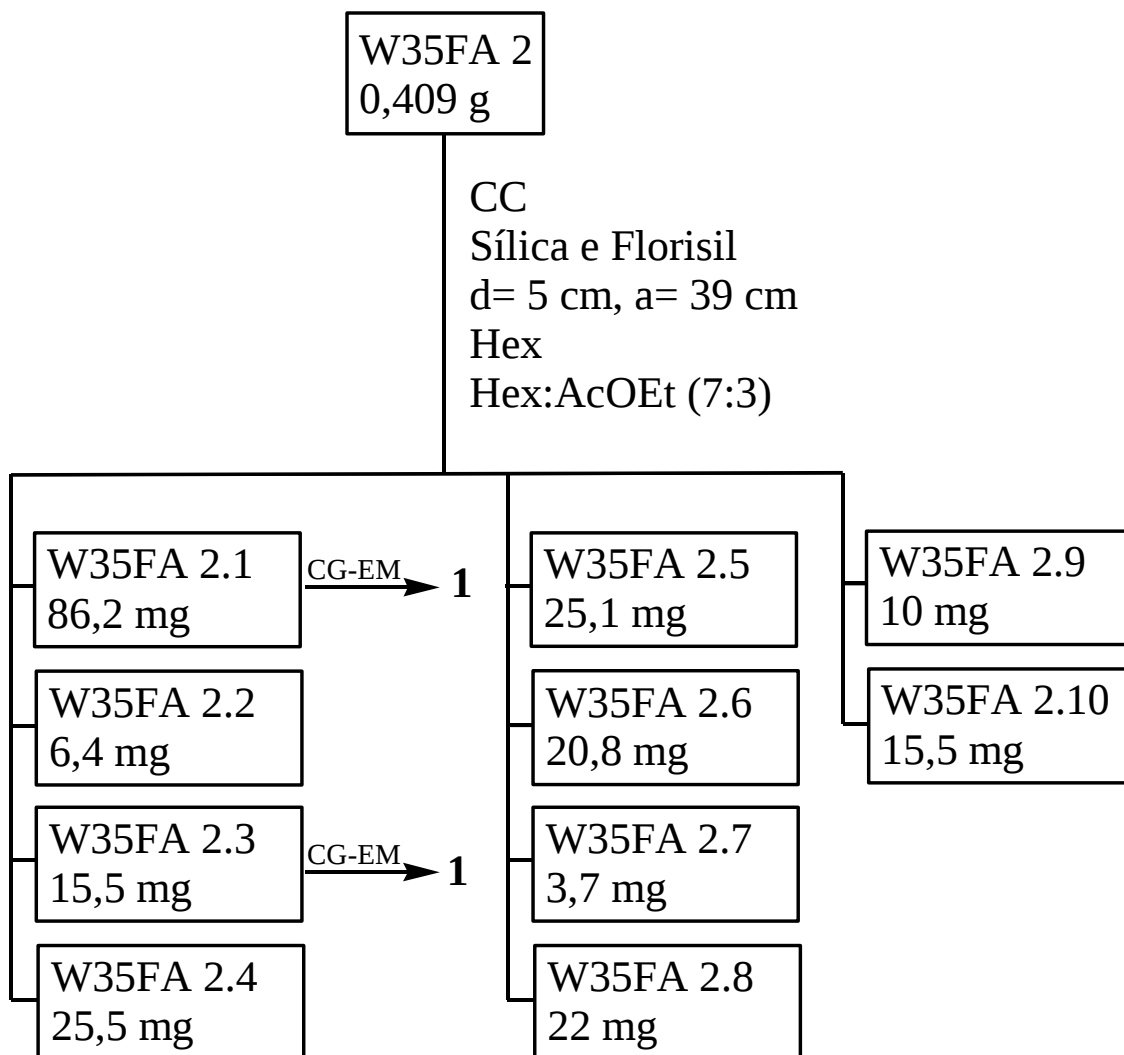


Figura 14: Fracionamento do extrato bruto (W35) da fração acetato de etila (W35FA)

Nota: O Florisil é utilizado para reter por adsorção compostos polares como a clorofila dos extratos.

A fração W35FA 2 foi fracionada através de CC sílica com florisil (d= 5 cm, a= 39 cm), utilizando-se gradiente de hexano (Hex) a Hex:AcOEt (7:3), sendo obtidas, após análise por CCD, dez frações (W35FA 2.1 – 2.10) (figura 15).



Nota: O Florisil é utilizado para reter por adsorção compostos polares como a clorofila, resultando em frações mais limpas.

Figura 15: Fracionamento inicial de W35FA 2.

- A fração W35FA 2.1 foi submetida à CG-EM, identificando-se o composto **1**.
- A fração W35FA 2.3 foi submetida à CG-EM, identificando-se o composto **1**.

A fração W35FA 3 foi submetida a fracionamento por CC com sílica gel (d = 4,5 cm, a = 40 cm) e eluição com Hex:AcOEt:MeOH (6:4:1) (figura 16)

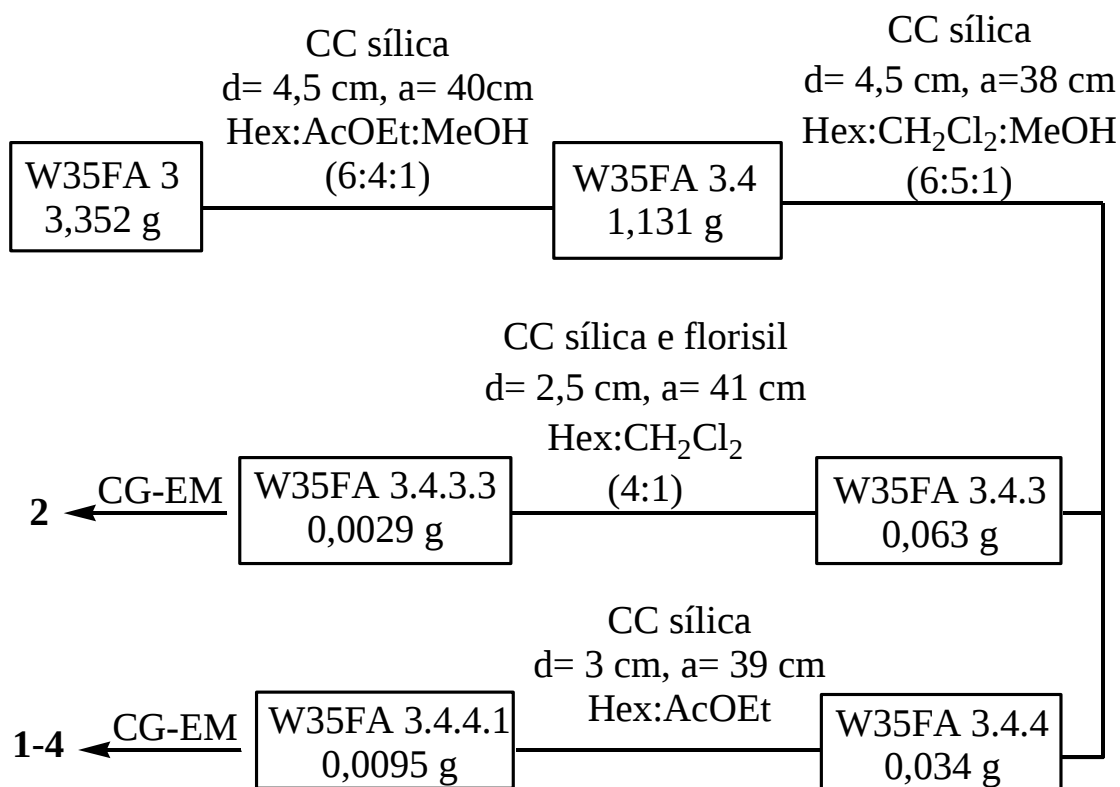


Figura 16: Esquema de fracionamento de W35FA 3.

- A subfração W35FA 3.4 foi submetida a CC com sílica (d = 4,5 cm, a = 38 cm) e Hex:CH₂Cl₂:MeOH (6:5:1);
 - A subfração FA 3.4.3 foi submetida a fracionamento por CC, sílica (d = 2,5 cm, a = 40 cm) e florissil na parte superior (a = 1,0 cm); sendo a subfração FA 3.4.3.3 analisada por CG-EM e identificou-se o composto **2**.
 - A subfração FA 3.4.4 foi fracionada por CCC, sílica (d = 3,0 cm, a = 39 cm), sendo a subfração resultante FA 3.4.4.1 analisada por CG-EM e identificaram-se os compostos **1-4**.

Parte da fração W35FA 4 (0,9393 g) foi submetida a CC de sílica com florissil (d= 3,5 cm, a= 62 cm) eluída em gradiente de Hex:AcOEt (8:2) a (1:1), resultando em sete subfrações.

Parte da fração W35FA 5 (0,9814 g) foi submetida a CC de sílica com florissil (d= 3,5 cm, a= 60 cm) eluída em gradiente de Hex:AcOEt (7:3) a (1:1), resultando em seis subfrações.

A fração W35FA 6 foi fracionada por CC de sílica com florisil (d= 5,5 cm. a= 39 cm) com eluição gradiente de Hex:AcOEt (7:3) a (6:4), resultando em nove subfrações.

Parte da fração W35FA 7 (0,9398 g) foi submetida a CC de sílica com florisil (d=3,5 cm, a= 62 cm) eluída em gradiente de Hex:AcOEt (7:3) a (1:1), resultando em nove subfrações.

A metodologia cromatográfica associada às análises de CG-EM e RMN de ^1H , das subfrações resultantes das amostras W35FA 4 à 7, não levou a identificação de nenhuma substância.

Uma amostra da fração hexano (W35FH) (0,949 g) foi submetida a CC de sílica (d= 5 cm, a= 38,5 cm) e eluída com um gradiente de hexano puro até Hex:AcOEt (1:1), resultando em 12 subfrações. As frações foram então analisada por CG-EM, sendo identificado o composto **1** na fração W35 FH 7 (figura 17).

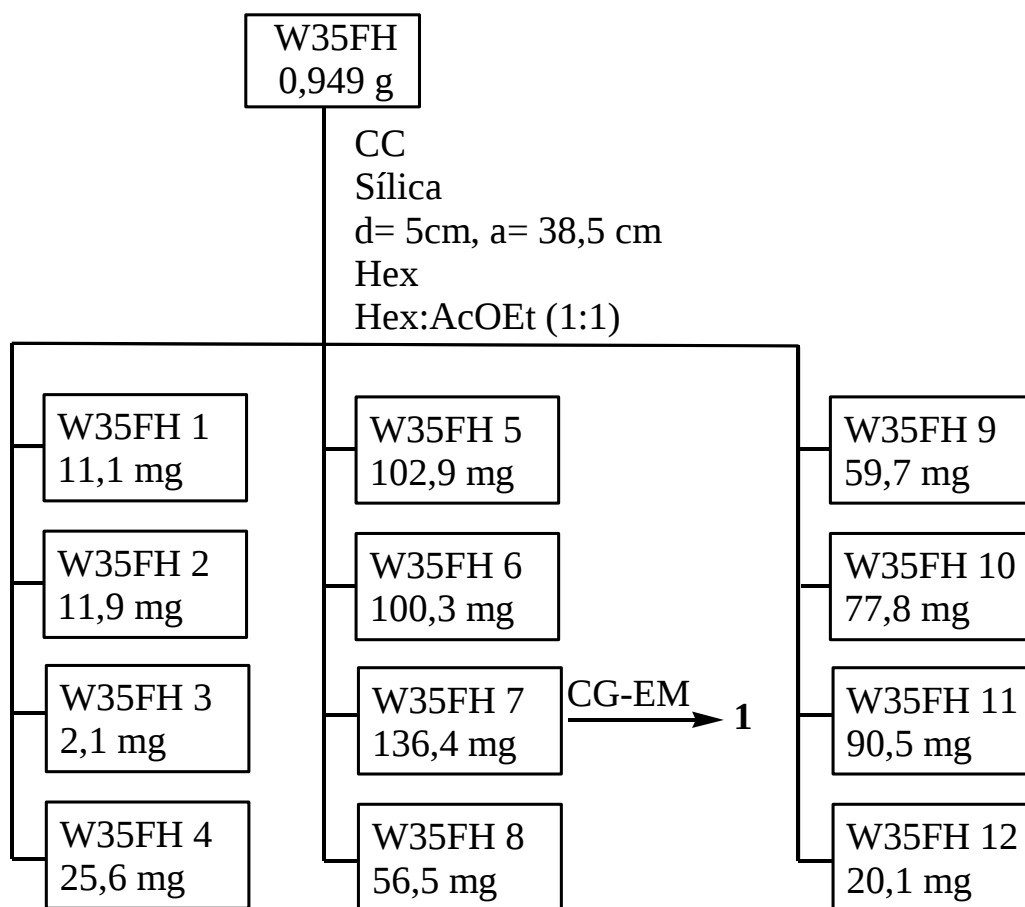


Figura 17: Esquema de fracionamento de W35FH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica preliminar de uma espécie vegetal pode ser feita através dos chamados testes clássicos, que permitem a identificação das classes de metabólitos presentes. Esses testes são descritos normalmente em livros de fitoquímica experimental ou farmacognosia. A utilização de informações fitoquímica é uma ferramenta importante de investigação para entender uma determinada atividade biológica, uso etnofarmacológico, ou avaliar o potencial terapêutico (como fonte de um princípio ativo) de uma planta.

P. venusta já tem várias atividades biológicas e usos na medicina popular descritos na literatura, assim, foram realizados os testes clássicos para verificar as classes de metabólitos presentes no extrato bruto e frações. Os resultados revelaram a presença de esteroides, cumarinas e flavona (tabela 3).

Tabela 3: Testes fitoquímicos das folhas de *P. venusta*.

Teste	Bruto	Hexano	AcOEt
1. Alcaloides			
Teste de Dragendorff	(-) sem precipitado	(-) sem precipitado	(-) sem precipitado
2. Esteroides e Triterpenoides			
Reação de Liebermann-Burchard	(+) para esteroides (cor verde)	(-)	(+) para esteroides (cor verde)
3. Taninos			
teste da gelatina	(-)	(-)	(-)
4. Saponinas			
teste da espuma	(-)	(-)	(-)
5. Cumarinas			
fotoisomerização em meio básico	(+) Azul	(-)	(+) amarelo/esverdeado
6. Naftoquinonas			
desprotonação fenólica	(-)	(-)	(-)
7. Flavonoides			
reação de cianidina (ou shinoda) e reação com $AlCl_3$	(+) Flavona	(-)	(+) Flavona
(+) presença, (-) ausência			

Analisando a tabela 2 é possível verificar que o perfil fitoquímico do extrato bruto e da fração acetato de etila são muito próximos, ou seja, ambos contêm esteroides, flavonoides e cumarinas, enquanto a fração hexano não apresentou quantidade detectáveis de nenhuma das classes de compostos analisados.

A partição líquido-líquido realizada com hexano, devido à baixa polaridade deste, concentra os compostos de características mais lipofílicas, sendo esperado que esta fração apresente esteroides e triterpenoides em sua composição. Porém, a fração hexano não indicou presença de nenhuma das classes analisadas. Isso não significa que estas (principalmente as menos polares) não estejam presentes, mas que, possivelmente, as outras classes de compostos apolares não abrangidos pelos testes, como ácidos e ésteres orgânicos de cadeia longa, podem ter mascarado a presença dos compostos avaliados.

Comparando os resultados obtidos para as flores e raízes de *P. venusta* obtidos por ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.* (2011), nos quais se verificou a presença de alcaloides, taninos, esteroides, saponinas, pode-se observar que estas apresentam uma composição, em termos de classes de compostos, mais diversificada que as folhas.

Na literatura são descritas várias utilizações do “Cipó de São João”, bem como de outras plantas da família das Bignoniaceae, na medicina popular, além de várias atividades biológicas, essas informações podem ser relacionadas com o perfil fitoquímico obtido pelos testes clássicos.

- Alcaloides

Segundo LOBO e LOURENÇO (2007), alcaloides são “produtos naturais que contêm azoto normalmente básico (e daí a designação de alcaloide = semelhante a álcali) e que não são nem aminoácidos, nem nucleótidos, nem cofactores”.

O teste de identificação dessa classe tem como mecanismo proposto a ligação do alcaloide ao $(\text{BiI}_4)^-$ através do nitrogênio formando um precipitado (figura 18) (KATAVIC, 2005; DENNY, ZHCHARIAS, KOHN *et al.*, 2007).

Nas amostras de *P. venusta* não foi identificada a presença de alcaloides.

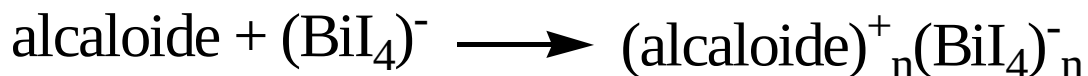


Figura 18: Esquema de interação do bismuto tetraiodo e o alcaloide.

- Esteroides

A reação de identificação dessa classe foi descrita pela primeira vez por Liebermann para a análise de material vegetal (1885). Posteriormente, Burchard aplicou o mesmo teste para análise quantitativa de colesterol (1890), sendo recomendado até hoje pela *FDA* (XIONG, WILSON e PANG, 2007; BURKE, DIAMONDSTONE, VELAPOLDI *et al.*, 1974).

AXIONG, WILSON e PANG (2007) identificaram os produtos da reação de Liebermann-Burchard através de técnicas de RMN, propondo um mecanismo de sulfonação/desaturação em meio ácido, com evolução de gás SO_2 e a formação de insaturações (ligações duplas) (figura 19). À medida que o número de insaturações vai aumentando, paralelamente, ocorrem rearranjos formando estruturas conjugadas ou aromáticas, observando-se a transição de coloração de azul a verde (figuras 19 e 20) (XIONG, WILSON E PANG, 2007; BURKE, DIAMONDSTONE, VELAPOLDI *et al.*, 1974).

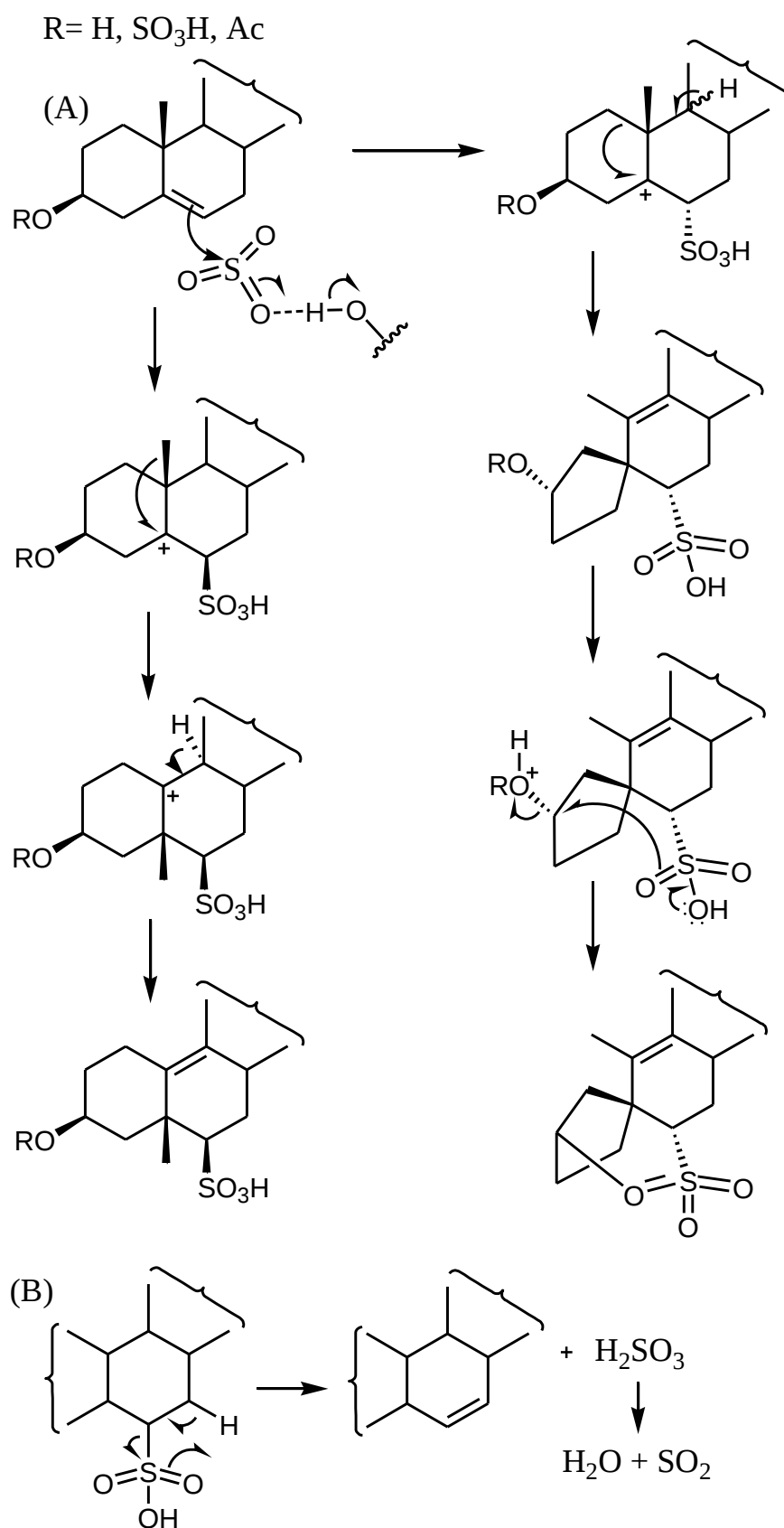


Figura 19: Mecanismo proposto por XIONG, WILSON e PANG (2007). A: sulfonação; B: eliminação de H_2SO_3 com formação de insaturação.

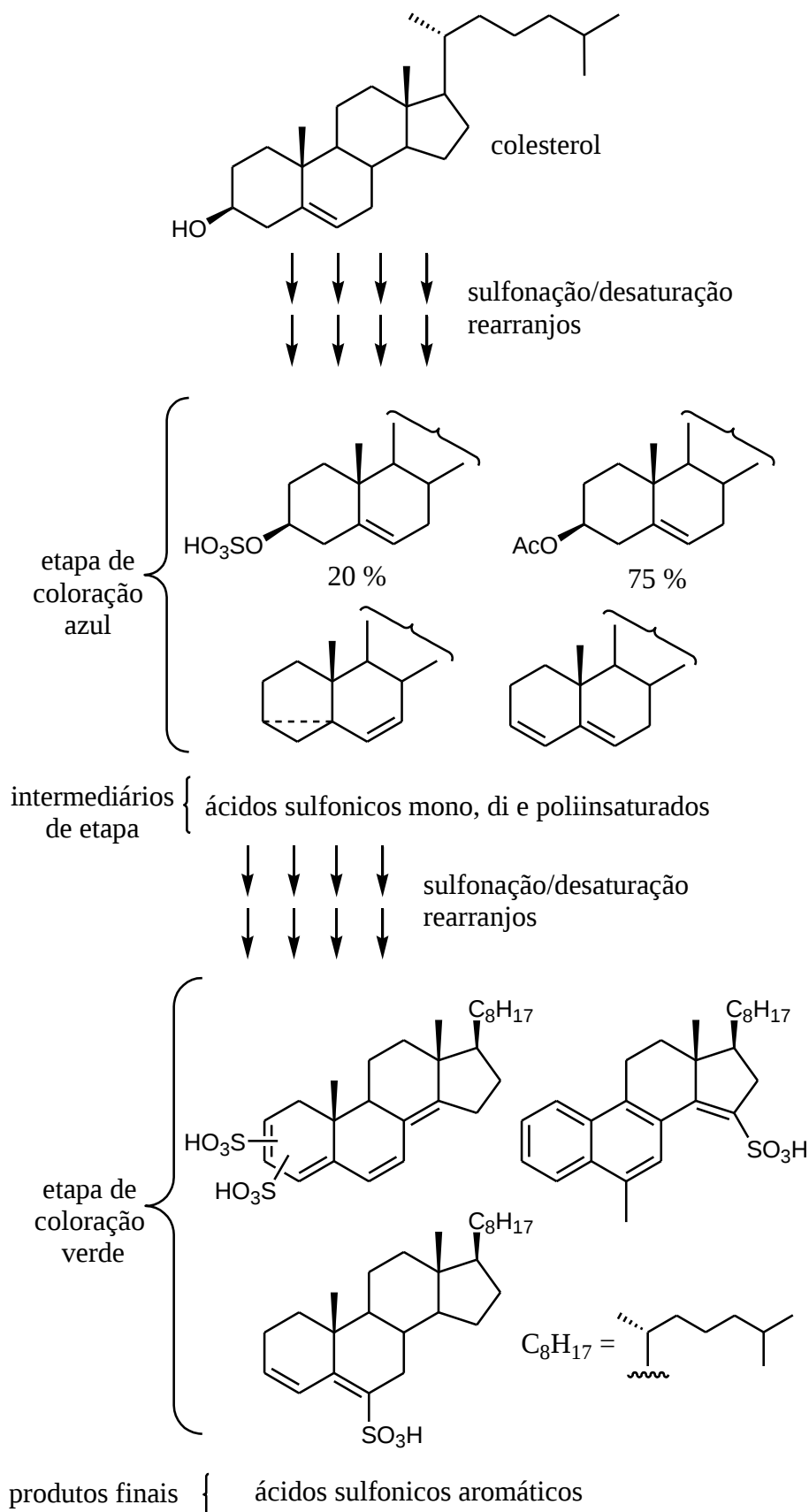


Figura 20: Esquema generalizado da mudança de coloração. Estrutura de alguns dos componentes identificados em cada etapa por XIONG, WILSON e PANG (2007).

