



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**SUSYANNE DE LIMA FIGUEREDO DUARTE**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Phyllanthus acuminatus* Vahl  
(PHYLLANTHACEAE): ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

**JOÃO PESSOA  
2013**

**SUSYANNE DE LIMA FIGUEREDO DUARTE**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Phyllanthus acuminatus* Vahl  
(PHYLLANTHACEAE): ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre na área de Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares**

**JOÃO PESSOA  
2013**

D812c Duarte, Susyanne de Lima Figueredo.

*Constituintes químicos de Phyllanthus acuminatus Vahl (Phyllanthaceae): isolamento, caracterização estrutural e atividades biológicas / Susyanne de Lima Figueredo Duarte.-- João Pessoa, 2013.*

115f. : il.

*Orientador: Josean Fachine Tavares*

*Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS*

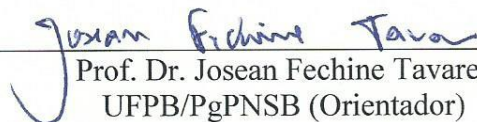
SUSYANNE DE LIMA FIGUEREDO DUARTE

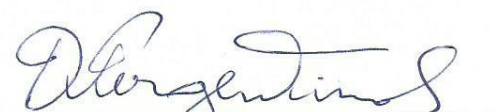
**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Phyllanthus acuminatus* Vahl  
(PHYLLANTHACEAE): ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

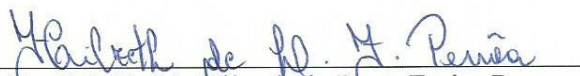
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre na área de Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Aprovado em 08 de novembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Josean Fechine Tavares  
UFPB/PgPNSB (Orientador)

  
Prof. Dr. Damiano Pergentino de Sousa  
UFPB (Examinador Externo)

  
Prof(a). Dr(a). Hilzeth de Luna Freire Pessoa  
UFPB/PgPNSB (Examinadora Interna)

Dedico este trabalho aos meus filhos Lucas e Maria Clara e ao meu esposo Cícero, pela plenitude da palavra FAMÍLIA.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por permitir todas as coisas que acontecem em minha vida e por me capacitar ao longo da caminhada aumentando minha fé em um mundo melhor.

A Nossa Senhora por toda proteção e por sempre passar na frente abrindo os caminhos pra que tudo sempre dê certo em minha vida.

Ao meu esposo Cícero por ser um anjo em minha vida, sempre me apoiando, elogiando, dizendo vá em frente, você é capaz. Obrigada meu amor, por sua compreensão, paciência, dedicação e seu amor incondicional!

Ao meu filho Lucas por acreditar no meu potencial, por ter-me feito sentir realmente especial para alguém pela primeira vez na minha vida.

À minha pequena Maria Clara, por sua alegria contagiante e por me fazer acreditar que sempre podemos ser melhores, desculpe pelos momentos de ausência.

Ao meu pai que mesmo não estando presente fisicamente, mas me deixou tesouros como caráter e dignidade.

À minha mãe que, sempre presente em minha vida, me educou nas primeiras letras e nos princípios de uma vida cristã. Obrigada, Mainha, pela força, pelas vezes que além de avó e mãe você foi babá, cozinheira e tudo o mais, pois sem sua ajuda com certeza essa vitória não teria sido alcançada.

À minha irmã Symonne por muitas e muitas vezes ser meu porto seguro e por me fazer acreditar que o perdão é capaz de modificar e unir as pessoas.

Ao meu irmão Sidney pelo exemplo de ser humano.

À minha cunhada Tânia e aos meus sobrinhos Tiago e Sara pelas palavras de incentivo sempre me levando à diante.

Ao meu orientador e amigo, Josean Fachine Tavares, pela orientação, paciência e insistência.

Ao professor Marcelo Sobral pelo apoio ao longo do desenvolvimento do trabalho.

À professora Maria de Fátima Agra pela coleta e identificação botânica.

À professora Marianna e ao professor Siqueira pela colaboração nos ensaios farmacológicos.

Aos professores Raimundo Braz Filho e Mário Geraldo de Carvalho da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela ajuda na elucidação estrutural e ao técnico Maurício pela obtenção dos espectros.

Aos meus tios Yaponira, Jonas, Magnólia e Kátia por sempre torcerem por mim.

Às minhas amigas Paula Tatiana, Ana Cláudia, Maryngá, Josete, Lilá, Diana e ao amigo Fábio pela amizade ao longo da vida.

Aos meus companheiros do ECC e da Casa de Caná por estarem sempre comigo na caminhada da fé.

Aos meus companheiros do Ministério de música por compreenderem minha ausência e por rezarem sempre por mim.

À minha turma de mestrado 2011, em especial a amiga Maria Sallett, pelo companheirismo, dedicação, paciência e especialmente pela AMIZADE verdadeira.

À Milen, Jéssica, Evandro, Flávio, Sany e Élide companheiros da química.

À minha amiga Janine que mesmo distante, sempre esteve perto do coração.

À amiga do coração e confidente, Heloísa Mara e ao seu futuro esposo Abraão “Filhinho”.

Obrigada por sua amizade!

À Narlize pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus compadres Gelsivan e Fernanda, pelo carinho de sempre.

Aos meus filhos adotivos Ingrid, Bruna e Diôgo.

À Vanessa minha mais recente amiga, pela ajuda e apoio.

Às amigas cubanas Ania e Tânia por sempre torcerem por mim.

À Sara Madeiro pelo carinho e disponibilidade sempre.

À Nathalie Hellen e Débora pela ajuda nos experimentos.

Às amigas, Adriana, Luciana, Lindinalva, Bianca, Antônia e Gilcélia.

Às professoras Leônia e Inês, pela amizade, apoio e incentivo.

À minha companheira de graduação Leila Cordeiro.

Aos meus companheiros de bancada Manso, Camila Holanda, Andrezza, Fernanda, Carol, Isis, Rayanne, Amanda, Anne Dayse, Hellane, Denise, Rafaela, Jacqueline, Otemberg, Ana Sílvia, Camila Figueiredo, Ana Letícia, Roseana, Tiago, Yanna, Madalena (Mada), Jéssica Karina e Jéssica Celestino.

Aos técnicos de laboratório Nonato, Sócrates, Alexsandro e Wellington pela contribuição imprescindível para a conclusão deste trabalho, em especial a Vicente, pela amizade além da ajuda.

Aos professores do Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos transmitidos, em especial a Fábio Santos pela amizade de tantos anos.

À Mônica, Maria, Geresa, Evanise, Dinho, Bambam e seu Ivan pela disponibilidade sempre.

Aos secretários do Programa, Caroline e Cassimiro por sempre estarem dispostos a ajudar.

À comissão examinadora pela contribuição.

Ao Programa Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que acreditaram em mim e no meu potencial e me ajudaram a atingir este objetivo, o meu MUITO OBRIGADA!

*Susyanne de Lima Figueredo Duarte*

“Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

**Eclesiastes 3:1**

## RESUMO

O gênero *Phyllanthus* pertence à família Phyllanthaceae que é composta por ervas, arbustos e árvores não latescentes com uma distribuição predominantemente pantropical, incluindo 55 gêneros e 1.745 espécies e que foi recentemente desmembrada da família Euphorbiaceae. No Brasil, as espécies do gênero *Phyllanthus* estão distribuídas nas subzonas do agreste e sertão em vegetação de caatinga. Este gênero caracteriza-se pela presença de diversas classes de metabólitos secundários, incluindo lignanas. O objetivo desse trabalho foi ampliar o conhecimento sobre o gênero *Phyllanthus* através do estudo da espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl, isolando seus constituintes e avaliando possíveis atividades dos mesmos. Foram utilizadas as seguintes metodologias: Cromatografia em coluna (CC), Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), Espectroscopia de Infravermelho, Massas, Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, avaliação de modulação da atividade antimicrobiana por bomba de efluxo, avaliação antitumoral *in vitro* e citotoxicidade frente a eritrócitos. Neste trabalho, descrevemos o isolamento e identificação de duas lignanas, justicidina B, já descrita nas raízes da espécie e luclaricina, substância inédita. Foi avaliada a atividade farmacológica da justicidina B, componente majoritário, que apresentou baixa citotoxicidade frente a eritrócitos  $\text{CH}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ , porém nos testes de modulação de resposta a antimicrobianos, em cepas resistentes por bomba de efluxo, não apresentou atividade biológica. Quanto à atividade tumoral, apresentou-se ativa em diversas linhagens celulares corroborando com a literatura. Dessa forma o presente trabalho contribuiu com o conhecimento sobre o gênero e espécie estudada com o isolamento de uma nova lignana, a luclaricina, e acrescenta dados sobre a atividade farmacológica da justicidina B.

**Palavras-chave:** Phyllanthaceae, *Phyllanthus acuminatus*, lignanas, justicidina B e luclaricina.

## ABSTRACT

The genus *Phyllanthus* belongs to *Phyllanthaceae* family that consists on non-latescent herbs, shrubs and trees with a predominantly pantropical distribution, including 55 genera and 1,745 species and which was recently detached from the family *Euphorbiaceae*. In Brazil, the species of the genus *Phyllanthus* are distributed in subareas of wastelands and backlands in savanna vegetation. The genus is characterized by the presence of several classes of secondary metabolites, including lignans. The objective of this study was to increase knowledge of the genre through the study of *Phyllanthus* species *Phyllanthus acuminatus* Vahl, isolating their constituents and evaluating potential activities of these. The following methodologies were used: Column chromatography (CC), analytical thin layer chromatography (CCDA), infrared spectroscopy, Mass, uni and two dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance, evaluation of modulated antimicrobial activity by efflux pump, antitumor evaluation *in vitro* and cytotoxicity against erythrocytes. Here we describe the isolation and identification of two lignans, justicidin B, already found in the roots of the species and luclaricin, never previously found in *Phyllanthus acuminatus* Vahl species. We evaluated the pharmacological activity of justicidin B, major component in the plant's aerial parts, which showed low cytotoxicity against erythrocytes CH<sub>50</sub> > 1000 mg / mL, however it showed no biological activity in the modulation test of response towards antimicrobial resistant strains by efflux pump. Regarding antitumor activity it presented activity in several cell lineages, corroborating with literature. Thus this study contributed with new knowledge about the genus and species studied by isolating a new lignan the luclaricin and adds data on the pharmacological activity of justicidin B.

**Key-words:** Phyllanthaceae, *Phyllanthus acuminatus*, lignans, justicidin B e luclaricin.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>APT</b>	<i>Attached Proton Test</i>
<b>ATCC 6538</b>	Linhagem padrão usada como controle
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CCEN</b>	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b>d</b>	Dubleto
<b>dd</b>	Duplo dubleto
<b>dl</b>	Dubleto largo
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EEB</b>	Extrato Etanólico Bruto
<b>EM</b>	Espectrometria de massas
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>g</b>	Gramas
<b>GI<sub>50</sub></b>	<i>Growth inhibition</i>
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HMQC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<b>Hex</b>	Hexano
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IV</b>	Infravermelho

<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b>KBr</b>	Brometo de potássio
<b>kg</b>	quilograma
<b>LMCA</b>	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
<b>MeCN</b>	Acetonitrila
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mL</b>	Mililitro
<b>μL</b>	Microlitro
<b><i>m/z</i></b>	Relação massa/ carga
<b>MsrA</b>	Bomba de efluxo de macrolídeos
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
<b>NorA</b>	Bomba de efluxo não específica (inclui norfloxacino)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P.A.</b>	Para análise
<b>p.</b>	Página
<b>PgPNSB</b>	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
<b>PB</b>	Paraíba
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>rpm</b>	rotação por minuto
<b>SBF</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SBR</b>	Sulforrodamina B
<b><i>s</i></b>	Singleto
<b><i>sl</i></b>	Singleto largo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b><i>t</i></b>	Tripleto
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TetK</b>	Bomba de efluxo de tetraciclina
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba

v Volume  
 $\delta$  Deslocamento químico em ppm

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Distribuição geográfica da família Phyllanthaceae MARTINOV no mundo.

FIGURA 2- Mapa da concentração de espécies da Phyllanthaceae no mundo.

FIGURA 3- Detalhe dos frutos capsulares de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

FIGURA 4A - Aspectos botânicos do gênero *Phyllanthus*.

FIGURA 4B - Aspectos botânicos do gênero *Phyllanthus*.

FIGURA 5 - *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

FIGURA 6 - Aspectos botânicos da *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

FIGURA 7 - Espectro de massas de PhA-1 obtido em baixa resolução LR-ESI-MS.

FIGURA 8 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q (125 MHz) de PhA-1 em  $\text{CDCl}_3$ .

FIGURA 9 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q de PhA-1 na região de 131-103 ppm (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 10 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q de PhA-1 na região de 70-50 ppm (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 11- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1.

FIGURA 12 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de 7,75-6,80 ppm.

FIGURA 13 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de 6,31-3,7 ppm.

FIGURA 14 - Espectro HSQC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1.

FIGURA 15 - Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de (6,3-3,7 ppm) x (30-120 ppm).

FIGURA 16 - Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de (7,8-6,3 ppm) x 100-130 ppm).

FIGURA 17 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1.

FIGURA 18 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de (7,35-6,6 ppm) x (100-155 ppm).

FIGURA 19 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1 na região de (7,75-7,1 ppm) x (65-160 ppm).

FIGURA 20 – Espectro NOESY 1D (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

FIGURA 21 – Espectro NOESY 1D (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

FIGURA 22 – Espectro NOESY 1D (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

FIGURA 23- Espectro de massas de PhA-2 obtido em alta resolução HR-ESI-MS.

FIGURA 24 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C APT (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

FIGURA 25– Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C APT (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 174-122 ppm.

FIGURA 26– Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C APT (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 130,5-123,0 ppm.

FIGURA 27 - Espectro de infravermelho de PhA-2.

FIGURA 28 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

FIGURA 29– Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 7,0-5,75 ppm.

FIGURA 30– Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 6,95-6,61 ppm.

FIGURA 31– Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 6,1-5,2 ppm.

FIGURA 32– Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de 7,75-6,70ppm.

FIGURA 33 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

FIGURA 34 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (5,6-2,0 ppm) x (20-75 ppm).

FIGURA 35 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (7,8-5,7 ppm) x (90-130 ppm).

FIGURA 36 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

FIGURA 37 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (6,2-3,6 ppm) x (100-190 ppm).

FIGURA 38 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (8,2-6,8 ppm) x (60-155 ppm).

FIGURA 39 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (7,22-6,74 ppm) x (100-160 ppm).

FIGURA 40 - Espectro NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

FIGURA 41 - Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (7,5-1,0 ppm) x (0-9 ppm).

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação taxonômica do gênero *Phyllanthus*.

TABELA 2 - Lignanas com atividade biológica.

TABELA 3 - Processamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt (8:2) do EEB de *P. acuminatus* – Coluna 1 em sílica gel.

TABELA 4 - Processamento cromatográfico das frações 54-68 da Coluna 1– Coluna 1.1 em sílica gel.

TABELA 5 - Processamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt (1:1) do EEB de *P. acuminatus* – Coluna 2 em sílica gel.

TABELA 6 - Processamento cromatográfico da fração 29 da Coluna 2– Coluna 2.1 em sephadex.

TABELA 7 - Processamento cromatográfico das frações 28-38 da Coluna 2– Coluna 2.2 em sephadex.

TABELA 8 - Dados de RMN 1D e 2D de PhA-1 em 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, comparados com justicidina B (SILVA et al., 2007).

TABELA 9 - Dados de RMN 1D e 2D de PhA-2 em 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, comparados com filantostatina A (PETTIT et al., 1988).

TABELA 10 - Valores de GI<sub>50</sub> (µg/mL) para a doxorrubicina e justicidina B.

TABELA 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de justicidina B para as cepas bacterianas da espécie *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA.

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Obtenção e partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

ESQUEMA 2 - Fracionamento cromatográfico da fase Hex: AcOEt 8:2 do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

ESQUEMA 3 - Fracionamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt 1:1 do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

GRÁFICO 1 - Atividade antitumoral da doxorubicina (A) e justicidina B (B) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra.

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Algumas lignanas isoladas de espécies do gênero *Phyllanthus*.

QUADRO 2 - Estrutura química das lignanas isoladas de *Phyllanthus acuminatus* em estudos anteriores.

QUADRO 3 - Esqueletos das principais lignanas.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivo Específico.....	29
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	31
3.1. Considerações sobre a família Phyllanthaceae .....	31
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Phyllanthus</i> .....	33
3.3. Considerações sobre a espécie <i>Phyllanthus acuminatus</i> Vahl.....	39
3.4. Considerações sobre lignanas .....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
4.1. Material Botânico .....	49
4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto e seu particionamento .....	49
4.3. Métodos Cromatográficos.....	51
4.4. Processamento cromatográfico da fase Hex: AcOEt 8:2.....	51
4.5. Processamento cromatográfico da Fase Hex: AcOEt 1:1 .....	56
4.6. Métodos Espectroscópicos.....	59
4.6.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV) .....	59
4.6.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	59
4.6.3. Espectrometria de Massas (EM).....	59
4.7. Estudo Farmacológico .....	60
4.7.1. Citotoxicidade frente eritrócitos .....	60
4.7.2. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas.....	61
4.7.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	62
4.7.4. Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas .....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1. Identificação estrutural de PhA-1 .....	64
5.2. Identificação estrutural de PhA-2 .....	83
5.3. Citotoxicidade frente eritrócitos .....	104

5.4. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas .....	104
5.5. Concentração inibitória mínima (CIM) e atividade moduladora da resistência a drogas.....	106
6. CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS .....	110

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

O uso de plantas medicinais, a exemplo da fitoterapia, tem ressurgido como uma opção medicamentosa bem aceita e acessível aos povos, e no caso do Brasil é adequada para as necessidades locais de centenas de municípios brasileiros no atendimento primário à saúde. A expansão da fitoterapia pode ser atribuída a diversos fatores tais como: os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados, além do menor custo se comparado com os fármacos sintéticos (BRAZ FILHO, 2010).

Ao longo do tempo as plantas medicinais vêm sendo utilizadas pela população mundial como matéria-prima para o tratamento empírico, cura e prevenção de doenças. É uma prática milenar que ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo de evolução tecnológica e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico; é largamente difundida, refletindo o reconhecimento do potencial da fitoterapia para a expansão dos serviços de saúde, bem como a tendência generalizada dos consumidores em utilizarem preferencialmente produtos de origem natural (GRAÇA, 1999; CALIXTO, 2000).

Os vegetais respondem a diferentes estímulos ambientais, de natureza química, física e biológica, dos quais depende a sua relação e interação no ambiente no qual se encontram. Como são impossibilitados de se locomoverem, a resposta a esses estímulos se dá a partir da produção de substâncias químicas oriundas do seu metabolismo secundário (SIMÕES et al., 2007). A produção desses compostos está associada à defesa da planta contra herbívoros, ataque de patógenos, radiação solar (MONTANARI JR., 2002), ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes (SIMÕES et al., 2007).

O isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos apresentam importância fundamental para a fitoterapia e o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais, contribuindo para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (BRAZ FILHO, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os vegetais são as maiores e melhores fontes de fármacos para a humanidade (BEZERRA et al., 2006), cerca de 60% dos fármacos disponíveis no mercado tem origem direta ou indiretamente ligada a produtos naturais (NEWMAN, 2008) dos quais 48,6% são antitumorais (NEWMAN, 2012), e muitos destes produtos naturais servem como modelo à síntese orgânica de novas drogas (BEGHYN et al., 2008). As chances de se obter novas entidades químicas de plantas, animais, fungos e bactérias são reais e mesmo que a nova entidade química não passe em todos os testes clínicos, ela servirá de modelo para a síntese de novos candidatos a fármaco (VEIGA-JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Estima-se que apenas 17% de toda a flora mundial tenham sido estudadas quanto ao seu emprego medicinal (FOGLIO, 2006), o que comprova que ainda há muito a ser explorado.

O Brasil detém uma grande diversidade de plantas com potencialidades medicinais, o que o coloca numa posição privilegiada em relação a outros países e, considerando sua riqueza vegetal ainda sem estudo, aumenta a possibilidade do desenvolvimento de novos medicamentos (YUNES, 2001). Isto estimula os pesquisadores no estudo de possíveis ações farmacológicas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade, em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL e WANI, 1996).

Apesar do mundo vivenciar uma era de tecnologias avançadas e inovadoras para a elucidação do mecanismo de diversas patologias, bem como conceber molecularmente a descoberta de novas drogas, as doenças infecciosas continuam a ser um dos maiores desafios da área de saúde em todo o mundo. Os agentes antimicrobianos convencionais apresentam o inconveniente de permitir o desenvolvimento da resistência a drogas, sem mencionar os efeitos adversos ao organismo humano, o que leva a administração de doses elevadas, muitas vezes causando toxicidade intolerável (FERNEBRO, 2011).

Alternativas para resolver problemas devido à resistência bacteriana incluem a descoberta de novos agentes antimicrobianos ou a modificação química de moléculas já existentes. Assim, os compostos semissintéticos foram relatados após os primeiros casos de resistência aos antibióticos naturais descritos na literatura, a fim de melhorar a atividade das moléculas já existentes (RAWAT et al., 2010).

Outro grande problema de saúde é o câncer, pois é a segunda maior causa de morte no mundo e em alguns países chega a ser a principal causa. De acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS), constatou-se que anualmente 10 milhões de casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo e seis milhões de pessoas morrem devido a esta enfermidade (CHAM, 2008).

Apesar das melhorias no tratamento do câncer, os tratamentos quimioterápicos existentes que usam agentes citotóxicos clássicos, têm limitações bem definidas, que incluem um índice terapêutico estreito que não permite a administração de uma quantidade adequada do fármaco a fim de induzir a resposta pretendida. Além disso, os tratamentos convencionais (radioterapia e quimioterapia) não garantem que as células normais não sejam atingidas, provocando efeitos colaterais graves que limitam o seu uso (ROMAROV et al., 1999).

Historicamente, compostos derivados de plantas também têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de vários agentes antineoplásicos, dentre eles a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo; e a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL-FILHO e YUNES, 2009), sendo fundamental uma integração entre a química e a farmacologia, cujo elo pode levar à obtenção de substâncias naturais ou sintéticas de grande interesse químico-medicinal.

Baseando-se em dados da literatura sobre a existência de compostos biologicamente ativos na espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl, bem como em outras espécies do gênero *Phyllanthus*, decidiu-se investigar essa espécie coletada na Paraíba na busca de novos compostos potencialmente ativos, especialmente como antitumorais e antimicrobianos.

*Objetivos*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Contribuir para o estudo fitoquímico e farmacológico do gênero *Phyllanthus*, isolando constituintes químicos da espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl e avaliando a atividade dos mesmos.

### **2.2. Objetivo Específico**

- Extrair, isolar e purificar metabólitos secundários presentes nas partes aéreas da espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl.
- Identificar e/ou elucidar a estrutura de seus constituintes químicos.
- Realizar ensaios de citotoxicidade frente a eritrócitos.
- Realizar ensaios de atividade antitumoral.
- Realizar ensaios de atividade antimicrobiana com determinação de concentração inibitória mínima (CIM).
- Realizar ensaio de modulação de resposta a antimicrobianos.

*Fundamentação*

*Teórica*

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Considerações sobre a família Phyllanthaceae

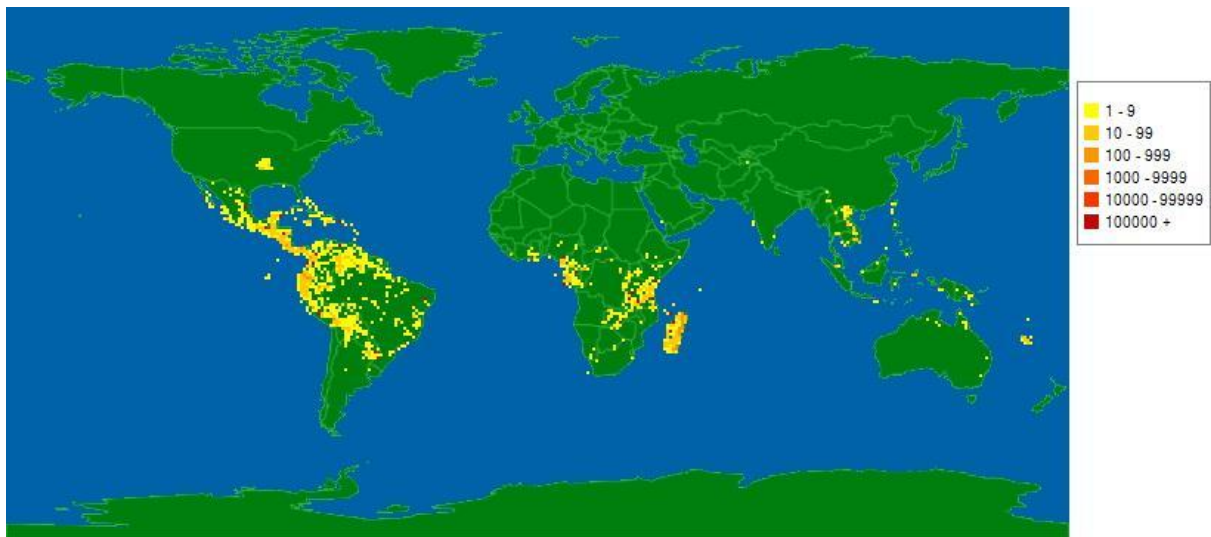
Em 2006, Hoffmann et al. baseados tanto em dados moleculares, quanto morfológicos, propuseram que as Euphorbiaceae s.l. fossem divididas em cinco famílias, Euphorbiaceae s.s., Phyllanthaceae, Picrodendraceae, Pandaceae e Putranjivaceae.

Phyllanthaceae pode ser distinguida de Euphorbiaceae s.s. por apresentar os lóculos do ovário biovulados (vs. lóculos uniovulados), pela ausência de canais laticíferos e, conseqüentemente, de látex branco ou colorido, caráter relativamente comum nas Euphorbiaceae s.s., além da ausência de arilo nas sementes, característica também presente na maioria das Euphorbiaceae s.s. Pode também ser separada da pequena família Picrodendraceae, que também apresenta os lóculos do ovário biovulados, pela presença de um disco nectarífero nas flores masculinas e femininas, pela frequente presença de estiletos bífidos e pela ausência do pólen espinhoso (característico de Picrodendraceae) (HOFFMANN, 2006).

De acordo com Judd et al.(2009), a família Phyllanthaceae é presumivelmente monofilética com base nas flores unissexuais, nos estiletos bífidos e nos frutos esquizocárpicos. Assim como as Euphorbiaceae s.s., as Phyllanthaceae também apresentam flores unissexuais, estiletos bífidos e frutos esquizocárpicos, porém a filogenia mostra que essas características parecem ter evoluído de maneira independente nas diferentes linhagens do que eram as Euphorbiaceae s.l. (MARTINS e LIMA, 2011)

A família Phyllanthaceae inclui ervas, arbustos e árvores não latescentes (produtoras de látex). De distribuição predominantemente pantropical (SAMUEL, 2005), as phyllanthaceas incluem 55 gêneros e 1.745 espécies. No Brasil, ocorrem 13 gêneros e cerca de 100 espécies, com destaque para *Phyllanthus spp.*, *Hyeronima spp.*, *Savia spp.* e *Richeria spp.* (SOUZA e LORENZI, 2005; JUDD et al., 2009; DENARDI, 2013).

FIGURA 1 - Distribuição geográfica da família Phyllanthaceae MARTINOV no mundo.



Fonte: <http://www.tropicos.org/HeatMap.aspx?maptypeid=2&lookupid=50308046&map=2>

FIGURA 2 - Mapa da concentração de espécies da Phyllanthaceae no mundo, correspondendo a maior concentração à maior intensidade da cor verde.



Fonte: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=50308046&tab=maps>

### 3.2.Considerações sobre o gênero *Phyllanthus*

O gênero *Phyllanthus* é o maior da família Phyllanthaceae, destaca-se pelo elevado número de espécies dispersas por todas as regiões do mundo, e pela complexidade taxonômica. Na Região Nordeste do Brasil, há aproximadamente 36 espécies e boa parte apresenta-se nos campos rupestres, cerrado e caatinga (SILVA e SALES, 2007).

Segundo Silva e Sales (2007), *Phyllanthus* L. compreende aproximadamente 1.269 espécies, alocadas em mais de 50 seções, com distribuição em diversos ambientes e tipos vegetacionais das regiões tropicais do mundo, apresentando como importantes centros de diversidade de espécies as Américas (200 spp.), a África (100 spp.) e Madagascar (70 spp.)

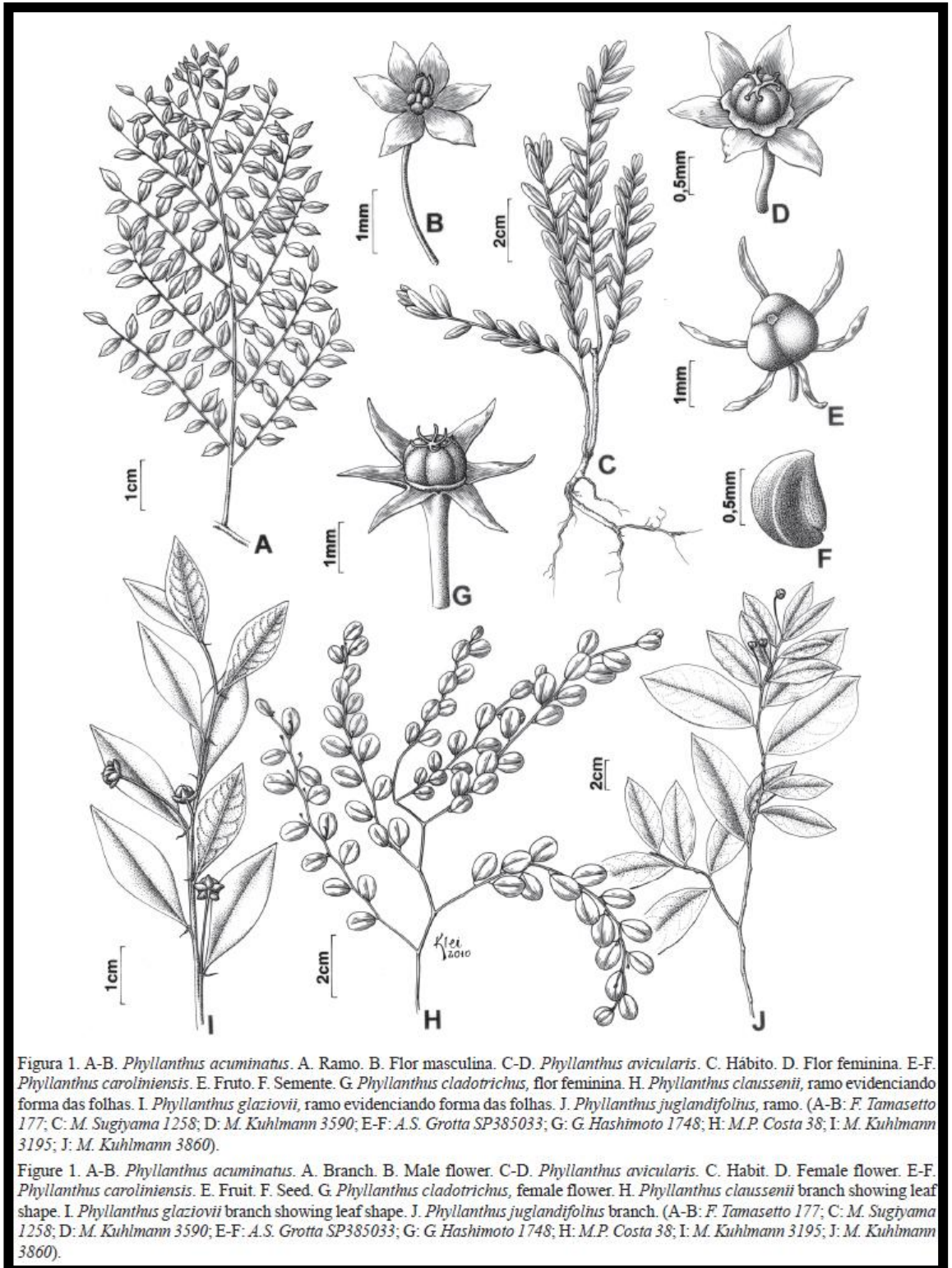
Este gênero subordina plantas de hábito variado, principalmente herbáceo, com ramificação filantoide ou não filantoide, flores gamossépalas em inflorescências cimosas, disco usualmente presente em ambas as flores, comumente inteiro, nas pistiladas, e segmentado nas estaminadas, frutos capsulares (FIGURA 3), mas raramente bacáceos, e sementes usualmente trígonas e ornamentadas (SILVA e SALES, 2007).

