



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “PROF.
DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ISIS FERNANDES GOMES

**Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-
árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e
Solanum rhytidoandrum Sendtn. (Solanaceae)**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

João Pessoa – PB
2011

ISIS FERNANDES GOMES

**Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-
árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e
Solanum rhytidoandrum Sendtn. (Solanaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA - PB

2011

G633e Gomes, Isis Fernandes.

Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae) / Isis Fernandes Gomes.- João Pessoa, 2011. 181f. : il.

Orientador: Marcelo Sobral da Silva

Co-orientador: Josean Fachine Tavres

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. *Pithecoseris pacourinoides* Mart. 3. *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. 4. Flavonóides – atividades biológicas - aspectos biossintéticos. 5. Glicoalcalóide. 6. Antitumoral.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ISIS FERNANDES GOMES

**Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-
árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e
Solanum rhytidoandrum Sendtn. (Solanaceae)**

APROVADA EM 22 /02 /2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Orientador – UFPB

Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias
Examinadora interna – UFPB

Profa. Dra. Vanusia Cavalcanti França
Examinadora externa – UEPB

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Rildo Gomes da Silva e Maria Giselda Fernandes Gomes**, pela dedicação, persistência, carinho, confiança, ensinamentos e incentivo em todos os momentos da minha vida, aos meus irmãos **Igor Fernandes Gomes e Ildo Fernandes Gomes**, por todo apoio, confiança e amizade, ao meu namorado **Diego Valois da Mota Ribeiro**, por todo amor, companheirismo, compreensão e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, muito obrigada pela oportunidade da vida, por me conceber todas as conquistas tão sonhadas, pela constante proteção e pela fé.

A **Painho e Mainha (Rildo & Giselda)**, guerreiros na vida, por toda dedicação, carinho, persistência, incentivo, confiança, luta pela nossa educação e qualidade de vida, ensinamentos em todos os momentos, sempre mostrando que não existe fracasso.

Aos meus irmão **Igor e Ildo**, por todo apoio, confiança, amizade, enfim, por todos os momentos.

Ao meu namorado **Diego Valois**, por todo amor, companheirismo, dedicação, compreensão, paciência e confiança.

A minha cunhada **Julliana**, pelo imenso apoio e ao meu sobrinho **Pedro**, ainda pequenino, mais de grande importância com sua alegria, desenvoltura e persistência.

A meus avós **Constantino** (*in memoriam*) e **Cecília**, por todo orgulho sentido e alegria que nos proporcionam.

A minha “cadelinha” **Miuke**, que desde os estudos para seleção do mestrado não me deixa ficar sozinha, incentivando até mesmo na vida profissional.

Aos meus **primos e tios Gildete, Gilberto e Miguel**, por todo apoio e dedicação prestados a nossa família.

A toda minha **família**.

A família **Andrade & Agregados**, companheira, dedicada, alegre e presente.

As amigas **Janaína, Mônica, Gina e Jussara** por todo incentivo e amizade.

Aos amigos **Breno, Fabrício, Vítor e Cuca**, por todo apoio e amizade.

Aos **Profº Dr. Marcelo Sobral e Dr. Josean Fachine** pela orientação, ensinamentos e oportunidade de trabalhar numa área que tanto gosto.

A **Nonato e Vicente**, pela amizade e imensa ajuda no nosso trabalho.

Aos **Professores** que me incentivaram no estudo.

A amiga **Ana Silvia**, companheira de graduação e mestrado, que embarcou nesse desafio comigo, indispensável, me ajudando imensamente e compartilhando momentos inesquecíveis.

A amiga **Karine Queiroga**, incentivadora desde a iniciação científica, com apoio em todos os momentos, altamente dedicada com quem tento aprender o significado da palavra disciplina.

A amiga **Hellane** Fabrícia, pelo apoio, fundamental ajuda, companheirismo e participante de tantas emoções.

Aos amigos **Fábio Tenório**, **Sócrates Golzio** e **João Carlos** pela imensa ajuda e incentivo.

Aos amigos **Camila** “Dictyota”, **Bruna Priscila**, **Jaqueline**, **Camila “HP”**, **Thyago**, **Gedson “HP”**, **Ingrid**, **Aline Xavier**, e **Heloísa Mara** pelo apoio e dedicação.

A turma do laboratório **Viviane**, **Steno**, **Paula**, **Augusto**, **Manso**, pela ajuda diária.

Ao grupo de pesquisa da **Profª. Drª. Marianna Sobral** do LABETOX, pela realização dos ensaios toxicológicos.

A **Ionaldo**, **Cínthia**, **Sandro**, **Rousevelt**, **Wemerson**, **Gabriela Lemos**, **Analúcia**, **Daysiane**, **Ricardo**, **Andreza**, **Thaísa**, **Narlize**, **Adriana**, **Daniele**, **Carminha**, **Meri Emili**, **Carol**, **Sara**, **Denise**, **Ania “La Cubana”** por toda ajuda.

Aos Professores **Dr. Davi** e **Drª. Dannielly** pelo importante incentivo na iniciação científica.

As proferoras **Drª. Vanusia Cavalcanti** e **Drª. Celidarque da Silva** pela contribuição ao nosso trabalho.

A professora **Drª. Maria de Fátima Agra** pela identificação dos materiais botânicos.

A **Universidade Federal da Paraíba**.

Ao **Programa de Produtos Naturais em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**.

Ao **Laboratório de Tecnologia Farmacêutica**.

A **todos os funcionários do LTF**, pelos diversos serviços prestados.

A **todos** que lutam por um grande sonho e nunca se cansam de buscá-lo.

A **FAPESQ-PB**.

Ao **CNPq**, pela bolsa concedida.

A natureza das coisas

Composição: Accioly Neto

Se avexe não
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada

Se avexe não
A lagarta rasteja até o dia
Em que cria asas

Se avexe não
Que a burrinha da felicidade
Nunca se atrasa

Se avexe não
Amanhã ela pára na porta
Da sua casa

Se avexe não
Toda caminhada começa
No primeiro passo
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá

Se avexe não
Observe quem vai
subindo a ladeira
Seja princesa ou seja lavadeira
Pra ir mais alto vai ter que suar

RESUMO

GOMES, ISIS FERNANDES. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de duas espécies do semi-árido paraibano: *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae).** 181 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de Concentração: Farmacoquímica) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

A família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 1.100 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies. Estudos químicos e farmacológicos ainda não são conhecidos no gênero *Pithecoseris*. A família Solanaceae A. Juss. possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 150 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. O gênero *Solanum* é composto por aproximadamente 1000 espécies. Muitas espécies de *Solanum* são conhecidas como “jurubeba”, palavra originária do Tupi-guarani *yu’beba*, que está associada a presença de espinhos, sendo empregadas na medicina popular para vários fins. O presente trabalho descreve o isolamento, identificação estrutural e atividades biológicas de alguns constituintes químicos das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) e raízes de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae), com o objetivo de contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico dos gêneros *Pithecoseris* e *Solanum*, bem como das famílias Asteraceae e Solanaceae. Os constituintes químicos foram identificados através da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos como IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, espectroscopia de massas, além de comparação com dados da literatura. O estudo fitoquímico da fase acetato de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. resultou no isolamento dos esteróides Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e Estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e os flavonóides 5,7,4'-trihidroxiflavona (apigenina), 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (3-O-metilquercetina) e Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo, todos relatados pela primeira vez no gênero. O estudo fitoquímico das raízes de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. resultou no isolamento de um alcalóide esteroidal glicosilado denominado xilosilolamargina, relatado pela primeira vez na espécie. As fases e extratos de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. foram submetidas a um bioensaio frente *Artemia salina* Leach o qual forneceu um direcionamento para estudos em busca de novas moléculas biologicamente ativas nas demais fases. A 3-O-metilquercetina e a xilosilolamargina foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade frente células leucêmicas da linhagem k562 demonstrando que os constituintes avaliados apresentam excelente atividade antitumoral *in vitro* de maneira concentração-dependente. O isolamento dos metabólitos nas espécies *Pithecoseris pacourinoides* Mart. e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. associado aos ensaios biológicos evidenciou um elevado potencial do estudo.

Palavras-chave: *Pithecoseris pacourinoides* Mart., *Solanum rhytidoandrum* Sendth., flavonóides, glicoalcalóide, antitumoral.

ABSTRACT

GOMES, ISIS FERNANDES. **Phytochemical study and biological activity of two species of semi-arid from Paraíba: *Pithecoseris pacourinoides* Mart.(Asteraceae) and *Solanum rhytidoandrum* Sendtn.(Solanaceae)** 181 p. Dissertation (Master of Bioactive Natural Products and Synthetic - Concentration Area: Pharmacochemistry) - Laboratory of Pharmaceutical Technology "Prof. Delby Fernandes de Medeiros", Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2011.

The Asteraceae family has cosmopolitan distribution, including about 1.100 genus and about 25.000 species. Chemical and pharmacological studies are not yet known in the genus *Pithecoseris*. The family *Solanaceae* A. Juss. has a worldwide distribution, including about 150 genus and approximately 3000 species. The genus *Solanum* comprises about 1000 species. Many species of *Solanum* are known as "jurubeba", a word that comes from the Tupi-Guarani *yu'beba*, which is associated with the presence of thorns and is used in folk medicine for various purposes. This paper describes the isolation, structural identification and biological activities of some chemical constituents of the flowers of *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae) and roots of *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae), with the objective of contributing to the knowledge chemotaxonomic of the genera *Pithecoseris* and *Solanum*, as well as families Asteraceae and Solanaceae. The chemical constituents were identified by analysis of data obtained by spectroscopic methods as Infrared, ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance, with the add of two-dimensional techniques, Mass spectroscopy, and compared with values from the literature. Phytochemical study of the ethyl acetate phase of *Pithecoseris pacourinoides* Mart. resulted in the isolation of the steroids Sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside and Stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside and flavonoids 5,7,4'-trihydroxyflavone, 3-O-methylquercetin and quercetin 3-O- α -L-rhamnoside, all first reported in the genus. Phytochemical study of the roots of *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. resulted in the isolation of an alkaloid steroidal glycoside called xilosilamargina, first time reported in the species. The phases and extracts *Pithecoseris pacourinoides* Mart. were subjected to a bioassay with *Artemia salina* Leach which provided a direction for studies in search of new biologically active molecules in the other phases. The 3-O-methylquercetin and xilosilamargina were subjected to cytotoxicity assay against K562 line leukemia cell demonstrating that the analyzed constituents have excellent antitumor activity in vitro, concentration-dependent manner. The isolation of metabolites in species *Pithecoseris pacourinoides* Mart. and *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. associated with biological assays showed a high potential of the study.

Key words: *Pithecoseris pacourinoides* Mart., *Solanum rhytidoandrum* Sendtn., flavonoids, glycoalkaloid, anti-tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição da Família Asteraceae	34
Figura 2. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae	36
Figura 3. (A) Inflorescência de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. (B) Ramos com inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.	41
Figura 4. Representação dos núcleos fundamentais de algumas classes de flavonóides	46
Figura 5. Representação da biossíntese dos flavonóides (DEWICK, 1994)	52
Figura 6. Mapa de distribuição da Família Solanaceae	54
Figura 7. Mapa de distribuição do gênero <i>Solanum</i>	57
Figura 8. (A) Inflorescências de <i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn. (B) Partes aéreas de <i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn.	61
Figura 9. Flavonoides isolados dos tricomas de <i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn	62
Figura 10. Mecanismos de incorporação do nitrogênio na biossíntese dos alcaloides esteroidais. * HOP: Fosfato ou pirofosfato (CHIESA et al., 1999)	66
Figura 11. Rota simplificada da biossíntese de alcaloides esteroidais (DEWICK et al., 2001)	67
Figura 12. Ciclizações possíveis para a formação do anel E (Adaptada de OSMAN et al., 1991)	68
Figura 13. Exemplo de alcaloides esteroidais obtidos a partir do colesterol	69
Figura 14. Exemplos de alcaloides do tipo aminopregnano	70
Figura 15. Exemplos de alcaloides do tipo espirosolano	71
Figura 16. Exemplos de alcaloides do tipo solanidano	72
Figura 17. Exemplos de alcaloides do tipo solanocapsina	73
Figura 18. Exemplos de alcaloides do tipo piperidilpregnanos simples	74
Figura 19. Alcaloides com esqueletos anômalos	74
Figura 20. Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i> . (A) Recipiente	

retangular com divisória contendo furos; (B) Parte conberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz	88
Figura 21. Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983)	90
Figura 22. Sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo e Estigmasterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo, isolados pela primeira vez no gênero <i>Pithecoseris</i>	95
Figura 23. Sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (Pp-1)	96
Figura 24. Estigmasterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (Pp-2)	96
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i>	98
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 3,5 a 5,4 ppm.	98
Figura 27. Expansão do espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 0,6 a 2,8 ppm	99
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i>	99
Figura 29. Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 122 a 144 ppm	100
Figura 30. Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 102 a 142 ppm	100
Figura 31 . Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 56 a 79 ppm	101
Figura 32 . Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 34 a 52 ppm	101
Figura 33. Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 19 a 33 ppm	102
Figura 34 . Expansão do espectro de RMN ¹³ C – APT (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> na região de 11 a 27 ppm	102
Figura 35. 5,7,4'-triidroxiflavona (Apigenina)	104
Figura 36. Espectro de infravermelho (KBr cm ⁻¹) de <i>Pp-3</i>	105
Figura 37. Espectro de massas de alta resolução de <i>Pp-3</i>	106
Figura 38 . Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 200 MHz) de <i>Pp-3</i>	106

Figura 39 . Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>Pp-3</i> na região de 6,1 a 7,9 ppm	107
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>Pp-3</i>	107
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>Pp-3</i> na região de 150 a 185 ppm	108
Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>Pp-3</i> na região de 95 a 130 ppm	108
Figura 43. 3-metoxi-5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (3-O-metilquercetina)	110
Figura 44. Espectro de infravermelho (KBr cm^{-1}) de <i>Pp-4</i>	111
Figura 45. Espectro de massas de alta resolução de <i>Pp-4</i>	112
Figura 46. Espectros de fragmentação do íon m/z 315,0 com diferentes energias de colisão	112
Figura 47. Proposta de fragmentação da 3-O-metilquercetina (<i>Pp-4</i>) baseada nos espectros de massas no modo de ionização negativo	113
Figura 48. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>Pp-4</i>	114
Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de <i>Pp-4</i> na região de 6,1 a 7,8 ppm	114
Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>Pp-4</i>	115
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 50 MHz) de <i>Pp-4</i> na região de 60 a 180 ppm	115
Figura 52. Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo	118
Figura 53. Espectro de infravermelho (KBr cm^{-1}) de <i>Pp-5</i>	119
Figura 54. Espectro de massas de alta resolução de <i>Pp-5</i>	120
Figura 55. Espectros de fragmentação do íon m/z 447,1 com diferentes energias de colisão	120
Figura 56. Proposta de fragmentação da Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo baseada nos espectros de massas no modo de ionização negativo	121
Figura 57. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de <i>Pp-5</i>	122
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 0,8 a 7,5 ppm	122

Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 5,3 a 7,8 ppm	123
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 0,9 a 4,3 ppm	123
Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 3,2 a 4,3 ppm	124
Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C – BB (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i>	124
Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C – BB (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i>	125
Figura 64. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – BB (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 71 a 125 ppm	125
Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i>	126
Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 17 a 180 ppm	126
Figura 67. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 116 a 180 ppm	127
Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de 71 a 107 ppm	127
Figura 69. Espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i>	128
Figura 70. Expansão do espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (5,2 – 7,8 ppm) x (135 – 167 ppm)	128
Figura 71. Expansão do espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (5,4 – 7,6 ppm) x (94 – 124 ppm)	129
Figura 72. Expansão do espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (5,5 – 7,5 ppm) x (97 – 163 ppm)	129
Figura 73. Expansão do espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (1,0 – 5,5 ppm) x (20 – 75 ppm)	130
Figura 74. Espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMQC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i>	130
Figura 75. Expansão do espectro de correlações ^1H x ^{13}C -JCH-HMQC	

(CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (1,0 – 5,0 ppm) x (20 – 75 ppm)	131
Figura 76. Expansão do espectro de correlações ¹ H x ¹³ C-JCH-HMQC (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (6,9 – 7,9 ppm) x (116 – 132 ppm)	131
Figura 77. Expansão do espectro de correlações ¹ H x ¹³ C-JCH-HMQC (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (5,5 – 8,5 ppm) x (95 – 135 ppm)	132
Figura 78. Espectro de correlação homonuclear COSY (CD ₃ OD, 500 MHz) de <i>Pp-5</i>	132
Figura 79. Expansão do espectro de correlação homonuclear COSY (CD ₃ OD, 500 MHz) de <i>Pp-5</i> na região de (6,9 – 7,8 ppm) x (6,9 – 7,8 ppm)	133
Figura 80. Diferença da ligação da xilose na Xilosilisolamargina e Arudonina ...	135
Figura 81. Correlações nas unidades osídicas (HMBC)	136
Figura 82. Correlações na aglicona (HMBC) (USUBILLAGA, 1997)	136
Figura 83. Espectro de infravermelho (KBr cm ⁻¹) de <i>Sr-1</i>	140
Figura 84. Espectro de massas de alta resolução de <i>Sr-1</i>	141
Figura 85. Espectros de fragmentação do íon <i>m/z</i> 1000,5 com diferentes energias de colisão	141
Figura 86. Proposta de fragmentação da xilosilisolamargina baseada nos espectros de massas no modo de ionização positivo	142
Figura 87. Espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Sr-1</i>	143
Figura 88. Expansão do espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 4,7 a 6,4 ppm	143
Figura 89. Expansão do espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 3,4 a 4,7 ppm	144
Figura 90. Expansão do espectro de RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 0,7 a 2,1 ppm	144
Figura 91. Espectro de RMN ¹³ C – BB (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Sr-1</i>	145
Figura 92. Expansão do espectro de RMN ¹³ C – BB (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 98 a 150 ppm	145

Figura 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – BB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 96 a 122 ppm	146
Figura 94. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – BB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 55 a 82 ppm	146
Figura 95. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – BB ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 14 a 51 ppm	147
Figura 96. Espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i>	147
Figura 97. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 47 a 82 ppm	148
Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 67 a 84 ppm	148
Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 14 a 43 ppm	149
Figura 100. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 98 a 155 ppm	149
Figura 101. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de 121 a 150 ppm	150
Figura 102. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i>	150
Figura 103. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (0,6 – 2,2 ppm) x (30 – 140 ppm)	151
Figura 104. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (0,8 – 1,8 ppm) x (30 – 75 ppm)	151
Figura 105. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (4,0 – 6,5 ppm) x (70 – 105 ppm)	152
Figura 106. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (4,0 – 6,5 ppm) x (68 – 82 ppm)	152
Figura 107. Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i>	153

Figura 108. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMQC (C ₅ D ₅ N, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (1,0 – 10,0 ppm) x (20 – 200 ppm)	153
Figura 109. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMQC (C ₅ D ₅ N, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (1,0 – 5,5 ppm) x (50 – 90 ppm)	154
Figura 110. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMQC (C ₅ D ₅ N, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (3,8 – 5,1 ppm) x (69 – 83 ppm)	154
Figura 111. Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -JCH-HMQC (C ₅ D ₅ N, 500 e 125 MHz) de <i>Sr-1</i> na região de (1,0 – 3,5 ppm) x (15 – 45 ppm)	155

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com o extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. (µg/mL).....	158
Gráfico 2. Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com a fase hexânica das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. (µg/mL).....	158
Gráfico 3. Viabilidade das larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> após tratamento com a fase diclorometano das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. (µg/mL).....	159
Gráfico 4. Viabilidade celular após tratamento com a 3-O-metilquercetina. Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT.....	160
Gráfico 5. Viabilidade celular após tratamento com a xilosilisolamargina. Concentração-resposta através do ensaio de redução do MTT.....	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Solubilização das substâncias.....	89
Tabela 3. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , C_5D_5N , 500 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i> . Dados da Literatura (KOJIMA et al., 1990).....	96
Tabela 4. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , CD_3OD 200 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para <i>Pp-3</i> . Dados da Literatura (STOCHMAL et al., 2001).....	104
Tabela 5. Valores de Deslocamentos Químicos (δ CD_3OD 200 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para <i>Pp-4</i> e Dados da Literatura para 3-O-metilquercetina (HARBONE, 1994).....	110
Tabela 6. Valores de Deslocamentos Químicos (δ CD_3OD 200 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para <i>Pp-4</i> e Dados da Literatura para Quercetina 3-O- α -L-raminosídeo (BELTRAME et al., 2001).....	118
Tabela 7. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , C_5D_5N , 500 MHz) de RMN ^{13}C para <i>Sr-1</i> . Dados da Literatura (LOREY et al., 1996).....	138
Tabela 8. HMQC. Correlações para os átomos de carbono e hidrogênio das unidades osídicas. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , C_5D_5N , 500 MHz) de RMN ^{13}C e 1H para <i>Sr-1</i> . Dados da Literatura (LOREY et al., 1996).....	139
Tabela 9. Valores de CL_{50} obtidos através do bioensaio com <i>A. salina</i> para os extratos e fases de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	157

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	85
FLUXOGRAMA 2. Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	86
FLUXOGRAMA 3. Marcha para glicoalcaloides das raízes de <i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACC: Acetil-CoA carboxilase

AcOEt: Acetato de etila

CC: Cromatografia em Coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

EM: Espectometria de Massas

CIM: Concentração Inibitória Mínima

COSY: Correlation Spectroscopy

d: Dupleto

dd: Duplo dupleto

dl: Dupleto largo

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EtOH: Etanol

g: Grama

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

Kg: Quilograma

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

m: Múltiplo

mg: Miligrama

mL: Mililitro

MHz: Megahertz

MTT: brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NADH : Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

nm: Nanômetro

p.: Página

ppt: Precipitado

q: Quarteto

RMN 1H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN 13C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Simpleto

sl: Simpleto largo

ssb: Sobrenadante

t: Tripleto

δ: Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	34
3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE.....	34
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Pithecoseris</i>	41
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	41
3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE FLAVONOIDES.....	43
3.4.1 Aspectos químicos.....	43
3.4.1.1 Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos.....	44
3.4.1.2 Flavanonas.....	44
3.4.1.3 Isoflavonas.....	45
3.4.1.4 Pterocarpanos.....	45
3.4.2 Atividades biológicas dos flavonoides.....	47
3.4.3 Aspectos biossintéticos dos flavonoides.....	48
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA SOLANACEAE.....	54
3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO SOLANUM.....	57
3.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O A ESPÉCIE <i>Solanum rhytidoandrum</i> SENDTN.....	61
3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE ALCALOIDES ESTEROIDAIS.....	64
3.9 ASPECTOS BIOSSINTÉTICOS DOS ALCALOIDES ESTEROIDAIS.....	65
3.10 CLASSIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES ESTEROIDAIS.....	69
3.10.1 Aminopregnanos.....	69
3.10.2 Piperidilpregnanos.....	70

3.10.2.1 Espirosolanos.....	71
3.10.2.2 Solanidanos.....	71
3.10.2.3 Solanocapsinas.....	72
3.10.2.4 Piperidilpregnanos simples.....	73
3.10.3 Alcaloides com esqueletos anômalos.....	74
3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	77
3.11.1 Ensaios biológicos frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	77
3.11.2 Ensaios biológico de citotoxicidade frente células leucêmicas.....	77
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	80
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	80
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	80
4.1.2 Métodos de análise.....	80
4.1.2.1 Métodos cromatográficos.....	80
4.1.2.2 Métodos espectrométricos.....	81
4.1.2.2.1 Infravermelho.....	81
4.1.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear.....	81
4.1.2.2.3 Espectrômetria de Massas.....	81
4.1.2.3 Pontos de fusão.....	82
4.1.3 Processamento das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	82
4.1.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	82
4.1.3.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	82
4.1.4 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das inflorescências de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart.....	83
4.1.4.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex LH-20®	83

4.1.4.2 Processamento das raízes de <i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn. e Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex LH-20®	84
4.2 ESTUDOS BIOLÓGICOS.....	88
4.2.1 Bioensaio dos extratos e fases de <i>Pithecoseris pacourinoides</i> Mart. frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	88
4.2.2 Citotoxicidade frente células leucêmicas da linhagem K562.....	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Pp-1</i> e <i>Pp-2</i>	94
5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Pp-3</i>	103
5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Pp-4</i>	109
5.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Pp-5</i>	116
5.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE <i>Sr-1</i>	134
5.6 BIOENSAIO FRENTE <i>ARTEMIA SALINA LEACH</i>	157
5.7 CITOTOXICIDADE FRENTE CÉLULAS LEUCÊMICAS DA LINHAGEM K562.....	159
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	160
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	163
REFERÊNCIAS.....	166

Introdução



1 INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. O resultado desse processo é que muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais (FERREIRA; PINTO, 2010).

O homem moderno pode ser compreendido e diferenciado das demais épocas por seu consumo elevado de medicamentos. As pesquisas químicas e farmacêuticas, ao longo do Século XX possibilitaram o alívio para males que devastaram a humanidade, como a tuberculose, a sífilis, o câncer e a hanseníase, assim como para as endemias do mundo moderno, como a depressão, as cardiopatias e a AIDS. A grande oferta de medicamentos alopáticos, entretanto, não resolveu os problemas de saúde da maior parte da população. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da humanidade não tem acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos (VEIGA-JÚNIOR, 2008).

O Brasil possui um dos níveis de biodiversidade mais altos do mundo e uma enorme diversidade cultural (ARAÚJO et al., 2007), as plantas medicinais da flora nativa são consumidas intensamente, necessitando ampliar os estudos para comprovação de suas propriedades farmacológicas. A toxicidade de plantas medicinais, os efeitos adversos dos fitomedicamentos e a ação sinérgica são problemas sérios de saúde pública que ocorrem comumente (VEIGA-JÚNIOR, 2005). Isso deve incentivar a realização das pesquisas, para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos, regulamentado pela Organização Mundial de Saúde, ao estimular o uso de plantas medicinais e, por meio da informação científica, comprovar a segurança, a eficácia e a qualidade, afim de que sejam criadas medidas eficazes e práticas de regulamentação para garantir a qualidade dos medicamentos fitoterápicos.

No Nordeste brasileiro os curandeiros que utilizam plantas medicinais são conhecidos como "raizeiros", conhecedores louváveis de plantas medicinais que crescem em torno de sua área (AGRA et al., 2005 e 2007 b). A vegetação da caatinga (semi-árido) é uma parte integrante da cultura da população que ali habita, abrangendo uma vasta área no nordeste do Brasil, com uma fonte de recursos cada

vez mais explorada e ameaçada (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002 a, b; ARAÚJO et al., 2007) devido à escassez de espécies, causada principalmente pelo ser humano juntamente com longos períodos de estiagem. O estudo da utilização tradicional de plantas na região Nordeste do Brasil vem aumentando progressivamente durante os últimos anos (AGRA et al. (2007 a, b, c). Com isso, há uma necessidade urgente de estudar essa vegetação, baseando-se na etnofarmacologia e etnobotânica (AGRA et al., 2007 a).

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas grandes indústrias farmacêuticas transnacionais nos últimos 50 anos (FERRIS, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2007). Certamente, foram os antibióticos que mais contribuíram para o interesse do setor farmacêutico pelos produtos naturais. Diversos metabólitos secundários com importantes propriedades farmacológicas foram isolados de espécies de plantas, bactérias e fungos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

As plantas têm a habilidade de produzir dezenas de milhares de metabólitos secundários complexos para ajudar a sua sobrevivência no ambiente, muito dos quais ajudam a proteger a planta contra predadores. No entanto, o homem passou, através dos tempos, a explorar estes compostos naturais como fontes de agentes medicinais, venenos e poções (BRUCE, 2007).

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a acontecer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracteriza-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcaloides. É desta época o isolamento de morfina (1806), quinina e estriquinina (1820) (PINTO et al., 2002). A descoberta de novos compostos é motivada pela busca de substâncias mais ativas e menos tóxicas, que possam ser utilizadas no tratamento de diversas patologias, ou em substituição àquelas já existentes. Fontes alternativas aos medicamentos industrializados e à implementação de um projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais, são de grande interesse para comunidade científica, visto que a importância dos organismos vegetais como fontes de substâncias detentoras de atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos e incentivando a percepção das lideranças industriais que se ocupavam, quase que exclusivamente, da fabricação de produtos sintéticos (BRAZ-FILHO, 2010).

A introdução dos métodos espectroscópicos e das diferentes modalidades de cromatografia na fitoquímica alterou gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e determinação estrutural de produtos naturais. A utilização de métodos espectroscópicos em identificação estrutural permitiu a determinação em curto espaço de tempo de estruturas complexas com vários centros estereogênicos. Nas florestas tropicais, onde se concentra grande parte da biodiversidade, há pouco estudo químico e biológico (PINTO et al., 2002).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis ou não, pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal, e conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações e/ou substâncias bioativas. Ressalta-se ainda a importância para o desenvolvimento de fitoterápicos e o estabelecimento de marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformações tecnológicas, aliados a estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final (TOLEDO et al., 2003).

Para isso, surgiu o interesse em trabalhar com as plantas *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Asteraceae), ainda sem relato de estudos do gênero na literatura, e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (Solanaceae), visto que as famílias apresentam metabólitos secundários de interesse químico e biológico, tornando-se relevante e promissor o estudo das mesmas.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Contribuir para o estudo quimiotaxonômico das famílias Asteraceae e Solanaceae através de estudos fitoquímicos dos gêneros *Pithecoseris* e *Solanum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar fitoquimicamente as inflorescências e folhas da espécie *Pithecoseris pacourinoides* Mart., através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos, contribuindo para o estudo quimiotaxonômico do gênero;
- ✓ Analisar fitoquimicamente as raízes da espécie *Solanum rhytidoandrum* Sendtn., através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos, principalmente alcaloides esteroidais glicosilados;
- ✓ Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos destas espécies, através de técnicas de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (uni e bidimensionais) e Espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade de extratos, fases e substâncias isoladas através de ensaios *in vitro*;
- ✓ Integrar estudos biológicos ao estudo químico através da disponibilização de extratos, fases e substâncias isoladas para realização de testes farmacológicos.

