

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E
CAULE DA ESPÉCIE *Sparattosperma leucanthum***

Fernanda Mendes de Azevedo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO DE 2007**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E
CAULE DA ESPÉCIE *Sparattosperma leucanthum***

Fernanda Mendes de Azevedo

Monografia apresentada ao
centro de ciência e tecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense , como parte das
exigências para a obtenção do
título de licenciado em Química.

Orientadora: Prof^a. Leda Mathias

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO DE 2007**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS EXTRATOS BRUTOS DAS FOLHAS E
CAULE DA ESPÉCIE *Sparattosperma leucanthum***

Fernanda Mendes de Azevedo

**Monografia apresentada ao
Centro de Ciência e Tecnologia
Da Universidade Estadual do
Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do
título de Licenciado em Química**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos (D.Sc., Química Orgânica) - UENF

Prof. Ildomar Alves do Nascimento (M.Sc., Química Orgânica) - CEFET

Prof^a.Leda Mathias (D.Sc., Química de Produtos Naturais) – UENF
(Orientadora)

Instruir-te-ei , e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir ; guiar-te-ei com os meus olhos .

(Salmos 32:8)

**Aos meus pais, Ilson e Marina
Aos meus filhos Amanda e José Neto
Ao meu marido José Augusto**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu afeto e gratidão a todos que me ajudaram na realização deste trabalho.

A Deus principalmente pela minha vida, e pela vida de pessoas tão especiais que me ajudaram nesta etapa da minha vida.

A minha mãe muito especialmente pela paciência, pelo carinho e pela força nos momentos de dificuldade. Sem ela nada seria possível.

Aos meus filhos Amanda e José Neto, que pelos olhinhos brilhantes e rostinhos sempre sorridentes me dão força para prosseguir.

Ao meu esposo José Augusto, pelas palavras de otimismo, apoio e pelo seu carinho.

Aos colegas de laboratório Marcelo, Débora, Leonardo, Graziella pela amizade e pela ajuda.

A minha orientadora, e querida professora pelo carinho, pela acolhida e pelos ensinamentos.

Ao professor Carlos Roberto Ribeiro Matos pela imprescindível colaboração, ensinamentos e amizade

Ao professor Olney Vieira da Motta por ceder o laboratório (LSA) para a realização dos ensaios biológicos .

Ao professor Ildomar pelo incentivo e apoio.

E aquelas outras pessoas que mesmo não citadas contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Esquemas.....	IV
Lista de Figuras.....	V
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	VIII
Resumo.....	IX
1-Introdução.....	1
2- Revisão da Literatura	
2.1 - Família Bignoniaceae.....	3
2.2 - A Espécie <i>Sparattosperma leucanthun</i>	4
2.3 - Divisão Taxonômica.....	6
2.4 - Considerações sobre as principais classes de substâncias encontradas em espécies da família Bignoniaceae.....	7
2.4.1 - Quinonas, Antraquinonas, e Naftoquinonas.....	7
2.4.2 - Atividades Farmacológicas do Lapachol.....	12
2.4.2.1 - Síntese do Lapachol.....	14
2.4.2.2 - Biossíntese do Lapachol.....	16
2.4.3 - Flavonóides e Derivados.....	17

2.4.3.1 -Atividade Biológica dos Flavonóides.....	19
2.4.3.2. - Biossíntese de flavonóides.....	19
3 - Objetivos.....	21
4 - Materiais e Reagentes Utilizados.....	22
5 - Procedimento experimental.....	23
5.1 - Levantamento Bibliográfico.....	23
5.1.2 - Material Botânico: coleta e Identificação.....	23
5.1.3 - Secagem e Moagem do material vegetal.....	23
5.1.4 - Preparação dos Extratos Brutos.....	23
5.1.4.1 - Folhas.....	23
5.1.4.2 - Madeira.....	24
6 – Avaliação da Atividade antioxidante e Ensaio Biológicos.....	26
6.1 - Avaliação do Potencial Antioxidante.....	26
6.1.1 - Materiais e Reagentes utilizados.....	29
6.1.2 - Procedimento Experimental.....	29
6.1.3 - Resultados e Discussão da avaliação do potencial antioxidante.....	31
6.2 - Bioensaio da Letalidade contra larvas de <i>Artemia salina</i> leach.....	34
6.2.1 - Materiais e Reagentes.....	35
6.2.2 - Procedimento Experimental.....	35
6.2.3 - Resultados e Discussão do bioensaio da letalidade frente à <i>A. salina</i>	36
6.3 - Avaliação da Atividade Antifúngica	38
6.3.1 - Materiais e Reagentes Utilizados.....	43
6.3.2 - Procedimento Experimental.....	44
6.3.3 - Resultados e Discussão da avaliação da atividade antifúngica.....	45
7 - Algumas Considerações sobre o Perfil Químico dos Extratos Bruto das folhas e madeira de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	46
7.1 - Extrato bruto em Hexano das folhas de <i>S. leucanthum</i>	47
7.2 - Extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>S. leucanthum</i>	47
7.2.1 - Fracionamento extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>S. leucanthum</i>).....	47

7.3 - Extrato em metanol das folhas de <i>S. leucanthum</i> (SLFM).....	53
7.4 - Resultados e Discussão.....	55
8 - Considerações Finais.....	56
9 - Bibliografia	58

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Oxidação de <i>orto</i> e <i>para</i> -quinóis.....	7
Esquema 2 - Reação da β -lapachona com o mercaptoetanol.....	14
Esquema 3 - Primeira tentativa de síntese do lapachol.....	14
Esquema 4 - Síntese do lapachol a partir da leucoisonaftazarina.....	15
Esquema 5 - Síntese total do lapachol.....	15
Esquema 6 - Síntese em larga escala do lapachol.....	15
Esquema 7 - Síntese do lapachol.....	16
Esquema 8 - Biossíntese do lapachol.....	16
Esquema 9 - Mecanismo de ação do DPPH frente a substâncias fenólicas.....	28
Esquema 10 - Mecanismo de ação e estabilidade das substâncias.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Detalhe das folhas e flores de espécies de Ipê.....	5
Figura 02 - Divisão Taxonômica da espécie <i>S. leucanthum</i>	6
Figura 03 - Exemplos de quinonas.....	9
Figura 04 - Quinoniminas derivadas da β -lapachona.....	13
Figura 05 - Exemplos de flavonóides antioxidantes e pró-antioxidantes.....	18
Figura 06 - Biossíntese de flavonóides	20
Figura 07 - Fracionamento das folhas de <i>S. leucanthum</i>	24
Figura 08 - Fracionamento da madeira de <i>S. leucanthum</i>	25
Figura 09 - Estrutura da rutina.....	31
Figura 10 - Procedimento experimental utilizado na análise quantitativa do potencial antioxidante.....	31
Figura 11 - Gráficos da porcentagem de Atividade Antioxidante <i>versus</i> concentração dos extratos brutos das folhas e madeira da <i>Sparattosperma</i> <i>leucanthum</i>	33
Figura 12 - Procedimento experimental do bioensaio da Letalidade contra Larvas de <i>Artemia salina</i> leach	36
Figura 13 - Antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções provocadas por fungos.....	41
Figura 14 - Fotos do Ensaio bilógico.....	45
Figura 15 - Espectro de cromatografia a gás da mistura de fitoesteróides (SLFD- 02).....	48
Figura 16 - Fragmentograma de massas de baixa resolução do Campesterol (SLFD-02 a).....	48
Figura 17 - Fragmentograma de massas de baixa resolução do Estigmasterol(SLFD-02 b).....	49
Figura 18 - Fragmentograma de massas de baixa resolução do Sitosterol (SLFD-02 c).....	49

Figura 19 - Espectro de RMN ¹³ C- PENDANT da subfração SLFD- 02 a-c.....	50
Figura 20 - Espectro de Cromatografia a gás da mistura de substâncias.(SLFD-03 a-b).....	51
Figura 21 - Fragmentograma de massas de baixa resolução do Etil linalool (SLFD-03 a).....	51
Figura 22 - Fragmentograma de massas de baixa resolução do lupeol (SLFD-03 b).....	52
Figura 23 - Espectro de Cromatografia a gás da mistura de substâncias (SLFD-03 c-d).....	52
Figura 24 - Espectro de Massas de baixa resolução da 5,6,7,7,tetraidro-4,4,7-bezofuranona (SLFD-03 c).....	53
Figura 25 - Espectro de Massas de baixa resolução do acetato do 7-metiltetradecen-1-ol (SLFD-03 d).....	53
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C APT do extrato (SLFM).....	54
Figura 27 - Estrutura das substâncias identificadas no extrato em diclorometano das folhas de <i>Sparattosperma leucanthum</i> (SLFD).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Ocorrência de lapachol em famílias e espécies.....	11
Tabela 02 - Porcentagem de Atividade Antioxidante <i>versus</i> concentração dos extratos brutos das folhas e madeira de <i>Sparattosperma leucanthum</i>	32
Tabela 03 - Concentração efetiva (CE ₅₀) obtida para os extratos brutos da madeira e folhas da espécie <i>Sparattosperma leucanthum</i>	33
Tabela 04 - Resultados do ensaio com larvas de <i>Artemia salina</i>	37
Tabela 05 - Alguns fungos patógenos para o homem e as enfermidades que produzem.....	42
Tabela 06 - Fungos utilizados no ensaio.....	43
Tabela 07 - Escala química do deslocamento e atribuições químicas.....	46
Tabela 08 - Substância <i>versus</i> tempo de retenção em cromatografia á gás	48
Tabela 09 - Substância <i>versus</i> tempo de retenção em cromatografia á gás.....	51
Tabela 10 - Substância <i>versus</i> tempo de retenção em cromatografia á gás da mistura (SLFD-03 c-d).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
Ax	Axial
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada á espectrometria de massas
DL ₅₀	Dose letal suficiente para matar 50% da população testada
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
CE ₅₀	Concentração efetiva para reduzir 50% dos radicais livres
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
TAS	Teste de letalidade frente ás larvas de <i>Artemia Salina</i>
TMS	Tetrametilsilano
SLFD	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> folha-diclorometano
SLMD	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> madeira-diclorometano
SLMMH	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> madeira-metanol/água
SLFM	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> folha-metanol
SLFMH	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> folha-metanol/água
SLMH	<i>Sparattosperma Leucanthum</i> madeira- hexano

RESUMO

AZEVEDO, Fernanda Mendes de; Universidade Estadual do norte Fluminense; Novembro de 2007; Avaliação Biológica dos Extratos Brutos da Folhas e Caule da Espécie *Sparasttosperma leucanthum*. Orientadora: Leda Mathias.

O presente trabalho visou à avaliação da atividade antioxidante, avaliação biológica e avaliação do perfil químico dos extratos brutos das folhas e caule da espécie *Sparasttosperma leucanthum*.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do método que utiliza o 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil como radical livre.

A avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos foi realizada utilizando-se o método proposto por McLaughlin para larvas de *Artemia salina*.

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos foi realizada utilizando o método de difusão em agar, e cepas de espécies de *Candida*

A análise do perfil químico dos extratos brutos foi realizada através de observação de espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 através dos experimentos unidimensionais PENDANT e APT e cromatografia de gás acoplada ao espectrômetro de massas.

t. Introdução

Desde que o homem deixou o jardim do Éden, as plantas têm lhe servido, como alimento e fonte de medicamentos. O mais provável é que, pela experimentação direta, a humanidade foi aprendendo a distinguir as plantas úteis e seus efeitos benéficos, daquelas sem qualquer efeito terapêutico ou tóxico, bem como o processamento e combinações que poderiam ser usados para a obtenção de resultados positivos.

De fato através dos séculos, a medicina tradicional, baseada nas propriedades terapêuticas das plantas, tem evoluído em sintonia com a composição da flora em dado local, com os aspectos culturais e religiosos em todas as partes do mundo, direcionado em muitos casos, o processo de obtenção de novas drogas de importância à saúde humana tais como: benzilpenicilina, taxol, vincristina, vimblastina, ajmalicina, atropina, digoxina, morfina, quinina, hiosciamina, berberina, ácido salicílico e artemisinina. Atualmente o uso de plantas com base na medicina tradicional representa cerca de 85% dos processos terapêuticos utilizados em países em desenvolvimento e nos países do ocidente. (Pezzuto, 1997; Contin, 1999 citado por Yunes *et al.* 2001)

Em um levantamento realizado na década de oitenta foram identificadas 121 substâncias oriundas de 95 espécies vegetais, usadas correntemente na medicina ocidental. Além disto, do total de medicamentos aprovados no período 1983 -1994, cerca de 6% são produtos naturais, 24% são derivados destes e 9% foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica com base em produtos naturais (Yunes & Calixto, 2001).

Os estudos científicos na área de produtos naturais têm sido conduzidos há mais de um século e, somente na última década, um total de 3500 novas substâncias vêm anualmente sendo descobertas, com a elucidação de suas estruturas químicas (Farnsworth, citado por Yunes *et al.* 2001). Deste total, 2619 substâncias foram isoladas a partir de espécies vegetais superiores (Abelson, 1990, citado por Yunes *et al.* 2001). Como estimativa, admite-se que aproximadamente 110.000 estruturas químicas de substâncias foram identificadas, sendo os terpenóides (aproximadamente 33.000 substâncias), o maior grupo, seguido dos

alcalóides com cerca de 16.000 substâncias (Hegnauer, 1992 citado por Yunes et al. 2001).

Estes metabólitos caracterizam-se, geralmente, por sua ocorrência restrita a alguns grupos taxonômicos, não sendo considerados vitais à manutenção das funções celulares e, portanto, à vida do organismo como um todo, mas desempenham um importante papel no que se refere às interações do indivíduo com os fatores bióticos e abióticos de seu ambiente (ação repelente ou atrativa de insetos ou vertebrados e interações entre plantas e microorganismos, por exemplo, garantindo a sobrevivência do organismo em seu ecossistema). Além de medicamentos, substâncias com uma série de outras atividades têm sido estudadas, como por exemplo, cosméticos, agrotóxicos e inseticidas entre outras.

Nesse contexto a espécie *Sparattosperma leucanthum* (Bignoniaceae) surge como modelo para esse estudo interdisciplinar, devido à diversidade de atividades biológicas encontradas em metabólitos isolados de espécies da família Bignoniaceae. Dentre estas propriedades podemos destacar a atividade antimicrobiana, antiprotozoário e antiinflamatória (Binutu et al., 1996). O interesse pelo estudo desta espécie reside no possível isolamento de substâncias com provável bioatividade, visto que lignanas e fenilpropanóides (Kanchanapoon et al., 2001), antraquinonas, naftoquinonas e quinonas (Kanchanapoon et al., 2002), glicosídeos fenólicos (Onegi et al., 2002) e flavonóides (Kutney et al., 1970) com diversas propriedades biológicas foram isolados de espécies da família Bignoniaceae.

A literatura cita ainda as propriedades anti-leishmanial, antimalarial, antitumoral (Mingarro et al., 2003), antidiabética (Hammouda, 1966) e também a utilização no tratamento de distúrbios coronarianos e cerebrovasculares (Bruneton, 1995). Dentro da família destaca-se a espécie *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl., "Ipê roxo", bastante conhecida por seus efeitos depurativos, antigripal, antireumático, antianêmico, antidiabético e antitumoral

2. Revisão da Literatura

2.1. A Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae é conhecida popularmente através de suas propriedades antimicrobiana, antiprotozoário e antiinflamatória. Seus representantes apresentam-se como árvores tropicais ou arbustos compreendendo cerca de 100 gêneros com aproximadamente 800 espécies (Binutu *et al.*, 1996) largamente distribuídas em regiões tropicais da América do Sul e África (Gentry, 1974; Munoz, *et al.*, 2003). Algumas espécies são cultivadas e utilizadas como plantas ornamentais há bastante tempo (Munoz, *et al.*, 2003) (Figura 1, p. 5). A família esta dividida em oito tribos ou grupos (Munoz, *et al.*, 2003).

- Tecomeae
- Bignonieae
- Crescentieae
- Eccremocarpeae
- Tourrettieae
- Oroxyleae
- Coleeae
- Schlegelieae

Das oito tribos somente as três primeiras são encontradas no Brasil. Embora Bignoniaceae seja uma família relativamente grande, somente um número limitado de espécies foi estudado quimicamente, dentre elas podemos citar: *Amphilophium paniculatum*, *Macfadyena unguis-cati*, *Pyrostegia venusta*, *Jacaranda micranta* Cham., *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau, *Tecoma sambucifolia* Kunth. e *Tecoma stans* (L.) Juss, com propriedade antiinflamatória, antireumática, antisifilítica, anticonceptiva e narcótica (Munoz, *et al.*, 2003).

2.2. A Espécie *Sparattosperma leucanthum*

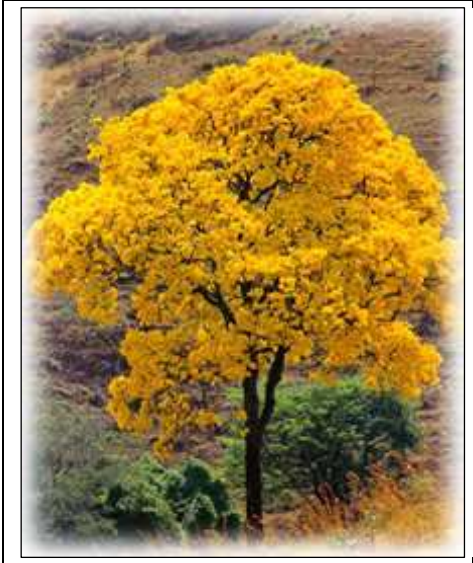
Sparattosperma leucanthum de acordo com a classificação taxonômica do Missouri Botanic Garden-MBG-W³ Trópicos, pertence à família Bignoniaceae, subclasse Asterideae, ordem Lamiales.

