



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E
ANTITUMORAL DE *Erythrina crista-galli* NATIVA DO RS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janaína Medeiros de Ávila

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E
ANTITUMORAL DE *Erythrina crista-galli* NATIVA DO RS.**

Janaína Medeiros de Ávila

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ionara Irion Dalcol

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de Mestrado

Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, de inibição enzimática e antitumoral de *Erythrina crista-galli* nativa do RS.

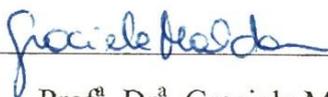
Elaborada por
Janaína Medeiros de Ávila

Como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE** em **QUÍMICA**

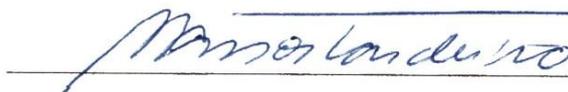
Comissão Examinadora:



Prof.ª. Dr.ª. Ionara Irion Dalcol - UFSM



Prof.ª. Dr.ª. Graciela Maldaner - URCAMP



Prof. Dr. Marco Aurélio Mostardeiro - UFSM

Santa Maria - RS, Setembro de 2013.

À Deus, criador de tudo, muito obrigada por me permitir estar nesse mundo, por ter saúde para viver esta vida e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho, muitas das quais já convivi e tantas outras com as quais convivo.

*À minha família, a qual palavras não são suficientes
para expressar o que vocês significam para mim.
Muito obrigada por tudo PAI, MÃE e IRMÃOS. Obrigada
por acreditarem e investirem em mim. Sou resultado da
força e da confiança de cada um de vocês. Apesar da
distância sempre estivemos juntos porque vocês estão
sempre no meu coração e nos meus pensamentos.
Obrigada por serem minha família!*

“Amar é compartilhar de momentos bons e ruins.”

Ao meu namorado Renato Nascimento Peixe, que sempre me apoiou nos momentos difíceis. Sou muito grata pela sua compreensão quando não podíamos estar juntos, pela grande ajuda nas formatações do trabalho, ajudando em tudo, sempre de boa vontade. Enfim, obrigada por ser esta pessoa especial na minha vida, por me ensinar tantas coisas sobre tudo e por estar sempre ao meu lado me dando forças. Te amo!

À minha orientadora, Ionara Dalcol, meu sincero e especial agradecimento. Obrigada por fazer do aprendizado não um trabalho, mas um contentamento. Por fazer com que me sentisse uma pessoa de valor; por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigada por afastar o medo das coisas que eu pudesse não compreender; levando-me, por fim, a compreendê-las... Por resolver o que achava complicado... Por ser essa pessoa digna de minha total confiança e a quem posso recorrer quando a vida se mostrar difícil... Obrigada por mostrar que eu era melhor do que eu suspeitava e, principalmente pela confiança depositada.

*"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."*

Antoine de Saint-Exupéry

*Obrigada às minhas queridas colegas e AMIGAS do Lab 2014,
Nalin S., Maura Z., Daniele M., Luciana A., Alessandra P. e Vanessa B.,
pelo convívio do dia-a-dia, pelas experiências compartilhadas, pelos
ensinamentos trocados, pelas alegrias vividas, pelos lanchinhos deliciosos,
pelas conversas intermináveis, pelas idas no "almox" e por todo apoio
que me deram em momentos difíceis. Vocês foram essenciais e as levarei
no meu coração sempre.*

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À professora Dr^a. Ionara Dalcol pela oportunidade dada, pela sua amizade, pela grande orientação, pelos conselhos e por todo acompanhamento, quando muitas vezes trabalhou comigo lado a lado.

Aos professores Marco A. Mostardeiro e Ademir F. Morel pela importante colaboração no exame de qualificação.

Um agradecimento também ao Bira, pela paciência nas inúmeras injeções na HPLC e pelos experimentos de HR-MS realizados.

À professora Ivana da Cruz, e seus orientandos Clarice, Francine e Alencar do Laboratório de Biogenômica-UFSM, pela realização da atividade antitumoral, prestada com muito boa vontade e eficiência, além de todo suporte para o entendimento e tratamento dos resultados obtidos.

Ao pessoal dos laboratórios 2123 e 2123B por sempre atenderem aos meus inúmeros pedidos, em especial à Adriana, Lu e Janice, agradeço pela paciência. E, também ao Dirceu e Mateus pela grande ajuda nas coletas da planta.

Ao Alexandre pela realização da atividade antimicrobiana e ao Marcelo por fazer os RMNs mais demorados da universidade e pelas injeções no CG e ao Vinícius (Vini) por fazer o experimento de NOESY, o meu sincero agradecimento.

Ao meu querido Márcio Lobo pela sua amizade e toda ajuda prestada quando resolvi tentar a seleção de mestrado, assim como a ajuda dada durante o mestrado, fica aqui o meu muito obrigada a este amigo com quem sempre pude contar.

À aluna de iniciação científica Alessandra Pereira, um agradecimento especial, que carinhosamente me chamou de “Mami” e que com muita dedicação ajudou-me na conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas de faculdade, Guilherme, Gustavo e Matias pelas dicas e empréstimos de materiais.

Às colegas de pós-graduação Nalin e Maura pela realização dos ensaios de inibição enzimática.

À funcionária da UFSM e colega de pós-graduação Suziane (Suzi) pelos empréstimos de matérias e por sua boa vontade em ajudar sempre que necessário.

À professora Dr^a. Graciela Maldaner por aceitar fazer parte da banca de defesa assim como o professor Dr. Marco A. Mostardeiro.

*“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo.”*

Nelson Mandela

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANTITUMORAL DE *Erythrina crista-galli* NATIVA DO RS.

AUTORA: JANAÍNA MEDEIROS DE ÁVILA

ORIENTADORA: IONARA IRION DALCOL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de Setembro de 2013.

O estudo fitoquímico do extrato bruto hexânico, metanólico e frações (éter ácida, éter básica e acetato básica) das cascas do caule de *E. crista-galli* (Fabaceae) resultou no isolamento de quatro compostos: o fitoesterol estigmasterol (**70**) e o triterpeno lupeol (**71**) além dos alcaloides erisotrina (**1**) e epieritratidina (**50**) usuais do gênero *Erythrina*. As estruturas dos metabólitos isolados foram elucidadas através de RMN ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais, além de comparação com amostra padrão quando existente e dados disponíveis na literatura. Os extratos, as frações e os compostos isolados foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, antitumoral frente a células cancerígenas HT29 (colorretal) e de inibição das enzimas POP, DPP-IV e AChE. Dentre as amostras testadas, o extrato bruto metanólico (EBM), suas frações (FEA, FEB e FAB) e compostos isolados apresentaram grande potencial antimicrobiano principalmente frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos foram satisfatórios para a enzima POP, onde o EBM e suas frações, principalmente a fração éterea ácida (FEA), demonstraram grande potencial inibidor desta enzima. Para a DPP-IV apenas o extrato bruto hexânico (EBH) mostrou-se ativo. O efeito antitumoral da planta em questão também foi investigado e os resultados obtidos indicam que o EBM, a combinação das frações FEB e FAB e o alcaloide epieritratidina (**50**) possuem um grande efeito antiproliferativo frente às células do colorretal (HT29) após 72 horas de exposição.

Palavras chave: *Erythrina crista-galli*, Fabaceae, alcaloides; atividades biológicas

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ENZYMATIC INHIBITION AND ANTITUMOR ACTIVITIES *Erythrina crista-galli* NATIVE FROM RS.

AUTHOR: JANAÍNA MEDEIROS DE ÁVILA

ADVISER: IONARA IRION DALCOL

Date and Place of Defense: Santa Maria, September 5th, 2013

The phytochemical study of the crude extract hexane, methanol and fractions (acid ether, basic ether and basic acetate) from the stem bark of *E. crista-galli* (Fabaceae) resulted in the isolation of four compounds: The phytosterol stigmasterol (**70**), the triterpene lupeol (**71**) and the alkaloids erysotrine (**1**) and epierythratidine (**50**), usual in the genus *Erythrina*. The structures of the isolated metabolites were elucidated by ¹H and ¹³C NMR uni and bidimensional, and compared with standard sample and data available in the literature. The extracts, fractions and isolated compounds were tested for their antimicrobial and antitumor front cancer cells HT29 (colorectal) activities, as well as regarding the capacity of inhibition of enzymes prolyl oligopeptidase, dipeptidil peptidase-VI and acetylcholinesterase. The crude methanolic extract, all fractions and individual compounds showed high antimicrobial activity mainly against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The results were satisfactory in POP inhibition assays, when the crude methanolic extract and its fractions, mainly acid ether fraction, showed great inhibitor potential against this enzyme. For DPP-IV only the crude hexane extract was active. The *in vitro* antitumoral activity of the crude methanolic extract, basic fractions and the isolate alkaloids was investigated at different concentrations against the human colon cancer cell line HT-29 (PicoGreen dsDNA assay). The results suggest that the anti-proliferative effect of *E. crista-galli* extract on HT-29 cancer cells may be attributed, at least in part, to the presence of the erythrinian alkaloids **1** and **50**.

Keywords: *Erythrina crista-galli*, Fabaceae, alkaloids, antimicrobial activity, enzymatic inhibition assay, prolyl oligopeptidase, dipeptidil peptidase-IV, acetylcholinesterase, antitumor activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partes das plantas do gênero <i>Erythrina</i> utilizadas na medicina popular.....	28
Figura 2 - Espécie <i>Erythrina crista-galli</i> , família Fabaceae.....	29
Figura 3 - Casca do tronco de <i>E. crista-galli</i>	30
Figura 4 - Estruturas e sistema de numeração para A: esqueleto 1,6-dieno e B: esqueleto $\Delta^{1(6)}$ -alqueno.....	31
Figura 5 - Alguns alcaloides diênicos do gênero <i>Erythrina</i>	31
Figura 6 - Alguns alcaloides alquênicos do gênero <i>Erythrina</i>	32
Figura 7 - Estrutura básica numerada do núcleo dos flavonoides	35
Figura 8 - Estrutura tridimensional da enzima prolil oligopeptidase.....	44
Figura 9 - Estrutura química de alguns inibidores sintéticos da POP.....	45
Figura 10 - Estruturas de alguns inibidores naturais da POP.....	46
Figura 11 - Comparação das estruturas tridimensionais da DPP-IV e POP.....	47
Figura 12 - Inibidores comerciais da DPP-IV.....	48
Figura 13 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos.....	49
Figura 14 - Estrutura do primeiro fármaco usado no tratamento da DA.....	50
Figura 15 - Estrutura de alguns compostos utilizados no tratamento da DA.....	50
Figura 16 - Processo de formação de tumores.....	55
Figura 17 - Fármacos derivados de plantas utilizados na terapia contra o câncer.....	56
Figura 18 - Fotomicrografia em contraste de fase de células de câncer colorretal HT29 (40 x) em alta densidade.....	77
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do estigmasterol (70) em CDCl_3 a 400 MHz.....	84
Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C do estigmasterol (70) em CDCl_3 a 100 MHz.....	85
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H do lupeol (71) em CDCl_3 a 400 MHz.....	87
Figura 22 - Cromatograma de HPLC da fração FEB a $\lambda = 240$ nm.....	88
Figura 23 - Cromatograma de HPLC do erisotrina (1).....	89
Figura 24 - Espectro de massa ESI (+) do erisotrina (1).....	90
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz.....	91
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 5,70-6,83 ppm, do erisotrina (1) a 400 MHz.....	92

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 3,20-4,90 ppm, do erisotrina (1) a 400 MHz.....	93
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 1,80-3,15 ppm, do erisotrina (1) a 400 MHz.....	94
Figura 29 - Espectro de RMN 2D COSY, região entre δ 3,5-7,5 ppm, do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz.....	95
Figura 30 - Espectro expandido de RMN 2D COSY, região entre δ 1,0-4,0 ppm, do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz.....	96
Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C do erisotrina (1) em CDCl_3 a 100 MHz.....	97
Figura 32 - Espectro de DEPT 135° do erisotrina (1) em CDCl_3 a 100 MHz.....	98
Figura 33 - Espectro de RMN 2D HSQC do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz.....	99
Figura 34 - Espectro expandido de RMN 2D HSQC, região entre δ 1,2-4,0 ppm, do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz.....	99
Figura 35 - Cromatograma de HPLC da fração FAB a $\lambda = 270$ nm.....	101
Figura 36 - Cromatograma de HPLC do epieritratidina (50).....	102
Figura 37 - Espectro de massa ESI(+) do epieritratidina (50).....	103
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz.....	104
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 3,64-7,26 ppm, do epieritratidina (50) a 400 MHz.....	105
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 1,00-5,50 ppm, do epieritratidina (50) a 400 MHz.....	106
Figura 41 - Espectro de RMN 2D COSY do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz....	107
Figura 42 - Espectro expandido de RMN 2D COSY, região entre δ 1,6-4,4 ppm, do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz.....	107
Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 100 MHz.....	108
Figura 44 - Espectro DEPT 135° do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 100 MHz.....	109
Figura 45 - Espectro de RMN 2D HSQC do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz....	110
Figura 46 - Espectro expandido de RMN 2D HSQC, região entre δ 1,6-4,6 ppm, do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz.....	110
Figura 47 - Espectro de RMN 2D NOESY do epieritratidina (50) em CDCl_3 a 400 MHz.	112
Figura 48 - Estrutura do epieritratidina (50) e interações espaciais ^1H - ^1H observadas no espectro de RMN 2D NOESY do alquenoide 50.....	112

Figura 49 - Efeito antitumoral do extrato (EBM) da planta <i>E. crista-galli</i> na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29.....	126
Figura 50 - Efeito antitumoral da combinação das frações FAB e FEB da planta <i>E. crista-galli</i> na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29.....	127
Figura 51 - Efeito antitumoral da combinação dos alcaloides isolados, erisotrina (1) e epieritratidina (50), da planta <i>E. crista-galli</i> na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metabólitos isolados de diversas espécies do gênero <i>Erythrina</i> pertencentes à classe dos flavonoides.....	35
Tabela 2 - Outros metabólitos pertencentes ao gênero <i>Erythrina</i>	37
Tabela 3 - Coluna cromatográfica C ₁ Hx (precipitado verde de EBH).....	63
Tabela 4 - Coluna cromatográfica CHxJ (fração CHxH 6/17-22 e sobrenadante do EBH)...	64
Tabela 5 - Coluna cromatográfica da Fração Etérea Básica (FEB).....	67
Tabela 6 - Coluna cromatográfica da Fração Acetato Básica (FAB).....	68
Tabela 7 - Micro-organismos indicadores.....	73
Tabela 8 - Rendimentos dos extratos brutos e frações.....	81
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H (400,13 MHz) e ¹³ C (100,62 MHz) do erisotrina (1) em CDCl ₃	100
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H (400,13 MHz) e ¹³ C (100,62 MHz) do epieritratidina (50) em CDCl ₃	113
Tabela 11 - Ponto de fusão e rotação óptica do epieritratidina (50).....	114
Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos extratos brutos, frações e metabólitos isolados de <i>E. crista-galli</i>	116
Tabela 13 - Atividade antifúngica dos extratos brutos, frações e metabólitos isolados de <i>E. crista-galli</i>	119
Tabela 14 - Atividade inibitória dos extratos brutos e frações testadas de <i>E. crista-galli</i> frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE.....	121
Tabela 15 - Atividade inibitória dos metabólitos isolados de <i>E. crista-galli</i> frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE.....	122
Tabela 16 - Atividade inibitória frente à enzima POP das principais frações obtidas a partir da CC da fração FEA.....	123

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota biossintética sugerida para a formação de alcaloides eritrínicos.....	34
Esquema 2 - Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico de <i>E. crista-galli</i>	66
Esquema 3 - Tratamento da casca de <i>E. crista-galli</i>	81

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
J	Constante de acoplamento
$[\alpha]_D$	Rotação óptica
μg	Micrograma
μL	Microlitro
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMC	N-aminometilcumarina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEUTSA	Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CNNLC	Comitê Nacional para Normas de Laboratório Clínico
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DCM	Diclorometano

DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarizations Transfer
dfDNA	Deoxyribonucleic acid dupla fita
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-IV	Dipeptidil peptidase-4
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EBH	Extrato Bruto Hexânico
EBM	Extrato Bruto Metanólico
EC	Enzyme Commission
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI(+)	Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray
FAB	Fração Acetato Básica
FDA	Food and Drugs Administration
FEA	Fração Éterea Ácida
FEB	Fração Éterea Básica
h	Horas
HEX	Hexano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
GIP	Polipeptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao Glucagon
GP-AMC	H-Gli-Pro-metilcumarina-7-amida
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
m	Multiplo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Micromolar

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
N/A	Não Ativo
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NPPN	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
NO	Óxido Nítrico
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
N/T	Não Testado
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pág	Página
PEP	Protil endopeptidase
PF	Ponto de Fusão
ppm	Partes por milhão
POP	Protil oligopeptidase
R _f	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ribonucleic Acid
RS	Rio Grande do Sul
s	Singleto
SBQA	Sociedade Britânica para Quimioterapia Antimicrobiana
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultra violeta
ZGP-AMC	N-benziloxycarbonil-Gli-Pro-metilcumarina-7-amida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Informações botânicas	27
3.1.1 Família Fabaceae.....	27
3.1.2 O gênero e as espécies de <i>Erythrina</i>	27
3.1.3 A espécie <i>Erythrina crista-galli</i> L.....	28
3.2 Fitoquímica	30
3.2.1 Alcaloides.....	30
3.4.1.1 Biossíntese dos alcaloides.....	33
3.2.2 Flavonoides.....	34
3.2.3 Outros compostos.....	36
3.3 Atividades farmacológicas	37
3.3.1 Atividade de inibição enzimática.....	43
3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP).....	43
3.3.1.2 Dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV).....	46
3.3.1.3 Acetilcolinesterase (AChE).....	48
3.3.2 Atividade antimicrobiana.....	51
3.3.2.1 Micro-organismos patogênicos.....	52
3.3.3 Atividade antitumoral.....	55
3.3.3.1 Câncer de cólon e reto.....	57
3.3.3.2 Ensaio de citotoxicidade.....	58
4 PARTE EXPERIMENTAL	60
4.1 Procedimentos experimentais	60
4.1.1 Materiais e métodos cromatográficos.....	60
4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	60
4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	61

4.1.4 Espectrometria de Massa de Alta Resolução ESI (+).....	61
4.1.5 Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP).....	61
4.1.6 Aparelho de Ponto de Fusão.....	61
4.1.7 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro.....	62
4.2 <i>Erythrina crista-galli</i>	62
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	62
4.2.2 Preparação dos extratos.....	62
4.2.2.1 Fracionamento do Extrato Bruto Hexânico - EBH.....	62
4.2.2.2 Fracionamento Ácido/Base do Extrato Bruto Metanólico - EBM.....	65
4.2.2.2.1 Fração Etérea Básica (FEB).....	66
4.2.2.2.2 Fração Acetato Básica (FAB).....	67
4.2.2.2.3 Fração Etérea Ácida (FEA).....	69
4.3 Dados dos metabólitos isolados	70
4.3.1 Extrato Bruto Hexânico - EBH.....	70
4.3.2 Extrato Bruto Metanólico - EBM.....	71
4.3.2.1 Fração Etérea Básica (FEB).....	71
4.3.2.2 Fração Acetato Básica (FAB).....	71
4.3.2.3 Fração Etérea Ácida (FEA).....	72
4.4 Ensaios biológicos	72
4.4.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	72
4.4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em caldo.....	72
4.4.1.2 Micro-organismos empregados no ensaio.....	72
4.4.1.3 Padrões utilizados nos ensaios biológicos.....	73
4.4.1.4 Meios de cultura.....	73
4.4.1.5 Método de determinação da atividade antimicrobiana.....	74
4.4.1.6 Método de Concentração Letal Mínima.....	74
4.4.2 Ensaios Enzimáticos.....	75
4.4.2.1 Enzimas utilizadas nos ensaios de inibição enzimática.....	75
4.4.2.2 Ensaio de inibição da prolil oligopeptidase (POP).....	75
4.4.2.3 Ensaio de inibição da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV).....	76
4.4.2.4 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	76
4.4.3 Atividade antitumoral <i>in vitro</i>	77

4.4.3.1 Avaliação da atividade antitumoral.....	77
4.4.3.2 Cultura de células.....	77
4.4.3.3 Ensaio de atividade antitumoral pela medição da viabilidade celular e do efeito antiproliferativo.....	78
4.4.3.3.1 Técnica de quantificação PicoGreen.....	78
4.4.3.3.2 Análise estatística.....	79
5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	80
5.1 Rendimentos dos extratos e frações.....	80
5.2 Análise fitoquímica de <i>Erythrina crista-galli</i>.....	82
5.2.2 Extrato Bruto Hexânico - EBH.....	82
5.2.2.1 Estigmasterol.....	82
5.2.2.2 Lupeol.....	85
5.2.3 Extrato Bruto Metanólico - EBM.....	87
5.2.3.1 Fração Etérea Básica (FEB).....	88
5.2.3.1.1 Erisotrina.....	88
5.2.3.2 Fração Acetato Básica (FAB).....	101
5.2.3.2.1 Erisotrina.....	101
5.2.3.2.2 Epieritratidina.....	102
5.2.3.3 Fração Etérea Ácida (FEA).....	114
5.3 Ensaios biológicos farmacológicos.....	115
5.3.1 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	115
5.3.2 Ensaios enzimáticos.....	120
5.3.2.1 Avaliação das atividades de inibição enzimática.....	120
5.3.3 Atividade antitumoral <i>in vitro</i>	124
5.3.3.1 Atividade antitumoral.....	124
6 CONCLUSÃO.....	130
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida humana desde tempos imemoriais. Há milhares de anos atrás o homem aprendeu a utilizar as substâncias naturais, principalmente aquelas de origem vegetal, para o tratamento e cura de suas enfermidades.¹

Os primeiros relatos escritos do uso de plantas com fins medicinais remontam as sagradas escrituras e o papiro egípcio de Ebers (1500 a.C.) que documenta 811 prescrições e 700 drogas (maioria oriunda de plantas) além de fórmulas como para gargarejos, pós para inalação, cataplasmas e infusões.^{2,3,4}

Já o primeiro texto chinês sobre plantas medicinais relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para o tratamento de doenças. Sendo que algumas dessas plantas são ainda utilizadas, dentre elas, Ginseng (*Panax spp*), *Ephedra spp*, *Cassia spp* e *Rheum palmatum L*, inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas.⁵

Antigamente, o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (fitoterapia) era uma opção adotada apenas pela população de baixo poder aquisitivo. Sua utilização era fundamentada em superstições religiosas e práticas culturais, sem maior significado farmacológico. Recentemente, a fitoterapia é utilizada tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento como uma solução alternativa para tratar problemas de saúde, estando bem estabelecida em algumas culturas e tradições, principalmente na Ásia, na América Latina e na África.⁶

Embora existam registros antigos sobre a ampla aplicabilidade dos vegetais como recurso terapêutico, pouco se sabia sobre os efeitos e mecanismos de ação das plantas medicinais. Seu conhecimento era baseado apenas no empirismo, ou seja, no conhecimento prático do uso dos vegetais como medicamentos. Apenas no final do século XIX e começo do século XX que os recursos naturais passaram a ser estudados como ferramentas científicas e os princípios ativos começaram a ser identificados e isolados, sendo então utilizados na medicina tradicional.⁷

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda desempenham um importante papel na contribuição para a saúde e além do mais estão distribuídas em todo o mundo, mas são mais abundantes em países tropicais. O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, dentre suas riquezas naturais estão, as plantas

medicinais, que são matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos.^{8,9}

Durante as últimas décadas, o interesse público em terapias naturais, aumentou drasticamente, em todo o mundo. O comércio de ervas medicinais têm atraído grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas, pois muitas dessas substâncias naturais isoladas ou os fármacos a quem servem de modelo têm movimentando um mercado bilionário, como por exemplo, a vimblastina e a viscristina, isoladas de *Catharanthus roseus*, e o taxol, isolado de *Taxus breavifolia*, importantes agentes quimioterapêuticos de uso clínico corrente contra o câncer.^{3,8,10}

As plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários, sintetizados através de uma série de reações químicas que ocorrem no interior de cada célula. Entende-se por metabólitos primários as substâncias químicas consideradas essenciais para o organismo vegetal e que estão relacionadas ao seu crescimento e constituição biológica, são eles: ácidos nucleicos (DNA e RNA), carboidratos, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos.^{7,11,12}

Os metabólitos secundários, por sua vez, são compostos que não estão envolvidos com as funções vitais e possuem características químicas muito variadas e, às vezes complexas. Desempenham um papel importante na interação da planta com o meio ambiente sendo responsáveis pela proteção contra herbívoros, patógenos e estresses abióticos, servem como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microorganismos, entre os principais grupos estão, alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos.^{11,13}

Considerando os efeitos terapêuticos que as plantas apresentam devido a presença, principalmente, de seus metabólitos secundários e conseqüentemente sua grande utilização na medicina popular, tanto no passado quanto no presente é necessário desenvolver cada vez mais pesquisas, com a finalidade de conhecer detalhadamente a composição dessas substâncias biologicamente ativas e seus efeitos no organismo humano.

Desta forma, o grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria vem realizando uma triagem nas espécies nativas do Rio Grande do Sul que apresentam relatos de uso na medicina popular. Diversas contribuições têm sido realizadas tanto para o isolamento e determinação estrutural de compostos químicos quanto para os trabalhos envolvendo as atividades biológicas dos mesmos.

Dentre as espécies nativas do bioma Pampa, selecionou-se a espécie *Erythrina cristagalli*, pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente no Brasil como corticeira-do-

banhado e comumente encontrada na flora sul-rio-grandense, para uma investigação mais detalhada dos seus constituintes químicos.¹⁴

O gênero *Erythrina* é distribuído amplamente pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É conhecido pela bioprodução significativa de alcaloides, alguns dos quais possuem atividade fisiológica semelhante à ação do curare. Além de alcaloides, produzem flavonoides, flavanonas, isoflavonas, pterocarpanos e terpenos, entre outros. Estes metabólitos apresentam diversas atividades farmacológicas e desta forma, plantas deste gênero são utilizadas na medicina popular para tratar diversos problemas de saúde, tais como agitação, insônia, infecções antimicrobianas e processos inflamatórios.^{15,16,17,18,19}

Um estudo realizado por Ozawa et al. (2010)²⁰ relata que no Brasil, as cascas da espécie *E.crista-galli* são utilizadas no tratamento de reumatismo e hepatite, também como sedativo e ainda como indutor de sono ou estado hipnótico. Considerando os estudos já relatados para esta planta, sua família, gênero e metabólitos produzidos pela mesma buscou-se uma investigação mais aprofundada desta espécie encontrada na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho consiste em realizar o estudo fitoquímico, bem como a avaliação da atividade biológica das cascas do caule da espécie *Erythrina crista-galli*, pertencente à família Fabaceae.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos brutos hexânico e metanólico, através de uma extração à quente das cascas do caule da espécie *E. crista-galli* coletada no município de Santa Maria
- Realizar o fracionamento ácido-base do extrato bruto metanólico para obtenção das frações e metabólitos presentes na planta em estudo
- Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos e frações das cascas do caule de *E. crista-galli*, sejam eles inéditos ou já identificados anteriormente
- Identificar os compostos isolados com a utilização de métodos espectroscópicos uni e bidimensionais, como RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135°, COSY, HSQC e NOESY e ainda, espectrometria de massa de alta resolução
- Realizar testes biológicos para a determinação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE dos extratos, frações e compostos isolados de *E. crista-galli*
- Testar as frações e compostos básicos isolados oriundos do extrato bruto metanólico de *E. crista-galli* frente à linhagem de células HT29 (colorretal) para verificar a existência do potencial antitumoral destas amostras;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Informações botânicas

3.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae, também chamada de Leguminosae é composta por aproximadamente 730 gêneros e mais de 19.400 espécies, sendo considerada a terceira maior família de angiospermas, no Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies. Uma característica típica desta família é a presença de frutos em formato de vagem (com algumas exceções). São plantas de hábitos variados, abrangendo tanto espécies arbóreas como espécies herbáceas anuais, muitas de grande importância econômica e principalmente alimentar. São também muito importantes ecologicamente uma vez que fixam o nitrogênio da atmosfera, já que quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes.^{21,22,23}

As Fabaceae possuem ampla distribuição pelo mundo, sendo encontradas principalmente em regiões temperadas e tropicais. Esta família está subdividida em 3 subfamílias muito distintas: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae (ou Caesalpinaceae) e Mimosoideae (ou Mimosaceae). A subfamília Faboideae é considerada a mais evoluída das leguminosas e, dentre as espécies florestais nativas, destaca-se o gênero *Erythrina* (corticeiras ou suínãs).^{21,22}

3.1.2 O gênero e as espécies de *Erythrina*

O gênero *Erythrina*, pertencente à família Fabaceae, é amplamente conhecido devido a sua grande ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, desde áreas quente-temperadas, como África do Sul, Cordilheira do Himalaia até sudeste dos Estados Unidos. O nome *Erythrina* possui origem grega, onde a palavra “erythros” significa vermelho em alusão às flores vermelhas brilhantes típicas das árvores do gênero. Mais de 130 espécies de “árvores corais” pertencentes ao gênero *Erythrina* têm sido amplamente estudadas.^{24,25}

Na América do Sul, essas espécies estão presentes na Argentina, Bolívia, Paraguai, Guiana Francesa, Colômbia e Peru. No Brasil são encontradas oito espécies de *Erythrina*,

sendo elas: *E. mulungu*, *E. velutina*, *E. crista-galli*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata*, *E. speciosa* e *E. verna*, que estão distribuídas por todos os biomas brasileiros, como mata Atlântica, cerrado, floresta Amazônica e caatinga nordestina.²⁵

Estudos fitoquímicos nas mais variadas espécies de gênero *Erythrina* demonstraram que estas plantas acumulam uma ampla variedade de metabólitos secundários, principalmente alcaloides, flavonoides (isoflavonas, flavanonas, pterocarpanos e isoflavanonas) e triterpenos. Devido à presença destes compostos, que possuem diversas propriedades farmacológicas, essas plantas têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de diferentes problemas de saúde como calmantes, contra insônia e no trato de inflamações.^{17,18,25,26}

Em relação às espécies que são utilizadas na medicina popular, em artigo de revisão do gênero *Erythrina* publicado em 2012, Araújo-Júnior et al. descreveram a casca como sendo a parte mais estudada, com uso de 40,8%, como pode ser observado na Figura 1.²⁵

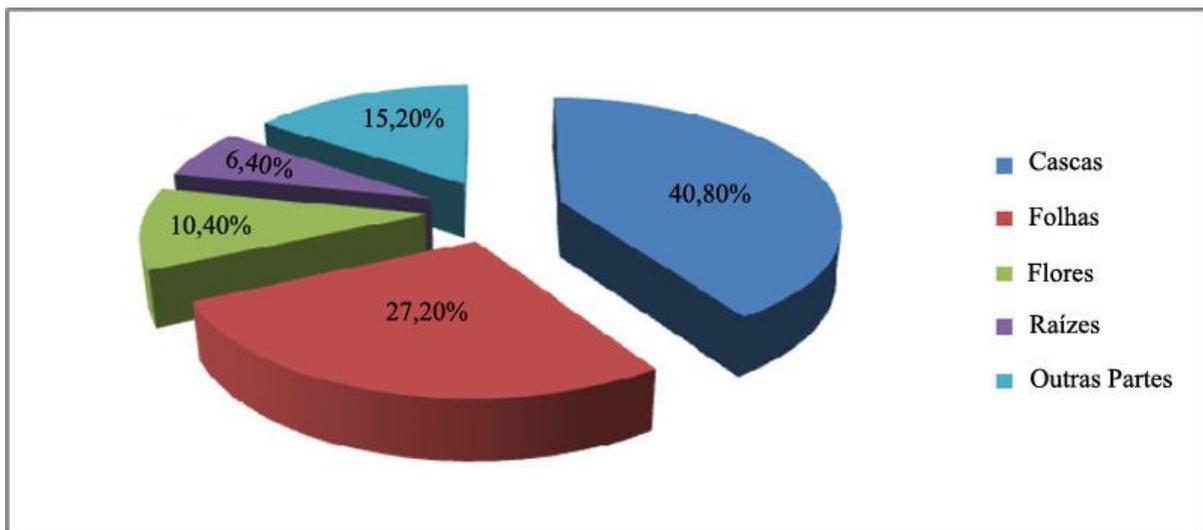


Figura 1 - Partes das plantas do gênero *Erythrina* utilizadas na medicina popular. Figura reproduzida de Araújo-Júnior et al. (2012)²⁵

3.1.3 A espécie *Erythrina crista-galli* L.

A espécie *E. crista-galli* L. (Figura 2) é uma árvore de tamanho médio, fixadora de nitrogênio e encontrada em vários países da América Latina, principalmente em zonas subtropicais. É pertencente à família Fabaceae, sendo que no Brasil ocorre principalmente em terrenos úmidos, que se entendem desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul, apesar desta espécie tolerar bem ambientes drenados. É utilizada para fins ornamentais, sendo adequada para o paisagismo e recuperação ambiental. O uso tradicional de diversas partes da árvore

incluem artefatos rurais e musicais, medicamentos, material para tingimento e para pesca. Na Argentina, é a espécie de *Erythrina* mais comumente encontrada, utilizada principalmente como planta ornamental.^{27,28,29,30}



Figura 2 - Espécie *Erythrina crista-galli*, família Fabaceae (Fonte: www.mavifidan.com)

Está presente no bioma Pampa, sendo considerada típica da paisagem rio-grandense e chamada popularmente de corticeira-do-banhado, crista de galo ou ainda de eritrina. Além do valor ornamental, *E. crista-galli* L. é uma planta imune ao corte no Rio Grande do Sul pela Lei Estadual 9.519/92 (Art. 33º).^{29,31,32}

A casca de *E.crista-galli* L. tem sido utilizada para reumatismo, hepatite, sedação e indução de sono ou estado hipnótico. Análises fitoquímicas realizadas com esta planta demonstraram a presença de alcaloides eritrínicos e benzilisoquinolínicos, isoflavonas e pterocarpanos.²⁰

Investigações farmacológicas mostraram que extratos de sementes de *E. crista-galli* possuem efeitos sedativos, hipertensivos, laxativos e diuréticos. Além disso, alcaloides eritrínicos presentes em extratos de sementes de certas espécies de *Erythrina* exibiram ação semelhante ao curare, agindo sobre o sistema nervoso central.²⁸

A Figura 3 mostra a casca do caule da planta em estudo.



Figura 3 - Casca do tronco de *E. crista-galli*

3.2 Fitoquímica

3.2.1 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados que possuem ação farmacológica e são encontrados predominantemente nas angiospermas, possuindo em sua maioria, caráter alcalino.³³

Plantas do gênero *Erythrina* são conhecidas pela produção significativa de alcaloides. Estudos realizados entre os anos de 1930 e 1940 mostraram que extratos de sementes de várias espécies continham alcaloides com atividade fisiológica semelhante à ação do curare, ou seja, capazes de causar bloqueio neuromuscular. Este fato despertou grande interesse por parte dos pesquisadores e a partir disso, vários alcaloides foram isolados de diferentes espécies do gênero.³⁴

Em relação à estrutura química, estes alcaloides destacam-se por serem bases terciárias com um sistema *spiro* único. Por conveniência, os alcaloides eritrínicos foram divididos em dois grupos principais de acordo com suas estruturas: 1,6-dieno e $\Delta 1(6)$ -alqueno (Figura 4).^{34,35}

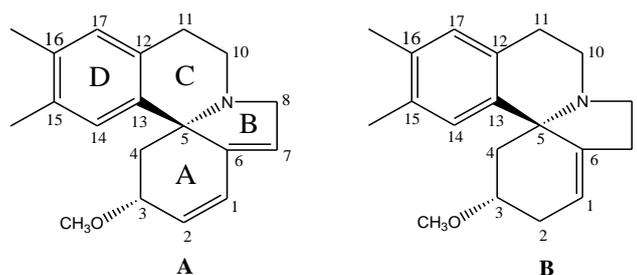
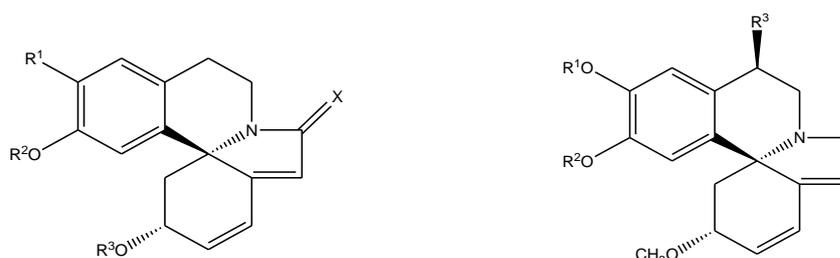


Figura 4 - Estruturas e sistema de numeração para A: esqueleto 1,6-dieno e B: esqueleto $\Delta 1(6)$ -alqueno.