Fundamentação teórica



Família Asteraceae



3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (EMERECIANO et al., 2007). Possui distribuição cosmopolita (representada na Figura 1, onde as áreas com verde mais intenso representam uma maior distribuição das espécies) e 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, sendo encontradas em todos os tipos de habitats, principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul, estando ausentes no continente Antártico e melhor representadas nas regiões temperadas e subtropicais em relação às florestas densas (VERDI et al., 2005). No Brasil, existem aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies, estando distribuídos desde as regiões mais frias e úmidas, como as serras do Sudeste e Sul, até as áreas secas na região do semi-árido nordestino, sendo menos freqüentes em formações florestais (LING *In*: HIND, 1995).

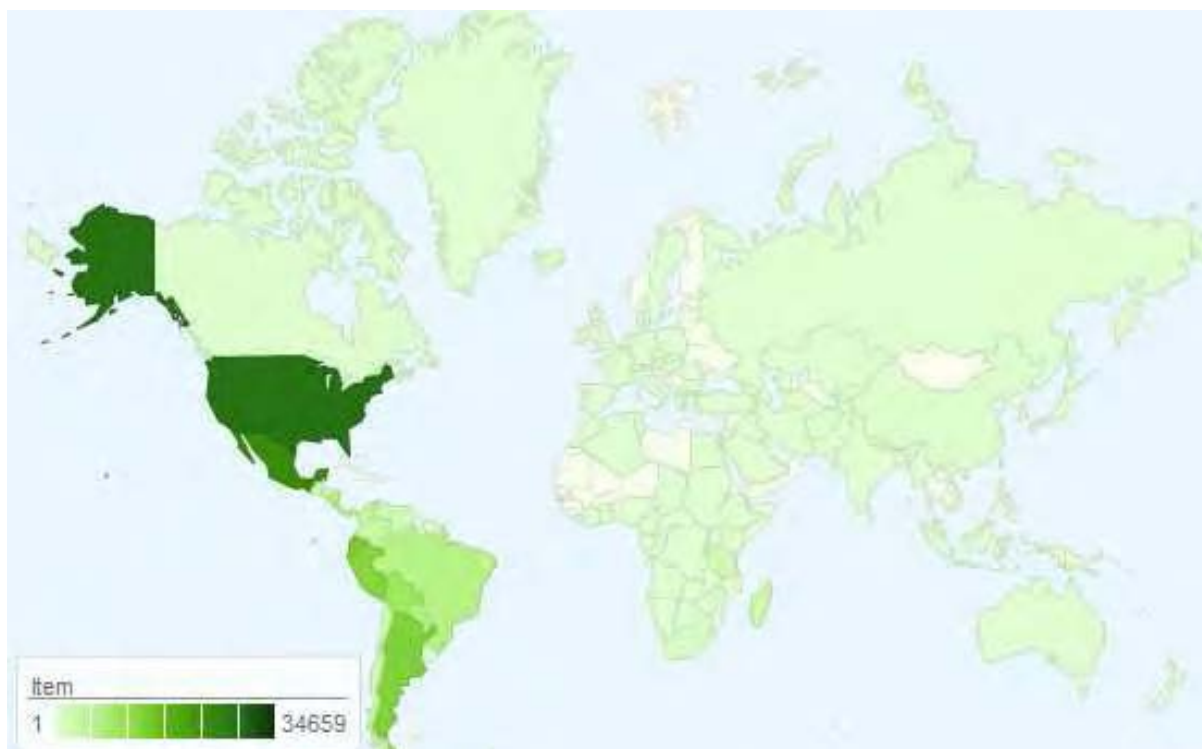


Figura 1. Mapa de distribuição da Família Asteraceae.

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/50307371?tab=maps>

Plantas dessa família constituem importante fonte de alimentos, ornamentações, matérias-primas, são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, muitas dessas proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas, entretanto ocorrem também ervas-daninhas e plantas tóxicas (SIMPSON, 2006).

Inúmeros estudos com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários, dentre eles: diterpenos, triterpenos, cumarinas, sesquiterpenos, fenilpropanóides poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, alcaloides, óleos essenciais, antocianinas (VERDI et al., 2005), com destaque aos flavonoides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos, além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Dentre as atividades biológicas relatadas dos constituintes químicos isolados de plantas da família Asteraceae, podemos destacar as atividades antioxidante, alelopática, espasmolítica, antibacteriana, antiviral, aleloquímica, citotóxica, inseticida, gastroprotetora, antileucêmica, antibiótica, antifúngica, vasorelaxante, moluscicida, antimutagênica e hepatoprotetora (VERDI et al., 2005).

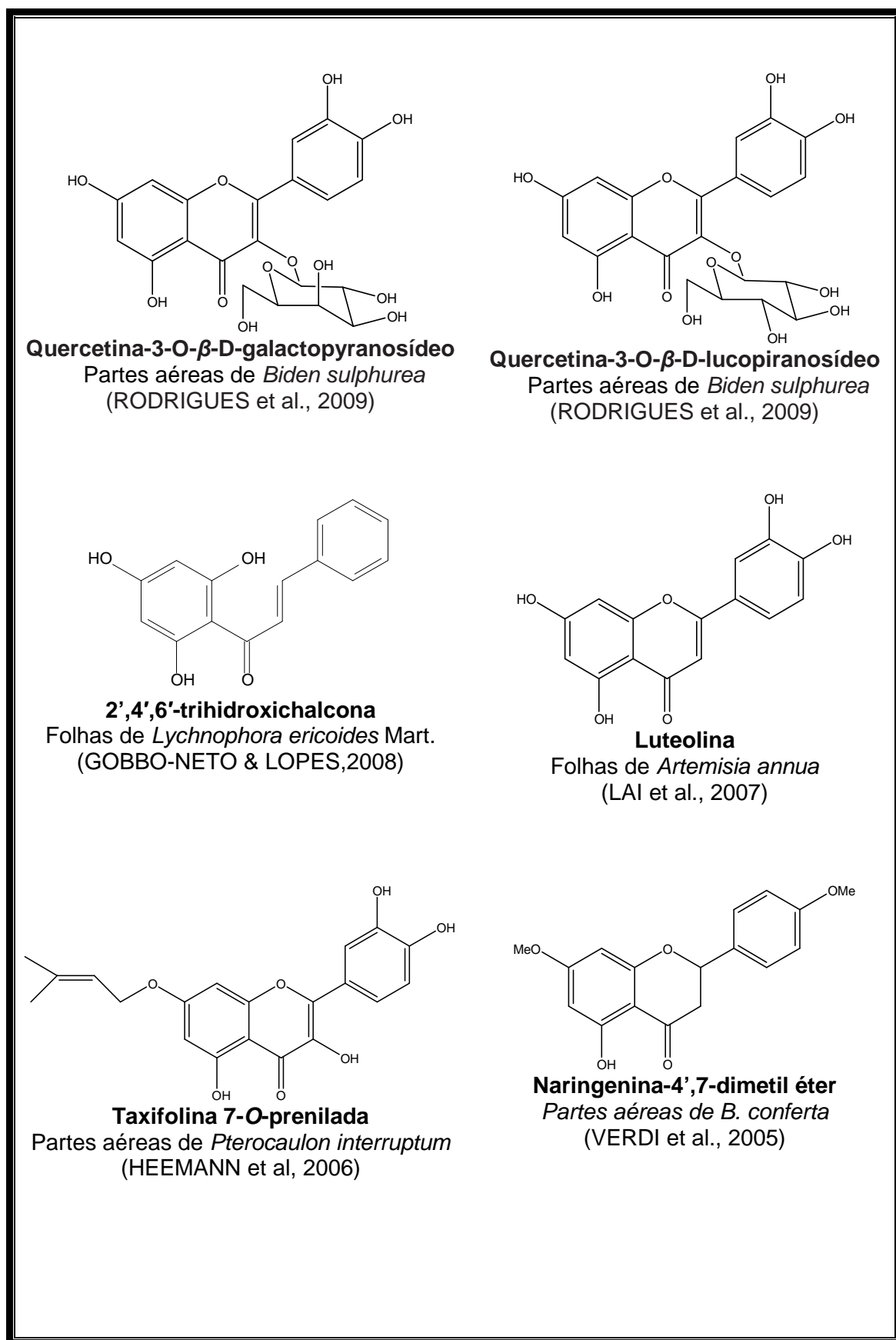


Figura 2. Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Asteraceae

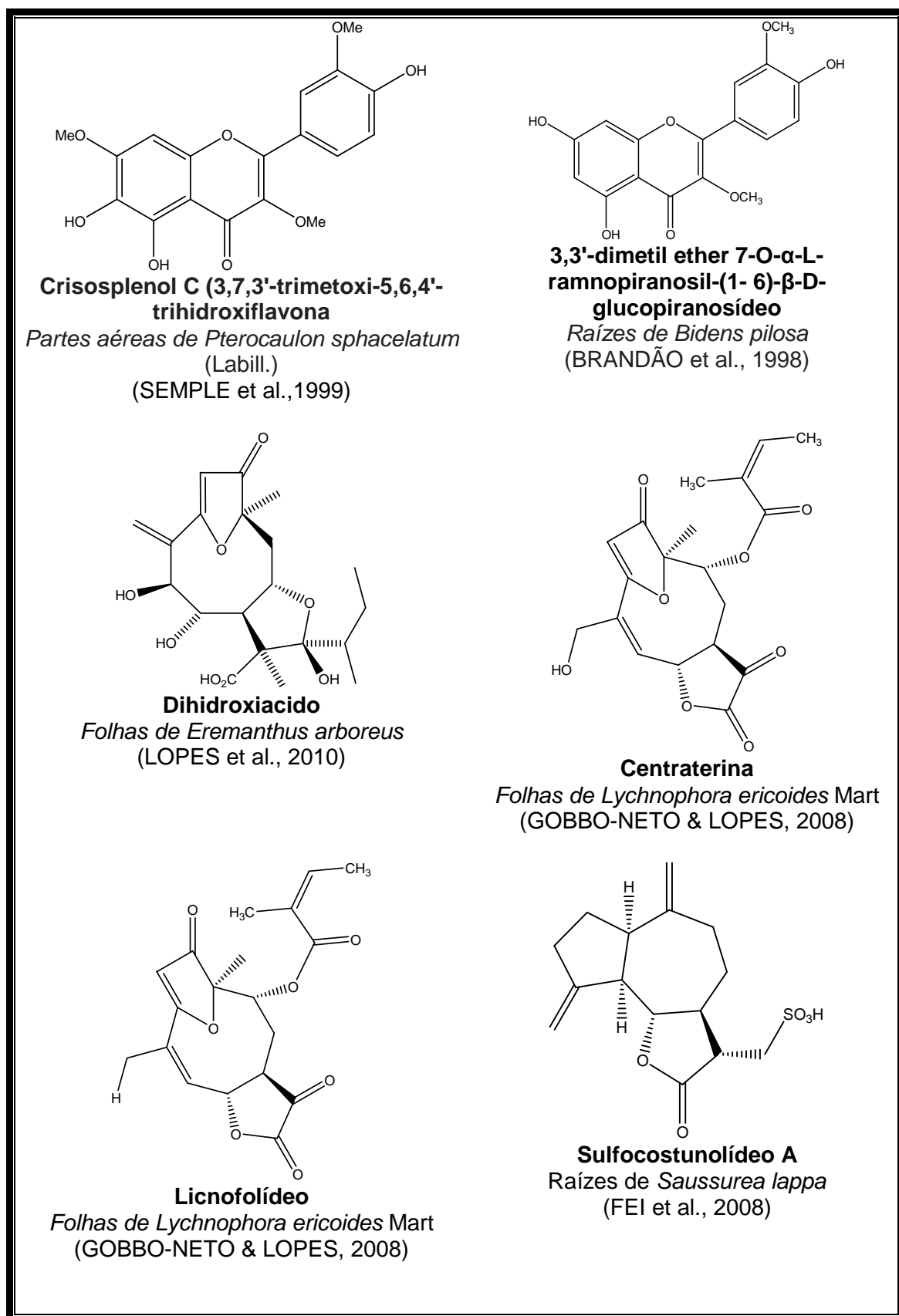


Figura 2 (cont.). Exemplos de metabólitos secundários isolados da família Asteraceae.

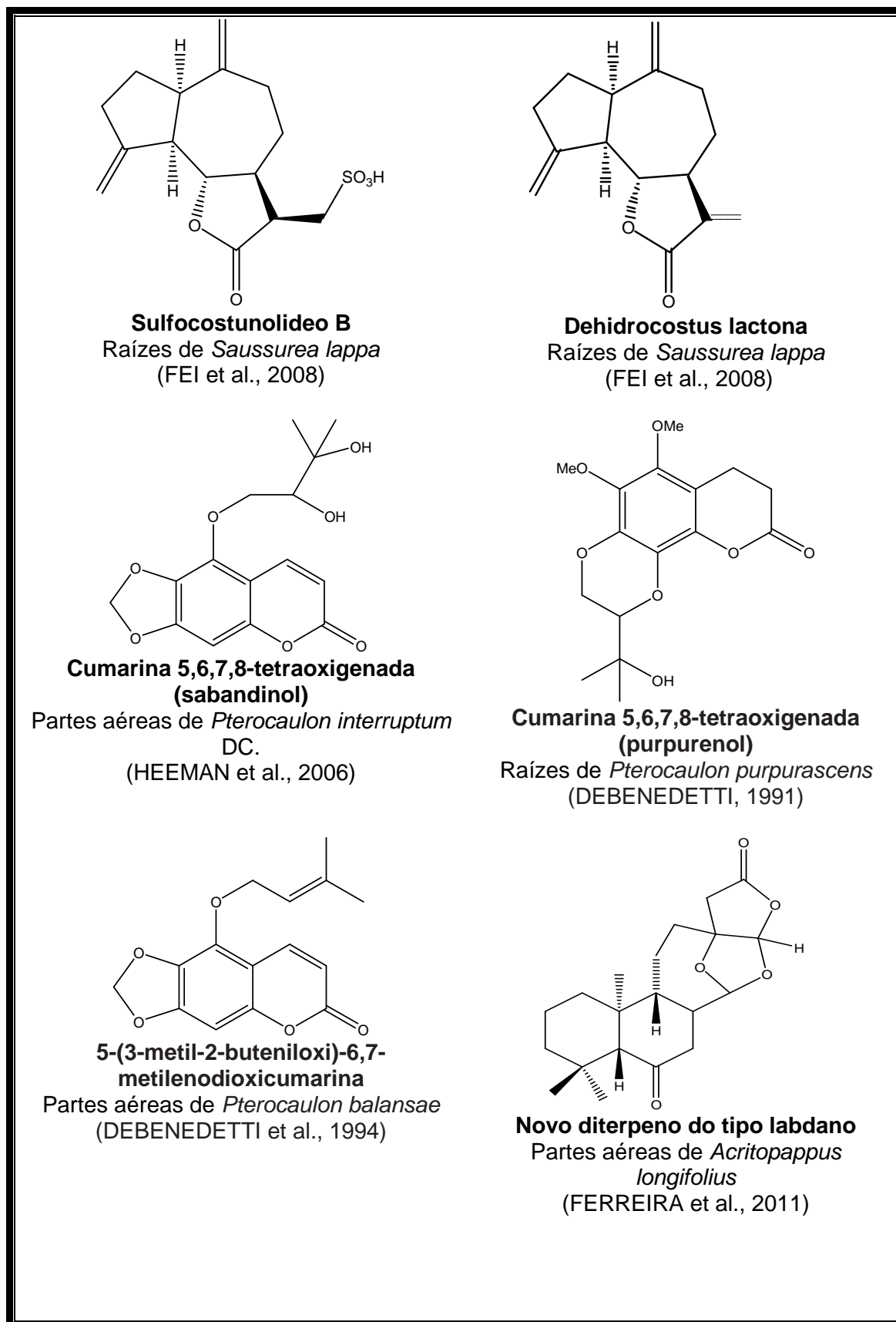


Figura 2 (cont.). Exemplos de metabólitos secundários isolados da família Asteraceae

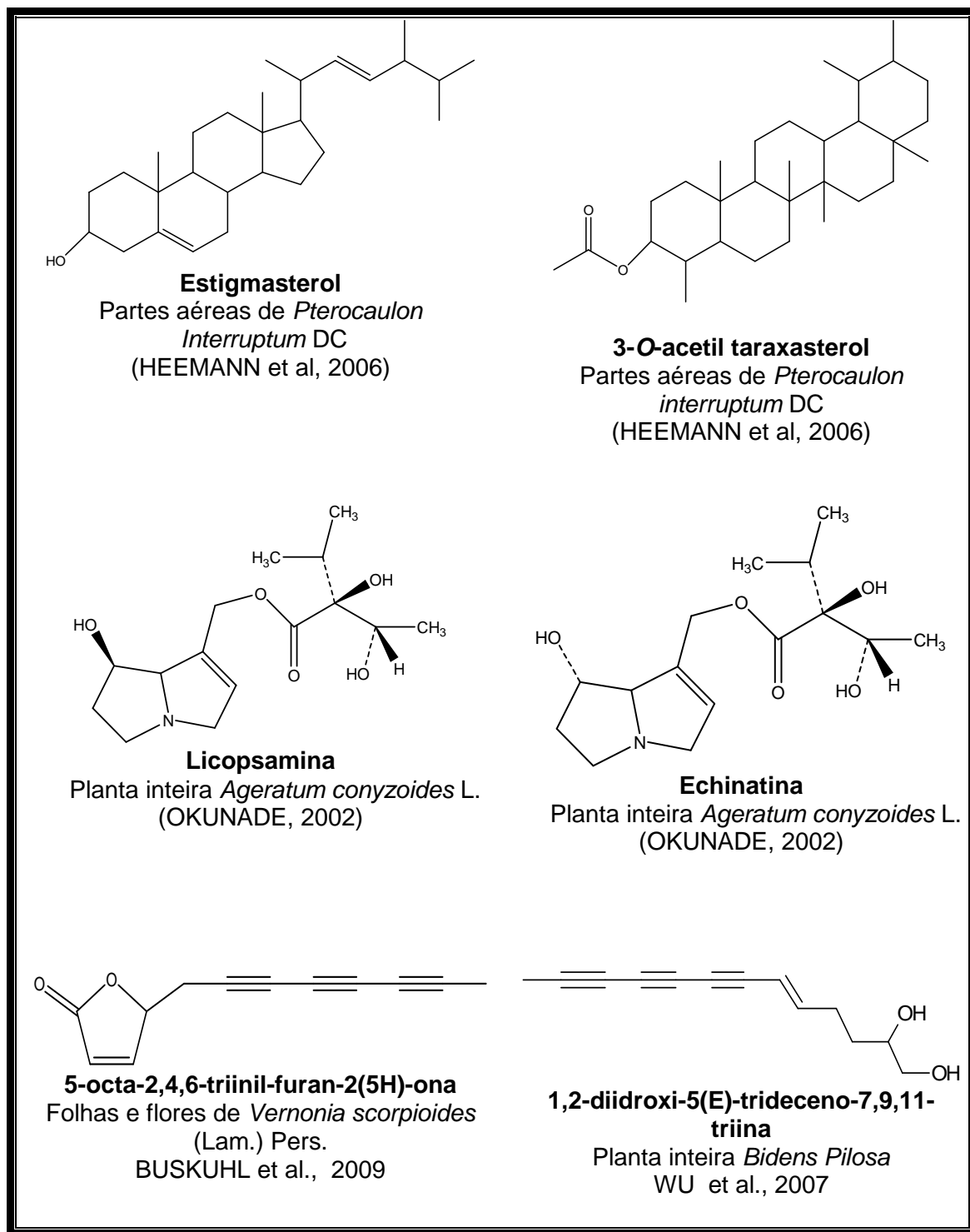


Figura 2 (cont.). Exemplos de metabólitos secundários isolados da família Asteraceae.

Lithecoseris pacourinoides Mart.



3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Pithecoseris*

Estudos químicos e farmacológicos ainda não são conhecidos no gênero *Pithecoseris*, haja vista a inexistência de relatos no Napralert, Biochemical Abstract e Scinfinder pesquisados até Fevereiro de 2011.

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Pithecoseris pacourinoides* Mart.

Os afloramentos rochosos são um tipo de ambiente muito comum no semi-árido brasileiro, nos quais se encontram várias espécies, como exemplo, *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (Figura 3, p. 41).

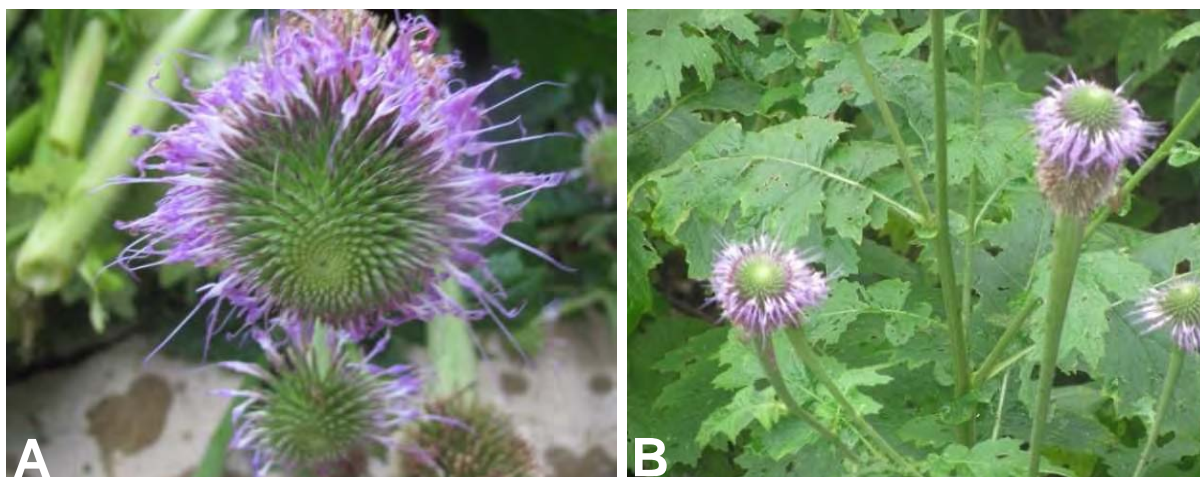


Figura 3. (A) Inflorescência de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. (B) Ramos com inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. Fonte: Fotos de JOSEAN FECHINE TAVARES, 2009.

flavonoides

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE FLAVONOIDES

Os flavonoides compreendem um grupo de metabólitos amplamente distribuídos no reino vegetal, pouco presente em algas com alguns representantes identificados em briófitas, existindo poucos relatos de ocorrência em fungos. Em pteridófitas, também foram encontrados, mas a sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia, estão presentes em abundância em angiospermas, apresentando neste grupo uma enorme variedade estrutural.

Flavonoides podem ser utilizados como marcadores taxonômicos devido a: abundância relativa em quase todo o reino vegetal, sua especificidade em algumas espécies, sua relativa facilidade de identificação, sua relativa estabilidade e seu acúmulo com menor influência do meio ambiente (VON-POSER; MENTZ, In: SIMÕES, 1999).

3.4.1 Aspectos químicos

É comum designar os produtos naturais derivados do esqueleto 1,3; 1,2 e 1,1 diarilpropânico em três grandes classes, respectivamente, como flavonoides propriamente dito (**1**), isoflavonoides (**2**) e neoflavonoides (**3**) (AGRAWAL; BANSAL, 1989).

Os flavonoides ocorrem em uma grande variedade de formas estruturais. Todos contêm 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são denominados A, B e C. Como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, isto é, derivados difenilpropânicos (Figura 4, p. 46).

As várias classes de flavonoides diferem no grau de oxidação e de substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000). Nos compostos tricíclicos, as unidades carbônicas são denominadas núcleos A, B e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonoides por 8a e 4a, respectivamente.

Estas substâncias são usualmente oxigenadas e possuem substituintes hidroxila, metoxila, metilenodioxila e prenila. São isolados de um grande número de plantas vasculares, com aproximadamente 8.000 compostos individuais conhecidos

(PIETTA, 2000). Um grande número de flavonoides ocorre como O-glicosídios, no qual um ou mais dos grupos hidroxila do flavonoide estão ligados a um açúcar ou açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídio. Nos flavonoides C-glicosídios o açúcar está ligado a um átomo de carbono. Quando o metabólito ocorre sem conjugação com esses carboidratos ou então quando é submetido à hidrólise ácida, é denominado aglicona ou genina (ZUANAZZI, In: SIMÕES, 1999).

3.4.1.1 Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídios

Esses compostos fazem parte de um grande grupo de flavonoides de origens biossintéticas muito próximas. Como os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila (Figura 4, p. 46), estas duas classes são em geral classificadas juntas. As flavonas e flavonóis naturais são freqüentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. Outros substituintes encontrados com bastante freqüência são: acila, C-metila, metilenodioxila, isopreno, prenila, pirano, furano e seus derivados clorados. A maioria das flavonas e flavonóis identificados em plantas está sob forma conjugada, isto é, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxila por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida.

As flavonas são derivadas da 2-fenilcromona e os flavonóis da 3-hidroxi-2-fenilcromona. As flavonas possuindo um grupamento metoxila ou isoprenila ligados ao carbono C-3 são chamadas de 3-metoxi-flavonas ou 3-prenil-flavonas, respectivamente. Alguns tipos de oxigenação, como aqueles das posições dos carbonos 5, 7, 3' e 4' são sempre os mesmos para as duas classes. Isto é devido ao fato de flavonas e flavonóis serem originários da mesma via biossintética (ZUANAZZI; MONTANHA, In: SIMÕES, 2003).

3.4.1.2 Flavanonas

Estas substâncias diferem das flavonas por possuírem uma ligação simples entre C-2 e C-3, mas são numeradas da mesma forma (Figura 4, p. 46). Em consequência, as flavanonas possuem centro de assimetria em suas moléculas. Contudo, devido ao fato de serem intermediários biogenéticos da maioria dos grupos

flavonoídicos, são isolados normalmente em pequenas quantidades. Dessa forma, freqüentemente a estereoquímica é omitida em publicações. As flavanonas possuem dois centros assimétricos possíveis: o núcleo B pode apresentar as configurações 2S ou 2R (BOHM, In: HARBORNE, 1994).

3.4.1.3 Isoflavonas

Os isoflavonoides são caracterizados, como os demais flavonoides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano (Figura 4, p. 46). Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva em Fabaceae. Apesar desta restrição a uma só família botânica, tal classe apresenta uma diversidade estrutural importante (SIMÕES et al., 2007). Isto se deve principalmente por modificações em seu esqueleto cíclico (14 classes). Destacam-se as isoflavonas, que são as mais abundantes. Em vegetais, uma grande parte dos isoflavonoides comporta-se como fitoalexinas (substâncias produzidas pela planta em resposta a uma infecção por um agente patogênico). São conhecidas muitas isoflavonas substituídas com grupamento prenila. A forma mais reduzida pertencente à classe das isoflavonas é a isoflavana (ZUANAZZI; MONTANHA, In: SIMÕES, 2003).

3.4.1.4 Pterocarpanos

Grupo de compostos que podem ser descritos como benzo-pirano-furano-benzenos os quais podem ser formados a partir das isoflavonas por acoplamento interno do anel B à posição 4-cetona (Figura 4, p. 46).

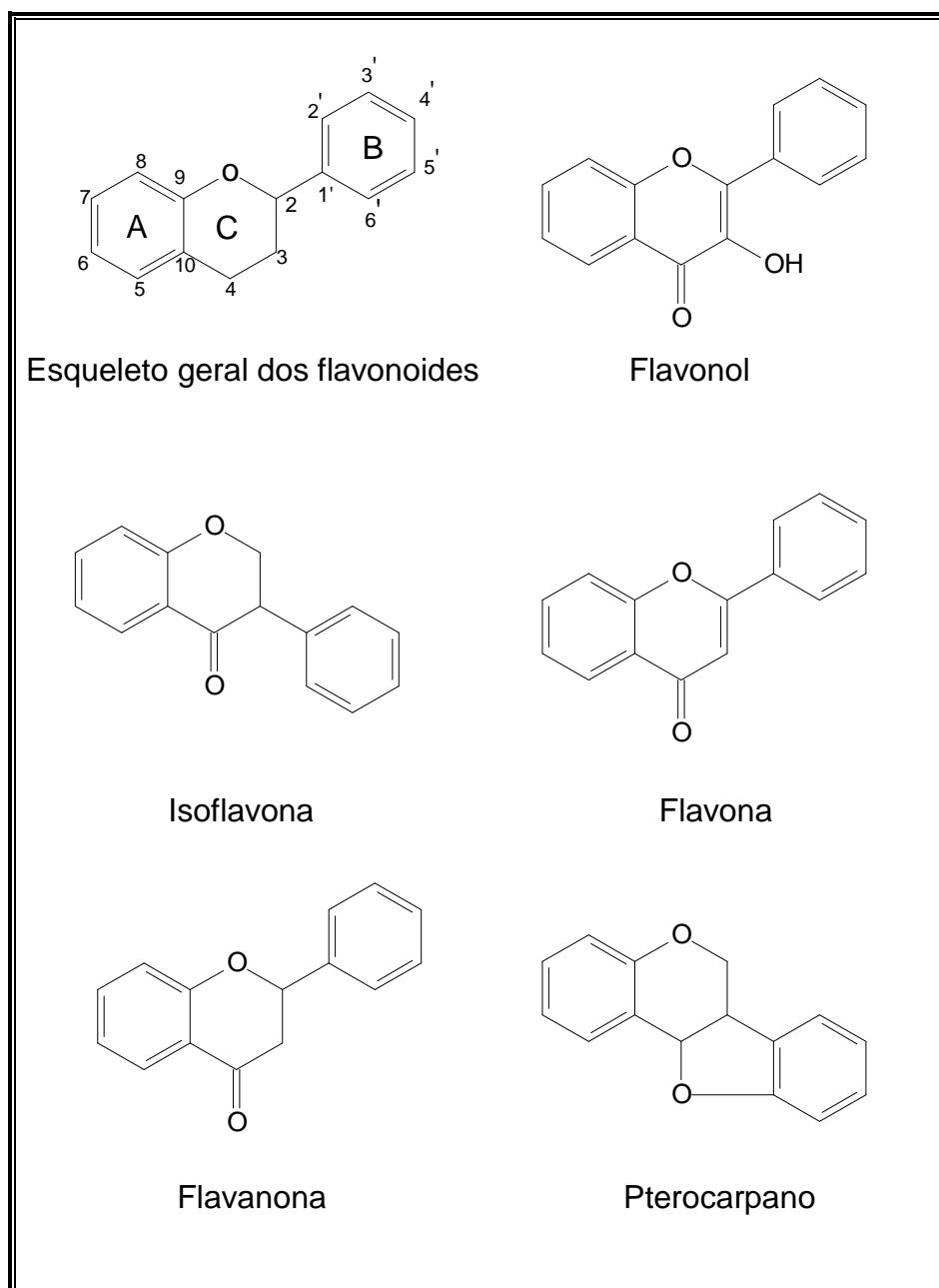


Figura 4. Representação dos núcleos fundamentais de algumas classes de flavonóides.