FIGURA 3 - Detalhe dos frutos capsulares de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.



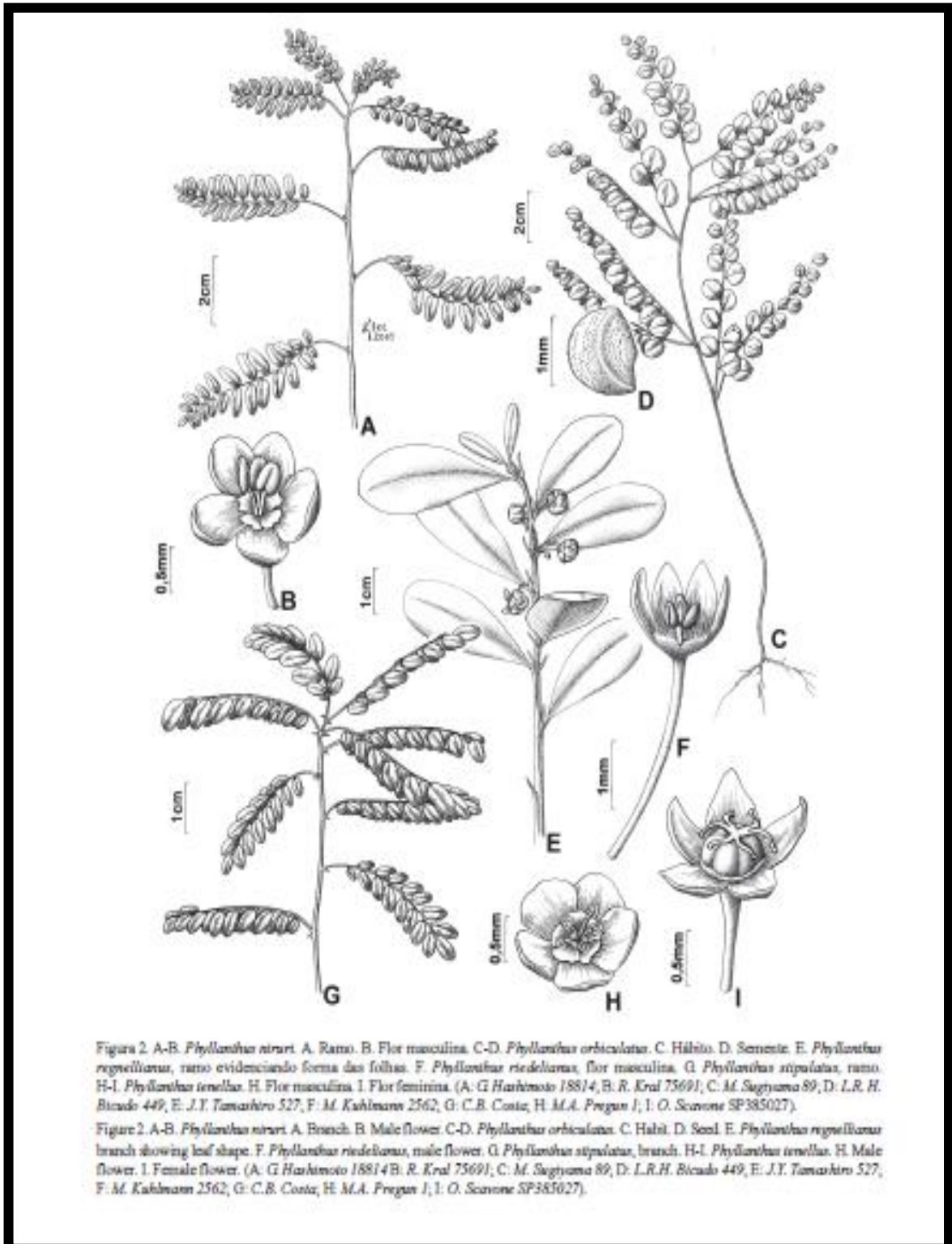
Fonte : J.F. Tavares, Maturéia –Pb, 2012

FIGURA 4A - Aspectos botânicos do gênero *Phyllanthus*.



Fonte: MARTINS e LIMA, 2011.

FIGURA 4B - Aspectos botânicos do gênero *Phyllanthus*.



Fonte: MARTINS e LIMA, 2011.

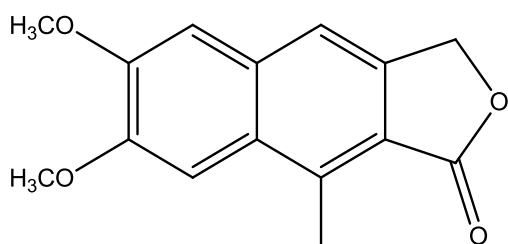
TABELA 1 - Classificação taxonômica do gênero *Phyllanthus*

TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Phyllanthus</i>	
<b>Classe</b>	Equisetopsida C. Agardh
<b>Subclasse</b>	Magnoliidae Novák ex Takht.
<b>Superordem</b>	Rosanae Takht.
<b>Ordem</b>	Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl
<b>Família</b>	Phyllanthaceae Martinov
<b>Gênero</b>	<i>Phyllanthus</i> L.

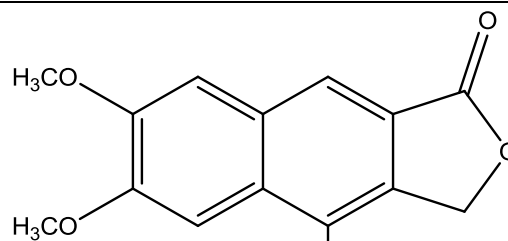
Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/12802298>

O gênero *Phyllanthus* caracteriza-se pela presença de algumas classes de metabólitos como antraquinonas, lignanas, saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides e todos os terpenoides, como pela ausência de alguns grupos, caso das antocianinas e cumarinas. (NASCIMENTO et al., 2008).

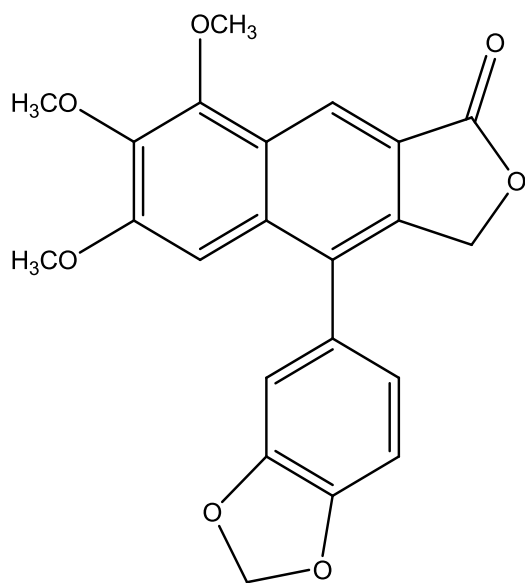
QUADRO 1 - Algumas lignanas isoladas de espécies do gênero *Phyllanthus*.



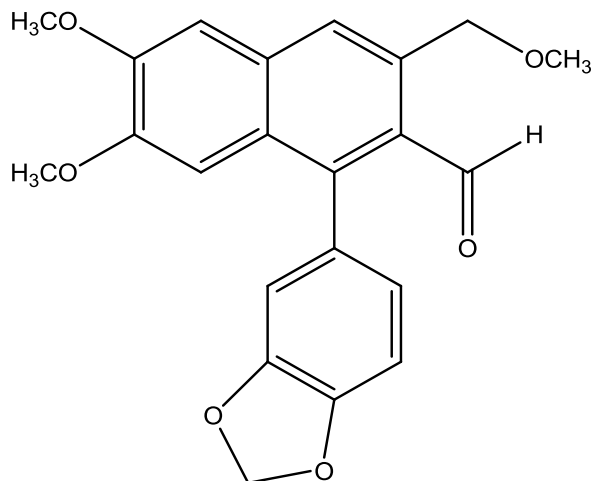
Justicidina B



Retrojusticidina B



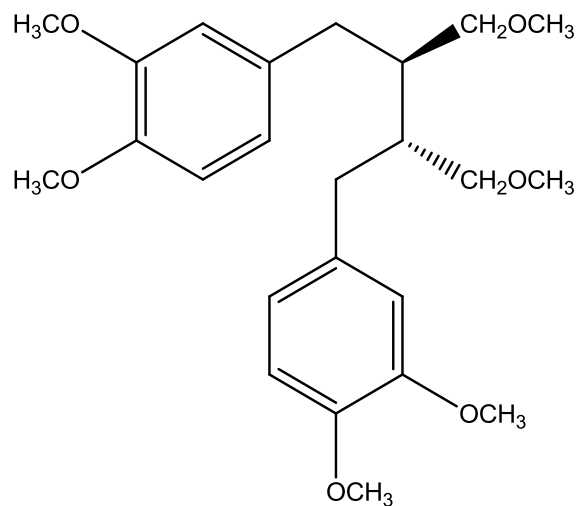
Filamiricina A



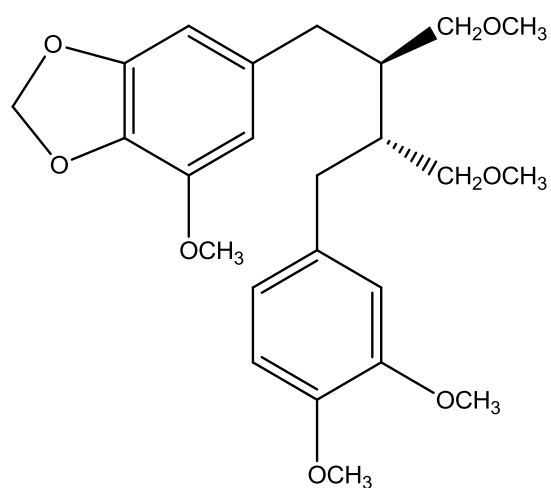
Filamiricina B

(WANG, 2011)

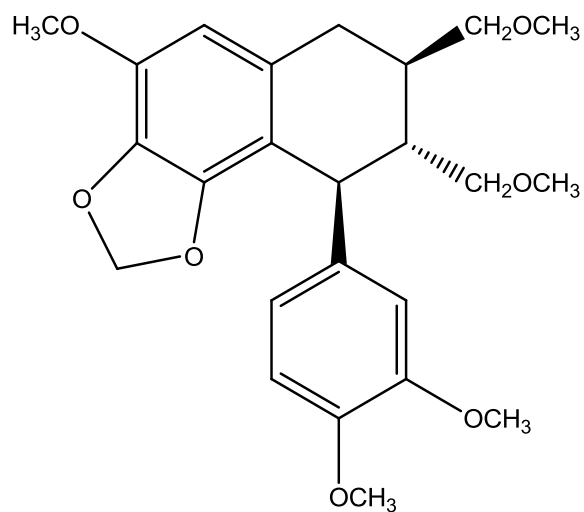
QUADRO 1 - CONTINUAÇÃO



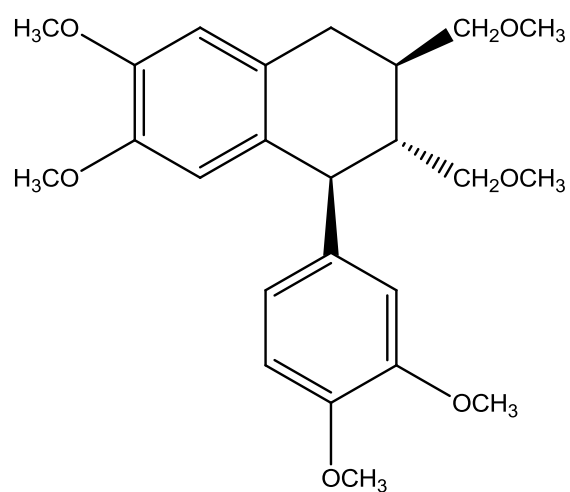
Filantina



Nirantina



Hipofilantina



Filtetralina

(MURUGAIYAH e CHAN, 2009)

### 3.3.Considerações sobre a espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl

Segundo Silva e Sales (2007), a *Phyllanthus acuminatus* Vahl é uma planta arbórea ou arbustivo-arbórea, com 3-6 m de altura, ramificação filantoide, ramos bipinatiformes, angulosos, lenticelados, glabros a puberulentos. Limbo foliar membranáceo, oval a oval-elíptico, base obtusa ou arredondada, ápice acuminado. Flor pistilada solitária na região central e estaminada. Sementes plano-convexas, superfície areolada, lustrosa.

Exclusiva das Américas, ocorrendo desde o México até o Norte da Argentina. Cresce em florestas secundárias e em matas de galeria do cerrado. No Brasil, ocorre nas regiões Norte, Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste. Floresce e frutifica de fevereiro a junho e de agosto a novembro. Apresenta distribuição na Zona das Caatingas, porém em áreas mais úmidas e elevadas (800 a 1000m), com vegetação de floresta semidecídua ou perenifólia como também na Zona da Mata e Litoral, na Mata Atlântica (SILVA e SALES, 2004).

Nas raízes de *P. acuminatus* provenientes da América central foram isoladas por PETTIT et al., (1984, 1988, 1990), diversas substâncias, entre elas as filantostatinas, compostos com potente atividade antitumoral, frente as células leucêmicas P388 e células de melanoma B16 murino, além dos filantosídeos, com atividade semelhante.

O extrato metanólico de folhas de *Phyllanthus acuminatus* Vahl apresentou atividade antifúngica contra *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* e o extrato diclorometânico contra *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* e *Aspergillus fumigatus* nos estudos realizados por GOUN et al., (2003), nesse mesmo estudo não foi evidenciada atividade antibacteriana.

O extrato aquoso de ramos secos não apresentou atividade antiviral, em contrapartida vários extratos de raízes e folhas apresentaram interessante atividade antitumoral, correlacionada por Muñoz et al., (2000) com atividade antimalárica devido a semelhança entre o ciclo de replicação do *Plasmodium* e das células tumorais, foi ainda descrita como ictiotóxica em preparações aquosas utilizando folhas.

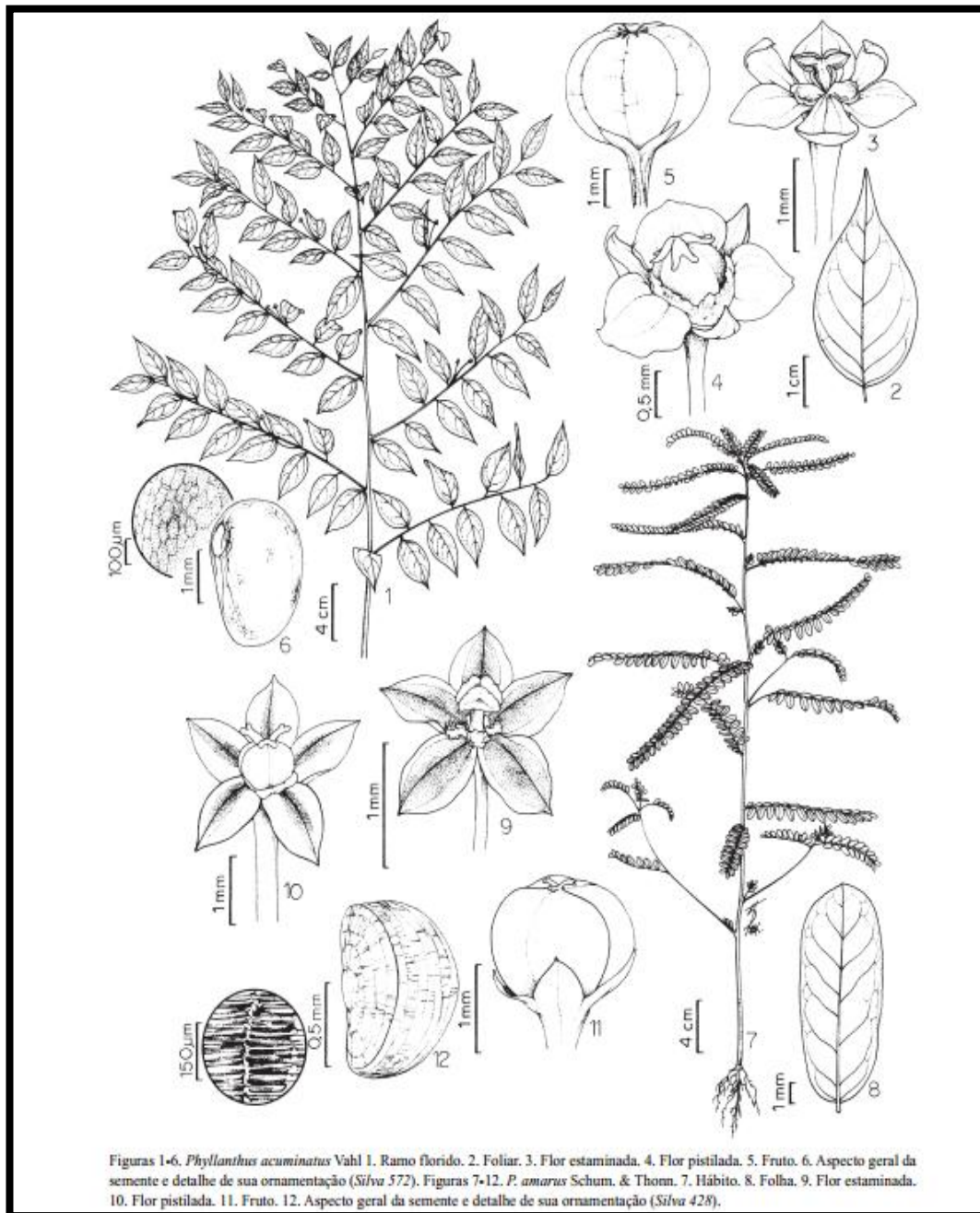
A *Phyllanthus acuminatus* Vahl apresenta dentre seus metabólitos secundários lignanas potencialmente ativas, o que justifica o interesse pela identificação e isolamento das mesmas.

FIGURA 5 - *Phyllanthus acuminatus* Vahl



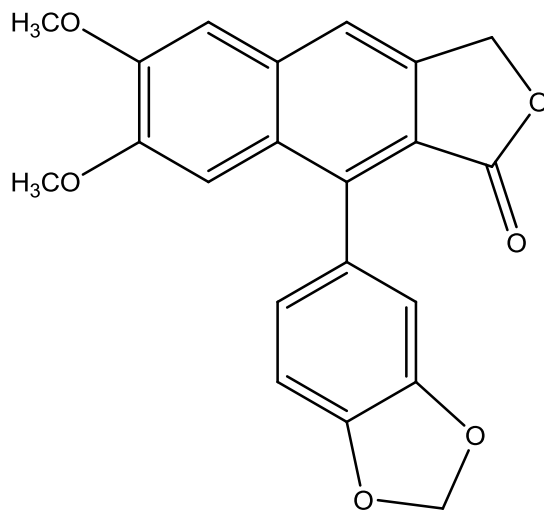
Fonte: J. F. Tavares, Maturéia –Pb, 2012

FIGURA 6 - Aspectos botânicos de *Phyllanthus acuminatus* Vahl

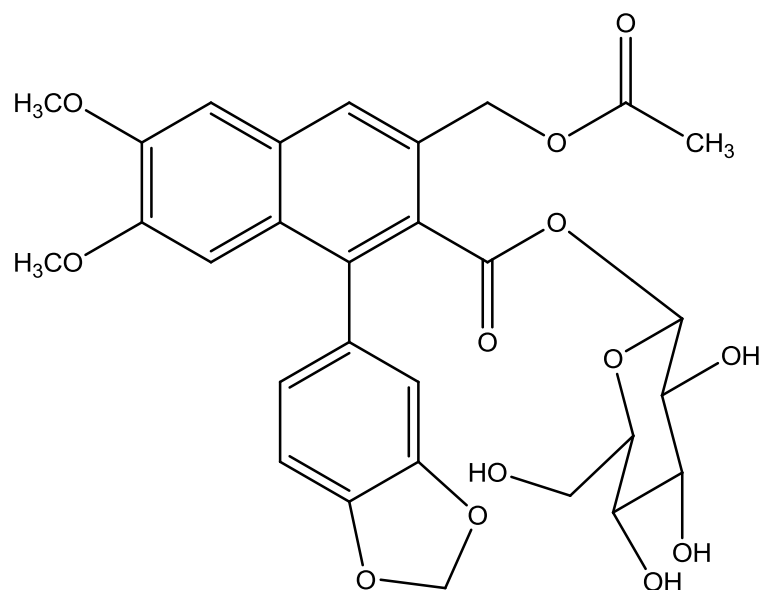


Fonte: SILVA e SALES, 2007.

QUADRO 2 - Estrutura química das lignanas isoladas de *Phyllanthus acuminatus* Vahl em estudos anteriores.



Justicidina B



Filantostatina A

(PETTIT et al., 1990)

### 3.4.Considerações sobre lignanas

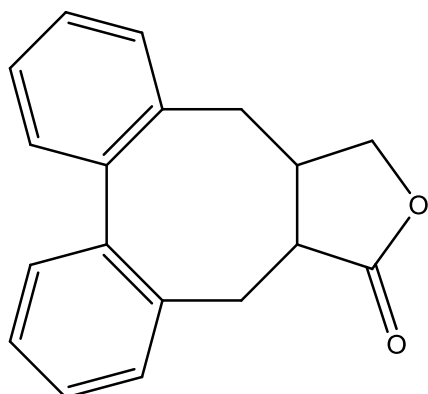
Os lignoides são micromoléculas cujo esqueleto é formado exclusivamente, ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico  $(C_6.C_3)_n$ , sendo n restrito a poucas unidades, 1 a 3 (BARROS, 2008), são metabólitos secundários de origem vegetal com uma grande variação estrutural subdividindo-se em: lignanas, norlignanas, neolignanas, alolignanas, oligolignoides e heterolignoides. Dentre esses se destacam as lignanas e neolignanas, pelo elevado número.

Segundo Barros (2008), com base em fitoquímica comparada, foi mostrado que os lignoides são indicadores do processo evolutivo em angiospermas e desempenham um papel na adaptação ecológica. Há evidências de que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas, e também apresentam efeitos farmacológicos.

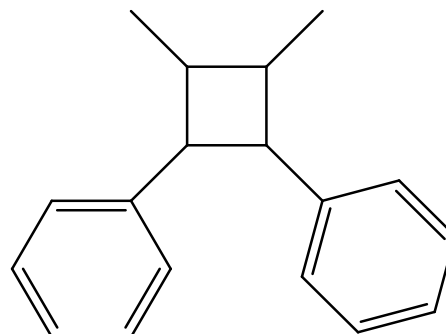
As lignanas são amplamente distribuídas no reino vegetal, tendo sido detectadas em 75 famílias e estando bem representadas em angiospermas e poucas gimnospermas, o que fornece indícios de que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam importantes ao desenvolvimento do próprio vegetal contribuindo para sua sobrevivência. Este dentre outros motivos, faz com que essas substâncias sejam investigadas quanto ao seu aproveitamento direto pelo homem como também servindo de modelo para a síntese de fármacos (BARROS, 2008).

As lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de alcoóis cinâmílicos entre si ou destes com ácidos cinâmílicos, apresentando o carbono gama (C-9) oxigenado, enquanto que as neolignanas são dímeros oxidativos de alilfenóis e de propenilfenóis, entre si ou cruzados e não apresentam o carbono gama (C-9) oxigenado (BARROS, 2008).

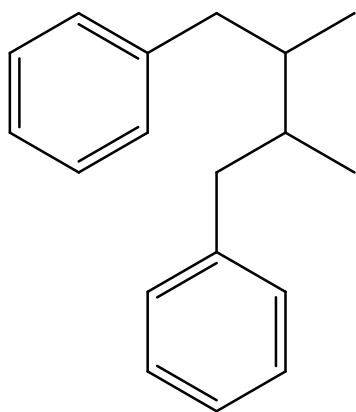
QUADRO 3 - Esqueletos das principais lignanas.



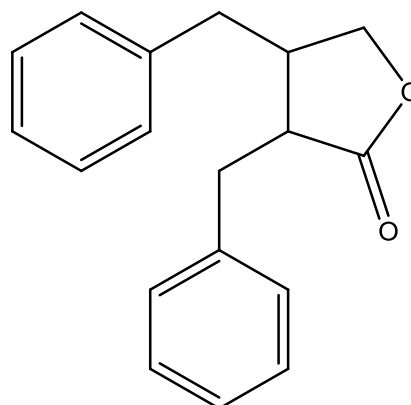
Dibenzociclooctadieno



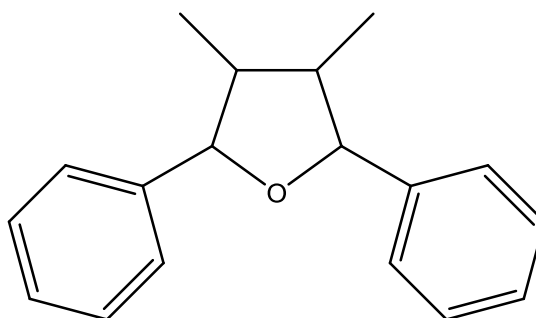
Ciclobutânico



Dibenzilbutano

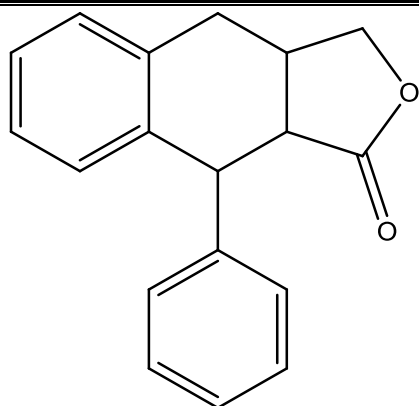


Dibenzilbutirolactônica

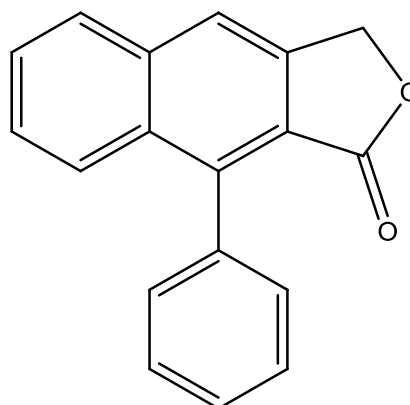


Tetrahidrofurânico

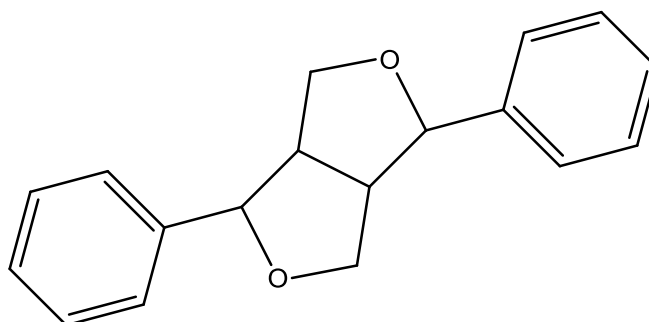
### QUADRO 3 - CONTINUAÇÃO



Ariltetrahidronaftaleno



Arilnaftaleno



Furofurânico

(RIOS, et al., 2002)

Lignanas são compostos que geralmente apresentam atividade biológica servindo tanto na terapêutica como na síntese de novos fármacos. Já foram documentadas diversas atividades biológicas para esse tipo de metabólito secundário, como por exemplo, a atividade antitumoral da podofilotoxina isolada de *Podophyllum peltatum* L. e usada como protótipo para o desenvolvimento de dois agentes clinicamente ativos usados no tratamento de câncer, etoposido e teniposido (CRAGG e NEWMAN, 2005).

TABELA 2 - Lignananas com atividade biológica.

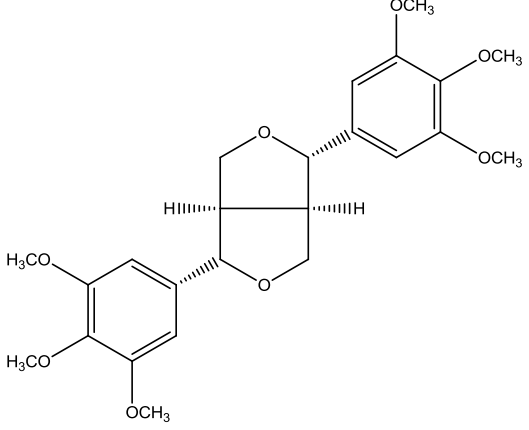
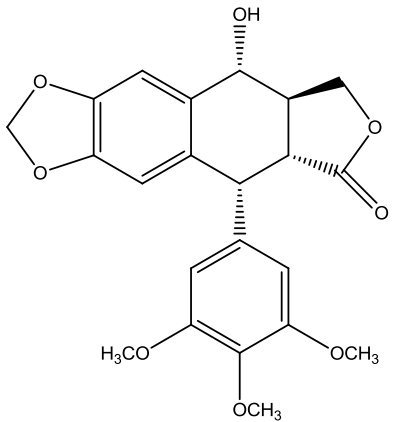
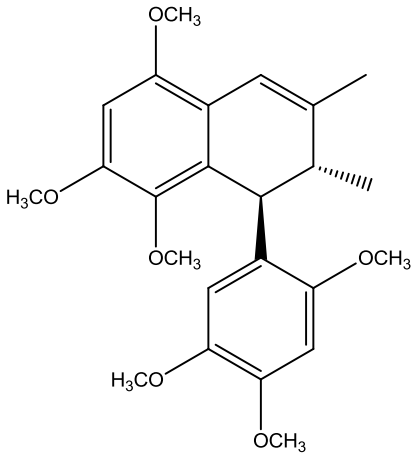
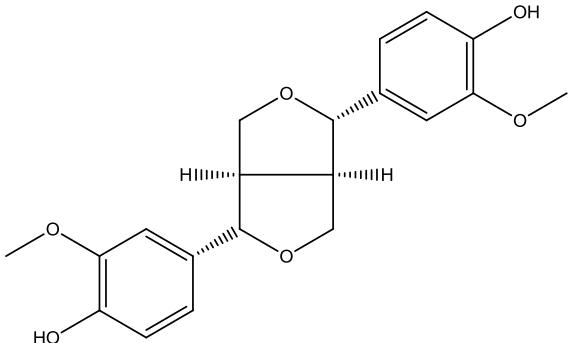
COMPOSTO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
 <p>Iangambina</p>	<p>Antialérgica, analgésica, leishmanicida, sedativo-hipnótica, anticonvulsivante, depressor do SNC, antitumoral</p>	<p><i>Ocotea duckei</i> Vattimo</p>	<p>PACHÚ et al., 1993; ALMEIDA et al., 1995; SERRA et al., 1997; HAUSOTT e MARIAN, 2003 e PENHA, 2010.</p>
 <p>Podofilotoxina</p>	<p>antitumoral e antimetabólico</p>	<p><i>Podophyllum peltatum</i> <i>Podophyllum emodi</i></p>	<p>DAMAYANTHI e LOWN, 1998; CRAGG e NEWMAN, 2005; MONTEIRO et al., 2007; SIMÕES et al., 2004; ZI, et al., 2013.</p>

TABELA 2 - CONTINUAÇÃO

COMPOSTO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
 <p data-bbox="459 782 616 813">Magnoshinina</p>	<p data-bbox="952 566 1176 598">anti-inflamatório</p>	<p data-bbox="1355 566 1646 598"><i>Magnolia salicifoliae</i></p>	<p data-bbox="1736 550 2004 614">BARBOSA-FILHO, 2004</p>
 <p data-bbox="459 1244 593 1276">Pinoresinol</p>	<p data-bbox="840 1085 1288 1117">anti-inflamatório e hepatoprotetor</p>	<p data-bbox="1366 1085 1624 1117"><i>Forsythiae Fructus</i></p>	<p data-bbox="1724 1045 2027 1125">KIM, et al., 2010; DURING, et al., 2012.</p>

*Materiais e  
Métodos*

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Material Botânico**

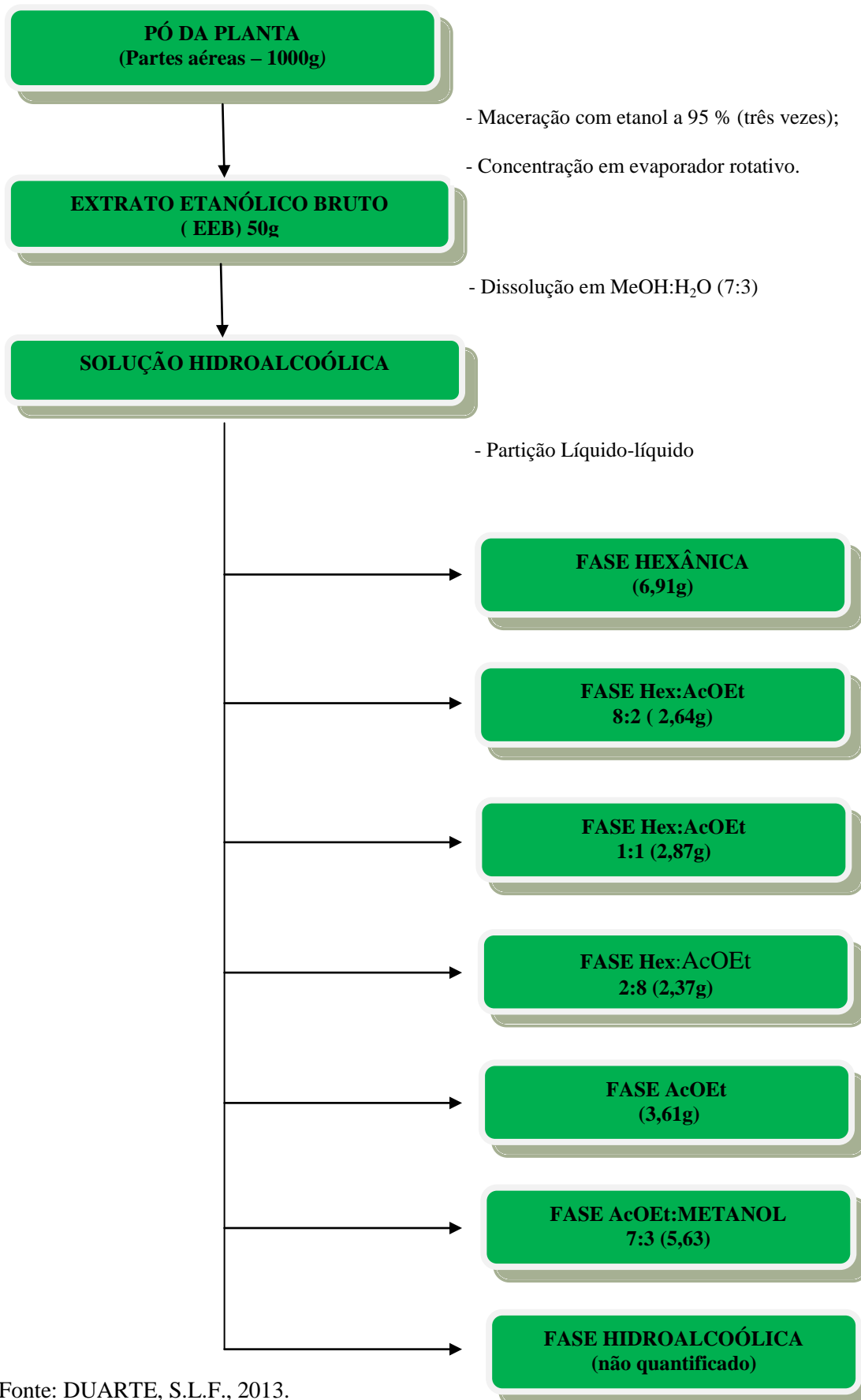
O material botânico (partes aéreas - folhas e galhos) de *Phyllanthus acuminatus* Vahl foi coletado em março de 2012 no Município de Maturéia, no Estado da Paraíba. Em seguida, a identificação botânica foi realizada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Agra do setor de botânica da UFPB e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, localizado no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) sob o código 7432 (Agra et al.)