A espécie *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) Schum. (sinonímia botânica: *S. vernicosum* Bur & Schum., *Bignonia leucantha* Vell., *S. lithontripticum* M., *Spathodea vernicosa* Cham., *Tecoma leucantha* All. e *T. subvernica* DC.) (figura 1, p. 5) é conhecida popularmente como “caroba-branca” (SP), “caroba-de-flor-branca”, “cinco - chagas”, “cinco - folhas” (ES, MG), “ipê-batata”, “ipê-bóia”, “ipê-branco” e “tarumã” (MG). É uma árvore que atinge de 6 a 14 m de altura, de tronco descamante de 30 a 50 cm de diâmetro; possui folhas compostas 5-digitadas, sustentadas por pecíolo de 6 a 12 cm e folíolos de 10 a 15 cm de comprimento por 4 a 5 cm de largura (Lorenzi, 2000).

Suas regiões de ocorrência são os estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, em várias formações vegetais. A madeira apresenta-se leve (densidade 0,57 g/cm³), firme, dotada de fibras retas e superfície luzidia, de baixa durabilidade natural. Apresenta florescimento de março a janeiro, com floração branca e rósea não muito vistosa (Figura 1, p. 5); seus frutos amadurecem nos meses de agosto a novembro (Lorenzi, 2000).

A madeira tem sua aplicação principalmente na construção naval, obras internas na construção civil, carpintaria e caixotaria . A árvore é bastante ornamental, tanto pelo seu florescimento como por sua copa de ramos pendentes; pode ser aproveitada no paisagismo em geral. Por ser uma árvore de rápido crescimento, pode ser aproveitada também para plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente.

A análise dos dados químicos existentes na literatura sobre espécies do gênero *Sparattosperma* deixa claro que poucas delas tiveram um estudo fitoquímico completo.



Tabebuia chrysotricha
(Ipê amarelo)



Tabebuia pentaphylla
(Ipê rosa)



Sparattosperma leucanthum
(Ipê branco)

Figura 1. Detalhe das folhas e flores de espécies de Ipê

2.3. Divisão Taxonômica

A espécie *Sparattosperma leucanthum* esta classificada taxonomicamente como mostrado no Figura 2.

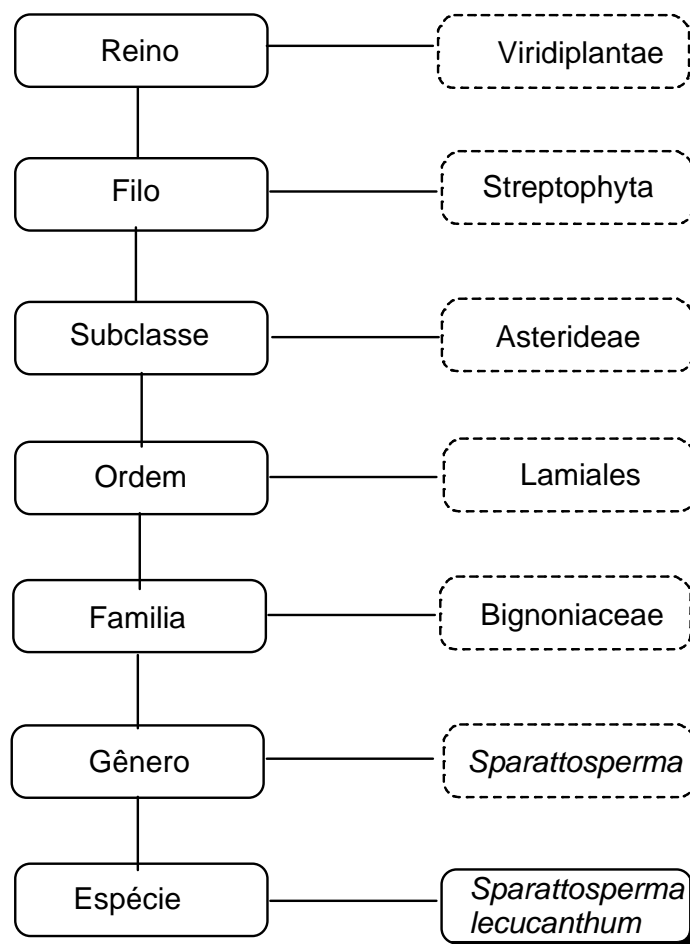


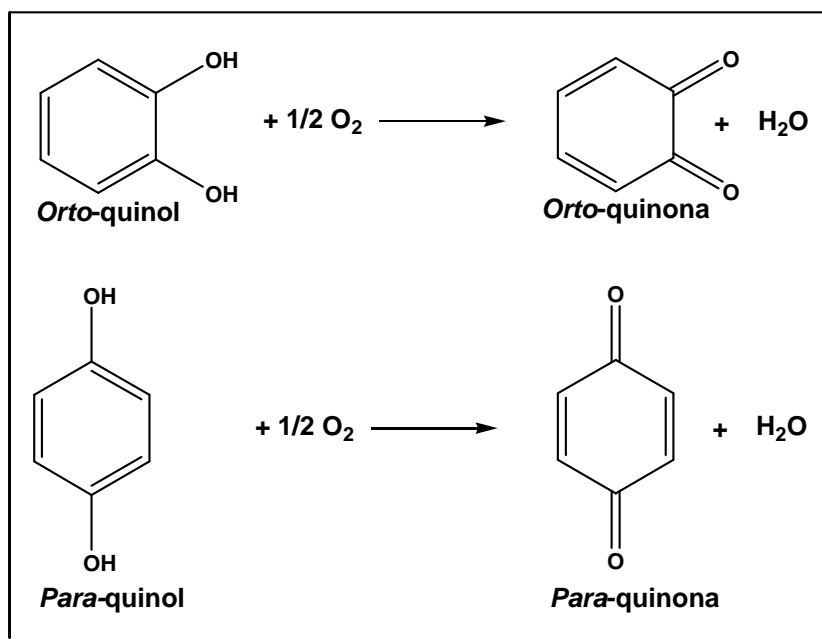
Figura 2. Divisão Taxonômica da espécie *S. leucanthum*

2.4. Considerações sobre as principais classes de substâncias encontradas em espécies da família Bignoniaceae

No que diz respeito à química de espécies da família Bignoniaceae, os grupos metabólicos registrados com maior regularidade são lignanas e fenilpropanóides (Kanchanapoon *et. al.*, 2001), antraquinonas, naftoquinonas e quinonas (Kanchanapoon *et. al.*, 2002), glicosídeos fenólicos (Onegi *et. al.*, 2002) e flavonóides (Kutney *et. al.*, 1970).

2.4.1. Quinonas, Antraquinonas e Naftoquinonas

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos (micromoléculas) especiais derivados da oxidação de substâncias fenólicas, catecóis (1,2-diidroxibenzeno) que dão origem as *orto*-quinonas e quinóis (1,4-diidroxibenzeno) as *para*-quinonas (Esquema 1). Conseqüentemente, as quinonas são formadas a partir de sistemas fenólicos gerados da via do chiquimato ou do acetato (Dewick, 1998).



Esquema 1. Oxidação de *orto* e *para*-quinóis

Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. Na natureza, estão envolvidas em etapas importantes do ciclo vital dos seres vivos, principalmente no sistema de transporte de elétrons na cadeia respiratória e fotossíntese (Dewick, 1998). As naftoquinonas, como por exemplo, as vitaminas do tipo K 14 (Figura 3, p. 9), de irrestrita necessidade aos seres vivos, possuem ação controladora da coagulação sanguínea (Barreiro *et al.*, 1996).

Em estudos farmacológicos as quinonas mostram variado biodinamismo, destacando-se, dentre muitas, as propriedades antimicrobiana, tripanossomicida, viruscida, antitumoral e inibidora de sistemas celulares reparadores (Silva *et al.*, 2003), processos nos quais atuam de diferentes formas. Quinonas podem, por exemplo, induzir a atividade chamada de estresse oxidativo que é a formação endógena de espécies bioativas deletérias derivadas do oxigênio, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, (Matés *et al.*, 2000). Outra atividade importante é a inibição de topoisomerase, que provoca o desencadeamento da apoptose celular ou relógio biológico, levando a célula maligna a morte. Apoptose celular é a resposta celular a “injurias” tais como, radiação UV ou dano físico ou infecção viral. A interferência das quinonas na apoptose constitui-se hoje em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, existindo grande expectativa quanto à delineação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias, principalmente as relacionadas ao câncer de próstata (Silva *et al.*, 2003).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico:

- Naftoquinonas: lapachol **1**, lapachonona **2**, lawsona **3**, Juglona **4**, plumbagina **5**, vitamina K **6**.
- Benzoquinonas: α -lapachona **7** e β -lapachona **8**.
- Antraquinona: antraquinona **9**, crisofanol **10** e aloe-emodina **11**.

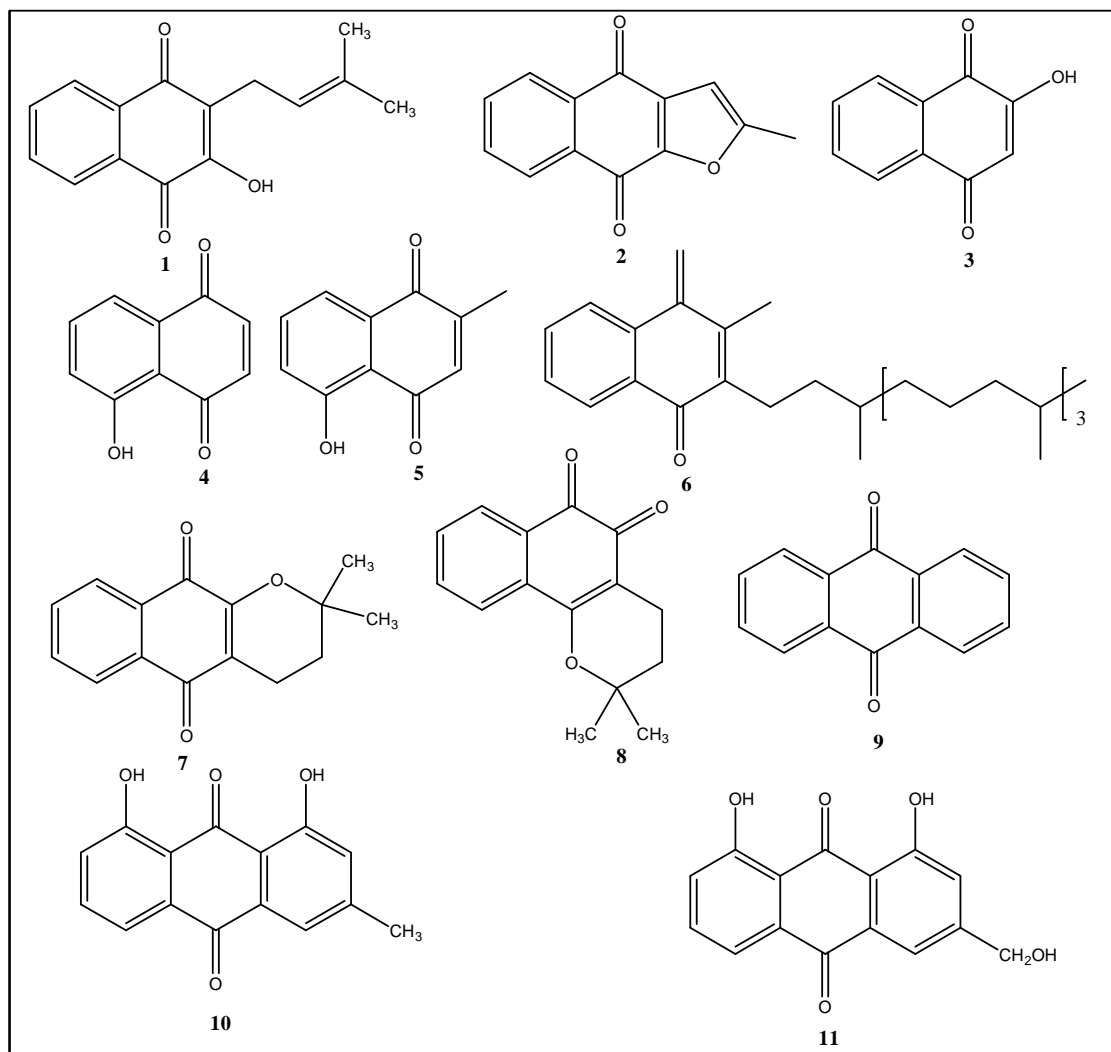


Figura 3. Exemplos de quinonas

Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, especialmente de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, pode-se citar o grande número de fármacos neste grupo de substâncias com aplicações práticas

reconhecidas. Alguns, inclusive, comercializados, como por exemplo, os laxantes naturais (Cáscara Sagrada, Sene e Ruibarbo), as vitaminas K, as mitomicinas e as antraciclinas. A química das quinonas, já há muito vem sendo descrita em vários estudos, em inúmeras revisões, estando assim bem documentada sua evolução ao longo do tempo (Silva *et al.*, 2003).

As quinonas se distribuem amplamente no reino vegetal, sendo que na família Bignoniaceae predominam as naftoquinonas (Bruneton, 1995). A atividade microbiciada das naftoquinonas se dá pela nucleofilicidade destas moléculas, o que gera citotoxicidade para alguns microrganismos.

As naftoquinonas são ainda responsáveis por episódios alérgicos (conjuntivites, rinites, dermatites), entre elas o lapachol **1** e outras presentes nos gêneros *Tabebuia* e *Tecoma* são identificadas como causadoras desses episódios. O potencial alergênico de várias quinonas (benzo e naftoquinonas) é devido ao fato delas agirem combinando-se, através de seu centro eletrofílico, com as funções amina e tiol das macromoléculas, induzindo a dermatite por sensibilização (Bruneton, 1995).

As naftoquinonas se apresentam com coloração que vai do amarelo ao laranja e, em alguns casos, são utilizadas em produção de cosméticos, como por exemplo, a naftoquinona lawsona **3** isolada das folhas de *Lawsonia inermis* (Henna). A Henna tem sido utilizada como pigmento para cabelos e corpo a mais de 4000 anos (Thomson, 1971, citado por Lemos *et al.*, 2007). Porém, dentre todas as naftoquinonas biologicamente ativas, destaca-se o lapachol **1** que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias, sendo encontrado como constituinte de várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae, Sapotaceae, Scrophulariaceae, Malvaceae e Proteaceae, entretanto, sua ocorrência maior é na família Bignoniaceae (Tabela 1, p. 11). (Hussain, 2007).

Lapachol **1** foi isolado pela primeira vez por E. Paterno da espécie *Tabebuia avellanedae*, conhecida como “pau d’ arco” em 1882. No Brasil a madeira do “pau d’arco” é usado como analgésico, antiinflamatório, antineoplásico e diurético por populações da região nordeste do Brasil (Hussain, 2007).

Tabela 1. Ocorrência de lapachol em famílias e espécies

Família	Espécie
Bignoniaceae	<i>Tabebuia flavescens</i> Benth. - & Hook. F. ex Griseb
	<i>T. guayacan</i> Hemsl
	<i>T. avellanedae</i> Lor. ex Griseb.
	<i>T. serratifolia</i> (Vahl.) Nichols
	<i>T. rosa</i>
	<i>T. bata</i> (E.Mey) Sandw
	<i>T. pentaphylla</i> (Linn) Hemsl.
	<i>T. heptaphylla</i>
	<i>Haplophragma adenophyllum</i>
	<i>Heterophragma adenophyllum</i>
	<i>Kigelia pinnata</i>
	<i>Phyllarthron comorense</i>
	<i>Radermachera sinica</i>
	<i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlms
	<i>Tecoma araliaceae</i> DC.
	<i>T. undulata</i>
	<i>Stereospermum suaveolens</i> DC.
	<i>S. kunthianum</i>
	<i>Zeyhera digitalis</i>
	<i>Z. tuberculosa</i>
	<i>Milingtonia hortensis</i> Linn
	<i>Stereospermum tetragonum</i> DC.
	<i>Stereospermum personatum</i>
	<i>Catalpa longissima</i>
	<i>Cybistax antisyphilitica</i>
	<i>Macfadyena unguis-cati</i>
	<i>Melloa quadrivalvis</i>
	<i>Newbouldia laevis</i>

Tabela 1. Continuação

Família	Espécie
Verbenaceae	<i>Tectona grandis</i> L.fil
	<i>Avicennia tomentosa</i> Jacq
	<i>Avicennia officinalis</i>
Proteaceae	<i>Conospremum teretifolium</i> R.Br.
Leguminosae	<i>Diphysa robinoide</i> Bent
Sapotaceae	<i>Bassia latifolia</i>
Malvaceae	<i>Hibiscus tiliaceus</i>
Scrophulariaceae	<i>Paulownia kawakamii</i>
Scrophulariaceae	<i>Paulownia kawakamii</i>

2.4.2. Atividades farmacológicas do lapachol e seus derivados

Entre as atividades farmacológicas atribuídas ao lapachol e seus derivados semi-sintéticos citamos atividade antimicrobiana e antifúngica (Garnier *et al.*, 1996); atividade cercaricida contra *Schistosoma mansoni* (Austin *et al.*, 1974); moluscicida (contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*) (Santos *et. al.*, 2000); leishmanicida (ação intracelular nas formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*) (Teixeira *et al.*, 2001); tripanossomicida (contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da “doença de Chagas” em sua fase tripomastigota) (Goulart *et al.*, 1997); antimalárico (contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*) (Carvalho *et al.*, 1988); uso contra enteroviroses (Pinto *et al.*, 1987); antiinflamatória (Almeida, 1990); antineoplásica (Santana *et al.*, 1968) e antiulcerante (Goel *et. al.*, 1987). Há ainda relatos da forte atividade anticonceptiva em ratas, ocasionando 100% de mortalidade feto/embrião sem, contudo, causar aparente efeito tóxico sobre os animais (Morrison *et al.*, 1970; Guerra *et al.*, 1999).

Diante das várias atividades farmacológicas atribuídas ao lapachol muitas têm sido as tentativas de modificação estrutural desta substância.