3.4.2 Atividades biológicas dos flavonoides

A grande prevalência de flavonoides e antocianidinas no reino vegetal não é acidental; eles não somente atuam como pigmentos coloridos de flores, mas também como inibidores de enzimas e precursores de substâncias tóxicas, como defesa contra a exposição à radiação ultravioleta, agentes quelantes de metais nocivos para as plantas e como agentes redutores. Em adição, os flavonoides estão envolvidos na transferência de energia, morfogênese e determinação do sexo, níveis de respiração e fotossíntese, ação de hormônios de crescimento e reguladores da planta, expressão de genes e comportamento (SMITH; BANK, 1986). Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas, podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1989).

Através da cadeia alimentar, animais e humanos ingerem flavonoides, e há muitos dados que apontam para um grande número de atividades destes compostos em humanos. Por exemplo, eles podem ser utilizados como proteção para a integridade vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988), como agentes antiosteoporóticos (EVANS, 1994) e por suas propriedades antihepatotóxicas (SOIKE; PESCHLOW, 1987). Alguns flavonoides foram examinados para a verificação da sua atividade em modelos experimentais de tumores *in vitro* (BRACKE et al., 1988) e *in vivo* (DESCHNER et al., 1991). Certos flavonoides inibiram a atividade de enzimas tais como a aldose-redutase (IWU et al., 1990) e xantina-oxidase (PATHAK et al., 1991). Os flavonoides também foram reportados por atuar no trato gastrointestinal como agentes antiúlcera (DI CARLO et al., 1999), antiespasmódico (CAPASSO et al., 1991), anti-secretório e antidiarréico (DI CARLO et al., 1993). Os flavonoides também são conhecidos pelos seus efeitos antialérgicos. Estes efeitos são em parte atribuídos à influência dos flavonoides sobre a produção de histamina (BERG; DANIEL, 1988).

Os flavonoides também podem prevenir catarata diabética por inibir a aldose-redutase óptica (CHAUDRY et al., 1983). As ações de alguns flavonoides podem estar relacionadas com a sua capacidade de interagir com o óxido nítrico (NO), que é um mediador de vários sistemas biológicos (MONCADA et al., 1991). Outras

atividades importantes como agentes antioxidantes e anti-radicais livres (BURDA; OLESZEK, 2001) também são relatadas.

3.4.3 Aspectos biossintéticos dos flavonoides

O esqueleto básico dos flavonoides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos ($C_6-C_3-C_6$), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico (Figura 5, pág. 52). O anel B e a parte heterocíclica do esqueleto flavônico são originados a partir de um éster do ácido hidroxicinâmico, ordinariamente denominado de 4-cumaril-CoA, ao passo que o núcleo A se origina de três unidades de acetato, via malonil-CoA. Ambos precursores derivam de carboidratos (metabolismo primário). A malonil-CoA é formada do acetil-CoA e CO_2 catalisado pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). 4-Cumaril-CoA e ésteres dos ácidos hidroxicinâmicos relacionados são supridos pelos primeiros passos da via geral dos fenilpropanóides. Esta via inicia-se a partir do aminoácido aromático fenilalanina, sendo este, por sua vez, sintetizado através da via chiquimato. A chave dessa reação é a desaminação da fenilalanina catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL). Esta enzima liga o metabolismo primário com a via dos fenilpropanóides, sendo que nas plantas está sob o controle de vários fatores internos e externos, tais como: hormônios, níveis de nutrição, luz, infecção por fungos, lesões, entre outros. O produto da reação, trans-cinamato, é hidroxilado ao 4-cumarato pela 4-hidroxilase cinamato, um citocromo P450 monoxigenase de função mista. A ativação do 4-cumarato pela formação do éster CoA é catalisada pela ligase de 4-cumarato-CoA. O 4-cumaril-CoA pode ser hidroxilado na posição 3 para cafeoil-CoA, que pode servir como substrato para a formação de chalconas (GOTTLIEB; BORIN, 1998).

A principal enzima envolvida na formação do esqueleto flavônico é a chalcona sintase (CHS). Esta enzima catalisa a condensação gradual de três unidades de acetato malonil-CoA com 4-cumaril-CoA ao C_{15} intermediário 2',4',6',4-tetrahidroxichalcona. O composto 6'- deoxichalcona, isoliquiritigenina, é um similar sintetizado a partir do malonil-CoA e do 4- cumaril-CoA via CHS, envolvendo nessa reação uma redutase dependente (NADPH). Os dois tipos de chalcona citados podem ser precursores diretos das auronas e de outros fenilpropanóides. Mas, em particular o 6-hidroxi e 6-deoxichalcona são os genitores imediatos de todos os tipos

de flavonoides e isoflavonoides. Contudo, as enzimas envolvidas nesta etapa ainda não são conhecidas. A ligação estereoespecífica da chalcona, catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), provê a 2S-flavanona com o esqueleto flavonoide típico. Dois tipos de CHI são conhecidos, uma catalisa a ciclização de 6'-hidroxichalcona a 5-hidroxi-flavanona; a outra CHI conhecida é a enzima chave na isomerização da 6'-hidroxi e 6'-deoxichalcona para a 5-hidroxi e 5-deoxichalcona, respectivamente (HELLER; FORKMANN, 1994).

Flavanonas são precursores diretos da maioria das classes de flavonas e isoflavonas, como também na formação de dois flavonoides intermediários: 4-flavanol e o dehidroflavanol (BOHM, 1994).

Flavonas são biossintetizadas a partir de flavanonas pela introdução de uma dupla ligação entre C-2 e C-3. Dois tipos de enzimas, a flavona sintase I-2-oxoglutarato dioxigenase dependente (FNS I) e a flavona sintase II (FNS II) são os catalizadores dessa reação. A formação de isoflavonas a partir de flavanonas se dá pela participação da 2-hidroxiisoflavanona sintase (IFS), um citocromo P450 monooxigenase de função mista. Esta enzima aceita tanto 5-hidroxi como 5-deoxiflavanonas como substrato. A reação em questão envolve um rearranjo oxidativo da flavanona, incluindo a troca do anel da posição 2 para a posição 3 (DEWICK, 1994).

Dewick (1994), a partir de experimentos realizados com *Cicer arietinum* (Fabaceae), postulou que a síntese de pterocarpanos procede a partir de isoflavonas, através de um intermediário pterocarpeno. Esse processo é mediado pela enzima pterocarpano sintase (PTS) e envolve a formação de um intermediário pterocarpeno. A transformação de pterocarpanos hidroxilados na posição 6a se dá a partir de ação específica da enzima pterocarpano 6a-hidroxilase (P6aH). As prenilações nesta classe de isoflavonoides são bem freqüentes e ocorrem pela presença de uma enzima específica, a pterocarpano prenil transferase (PTP).

A redução do grupo carbonila das flavonas origina compostos com esqueleto 4-flavanol. Esta reação é catalisada pela flavanona 4-redutase (FNR) e provê os precursores imediatos para a formação de 3-deoxiantocianinas, que, por sua vez, ocorrem em um número restrito de plantas.

Finalmente, as flavanonas podem ser hidroxiladas na posição 3, formando dehidroflavanóis, que são intermediários biossintéticos na formação de flavanóis,

catequinas, procianidinas e antocianidinas. Esta reação é catalisada pela 3-flavanona hidroxilase (FHT), uma 2-oxoglutarato dioxigenase dependente.

Dehidroflavonóis são substratos diretos para a abundante classe dos flavonóis, como também para a formação de substâncias com esqueleto 3,4-dióis, conhecidos como leucocianidinas. Flavonóis são formados a partir de dehidroflavonóis por introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, reação esta catalisada pela enzima flavonol sintase (FLS), outra 2-oxoglutarato dioxigenase dependente. A redução de dehidroflavonóis na posição 4, catalisada pela enzima 4-dehidroflavonol redutase (DFR), leva à formação de compostos do tipo *cis*-dióis, que são, por sua vez, intermediários na formação de catequinas, procianidinas e antocianidinas (HELLER; FORKMANN, 1994). As principais enzimas envolvidas nos processos biossintéticos das várias classes de flavonoides são mostradas no quadro 1, p. 51 e figura 5, p. 52 .

Enzima	Sigla	Numeração
Acetil-CoA carboxilase	ACC	I
Fenilalanina amônia liase	PAL	II
Cinamato-4-hidroxilase ligase	C4H	III
4-Cumarato-CoA ligase	4CL	IV
4-Cumaril-CoA 3-hidroxilase	CC3H	V
Chalcona sintase	CHS	1
Policetidio redutase	PKR	2
Chalcona isomerase	CHI	3
2-Hidroxiisoflavanona sintase	IFS	4
2-Hidroxiisoflavanone desidrase	IFD	5
Flavona sintase I	FNS I	6
Flavona sintase II	FNS II	-
Flavanona 4-redutase	FNR	7
Flavanona 3-hidroxilase	FHT	8
Flavonol sintase	FLS	9
Dehidroflavonol 4-redutase	DFR	10
Leucoantocianidina 4-redutase	LAR	11
Antocianidina sintase	ANS	12
Flavonoide 3-O-glucosil transferase	AGT	13
Pterocarpano sintase	PTS	14
Pterocarpano 6a-hidroxilase	P6aH	15
Prenil-pterocarpano transferase	PTP	-
Prenil transferase	PT	-
2'-Hidroxilase isoflavona	2'H	-
Isoflavona redutase	IFR	-
S-Adenosil Metionina	SAM	-
2-Hidroxiisoflavanona desidrase	2HFR	-
3',5'-hidroxilase	3',5'-H	-

Quadro 1. Enzimas envolvidas nos processos biossintéticos de classes de flavonóides.

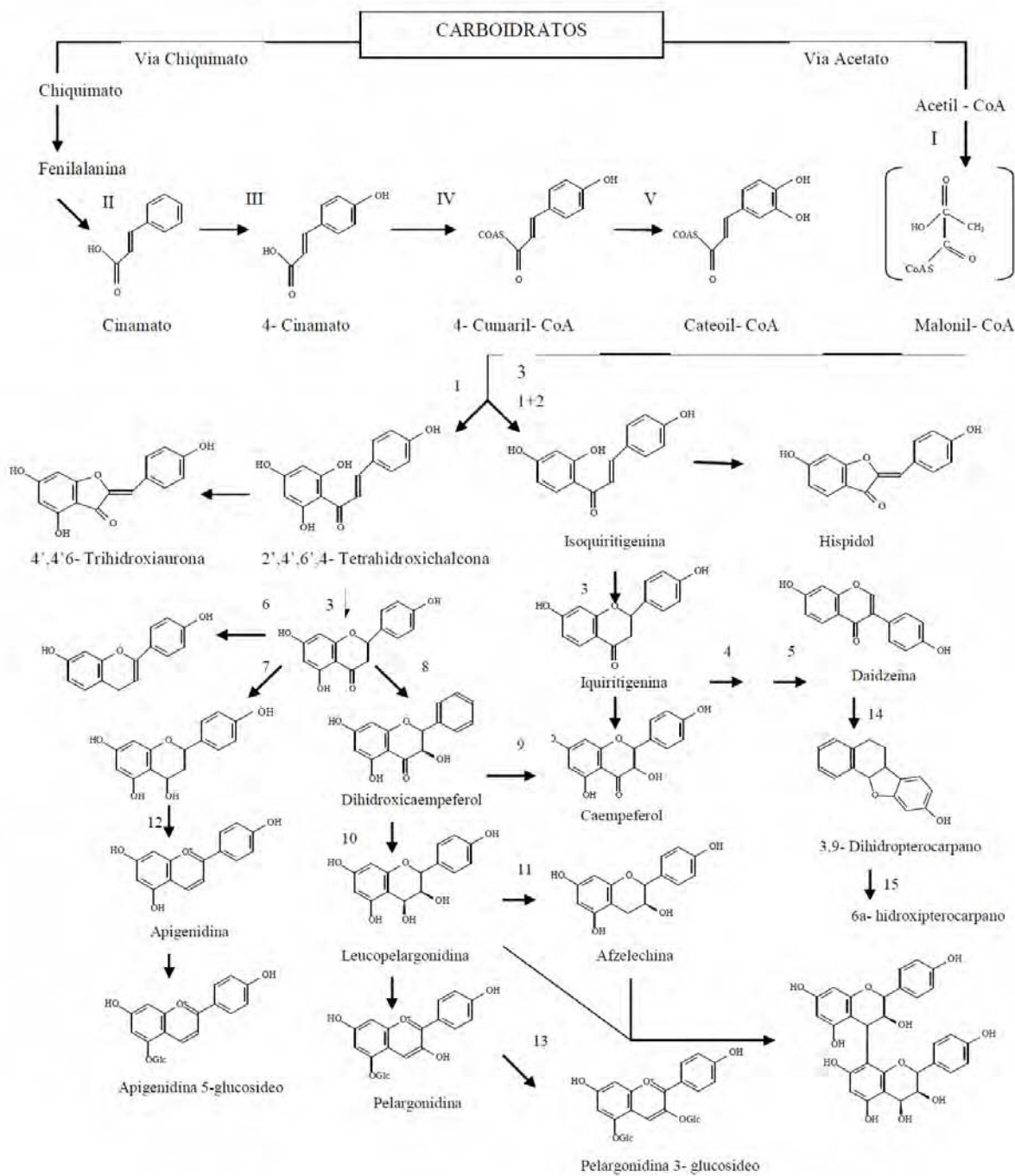


Figura 5. Representação da biossíntese dos flavonóides.

Fonte: DEWICK, 1994.

Família Solanaceae



3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae A. Juss. é considerada uma das maiores entre as angiospermas eudicotiledôneas reunindo cerca de 150 gêneros e 3000 espécies, com distribuição cosmopolita (representada na Figura 6, onde as áreas com verde mais intenso representam uma maior distribuição das espécies) concentradas na região neotropical (SOUZA & LORENZI, 2005). Muitas espécies dessa família são endêmicas no Brasil, sendo relatados 28 gêneros e cerca de 450 espécies (STEHMANN & MENTZ, 2006).



Figura 6. Mapa de distribuição da Família Solanaceae, representada em verde

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000282?tab=maps>

Algumas espécies de Solanaceae são utilizadas há muitos anos, como a *Mandragora officinarum* L., *Hyoscyamus niger* L. e *Atropa belladonna* L., tanto por suas propriedades curativas, quanto em práticas de magias e misticismo. São espécies que possuem atividades alucinógenas, devido à presença de alcaloides tropânicos, como hiosciamina, escopolamina e atropina que atuam no SNC, também encontrados em espécies de *Brugmansia* e *Datura* (RODDICK, 1991).

A família Solanaceae é amplamente pesquisada devido a sua inexorável importância econômica mundial, possuindo como principais representantes: a batata (*S. tuberosum*) (KODAMATANI et al., 2005; FRIEDMAN, 2004); a berinjela (*S.*

melongena L.) (GONÇALVES et al., 2006); o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (FRIEDMAN, 2004); o joá-bravo (*S. aculeastissimum*); erva moura (*S. americanum*); o tomatinho (*S. diflorum*); pimentas verdes e vermelhas (*Capsicum* spp.); inclusive plantas ornamentais como as petúnias (*Petúnia* spp.) e os jasmims (*S. jasminoides*). Está presente na família o tabaco (*Nicotiniana* spp.), uma das plantas mais nociva e economicamente mais importante do mundo, juntamente com outras plantas de valor toxicológico e medicinal como a beladona (*Atropa belladonna* L.) (EDMONDS et al., 1997). Outras espécies são utilizadas para outros fins, como por exemplo, espécies de *Capsicum*, que são empregadas na preparação de repelentes e "sprays" irritantes (SCHWEIGGERT et al., 2006), e pela presença de capsaicina que apresenta efeito analgésico, decorrente da estimulação do receptor específico vanilóide tipo 1 (ATERINA et al., 1997).

As plantas da família Solanaceae são fontes ricas de metabólitos secundários bioativos, como os alcaloides do tipo tropano (GRIFFIN; LIN, 2000), piridínicos (CHENG et al., 2008), sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcaloides (FRIEDMAN, 2004), alcaloides esteroidais (USUBILLAGA et al., 1997; WEISSENBERG, 2001; RIPPERGER; PORZEL, 1997), alcaloides do tipo pirrol (SAYED et al., 1998), flavonoides (SOUZA et al., 2002; CORNELIUS, 2004), esteróides (SAEZ et al., 1998), saponinas (ZHOU et al., 2006), sapogeninas esteroidais (USUBILLAGA et al., 1997; WEISSENBERG, 2001), alcanidas (SILVA et al., 2002), glicosídeos esteroidais (YOSHIMITSU et al., 2003) e até mesmo antraquinonas encontradas em menor quantidade (WINK, 2003).

Gênero Solanum



3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Solanum*

O gênero *Solanum* (família Solanaceae) é considerado um dos mais amplos e complexos entre as Angiospermas. É composto de cerca de 1000 espécies e aproximadamente 3000 epítetos já descritos. Este gênero é bem representado no Brasil, sendo amplamente distribuído do Norte ao Sul em regiões fitográficas diversas (representado na Figura 7, onde as áreas com verde mais intenso representam uma maior distribuição das espécies) (SILVA et al., 2006).

No Brasil, muitas espécies de *Solanum* são conhecidas como “jurubeba”, palavra originária do Tupi-guarani *yu’beba*, que está associada a presença de espinhos, sendo empregadas na medicina popular para vários fins. Dentre as mais conhecidas, *Solanum paniculatum* L. é a que mais se destaca pelos seus diferentes usos medicinais, por sua ampla distribuição e, principalmente, por ser única representante do gênero reconhecida como fitoterápico pela Farmacopéia Brasileira (PHARMACOPÉIA, 1929; 1959), cujas raízes e caules são indicados no tratamento da anemia e das desordens hepáticas e digestivas. Além disso, as raízes também são usadas no tratamento da artrite (MATOS et al., 1987), e fazem parte de garrafadas utilizadas como estimulante (AGRA, 1996).



Figura 7. Mapa de distribuição do gênero *Solanum*, representada em verde

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/40001681?tab=maps>

Alcaloides esteroidais são os principais metabólitos secundários encontrados no gênero *Solanum* e são de amplo interesse tanto na área de ecologia como de saúde. Na natureza, eles são componentes importantes para o armamento químico da planta contra herbívoros (FUKUHARA et al., 2004), tanto que estudos recentes relatam a utilização de espécies de *Solanum* disponíveis, como fontes potenciais e naturais de resistência contra o ataque do microrganismo *Ralstonia solanacearum*, que promove enfraquecimento das plantações (SIRI et al., 2009). Este fato é bastante interessante uma vez que os agroquímicos convencionais muitas vezes são custosos, ineficientes e nocivos a saúde animal e humana.

A toxicidade em humanos é manifestada pelos efeitos neurológicos e distúrbios gastrointestinais. Através de casos de intoxicações decorrentes do consumo de *S. tuberosum* "batatas", estimou-se uma dose tóxica para o ser humano na faixa de 2-5 mg/kg de peso corpóreo, o que indica uma toxicidade alta, quando comparado com as doses tóxicas de venenos bem conhecidos, tais como estricnina (5 mg/kg) e arsênio (8 mg/kg) (MORRIS & LEE, 1984).

Foi relatado efeito alelopático de espécies de *Solanum*, associado à presença dos alcaloides glicosilados espirosolanos como a solamargina e a solasonina que suprimem o crescimento de sementes de outras espécies (SILVA et al.; 2003).

Estudos anteriores centraram a atenção no isolamento e caracterização de alcaloides esteroidais do gênero *Solanum*, para a sua utilização como material de partida na produção industrial de hormônios esteroidais (FIESER & FIESER, 1959) e estudos biológicos dos mesmos. Os glicoalcaloides encontrados no gênero *Solanum* demonstraram inibição de crescimento de fungos, inativação do vírus *Herpes simplex* e os derivados da solasodina são efetivos clínicos e histologicamente no tratamento de tumores da pele (USUBILLAGA et al., 1997).

As propriedades tóxicas dos glicoalcaloides dependem do tipo de aglicona e da ligação do glicosídeo (ALZERRECA; HART, 1982; OSMAN, 1983; MAGA, 1994). Sendo assim, a reação de glicosilação importante para o biosíntese dos glicoalcaloides esteroidais (KOHARA et al., 2007).

Além de seu papel fisiológico nas plantas e de sua toxicidade, os glicoalcaloides e suas agliconas exibem um largo e notável espectro de atividades biológicas, sendo elas: antimicrobiana, antiviral, citotóxica, antifúngica (FENNER et al., 2006), imunosecretora, antioxidante, analgésica, antiinflamatória, cardiovascular, antiagregante plaquetária, antiasmática (VADNERE et al., 2008), antiulcerogênica,

antitumoral entre outras (NGUELEFACK et al., 2008), tendo assim, de acordo com banco de dados Napralert, mais de 100 espécies de *Solanum* estudadas, devido principalmente a presença desses metabólitos.

Estes relatos demonstram a importância deste gênero na medicina popular, onde muitas espécies vegetais ainda podem ser estudadas para a descoberta de novos compostos bioativos. Os produtos naturais continuam desempenhando um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas como materiais de partida para a síntese de drogas mais específicas e eficientes.

Solanum rhytidoandrum Sendtn

3.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O A ESPÉCIE *SOLANUM RHYTIDOANDRUM* SENDTN.

Solanum rhytidoandrum Sendtn. é uma espécie neotropical, exclusiva da América do Sul com distribuição no Brasil, Bolívia e Paraguai, ocorrendo em áreas do semi-árido, em elevações de 0-1.000 m. É comum na Paraíba, sendo encontrada em vegetação secundária, no litoral, brejos de altitudes, matas serranas e em diferentes tipos de microrregiões da caatinga, inclusive em áreas de conservação (Figura 8, p. 61). Habita solos argilosos, argilo-humosos e rupestres (AGRA et al.; 2009).

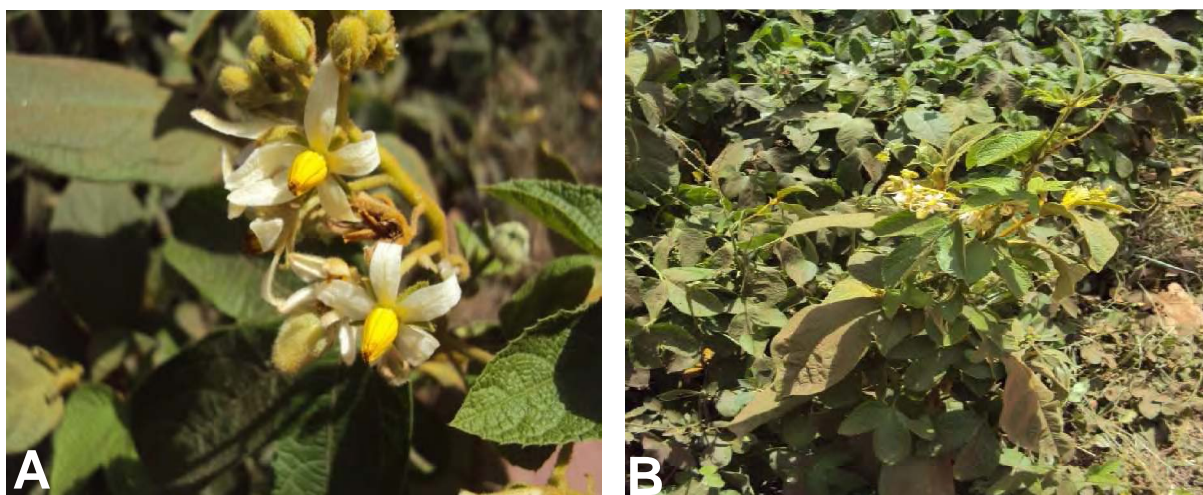


Figura 8. (A) Inflorescências de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. (B) Partes aéreas de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. Fonte: Fotos de ISIS FERNANDES GOMES, 2010.

Foram realizados estudos morfológicos comparativos entre as espécies *Solanum rhytidoandrum* e *Solanum paniculatum* L. de partes vegetativas de folhas, caules e raízes para as descrições e morfodiagnoses macroscópicas revelando caracteres anatômicos que refletiram as características gerais da família Solanaceae, etretanto, a morfologia das folhas, epiderme, raízes, sistema vascular, indumento e tricomas foram distintivos para separar as duas espécies (NURIT et al., 2007).

Em estudos anteriores com *Solanum rhytidoandrum* Sendtn., o extrato clorofórmico dos tricomas foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) resultando na identificação de cinco flavonoides (SILVA, 2002) (Figura 9, p. 62).

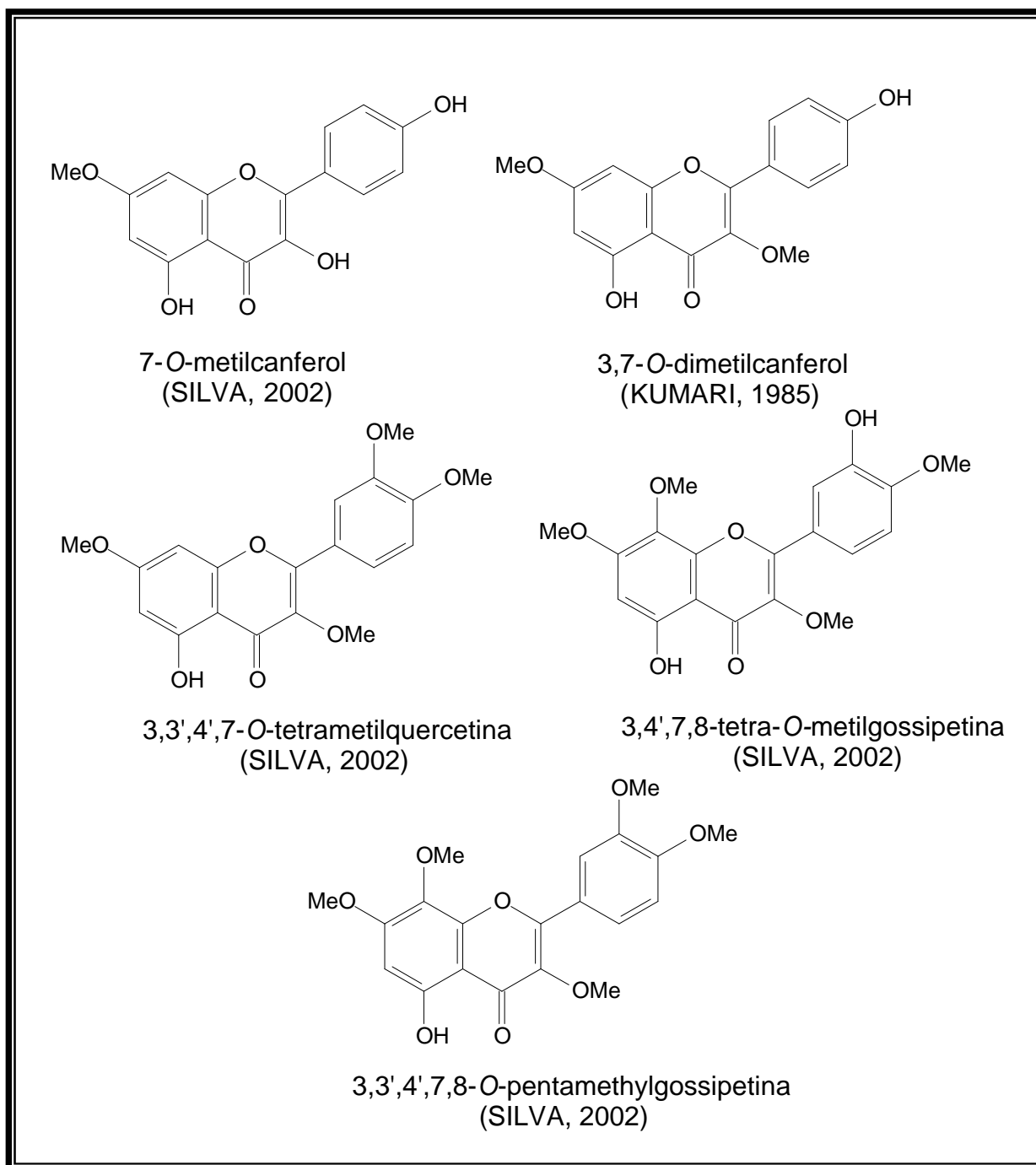


Figura 9. Flavonoides isolados dos tricomas de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn.

Alcaloides esteroideos



3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE ALCALOIDES ESTEROIDAIIS

O interesse relatado por Sato et al. (1951) e Kuhn, Loew e Trischman (1952) demonstrou que o alcaloide com esqueleto esteroidal do tipo espirostano, poderia funcionar como matéria-prima na síntese de hormônios esteroidais e corticosteróides. De acordo com Djerassi (1976), a solasodina com estrutura análoga à diosgenina, encontrada principalmente em *Dioscorea*, poderia substituí-la na síntese destes hormônios, devido a possibilidade de extinção das suas espécies. Têm-se a necessidade de obter moléculas que sejam convertidas facilmente no principal intermediário dos hormônios esteroidais, pois há um aumento crescente no uso de contraceptivos orais.

Friedman e McDonald (1997) relatam que pelo menos 90 alcaloides esteroidais com estruturas diferentes foram isolados de cerca de 350 espécies de *Solanum*. Estes alcaloides pertencem à subclasse dos pseudoalcaloides, pois o nitrogênio incorporado à estrutura não provém de um aminoácido, e sim incorporado à estrutura posteriormente.

Os alcaloides esteroidais são compostos naturais básicos, que na sua forma livre são solúveis em solventes orgânicos e seus sais são solúveis em água, sendo essas propriedades similares a outros grupos de alcaloides (DEWICK, 2001). Têm sido isolados tanto de vegetais como de animais, e em geral são compostos relativamente tóxicos ou muito tóxicos. Os mecanismos de toxicidade são diversos. Entre esses se encontram o bloqueio seletivo dos canais de sódio, como no caso das batráquio-toxinas, e a despolarização das membranas de neurônios e células musculares, como no caso da veratridina. Muitos alcaloides de *Solanum* e *Veratrum* são teratogênicos, além de produzir intoxicações agudas em doses maiores (CHIESA *et al.*, 1999).