Segundo MATOS (2009) a diferenciação entre esteroides e triterpenoides pentacíclicos, no teste de Liebermann-Burchard, ocorre por via da cor: esteroides formam coloração azul evanescente seguida de verde permanente, enquanto que triterpenoides pentacíclicos formam coloração de parda a vermelha. Com base no trabalho de XIONG, WILSON E PANG (2007) e considerando que os triterpenoides pentacíclicos tem uma estrutura maior (com mais ciclos) que os esteroides, pode-se propor que os triterpenoides pentacíclicos podem formar estruturas aromáticas (ou conjugadas) maiores, com transições eletrônicas menos energéticas, ou seja, com comprimentos de onda maiores (na região do vermelho).

Em *P. venusta* foi identificada a presença de esteroides, estes são descritos na literatura como, em parte, responsáveis pela atividade antidiarreica (CHOUDHURY, DATTA, TALUKDAR *et al.* 2011; JEEVA, JOSELIN, BRINTHA *et al.* 2013; MAMOUD, MOTAWA, WAHBA *et al.* 2006), assim possivelmente, podendo ser os responsáveis pelo uso na medicina popular sob forma de infusão, ou decocto, das partes aéreas, para o tratamento de diarreia (FERREIRA, ALVARE, HOUGHTON *et al.*, 2000).

- Taninos

A palavra tanino deriva do termo “tanante” que significa, em literatura botânica, um material vegetal usado pra curtir peles (tanar pele), transformando-as em couro e aumentando sua durabilidade. Essa capacidade se deve a propriedade que os taninos têm de formarem compostos insolúveis, em água, com proteínas (como as contidas nas peles) e gelatinas (produto de hidrólise parcial da proteína colágeno contida na pele e ossos) (THOMAS e FRIEDEN, 1923; MONTEIRO, ULBUQUERQUE, ARAUJO *et al.*, 2005; ROUSSELOT, 2014).

Na literatura se encontram três pontos chave para a compreensão da formação desses precipitados. O primeiro é que as ligações tanino-proteína se formam, provavelmente, por ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e certos sítios das proteínas. O segundo é que a massa molecular dos taninos deve estar compreendida em um intervalo, tal que, não seja tão elevada

ao ponto que os taninos não possam ocupar os espaços interfibrilares das proteínas; nem tão baixa que, estes não forneçam ligações suficientes para estabilizar o composto tanino-proteína. O fator massa molecular impede que qualquer composto fenólico seja um “tanante”. Segundo MONTEIRO, ULBUQUERQUE, ARAUJO *et al.*, 2005, a massa molecular dos taninos está compreendida entre 500 e 3000 Daltons. O terceiro refere-se especificamente ao teste da gelatina, no qual a literatura especifica que essa precipitação ocorre em um determinado intervalo de pH, mas, que a adição de um eletrólito neutro (NaCl por exemplo) acarreta uma ampliação desse intervalo de pH, facilitando a precipitação (THOMAS e FRIEDEN, 1923; MONTEIRO, ULBUQUERQUE, ARAUJO *et al.*, 2005).

Nas amostras de *P. venusta* não foi identificada a presença de taninos.

- Saponinas

As saponinas possuem estrutura composta de um grupo aglicona (esteróide ou triterpeno) ligado a um açúcar (glicona), assim sendo classificados em glicosídeos esteroidais (estrutura tetracíclica com 27 carbonos) ou triterpenoides (pentacíclico com 30 carbonos) (figura 21) (VIKEN, HENG, GROOT *et al.*, 2007; SOUZA, MELLO E LOPES, 2012; SADEGHI, ZOLFAGHARI, SENATORE, LANZOTTI, 2013).

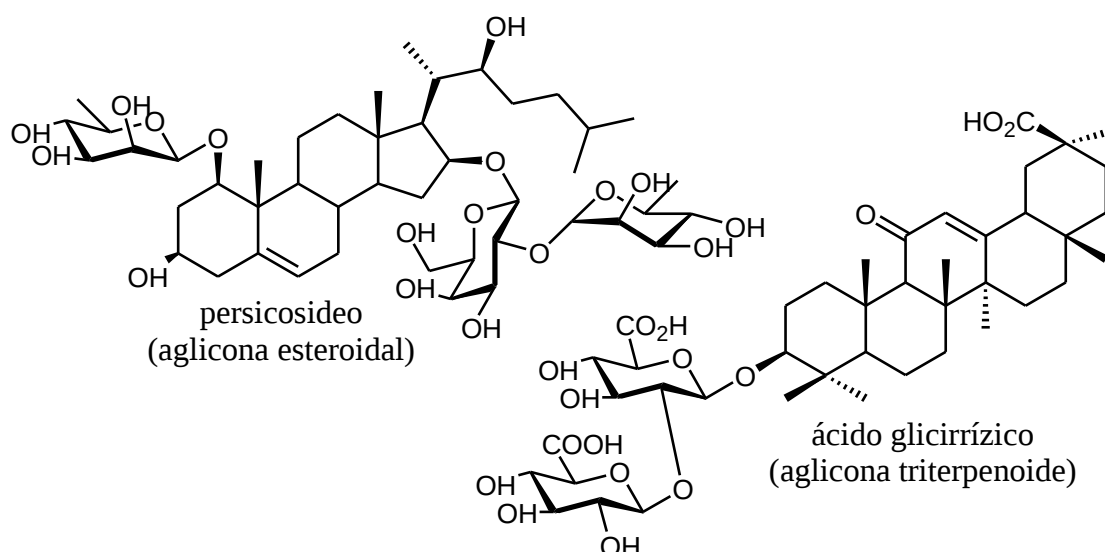


Figura 21: Estrutura do ácido glicirrízico (aglicona triterpenoide).

Esses compostos são assim chamados, por possuírem a propriedades de emulsionar substâncias lipossolúveis e formar espuma. Quando em solução aquosa provocam a diminuição da tensão superficial do líquido, originando soluções afrógenas (espumantes), princípio em que se baseia o seu teste de identificação (VIKEN, HENG, GROOT *et al.*, 2007; SBFgnosia, 2014a; SOUZA, MELLO E LOPES, 2012).

Os resultados dos testes não indicaram a presença de saponinas nas amostras de *P. venusta*.

- Cumarinas

As cumarinas são compostos formados pela fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona, possuindo em sua maioria a característica de fluorescência sob luz ultravioleta. O teste de identificação desta classe consiste na abertura do anel lactônico em meio alcalino, que quando exposto à luz UV sofre isomerização da dupla ligação pra forma *trans* (figura 22). Esse processo provoca a alteração da fluorescência: intensificação e/ou alteração da cor (que oscila de azul a verde) (SBFgnosia, 2014b; SOUZA, 2005).

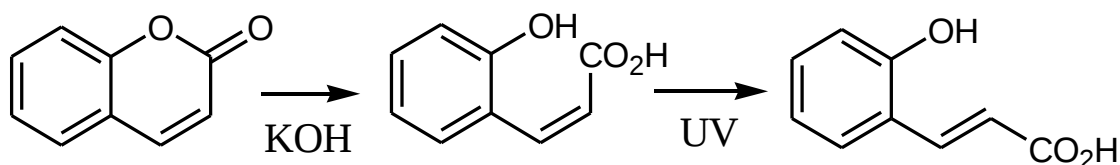


Figura 22: Abertura do anel lactônico e isomerização por ação da luz UV.

Nas folhas de *P. venusta* verificou-se a presença de cumarinas, o que pode justificar a atividade antimicrobiana descrita por FERNANDES, RIBEIRO, RUFINO *et al.*(2011). Esses compostos são reportados na literatura como anticoagulantes, hipotensores, anti-inflamatórios, antitumorais e antimicrobianos, (LEAL, FERREIRA, BEZERRA *et al.*, 2000). Em especial a aromaticidade desses compostos está relacionada à atividade antimicrobiana. COWAN (1999) descreve que a maioria dos compostos, isolados de plantas, que possuem atividade antimicrobiana são aromáticos.

Adicionalmente tem-se que, muitas cumarinas naturais se apresentam hidroxiladas, possuindo atividade biológica como antioxidante, devido à capacidade de neutralizar radicais pela transferência de hidrogênio fenólico (figura 23) (ZANG e WANG, 2004).

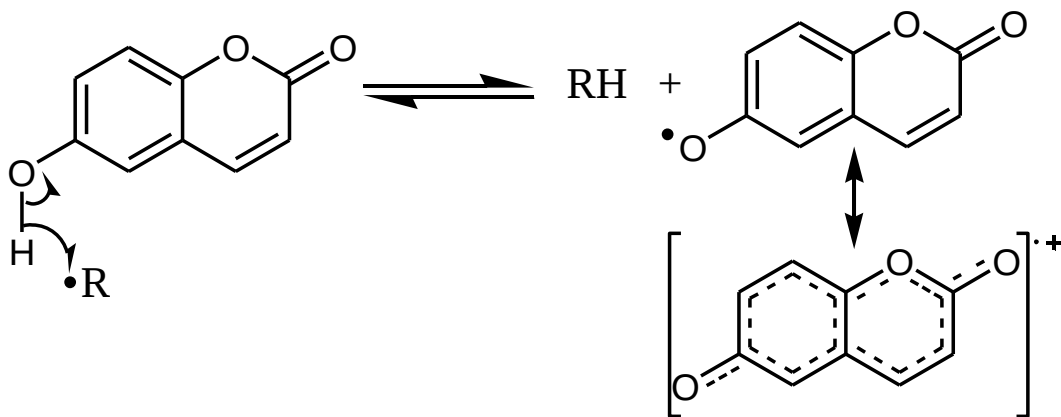


Figura 23: Esquema de radical sendo neutralizado/reduzido por uma cumarina hidroxilada.

- Naftoquinonas

As naftoquinonas são compostos derivados do sistema aromático naftaleno que possuem um anel quinonoídico (figura 24) (SILVA, M., FERREIRA e SOUZA, 2003). Nas plantas são encontradas geralmente hidroxiladas, com propriedades fenólicas, podendo ocorrer *in vivo* ligadas a açúcares (HARBONE, 1984).

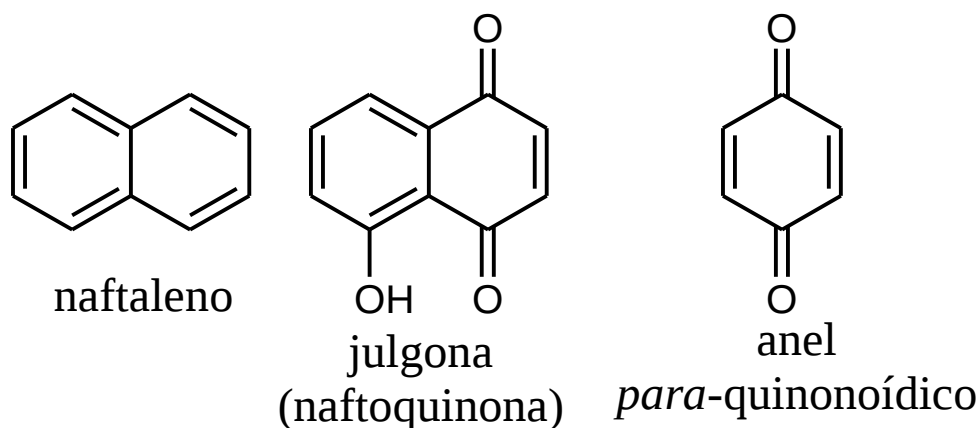


Figura 24: Estrutura do naftaleno, da julgona (naftoquinona) e do anel *para*-quinonoídico.

Segundo DERKSEN (2001), a alteração de cor, princípio do teste de identificação, de amarelo-alaranjado para vermelho-púrpura se deve a ionização

dos grupos fenólicos, podendo ser utilizada para a análise colorimétrica quantitativa (SAMPIETRO, CATALAN E VATTUONE, 2009).

Os resultados dos testes não indicaram a presença de naftoquinonas nas amostras de *P. venusta*.

- Flavonoides

A identificação desse grupo de compostos é feita através de dois testes, que distinguem subclasses de flavonoides, sendo que a presença só é confirmada pela indicação da subclasse nos dois testes (figura 25).

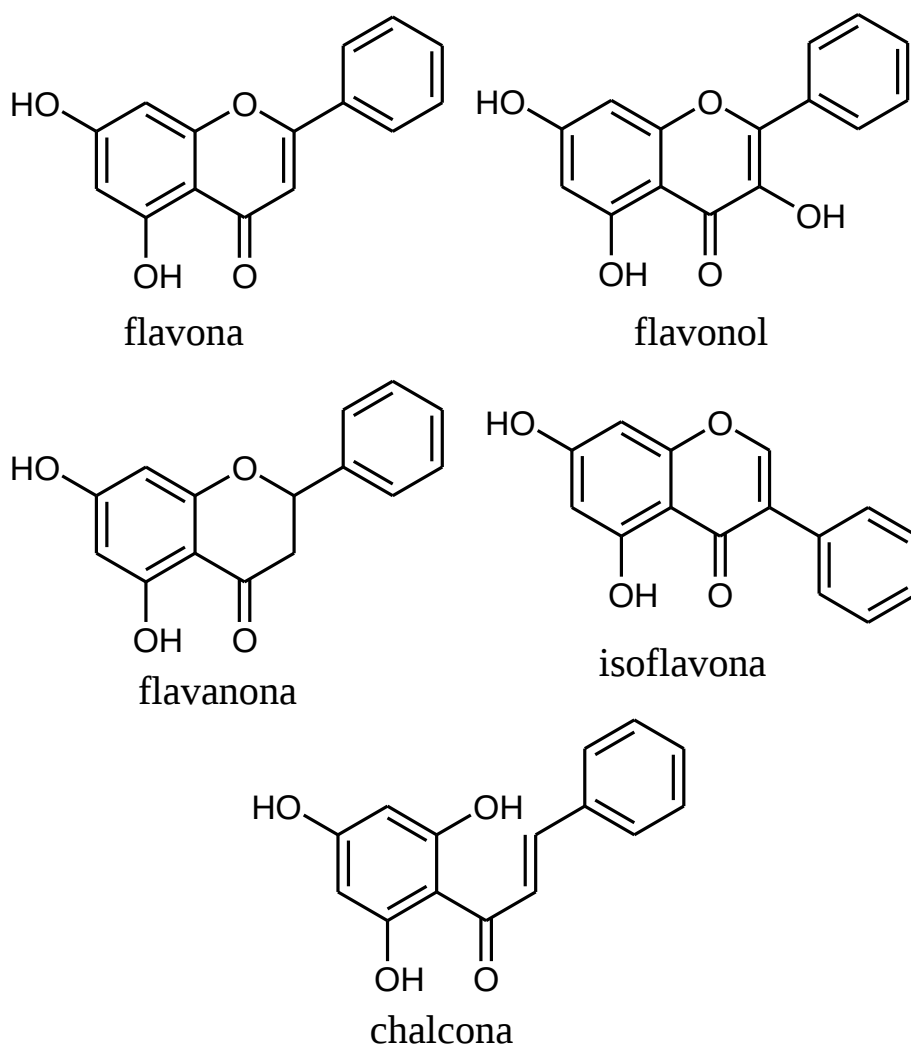


Figura 25: Estruturas básicas das subclasses de flavonoides.

○ Reação de cianidina

A reação de cianidina utiliza magnésio ou zinco metálico (quando utilizado zinco é mais conhecida por reação de Shinoda) como agente redutor em meio ácido. Nessa reação forma-se um composto de estrutura próxima do cloreto de cianidina (uma substância do grupo das antocianinas) (figura 26) (MARTINEZ, 2005; SANTOS, K., 2007; SIMONYAN e SHINKARENKO, 1972).

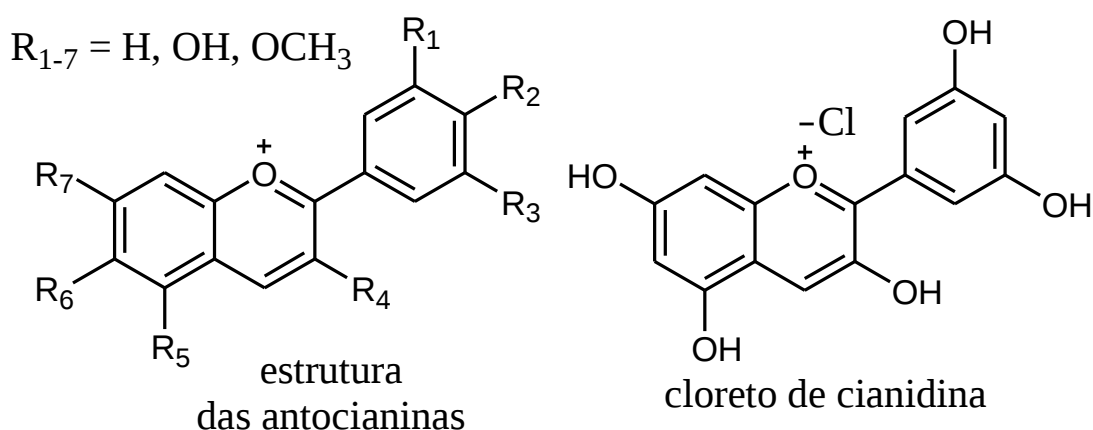


Figura 26: Estrutura das antocianinas do cloreto de cianidina.

Segundo SIMONYAN e SHINKARENKO (1972), os flavonoides que contem o anel 1,4-benzopirona (figura 27) são reduzidos a um derivado de cianidina de coloração característica: as flavonas formando coloração laranja, e os flavonóis coloração vermelha. No caso das flavanonas, que não possuem o anel 1,4-benzopirona, porém, formam coloração violeta, é plausível supor que formem um sistema conjugado menor, que seria condizente com o menor comprimento de onda da coloração ($\lambda_{\text{violeta}} < \lambda_{\text{vermelho}}$).

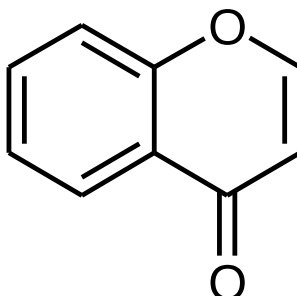


Figura 27: Estrutura do anel 1,4-benzopirona.

○ Reação com AlCl_3

Segundo DUKREY, WOLFENDER, MARSTON *et al.* (1995) o Al^{3+} se complexa com grupos *orto*-hidroxi e grupos ceto com hidroxila em posição *peri*, provocando um deslocamento pra maiores comprimentos de onda (figura 28).

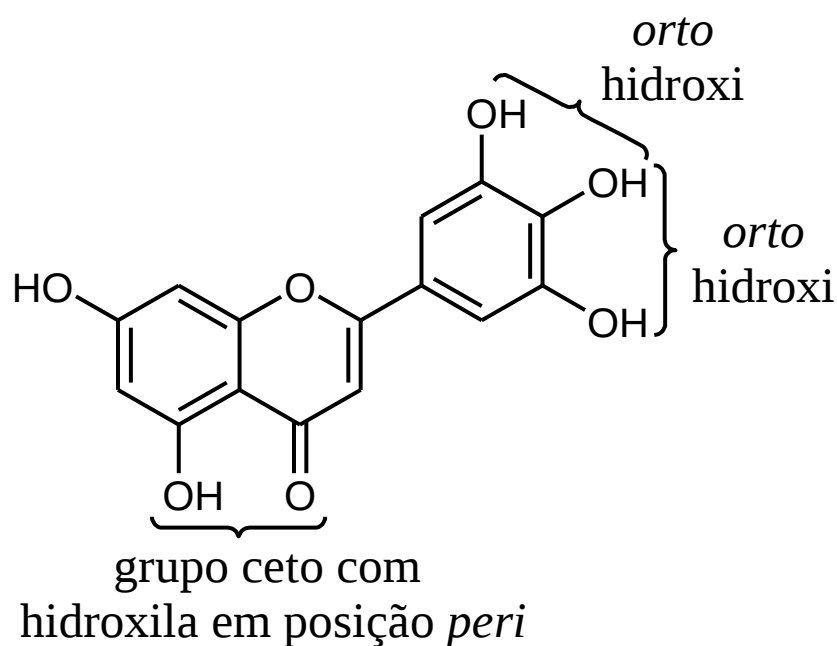


Figura 28: Grupo ceto com hidroxila em posição *peri* e grupos *orto* hidroxila.

Os resultados dos testes indicaram a presença de flavona (um polifenol) em *P. venusta*. Essa classe de compostos tem como característica marcante a atividade antioxidante, segundo ALVES, DAVID, M, DAVID, P, (2010) esse efeito biológico está ligado ao grupo hidroxila fenólico, sendo proporcional ao número de hidroxilas presentes (figura 29), porém, outros estudos afirmam que esta

atividade também é influenciada pela posição desses grupos, além das ligações duplas dos anéis benzênicos e da carbonila (ALVES, DAVID, M., DAVID, P., 2010; COS, YING, CALOMME *et al.* 1998; MELO, MACIEL, LIMA *et al.*, 2008).

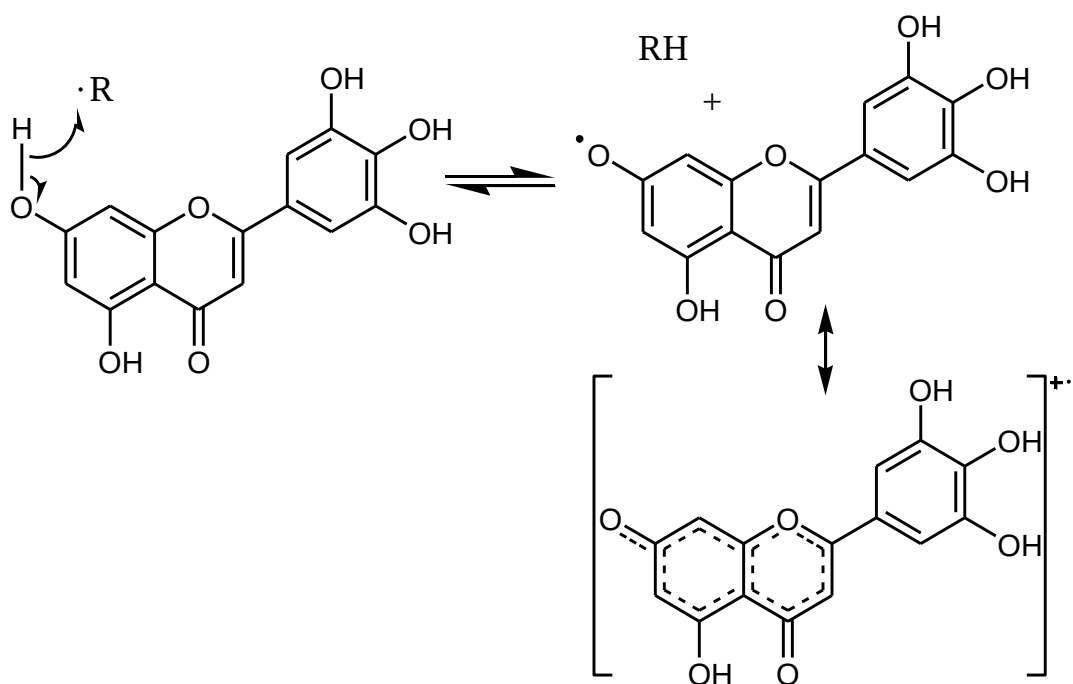


Figura 29: Esquema de radical sendo neutralizado/reduzido por um flavonoide (neste caso uma flavona).

O resultado da investigação das classes fitoquímicas, nos extratos e frações obtidas de *P. venusta*, em linhas gerais, foi consistente com diversos estudos anteriores desta espécie. Todavia os resultados podem variar de acordo com a época de colheita da planta, a região de coleta, as condições ambientais do solo e com a disponibilidade hídrica. Todos estes fatores podem modular as concentrações das diversas classes de metabólitos secundários nas plantas, promovendo uma possível alteração no perfil químico do vegetal (GLOBO-NETO e LOPES, 2007).

4.2. Atividade antioxidante

Sob um ponto de vista biológico, um processo altamente oxidativo a um tecido, ou *stress* oxidativo, deve-se ao excesso de espécies reativas (ERO's, em sua maioria, radicais livres) que capturam elétrons dos tecidos provocando oxidação

destes. Ainda sob esse ponto de vista, uma substância é considerada antioxidante quando diminui significativamente ou inibe o processo oxidativo (BOGLIOLO, 2006; FEKI, KOUBA e DAMAK, 2014; HAZRA, BISWAS E MANDAL, 2008). O teor dessa inibição pode ser mensurado avaliando-se um processo oxidativo genérico em presença do possível antioxidante, sendo que a eficiência do antioxidante está associada à sua habilidade em sequestrar os radicais livres (DIOULF, STEVANOVIC, CLOUTIER *et al.* 2009; KARIMI, OSKOU EIAN, HENDRA *et al.*, 2010).

4.2.1. Inibição do radical DPPH

O DPPH é um radical nitrogenado orgânico muito estável com absorção na região do ultravioleta visível (512-510 nm). Se um composto antioxidante está presente nos extratos testados, o radical é reduzido (ou inibido), e a absorbância diminui (figura 30).