### **4.2. Obtenção do extrato etanólico bruto e seu particionamento**

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante a temperatura média de 40°C durante 72 horas. Quando seco, o material foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 3,4 Kg de pó da planta. Posteriormente, 1 kg do pó da planta foi submetido à maceração com 5 litros de etanol (EtOH) a 95 %, em recipiente de aço inoxidável, por 72 horas, numa concentração de 20%, sendo este processo repetido por três vezes.

A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C, sendo obtido 93,6 g de extrato etanólico bruto (EEB) de cor verde lodo (ESQUEMA 1, p. 49). Posteriormente, 50,0 g do extrato foi dissolvido em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O (7:3) obtendo-se uma solução hidroalcoólica, sob agitação mecânica para total dissolução, por sua vez foi submetida a um processo de partição líquido-líquido com os solventes hexano e acetato de etila puros e com as seguintes combinações binárias (HEX:AcOEt 8:2; 1:1; 2:8; AcOEt:MeOH 9:1 e 7:3) em ampola de separação. As soluções resultantes desse processo foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se 6,91 g da fase hexânica; 2,64 g da fase Hex:AcOEt 8:2; 2,87g fase Hex:AcOEt 1:1; 2,37g fase Hex:AcOEt 2:8; 3,61g da fase AcOEt; 5,63g da fase AcOEt:MeOH 7:3 (ESQUEMA 1).

ESQUEMA 1- Obtenção e partição líquido-líquido do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.



Fonte: DUARTE, S.L.F., 2013.

Durante a primeira etapa do processo de partição, formou-se na ampola de separação, além das duas fases esperadas, hexânica e hidroalcoólica, uma terceira fase entre elas que foi recolhida separadamente onde recristalizou um material insolúvel como havia sido relatado por Pettit (1984) e que após completa evaporação do solvente, apresentou-se como um sólido amorfo esbranquiçado, com elevado rendimento 1,5g, identificado como PhA-1. As fases obtidas foram submetidas à RMN <sup>1</sup>H em busca de sinais que orientassem as próximas etapas de isolamento e purificação.

### **4.3.Métodos Cromatográficos**

Os métodos cromatográficos utilizados para o isolamento dos constituintes químicos foram Cromatografia em Coluna (CC), utilizando como fase fixa sílica gel ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e 0,04-0,063 mm. O comprimento e as dimensões das colunas de vidro variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

O monitoramento das frações obtidas das CC foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Para isso, foram utilizadas placas flexíveis Whatman AL SIL G/UV.

Os solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol) utilizados para eluição foram solventes P.A. e eventualmente solventes comerciais destilados na Central de Destilação, localizada nas dependências do PGPNSB.

A visualização das substâncias aplicadas nas cromatoplasmas foi feita por exposição da mesma à lâmpada de irradiação ultravioleta, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01) e pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

### **4.4.Processamento cromatográfico da fase Hex:AcOEt 8:2**

A fase Hex:AcOEt 8:2 (2,64 g) foi submetida à CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Desta coluna (Coluna 1) foram coletadas 94 frações de 100 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo,

analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, o que resultou em 11 grupos (TAB. 3, p. 51).

A fração 33-53 (102,9 mg) apresentou um precipitado amorfo esbranquiçado que foi analisado por CCDA, juntamente com o precipitado da partição, mostrou-se como uma única mancha quando revelada com vapores de iodo, sendo então codificada como **PhA-1**.

A fração 54-68 (994,7 mg) foi submetida a CC utilizando as mesmas condições anteriormente descritas para a Coluna 1, fornecendo 252 subfrações de 10 mL cada (Coluna 1.1). Após análise em CCDA, as subfrações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em 12 grupos (TAB. 4, p. 52).

Na subfração 111-133 foi observada a presença de um óleo âmbar que ao ser analisado por CCDA mostrou-se como uma mancha, em forma de chama de vela ou unha, sendo codificada de **PhA-2** (20 mg).

TABELA 3 - Processamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt (8:2) do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl – Coluna 1 em sílica gel.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (9:1)	1-10	1-2; 4-8; 10-12; 13-15; 17-25 27-32; <b>33-53</b> ; <b>54-68</b> ; 72-77; 78-80; 87-93
Hex:AcOEt (8:5)	11-22	
Hex:AcOEt (8:2)	23-43	
Hex:AcOEt (7:3)	44-55	
Hex:AcOEt (6:4)	56-59	
Hex:AcOEt (5:5)	60-65	
Hex:AcOEt (4:6)	66-69	
Hex:AcOEt (3:7)	70-72	
Hex:AcOEt (2:8)	73-75	
Hex:AcOEt (1:9)	76-79	
AcOEt	80-82	
AcOEt:MeOH (99:1)	83-84	
AcOEt:MeOH (95:5)	85-86	

TABELA 3 – CONTINUAÇÃO.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
AcOEt:MeOH (9:1)	87-88	
AcOEt:MeOH (8:2)	89	
AcOEt:MeOH (7:3)	90-91	
AcOEt:MeOH (6:4)	92	
AcOEt:MeOH (5:5)	93	
MeOH	94	

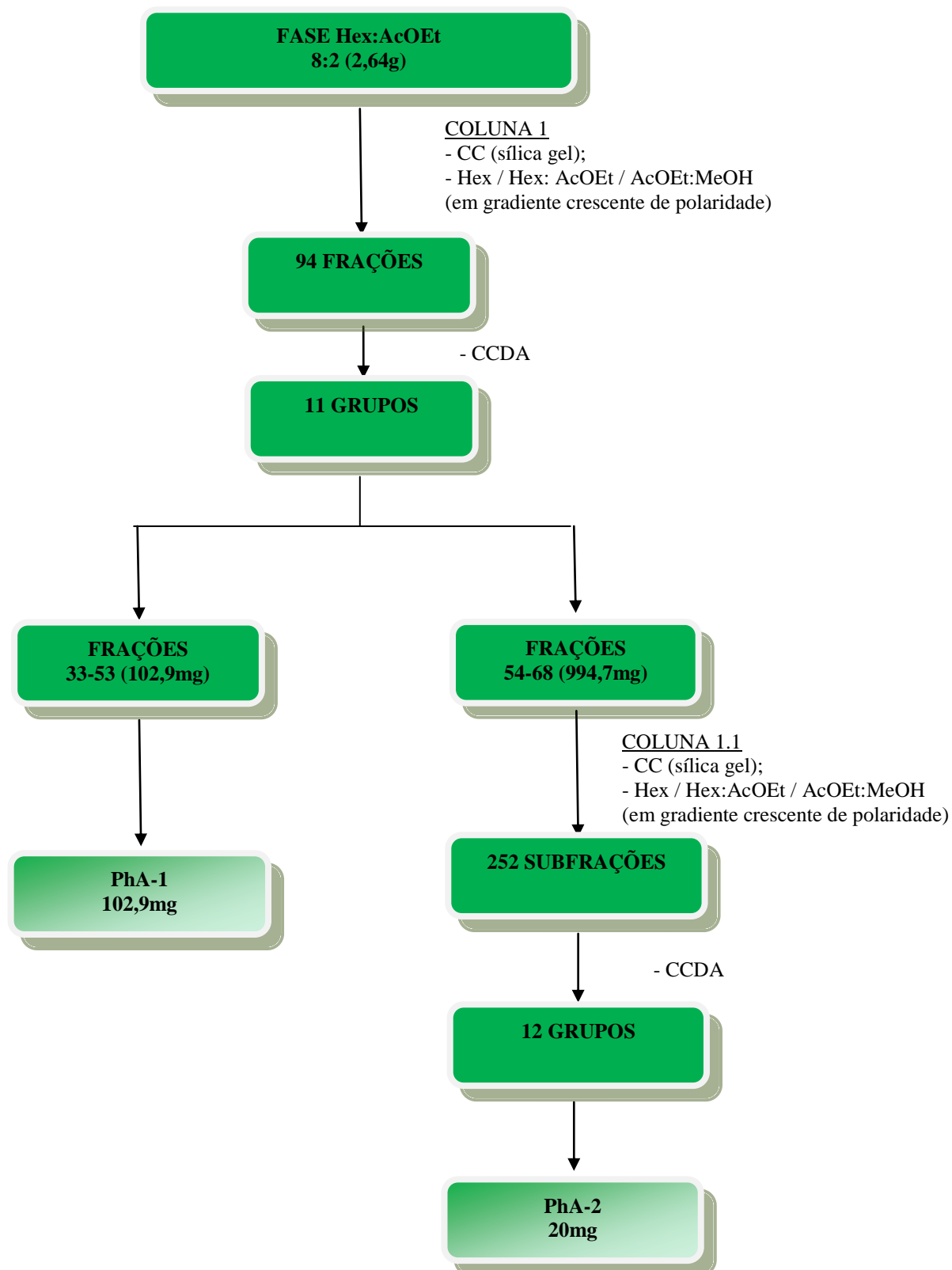
TABELA 4 - Processamento cromatográfico das frações 54-68 da Coluna 1– Coluna 1.1 em sílica gel.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hexano	1-2	1-15; 17-21; 34-46; 47-55; 57-73; 74-78; 80-86; 87-110; <b>111-133</b> ; 135-164; 166-170; 171-252;
Hex:AcOEt (9:1)	3-9	
Hex:AcOEt (88:12)	10-12	
Hex:AcOEt (86:14)	13-16	
Hex:AcOEt (85:15)	17-22	
Hex:AcOEt (83:17)	23-29	
Hex:AcOEt (8:2)	30-36	
Hex:AcOEt (78:22)	37-42	
Hex:AcOEt (75:25)	43-54	
Hex:AcOEt (7:3)	56-60	
Hex:AcOEt (68:32)	61-66	
Hex:AcOEt (65:35)	67-72	
Hex:AcOEt (62:38)	73-78	
Hex:AcOEt (6:4)	79-85	
Hex:AcOEt (58:42)	86-90	

TABELA 4 - CONTINUAÇÃO

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (57:43)	91-99	
Hex:AcOEt (55:45)	100-105	
Hex:AcOEt (53:47)	106-116	
Hex:AcOEt (5:5)	117-122	
Hex:AcOEt (48:52)	123-128	
Hex:AcOEt (46:54)	129-134	
Hex:AcOEt (44:56)	135-147	
Hex:AcOEt (42:58)	148-159	
Hex:AcOEt (4:6)	160-172	
Hex:AcOEt (39:61)	173-178	
Hex:AcOEt (38:62)	179-184	
Hex:AcOEt (35:65)	185-189	
Hex:AcOEt (3:7)	190-194	
Hex:AcOEt (25:75)	195-201	
Hex:AcOEt (2:8)	202-206	
Hex:AcOEt (1:9)	207-213	
AcOEt	214-217	
AcOEt:MeOH (98:2)	218-223	
AcOEt:MeOH (94:6)	224-229	
AcOEt:MeOH (8:2)	230-235	
AcOEt:MeOH (7:3)	236-242	
AcOEt:MeOH (5:5)	243-248	
MeOH	249-252	

ESQUEMA 2 - Fracionamento cromatográfico da fase Hex:AcOEt 8:2 do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.



Fonte: DUARTE, S.L.F., 2013.

#### 4.5. Processamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt 1:1

A fase Hex:AcOEt 1:1 (2,87 g) foi submetida à CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. Desta coluna (Coluna 2) foram coletadas 38 frações de 100 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por CCDA e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos, o que resultou em 7 grupos (TAB. 5, p.55).

As frações 10-11 apresentaram-se como um pó amorfo esbranquiçado, corresponde a **PhA-1** (76,7mg).

A fração 29 (252,8 mg) se apresentou como uma substância oleosa âmbar, em CCDA mostrou-se praticamente pura, por isso não foi incorporada a junção das frações 28-28. Foi submetida a CC em sephadex, conforme TABELA 6, para purificação. Não obtendo êxito, o mesmo ocorreu com a 28-38 (694,7 mg), conforme TAB. 7, p. 56.

TABELA 5 - Processamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt (1:1) do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl – Coluna 2 em sílica gel.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (95:5)	1-3	<b>1-5; 7-9; 10-11; 12-16; 17-24; 28-38 (exceto 29);</b>
Hex:AcOEt (9:1)	4-5	
Hex:AcOEt (7:3)	6-8	
Hex:AcOEt (65:35)	9	
Hex:AcOEt (6:4)	10-11	
Hex:AcOEt (55:45)	12-13	
Hex:AcOEt (5:5)	14-16	
Hex:AcOEt (45:55)	17	
Hex:AcOEt (4:6)	18-19	
Hex:AcOEt (3:7)	20-22	
Hex:AcOEt (2:8)	23-24	

TABELA 5 - CONTINUAÇÃO

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
Hex:AcOEt (1:9)	25-26	
AcOEt	27-28	
AcOEt:MeOH (95:5)	29-30	
AcOEt:MeOH (9:1)	31-33	
AcOEt:MeOH (8:2)	34	
AcOEt:MeOH (7:3)	35	
AcOEt:MeOH (6:4)	36	
AcOEt:MeOH (5:5)	37	
MeOH	38	

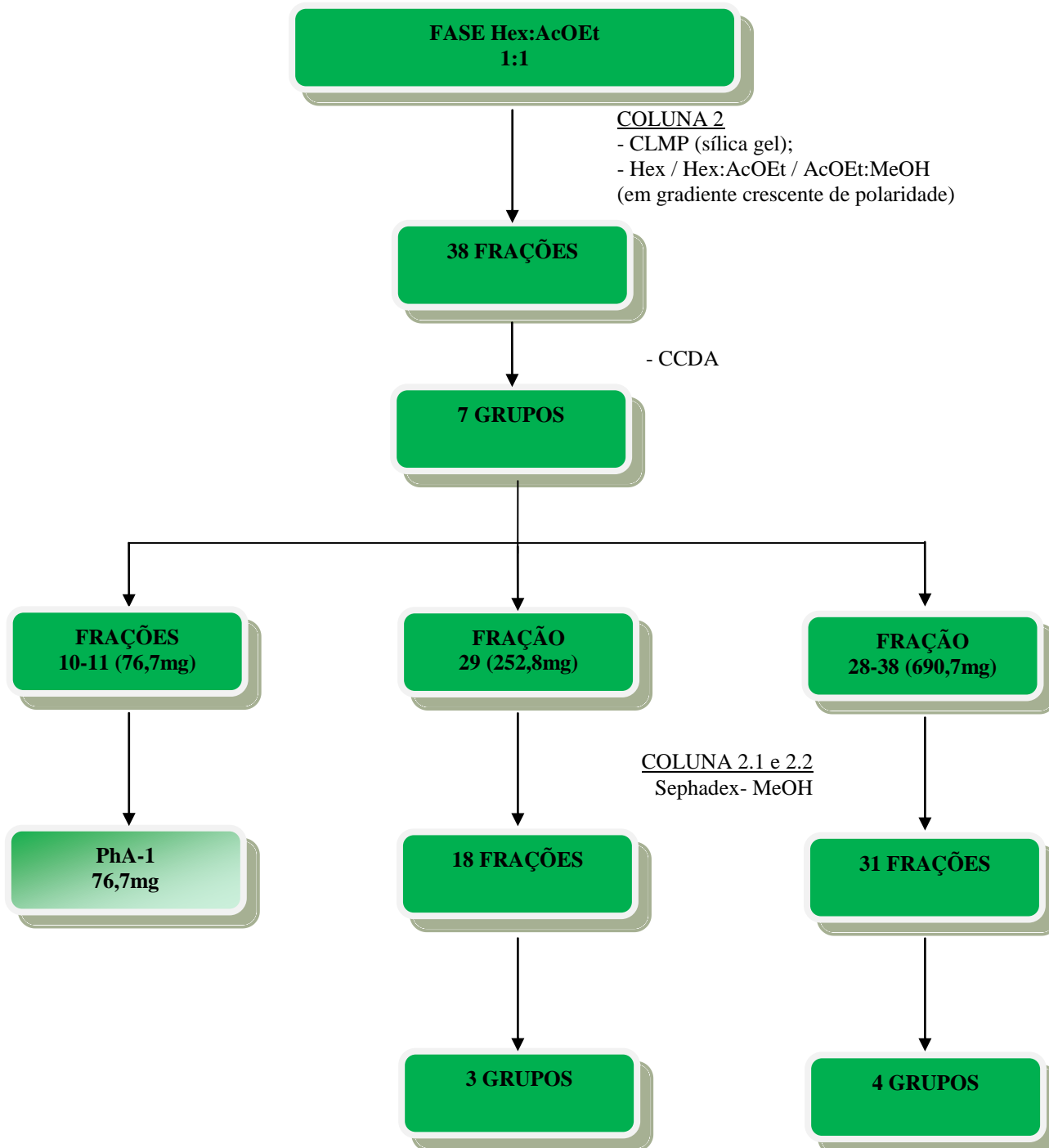
TABELA 6 - Processamento cromatográfico da fração 29 da Coluna 2– Coluna 2.1 em sephadex.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
MeOH	1-18	1-7; 8-13; 14-18;

TABELA 7 - Processamento cromatográfico das frações 28-38 da Coluna 2– Coluna 2.2 em sephadex.

Sistema de eluição	Frações coletadas	Frações reunidas
MeOH	1-31	1-12; 13-16; 17-22; 23-31;

ESQUEMA 3 - Fracionamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt 1:1 do EEB de *Phyllanthus acuminatus* Vahl.



Fonte: DUARTE, S.L.F., 2013.

## **4.6. Métodos Espectroscópicos**

### **4.6.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

Os dados espectrais na região do infravermelho (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) foram obtidos em aparelho de BOMEN FT-IR (modelo MB 100) do Centro de Biotecnologia-UFPB, utilizando-se de 1 a 3 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com número de onda medido em  $\text{cm}^{-1}$ .

### **4.6.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN, uni e bidimensionais, foram registrados em espectrômetros VARIAN SYSTEM e BRUKER AVANCE III operando a 500 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) e 125 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB e do Laboratório de Pós-graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O solvente empregado para a dissolução das amostras foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), cujos picos característicos em RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  serviram como padrão interno durante a obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: *s* (singlete), *sl* (singlete largo), *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *dd* (duplo dubleto).

### **4.6.3. Espectrometria de Massas (EM)**

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de alta e de baixa resolução da marca Bruker, modelo Microtof II e Ion Trap-Amazonx, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray, modo positivo (ESI+) ou negativo (ESI-), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB e no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) da UFRJ. As amostras foram diluídas em uma solução de  $\text{H}_2\text{O}$ : MeCN (1:1).

## 4.7. Estudo Farmacológico

Foram realizados ensaios farmacológicos com um dos compostos isolados (justicidina B) utilizando a seguinte metodologia.

### 4.7.1. Citotoxicidade frente eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de um camundongo Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação.

Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente resuspensores em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise.

A justicidina B foi solubilizada em DMSO (5%) e preparada em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles, positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente.

A placa de 96 poços foi mantida sob suave agitação por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH<sub>50</sub> da justicidina B (concentração do que produz 50% de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%Hemólise = \frac{A_{Tx} - A_{justicidina\ B \cdot X\ 100}}{A_{Tx}}$$

Onde:

$A_{Tx}$  = Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X.

$A_{justicidina\ B}$  = Absorbância do poço contendo a concentração da justicidina B.

#### **4.7.2. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas.**

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* da justicidina B pelo método da sulforrodamina B, foram utilizadas as linhagens de células: U251 (glioma, SNC); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorretal); K562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano imortalizado, linhagem não tumoral), as quais foram semeadas, em meio RPMI-1640 suplementado (25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal - SBF). As células foram incubadas com diferentes concentrações do justicidina B: 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL, em quadruplicata (em 0,5% de DMSO). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 48 h de incubação, o experimento foi interrompido pela fixação das células via adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. As placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio de cultura e SBF, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. As células foram então coradas com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas por três vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em leitor de microplacas a 540 nm (SKEHAN, STORENG e SCUDIERO, 1990).

Foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste. Os valores abaixo de 50% de crescimento celular e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática). Os valores negativos, abaixo de zero, representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células aferida pela absorbância no final do experimento, nesse caso, é menor da que iniciou o experimento.

Os resultados para a doxorrubicina e justicidina B. foram ainda expressos como GI<sub>50</sub> (Concentração que inibe o crescimento de 50% das células).

#### **4.7.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da justicidina B e dos antibióticos, foram determinadas em duplicata, por meio da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de c.a. 10<sup>5</sup> ufc/mL em solução salina a 0,9% de NaCl e com concentrações variando de 512µg/mL a 8 µg/mL em diluições seriadas em caldo nutritivo (BHI – *Brain and Heart Infusion*) (SMITH et al., 2005). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano após 24h, visualizada com o uso da solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich), um indicador de crescimento bacteriano.

#### **4.7.4. Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas**

Para avaliar a atividade da justicidina B como inibidor putativo de bomba de efluxo, foi determinada a CIM de antibióticos, na presença e na ausência da justicidina B, em cepas de *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo específicas (GIBBONS et al., 2003). A concentração da substância teste foi a correspondente a ¼ de sua CIM, considerada uma concentração subinibitória, de modo a não interferir diretamente na atividade antibacteriana (STAVRI et al., 2007). A clorpromazina, um inibidor de bomba de efluxo, foi usada como controle positivo para as cepas IS-58 (TetK) e SA-1199B (NorA), ambas da subfamília MFS. Após 24h de incubação a 37°C, foi realizada a visualização da presença/ausência de crescimento bacteriano, com o uso da solução (0,01%) de resazurina (Sigma-Aldrich).

# *Resultados e Discussão*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação estrutural de PhA-1

A substância codificada como PhA-1 foi isolada na forma de um pó amorfo esbranquiçado com rendimento de 3,36 %. O espectro de massas obtido em baixa resolução LR-ESI-MS (FIG.7, p. 66) mostrou um pico em 365 [M+H]<sup>+</sup> compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT-Q (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e suas expansões (FIG. 8-10, p. 67-69), foi possível observar a presença de vinte e um sinais. Destes, 11 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, seis a carbonos metínicos, dois a carbonos oximetilênicos e dois a carbonos metoxílicos. O gênero *Phyllanthus* é rico em lignanas, baseado nessa premissa e nos deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados entre  $\delta_C$  128,35 e 151,73, além dos sinais em  $\delta_C$  68,03 e 169,99 e comparação com dados da literatura (SILVA, et al., 2007) foi possível propor um esqueleto carbônico para PhA-1 de uma lignana do tipo arilnaftaleno lactona sendo esses dois últimos sinais atribuídos aos carbonos C-9 e C-9', respectivamente. Os sinais em  $\delta_C$  55,79, 56,04 e 101,21 foram atribuídos a duas metoxilas e um metilenodioxí, respectivamente. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e suas expansões (11-13, p. 70-72) observou-se três singletos com integral para 1H cada em  $\delta_H$  7,08, 7,16 e 7,68 e sinais correspondentes a um sistema ABX em  $\delta_H$  6,93 (d,  $J = 1,5$ ), 6,95 (d,  $J = 8,0$ ) e 6,81 (dd,  $J = 8,0$  e 1,5). Esses sinais comparados com a literatura (SILVA, et al., 2007) foram compatíveis com esqueleto de lignanas arilnaftaleno lactona e foram atribuídos a H-3, H-6, H-7, H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Esse padrão de hidrogenação inferiu ainda substituição nos carbonos C-4, C-5, C-3' e C-4'. Os sinais em  $\delta_H$  6,07 (d,  $J = 1,5$ ) e 6,02 (d,  $J = 1,0$ ) foram compatíveis com substituinte metilenodioxí e os sinais em  $\delta_H$  3,79 e 4,02 foram atribuídos a duas metoxilas. Um singlete largo com integral para dois hidrogênios em  $\delta_H$  5,35 foi atribuído aos hidrogênios 2H-9 característicos das lignanas arilnaftaleno lactona.

No espectro de HSQC FIG. 14-16, p. 73-75 e suas expansões, foi possível observar as correlações do sinal em  $\delta_H$  7,08 (H-3) com o carbono em  $\delta_C$  105,76, do sinal em  $\delta_H$  7,16 com o carbono em  $\delta_C$  105,96 e do sinal em  $\delta_H$  7,68 com o carbono em  $\delta_C$  118,26. Essas correlações corroboram para os hidrogênios e carbonos H-3/C-3, H-6/C-6 e H-7/C-7 das lignanas arilnaftaleno lactona com substituintes em C-4 e C-5. Observou-se correlação do sinal em  $\delta_H$  5,35 (2H-9) com o carbono em  $\delta_C$  68,03 e dos sinais em  $\delta_H$  6,07 e 6,02 (OCH<sub>2</sub>O) com o

carbono em  $\delta_C$  101,21 e de  $\delta_H$  3,79 e 4,02 com os carbonos em 55,79 e 56,04 confirmando os substituintes metilenodioxí e duas metoxilas. As demais correlações estão compiladas na TABELA 8, p. 65. Para o completo assinalamento de hidrogênios e carbonos fez-se o experimento HMBC (FIG. 17-19, p. 76- 78). Neste foi possível observar correlações do sinal em 7,68 (H-7) com os carbonos em 68,03 e 105,96 assinalando esses carbonos como C-9 e C-6, respectivamente. O sinal em  $\delta_H$  7,16(H-6) correlacionou-se com o sinal em 150,01 e com 151,73 que foram atribuídos a C-4 e C-5, respectivamente. Correlações dos sinais em 3,79 (MeO-4) e 4,02 (MeO-5) com os carbonos em 150,01 e 151,73 confirmam a localização das metoxilas em C-4 e C-5. O substituinte metilenodioxí está localizado em C-3'-C-4' e isso é confirmado pela correlação do sinal em 6,07 com os carbonos em 147,52 e 147,49 que foram atribuídos a C-3' e C-4', respectivamente. Observou-se também a correlação do sinal em 6,93 (H-2') com o sinal em 139,48 que foi atribuído a C-7' e do sinal em 5,35 (2H-9) com o carbono em 139,59 e 118,44 que foram atribuídos a C-8 e C-8', respectivamente. As correlações dos sinais em 7,08 (H-3) e 7,68 (H-7) com o carbono em 133,12 e comparações com a literatura permitiram atribuir esse carbono para C-1 e o sinal em 128,79 para C-2. As demais correlações estão compiladas na TABELA 8, p. 65. Através do experimento NOESY-1D, (FIG.20-22 ,p. 79-81) foi possível observar um ganho de NOE do sinal em 7,16 (H-6) quando a metoxila em 4,02 foi irradiada, confirmando assim esse deslocamento químico para OMe-5. Esse mesmo efeito foi observado quando da irradiação da metoxila em 3,79 o ganho de NOE foi observado no sinal em 7,08 (H-3). Assim o sinal em 3,79 foi confirmado para OMe-4. Uma vez estabelecido H-3 em 7,08 foi possível observar no HMQC uma correlação desse sinal com 105,76 atribuído a C-3. Através dessas informações foi possível inverter os sinais de C-3 e C-5' publicados por Silva et al.,(2007).

Assim, **PhA-1** trata-se de uma lignana arilnaftaleno lactona denominada justicidina B com atividade farmacológica como antifúngica, antitumoral, antireumática, antimalárica, antiprotozoária contra formas tripomastigota de *T. brucei*, atividade moderada contra *T. cruzi* e antiviral descritas na literatura (GERTSCH et al., 2003; PETTIT, et al, 1988; FONSECA, 2009).

TABELA 8 - Dados de RMN 1D e 2D de PhA-1 em 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, comparados com justicidina B (SILVA et al., 2007).

C	HSQC		HMBC		justicidina B	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	133,12	-	H-7	H-3	133,1	-
2	128,79	-	H-3	H-6; H-7	128,8	-
4	150,01	-	H-3	H-6; MeO-4	151,2	-
5	151,73	-	H-6	H-3; MeO-5	150,0	-
8	139,59	-	H-7; 2H-9		139,8	-
1'	128,35	-	H-2'	H-5'	128,3	-
3'	147,52	-	H-2'	H-5'; OCH <sub>2</sub> O	148,0	-
4'	147,49	-	H-5'	H-2'; H-6'; OCH <sub>2</sub> O	147,8	-
7'	139,48	-		H-3; H-2'; H-6'	139,8	-
8'	118,44	-		H-7; 2H-9	118,4	-
9'	169,99	-		2H-9	169,9	-
<b>CH</b>						-
3	105,76	7,08 (s)			108,1	7,08
6	105,96	7,16 (s)		H-7	106,0	7,12
7	118,26	7,68 (s)		H-6; 2H-9	118,2	7,61
2'	110,52	6,93 (d, $J = 1,5$ )		H-6'	110,5	6,78
5'	108,17	6,95 (d, $J = 8,0$ )	H-6'		105,8	6,98
6'	123,42	6,81 (dd, $J = 8,0$ e $1,5$ )	H-5'	H-2'	123,4	6,77
<b>CH<sub>2</sub></b>						
OCH <sub>2</sub> O	101,21	6,07 (d, $J = 1,5$ ) 6,02 (d, $J = 1,0$ )			101,2	6,08
9	68,03	5,35 (s)		H-7	67,9	5,33
<b>CH<sub>3</sub></b>						
MeO-4	55,79	3,79 (s)			56,0	3,20
MeO-5	56,04	4,02 (s)			55,8	3,95

Fonte: DUARTE, S. L. F., 2013.