Existem em espécies de *Solanum* na forma glicosilada, como glicoalcaloides, e formados a partir de unidades isoprênicas, os mesmos precursores dos esteróides. Consistem em dois componentes estruturais básicos: uma parte hidrofóbica com esqueleto colestano C-27 (aglicona), e outra hidrofílica, com uma cadeia lateral formada por unidades de aldoses (SCHREIBER, 1968).

3.9 ASPECTOS BIOSINTÉTICOS DOS ALCALOIDES ESTEROIDAIIS

Os átomos de nitrogênio dos alcaloides são oriundos de um aminoácido e, em geral, seu esqueleto carbônico é mantido intacto na sua estrutura. Relativamente poucos aminoácidos precursores estão envolvidos na biossíntese dos alcaloides, os principais são a ornitina, a lisina, o ácido nicotínico, a tirosina, o triptofano, o ácido antranílico e a histidina (DEWICK, 2001).

Entretanto outras classes de alcaloides não utilizam inicialmente os aminoácidos na sua biossíntese. Na maioria dos exemplos estudados, o átomo de nitrogênio é doado de uma fonte de aminoácido através de uma reação de transaminação com o aldeído ou cetona adequados. Contudo, um amplo grupo de alcaloides adquire seus átomos de nitrogênio via reações de transaminação incorporando apenas o nitrogênio de um aminoácido, enquanto o restante da molécula pode ser derivada das rotas do acetato, do chiquimato ou pode também ter origem terpênica ou esteroideal. O termo "pseudo-alcaloide" é algumas vezes utilizado para distinguir esse grupo (DEWICK, 2001).

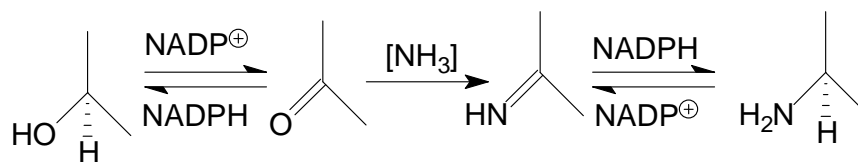
A incorporação do(s) átomo(s) de nitrogênio ocorre(m) em etapas avançadas da biossíntese dos alcaloides esteroidais e, por essa razão podem ser considerados tanto alcaloides como derivados aminados de seus precursores esteroidais. Contudo, as modificações sofridas são de importância crucial na determinação do destino e função desses compostos, pelo que são considerados como um grupo independente (CHIESA *et al.*, 1999).

Muitas plantas da família Solanaceae possuem alcaloides esteroidais baseados num esqueleto colestano como no caso da solasodina (Figura 15, p. 71). Em contraste com seus análogos oxigenados, todos esses compostos possuem a mesma configuração no C-25 (com a metila sempre na posição equatorial), porém podem ter diferente estereoquímica no C-22, podendo-se citar a solasodina (Figura 15, p. 71) e a tomatidina (Figura 15, p. 71) (DEWICK, 2001).

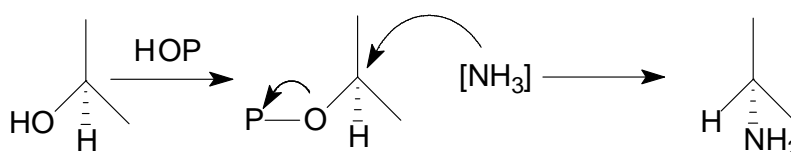
A incorporação do nitrogênio à molécula pode ocorrer por três mecanismos diferentes:

- ✓ oxi-redução;
- ✓ substituição;
- ✓ adição à ligação dupla (Figura 10, p. 66).

Quando a incorporação do nitrogênio ocorre pelo mecanismo de oxi-redução, a configuração do carbono pode ou não ser mantida, já no mecanismo de substituição tem sempre como resultado a inversão da configuração (CHIESA et al., 1999).



Processo redox



Substituição

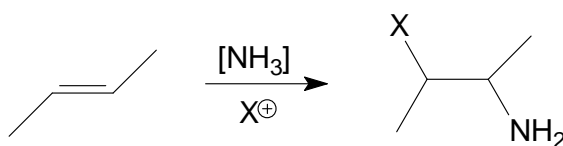


Figura 10. Mecanismos de incorporação do nitrogênio na biossíntese dos alcaloides esteroidais.

* HOP: Fosfato ou pirofosfato (CHIESA et al., 1999).

A aminação emprega a *L-arginina* como fonte de nitrogênio, via um processo de substituição no 26-hidroxicolesterol. Uma segunda substituição permite que o 26-amino-22-hidroxicolesterol ciclize, gerando um anel piridínico. Depois ocorre uma nova hidroxilação na posição 16, uma 16-β-hidroxilaminação. A amina secundária é oxidada a uma imina e o "sistema espiro" pode ser gerado como resultado de uma adição nucleofílica da 6-β-hidroxi na imina (ou íon imínium via protonação). A configuração do C-22 depende desta reação onde, tanto pode ser formado a 22R, como no caso da solasodina (Figura 15, p. 71), ou a 22S, como na tomatidina (Figura 15, p. 71) (DEWICK, 2001).

Uma variação no modo de ciclização da cadeia lateral do colesterol pode ser encontrada na solanidina (Figura 12, p. 68), a qual contém um sistema de anéis condensados com o nitrogênio como cabeça de ponte. A solanidina é encontrada

em batatas (*S. tuberosum*) tipicamente como glicosídeo: a α -solanina. Esse sistema de anéis condensados é produzido por uma ramificação da rota principal para a síntese da solasodina/tomatidina. Desta forma, um processo de substituição irá permitir a geração de um novo sistema de anéis (DEWICK, 2001).

A incorporação do nitrogênio é precedida pela etapa de hidroxilação da cadeia lateral. O colesterol é hidroxilado especificamente nos carbonos 26 ou 27, o que determinará posteriormente a configuração definitiva do carbono 25. Na segunda etapa pode ocorrer a substituição do grupamento hidroxila por um grupo amina, ou a oxidação na posição C-22. Independentemente da ordem que ocorram essas reações, tem-se lugar uma ciclização para a formação do anel F. A ativação da posição C-16 pela hidroxilação, permite uma nova ciclização que pode dar origem aos compostos com dois anéis fundidos através de um átomo de nitrogênio como ponte, caracterizando a formação de um alcaloide esteroidal do tipo solanidano, ou unidos através de um átomo de carbono caracterizando o sistema espiro presente nos alcaloides esteroidais do tipo espirosolano (Figura 11, p. 67).

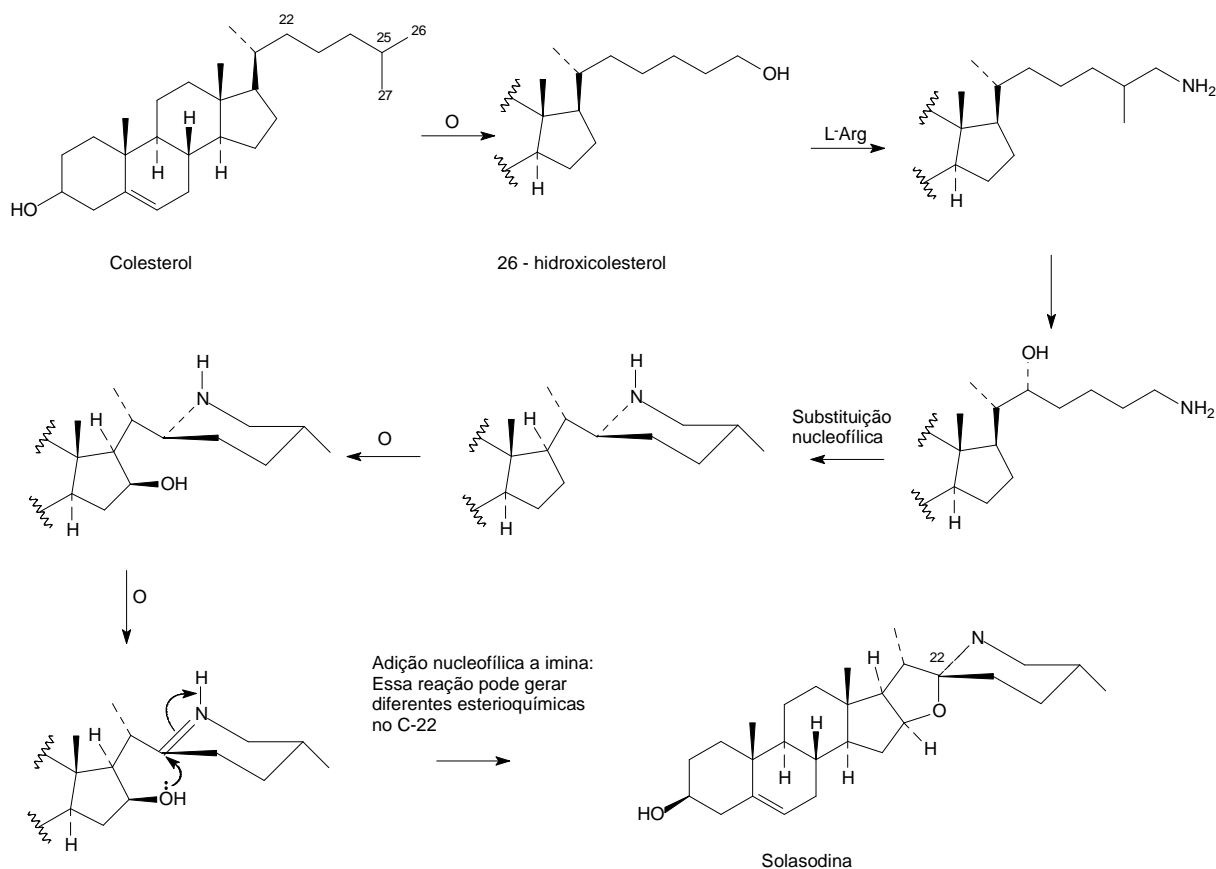


Figura 11. Rota simplificada da biossíntese de alcaloides esteroidais. Fonte: DEWICK et al., 2001.

As agliconas dos glicoalcaloides de *Solanum* são produtos comuns de uma rota biossintética que divergem na forma de ciclização da cadeia lateral do colesterol. Desta maneira, os espirosolanos e os solanidanos que possuem em comum o sistema de anéis tipo alcamina, são derivados de um intermediário comum (Figura 12, p. 68) (OSMAN et al., 1991).

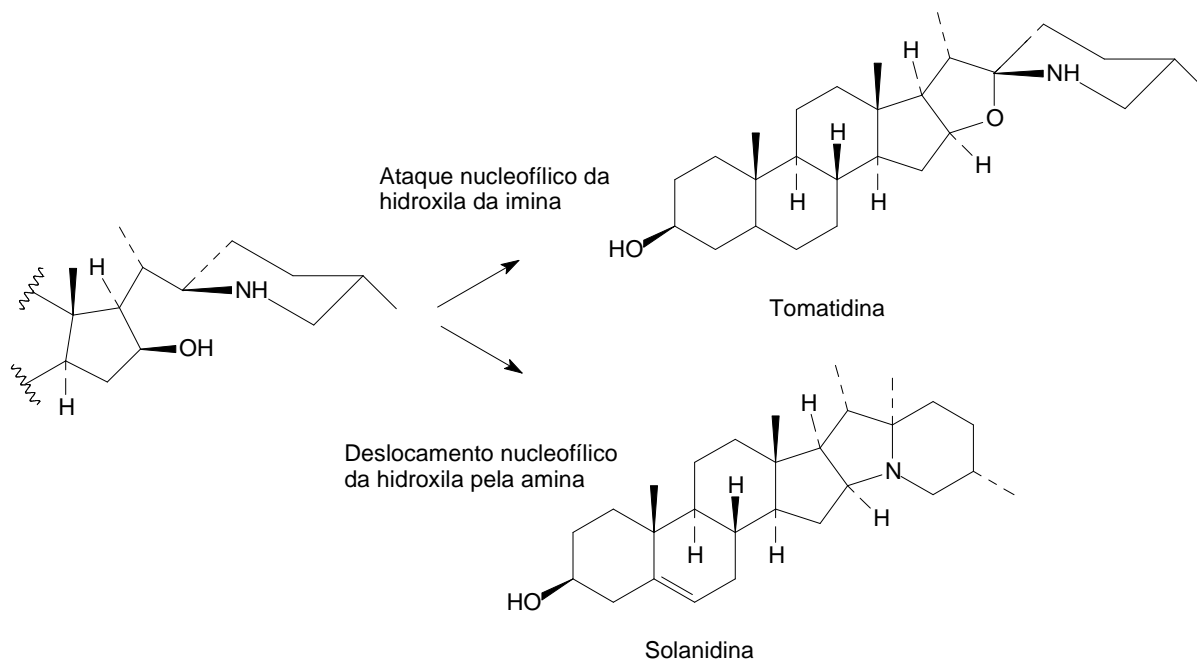


Figura 12. Ciclizações possíveis para a formação do anel E (Adaptada de OSMAN et al., 1991).

A incorporação de precursores marcados que os alcaloides esteroidais são biossintetizados a partir do colesterol. Também é indicativo deste fato que alguns alcaloides como a tomatidina (Figura 15, p. 71), produzida principalmente pelo tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) e a solanina, produzida pela batata (*Solanum tuberosum* L.) possuem esqueleto esteroidal intacto.

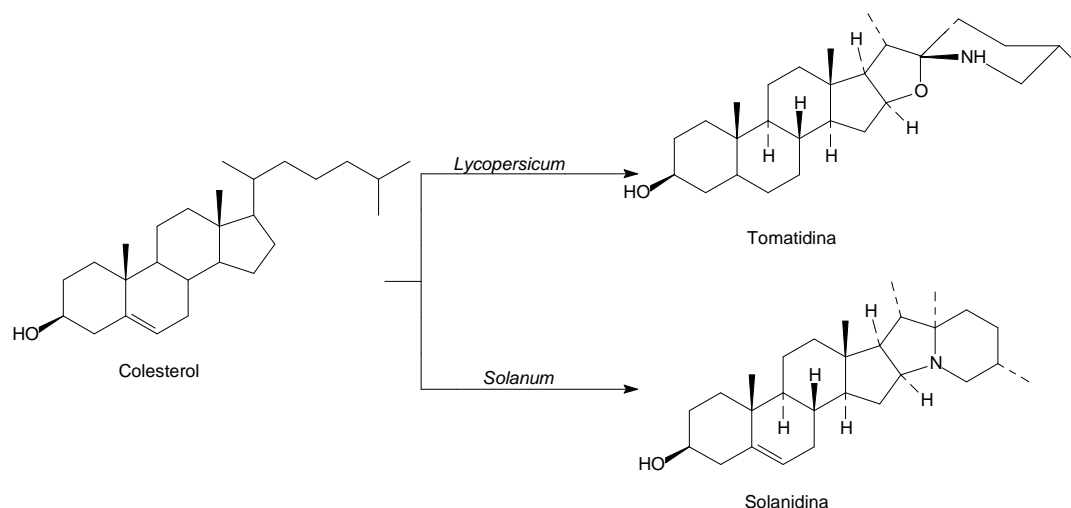


Figura 13. Exemplo de alcaloides esteroidais obtidos a partir do colesterol.

3.10 CLASSIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES ESTEROIDAIS

Os alcaloides são classificados de acordo com a natureza da estrutura que contém o átomo de nitrogênio como, por exemplo, os pirrolidínicos, piperidínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, indólicos, entre outros. A complexidade estrutural de alguns desses exemplos rapidamente se expande em seus números e subdivisões (DEWICK, 2001).

Os alcaloides esteroidais são classificados com base no hidrocarboneto esteroidal que melhor representa a estrutura geral do composto e sua configuração. De acordo com esse critério, se distinguem três grupos principais (CHIESA et al., 1999):

3.10.1 Aminopregnanos

São compostos esteroidais de 21 átomos de carbono produzidos pela degradação da cadeia lateral do colesterol, que contém o esqueleto do pregnano. Esses alcaloides são produzidos principalmente pelas espécies da família Apocinaceae, e em menor quantidade, por espécies das famílias Buxaceae e Solanaceae. O nitrogênio pode estar presente formando uma amina alifática, seja na posição C-3, ou mais frequentemente, na posição C-20. Eventualmente ambas as

posições podem estar aminadas. Alguns exemplos estruturais podem ser observados na Figura 14, p. 70.

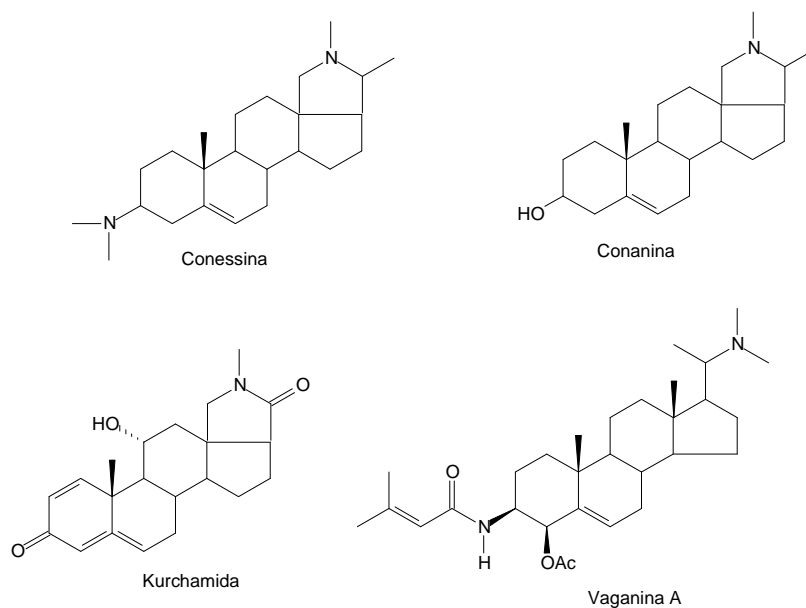


Figura 14. Exemplos de alcaloides do tipo aminopregnano.

3.10.2 Piperidilpregnanos

Com frequência os alcaloides esteroidais C27 são análogos às sapogeninas oxigenadas encontradas na mesma planta e assim como estas, podem ser encontrados na forma de glicosídeos freqüentemente unidos aos mesmos oligosacarídeos presentes em outros glicosídeos produzidos pela planta. Apesar de sua semelhança estrutural com as sapogeninas esteroidais, estes alcaloides possuem uma distribuição mais restrita entre os vegetais e são encontrados apenas nas famílias Solanaceae e Liliaceae. São particularmente abundantes nos gêneros *Fritillaria* e *Veratrum* (Liliaceae) e *Solanum*, *Lycopersicum* e *Cestrum* (Solanaceae).

São compostos que apesar de conservarem a estrutura de 27 átomos de carbono do colesterol, apresentam o átomo de nitrogênio no anel piperidina. Os alcaloides do tipo piperidilpregnano classificam-se por sua vez em quatro subgrupos:

3.10.2.1 Espirosolanos

Caracterizam-se pela presença de dois anéis heterocíclicos unidos através de um carbono espiro (C-22), e muitos deles se encontram naturalmente como glicosídeos. A tomatidina (Figura 15, p. 71), o principal alcaloide do tomate (*L. esculentum* L.) é também comum em outras espécies de tomates selvagens e em outros gêneros relacionados e apresenta a estereoquímica 25S, 22 β N. O seu estereoisômero solasodina (Figura 15, p. 71), com estereoquímica 25R, 22 α N, é amplamente empregado na síntese de hormônios esteroidais.

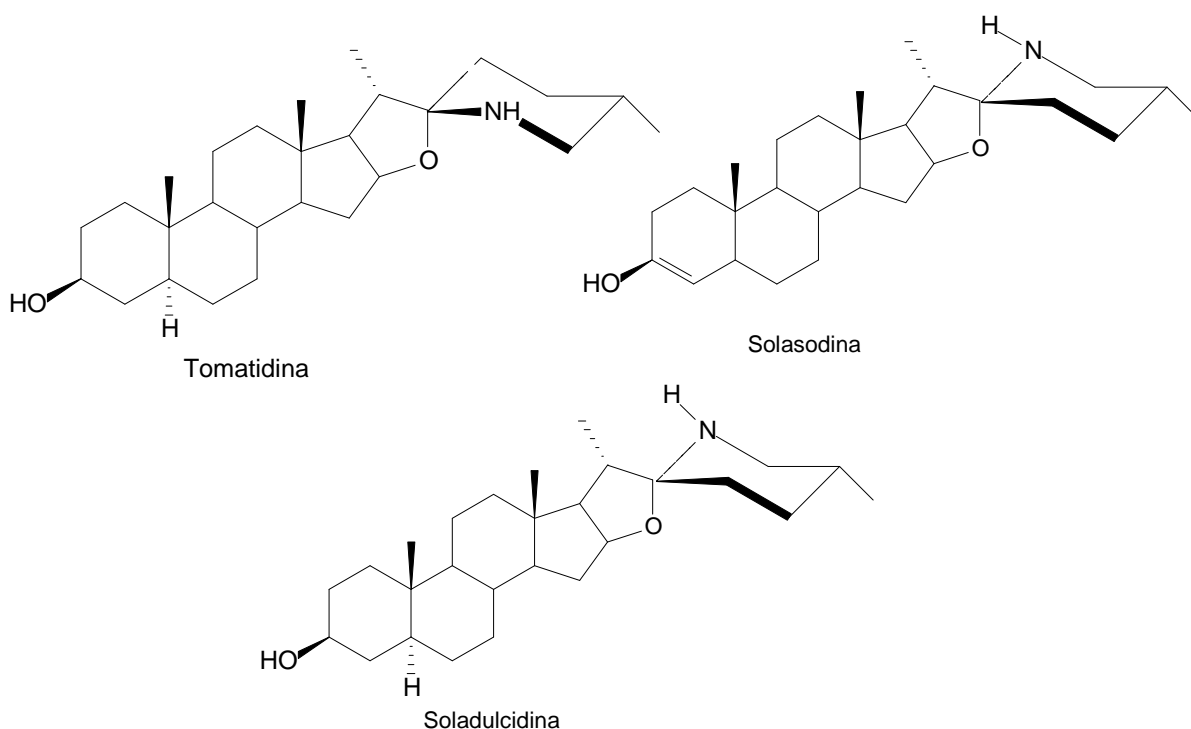


Figura 15. Exemplos de alcaloides do tipo espirosolano.

3.10.2.2 Solanidanos

A cadeia lateral se cicliza formando dois anéis fundidos, com um átomo de nitrogênio como cabeça de ponte. Os solanidanos com uma estereoquímica 22 α H, 25S são os mais comuns e, dentro desse grupo estão incluídos a solanidina (22R), a demissidina (22R) e a leptinidina (22S), entre outros os quais são encontrados na planta sob a forma de glicosídeos. A solanina (4) e a chaconina (5), que são os glicoalcaloides mais comuns da batata (*S. tuberosum*), são formados a partir da

glicosilação do alcaloide esteroidal solanidina pelo trissacarídeo, a solatriose ou a chacotriose, respectivamente.

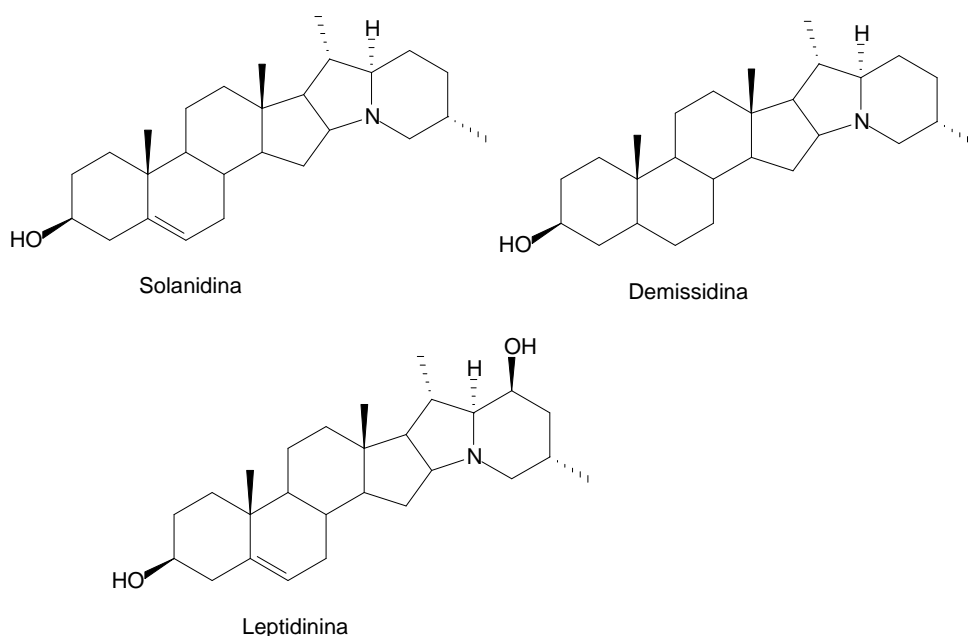


Figura 16. Exemplos de alcaloides do tipo solanidano.

3.10.2.3 Solanocapsinas

Derivadas do 22,26-epimino-hemiacetal, pois possuem um anel pirano e um piperidina, fundidos através de uma união hemiacetálica. A solanocapsina obtida de *Solanum pseudocapsicum* L. foi o primeiro alcaloide isolado deste tipo. A estereoquímica da união desses dois anéis heterocíclicos pode ser *cis*, como no caso da pimpifolidina, ou *trans*, como na 22-isopimpifolidina (16), ambas isoladas de uma espécie de tomate selvagem, *Lycopersicum pimpinellifolium* Dunal. (Figura 17, p. 73).

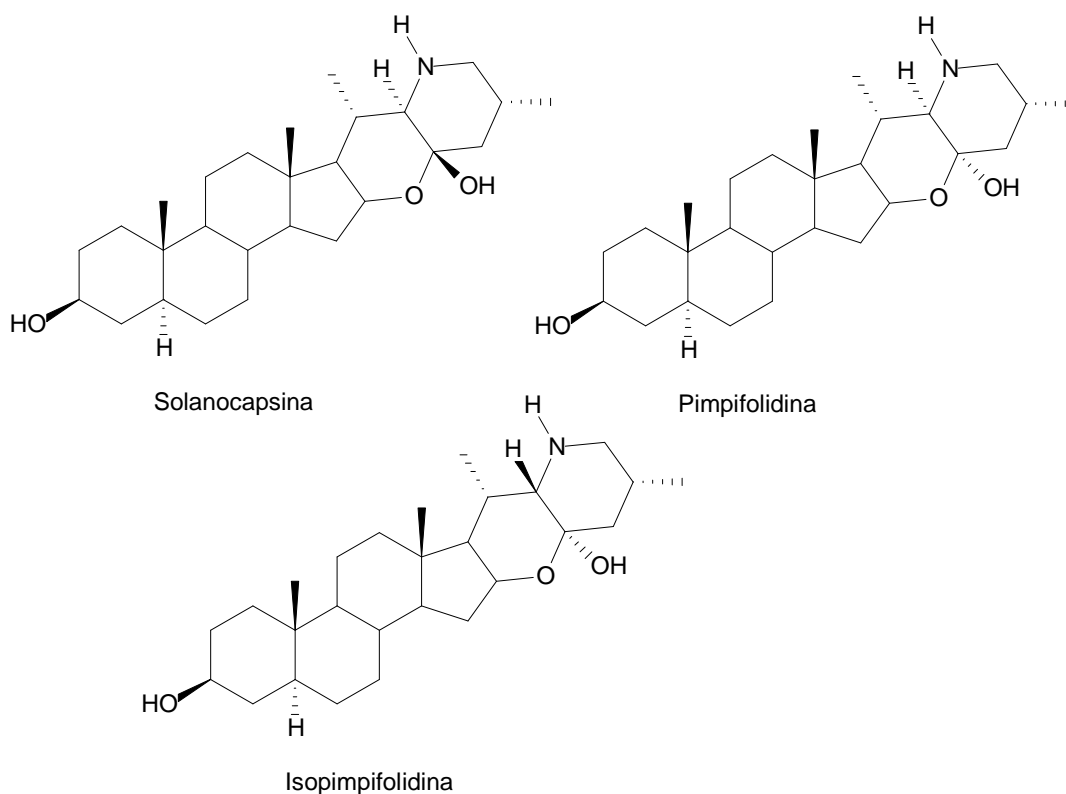


Figura 17. Exemplos de alcaloides do tipo solanocapsina.

3.10.2.4 Piperidilpregnanos simples

Derivadas do piperidilpregnano, onde a cadeia lateral do colesterol dá origem a um único anel piperidina. Esta classe de alcaloides encontra-se principalmente nos gêneros *Solanum* e *Veratrum* e são caracterizados pela presença do anel E aberto. São menos freqüentes e podem, em alguns casos, representar precursores ou intermediários biossintéticos de outros compostos. Exemplos desses alcaloides podem ser encontrados na Figura 18, p. 74.