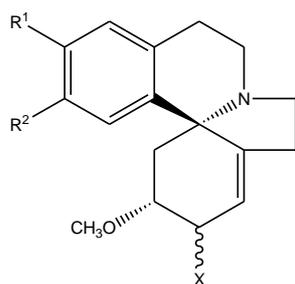
Plantas do gênero *Cocculus*, da família Menispermaceae também produzem alcaloides muito semelhantes aos produzidos pelo gênero *Erythrina*, somente diferindo no padrão de oxigenação do anel A.³⁶

As Figuras 5 e 6 mostram a maioria dos alcaloides identificados de plantas do gênero *Erythrina* conhecidos até a década de 80.³⁵



Alcaloide	R ¹	R ²	R ³	X	Alcaloide	R ¹	R ²	R ³
1 Erisotrina	CH ₃ O	CH ₃	CH ₃	2H	14 Eritartina	CH ₃	CH ₃	OH
2 Erisotramidina	CH ₃ O	CH ₃	CH ₃	O	15 Eritristemina	CH ₃	CH ₃	OCH ₃
3 Eritravina	CH ₃ O	CH ₃	H	2H	16 Eritrascina	CH ₃	CH ₃	OAc
4 Eritralina	—OCH ₂ —		CH ₃	2H	17 Eritrina	—CH ₂ —		OH
5 Erisovina	CH ₃ O	H	CH ₃	2H	18 11-Metoxieritralina	—CH ₂ —		OCH ₃
6 Erisolina	CH ₃ O	H	H	2H	19 11-Oxoeritralina	—CH ₂ —		==O
7 Erisodina	HO	CH ₃	CH ₃	2H	20 11-Hidroxierisovina	CH ₃	H	OH
8 Erisonina	HO	CH ₃	H	2H	21 11-Metoxierisovina	CH ₃	H	OCH ₃
9 Erisopina	HO	H	CH ₃	2H	22 11-Oxoerisovina	CH ₃	H	==O
10 Erisotiavina	CH ₃ O	<i>a</i>	CH ₃	2H	23 11-Hidroxierisodina	H	CH ₃	OH
11 Glicoyerisodina	<i>b</i>	CH ₃	CH ₃	2H	24 11-Metoxierisodina	H	CH ₃	OCH ₃
12 Erisotiopina	<i>a</i>	H	CH ₃	2H	25 11-Oxoerisodina	H	CH ₃	==O
13 Erisoporina	CH ₃ O	<i>c</i>	CH ₃	2H	26 11-Metoxierisopina	H	H	OCH ₃
					27 11-Oxoerisopina	H	H	==O

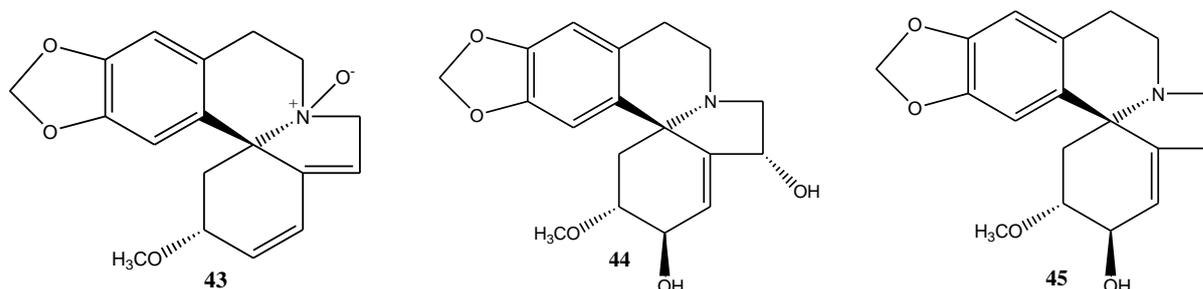
Figura 5 - Alguns alcaloides diênicos do gênero *Erythrina*; *a*: HO₂CCH₂SO₂—; *b*: 1- β -glicosil; *c*: hipaforina éster

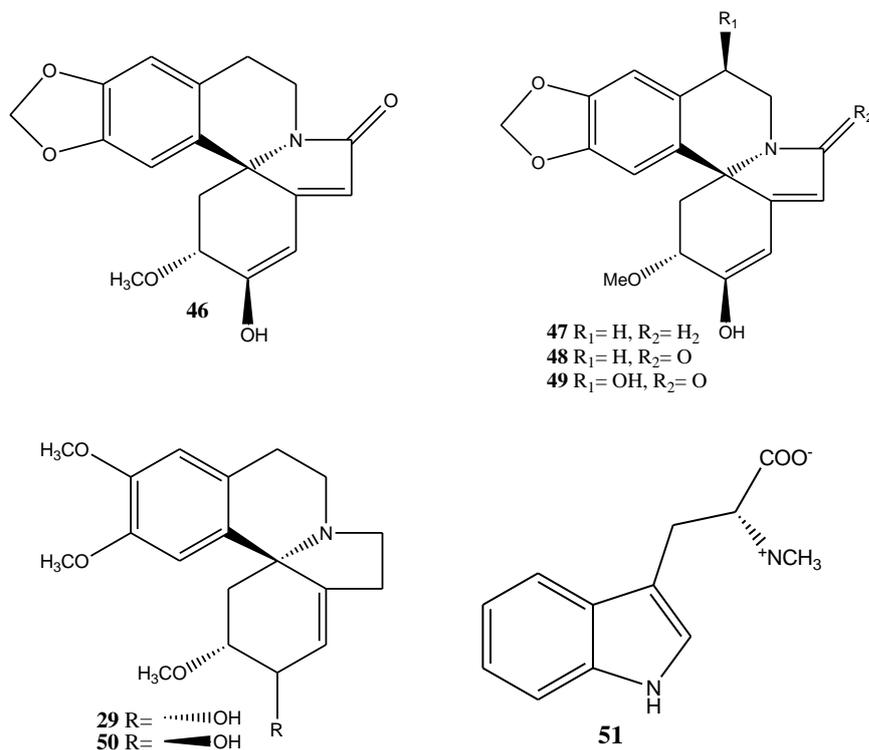


Alcaloide	R ¹	R ²	X	
28	Diidroerisotrina	CH ₃ O	CH ₃ O	H
29	Eritratidina	CH ₃ O	CH ₃ O	OH
30	Eritratidinona	CH ₃ O	CH ₃ O	=O
31	Eritramina	—OCH ₂ O—		H
32	Eritratina	—OCH ₂ O—		OH
33	Eritratinona	—OCH ₂ O—		=O
34	Diidroerisovina	CH ₃ O	HO	H
35	Erisosalvina	CH ₃ O	HO	OH
36	Erisosalvinona	CH ₃ O	HO	=O
37	Diidroerisodina	HO	CH ₃ O	H
37	Erisotina	HO	CH ₃ O	OH
39	Erisotinona	HO	CH ₃ O	=O
40	Erisopitina	HO	HO	OH
41	Erisoflorinona	HO	HO	=O
42	Eritroculina	CH ₃ O	CH ₃ O ₂ C—	H

Figura 6 - Alguns alcaloides alquênicos do gênero *Erythrina*

Em 2010, Osawa et al. relatou o isolamento de dois novos alcaloides eritrínicos, cristianina A (**43**) e cristianina B (**44**) da espécie *E. crista-galli*, juntamente com outros dez alcaloides eritrínicos e um alcaloide indólico já conhecidos da literatura, sendo eles: eritratina (**45**), cristamidina (**46**), erisovina (**5**), erisotrina (**1**), eritralina (**47**), 8-oxoeritralina (**48**), erittrinina (**17**), 8-oxoerittrinina (**49**), eritratidina (**29**), epieritratidina (**50**) e hipaforina (**51**).²⁰



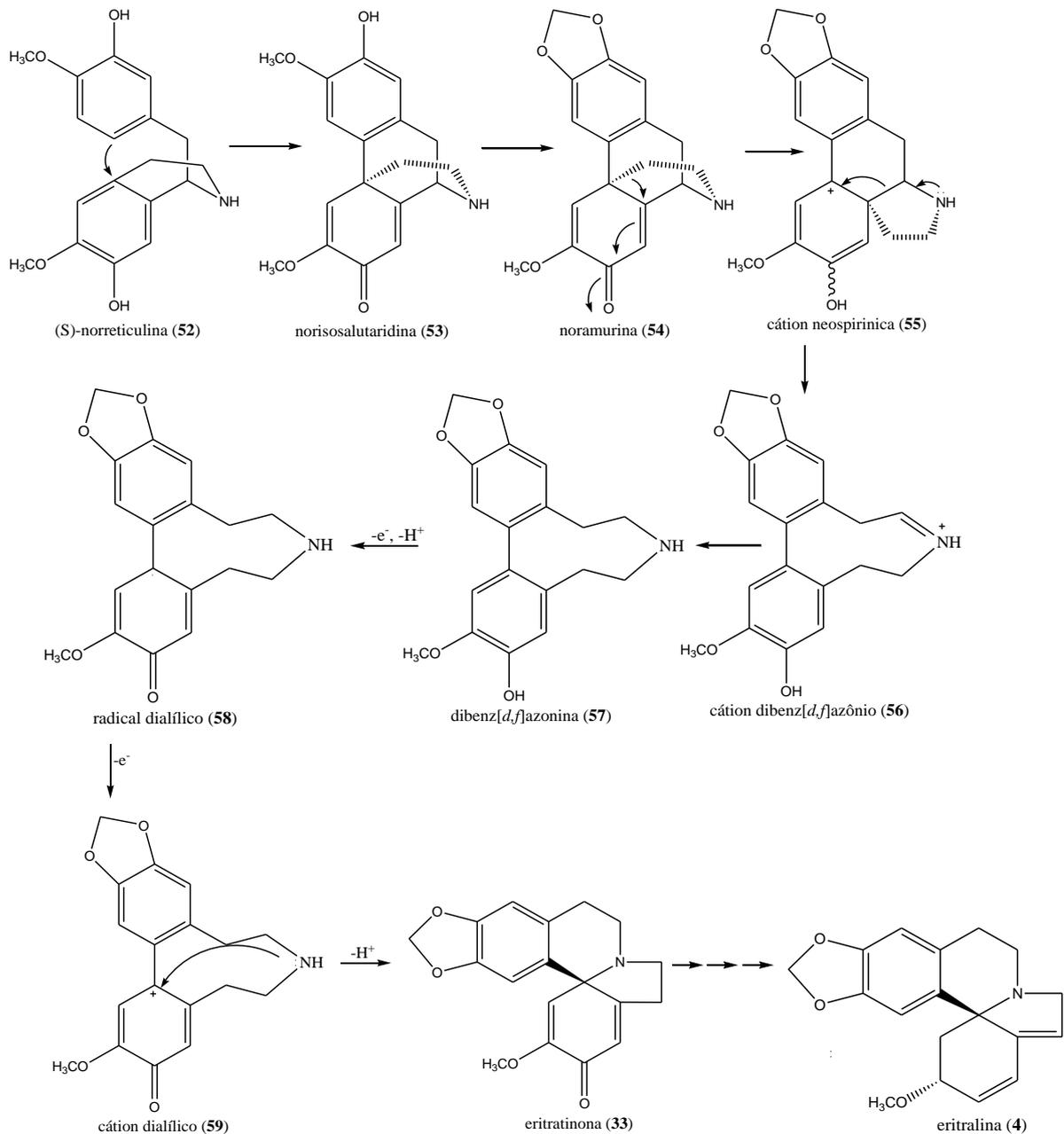


3.4.1.1 Biossíntese dos alcaloides

Divergências entre alguns autores sobre a biossíntese dos alcaloides de plantas do gênero *Erythrina* podem ser constatadas na literatura. Contudo, os estudos realizados até então presumem que estes alcaloides são biossintetizados a partir da tirosina, via condensação de duas moléculas de dopamina.

Experimentalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Barton et al. durante vários anos, demonstraram que um derivado de uma isoquinolina, o alcaloide (5)-norprotosinomenina é precursor dos alcaloides eritrínicos, tornando-os muito semelhante estruturalmente com os alcaloides benzilisoquinolínicos.^{37,38,39,40,41}

Em 1999, novos estudos realizados por Maier et al. sugeriram um novo mecanismo para a biossíntese dos alcalóides eritrínicos, comprovando-se que o composto alcaloídico (S)-norreticulina (**52**) é principal precursor comprometido na biossíntese desses alcaloides, sendo esta nova rota biossintética (Esquema 1) considerada a mais correta.²⁸



Esquema 1 - Rota biossintética sugerida para a formação de alcaloides eritrínicos

3.2.2 Flavonoides

São uma classe de polifenóis presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, principalmente angiospermas, e que apresentam grande diversidade estrutural dentro da própria classe. A maioria dos flavonoides possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo este formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três carbonos, conforme pode ser observado na Figura 7.³³

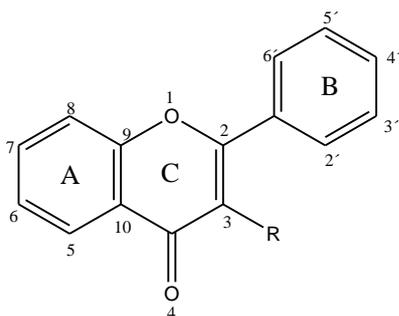


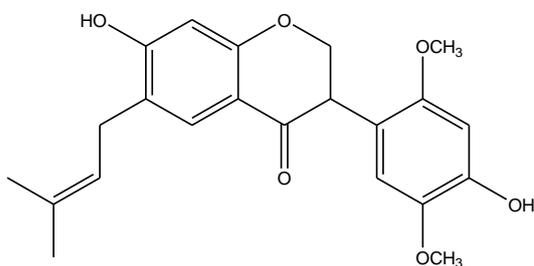
Figura 7 - Estrutura básica numerada do núcleo dos flavonoides

Os flavonoides diferem entre si pelo arranjo dos grupamentos das cadeias laterais de hidroxilas, metoxilas e glicosídeos e na conjugação entre os anéis A e B. Uma variação no anel C causa uma divisão de subclasses. De acordo com sua estrutura dividem-se em: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas, catequinas, diidroflavonóis e chalconas.³³

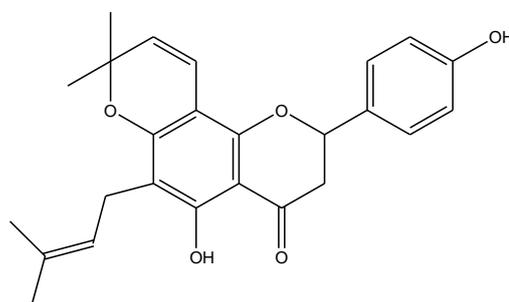
Apesar dos inúmeros registros sobre a ocorrência de alcaloides em plantas do gênero *Erythrina*, muitos estudos têm relatado a presença de flavanonas preniladas, isoflavonas e pterocarpanos, entre os derivados não-alcaloídicos que fazem parte dos metabólitos secundários produzidos por estas plantas. A Tabela 1 demonstra alguns exemplos dos mais diversos tipos de flavonoides já isolados de espécies de *Erythrina*.

Tabela 1 - Metabólitos isolados de diversas espécies do gênero *Erythrina* pertencentes à classe dos flavonoides (continua)

Tipos de Flavonoides

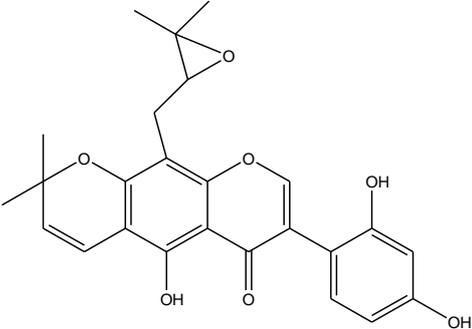
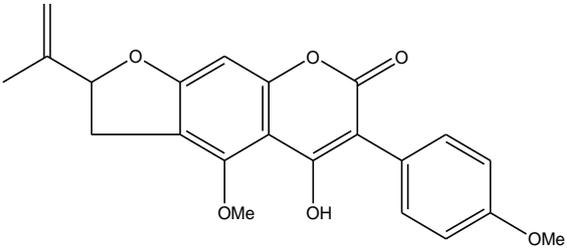
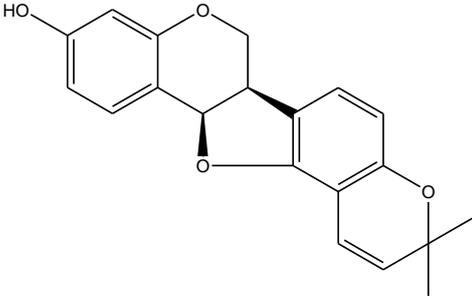
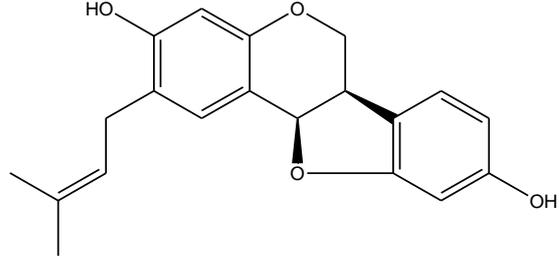
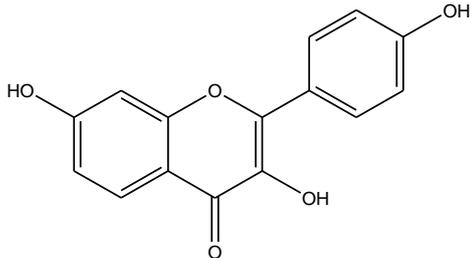
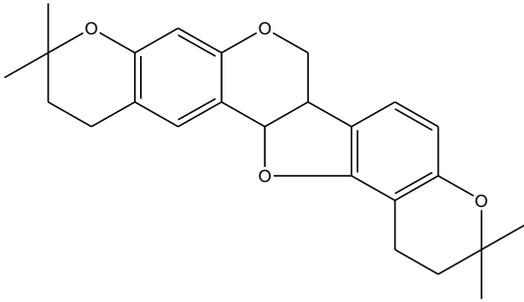


Sigmoidina (**60**)¹⁵



Eritrisenegalona (**61**)⁴²

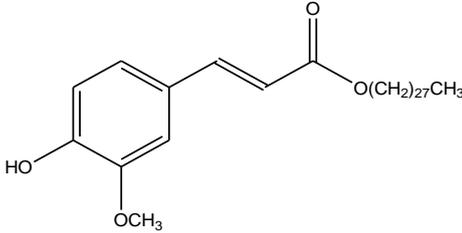
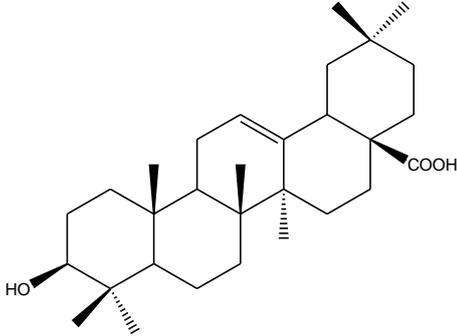
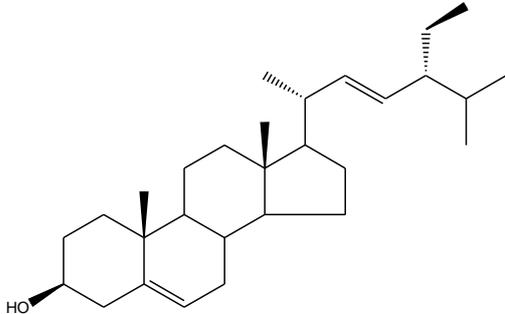
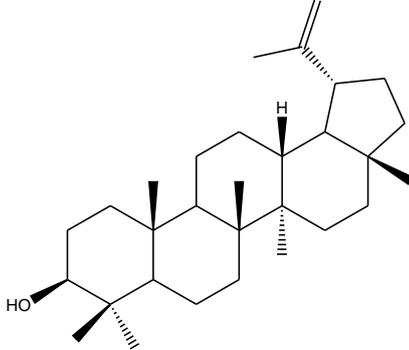
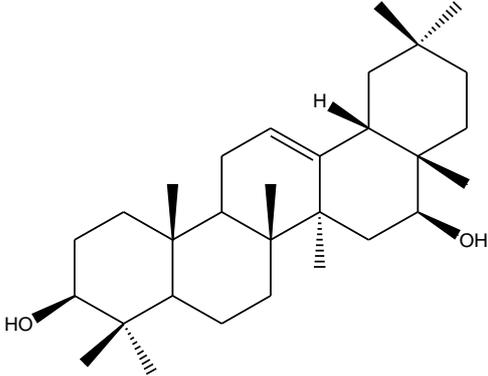
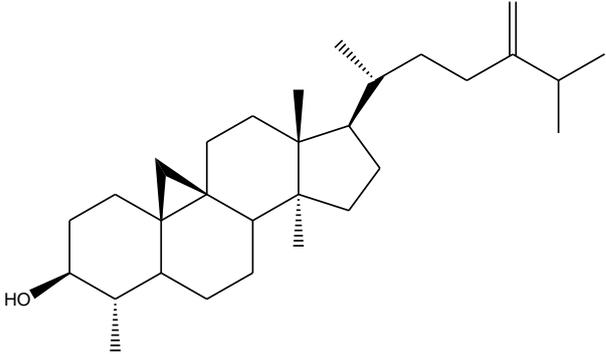
Tabela 1 - Metabólitos isolados de diversas espécies do gênero *Erythrina* pertencentes à classe dos flavonoides (conclusão)

Tipos de Flavonoides	
 <p>Erisenegalenseina (62)⁴³</p>	 <p>Indicanina A (63)⁴⁴</p>
 <p>Faseolina (64)⁴⁵</p>	 <p>Calopocarpina (65)⁴⁵</p>
 <p>3,7,4'-trihydroxiflavona (66)⁴⁶</p>	 <p>Diidrofolinina (67)⁴⁷</p>

3.2.3 Outros compostos

Além de alcaloides e flavonoides, outras classes de metabólitos secundários já foram identificados no gênero *Erythrina*, incluindo terpenos, esteróis, cumarinas, entre outros. A Tabela 2 exibe alguns exemplos desses compostos, onde é possível visualizar suas estruturas.

Tabela 2 - Outros metabólitos pertencentes ao gênero *Erythrina*

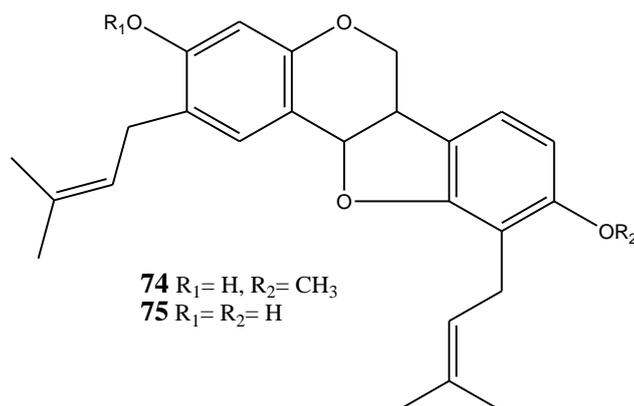
Compostos de classes variadas	
 <p>Ácido ferúlico (68)⁴⁷</p>	 <p>Ácido oleanólico (69)⁴⁸</p>
 <p>Estigmasterol (70)⁴⁸</p>	 <p>Lupeol (71)⁴⁹</p>
 <p>Maniladiol (72)⁵⁰</p>	 <p>Cicloeucaleenol (73)⁵¹</p>

3.3 Atividades farmacológicas

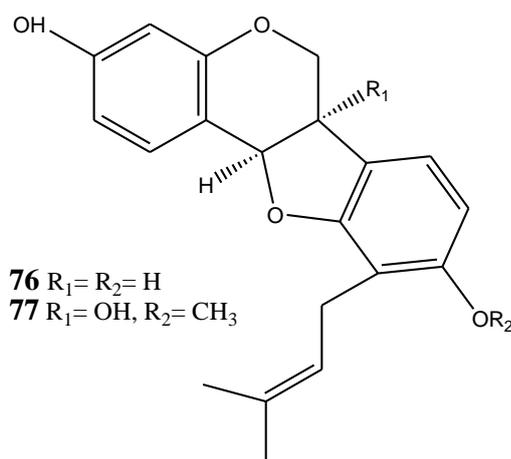
Considerando a grande variedade de espécies e sua ampla distribuição pelo mundo, as plantas do gênero *Erythrina* são muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de

diversas enfermidades. Vários ensaios farmacológicos têm sido realizados com a finalidade de confirmar os efeitos reais de algumas espécies.

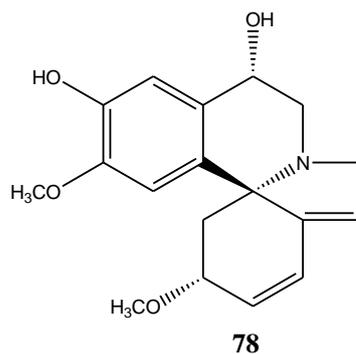
Estudo realizado por Mitscher et al. (1988) com a espécie *E. crista-galli* oriunda da Bolívia mostraram o isolamento de vários pterocarpanos, sendo que ericristina (**74**) e eritrabissina-II (**75**) apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias *S. aureus* e *M. smegmatis*.⁵²



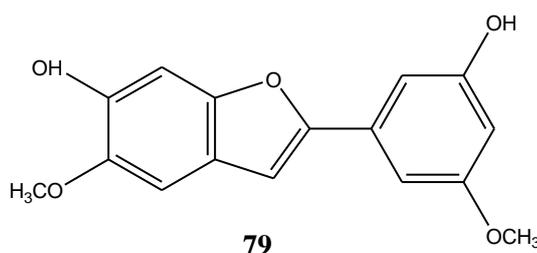
Em 1993, Dagne et al. isolaram da *E. burana* originária da Etiópia, os pterocarpanos faseolidina (**76**) e cristacarpina (**77**) com atividade seletiva para leveduras mutantes que causam danos ao DNA, sendo o metabólito **76** considerado citotóxico.⁵³



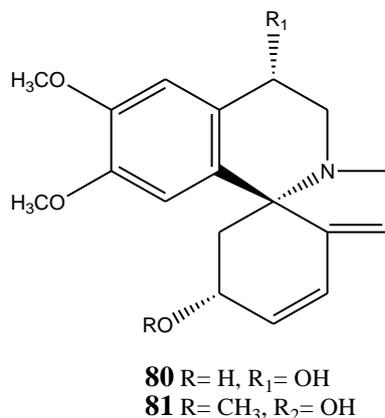
Juma e Majinda (2004) relataram o isolamento de diversos alcaloides de *E. lysistemon* da Botswana. Entre os metabólitos isolados, apenas os alcaloides erisodina (**7**) e 11 α -hidroxierisodina (**78**) mostraram possuir propriedades antioxidantes.⁵⁴



O estudo realizado por Wanjala et al. em 2002 apresentou o isolamento de vários metabólitos de *E. latissima*, sendo que o composto 2-(5'-hidroxi-3'-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzofurano (**79**) exibiu significativa atividade antimicrobiana contra esporos de fungos, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de pterocarpanos com atividade antifúngica e flavonoides antimicrobianos.⁵⁵

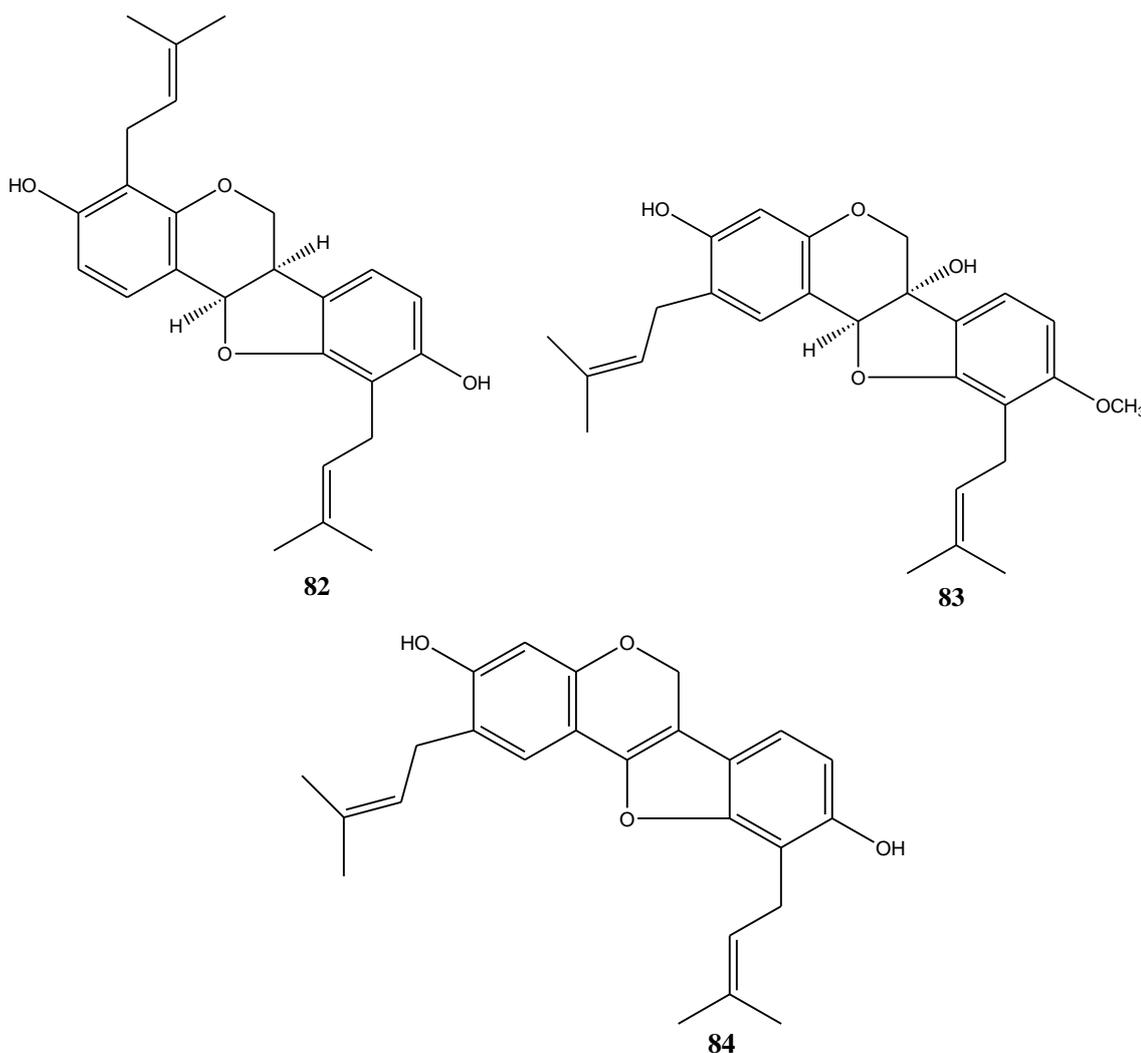


A investigação fitoquímica realizada por Flausingo Jr. et al. (2007) com a *E. mulungu* do Brasil, levou ao isolamento de alcaloides com propriedades ansiolíticas: eritravina (**3**), 11 α -hidroxieritravina (**80**) e α -hidroxierisotrina (**81**).⁵⁶



A espécie *E. subumbrans* coletada na Tailândia foi estudada por Rukachaisirikul et al. (2007) que isolaram pterocarpanos com grande potencial antimicrobiano. Os pterocarpanos eritrabissina-II (**75**), eribraedina A (**82**), eristagalina A (**83**) e ericristagalina (**84**) foram ativos

contra várias cepas de *Streptococcus* e *Staphylococcus*, incluindo estirpes de bacterianas resistentes a drogas (MRSA e VRSA) sendo mais ativos que os antibióticos padrões (vancomicina e oxacilina) utilizados no ensaio. O composto **84** mostrou o mais alto nível de atividade contra todas as estirpes bacterianas testadas, inclusive contra a estirpe resistente VRSA.⁵⁷

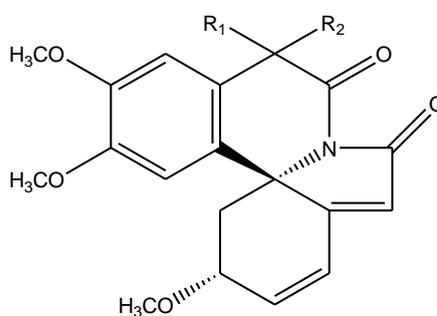


Em 2009, no estudo realizado por Nguyen et al. com *E. abyssinica* foi relatado o isolamento de vários pterocarpanos, sendo observado neste estudo que apenas os pterocarpanos prenilados inibiram a atividade da proteína tirosina-fosfatase-1B (PTP1B), bem como demonstraram citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama.⁵⁸

Ozawa et al. (2009) ao estudar alguns alcaloides da espécie *E. velutina*, como erisotrina (**1**), eritralina (**4**), erisovina (**5**), erisodina (**7**), glicoesisodina (**11**) e 8-oxoesitralina (**48**) verificaram que estes alcaloides apresentavam grande citotoxicidade frente às células Jurkat (linhagem de células derivadas de células leucêmicas), principalmente quando

combinadas com o TRAIL (cofator indutor seletivo de apoptose). Os compostos **4**, **5** e **7** isoladamente já eram citotóxicos, mas a combinação com o TRAIL aumentou ainda mais seus efeitos. Por outro lado, os alcaloides **1**, **11** e **48** que isoladamente não apresentaram nenhuma toxicidade, ao serem combinados com o indutor de apoptose demonstraram expressiva toxicidade frente às células cancerígenas em estudo. Os autores sugeriram a existência de interações sinérgicas entre compostos da planta e o TRAIL.⁵⁹

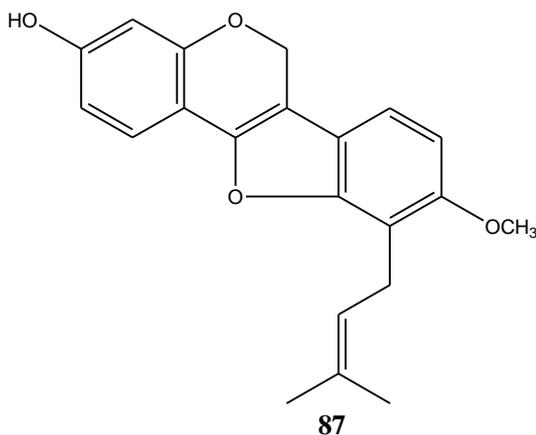
Ainda em 2009, Cornelius et al. descobriram alcaloides inibidores de apetite isolados de *E. latissima*, dentre os quais, erisotrina (**1**), erisotramidina (**2**), eritralina (**4**), 11 β -hidroxierisotramidina, 8-oxoeritralina (**48**), 11-metoxi-10-oxoerisotramidina (**85**), 10,11-dioxoerisotramidina (**86**).⁶⁰



85 $R_1 = H, R_2 = OCH_3$
86 $R_1 + R_2 = O=$

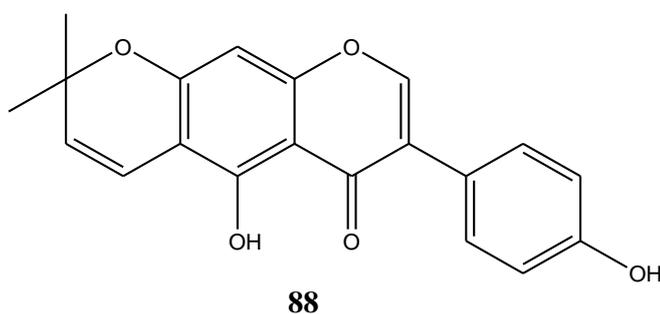
Já em 2010, um trabalho realizado por Nguyen et al. com a espécie *E. abyssinica* de Uganda relataram o isolamento de pterocarpanos com efeitos inibitórios significativos sobre as neuraminidases de *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae*, sugerindo que estes metabólitos, entre eles faseolina (**64**) e calopocarpina (**65**), podem ser utilizados no desenvolvimento de novos tratamentos para combater doenças infecciosas.⁴⁵

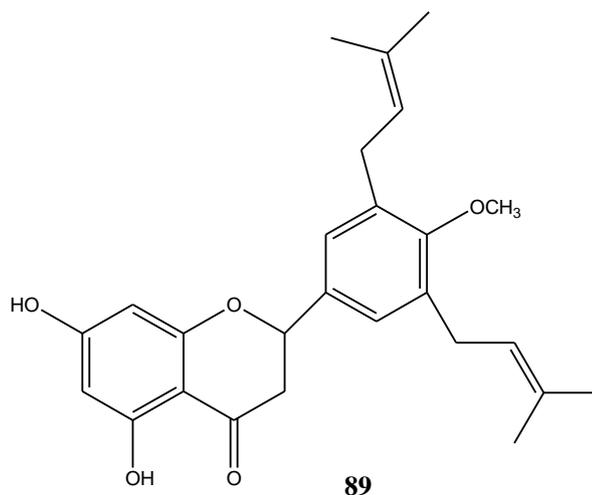
A investigação química de *E. fusca* Lour realizada por Innok et al. (2010) resultou no isolamento de vários metabólitos secundários da classe dos flavonoides. Muitos destes compostos apresentaram propriedades antimicrobianas e citotóxicas, com destaque para os metabólitos 3,7,4'-trihidroxi-flavona (**66**) e erivarina D (**87**) que apresentaram grande potencial antimicrobiano frente às cepas bacterianas de *S.aureus* (SA), incluindo as cepas resistentes (MRSA) à medicamentos e elevada citotoxicidade frente às células do câncer de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H187) e papiloma vírus (KB).⁴⁶



A espécie *E. crista-galli* coletada no estado de São Paulo (Brasil) foi estudada em 2010 por Osawa et al. Estes autores descreveram o isolamento de vários alcaloides, sendo que os eritrínicos eritralina (**4**) e eritrinina (**17**) e o alcaloide indólico hipaforina (**51**), mostraram atividade inibitória contra lipopolissacarídeo (LPS)-induzido na produção do óxido nítrico (NO). O excesso de produção de óxido nítrico (NO) está associado com o estresse oxidativo e com a fisiopatologia de várias doenças, tais como reumatismo, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças crônicas inflamatórias. Assim, o alcaloide **4**, que exibiu os resultados mais significativos, poderia desempenhar algum papel no tratamento de doenças inflamatórias (reumatismo e hepatite) em prescrições que contêm essa planta medicinal.²⁰

Em 2012, Nde et al. relataram a atividade estrogênica, relacionada à menopausa e seus sintomas, para os metabólitos alpinumisoflavona (**88**) e abissinona V-4'-metil-éter (**89**) isolados de *E. lysistemon*.⁶¹





Iranshahi et al. (2012) em trabalho com a *E. vesperilio* Benth, descreveram a atividade citotóxica contra células do câncer de próstata (PC3) do isoflavonoide faseolina (**64**).⁶²

3.3.1 Atividade de inibição enzimática

3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP)

A família prolil oligopeptidase, também denominada S9 e agrupada com outras famílias ao clã SC, representa a classe de serinas peptidases composta pelas seguintes enzimas: prolil oligopeptidase (POP; EC 3.4.21.26), dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5), acilaminoacil peptidase (AARH; EC 3.4.19.1) e oligopeptidase B (OB; EC 3.4.21.83). São enzimas consideradas relativamente grandes, com massa molecular de 80 KDa e que apresentam uma característica notável que é a seletividade, ou seja, hidrolizam restritamente oligopeptídeos com até 30 resíduos de aminoácidos.^{63,64,65}

A POP (Figura 8), também conhecida como prolil endopeptidase (PEP), é uma enzima intramolecular que foi descoberta no útero humano, onde degrada oxitocina. Inicialmente era chamada de “post-proline cleaving enzyme” pelo fato de hidrolizar preferencialmente a ligação peptídica na porção carboxílica dos resíduos de prolina. Geralmente é encontrada no citoplasma, mas também pode ocorrer ligada a membrana plasmática.^{63,66}

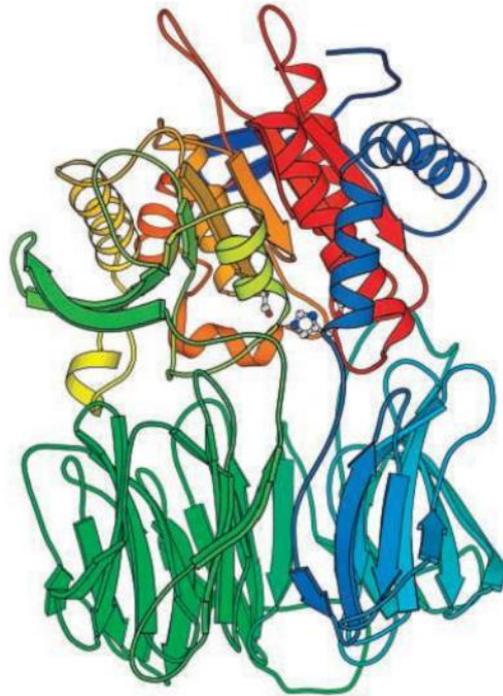


Figura 8 - Estrutura tridimensional da enzima prolil oligopeptidase

A prolil oligopeptidase está presente na maioria dos tecidos e organismos, porém pode ocorrer em maior concentração no cérebro, e desta forma está envolvida em uma variedade de distúrbios do sistema nervoso central (SNC) já que degrada neuropeptídeos comprometidos no processo de aprendizado e memória.⁶³

Pacientes em diferentes estágios de depressão têm sido observados com uma baixa atividade da POP. Alguns peptídeos envolvidos na fisiopatologia de depressão, como B-endorfina, substância P, arginina e vasopressina, são conhecidos substratos da enzima POP. Em contraste, pacientes que sofrem de esquizofrenia apresentam os níveis séricos de prolil oligopeptidase superiores aos pacientes não afetados. Tanto o antidepressivo fluoxicetina quanto o fármaco antimaniaco valproato são utilizados hoje para restaurar a atividade da enzima POP a níveis normais.⁶⁷

A diminuição da atividade da POP também tem sido constatada em pacientes que sofrem de anorexia e bulimia nervosa. Além do mais, no que diz respeito à doença de Alzheimer, diversas evidências têm sido apontadas de que a POP pode contribuir para a sintomatologia de tal doença, especialmente quanto à perda de memória.^{68,69}

Diante das desordens clínicas às quais a POP está intimamente ligada, a descoberta de novos inibidores desta enzima é extremamente importante. Sinteticamente, vários inibidores

têm sido desenvolvidos, como Z-Pro-Prolinal (**90**), S-17092 (**91**), JTP-4819 (**92**), Y-29794 (**93**) (Figura 9).^{70,71}

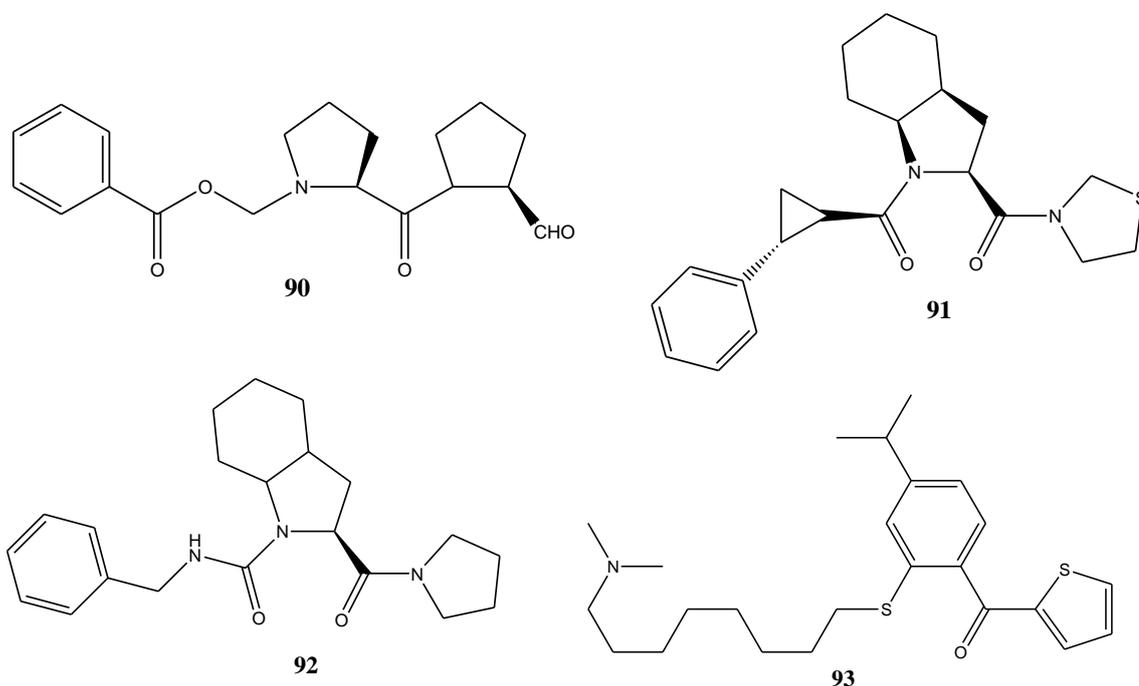


Figura 9 - Estrutura química de alguns inibidores sintéticos da POP

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram a existência de alguns inibidores naturais da POP de origem bacteriana e outros isolados de plantas, como a baicalina (**94**), o ácido clorogênico (**95**), ácido rosmarínico e a berberina que também foram descritos como inibidores da POP. Em 2010, Marques et al. relataram o isolamento de alguns flavonoides da planta *Scutellaria racemosa* Pers, o hispidulina (4',5,7-tri-hidroxi-6-metoxiflavona) e o oroxylosídeo (oroxilina A 7-O-glucuronida) que apresentaram atividade inibitória seletiva contra a POP.^{71, 72,73,74}

Publicações recentes relatam o isolamento de outros inibidores naturais extraídos do vinho, queijo, peixe, folhas da *Ginkgo biloba* e partes aéreas de *Tamarix hispida* Wild, como o terpenóide pentacíclico denominado ácido 3 α -(3'',4''-diidroxitrans-cinamoiloxi)-D-friedolan-14-en-28-oico (**96**), a ramnocitrina (**97**) e a isoramnetina, isolados da *Tamarix hispida* Wild; e os ácidos 6-(8'-Z-pentadecenil)salicílico e o 6-(10'-Z-heptadecenil)salicílico isolados da *Ginkgo biloba*.⁷⁵

Em 2012, um estudo realizado por Filho et al. mostrou que o fenilpropanoide verbascosídeo inibiu significativamente a POP de forma dose-dependente. A Figura 10 mostra a estrutura de alguns inibidores naturais da enzima POP citados anteriormente.⁷⁶

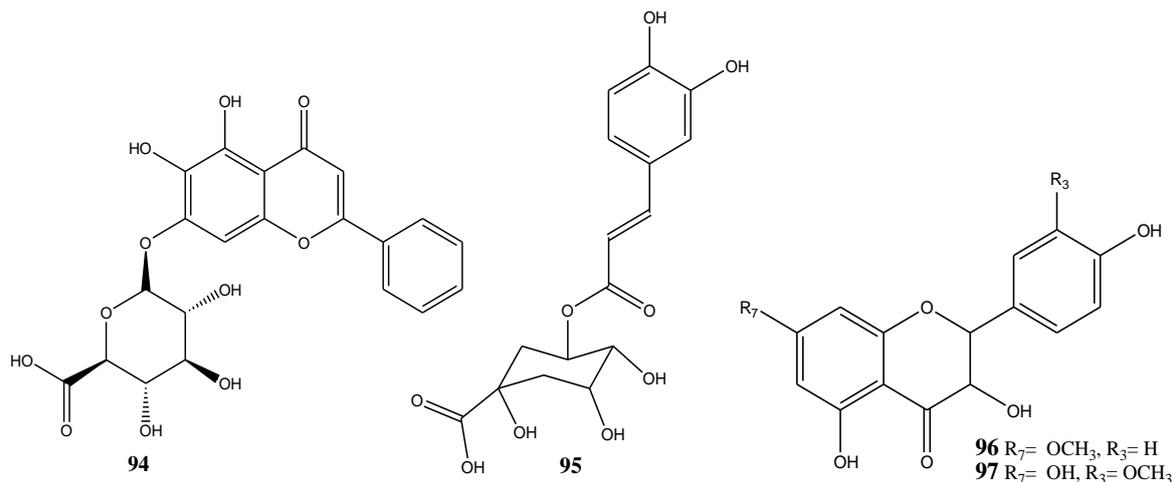


Figura 10 - Estruturas de alguns inibidores naturais da POP

3.3.1.2 Dipeptidil peptidase-IV (DPP IV)

Dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV ou DPP-4; EC 3.4.14.5) é uma prolil peptidase que cliva proteínas e peptídeos contendo prolina ou alanina na penúltima posição. Pode ser encontrada em vários tecidos como pâncreas, rins, intestino, útero, próstata, glândulas sudoríparas, salivares e mamárias, além de ser encontrada solúvel em fluidos corporais, como sangue, plasma e fluido cérebro-espinhal. A ampla distribuição da enzima DPP-IV facilita o acesso aos mais diferentes peptídeos, como peptídeos endócrinos e neuropeptídeos.