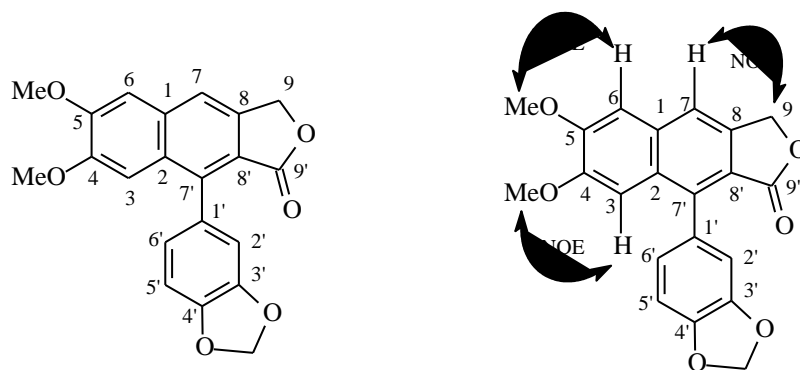


FIGURA 7 - Espectro de massas de Pha-1 obtido em baixa resolução LR-ESI-MS.

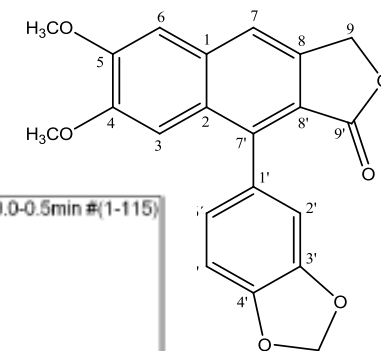
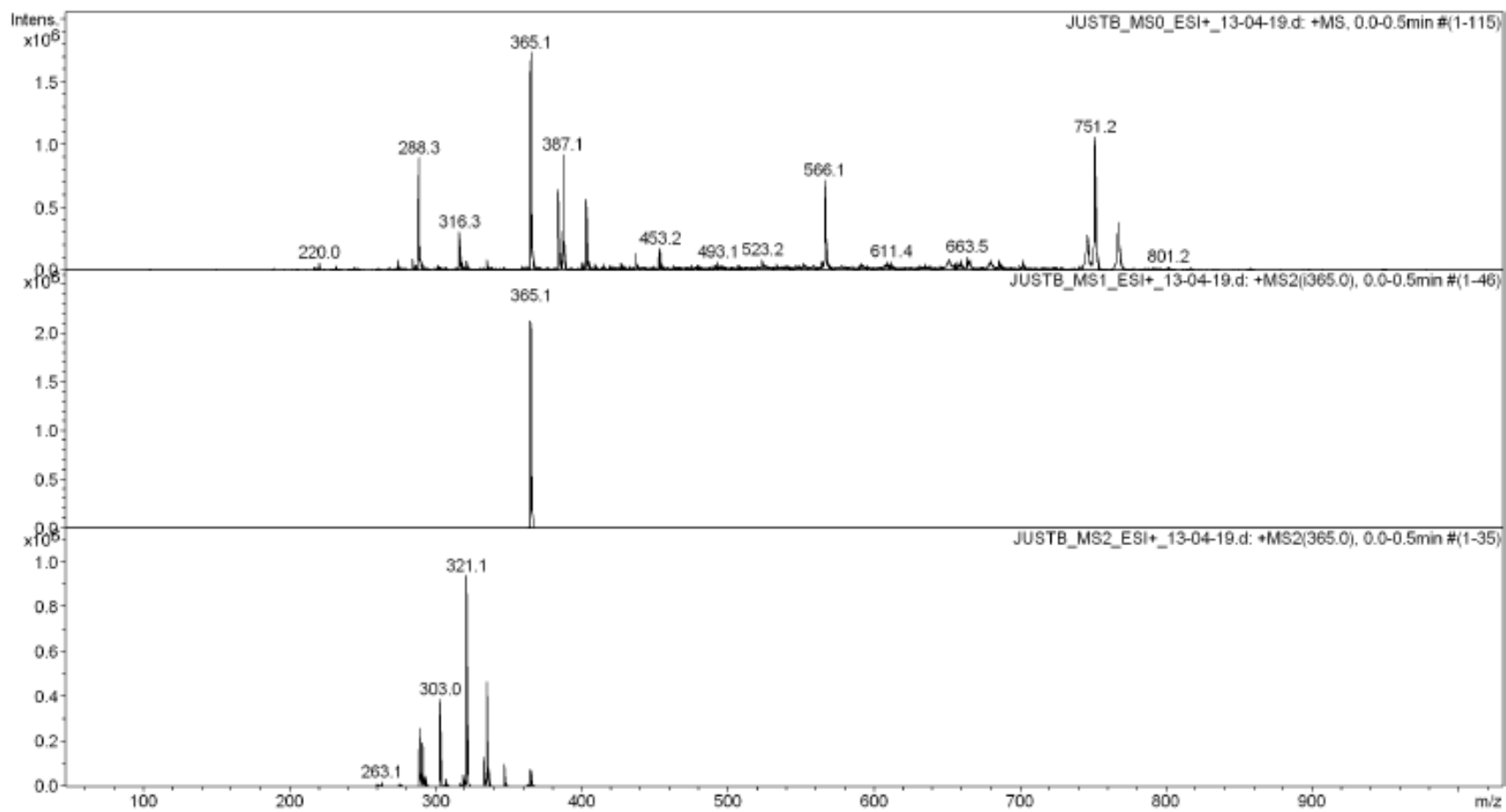


FIGURA 8 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q (125 MHz) de PhA-1 em  $\text{CDCl}_3$ .

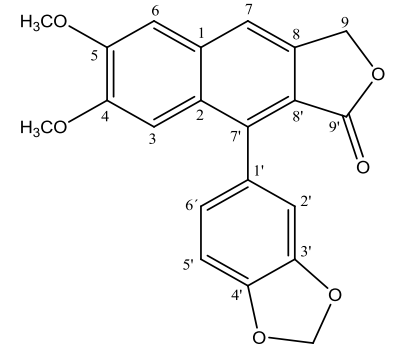
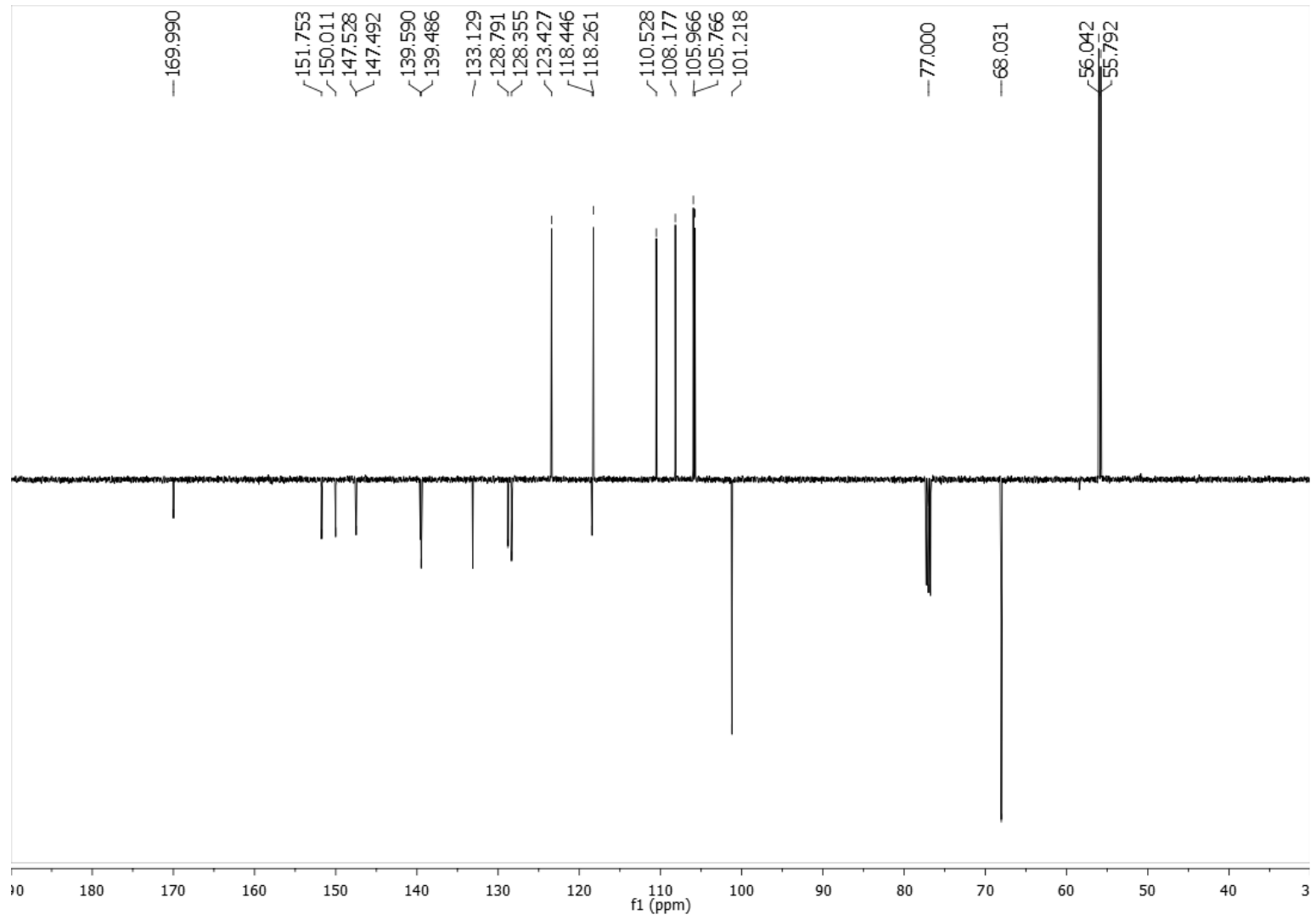


FIGURA 9 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q de PhA-1 na região de 131-103 ppm (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

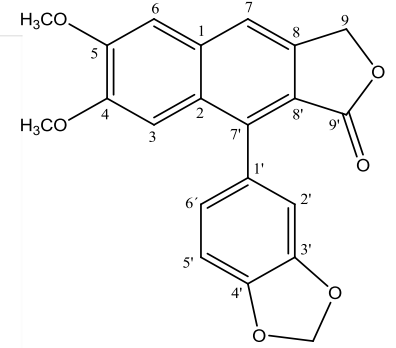
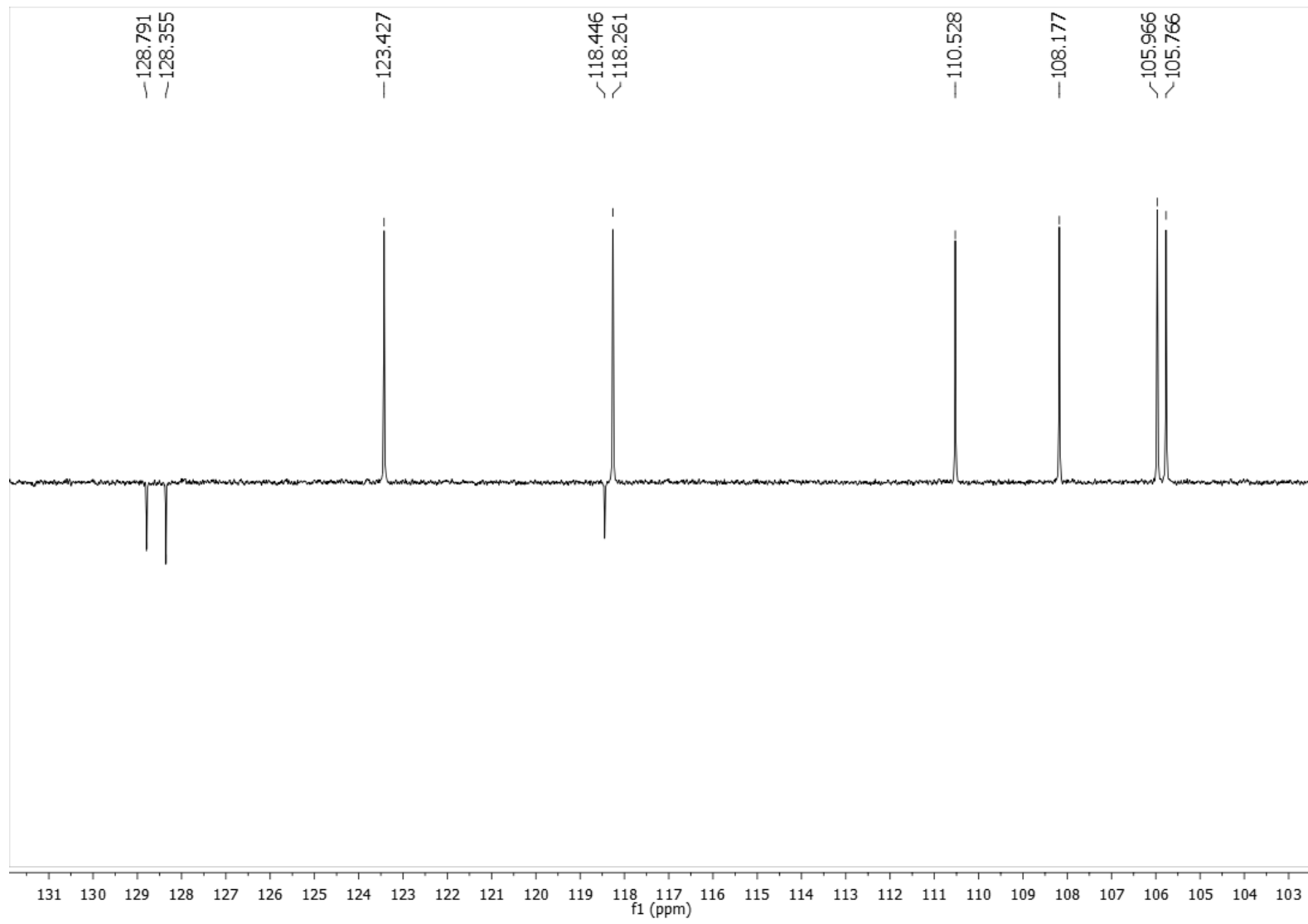


FIGURA 10 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT-Q de PhA-1 na região de 70-50 ppm (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

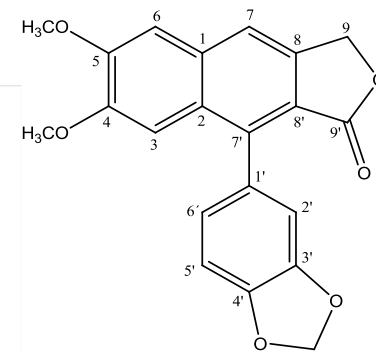
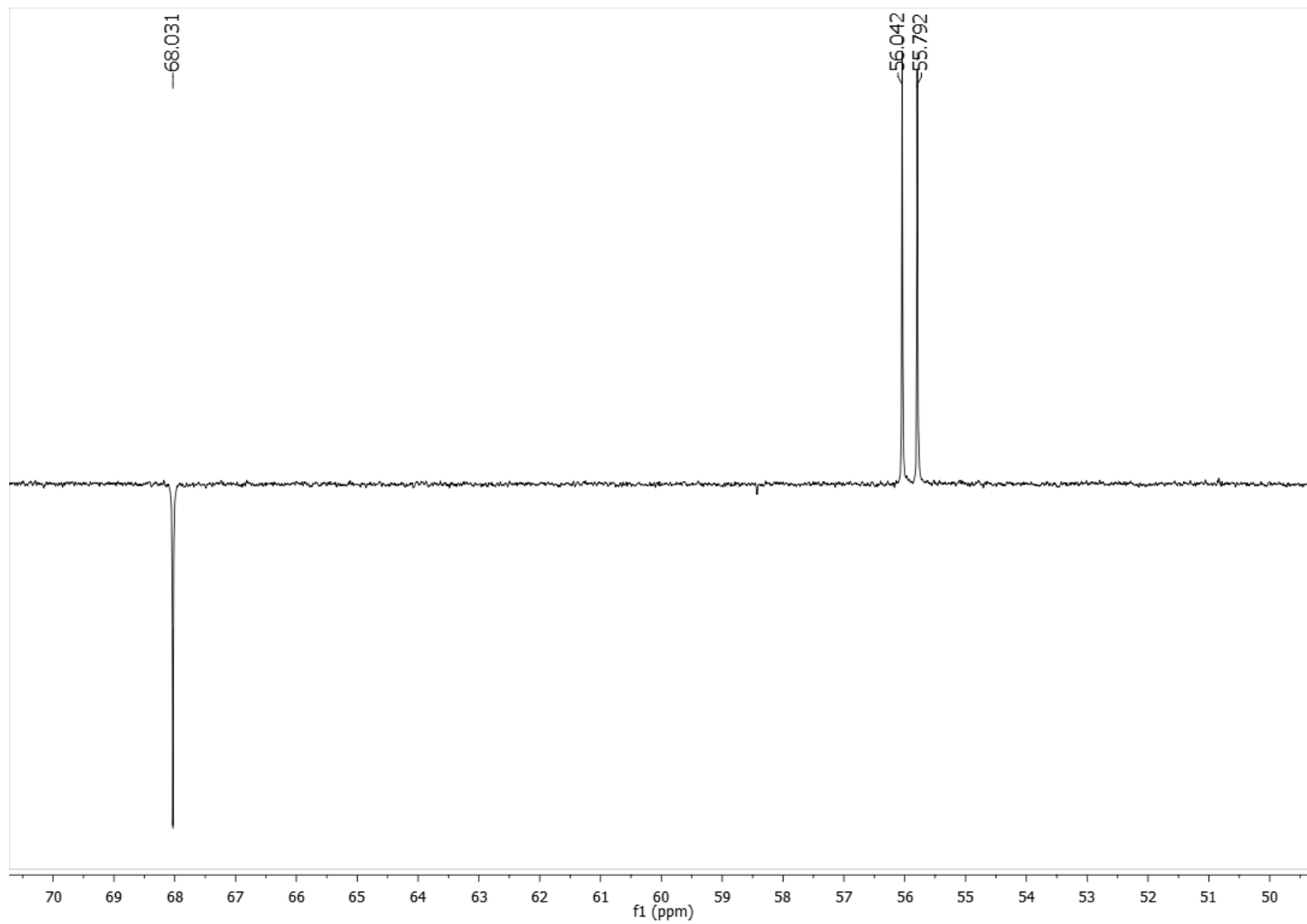


FIGURA 11- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1.

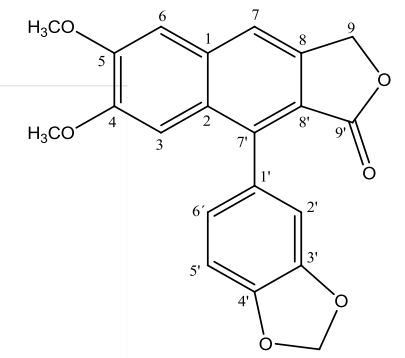
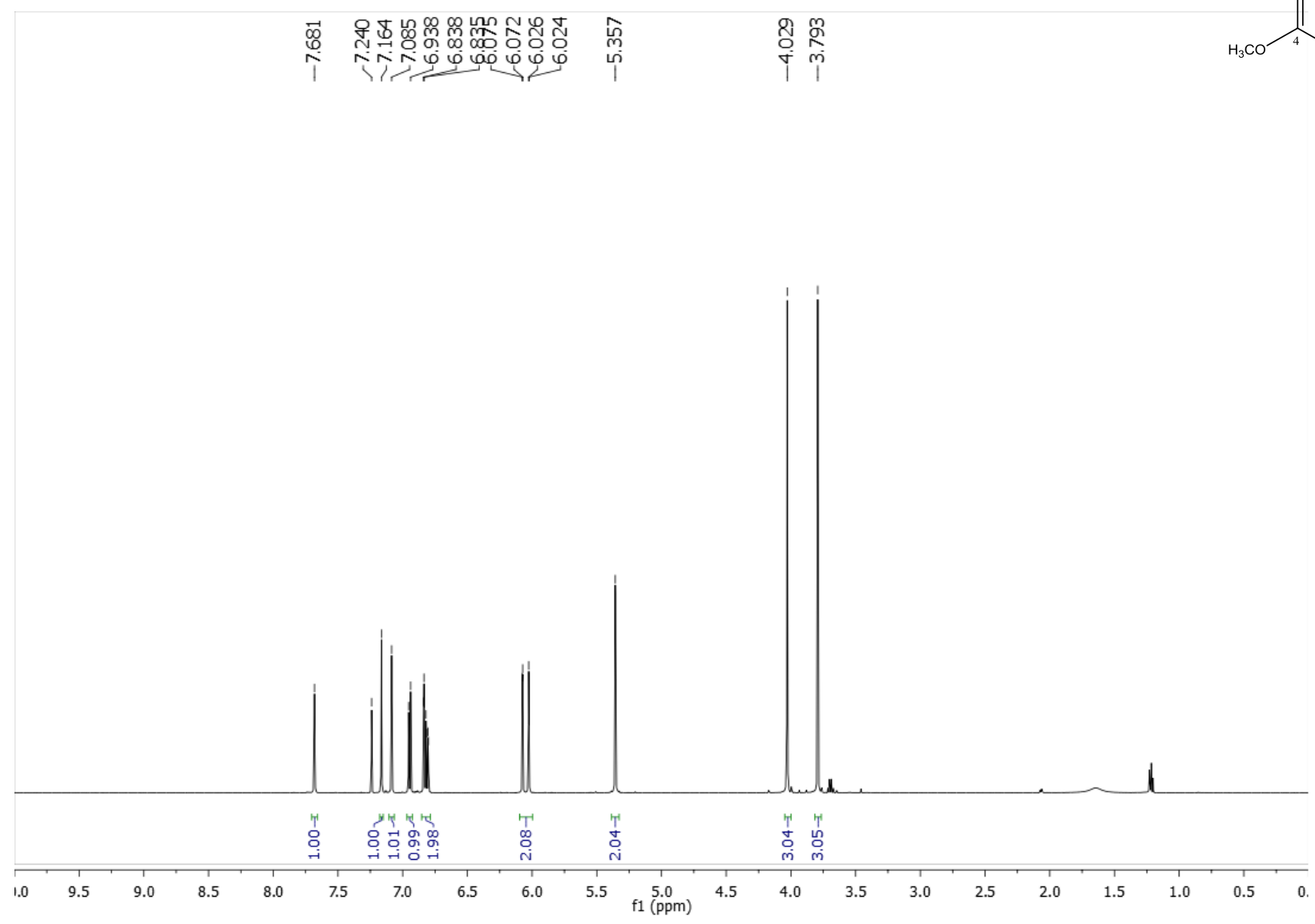


FIGURA 12 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de 7,75-6,80 ppm.

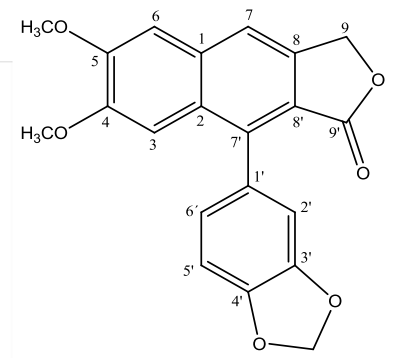
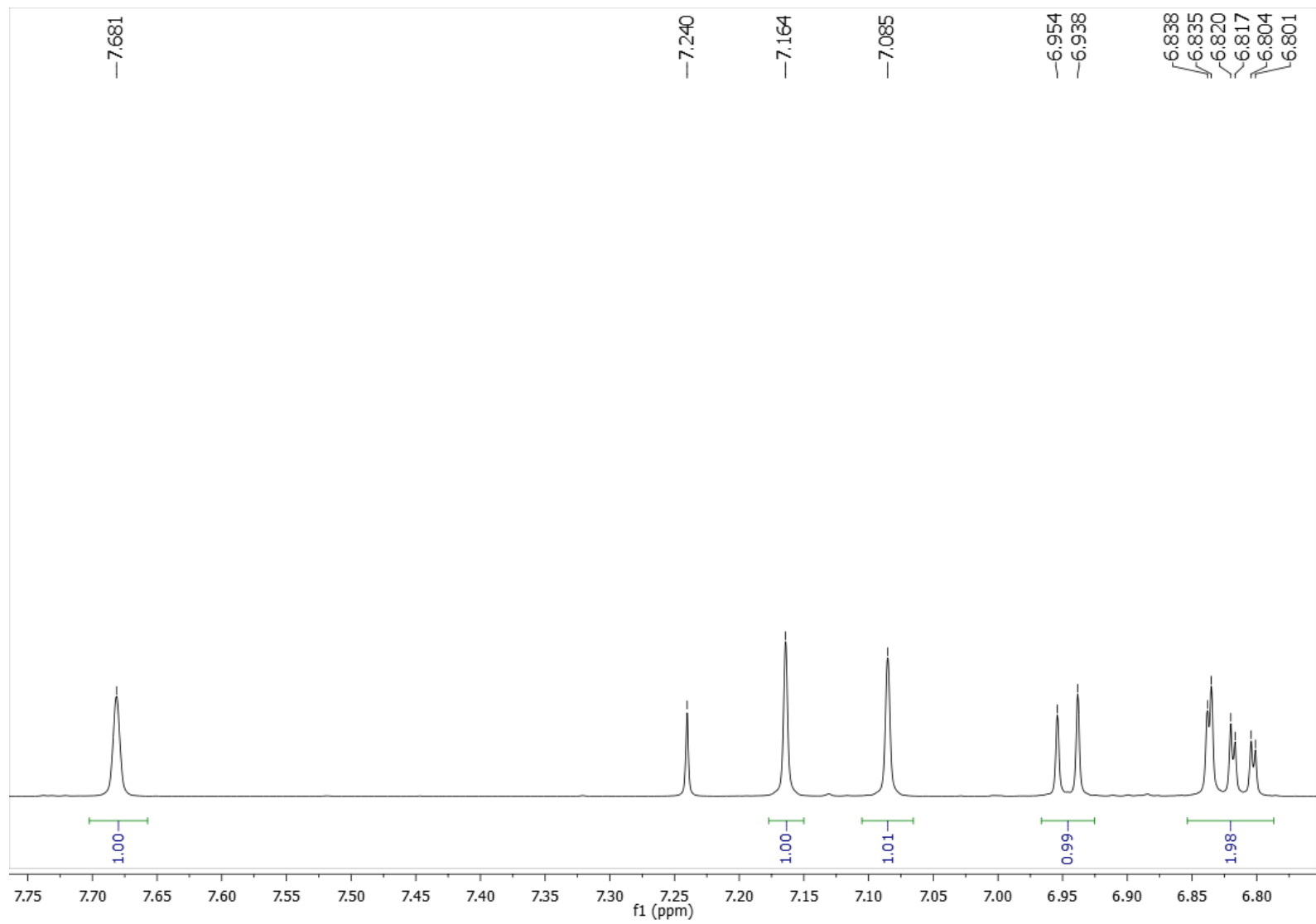


FIGURA 13 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de 6,31-3,7 ppm.

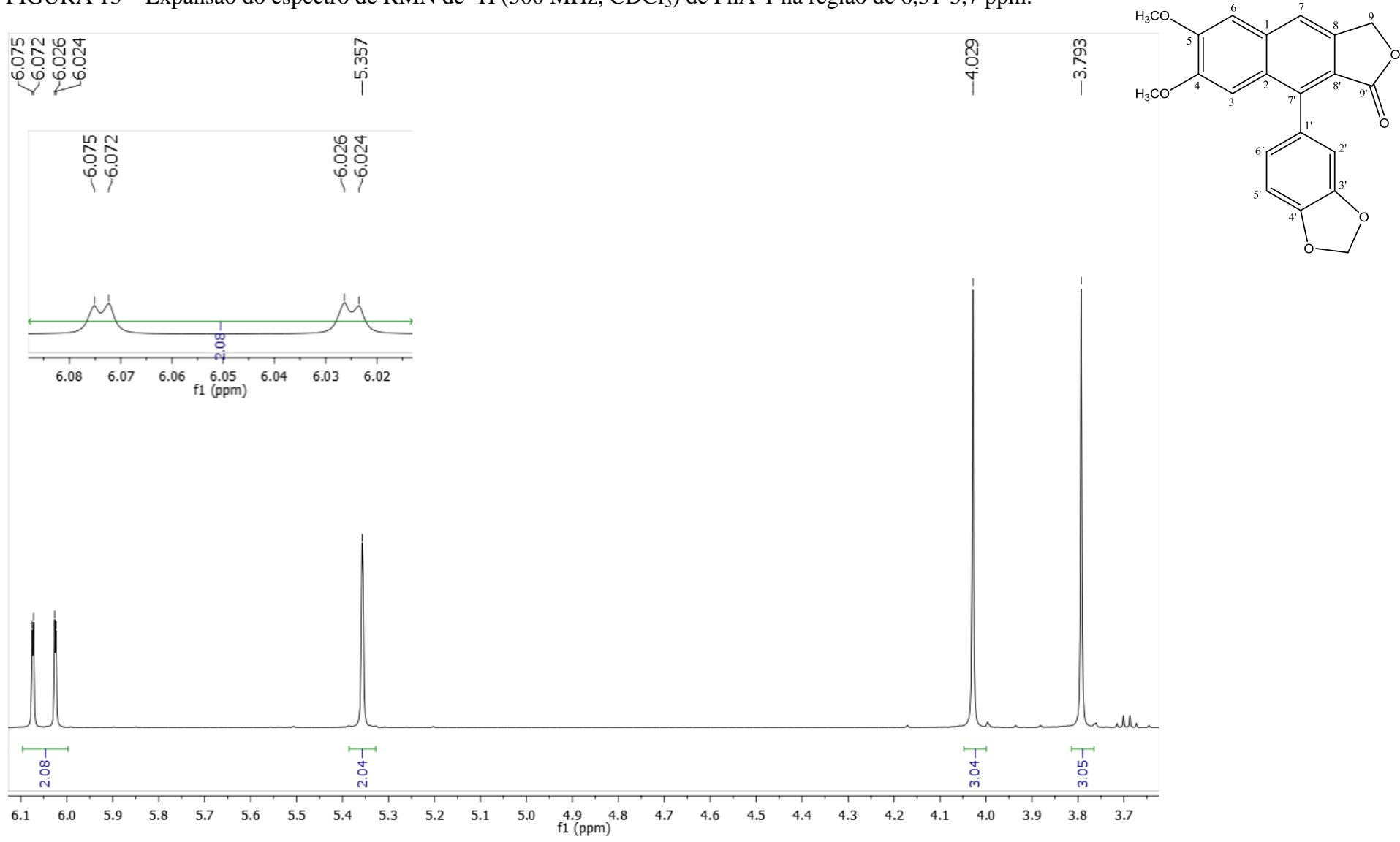


FIGURA 14 - Espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

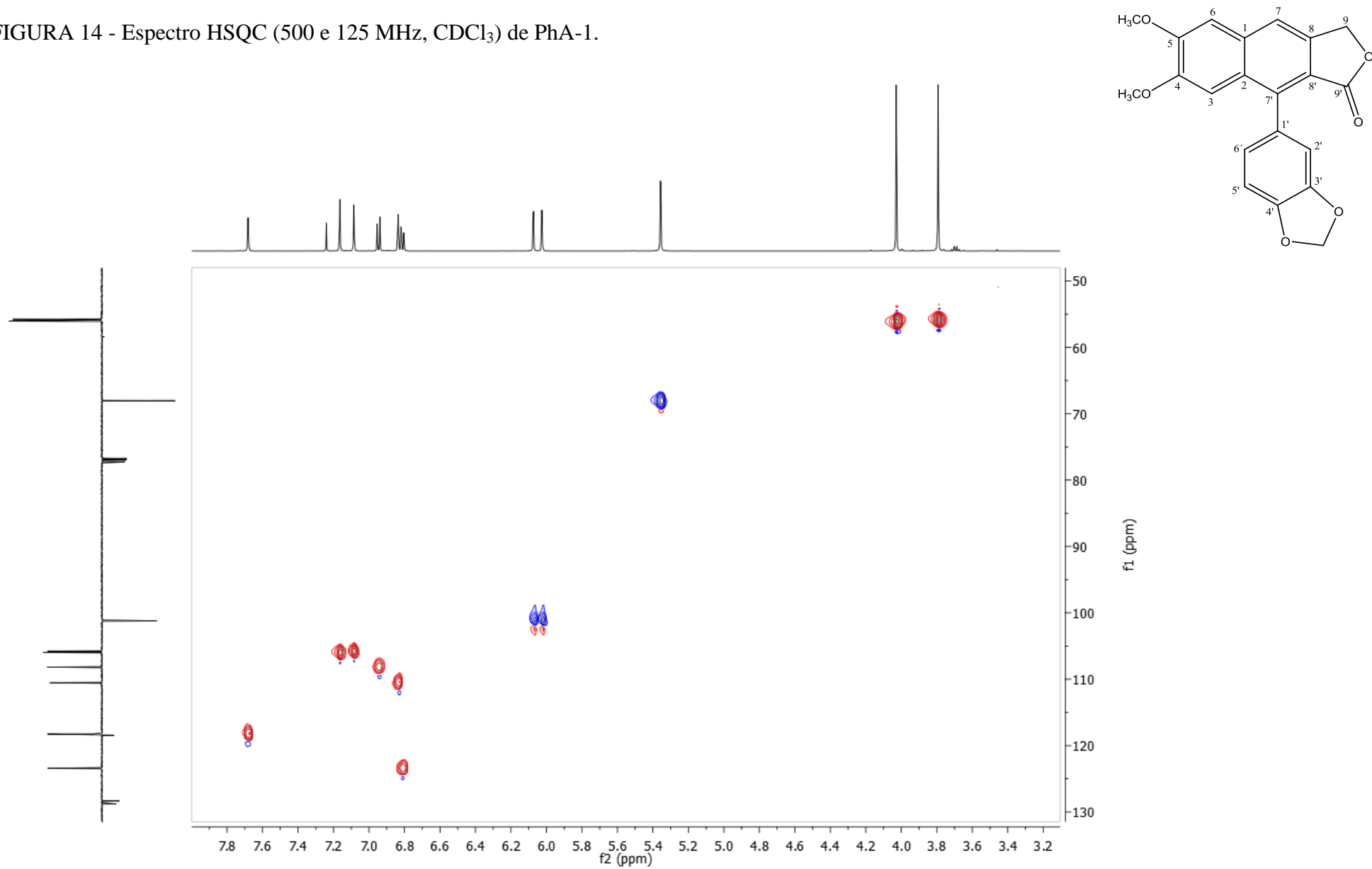


FIGURA 15 - Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-1 na região de (6,3-3,7 ppm) x (30-120 ppm).