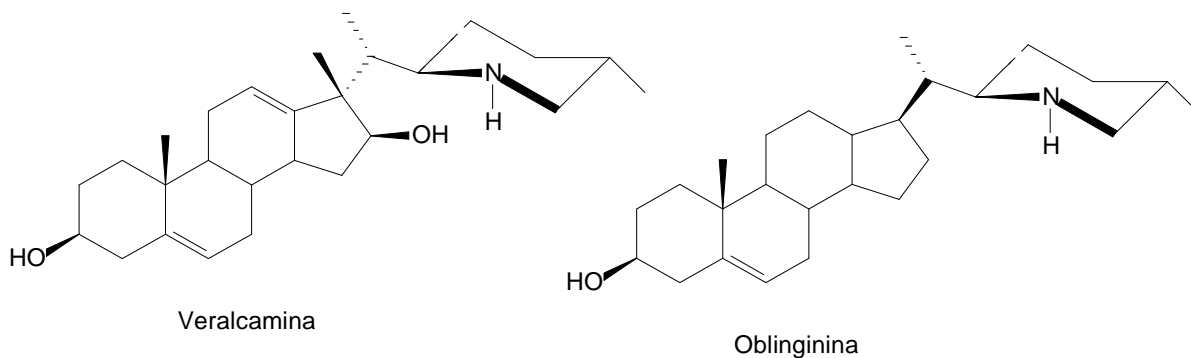
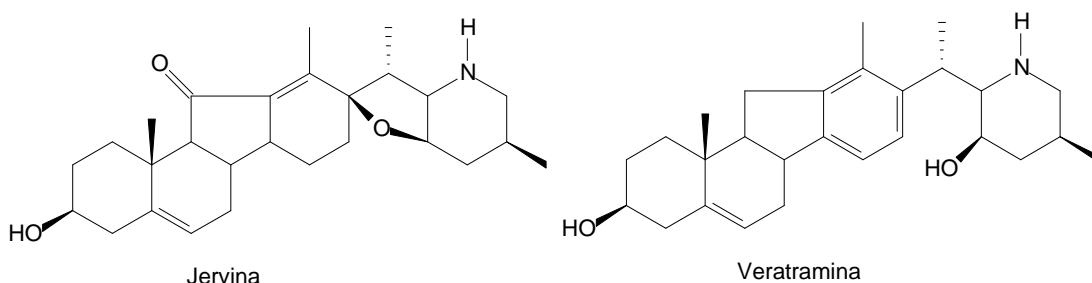


Figura 18. Exemplos de alcaloides do tipo piperidilpregnanos simples.

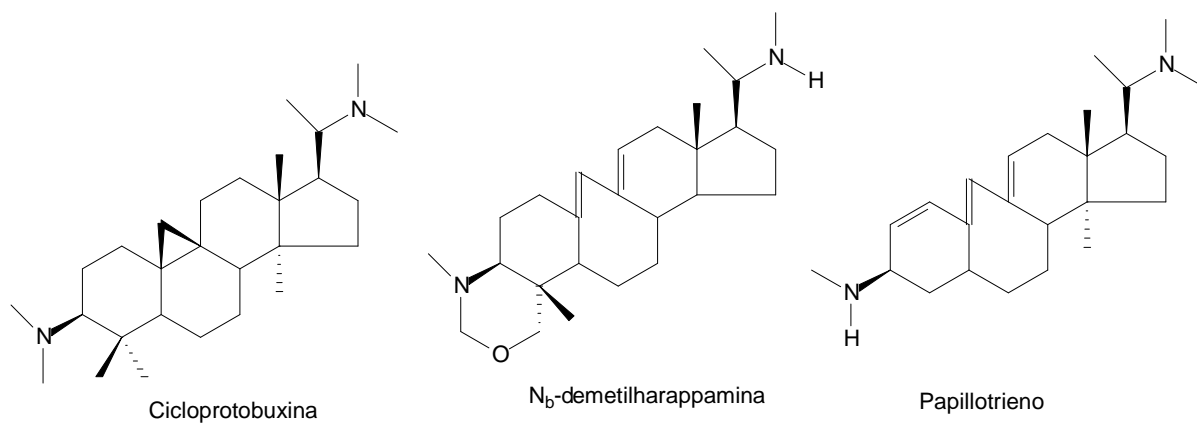
3.10.3 Alcaloides com esqueletos anômalos

São aqueles onde a estrutura do cicloperidrofenantreno sofreu modificações. A principal diferença quando comparado aos grupos anteriores, é que apresentam esqueletos esteroidais modificados. Dentro deste grupo se distinguem duas classes: **1)** alcaloides de *Veratrum* (Figura 19, p. 74), que apresentam um esqueleto 12-*nor*-D-*homo* e, **2)** alcaloides de *Buxus* [Figura 19 (cont.), p. 75], que estão estruturalmente relacionados com o cicloartenol.



Exemplo de alcalóides de *Veratrum*

Figura 19. Alcaloides com esqueletos anômalos.



Exemplo de alcalóides de *Buxus*.

Figura 19 (cont.). Alcaloides com esqueletos anômalos.

Ensaaios biolóxicos



3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.11.1 Ensaios biológicos frente *Artemia salina* Leach

Laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre esses bioensaios, encontra-se o ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente *A. salina* e atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRAE; HUDSON; TOWERS, 1988) parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. Há, também, correlação com a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (MacLAUGHLIN, 1991).

Atualmente, um dos debates éticos em ampla evidência está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Adicionalmente, além da questão ética, existe um fator financeiro envolvido nos estudos de toxicidade *in vivo*. Uma das soluções para essa problemática sugere a realização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de prever o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001).

3.11.2 Ensaios biológico de citotoxicidade frente células leucêmicas

Investigações químicas e farmacológicas utilizando plantas medicinais têm proporcionado importantes avanços na abordagem terapêutica de diversas doenças, bem como ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico da fisiologia e

farmacologia. Uma série de medicamentos a base de plantas contendo alcalóides esteroidais, que geralmente estão presentes como glicosídeos e flavonóides, que consumidos diariamente em nossa dieta vegetal são empregadas para o tratamento de certos tipos de câncer.

Existe uma série de substâncias isoladas de plantas amplamente utilizadas no tratamento do câncer (HARTWELL, 1982). Dentre elas, encontram-se os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), cujo isolamento introduziu uma nova era do uso de plantas medicinais como agentes anticâncer. A descoberta do paclitaxel da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) é outra evidência do sucesso na descoberta de drogas de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005), sendo ativo contra câncer de ovário, câncer avançado de mama e câncer de pulmão (ROWINSKY et al., 1992). Em 1966, Wall, Wani e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL et al., 1966; OBERLIES; KROLL, 2004).

Epipodofilotoxina é um isômero da podofilotoxina, a qual foi isolada como um agente antitumoral ativo das raízes das espécies do gênero *Podophyllum*, *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi* (Berberidaceae) (STAHELIN, 1973). Etoposídeo e teniposídeo são dois derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina e são usados no tratamento de linfomas e câncer brônquico e testicular (HARVEY, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2005; SHOEB, 2006). Homoharringtonina, isolada de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), é outro agente derivado de produto natural de uso clínico, para leucemia mielóide aguda e crônica (KANTARJIAN et al., 1996; CRAGG; NEWMAN, 2005; ITOKAWA; WANG; LEE, 2005).

Considerando esses aspectos, é nítido o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos para o tratamento do câncer.

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI; XU, 2006).

Material e Métodos



4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal de *Pithecoseris pacourinoides* Mart., e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn., foi coletado no Estado da Paraíba, em Agosto de 2009 e exsiccatas destas espécies encontram-se catalogadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro AGRA et al. 7119, e AGRA et al. 6227 respectivamente, sendo ambos identificados pela botânica Prof^a Dra. Maria de Fátima Agra do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB).

4.1.2 Métodos de análise

4.1.2.1 Métodos cromatográficos

Na partição por filtração a vácuo foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck), de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm. Utilizamos na cromatografia em coluna (CC) Sephadex LH-20[®] da AMERSHAM BIOSCIENCES, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para cromatografia em camada delgada (CCD), foi usada sílica gel 60 PF254 ART 7749 da MERCK, distribuída sobre placas de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo quick fit, seguindo técnica descrita por MATOS (1997). As cromatoplasmas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110,0 °C durante cinco horas.

As revelações das substâncias nas CCD analíticas foram executadas pela exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58 e/ou pela pulverização com o reagente Draggendorf para alcaloides. Também foi utilizado como revelador câmara saturada com vapores de iodo. O grau de pureza preliminar das substâncias foi evidenciado por cromatografia em camada delgada

analítica (CCDA), determinando-o quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluição diferentes.

4.1.2.2 Métodos espectrométricos

4.1.2.2.1 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro marca BOMEM, modelo MB 100 do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

4.1.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro da marca MERCURY-VARIAN (LMCA/UFPB) operando a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C) e VARIAN- NMR-SYSTEM (LMCA/UFPB) operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se em solvente deuterado da Cambridge Isotope Laboratories (CDCl_3 , CD_3OD e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes: clorofórmio (δH 7,24), metanol (dH 3,30 ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio (δC 77,0), metanol (dC 49,00 ppm).

As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), dl (duplete largo), t (tripleto), q (quadruplete), m (multiplete).

4.1.2.2.3 Espectrômetria de Massas

Foram utilizadas concentrações de 1ng/ μL das amostras para obtenção dos espectros utilizando o espectrômetro de Massas (Bruker, *Ion Trap* Amazon)

acoplado a Cromatógrafo Líquido (Shimadzu Série 20AD (SPD-M20A; controladora: CBM-20; Bomba: LC-20AD (2); Degasificador: DGU-14A).

4.1.2.3 Pontos de fusão

Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350 °C. Os valores obtidos não foram corrigidos.

4.1.3 Processamento das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.

As inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 3,0 Kg do pó seco.

4.1.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável denominado percolador. Foram feitos quatro processos de extração num intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador a uma temperatura média de 40 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que pesou 247,60g (8,2 % em relação ao peso seco da planta).

4.1.3.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.

Para obtenção das fases, 50 gramas do extrato etanólico bruto foi submetido a uma partição á vácuo com funil de placa porosa, utilizando sílica gel 60 (70-230

mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária e como fase móvel, em grau crescente de polaridade, os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros e uma mistura binária de acetato de etila: metanol, numa proporção 7:3, obtendo-se 4 fases. As soluções obtidas nesse processo foram concentradas sob pressão reduzida em rotaevaporador a uma temperatura média de 40°C obtendo-se quatro fases: 11,6713 g da fase hexânica, 9,4779 g da fase diclorometano, 12,0649 g da fase acetato de etila e 17,6284g da fase acetato de etila: metanol (7:3). Na fase acetato de etila obtivemos um precipitado, o qual codificamos como **Pp-1** e **Pp-2** (FLUXOGRAMA 1, p. 85).

4.1.4 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.

4.1.4.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex LH-20®

Uma alíquota da fase acetato de etila (5,0 g) foi submetida à coluna cromatográfica (CC), utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20®, e como fase móvel metanol. Neste processo obteve-se um total de 62 frações que foram coletadas em vidros de 15 mL.

Todas as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus fatores de retenção (R_fs), após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada de vapores de iodo. As frações foram reunidas em 12 grupos. (FLUXOGRAMA 2, p. 86).

A frações 34 a 41 (73,4 mg) foram reunidas e apresentaram-se como um sólido amarelo, mais ainda com grau de pureza insatisfatório após análise em CCDA. Com isso realizamos duas posteriores cromatografias em coluna, da reunião das frações 34 a 41, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20®, e como fase móvel metanol. Na coluna 9 utilizamos 13,4 mg e obtivemos 10 frações, as quais foram reunidas em três grupos, seguindo os critérios expostos anteriormente, dos quais, o grupo das frações 6 e 7 foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP1), utilizando Clorofórmio:MeOH (85 :15) como eluentes,

fornecendo seis faixas, sendo a faixa 4 analisada e codificada como **Pp-3** (4,0 mg) (FLUXOGRAMA 2, p. 86). Já na coluna 10, utilizamos 60,0 mg e obtivemos 16 frações, as quais foram reunidas em quatro grupos, sendo o das frações 6 a 11 submetido a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP2), utilizando Clorofórmio:MeOH (85 :15) como eluentes, fornecendo seis faixas, que foram analisadas, resultando na faixa 5 codificada como **Pp-4** (33,1 mg) (FLUXOGRAMA 2, p. 86).

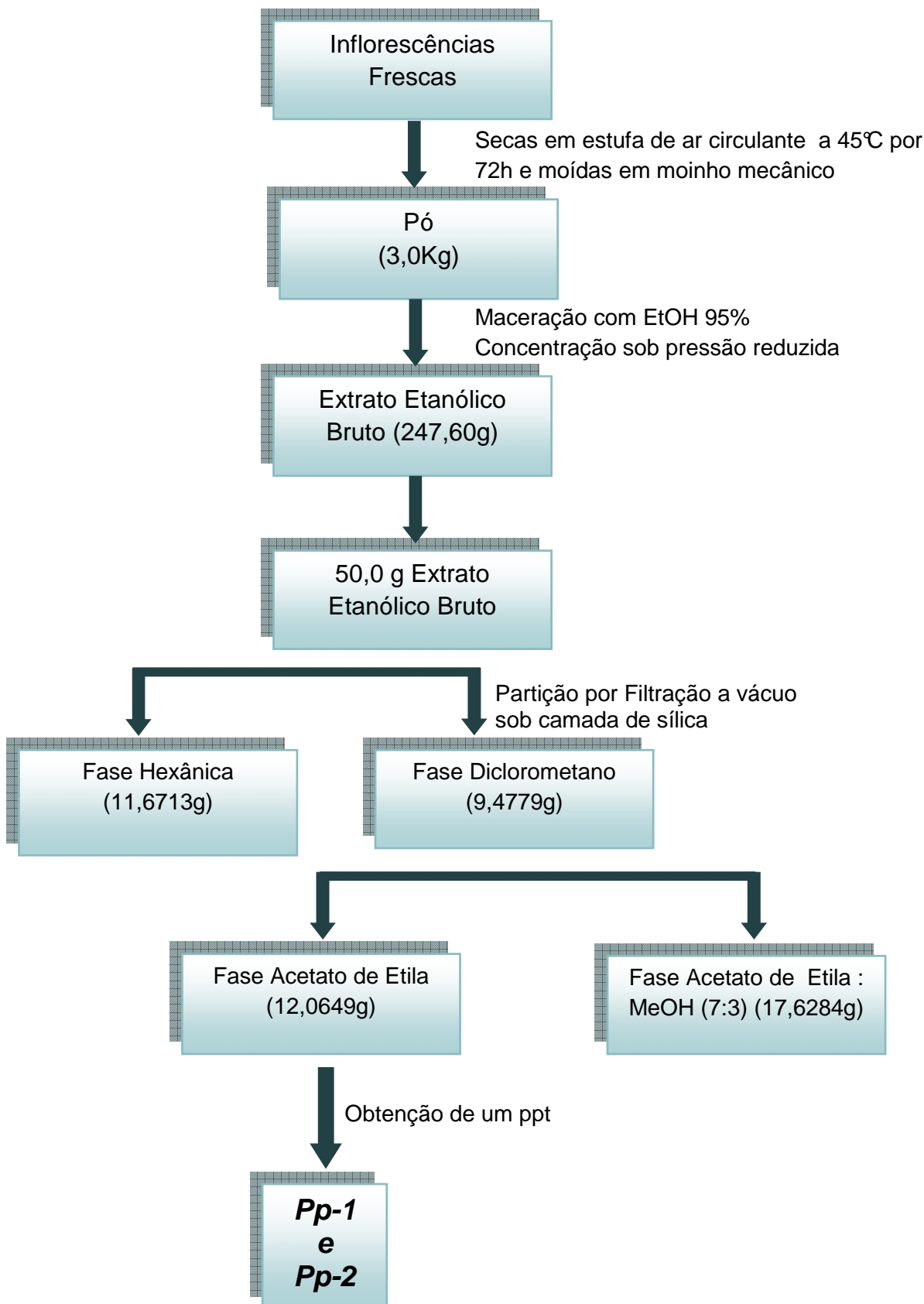
A fração 51 (47,5 mg) foi cromatografada utilizando como adsorvente Sephadex LH-20®, e como eluente, metanol, obtendo-se quatro grupos, dos quais o das frações 5 a 8 foi recromatografado, novamente utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20®, e como fase móvel metanol, apresentando-se a fração 4 como sólido vermelho, que após análise foi codificada como **Pp-5** (16,0 mg) (FLUXOGRAMA 2, p. 86).

4.1.4.2 Processamento das raízes de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. e fracionamento cromatográfico em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20®

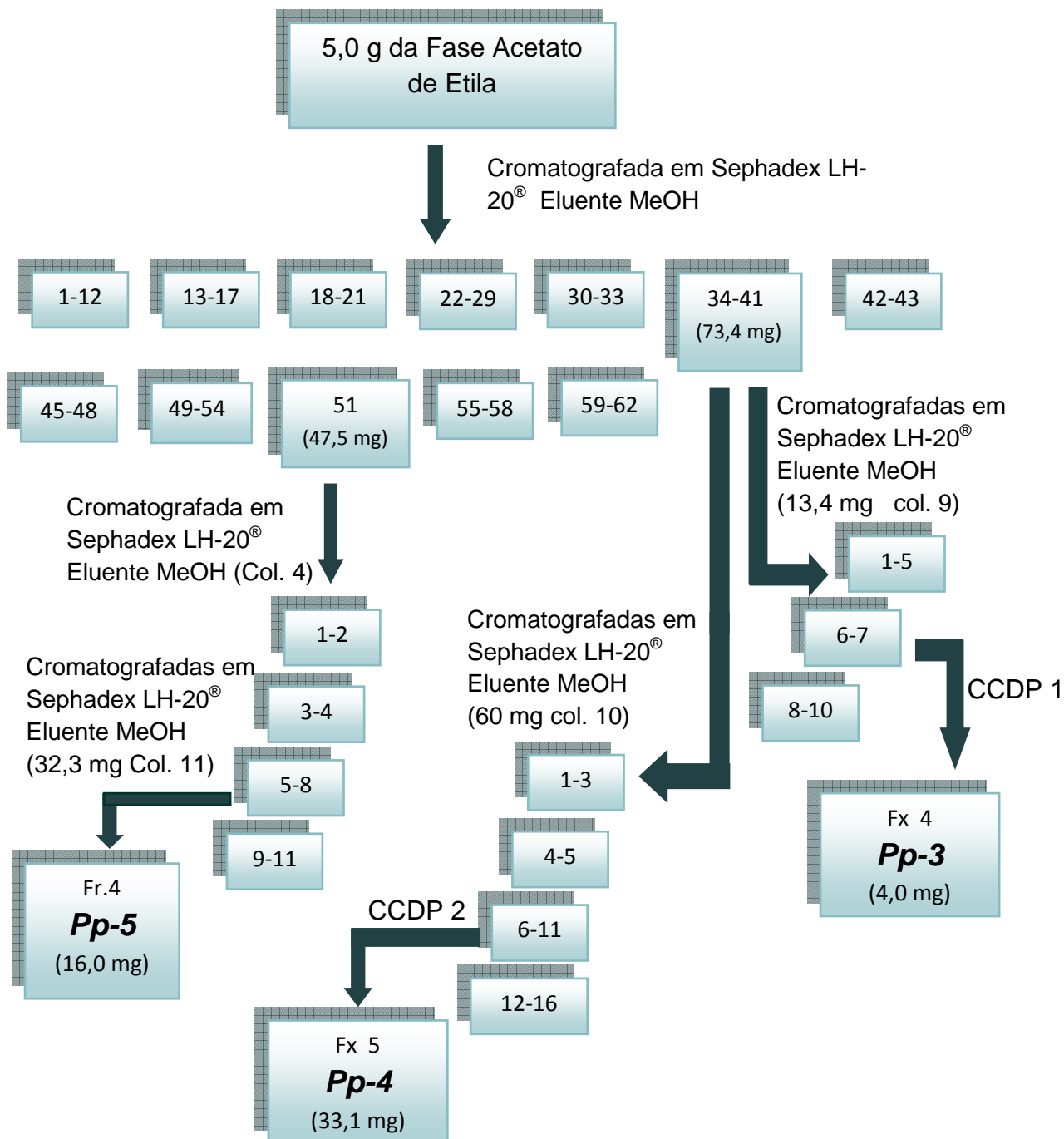
As raízes de *Solanum rhytidoandrum* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 207 g do pó seco. Foi realizada uma extração com 80 % de água e 20% de ácido acético, diretamente no pó das raízes, ficando em agitação com misturador durante 12 horas. Após esse processo, foi realizada uma filtração em camada fina de celite, obtendo-se então o filtrado ácido aquoso, que por sua vez foi basificado com hidróxido de amônio atingindo um pH = 9 sendo submetido a pernoite sob refrigeração.

Após esse processo, realizou-se filtração a vácuo sob papel de filtro, obtendo assim 868,8 mg de um precipitado gelatinoso, posteriormente submetido à coluna cromatográfica (CC), utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20®, e como fase móvel metanol, originando 14 frações, das quais a fração 1 (56,8 mg) foi submetida a cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) utilizando Clorofórmio:MeOH:NH₄OH (90:9,5:0,5) como eluentes, fornecendo cinco faixas sendo a faixa 1 analisada e codificada como **Sr-1** (16,5 mg) (FLUXOGRAMA 3, p. 87).

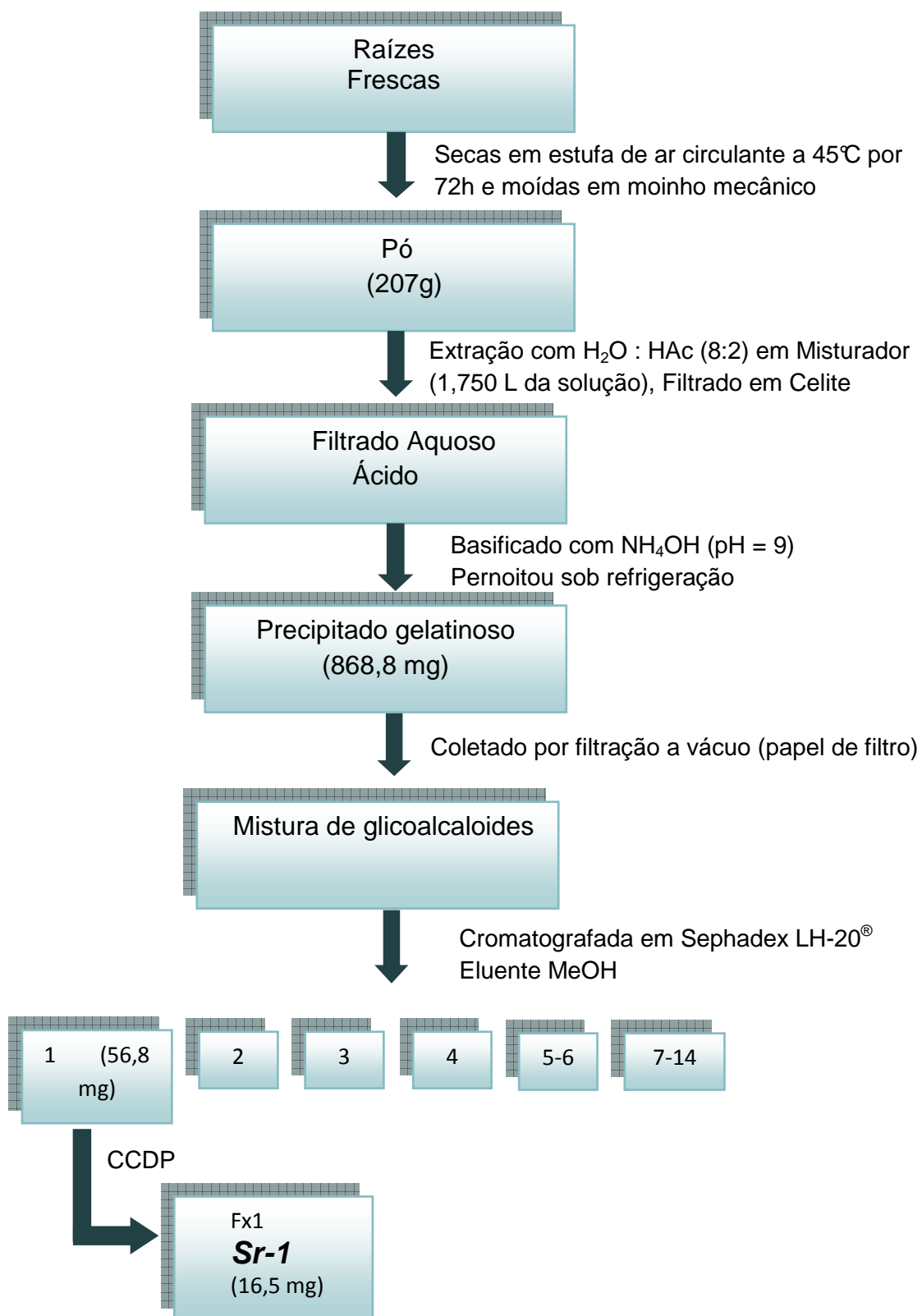
FLUXOGRAMA 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.



FLUXOGRAMA 2. Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das inflorescências de *Pithecoseris pacourinoides* Mart.



FLUXOGRAMA 3. Marcha para glicoalcaloides das raízes de *Solanum rhytidoandrum* Sendtn.



4.2 ESTUDOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Bioensaio dos extratos e fases de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. frente *Artemia salina* Leach

A toxicidade das fases e extratos de *Pithecoseris pacourinoides* Mart. foi avaliada utilizando-se o teste de letalidade com *Artemia salina* (MEYER et al., 1982; NASCIMENTO; ARAÚJO, 1999). Os cistos de *A. salina* foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraca, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

Em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente, foi adicionada água salina artificial (pH 8,5 e 29 °C) preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex®) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação através de uma lâmpada incandescente. Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas (22 – 29 °C) em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (Figura 20, p 88).

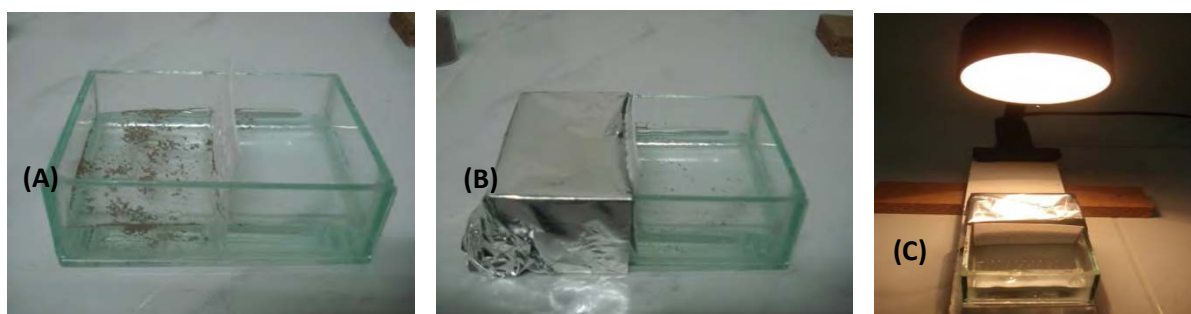


Figura 20. Aspecto geral do experimento com *Artemia salina*. (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte coberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz.

(Fotos: JOÃO CARLOS PITA)

Os extratos e fases foram solubilizados (Tabela 2, p. 89) para a obtenção de uma solução mãe de 10 mg/mL. A partir desta efetuou-se diluições para concentrações de intervalo 10 - 1000 µg/mL. Colocou-se em microtubos as diferentes diluições da solução mãe adicionando em seguida 10 náuplios. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em três experimentos. Um grupo controle foi preparado contendo apenas veículo de ressuspensão e as larvas. Deixou-se o conjunto em incubação sob luz artificial por 24 h realizando em seguida a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL₅₀ (concentração que produz 50% de letalidade) (LOPES, 2002).

Substâncias utilizadas	Solventes
Extrato etanólico (folhas)	Tween + H ₂ O salina artificial
Extrato etanólico (inflorescências)	Tween + H ₂ O salina artificial
Fase hexânica (inflorescências)	Tween + H ₂ O salina artificial
Fase diclorometano (inflorescências)	Tween + H ₂ O salina artificial
Fase acetato de etila (inflorescências)	DMSO + Tween + H ₂ O salina artificial
Fase acetato de etila / metanol (7:3) (inflorescências)	DMSO + Tween + H ₂ O salina artificial

Tabela 2. Solubilização das substâncias.

4.2.2 Citotoxicidade frente células leucêmicas da linhagem K562

Células da linhagem K562, mantidas em cultura, foram utilizadas para o ensaio antitumoral *in vitro*. Foi utilizado meio RPMI-1640 (Nutricell®) suplementado com 2 g/L NaHCO₃ (Sigma-Aldrich®), 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10 % de soro fetal bovino (Nutricell®). Foi retirada uma alíquota de 10 µL para avaliar a viabilidade celular com 10 µL de Azul de tripan (Sigma-Aldrich®) (0,4 %) em câmara de Neubauer. As

células tumorais da linhagem K562 foram semeadas (3×10^5 células/mL) em placas de 96 poços (BD/Labware®) e incubadas com diferentes concentrações (0 a 400 µg/mL) da xilosilolamargina (glicoalcaloide) e 3-O-metilquercetina (flavonoide) por 72 h (37 °C e 5 % CO₂). Os produtos testados foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt CHEMICALS®) e então em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,5 %. O ensaio de citotoxicidade utilizado na triagem farmacológica preliminar foi o ensaio de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (Sigma-Aldrich®).

✓ *Redução do sal de tetrazólio (MTT)*

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa (Figura 21, p. 90). Uma vez solubilizado, a quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Dessa forma, a redução do sal tetrazólio MTT para um produto azul (formazan), principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular. Somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

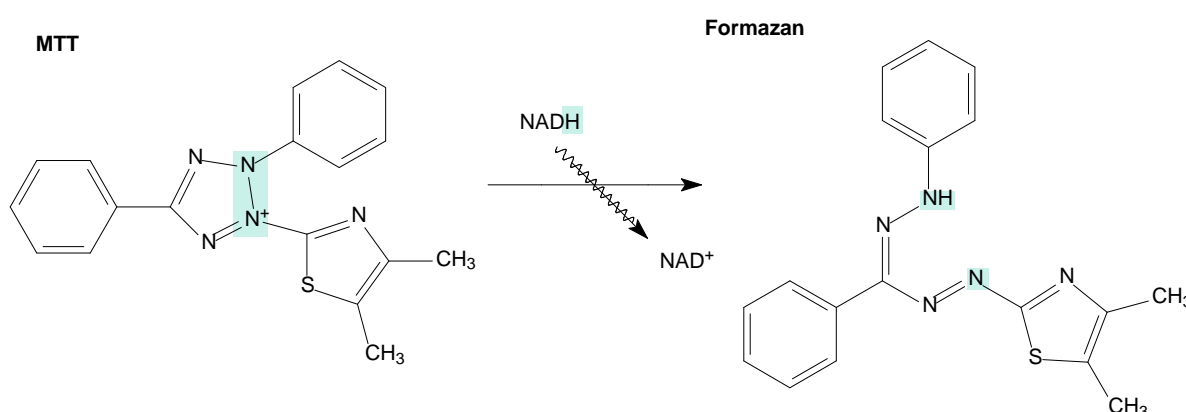


Figura 21. Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan (MOSMANN, 1983).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo et al. (2003). Da placa de 96 poços com as células sob 72 h de tratamento, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h (37 °C e 5 % CO₂), o sobrenadante foi removido cuidadosamente de cada poço, e a estes foram adicionados, 100 µL de etanol para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância foi lida em 595 nm para cálculo da CI₅₀ (concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular) através da determinação da percentagem de células viáveis pela fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{[(DO_{\text{Células tratadas}} - DO_{\text{Branco}})]}{[(DO_{\text{Controle negativo}} - DO_{\text{Branco}})]} \times 100$$

Onde:

DO_{Células tratadas} = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo} = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO_{Branco} = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

Resultados e Discussão



Determinação estrutural



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE *Pp-1* E *Pp-2*

Na análise do espectro de RMN ^1H da mistura *Pp-1* e *Pp-2* (Figuras 25 a 27 , p. 99 e 99), observou-se um envelope de sinais entre δ_{H} 0,60 e δ_{H} 2,80 característico de núcleo esteroidal ou triterpênico, além de um duplo duplete em δ 5,25 referente ao hidrogênio olefínico 6 (H-6) de esteróides acoplado com os hidrogênios H-7 (AHMED et al., 1992). A presença da unidade osídica foi sugerida por um conjunto de picos entre δ_{H} 4,00 e δ_{H} 4,60 (Figuras 25 e 26, p. 98), típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade. Esta proposta foi fortalecida pela presença de um duplete em δ_{H} 5,03 com $J = 7,5$ Hz, atribuído ao hidrogênio anomérico, comum em unidade de glicose com configuração β (KASAI et al., 1987). Um multiplete em δ_{H} 3,95, referente ao hidrogênio carbinólico, permitiu propor a existência de unidade osídica em C-3, tendo em vista seu deslocamento para campo baixo (δ_{H} 3,98) em *Pp-1/Pp-2* quando comparado com o mesmo hidrogênio (H-3) na aglicona, que absorve em δ 3,58 (KOJIMA et al., 1990).