A enzima DPP-IV geralmente inativa uma grande variedade de hormônios peptídicos, sendo conhecida pela inibição de dois hormônios intestinais denominados incretinas, incluindo o GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon) e o GIP (polipeptídeo insulínico dependente de glicose). Estes hormônios adquirem importância pela capacidade de secretar insulina e, assim, apresentarem potencial contra a diabetes de mellitus do tipo II, tipo de diabetes em que o paciente tem dificuldade em secretar insulina. Desta forma, evitar a degradação dos hormônios incretinas (GLP-1 e GIP), por inibição da DPP-IV tornou-se uma estratégia terapêutica muito usada no tratamento de diabetes de mellitus tipo II.^{63,77,78}

Assim como a POP, a DPP-IV pertence à mesma família das serinas proteases e, portanto, apresenta sítio ativo espacialmente muito semelhante, o que faz com que muitos inibidores de uma enzima também tenham capacidade de inibir a outra enzima (Figura 11). Do ponto de vista farmacológico este efeito não é desejável, pois as enzimas (POP e DPP-IV) apresentam mecanismos de ações diferentes e estão relacionadas com diferentes patologias.

Deste modo, é de extrema importância que se encontre inibidores específicos e

seletivos para cada uma destas enzimas. Por este motivo, trabalha-se com as enzimas concomitantemente a fim de se descobrir inibidores que sejam seletivos.⁷⁹

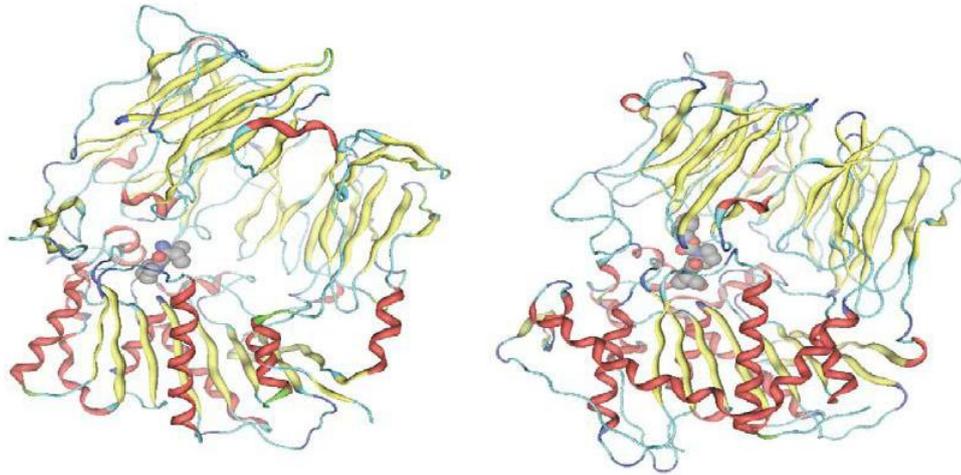


Figura 11 - Comparação das estruturas tridimensionais da DPP-IV e POP

Desde 1977 um grande número de inibidores da DPP-IV vem sendo descritos e suas características avaliadas. A síntese e as diferentes classes estruturais destes compostos têm sido objeto de diferentes opiniões. A maioria dos inibidores se encaixa em uma das três categorias principais:

- Agonistas do receptor do GLP-1 (por exemplo, exenatida)
- Análogos sintéticos do GLP-1 resistentes a inativação enzimática (por exemplo, liraglutida)
- Inibidores da DPP-IV não peptídicos (sitagliptina e vildagliptina)⁸⁰

Além dos conhecidos inibidores, isoleucina tiazolida e valina pirrolidina, uma variedade de pequenas moléculas foram descobertas nas últimas décadas com grande atividade contra a DPP-IV e assim passaram a ser utilizadas comercialmente no tratamento da diabetes mellitus do tipo II.^{81,82}

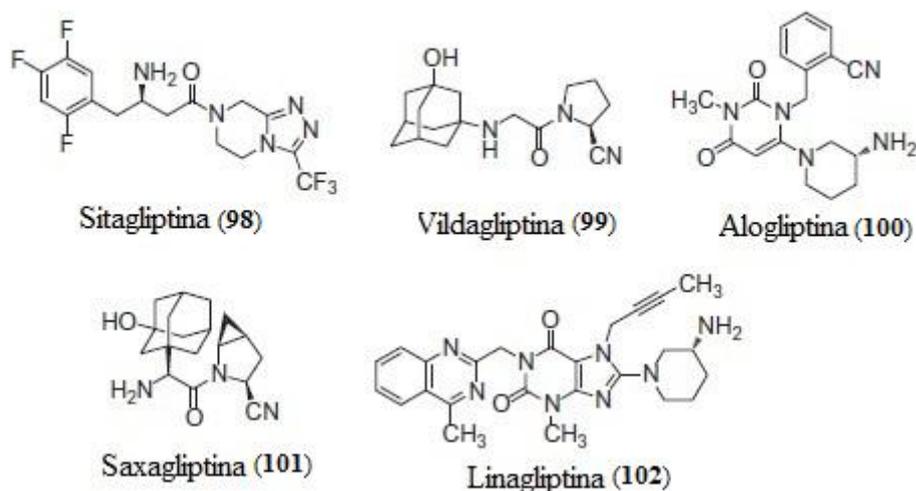


Figura 12 - Inibidores comerciais da DPP-IV. Figura reproduzida de Yoshida et al. (2012)⁸⁴

Publicações recentes têm apontado novas substâncias com potencial de inibição da enzima DPP-IV. Em 2012, Yoshida et al. descobriram um inibidor com estrutura única altamente potente, seletivo e de longa duração contra a DPP-IV, o teneligliptina. No Japão este composto já foi aprovado para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo II.⁸⁴

Muitos estudos estão em andamento para a descoberta de novos inibidores, buscando através de modificações estruturais a otimização de substâncias que sejam capazes de inibir seletivamente a DPP-IV. Muitos resultados já indicam compostos com melhor capacidade de inibição do que os comerciais existentes, mostrando assim uma grande evolução frente às desordens causadas pela ação da DPP-IV.⁸³

3.3.1.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase pertencente à família das colinesterases e responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) restante no espaço sináptico, em colina e acetato. Esta reação é necessária para possibilitar que o neurônio colinérgico retorne a seu estado de repouso após a ativação, evitando assim uma transmissão excessiva de ACh, que produziria uma sobre-estimulação do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço.^{85,86}

A AChE é encontrada no sistema nervoso central e periférico. Neste último tem como função modular os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, pela dilatação dos vasos sanguíneos e pela contração dos músculos lisos enquanto que no sistema nervoso central (SNC) está envolvida no controle motor, na cognição e na memória. Desta forma, a

AChE é uma importante enzima regulatória, controlando a transmissão de impulsos nervosos através da sinapse colinérgica pela hidrólise da ACh, terminando portanto, sua ação. Possui uma alta eficiência catalítica, sendo capaz de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima por minuto. No sítio ativo da enzima existem três resíduos principais de aminoácidos, os quais estão envolvidos diretamente no processo de hidrólise da ACh, a serina n° 200 (Ser-200), a histidina n° 440 (His-440) e o ácido glutâmico n° 327 (Glu-327), como mostrado na Figura 13.^{85,87}

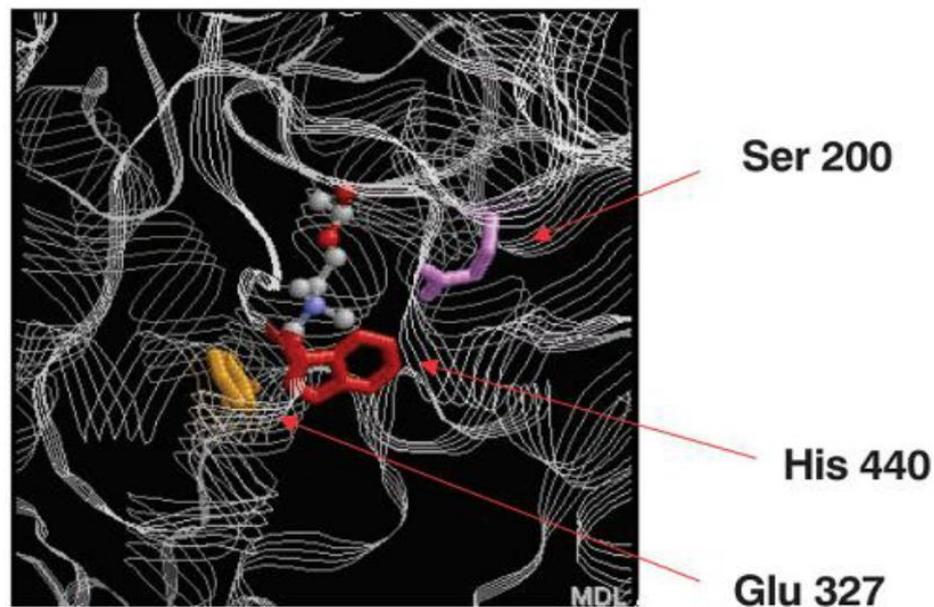


Figura 13 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos

Um dos grandes processos pelos quais a AChE está diretamente envolvida é a doença de Alzheimer (DA). É considerada uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível. Caracteriza-se pela perda gradativa da memória, alterações no comportamento e na personalidade e também pelo declínio das habilidades intelectuais, ocorrendo a partir de uma certa idade. Foi descrita primeiramente, em 1907 pelo médico patologista alemão Alois Alzheimer.^{88,89}

A DA possui grande impacto sócio-econômico, sendo responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos. Estimativas para o futuro apontam que em 2050, uma a cada 85 pessoas sofrerá desta doença. Como a DA não tem cura, o tratamento sintomático restaurando a função colinérgica tem sido adotado através da elevação no nível da ACh. Para tanto, faz-se uso de fármacos inibidores da AChE (anticolinesterásicos) para evitar a degradação da ACh.^{85,90}

Em relação à ligação que é estabelecida com a AChE durante o processo de inibição, os anticolinesterásicos podem ser classificados em reversíveis, irreversíveis e pseudo-irreversíveis. Uma das primeiras substâncias testadas foi a fisostigmina (**103**, também conhecida como eserina) (Figura 14), um inibidor reversível da AChE. Este composto apresentou uma leve melhora da memória em pacientes com DA, mas teve seu uso restrito devido a seus efeitos colaterais.⁸⁵

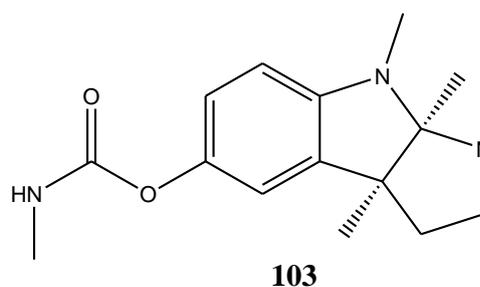


Figura 14 - Estrutura do primeiro fármaco usado no tratamento da DA

Atualmente, existem cinco fármacos aprovados para o tratamento clínico da DA aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), sendo eles donepezila (**104**), galantamina (**105**), rivastigmina (**106**), tacrina (**107**) e memantina. Dentre estes, os quatro primeiros são classificados como anticolinesterásicos, ou seja, inibidores da AChE e o último atua como antagonista do receptor de glutamato aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica. A galantamina (**105**) é o único fármaco natural, isolado de plantas da família Amarilidaceae.^{85,87}

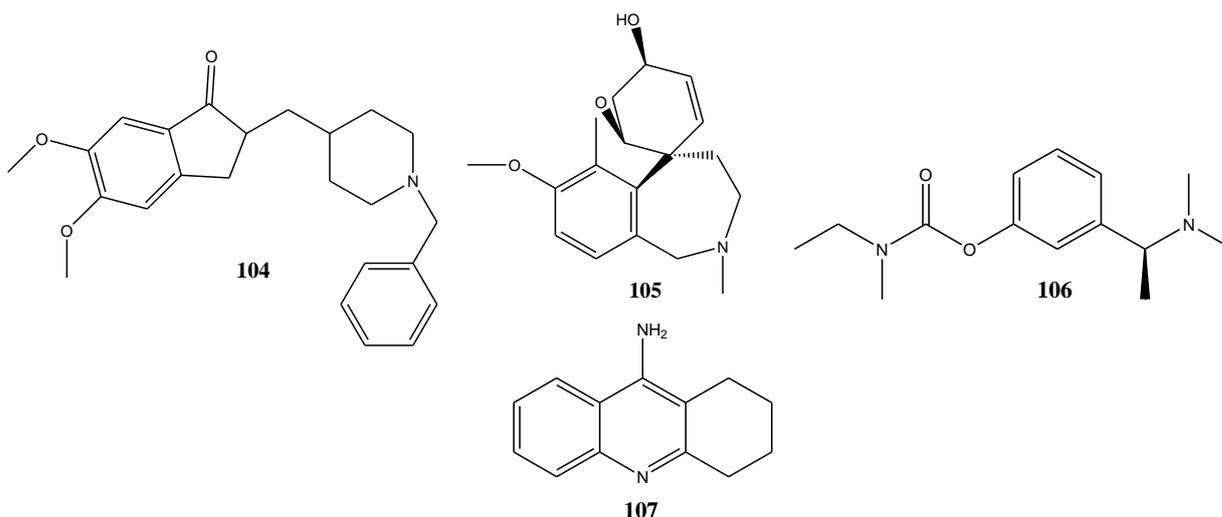


Figura 15 - Estrutura de alguns compostos utilizados no tratamento da DA

Devido ao fato de que os fármacos empregados para o tratamento da doença apresentam efeitos adversos como efeitos colinomiméticos, náusea, vômitos, bem como hepatotoxicidade significativa, fica evidente a necessidade urgente de fármacos mais eficazes e menos tóxicos para cura desta enfermidade.^{86,92}

Um estudo realizado por Barbosa Filho (2006), mostra que, dentre 309 plantas já analisadas frente a AChE, foram detectados 260 compostos com capacidade de inibição desta enzima, assim confirma-se a importância da pesquisa de inibidores naturais para a AChE a fim de sintetizar novas drogas para terapêutica da DA.⁹¹

3.3.2 Atividade antimicrobiana

O surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais associadas à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), quimioterapia antineoplásica e transplantes tem tornado a pesquisa por agentes antimicrobianos extremamente necessária. Desta forma, o uso de recursos naturais como fonte para o tratamento de distintas patologias tem sido uma ferramenta crucial utilizada nas áreas farmacêutica e cosmética.⁹³

Há séculos, as propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como consequência do metabolismo secundário são reconhecidas empiricamente, mas foram comprovadas cientificamente por volta da década de 90. Inúmeros estudos sobre a atividade antimicrobiana de plantas nativas já foram e estão sendo relatados, principalmente em países que possuem flora diversificada e uma rica utilização de plantas medicinais para o uso antibacteriano ou antifúngico, como o Brasil, Índia, México e Jordânia.⁵

Os estudos são realizados através da triagem de plantas medicinais compostas por uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas objetivando a descoberta de compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos.⁹⁴

Na pesquisa clínica, atualmente inúmeros métodos padrões são utilizados para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, também conhecida como “método de rastreio”, sendo que método *in vivo* (teste de aplicação) também é utilizado. Estes métodos são estabelecidos por diferentes organizações, como o Comitê Nacional para Normas de Laboratório Clínico (CNNLC ou NCCLS), a Sociedade Britânica para Quimioterapia Antimicrobiana (SBQA) e o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (CEUTSA).⁹⁴

Um grupo de micro-organismos, tais como bactérias, fungos, leveduras, vírus, protozoários e helmintos são testados frente a amostras vegetais (extratos brutos, frações ou compostos isolados). O ensaio deve apresentar facilidade de uso, reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade.⁹⁴

Os ensaios padronizados antimicrobianos podem ser divididos em métodos de difusão e diluição. Os testes de difusão incluem difusão em ágar, difusão em disco e bioautografia, enquanto que os ensaios de diluição incluem diluição em ágar e micro diluição em caldo ou macrodiluição, sendo estes últimos utilizados para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração testada em que não ocorre crescimento microbiano em um meio de nutriente num determinado período de tempo. A Concentração Letal Mínima (CLM) também é medida, mostrando a menor concentração de uma substância capaz de matar os micro-organismos.⁹⁴

As técnicas de diluição utilizadas hoje em dia através do uso de microplacas é um método relativamente barato e com reprodutibilidade, sendo 30 vezes mais sensível que outros métodos já empregados na literatura, além de possibilitar a utilização de pequena quantidade de amostra, permitindo testar um grande número de amostras em um ensaio.⁹³

3.3.2.1 Micro-organismos patogênicos

Os micro-organismos formam um grande e diverso grupo de seres microscópicos que existem em células isoladas ou em aglomerados. Neste grupo incluem-se bactérias, fungos, leveduras, vírus e protozoários que convivem intimamente com os seres humanos, uma vez que mais de 90% das células do nosso corpo são micróbios.⁹⁵

Sabe-se que mesmo os micro-organismos considerados não patogênicos, têm a capacidade de causar infecção e doença. No entanto, isso não depende só de fatores de virulência, mas também dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O uso de drogas imunossupressoras, como é o caso de pacientes recém transplantados, portadores da SIDA, indivíduos diabéticos e nos casos de câncer são condições que podem contribuir para enfraquecimento do organismo.⁹⁶

Variações na microbiota original do hospedeiro, por menores que sejam, podem causar perturbações dessa população. Na maioria das vezes isso acontece devido ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, especialmente antibióticos, havendo a substituição da microbiota original por organismos resistentes e causando, por conseguinte uma infecção secundária, também conhecida como superinfecção.⁹⁶

Os estafilococos são bactérias não esporuladas que mais resistem no meio ambiente. Causam infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados. No Brasil já foram descritos casos de infecções causadas por *S. aureus*.⁹⁷

Os estreptococos foram os maiores causadores de infecção hospitalar na era pré-antibiótica, causando surtos de infecção e morte de mulheres pós-parto. Atualmente não são uma importante causa de infecção hospitalar, mas podem provocar doenças muito graves e até letais, mesmo em pacientes imunocompetentes, sendo importante o rápido diagnóstico deste agente.⁹⁷

Já os enterococos têm sido causadores de infecção hospitalar devido à resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento. Os enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização em humanos e objetos hospitalares.⁹⁷

O gênero *Bacillus* é encontrado basicamente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal nas condições mais variadas de temperatura, umidade, pH, etc. É composto por bactérias Gram-positivas esporuladas e compreende várias espécies, entre elas a *B. Subtilis* causadora de intoxicação alimentar, bacteremia, sepse, endocardite e infecções respiratórias e a *B. cereus* responsável pelas mesmas patologias além de necrose ou gangrena em partes moles, meningite, osteomielite e endoftalmite.⁹⁷

As enterobactérias são a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância médica. Estão presentes no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais. Alguns também são considerados enteropatógenos por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais como a *Salmonella typhi*, outras salmonellas, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e vários sorotipos de *Escherichia coli*, embora também possam causar infecção em outros locais.⁹⁷

As enterobactérias representam $\geq 80\%$ de todos os gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. São responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Os principais gêneros das enterobactérias são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp.⁹⁷

Os bacilos gram-negativos *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* fazem parte de um grupo de bactérias muito grande e que são classificadas como não fermentadores. São de grande importância nos casos de infecção hospitalar, pois apresentam resistência elevada a vários antibióticos e são capazes de causar infecções graves.⁹⁷

Os fungos, assim como as bactérias também são micro-organismos responsáveis por uma série de patologias que acometem o homem. Os fungos formam uma importante classe de agentes patogênicos de pele, entre os quais os dermatófitos e as leveduras são os mais comuns. Desde o final da década de 1990, o número de pacientes imunocomprometidos e infectados pelo vírus da AIDS, que desenvolveram frequentemente micoses sistêmicas, superficiais e oportunistas, como candidíases, aspergiloses e infecções por fungos filamentos, aumentou drasticamente.⁹⁸

Os medicamentos disponíveis para tratar essas doenças, mesmo nos dias de hoje ainda são limitados por uma série de inconvenientes, dentre os quais citam-se baixa potência, baixa solubilidade, o surgimento de cepas resistentes e a toxicidade. Esses fatores demonstram a necessidade urgente de novos medicamentos antifúngicos com maior eficácia.⁹⁸

As leveduras do gênero *Candida* provocam infecções sistêmicas frequentes em hospedeiro imunocomprometido. É gênero de fungo mais comum que ataca o organismo humano, habitando no corpo humano a mucosa digestiva e por contiguidade, nas mulheres, a mucosa vaginal. A infecção pode atingir essas mucosas e também tecidos cutâneos. Estima-se que mais de 20 espécies reconhecidamente patogênicas já tenham sido descobertas, dentre as quais destacam-se *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.^{98,99}

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gatti* são leveduras basidiomicéticas causadoras da criptococose, que é uma infecção fúngica sistêmica oportunista comum em pacientes imunocomprometidos e que acaba gerando lesões principalmente no SNC, em particular nas meninges. O *C. neoformans* está distribuído mundialmente na natureza, ocorrendo em pessoas imunocompetentes, mas com maior frequência em pessoas com AIDS, doenças hematogênicas e outras condições imunossupressivas. O *C. gatti* é menos comum, encontrado apenas em árvores de regiões tropicais. Sua criptococose é rara e ocorre em hospedeiros aparentemente normais.⁹⁵

O gênero *Saccharomyces* compreende leveduras comumente conhecidas, sendo *Saccharomyces cerevisiae* seu representante mais conhecido. Este, por sua vez, é utilizado no pão, etanol e indústrias de vinhos, e também usado na indústria farmacêutica para obter lepuridin. Na área biomédica, os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* são marcadores diagnósticos da doença de Crohn. Este gênero pode colonizar mucosas gastrointestinais, respiratórias e urinárias em pacientes com doenças subjacentes. Contudo, infecções fúngicas raras são "incomuns" embora tenha aumentado ao longo do tempo. *S. cerevisiae* tem sido reconhecido como um micro-organismo emergente, com uma incidência de até 4% entre os micro-organismos de hemocultura. Sua associação com outras leveduras (especialmente

Candida) está também descrita na literatura, apresentando desta forma, altas taxas de mortalidade.¹⁰⁰

3.3.3 Atividade antitumoral

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas.¹⁰¹

Causas variadas são atribuídas para o desenvolvimento do câncer, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estando ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais ao interagirem de várias formas, aumentam a probabilidade de transformações malignas nas células normais.¹⁰¹

O desenvolvimento do câncer envolve vários passos. Seu processo se inicia a partir de uma mutação genética (alterações no DNA dos genes de uma célula normal) que resulta em um comportamento anormal destas células. Assim, elas se multiplicam de maneira descontrolada e muito mais rapidamente do que as células de tecido normais que estão à sua volta, invadindo assim o tecido. O acúmulo deste tipo de células forma os tumores malignos, e adquirem ainda, a capacidade de se desprender do tumor e migrar, disseminando-se e chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (Figura 16).¹⁰¹

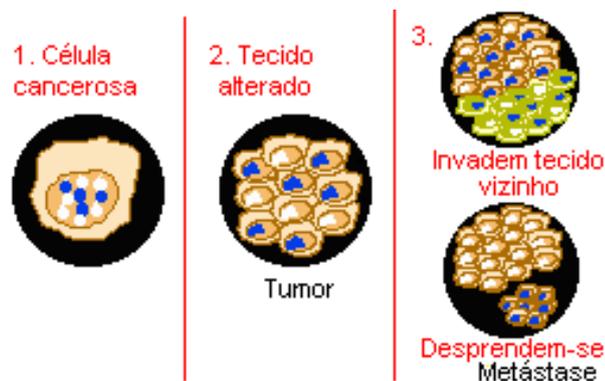


Figura 16 - Processo de formação de tumores (Fonte: INCA)

Os tumores malignos são responsáveis por um número significativo e cada vez maior de pacientes no mundo inteiro, causando um interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas.^{102,103}

A descoberta de medicamentos para o câncer tem relação direta com pesquisas na área de produtos naturais. Nas últimas décadas, cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada a uma fonte natural. Desta forma, a natureza se constitui como uma fonte abundante para a descoberta de substâncias de interesse terapêutico.¹⁰²

O avanço nas pesquisas de produtos naturais, no campo da oncologia favoreceu a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica contra o câncer, conforme pode ser observado na Figura 17.¹⁰²

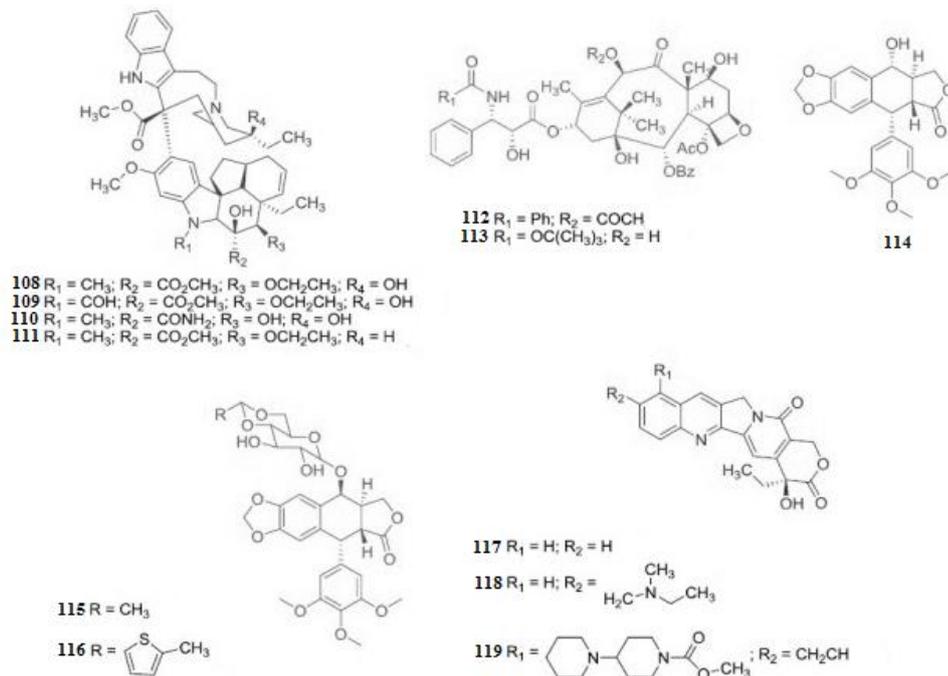


Figura 17 - Fármacos derivados de plantas utilizados na terapia contra o câncer; vinblastina (**108**, Velban[®]); vincristina (**109**, Oncovin[®]); vindesine (**110**, Eldisine[®]); vinorelbina (**111**, Navelbine[®]); paclitaxel (**112**, Taxol[®]); docetaxel (**113**, Taxotere[®]); podofilotoxina (**114**); etoposídeo (**115**, Etopophos[®]); teniposídeo (**116**, Vumon[®]); camptotecina (**117**); topotecano (**118**, Hycamtin[®]) e irinotecano (**119**, Camptosar[®]). Figura reproduzida de Costa-Lotufu et al. (2010)¹⁰²

Contudo, a inserção de novos fármacos na terapêutica antineoplásica ainda não é suficiente, uma vez que muitos tumores sólidos ainda não são tratados adequadamente. Estima-se que mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais estejam em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas.¹⁰⁴

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando as grandes proporções que o câncer tomou no país. Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Desse modo, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, de próstata, pulmão, cólon e reto e de estômago para o sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, de mama, colo do útero, cólon e reto e da glândula tireóide para o sexo feminino.¹⁰¹

3.3.3.1 Câncer de cólon e reto

O câncer colorretal é formado por tumores originados a partir de dois pontos, cólon (aproximadamente 70%) e reto (cerca de 30%). Na escala global, ocupa o terceiro lugar entre todas as neoplasias malignas mais comuns encontradas em termos de incidência. É especialmente comum nos países ocidentais, onde representa a segunda neoplasia maligna mais comum perdendo apenas para o câncer de pulmão. A incidência anual global do câncer colorretal é estimada em 1 milhão e mais da metade dos casos acabará em mortalidade, o que torna esta enfermidade a terceira causa mais comum de morte relacionada ao câncer em todo o mundo. No Brasil, cerca de 28 mil novos casos por ano foram contabilizados e este número tem aumentado cada vez mais.^{105,106}

Quando detectado precocemente, quando ainda não se espalhou para outros órgãos, o câncer colorretal é considerado tratável e, na maioria dos casos, até mesmo curável. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção dos pólipos antes de eles se tornarem malignos. Na prática clínica, cirurgia, radioterapia e quimioterapia são utilizadas para o tratamento de tumores do cólon humano.^{101,107}

A quimioterapia antineoplásica foi constituída inicialmente por um único quimioterápico, o 5-fluorouracil (5-FU). Com o passar dos anos, houve a inclusão de outros agentes antitumorais, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes. Estes medicamentos passaram a ser utilizados de forma combinada, sendo eles, o ácido folínico (leucovorin), o

irinotecano (Camptosar[®]), e a oxaliplatina (Eloxatin[®]). Mais tarde foram descobertos os anticorpos monoclonais que são imunoproteínas derivadas da biotecnologia. São capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos (alvos) e desencadear respostas imunológicas, poupando células normais e provocando efeitos menos tóxicos que a quimioterapia tradicional. Atualmente dois destes compostos são utilizados no tratamento do câncer colorretal, cetuximabe (Erbitux[®]) e bevacizumabe (Avastin[®]).¹⁰⁸

Apesar de todos os investimentos, de todos os estudos já realizados e aqueles que estão em desenvolvimento, os resultados obtidos na terapêutica contra o câncer colorretal ainda não são satisfatórios. A indução de apoptose (morte celular programada) em células cancerosas tem sido considerada como uma importante estratégia de defesa contra a progressão deste câncer. Muitos medicamentos anticancerígenos podem inibir o crescimento de células tumorais pela indução da apoptose, sendo esta um componente normal do desenvolvimento e condição física de organismos celulares. Vários estudos têm focado em matar seletivamente as células cancerosas através da indução pela morte programada.¹⁰⁷

3.3.3.2 Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são utilizados para a avaliação da inibição de substâncias que são analisadas quanto à atividade antineoplásica, onde se verificam parâmetros que incluem desde a morte celular até alterações de seu metabolismo. A medição da citotoxicidade de compostos através de ensaios *in vitro* é muito importante, uma vez que a fase de *screening* reduz os ensaios *in vivo* em animais. Além disso, são muito utilizados como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados e experimentação com animais.^{109,110}

A utilização de culturas de células neoplásicas apresenta vantagens que torna este tipo de experimento essencial para o estudo da atividade anticancerígena. Dentre as vantagens citam-se: condições controladas para o estudo do comportamento das células, teste com amostras em concentração conhecida, no *screening* de drogas onde se fazem muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é mais viável economicamente que os testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais nestes ensaios.^{109,110}

Quantificar a proliferação celular é um importante na biologia celular e na ciência biomédica, em particular na investigação do cancro. Dos quimioterápicos usados nos tratamentos contra o câncer, a maioria foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular. Desta forma, o ensaio de citotoxicidade em linhagens de células

neoplásicas é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral.^{111,112}

Uma variedade de ensaios está disponível para investigar a proliferação de células com base em diferentes químicas. A metodologia mais utilizada para os testes é realizada por meio dos ensaios de citotoxicidade que utilizam linhagens celulares, onde a taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes. Para tanto, são utilizados corantes como o azul de tripan e a eosina, baseados na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante, contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos, dentre os quais tem-se: Cristal violeta, MTT (microtétrazolium), Alamar Blue, SRB (sulforrodamina B), CyQuant e PicoGreen, sendo estes dois últimos conhecidos como corantes cianinas.^{111,112,113,114,115}

Estudos publicados em revistas de alto impacto descrevem o MTT e o Alamar Blue como alguns dos ensaios metabólicos mais comuns disponíveis atualmente para o estudo da proliferação celular. Entretanto, eles estão sujeitos a inúmeras variáveis e, portanto, nem sempre são as melhores escolhas para avaliar a proliferação celular.

A proliferação celular também pode ser quantificada através da contagem de células. O corante DNA PicoGreen é um reagente fluorescente, estável e que realiza de forma precisa a medição do teor de DNA dupla-fita, quantificando indiretamente a quantidade de células tumorais. Sua principal limitação está no fato de que não podem ser quantificadas as células que estão em processo inicial de apoptose. Citometria de fluxo e Nucleo Count são métodos de contagem de células que podem ser realizados juntamente com os ensaios anteriores para a obtenção de resultados mais precisos.^{112,116}

Outros inúmeros métodos podem ser realizados com a finalidade de avaliar a atividade antitumoral de amostras em estudo, como por exemplo, o ensaio de quantificação de lactato desidrogenase (LDH). A LDH é uma enzima intracelular, sua medição em um determinado meio serve para quantificar dados com relação a morte ou inibição do crescimento celular.¹¹⁷

Devido aos diferentes métodos existentes para avaliar a citotoxicidade, é necessário que se escolha o ensaio citotóxico mais adequado ao que se deseja, assim como os testes complementares, de forma que se obtenham resultados seguros e confiáveis, contribuindo então para a busca de novos fármacos a serem utilizados na terapêutica das neoplasias existentes.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimentos experimentais

4.1.1 Materiais e métodos cromatográficos

Foram realizadas separações cromatográficas em coluna (CC) com diferentes tamanhos e diâmetros interno, utilizando como adsorvente sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh. A purificação dos compostos foi realizada através da cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com o adsorvente sílica gel SiliaFlash C60 (Silicycle) 5-40 μm . A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromatofolhas de alumínio como suporte, e sílica gel 60 F₂₅₄ como adsorvente.

A revelação das cromatoplasmas ocorreu através de lâmpada ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm, Germicida), reativo de Dragendorff para alcaloides e solução de anisaldeído (solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5) seguido de aquecimento para os demais metabólitos.

Os solventes utilizados neste trabalho foram de nível técnico, sendo purificados por técnicas de destilação para a remoção de umidade e possíveis contaminantes. A polaridade de misturas dos solventes usados durante as técnicas de cromatografia são indicadas no decorrer do texto.

4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , uni e bidimensionais (Dept 135°, COSY, NOESY e HSQC) foram realizados em espectrômetro Bruker DPX 400, operando a 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C , do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria. Utilizou-se para a preparação das amostras, quantidades entre 5-20 mg de amostra em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) em tubos de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) calculadas em Hertz (Hz). A calibração dos espectros foi realizada utilizando-se como

referência interna o TMS (δ 0,00) e o CDCl_3 (δ 77,00) para os espectros de ^1H e ^{13}C , respectivamente.