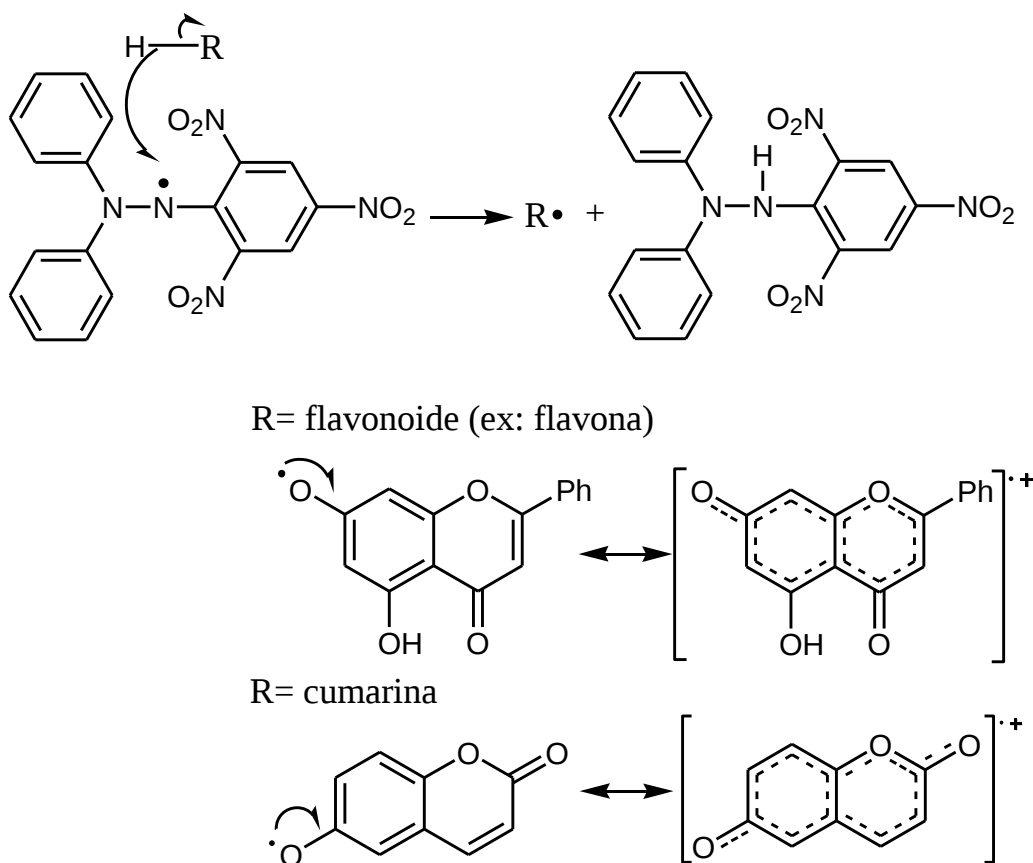


Figura 30: Redução (inibição) do radical DPPH por flavonoide (flavona) e cumarina.

Os resultados para várias concentrações das amostras (extrato bruto e frações acetato de etila e hexano) de *P. venusta* e do antioxidante utilizado como padrão, trolox (figura 31), são mostrados na tabela 4 e na figura 32.

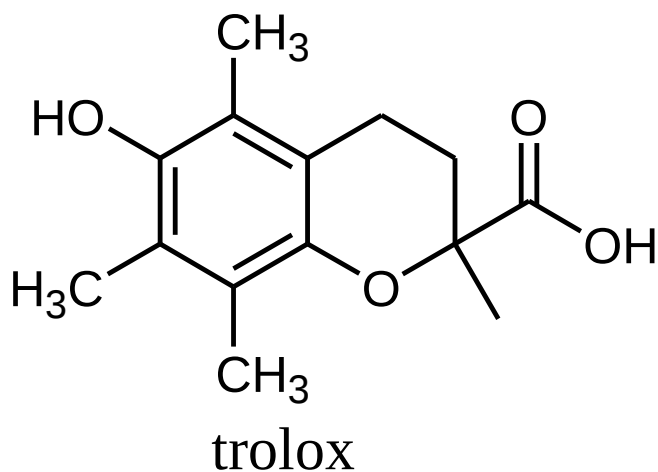


Figura 31: Estrutura química do antioxidante utilizado como padrão, trolox.

Tabela 4: Resultados de inibição do radical DPPH para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.

concentração µg/mL	AcOEt (%)	hexano (%)	bruto (%)	trolox (%)
3,125	25,76	15,76	25,76	33,54
6,25	16,92	10,59	25,76	71,10
12,5	21,93	27,39	20,70	94,21
25	45,26	29,34	31,81	95,03
50	66,20	37,34	41,52	95,35
100	95,74	57,60	54,74	96,24

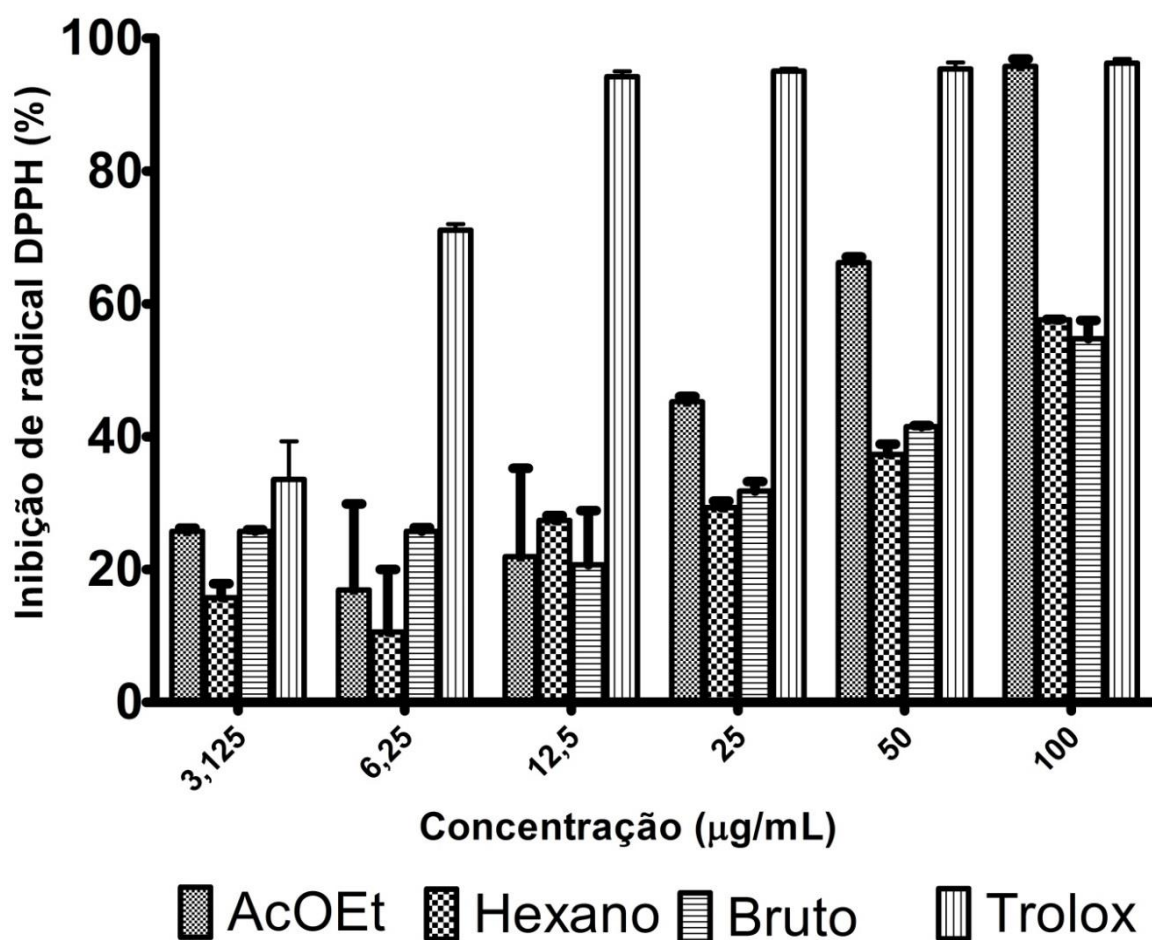


Figura 32: Resultados de inibição do radical DPPH para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.

Comparando os valores de atividade das amostras entre si, foi possível verificar que, para as três maiores concentrações testadas (25, 50, 100 µg/mL), a fração acetato de etila teve uma maior atividade, sendo que a fração hexano e o extrato bruto tiveram resultados próximos. Como já supracitado, a atividade antioxidante está ligada principalmente a presença de compostos com propriedades fenólicas, como flavonoides e cumarinas. Os resultados dos testes fitoquímicos demonstraram que esses compostos (flavonoides e cumarinas) podem estar presentes no extrato bruto e na fração acetato de etila, podendo então, terem sido concentrados nesta fração pelo processo de fracionamento, o que justifica os maiores valores de inibição do radical DPPH para esta fração, assim posteriormente realizou-se um experimento de quantificação.

Os valores de IC_{50} (quantidade necessária para atingir a inibição 50% do radical) foram calculados através de regressão linear para os extratos: 38,62 $\mu\text{g/mL}$ fração acetato de etila; 79,72 $\mu\text{g/mL}$ fração hexano e 83,04 $\mu\text{g/mL}$ para o bruto. O valor de IC_{50} do trolox foi calculado por regressão logarítmica, por fornecer maior linearidade (R^2) do que a regressão linear, resultando em um valor de 2,55 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar dos altos valores de IC_{50} das amostras, se comparadas ao padrão, pode-se observar que a fração acetato de etila foi capaz de se equiparar ao antioxidante padrão, na maior concentração testada.

4.2.2. Inibição do radical ABTS

O radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) é produzido pela oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio. Esse radical é um cromóforo azulado (reflete luz na região do azul) com absorbância mensurada em 734 nm (absorve luz na região do vermelho). A presença de algum composto capaz de reduzir esse radical (antioxidante) provoca um decréscimo na absorbância, devido ao deslocamento da absorbância de máximo para λ menores (figura 33).

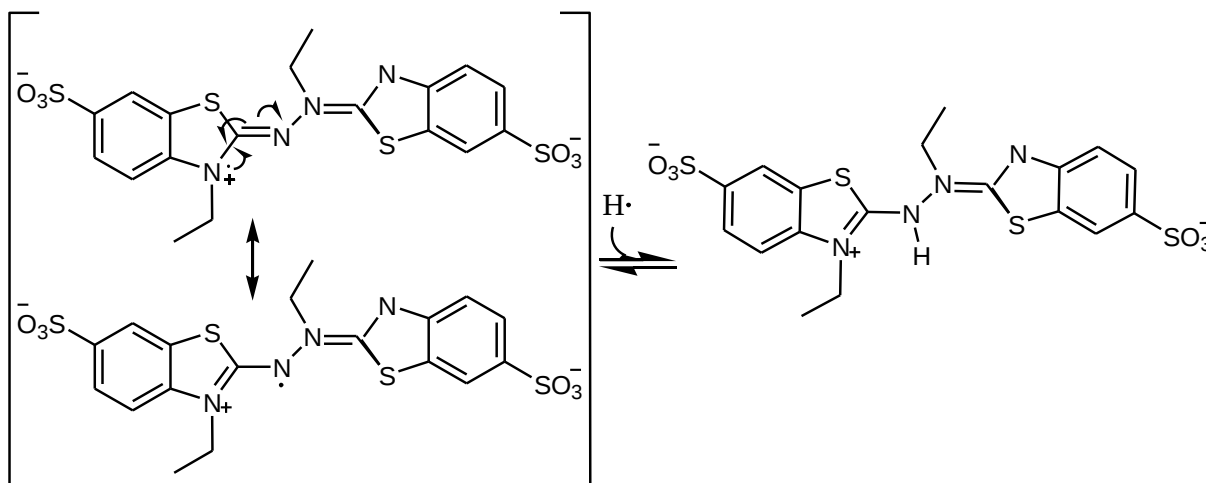


Figura 33: Esquema da redução (inibição) do radical ABTS.

O mecanismo de avaliação da atividade antioxidante pelo radical ABTS é o mesmo do teste com radical DPPH, ou seja, capacidade de redução do radical por doação de hidrogênio radicalar. Assim, o teste com ABTS pode ser considerado uma

confirmação dos resultados obtidos para a atividade antioxidante via DPPH. Porém, estudos na literatura nos quais esses dois métodos de avaliação foram comparados em extratos altamente pigmentados (tanto extratos lipofílicos quanto a extratos hidrofílicos), demonstraram que, estes pigmentos poderiam causar uma subestimação do valor de inibição no caso do radical DPPH, e ressaltam que o método ABTS é mais adequado a esse tipo de extrato (AMARI, BOUZOUNIANA, BERKANI *et al.*, 2014; FLOEGEL, KIM, CHUNG *et al.*, 2011; TEOW, TROUNG, MCFEETERS *et al.*, 2007).

Esse resultado se deve ao radical ABTS possuir maior solubilidade, tanto em fase aquosa quanto orgânica, em relação ao radical DPPH, além de não sofrer interferências como a presença de antocianinas, compostos coloridos que podem ter absorção próxima ao do DPPH, levando a uma subestimação do valor de atividade antioxidante (AMARI, BOUZOUNIANA, BERKANI *et al.*, 2014; FLOEGEL, KIM, CHUNG *et al.*, 2011; TEOW, TROUNG, MCFEETERS *et al.*, 2007). Um estudo realizado por FLOEGEL (2011) descreve a comparação dos métodos ABTS e DPPH para mais de 50 amostras de frutas, vegetais e bebidas ricas em antioxidantes, frente à metodologia padrão da *USDA* (*United States Department of Agriculture*), método *ORAC* (*Oxygen radical absorbance capacity*), relevando que o método ABTS tem uma melhor correlação com os valores da *USDA*.

Como as soluções de *P. venusta* usadas nos testes possuem uma pigmentação forte, o teste de ABTS é o mais adequado. Os resultados obtidos por esse método indicaram uma atividade antioxidante maior para as amostras do que o teste do radical DPPH.

Os resultados de inibição das amostras, juntamente com o controle (trolox), estão dispostos na tabela 5 e na figura 34.

Tabela 5: Resultados de inibição do radical ABTS para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.

concentração µg/mL	AcOEt (%)	hexano (%)	bruto (%)	trolox (%)
3,125	12,69	2,59	11,40	75,28
6,25	23,62	6,62	18,91	98,75
12,5	40,20	14,54	29,42	99,44
25	64,03	29,01	42,80	99,03
50	87,03	49,42	59,52	99,03
100	99,04	78,98	90,92	99,30

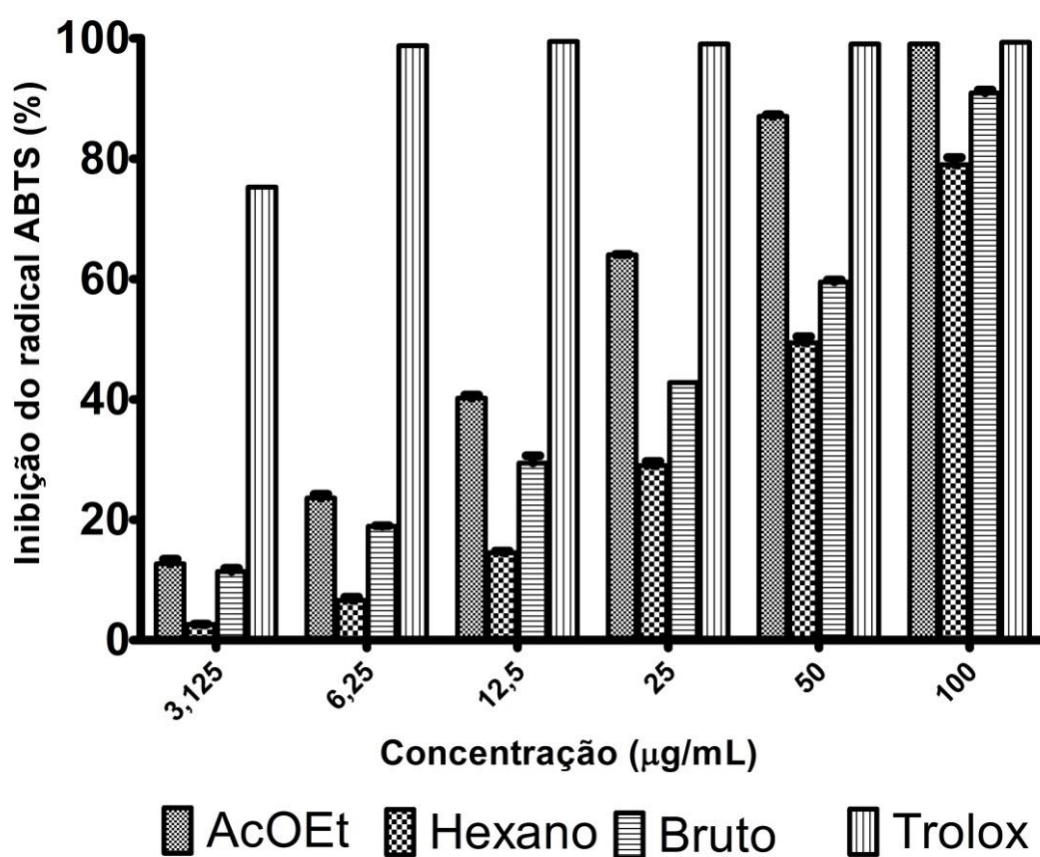


Figura 34: Resultados de inibição do radical ABTS para o trolox, extrato bruto e frações acetato de etila e hexano.

Nesse perfil de inibição pode-se observar, para todas as concentrações testadas, a mesma sequência de poder antioxidante para as amostras de *P. venusta*: f. AcOEt > ex. bruto > f. hexano. Em suma, pode-se observar que possivelmente, a fração acetato de etila concentrou os compostos com atividade antioxidante.

Os valores de IC₅₀ foram calculados através de regressão linear para as amostras de *P. venusta*: 27,58 µg/mL fração acetato de etila; 58,09 µg/mL fração hexano e 42,86 µg/mL para o bruto. O valor de IC₅₀ do trolox foi calculado por regressão logarítmica, por esta fornecer maior linearidade (R²), obteve-se o valor de 0,59 µg/mL.

Como esperado, devido a sofrer menor interferência de compostos pigmentados, obtiveram-se melhores valores de atividade antioxidante, ou seja, menores valores de IC₅₀, para a metodologia do radical ABTS em comparação a do radical DPPH (tabela 6).

Tabela 6: Valores de IC₅₀ para as metodologias de redução do radical ABTS e DPPH.

	Ex. Bruto (µg/mL)	F. AcOEt (µg/mL)	F. Hexano (µg/mL)	Trolox (µg/mL)
ABTS	42,86	27,58	58,09	0,59
DPPH	83,62	38,62	79,72	2,55

Novamente o trolox se mostrou mais efetivo que as amostras de *P. venusta*, porém, na maior concentração aplicada: a fração acetato de etila foi capaz de inibir 100% do radical ABTS, além de serem obtidos valores de inibição acima de 75 % para a fração hexano (78,97 %) e o extrato bruto (90,92 %).

Esses resultados confirmam que *P. venusta* tem potencial como fonte de agentes antioxidantes e que estes se concentram na fração mais polar.

4.3. Estimativa do teor de flavonoides no extrato bruto

A atividade antioxidante de flores e raízes de *P. venusta* foi descrita nos trabalhos de ROY, AMDEKAR, KUMAR *et al.* (2011, 2012), que concluem que esta possui “quantidades significativas de [compostos] fitoquímicos com propriedades antioxidantes”, sem descrever quais seriam esses compostos, nem a quantidade presente destes.

No presente trabalho também se pôde verificar consideráveis valores de atividade antioxidante para as folhas de *P. venusta*, visto que os testes clássicos confirmaram a presença de flavonoides no extrato bruto, estes sendo conhecidos

por serem agentes antioxidantes; a quantidade destes poderia justificar, ou não, essa atividade biológica, assim, foi realizado um experimento de quantificação.

O teor de flavonoides foi estimado por uma curva de calibração utilizando rutina como padrão (um flavonoide, mais especificamente uma flavona) (figura 35), baseado na formação do complexo alumínio-flavonoide, o mesmo princípio do teste clássico de identificação de flavonoides. A curva de calibração representa uma relação de absorvância *versus* concentração de rutina, assim, o valor de absorvância mensurado para o extrato bruto representará determinada concentração de rutina, ou seja, o valor calculado é uma estimativa do teor de flavonoides em unidades de equivalentes de rutina.

O método utilizado demonstrou possuir uma linearidade elevada ($R^2 = 0,999$) no intervalo de concentrações utilizado, obtendo-se um teor de $148,5 \pm 7,65 \mu\text{g}$ de equivalentes de rutina por mg de extrato.

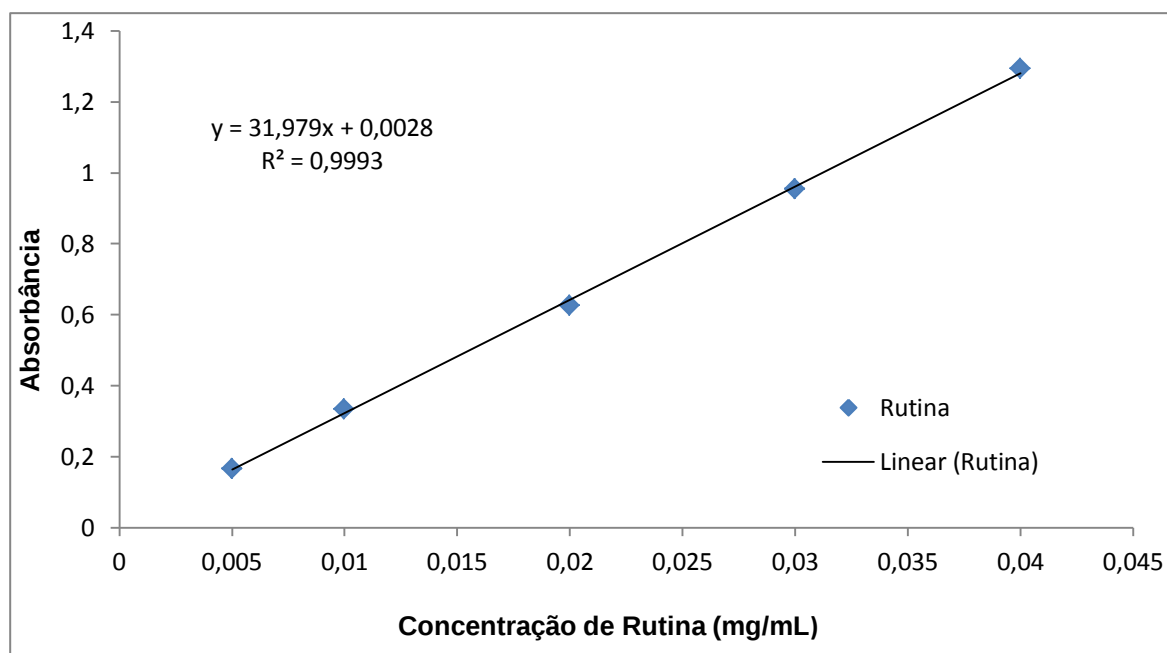


Figura 35: Curva de calibração obtida utilizando rutina como padrão.

Em relação à massa de folhas secas obteve-se um teor de $1,02 \pm 0,05\%$ (m/m) de equivalente de rutina, um valor baixo, confirmando o descrito por BLATT, SANTOS e SALATINO (1998) e SANTOS e BLATT (1998), que indicaram que as folhas de *P. venusta* possuem teores baixos de flavonoides, além de terem

identificado exclusivamente rutina nas folhas de *P. venusta*. Entretanto, o teor de equivalentes de rutina em relação a massa de extrato, $148,5 \pm 7,65 \mu\text{g}/\text{mg}$ (14,85 % (m/m)), é um valor considerável, se comparados com os encontrados FEKI, KOUBA, DAMAK, 2014 (2014), que testaram vários solventes para extração de flavonoides, alcançando uma extração máxima de flavonoides com acetona ($207,61 \pm 2,62 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato ou 20,76 % (m/m)) em amostras de *Solanum elaeagnifolium*. Esses dados demonstram que o processo de maceração (extração), foi eficiente em extrair e concentrar esses compostos.

4.4. Imunotoxicidade e Viabilidade celular

Um processo infeccioso leva a indução de uma resposta inflamatória, esta por sua vez, causa um estado de *stress* oxidativo (grande produção de ERO's) no tecido infectado com o objetivo de eliminar os agentes infecciosos, porém este estado pode levar a lesões, sendo às vezes necessário o uso de anti-inflamatórios e antioxidantes (BOGLIOLO, 2006).

Tomando por base isso, tem-se que um antioxidante deve ter uma alta capacidade de neutralizar essas espécies reativas, porém sem interferir na atividade dos fagócitos (células que produzem os ERO's), ou seja, não deve apresentar toxicidade a essas células de defesa (imunotoxicidade) (KENNEDY e ABKOWITZ, 1997; BOGLIOLO, 2006).