As reações utilizando o lapachol como ponto de partida iniciou-se no final do século XIX, dando origem as fenazinas **13** e com a *nor-β*-lapachona **14** dando diversos derivados (Figura 4) (Silva *et al.*, 2005), estabelecendo-se inclusive estudos da relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados da lapachona (Ferreira *et al.*, 2006). Outros exemplos de reações com a *-β*-lapachona são mostrados no Esquema 2.

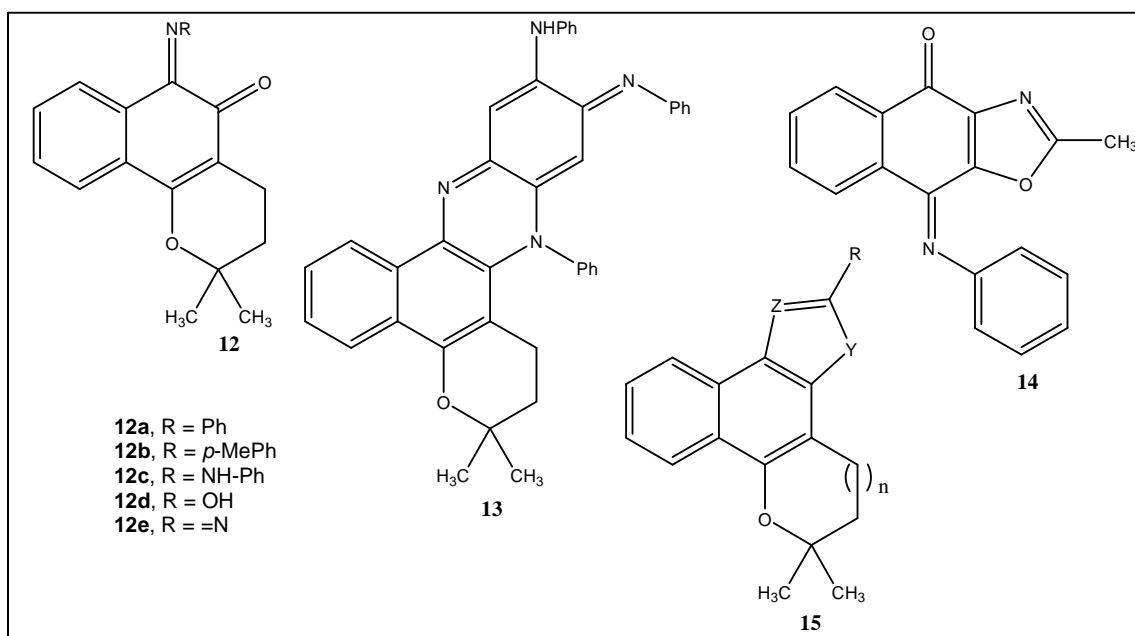
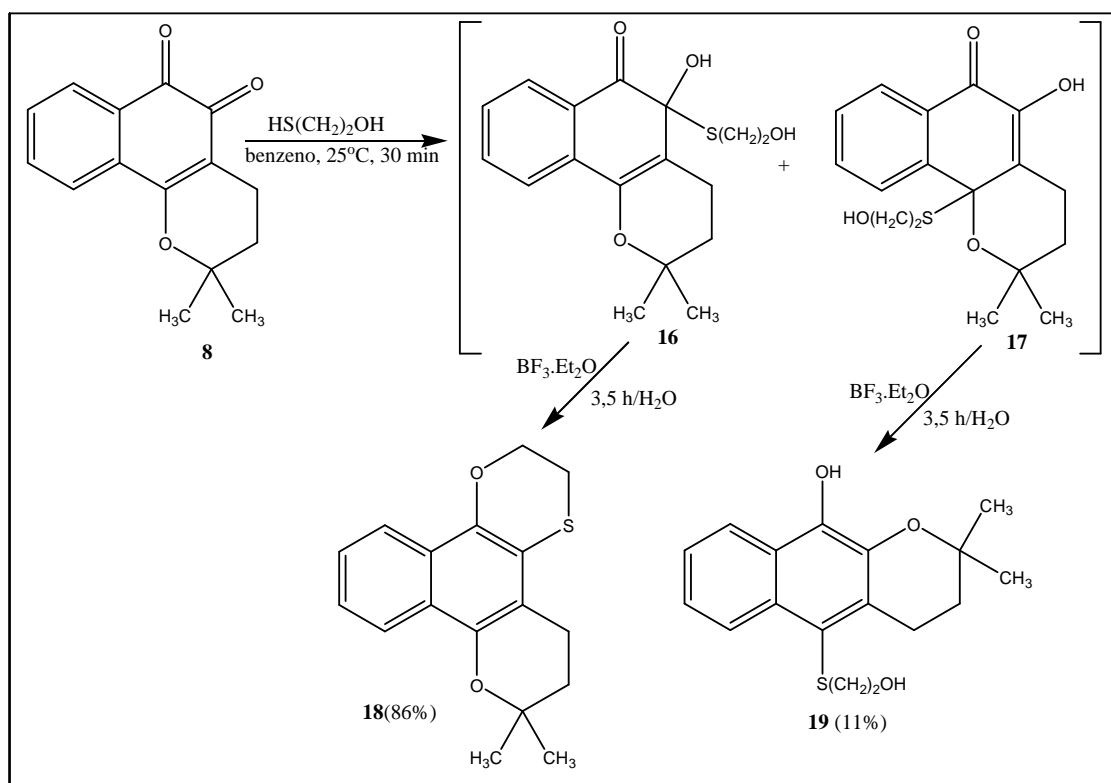


Figura 4. Quinoniminas derivadas da β -lapachona

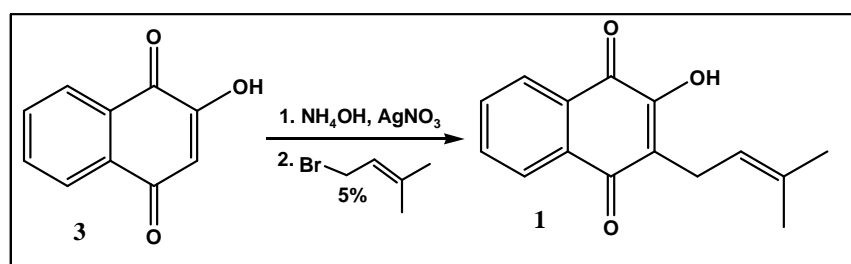
Desse modo, a classe das quinonas mostra-se como uma importante fonte para pesquisa sobre seus efeitos nos organismos vivos, e passíveis de modificações estruturais que possibilitem um maior aproveitamento de sua ação farmacológica.



Esquema 2. Reação da β -lapachona **8** com o mercaptoetanol

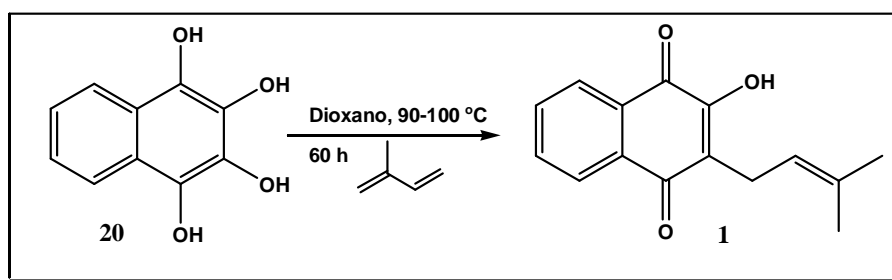
2.4.2.1. Síntese do lapachol

A primeira tentativa de síntese do lapachol foi feita por Fieser (1927) a partir da 2-hidroxi-naftoquinona com um rendimento de 5%. (Esquema 3).



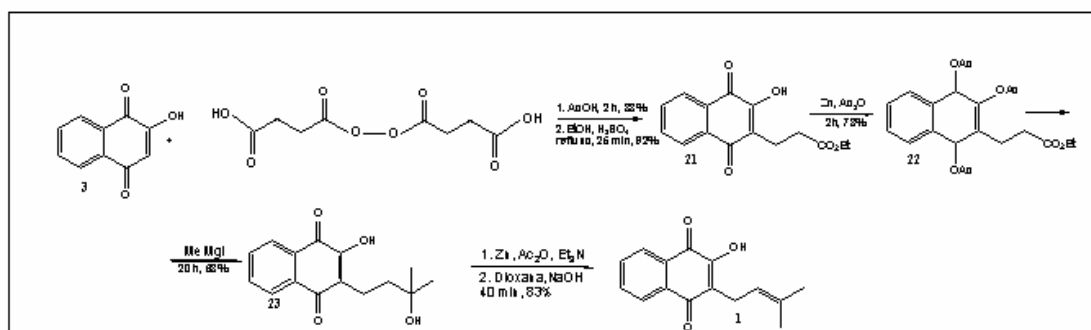
Esquema 3. Primeira tentativa de síntese do lapachol

Em 1948 Gates e Moesta realizaram a síntese do lapachol a partir da condensação da leucoisonaftazarina com isopreno. (Esquema 4).



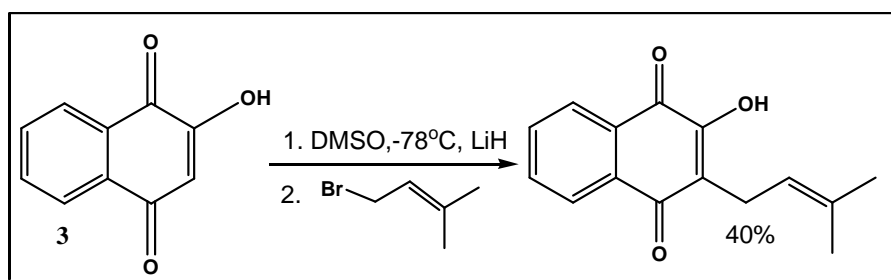
Esquema 4. Síntese do lapachol a partir da leucoisonaftazarina

Pettit & Houghton (1968, 1971) obtiveram o lapachol através da síntese total com um rendimento de 35%. (Esquema 5).



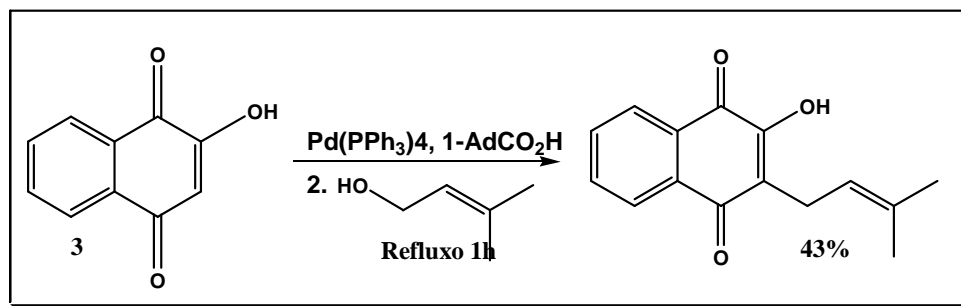
Esquema 5. Síntese total do lapachol

A síntese em larga escala do lapachol foi realizada por Sun e Geiser (1998) a partir da lawsona **3** (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) com um rendimento de 40%. (Esquema 6).



Esquema 6. Síntese em larga escala do lapachol

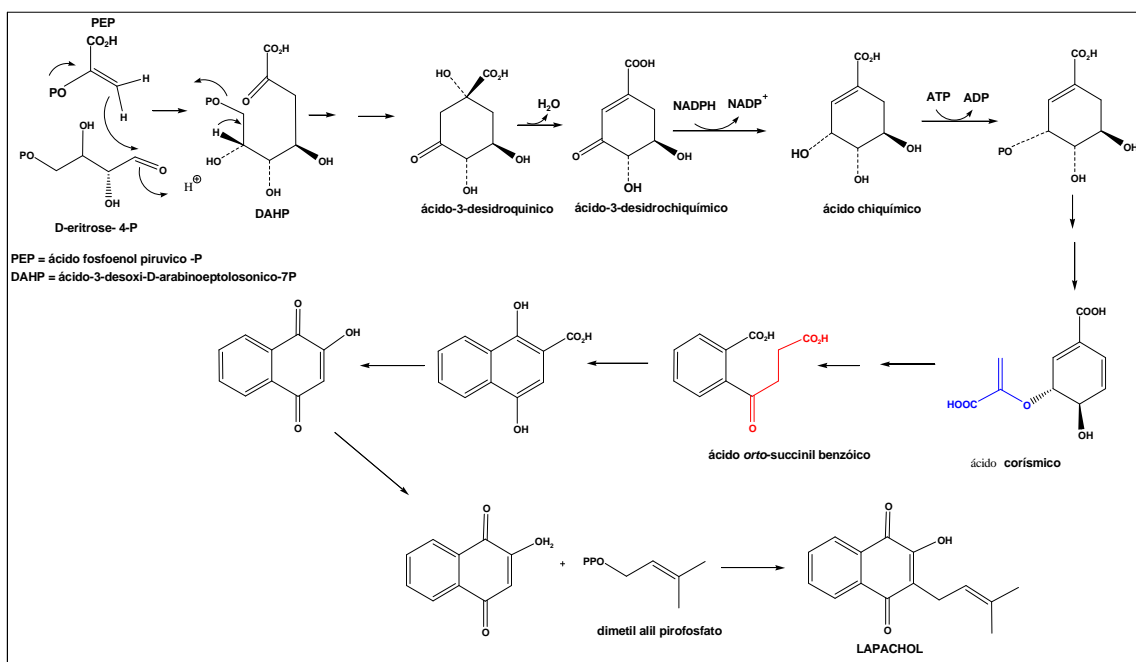
Mais recentemente Kazanti (2007) reportou a síntese do lapachol com 43% de rendimento (Esquema 7).



Esquema 7. Síntese do lapachol

2.4.2.2. Biossíntese do lapachol

A biossíntese do lapachol a partir da via do chiquimato esta resumido no esquema 8.



Esquema 8. Biossíntese do lapachol

2.4.3. Flavonóides e derivados

Flavonóide no sentido mais amplo do termo são pigmentos de plantas. Frequentemente solúveis em água, essas substâncias são responsáveis pela coloração das flores, frutos e algumas vezes das folhas. De acordo com a sua estrutura química, são classificados em: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianidinas e chalconas (Bruneton, 2000).

Atualmente essas substâncias têm despertado grande interesse devido aos efeitos benéficos sobre a saúde humana. Têm sido relatadas atividades antivirais (Kaul, 2005), antialérgicas (Broner, 1985; Cheong, 1998), antiinflamatórias (Bankova, 1983; Greco, 2006), antitumorais (Akbay, 2003; Ferrer, 2006; Rubio, 2006) e antioxidantes (Cao, 1997; Isla, 2001; Mojsilove, 2001).

Antioxidantes são substâncias que protegem as células contra os efeitos prejudiciais provocados por espécies reativas de oxigênio, tais como o oxigênio singlete, superóxido, radicais peroxil e hidroxil. Um desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio resulta em estresse oxidativo e como consequência a danos celulares.

Estresse oxidativo esta ligada a doenças como cancro, envelhecimento precoce, aterosclerose, lesão isquêmica, inflamação e doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer's) (Logroscino, 1996; Ebadi, 1996; Engelhart, 2002; Morris, 2002; Contreras, 2004; Cuneo, 1999). Estudos epidemiológicos mostraram que a ingestão de flavonóides esta inversamente relacionada com a mortalidade por doença coronariana e com a incidência de ataques cardíacos. A oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenha um papel importante na aterosclerose. O sistema imunológico das células, os macrófagos reconhecem e fagocitam LDL oxidado, processo este que leva à formação de placas ateroscleróticas nas paredes arteriais. Vários estudos têm demonstrado que certos flavonóides podem proteger o colesterol LDL de ser oxidado (Hayek *et al.*, 1997).

A capacidade de um flavonóides para agir como antioxidante depende da sua estrutura molecular. A posição dos grupos hidroxilas e outras funções na estrutura são importantes para a atividade antioxidante e capturadora de radicais livres.

Quercetina, um dos mais abundantes flavonóides encontrados na dieta humana é um potente antioxidante, pelo fato de possuir todas as características estruturais (hidroxilas fenólicas que quando oxidadas, produzem radicais facilmente estabilizados por ressonância) necessárias para a atividade capturadora de radicais livres (<http://ipi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>, acessado em 7/11/2007).

Os flavonóides encontrados na natureza com maior capacidade antioxidante são: quercetina **24**, encontrado em legumes, peles de frutas, cebolas; xantoumol **25**, chalcona encontrada no lúpulo e cerveja; Isoxantoumol **26**, flavonona prenilada encontrada no lúpulo e cerveja; genisteína **27**, isoflavona encontrada na soja e os pró-antioxidantes, chalconaringenina **28**, chalcona não prenilada encontrada em cítricos e narigenina **29**, flavonona não prenilada encontrada em cítricos (Oregon, 2000), (Figura 5).