Os espectros de RMN ^{13}C obtidos segundo a técnica APT (Figuras 28 a 34, p. 99 a 102), corroboraram com a proposta anterior, da presença da unidade de glicose, ao mostrar um sinal em δ_{C} 102,91 referente ao carbono anomérico (C-1') da unidade osídica (AQUINO et al., 1988), além de outros picos referentes a carbonos carbinólicos desta molécula em δ_{C} 63,17, δ_{C} 72,02, δ_{C} 75,63, δ_{C} 78,48 e δ_{C} 78,75. Observou-se também, valores entre δ_{C} 11,94 e δ_{C} 19,94, característicos de carbonos metílicos de esteróides (BREITMAIER & VOELTER, 1990). Sinais em δ_{C} 141,28 e δ_{C} 122,24 correspondem, respectivamente, aos carbonos 5 e 6 do esqueleto de esteróides como o sitosterol e o estigmasterol, sendo que, para este último, observou-se ainda dois picos em δ_{C} 139,17 e δ_{C} 129,83, referentes aos carbonos olefínicos 22 e 23, respectivamente (Tabela 3, p. 96).

A compilação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da mistura *Pp-1/Pp-2* e comparações com valores de substâncias já isoladas (KOJIMA et al., 1990), permitiram identificá-las como sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (***Pp-1***) e estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (***Pp-2***), substâncias isoladas pela primeira vez no gênero *Pithecoseris* (Tabela 3, p. 96).

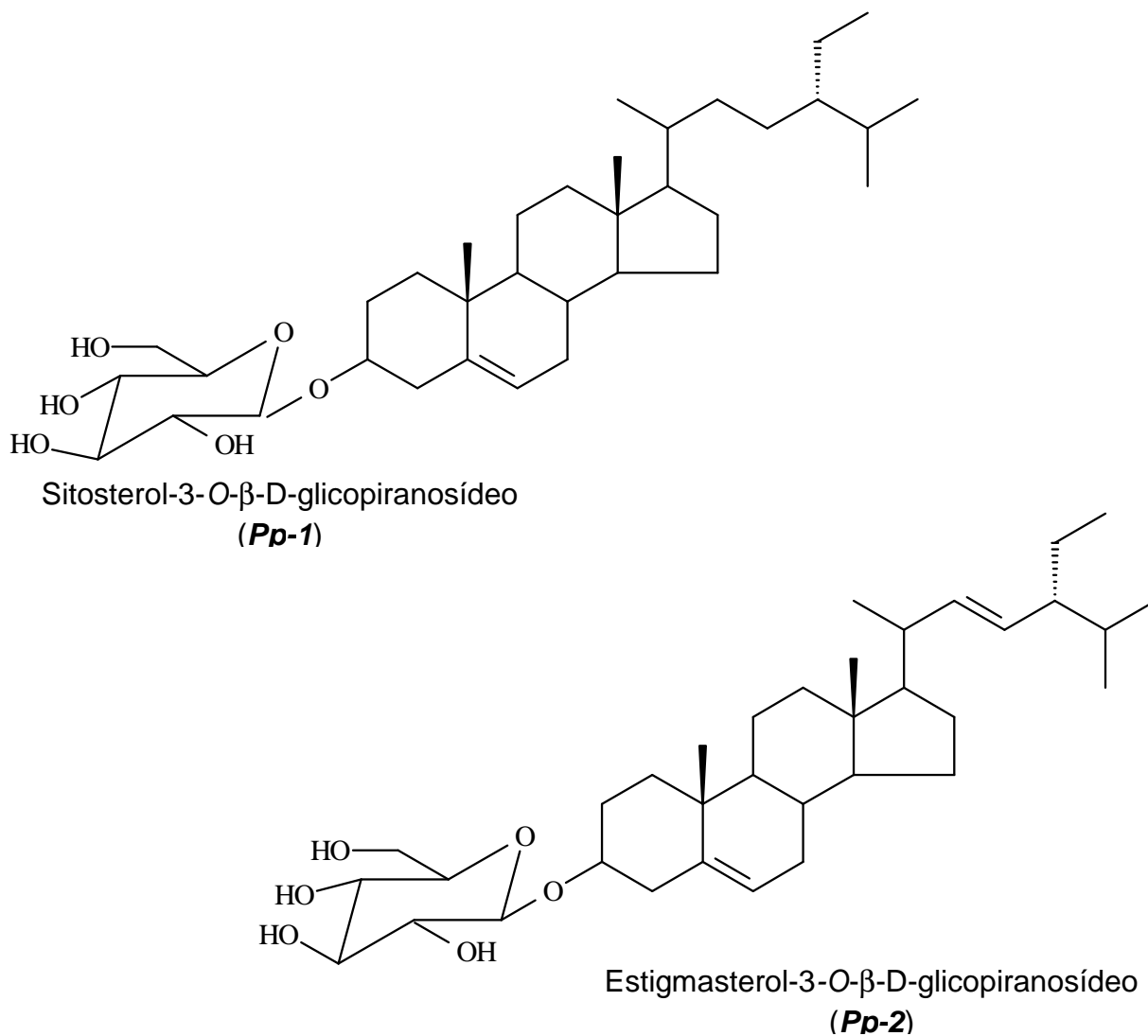


Figura 22. Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e Estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, isolados pela primeira vez no gênero *Pithecoseris*.

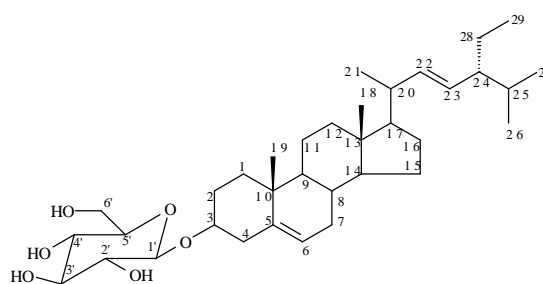
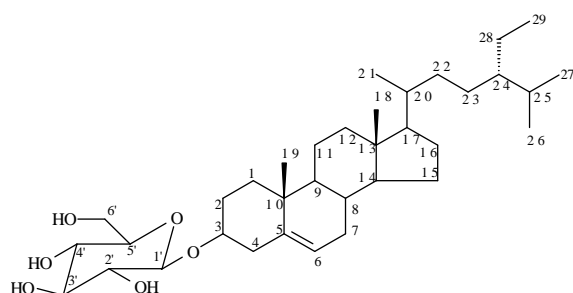


Figura 23. Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Pp-1**) **Figura 24.** Estigmasterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Pp-2**)

	δ_c (ppm) Sitosterol 3-O- β -D- glicopiranosídeo (KOJIMA et al., 1990)	δ_c (ppm) <i>Pp-1</i>	δ_c (ppm) Estigmasterol 3-O- β -D- glicopiranosídeo (KOJIMA et al., 1990)	δ_c (ppm) <i>Pp-2</i>
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	37,60	37,84	37,60	37,84
2	30,30	30,60	30,30	30,60
3	78,30	78,48	78,30	78,48
4	39,40	39,69	39,40	39,69
5	141,00	141,28	141,00	141,28
6	122,00	122,24	122,00	122,24
7	32,20	32,56	32,20	32,56
8	32,10	32,43	32,10	32,43
9	50,40	50,72	50,40	50,72
10	37,00	37,29	37,00	37,29
11	21,40	21,64	21,40	21,64
12	40,00	40,33	39,90	40,20
13	42,40	42,71	42,40	42,71
14	57,00	57,21	57,10	57,30
15	24,60	24,88	24,70	24,91

Tabela 3. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , C_5D_5N , 500 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para *Pp-1* e *Pp-2*. Dados da Literatura (KOJIMA et al., 1990).

16	28,70	28,90	29,40	29,66
17	56,30	56,62	56,20	56,45
18	12,00	11,94	12,30	12,48
19	19,30	19,38	19,30	19,38
20	36,50	36,75	36,90	36,75
21	19,10	19,78	21,70	20,35
22	34,30	34,58	138,90	139,17
23	26,40	129,83	129,50	129,83
24	46,10	46,41	51,50	51,79
25	29,50	29,85	32,20	32,50
26	19,50	19,56	21,40	21,67
27	20,10	19,60	20,10	19,60
28	23,40	23,77	25,80	26,06
29	12,20	12,12	12,60	13,00
1'	102,60	102,91	102,60	102,91
2'	75,40	75,63	75,40	75,63
3'	78,70	78,75	78,70	78,75
4'	71,70	72,02	71,70	72,02
5'	78,50	78,90	78,50	78,90
6'	62,90	63,17	62,90	63,17

Tabela 3 (Cont.). Valores de Deslocamentos Químicos (δ , C_5D_5N , 500 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para *Pp-1* e *Pp-2*. Dados da Literatura (KOJIMA et al., 1990).

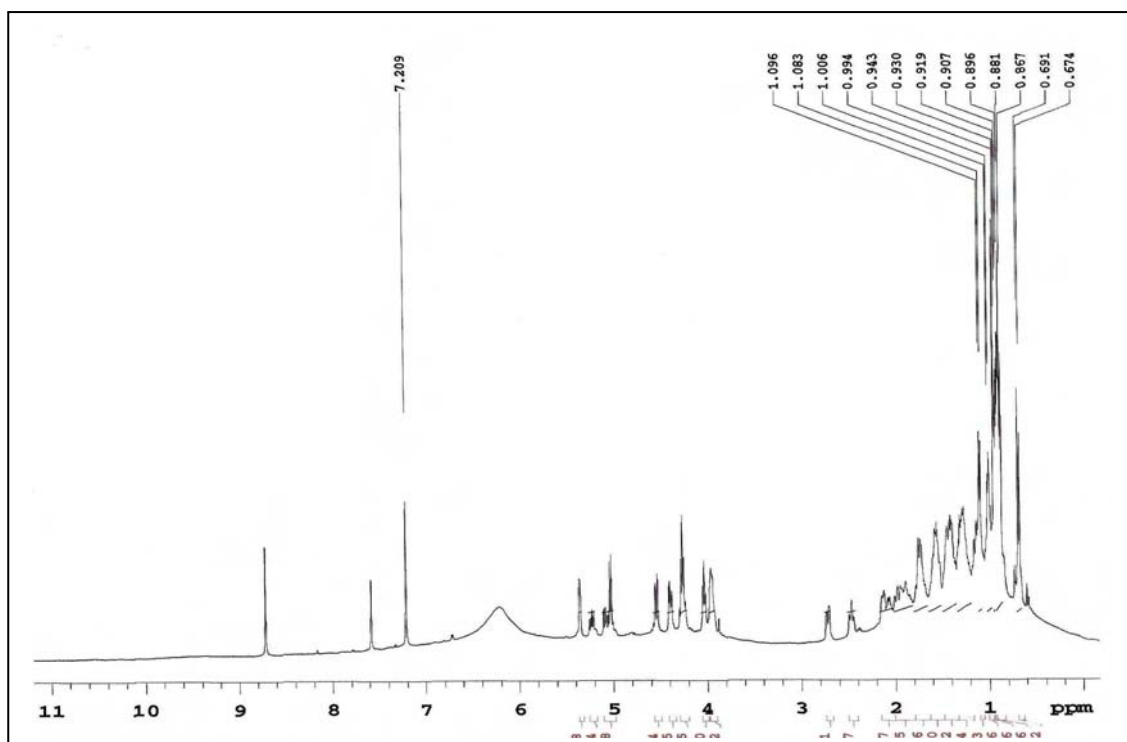


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (C₅D₅N, 500 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2*.

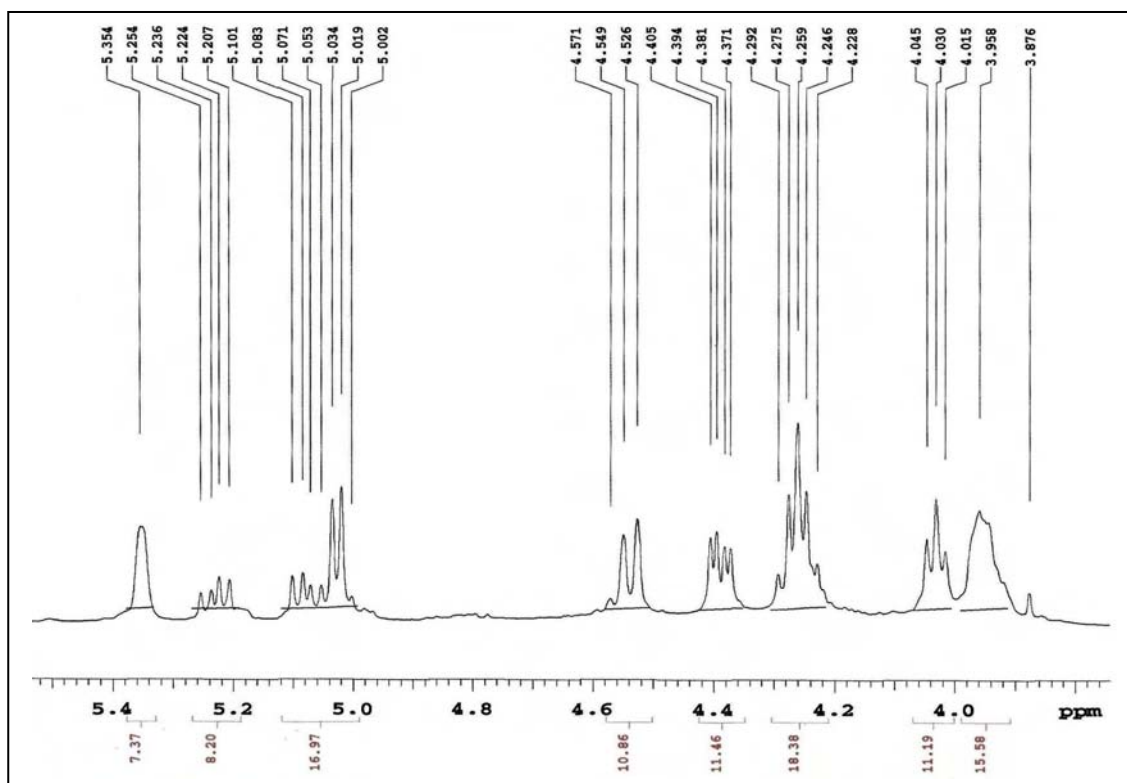


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (C₅D₅N, 500 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 3,5 a 5,4 ppm.

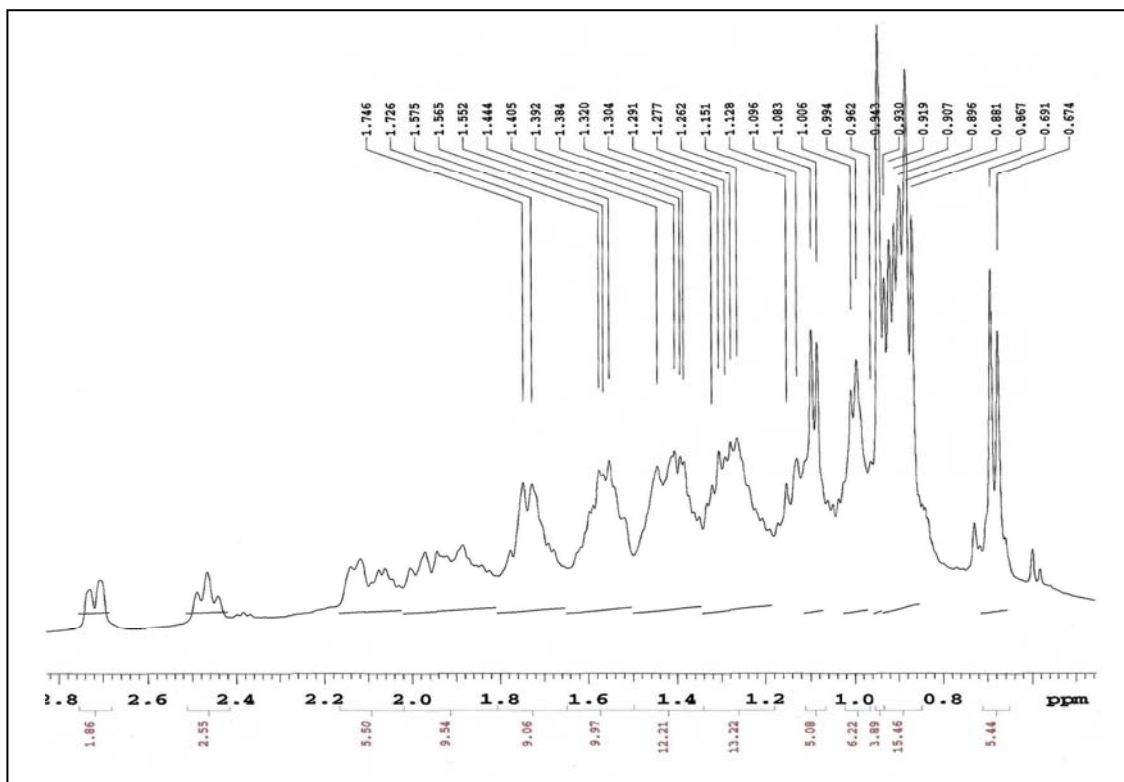


Figura 27. Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 0,6 a 2,8 ppm.

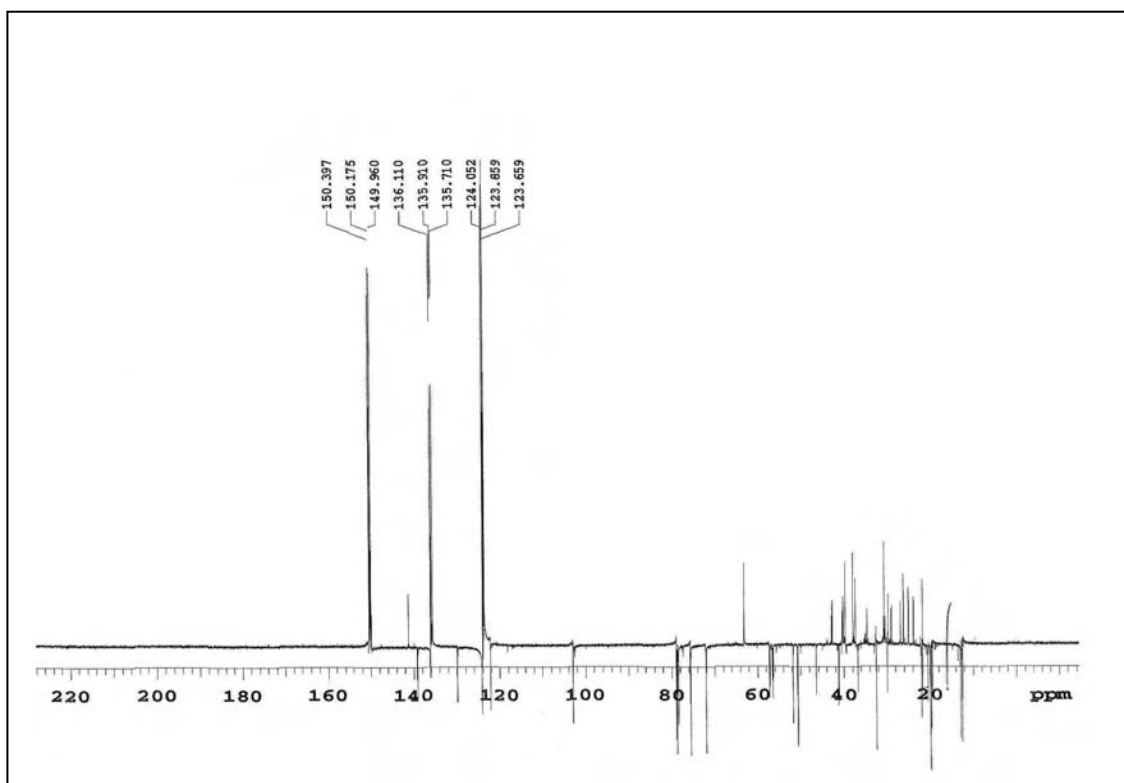


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2*.

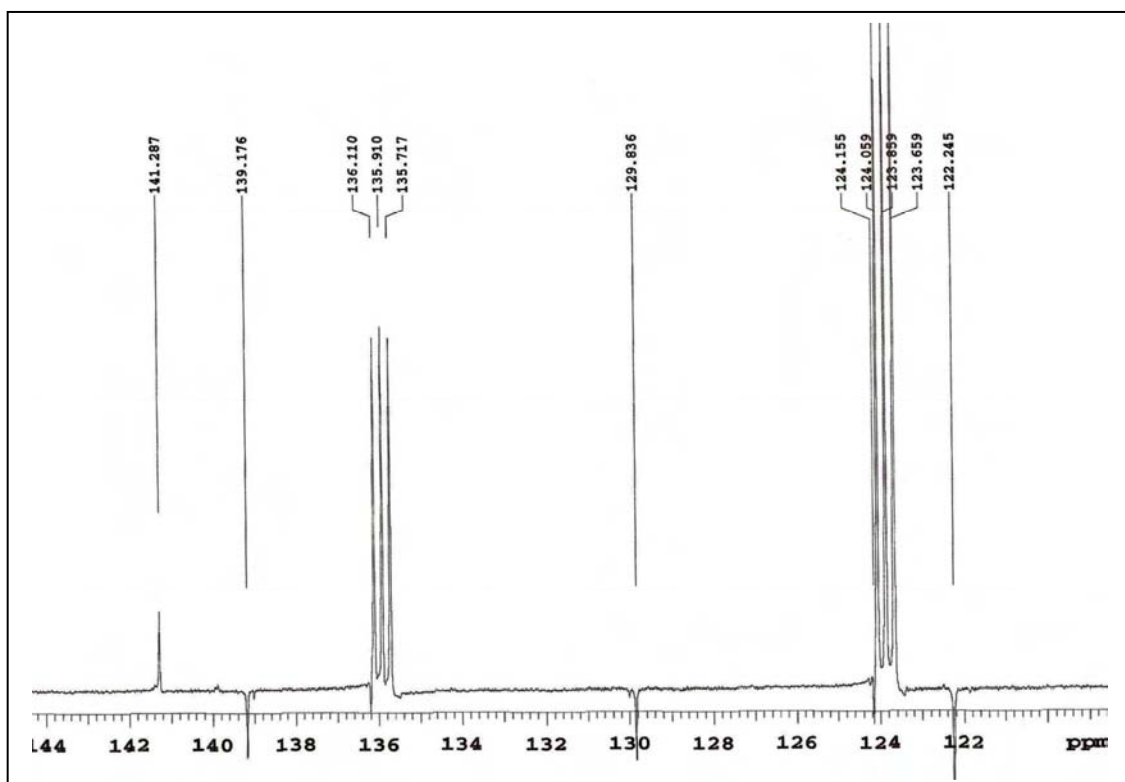


Figura 29. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 122 a 144 ppm.

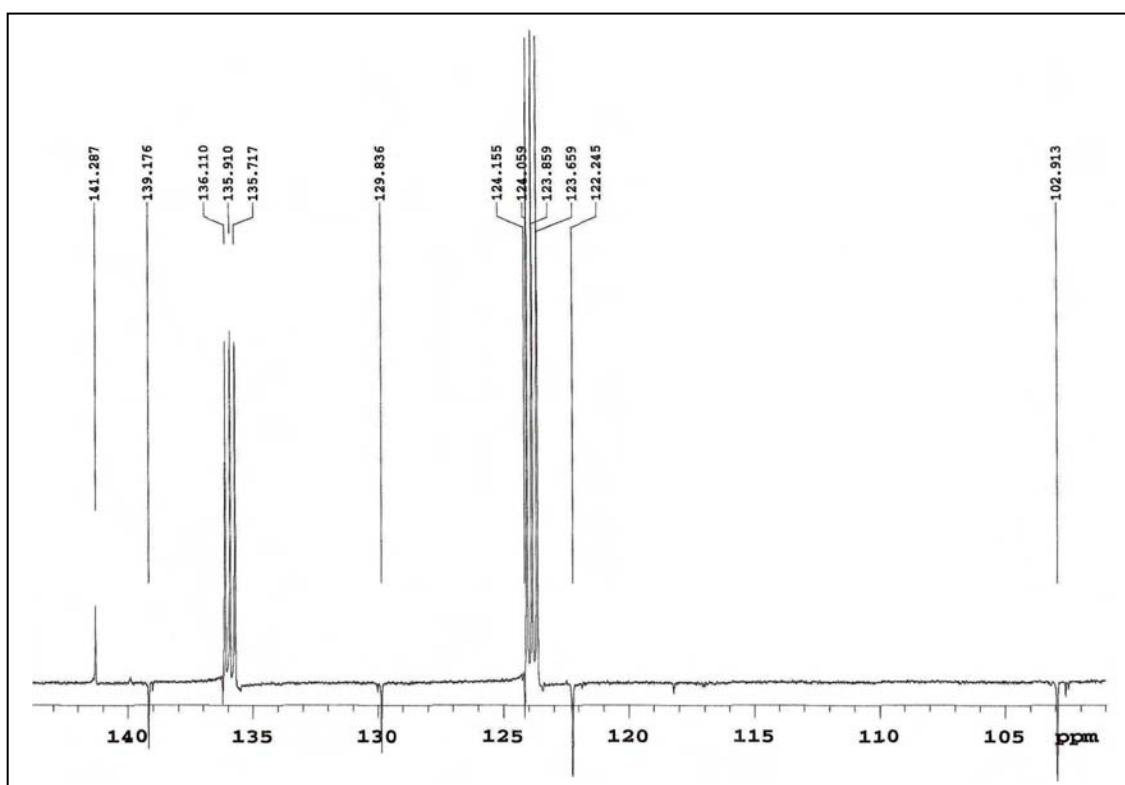


Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 102 a 142 ppm.

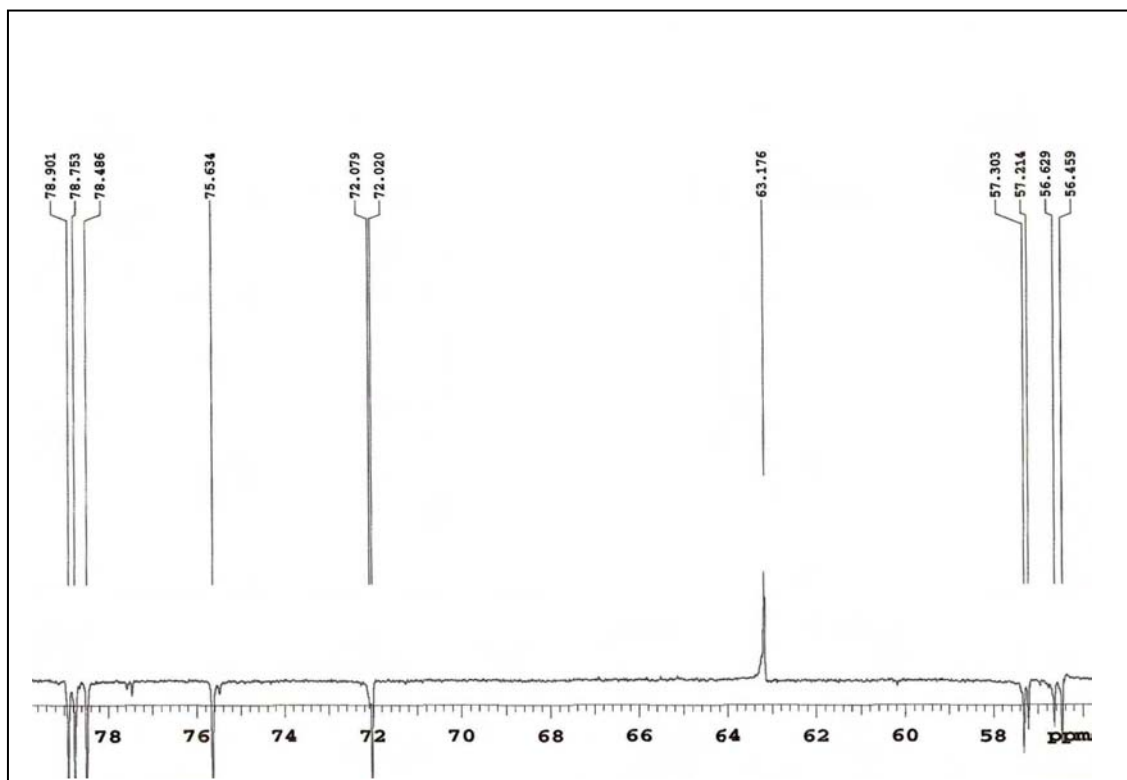


Figura 31 . Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 56 a 79 ppm.