Como já avaliado anteriormente pelos teste de inibição de radicais, os extratos de *P. venusta* possuem comprovada atividade antioxidante. Assim, com o objetivo de verificar a segurança e aplicabilidade desses extratos (sob aspecto de imunotoxicidade), realizou-se um ensaio de viabilidade celular frente à linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), os quais são células imunitárias retiradas de camundongos, amplamente utilizadas como modelo em ensaios de inflamação (KIM, PARK, NAM *et al.*, 2005; KARIMI, OSKOEIAN, HENDRA *et al.*, 2011; TAYLOR, MEGSON, HASLETT *et al.*, 2003).

O teste de viabilidade celular utilizado foi o do sal de MTT (MOSMANN, 1983) e baseia-se no fato de que somente enzimas presentes em mitocôndrias de células metabolicamente ativas, também chamadas de viáveis, são capazes de reduzir o MTT (sal de tetrazol) à formazana, sendo que a formação dessa substância é

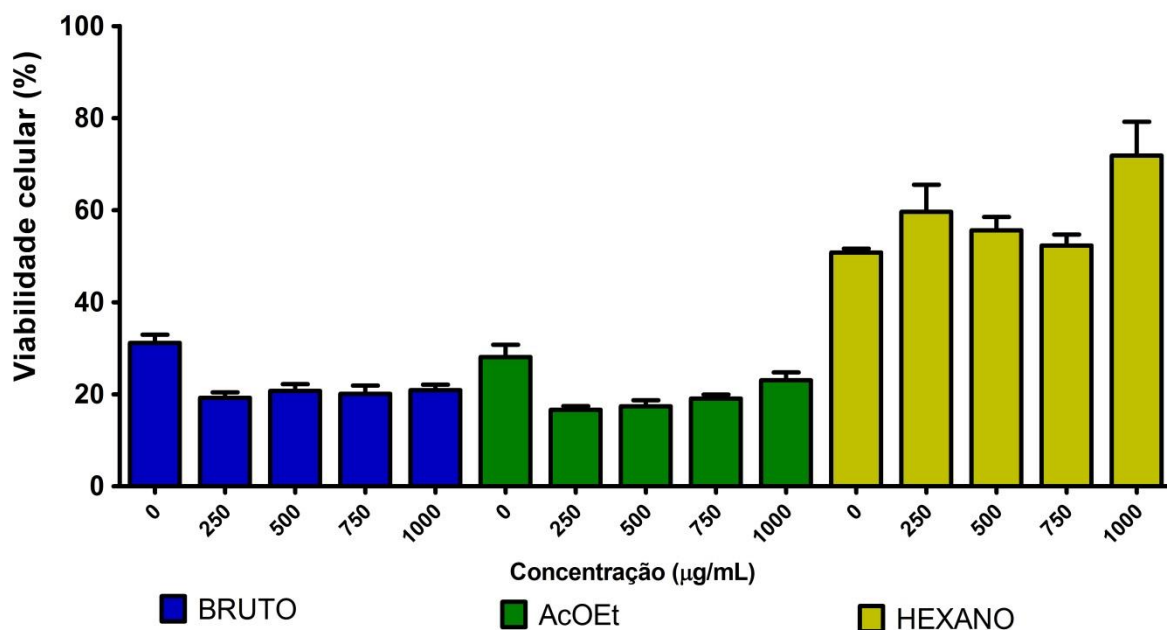


Figura 37: Valores de viabilidade celular (%) para o extrato bruto e frações.

Pode-se observar que o extrato bruto e a fração acetato de etila alcançaram valores de viabilidade menores que o do próprio controle negativo (0 µg/mL), demonstrando que essas possuem um efeito tóxico sobre as células. Entretanto, a fração hexano demonstrou ter valores de viabilidade positivos, acima do controle negativo, porém não sendo um resultado linear em função da concentração, não é possível afirmar se o aumento é um fator pró ou contra a viabilidade celular.

Neste trabalho, e como estudo preliminar, os efeitos do extrato bruto e frações foram comparados com alguns anti-inflamatórios comerciais (tabela 7, figuras 38 e 39); todos inibidores da COX (ciclo-oxigenase). Essa enzima, em macrófagos ativados por um processo inflamatório, é responsável pela síntese de substâncias chamadas prostaglandinas, as quais provocam vasodilatação e regulam o processo inflamatório em geral (MAHMOOD, ZUBERI e ASHFAQ, 2001; CHIONG, YONG, AHMAD, 2013; VOLLMER, STOCKHAUSEN e ZHANG, 2012; BOGLIOLO, 2006).

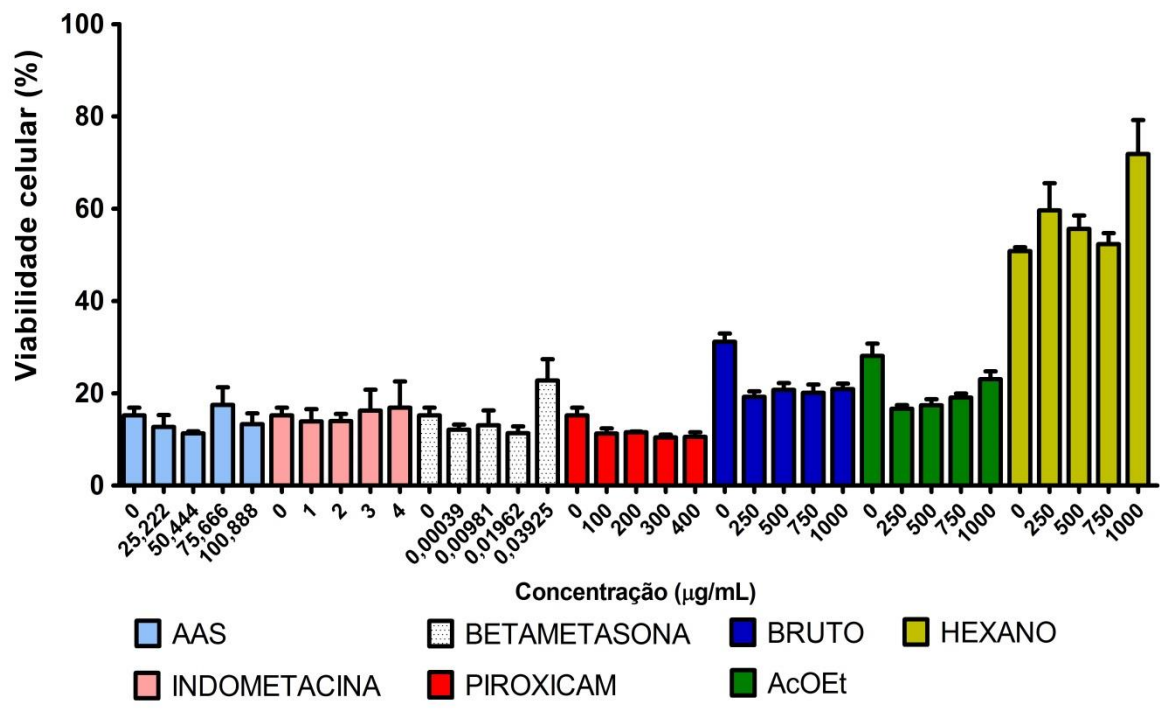


Figura 38: Viabilidade celular (%) dos fármacos e das amostras de *P. venusta*. Todos os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. AAS é o ácido acetilsalicílico.

Tabela 8: Valores de viabilidade celular (%) dos fármacos.

µg/mL	aas	µg/mL	indometacina	µg/mL	betametasona	µg/mL	piroxicam
0	15,21	0	15,21	0	15,21	0	15,21
25,222	12,71	1	13,9	0,00039	12,12	100	11,27
50,444	11,3	2	13,97	0,00981	13,05	200	11,54
75,666	17,47	3	16,23	0,01962	11,37	300	10,45
100,888	13,29	4	16,88	0,03925	22,78	400	10,55

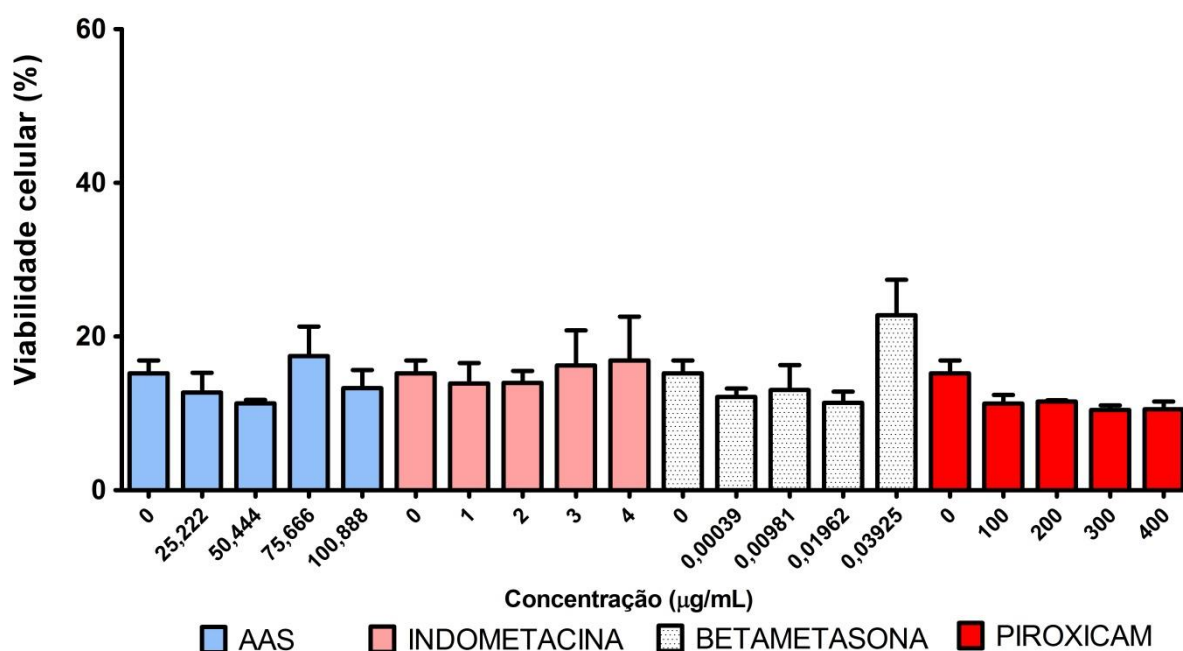


Figura 39: Valores de viabilidade celular (%) dos fármacos.

Analisando somente os resultados dos fármacos, pode-se observar que todos, em ao menos uma das concentrações testadas, resultaram em valores negativos de viabilidade celular, abaixo do controle negativo. Assim como ocorreu para o extrato bruto e fração acetato de etila, isso indica que estes também possuem certo grau de toxicidade aos macrófagos.

Apesar de somente os resultados da fração hexano poderem ser considerados positivos, em termos de viabilidade celular, um estudo posterior de inflamação (modelo de macrófagos estimulados por exemplo) deve certamente incluir o extrato bruto e fração acetato de etila, visto que os fármacos anti-inflamatórios também apresentaram imunotoxicidade, não sendo este então um critério de exclusão destas amostras em estudos posteriores.

4.5. Inibição das catepsinas

Os ensaios foram realizados segundo metodologia já descrita na literatura (SEVERINO 2008), sendo avaliadas as concentrações de 50 e 125 µg/mL de extrato bruto para cada uma das catepsinas.

O substrato fluorogênico Z-FR-MCA possui ligação química do tipo peptídica entre o grupo MCA e arginina de sua estrutura, assim, as catepsinas tem a capacidade de quebrar essa ligação, liberando o MCA, que livre, possui alta fluorescência (figura 40). O controle positivo dos testes foi realizado com o inibidor E-64 (figura 41), que se liga irreversivelmente a enzima por sofrer um ataque nucleofílico desta, no carbono do grupo epóxi ligado à carboxila (figura 42) (VARUGHESE, AHMED, CAREY *et al.*, 1982).

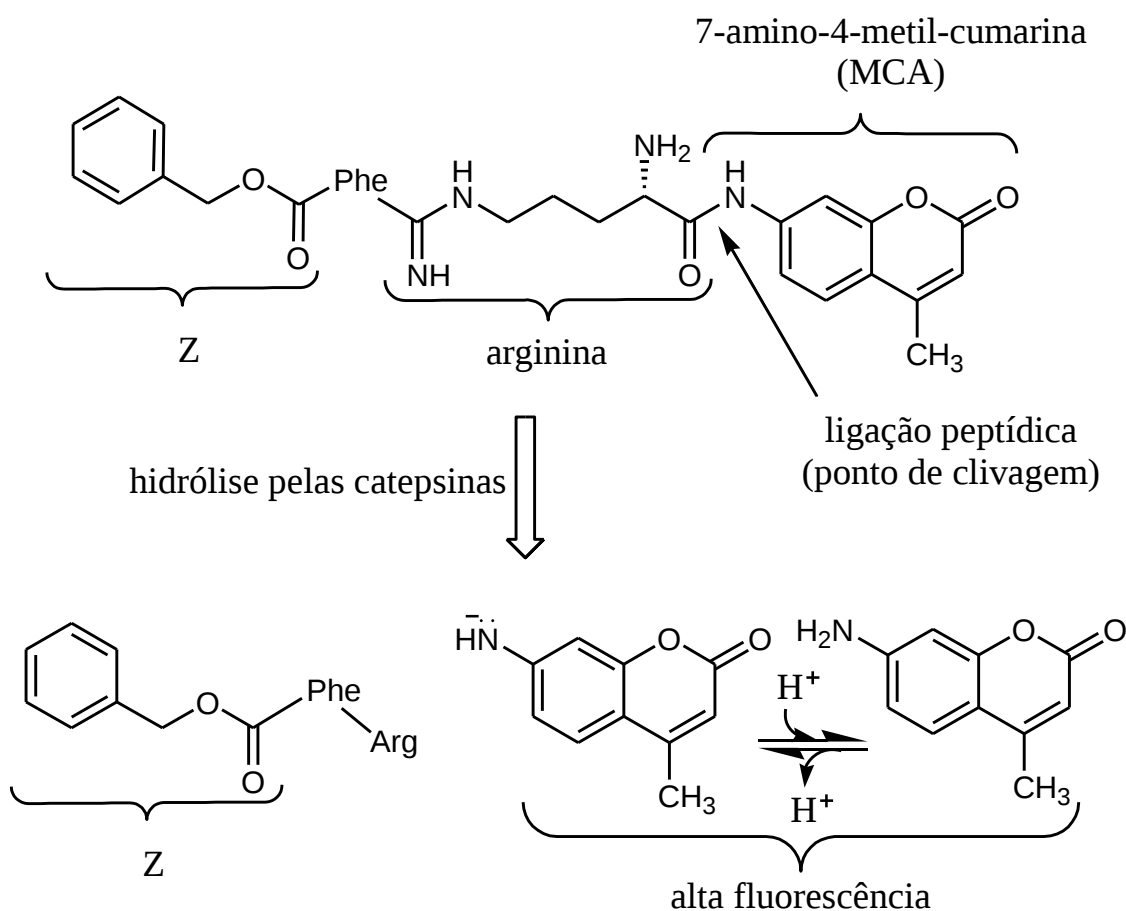


Figura 40: Esquema do teste de hidrólise do substrato Z-FR-MCA.

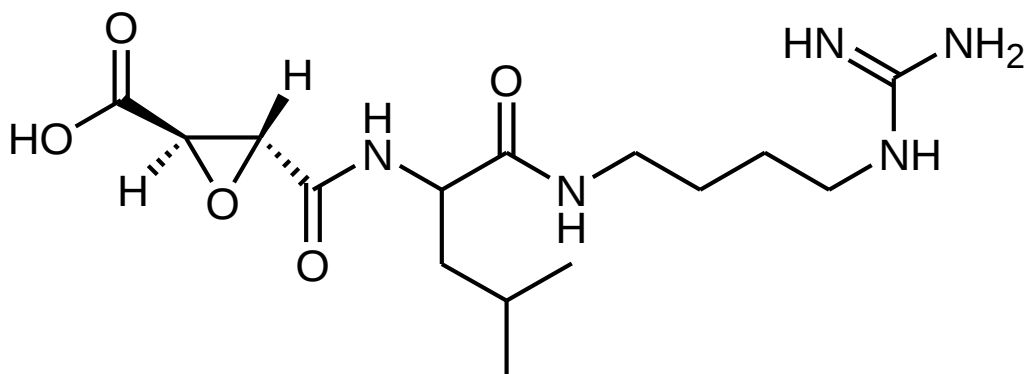


Figura 41: Estrutura química do composto E-64.

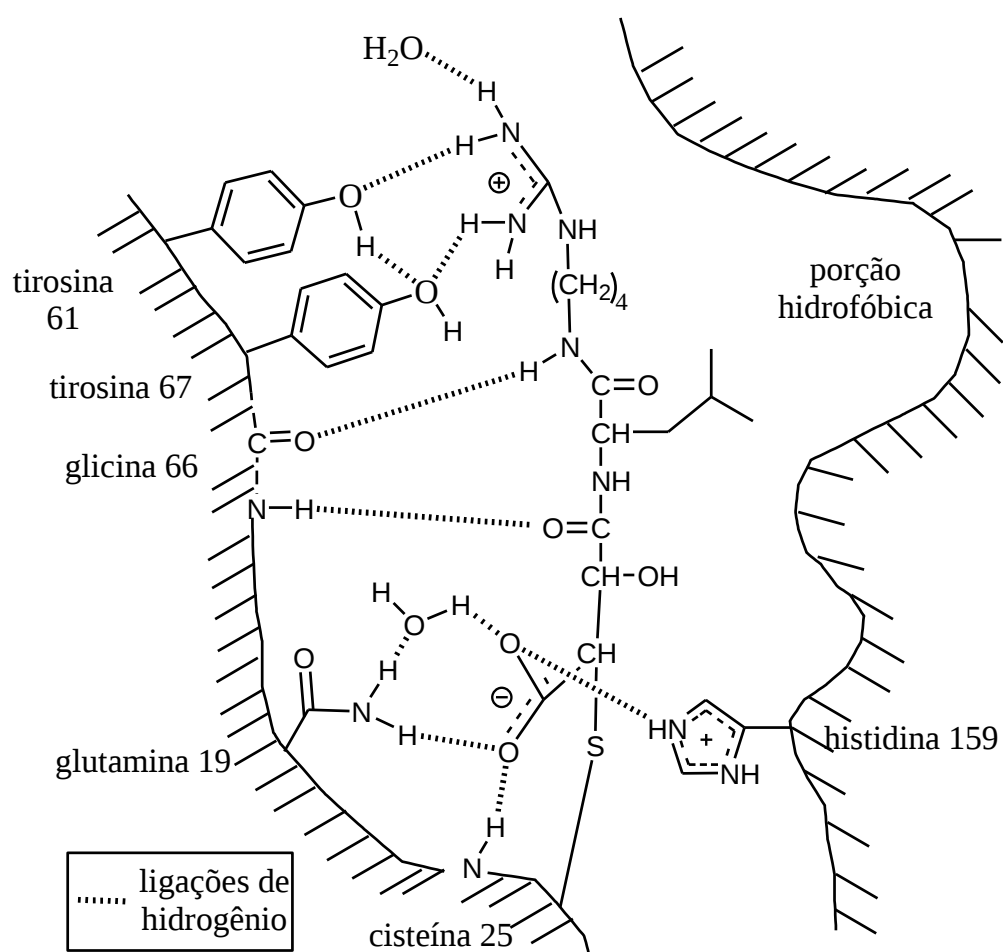


Figura 42: Esquema das interações entre o inibidor E-64 e a papaína (estruturalmente semelhante às cisteínas) (VARUGHESE, AHMED, CAREY *et al.*, 1982).

Os resultados estão apresentados nas figuras 43 e 44.

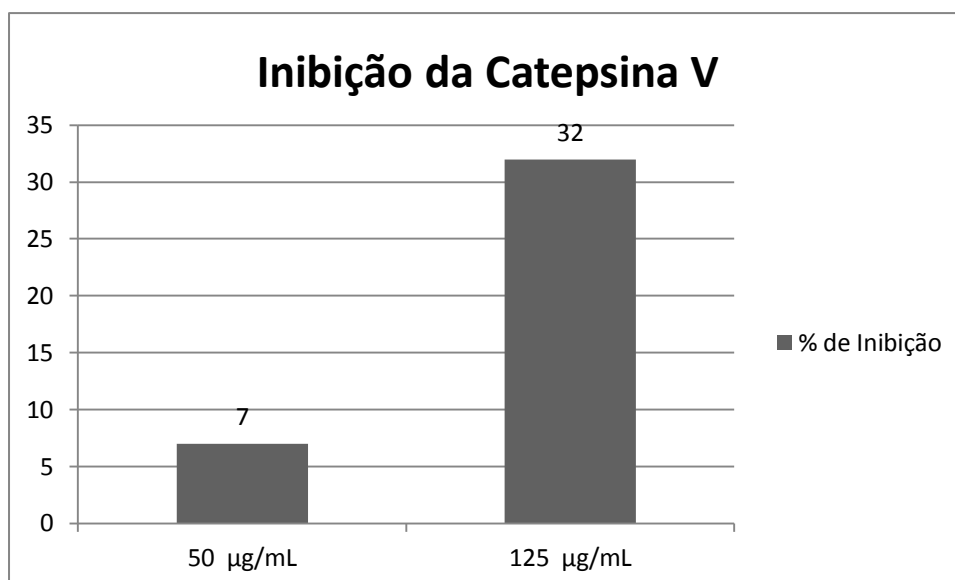


Figura 43: Porcentagem de inibição da catepsina V em função da concentração.

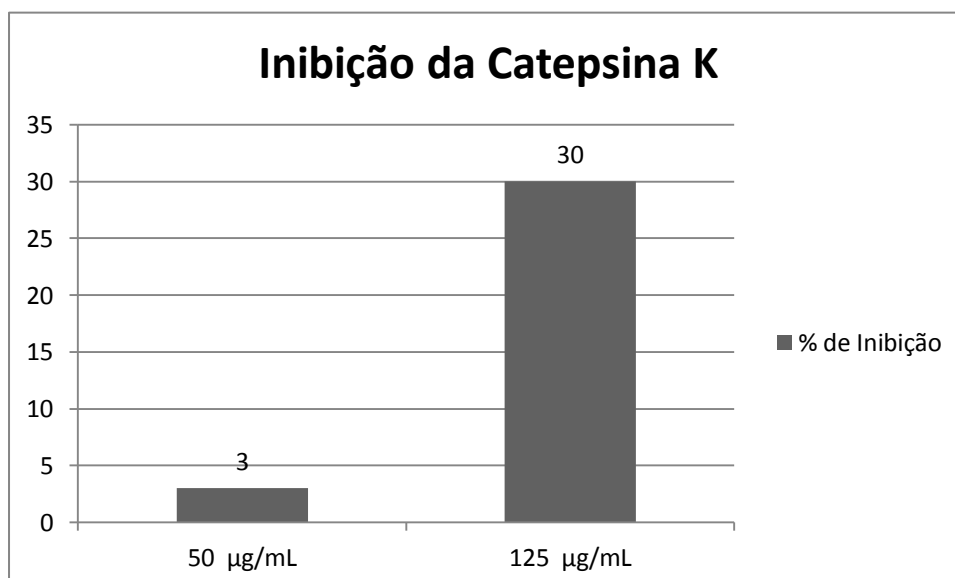


Figura 44: Porcentagem de inibição da catepsina K em função da concentração.

Os dados demonstram, para ambas catepsinas, uma relação diretamente proporcional entre a porcentagem de inibição e a concentração de amostra, o que indica que existe um potencial de inibição, porém, este somente ocorre em altos valores de concentração o que não é o ideal.

4.6. Estudo químico de *P. venusta*

A fração W35FA 1 foi analisada por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), que revelou que esta é composta principalmente com compostos de cadeia orgânica saturada, quase não possuindo sinais na região mais desblindada do espectro, e de posse desses dados, decidiu-se não fracioná-la (figura 45). Na região de 0,5 a 3 ppm tem-se a região de hidrogênios ligados a carbonos saturados, onde se encontram a maior parte dos sinais, porém também pode se observar o sinal do CHCl_3 em δ_{H} 7,26, contaminante do solvente deuterado, em δ_{H} 4,10 (*dd*), observa-se um sinal referente a acetona, utilizada no processo de secagem da amostra em procedimentos anteriores a análise por RMN. A análise de CG-IE-EM confirmou que essa fração era composta principalmente por composto de cadeia orgânica saturada com ácido e ésteres orgânicos de cadeia longa.