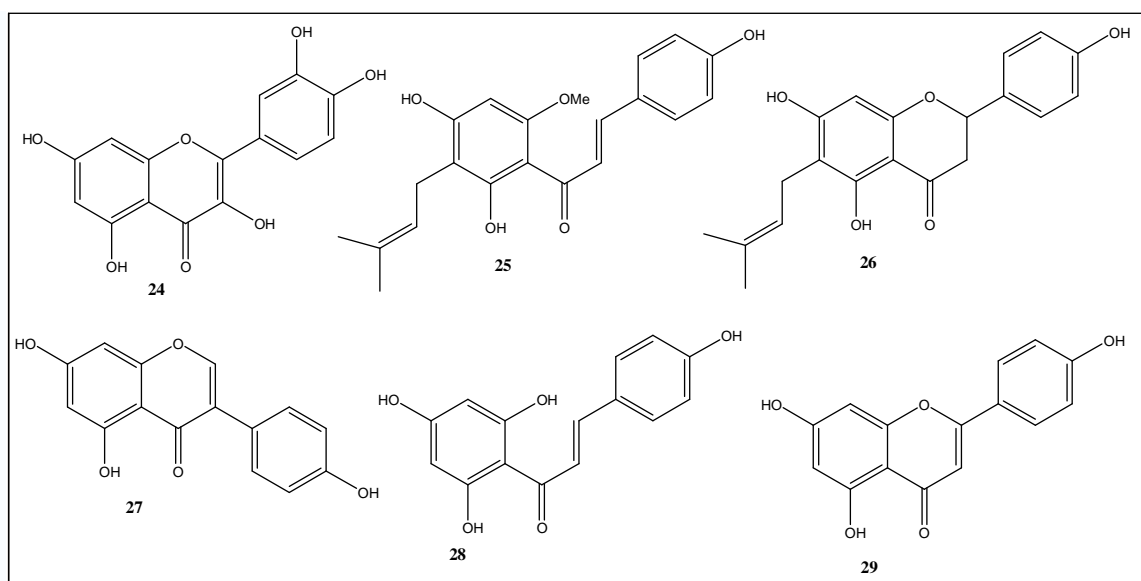


Figura 5. Exemplos de flavonóides antioxidantes e pró-antioxidantes

2.4.3.1. Atividade biológica de flavonóides

A principal atividade atribuída aos flavonóides é a sua atuação sobre os vasos capilares, diminuindo sua fragilidade e permeabilidade. Esta atividade confere aos flavonóides o *status* de “vitamina P” em referência ao termo fator P (fator de permeabilidade capilar). Propriedades tais como, capturadora de radicais livres, inibidora enzimática também são atribuídas aos flavonóides (Bruneton, 1995).

Nas plantas os flavonóides estão amplamente distribuídos e cumprindo várias funções, incluindo a produção de pigmentação nas flores e proteção contra ataques de micróbios e insetos. A ampla distribuição de flavonóides, a sua diversidade e a sua toxicidade relativamente baixa, em comparação com outras substâncias ativas vegetais (por exemplo, alcalóides) significam que muitos animais, incluindo os seres humanos, ingerem quantidades significativas na sua dieta. Eles apresentam também atividade antialérgica (Bronner & Landry, 1985; Cheong *et al.*, 1998), antiinflamatória (Otimenyin, 2004; Greco *et al.*, 2006; Bankova *et al.*, 1983), antiviral (Kaul *et al.*, 1985) e antimicrobiana.

Atualmente consumidores e fabricantes de alimentos aumentaram seu interesse em plantas (vegetais) contendo flavonóides devido as suas propriedades medicinais, em especial o seu papel na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares.

2.4.3.2. Biossíntese de flavonóides

Flavonóides são biossintetizados a partir de duas vias metabólicas distintas: a via do chiquimato e a via do acetato. A condensação de três unidades de malonilCoA (anel A) e uma unidade de ácido cinâmico (anel B), seguida de ciclização forma o anel central pirânico (anel C). O passo chave na formação de flavonóides é a condensação das três unidades de malonilCoA, catalisada pela enzima chalcona sintase e um derivado do ácido cinâmico, o 4-hidroxicumarilCoA que tem como produto final a chalcona. A enzima chalcona isomerase induz a ciclização da chalcona produzindo a flavona (Bruneton, 2000; Dewick, 1997). A biossíntese de flavonóides está resumida na (Figura 6).

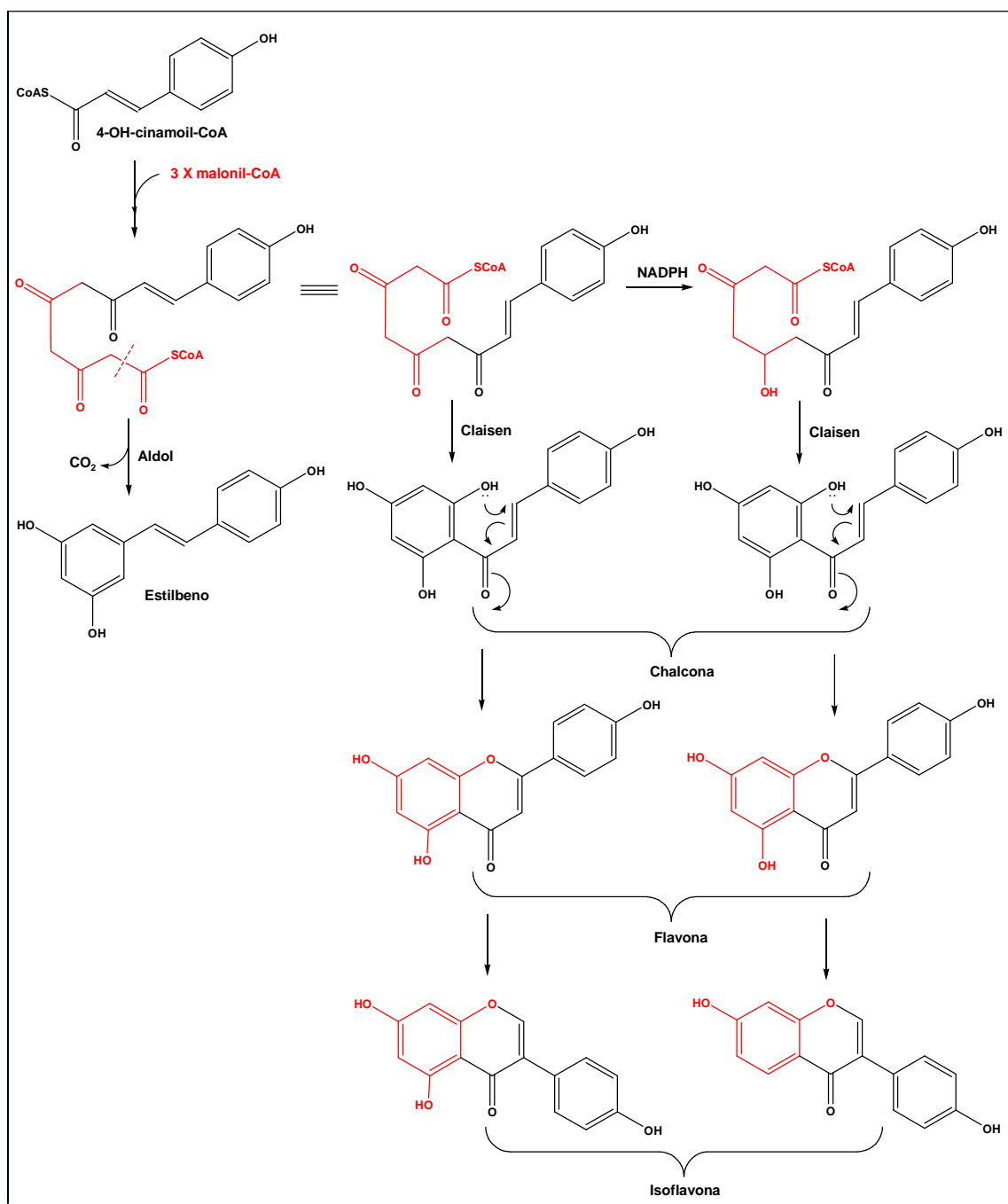


Figura 6. Biossíntese de flavonóides

3. Objetivos

O principal objetivo desta monografia é o aprendizado da metodologia científica a ser utilizada nos seguintes itens práticos:

- Avaliação do potencial antioxidante dos extratos brutos da madeira e folhas da espécie *Sparattosperma leucanthum*, utilizando o método do radical livre DPPH;
- Avaliação da letalidade dos extratos brutos da madeira e folhas da espécie *Sparattosperma leucanthum* frente às larvas de *Artemia salina* Leach;
- Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos da madeira e folhas da espécie *Sparattosperma leucanthum*, utilizando cepas de *Candida albicans*;
- Aprendizado de técnicas assépticas utilizadas na avaliação da atividade biológica;
- Aprendizado de técnicas espectrofométricas (UV) e espectrométricas (CG-EM) utilizadas na rotina de um laboratório de química orgânica.
- Verificação do Perfil Químico dos extratos brutos ativos.

4. Materiais e Reagentes utilizados

- Na etapa de extração foram utilizados solventes Synth e Vetec;
- A concentração dos extratos foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Büchi B-480 e Fisatom 802;
- Nas etapas de fracionamento e purificação, foram utilizadas, sílica gel 60G (0,063-0,200 mm) Merck, sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) Merck, sílica gel silanizada 60 (0,063-0,200 mm) Merck .
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck;
- As cromatoplasmas foram reveladas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda $\lambda = 254$ e 366 nm e/ou com reveladores cromatogênicos [vanilina sulfúrica e solução etanólica de sulfato cérico 20%].
- Os cromatogramas e os espectros de massas (CG-EM) foram obtidos em aparelhos CGMS-QP5050 Shimadzu.
- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetros Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C .

5. Procedimento experimental

5.1. Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado através de pesquisas bibliográficas de periódicos em bibliotecas e em sítios disponíveis na INTERNET.

5.1.2. Material botânico: coleta e identificação

As folhas e a madeira de um espécime de *S. leucanthum* foram coletadas no Município de Seropédica - RJ. A espécie foi identificada pela botânica Denise Braz Monte.

5.1.3. Secagem e moagem do material vegetal

O material vegetal após seco à temperatura ambiente foi moído em moinho do tipo Willey.

5.1.4. Preparação dos extratos brutos

5.1.4.1. Folhas

As folhas de *S. leucanthum* após secas e moídas foram pesadas obtendo-se uma massa de 682,0 g. Em seguida foram submetidas à extração por maceração exaustiva em ordem crescente de polaridade utilizando os seguintes solventes e obtendo as respectivas massas de extratos: hexano 39,83 g, (5,8 % da massa do material seco), diclorometano 14,16 g, (2,07 % da massa do material seco), metanol 21,74g, (3,19% da massa do material seco) e metanol/água (80:20) 15,58 g, (2,28% da massa do material seco) (Figura 7, p. 24).

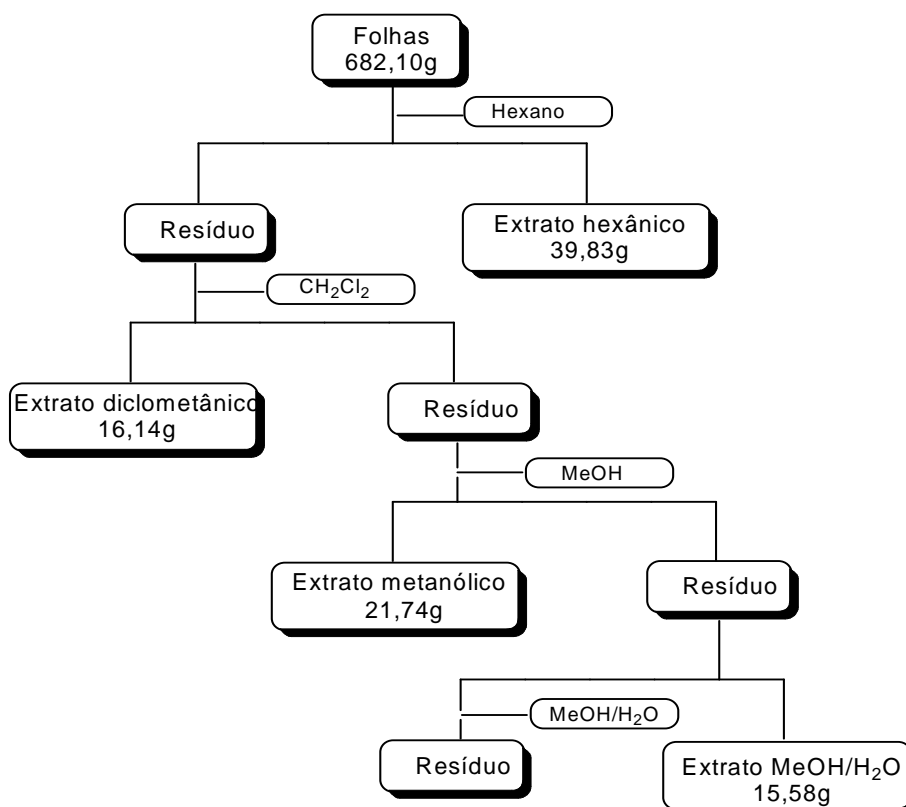


Figura 7. Fracionamento das folhas de *S. leucanthum*

5.1.4.2 – Madeira

A madeira de *S. leucanthum* (1,2 Kg) após seca e moída foi submetida à maceração exaustiva com os seguintes solventes: hexano 39,83g de extrato (3,32% da massa do material vegetal), diclorometano 27,43g (2,28% da massa do material vegetal), metanol 39,96 g (5,86% da massa do material vegetal) e metanol/água (80:20) 26,49g (2,20% da massa do material vegetal) (figura 8 , p. 25.).

Assim, os extratos brutos obtidos foram reservados para avaliação da atividade biológica e perfil químico, principalmente dos extratos ativos.

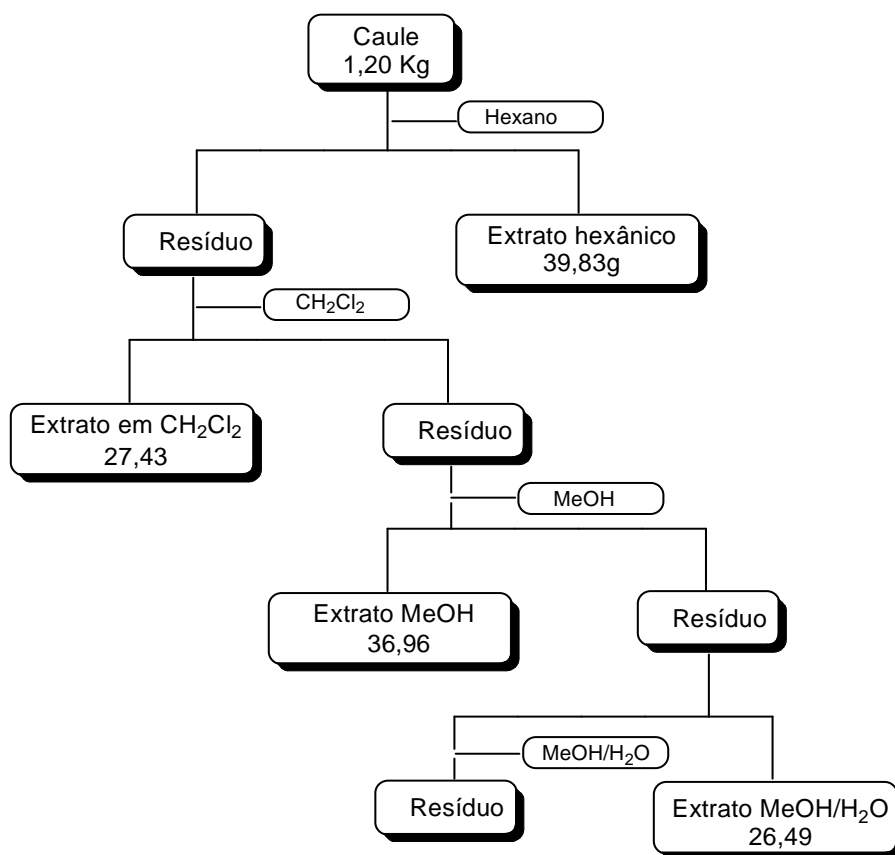


Figura 8. Fracionamento da madeira de *S. leucanthum*

6. Avaliação da Atividade Antioxidante e Ensaio Biológicos

Com o objetivo de se identificar os extratos brutos ativos da espécie *S. leucanthum* foi realizado nesta monografia à investigação da atividade antioxidante, atividade citotóxica e atividade antifúngica dos extratos brutos das folhas e madeira de uma espécie de *Sparattosperma leucanthum*.

6.1. Avaliação do Potencial Antioxidante

- **Formação de radicais**

De um modo geral, radicais são formados pela cisão homolítica de uma ligação covalente, normalmente sendo necessário para tanto, o fornecimento de considerável quantidade de energia oriunda de processos tais como aquecimento ou radiação eletromagnética. Um bom exemplo são as reações iniciadas em câmaras de radiação UV ou mesmo as reações de combustão. No entanto, dependendo das espécies presentes no meio, processos catalíticos podem ocorrer, permitindo que a reação ocorra por mecanismos outros, os quais possuam menor energia de ativação (Andrade *et al.*, 2005).

O termo radical livre é usado num sentido que abrange substâncias que possuam em sua estrutura eletrônica um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. A existência destes elétrons desemparelhados é justamente a causa do principal interesse nestas espécies, já que os mesmos usualmente conferem a estes radicais uma alta reatividade frente a outras moléculas (Andrade *et al.*, 2005).

- **Substâncias Antioxidante**

Substâncias antioxidante desempenham um papel importante na saúde através de seus efeitos na modulação dos processos oxidativo que ocorrem no organismo. A formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente oxidação de moléculas biológicas constituem um mecanismo de dano tecidual presente em vários

processos patológicos como inflamação, derrame, infarto do miocárdio, arteriosclerose, doença de Alzheimer e Parkinson e em alguns tipos de câncer (Young *et al.*, 2001; Ozben *et al.*, 1998 http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry acessado em 13/06/2007).

Os mecanismos biológicos responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio são: peroxidação lipídica, dano oxidativo do DNA, oxidação protéica. Vários ensaios para avaliação de atividade seqüestradora de radical livre e atividade antioxidante estão descritos na literatura

O ensaio espectrofotométrico do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) é um teste simples e amplamente empregado (Blois, 1958, http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry, acessado em 13/06/2007)

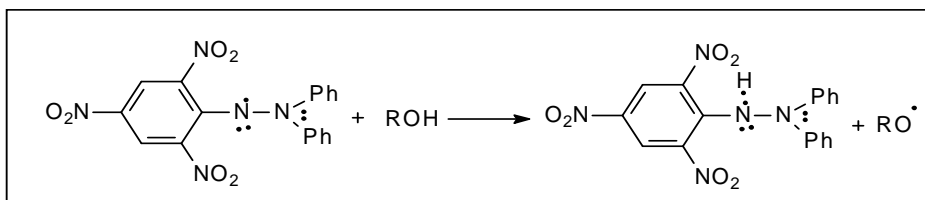
DPPH é um radical livre estável, não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxil, alcoxil, superóxido, etc., que apresentam um importante papel nos processos oxidativos biológicos.