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) foram realizadas em cromatógrafo Agilent Technologies Modelo 1200, equipado com detector DAD e coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm), utilizando como fase móvel os seguintes eluentes: A= 0,01% ácido fórmico em água; B= metanol com uma rota de fluxo de 1mL/min. Condições de injeção: Isocrático a 15% B em A por 7 min seguido de 15% a 50% B em 23 min e 50% B a 100% B em 10 minutos.

4.1.4 Espectrometria de Massa de Alta Resolução ESI (+)

Os espectros de massa de alta resolução (ESI-MS) foram obtidos em aparelho espectrômetro Xevo G2 Q-TOF (Waters). As amostras foram realizadas no LAQIA- UFSM sob a responsabilidade do Prof. Dr. Érico M. M. Flores. Condições de análise: Temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 500 °C, gás de dessolvatação nitrogênio, fluxo de gás no cone de 10 L/h, fluxo do gás de dessolvatação entre 500 e 600 L/h, tensão do capilar entre 2,0 e 2,5 kV, tensão do cone de amostragem 20-30 v e infusão 10- 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

4.1.5 Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP)

As separações cromatográficas por MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) foram realizadas em aparelho Shimadzu LC-8A com detector espectrofotométrico UV Shimadzu SPD-6A equipado com coluna de vidro contendo C18 como fase estacionária. Seguiu-se uma taxa de fluxo de 2 a 3,5 mL/min em um $\lambda= 254$ nm, utilizando como sistema eluente inicial um isocrático de 47% metanol em água por 23 min seguido de um gradiente de metanol por 30 min.

4.1.6 Aparelho de Ponto de Fusão

O ponto de fusão foi determinado em aparelho digital MQAPF - 302 da Microquímica Equipamentos com termômetro não aferido.

4.1.7 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro

As medidas de rotação óptica foram realizadas em polarímetro Perkin Elmer, modelo 343, com comprimento de onda da lâmpada de 589 nm e temperatura de 20 °C. As amostras foram realizadas no LAQIA- UFSM.

4.2 *Erythrina crista-galli*

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

A casca do caule da espécie *E. crista-galli* foi coletada no mês abril de 2011, no município de Santa Maria (29°53'57.76"S; 53°43'48.94"O), Rio Grande do Sul. O material vegetal foi identificado pela professora Dr^a. Thaís Scotti Canto Dorrow e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, sob o número SMDB 13931.

4.2.2 Preparação dos extratos

As cascas do caule foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 50 °C, trituradas em liquidificador Poli LS-04 e, por fim, moídas a fino grão (1,002 kg) em moinho Marconi MA 048. Realizou-se a extração à quente deste material, primeiramente com hexano, onde o material moído foi colocado em um balão de 5 L com a adição de hexano até a total cobertura do mesmo, aproximadamente 2 L. O solvente foi filtrado e evaporado à pressão reduzida uma vez ao dia, sendo este procedimento repetido durante 20 dias até a completa exaustão, obtendo-se um resíduo sólido verde escuro, denominado extrato bruto hexânico (EBH). Posteriormente à extração com hexano, utilizando-se do mesmo material vegetal, procedeu-se a extração com metanol à quente, o qual foi filtrado e evaporado uma vez ao dia durante 30 dias até a completa exaustão. O resíduo escuro e viscoso obtido foi liofilizado para a total secagem, sendo denominado extrato bruto metanólico (EBM).

4.2.2.1 Fracionamento do Extrato Bruto Hexânico - EBH

O EBH (5,22 g) ao ter sua solubilidade testada frente aos solventes de polaridades variadas, formou um precipitado verde (2,20 g) com a adição de metanol. A porção líquida,

após ser evaporada resultou em um resíduo sólido (3,0 g) que foi trabalhado através de diversas CC, CCDP e tentativas de precipitação, não sendo possível a purificação de nenhum metabólito desta porção do EBH. O precipitado verde formado (2,20 g) foi submetido a fracionamento direto através de filtração em coluna cromatográfica (denominada C₁Hx), utilizando-se como adsorvente sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh (75 g) e diferentes sistemas de solventes em grau crescente de polaridade. Foram coletadas frações de 20 mL que foram evaporadas e reunidas de acordo com suas similaridades, verificadas por CCD conforme descreve a Tabela 3.

Tabela 3 - Coluna cromatográfica C₁Hx (precipitado verde de EBH)

Frações C₁Hx	% Solventes	Peso (mg)
I - 1 a 6	Hexano	25
II - 7 a 10	Hex/DCM 10%	7
III - 11 a 14	Hex/DCM 20%	2
IV - 15 a 20	Hex/DCM 25%	7
V - 21 a 29	Hex/DCM 30%	131
VI - 30 a 39	Hex/DCM 35%	135
VII - 40 a 53	Hex/DCM 45%	28
VIII - 54 a 59	Hex/DCM 75%	29
IX - 60 a 63	DCM	83
X - 64 a 70	DCM	78
XI - 71 a 74	DCM	30
XII - 75 a 84	DCM/MeOH 2%	296
XIII - 85 a 101	DCM/MeOH 5%	177
XIV - 102 a 129	DCM/MeOH 10%	826
XV - 130 a 140	DCM/MeOH 25%	17
XVI - 141 a 149	DCM/MeOH 50%	25
XVII - 150 a 154	Metanol	4

A fração XI (71 a 74; 30 mg), foi cromatografada em coluna utilizando-se sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh com os eluentes hexano: diclorometano (1:1), seguido de diclorometano e diclorometano: metanol (1:0,25), resultando em 6 frações que foram rotaevaporadas, sendo que a fração 3 (5 mg), denominada 3E, apresentou pouca mistura de substâncias. Esta mesma amostra foi reunida juntamente com a fração XII, (75 a 84; 296 mg),

e recromatografa em coluna utilizando-se sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh (1 g) como adsorvente e diclorometano seguido de diclorometano: metanol (95:5) como sistema eluente. Foram obtidas 36 frações que foram rotaevaporadas e reunidas por semelhança, através de comparação por CCD, resultando num total de 7 frações. Desta CC, denominada CHxG, a fração 5 (15-26; 79 mg) precipitou com a adição de acetona, resultando em um sólido branco (5,50 mg) não identificado por conter mistura de vários compostos e em um sobrenadante que foi evaporado a secura para obter-se 63 mg de um resíduo, que foi purificado por CCDP utilizando clorofórmio como eluente. Após este procedimento verificou-se a pureza do composto isolado, que não é visível na luz UV e apresenta coloração violácea quando pulverizado com a solução de anisaldeído sob aquecimento. Análise por CCD com padrão conhecido, espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura, confirmou o metabólito como sendo o estigmasterol (**70**).

A fração XIII (C_1H_x 85 a 101; 177 mg), foi submetida a uma CC (denominada CHxH), eluída com clorofórmio/éter etílico/acetato de etila num gradiente crescente de polaridade, resultando em 28 frações que foram rotaevaporadas e reunidas conforme suas semelhanças (CCD) e por fim, resultou em 9 frações. A fração 6 (17-22; 21 mg) apresentou pouca mistura de compostos e foi reunida devido a semelhança com uma amostra restante do resíduo do sobrenadante inicial (89 mg) proveniente do EBH. Esta amostra (110 mg) foi cromatografada em coluna (denominada CHxJ), utilizando-se como adsorvente sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh (8,50 g) e hexano/ diclorometano/ metanol como sistema eluente, num gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 67 frações que foram reunidas de acordo com suas similaridades, verificadas por CCD conforme descreve a Tabela 4.

Tabela 4 - Coluna cromatográfica CHxJ (fração CHxH 6/17-22 e sobrenadante do EBH)

(continua)

Frações	Solventes	Peso (mg)
I - 1 a 3	Hex/DCM 1:1	2
II - 4 a 5	Hex/DCM 1:1	3
III - 6	Hex/DCM 1:2	2
IV - 7 a 8	Hex/DCM 1:2	4
V - 9 a 24	DCM	9
VI - 25 a 28	DCM	11
VII - 29 a 49	DCM/MeOH 20:1	22
VIII - 50 a 51	DCM/MeOH 90:10	29

Tabela 4 - Coluna cromatográfica CHxJ (fração CHxH 6/17-22 e sobrenadante do EBH)

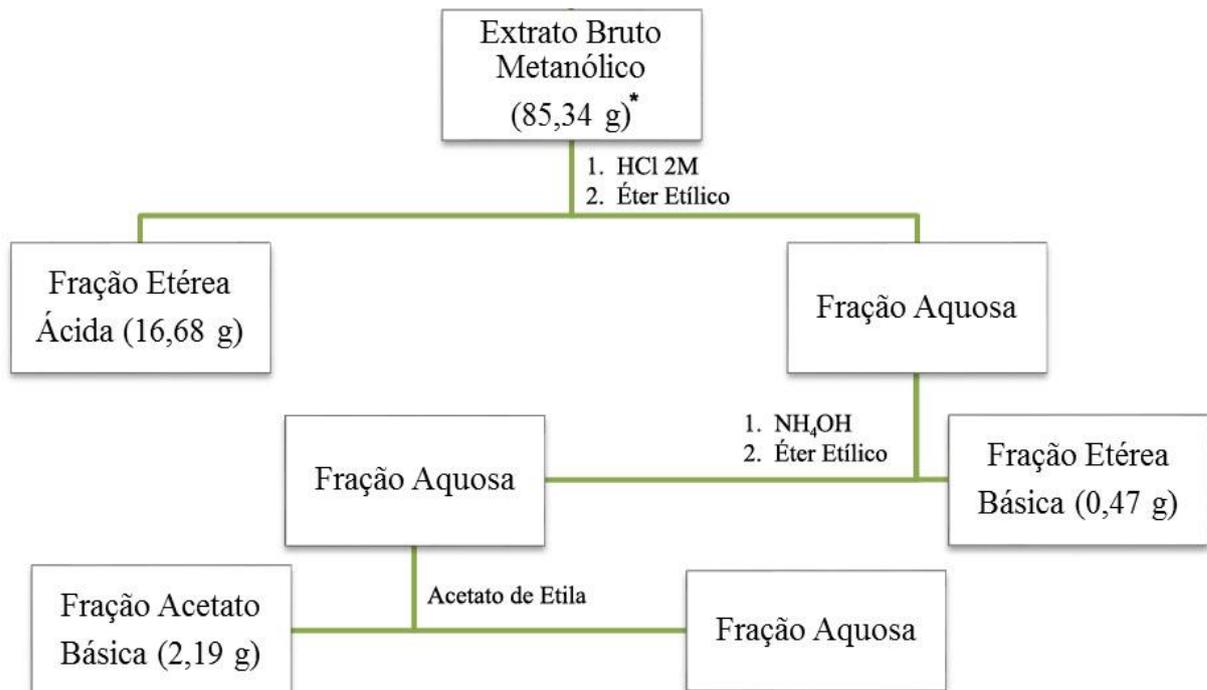
(conclusão)

Frações	Solventes	Peso (mg)
IX - 52 a 60	DCM/MeOH 80:20	14
X - 61 a 62	DCM/MeOH 60:40	3
XI - 63 a 67	DCM/MeOH 50:50	7

Analisando as frações obtidas por CCD, observou-se na fração V, a existência de um composto majoritário que também estava presente na amostra restante recuperada da fração 5 (CHxG 15-26) submetida a CCDP anteriormente. Reuniu-se estas duas amostras (30 mg) que foram submetidas à nova purificação por CCDP no sistema eluente de hexano: clorofórmio (1:2), resultando em três amostras denominadas PP2B, PP2M, PP2C. A amostra PP2B (20 mg) foi purificada através de outra CCDP, eluída com hexano: clorofórmio (1:2), resultando em um composto puro. Análise por CCD com padrão autêntico, espectros de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura, confirmaram o isolamento do metabólito secundário lupeol (**71**).

4.2.2.2 Fracionamento Ácido/Base do Extrato Bruto Metanólico - EBM

O EBM (85,34 g) foi solubilizado em água e acidificado com ácido clorídrico (HCl) 2 M a pH próximo de 1,5, e extraído exaustivamente com éter etílico em ampola de separação. O solvente foi evaporado ácido clorídrico (HCl) à vácuo, resultando num resíduo marrom, denominado Fração Etérea Ácida (FEA). A solução aquosa remanescente foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH_4OH) a pH 9,0, e extraída exaustivamente com éter etílico e acetato de etila. Após cada extração, evaporou-se o solvente em rota evaporador, obtendo-se as frações resultantes, Fração Etérea Básica (FEB) e Fração Acetato Básica (FAB), conforme o Esquema 2.



Esquema 2 - Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico de *E. crista-galli*; *quantidade de EBM utilizado para fracionamento

As frações obtidas foram analisadas por CCD, utilizando-se vários sistemas de solventes e reveladas em lâmpada UV a 254 e 365 nm, reagente de Dragendorff e solução de anisaldeído seguida de aquecimento. Desta forma, foi possível observar que tanto a fração etérea quanto a fração acetato básica apresentaram manchas alaranjadas frente ao uso do revelador Dragendorff, demonstrando assim a presença de alcaloides. Já a fração etérea ácida, que não revelou a ocorrência de alcaloides, quando revelada com a solução de anisaldeído, apresentou manchas de coloração variadas. Desta forma, estas três frações foram analisadas individualmente para o isolamento e identificação dos compostos majoritários.

4.2.2.2.1 Fração Etérea Básica (FEB)

A fração etérea básica (423 mg) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh (65,50 g) como fase estacionária e diclorometano/metanol como sistema eluente. Foram coletadas frações de 20 mL que foram rotaevaporadas, analisadas e reunidas através de comparação feita em CCD, conforme descreve a Tabela 5.

Tabela 5 - Coluna cromatográfica da Fração Etérea Básica (FEB)

Frações	Solventes	Peso (mg)
I - 1 a 5	DCM	16
II - 7 a 15	DCM/MeOH 3%	3
III - 16 a 24	DCM/MeOH 5%	6
IV - 25 a 36	DCM/MeOH 7%	178
V - 37 a 60	DCM/MeOH 8%	13
VI - 61 a 76	DCM/MeOH 10%	5
VII - 77 a 92	DCM/MeOH 20%	20
VIII - 93 a 115	DCM/MeOH 30%	9
IX - 116 a 125	DCM/MeOH 50%	4
X - 126 a 145	Metanol	4

A análise preliminar destas frações por CCD com o uso do revelador Dragendorff demonstrou a presença de alcaloides nas frações IV até a VIII e desta forma, estas frações foram priorizadas para o trabalho. As frações contendo alcaloides (IV a VIII) foram trabalhadas individualmente através de sucessivas técnicas de CC e CCDP sendo que, no entanto, não se obteve êxito na purificação de nenhum metabólito. Reuniu-se então apenas as amostras que continham alcaloides (108,40 mg) e fez-se uma injeção em MPLC (CLMP) nas condições já descritas anteriormente (pág. 61). Foram recolhidos 34 frascos com volumes variados que foram evaporados, liofilizados e reunidos conforme a análise realizada através CCD, lâmpada UV e revelador Dragendorff. Através de CCD, verificou-se na fração 8, (17-22; 33 mg) a presença de um alcaloide livre de impurezas. O isolamento do metabólito foi confirmado por CCD e análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais com dados da literatura levando a identificação do alcaloide erisotrina (**1**).

4.2.2.2.2 Fração Acetato Básica (FAB)

A fração acetato básica (2,17 g) foi cromatografada em coluna, utilizando-se sílica gel F60 (Silicycle) 230-400 mesh (74,10 g) como fase estacionária e diclorometano/acetato de etila/metanol como sistema eluente. Foram coletadas frações de 20 mL que foram rotaevaporadas, analisadas e reunidas através de comparação por semelhança feita em CCD, conforme descreve a Tabela 6.

Tabela 6 - Coluna cromatográfica da Fração Acetato Básica (FAB)

Frações	Solventes	Peso (mg)
I - 1 a 17	DCM	13
II - 18 a 24	DCM/AcOEt 25%	24
III - 25 a 29	DCM/AcOEt 35%	17
IV - 30 a 38	DCM/AcOEt 35%	26
V - 39 a 48	AcOEt	38
VI - 49 a 52	AcOEt/MeOH 2%	51
VII - 53 a 57	AcOEt/MeOH 2%	13
VIII - 58 a 78	AcOEt/MeOH 5%	165
IX - 79 a 83	AcOEt/MeOH 7%	84
X - 84 a 89	AcOEt/MeOH 10%	148
XI - 90 a 114	AcOEt/MeOH 15%	629
XII - 115 a 136	AcOEt/MeOH 25%	205
XIII - 137 a 141	AcOEt/MeOH 40%	49
XIV - 142 a 143	AcOEt/MeOH 50%	30
XV - 144 a 146	MeOH	181

A análise preliminar por CCD com o uso do revelador Dragendorff demonstrou a presença de alcaloides nas frações de nº X a XIII e XV e, portanto, apenas estas frações foram trabalhadas.

As frações de X a XIII foram trabalhadas primeiramente de forma individual, através de CC, CCDP e injeção em MPLC (CLMP), nas condições descritas anteriormente (pág. 61). Entretanto, não foi possível desta forma realizar a purificação do alcaloide majoritário presente nestas frações. Reuniu-se apenas as amostras contendo alcaloides (100 mg) e realizou-se uma CCDP, utilizando como sistema eluente AcOEt: MeOH (6:1,5). Após o procedimento, verificou-se por CCD a purificação de um dos alcaloides presentes nesta fração. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais aliados a dados da literatura demonstraram o isolamento do erisotrina (**1**), alcaloide majoritário presente na fração FEB e já identificado anteriormente. Análise simultânea por CCD dos dois compostos, também confirmou ser o mesmo alcaloide presente em ambas às frações, FEB e FAB.

A fração XV (144 a 146; 181 mg) revelou a presença de um alcaloide majoritário e foi então submetida a CC, utilizando sílica gel tipo SiliaFlash F60 (Silicycle) 230-400 mesh (4 g) como fase estacionária, e como sistema eluente um gradiente de acetato de etila/ metanol.

Foram obtidas 50 frações que foram analisadas e reunidas por similaridade através de CCD, resultando num total de 6 frações finais. Na fração 4 (F 30-48) o alcaloide de interesse foi cristalizado pela adição de éter etílico. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com dados existentes na literatura indicaram tratar-se do alcaloide epieritratidina (**50**).

4.2.2.2.3 Fração Etérea Ácida (FEA)

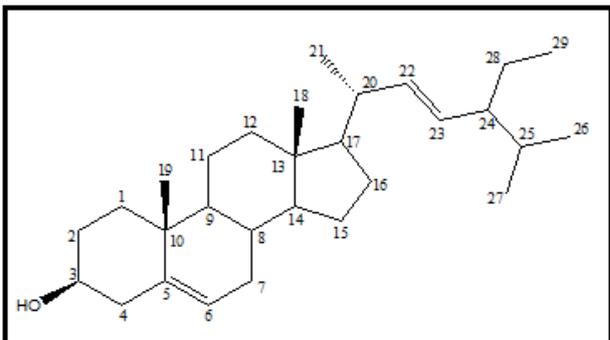
A fração etérea ácida (14,66 g) foi submetida a uma CC, utilizando-se sílica gel tipo SiliaFlash F60 (Silicycle) 230-400 mesh (145,09 g) como fase estacionária e diclorometano/acetato de etila/metanol/água em ordem crescente de polaridade, como sistema eluente. As 242 frações obtidas foram rotaevaporadas, analisadas e reunidas através de comparação feita em CCD com o uso de lâmpada UV 254 e 365 nm e solução de anisaldeído seguida de aquecimento, resultando num total de 23 frações. A fração 8, (F 56-62; 1,65 g) foi cromatografada em coluna com sílica gel tipo SiliaFlash F60 (Silicycle) 230-400 mesh (89 g) como fase estacionária e hexano/diclorometano/acetona/metanol como sistema eluente em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram rotaevaporadas, analisadas e reunidas através de comparação feita em CCD com o uso de lâmpada UV a 254 e 365 nm e solução de anisaldeído seguida de aquecimento. A fração de coloração amarelada, obtida da eluição com diclorometano precipitou com a adição de metanol, resultando num sólido branco que ao ser analisado por CCD, verificou-se que estava puro. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C , dados da literatura e CCD com amostra padrão, mostraram o isolamento do esteroide estigmasterol (**70**), já isolado anteriormente do EBH.

O sobrenadante amarelo resultante da precipitação com metanol, descrita anteriormente, foi misturado com a fração seguinte (obtida da eluição com acetona) e submetido a uma CCDP eluída com DCM: MeOH (45:0,75), resultando na purificação de uma substância identificada como sendo o lupeol (**71**), que também já havia sido isolado neste mesmo trabalho do EBH. A estrutura de **71** foi determinada através de RMN de ^1H , dados da literatura e CCD com amostra autêntica.

4.3 Dados dos metabólitos isolados

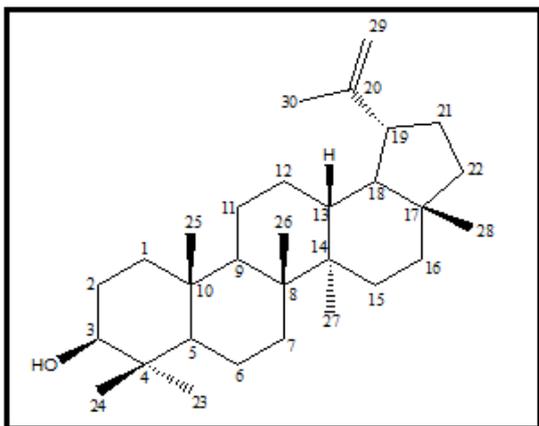
4.3.1 Extrato Bruto Hexânico - EBH

Estigmasterol (70): 23 mg; sólido branco; Rf: 0,54 em DCM-AcOEt (1,5:0,16); RMN ^1H a



400,13 MHz, CDCl_3 : δ 5,36 (1H, m, H-6), 5,16 (1H, dd, $J= 8,5$ e $15,2$ Hz, H-22), 5,06 (1H, dd, $J= 8,5$ e $15,2$ Hz, H-23), 3,53 (1H, m, H-3), 0,7-2,33 (m, demais hidrogênios); RMN ^{13}C a 100,62 MHz, CDCl_3 : δ 71,7 (C-3), 121,6 (C-6), 129,2 (C-23), 138,2 (C-22), 140,7 (C-5), 11,8-56,7 (demais carbonos).

Lupeol (71): 5 mg; sólido branco; Rf: 0,65 em DCM-AcOEt (1,5:0,16); RMN ^1H a

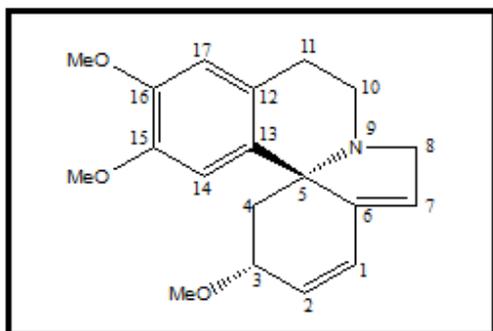


400,13 MHz, CDCl_3 : δ 4,69 (1H, m, H-29a), 4,56 (1H, m, H-29b), 3,20 (1H, m, H-3), 0,8-2,37 (demais hidrogênios).

4.3.2 Extrato Bruto Metanólico - EBM

4.3.2.1 Fração Etérea Básica (FEB)

Erisotrina (1): 31 mg; sólido viscoso amarelo; $[\alpha]_D = +232^\circ$ (*c* 0,12 em CHCl_3 ; Lit. $[\alpha]_D = +262,1^\circ$ *c* 0,67 em HCl 5%)¹¹⁸; Rf: 0,46 em DCM-MeOH (1,5:0,16); RMN ^1H a 400,13 MHz, CDCl_3 : δ 6,83 (1H, s, H-14), 6,62 (1H, s, H-17), 6,55 (1H, dd, $J = 2,0$ e $10,2$ Hz, H-2), 6,01 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-1), 5,72 (1H, br s, H-7), 4,07 (1H, m, H-3), 3,85 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-16$), 3,75 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-15$), 3,68 (1H, d, $J = 2,8$ Hz,

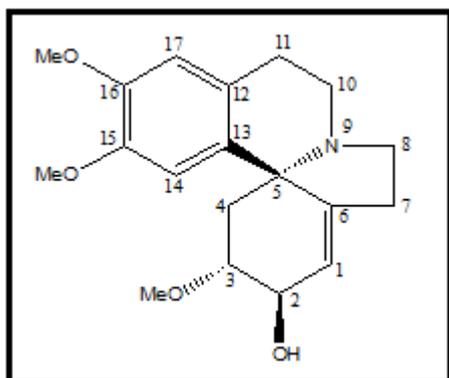


H-8a), 3,53 (1H, m, H-8b), 3,49 (1H, m, H-10a), 3,32 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-3$), 2,98 (1H, m, H-10b), 2,97 (1H, m, H-11a), 2,61 (1H, m, H-11b), 2,52 (1H, dd, $J = 5,6$ e $11,2$ Hz, H-4a), 1,84 (1H, dd, $J = 11,0$ e $11,2$ Hz, H-4b). RMN ^{13}C a 100,62 MHz, CDCl_3 : δ 23,9 (C-11), 41,3 (C-4), 43,5 (C-10), 55,8 ($\text{CH}_3\text{O}-15$), 55,8 ($\text{CH}_3\text{O}-16$), 55,9 ($\text{CH}_3\text{O}-3$), 56,6 (C-8), 66,8 (C-5), 76,1 (C-3), 109,7 (C-14), 111,8 (C-17), 122,7 (C-7), 125,4 (C-2), 126,4 (C-12), 131,3 (C-13), 131,5 (C-1), 142,2 (C-6), 147,8 (C-16), 147,2 (C-15).

4.3.2.2 Fração Acetato Básica (FAB)

Erisotrina (1): 11 mg. Os dados referentes a este metabólito já foram descritos acima.

Epieritratidina (50): 39 mg; sólido amorfo branco-amarelado; $[\alpha]_D = +89^\circ$ (*c* 0,12 em



CHCl_3 ; Lit. $[\alpha]_D = +142^\circ$ *c* 0,14 em CHCl_3)²¹; PF: 65-67 °C (Lit. 67-68 °C)¹¹⁹ Rf: 0,36 em AcOEt-MeOH (1:1);

RMN ^1H a 400 MHz, CDCl_3 : δ 6,80 (1H, s, H-14), 6,58 (1H, s, H-17), 5,58 (1H, m, H-1), 4,33 (1H, m, H-2), 3,83 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-16$), 3,82 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-15$), 3,66 (1H, ddd, $J = 4,2$, $6,8$ e $12,4$ Hz, H-3), 3,45 (1H, ddd, $J = 6,9$, $11,2$ e $14,3$ Hz, H-10a), 3,28 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-3$), 3,14 (1H, ddd, $J = 1,0$, $7,6$ e $14,3$ Hz, H-10b), 2,96 (1H, m, H-

11a), 2,96 (1H, m, H-8a), 2,70 (1H, m, H-8b), 2,55 (1H, dd, $J = 6,9$ e $17,1$ Hz, H-11b), 2,40

(1H, m, H-7a), 2,29 (1H, dd, $J= 4,2$ e $12,4$ Hz, H-4a), 2,23 (1H, m, H-7b), 1,63 (1H, t, $J= 12,4$, H-4b). RMN ^{13}C a 100,62 MHz, CDCl_3 : δ 21,5 (C-11), 26,9 (C-7), 39,7 (C-4), 40,2 (C-10), 46,5 (C-8), 55,8 (CH_3O -15), 56,1 (CH_3O -16), 56,8 (CH_3O -3), 64,4 (C-5), 72,9 (C-2), 81,3 (C-3), 111,6 (C-14), 112,2 (C-17), 121,0 (C-1), 125,3 (C-13), 128,4 (C-12), 144,4 (C-6), 146,8 (C-15), 148,1 (C-16).

4.3.2.3 Fração Etérea Ácida (FEA)

Estigmasterol (**70**; 24,5 mg) e lupeol (**71**; 5 mg). Os dados espectroscópicos referentes a estes metabólitos já foram descritos na página 70.

4.4 Ensaio biológicos

4.4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

4.4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de uma substância testada capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, sob condições de culturas adequadas e padronizadas. Desta forma, quanto menor a CIM, maior a potência antimicrobiana, e maior a dificuldade do micro-organismo em desenvolver resistência.

4.4.1.2 Micro-organismos empregados no ensaio

Foram utilizadas cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), constituídas de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Micro-organismos indicadores

Micro-organismos (ATCC)		
Gram-positivos	Gram-negativos	Fungos
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	<i>Escherichia coli</i> (25922)	<i>Candida albicans</i> (10231)
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1304)	<i>Candida tropicalis</i> (18803)
<i>Bacillus cereus</i> (33019)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (9027)	<i>Candida krusei</i> (6258)
<i>Enterococcus spp.</i> (6589)	<i>Burkholderia cepacia</i> (17759)	<i>Candida parapslosis</i> (22018)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	<i>Shigella sonnei</i> (25931)	<i>Cryptococcus neoformans</i> (28952)
	<i>Salmonella typhimurium</i> (14028)	<i>Cryptococcus gatti</i> (2601)
		<i>Sacharomyces cervisiae</i> (2601)

4.4.1.3 Padrões utilizados nos ensaios biológicos

As substâncias empregadas como padrões antibióticos, e preparadas conforme FDA¹²⁰ foram: Ampicilina, Azitromicina e Levofloxacina para bactérias e Nistatina para fungos.

4.4.1.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de CIM foram:

- Caldo caseína de soja (para bactérias): cloreto de sódio (5,0 g), dextrose (2,5 g), fosfato dibásico de potássio (2,5 g), peptona de caseína (17 g), peptona de soja (3 g) e água destilada (1 L);

- Caldo Sabouraud dextrosado (para fungos): dextrose (40,0 g), peptona de carne (5,0 g), peptona de caseína (5,0 g) e água destilada (1 L).

4.4.1.5. Método de determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo foi realizada através da técnica descrita pela NCCLS.¹²¹ Este método foi determinado em placas de culturas estéreis de 96 micro poços onde é realizada uma diluição seriada das amostras em meio líquido contendo 2% de surfactante Tween 80. Cada micro poço foi inoculado com os micro-organismos na concentração de 1×10^6 células viáveis, e após, as amostras foram adicionadas no primeiro micro poço seguindo-se a diluição em série das mesmas. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para as bactérias e, por 48 horas a 25 °C para os fungos. Após a incubação, determinou-se o crescimento microbiano através da leitura da microplaca de 96 poços feita em espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA) no comprimento de onda de 420 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e comparados com os padrões. Utilizou-se também um controle positivo e um negativo para cada amostra testada, de forma a garantir a reprodutibilidade do ensaio.

4.4.1.6. Método de Concentração Letal Mínima

As culturas de micro-organismos que no ensaio da CIM não apresentaram crescimento ou foram inibidas, são, ainda, testadas para a verificação da concentração letal mínima (CLM), que, segundo Hammer et al. (2004)¹²² é a menor concentração da substância capaz de alcançar uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias.

Para a medição de CLM, foi retirado 10 µL de solução de cada poço onde feito anteriormente a medição da CIM e adicionado a 100 µL de um novo meio de cultura líquido apropriado para cada classe de micro-organismo. Após a incubação, cumprindo-se o tempo necessário para o crescimento de cada micro-organismo (24 h, 35-37 °C, bactérias e 48 h, 25-27 °C, fungos) determinou-se a CLM que foi dividida em Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para cada substância testada, nos poços onde não houve crescimento microbiano.

4.4.2 Ensaios enzimáticos

4.4.2.1 Enzimas utilizadas nos ensaios de inibição enzimática

As enzimas POP e DPP-IV foram cedidas pelo grupo do prof. Ernest Giralt do Instituto de Pesquisa Biomédica de Barcelona (IRB-Espanha) e os substratos referentes a cada enzima, respectivamente, o ZGP-AMC (N-benziloxycarbonil-Gli-Pro-metilcumarina-7-amida) e o GP-AMC (H-Gli-Pro-metilcumarina-7-amida) foram obtidos comercialmente de Bachem (Bubendorf, Switzerland).

A enzima AChE foi adquirida de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany), assim como a albumina de soro bovino e o reagente colorimétrico DTNB. A leitura em microplacas foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA) baseando-se na medida do comprimento de onda da absorbância para AChE e da fluorescência para a POP e DPP-IV, e que demonstra o resultado final do teste de inibição enzimática.

4.4.2.2 Ensaio de inibição da prolil oligopeptidase (POP)

A atividade de inibição frente à enzima POP foi determinada seguindo-se o método descrito por Toide et al. (1995).¹²³ Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, permitindo assim, um monitoramento simultâneo das múltiplas reações. Para cada reação foi realizada uma pré-incubação do tampão fosfato Na/K (131 μ L, pH 8.0), com a enzima POP (7 nM) e a amostra a ser testada (3 μ L) a 37 °C durante 15 minutos. As amostras-estoque a serem testadas foram preparadas em DMSO. Após a pré-incubação, adicionou-se a cada poço o substrato o ZGP-AMC (10 μ L, 3 mM em 40% de 1,4-dioxano) e a reação foi incubada por 1 h a 37 °C. A reação foi interrompida com acetato de sódio (150 μ L, 1 M, pH 4,0) e a formação de N-aminometilcumarina (AMC) foi medida fluorimetricamente. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 360/40 e 485/20 nm, respectivamente.

Foram realizados controles positivos e negativos contendo a amostra em DMSO (3 μ L), o substrato ZGP-AMC (10 μ L) e o tampão fosfato Na/K (131 μ L), com e sem a presença da enzima POP (7 nM) respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata, usando-se um branco para cada amostra sem a enzima. Um inibidor conhecido da POP, também foi utilizado como controle positivo sob as mesmas condições experimentais. A porcentagem de inibição foi calculada pela fluorescência da amostra comparando com o ensaio em branco.

4.4.2.3 Ensaio de inibição da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV)

A atividade inibitória da enzima DPP-IV foi determinada seguindo-se o método descrito por Checler et al. (1995).¹²⁴ As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço adicionou-se o tampão (131 μ L, 100 mM de Na/K tampão fosfato, pH 8,0), 0,7 nM de enzima DPPIV e 3 μ L da amostra a ser testada (em DMSO). Após a pré-incubação (15 min a 37 °C), o GP-AMC (10 μ L, 3 mM em 40% de 1,4-dioxano) foi adicionado e a reação foi então incubada durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, a reação foi interrompida com acetato de sódio (150 μ L, 1 M, pH 4,0) e a formação do AMC foi medida fluorimetricamente (comprimentos de onda de excitação e a emissão foram 360/40 nm e 485/20 nm, respectivamente).

Foram realizadas reações com os controles positivos e negativos, que continham a amostra em DMSO (3 μ L), o substrato GP-AMC (10 μ L) e o tampão fosfato Na/K (131 μ L), com e sem a presença da enzima DPP IV (7 nM) respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata e com um branco, sem enzima, para cada amostra. A porcentagem de inibição foi calculada por comparação da absorbância da amostra com o branco. Um inibidor conhecido da enzima, isoleucina tiazolida, também foi utilizado como controle positivo sob as mesmas condições experimentais. A porcentagem de inibição foi calculada pela fluorescência da amostra comparando com o ensaio em branco.

4.4.2.4 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada através de um ensaio colorimétrico quantitativo, baseado no método adaptado de Ellman (RHEE et al., 2001).¹²⁵ Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, misturados e incubados a 25 °C por 5 min, 25 μ L de 15 mM ACTI, 125 μ L de 3 mM DTNB em tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 7,9 contendo NaCl 0,1 M e 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$), 50 μ L de tampão A (50 nM Tris-HCl, pH 7,9 contendo 0,1% de BSA) e 25 μ L da amostra (20 mM em DMSO diluídos com água até uma concentração de 5, 2, 0,2 e 0,02 nM.). Em seguida, 25 μ L de AChE (0,22 U/mL em tampão A) foi adicionada e então a absorbância foi medida sessenta vezes a cada 60 segundos a 25 °C. A enzima hidrolisa o substrato acetilcolina que reage com o DTNB para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e 5-tio-2-nitro-benzoato, que possui coloração amarela e é detectado a 405 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata e com um branco sem enzima para cada amostra. Eserina (fisostigmina) foi utilizada como controle positivo e a porcentagem de inibição foi calculada por comparação da absorbância da amostra com o ensaio em branco.

4.4.3 Atividade antitumoral *in vitro*

4.4.3.1 Avaliação da atividade antitumoral

A atividade antitumoral das amostras de *E. crista-galli* foi medida através de duas análises: a primeira mediu a concentração das células vivas após 24 h, fornecendo o efeito sobre a viabilidade celular, ou seja, o quanto a amostra-teste (extrato bruto, fração ou substância pura) matou ou induziu (por apoptose) a morte das células. A segunda análise, realizada após 72 h, forneceu o efeito antiproliferativo da amostra testada, ou seja, quanto ela inibiu o crescimento das células. O ensaio da atividade antitumoral foi realizado no Laboratório de Biogenômica - UFSM sob a responsabilidade de prof^a. Dr^a. Ivana B. M. da Cruz.

4.4.3.2 Cultura de células

Foram utilizadas células neoplásicas HT29 (ATCC HTB38, carcinoma de cólon) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ (RJCB 0111) (Figura 18). Estas células são oriundas de um adenocarcinoma de uma mulher caucasiana, 44 anos, apresentando uma citomorfologia epitelial com propriedades de aderência. É um câncer hipertriplóide com 71 cromossomos, apresentando os seguintes oncogenes: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -. Em termos citológicos as células HT29 apresentam microvilosidades, microfilamentos, são grandes, as mitocôndrias apresentam vacúolos com grânulos negros, gotículas de gordura, e alguns lisossomos.¹²⁶

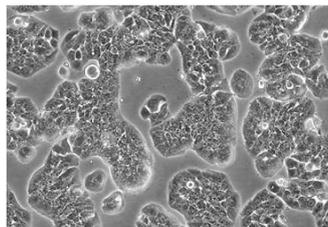


Figura 18 - Fotomicrografia em contraste de fase de células de câncer colorretal HT29 (40 x) em alta densidade (Fonte: ATCC)

Tais células foram cultivadas sob condições ideais de cultura celular, conforme foi estabelecida por Peres e Curi (2005),¹²⁷ sendo utilizado o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e antifúngico anfotericina B, sendo mantidas em incubadora de CO₂, a 37 °C e saturação de 5% de CO₂. Dessa forma, as células passaram por um período de expansão celular até a obtenção da quantidade ideal para a realização dos devidos experimentos.

4.4.3.3 Ensaio de atividade antitumoral pela medição da viabilidade celular e do efeito antiproliferativo

Para avaliar o potencial antitumoral da planta em estudo, as células neoplásicas com confluência elevada e já expandidas, foram colocadas em placas estéreis de Elisa de 96 poços em uma concentração de 1×10^6 células viáveis e tratadas com as amostras a serem testadas como antitumorais em diferentes concentrações.

Em seguida, as placas foram incubadas em incubadora de CO₂ a 37 °C por 24 e 72 h para determinar a viabilidade celular e seu efeito antiproliferativo respectivamente. Decorridos os períodos de incubação, foi realizada a técnica de quantificação pelo uso do corante PicoGreen.

4.4.3.3.1 Técnica de quantificação PicoGreen

Este método de quantificação consiste em avaliar a atividade antitumoral das amostras em teste tanto nas 24 quanto nas 72 horas através da medição dos níveis de DNA dupla-fita (dfDNA) medidos pelo corante de alta especificidade ao DNA dupla-fita, PicoGreen, que tem correlação direta com a proliferação celular, alta sensibilidade e reprodutibilidade.¹¹²

A análise da concentração de dfDNA foi realizada por fluorimetria utilizando-se o kit Quanti-iT PicoGreen (Invitrogen). Para tanto, após 24 e 72 h de incubação as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 180 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,6), 20 µL de Triton 1% e incubadas durante 45 minutos a 37 °C a fim de romper as membranas celulares e expor o dfDNA contido no núcleo. Após este período a amostra foi centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos e 10 µL do sobrenadante foi adicionado a 80 µL de tampão Tris-HCL (10 mM) e 1 mM de EDTA (tampão TE, pH 7,6) e 10 µL de uma solução do corante DNA PicoGreen diluída em 1:200

em tampão TE. A reação foi incubada durante 30 minutos a 37 °C e após este período a absorbância foi analisada por fluorimetria em um comprimento de excitação de 485 nm e de emissão de 20 nm utilizando o equipamento SpectraMax M2/M2 e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA, USA).