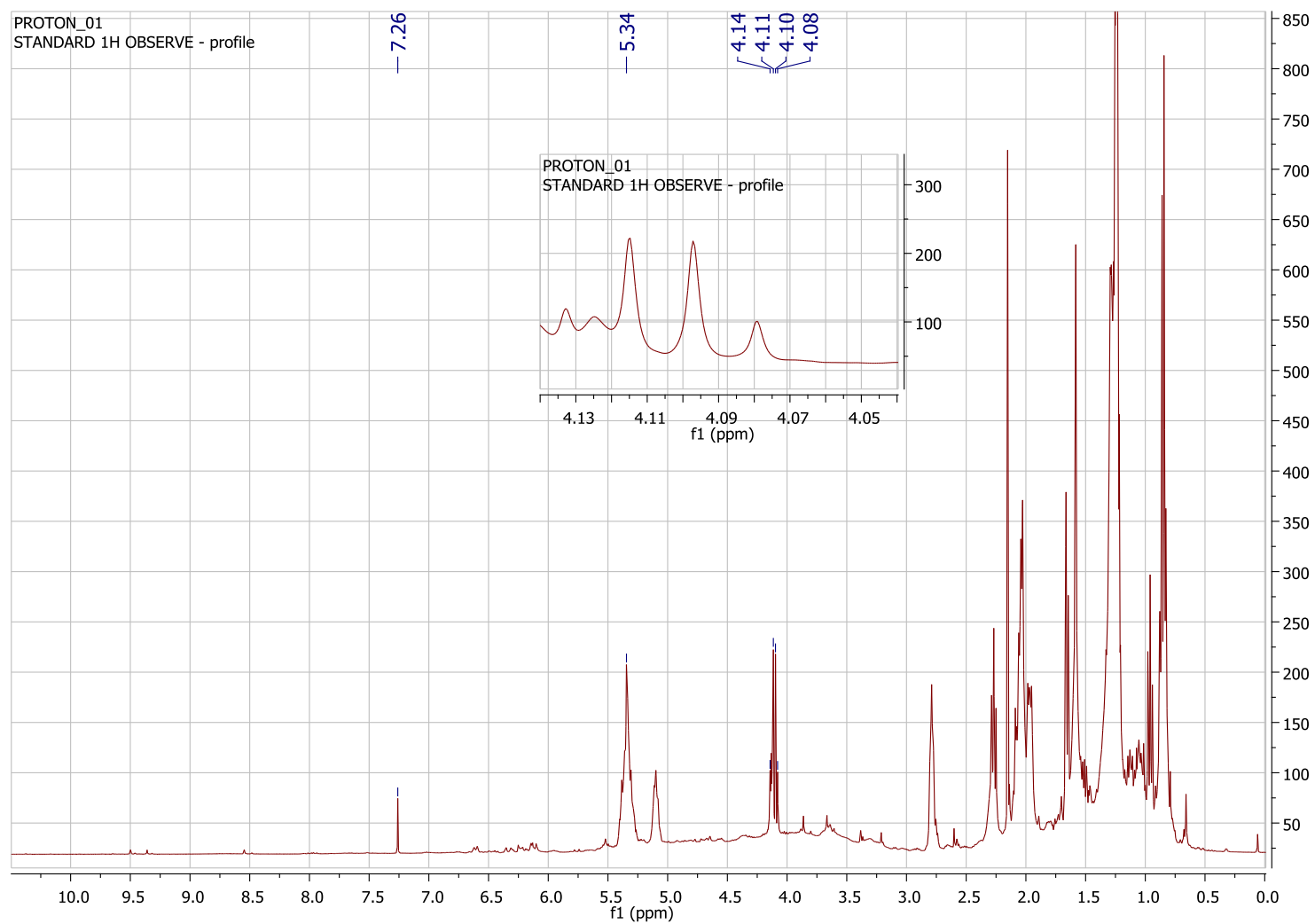


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a W35FA 1 entre 11 e 0 ppm.

A fração W35FA 2 quando analisada por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) mostrou grande quantidade de sinais na região, entre 0,5 e 3 ppm, indicando a presença de compostos de cadeia saturada; porém, também apresentou alguns sinais na região de hidrogênio vinílico (diretamente ligado a uma ligação dupla), alílico (ligado a carbono adjacente a dupla ligação) e alguns na região dos aromáticos (figura 46).

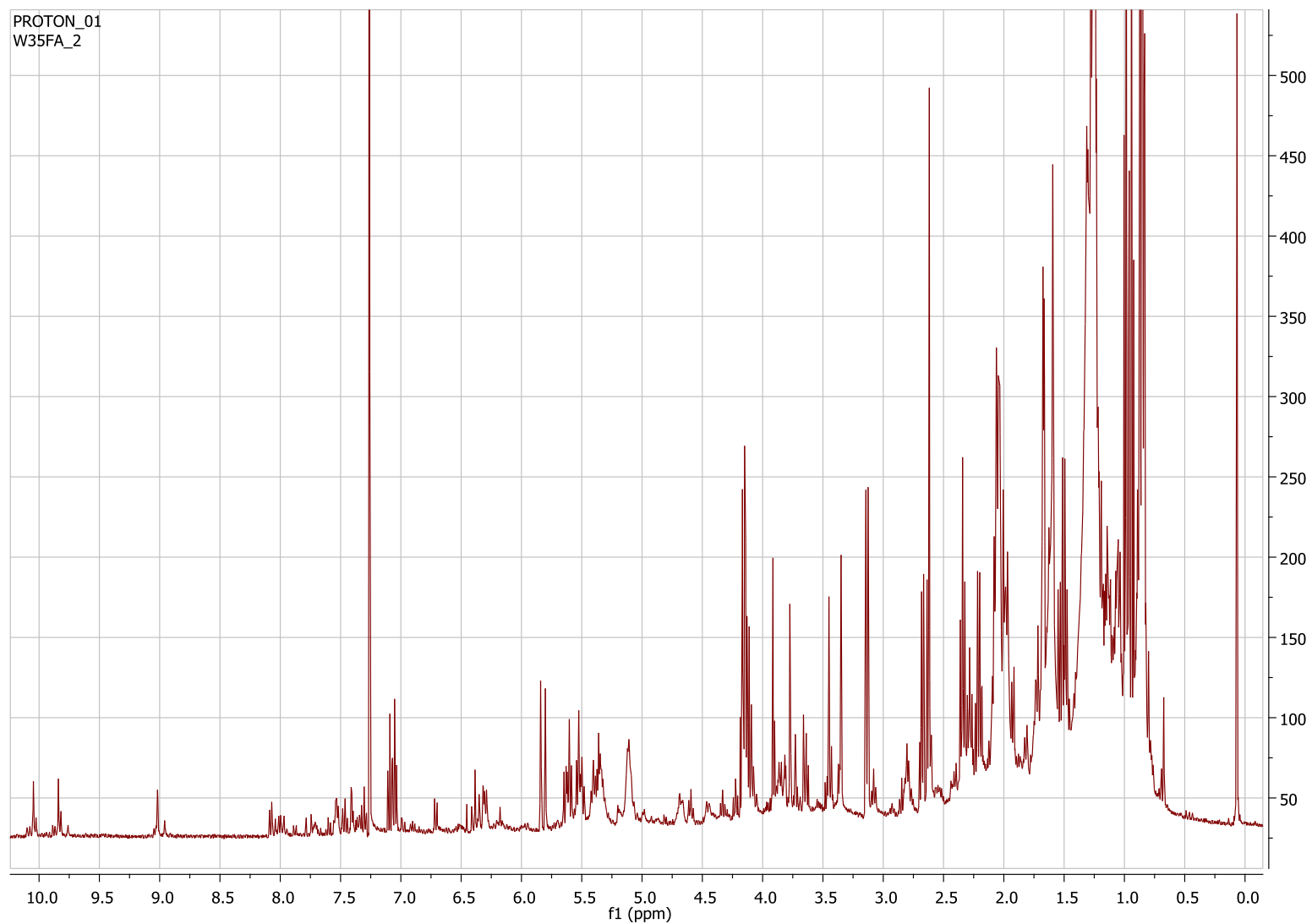


Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a W35FA 2 entre 10,5 e 0 ppm.

A análise por CG-IE-EM da fração W35FA 2.1 levou a identificação do composto fitol **1**. A análise comparativa com a biblioteca do equipamento revelou que o pico de tempo de retenção (t.r.) 9,797 min, obteve 92 % de similaridade com o espectro do fitol **1** contido na biblioteca. A figura 47 apresenta a estrutura do fitol **1**, a figura 48 o espectro de massas da biblioteca para o fitol **1** e a figura 49 o espectro obtido para o fitol **1**, na amostra W35FA 1.

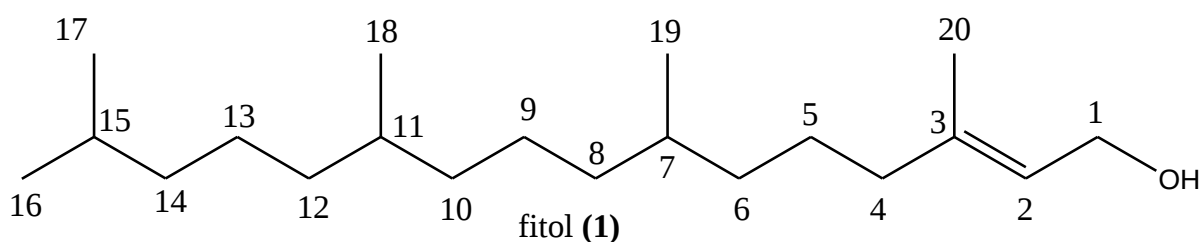


Figura 47: Estrutura do fitol **1**.

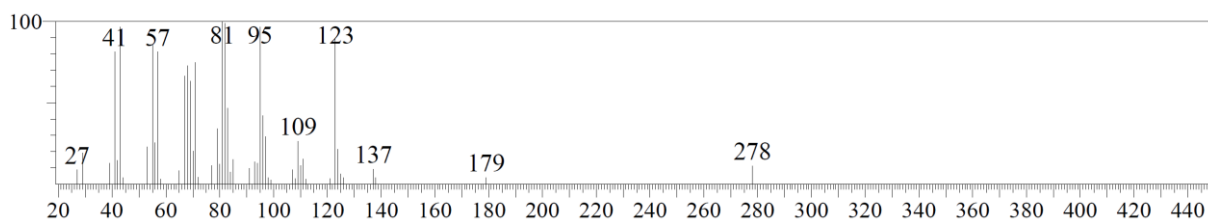


Figura 48: Espectro de massas da biblioteca (adquirida do *NIST*) para o fitol. Espectro de intensidade(%) versus *m/z*.

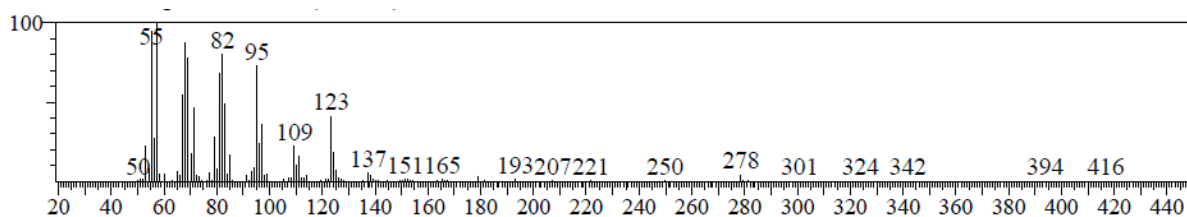
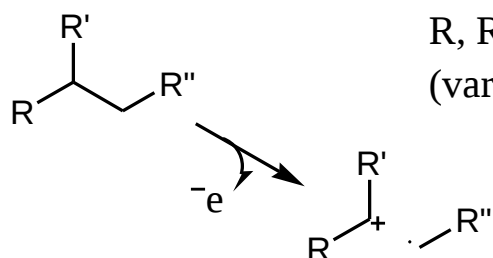


Figura 49: Espectro de massas obtido para o fitol **1**. Espectro de intensidade(%) versus *m/z*.

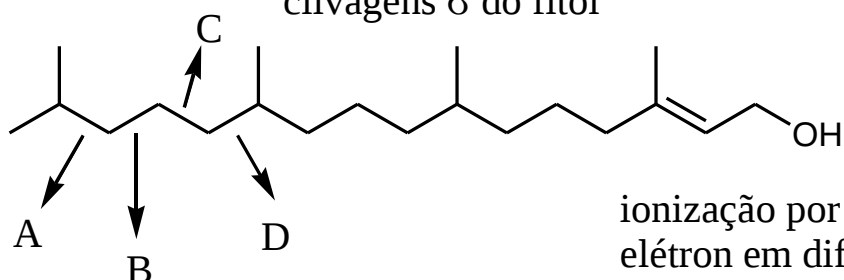
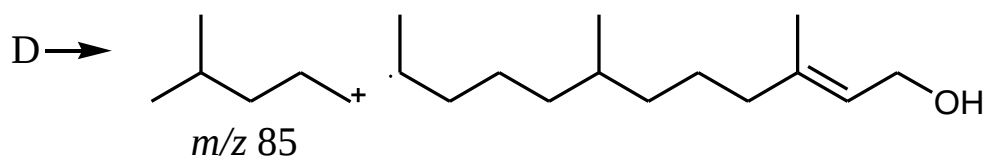
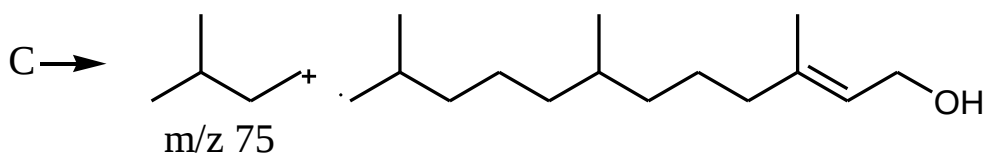
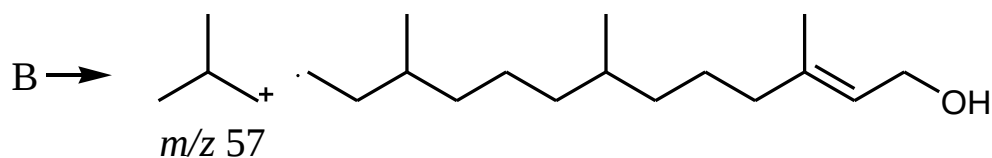
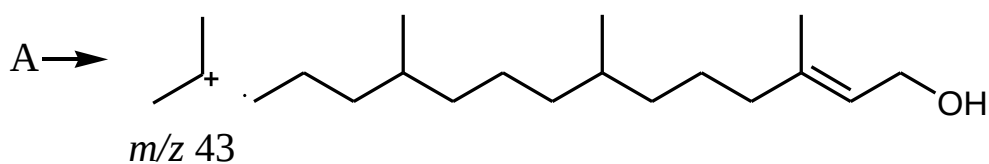
Inicialmente vale ressaltar que os espectros de massa da biblioteca compõe uma base informações adquirida do *NIST* (*National Institute of Standards and Technology*). Esses espectros são gerados em condições padrões, com concentrações bem definidas (com padrões ou amostras puras). Apesar dos espectros de massas serem função intrínseca da estrutura molecular, estes são influenciados por fatores como: pureza da amostra, tipo de fonte de ionização

utilizada, no caso de acoplamento com cromatografia gasosa, a rampa de temperatura tem influência; todos esses fatores podem gerar diferenças entre espectros de massas da mesma molécula. No caso da amostra W35FA 2.1, pode-se concluir que a técnica de cromatografia possivelmente não foi capaz de separar totalmente o fitol **1** dos outros compostos da mistura, resultado em vários íons de baixa intensidade que não resultam do padrão de fragmentação do fitol.

Analizando o espectro de massas do fitol, figura 49, não se observa a formação do íon molecular (m/z 296), o que era esperado, já que álcoois normalmente possuem a intensidade do íon molecular bem baixa ou ausente. Essa característica deve-se ao processo de desidratação que tem efeito crescente com o aumento da cadeia do álcool, que pode ser térmica ou causada pela fragmentação do íon molecular. Nas análises de CG-EM, a desidratação térmica é altamente pronunciada devido ao aquecimento durante a análise (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010). A figura 50 mostra o mecanismo de desidratação térmica para o fitol e a uma proposta de formação dos íons m/z 278 e 67 (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010).

clivagens σ genéricaR, R' e R'' = H, CH₂ ou CH₃

(varia de acordo com o ponto de quebra)

clivagens σ do fitolionização por
elétron em diferentes pontos**Figura 51:** Proposta de fragmentação da porção alceno do fitol **1**.

Continuando a proposta de fragmentação a figura 52 contém a fragmentação do fitol **1** com formação dos íons m/z 278, 123, 68 e 53.

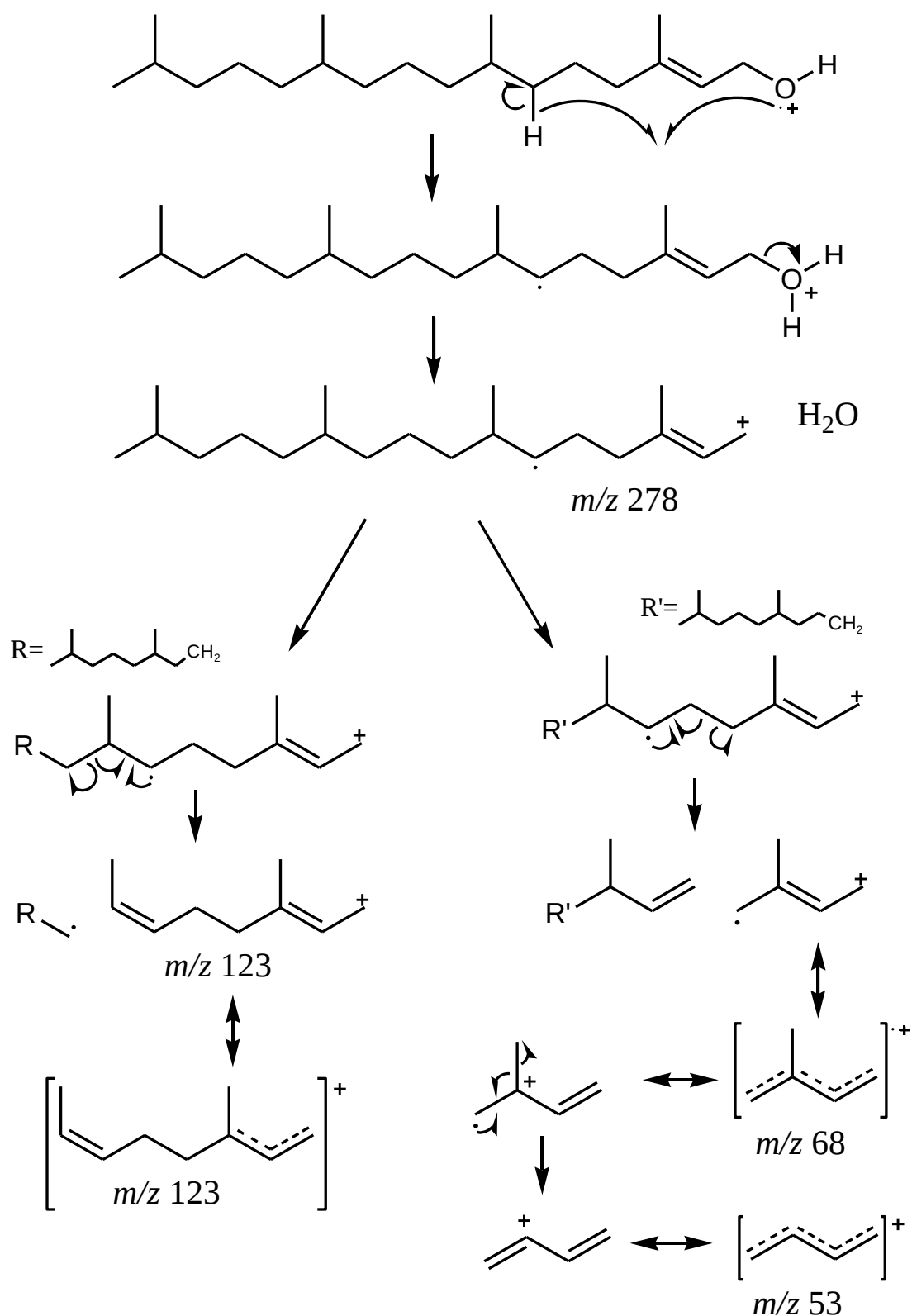


Figura 52: Proposta de fragmentação do fitol **1** com formação dos íons m/z 278, 123, 68 e 53.

A figura 53 apresenta uma proposta de fragmentação para os íons formados pela a partir do íon m/z 123.

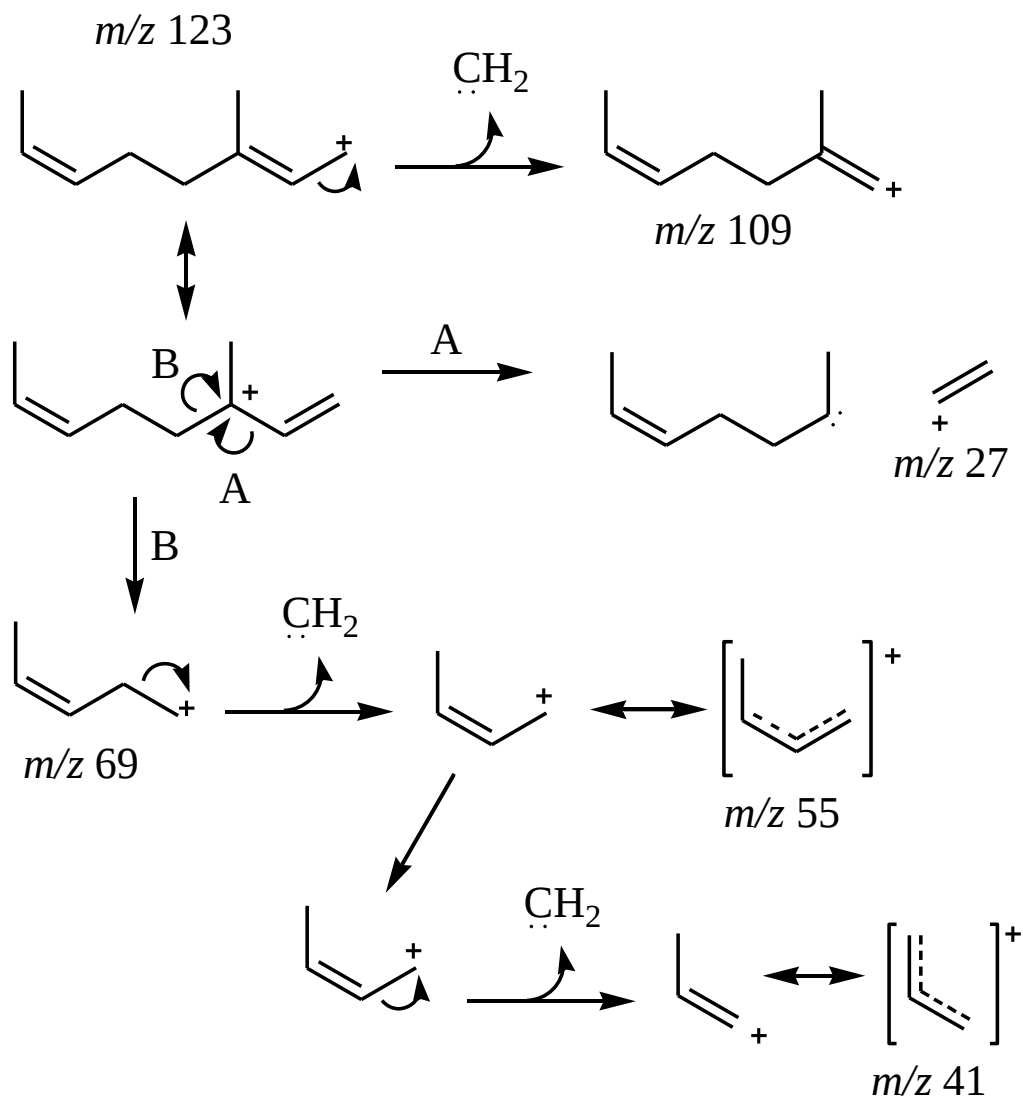


Figura 53: Proposta de fragmentação do fitol **1**, íons formados a partir da segmentação do íon m/z 123.

Pode-se notar que a proposta de segmentação leva as estruturas com capacidade de deslocalizar a carga ou de deslocalizar o elétron desemparelhado e carga ao mesmo tempo. Todos esses fatores contribuem para a estabilidade desses íons, o que resulta em sua maior intensidade no espectro.

A análise por CG-IE-EM da fração W35FA 2.3, por sua vez, também levou a identificação do fitol **1**. A análise comparativa com a biblioteca do equipamento revelou que o pico de tempo de retenção (t.r.) 6,875 min, obteve 93 % de similaridade com o espectro da biblioteca (figura 54).

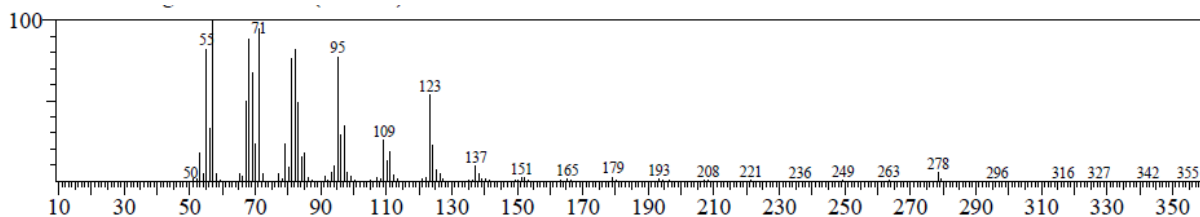


Figura 54: Espectro de massas do fitol **1** obtido da fração W35FA 2.3. Espectro de intensidade(%) versus m/z .

A análise da fragmentação do fitol obtido nesta fração é idêntica ao obtido da fração W35FA 2.1.

A fração W35FA 3.4.3.3 foi analisada por CG-IE-EM e o pico de tempo de retenção (t.r.) 19,708 min foi comparado com a biblioteca do equipamento que revelou um índice de similaridade (i.s.) de 85% para o sitosterol **2** (figura 55).