Várias substâncias têm apresentado estreita correlação entre as atividades seqüestradora de radical livre e antioxidante determinada em modelos biológicos e outros não-biológicos (Malterud *et al.*, 1993; Joyeux *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 1994; http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry, acessado em 13/06/2007)

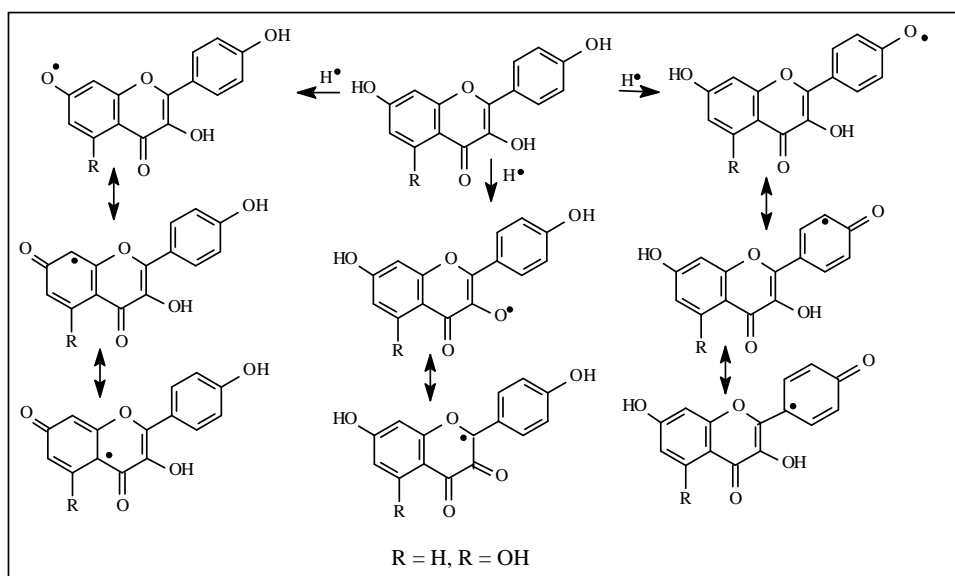
Substâncias como polifenóis, heteroaril-pirrol, acetofenonas, etc. apresentam capacidade de deslocar elétrons, conferindo à estas substâncias propriedades oxidáveis. Logo, o ensaio de atividade seqüestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste de predição de um potencial antioxidante e pode ser empregado para varredura de substâncias sintéticas e naturais.

- **Princípio**

O ensaio fundamenta-se na propriedade do DPPH (radical livre a temperatura ambiente) apresentar uma forte absorção no comprimento de onda de 518 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de seqüestrarem radicais livres, a absorção é inibida, resultando em uma descoloração estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independentes de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração indica a capacidade seqüestradora de radical livre (Lehuédé *et al.*, 1999; Mathiesen *et al.* 1997). (Esquema 9 e 10).



Esquema 9. Mecanismo de ação do DPPH frente a substâncias fenólicas.



Esquema 10. Mecanismo de ação e estabilidade dos radicais formados

6.1.1. Materiais e Reagentes utilizados:

- DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) da Sigma-Aldrich;
- Etanol absoluto Vetec;
- Balões volumétricos (10, 20 e 25 mL);
- Pipetas volumétricas (0,5; 1,0; 2,5 mL);
- Espectrofotômetro na região do UV-VIS, 482 FEMTO, faixa espectral de (240-1000nm) e UV-1601 PC SHIMADZU.
- Tubos de ensaio;
- Rutina da Sigma Aldrich.

6.1.2. Procedimento Experimental

As análises foram realizadas nos Setores de Química de Produtos Natural e Química Analítica - LCQUI-UENF.

A análise quantitativa foi realizada empregando-se o método que utiliza o DPPH como radical livre (Mensor *et al.*, 2001; Argolo *et al.*, 2004).

Na análise uma solução estoque de concentração 1,00 mg/ml foi preparada com 10,0 mg de amostra em 10,0 mL de etanol. Posteriormente esta solução foi submetida a diluições de: 25,0; 50,0; 125 e 250 µg/mL. Na análise quantitativa utilizou-se 1,00 mL de uma solução etanólica 0,30 mM de DPPH e 2,50 mL de cada concentração das amostras. A leitura no espectrofotômetro de luz ultravioleta a 518 nm foi realizada após 30 minutos de reação. As análises foram realizadas em triplicatas. (Figura 10, p. 31).

Os valores das absorbâncias foram convertidos para porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%) usando a fórmula abaixo:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}} \right\}$$

Onde:

% de Atividade Antioxidante = Porcentagem de Atividade Antioxidante

Absamostra = Absorção da Amostra, 2,5 ml da amostra + DPPH 1ml

Absbranco = Absorção do Branco, 2,5 ml da amostra + 1 ml de etanol

Abscontrole = Absorção do controle negativo, 2,5 ml de etanol + 1ml de DPPH.

O valor da concentração efetiva (CE) para se obter 50% de efeito antioxidante máximo estimado em 100% (CE₅₀) foi calculado através de uma regressão linear para cada extrato onde a abscissa representa as concentrações da amostra e a ordenada à porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%).

Como controle positivo foi utilizando o flavonóide rutina[#] Sigma-Aldrich utilizando o mesmo procedimento feito para as amostras. A finalidade da substância controle é a comparação dos valores de (CE₅₀) das amostras analisadas, onde valores menores ou próximos aos obtidos para a substância controle indicam que as amostras são ativas.

No controle negativo foi utilizado 1 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi feita com 2,5 mL de cada concentração das amostras mais 1 mL de etanol.

#Rutina é um bioflavonóide, também conhecido com o nome de vitamina P (complexo de vitamina solúvel em água e composta de citrina, rutina e hesperidina, que aumenta a absorção e funcionamento da vitamina C no organismo, a resistência dos vasos capilares e regula a absorção), rutinosídeo e fator de antipermeabilidade, apresenta as seguintes propriedades: inibição da permeabilidade vascular, inibição da formação de edema, melhora da perfusão microvascular e aumento da resistência capilar cutânea. A inibição da formação de edema é devida à propriedade da rutina de inibir a enzima hialuronidase, fato que por sua vez, aumenta a resistência das paredes vasculares (Bruneton, 1995; http://www.saudenarede.com.br/vitaminas/vitamina_p.html, acessado em 06/11/2007). A estrutura da rutina é mostrada na (Figura 9, p.31)

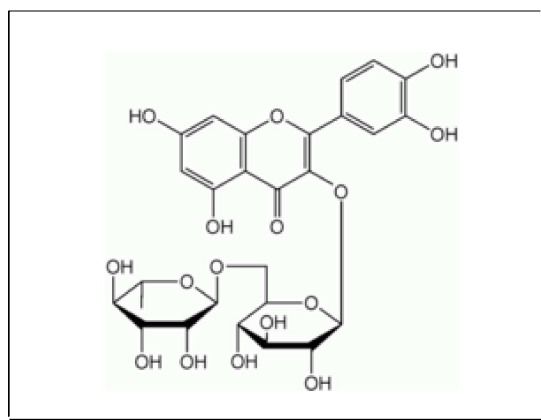


Figura 9. Estrutura da rutina

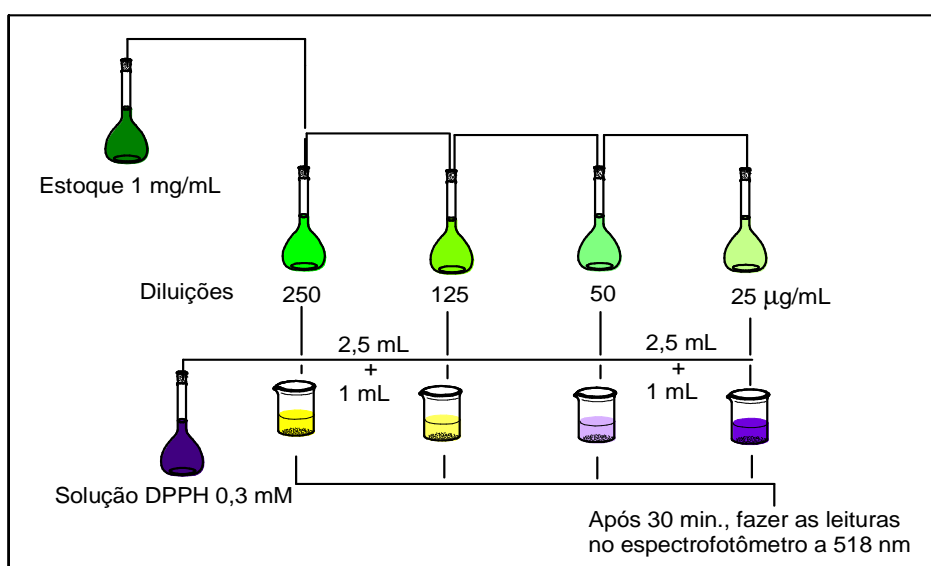


Figura 10. Procedimento experimental utilizado na análise quantitativa do potencial antioxidante

6.1.3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante estão resumidos nas Tabelas 2 e 3, p. 32 e 33 e na Figura 11, p. 33. A análise desses resultados mostra que os extratos em metanol da madeira ($CE_{50} = 19,04$) e diclorometânico das folhas ($CE_{50} = 21,24$) foram os que apresentaram melhores resultados quando comparados com o padrão rutina ($CE_{50} = 9,55$).

Tabelas 2. Porcentagem de Atividade Antioxidante versus concentração dos extratos brutos das folhas e madeira de *Sparattosperma leucanthum*

Extrato	Concentração (µg/mL)	AA%
SLMM		
	25	44,08
	50	49,08
	125	59,43
	250	68,07
SLMD		
	25	15,37
	50	14,61
	125	19,21
	250	30,42
SLFD		
	25	9,57
	50	13,07
	125	13,33
	250	16,47
SLFM		
	25	1,60
	50	4,43
	125	17,32
	250	30,42
Rutina		
	25	73,08
	50	82,15
	125	87,17
	250	89,08

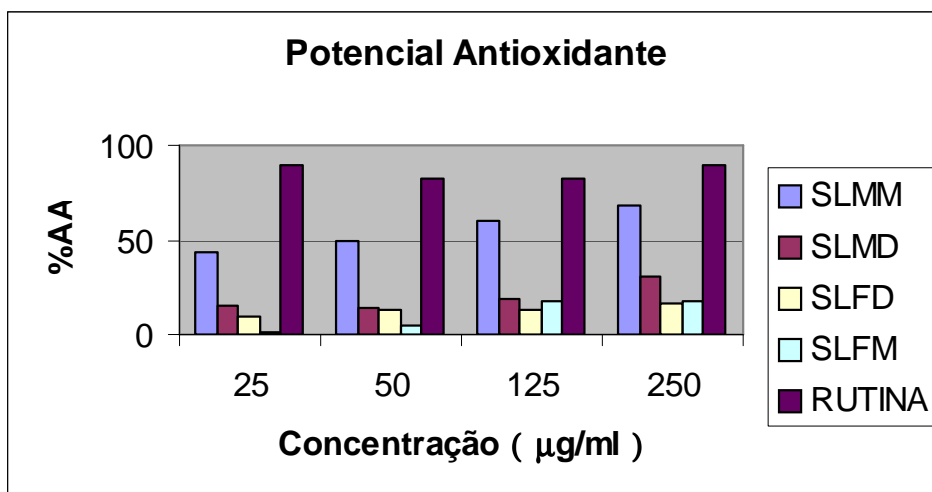


Figura 11. Gráficos da porcentagem de Atividade Antioxidante *versus* concentração dos extratos brutos das folhas e madeira da espécie *Sparattosperma leucanthum*

Tabela 3. Concentração efetiva (EC_{50}) obtida para os extratos brutos da madeira e folhas da espécie *Sparattosperma leucanthum*

Extrato	EC_{50} (µg/ml)
MeOH (madeira)	19,04
CH ₂ Cl ₂ (madeira)	30,86
CH ₂ Cl ₂ (folhas)	21,24
MeOH (folhas)	64,51
Rutina	9,55

6.2. Bioensaio da Letalidade contra Larvas de *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um microcrustáceo (larva de camarão de água salgada) que é utilizado como alimento para peixes. A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa, pois a técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (Meyer *et al.*, 1982). O bioensaio é caracterizado por ser uma forma simples de determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras, extratos brutos e frações (McLaughlin *et al.*, 1995).

O teste baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias ativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a atividade substâncias presentes nos extratos brutos. A literatura relata alguns trabalhos relacionando a toxicidade sobre as larvas de *A. salina* com atividades, tais como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomocidas (Siqueira *et al.*, 1998) e também com células cancerosas do tipo P-388 (Meyer *et al.*, 1982).

Segundo McLaughlin, valores de DL₅₀ ≤ 1000 µg/mL são considerados ativos para extratos brutos e < 30 µg/mL, muito ativos para substâncias puras.

O único parâmetro envolvido no ensaio é a morte ou vida dos microcrustáceos em contato com o material analisado e os dados obtidos são facilmente tratados estatisticamente (Cavalcante *et al.*, 2000).

6. 2.1. Materiais e Reagentes Utilizados

- Larvas de *Artemia salina*;
- NaCl (24,0 mg), CaCl₂.2H₂O (1,50 mg), KBr (0,10 mg), KCl (0,70 mg), Na₂SO₄ (4,00 mg), NaHCO₃ (0,20 mg) e MgCl.6H₂O (11,0 mg) (Para 2,00 L de solução de água do mar artificial);
- K₂Cr₂O₇ (50,0 mg);
- DMSO;
- H₂O;
- Pipeta automática (100 µL);
- Pipeta Pasteur;
- Recipiente (10X5X3 cm);
- Balão volumétrico (5,00 mL);
- Tubos de ensaio
- Luminária.

6.2.2. Procedimento Experimental

As análises foram realizadas no Setor de Química de Produtos Naturais LCQUI-UENF.

Na análise foram utilizados 50 mg de cada extrato diluído em um volume de 5 mL no seguinte sistema de solventes: [H₂O:DMSO (3:2)], formando soluções estoque de 10 mg/mL.

Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de: 50, 100, 200, 300 e 500 µL as quais foram diluídas com água do mar artificial até atingir um volume final de 5 mL As concentrações finais foram de: 100, 200, 400, 600 e 1000 µg/mL..

Em cada tubo de ensaio foram adicionadas aproximadamente 15 larvas de *A. salina*. Após 24 horas sob iluminação artificial foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos. A quantificação dos resultados foi realizada através do programa Finney Probit que permite calcular a (DL₅₀), isto é, a dose letal para 50% da

população de microcrustáceos presente nos tubos nas concentrações acima definidas.

Como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo foi utilizado a mistura de solventes $H_2O:DMSO$ (3:2) a uma concentração de 100 $\mu g/mL$.

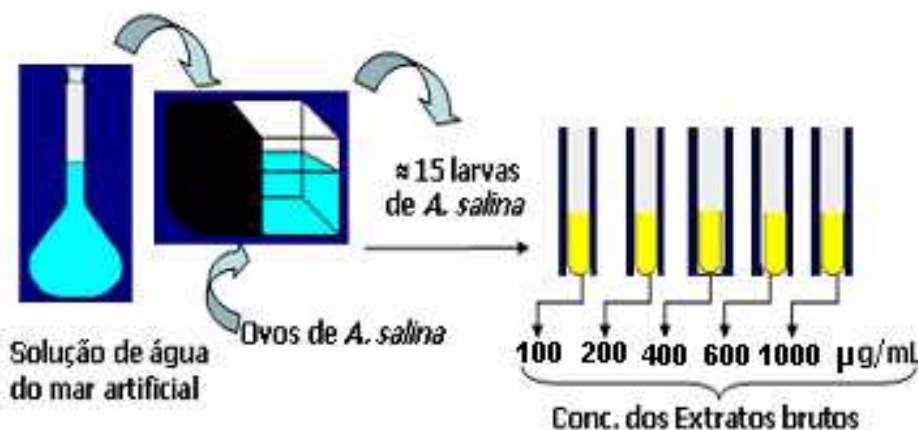


Figura 12. Experimental do bioensaio da letalidade contra larvas de *Artemia salina* Leach

6.2.3. Resultados e discussão

Os resultados apresentados pelos extratos brutos de *S. leucanthum* no ensaio da letalidade frente a larvas de *A. salina* estão ilustrados na Tabela 4, onde se pode observar que os extratos mais ativos foram os extratos das folhas, sendo que o metanólico (SLFM) apresentou uma $DL_{50} = 978,7581 \mu g/mL$ e o diclorometânico (SLFD) uma $DL_{50} = 289,4071 \mu g/mL$. Segundo McLaughlin, valores de $DL_{50} \leq 10^3 \mu g/mL$ são considerados ativos para extratos brutos. Os extratos diclorometânico das folhas (SLFD) e hexânico da madeira (SLMH) não apresentaram atividade considerável. Os resultados obtidos apontam os extratos das folhas (SLFM) e (SLFD) de *S. leucanthum* como promissores para uma avaliação fitoquímica em busca da identificação das substâncias responsáveis por tal atividade.

Tabela 4. Resultados do ensaio com larvas de *Artemia salina*.

Porcentagem de mortos após 24 H							
Extratos	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	600 µg/mL	1000 µg/mL	DL ₅₀ µg/mL	Intervalo de confiança a 95%
SLFD	27,9	55,5	29,9	41,5	48,2	>1000	3,085421
SLFM	14,6	20	15,3	27,4	52,7	978,7581	496.4681- 4034.581
SLMD	19,9	12,3	24,2	36,5	90,4	289,4071	225.2214- 419.2666
SLMH	19,4	23,4	24,6	20,9	27,4	>1000	5,92065

6.3. Avaliação da Atividade Antifúngica

Nas últimas três décadas a indústria farmacêutica produziu um grande número de novos antibióticos, mas a frequência e a resistência a estes fármacos por bactérias e fungos têm aumentado (Cohen, 1992). Este fato é motivo de preocupação devido ao grande número de pacientes com imunidade comprometida hospitalizados e susceptível a novas infecções e como consequência ao óbito. (Nascimento *et al.* 2000).