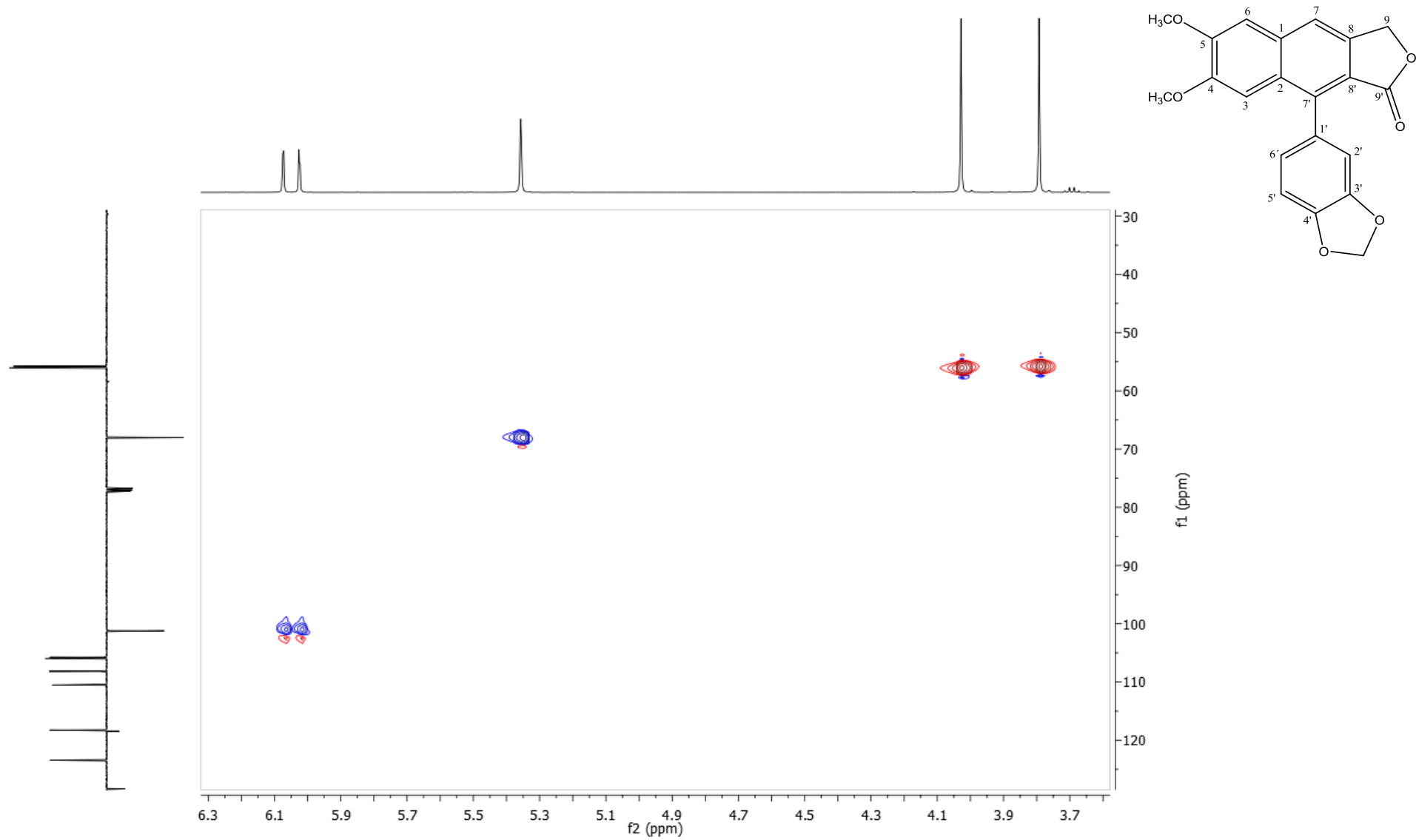


FIGURA 16 - Expansão do espectro HSQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1 na região de (7,8-6,3 ppm) x 100-130 ppm).

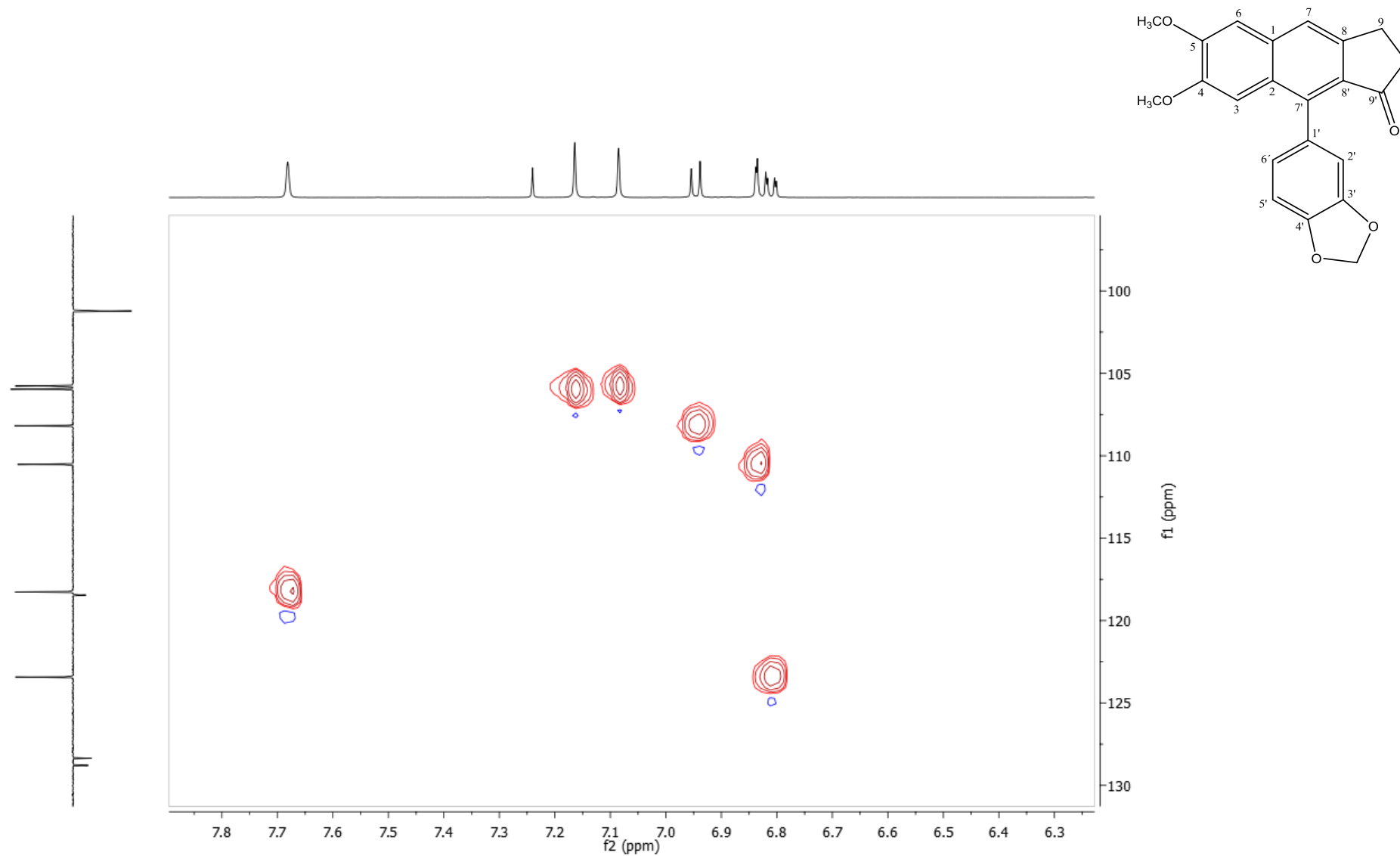


FIGURA 17 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

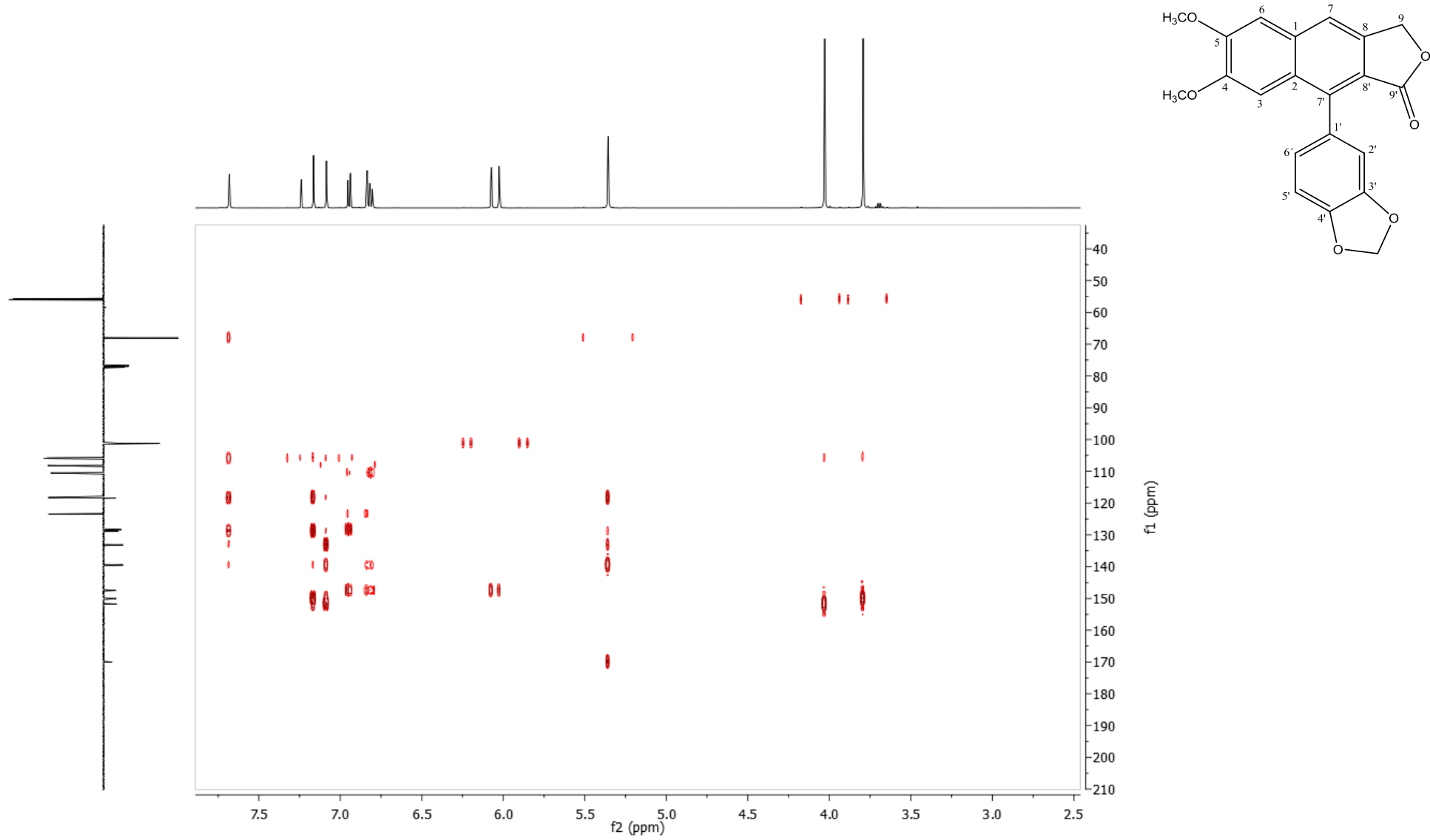


FIGURA 18 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1 na região de (7,35-6,6 ppm) x (100-155 ppm).

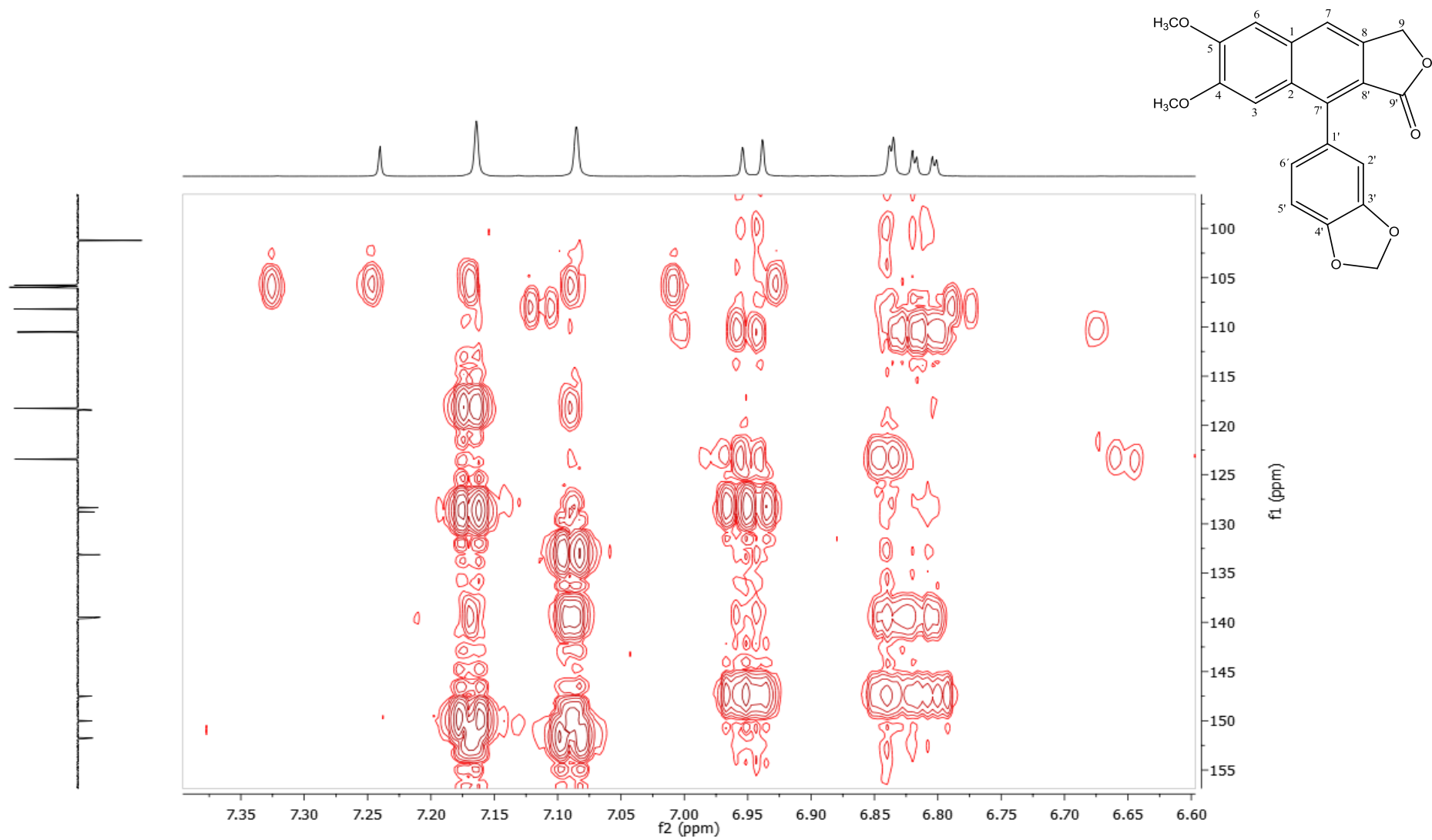


FIGURA 19 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1 na região de (7,75-7,1 ppm) x (65-160 ppm).

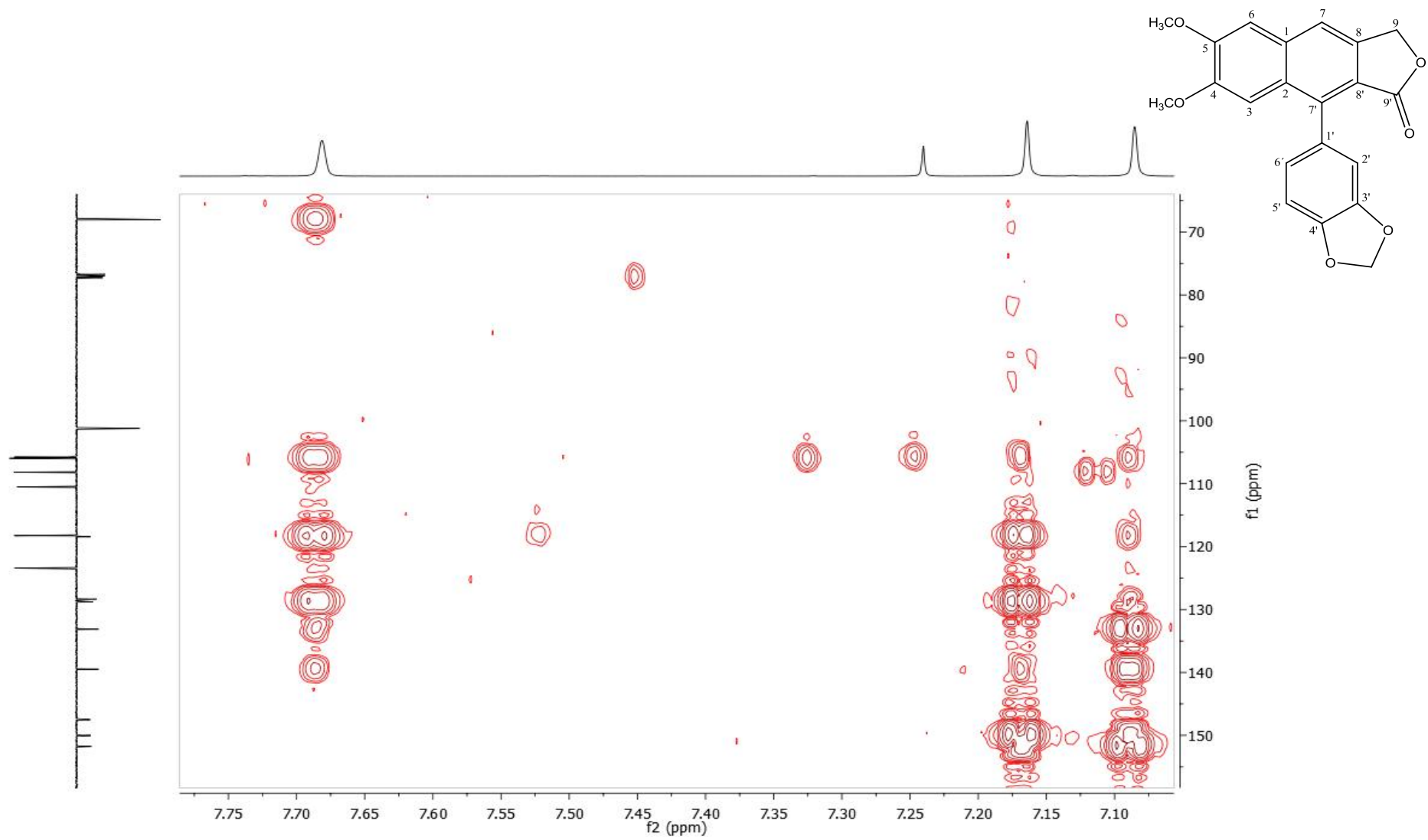


FIGURA 20 – Espectro NOESY 1D (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.

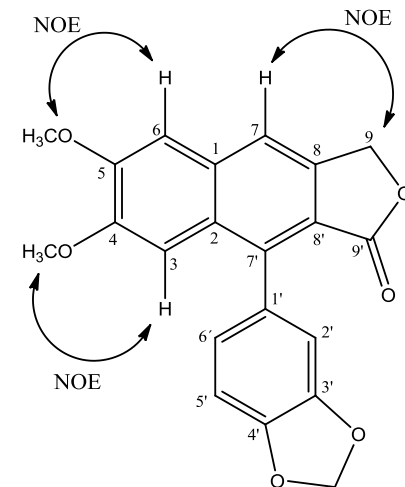
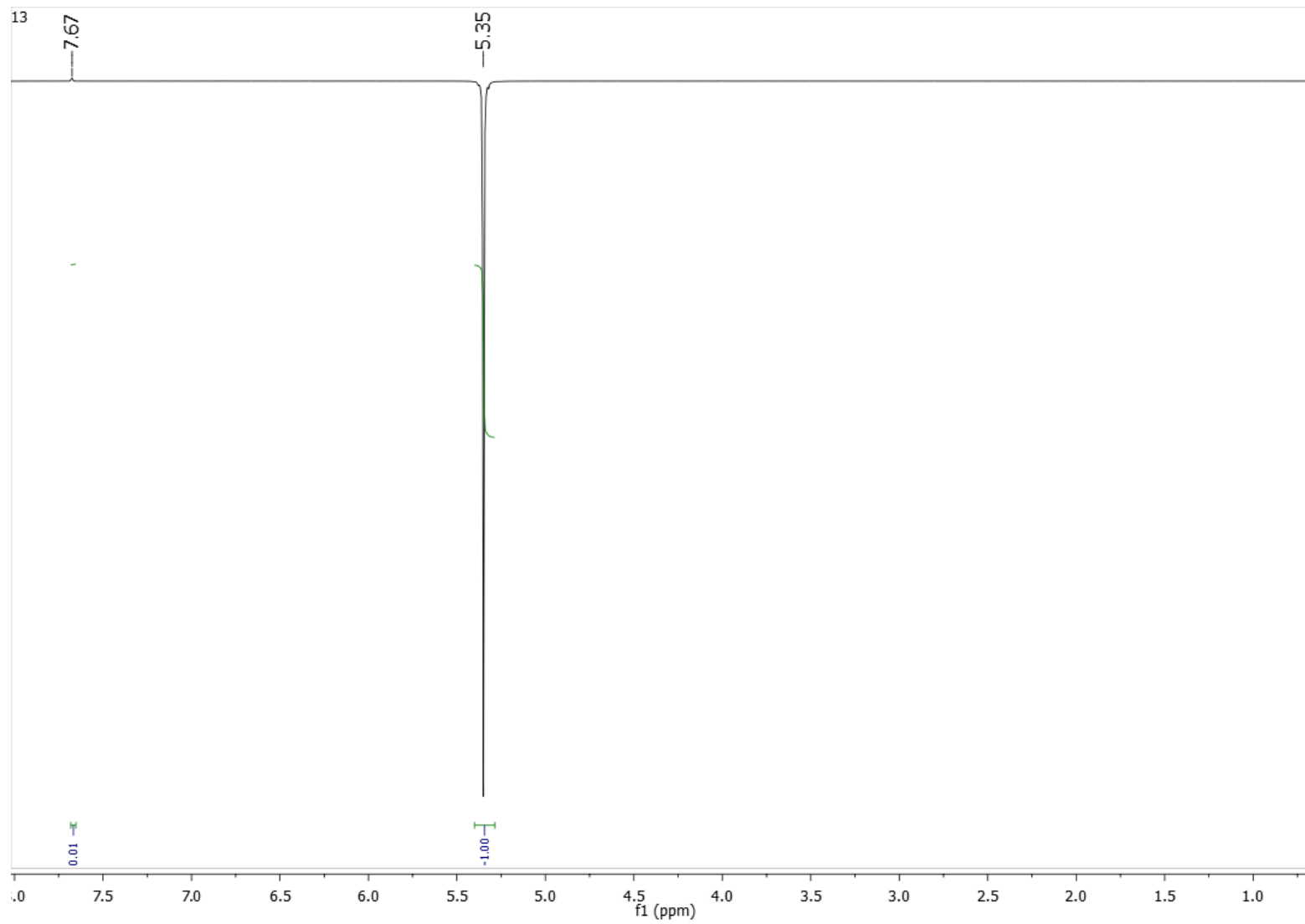
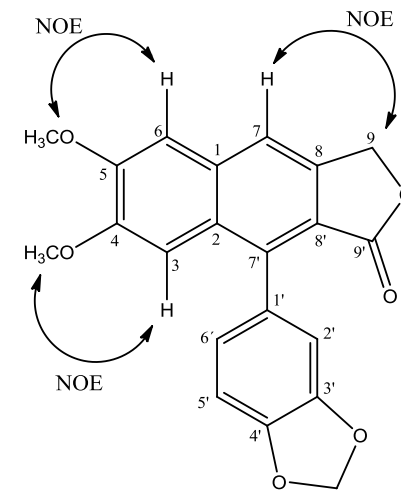
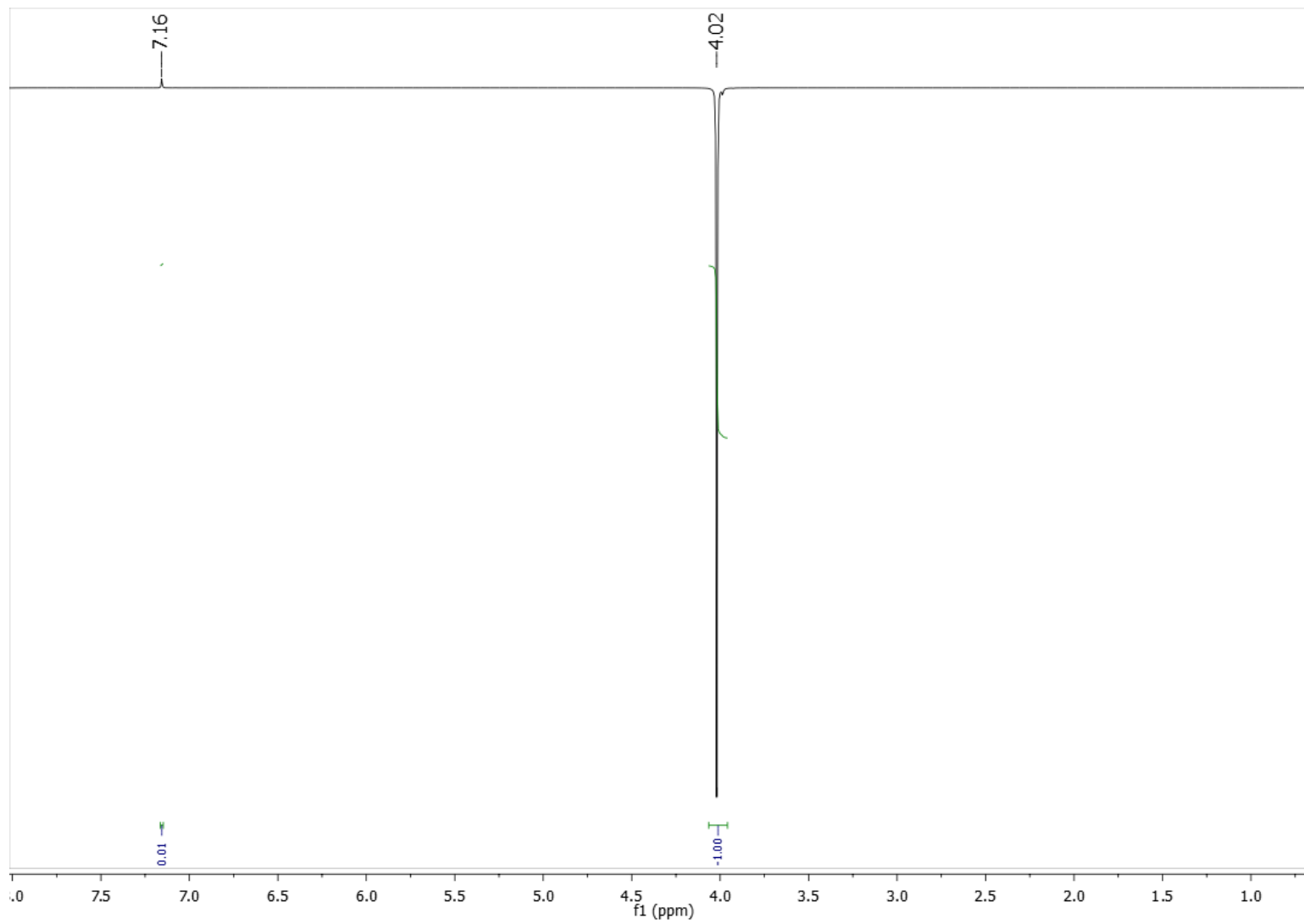


FIGURA 21 – Espectro NOESY 1D (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-1.