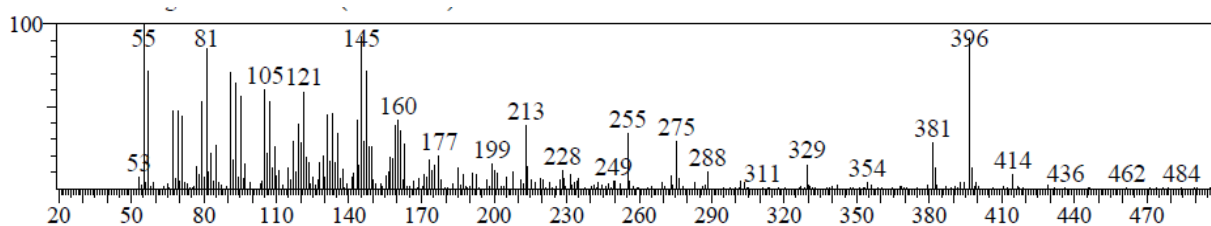


Figura 55: Espectro de massas do sitosterol **2** obtido na fração W35FA 3.4.3.3. Espectro de intensidade(%) versus m/z .

A análise de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração W35FA 3.4.3.3 apresentou um dubleto largo em δH 5,36 (d, $J = 4$ Hz) que é compatível com valores da literatura para o hidrogênio olefínico do sitosterol **2** (ZANON, PERREIRA, BOSCHETTI *et al.*, 2008) (figura 56).

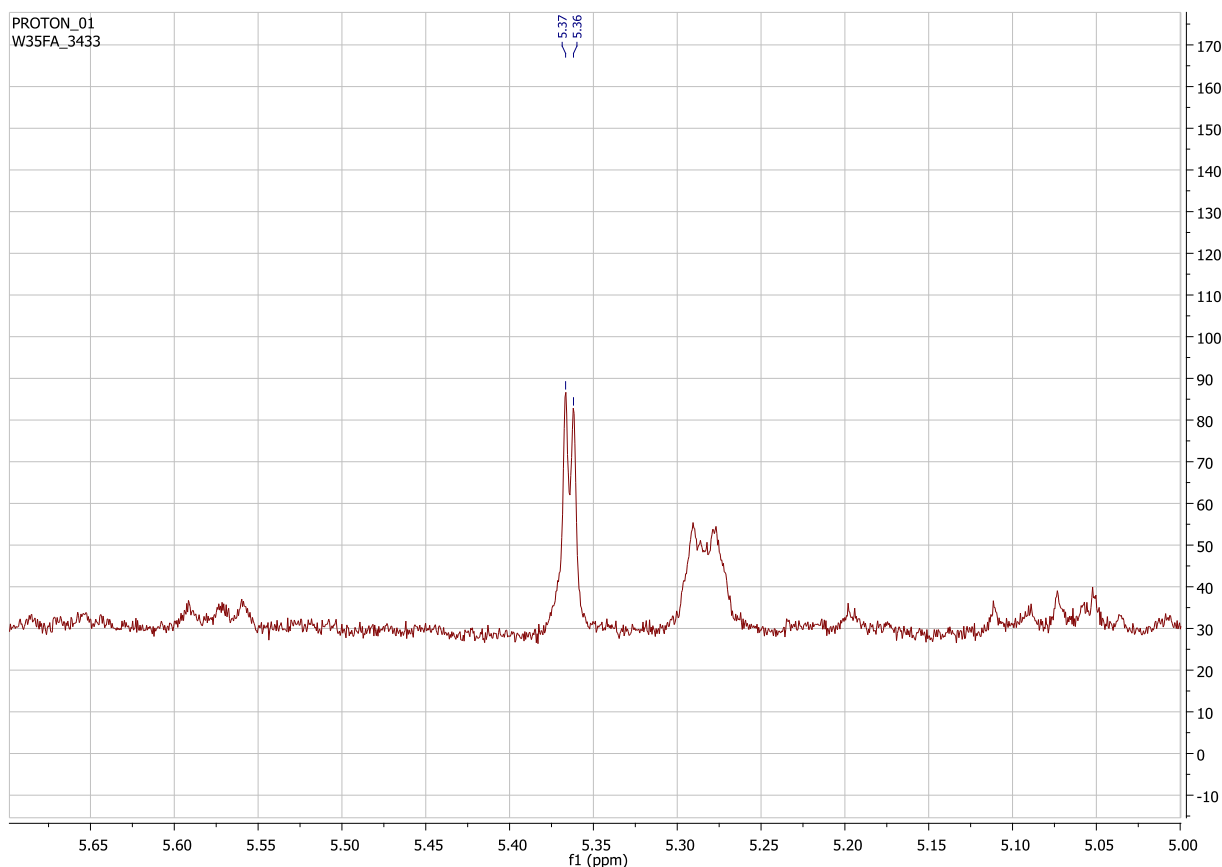


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.3.3 entre 5,00 e 5,70 ppm.

A fração W35FA 3.4.4.1 foi analisada por CG-IE-EM. Através da comparação dos espectros de massas obtidos com a biblioteca do equipamento, identificaram-se quatro compostos nessa fração: fitol **1** (t.r.: 5,458; is: 92%), campesterol **4** (t.r.: 18,050; is: 83%), estigmasterol **3** (t.r.: 18,525; i.s.: 87%) e sitosterol **2** (t.r.: 19,758; i.s.: 87%). As estruturas dos esteroides isolados estão dispostas na figura 57, em que se pode observar que os três só se diferenciam pela cadeia lateral em C17.

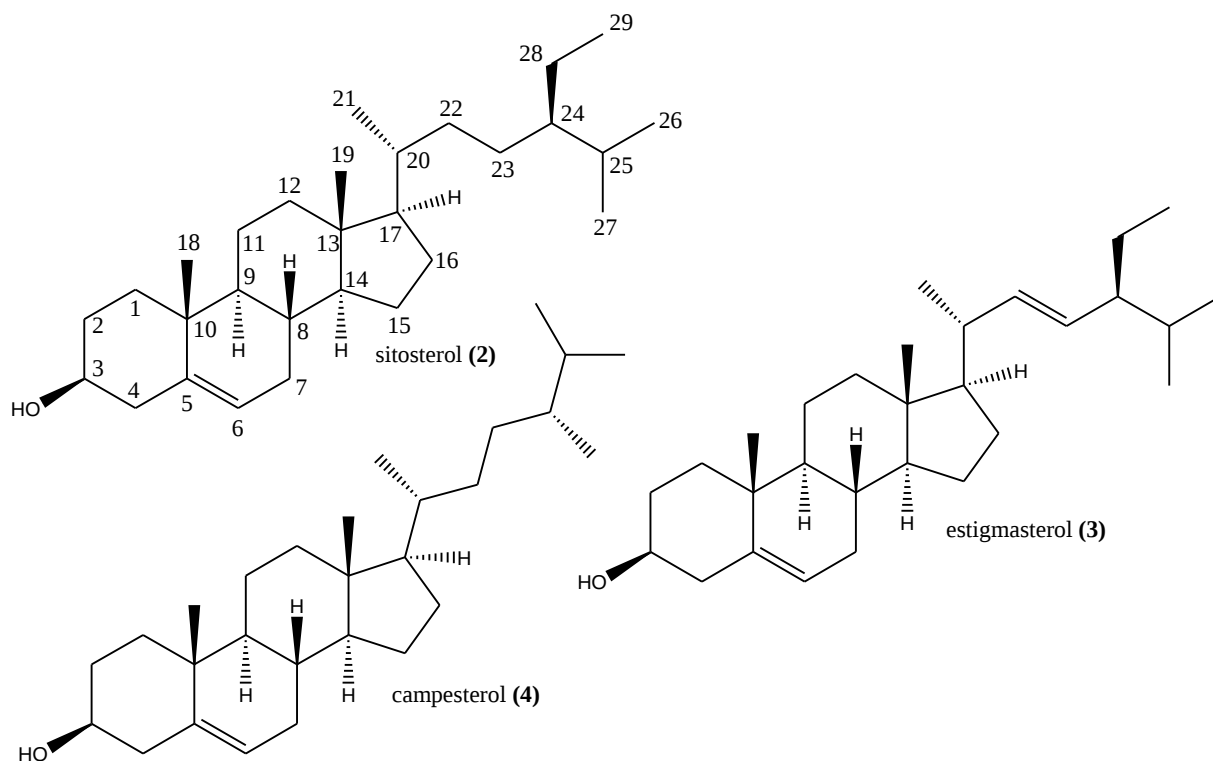


Figura 57: Esteroides isolados da fração W35FA 3.4.4.1.

Seguem as figuras 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 e 65 com os espectros de massa obtidos e da biblioteca do equipamento, para cada um dos esteroides identificados e do fitol **1**, o qual já teve o espectro de massas discutido anteriormente.

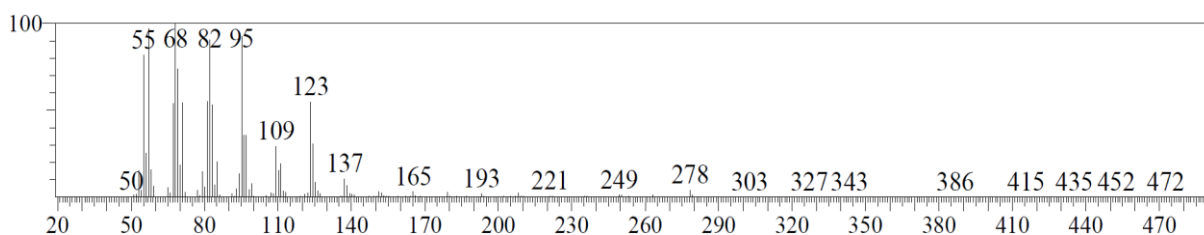


Figura 58: Espectro de massas do fitol **1** da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade (%) versus m/z .

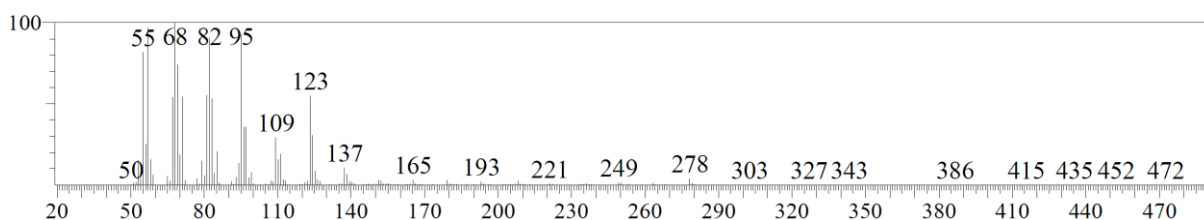


Figura 59: Espectro de massas do fitol **1** da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade (%) versus m/z .

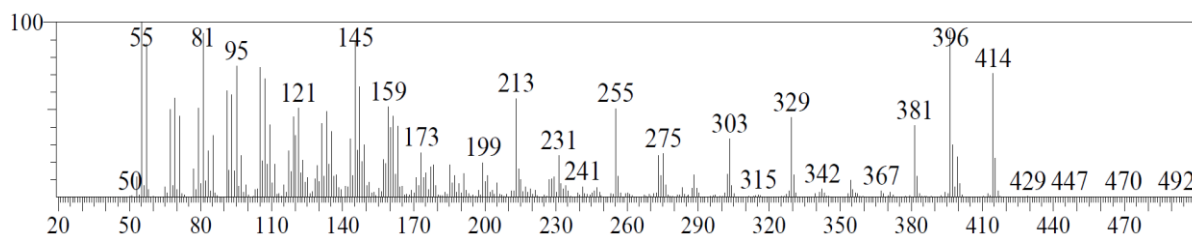


Figura 60: Espectro de massas do sitosterol **2** da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) *versus* m/z .

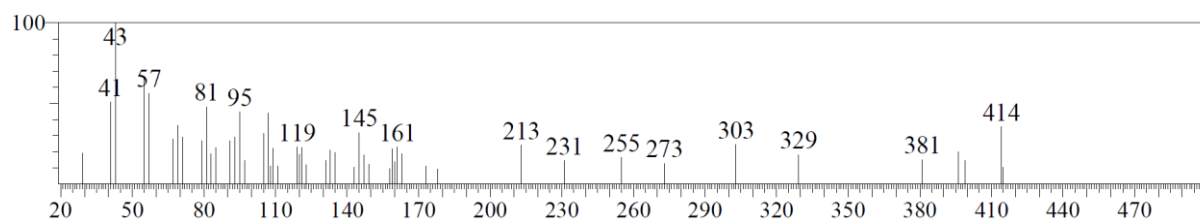


Figura 61: Espectro de massas do sistosterol **2** da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) *versus* m/z .

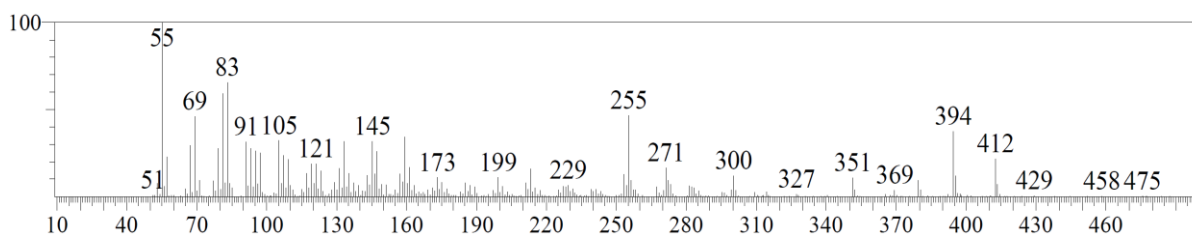


Figura 62: Espectro de massas do estigmasterol **3** da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) *versus* m/z .

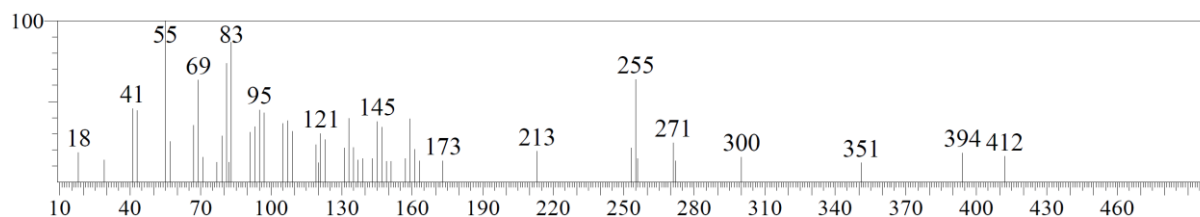


Figura 63: Espectro de massas do estigmasterol **3** da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) *versus* m/z .

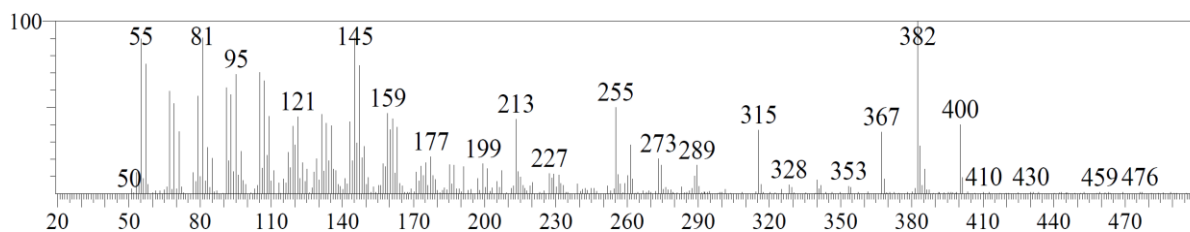


Figura 64: Espectro de massas do campesterol **4** da fração W35FA 3.4.4.1. Espectro de intensidade relativa (%) versus m/z .

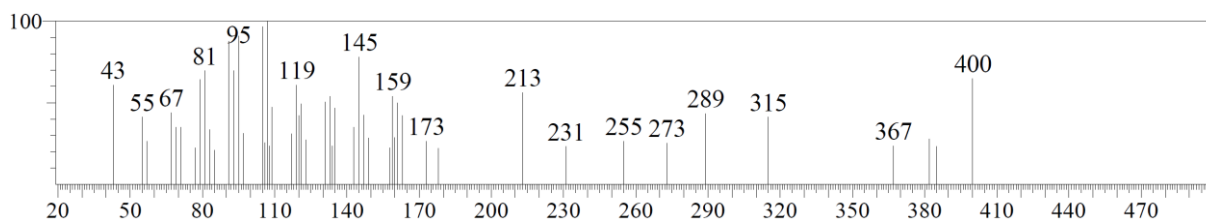


Figura 65: Espectro de massas do campesterol **4** da biblioteca do equipamento. Espectro de intensidade relativa (%) versus m/z .

O primeiro íon que se leva em consideração na identificação de uma molécula é o íon molecular ($[M]^{+}$). Os três esteroides podem formar o íon molecular facilmente por ionização na função álcool ou na dupla ligação em C5-C6. No caso do estigmasterol, ainda seria possível a ionização na dupla ligação em C22 (dupla ligação na cadeia lateral) (figura 66) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010).

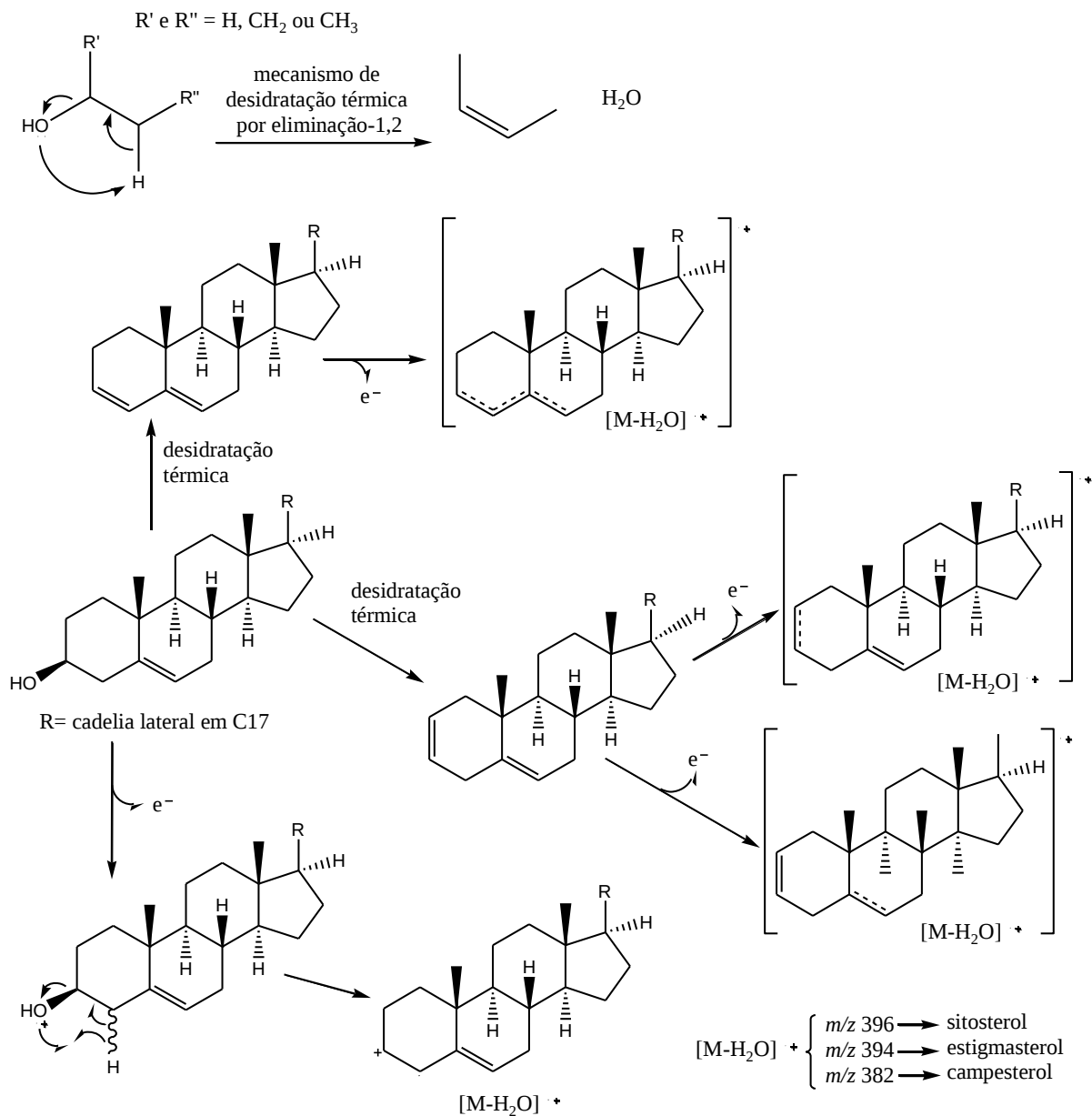


Figura 67: Proposta de formação dos íons $[M-H_2O]^{\bullet+}$.

Outro íon característico aos três esteroides é o formado pela perda de água e de CH_3 , $[\text{M}-(\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3)]^{+}$, este pode ser formado pela desidratação térmica, seguida de ionização por elétrons com posterior eliminação do grupo metil (figura 68).

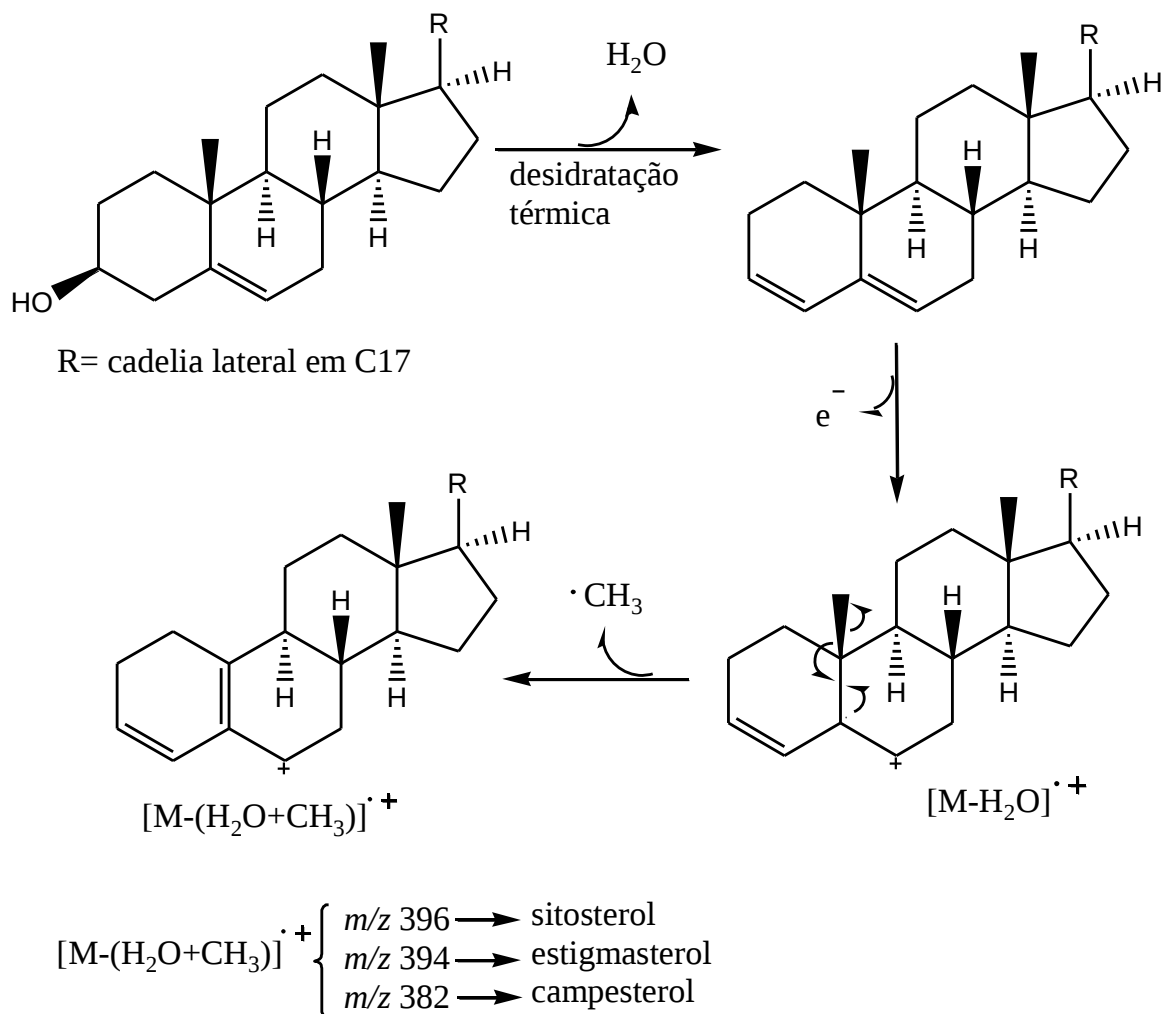


Figura 68: Proposta de mecanismo generalizado de formação do íon $[\text{M}-(\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3)]^{\cdot+}$.

A tabela 8 apresenta, de maneira resumida, as razões massa/carga (m/z) dos íons moleculares de cada esteroide, bem como das perdas de 18 Da (água) e de 33 Da (perda de água e metil).

Tabela 9: Tabela comparativa com o íon molecular, a perda de água e a perda de água e metil de cada esteroide.