As micoses superficiais e sistêmicas são infecções causadas por fungos e nos últimos anos, foram responsáveis por alta morbidade e mortalidade em pacientes imunodeficientes. A cada ano, o número de indivíduos infectados pelo vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tem aumentado, e consequentemente, as micoses se desenvolvem como infecções oportunistas em virtude da deficiência imunológica desencadeada pela ação desse vírus (Trabulsi *et al.*, 2000)).

As infecções oportunistas são mais frequentes em pacientes imunodeficientes e a população de risco inclui principalmente aqueles indivíduos submetidos à terapia imunossupressora e cirurgias invasivas de grande porte, infectados pela SIDA, tuberculosos, ou sob uso crônico de corticóides e antibióticos (Nucci & Marr, 2005).

As infecções invasivas e superficiais provocadas por fungos, são causadas por diferentes espécies de fungos e nos últimos anos a incidência tem aumentado drasticamente e há previsão de maior aumento nos próximos anos (Ruhnke, 2004). Praticamente todas as pessoas estão expostas às infecções por fungos já que os fungos estão presentes em todos os locais. Em condições favoráveis, como umidade e calor excessivos, os fungos se reproduzem e podem desencadear infecções.

Além da *Candida albicans* e do *Aspergillus fumigatus* outras espécies de *Cândida* e de *Aspergillus* tem se destacado como significantes agentes etiológicos de micoses invasivas em pacientes imunodeficientes. Infecções fúngicas sistêmicas estão associadas a 40% de mortes quando causadas por *C. albicans* e a mais de 50% de mortes nos casos de aspergilose invasiva (Lin *et al.*, 2001).

De acordo com os tecidos e órgãos afetados as micoses são classificadas em: superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas ou profundas (Trabulsi *et al.*, 2000).

- **Micoses superficiais:** são originadas por microorganismos da microbiota normal ou adquiridas no meio ambiente. Os fungos localizam-se na camada externa da pele, ao redor de pêlos e/ou cabelo, ou nas unhas, alimentando-se de queratina.
- **Micoses cutâneas ou dermatomicoses:** localizam-se na pele, pêlo, unhas e/ou mucosas em maior extensão..
- **Micoses subcutâneas:** os fungos responsáveis pelas micoses subcutâneas crescem no solo ou em vegetação em decomposição e infectam o tecido subcutâneo através da pele traumatizada.
- **Micoses sistêmicas ou profundas:** neste caso os fungos disseminam-se através da circulação sanguínea e linfática. Podem infectar a pele e órgãos internos, como pulmões, intestinos, ossos ou sistema nervoso. Os fungos causadores destas infecções são dimórficos e a infecção ocorre através da inalação de fungos encontrados principalmente no solo.

Entre as infecções fúngicas sistêmicas mais comuns destaca-se a candidíase, seguida da aspergilose, que apresenta maior mortalidade. A candidíase ocasiona manifestações clínicas variadas e tem como agente etiológico principalmente *C. albicans*. As espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ou *C. dubliniensis* são freqüentemente encontradas concomitantes a *C. albicans* e raramente causam infecção quando não associadas a *C. albicans* (Ruhnke, 2004). A candidíase ocorre em até 40% dos pacientes com câncer e 25% nos transplantes de medula óssea.

A espécie mais comum responsável pela aspergilose é o *A. fumigatus* seguida por *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (Baddley & Moser, 2004). A aspergilose pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes. Nestes últimos, a infecção tende à forma disseminada ou cerebral, de alta letalidade, geralmente,

associada à neutropenia ou a doenças debilitantes. É crescente o número de relatos desta doença como infecção secundária em pacientes com antibioticoterapia e uso de corticosteróide por tempo prolongado (carcinoma, tuberculose, pacientes neutropênicos), e em lesões de tecidos subcutâneos, da pele ou da córnea. Aspergilose não é freqüente, porém é fatal em pacientes SIDA infectados, nos quais o tempo de sobrevida médio após o diagnóstico é de cerca de 3 meses e somente 26% sobreviveram tempo maior (Holding et al., 2000).

- **Antifúngicos**

O número de agentes antifúngicos, disponíveis para o tratamento de infecções provocadas por fungos é limitado e restringe-se a: antibióticos polienos [Anfotericina B (Figura, 13, 41) e Nistatina], derivados de azóis [Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol, Miconazol (Figura 13, p. 41)], alilaminas [Terbinafina (Figura 13) e Naftina] e tiocarbamato (Tolnaftato), morfollinas (Amorolfilina) e análogos de nucleosídeos (Flucitosina) (Georgopapadakou & Walsh, 1996), Caspofungina, uma droga da classe de candinas aprovada para uso em 2001.

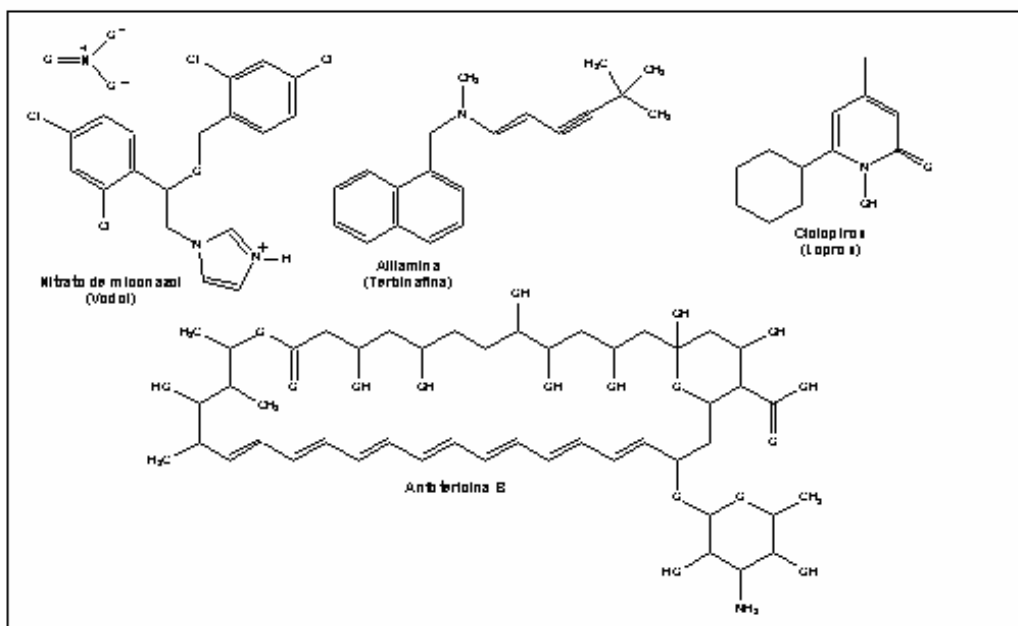


Figura 13. Antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções provocadas por fungos

O uso clínico extensivo de azóis a partir de 1980, desencadeou o aumento de resistência, principalmente a fluconazol por espécies de *Candida* e *C. neoformans* (Canuto & Rodero, 2002).

A descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana constitui uma necessidade urgente devido ao aumento da incidência de enfermidades infecciosas novas e re-emergentes e também, devido à alta capacidade dos microrganismos de desenvolverem resistência aos antibióticos usados clinicamente (Mallavarapu, 2001).

A crescente incidência de infecções por fungos oportunistas, a resistência deles aos azóis e as reações adversas produzidas pelos antifúngicos de uso clínico, principalmente os *polienos*, tem atraído a atenção dos pesquisadores para o desenvolvimento de novos e potentes antifúngicos e também de novas metodologias para teste de susceptibilidade *in vitro*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para se obter novas substâncias bioativas (Santos *et al.*, 1995). Desse modo, é com base na constante busca por novos extratos bioativos e também no crescente surgimento de

microrganismos resistentes aos fármacos atualmente usados na terapêutica, que um dos objetivos desta monografia foi avaliar a atividade antifúngica da madeira e folhas da espécie *Sparattosperma leucanthum*.

A tabela da página seguinte apresenta alguns dos principais fungos que infectam o homem e as enfermidades que estes produzem.

Tabela 5. Alguns fungos patógenos para o homem e as enfermidades que produzem

Fungos	Enfermidades
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Tinea capitis, T. corporis, T.cruis T.pedis (pé de atleta)
<i>Microsporum canis</i>	Tinea capitis, T. corporis
<i>Microsporum gypseum</i>	Tinea capitis, T. corporis
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	T.pedis, Tinea barbae (tricotíia de la barba) Tinea capitis, T. corporis, T.cruis
<i>Candida albicans</i>	Candidíase (sistêmica e superficial)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Criptococosis
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicosis
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Aspergilosis

6.3.1. Materiais e Reagentes Utilizados

- Placas de Petri
- Cloreto de Sódio
- Meio Saboraud dextrose (Agar)
- Suabe
- Nitrato de Miconazol (Vodol[®])
- Tubos de ensaio
- Fotômetro
- Alça de Drigalsky

Tabela 6. Fungos utilizados no ensaio

Espécies	Descrição
<i>Candida albicans</i>	ATCC 36802
<i>Candida inconspicua</i>	ATCC 16783
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
<i>Candida krusei</i>	ATCC 34135
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC 6260
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 34449
<i>Candida spp.</i>	ATCC 34147

Os testes foram realizados com os seguintes extratos:

- SLFD** *Sparattosperma leucanthum* folha-diclorometano
SLMD *Sparattosperma leucanthum* madeira-diclorometano
SLMMH *Sparattosperma leucanthum* madeira-metanol/água
SLFM *Sparattosperma leucanthum* folha-metanol
SLFMH *Sparattosperma leucanthum* folha-metanol/água

6.3.2. Procedimento Experimental

Os testes foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal LSA-UENF.

Para a realização deste teste, foi empregada a técnica de difusão em agar (Hadaceck & Greger, 2000).

- **Difusão em agar**

Como meio de cultura foi utilizado Agar Sabouraud dextrose (Acumedia, EUA) que foi adicionado em placas de Petri de 14 cm de diâmetro até atingir uma espessura de 5 mm de agar.

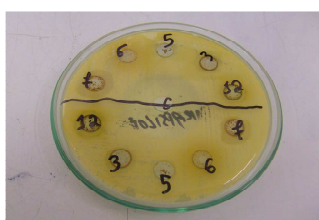
Com o auxílio de um suabe foi semeada sobre o meio uma alíquota de 100µL do inoculo das leveduras (Tabela 6) previamente preparada com uma suspensão de células em solução salina. A padronização da solução foi realizada pela Escala de McFarland nº 0,2 ($0,6 \times 10^8$ células/mL). Após a semeadura do microrganismo, foram feitas perfurações (poços no meio de cultura), que receberam um volume de 50 µL das amostras analisadas. Foi utilizado uma concentração de 25 mg/mL para extratos e 3 mg/mL para substâncias puras isoladas. Como controle positivo foi utilizado uma solução 20 µg/mL de Nitrato de Miconazol (Vodol[®] lote 606401, União Química, Brasil).

Vodol atua inibindo a síntese do ergosterol (Figura 13, p. 41), na membrana celular fungal. O ergosterol tem a mesma função do colesterol na célula animal.

Após aplicação das amostras e do controle as placas foram incubadas em estufa por um período de 24-36 h a 37 °C.

Uma distância de aproximadamente 1,5 cm foi mantida para que não ocorresse sobreposição dos halos.

A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos de inibição, considerando ativas as amostras que apresentaram um halo de inibição \geq 1,00 cm de diâmetro (Lima *et al.*, 2006). O ensaio foi realizado em três vezes de triplicata.



6.3.3. Resultados e Discussão

Os resultados observados através da formação do halo de inibição do crescimento fúngico em diâmetro(cm) cujo os resultados estão demonstrados abaixo, mostraram que apenas o extrato metanólico(12) das folhas apresentou atividade contra a *C. parapsilosis*, os outros extratos testados não apresentaram atividade frente as outras cepas de *candida* utilizadas neste ensaio.

Ext.	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6	Placa 7	Placa 8	Placa 9
12	17	22	22	23	19	22	20	23	23
Cont.	31	32	32	34	32	30	33	33	32

7. Algumas considerações sobre o Perfil Químico dos Extratos Brutos das folhas e madeira de *Sparattosperma leucanthum*

A análise do perfil químico dos extratos brutos da espécie *S. leucanthum* foi realizado através de análise de espectros de ressonância magnética nuclear. Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Jeol Eclipse, operando a uma frequência de 100 MHz para ^{13}C . (os solventes utilizados foram: clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD), puros de marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm (parte por milhão).

As técnicas unidimensionais utilizadas no experimento de RMN ^{13}C foram: PENDANT/APT, onde os sinais de CH_3 e CH aparecem em fase oposta a CH_2 e carbono não hidrogenado.

Foi feita a subdivisão dos espectros obtidos em quatro regiões como apresentado na Tabela 7 (Silverstein, 1994).

Tabela 7. Escalas químicas de deslocamento e atribuições químicas.

Escala de deslocamento químico em ppm	Tipo de carbono
0 – 45	Alifáticos/C-alquil
45 – 110	O - Alquil
110 – 162	Aromático/Olefínico
162 – 190	Carbonílico

7.1. Extrato Bruto em Hexano das Folhas de *Sparattospema leucanthum*

Este extrato apresentou-se como uma mistura de material graxo e clorofila.

7.2. Extrato Bruto em Diclorometano das Folhas de *Sparattosperma leucanthum* (SLFD)

7.2.1. Fracionamento do extrato bruto em diclorometano das folhas de *S. leucanthum*

O extrato bruto (14,16g) em diclorometano das folhas de *S. leucanthum* foi submetido à cromatografia em coluna utilizando hexano, diclorometano e metanol em gradiente de polaridade crescente. As frações obtidas foram reunidas de acordo com a semelhança de RF em cromatografia de camada delgada analítica, (CCDA), resultando em 18 subfrações.

A subfração **07** foi submetida à purificação em cromatografia em coluna tipo “flash” utilizando como eluente éter de petróleo e acetato de etila (80:20). Este procedimento resultou em 32 subfrações que foram reunidas de acordo com a semelhança de RF em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), resultando nas seguintes subfrações: (1-6), (7-9), (10-13), (**14-17**), (18-26).

A subfração [**14-17** (18,2mg)] foi novamente submetida à purificação em cromatografia em coluna tipo “flash”, resultando em 25 frações. As frações de no. **11** e **12** apresentaram-se como uma única mancha e CCDA, sendo então analisadas através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e os fragmentogramas obtidos comparados com o banco de dado do espectrômetro de massas. A subfração **11 SLFD-01** mostrou tratar-se de uma mistura de ácidos graxos e a subfração **12 SLFD-02a-c** uma mistura de fitoesteróides campesterol, estigmasterol e sitosterol (Figura 15, 16, 17 e 18, tabela 8 , p. 48 e 49).

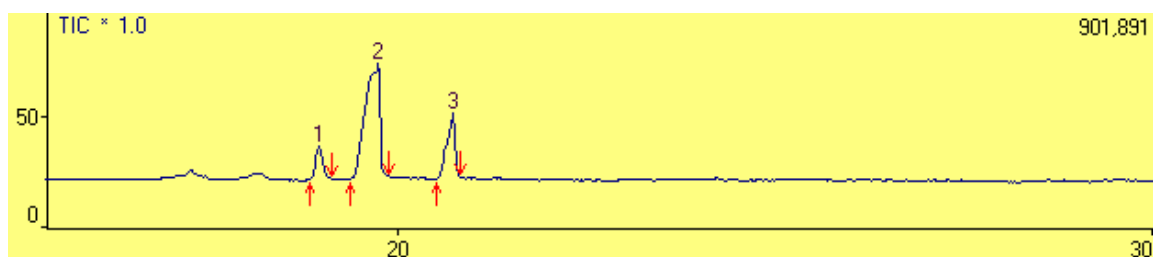


Figura 15. Espectro de Cromatografia a gás da mistura de fitoesteróides **SLFD-02**

Tabela 8. Substância *versus* tempo de retenção em cromatografia a gás

Tempo de retenção	Proporção	Substância	Peso Molecular
18,96	9,61	campesterol	400
19,73	68,27	estigmasterol	412
20,72	22,12	sitosterol	414

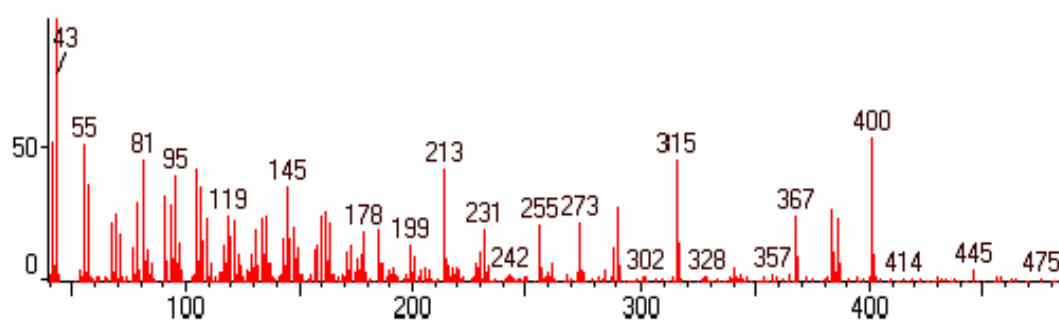


Figura 16. Fragmentograma de massas de baixa resolução do campesterol **SLFD-02a**

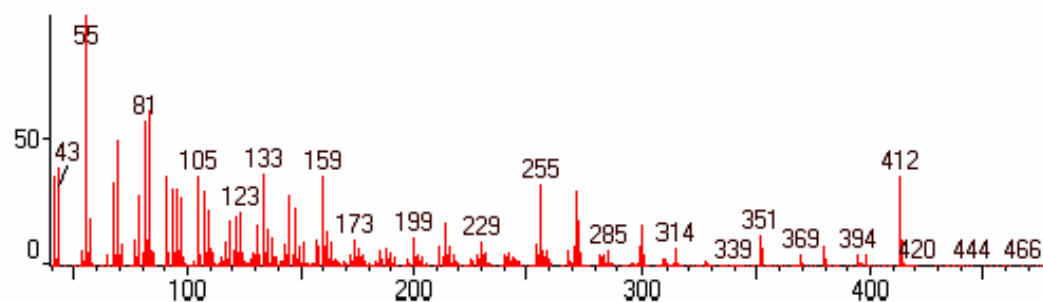


Figura 17. Fragmentograma de massas de baixa resolução do estigmasterol **SLFD-02b**

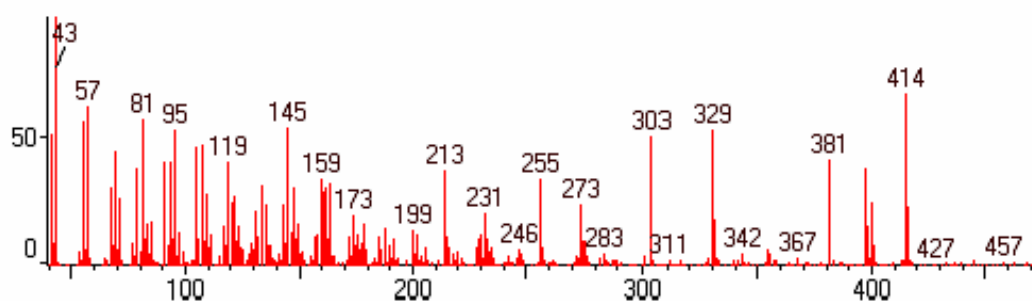


Figura 18. Fragmentograma de massas de baixa resolução do sitosterol **SLFD-02c**

A análise do espectro de RMN ^{13}C -PENDANT dessa fração mostrou sinais em fase na região de δ_{C} 18,1- 47,6 Carbonos hidrogenados (CH e CH_3) e fora de fase nas regiões entre δ_{C} 16,4 – 45,9, característicos de CH_2 e carbono não hidrogenado; 53,4 - 55,4 e 78,3 de carbono não hidrogenado e/ ou O-alquil (C-OH) e 121, 7 – 122,3 de CH olefínico característico de fitoesteróides (Figura 19, p.50).