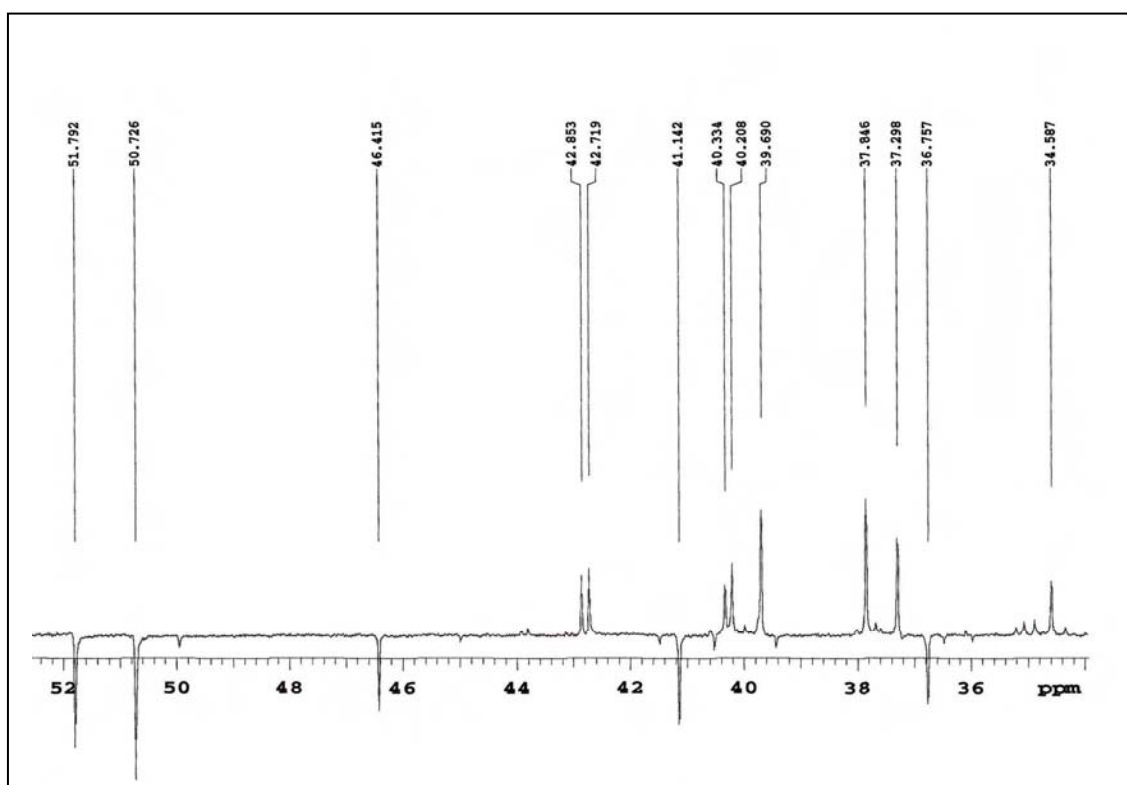


Figura 32 . Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 34 a 52 ppm.

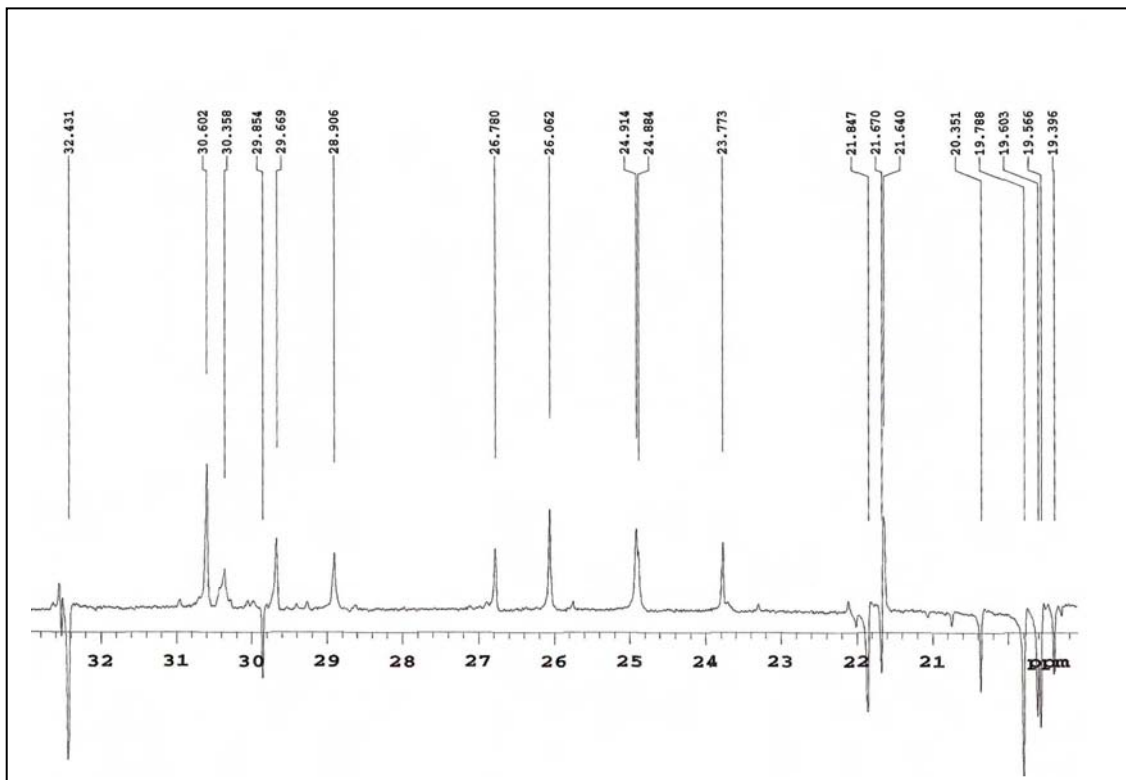


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 19 a 33 ppm.

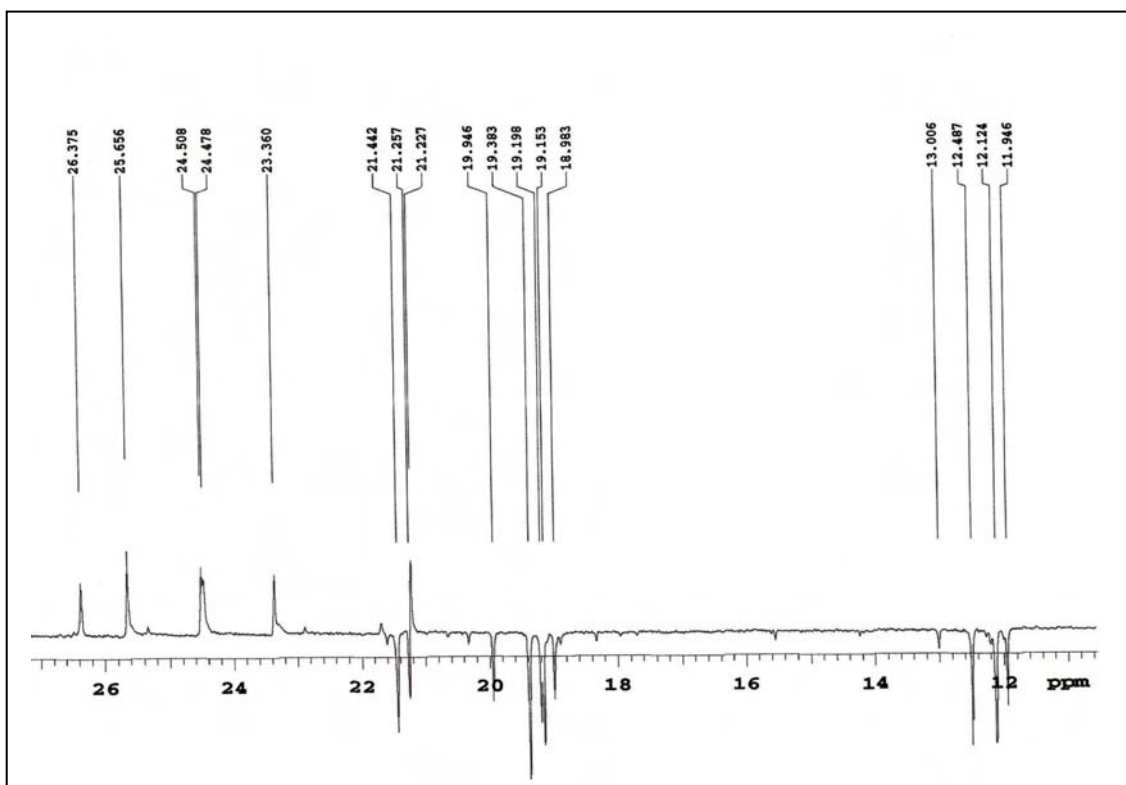


Figura 34 . Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de *Pp-1* e *Pp-2* na região de 11 a 27 ppm.

5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE *Pp-3*

A substância codificada como *Pp-3* foi isolada na forma de um pó amorfo amarelo, com ponto de fusão 246,8-247,5°C e sob luz ultravioleta apresentou fluorescência sugerindo a presença de grupo cromóforo na estrutura química.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 37, p. 106), obtido por CL-ESI-EM mostrou o pico do íon molecular em m/z 269.0646 [M-H] compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$.

O espectro de Infravermelho (IV) (Figura 36, p. 105), obtido em pastilhas de KBr, mostrou características típicas de um composto com hidroxilas fenólicas não impedidas estericamente, pela presença de um larga banda de absorção de grande intensidade em $3419,7\text{cm}^{-1}$ corroborada pela absorção em $1182,3\text{cm}^{-1}$ de estiramento de C-O fenólico. Absorção em $1647,21\text{cm}^{-1}$ indica a presença de carbonila cetônica e as bandas em $1606,7$ e $1548,8\text{cm}^{-1}$ revelaram a natureza aromática da substância.

O espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CD_3OD) (Figuras 40 a 42, p. 107 e 108) apresentou treze sinais correspondentes a quinze átomos de carbono. Destes, oito sinais foram atribuídos a carbonos não hidrogenados e sete a carbonos metínicos. Os sinais em δ_{C} 166,0, 163,1, 166,1, 162,7, e 159,3, juntamente com a presença de sete sinais metínicos aromáticos, sugeriram esqueleto de flavona trissubstituída para *Pp-3*. A ausência dos sinais em δ_{C} 139,4 (C-3) e δ_{C} 60,5 (MeO) confirmaram a ausência de substituição em C-3 (HARBONE, 1994). Os sinais em δ_{C} 100,1 e 95,0 foram atribuídos a C-6 e C-8 do anel A de flavonas 5,7 substituídas. O sinal em δ_{C} 129,4 foi atribuído a C-2' e C-6' e δ_{C} 117,0 a C-3' e C-5', corroborando com a hipótese de flavona com sistema AA'BB'

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) (Figuras 38 e 39, p. 106 e 107) apresentou deslocamentos químicos, sendo observados sinais em δ_{H} 6,19 ($J = 1,6$ Hz) e δ_{H} 6,57, atribuídos aos H-6 e H-8, característicos de flavonas. A região entre 6,00 e 8,00 ppm, correspondente aos hidrogênios dos anéis aromáticos, apresentou dupletos em 7,85 ($J = 8,6$ Hz) e 6,93 ($J = 8,6$ Hz) com integração para dois hidrogênios cada um. As constantes de acoplamento observadas (8 - 9 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B, respectivamente, característicos de um anel aromático substituído na posição 4' (padrão 4'-OH). Isso ocorre devido à

simetria apresentada por este anel, fazendo com que os hidrogênios das posições 2' e 3' apresentem equivalência em deslocamento químico com os hidrogênios das posições 6' e 5', respectivamente (STOCHMAL *et al.*, 2001).

A presença do simpleto em δ_H 6,43 (H-3) e a ausência de sinal em δ_H 3,76 característico de hidrogênio metoxílico (HARBONE, 1994), confirma que não há substituição na posição C-3. Para o anel A foram observados sinais em 6,19 ppm (H-6, $J = 1,6$ Hz) e 6,57 ppm (H-8). A constante de acoplamento observada (aproximadamente 2 Hz) confirma um acoplamento *meta* entre esses hidrogênios, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7- dihidroxilado no anel A. Após análise desses dados e comparação com a literatura, foi possível identificar *Pp-3* como sendo a 5,7,4'-trihidroxiflavona (Apigenina), sendo este composto relatado pela primeira vez no gênero *Pithecoseris*.

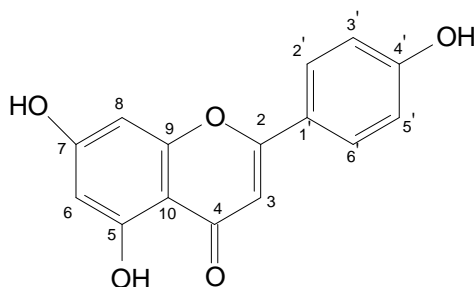


Figura 35. 5,7,4'-trihidroxiflavona (Apigenina).

C	δ_c (ppm) 5,7,4'-trihidroxiflavona (STOCHMAL <i>et al.</i> , 2001)	δ_c (ppm) <i>Pp-3</i>	δ_H (ppm); m; J (Hz) 5,7,4'-trihidroxiflavona (STOCHMAL <i>et al.</i> , 2001)	δ_H (ppm); J (Hz) <i>Pp-3</i>
2	166,1	166,2	-	-
3	104,8	103,7	6,87 s	6,43 s
4	183,9	183,8	-	-
5	163,2	163,1	-	-
6	100,2	100,1	6,19 d ($J = 1,9$)	6,19 d ($J = 1,6$)
7	165,5	166,0	-	-
8	95,1	95,0	6,51 d ($J = 1,9$)	6,57 s
9	159,4	159,3	-	-
10	105,4	105,2	-	-
1'	126,1	123,2	-	-
2' e 6'	129,1	129,4	7,98 d ($J = 8,7$)	7,85 d ($J = 8,6$)
3' e 5'	117,9	117,0	7,10 d ($J = 8,7$)	6,93 d ($J = 8,6$)
4'	161,3	162,7	-	-

Tabela 4. Valores de Deslocamentos Químicos (δ , CD₃OD 200 MHz) de RMN ¹H e ¹³C para *Pp-3*. Dados da Literatura (STOCHMAL *et al.*, 2001).

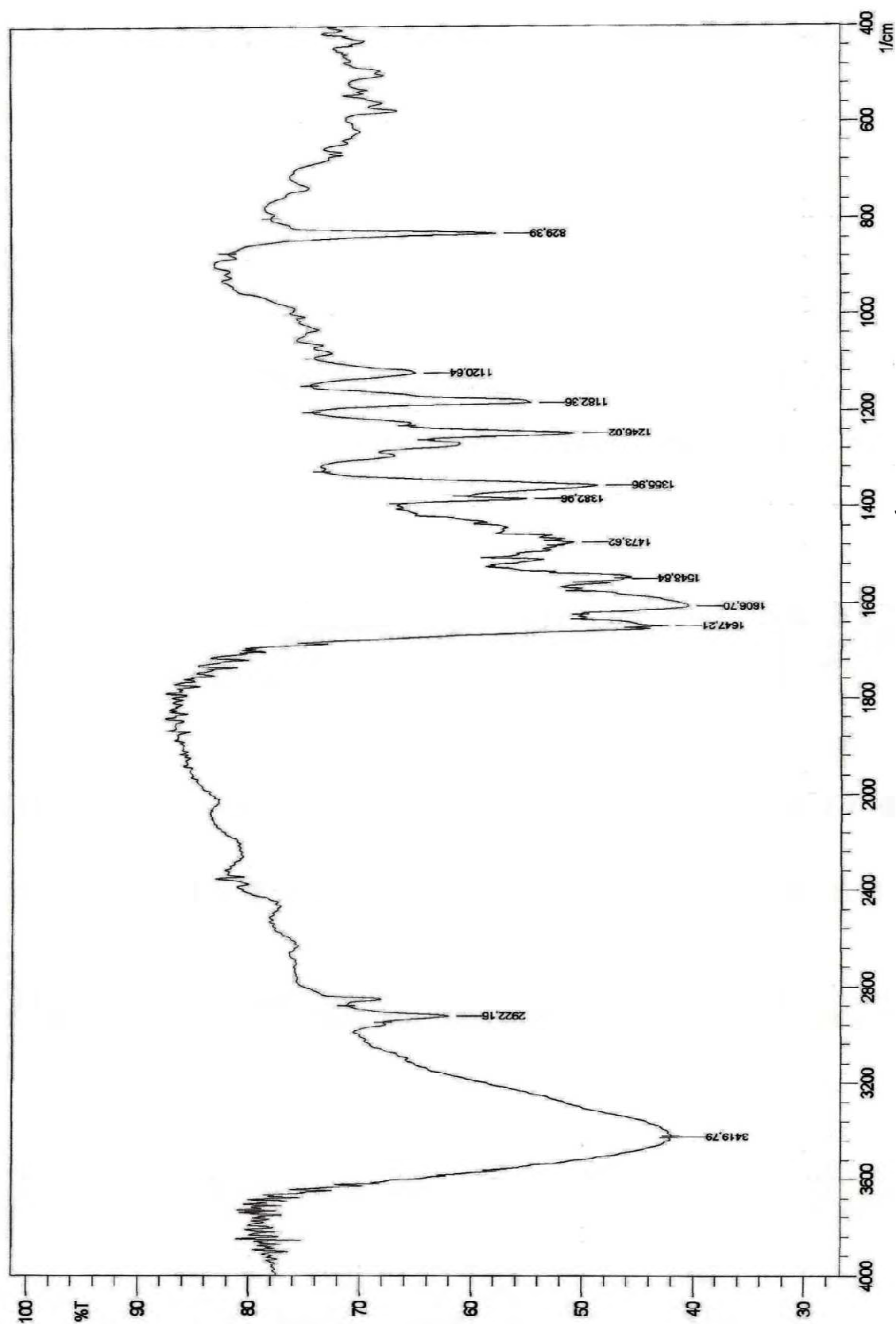


Figura 36. Espectro de infravermelho (KBr cm⁻¹) de Pp-3.

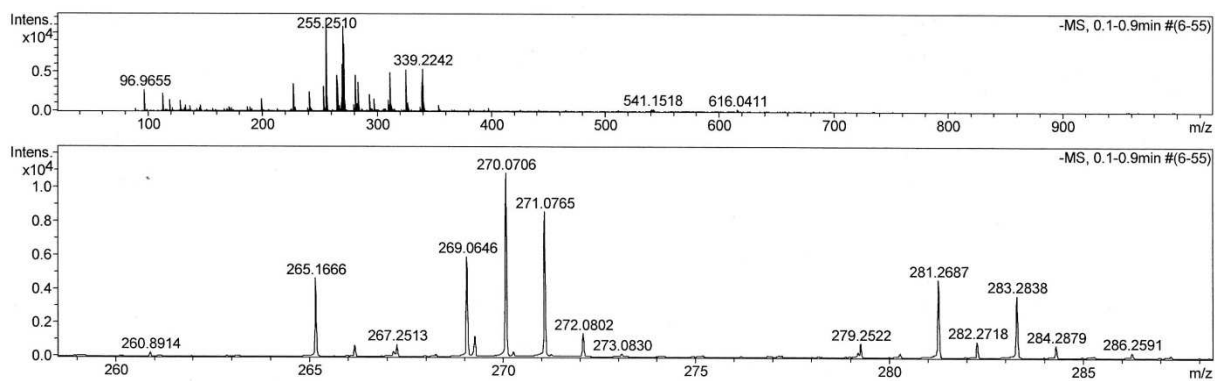


Figura 37. Espectro de massas de alta resolução de *Pp-3*.

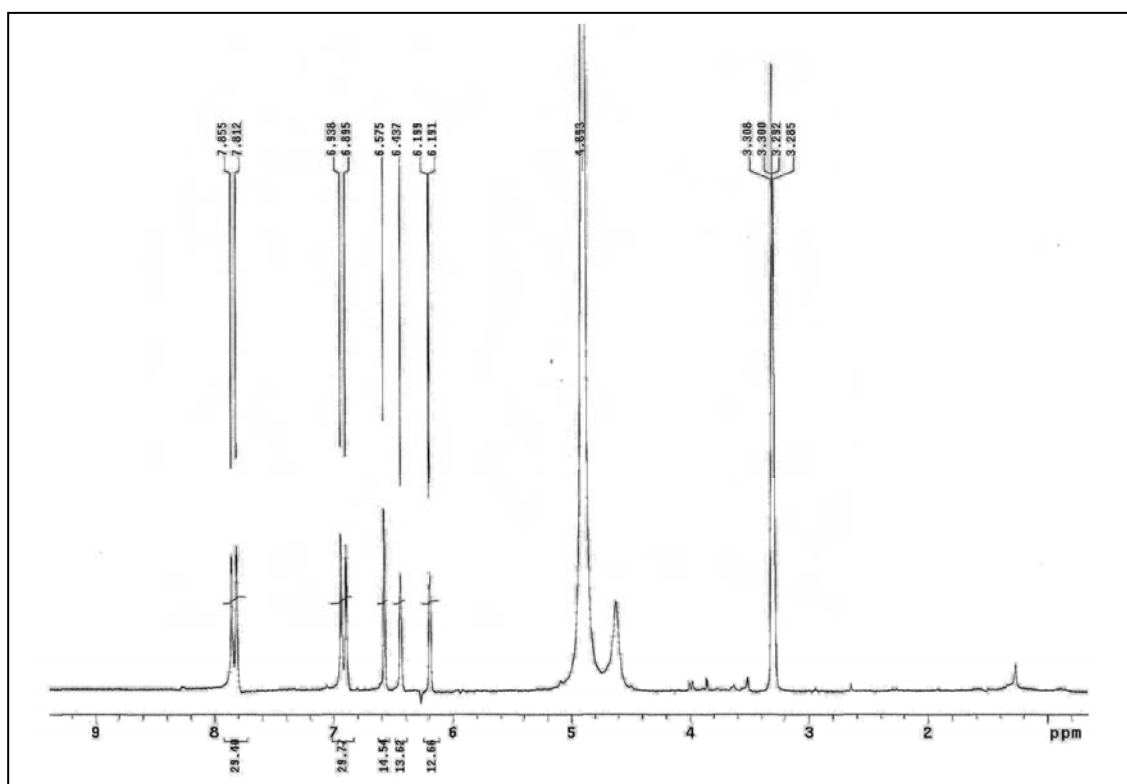


Figura 38 . Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Pp-3*.

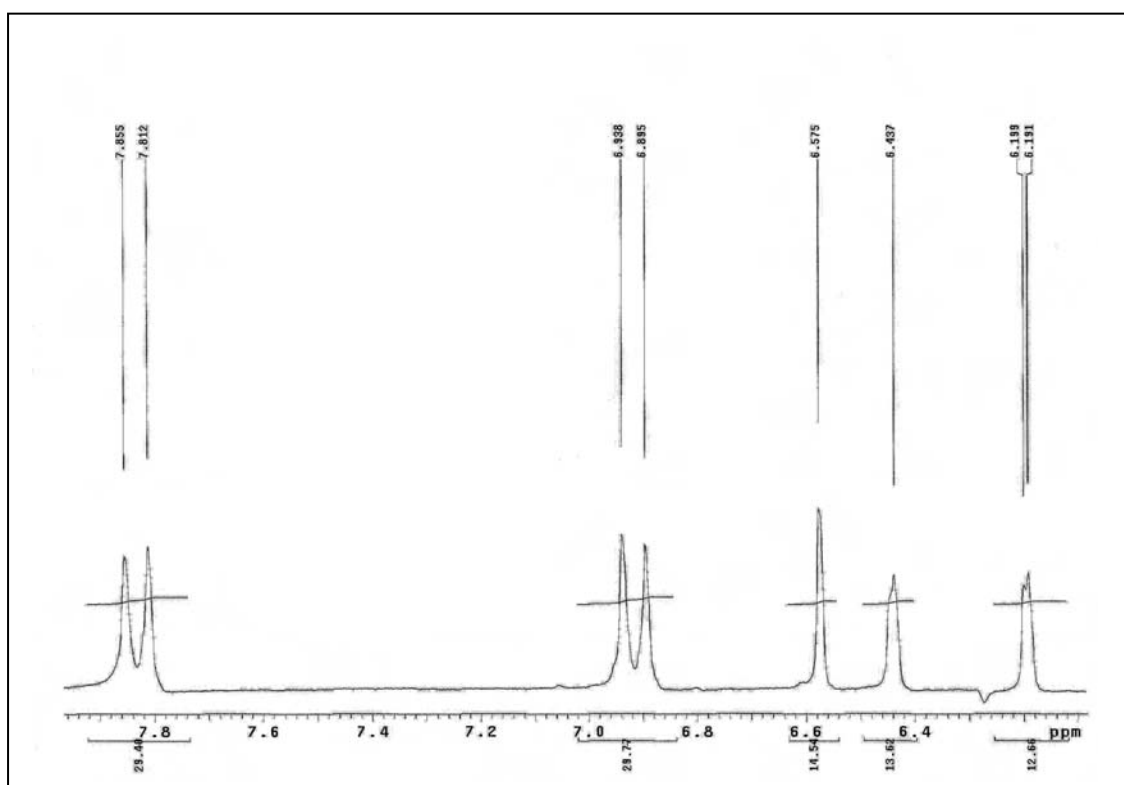


Figura 39 . Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Pp*-3 na região de 6,1 a 7,9 ppm.

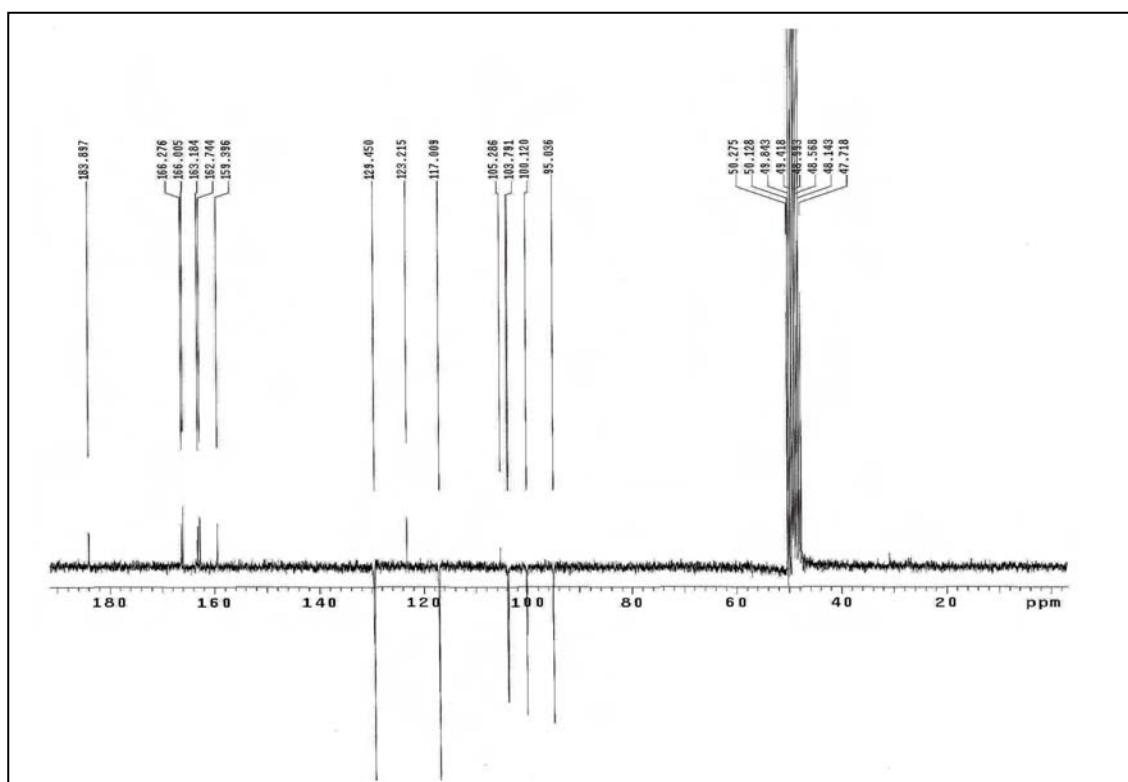


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Pp*-3.

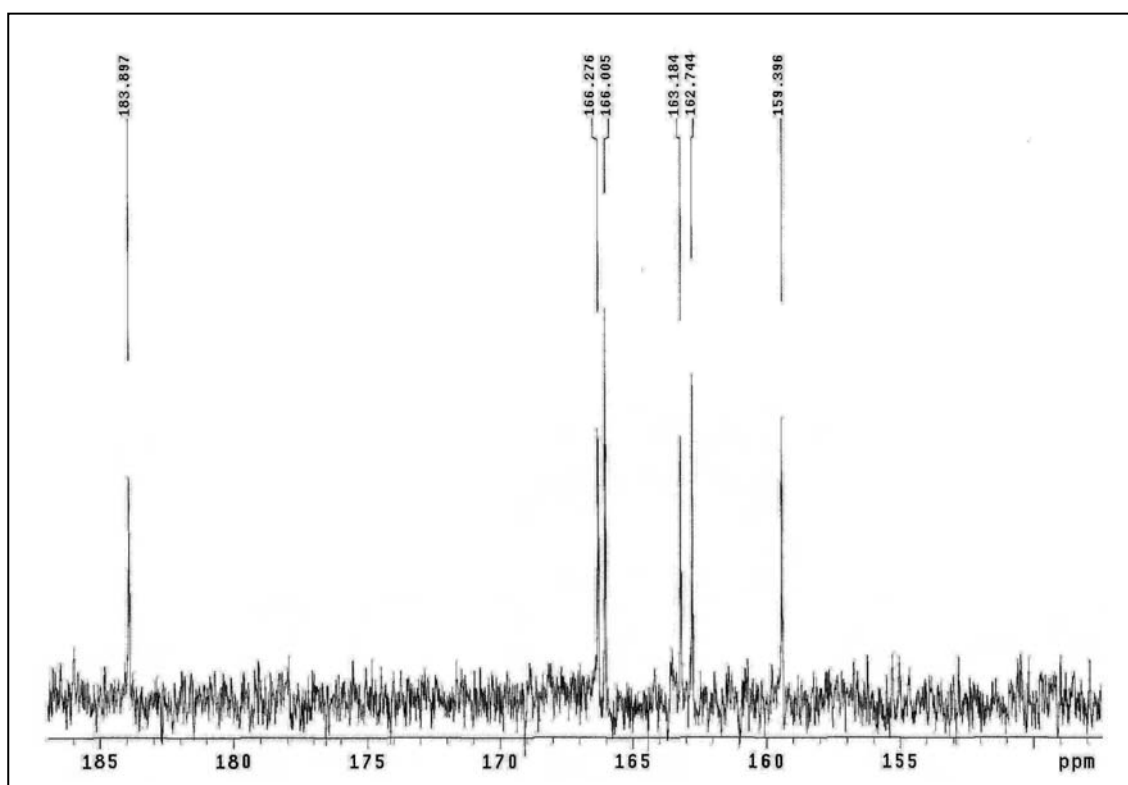


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Pp*-3 na região de 150 a 185 ppm.