## 5.2. Identificação estrutural de PhA-2

A substância codificada como **PhA-2** foi isolada na forma de óleo âmbar com rendimento de 0,04%. O espectro de massas obtido em alta resolução HR-ESI-MS (FIG. 23, p. 85) mostrou um pico em 447,1065  $[M+Na]^+$  compatível com a fórmula molecular  $C_{23}H_{20}NaO_8$ . No espectro de RMN de  $^{13}C$  APT (125 MHz,  $CDCl_3$ ) e suas expansões (FIGS. 24-26, p. 86-88), foi possível observar a presença de vinte e três sinais. Destes, 12 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, seis a carbonos metínicos, dois a carbonos oximetilênicos, dois a carbonos metoxílicos e um a carbono metílico. Os deslocamentos químicos de carbonos de PhA-2 foram semelhantes a PhA-1 e com base nas absorções de carbonos não hidrogenados entre  $\delta_C$  127,74 e 150,48 inferiu-se que PhA-2 também possui esqueleto carbônico de lignana arilnaftaleno. Diferentemente de PhA-1 o sinal correspondente ao C-9 em  $\delta_C$  68,03, característico de lignanas arilnaftaleno lactona, sofreu uma proteção e absorveu em  $\delta_C$  65,01, sugerindo a abertura do anel lactônico. Ainda nesse espectro, foram observados os sinais em 171,03 e 20,76 que, quando associado com o deslocamento químico do C-9 em 65,01, inferiu a inserção de um grupo acetoxi nessa posição (PETTIT, 1988). Detectou-se ainda um deslocamento químico em 172,38 que associado com a informação do espectro de infravermelho (FIG. 27, p. 89) onde se observou uma banda larga em 3100-3500 e uma banda forte em 1680 características de ácido carboxílico, sugeriu-se uma oxidação em C-9'. Os demais deslocamentos químicos de carbonos foram semelhantes à filantostatina A e estão compilados na TABELA 9. No espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ) e suas expansões (FIG.28-32, p. 90-94) observaram-se três singletos com integral para 1H cada em  $\delta_H$  6,86, 7,11 e 7,68 e sinais correspondentes a um sistema ABX em  $\delta_H$  6,84 (sl), 6,85 (d,  $J = 8,0$ ) e 6,79 (dd,  $J = 8,0$  e 2,0). Esses sinais comparados com a literatura (SILVA, et al., 2007) foram compatíveis com esqueleto de lignanas arilnaftaleno e foram atribuídos a H-3, H-6, H-7, H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Esse padrão de hidrogenação inferiu ainda substituição nos carbonos C-4, C-5, C-3' e C-4'. Os sinais em  $\delta_H$  5,99 (d,  $J = 1,0$ ) e 5,95 (d,  $J = 1,0$ ) foram compatíveis com substituinte metilenodioxi e os sinais em  $\delta_H$  3,73 e 3,96 foram atribuídos a duas metoxilas. Dois dubletos em 5,32 (d,  $J = 12,5$ ) e 5,31 (d,  $J = 12,5$ ) atribuído aos hidrogênios 2H-9 característicos das lignanas arilnaftaleno. Ainda nesse espectro observou-se um singlete em 2,03, característico de metila de grupo acetato. No espectro de HMQC FIG.33-35, p. 95-97 e suas expansões foi possível observar as correlações do sinal em  $\delta_H$  6,86 (H-3) com o carbono em  $\delta_C$  105,48, do sinal em  $\delta_H$  7,11 (H-6) com o carbono em  $\delta_C$  106,33 e

do sinal em  $\delta_H$  7,68 (H-7) com o carbono em  $\delta_C$  126,72. Essas correlações corroboram para os hidrogênios e carbonos H-3/C-3, H-6/C-6 e H-7/C-7 das lignanas arilnaftaleno com substituintes em C-4 e C-5. O Sinal em 126,72 para C-7 corrobora com a abertura do anel lactônico e oxidação em C-9'(172,40) (PETTIT, 1988). Observou-se correlação do sinal em  $\delta_H$  5,32/5,31 (2H-9) com o carbono em  $\delta_C$  65,01 e dos sinais em  $\delta_H$  6,95 e 6,99 (OCH<sub>2</sub>O) com o carbono em  $\delta_C$  101,07 e de  $\delta_H$  3,73 e 3,96 com os carbonos em 55,66 e 55,86 confirmando os substituintes metilenodioxí e duas metoxilas. As demais correlações estão compiladas na TABELA 9 p.84. Para o completo assinalamento de hidrogênios e carbonos fez-se o experimento HMBC (FIG. 36-39, p. 98-101). Neste foi possível observar correlações do sinal em 7,68 (H-7) com os carbonos em 65,01 e 106,33 assinalando esses carbonos como C-9 e C-6, respectivamente. O sinal em  $\delta_H$  7,11 (H-6) correlacionou-se com o sinal em 150,18 e com 150,48 que foram atribuídos a C-4 e C-5, respectivamente. Correlações dos sinais em 3,73 (MeO-4) e 3,96 (MeO-5) com os carbonos em 150,18 e 150,48 confirmam a localização das metoxilas em C-4 e C-5. Assim o substituinte metilenodioxí está localizado em C-3'-C-4' e isso é confirmado pela correlação do sinal em 5,99 e 5,95 com os carbonos em 147,36 e 147,15 que foram atribuídos a C-3' e C-4', respectivamente. Observou-se também a correlação do sinal em 5,32/5,31 (2H-9) com o sinal em 128,75 que foi atribuído a C-8' e com 171,03 que foi atribuído a carbonila da acetoxila. As demais correlações estão compiladas na TABELA 9. O Sinal em 7,11 foi atribuído a H-6 e através do espectro de NOESY, FIG. 40-41, p. 102-103, foi possível observar uma correlação do sinal em 3,96 com o H-6 (7,11), confirmando esse sinal para MeO-5 e de 6,86 (H-3) com 3,73 (MeO-4). H-6 ainda se correlacionou com o sinal em 7,68 (H-7) e esse com 5,32 (H-9). Através da análise dos dados acima foi possível concluir que PhA-2 abriu o anel lactônico, acetilou C-9 e oxidou C-9' gerando um ácido carboxílico. A abertura do anel lactônico em lignanas isoladas de *Phyllanthus* foi relatado para a filarimicina e filantostatina A (PETTIT, 1988; BACHMANN, 1993). Levantou-se a hipótese de PhA-2 ser um produto da hidrólise ácida da filantostatina A, porém segundo Pettit, et al (1988) a hidrólise ácida produz a justicidina B e a D-glicose e não o ácido como aqui relatado. Assim PhA-2 trata-se de uma lignana arilnaftaleno inédita denominada luclaricina, um novo produto natural.

Conforme relato de Pettit, 1988 diversas lignanas biossintéticas têm atividade citostática e/ou antineoplásica, como a filantostatina A e o ácido picropodofílico, levando a crer que esta nova lignana, a luclaricina, é uma substância com possível atividade citostática e/ou antineoplásica.

TABELA 9 - Dados de RMN 1D e 2D de PhA-2 em 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, comparados com filantostatina A (PETTIT, 1988).

C	HSQC		HMBC		Filantostatina A – 200MHz	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	129,51	-		H-3	129,70	-
2	127,74	-		H-6; H-7	127,70	-
4	150,18	-		H-6; MeO-4	150,35	-
5	150,48	-		H-3; MeO-5	150,63	-
8	127,90	-			127,70	-
1'	131,53	-	H-2'	H-5'	131,17	-
3'	147,36	-		H-5'	147,58	-
4'	147,15	-		H-6'	148,58	-
7'	136,90	-		H-3; H-2'	137,31	-
8'	128,75	-		2H-9; H-7	128,59	-
9'	172,38	-	-	-	167,42	-
Ac	171,03	-	Me do Ac	2H-9	172,92	-
<b>CH</b>						-
3	105,48	6,86 (s)			105,45	6,90 (s)
6	106,33	7,11 (s)		H-7	106,37	7,45 (s)
7	126,72	7,68 (s)		H-6	126,92	7,85 (s)
2'	110,47	6,83 (sl)			110,84	6,85 (d, 1,7)
5'	108,14	6,85 (d, $J = 8,0$ )			108,31	6,90 (d, 7,9)
6'	123,40	6,79 (dd, $J = 8,0$ e 2,0)	H-5'		123,86	6,81 (dd, 7,9, 1,7)
<b>CH<sub>2</sub></b>						
OCH <sub>2</sub> O	101,07	5,99 (d, $J = 1$ ) 5,95 (d, $J = 1$ )			101,28	6,18 - 5,98
9	65,01	5,32 (d, $J = 12,5$ ) 5,31 (d, $J = 12,5$ )			65,26	5,21 (s)
<b>CH<sub>3</sub></b>						
MeO-4	55,66	3,73 (s)			55,79	3,66 (s)
MeO-5	55,86	3,96 (s)			55,94	3,92 (s)
Ac	20,76	2,03 (s)			-	-

Fonte: DUARTE, S. L. F., 2013.

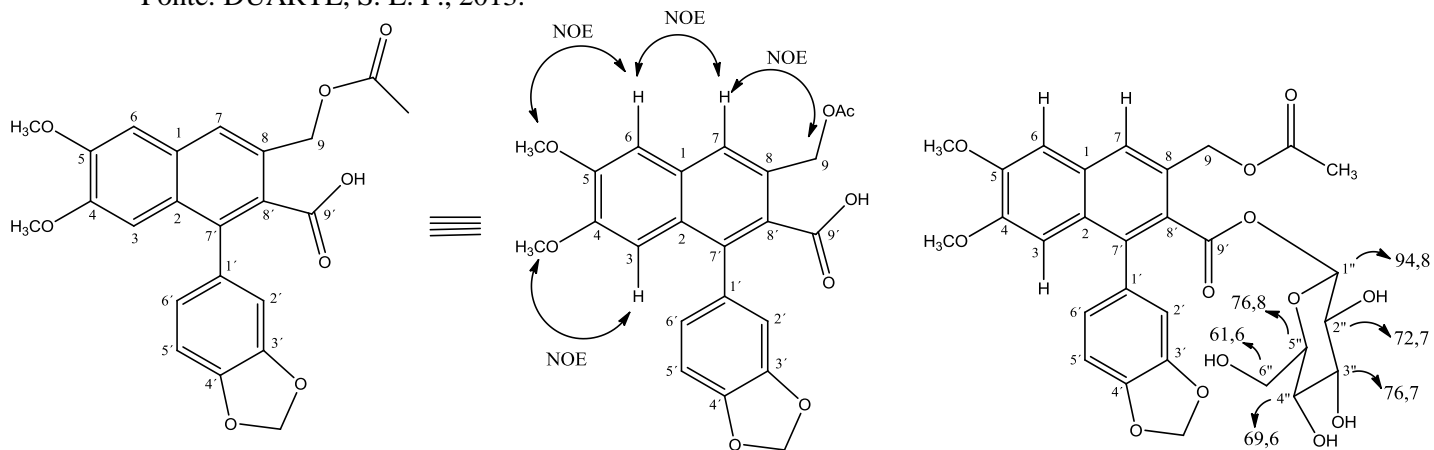


FIGURA 23- Espectro de massas de PhA-2 obtido em alta resolução HR-ESI-MS.

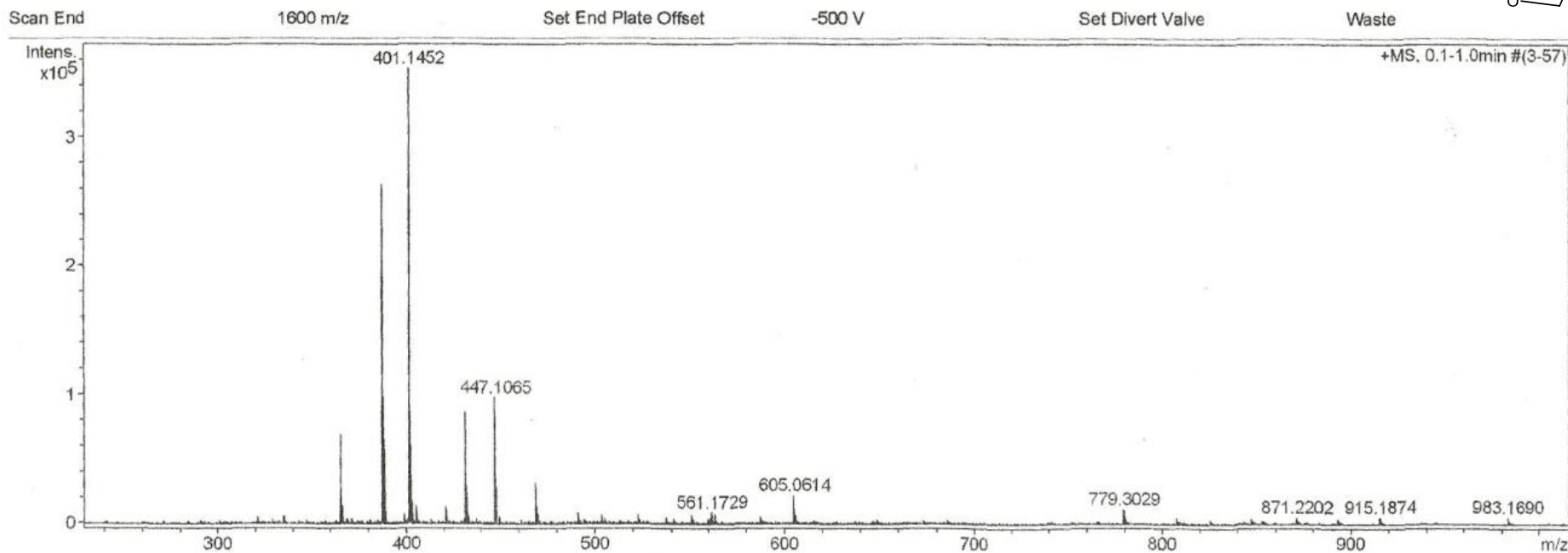
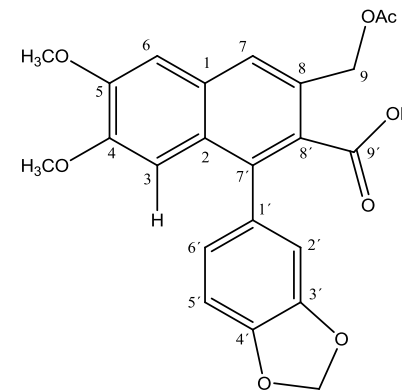


FIGURA 24 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2.

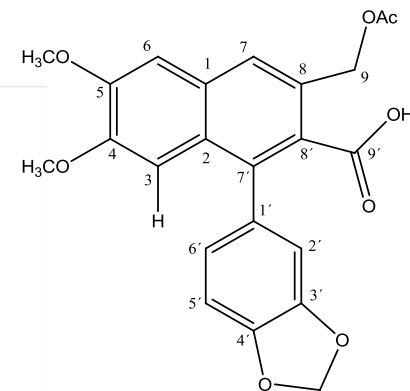
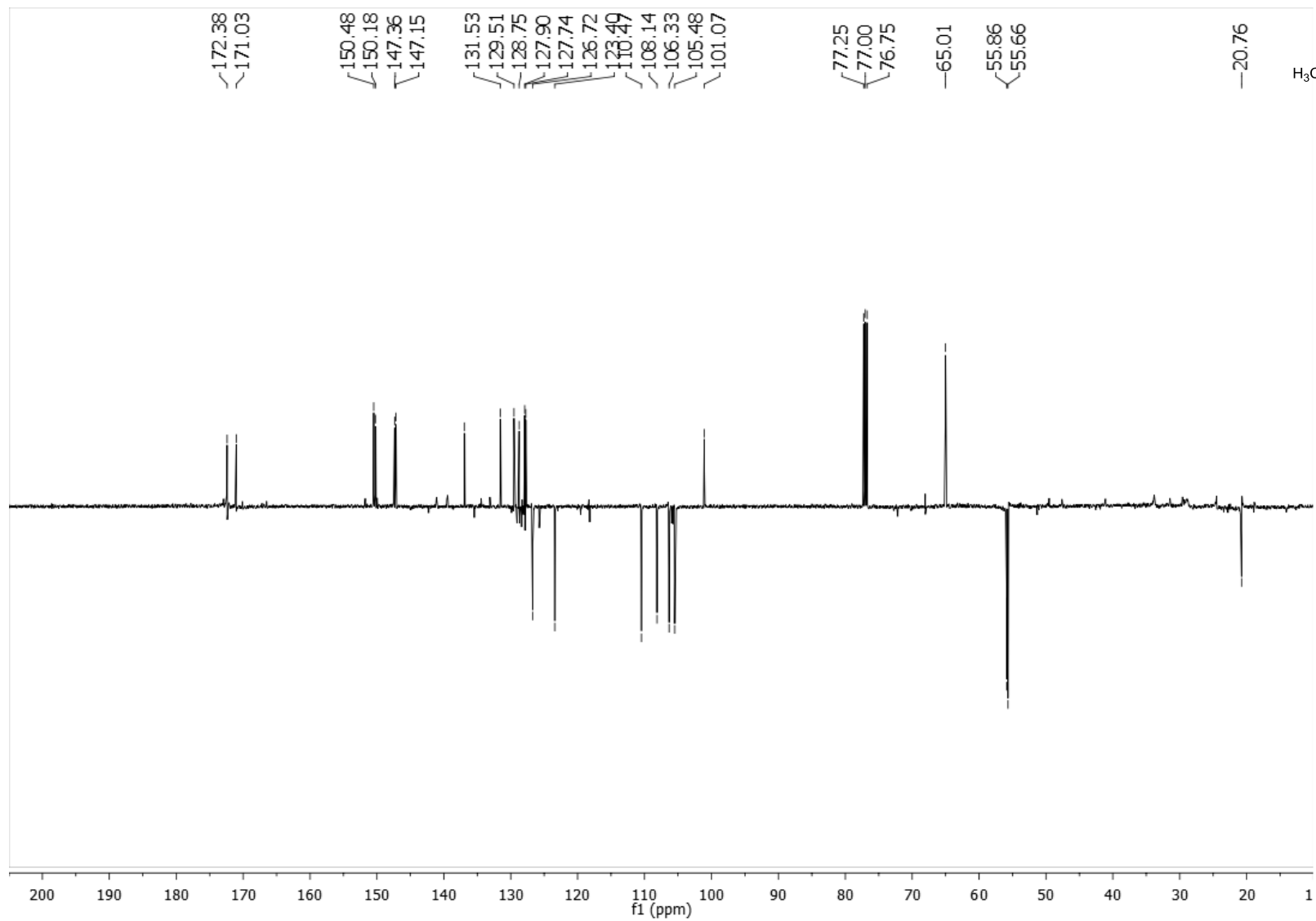


FIGURA 25– Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 174-122 ppm.

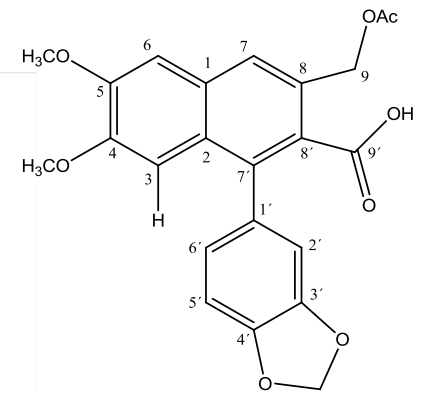
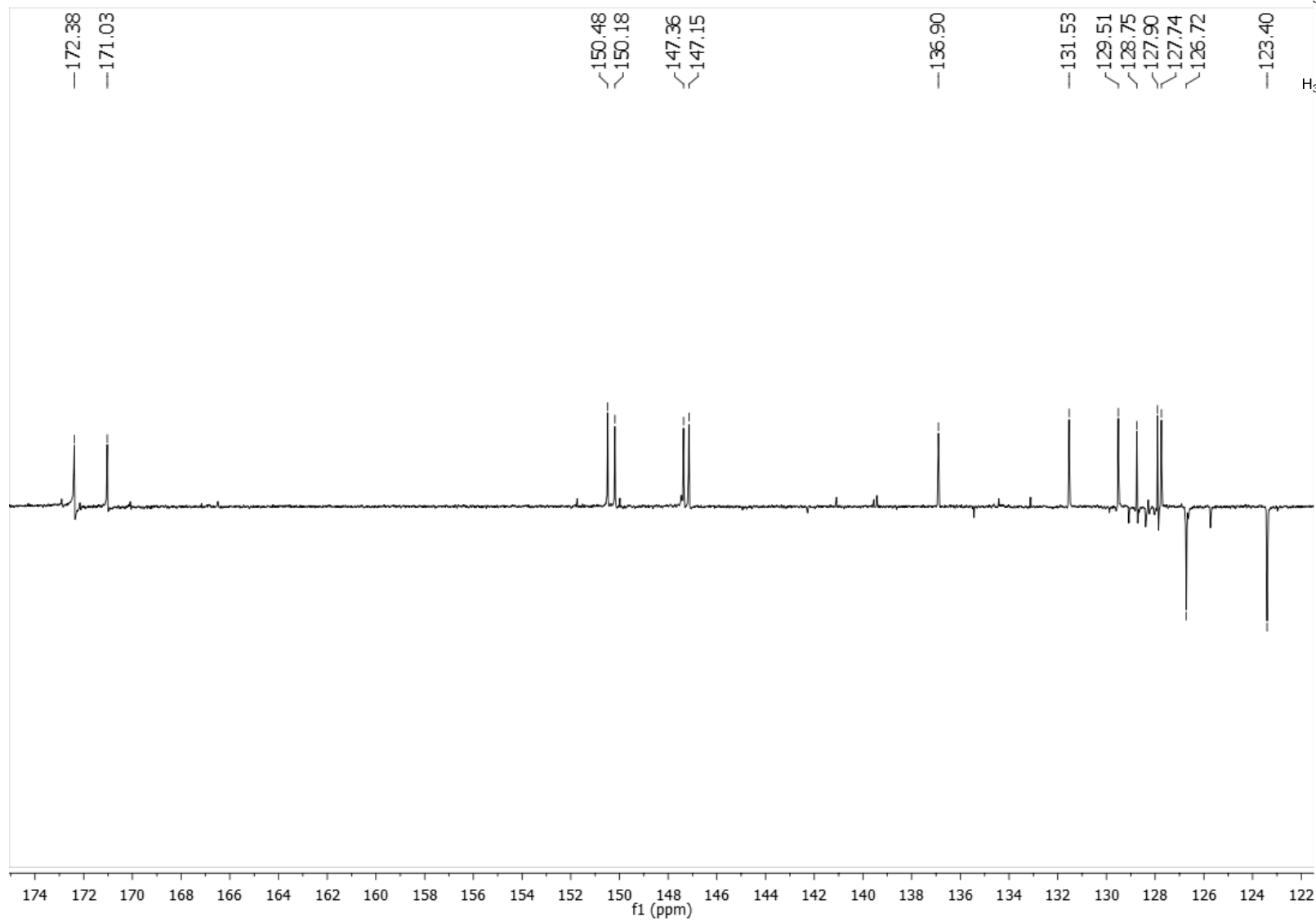


FIGURA 26– Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 130,5-123,0 ppm.

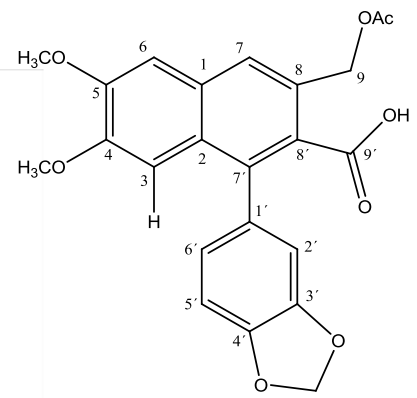
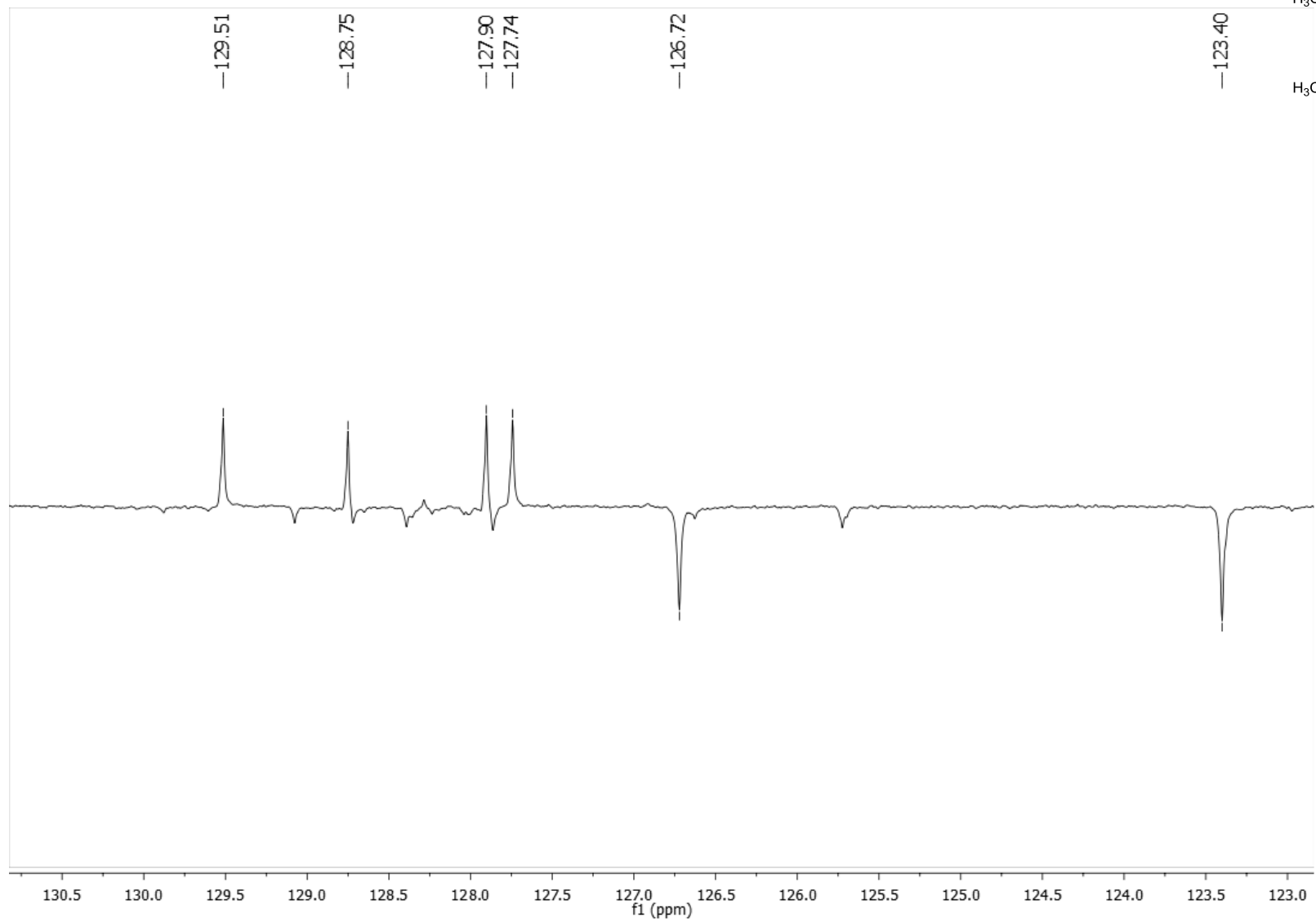


FIGURA 27 - Espectro de infravermelho de PhA-2.

Comment; **LAB. TEC FARMACEUTICA**  
Amostra: Fr 14

No. of Scans; 10  
Resolution; 8 [1/cm]  
Apodization; Happ-Genzel

Date/Time; 22/2/2013 07:39:59  
Dep.: **CONT. DE QUALIDADE**  
Equip. **IR PRESTIGIU**

Operador; \$ **WELLINGTON DE LIMA NAVARRO**

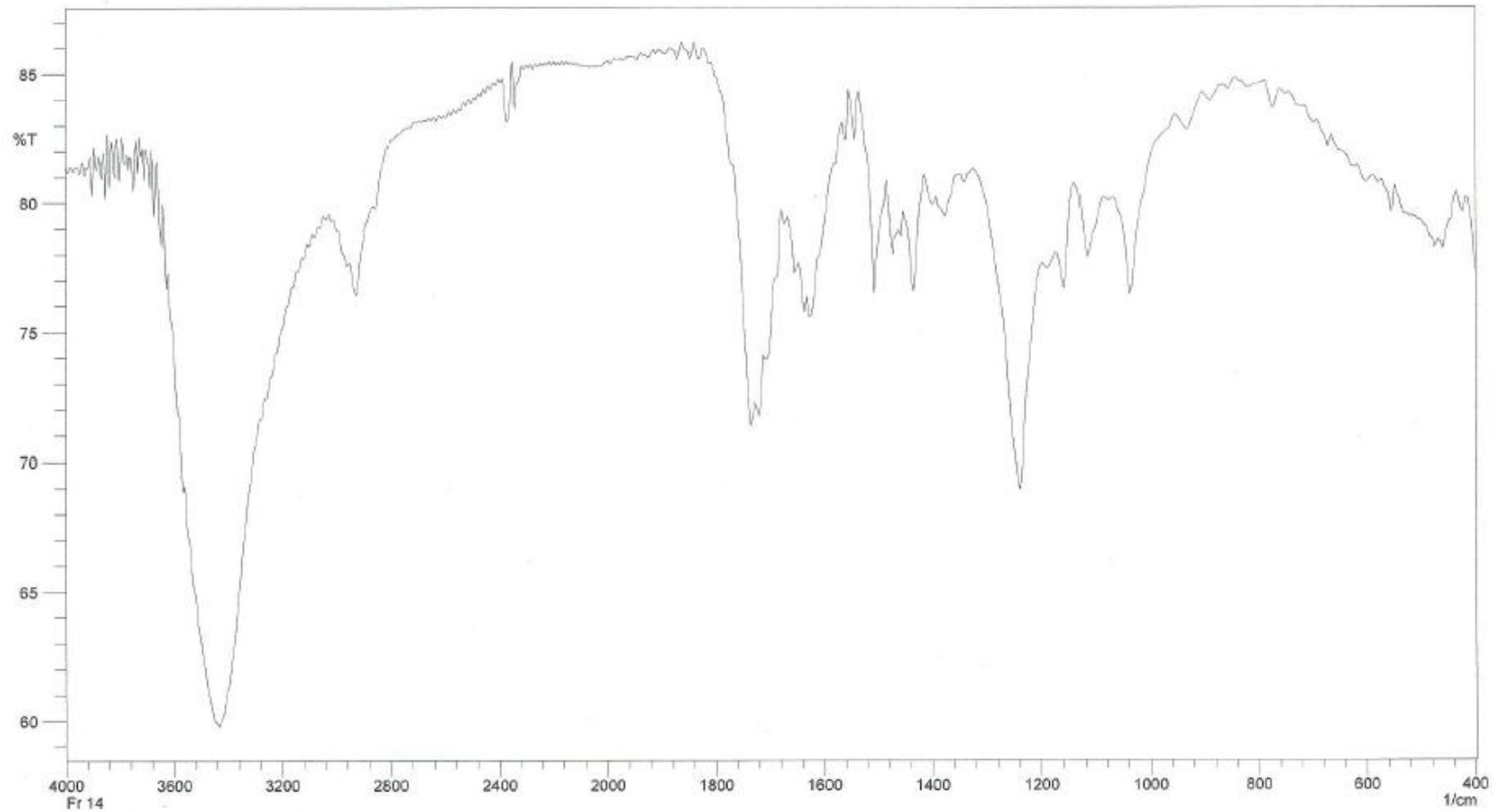
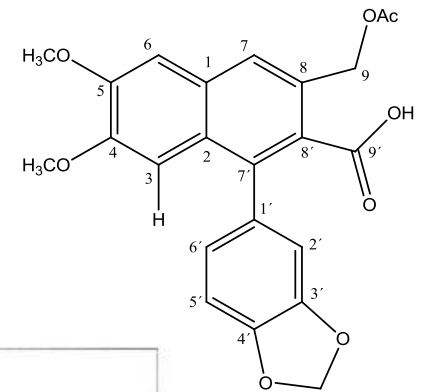


FIGURA 28 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2.

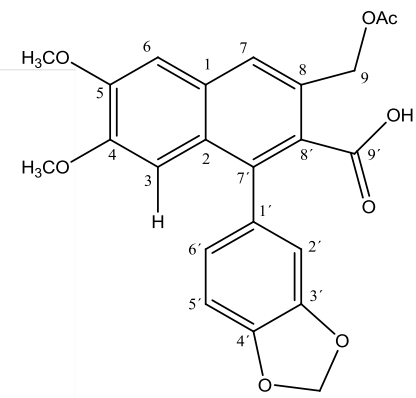
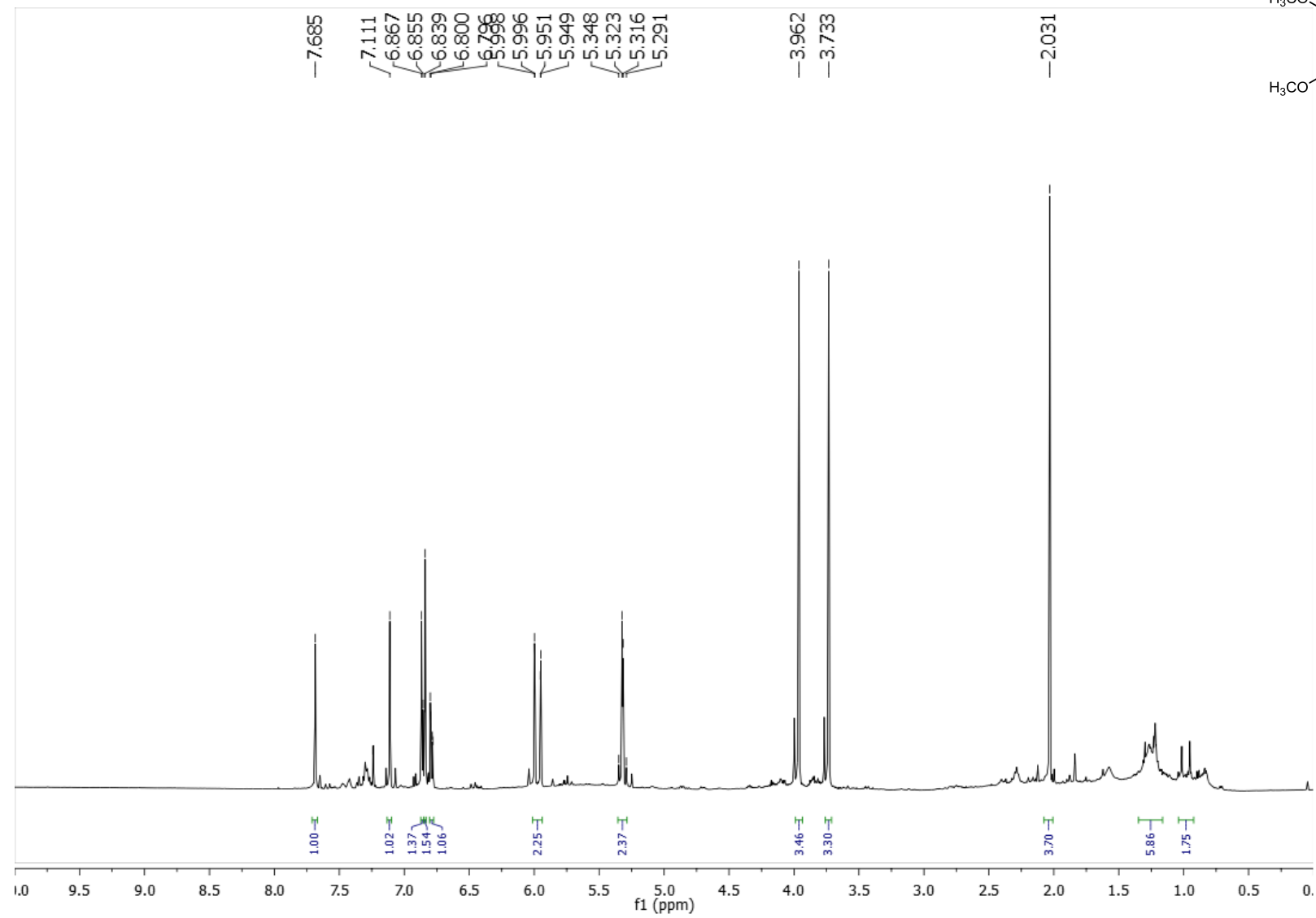


FIGURA 29– Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 7,0-5,75 ppm.