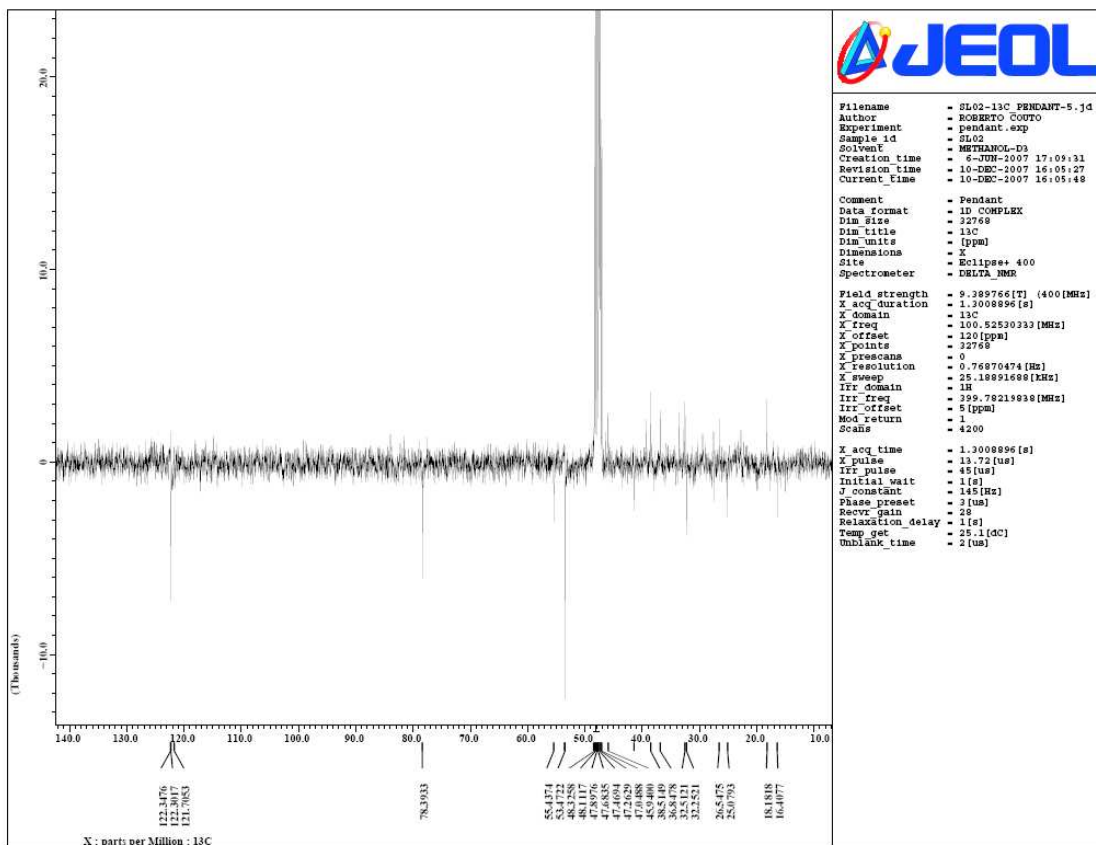


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C -PENDANT da subfração **SLFD-02a-c**

A subfração **08** (701,0 mg) foi submetida à purificação em cromatografia em coluna tipo “flash” utilizando como eluente éter de petróleo e acetato de etila (60:30). Este procedimento resultou em 71 subfrações que também foram reunidas de acordo com a semelhança e CCDA, resultando nas seguintes subfrações: (4-7), (8-11), (12-15), (**16-20**), (21-25), (26-31), (32-36), (37-46), (47-53), (55-71). Aquelas que apresentaram maior grau de pureza foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

A subfração [16-20 (124,8 mg)] foi submetida a nova CC tipo “flash” que resultou em 5 subfrações (4-5), (6-8), (9-10), (11-15) e (16-25).

A subfração 6-8 quando submetidas à CG-EM e comparadas com o banco de dados apresentaram perfil semelhante a mistura das seguintes substâncias: um álcool de cadeia curta: etil linalool **SLFD-03a** e o triterpeno: lupeol **SLFD-03b**.

A subfração 9-10 apresentou perfil semelhante à benzofuranona: 5,6,7,7- α -tetraidro-4,4,7- α -benzofuranona **SLFD-03c** e o álcool de cadeia longa: 7-metil-tetradecen-1-ol **SLFD-03d** (Tabelas 9 e 10, Figuras 20, 21, 22, 23, 24 e 25. p.51, 52 e 53).

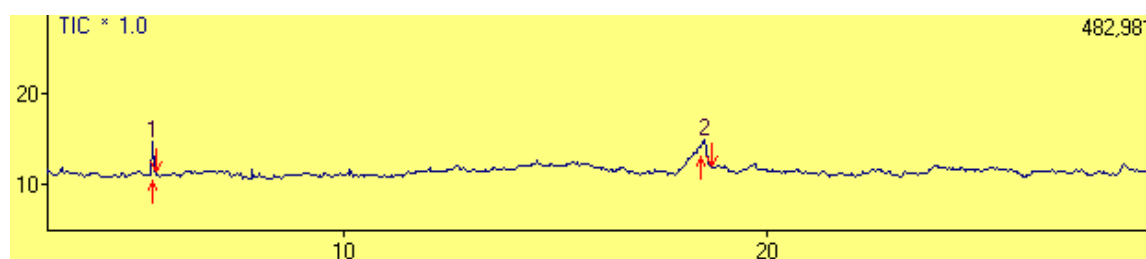


Figura 20. Espectro de cromatografia à gás da mistura de substâncias **SLFD-03a-b**

Tabela 9. Substância *versus* tempo de retenção em cromatografia à gás

Tempo de retenção	Proporção	Substância	Peso Molecular
5,54	26,56	Etil linalool	182
18,54	73,44	Lupeol	426

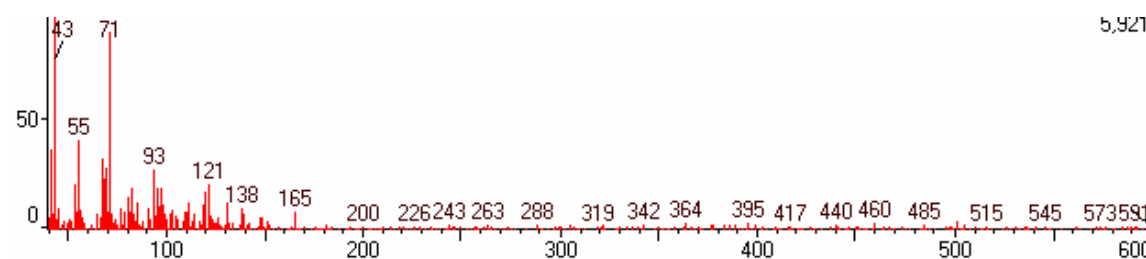


Figura 21. Fragmentograma de massas de baixa resolução do etil linalool **SLFD-03a**

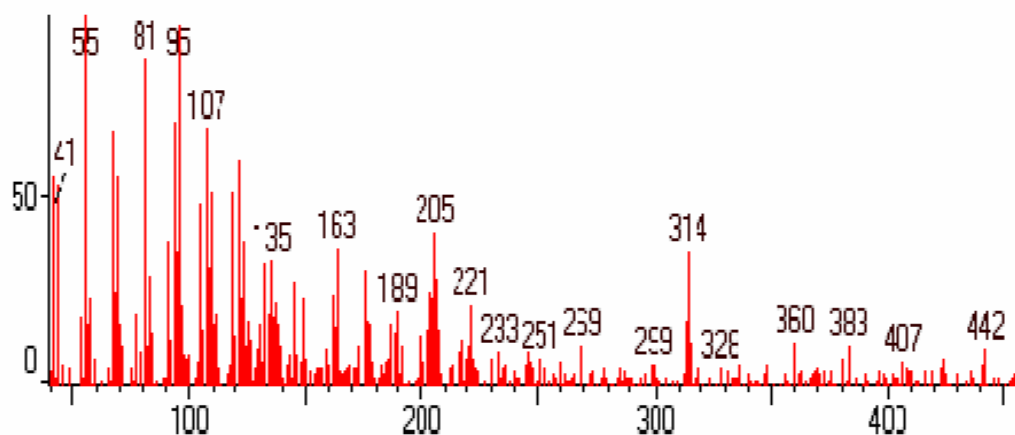


Figura 22. Fragmentograma de massas de baixa resolução do lupeol **SLFD-03b**

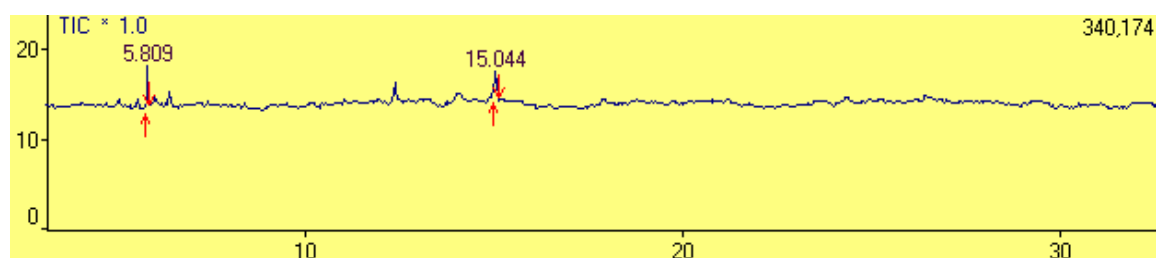


Figura 23. Espectro de cromatografia de gás da mistura **SLFD-03c-d**

Tabela 10. Substância *versus* tempo de retenção em cromatografia à gás da mistura **SLFD-03c-d**

Tempo de retenção	Proporção	Substância	Peso Molecular
5,81	42,94	5,6,7,7- α -tetraidro-4,4,7- α -benzofuranona	180
15,05	57,06	acetato de 7-metil-tetradecen-1-ol	268

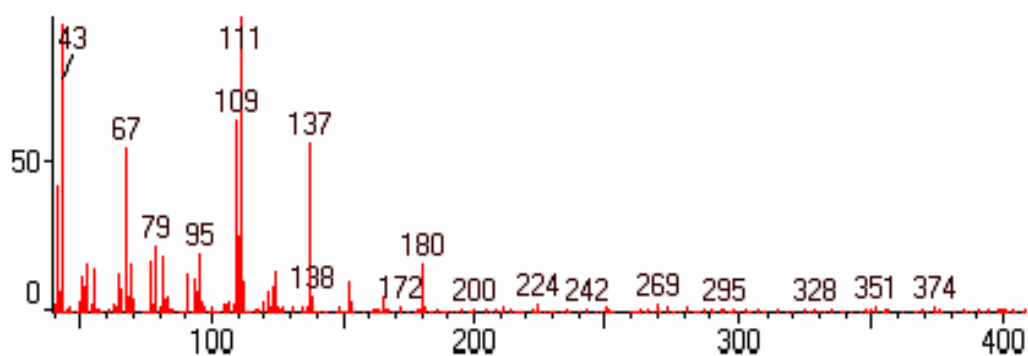


Figura 24. Espectro de massa de baixa resolução da 5,6,7,7-tetraidro-4,4,7-benzofuranona **SLFD-03c**.

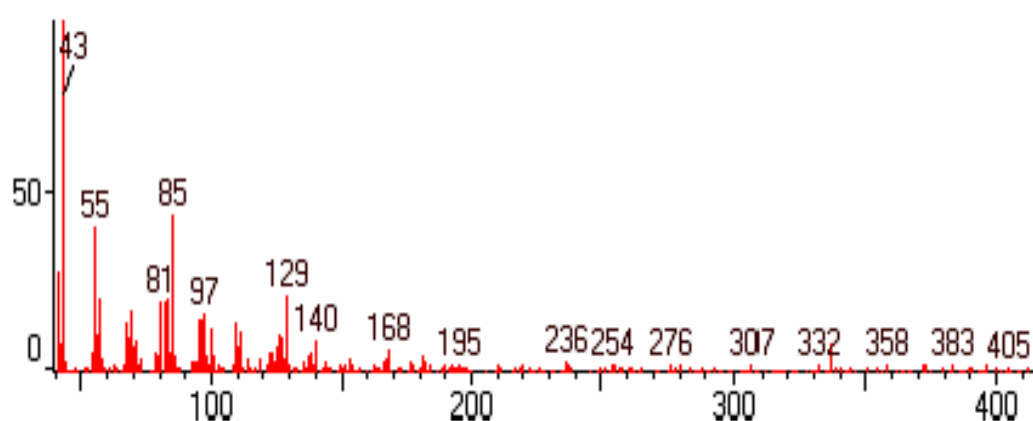


Figura 25. Espectro de massas de baixa resolução do acetato do 7-metiltetradecen-1-ol **SLFD-03d**

7.3. Extrato em Metanol das folhas de *Sparattosperma leucanhum* (SLFM)

Este extrato quando submetido a análise de RMN ^{13}C -APT mostrou sinais em fase na região entre δ_{C} 25-35, indicando a presença de carbonos C-alquílicos de grupos metilas ($-\text{CH}_3/-\text{CH}_2$) e entre δ_{C} 62-65 relativos a carbonos O-

alquílicos de álcoois primários/secundários (-C-OH/-CHOH) ou éteres alifáticos (-C-O-C-). Fora de fase aparecem sinais na região entre δ_C 70-75, indicando a presença de carbonos O-alquílicos de álcoois terciários [(CH₂)₃ – OH] e δ_C 124-128, indicando a presença de carbonos olefinicos e/ou aromáticos. Carbonos não hydrogenados não foram visualizados através desta técnica (Figura 26, p. 54).