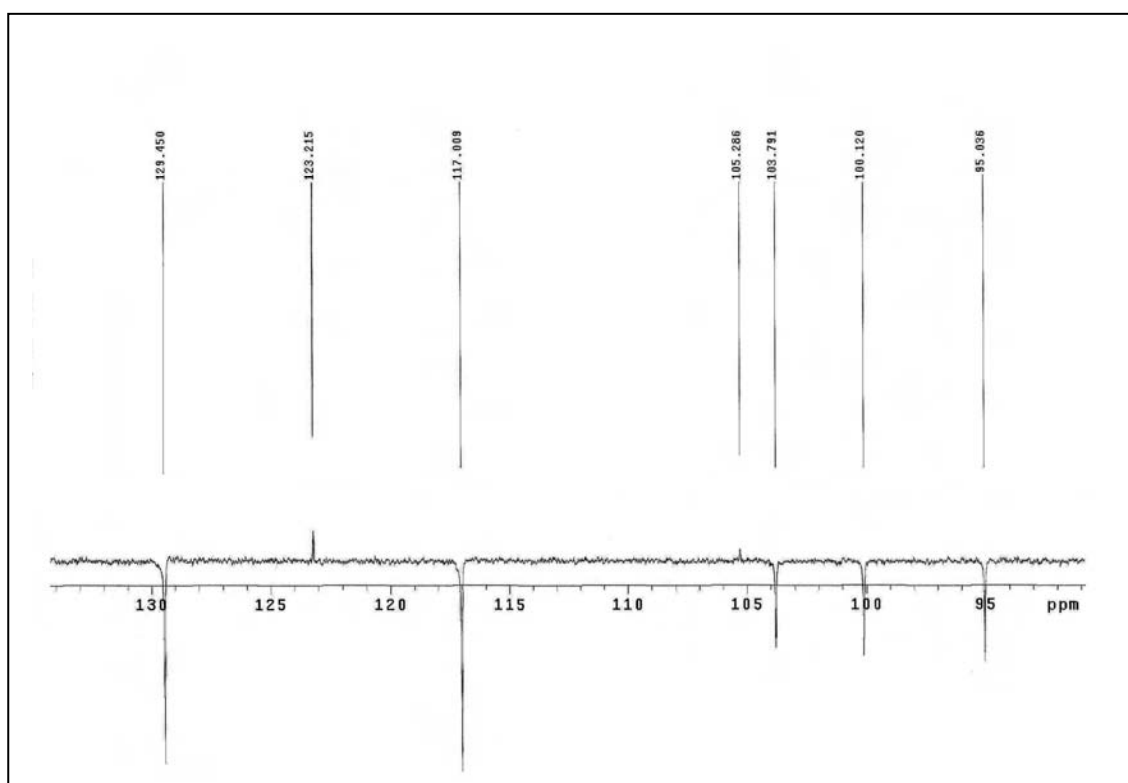


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Pp*-3 na região de 95 a 130 ppm.

5.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE *Pp-4*

A substância codificada como *Pp-4* foi isolada na forma de um pó amorfo amarelo, com ponto de fusão 257,8-258,2°C e sob luz ultravioleta apresentou fluorescência sugerindo a presença de grupo cromóforo na estrutura química.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 45, p. 112), obtido por CL-ESI-EM mostrou o pico do íon molecular em m/z 315.0706 [M-H] compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$.

O espectro de Infravermelho (IV) (Figura 44, página 111), obtido em pastilhas de KBr, mostrou características típicas de um composto com hidroxilas fenólicas não impedidas estericamente, pela presença de um larga banda de absorção de grande intensidade em $3419,7\text{cm}^{-1}$ corroborada pela absorção em $1172,7\text{cm}^{-1}$ de estiramento de C-O fenólico. Absorção em $1653,0\text{cm}^{-1}$ indica a presença de carbonila cetônica e as bandas em $1604,7$ e $1496,7\text{cm}^{-1}$ revelaram a natureza aromática da substância.

O espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, CD_3OD) (Figuras 50 e 51, p. 115), apresentou quinze sinais correspondentes a desesseis átomos de carbono. Destes, dez sinais foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos e um a carbono metoxílico.

Os sinais em δ_{C} 166,4, 163,0, 158,4, 157,9, 149,9, 146,4 e 139,4, juntamente com a presença de cinco sinais metínicos aromáticos, corroboram esqueleto de flavona pentasubstituída para *Pp-4*. A ausência do sinal em δ_{C} 103,7 (C-3) (STOCHMAL *et al.*, 2001), e presença dos sinais em δ_{C} 139,4 e 60,5 ppm, infere o grupo metóxi em C-3 (HARBONE, 1994). Os sinais em δ_{C} 99,9 e 94,8 foram atribuídos a C-6 e C-8 do anel A de flavonas 5,7 substituído. Os sinais em δ_{C} 116,4 e 122,8 foram atribuídos a C-2', C-5' e C-6', respectivamente, corroborando com a hipótese de flavona penta substituída.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) (Figura 48 e 49, p.14), apresentou deslocamentos químicos, nos quais foram observados dois sinais em δ_{H} 6,17 e δ_{H} 6,37, característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7 (HARBONE, 1994). Dois dupletos em δ_{H} 7,61 e δ_{H} 6,91 (1H, $J = 8,6$ Hz) e um duplete em δ_{H} 7,55 (1H, $J = 8,4$ Hz), sugerindo o sistema ABX no anel B da flavona.

A ausência de simpleto em δ_H 6,87 (H-3) (STOCHMAL et al., 2001) e a presença de sinal em δ_H 3,76 característico de hidrogênio metoxílico (HARBONE, 1994), confirmam uma flavona pentasubstituída com metoxila em C-3.

Os demais dados de RMN 1H e ^{13}C de *Pp-4* estão compilados na Tabela 5, p. 110. Após análise desses dados e comparação com a literatura, foi possível identificar *Pp-4* como sendo a 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (3-O-metilquercetina), sendo este o primeiro relato de um composto para o gênero *Pithecoseris*.

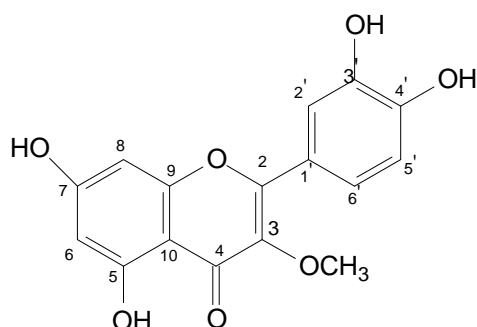


Figura 43. 3-metoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (3-o-metilquercetina).

C	δ_c (ppm) 3-O-metilquercetina (HARBONE, 1994)	δ_c (ppm) <i>Pp-4</i>	δ_H (ppm) ; m; <i>J</i> (Hz) 3-O-metilquercetina (HARBONE, 1994)	δ_H (ppm) ; m; <i>J</i> (Hz) <i>Pp-4</i>
2	157.96	157.94		
3	139.50	139.4		
4	179.98	179.94		
5	163.04	163.04		
7	165.87	166.44		
9	158.37	158.44		
10	105.84	105.67		
1'	122.92	122.86		
3'	146.42	146.48		
4'	149.90	149.99		
CH				
6	99.75	99.91	6.16 d (<i>J</i> = 2,0)	6,17 sl
8	94.71	94.81	6.35 d (<i>J</i> = 2,0)	6,37 sl
2'	116.40	116.41	7.60 d (<i>J</i> = 2,2)	7,61 sl
5'	116.46	116.41	6.88 d (<i>J</i> = 8,4)	6,91 d (<i>J</i> = 8,6)
6'	122.33	122.26	7.50 dd (<i>J</i> = 2,2 e 8,4)	7,54 d (<i>J</i> = 8,2)
OCH ₃	60.49	60.50	3.76 s	3,76s

Tabela 5. Valores de Deslocamentos Químicos (δ CD₃OD 200 MHz) de RMN 1H e ^{13}C para *Pp-4* e Dados da Literatura para 3-O-metilquercetina (HARBONE, 1994).

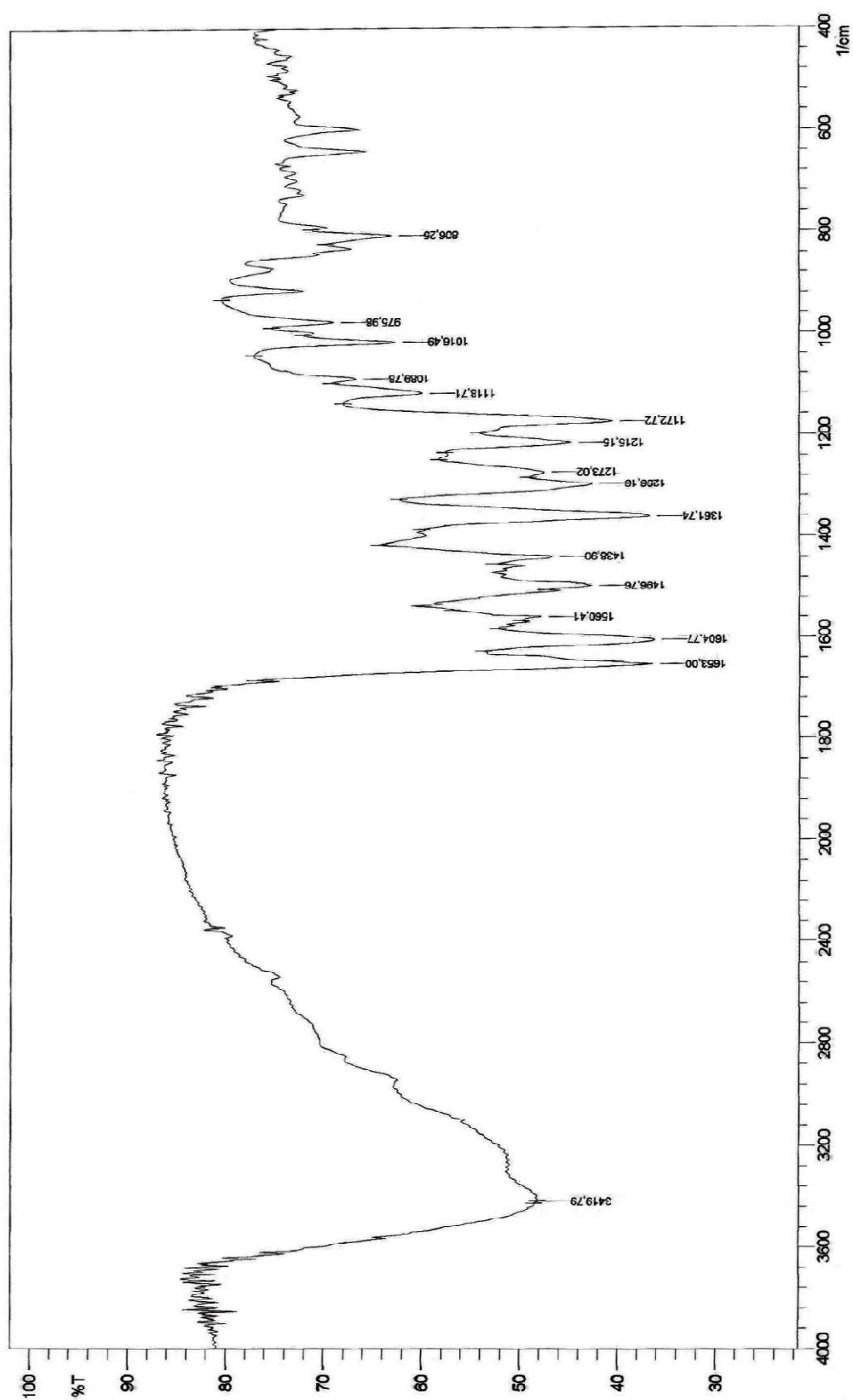


Figura 44. Espectro de infravermelho (KBr cm⁻¹) de Pp-4.

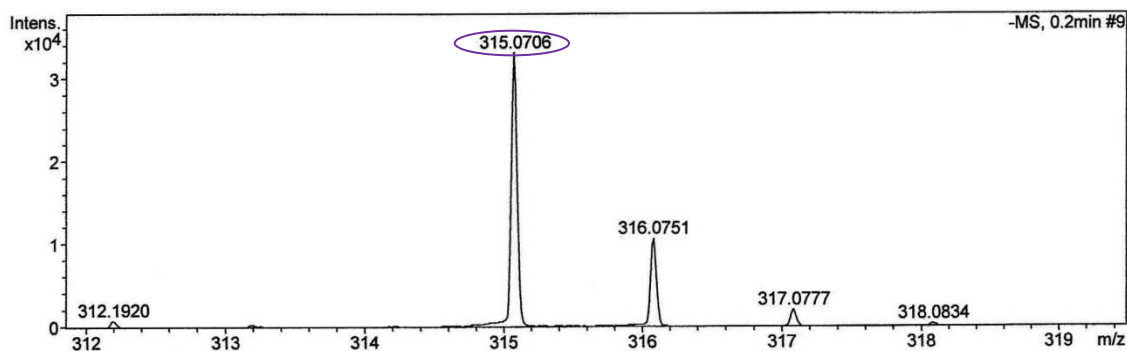


Figura 45. Espectro de massas de alta resolução de *Pp-4*.

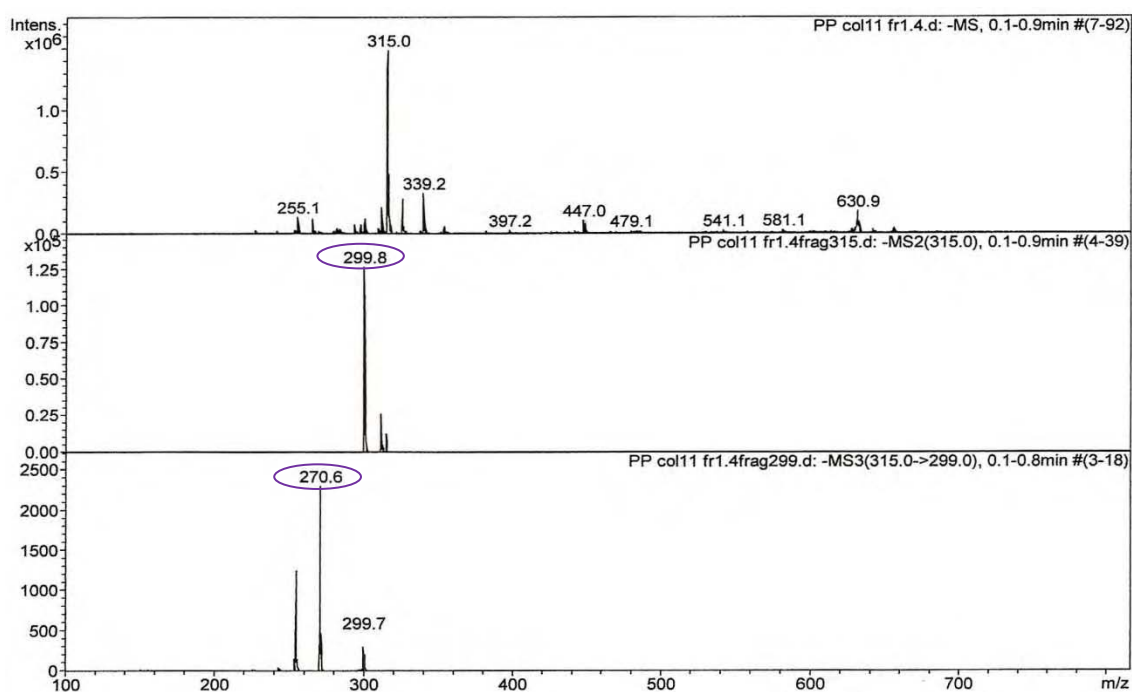


Figura 46. Espectros de fragmentação do íon m/z 315,0 com diferentes energias de colisão.

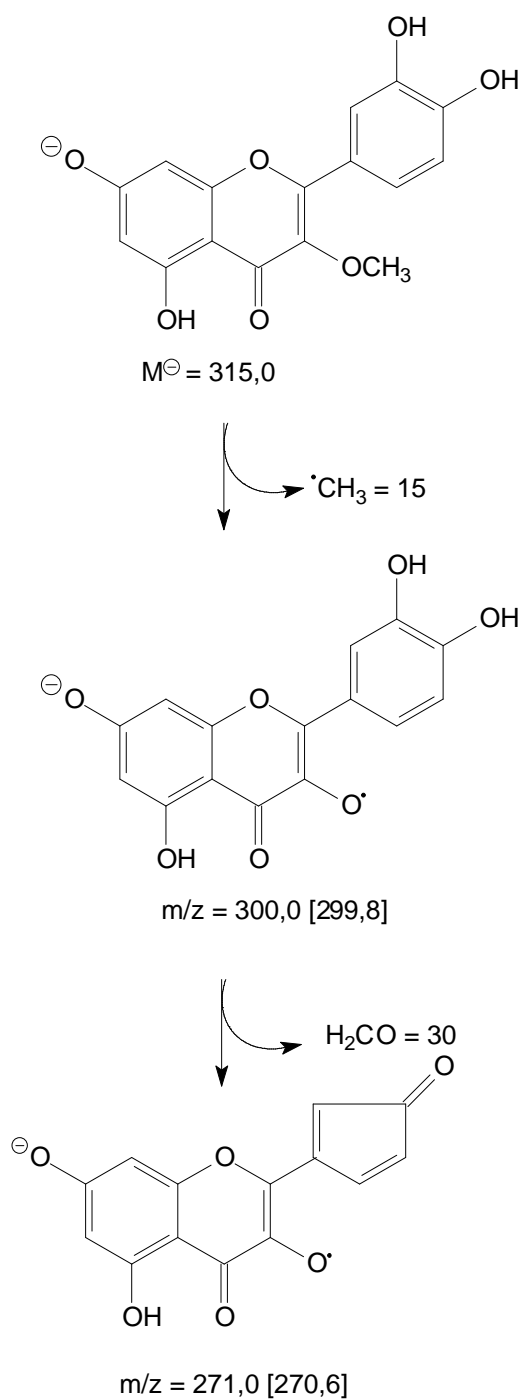


Figura 47. Proposta de fragmentação da 3-O-metilquercetina (*Pp-4*) baseada nos espectros de massas no modo de ionização negativo.

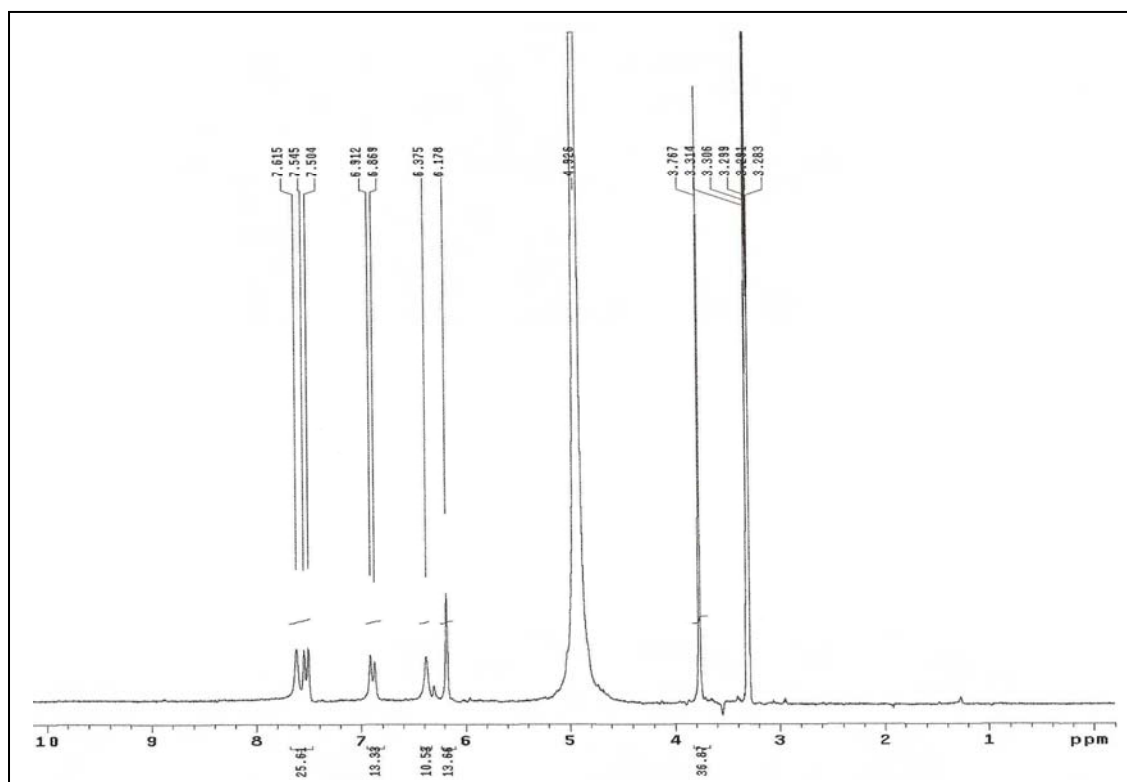


Figura 48. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Pp-4*.

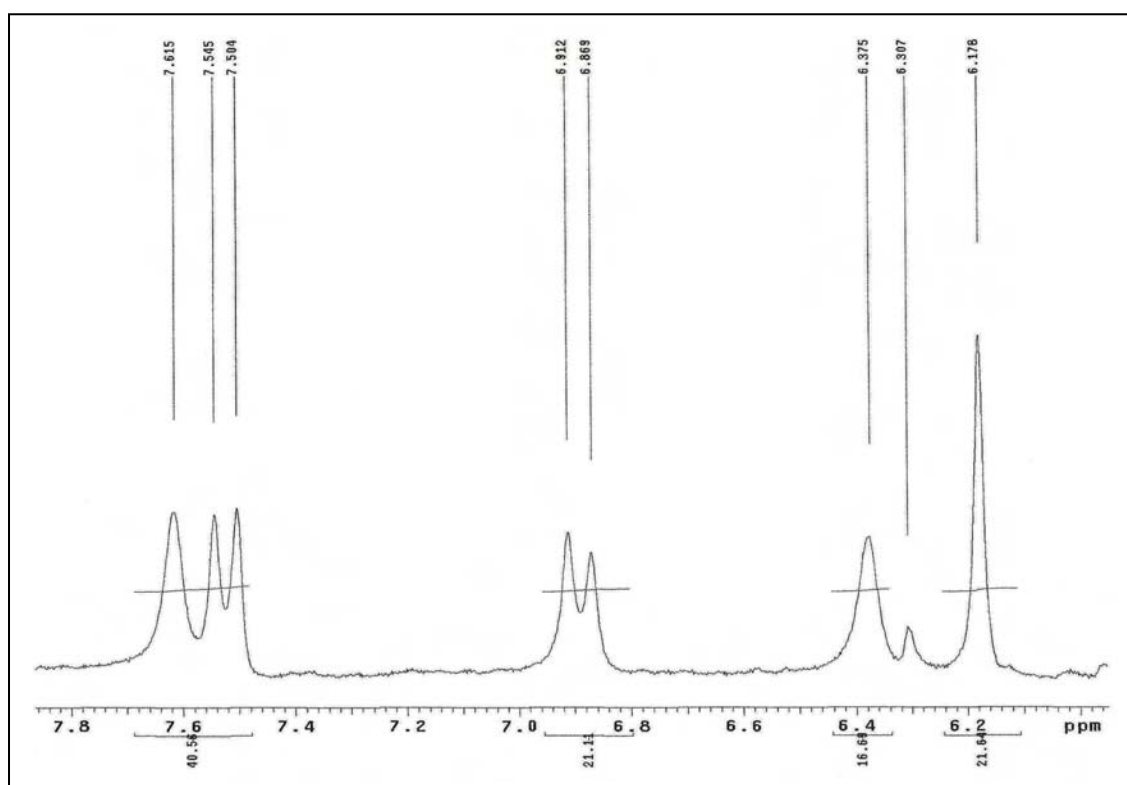


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de *Pp-4* na região de 6,1 a 7,8 ppm.

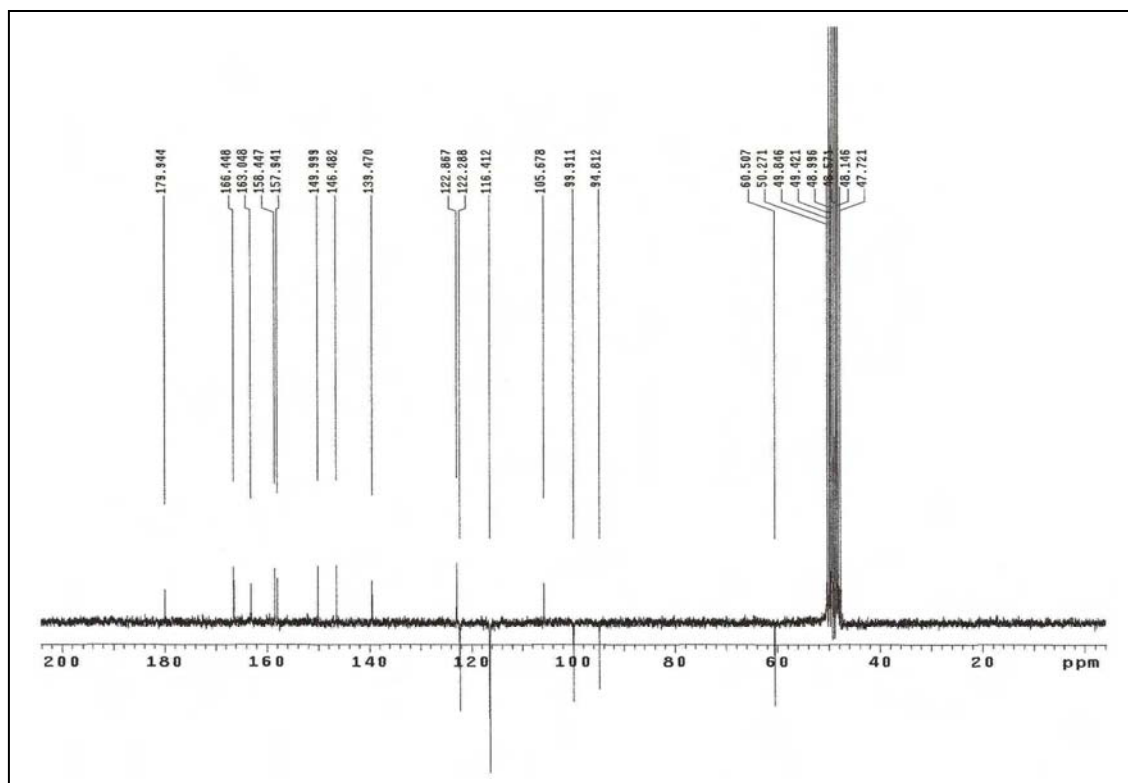


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Pp-4*.

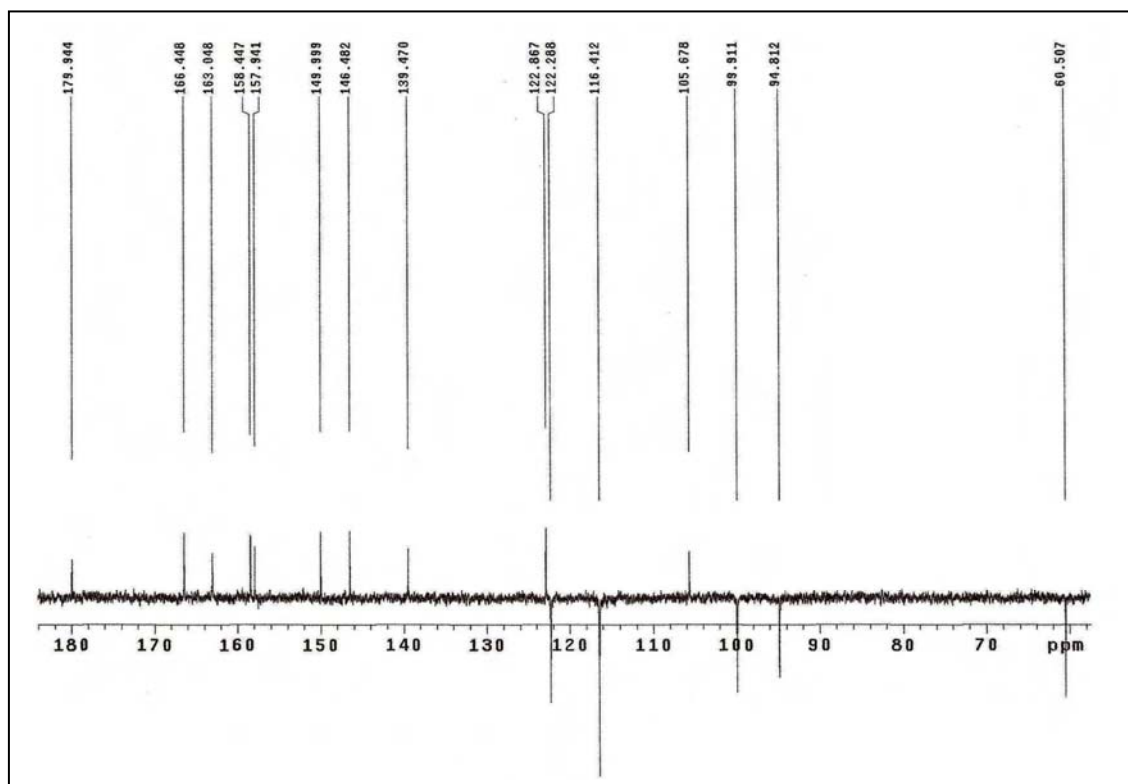


Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 50 MHz) de *Pp-4* na região de 60 a 180 ppm.