	$[\text{M}]^{++} (m/z)$	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{++} (m/z)$	$[\text{M}-(\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3)]^{++} (m/z)$
sitosterol	414	396	381
estigmasterol	412	394	379
campesterol	400	382	367

$-\text{H}_2\text{O}$ = perda de água; $-\text{H}_2\text{O} - \cdot\text{CH}_3$ = perda sequencial de água e metila;

Analisando da tabela 8, observa-se que a diferença de massa entre os íons se repete, o que facilmente leva a distinção dos esteroides: dois Da do sitosterol para o estigmasterol e doze Da do estigmasterol para o campesterol.

Estruturalmente esses três esteroides só se diferenciam na cadeia lateral em C17, sendo que as fragmentações que ocorrem nessa parte da estrutura são também de grande valia para a identificação destes compostos. As figuras 69, 70 e 71 apresentam algumas propostas de mecanismo dessas fragmentações.

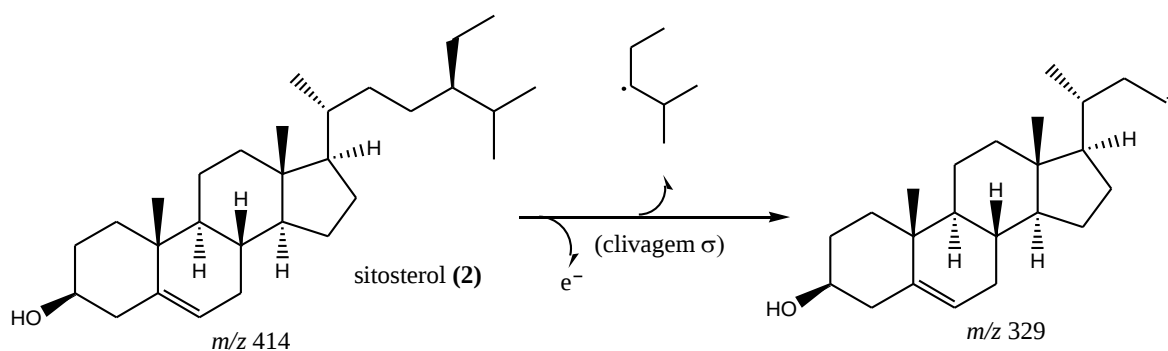


Figura 69: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do sitosterol (2).

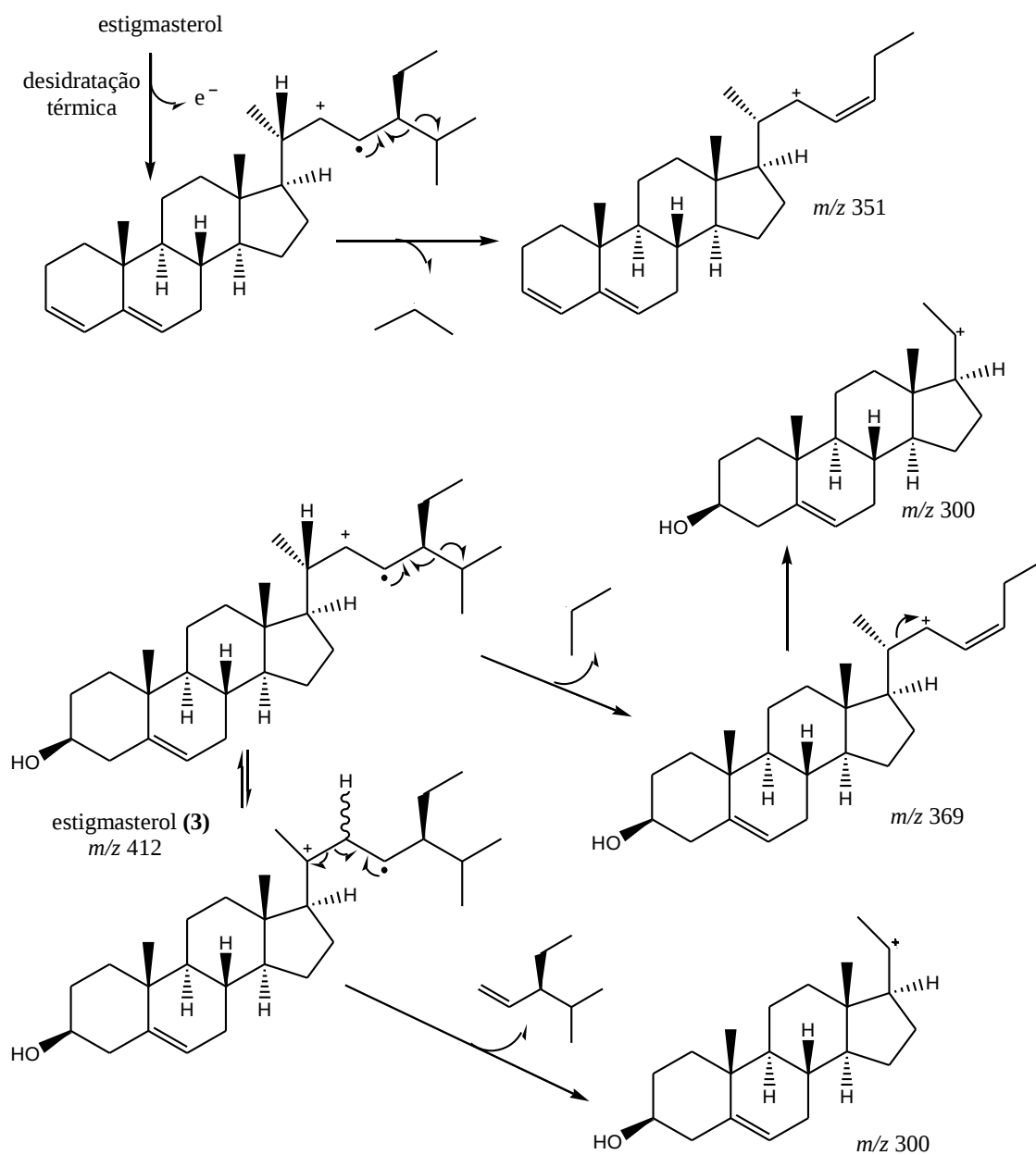


Figura 70: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do stigmasterol (3).

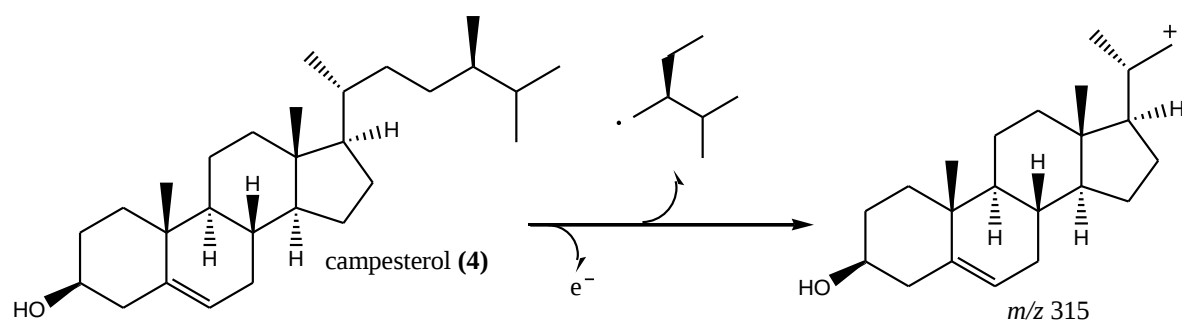


Figura 71: Proposta de fragmentação por clivagem σ da cadeia lateral do campesterol (4).

Outras fragmentações comuns aos três esteroides, que não levam a distinção entre eles, mas colaboram para compreensão do espectro é a formação dos íons m/z 57 e 105 (figura 72 e 73) (PRETSCH, BÜHLMANN e AFFOLTER, 2000; PAVIA, LAMPMAN, KRIZ *et al.*, 2010).

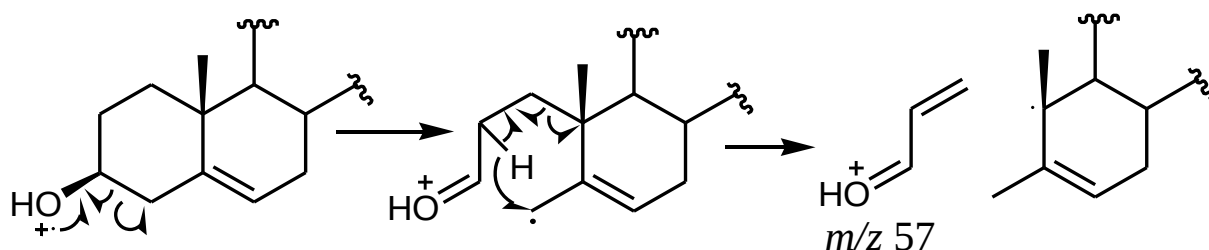


Figura 72: Proposta de fragmentação com formação do íon de m/z 57.

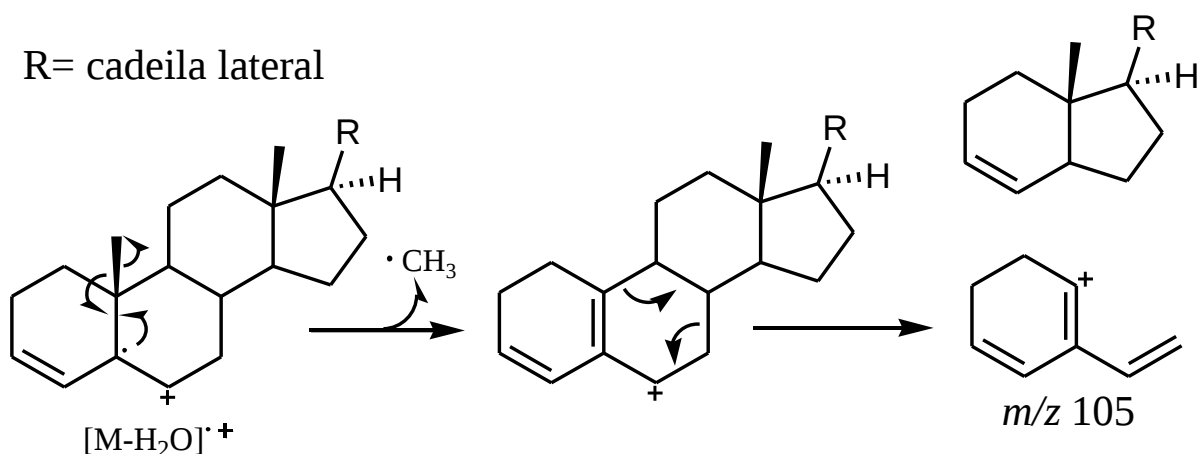


Figura 73: Proposta de fragmentação com formação do íon m/z 105.

A fragmentação com perda da cadeia lateral, antes ou depois de desidratação térmica, também constitui um mecanismo de fragmentação que leva a íons comuns a todas as estruturas (figura 74).

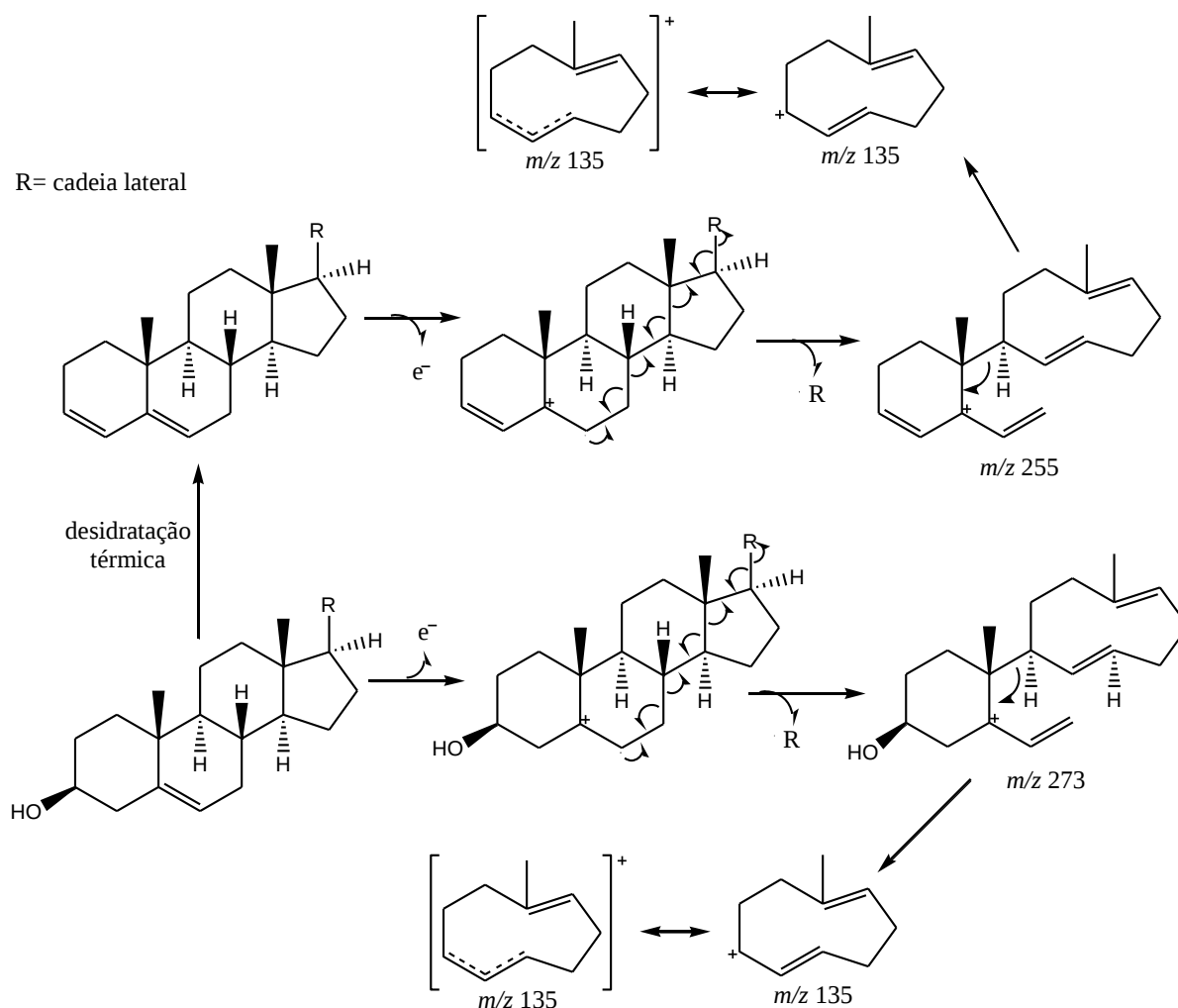


Figura 74: Proposta de fragmentação com formação dos íons m/z 255 e 273.

Todas as fragmentações propostas levam à formação de íons presentes nos espectros de massas, e assim auxiliam na confirmação das estruturas dos esteroides.

A análise de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração W35FA 3.4.4.1 apresentou um sinal em δH 5,35 (d , $J = 5,3$ Hz), referente ao hidrogênio olefínico H-6, comum aos três esteroides (figuras 75 e 76). (ZANON, PERREIRA, BOSCHETTI *et al.*, 2008; CHO, LEE, D, LEE, J, 2009; SILVA, 2013).

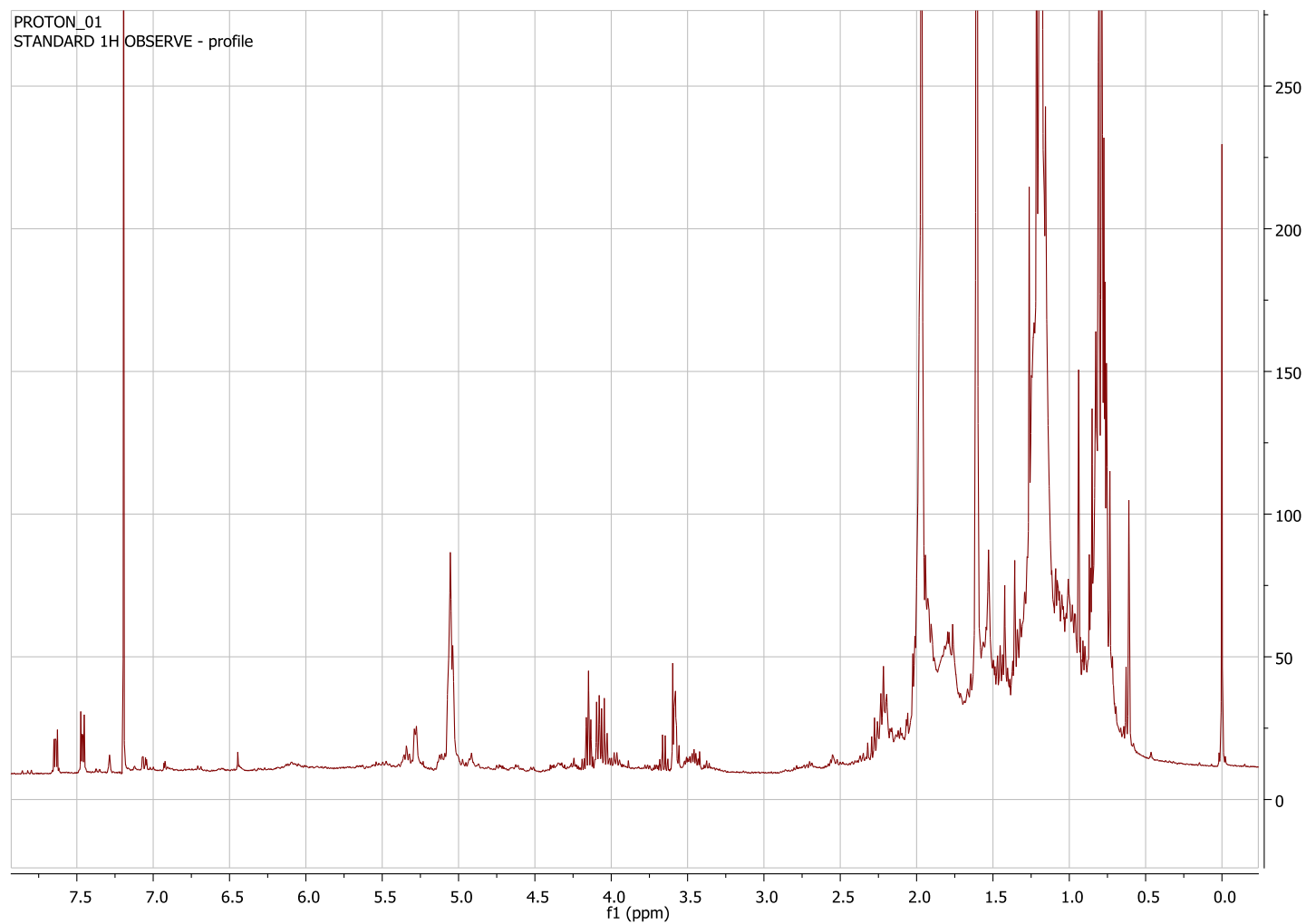


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.4.1

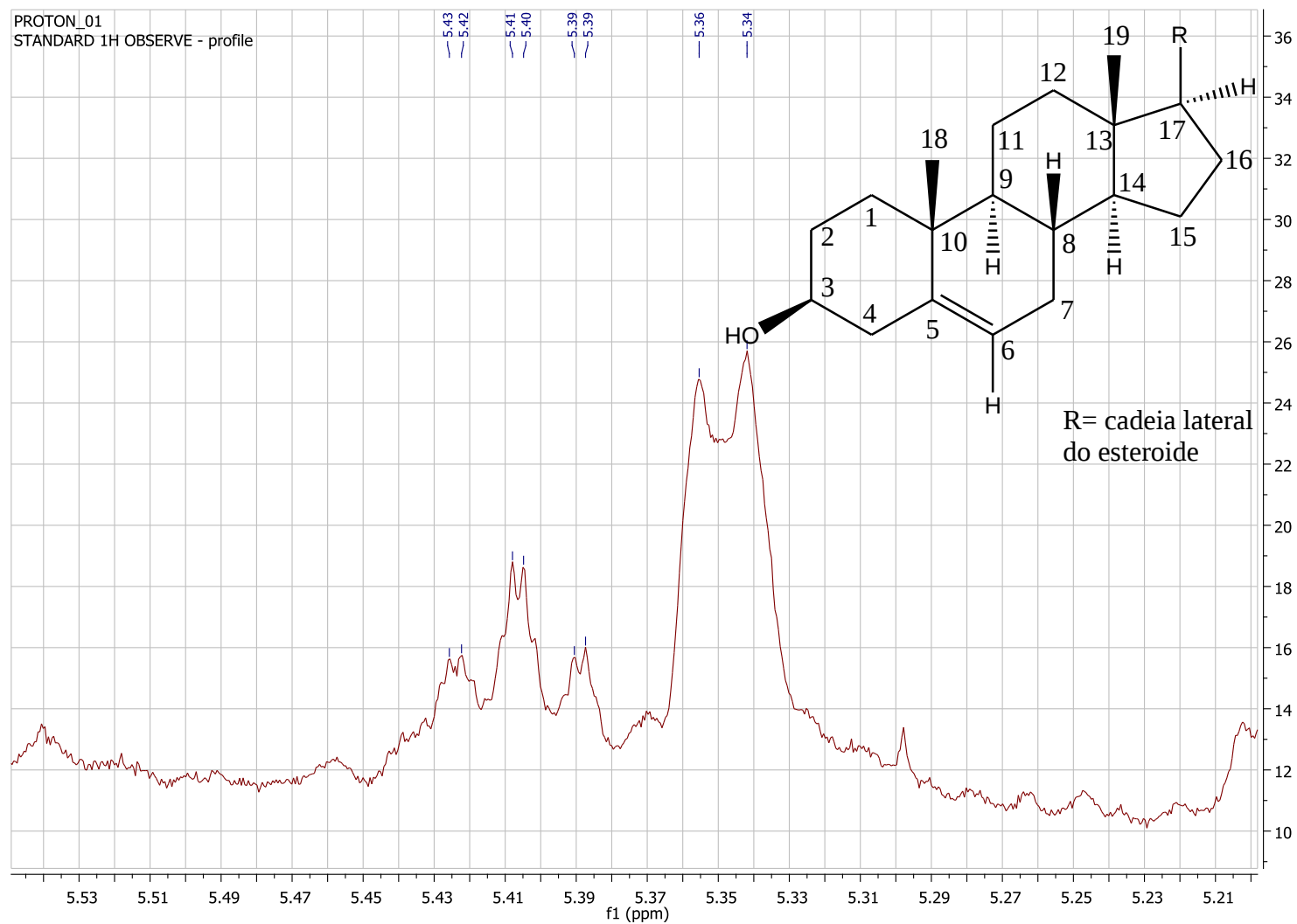


Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a FA 3.4.4.1 entre 5,22 e 5,60 ppm.

As frações W35FA 4, W35FA 5, W35FA 6 e W35FA 7 foram fracionadas, por CC com sílica gel, sendo que todas as subfrações resultantes destas foram analisadas por CCD e CLAE. As análises em CCD resultavam em um perfil com baixa resolução (não haviam manchas bem definidas). Após várias diluições e tentativas foi possível obter uma melhor resolução, normalmente o perfil era composto por uma ou duas manchas verdes muito próximas e, às vezes, uma mancha amarelada. O perfil cromatográfico das amostras por CLAE pode ser resumido no seguinte conjunto de sinais: um sinal com tempo de retenção próximo a 5,5 minutos referente à presença de clorofila, e um conjunto de 3 sinais em torno de 40 minutos referentes a ftalatos, como observado por GALVÃO (2013), com aparecimento de poucos sinais de baixíssima intensidade em alguns perfis.

As doze subfrações resultantes de W35FH foram analisadas por CCD, observadas sob luz UV (256 nm) e posteriormente reveladas com solução ácida de vanilina. A amostra W35FH 7 apresentou uma mancha de intensa coloração, visível somente após a revelação com solução ácida de vanilina, manchas similares, porém com baixíssima intensidade foram observadas nas amostras W35FH 1 à 7 e 8. As amostras foram posteriormente analisadas por CG-IE-EM na tentativa de identificar os terpenos presentes além de outras substâncias.

A fração W35FH 1 demonstrou ser composta por uma mistura, tendo em sua maioria hidrocarbonetos de cadeia longa como: 1-docoseno (t.r.: 6,267; is: 96%), eisocosano (t.r.: 6,800; is: 95%), heptacosano (t.r.: 9,128; is: 94%), pentatriacontano (t.r.: 15,858; is: 94%).

A fração W35FH 2 demonstrou ser composta por um contaminante do solvente utilizado, um diéster do ácido ftálico (t.r.: 9,429; is: 95%) (figura 77), a figura 78 apresenta uma proposta de fragmentação com a formação dos íons m/z 167 e 149, comuns a esses derivados do ácido ftálico (JEILANE, CARDENILO e IBEANUSI, 2011). Os derivados ftálicos são produzidos por diversas espécies de plantas, sendo sua presença facilmente indicada pelos íons m/z 167 e 149, em especial o íon m/z 149 geralmente aparece com grande intensidade no espectro. A análise prévia do solvente utilizado por CG-IE-EM possibilitou a confirmação que este era um contaminante e não um PN nas amostras de *P. venusta*.