Os resultados foram expressos como percentagem de dfDNA em relação a amostra controle das células tumorais que não receberam nenhum tipo de tratamento, cuja absorbância foi considerada 100%. Assim sendo, foi inicialmente calculada a absorbância média das amostras controle (AMAC) utilizada na seguinte equação: Viabilidade (% do controle) = [(Absorbância da Amostra x 100)/AMAC]. Foram realizadas 04 repetições por concentração de cada amostra aqui investigada. As concentrações do EBM, frações e alcaloides obedeceram a uma distribuição aproximada de log variando de 0,03 a 30 µg/mL. Uma vez que as amostras testadas possuem baixa solubilidade, os mesmos foram diluídos em DMSO a uma concentração $\leq 1\%$ o que não permitiu testar concentrações mais elevadas já que o solvente pode ser citotóxico e assim mascarar os resultados da planta investigada.

4.4.3.3.2 Análise estatística

Os resultados das diferentes concentrações do EBM, frações e alcaloides foram comparados através de análise de variância de uma via seguida de teste post hoc de Tukey. O programa utilizado foi o GraphPad Prisma e foram consideradas significativas todas as comparações com $p \leq 0.05$.

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão do estudo fitoquímico realizado com os extratos, frações e metabólitos isolados da casca do caule da *E. crista-galli* bem como a avaliação das atividades farmacológicas dos mesmos.

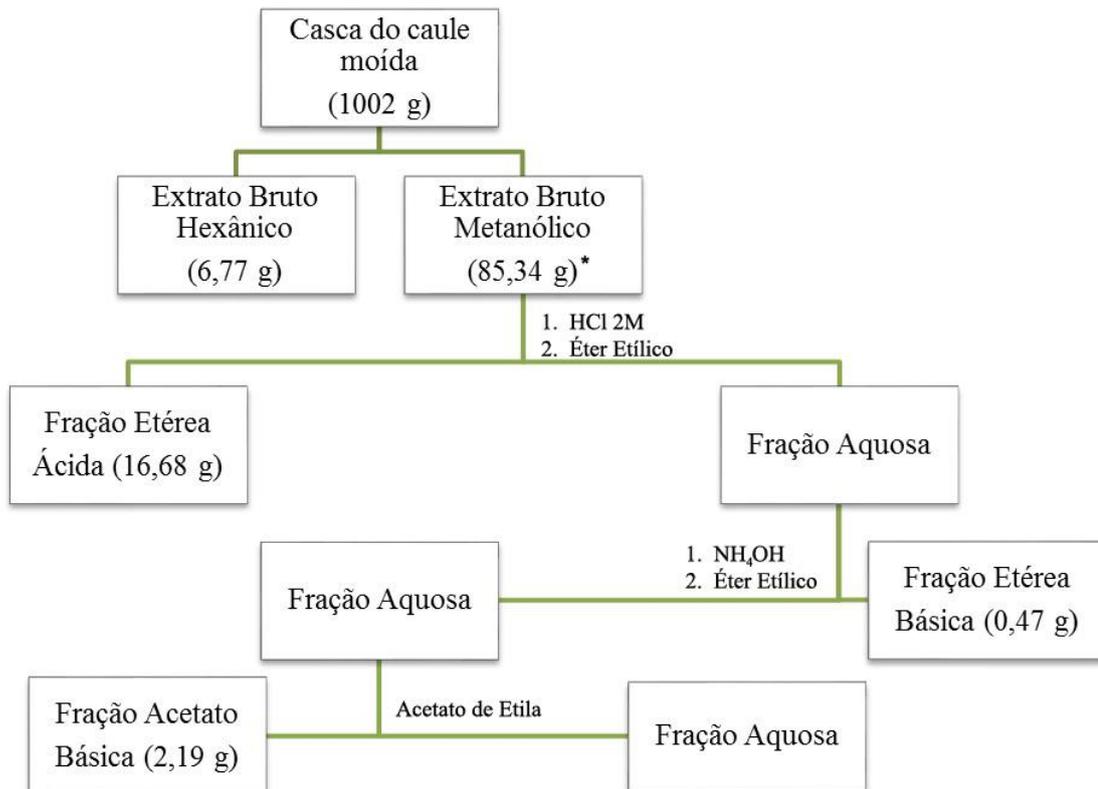
As estruturas químicas dos metabólitos isolados foram estabelecidas com base na interpretação de dados espectrais, principalmente de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, espectrometria de massa de alta resolução, comparação com dados da literatura e amostra padrão quando existente no laboratório.

Os estudos dos extratos e frações obtidos durante o trabalho levaram ao isolamento e identificação de quatro compostos. Dois destes compostos são alcaloides presentes nas frações etérea básica (FEB) e acetato básica (FAB) do EBM, sendo eles o alcaloide dienoide erisotrina (**1**) e o alquenoide epieritratidina (**50**), específicos e usuais no gênero *Erythrina*. Os outros dois compostos também são metabólitos já conhecidos nesta e em outras plantas do gênero *Erythrina*, sendo eles o esterol estigmasterol (**70**) e o triterpeno lupeol (**71**), isolados tanto do EBH quanto da fração etérea ácida (FEA) do EBM.

Os compostos isolados, os extratos brutos e as frações foram submetidos a ensaios biológicos para a determinação das suas atividades antimicrobiana, antitumoral (células HT29) e de inibição das enzimas POP, DPP-IV e AChE.

5.1 Rendimentos dos extratos e frações

Após a coleta, secagem e moagem das cascas do caule, obteve-se 1002 g de planta moída. Fez-se a extração do material vegetal a quente, primeiramente com hexano, resultando em 6,77 g de EBH e após, seguiu-se a extração com metanol, obtendo-se 86,18 g de EBM. O EBM foi então submetido a um fracionamento ácido/base, conforme descrito anteriormente (página 65), resultando nas frações: FEA, FEB e FAB. O Esquema 3 mostra o tratamento, cuja casca de *E. crista-galli* foi submetida.



Esquema 3 - Tratamento da casca de *E. crista-galli*; *quantidade de EBM utilizado para fracionamento

Os rendimentos, em relação à planta moída e aos extratos brutos, são demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Rendimentos dos extratos brutos e frações

Extrato bruto ou fração	Quantidade obtida (g)	Em relação à casca do caule seca (%)	Em relação ao extrato bruto (%)
EBH	6,77	0,67	-
EBM	86,18	8,61	-
FEA	16,68	1,66	19,35
FEB	0,47	0,04	0,54
FAB	2,19	0,21	2,54

5.2 Análise fitoquímica de *Erythrina crista-galli*

5.2.2 Extrato Bruto Hexânico - EBH

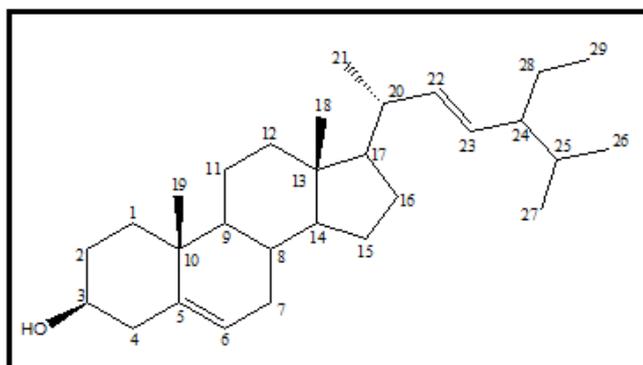
Com o objetivo de separar os compostos mais apolares presentes na planta, realizou-se inicialmente a extração com o solvente orgânico hexano. Uma vez preparado e fracionado em coluna cromatográfica, o EBH deu origem a várias frações menores que também foram submetidas a CC e CCDP para a purificação e isolamento dos compostos. Durante a execução do trabalho considerou-se a quantidade de substâncias existentes em cada fração e a possibilidade de purificação dos compostos majoritários presentes nas mesmas.

Todas as frações oriundas do EBH foram trabalhadas exaustivamente através de técnicas de CC, CCDP e cristalização sendo que, no entanto, as quantidades finais obtidas não foram suficientes para o isolamento e/ou identificação de outros compostos, uma vez que se observou em todas as frações misturas de muitas substâncias. Por este motivo, o tratamento a que estas frações foram submetidas não foram relatadas detalhadamente neste trabalho, embora tenham sido amplamente estudadas.

Assim, do EBH foi possível isolar e identificar os seguintes metabólitos já conhecidos: estigmasterol (**70**) e lupeol (**71**).

5.2.2.1 Estigmasterol

O esterol ou fitoesterol estigmasterol (**70**), de fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, já isolado pelo grupo anteriormente, foi obtido como um sólido branco conforme descrito na parte experimental (páginas 62 a 64).



(70)

Este metabólito tem sido isolado de várias plantas medicinais, dentre elas, de várias espécies de *Erythrina*. Vários estudos prévios descrevem o isolamento deste metabólito em extratos juntamente com outros compostos. De acordo com a literatura disponível, a *E. variegata* é a espécie mais relatada com a presença de estigmasterol (**70**) em diferentes partes da planta.^{48,128,129,130,131,132,133,134,135,136}

Investigações anteriores realizadas com a espécie *E. crista-galli*, mostraram o isolamento do estigmasterol (**70**) a partir das folhas e das cascas do caule, conforme Abo El-Fotouh et al. (2008)¹³⁷ e Imamura et al. (1981)¹³⁸ respectivamente.

O composto **70** é utilizado numa série de processos químicos que são realizados para a produção de numerosos compostos sintéticos e semi-sintéticos na indústria farmacêutica. Além disso, ele tem sido investigado cientificamente pelas suas propriedades farmacológicas como, atividade antitumoral, antimutagênica, antioxidante, antiinflamatória e efeitos sobre o SNC, entre outras.^{139,140,141,142,143,144,145,146}

Sua estrutura foi determinada com base nos dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C, comparação com dados da literatura¹⁴⁷ e CCD com amostra autêntica.

Pela análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 19), é possível observar a existência de picos característicos de hidrogênios olefínicos em 5,36, 5,16 e 5,06 ppm referentes às ligações com os carbonos C-6, C-22 e C-23 respectivamente, além de um multipeto em 3,53 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. Na região a campo alto, entre 0,7-2,3 ppm é possível observar a presença de vários outros sinais correspondentes aos hidrogênios dos grupos metílicos e metilênicos presentes na estrutura do estigmasterol (**70**).

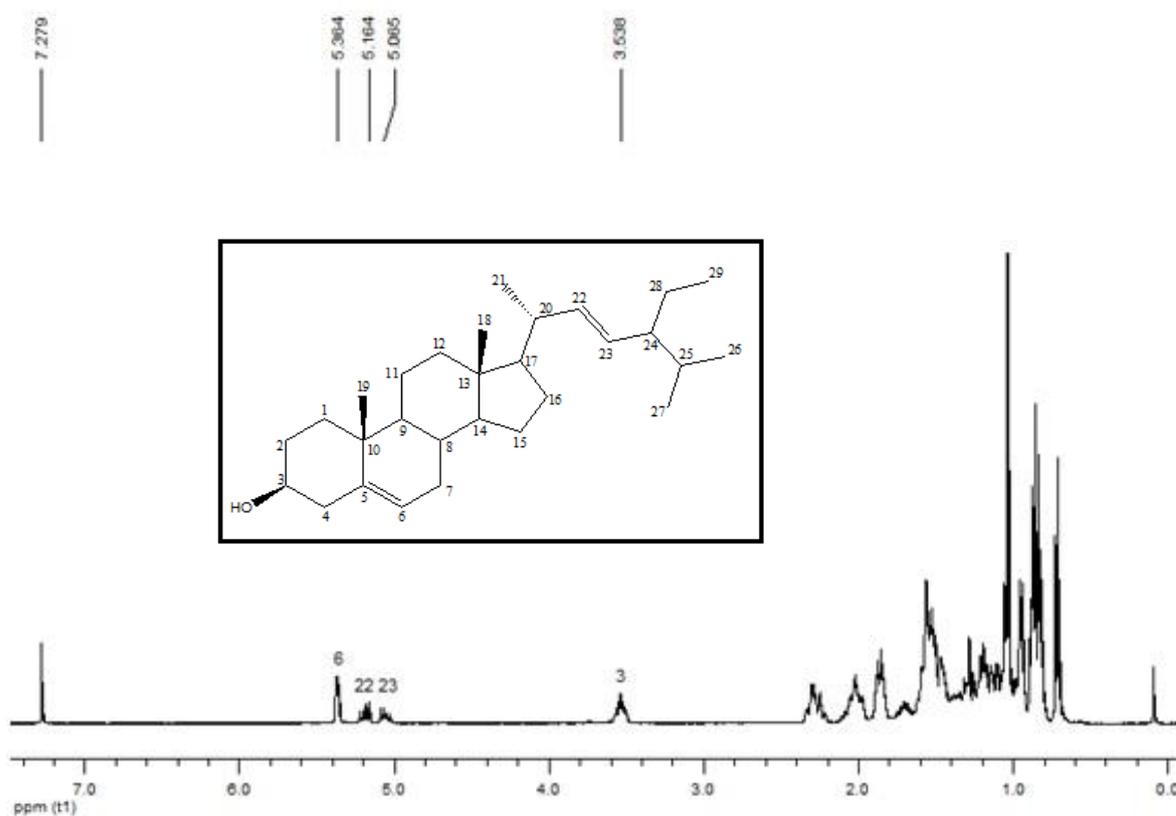


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do estigmasterol (**70**) em CDCl_3 a 400 MHz

O espectro de RMN de ^{13}C , demonstrado na Figura 20, permite a visualização dos picos de carbonos olefínicos C-5, C-6, C-22 e C-23 em 140,74, 121,64, 138,23 e 129,29 ppm, respectivamente. Em 71,77 ppm o pico referente ao C-3 e entre 11,0-57,0 ppm os demais picos correspondentes aos carbonos metílicos e metilênicos característicos da estrutura do composto **70**.

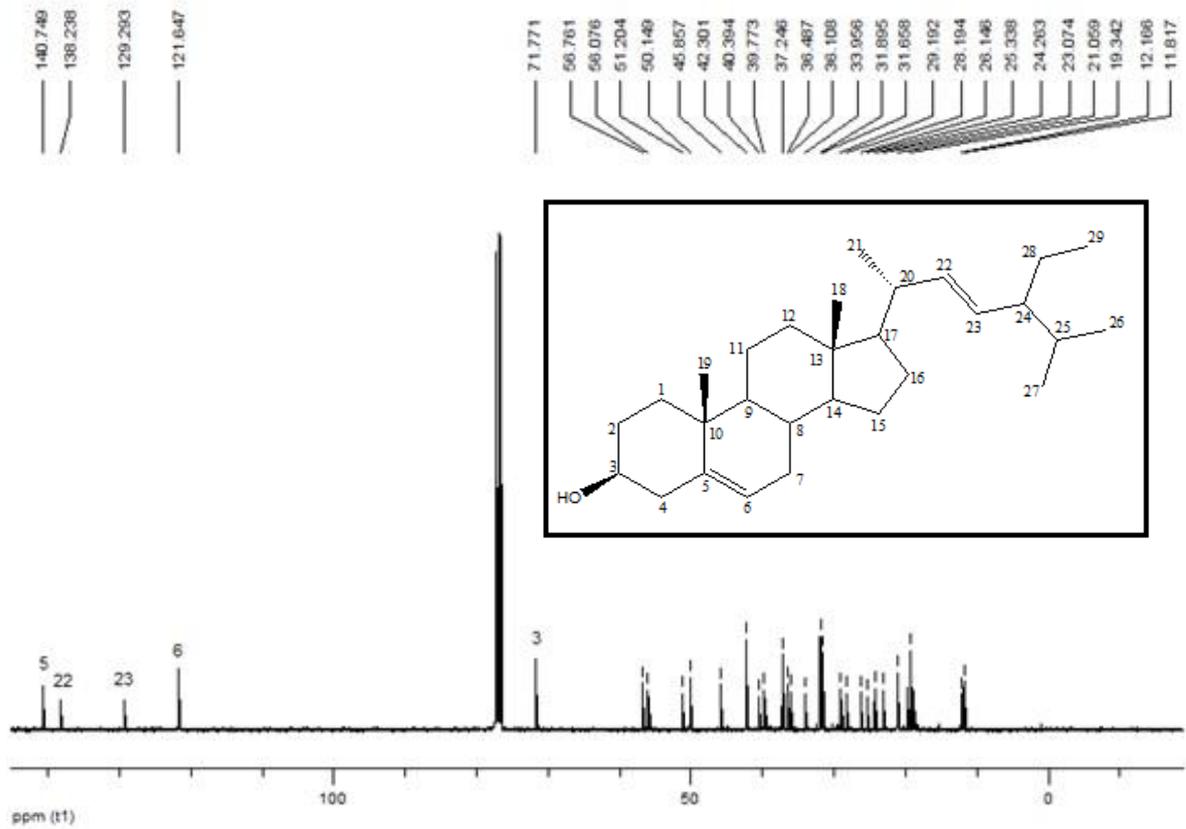
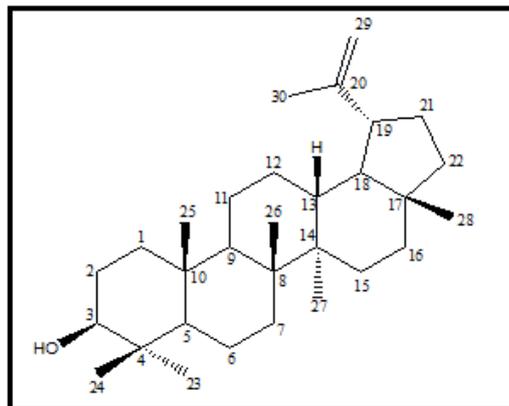


Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C do estigmasterol (**70**) em CDCl_3 a 100 MHz

5.2.2.2 Lupeol

O triterpeno **71**, de fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, já isolado pelo grupo anteriormente, obtido como um sólido branco conforme descrito na parte experimental (páginas 64 e 65).



(71)

Este metabólito é frequentemente encontrado em diversas espécies de plantas. Nas últimas décadas, o seu amplo espectro de ação farmacológica despertou o interesse de vários profissionais na área da saúde e pesquisa científica. O potencial terapêutico e preventivo do lupeol (**71**) se estende a doenças inflamatórias, artrite, diabetes, doenças cardiovasculares, desordens renais, toxicidade hepática, infecções microbianas e câncer.^{148,149,150,151,152,153}

Conforme a literatura, vários estudos realizados com ensaios *in vitro* e *in vivo* sugerem que o lupeol (**71**) é um agente não tóxico e que alveja seletivamente células doentes e insalubres, poupando as normais e saudáveis. Estes resultados são promissores e tornam este metabólito um candidato a agente terapêutico frente a várias doenças, porém avaliações adicionais tornam-se necessárias para a confirmação da utilidade clínica do metabólito em questão.^{154,155,156,157,158}

No que se refere ao gênero *Erythrina*, Rukachaisirikul et al. (2007)⁴⁹ publicou um estudo reportando o isolamento do lupeol (**71**) a partir de cascas do caule *E. subumbrans*. O presente trabalho descreve pela primeira vez a presença deste metabólito na espécie *E. cristagalli*.

O composto em questão foi identificado através de RMN de ¹H em comparação com dados disponíveis na literatura¹⁵⁹ e CCD com amostra padrão.

Pelo espectro de RMN de ¹H (Figura 21) é possível observar sinais de hidrogênios olefinicos em δ 4,69 e 4,56 referentes aos hidrogênios ligados ao C-29, H-29a e H-29b respectivamente. Em 3,20 ppm um multipeto correspondente ao H-3 e entre 0,80-2,37 ppm, os demais hidrogênios.

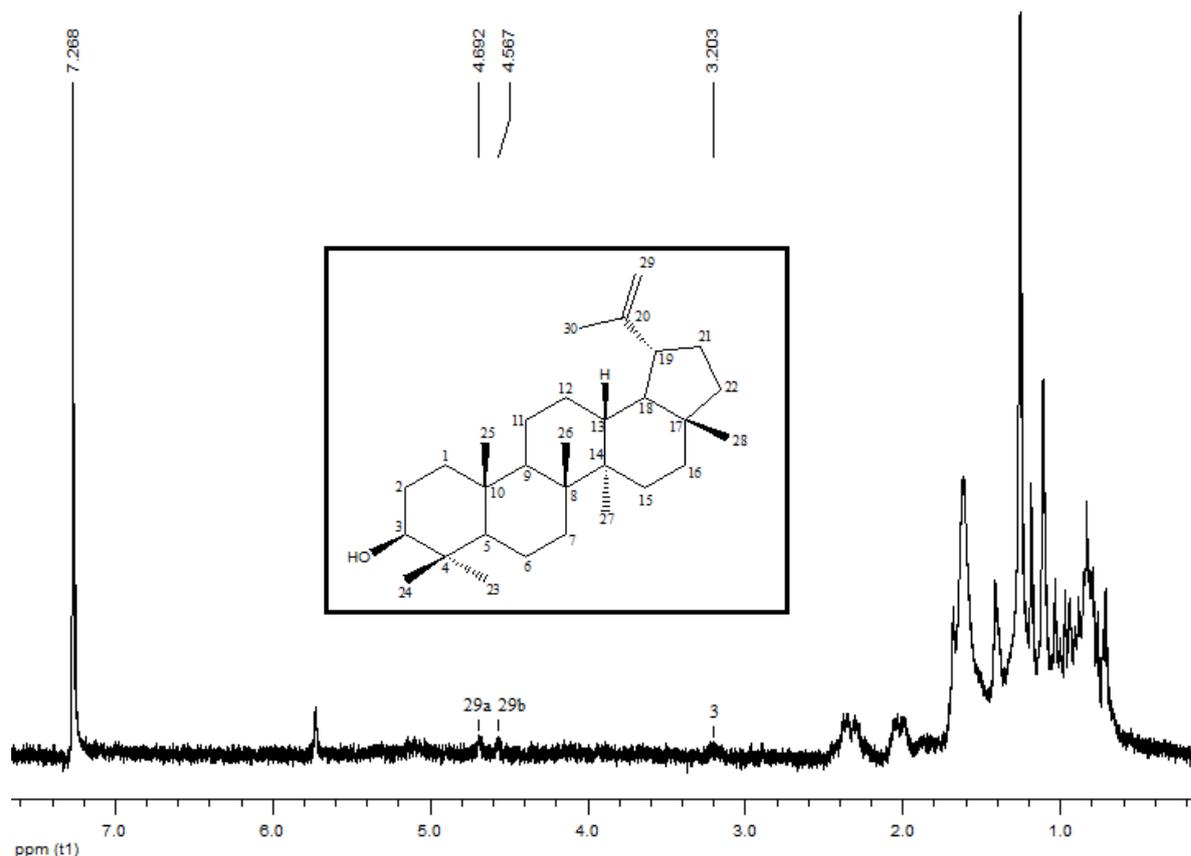


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H do lupeol (**71**) em CDCl_3 a 400 MHz

5.2.3 Extrato Bruto Metanólico - EBM

Conforme estudos anteriores, plantas do gênero *Erythrina* são conhecidas por produzirem alcaloides específicos. Assim sendo, buscou-se através desse trabalho o isolamento e identificação principalmente desta classe de compostos.

O EBM foi submetido a um processo de fracionamento (extração) ácido/base, o qual possibilitou a separação dos alcaloides nas frações básicas, de outros grupos de substâncias, na fração ácida. Isso acontece devido às propriedades dos alcaloides que quando em solução ácida se tornam sais solúveis em solventes aquosos e em meio básico são solúveis em solventes orgânicos, sendo desta maneira, isolados como bases livres.

Uma vez realizado o fracionamento ácido/base, foram obtidas três frações, sendo elas: fração etérea ácida (FEA), fração etérea básica (FEB) e fração acetato básica (FAB). Cada fração foi trabalhada individualmente possibilitando o isolamento e identificação de alguns metabólitos.

Para um melhor acompanhamento do trabalho, as frações básicas (FEB e FAB) foram monitoradas através de HPLC (CLAE), onde foi possível visualizar e identificar os picos principais das substâncias presentes nas frações.

5.2.3.1 Fração Etérea Básica (FEB)

Uma vez realizada a primeira CC com a fração FEB, foram trabalhadas apenas as frações que demonstraram positividade para a presença de alcaloides com o uso do revelador Dragendorff e que apresentaram quantidades significativas para o isolamento de substâncias.

A fração FEB foi monitorada por HPLC, permitindo assim verificar a quantidade de metabólitos presentes nesta fração. Embora o cromatograma de HPLC da fração FEB tenha indicado a presença de várias substâncias, foi possível isolar em quantidade suficiente para análise e elucidação estrutural apenas o alcaloide erisotrina, pico majoritário com tempo de retenção de 20,78 min, conforme mostra a Figura 22.

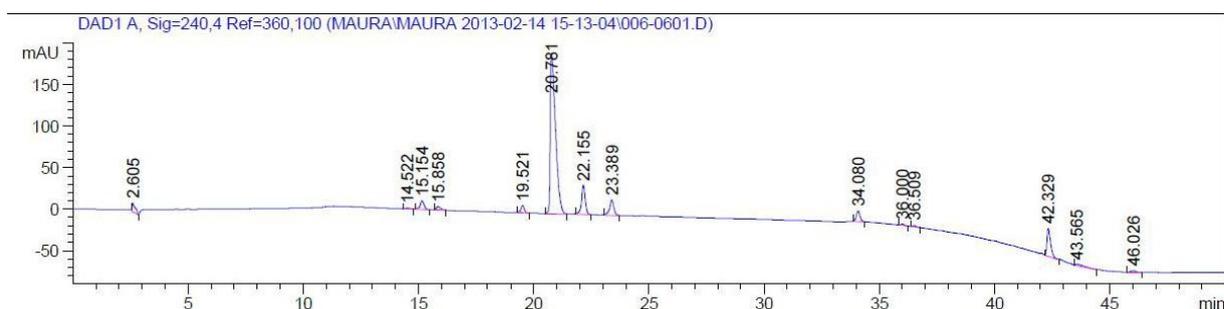
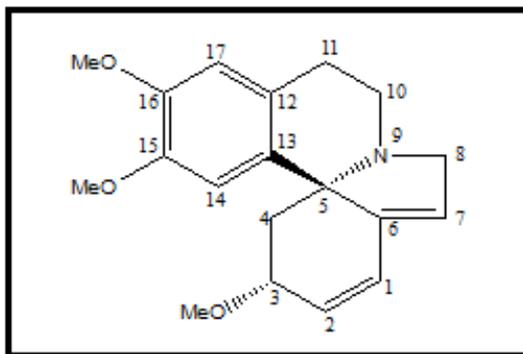


Figura 22 - Cromatograma de HPLC da fração FEB a $\lambda = 240$ nm; Condição de eluição descrita no sub item 4.1.3 (página 61)

5.2.3.1.1 Erisotrina

O alcaloide dienoide erisotrina (**1**), de fórmula molecular $C_{19}H_{23}O_3N$, foi obtido como um sólido viscoso amarelo claro. Embora seja um metabólito bastante usual no gênero *Erythrina*, essa foi a primeira vez que ele foi isolado das cascas do caule da *E. crista-galli*. Seu isolamento se deu através de CC e MPLC, além de análises em CCD que confirmaram a pureza do mesmo, conforme descrito na parte experimental, páginas 66 e 67. Sua estrutura foi elucidada após análises de ESI-MS, RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais, DEPT 135°, COSY, HSQC e comparações com dados da literatura disponível.



(1)

Poucos relatos têm sido publicados sobre as atividades biológicas do erisotrina (1). Mohammed et al. (2012)¹⁶⁰ mostraram sua atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células neoplásicas HEP-G2 e Hep-2. Efeitos anticonvulsivos e ansiolíticos significativos foram relatados por Serrano et al. (2011)¹⁶¹ e Rosa et al. (2012)¹⁶² respectivamente e o TRAIL (fator de necrose tumoral-lançado ligante indutor de apoptose) melhorando o efeito da erisotrina (1) quando ligada a ele (Ozawa et al., 2009).¹⁶³ Wanjala et al. (2002)⁵⁵ estudaram a sua atividade antibacteriana e verificaram que este alcalóide não é eficaz contra as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. É importante mencionar que esta é a primeira vez que o erisotrina (1) foi isolado da casca de *E. crista-galli*.

O cromatograma de HPLC, Figura 23, obtido do alcaloide erisotrina (1), confirma este metabólito como sendo o componente majoritário presente na fração FEB.

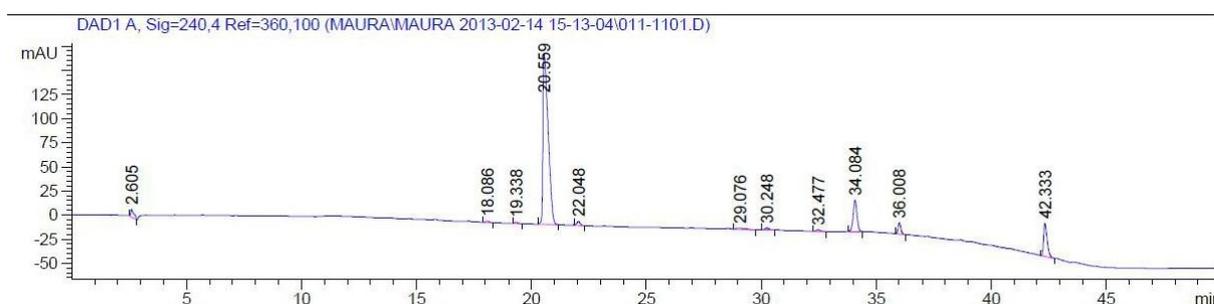


Figura 23 - Cromatograma de HPLC do erisotrina (1); Condição de eluição descrita no sub item 4.1.3 (página 61)

Este alcaloide apresentou-se de difícil purificação, sendo observado através de CCD que pouco tempo após o processo purificação ele apresentava-se impuro novamente, demonstrando assim uma grande instabilidade do composto erisotrina (1) nas condições ambientes. Não existem relatos na literatura sobre a ocorrência de degradação deste,

entretanto, no decorrer deste trabalho este fato foi constatado diversas vezes, tanto pela mudança de cor do metabólito isolado (passando de amarelo claro para amarelo escuro), como pelo surgimento de várias manchas inexistentes antes da purificação nas análises realizadas por CCD. Vale ressaltar que, uma vez observada esta instabilidade do alcaloide **1**, várias medidas (conservação a baixa temperatura e sob abrigo da luz) para evitar sua degradação foram tomadas, mas isso não evitou totalmente o processo de sua degradação, o que pode ter causado alguma interferência nos ensaios a que ele foi submetido.

A Figura 24 mostra o espectro de massa ESI (+) do alcaloide **1**, onde é possível observar sua fragmentação e a presença de um íon molecular com relação m/z 314,17 referente a $[M + H]$, sugerindo a fórmula molecular $C_{19}H_{23}O_3N$.

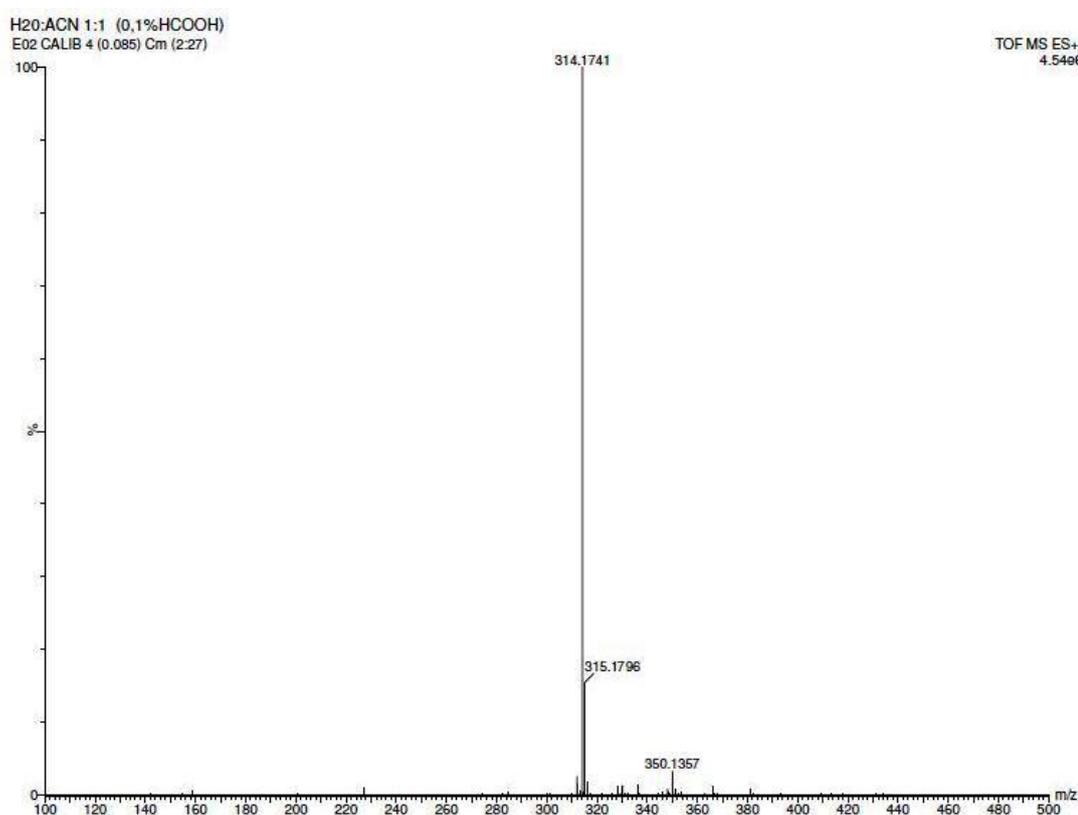


Figura 24 - Espectro de massa ESI (+) do erisotrina (**1**)

No espectro de RMN 1H (Figura 25) é possível visualizar os sinais referentes aos hidrogênios que compõem a molécula do alcaloide **1**.

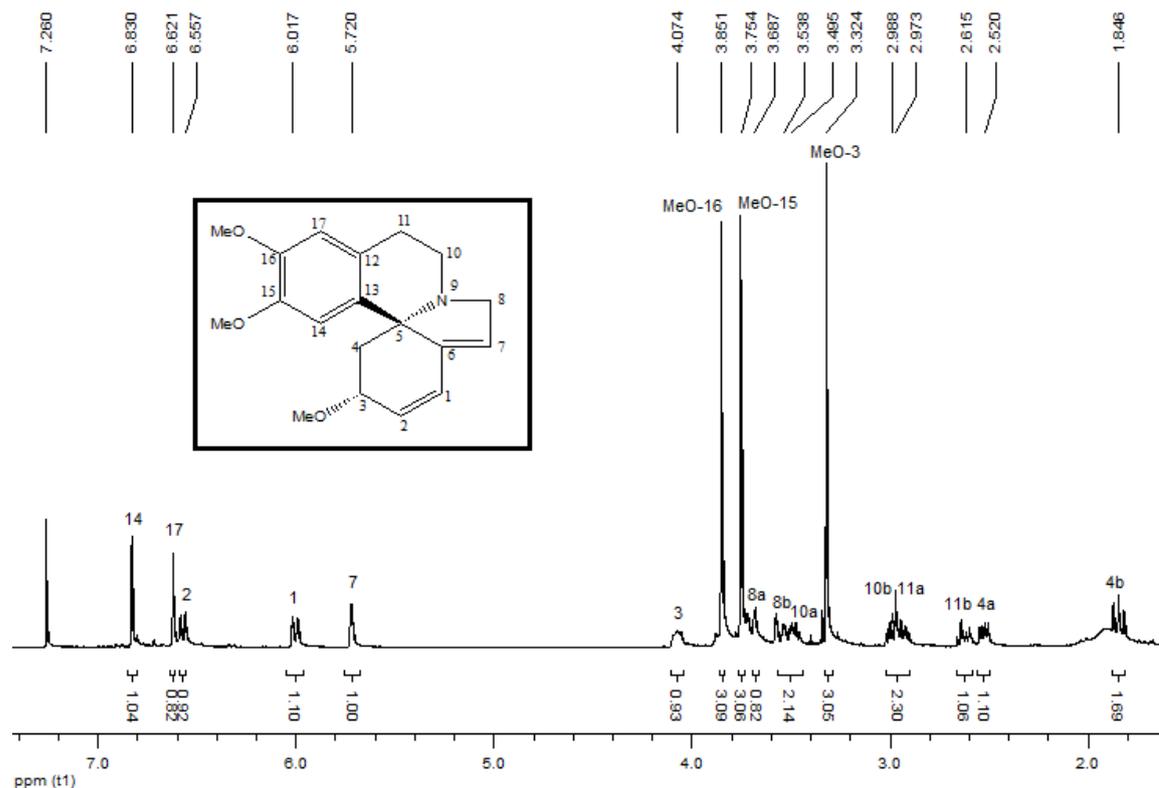


Figura 25 - Espectro de RMN de ¹H do eristrina (**1**) em CDCl₃ a 400 MHz

Para uma melhor visualização da multiplicidade de cada hidrogênio, foram realizadas algumas expansões do espectro mostrado anteriormente. Na Figura 26, a expansão da região entre 5,70-6,83 ppm, observa-se os hidrogênios olefínicos, um dubleto a 6,01 ppm ($J= 10,2$ Hz) do H-1 e um duplo dubleto a 6,55 ppm correspondente ao H-2 ($J= 2,0$ e $10,2$ Hz), bem como a 5,72 ppm um sinal alargado do H-7. Estes sinais são característicos do sistema diêno inserido entre os átomos 2 e 7, usual dos alcaloides eritrínicos. Em 6,83 e 6,62 ppm são observados dois singletos, cada um com integração correspondente a um hidrogênio, referentes aos hidrogênios H-14 e H-17 respectivamente, do anel aromático presente na estrutura do metabólito **1**.