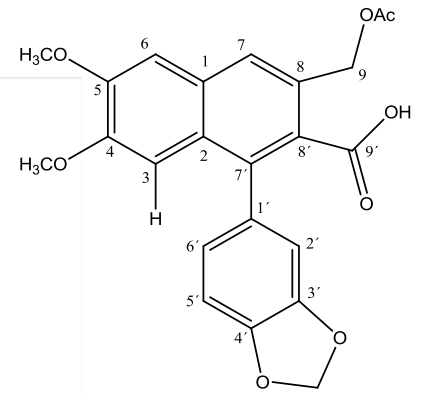
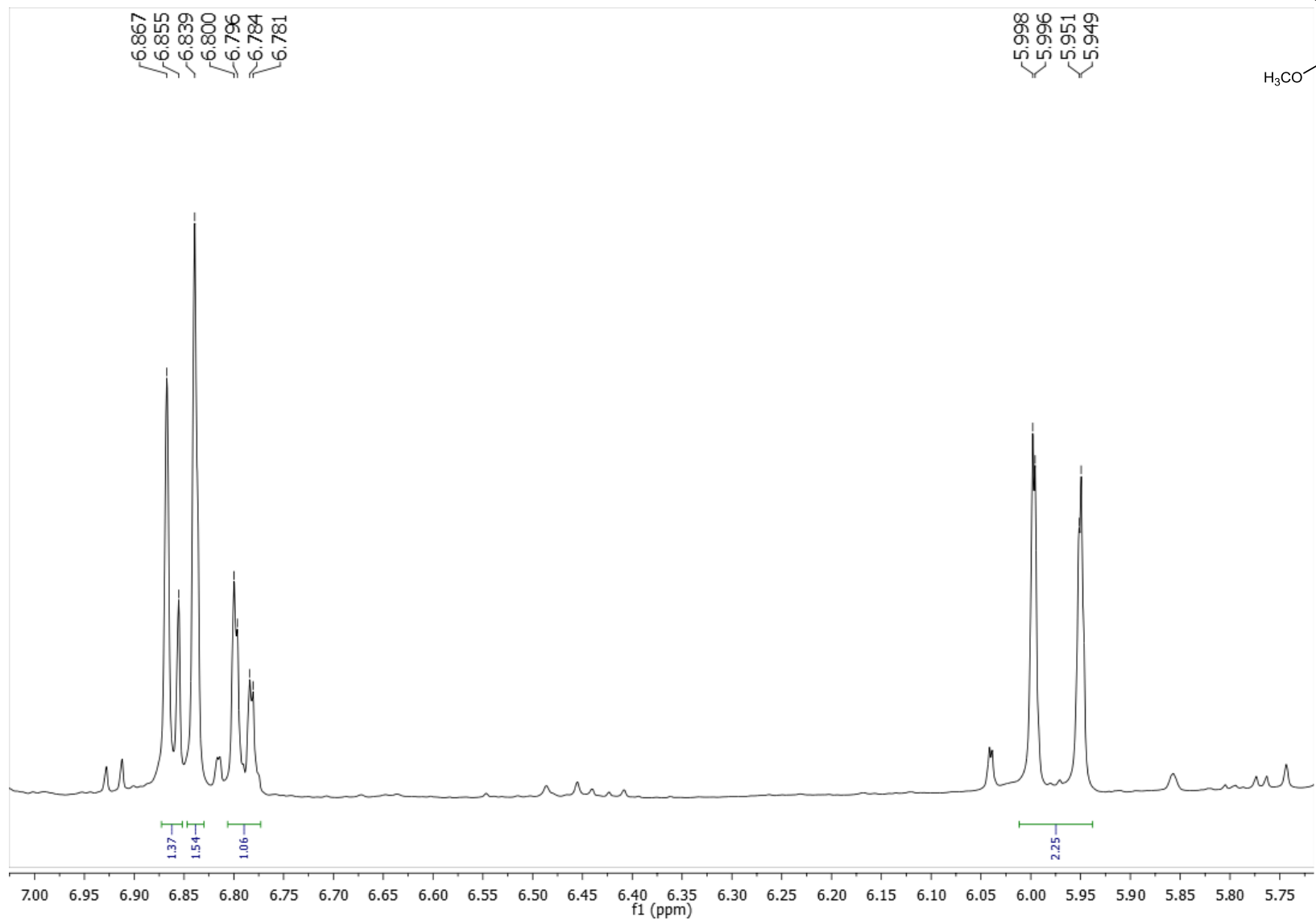


FIGURA 30– Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 6,95-6,61 ppm.

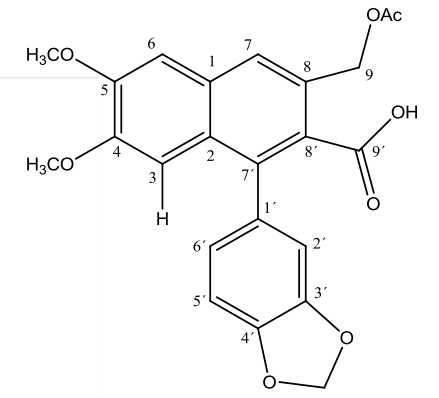
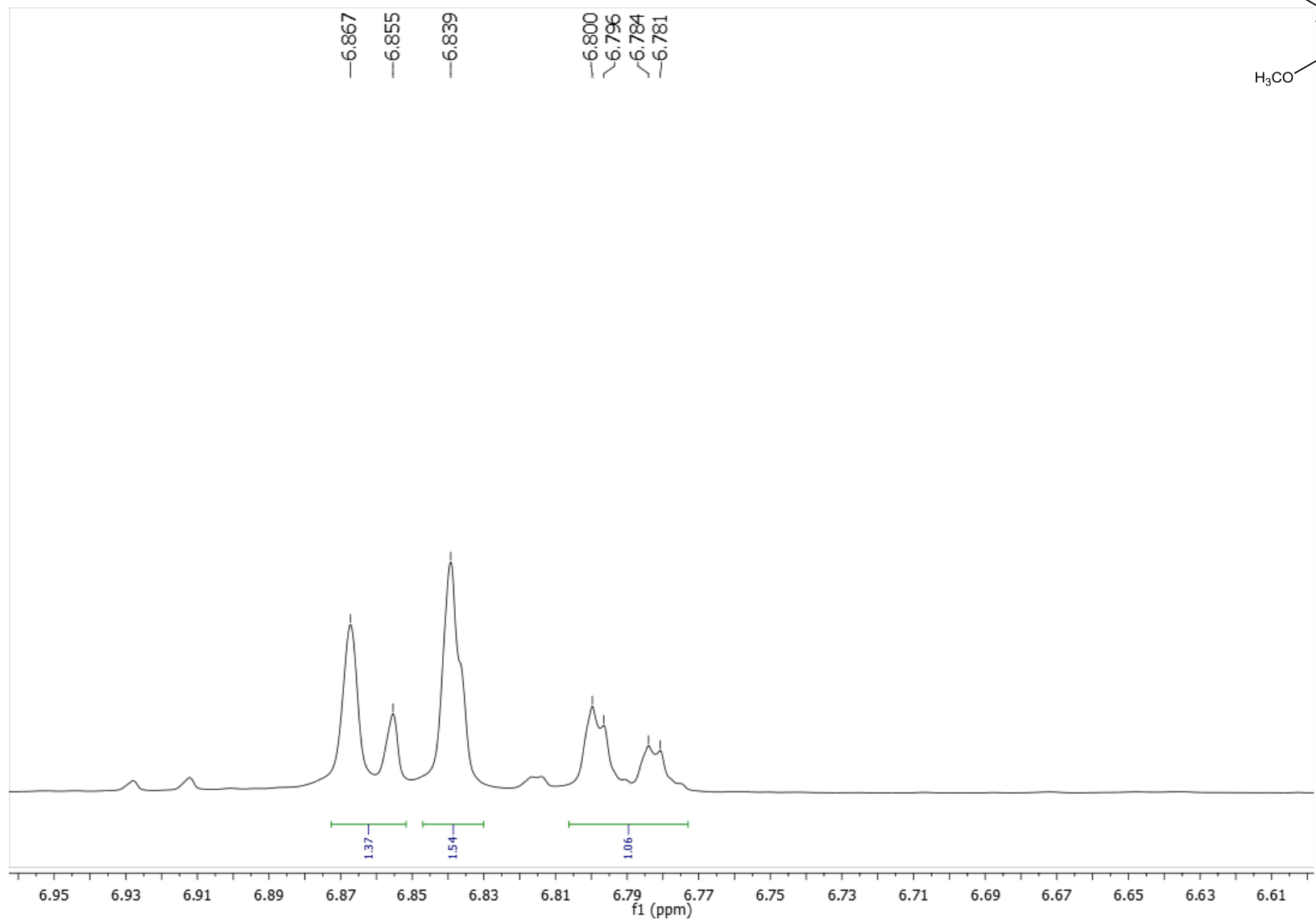


FIGURA 31– Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 6,1-5,2 ppm.

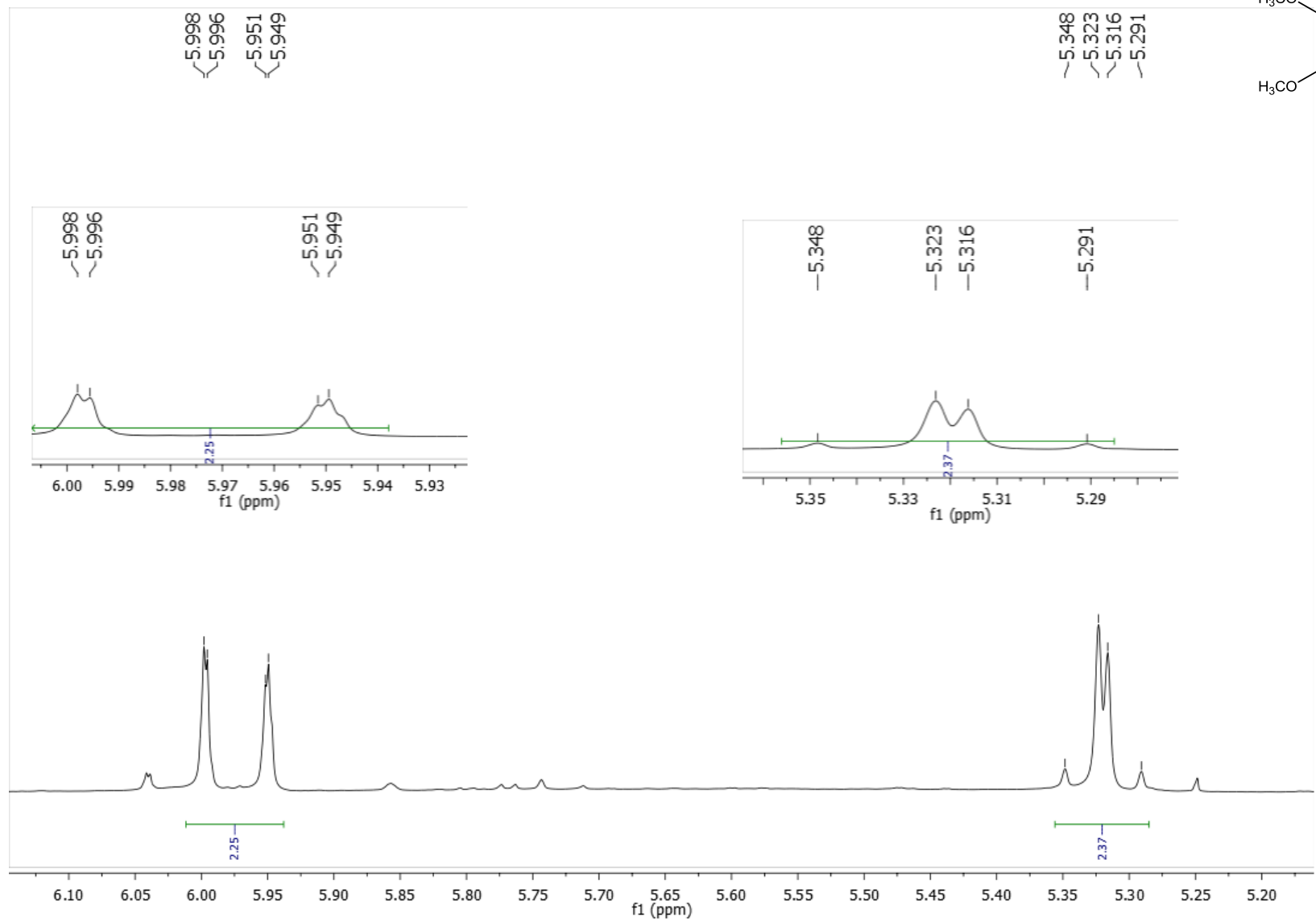


FIGURA 32– Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2 na região de 7,75-6,70ppm.

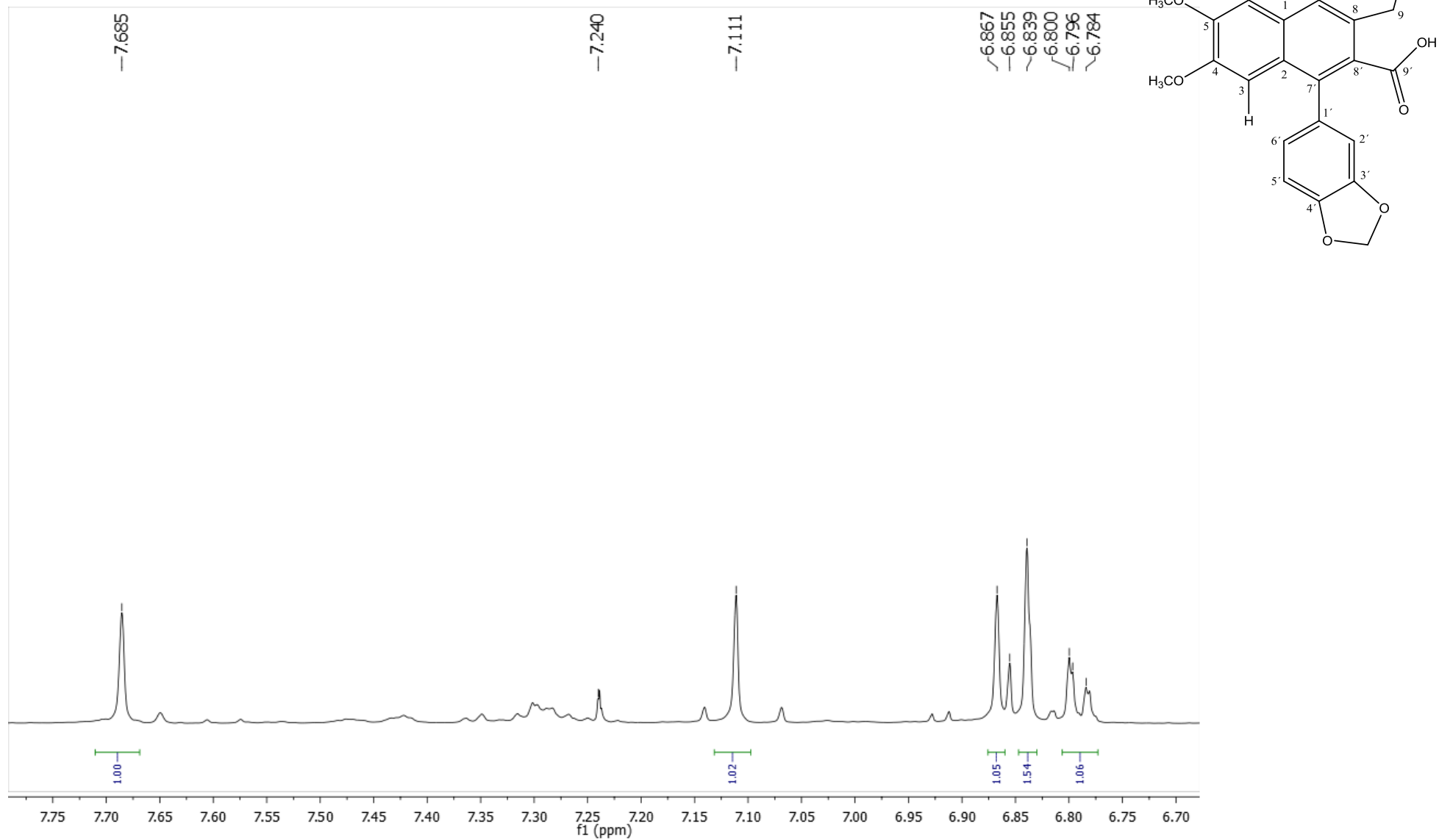


FIGURA 33 - Espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

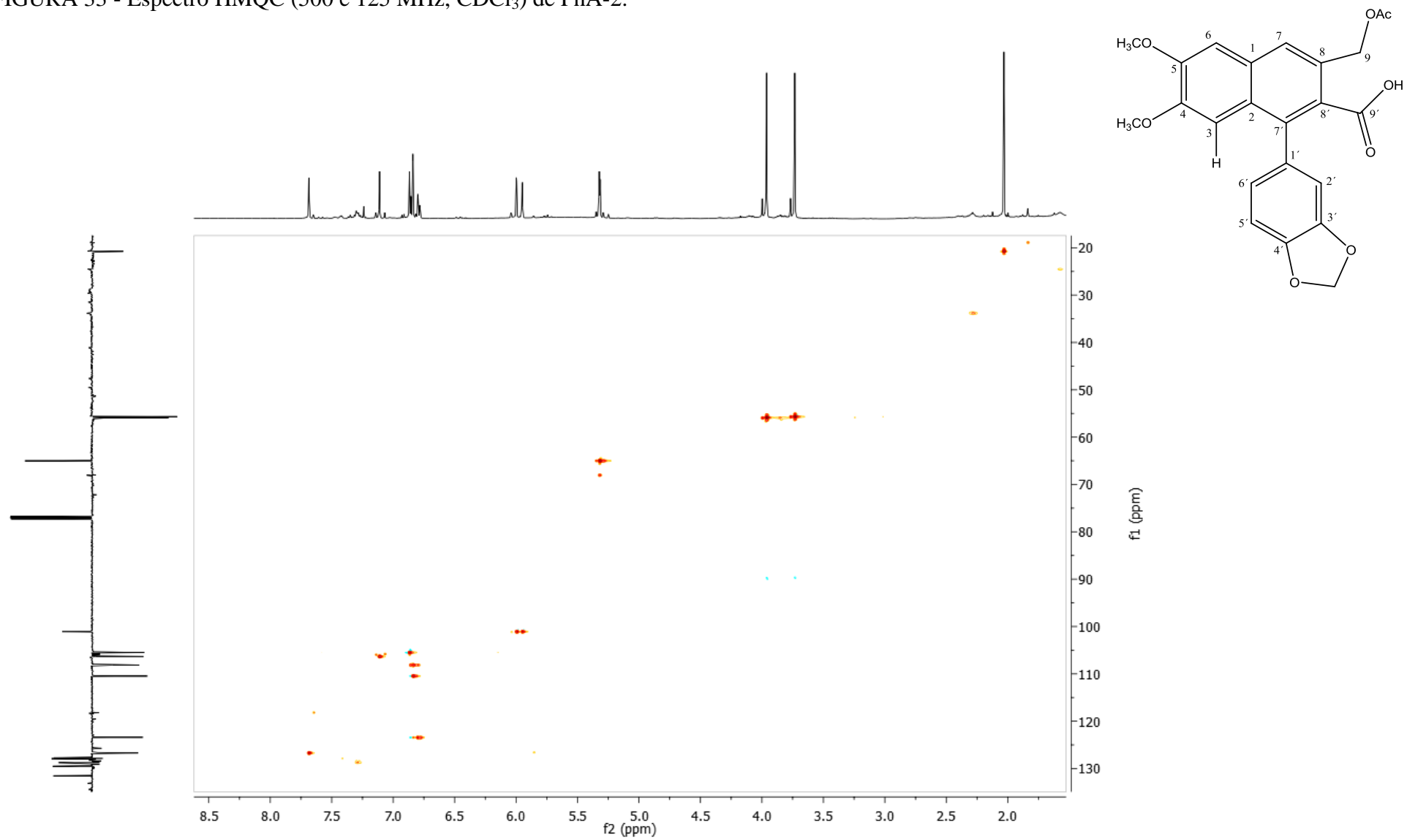


FIGURA 34 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (5,6-2,0 ppm) x (20-75 ppm).

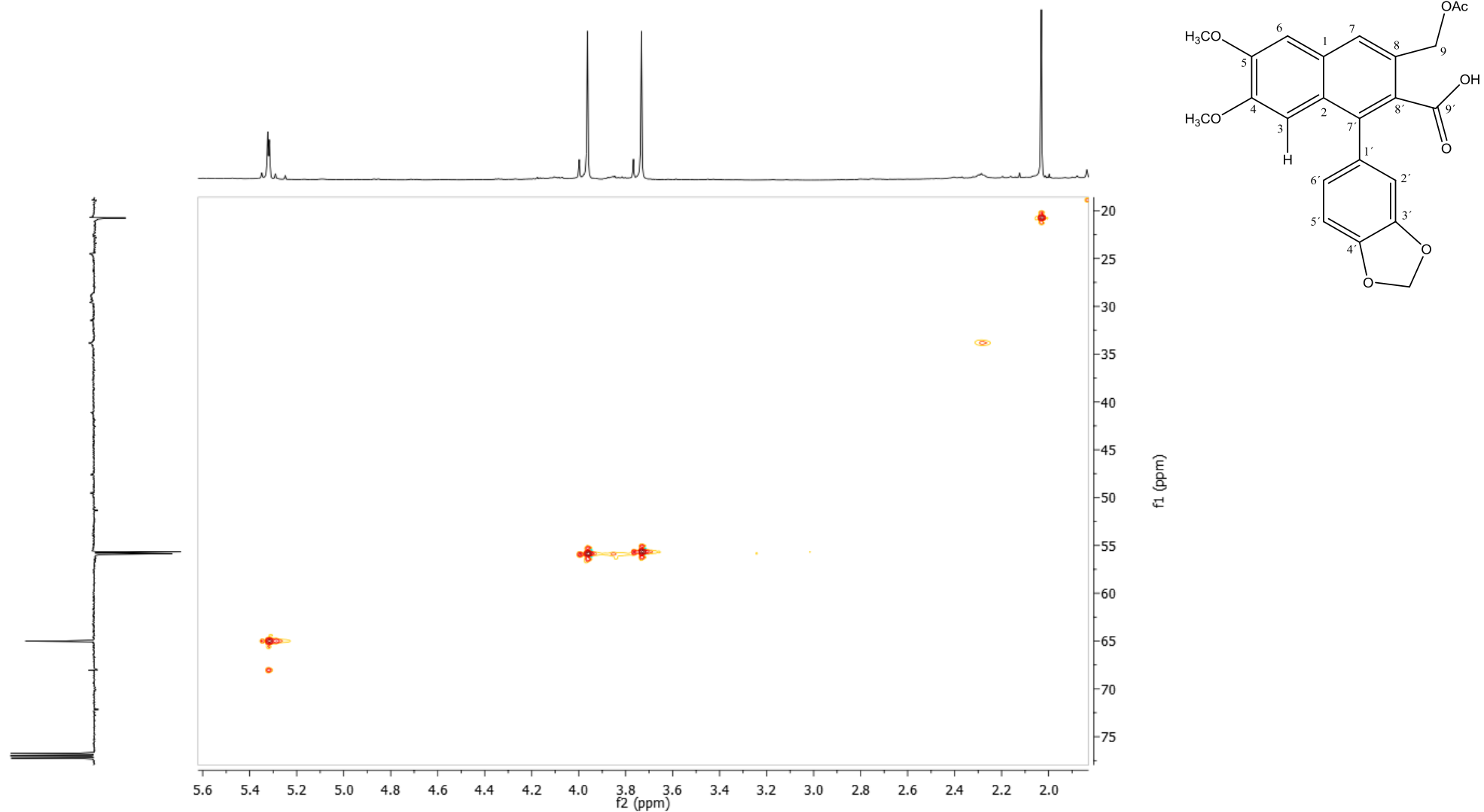


FIGURA 35 - Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (7,8-5,7 ppm) x (90-130 ppm).

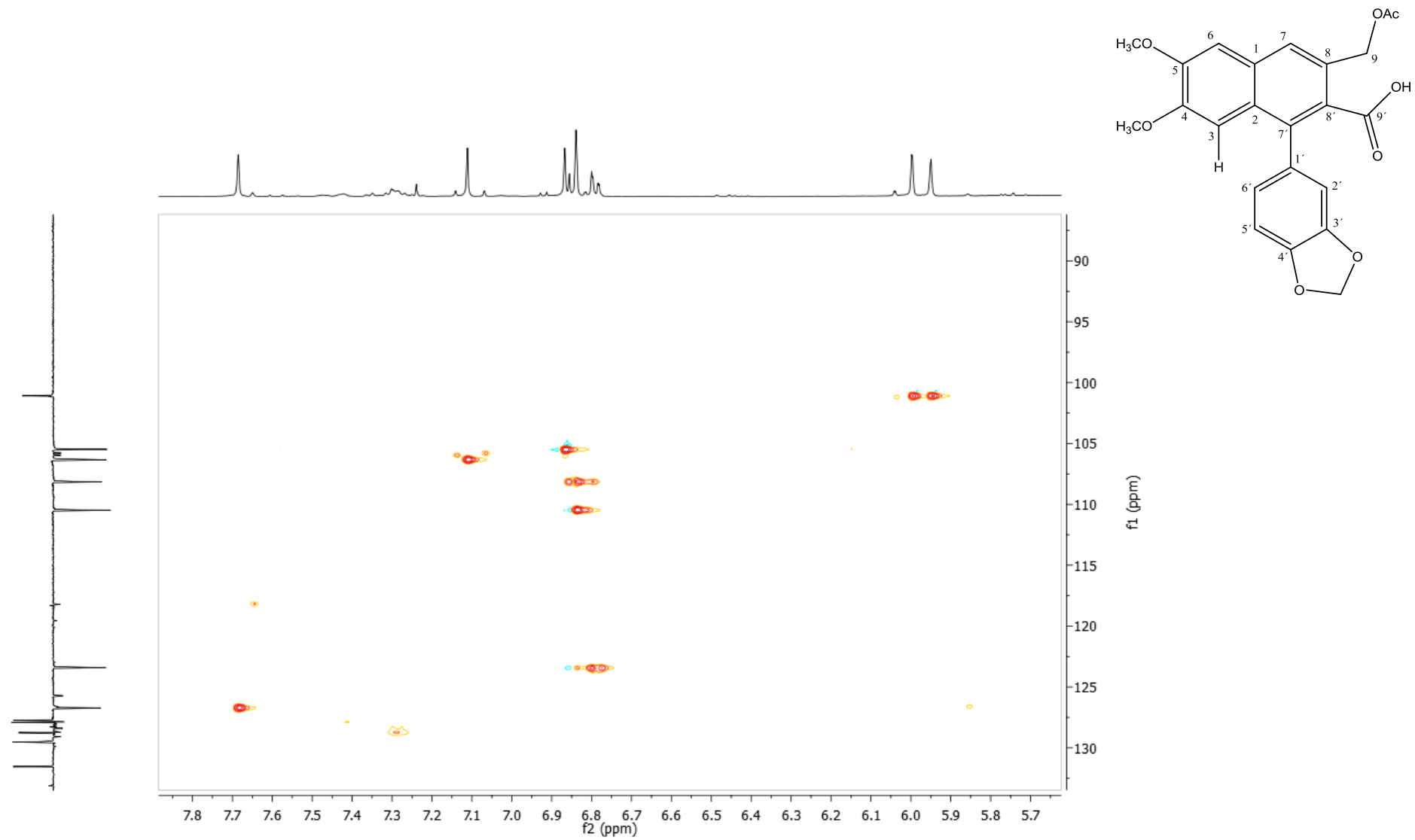


FIGURA 36 - Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2.

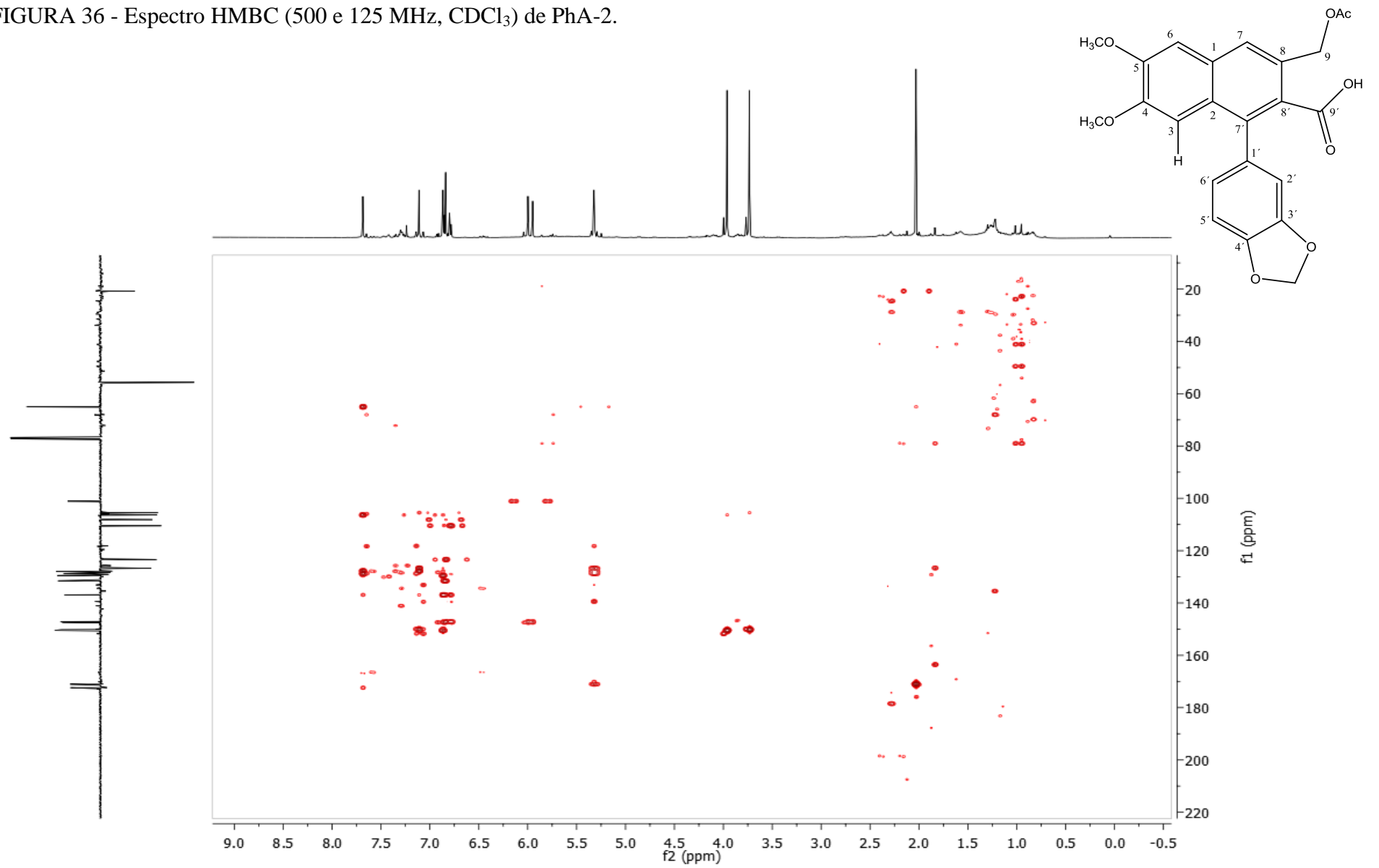


FIGURA 37 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (6,2-3,6 ppm) x (100-190 ppm).