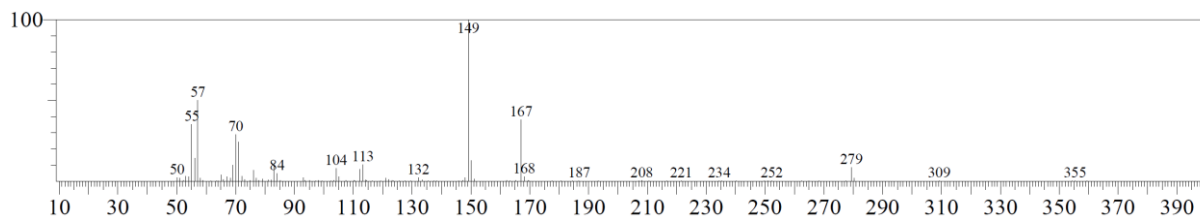


Figura 77: Espectro de massas do diéster do ácido ftálico da fração W35H 2. Espectro de intensidade relativa (%) versus m/z .

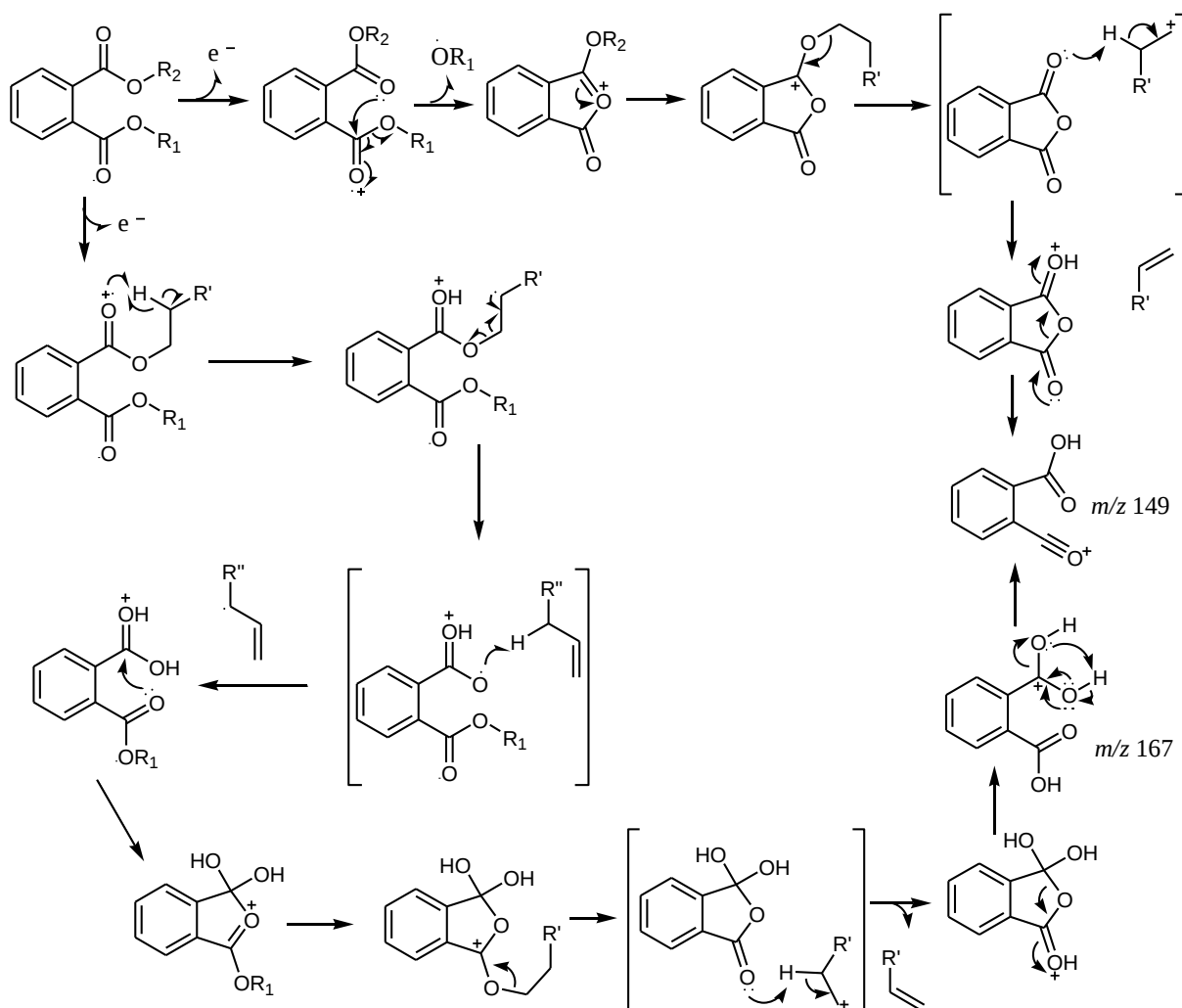


Figura 78: Esquema de fragmentação do ftalato com formação dos íons m/z 167 e 149 (JEILANE, CARDENILO e IBEANUSI, 2011).

Da análise da amostra W35FH 3 foi possível observar a presença de pequena quantidade de diéster do ácido ftálico (t.r.: 9,422; is: 82%) e de alguns ésteres de ácidos orgânicos como o hexadecanoato de butila (t.r.: 7,014; is: 88%). As amostras

W35FH 4 a 6 eram compostas basicamente por uma mistura de ésteres de ácidos orgânicos de cadeia longa.

A subfração W35FH 7 apesar de ser composta também por uma mistura de ésteres, apresentou um sinal majoritário identificado como fitol **1** (t.r.: 6,892; is: 94%), cujo espectro de massas já foi discutido. A amostra W35FH 8 apresentou fitol **1** (t.r.: 6,881; is: 94%) em pequena quantidade, sendo formada basicamente por ésteres.

5. CONCLUSÕES

O estudo químico das folhas de *P. venusta* levou à identificação do diterpenoide fitol, e de três esteroides: sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Os testes fitoquímicos preliminares permitiram verificar o perfil das amostras (extrato bruto, frações acetato de etila e hexano), sendo encontradas as seguintes classes de compostos: esteroides, flavonas e cumarinas. A presença dessas classes de compostos pode justificar alguns dos usos de *P. venusta* na medicina popular.

O potencial antioxidante das três amostras foi testado sob duas metodologias, obtendo-se maior confiabilidade dos resultados. O teste do DPPH resultou em valores de IC₅₀ de 38,62 µg/mL para a fração acetato de etila, 79,72 µg/mL para a fração hexano e 83,04 µg/mL para o extrato bruto. O teste do radical ABTS resultou em valores de IC₅₀ menores que o do teste do DPPH, sendo de 27,58 µg/mL para a fração acetato de etila, 58,09 µg/mL para a fração hexano e 42,86 µg/mL para o extrato bruto. Os resultados confirmam que *P. venusta* pode ser considerada um fonte natural de antioxidantes, sendo que em ambas as metodologias a fração acetato de etila foi a que apresentou maior potencial antioxidante.

O teor de flavonoides calculado em relação à massa de folhas secas de *P. venusta* é consideravelmente baixo, 1,02±0,05% (m/m), porém o teor em relação à massa de extrato, 148,5±7,65 µg/mg de extrato (14,85 % (m/m)), esse valor justifica a capacidade antioxidante das folhas de *P. venusta*, visto que os flavonoides são agentes antioxidantes. Esses resultados provam que o processo de extração utilizado, maceração com etanol e acetado de etila, foi capaz de extrair um grande teor de flavonoides.

Os ensaios de inibição de catepsinas, com o extrato bruto, apresentaram valores baixos, mesmo na maior concentração (125 µg/mL): 32% para a catepsina V e 30% para a K.

O teste de viabilidade celular demonstrou que o extrato bruto e a fração acetato de etila apresentam toxicidade aos macrófagos (imunotoxicidade), porém, a fração hexano demonstrou ter bons valores de viabilidade celular. Todavia, os resultados de viabilidade para os anti-inflamatórios comerciais, demonstram que estes também possuem toxicidade, em pelo menos uma concentração utilizada,

assim, não se devendo excluir o extrato bruto e a fração acetato de etila de trabalhos posteriores de avaliação de efeito anti-inflamatório.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA M.; AGUIAR, R. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quím. Nova*, **33(10)**, 2202-2210, 2010.
- AMARI, N. O.; BOUZOUINA, M.; BERKANI, A.; LOTMANI, B. Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, **4(2)**, 104-109, 2014.
- BAE, G. U.; SEO, D. W.; KWON, H. K.; LEE, H. Y.; HONG, S.; LEE, Z. W.; HA, K. S.; LEE, H. W.; HAN, J. W. Hydrogen Peroxide Activates p70S6k Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*, **274(46)**, 32596-32602, 1999.
- BARRETE, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H. L-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.*, **201**, 189-198, 1982.
- BLATT, C. T. T.; SANTOS, M. D.; SALATINO, A. Flavonoids of *Bignoniaceae* from the "cerrado" and their possible taxonomic significance. *Plant Syst. Evol.*, **210**, 289-292, 1998.
- BOGLIOLO, L. Bogliolo Patologia. 7ª Ed. Brasileira: Guanabara Koogan, 2006. 130 p.
- BOISCLAIR, M. D.; EGAN, D. A.; HUBERMAN, K.; INFANTINO, R. Anticancer Drug Development Guide. 2ª Edição: Humam Press, 2004. 451 p.
- BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quím. Nova*, **32(3)**, 679-688, 2009.
- BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; FONSECA, L. M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 133-141, 2012.
- BURKE, R. W.; DIAMONDSTONE, R. A.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clin. Chem.*, **20(7)**, 794-801, 1974.

- CARDOZO, N. P.; PARREIRA, M. C.; ALVES, P. L.; BIANCO, S. Foliar área estimate of two sugarcane-infesting weeds using leaf blade linear dimensions. *Planta Daninha*, **27**, 683-687, 2009.
- CHI, Y.; NAKAMURA, M.; ZHAO, X.; YOSHIZAWA, T.; YAN, W.; HASHIMOTO, F.; KINJO, J.; NOHARA, T. A Monoterpene Alkaloid from *Incarvillea sinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **53(9)**, 1178-1179, 2005.
- CHIONG, H. S.; YONG, Y. K.; AHMAD, Z.; SULAIMAN, M. R.; ZAKARIA, Z. A.; YUEN, K. H.; HAKIM, M. N. Cytoprotective and enhanced anti-inflammatory activities of liposomal piroxicam formulation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 1245–1255, 2013.
- CHO, J.; LEE, D.; LEE, J.; LEE, D.; LEE, Y.; KIM, S.; KIM, S.; BAEK, N. Acyclic Diterpenoids from the Leaves of *Capsicum annuum*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **58**, 128, 2009.
- CHOUDHURY, S.; DATTA, S.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, M. D. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae- A review. *Biological and Environmental Sciences*, **7**, 145-150, 2011.
- CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. *Nutrition*, **12(4)**, 274-277, 1996.
- COPELAND, R. A. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. John Wiley e Sons, New Jersey, 2005, 294p.
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61**, 71-76, 1998.
- COSTA, A. F. Farmacognosia. 3. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.
- COSTA, A. G.; CUSANO, N. E.; SILVA, B. C.; CREMERS, S.; BILEZIKIAN, J. P. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **7**, 447–456, 2011.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12(4)**, 564-584, 1999.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **17(4)**, 598-603, 2007.

DERKSEN, G. C. H. **Analysis and isolation of anthraquinones from madder roots (*Rubia tinctorum*)**. Tese. Wageningen Universiteit, 2001.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord.*, **2**, 95-107, 2003.

DINDA, B.; DE, U. C.; BHATTACHARYA, A.; ARIMA, S. SATO, N.; HARIGAYA, Y. Chemical constituents of *Argyrea argentea*, *Millingtonia hortensis* and *Pyrostegia venusta*. *J. Ind. Chem. Soc.*, **79**, 291-293, 2002.

DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; CLOUTIER, A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**, 897-902, 2009.

DUCREY, B.; WOLFENDER, J. L.; MARSTON, A.; HOSTETTMAN, K. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry*, **38(1)**, 129-137, 1995.

Farmacopéia Brasileira: generalidades e métodos de análise. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FEKI, H.; KOUBAA, I.; DAMAK, M. Secondary metabolites and antioxidant activity of seed extracts from *Solanum elaeagnifolium* Cav. *Mediterranean Journal of Chemistry*, **2(5)**, 639-647, 2014.

FERNANDES, A. P.; RIBEIRO, G. E.; RUFINO, L. R. A.; SILVA, L. M.; BORIOLO, M. F. G.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese "in vivo", e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular "in vitro". *Revista Medica de Minas Gerais*, **21**, 264-274, 2011.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. *Quim. Nova*, **23(1)**, 42-46, 2000.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.*, **24**, 1043-1048, 2011.

FRICKER, S. P. Cysteine proteases as targets for metal-based drugs. *Metallomics*, **2**, 366-377, 2010.

GALVÃO, D. C. **Estudos Fitoquímico e Biológico de *Pachystroma longifolium* (Nees) I. M. Johnst (Euphorbiaceae).** Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013. 53 p.

GEBER, M.; BOUTRON-ROUALT, M.C.; HERCBERG, S.; RIBOLI, E.; SCALBERT, A.; SIESS, M. H. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*, **89**, 293-312, 2002.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*, **94**, 57-63, 1986.

GLOBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, **3(2)**, 374-381, 2007.

GÜLÇİN, I.; BURSA, E.; ŞEHİTOĞLU, M. H.; BILSEL, M.; GÖREN, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 2227-2238, 2010.

GÜLÇİN, I.; TOPAL, F.; ÇAKMAKÇI, R.; BILSEL, M.; GÖREN, A. C.; ERDOĞAN, U. Pomological Features, Nutritional Quality, Polyphenol Content Analysis, and Antioxidant Properties of Domesticated and 3 Wild Ecotype Forms of Raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Sciences*, **76**, 585-593, 2011.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids - VI.: flavonoids patterns in the bignoniaceae and the gesneriaceae. *Phytochemistry*, **6(12)**, 1643-1651, 1967.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2ª Ed. New York: Champman e Hall, 1984. 89 p.

HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. *Drug Discovery Today*, **13**, 894-901, 2008.

HARVEY, A. L. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, **5**, 294-300, 2000.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med.*, **8**, 63, 2008.

HOFFMANN, W.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry. 3^a Ed. San Francisco: John Wiley & Sons, 2007.

HOLTON, R. A.; KIM, H.; SOMOZA, C.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K. K. GENTILE, L. N.; LIU, J. H. First Total Synthesis of Taxol. 2. Completion of the C and D Rings. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1599-1600, 1994.

JANG, M.; JEONG, S.; CHO, S. K.; AHM, K. S.; LEE, J. H.; YANG, D. C.; KIM, J. Anti-Inflammatory Effects of an Ethanolic Extract of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Med. Food*, **17(6)**, 678-685, 2014.

JEEVA, S.; JOSELIN, J.; BRINTHA, T. S. S.; FLORENCE, A. R. Phytochemical evaluation of Bignoniaceae flowers. *J. Chem. Pharm. Res.*, **5(4)**, 106-111, 2013.

JEILANE, Y. A.; CARDENILA, B. H.; IBEANUSI, V. M. Density Functional Theory and Mass Spectrometry of Phthalate Fragmentations Mechanisms: Modeling Hyperconjugated Carbocation and Radical Cation Complexes with Neutral Molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22**, 1999-2010, 2011.

JIMEÑEZ, J. P.; CALIXTO, F. S. Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5036-5040, 2005.

KARIMI, E.; OSKOEIAN, E.; HENDRA, R.; JAAFAR, H. Z. E. Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules*, **15**, 6244-6256, 2010.

KATAVIC, P. L. **Chemical investigations of the alkaloids from the plants of the family Elaeocarpaceae.** Tese. School of Science/Natural Product Discovery (NPD) Faculty of Science, Griffith University, Austrália, 2005.

KENNEDY, D. W.; ABKOWITZ, J. L. Kinetics of Central Nervous System Microglial and Macrophage Engraftment: Analysis Using a Transgenic Bone Marrow Transplantation Model. *Blood*, **90(3)**, 986-993, 1997.

- KIM, I. T.; PARK, H. J.; NAM, J. H.; PARK, Y. I.; WON, J. H.; CHOI, J.; CHOE, B. K.; LEE, K. T. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis*. *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 607-615, 2005.
- KRISHNA, V.; SHAMA, S.; PAREEK, R. B.; SINGH, P. Terpenoid constituents from some indigenous plants. *J. Ind. Chem. Soc.*, **79**, 550-552, 2002.
- KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S.. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.*, **204**, 491-500, 2008.
- LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.*, **15(6)**, 279-289, 2007.
- LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.*, **70**, 151-159, 2000.
- LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem. Rev.*, **102**, 4459-4488, 2002.
- LOMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). *Am. J. of Bot.*, **93(2)**, 304–318, 2006.
- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, **1(1)**, 19-27, 2006.
- MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, **14(23/24)**, 1136-1142, 2009.
- MAGALHAES, E. A.; JÚNIOR, G. J. S.; CAMPOS, T. A.; SILVA, L. P. SILVA, R. M. G. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Farmacog.*, **20**, 65-69, 2010.
- MAHMOOD, M.; ZUBERI, H. S.; ASHFAQ, M. K. Nitric Oxide Mediated Effect of Cyclo-Oxygenase Inhibitors. *J. Pak. Med. Assoc.*, **51(2)**, 100, 2001.

- MAMOUD, A. H.; MOTAWA, H. M.; WAHBA, H. E. Study of some antioxidant parameters in Mice Livers affected with *Urtica pilulifer* extracts. *Assian Journal of Biochemistry*, **1(1)**, 67-74, 2006.
- MANDAL, P.; MISRA, T. K.; GHOSAL, M. Free-radical scavenging activity and phytochemical analysis in the leaf and stem of *Drymaria diandra* Blume. *Int. J. Integr. Biol.*, **7(2)**, 80-84, 2009.
- MARQUES, E. F. **Estudos de produtos naturais e derivados sintéticos buscando inibidores seletivos das catepsinas L e V**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, 2011. 152 p.
- MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F., LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIN-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Quim. Nova*, **35(3)**, 517-522, 2012.
- MARTÍNEZ A. **Flavonóides**. Medellín: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, 2005. 20p.
- MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da europa medieval ao Brasil. *Quim. Nova*, **32(9)**, 2501-2507, 2009.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3ª Ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 54 p.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **44(2)**, 2008.
- MONTEIRO, J. M.; ULBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem química à ecologia. *Quim. Nova*, **28(5)**, 892-896, 2005.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63, 1983.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**, 311-335, 2012.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileira. *Quim. Nova*, **13(4)**, 302-307, 1990.

OLIVEIRA, G. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e inibitória das catepsinas b e k de *Miconia ferruginata* (melastomataceae)**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em ciências moleculares, Universidade Federal de Goiás, Anápolis, 2010. 66 p.

OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of bignoniaceae. *J. of Bot.*, **96(9)**, 1731-1743, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S, VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PAL, R.; GIRHEPUNJE, K.; SHRIVASTAV, N.; HUSSAIN, M. M.; THIRUMOORTHY, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia*. *Ann. Biol. Res.*, **2(1)**, 127-131, 2011.

PEREIRA, O. A. Dicionário de Substâncias Farmacêuticas Comerciais. 5ª ed., revisada e ampliada. Rio de Janeiro: ABIQUIF, 2013.

POOL, A. A Review Of the Genus *Pyrostegia* (Bignoniaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **95**, 495-510, 2008.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. Structure Determination of organic compounds. 3ª Ed. Nova York: Springer, 2000.

RANI, M. P.; RAGHU, K. G.; NAIR, M. S.; PADMAKUMARI, K. P. Isolation and Identification of α -Glucosidase and Protein Glycation Inhibitors from *Stereospermum colais*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **173**, 946-956, 2014

ROUSSELOT. Definição e descrição. Disponível em:

<http://www.rousselot.com/pt/gelatina-rousselot/caracterisiticas/definicao-e-descricao/>.

Acessado em 19 de junho de 2014.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, V. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *BMC Compl. Altern. Med.*, **11**, 69-77, 2011.

ROY, P.; AMDEKARA, S.; KUMARB, A.; SINGHC, R.; SHARMAD, P.; SINGH, V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *J. Ethnopharmacol.*, **140**, 186– 192, 2012.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico 127*, EMBRAPA, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. *Comunicado Técnico 128*, EMBRAPA, 2007b.

SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity. *Food Chem.*, **141**, 1512-1521, 2013.

SAMPIETRO, D. A.; CATALAN, C. A. N.; VATTUONE, M. A. Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products. 1^a Ed. USA: Science Publishers, 2009. 288p.

SANTAMARIA, I.; VELASCO, G.; CAZORLA, M.; FUEYO, A.; CAMPO, E.; LOPÉZ-OTÍN, C. Cathepsin L2, a Novel Human Cysteine Proteinase Produced by Breast and Colorectal Carcinomas. *Cancer Res.*, **58**, 1624-1630, 1998.

SANTOS, K. M. P. **Identificação química de flavonóides, taninos e verificação da presença de saponinas nas folhas de mamona branca (*Ricinus communis* L.)**. Monografia. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2007. 17p.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, **21(2)**, 135-140, 1998.

SBFgnosia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA). Saponinas. Disponível em <http://sbfgnosia.org.br/Ensino/saponinas.html>. Acessado em 19 de junho de 2014a.

SBFgnosia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA).Cumarinas. Disponível em <http://sbfgnosia.org.br/Ensino/cumarinas.html>. Acessado em 19 de junho de 2014b.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da terra indígena Ibirama**. Dissertação de Mestrado. Programa Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002, 386 p.

SERAFIN, I. M.; BELLOCCO, R.; WOLK. A.; EKSTROM, A. M. Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, **123**, 985-991, 2002.

SEVERINO, R. P. **Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas**. Tese. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos- SP, 2008. 248 p.

SILVA, E. L. **Estudo Químico-Biológico de *Dalbergia miscolobium* Benth (Fabaceae)**. Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2013. 95 pg.

SILVA, J. A. **Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares**. Tese. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011. 11 p.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim. Nova*, **26(3)**, 407-416, 2003.

SIMONYAN, A. V.; SHINKARENKO, A. L.; OGANESYAN, A. L. Use of the cyanidine reaction in the analysis of flavonoids: I. Absorption spectra of reduction products of flavonoids. *Khim.-Farm. Zh.*, **6(10)**, 59-62, 1972.

SOOD, D.; VENKATESH, R. A. **Review of the Physiological Implications of Antioxidants in Food**. Monografia. Worcester Polytechnic Institute, Massachusetts (United States), 2011.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. 1ª Ed. Ouro Preto: UFOP, 2012. 45 p.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação. UFSC, Florianópolis, 2005. 13 p.

SUN, P.; LIU, Y.; DENG, X.; YU, C.; DAI, N.; YUAN, X.; CHEN, L.; YU, S.; SI, W.; WANG, X.; WU, D.; LIU, S.; PANG, H. An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis. *Phytomedicine*, **20**, 975–979, 2013.

SYAHIDA, A.; ISRAF, D. A.; PERMANA, D.; LAJIS, N. H.; IRAH, K.; AFIZA, A. W.; KHAIZURIN, T. A.; SOMCHIT, M. N.; SULAIMAN, M. R.; NASARUDDIN, A. A. Atrovirone inhibits pro-inflammatory mediator release from murine macrophages and human whole blood. *Immunol. Cell Biol.*, **84**, 250-258, 2006.

TAYLOR, E. L.; MEGSON, I. L.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ.*, **10**, 418-430, 2003.

TEOW, C. C.; TRUONG, V. D.; MCFEETER, R. F.; THOMPSON, R. L.; PECOTA, K. V.; YENCHO, G. C. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.*, **103**, 829-838, 2007.

THOMAS, A. W.; FRIEDEN, A. The gelatin-tannin reaction. *Ind. Eng. Chem.*, **15(8)**, 839-841, 1923.

VARUGHESE, K. I.; AHMED, F. R.; CAREY, P. R.; HASNAIN, S.; HUBER, C. P.; STORER, A. C. Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex. *Biochemistry*, **28**, 1330-1332, 1989.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. *Quim. Nova*, **28(3)**, 519-528, 2005.

VELOSO, C. C.; BITENCOURT, A. D.; CABRAL, L. D. M.; FRANQUIA, L. S.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINIA, R.; GIUSTI-PAIVA, A. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. *J. Ethnopharmacol.*, **132**, 355-358, 2010.

VELOSO, C. C.; CABRAL, L. D. M.; BITENCOURT, A. D.; FRANQUI, L. S.; SANTA-CECILIA, F. V.; DIAS, D. F.; SONCINI, R.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* in mice. *A. Rev. Bras. Farm.*, **22**, 162-168, 2012.

- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, **29(2)**, 326-337, 2006.
- VIKEN, J.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, **68**, 275-297, 2007.
- VOLLMER, T. R.; STOCKHAUSEN, A.; ZHANG, J. Anti-inflammatory Effects of Mapracorat, a Novel Selective Glucocorticoid Receptor Agonist, Is Partially Mediated by MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1). *The Journal of Biological Chemistry*, **287(42)**, 35212–35221, 2012.
- WAGNER, H.; BLAT, S.; ZGAINSKY, E.M. Plant drug analysis. Berlin: Springer, 1984.
- XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. *Lipids*, **42**, 87-96, 2007.
- ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Rev. Bras. Farmacog.*, **18**, 226, 2008.
- ZHANG, H.; WANG, L. F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **675**, 199-202, 2004.
- ZHAO, B.; MOOCHHALA, S. M.; THAM, S. Biologically active components of *Physostigma venenosum*. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **812**, 183–192, 2004.