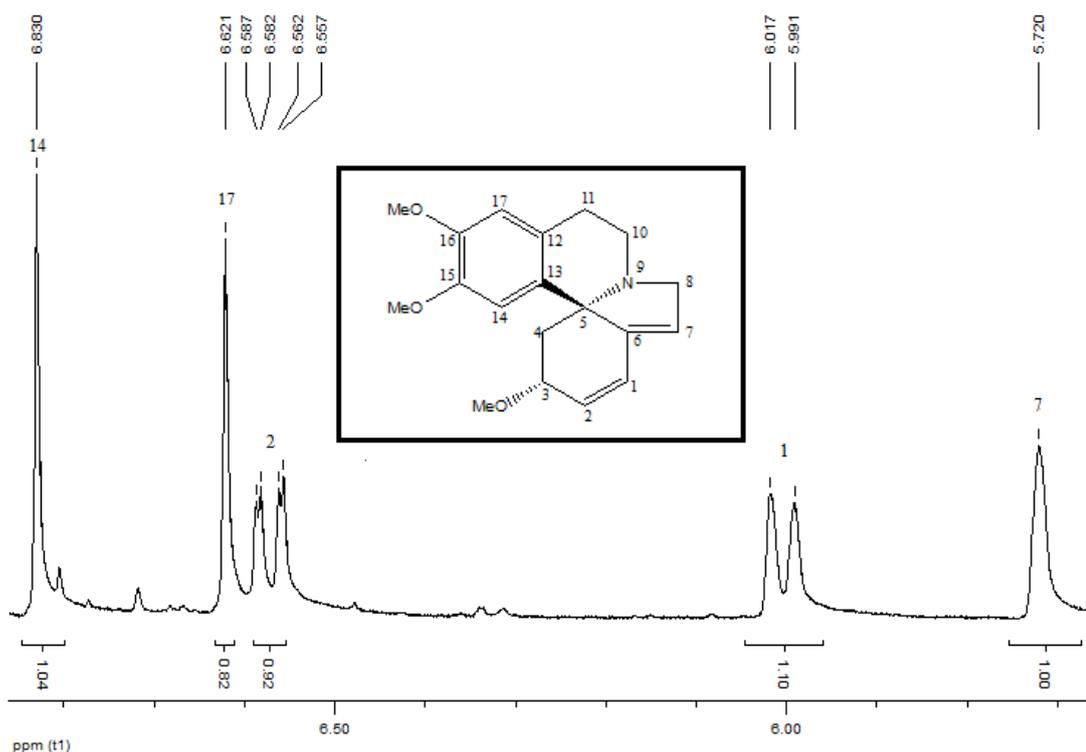


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 5,70-6,83 ppm, do erisotrina (**1**) a 400 MHz

A expansão da região de 3,20-4,90 ppm (Figura 27) mostra a presença de três singletos com integração relativa a três hidrogênios, cada um indicando a presença de três metoxilas: a 3,32 ppm observa-se a presença de um sinal dos hidrogênios da metoxila mais blindada ligada ao C-3 e em 3,85 e 3,75 ppm os sinais dos hidrogênios das metoxilas ligadas a átomos de carbono do anel aromático, C-16 e C-15 respectivamente. Um sinal de próton metínico (H-3) é observado na forma de multipletto em 4,07 ppm devido ao acoplamento com o H-2 e com os hidrogênios diastereotópicos do C-4. Em 3,68 e 3,53 ppm os sinais referentes ao H-8a (d; $J = 2,8$ Hz) e H-8b (m), assim como um multipletto com deslocamento químico de 3,49 correspondente ao H-10a;

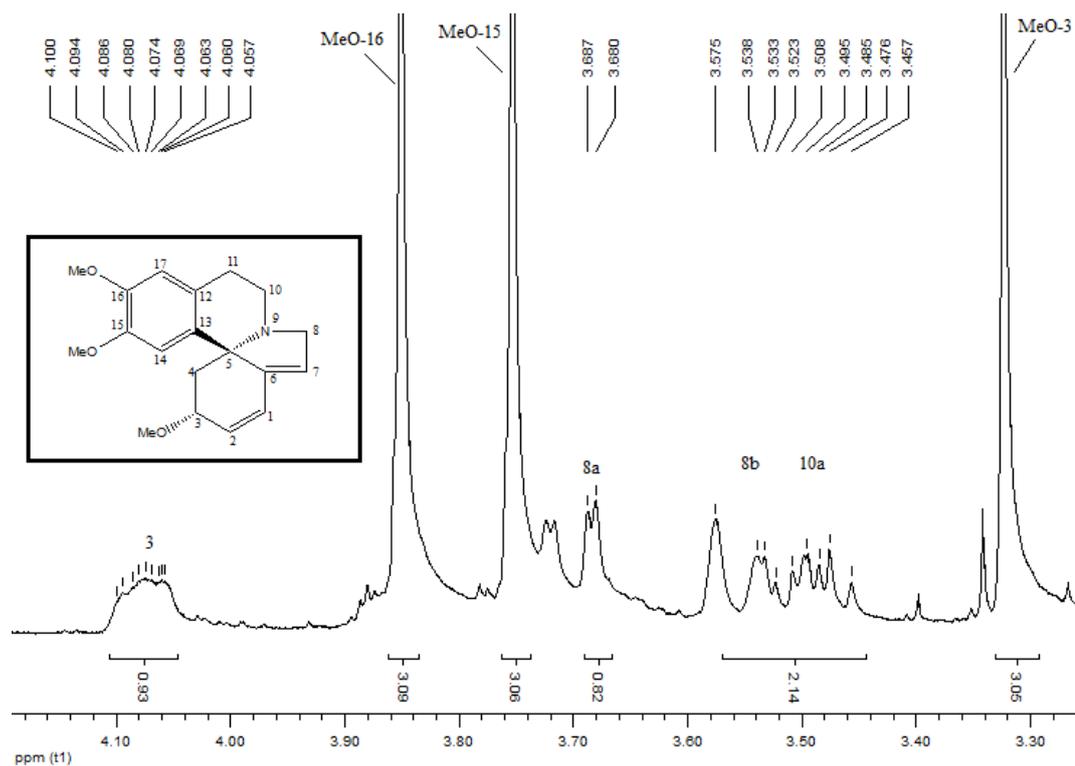


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 3,20-4,90 ppm, do erisotrina (**1**) a 400 MHz

Na Figura 28, expansão da região entre 1,80-3,13 ppm, pode-se visualizar os sinais dos hidrogênios diastereotópicos do C-4 localizados a 2,52 ppm (dd; $J= 5,6$ e $11,2$ Hz; Ha) e 1,84 ppm (dd; $J= 11,0$ e $11,2$ Hz; Hb). Enquanto que em 2,98, 2,97 e 2,61 ppm são visualizados os multipletos referentes aos hidrogênios diastereotópicos H-10b e H-11a,b respectivamente.

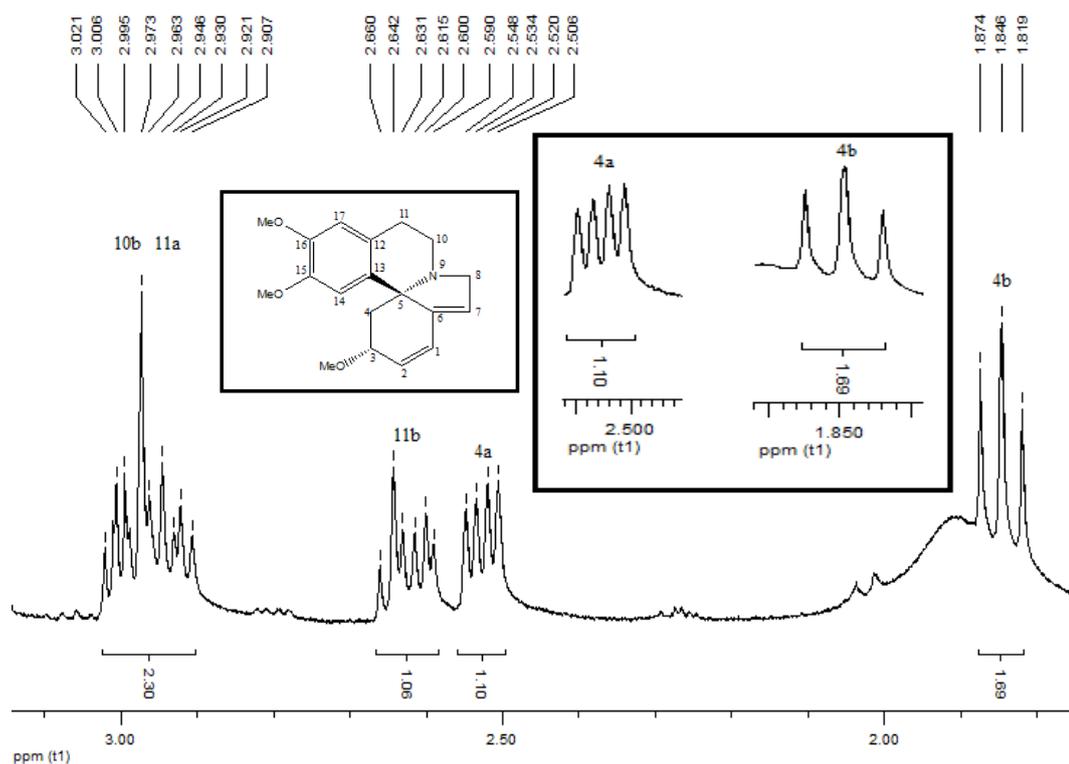


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 1,80-3,15 ppm, do erisotrina (**1**) a 400 MHz

Através da expansão do espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H (Figuras 29 e 30) foi possível a confirmação das atribuições feitas anteriormente, de forma que pode-se visualizar os acoplamentos entre os hidrogênios dos diferentes sistemas de spin. Na Figura 29 observam-se as correlações entre os hidrogênios H-1 e H-2, entre H-2 e H-3 e este por sua vez, na expansão deste espectro (Figura 30) acoplando com os hidrogênios diastereotópicos H-4a e H-4b, completando assim o primeiro sistema de spins. O segundo sistema de spins pode ser observado pela correlação estabelecida entre o H-7 com os hidrogênios diastereotópicos H-8a e H-8b (Figura 29). O espectro expandido de COSY ^1H - ^1H (Figura 30) mostra ainda as correlações do terceiro e último sistema de spins referentes aos acoplamentos entre os hidrogênios diastereotópicos H-10a,b e H-11a,b.

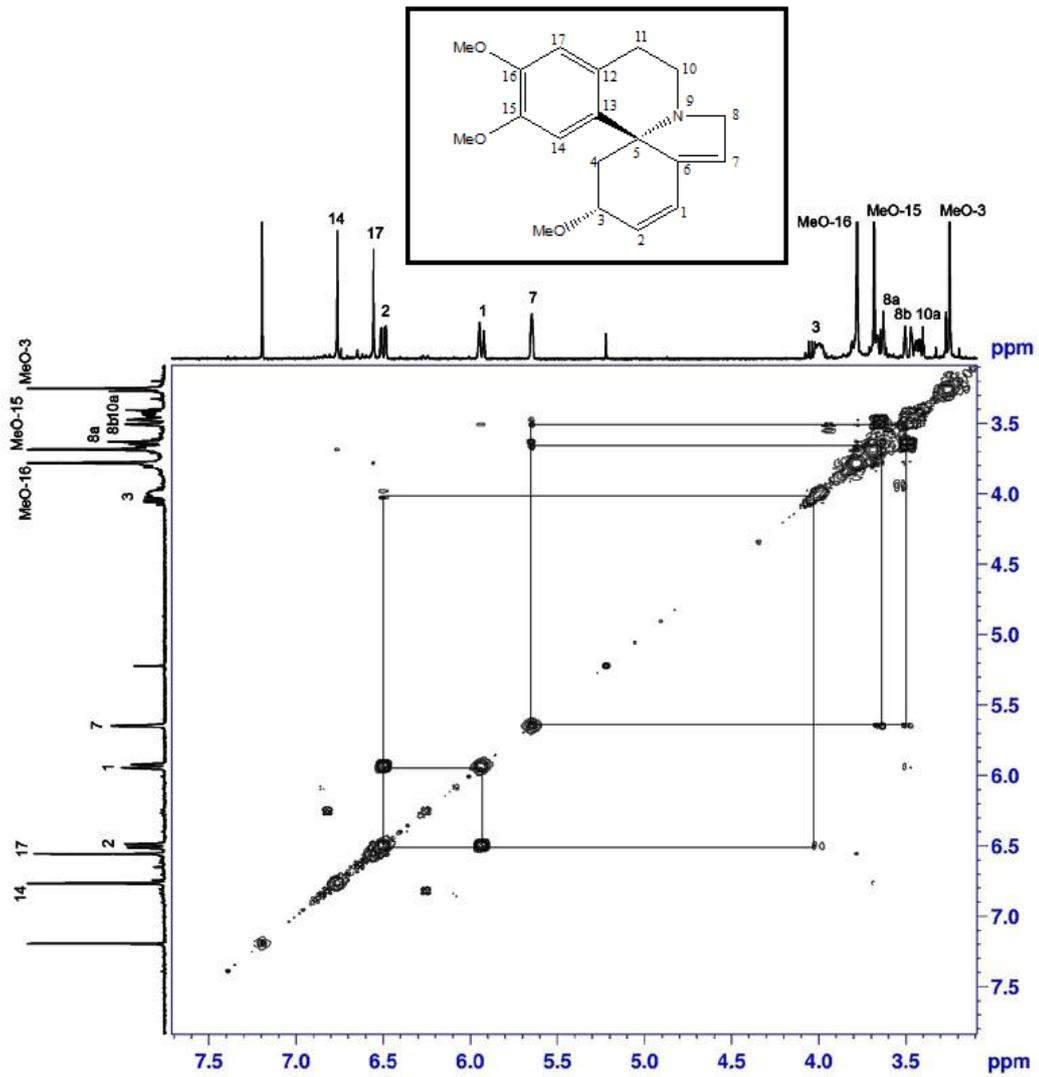


Figura 29 - Espectro expandido de RMN 2D COSY, região entre δ 3,5-7,5 ppm, do erisotrina (1) em CDCl₃ a 400 MHz

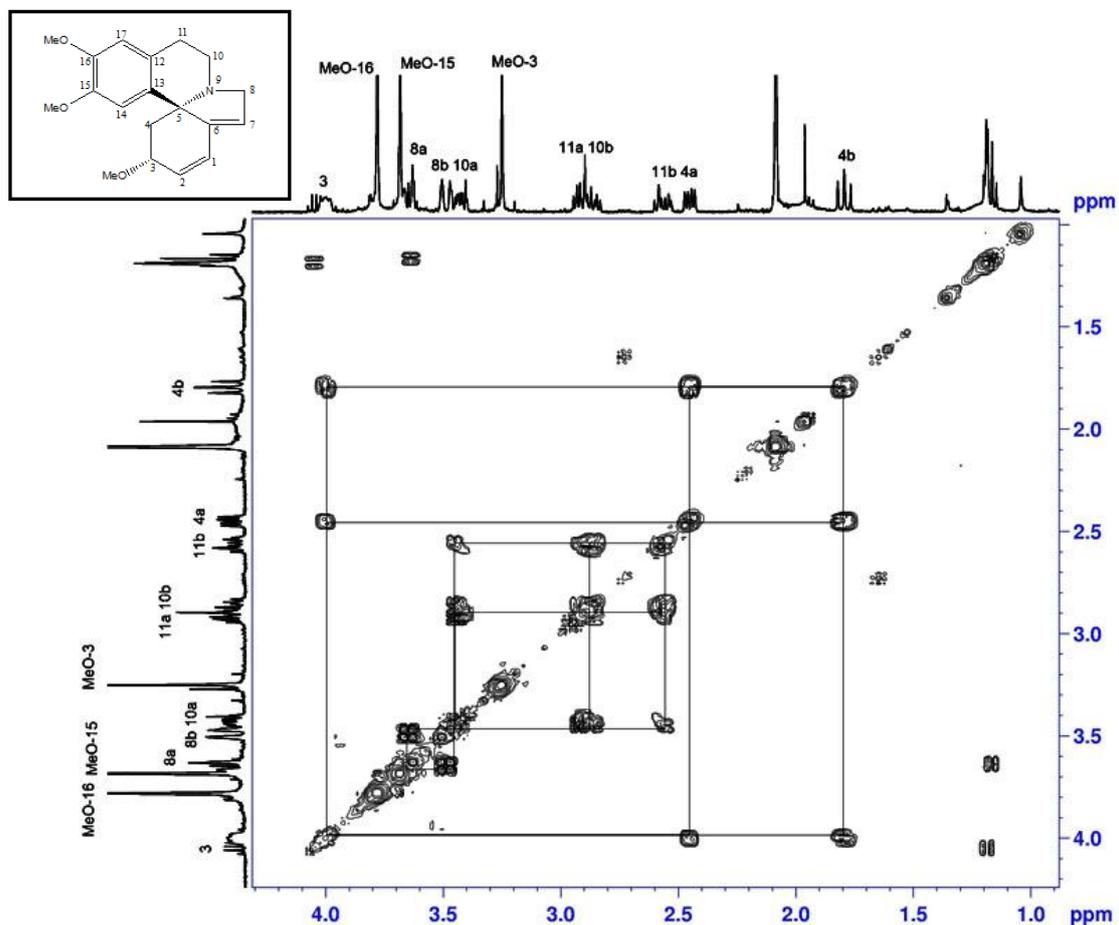


Figura 30 - Espectro expandido de RMN 2D COSY, região entre δ 1,0-4,0 ppm, do erisotrina (**1**) em CDCl_3 a 400 MHz

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31) são observados 18 sinais, sendo que em 55,76 ppm é possível notar a sobreposição de dois sinais referentes aos carbonos das metoxilas ligadas a C-16 e C-15, confirmando assim a presença total de 19 carbonos na estrutura do metabólito **1**.

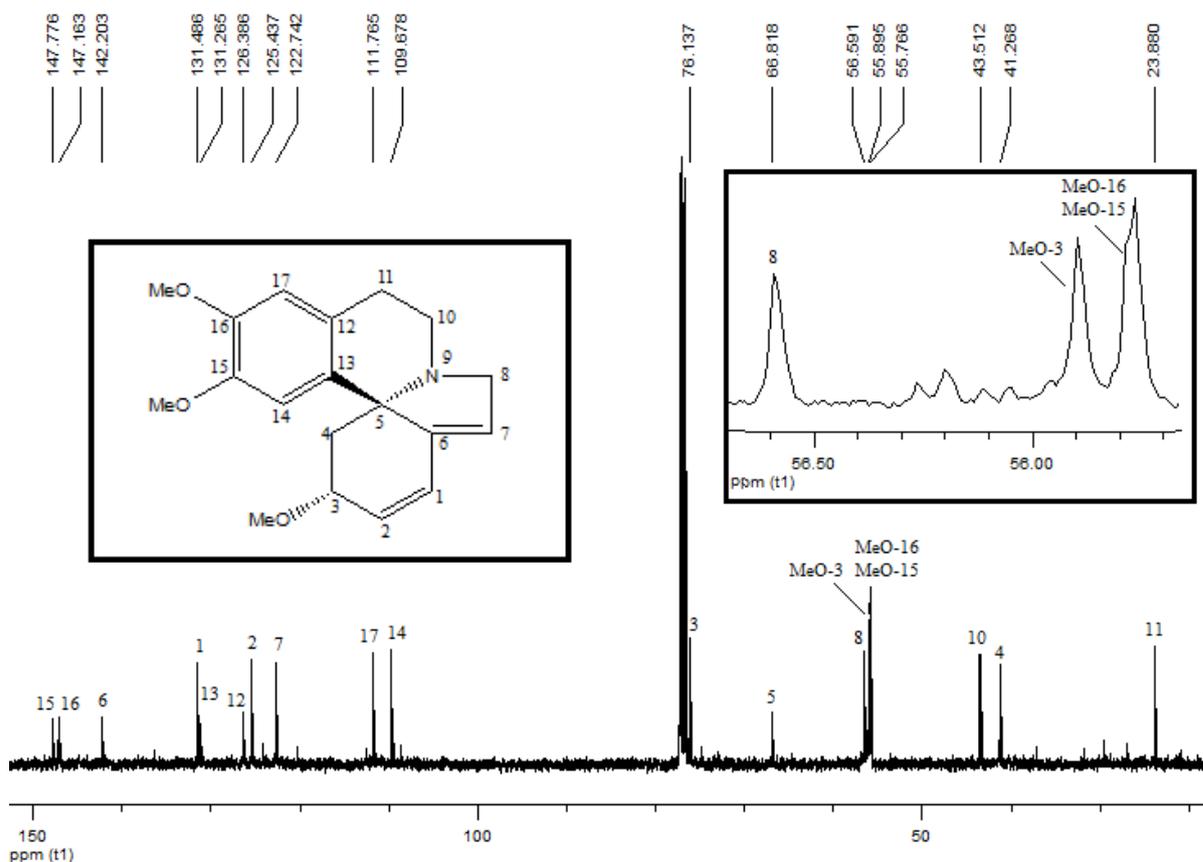


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C do erisotrina (**1**) em CDCl_3 a 100 MHz

A análise do espectro de DEPT 135° , mostrado na Figura 32, confirma a presença de quatro sinais de amplitude negativa, referentes aos carbonos metilênicos C-11, C-4, C-10 e C-8, além de sinais com amplitude positiva correspondentes aos carbonos metínicos e metílicos. Pode-se verificar também a ausência dos seis sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C a 147,77 (C-15), 147,16 (C-16), 142,20 (C-6), 131,26 (C-13), 126,38 (C-12) e 66,81 ppm (C-5), sinais característicos de carbonos desidrogenados (quaternários), conforme é proposto na estrutura do composto **1**.

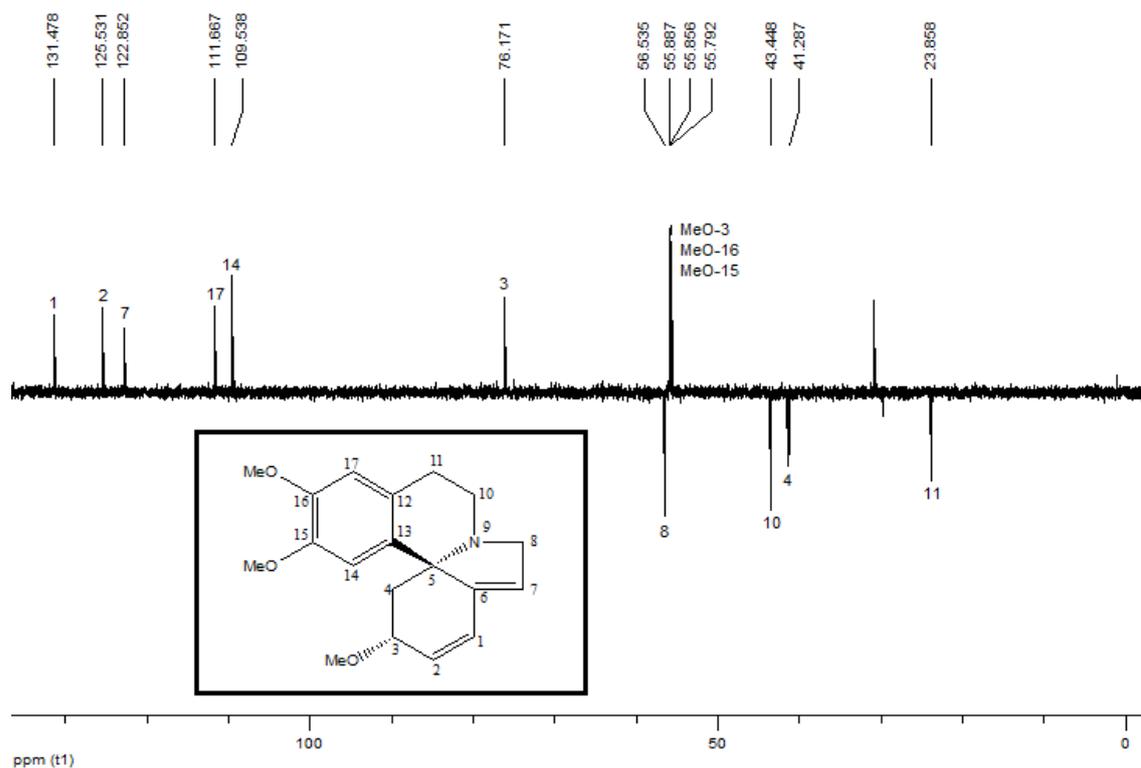


Figura 32 - Espectro de DEPT 135° do erisotrina (1) em CDCl₃ a 100 MHz

O espectro bidimensional de RMN HSQC $^1J_{H-C}$ (Figura 33) mostra a correlação de cada hidrogênio ligado diretamente ao seu carbono, sendo a análise deste espectro muito importante principalmente para a atribuição de hidrogênios diastereotópicos. Uma expansão da região espectral localizada entre 1,2-4,0 ppm (Figura 34) mostra as principais correlações existentes referentes aos hidrogênios diastereotópicos presentes na estrutura proposta.

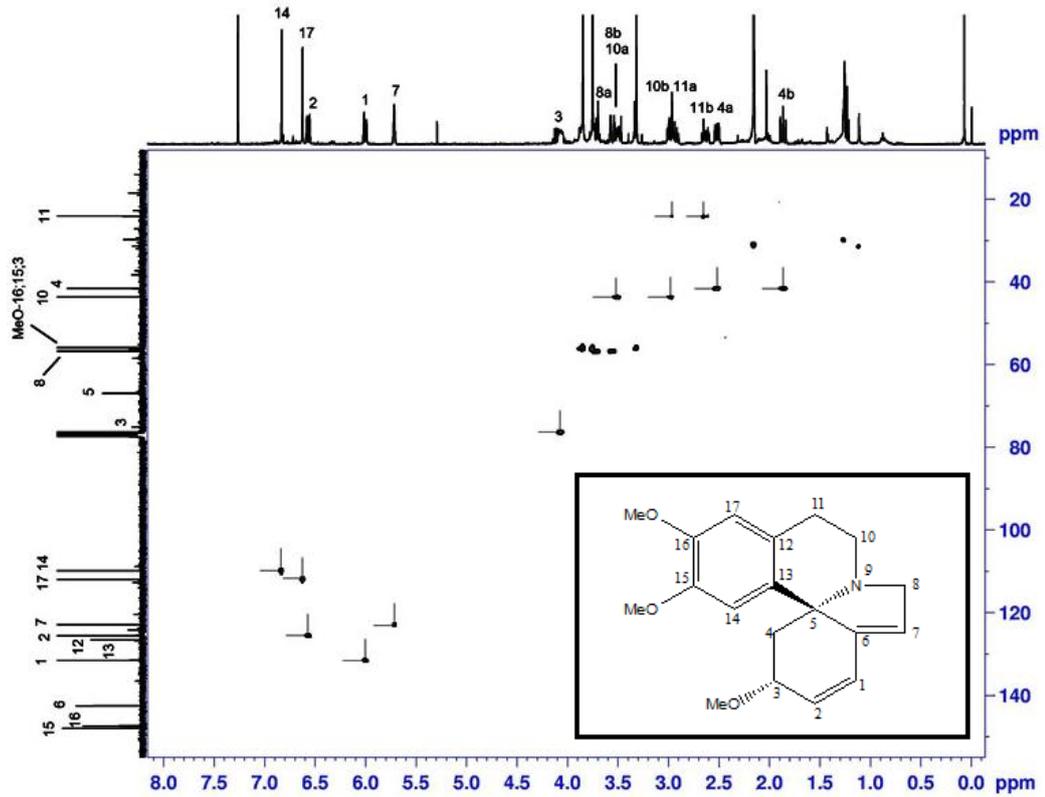


Figura 33 - Espectro de RMN 2D HSQC do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz

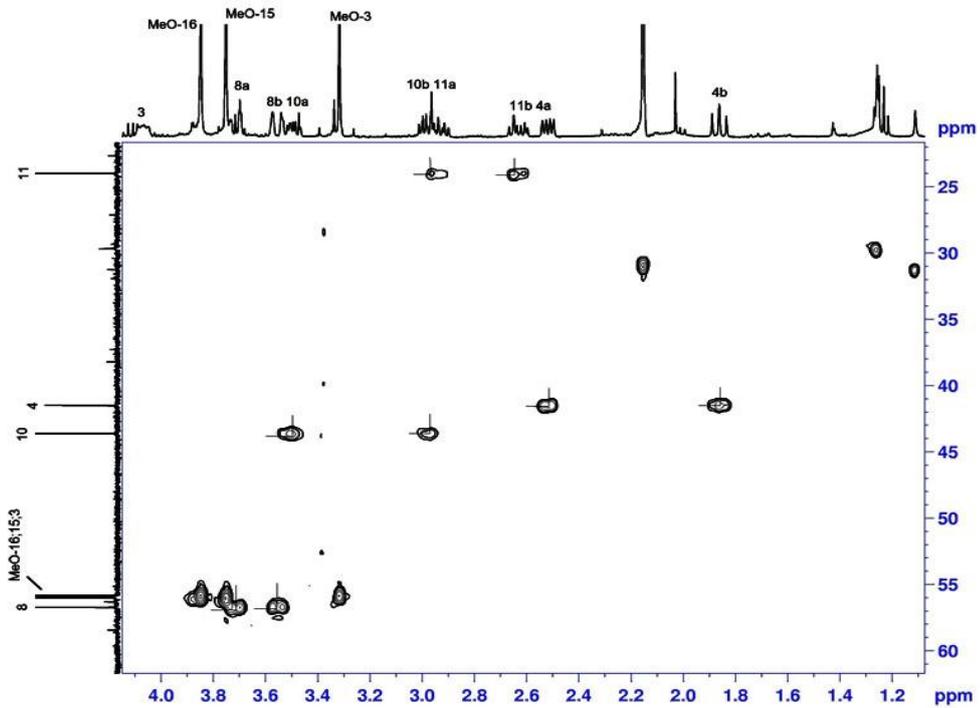


Figura 34 - Espectro expandido de RMN 2D HSQC, região entre δ 1,2-4,0 ppm, do erisotrina (1) em CDCl_3 a 400 MHz

Na Tabela 9 são apresentados os dados espectroscópicos obtidos para o metabólito **1** e os dados espectroscópicos existentes na literatura deste composto, para fins de comparação.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (400,13 MHz) e ^{13}C (100,62 MHz) do erisotrina (**1**) em CDCl_3

Posição	δ ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ $^1\text{H}^*$ (ppm); <i>J</i> (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	δ $^{13}\text{C}^{**}$ (ppm)
1	6,01 (d; 10,2)	6,05 (d; 10,0)	131,48	124,90
2	6,55 (dd; 2,0 e 10,2)	6,58 (dd; 1,8 e 10,0)	125,43	132,00
3	4,07 (m)	4,08 (m)	76,13	75,60
4	2,52 (dd; 5,6 e 11,2; Ha) 1,84 (dd; 11,2 e 11,0; Hb)	2,54 (dd; 5,6 e 11,5; Ha) 1,89 (t; 11,5; Hb)	41,26	40,20
5	-	-	66,81	67,80
6	-	-	142,20	141,50
7	5,72 (br s)	5,73 (s)	122,74	121,60
8	3,68 (d; 2,8; Ha) 3,53 (m; Hb)	3,90-3,70 (m) 3,56 (d; 14,8)	56,59	56,60
9	-	-	-	-
10	3,49 (m; Ha) 2,98 (m; Hb)	3,51 (m; Ha) 3,01 (m; Hb)	43,51	43,70
11	2,97 (m; Ha) 2,61 (m; Hb)	2,95 (m; Ha) 2,65 (d; 15,4; Hb)	23,88	23,80
12	-	-	126,38	125,60
13	-	-	131,26	129,60
14	6,83 (s)	6,82 (s)	109,67	109,20
15	-	-	147,16	147,20
16	-	-	147,77	147,90
17	6,62 (s)	6,63 (s)	111,76	111,4
OCH₃-3	3,32 (s)	3,31 (s)	55,89	55,80
OCH₃-15	3,75 (s)	3,75 (s)	55,76	55,80
OCH₃-16	3,85 (s)	3,86 (s)	55,76	55,80

δ_{H^*} (ppm) em CDCl_3 a 400 MHz conforme Faria et al. (2007)¹⁹ $\delta_{\text{C}^{**}}$ (ppm) em CDCl_3 a 25,2 MHz conforme Sarragiotto et al. (1981)¹⁷

Os dados obtidos na Tabela 9 estão de acordo com os dados encontrados na literatura, com exceção dos deslocamentos químicos referentes aos carbonos C-1 e C-2. Faria et al.¹⁹ em trabalho publicado em 2007 sugeriu uma correção na atribuições feitas por Sarragiotto et al. (1981)¹⁷ no que diz respeito a estes carbonos. De fato, o presente estudo comprova que as

atribuições dos carbonos C-1 e C-2 de Sarragiottho et al. encontram-se invertidas, uma vez que o espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H mostrou a posição correta desses átomos. A análise dos experimentos discutidos anteriormente, em conjunto com a comparação dos dados disponíveis na literatura, permitiu a elucidação da estrutura do alcaloide erisotrina (**1**).

5.2.3.2 Fração Acetato Básica (FAB)

Inicialmente a fração FAB foi submetida a uma CC e, da mesma forma que a fração anterior (FEB), verificou-se a presença de diversos alcaloides e então apenas estas frações foram priorizadas para o trabalho.

O cromatograma de HPLC (Figura 35) da fração FAB mostra a existência vários picos correspondentes as substâncias presentes nesta fração. Dentre as substâncias principais, foram isoladas em quantidades suficientes para identificação e elucidação estrutural os alcaloides erisotrina (**1**), já isolado anteriormente da fração FEB e o epieritratidina (**50**), os quais correspondem aos picos com tempos de retenção de 20,84 e 14,99 min, respectivamente.

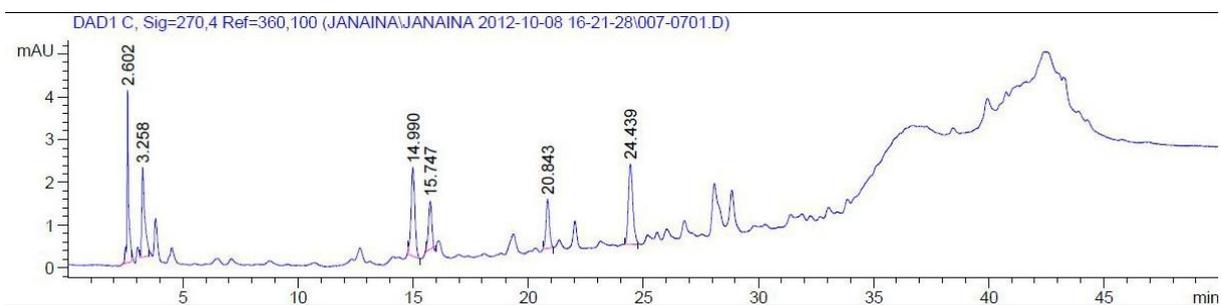


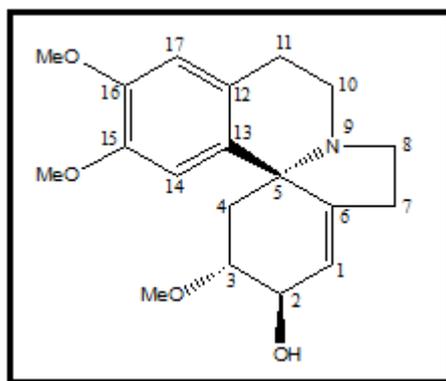
Figura 35 - Cromatograma de HPLC da fração FAB a $\lambda = 270$ nm; Condição de eluição descrita no sub item 4.1.3 (página 61)

5.2.3.2.1 Erisotrina

Alcaloide que foi isolado nas duas frações básicas, FEB e FAB, seu isolamento na fração FAB (páginas 67 e 68) e seus dados de identificação de RMN (página 71) já foram apresentados anteriormente.

5.2.3.2.2. Epieritratidina

O alcaloide alquenoide epieritratidina (**50**), de fórmula molecular $C_{19}H_{25}O_4N$, foi isolado como um sólido cristalino esbranquiçado. Sua purificação foi realizada através de CC e cristalização com éter etílico, conforme descrito na parte experimental (página 69). A estrutura deste alcaloide foi elucidada após análises ESI-MS, RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais (DEPT 135°, COSY, HSQC e NOESY).



(50)

Não há relatos disponíveis sobre as atividades farmacológicas do epieritratidina (**50**).

No cromatograma de HPLC do alcaloide (**50**) (Figura 36) após isolamento observa-se um pico principal com tempo de retenção 14,58 min, confirmando ser este um dos principais metabólitos presentes na fração FAB.

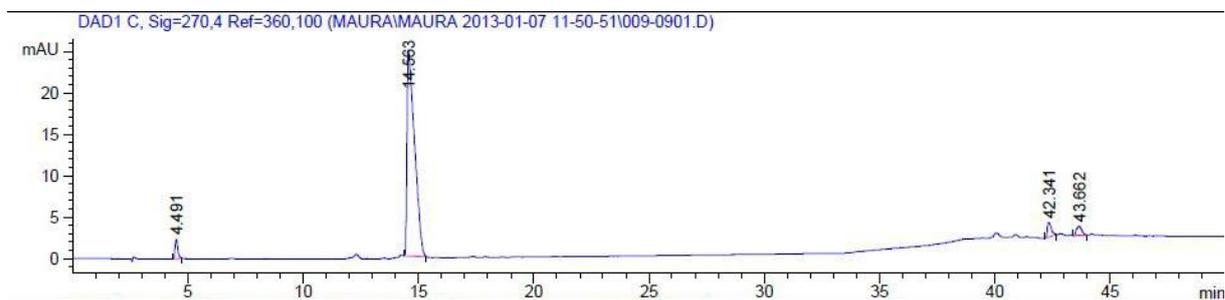


Figura 36 - Cromatograma de HPLC do epieritratidina (**50**); Condição de eluição descrita no subitem 4.1.3 (página 61)

O espectro de massa ESI (+) do alcaloide epieritratidina (**50**), conforme a Figura 37 permite a visualização da sua fragmentação e do íon molecular com relação m/z 332,16 referente a $[M + H]$, sugerindo a fórmula molecular $C_{19}H_{25}O_4N$.

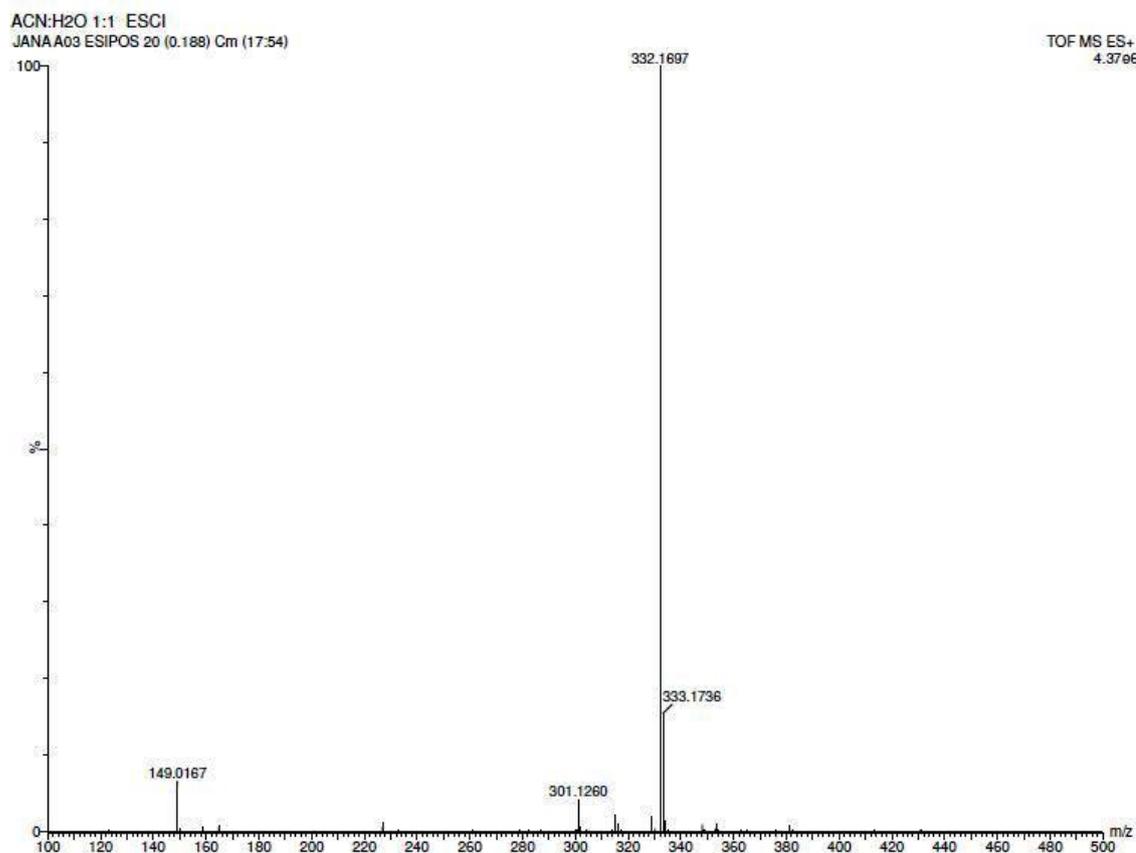


Figura 37 - Espectro de massa ESI(+) do epieritratidina (**50**)

A análise do espectro de RMN de 1H (Figura 38) possibilita a observação de um sistema alquênico característico dos alcaloides de plantas do gênero *Erythrina*.