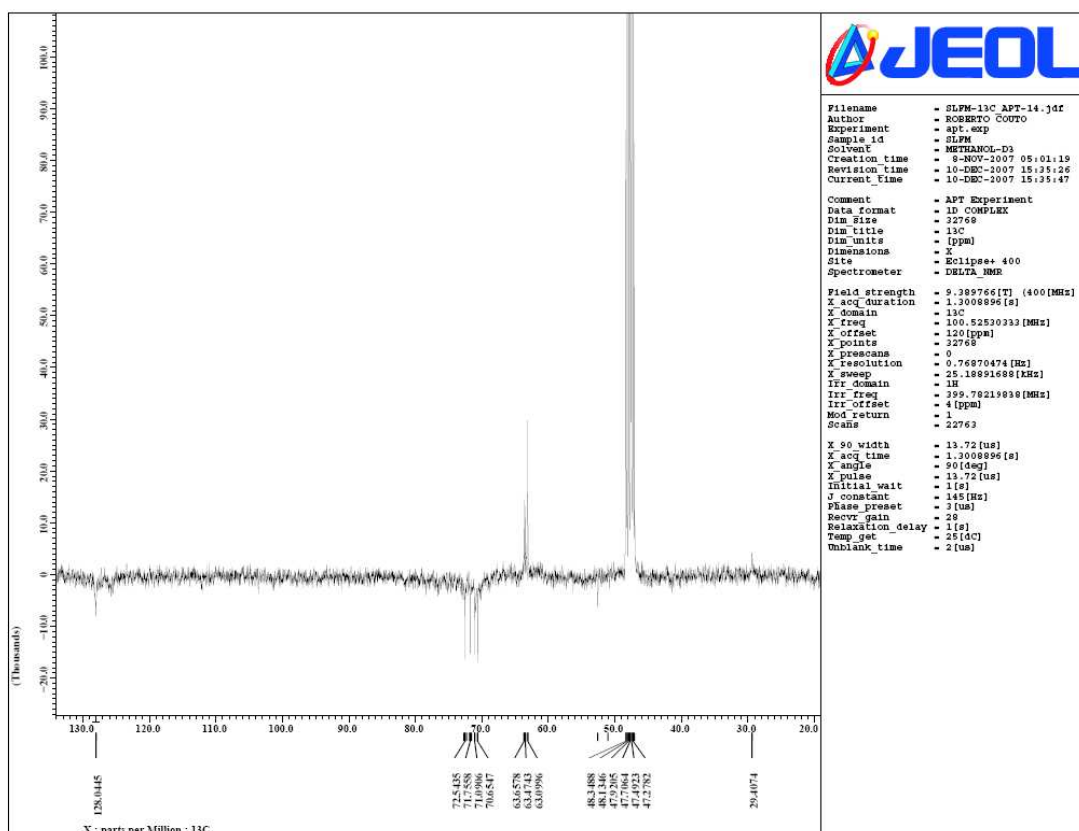


Figura 26. Espectro de RMN ¹³C-APT do extrato SLFM

7.4. Resultados e Discussão

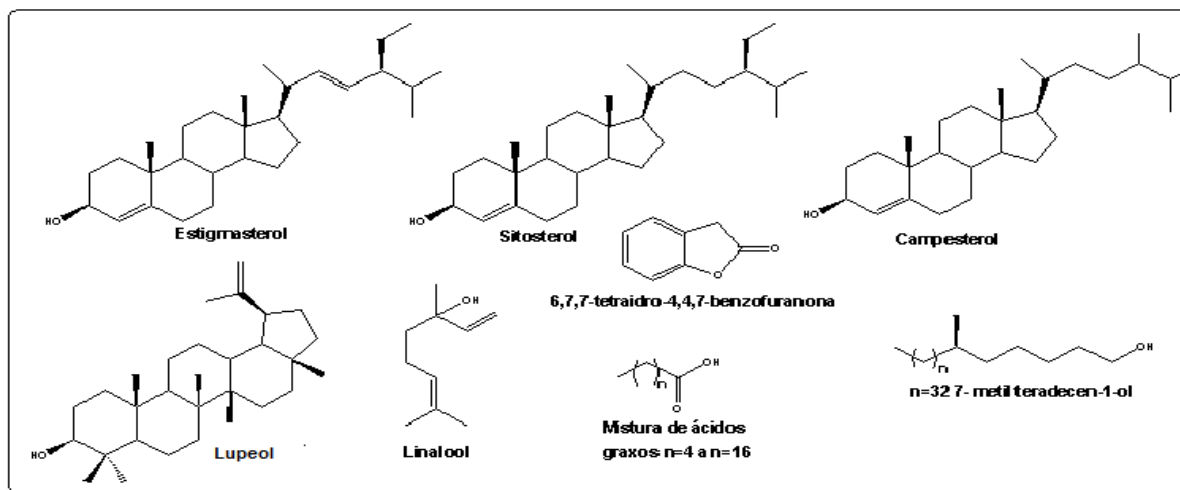


Figura 27. Estrutura das substâncias identificadas no extrato em diclorometano das folhas de *S. leucanthum* (SLFD)

A avaliação do perfil químico dos extratos ativos da espécie *S. leucanthum*, forneceu indícios da presença marcante de fitoesteróides. Estes indícios foi também verificado por Morales *et al.* e Anaya *et al.*, citados por Galotta & Boaventura (2005) que constataram que para fitoesteróides/triterpenos α e β -amirina $DL_{50} = 200 \mu\text{g/mL}$ e lupeol $DL_{50} > 300 \mu\text{g/mL}$. Segundo Ferrigini & McLaughlin (1984) e Dolabela, citado por Gallotta e Boaventura (2005) substâncias com $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ são apropriadas para biomonitoramento utilizando o teste da citotoxicidade com *A. salina* e substância cuja DL_{50} estiverem na faixa de $80 \mu\text{g/mL} < DL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar atividade tripanossomida e por outro lado, substâncias com $DL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar atividade antitumoral.

Os extratos metanólico **SLFM** e diclometânico **SLFD** das folhas de *S. leucanthum* apresentaram $DL_{50} = 978,7581$ e $289,4071 \mu\text{g/mL}$, mostrando-se promissores para um posterior estudo fitoquímico biomonitorado.

A Figura 27, p. 55, mostra as prováveis estruturas de algumas das substâncias presentes no extrato em diclorometano das folhas de *S. leucanthum*. Quanto ao extrato metanólico das folhas a análise do perfil de carbono quando comparado com a Tabela 7, p. 46, mostra tratar-se de substâncias insaturadas ou de caráter aromático ligado a resíduo de açúcar.

Sendo assim, os dados obtidos tornam os extratos da espécie *S. leucanthum*, promissores um posterior estudo fitoquímico visando o isolamento, identificação e elucidação estrutural das substâncias ativas e também das não ativas, quando possível.

Vale ressaltar que testes químicos preliminares não revelaram a presença de fenóis ou quinonas nestes extratos.

8. Considerações Finais

A avaliação biológica dos extratos da espécie *S. leucanthum* (ipê branco) mostraram os seguintes resultados:

- Extrato metanólico madeira - atividade antioxidante (DPPH);
- Extrato metanólico folha - atividade antifúngica (*Candida*) e citotóxica (*Artemia salina*);
- Extrato diclorometânico folha – atividade citotóxica (*Artemia salina*);

Sendo assim, os resultados obtidos com a espécie *Sparasttosperma leucanthum* (ipê branco) mostram os extratos ativos como promissores para uma futura avaliação fitoquímica, visando o isolamento e a elucidação estrutural dos constituintes químicos (metabólitos secundários ou especiais) responsáveis por tais atividades.

9. Bibliografia

- Almeida, E. R. (1990). Antyinflamatory action of lapachol. *Journan Ethnopharmacol.*, 29(2) 239-41.
- Akbay, P., Basaran, A.A. (2003). In vitro Immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytoterapy Research* 17(1) 34-37.
- Andrade Jr. R.G. (2005). Tannic Acid inhibts in vitro iron-dependent free radical formation. *Biochemical Journal*
- Argolo, A.C.C., Sant'Ana, A.E.G., Pletsch, M., Coelho, L.C.B.B. (2004). Antioxidant activity of leaves form *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*. 95: 229-233p.
- Austin, F. G., (1974), *Schistossoma mansoni* chemoprophylaxis with dietary lapachol. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 23 (3): 412-419.
- Baddley ,J., (2004). Emerging fungal resistance. *Clinics in Laboratory Medicine:* 24(3), 721-735.
- Bankova, V.S., Popov, S.S., Marekov, N.L. (1983) – A study on flavonoids of Propolis. *Journal of Natural products*. 46(4):471-474.
- Barreiro E.J., Fraga, C.A.M. (1996). Basic notions of drug metabolism. *Química nova* 19 (6): 641-650 .
- Binutu, O.A., Adesogan, K.E., Okogu, J.I., (1996). Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Medicinal Plants*. 62(4):353-3.

- Bronner, C., Landry Y. (1985). Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Inflammation Research*. 16(3,4):147,151.
- Bruneton, J. (1995), *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 1^a ed. Paris: Lavoisier Publishing p. 915.
- Canuto, Mar Masiá., Félix Gutiérrez Roderó.(2002) Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Antifungal drug resistance* 2(9): 550-563.
- Cao, G., Sofic, E., Prior R.L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of flavonoids; Structure-Activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22(5): 749-760.
- Carvalho, L. H., Rocha, E. M. M., Rasland, D. S., Oliveira, A. B. & Krettly, A. U., (1988), *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Brazilian. *Journal Medicinal Biology Research*. 21: 485-487.
- Cavalcante, M.F., de Oliveira, M.C.C., Velandia, J.R., Echevarria, A. (2000). Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina leach*. *Química Nova*, 23(1):20-22.
- Cheong, H., Ryu, S.Y, Oak, M.H., Cheon, S.H, Yoo, G.S, Kim, K.M. (1998). Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions. *Archives of Pharmacal Research*. 21(4): 478-80.
- Cohen, M.L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science*. 21;257(5073): 1055-5.
- Contreras, G.O., Mier G.M. Alberto Zúñiga, R., (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de endocrinología y nutrición*. 12(4): 199-206.

- Cúneo C.A. , (1999). Dieta mediterranea y enfermedad coronaria . Manejo no farmacológico de los factores de riesgo para la aterosclerosis. *Revista da Federação Argentina de Cardiología* .28: 119-124.
- Dewick, P.M. (1988). The flavonoids advance in research. *Isoflavonoids*. London: New York Harbone Chapman and Hall, p 140, 621.
- Ebaddi, M., Srinivasan, S.K., Baxi, M.D. (1996). Oxidative stress and antioxidant therapy in parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 48(1):1-19.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I. (2002). Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Alzheimer Disease. *Americam Medical Association*. 287(24): 3223-3229.
- Ferreira, A.V.M., Botion L.M., Côrtes S.F., Lemos V.S., Braga F.C. (2006). Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina on lipid metabolism and intestinal tonus. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 137,142.
- Ferrer, E.G., Salinas, M.V., Correa, M.J., Naso L. (2006). Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV). *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 11(6): 791-801.
- Ferrigni, N. R., McLaughlin J. L., Powell R. G., Smith C. R.(1984). Use of Potato disc and brine shrimp Bioassays to detect Activity and Isolate piceatannol as the Antileukemic Principle from the Seeds of *Euphorbia lagascae* Jr. *Journal of Natural Products* 47(2): 347- 352.
- Fieser, L.F. (1927). The alkylation of hydroxynaphtoquinone. III. A synthesis of lapachol. *The Journal of American Chemical society*.

- Galotta, A. L. Q. A. (2005). Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí. *Química Nova* 28(4): 610-613.
- Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Stoeckli-Evans, Hostettman, K. (1996). Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry*, 42, 1315
- Gates, M. & Moesta, D. L. (1948) Synthesis of lapachol series. *Journal of American Chemical Society*. 70: 614.
- Gentry, A. H. (1974). Flowering Phenology and Diversity in Tropical Bignoniaceae. *Alwyn H. Biotropica*. 6 (1): 64-68.
- Georgopapadakou, N.H. Walsh, T.J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Free full text article in PubMed Central* 40(2): 279-91.
- Goel, R. K., Pathak, N. K., Biswas, M., Pandey, V. B., Sanyal, A. K. (1987). Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39(2): 138-40.
- Goulart, M.O .F., Zani, C.L., Tonholo, J., Freita, L.R., Abreu, F.C., Oliveira, A .B., Raslan, D.S., Starling, S., Chiari, E. (1997). Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (15): 2043-2048.
- Greco, K.V., Lara, P.F., Oliveira Filho, R.M., Greco, R.V.(2006). Inhibition by dexamethasone and aspirin, and acceleration by a micronized purified flavonoid. *European Journal of Pharmacology*

Guerra, M. O., Mazoni, A. S. B., Brandão, M. A. F. and Peters, V. M. (1999). Toxicology of lapachol in rats. *Revista brasileira de biologia*, 61(1): 171-174.

Hadaceck, F., Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 11: 137-147p.

Hammouda, Y., Amer, M.S., (1966). Antidiabetic effect of Tecomine and Tecostanine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55:1452, 1454.

Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. (1997). Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 17 (11): 2744-2752

Holdin, K.J., Dworkin, M. S., Wan, P.C., Hanson, D. L., Klevens, R.M., Jones, J. L., Sullivans, P.S. (2000). Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus: incidence and survival. Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease Project. *Clinical Infectology disease*. 31(5) 1253-7.

[http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid\].html](http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid].html) acessado em 7/11/2007

http://www.saudenarede.com.br/vitaminas/vitamina_p.html acessado em 06/11/2007

http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry acessado em 13/06/2007

Hussain, H., Kroh, K., Ahmad, V. U., Miana, G. A. & Greend, I. R.(2007). Lapachol: an overview. *Arkivoc*: 145,171.

- Isla, M.I., Nieva Moreno M.I, Sampietro, A.R. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Kanchanapoom,T., Kasai, R., Yamasaki, K., (2002). Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. *Phytochemistry* 67: 516 ,520.
- Kaul Tej N., Elliott Middleton Jr., M.D., Pearay L. Ogra.(2005).Antiviral effect of flavonoids human viruses. *Journal of Medical Virology*. 15(1):71,79.
- Kazantzi, G, Malamidou-Xenikaki, E. & Spyroudis, S. (2007). Palladium-Catalyzed Allylation of 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone: Application to the preparation of lapachol. *Synlett*. 427.
- Kutney, J. P., Warnock, W. D. C.; Gilbert, B. (1970). Pinocembrin 7-beta-nioshesperoside, flavonone glycoside from *Sparattosperma vernicosum*. *Phytochemistry*, 8:1877.
- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P., Souza, E.L. (2006). Atividade Antifúngica de Óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 197-201p.
- Lin Swu-Jane, Schz, Steven M. Teutsch.(2001). Aspergillosis Case –Fatality Rate : Systematic Review of the Literature.*CID* 2001:32.
- Logroscino, G. Marder, K. , Cote, L., Tang, M.X., Shea S, R. (1996) . . Dietary lipids and antioxidants in Parkinson’s disease: a population – based, case-control study. *Ann Neurol*. 39(1) : 89 , 94.
- Lorenzi, H. (2000). *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol. 1, 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 43.

- Mallavarapu, G.O., (2001). Contribution of medicinal plants to modern medicine. *Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine*. 22: 572-578p.
- Mates, J.M., Perez-Gomez,C., Blanca, M. (2000). Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clinica Chimica ACTA* 296 (1-2).
- McLaughlin, J. L. Colman-Saizarbitoria, T. e Anderso J.E. (1995). Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, 18,13-18p.
- Mensor, L.L., Menezes, S.F., Leitão, G.G., Reis, S.A., Dos Santos, C.T., Coube, S.C., Letão, G.S. (2001). Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytherapy Research*, 15, 127p.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.F., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp a Convenient Genera Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45,31p.
- Mingarro, M. D., Acero, N. , Llinares, F., Pozuelo, J. M., Galán, Mera A., Vicenten J. A., L. Morales, Alguacil L. F., Pérez C. (2003). Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (*Bignoniaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 87, (2-3):163-167.
- Mojsilovê, G. Kuchta, M. (2001).Dietary Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease. *Physiological Research*. 50(6): 529-535.

- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C.(2002) .Dietary Intake of Antioxidant Nutrients and the Risk of incident Alzheimer Disease in a Biracial. *American Medical Association*. 287(24):3230-7.
- Morrison, R. K., Brown, D. E.; Oleson, J. J.; Cooney, D. A. (1970). Oral toxicity studies with lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 17: 1,11.
- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C. (2000).Antibacterial activity of plant and phitochemical on antibiotic resistant bacteria ,*Brazilian Journal Microbiology*. 31, p.246 –256.
- Nucci, M., Marr, K.A. (2005).Emerging fungal disease. *The University of Chicago Press. Clinical Infectology Disease* 15;41(4):521,6.
- Onegi, B.; Kraft, C.; Kohler, I.; Freund, M.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Beyer, G.; Melzig, M.F.; Bienzle, U.; Eich, Eckart. (2002). Antiplasmodal activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum Kunthianum*. *Phytochemistry*, 60:39-44.
- Otimenyin, S.O., Uguru, M.O., Atang, B.L. (2004). , Antiinflamatory anda analgesic activities of *Ficus thgonningii* and *Pseudocedrela kotschy* extracts. *Journal of Pharmaceutical Research*
- Pettit, G. R. & Houghton, L. E. (1968). *Lapachol*. *Canadian Journal Chemistry*. 46(14): 2471–2472
- Pettit, G. R. & Houghton, L. E. (1971). Synthesis of hydroxyhydrolapachol and lapachol. *Journal of the Chemical Society C*. 509-511

- Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Lagrota, M. H. C. *et al.*, (1987), Antiviral activity of naphthoquinones. Lapachol derivatives against enteroviruses. *Latin-american Microbiology*, 29: 15-20.
- Ruhnke, M., Maschmeyer, G. (2004). Update on antifungal treatment of invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. *Mycoses* 47(7):263-276.
- Santana, de C.F., Lima de O., D'albuquerque, I.L., Lacerda, A.L., Martins, D.G. (1968). Antitumoral and toxicological properties of extracts of bark and various wood components of Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). *Rev Inst Antibiot*, 8:89-94.
- Santana, C. A. A.; Lima, C. C. D.; Magalhães, L. M. S. (2004). Estrutura horizontal e composição florística de três fragmentos secundários na cidade do Rio de Janeiro. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 26(4):443-451.
- Santos, A. F., Ferraz, P. A.L., Pinto, A. V., Pinto, M. C. F. R., Goulart, M.O.F. Sant'ana A. E. G. (2000). Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *International journal of parasitology*, 30(11): 1199-1202.
- Santos, P.R.V., Oliveira, A.C.X.; Tomassini, T.C.B. (1995). Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Revista farmacêutica bioquímica* . 31, p. 35-38.
- Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V. (2003). Um panorama atual da química e da farmacologia de Naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. *Química Nova*, 26(3):407-416.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1994) Identificação espectrométrica dos compostos orgânicos. 5ª edição, Guanabara Koogan, 387p.

- Siqueira, M.J., Bomm, D.M., Pereira, G.F.N., Garcez, S.W., Boaventura, D.A. M. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. 21(5).
- Sun, J.S & Geiser, A.H. (1998). A preparative synthesis of lapachol and related naphtoquinones. *Tetrahedron Letters*. 39(45): 8221-8224.
- Teixeira, M.J, de Almeida Y.M, Viana J.R, Holanda Filha, J.G, Rodrigues TP, Prata Jr J.R. (2001). *Phytotherapy Research*;15:44.
- Trabulsi, Luiz Rachid & Toledo, M.R.F. de, ed. (1991) *Microbiologia* .2ª. ed. Rio de Janeiro , Atheneu, 386 p.
- Yunes, R.S., Calixto, J.B. (2001). Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. UNOESC, SC- Chapecó, ARGOS Editora Universitária, 382-384 p.