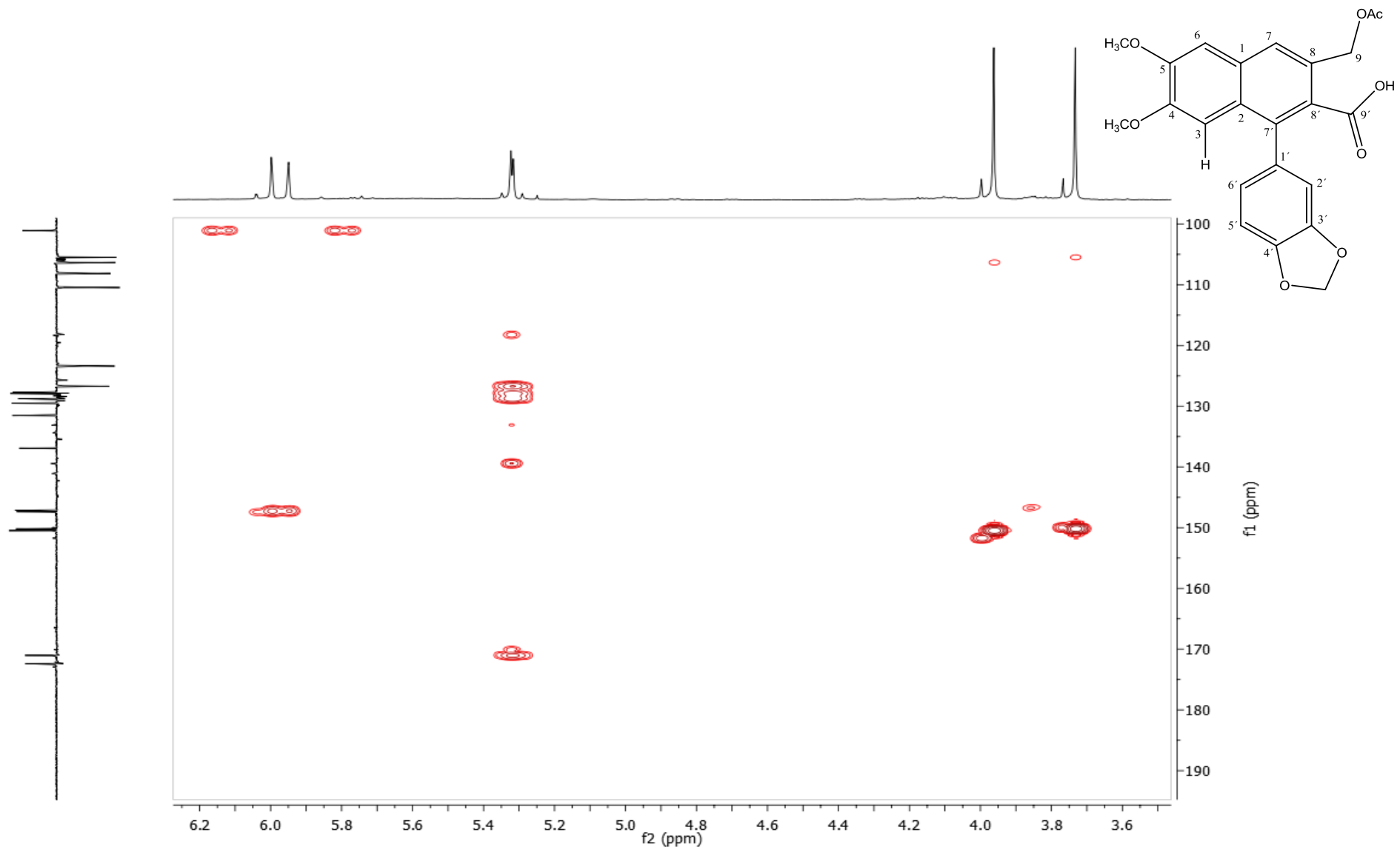


FIGURA 38 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (8,2-6,8 ppm) x (60-155 ppm).

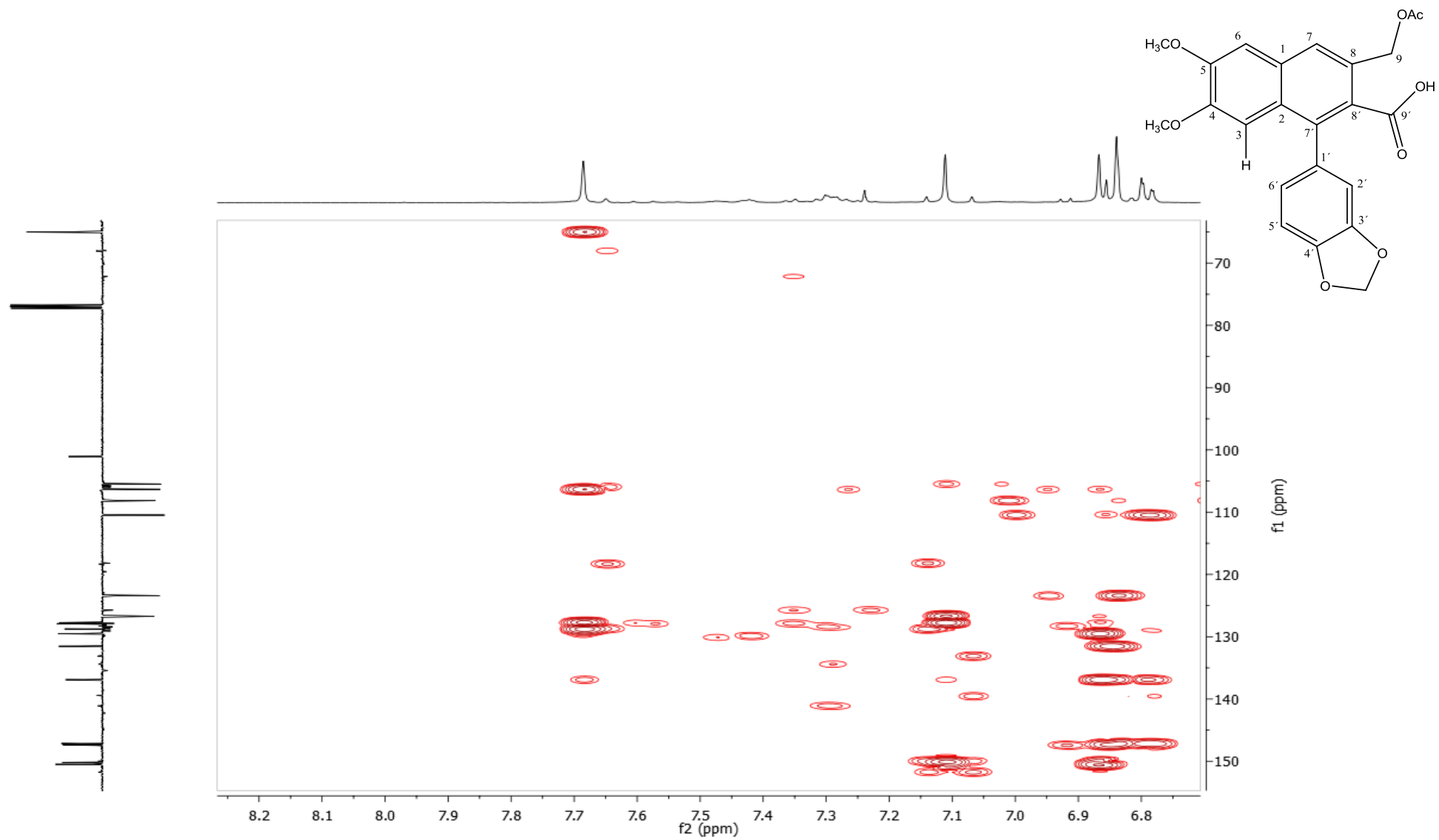


FIGURA 39 - Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PhA-2 na região de (7,22-6,74 ppm) x (100-160 ppm).

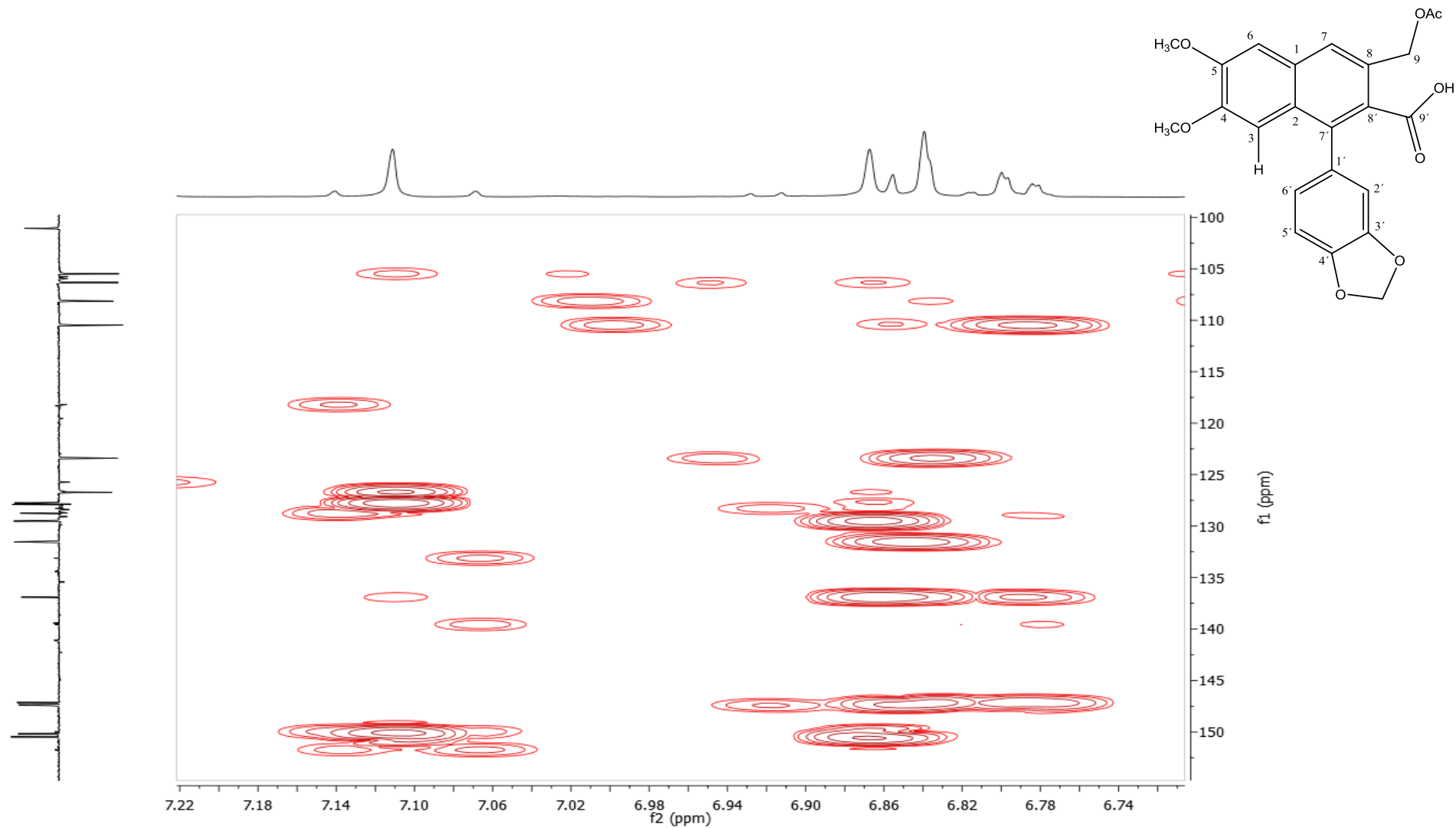
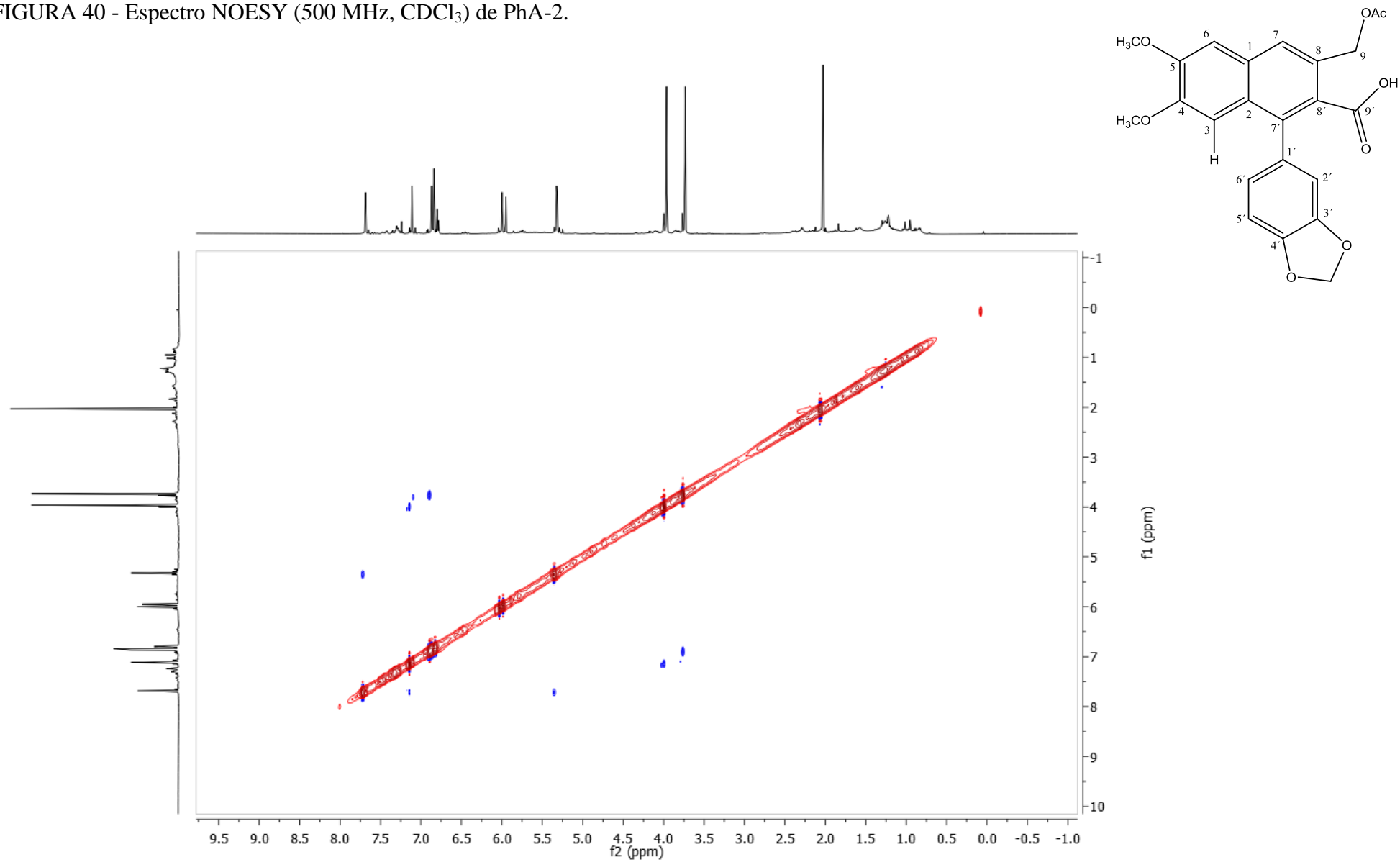


FIGURA 40 - Espectro NOESY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PhA-2.





### **5.3. Citotoxicidade frente eritrócitos**

A citotoxicidade da justicidina B foi avaliada frente eritrócitos de camundongos Swiss. A  $CH_{50}$  (concentração do que produz 50% de hemólise) foi maior do que 1000  $\mu\text{g/mL}$ . O resultado obtido sugere que a justicidina B apresenta baixa toxicidade frente eritrócitos.

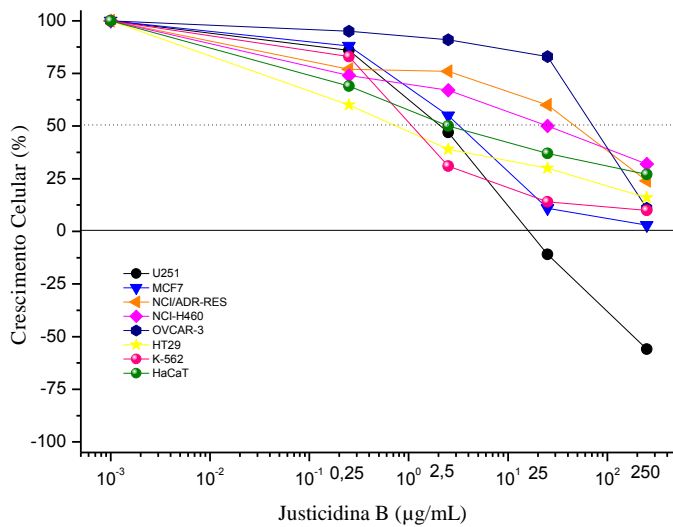
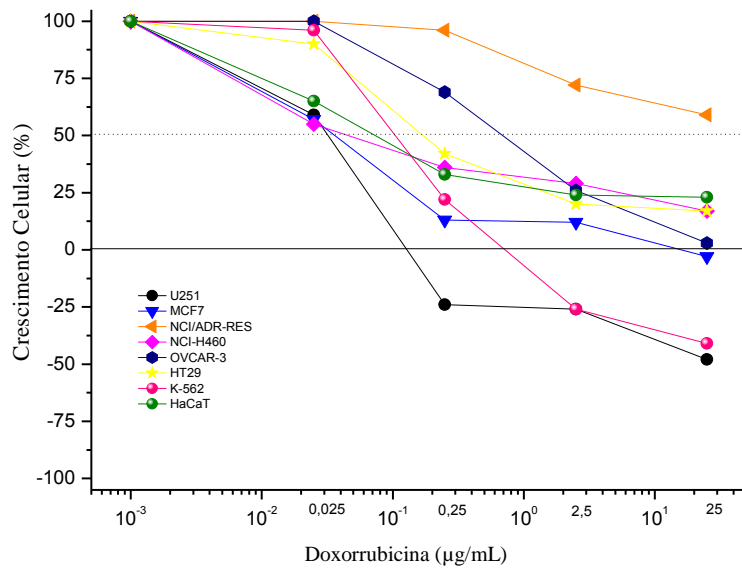
### **5.4. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas**

Segundo Fonseca (2009), a justicidina B possui atividade citotóxica inespecífica em cultura de células neoplásicas, isto pode ser observado nos resultados compilados no GRÁFICO 1B onde mostram que justicidina B é citotóxica para a maioria das linhagens celulares utilizadas, atividade que ocorreu dependente de concentração.

O GRÁFICO 1 (A e B) representam a avaliação da atividade citotóxica da doxorubicina e da justicidina B, respectivamente, em cultura de células tumorais humanas e em uma linhagem de células não tumorais (HaCat).

Como esperado, a doxorubicina apresentou efeito citotóxico, para a maioria das linhagens celulares, em todas as concentrações testadas (GRÁFICO 1A). Os valores de  $GI_{50}$  variaram de 0,026 a 0,69  $\mu\text{g/mL}$  na diferentes linhagens testadas (TAB. 10, p. 106).

Os valores de  $GI_{50}$  da justicidina B variaram de 0,83 a 67,2  $\mu\text{g/mL}$  (TAB. 10). Pode-se observar que a referida substância apresenta citotoxicidade especialmente para as linhagens de câncer colorretal, leucemia, glioma e mama (TAB. 10, p. 106). Apresentando atividade citocida para linhagem de células de glioma com certa seletividade, numa concentração  $<25\mu\text{g/mL}$  o que corrobora com dados encontrados na literatura sobre outras lignanas arilnaftaleno como a podofilotoxina e seus derivados que também apresentam potente atividade antitumoral (CRAGG e NEWMAN, 2005; ZI, et al., 2013), confirmando a viabilidade de dar continuidade a estudos sobre a atividade antitumoral dessas lignanas.



Fonte: DUARTE, S. L. F., 2013.

GRÁFICO 1- Atividade antitumoral da doxorubicina (A) e justicidina B (B) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração da amostra. **U251 – glioma; MCF-7 – mama; NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos; NCI-H460 – pulmão; OVCAR-3 – ovário; HT29 – colorretal; K-562 – leucemia; HaCaT – pele (linhagem de células não tumorais).**

TABELA 10 - Valores de GI<sub>50</sub> (µg/mL) para a doxorrubicina e justicidina B

LINHAGEM / TRATAMENTO	GI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	JUSTICIDINA B	DOXORRUBICINA
U251 (glioma, SNC)	2,1	0,026
MCF-7 (mama)	2,9	0,033
NCI-ADR/RES (ovário resistente)	31,4	>25
NCI-H460 (pulmão)	21,1	0,043
OVCAR-3 (ovário)	67,2	0,69
HT29 (colorretal)	0,83	0,25
K562 (leucemia)	1,2	0,22
HaCat (linhagem não tumoral)	3,7	0,08

### 5.5. Concentração inibitória mínima (CIM)

Segundo GOUN et al., (2003) a justicidina B não apresenta boa atividade antibacteriana, o que foi comprovado, pois mesmo utilizando 512µg/mL da justicidina B ocorreu crescimento bacteriano, desta forma a CIM da justicidina B para as cepas testadas é >512µg/mL.

### 5.6. Atividade moduladora da resistência a drogas

Nos dados compilados na TABELA 11, observou-se que a justicidina B não modulou atividade antibacteriana da tetraciclina, eritromicina e norfloxacino, não havendo alteração da CIM destes antibióticos frente às cepas resistentes testadas, ao contrário do que foi observado quando utilizada a substância controle, a clorpromazina, que reduziu a CIM do norfloxacino em quatro vezes e da tetraciclina em duas vezes.

TABELA 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de justicidina B para as cepas bacterianas da espécie *S. aureus* que super expressam bombas de efluxo TetK, MsrA e NorA.

Cepa (Bomba de efluxo) /Antibiótico utilizado (CIM do antibiótico µg/mL)			
Substâncias (¼ da CIM)	IS-58 (TetK) / Tetraciclina (64)	RN4220 (MsrA) / Eritromicina (512)	SA-1199B (NorA) / Norfloxacino (64)
Justicidina B (512/4)	64	512	64
Clorpromazina (64/4)	32 (2)*	512	16 (4)*

( )\* Entre parênteses, fatores de redução da CIM.

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Phyllanthus acuminatus* Vahl levou ao isolamento de duas lignanas com relevância para a espécie, a justicidina B e a luclaricina, esta última relatada pela primeira vez. Estas substâncias foram identificadas por Espectroscopia no Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY).

A justicidina B, antes isolada nas raízes de *P. acuminatus*, foi obtida em grande quantidade nas partes aéreas da espécie sendo então submetida a testes farmacológicos que confirmaram sua atividade antitumoral, em especial sobre linhagens de câncer colorretal, leucemia, mama e glioma, apresentando elevada citotoxicidade para esta última.

A justicidina B não apresentou toxicidade em ensaio utilizando hemácias de camundongos Swiss.

A justicidina B não apresentou efeito modulador frente a cepas bacterianas resistentes a tetraciclina, eritromicina e norfloxacino pelo mecanismo de bomba de efluxo.

A justicidina B não apresentou atividade antibacteriana na maior concentração utilizada contra as cepas testadas, o que não descarta a possibilidade de futuras derivatizações estruturais para submissão de novas avaliações.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. N.; PACHÚ, C. O.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo. **Revista CCS**, v.14, p.7-10, 1995.

BACHMANN, T. L.; GHIA, F.; TORSELL, B. G. Lignans and lactones from *Phyllanthus anisobulos*. **Phytochemistry**, v.33, n.1, p.189-191, 1993.

BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: Oliveira Simões, Cláudia Maria et. al.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. 1102p., p.557-575, 2004.

BARROS, L. F. L. Estudo químico, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de *Talauma ovata* A. St. Hill (Magnoliaceae). **Dissertação (Mestrado em Química)**, Universidade Federal do Paraná, 140 p, Curitiba, 2008.

BEGHYN, T.; DEPREZ-POULAIN, R.; WILLAND, N.; FOLLEAS, B.; DEPREZ, B. Natural compounds: leads or ideas? Bioinspired molecules for drug discovery. **Chemical Biology & Drug Design**, v.72, p.3-15, 2008.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.16, supl., p.631-637, 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phyto therapeutic agents). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v.33, n.2, p.180, 2000.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: Rosendo Augusto Yunes e Valdir Cechinel Filho (Org.) **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p.11-31, 2009.

CHAM, B. E. Cancer intralesion chemotherapy with solasodine rhamnosyl glycosides. **Research Journal of Biological Sciences**, v.3, n.9, p.1008-1017, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72-79, 2005.

DAMAYANTHI, Y.; LOWN, J. W. Podophyllotoxins: current status and recent developments. **Current Medicinal Chemistry**, v.5, n.3, p.205-252, 1998.

DENARDI, L.; TREVISAN, R.; PERRANDO, E. R.; SUTILI, F. J.; BALDIN, T.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Phyllanthus sellowianus* Müll. Arg. (Phyllanthaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.23, n.2, p.503-509, 2013.

DURING, A.; DEBOUCHE, C.; RAAS, T.; LARONDELLE, Y. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells. **Journal Nutrition**, v.142, n.10, p.1798-805, 2012.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections - future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v.14, n.2, p.125-139, 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fontes de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Revista Multiciência**, v.7, 2006.

FONSECA, F. N. Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* - chambá: Obtenção do extrato padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade Federal do Ceará, 130 p, Fortaleza, 2009.

GERTSCH, J.; TOBLER, R. T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Médica**, v.69, n.5, p.420-424, 2003.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.13-17, 2003.

GOUN, E.; CUNNINGHAM, G.; CHU, D.; NGUYEN, C.; MILES, D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, v.74, n.6, p.592-596, 2003.

GRAÇA, C. Fitoterapia em saúde pública. In: **Congresso Sul Brasileiro de Plantas Medicinais**, Maringá. Resumos, p.43-45, 1999.

HAUSOTT, H. B.; MARIAN, B. G. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.129, p.569-576, 2003.

HOFFMANN, P.; KATHRIARACHCHI, H.; WURDACK, K. J. A phylogenetic classification of Phyllanthaceae (Malpighiales; Euphorbiaceae *s.l.*). **Bulletin of the Royal Botanic Gardens**, n.61, p.37-53, 2006.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético. 3ed. Porto Alegre, **Artmed**, p.354-362, 2009.

KANG, C; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.150, p.85-90, 2009.

KATHRIARACHCHI, H.; SAMUEL, R.; HOFFMANN, P.; MLINAREC, J.; WURDACK, K. J.; RALIMANANA, H.; STUESSY, T. F.; CHASE, M. W. Phylogenetics of tribe phyllanthae (phyllanthaceae; euphorbiaceae sensu lato) based on NRits and plastid MATk DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v.93, n.4, p.637-655, 2006.

KIM, H. Y.; KIM, J. K.; CHOI, J. H.; JUNG, J. Y; OH, W. Y.; KIM, D. C.; LEE, H. S.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; LEE, S.H.; LEE, S. M. Hepatoprotective effect of pinoresinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.112, n.1, p.105-12, 2010.

MARTINS, E. R.; LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, v.38, n.1, p.123-133, 2011.

MONTANARI JR., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. Disponível no site: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>>. Acesso em 15 de setembro de 2013.

MONTEIRO, M. C. M.; LEPTOKARYDIS, I. H.; SILVA, G. H.; DA SILVA, V. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N. Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). **Eclética Química**, São Paulo, v.32, n.3, p.13-18, 2007.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.139-155, 2000.

MURUGAIYAH, V.; CHAN, K-L. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.233-239, 2009.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.143-148, 2008.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

PACHÚ, C. O.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Atividade depressora do sistema nervoso central da iangambina. **Revista CCS**, v.12, n.1, p.14-16, 1993.

PENHA, A. R. S. Estudo da potencialidade da lignana iangambina e da quitosana no tratamento da leishmaniose experimental em camundongos suíços, **Dissertação de Mestrado**, João pessoa, 2010.

PETTIT, G. R.; CRAGG, G. M.; SUFFNESS, M. I.; GUST, D.; BOETTNER, F. E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J. A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J. M.; ELLIS, P. D. Antineoplastic agents. 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* Vahl (Euphorbiaceae) glycosides. **The Journal of Organic Chemistry**, v.49, p.4258-4266, 1984.

PETTIT, G. R.; SCHAUFELBERGER, D. E. Isolation and Structure of the cytostatic lignan glycoside Phyllanthostatin A. **Journal of Natural Products**, v.51, n.6, p.1104-1112, 1988.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D. E.; NIEMAN, R. A.; DUFRESNE, C.; SAENZ-RENAUD, J. A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. **Journal of Natural Products**, v.53, n.6, p.1406-1413, 1990.

POWIS, G.; MOORE, D. High-performance liquid chromatographic assay for the antitumor glycoside phyllanthoside and its stability in plasma of several species **Journal of Chromatography**, v.342, p.129-134, 1985.

RAWAT, D. e NAIR, D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.2, n.3, p.263-274, 2010.

RIOS, J. L.; GINER, R. M.; PRIETO, J. M. New findings on the bioactivity of lignans. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.26, p.183-292, 2002.

ROMAROV, P. G.; KOMAROVA, E. A.; KONDRATOV, R. V.; CHRISTOV-TSELKOV, K.; COON, J. S.; CHERNOV, M. V.; GUDKOV, A. V. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. **Science**, v.285, n.5434, p.1733-1737, 1999.

SAMUEL, R.; KATHRIARACHCHI, H.; HOFFMANN, P.; BARFUSS, M. H. J.; WURDACK, K. J.; DAVIS, C. C.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae: evidence from plastid *MATK* and nuclear *PHYC* sequences. **American Journal of Botany**, v.92, n.1, p.132-141, 2005.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O.; PEREIRA, A. P.; LIMA, M. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A.; DE SILVA, P. M. Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambin. **Planta Médica**, v.63, p.207-212, 1997.

SILVA, M. J.; SALES, M. F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma caatinga do estado de Pernambuco - Brasil. **Rodriguésia**, v.55, n.84, p.101-126, 2004.

SILVA, M. J.; SALES, M. F. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil, **Acta Botânica Brasileira**, v.21, n.1, 2007.

SILVA, R.; RUAS, M. M.; DONATE, P. M., Spectral assignments and reference data, **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.45, p.902-904, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 6ed, Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p., 2007.

SMITH, E.; WILLIAMSON, M.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and MRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v.19, p.538-542, 2005.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1107-1112, 1990.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas dicotiledôneas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**. Nova Odessa - São Paulo, 640 p., 2005.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.1247-1260, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacol**, v.51, p.239-254, 1996.

WANG, C. Y.; LAM, S. H.; TSENG, L. H.; LEE, S. S. Rapid screening of lignans from *Phyllanthus myrtifolius* and stilbenoids from *Syagrus romanzoffiana* by HPLC-SPE-NMR. **Phytochemical Analysis**, v.22, p.352-360, 2011.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZI, C.; XU, F.; LI, G.; LI, Y.; DING, Z.; ZHOU, J.; JIANG, Z.; HU, J. Synthesis and Anticancer Activity of Glucosylated Podophyllotoxin Derivatives Linked via 4 $\beta$ -Triazole Rings. **Molecules**, v.18, p.13992-14012, 2013.