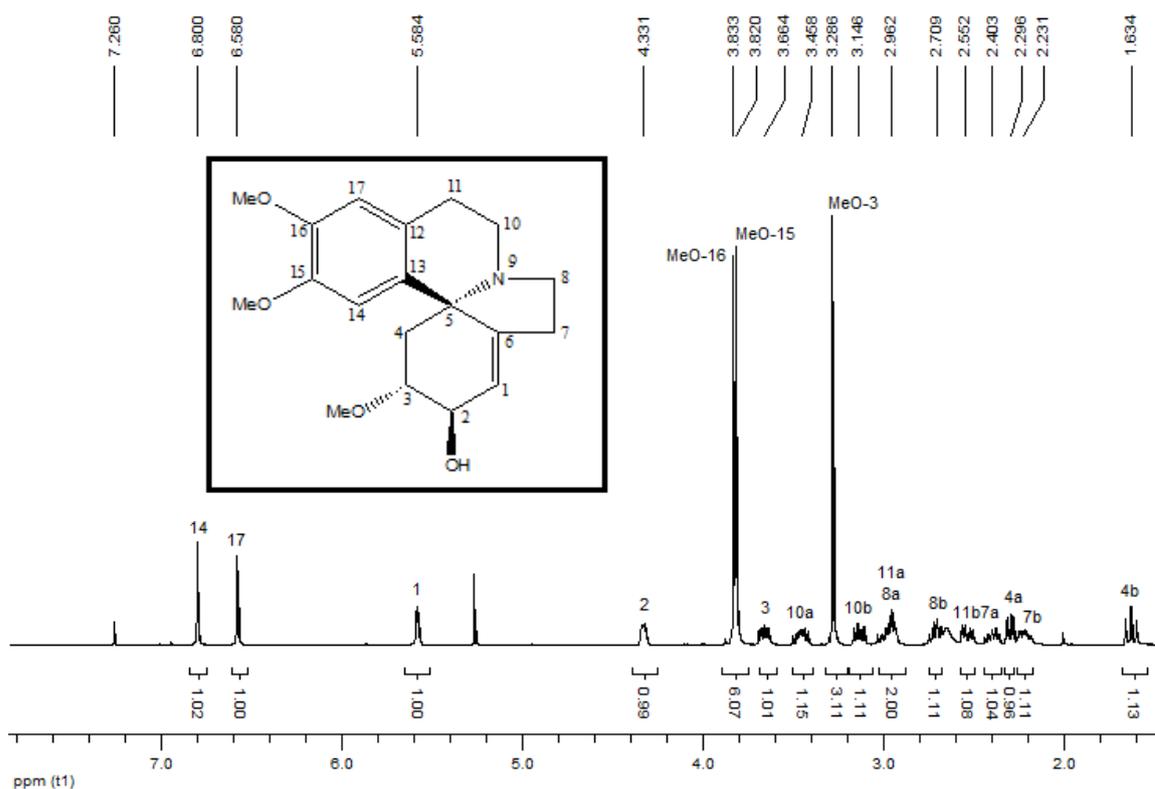


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H do epieritratidina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

Expansões realizadas com este espectro mostram claramente a multiplicidade de cada hidrogênio conforme pode ser visto nas Figura 39 e 40. A expansão da região entre 3,64-7,26 ppm (Figura 39) mostra os singletos localizados a 6,80 e 6,58 ppm referentes aos hidrogênios H-14 e H-17 ligados ao anel aromático. Em δ 5,58 ppm também observa-se um sinal que corresponde ao hidrogênio H-1 ligado a um C sp^2 , bem como um multipletto a 4,33 ppm atribuído ao hidrogênio H-2 ligado a um carbono carbinólico. O sinal do hidrogênio H-3 é observado a 3,66 ppm (ddd; $J = 4,2, 6,8$ e $12,4$ Hz). Dois sinais em forma de singletos referentes aos hidrogênios metílicos das metoxilas presentes na estrutura do epieritratidina aparecem a δ 3,83 e 3,82 ppm.

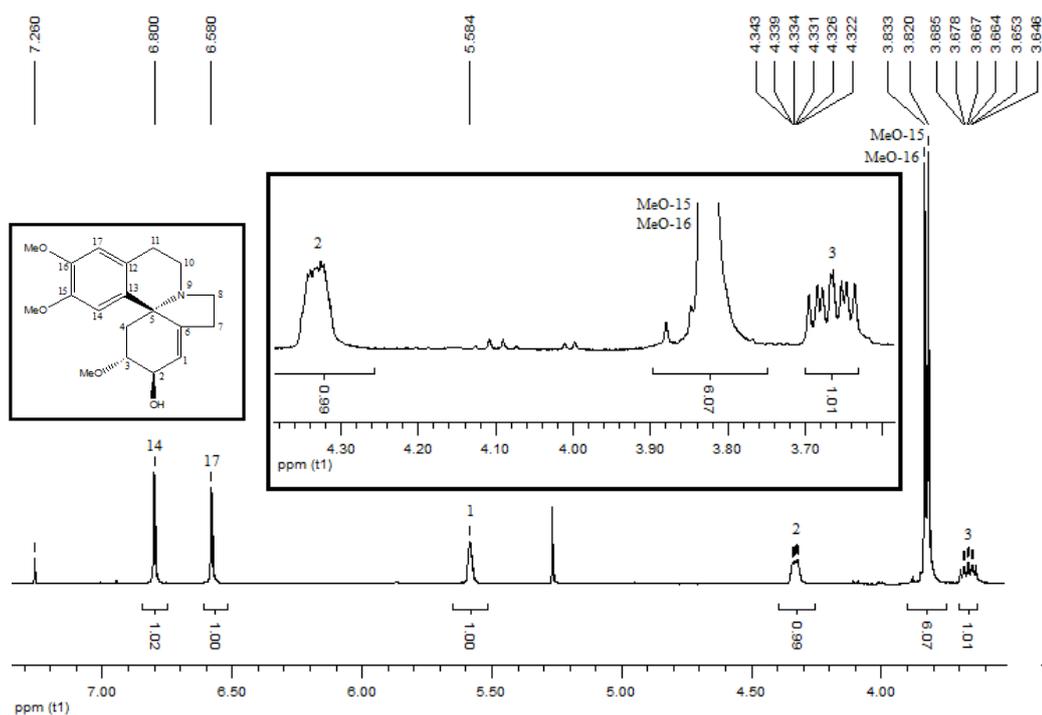


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 3,64-7,26 ppm, do epieritratidina (**50**) a 400 MHz

A Figura 40, expansão da região entre 1,00-5,50 ppm, permite a visualização de um sinal em forma de singleto com deslocamento químico de 3,28 ppm, correspondente aos hidrogênios da metoxila ligada ao C-3 e vários sinais de hidrogênios diastereotópicos, entre eles o H-10a (ddd; $J= 6,9, 11,2$ e $14,3$ Hz) em 3,45 ppm e H-10b (ddd; $J= 1,0, 7,6$ e $14,3$ Hz) em 3,14 ppm, H-4a δ 2,29 (dd; $J= 4,2$ e $12,4$ Hz) e H-4b δ 1,63 (t; $J= 12,4$ Hz), assim como o restante dos sinais referentes aos outros grupos metilênicos. Entre estes últimos é possível observar um sinal a 2,96 ppm na forma de multipletto que corresponde a sobreposição dos sinais do H-11a e H-8a.

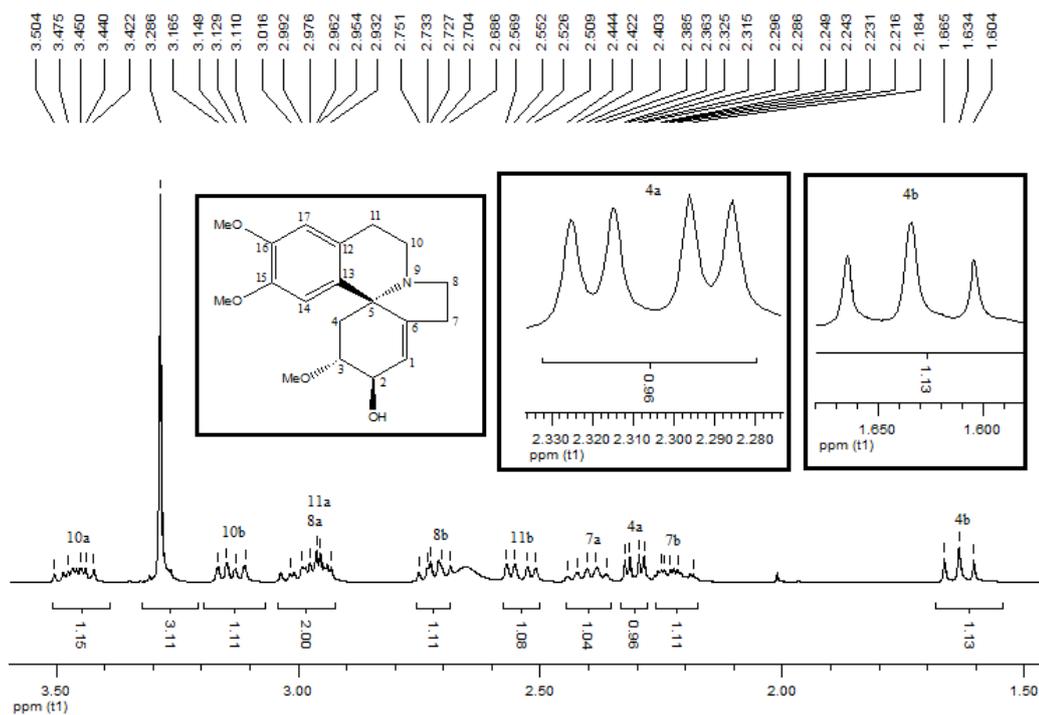


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H expandido, região entre δ 1,00-5,50 ppm, do epieritratidina (**50**) a 400 MHz

O espectro homonuclear bidimensional COSY ^1H - ^1H (Figura 41) mostra as proximidades dos núcleos, confirmando as posições dos hidrogênios atribuídos para o epieritratidina (**50**). A expansão da região entre 1,6-4,4 ppm deste mesmo espectro (Figura 42) apresenta claramente o acoplamento entre os hidrogênios do alcaloide **50**.

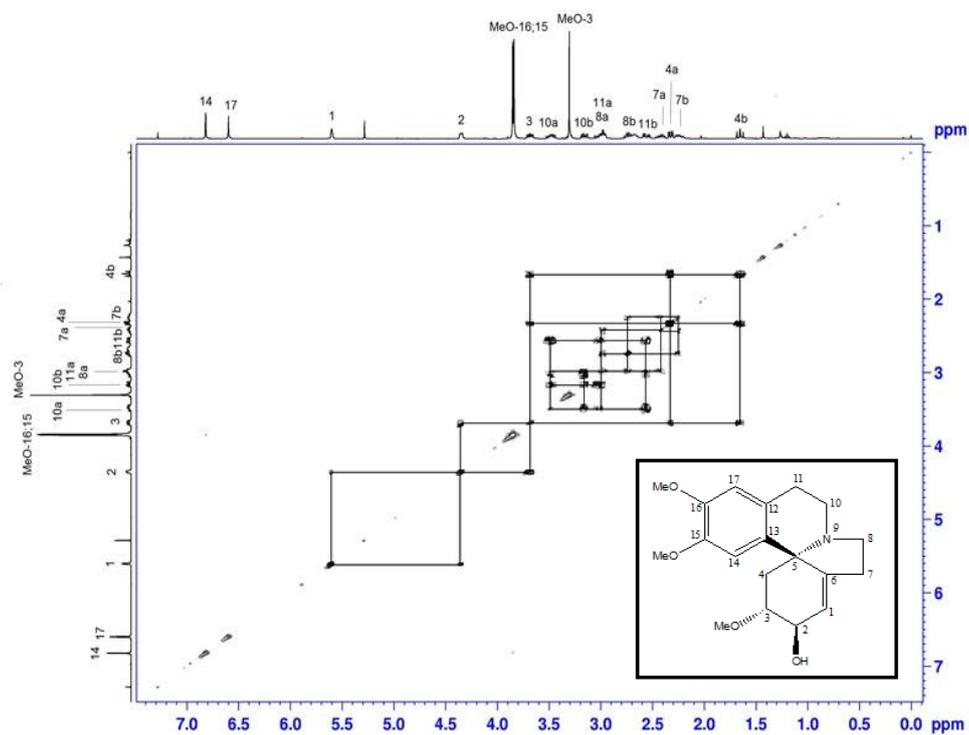


Figura 41 - Espectro de RMN 2D COSY do epieritradina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

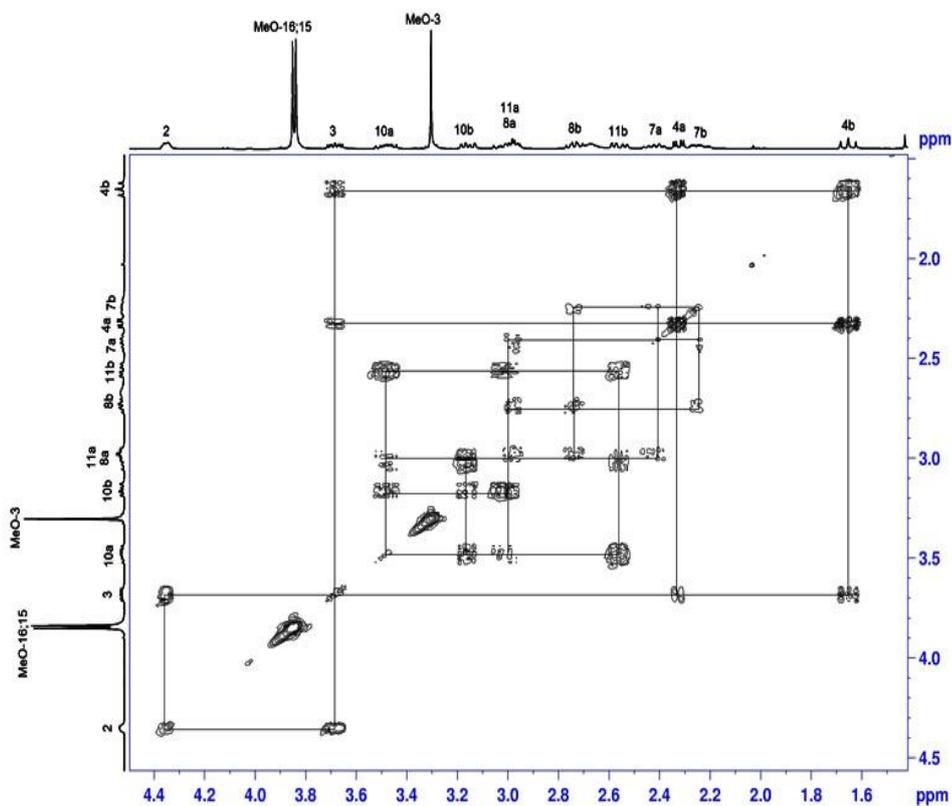


Figura 42 - Espectro expandido de RMN 2D COSY, região entre δ 1,6-4,4 ppm, do epieritradina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado, conforme observado na Figura 43, apresenta 19 sinais referentes aos carbonos do epieritratidina (**50**). Através deste espectro é possível observar os carbonos desidrogenados (C-16, C-15, C-6, C-12, C-13 e C-5), além das metoxilas em δ 56,83 (C-3), 56,13 (C-16) e 55,82 ppm (C-15). O restante dos sinais correspondem aos grupos metilênicos presentes na estrutura do metabólito **50**.

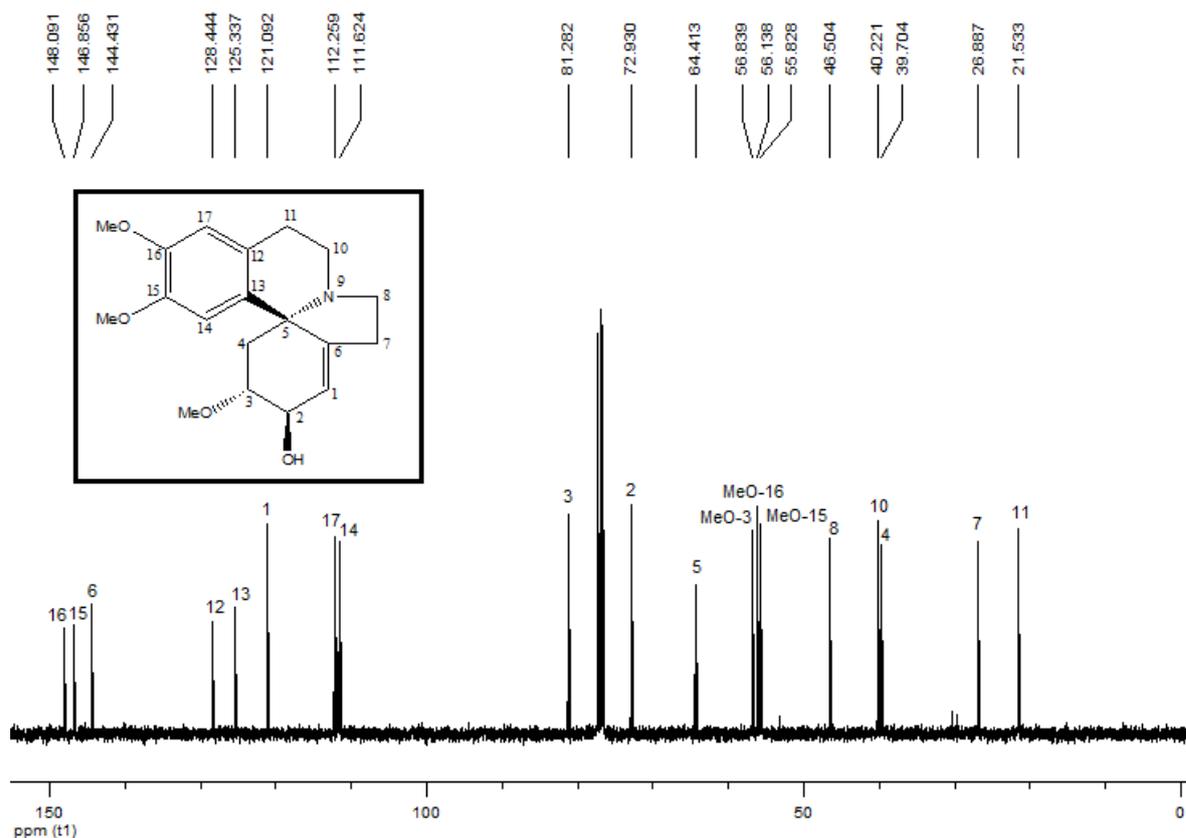


Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C do epieritratidina (**50**) em CDCl_3 a 100 MHz

O espectro de DEPT 135° (Figura 44) mostra a presença de cinco sinais correspondentes a cinco carbonos metilênicos com amplitude negativa, além de carbonos metínicos e metílicos. O desaparecimento no espectro de DEPT 135° de seis dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C indica a presença de seis carbonos desidrogenados, estando assim os dados analisados em concordância com a estrutura proposta.

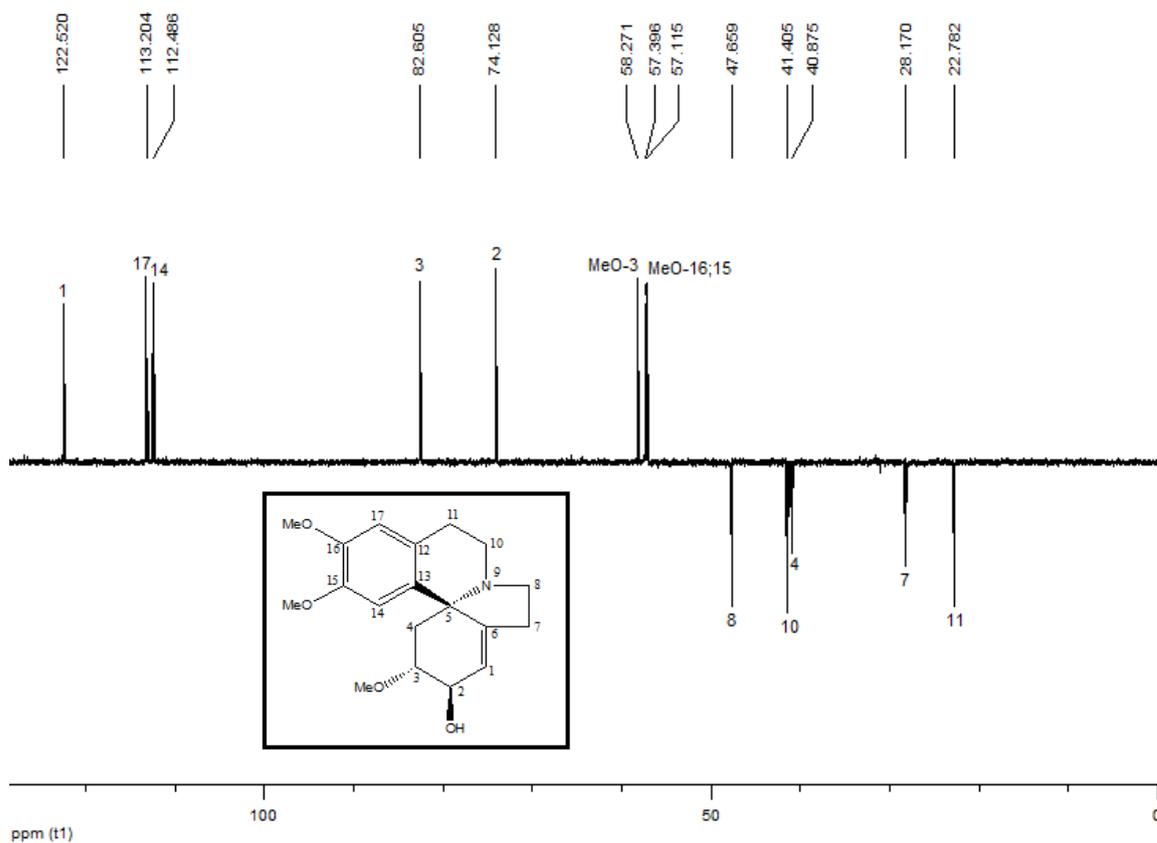


Figura 44 - Espectro DEPT 135° do epieritratidina (**50**) em CDCl₃ a 100 MHz

No espectro de RMN bidimensional heteronuclear HSQC $^1J_{H-C}$ (Figura 45) são observadas as correlações apresentadas entre cada hidrogênio e seu respectivo carbono, além da distinção entre carbonos não hidrogenados e hidrogenados. A expansão deste espectro na região entre 1,6-4,6 ppm (Figura 46) permite uma melhor visualização das correlações C-H para a estrutura do alquenoide **50**.

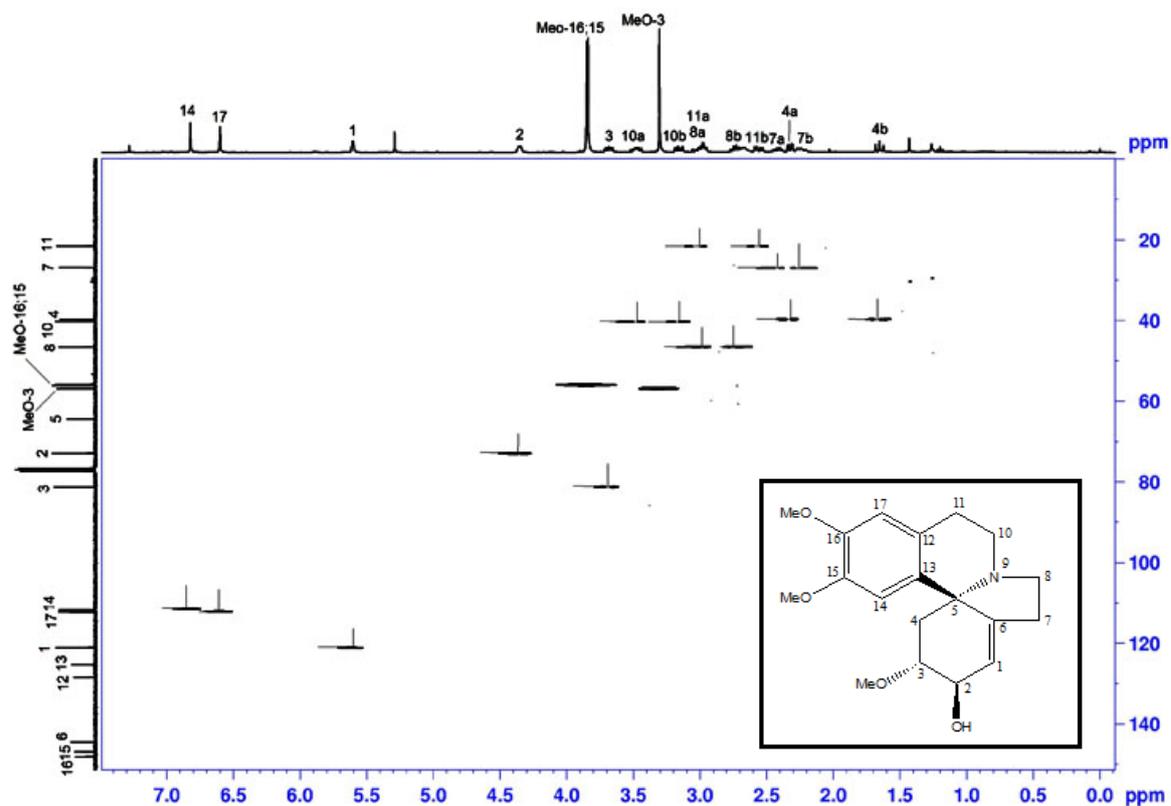


Figura 45 - Espectro de RMN 2D HSQC do epierritridina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

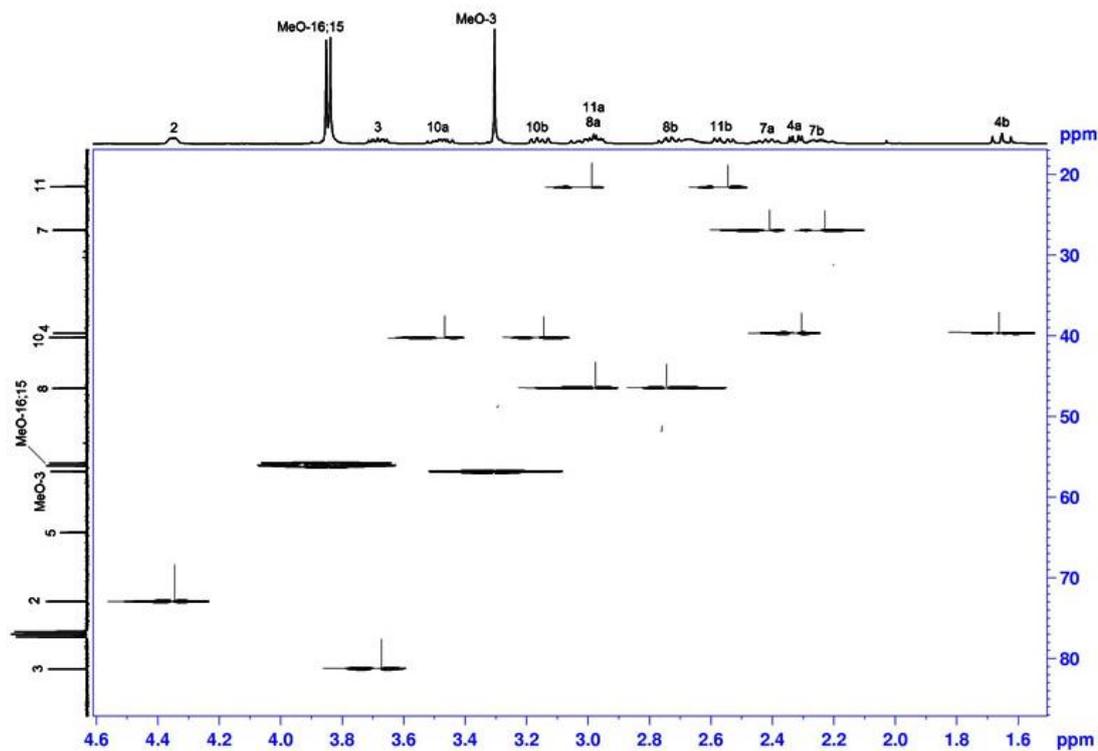


Figura 46 - Espectro expandido de RMN 2D HSQC, região entre δ 1,6-4,6 ppm, do epierritridina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

No espectro de RMN 2D NOESY (Figura 47) pode-se observar principalmente as interações espaciais homonucleares ^1H - ^1H . O experimento de RMN NOESY do epieritratidina (**50**) foi realizado com o propósito de se obter informações importantes a respeito das interações dos hidrogênios ligados aos carbonos quirais C-2 e C-3. A análise dos espectros NOESY das Figuras 47 e 48 permitiram assim definir a configuração destes carbonos e, por conseguinte, finalizar a análise confirmando que o metabólito isolado trata-se do epieritratidina (**50**), cuja estereoquímica do C-2 é R, e não seu epímero eritratidina (**29**), onde o C-2 tem configuração absoluta S. Para realizar-se a análise do espectro de RMN NOESY ^1H - ^1H utilizou-se como ponto de partida o sinal do hidrogênio H-1, que apresenta correlação com H-2. Este hidrogênio H-2, por sua vez, mostra correlação espacial somente com H-1, não se observando correlação com H-3, o que indica uma relação *trans* entre H-2 e H-3. A configuração R do carbono C-3 foi confirmada pela forte correlação espacial observada entre H-3 e o hidrogênio aromático H-14, indicando que estes hidrogênios encontram-se muito próximos no espaço. As demais correlações importantes podem ser observadas no espectro NOESY ^1H - ^1H , Figura 47.

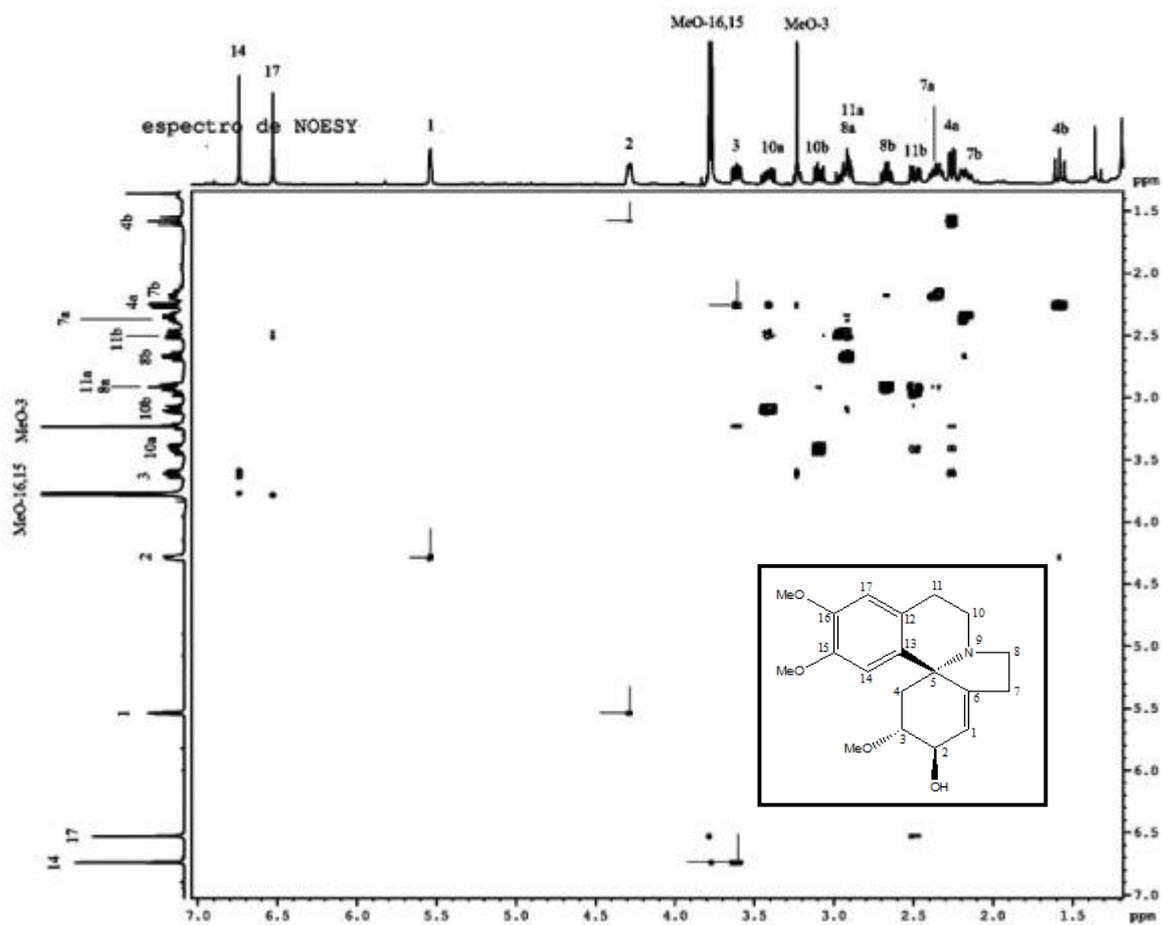


Figura 47 - Espectro de RMN 2D NOESY do epierritridina (**50**) em CDCl_3 a 400 MHz

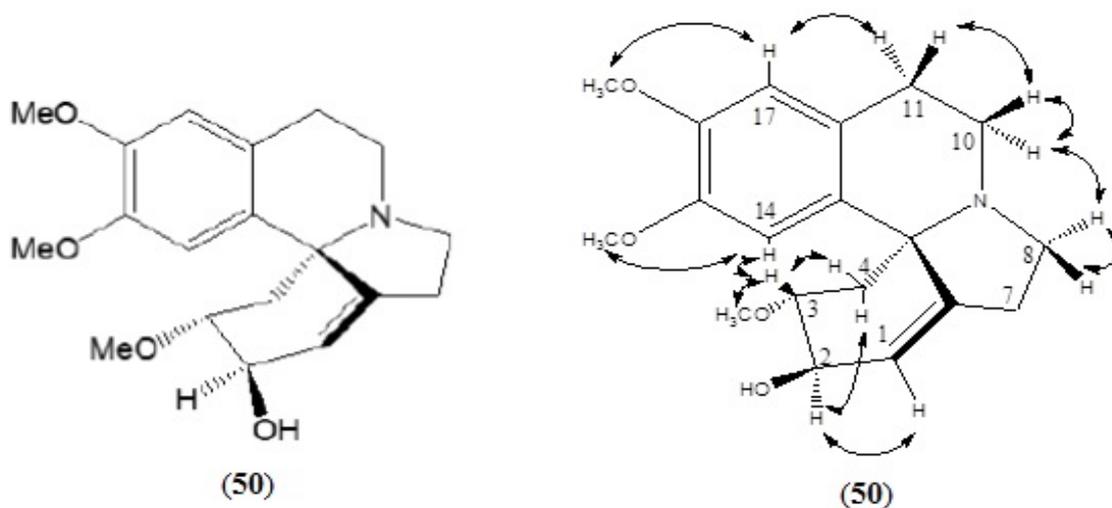


Figura 48 - Estrutura da epierritridina (**50**)¹⁶⁴ e interações espaciais ^1H - ^1H observadas no espectro de RMN 2D NOESY do alquenoide **50**

Na Tabela 10 são descritos os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para o epieritratidina (**50**) em comparação com dados disponíveis na literatura.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (400,13 MHz) e ^{13}C (100,62 MHz) do epieritratidina (**50**) em CDCl_3

Posição	δ ^1H (ppm); J (Hz)	δ $^1\text{H}^*$ (ppm); J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	δ $^{13}\text{C}^*$ (ppm)
1	5,58 (m)	5,80 (s)	121,09	125,3
2	4,33 (m)	4,20 (m)	72,93	71,36
3	3,66 (ddd; 4,2, 6,8 e 12,4)	3,60 (4,3 e 12,0)	81,28	80,17
4	2,29 (dd; 4,2 e 12,4; Ha) 1,63 (t; 12,4; Hb)	2,40 (dd; 4,0 e 12,0; Ha) 1,75 (t; 12,0; Hb)	39,70	37,76
5	-	-	64,41	66,99
6	-	-	144,43	139,3
7	2,40 (m; Ha) 2,23 (m; Hb)	2,54 (m; Ha) 2,36 (m; Hb)	26,88	25,60
8	2,96 (m; Ha) 2,70 (m; Hb)	3,26 (m; Ha) 3,07 (m; Hb)	46,50	46,74
9	-	-	-	-
10	3,45 (ddd; 6,9, 11,2 e 14,3 Ha) 3,14 (ddd; 1,0, 7,6 e 14,3; Hb)	3,67 (dd; 7,0 e 2,8; Ha) 3,36 (m; Hb)	40,22	40,09
11	2,96 (m; Ha) 2,55 (dd; 6,9 e 17,1; Hb)	3,12 (m; Ha) 2,91 (m; Hb)	21,53	20,85
12	-	-	128,44	123,80
13	-	-	125,33	124,40
14	6,80 (s)	6,80 (s)	111,62	110,80
15	-	-	146,85	147,40
16	-	-	148,09	149,40
17	6,57 (s)	6,78 (s)	112,26	112,40
OCH₃-3	3,28 (s)	3,30 (s)	56,83	56,45
OCH₃-15	3,82 (s)	3,76 (s)	55,82	55,51
OCH₃-16	3,83 (s)	3,78 (s)	56,13	55,14

δ $^1\text{H}^*$ e $^{13}\text{C}^*$ do epieritratidina (**50**) em CD_3OD a 400 MHz conforme Beltrán et al. (2012)¹⁶⁴

A comparação entre os dados de ponto de fusão e rotação óptica obtidos para o composto epieritridina (**50**) isolado neste trabalho e os dados relatados pela literatura para o mesmo composto e para seu epímero eritratidina (**29**) é mostrada na Tabela 11. Os resultados obtidos confirmam que o composto isolado no presente trabalho é alcaloide epieritratidina (**50**), uma vez que os valores apresentados se aproximam muito dos referentes a ele na literatura.

Tabela 11 - Ponto de fusão e rotação óptica do epieritratidina (**50**)

Alquenoide	PF	$[\alpha]_D$
Epieritratidina	65-67 °C	+89° (<i>c</i> 0,12, CHCl ₃)
Epieritratidina*	67-68 °C	+142° (<i>c</i> 0.14, CHCl ₃)
Erithratidina*	120- 121 °C	+258° (<i>c</i> 0.58, CHCl ₃)

*Conforme Barton et al. (1973)¹¹⁹

5.2.3.3 Fração Etérea Ácida (FEA)

A fração FEA foi inicialmente cromatografada em coluna e suas diversas frações foram analisadas e reunidas por similaridade através de CCD com o uso de lâmpada UV 254 e 365 nm e solução de anisaldeído seguida de aquecimento, resultando então em 23 frações. Considerando o pouco tempo restante para a conclusão deste trabalho, foram trabalhadas individualmente apenas algumas frações.

Assim, as frações 2 (F 13-16; 13 mg), 3 (F 17-27; 106 mg), 4 (F 28-37; 176 mg), 5 (F 38-46; 80 mg), 6 (F 47-51; 46 mg), 7 (F 52-55; 1,19 g), 8 (F 56-62; 1,65 g), 9 (F 63-65; 583 mg), 10 (F 66-84; 1,3 g), 12 (F 92-140; 1,8 g) e 16 (F 160-175; 270 mg) foram trabalhadas exaustivamente, através de sucessivas técnicas CC, CCDP, MPLC, precipitação e cristalização, buscando desta forma, o isolamento dos metabólitos presentes em cada fração. Entretanto, apesar de todas as tentativas de purificação dos metabólitos, foi possível isolar e identificar dois compostos, o estigmasterol (**70**) e lupeol (**71**), ambos isolados da fração 8 (F 56-62), conforme descrito na parte experimental (página 69)

No caso das frações citadas anteriormente, de onde não obteve-se o isolamento de compostos, durante a realização do trabalho, as quantidades finais obtidas de algumas frações ou não eram suficientes para a identificação da estrutura ou ainda apresentavam-se impuras em pequenas quantidades, não havendo como continuar os processos de purificação. O que sugere a necessidade de uma maior quantidade inicial de planta, de modo que se obtenha

maior quantidade de extrato bruto e frações, possibilitando desta forma, isolar compostos em quantidades suficientes para serem identificados. Além disso, a presença de inúmeras substâncias fluorescentes e muitos pigmentos verificados em todas as frações trabalhadas também dificultaram a purificação dos metabólitos secundários presentes na fração FEA da planta em estudo.

5.3 Ensaios biológicos farmacológicos

5.3.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Com o intuito de analisar a atividade antimicrobiana dos extratos, frações e compostos isolados da espécie *E. crista-galli* realizou-se este ensaio, através do método de microdiluição em caldo, conforme descrito na parte experimental, páginas 72 a 74, utilizando-se bactérias e fungos que fazem parte do grupo das infecções oportunistas, frequentemente encontrados em pacientes cujo sistema imunológico apresenta baixa resistência.

Foram medidas a CIM, ou seja, menor concentração testada de uma substância capaz de inibir o crescimento de micro-organismos, bem como a CLM, que está associada à capacidade letal mínima que essas mesmas substâncias são capazes de exercer sobre os micro-organismos testados.

A Tabela 12 mostra os valores referentes aos resultados da atividade antimicrobiana realizada com as amostras de *E. crista-galli* testadas frente às bactérias.

Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos extratos brutos, frações e metabólitos isolados de *E. crista-galli*

CIM (µg/mL)													
Amostras	Bactérias Gram-Positivas						Bactérias Gram-Negativas						
	Sa	Bs	Bc	Es	Ea	Ec	Etc	Pa	Bkc	Ss	St		
	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM	CIM/CLM
EBH	125 250	250 >250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 250	250 N/T
EBM	62,5 125	62,5 125	62,5 62,5	31,2 125	125 >250	250 250	31,2 125	62,5 250	>250 -	62,5 250	31,2 250	31,2 250	31,2 250
FEA	>250 -	31,2 125	62,5 62,5	31,2 125	125 250	125 250	31,2 62,5	125 250	62,5 62,5	125 250	125 250	125 250	125 250
FEB	62,5 250	250 >250	125 250	62,5 62,5	250 >250	125 250	125 250	125 250	250 250	125 250	125 250	125 >250	125 >250
FAB	125 >250	125 >250	125 250	125 125	125 250	125 250	125 250	125 250	125 125	125 250	125 250	125 250	125 250
Estigmasterol	50 >100	100 >100	100 >100	12,5 100	100 >100	100 >100	100 >100	50 100	25 >100	100 >100	100 >100	100 >100	100 >100
Lupeol	>100 -	100 >100	100 100	25 100	50 100	50 50	50 100	25 50	>100 100	50 -	50 100	50 100	50 100
Erisotrina	50 100	100 >100	50 100	25 100	50 100	50 100	25 100	50 100	100 100	50 100	50 100	50 100	50 100
Epieritratidina	50 >100	>100 -	50 >100	25 >100	100 >100	50 >100	50 50	50 >100	25 >100	50 >100	50 >100	50 >100	50 >100
Ampicilina	0,77 50	0,77 50	50 50	25 50	50 50	3,1 25	50 50	25 50	50 50	25 50	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77
Azitromicina	0,77 50	0,77 0,77	1,55 1,55	1,55 6,2	12,5 12,5	1,55 3,1	0,77 1,55	12,5 25	1,55 3,1	3,1 3,1	3,1 3,1	3,1 6,2	3,1 6,2
Levofloxacina	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77	0,77 0,77

^aATCC (American Type Culture Collection): *Sa-Staphylococcus aureus*; *Bs-Bacillus subtilis*; *Bc-Bacillus cereus*; *Es-Enterococcus spp.*; *Ea-Enterobacter aerogene*; *Ec-Escherichia coli*; *Etc-Enterobacter cloacae*; *Pa-Pseudomonas aeruginosa*; *Bkc-Burkholderia cepacia*; *Ss-Shigella sonnei*; *St-Salmonella typhimurium*;

Os dados apresentados na Tabela 12 demonstram que a maioria das amostras possui potencial antimicrobiano em alguma extensão. Os resultados obtidos inicialmente com os extratos brutos e frações mostraram que o EBH apresentou valores de CIM ≥ 125 $\mu\text{g/mL}$ e CLM ≥ 250 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstra que ele não apresenta efeito antimicrobiano considerável, assim como a fração FAB que exibiu uma CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ e CLM ≥ 125 $\mu\text{g/mL}$. Já o EBM mostrou grande potencial para inibir o crescimento de quase todas as bactérias testadas, com CIM entre 31,2 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo a CIM de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ para *Enterococcus spp.*, *E. cloacae* e *S. typhimurium*.

As frações obtidas a partir do EBM, FEA e FEB, também se mostraram ativas, sendo que a fração FEA apresentou CIM entre 31,2 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para quase todas as bactérias Gram-positivas testadas e também para algumas bactérias Gram-negativas. A fração FEB foi ativa contra o crescimento microbiano apenas para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *Enterococcus spp.*, com CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Após a obtenção destes resultados, os compostos isolados também foram testados. Pela Tabela 12, é possível observar que os metabólitos estigmasterol (**70**) e lupeol (**71**) são muito ativos como inibidores do crescimento bacteriano, principalmente contra a bactéria *Enterococcus spp.*, onde as CIMs medidas foram de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos para estes compostos frente a esta estirpe bacteriana não haviam sido relatados até o momento. O estigmasterol (**70**) também inibiu significativamente o crescimento bacteriano de *B. cepacia* em 25 $\mu\text{g/mL}$ e de *S. aureus* em 50 $\mu\text{g/mL}$. Estudos recentes têm relatado o estigmasterol (**70**) como composto antimicrobiano contra algumas cepas bacterianas. Tao et al. (2013)¹⁶⁵ relatou esta atividade contra *S. aureus* e *S. entérica* e Tanaka et al. (2013)¹⁶⁶ contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados obtidos contra o crescimento de *S. aureus* estão de acordo com o que foi encontrado neste trabalho.

No caso do triterpeno lupeol (**71**), ele também se mostrou ativo contra o crescimento de *P. aeruginosa* (CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$) e *E. aerogene*, *E. coli*, *E. cloacae*, *S. sonnei*, *S. typhimurium*, com CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$ para todas as bactérias citadas. Relatos da literatura têm demonstrado um grande potencial antimicrobiano por parte do lupeol (**71**). Entretanto, em estudo realizado por Mathabe et al. (2007)¹⁶⁷, o referido composto apresentou CIM de >200 $\mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. sonnei*, mostrando assim pouco efeito antimicrobiano. Estes dados não estão de acordo com os resultados significativos encontrado neste trabalho diante dos mesmos micro-organismos, possivelmente devido a alguma diferença de resistência das cepas utilizadas em ambos os trabalhos.

Os alcaloides isolados das frações básicas também se mostraram bons antimicrobianos, apresentando valores de CIM entre 25 e 50 µg/mL. Tanto erisotrina (**1**) quanto epieritratidina (**50**) foram ativos frente à maioria dos micro-organismos testados, sendo que a bactéria *B. subtilis* foi a única resistente aos dois alcaloides. É importante destacar o potencial antibacteriano destes alcaloides frente às bactérias Gram-negativas, já que estas geralmente são muito resistentes ao uso de medicamentos antimicrobianos e configuram um sério problema clínico, resultando numa significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo.

De uma forma geral, a bactéria *Enterococcus spp.* foi a mais sensível frente a capacidade antimicrobiana das substâncias testadas e a *E. aerogene* foi a bactéria mais resistente diante das amostras testadas como antimicrobianas.

No que se refere à avaliação da CLM, relacionada diretamente com a CIM, uma substância só pode ser considerada letal quando a CLM medida possui um valor de até quatro vezes o valor da CIM. No caso das bactérias estudadas, é possível se observar que praticamente todas as amostras que inibiram o crescimento bacteriano em concentrações baixas, também foram letais, ou seja, além de inibir o crescimento elas também causaram a morte dos micro-organismos.

É válido ressaltar que o EBM foi letal para todas as bactérias, com exceção da *S. typhimurium*. O estigmasterol (**70**) apresentou a CIM mais baixa de todo experimento frente a *Enterococcus spp.*, porém mostrou ser apenas inibidor do seu crescimento, já que não exibiu efeito de letalidade sobre a bactéria. O alcaloide epieritratidina (**50**) foi letal frente todas as bactérias testadas, com exceção de *Enterococcus spp.* e *B. cepacia*. O restante das amostras testadas que apresentaram potenciais para a inibição do crescimento bacteriano também apresentaram efeito letal, demonstrando assim o grande potencial antimicrobiano que os extratos, frações e compostos isolados de *E. crista-galli* apresentam.

Ainda pela Tabela 12, é possível observar que o EBM, as frações FEA e FEB e os compostos isolados estigmasterol (**70**), lupeol (**71**), erisotrina (**1**) e epieritratidina (**50**) frente a algumas cepas bacterianas (*B. cereus*, *Enterococcus spp.*, *E. aerogene*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e *S. sonnei*) apresentaram resultados de CIM muito próximas, iguais e até mesmo menores que a ampicilina, um dos padrões utilizados no ensaio. No caso dos metabólitos isolados todos apresentaram uma CIM menor ou igual a do padrão citado anteriormente, indicando desta forma, uma ação antibacteriana muito significativa desses compostos na inibição do crescimento destas bactérias.

O potencial antifúngico das amostras de *E. crista-galli* frente a cinco fungos também foi testado e é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividade antifúngica dos extratos brutos, frações e metabólitos isolados de *E. crista-galli*

CIM (µg/mL)										
Fungos										
Amostras	Ca		Ct		Cn		Cg		Sc	
	CIM/CLM									
EBH	250	250	250	250	62,5	62,5	>250	-	250	250
EBM	250	>250	>250	-	31,2	62,5	>250	-	>250	-
FEA	250	>250	250	250	31,2	62,5	>250	-	250	>250
FEB	250	>250	>250	-	62,5	125	125	125	>250	-
FAB	250	>250	250	>250	62,5	125	125	125	250	>250
Estigmasterol	100	>100	>100	>100	50	50	>100	-	>100	-
Lupeol	100	100	100	100	25	25	>100	-	100	100
Erisotrina	100	100	100	>100	25	50	25	25	100	100
Epieritratidina	50	>100	>100	-	25	>100	50	100	>100	-
Nistatina	0,77	3,1	1,52	3,1	1,52	3,1	3,1	3,1	1,52	3,1

^aATCC (American Type Culture Collection): *Ca-Candida albicans*, *Ct-Candida tropicalis*; *Ck-Candida krusei*; *Cp-Candida parapslosis*; *Cn-Cryptococcus neoformans*; *Cg-Cryptococcus gatti*; *Sc-Sacharomyces cerevisae*

Assim como com as bactérias, todas as amostras testadas apresentaram alguma atividade antifúngica. Pela Tabela 13, observa-se que o fungo *C. neoformans* teve seu crescimento inibido por todas as amostras testadas. O lupeol (**71**), a erisotrina (**1**) e o epieritratidina (**50**) apresentaram a menor concentração fungicida (25 µg/mL), sendo estes três compostos os mais ativos frente a este micro-organismo. O alcaloide erisotrina (**1**) mostrou-se também ativo contra *C. gatti*, com uma CIM de 25 µg/mL e o epieritratidina (**50**) demonstrou ainda, atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. gatti*, ambos apresentando CIM de 50 µg/mL.

O estudo realizado por Shai et al. (2008)¹⁶⁸ mostrou o triterpeno lupeol (**71**) com fraca atividade inibitória frente aos fungos *C. neoformans* e *C. albicans*. Os resultados obtidos neste trabalho em relação a *C. albicans* estão de acordo com o observado por Shai et al. (2008). Já no caso do fungo *C. neoformans*, os dados são conflitantes, pois no presente estudo observou-

se que o lupeol apresenta CIM de 25 µg/mL, sendo considerado ativo contra o crescimento de tal micro-organismo.

Em relação à CLM frente aos fungos testados, pode-se observar que somente o metabólito epieritratidina (**50**) não apresentou letalidade significativa frente ao *C. neoformans*, apesar de exibir CIM satisfatória como inibidor do crescimento deste fungo. As demais amostras apresentaram potencial como inibidores do crescimento de fungos e também se mostraram letais para os mesmos.

É possível concluir pelos resultados obtidos que *E. crista-galli* apresenta um grande potencial antimicrobiano principalmente frente as bactérias, já que tanto os extratos brutos, quanto as frações e os metabólitos isolados apresentaram CIM e CLM com valores satisfatórios para tal atividade.

Vale destacar também a atividade antimicrobiana muito significativa exibida pelos metabólitos puros extraídos da planta em estudo, especialmente a atividade exibida pelos alcaloides testados, pois além de inibirem o crescimento, estas substâncias também se apresentaram letais para os micro-organismos, o que pode demonstrar uma perspectiva no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos a partir das amostras testadas. É interessante destacar ainda que não foram encontrados na literatura estudos referentes aos extratos brutos, frações e alcaloides isolados de *E. crista-galli* que tenham exibido a atividade antimicrobiana demonstrada neste trabalho.

5.3.2 Ensaio enzimáticos

5.3.2.1 Avaliação das atividades de inibição enzimática

O desenvolvimento da ciência e da tecnologia em conjunto com o interesse em se confirmar o conhecimento da medicina popular, têm propiciado intensas pesquisas com relação ao potencial terapêutico e ao uso recorrente de plantas medicinais. As plantas são importantes produtoras de compostos biologicamente ativos e com isso a natureza se constitui em uma fonte inestimável de produtos naturais com ampla diversidade química de interesse para o tratamento de várias doenças.^{169,170}

Neste contexto, extratos de plantas medicinais têm sido amplamente relatados como objeto de estudo no tratamento de distúrbios associados com o sistema nervoso central (SNC). Vários indícios demonstraram que estes extratos podem ser veículos carreadores de

importantes substâncias ativas, onde se incluem, por exemplo, as substâncias inibidoras da AChE.⁸⁸

Plantas pertencentes ao gênero *Erythrina* (Fabaceae), que possuem ampla distribuição nas regiões tropicais do mundo, têm sido investigadas principalmente pela significativa presença de alcaloides como principais metabólitos secundários. Na Índia, extratos alcaloídicos de diferentes partes de espécies de *Erythrina* têm sido utilizados na medicina indígena. Vários efeitos farmacológicos incluindo efeito adstringente, sedativo, hipotensivo, efeitos de bloqueio neuromuscular e depressor do SNC, laxante e propriedades diuréticas foram relatados para este tipo de extrato.^{171,172,173}

Considerando então, o potencial das plantas para a descoberta de novos inibidores das enzimas POP, DPP-IV e AChE, os extratos brutos, as frações e os compostos isolados de *E. crista-galli* foram testados frente a estas enzimas. O ensaio de inibição enzimática referente a cada enzima foi realizado conforme foi descrito na parte experimental, páginas 75 a 77.

Na Tabela 14, são apresentados os valores de inibição dos extratos brutos e frações obtidas para as enzimas testadas.

Tabela 14 - Atividade inibitória dos extratos brutos e frações testadas de *E. crista-galli* frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE

Amostra [200 µg/mL]	POP (% inibição)	DPP-IV (% de inibição)	AChE (% inibição)
EBH	78,16	N/A	N/A
EBM	96,30	31,00	N/A
FEA	96,00	47,00	3,42
FEB	75,30	8,36	N/A
FAB	90,00	48,01	1,40
Controle			
Z-prolil-prolinal	4,9 x 10 ⁻³ *	-	-
Isoleucina tiazolida	-	0,52**	-
Eserina	-	-	96,80***

* IC₅₀ POP (µM) ** IC₅₀ DPP IV (µM) *** % AChE (inibidor testado na concentração de 125 µM)

A Tabela 14 mostrou o grande potencial inibidor do EBM e suas frações, principalmente a fração FEA, frente à enzima POP. Em relação às enzimas DPP-IV e AChE, é possível observar que as amostras testadas não apresentaram potencial inibidor significativo.

Embora as frações FEA e FAB tenham apresentado um percentual de inibição próximo a 50% para a DPP-IV, estes valores não são significativos já que neste *screening* inicial as amostras foram testadas numa concentração considerada bastante elevada (200 µg/mL).

A partir dos resultados relevantes obtidos nos ensaios de inibição enzimática da POP, foram testadas as substâncias puras. Apesar dos resultados do *screening* inicial não terem sido satisfatórios em relação à inibição da DPP-IV e AChE por estas substâncias, também realizou-se uma avaliação das mesmas, conforme demonstra a Tabela 15.

Tabela 15 - Atividade inibitória dos metabólitos isolados de *E. crista-galli* frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE

Amostra [250 µM]	POP (% inibição)	DPP-IV (% de inibição)	AChE (% inibição)
Estigmasterol	17,93	44,24	3,44
Lupeol	N/A	N/A	N/T
Erisotrina	46,00	N/A	N/A
Epieritratidina	12,30	N/A	N/A
Controle			
Z-prolil-prolinal	4.9 x 10 ⁻³ *	-	-
Isoleucina tiazolida	-	0.52**	-
Eserina	-	-	96,82***

* IC₅₀ POP (µM) ** IC₅₀ DPP IV (µM) ***% AChE (inibidor testado na concentração de 125 µM)

Analisando os resultados da Tabela 15 observa-se que nenhum dos compostos puros apresentou potencial de inibição para as enzimas testadas. Algumas amostras mostraram-se não ativas (N/A) e outras apresentaram um percentual de inibição bastante baixo para ser considerado significativo diante da concentração testada.

Neste trabalho foi observado que não é possível relacionar os valores de inibição da POP encontrados para os extratos brutos e frações diretamente com a presença dos compostos isolados a partir dos mesmos. Assim, os metabólitos estigmasterol (**70**) e lupeol (**71**), ambos extraídos do EBH e da fração FEA, quando puros não se mostraram bons inibidores da POP, o que indica não serem eles os responsáveis pela inibição da enzima em questão. Esse mesmo fato pode ser observado em relação aos dois alcaloides isolados das frações básicas. A fração FAB, que continha erisotrina (**1**) e epieritratidina (**50**), apresentou considerável poder de inibição, contrariamente ao observado quando foram testados os alcaloides em forma pura. A

fração FEB, de onde se extraiu apenas o alcaloide erisotrina (**1**), também apresentou um valor de inibição moderado, sendo que este alcaloide majoritário na fração quando analisado isoladamente não foi inibidor da POP.

A fração FEA apresentou um percentual de inibição da POP de 96%. Desta fração foram isolados e identificados somente o estigmasterol (**70**) e o lupeol (**71**), sendo que foi verificado que estes não são responsáveis pela inibição da enzima. Assim, fazendo-se um *screening* frente a POP das principais frações obtidas do fracionamento em coluna cromatográfica da fração FEA (Tabela 16), verificou-se a presença de frações com significativa atividade inibitória desta enzima.

Tabela 16 - Atividade inibitória frente à enzima POP das principais frações obtidas a partir da CC da fração FEA

Fração FEA [200 mM]	POP (% inibição)
F 52-55	97,67
F 56-62	97,58
F 63-65	97,98
F 66-84	98,40
F 85-91	97,56
F 92-140	97,96
F 143-148	94,57
F 160-175	71,76
F 193-213	95,95
F 224-227	46,54
F 228-233	77,04
Controle^a	97,17

^aControle: Ácido Clorogênico (na concentração de 200µM)

Analisando a Tabela 16 observa-se o enorme potencial inibidor da fração FEA frente à POP, dado que praticamente todas as frações mostraram grande potencial de inibição desta enzima. A fração 66-84 apresentou um percentual de inibição de 98%, maior que o valor exibido pelo padrão utilizado no ensaio, que foi de 97%. A fração F 56-62, de onde foram isolados o estigmasterol (**70**) e o lupeol (**71**), apresentou alto valor de inibição (97%) comparável ao padrão, o que é um claro indício de que há outro(s) metabólito(s) ainda não identificado(s) presente(s) nesta fração que apresentam atividade inibitória contra a POP.

As frações F 52-55, F 63-65, F 66-84, F 92-140 e F 160-175 foram trabalhadas até a exaustão e, no entanto, as quantidades finais obtidas não foram suficientes para a total purificação e posterior identificação das substâncias presentes.

A partir das todas as análises realizadas, pode-se concluir que a planta *E. crista-galli* possui um grande potencial para inibir a enzima POP, porém, é necessário o isolamento dos demais metabólitos secundários presentes nesta planta, principalmente da fração etérea ácida (FEA) além dos que foram isolados neste trabalho, para que se descubra quais substâncias são responsáveis pela significativa atividade enzimática observada, ou bem que se constate que isto é resultado do sinergismo que ocorre entre os metabólitos que estão presentes na planta.

5.3.3 Atividade antitumoral *in vitro*

5.3.3.1 Atividade antitumoral

O câncer de colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (cólon) e o reto. Na maioria dos casos é um câncer tratável e curável se for precocemente diagnosticado. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que tenham ocorrido 14.190 novos casos de câncer colorretal no ano de 2012. Na região Sul, o câncer do cólon de reto em homens, é o terceiro tipo de câncer mais frequente e, nas mulheres é o segundo. Portanto, a descoberta de produtos naturais ativos com atividade antiproliferativa é de grande interesse no tratamento deste tipo de câncer. Neste contexto a linhagem comercial HT29 vem sendo utilizada como modelo experimental para averiguar o efeito anticancerígeno de extratos de plantas contra o câncer colorretal.^{101,174,175}

Entre estes estudos existem trabalhos, como realizado por Still et al. (2013)¹⁷⁶ que avaliaram o efeito de alcalóides isolados da planta *Microcos paniculata* nas células tumorais HT29 e que mostraram efeito anticarcinogênico.

A partir dessa reflexão, buscamos analisar o potencial antitumoral da casca do caule de *E.crista-galli* testando o EBM, frações (FEA, FEB e FAB) e alcaloides isolados (erisotrina e epiritratidina) da respectiva planta.

Geralmente em estudos para averiguar a atividade antitumoral de um dado extrato, fração ou composto puro, é utilizado o ensaio espectrofotométrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida (MTT). Porém, existem evidências de que algumas substâncias como polifenóis podem interferir nos resultados pela reação com os compostos do teste, em especial o Formazan.¹⁷⁷

Um estudo inicial realizado com as amostras aqui investigadas mostrou uma grande variação nos resultados do ensaio do MTT. Além disso, neste trabalho foram feitos ainda, estudos pilotos que analisaram a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) produzida pelas células HT29. Este teste enzimático tem sido utilizado no estudo da atividade antitumoral de diversos tipos de neoplasias. Todavia, o câncer colorretal apresenta uma atividade alta desta enzima e, novamente os resultados obtidos foram bastante variáveis. Por este motivo, optou-se pela avaliação da concentração de dfDNA, considerada uma medida direta da quantidade de células presentes em um determinado meio de cultura.

Para tanto foi utilizado o corante DNA PicoGreen que é um reagente fluorescente, estável e que possui alta afinidade pelo DNA dupla-fita (dfDNA) e baixa afinidade por moléculas de DNA simples-fita, RNAs e nucleotídeos. Deste modo é possível quantificar indiretamente a quantidade de células. O principal fator limitante no uso desta medida é que não podem ser quantificadas as células que estão em processo inicial de apoptose. Apesar desta limitação, o método do PicoGreen é muito empregado para avaliação de atividade antitumoral, sendo os resultados obtidos no presente trabalho bastante promissores.¹⁷⁸

O ensaio antitumoral foi realizado conforme descrito na parte experimental (páginas 77 a 79). Inicialmente, o EBM foi avaliado nas células de câncer colorretal HT29. Como pode ser observado na Figura 49, o extrato apresentou atividade pró-carcinogênica, estimulando a proliferação tumoral nas primeiras 24 horas de exposição de um modo concentração-dependente. Entretanto, este resultado foi completamente revertido quando os seus efeitos antitumorais foram avaliados após 72 horas de exposição. Em todas as concentrações do EBM foi observada uma diminuição de aproximadamente 75% na taxa de proliferação das células de câncer colorretal indicando efeito antitumoral.

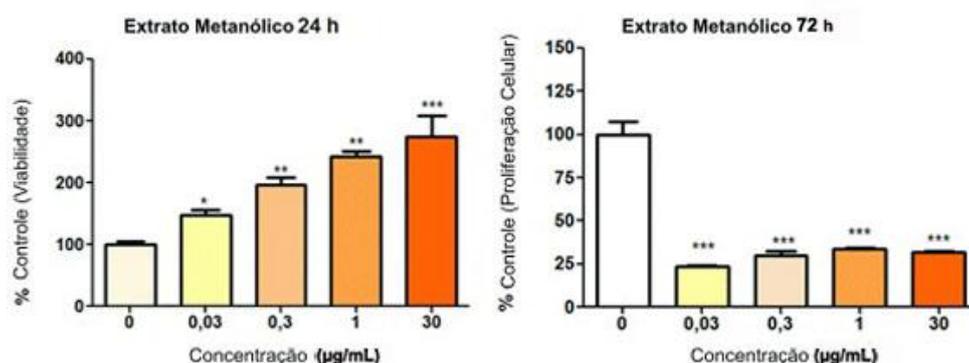


Figura 49 - Efeito antitumoral do extrato (EBM) da planta *E. crista-galli* na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29. As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$

Os efeitos das frações FEA, FEB e FAB sobre a linhagem de células HT29 também foram analisados. Ensaio piloto mostraram que a fração FEA não apresentou nenhum tipo de atividade anticarcinogênica. Já nas frações básicas, um efeito antitumoral foi constatado, embora tenha sido bastante baixo tanto nas 24 quanto nas 72 horas. Os melhores resultados foram obtidos após 24 horas de exposição, onde na concentração de 1 µg/mL as frações FEB e FAB diminuíram em 10% as células tumorais e após 72 horas, onde na concentração de 1 µg/mL a fração FAB continuou a apresentar efeito antitumoral enquanto que na concentração de 0,03 µg/mL a fração FEB já mostrou tal efeito. Por este motivo, foi realizado um novo teste com a adição concomitante das duas frações básicas diluídas nas concentrações em que apresentaram ação antitumoral.

Os resultados apresentados na Figura 50 mostraram que as duas frações combinadas diminuíram significativamente a concentração de células HT29 após 24 horas de exposição. O uso em combinação de 1 µg/mL FAB + 1 µg/mL FEB provocou uma diminuição de 22,2% das células tumorais (quando comparado com o controle), enquanto que com o uso combinado de 1 µg/mL FAB + 0,03 µg/mL FEB observou-se uma diminuição de 17,6%, indicando que estas frações combinadas apresentam discreto efeito antitumoral na viabilidade das células HT29. Entretanto, quando se analisou a ação antiproliferativa (FAB-FEB 72 horas, Figura 50), as frações apresentaram efeito significativamente elevado. Em ambas as combinações a inibição da proliferação celular foi de 74-76% quando comparada com o grupo controle.

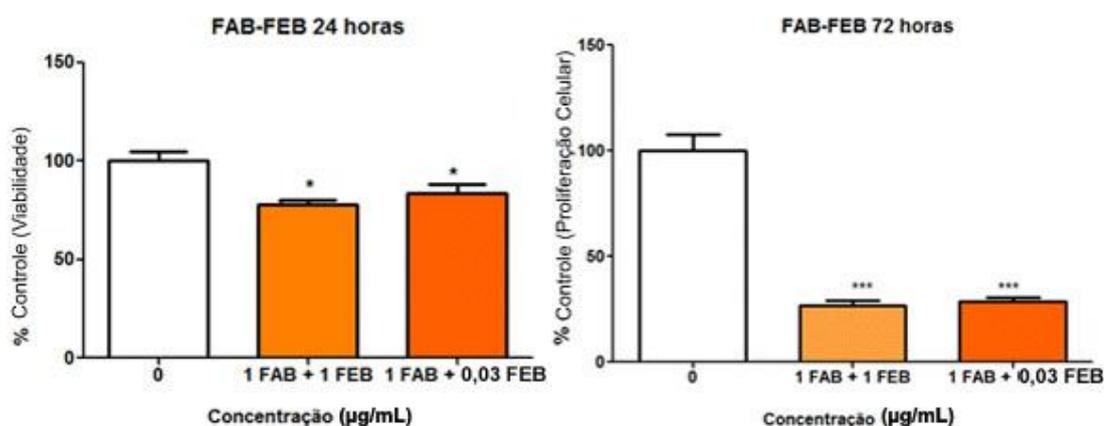


Figura 50 - Efeito antitumoral da combinação das frações FAB e FEB da planta *E. crista-galli* na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29. As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. *** $p \leq 0,001$

Por fim, foi testada a contribuição dos alcaloides isolados de *E. crista-galli*, erisotrina (**1**) e epieritratidina (**50**) no efeito antitumoral observado no presente trabalho. Como pode ser verificado na Figura 51, o efeito do alcaloide erisotrina (**1**) nas células de câncer colorretal após 24 horas de exposição foi de estímulo do crescimento celular em todas as concentrações testadas. Já o alcaloide epieritratidina (**50**), no mesmo período apresentou estímulo de crescimento tumoral na concentração mais baixa (0,03 µg/mL) e um claro efeito inibitório no crescimento celular na concentração de 0,1 µg/mL. As concentrações mais altas não apresentaram nenhum efeito significativo nas células HT29 após 24 horas de exposição. Em 72 horas pode-se verificar que os dois alcaloides apresentaram efeito antiproliferativo elevado em todas as concentrações testadas, sendo que a erisotrina (**1**) apresentou efeito antiproliferativo maior contra o crescimento celular na concentração de 0,1 µg/mL e o epieritratidina (**50**) na concentração de 0,03 µg/mL.

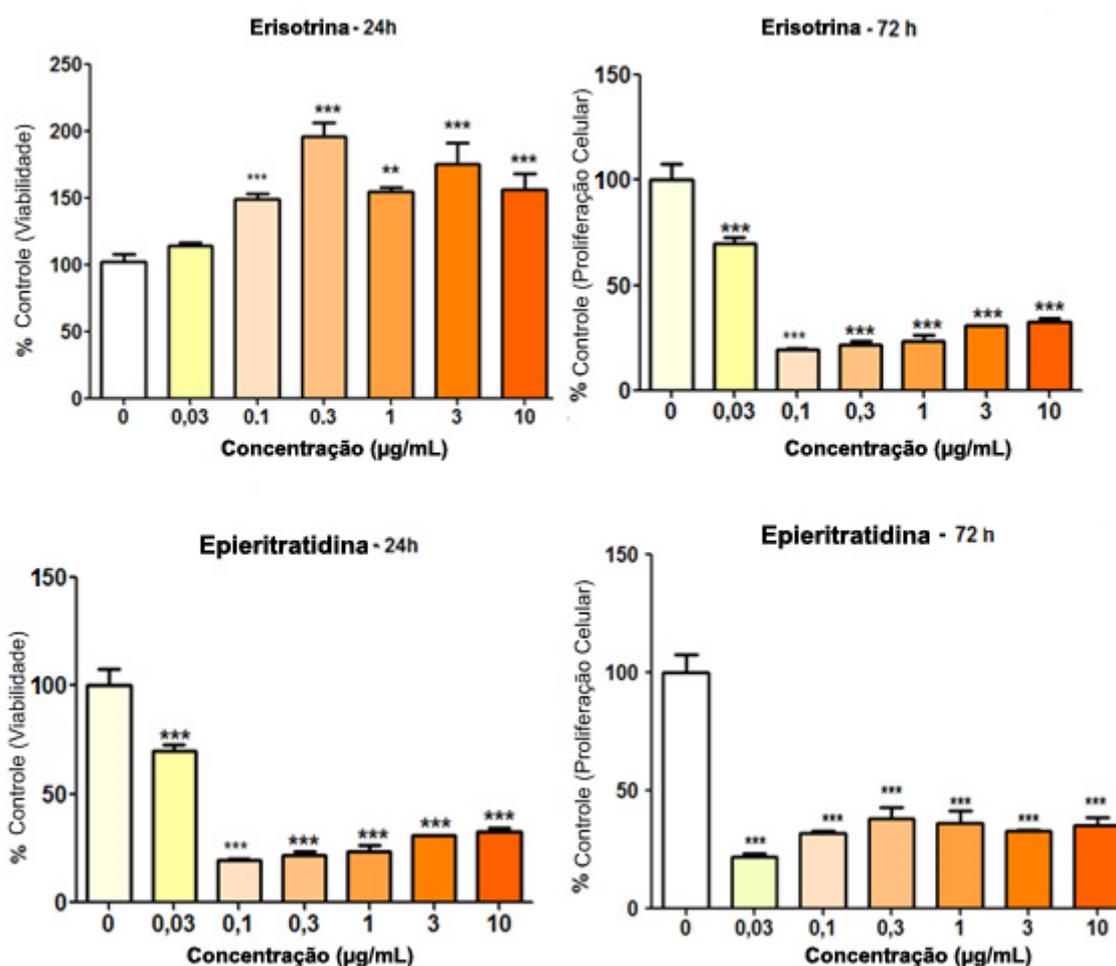


Figura 51 - Efeito antitumoral da combinação dos alcaloides isolados, erisotrina (**1**) e epieritratidina (**50**), da planta *E. crista-galli* na viabilidade e na taxa de proliferação celular da linhagem de câncer colorretal HT29. As diferenças foram comparadas por análise de variância seguida de teste *post hoc* de Tukey. *** $p \leq 0,001$

Os resultados obtidos sugerem que tanto o EBM quanto a combinação das frações FAB e FEB e o alcaloide epieritratidina (**50**) possuem uma alta atividade antitumoral contra o câncer de coloretal através da inibição da proliferação celular após 72 horas de exposição. Estes resultados devem ser confirmados com ensaios complementares.

Estudos recentes realizados com plantas do gênero *Erythrina* têm apontado fortes indícios sobre o potencial antitumoral deste gênero frente a diferentes linhagens de células tumorais.^{46,179}

Iranshahi et al. (2012)⁶² avaliaram os efeitos citotóxicos de flavonoides e alcaloides isolados de *E. vespertilio*, dentre estes últimos, o erisotrina (**1**), que exibiu atividade contra células do câncer de próstata (PC3). Mohammed et al. (2012)¹⁶⁰ também relataram a

citotoxicidade moderada contra as células neoplásicas HEP-G2 e HEP-2 para o alcaloide (**1**) e outros alcaloides isolados de *E. abyssinica* Lam. Em 2008, Cui et al.¹⁸⁰ testaram as células de câncer colorretal com chalconas isoladas da espécie *E. abyssinica*, que exibiram atividade citotóxica de moderada a fraca frente a esta linhagem cancerosa.

Contudo, não existem relatos de ensaios antitumorais realizados com a planta *E. crista-galli* frente as células HT29. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho são inéditos para o EBM, frações e principalmente alcaloides isolados.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir da análise fitoquímica realizada com a espécie *E. crista-galli*, pertencente à família Fabaceae permite concluir que:

- a espécie é bioprodutora de vários alcaloides que possuem núcleo característico, sendo que foi possível isolar e identificar o dienoide erisotrina (**1**) e o alquenoide epieritratidina (**50**) das frações básicas (FEB e FAB) do EBM. Este é o primeiro relato na literatura sobre o isolamento de (**1**) a partir da casca de *E. crista-galli*. Foram isolados também do EBH e da fração FEA (EBM) o fitoesterol estigmasterol (**70**) e o triterpeno lupeol (**71**)

- a avaliação da atividade antimicrobiana frente às diversas estirpes de micro-organismos dos extratos, frações e compostos isolados mostraram um potencial significativo com relação ao EBM, frações (FEA, FEB e FAB) e metabólitos isolados. Cada amostra testada exibiu algum potencial antimicrobiano frente às bactérias e fungos testados

- o potencial de inibição das amostras (extratos, frações e compostos isolados) de *E.crista-galli* foi testado frente às enzimas POP, DPP-IV e AChE. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos com o EBM e suas frações, e destas, a fração FEA foi a que se mostrou mais ativa frente a POP. Com a enzima DPP-IV apenas o EBH apresentou um resultado expressivo enquanto que frente à enzima AChE nenhuma amostra apresentou algum potencial para inibi-la

- quanto à atividade antitumoral medida contra as células HT29 (colorretal), os resultados obtidos demonstram que o EBM, a combinação das frações básicas FEB e FAB e o alcaloide epieritratidina (**50**) possuem significativo poder de inibição da proliferação celular após 72 h de exposição, sugerindo assim um efeito antitumoral destas amostras frente a esta linhagem

- os resultados significativos obtidos durante a análise fitoquímica de *E. crista-galli* remetem à necessidade de que outros compostos sejam isolados desta espécie e que alguns ensaios sejam refeitos de forma que possa confirmar as atividades farmacológicas exibidas pela planta neste estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARREIRO, E. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Quim. Nova**, v. 13(1), p. 29-39, 1990.
2. CUNHA, A. P. Aspectos Históricos sobre Plantas Medicinais, seus Constituintes Activos e Fitoterapia. Disponível em: <http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt/>. Acesso em 07 de abril de 2013.
3. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
4. YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. 2ª Ed., Itajaí, Santa Catarina: Editora Univali, 2009.
5. DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, 7, Campinas, SP, 2006.
6. RATES, S. M. K. Promoção do Uso Racional de Fitoterápicos: uma Abordagem no Ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11(2), p. 57-69, 2001.
7. SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
8. CALIXTO, J. B. Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytotherapeutic Agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33(2), p. 179-189, 2000.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2009.
10. BRAZ FILHO, R. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Quim. Nova**, v. 33(1), p. 229-239, 2010.
11. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Documento 316 - Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Pelotas, RS, 2010.
12. MAGALHÃES, V. G. Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB): A necessidade de revisão do seu texto substituindo o termo “recursos energéticos” por “recursos biológicos” nos arts 1,9,15,16 e 19. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 1, p. 16-32, 2006.
13. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Documento 189 - Metabolômica: Aplicações e Perspectivas. Brasília, DF, 2006.

14. MARCHIORI, J. N. C. Dendrologia das Angiospermas: Leguminosas. Ed. UFSM, Santa Maria, Brasil, p. 200, 1997.
15. NKENGFAK, A. E. et al. An Isoflavanone and a Coumestan from *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 35(1), p. 521-526, 1994.
16. SOTO-HÉRNANDEZ, M.; JACKSON, A. H. *Erythrina* Alkaloids: Isolation and Characterisation of Alkaloids from Seven *Erythrina* species. **Planta Med.**, v. 60(2), p. 175-177, 1994.
17. SARRAGIOTTHO, M. H.; LEITÃO FILHO, H.; MARSAIOLI, A. J. Erysotrine-N-oxide and Erythartine-N-oxide, Two Novel Alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Can. J. Chem.**, v. 59(18), p. 2771-2775, 1981.
18. NKENGFAK, A. E. et al. Phenolic Metabolites from *Erythrina* species. **Phytochemistry**, v. 46(3), p. 573-578, 1997.
19. FARIA, T. J. et al. Alcalóides de Flores e Folhas de *Erythrina speciosa* Andrews. **Quim. Nova**, v. 30(3), p. 525-527, 2007.
20. OSAWA, M. et al. Structures of New *Erythrinan* Alkaloids and Nitric Oxide Production Inhibitors from *Erythrina crista-galli*. **Chem. Pharm. Bull**, v. 58, p. 1119-1122, 2010.
21. WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A Phylogeny of Legumes (Leguminosae) Based on Analysis of the Plastid Matk Gene Resolves Many Well-supported Subclades Within the Family. **American Journal of Botany**, v. 91(11), p. 1846-1862, 2004.
22. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Disponível em: www.embrapa.br/#. Acesso em 03 de agosto de 2013.
23. SCHWIRKOWSKI, P. Flora de São Bento do Sul- SC. Disponível em: sites.google.com/site/florasbs/fabaceae. Acesso em 03 de agosto de 2013.
24. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Circular Técnica 160: Mulungu (*Erythria velutina*), 2008.
25. ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus *Erythrina*. In: Rao, V. (Ed.). **Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Intech, p. 327-352, 2012.
26. CHACHA, M.; BOJASE-MOLETA, G.; MAJINDA, R. R. Antimicrobial and Radical Scavenging Flavonoids from the Stem Wood of *Erythrina latissima*. **Phytochemistry**, v. 66(1), p. 99-104, 2005.
27. LARRÉ, C. F. et al. Growth and Chlorophyll a Fluorescence in *Erythrina crista-galli* L. Plants Under Flooding Conditions. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 1463-1471, 2013.
28. MAIER, U. H. et al. Biosynthesis of *Erythrina* Alkaloids in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 52(3), p. 373-382, 1999.

29. SILVA, A. J. C.; CARPANEZZI, A. A.; LAVORANTI, O. J. Quebra de Dormência de Sementes de *Erythrina crista-galli*. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 53, p. 65-78, 2006.
30. CHAWLA, A. S.; GUPTA, M. P.; JACKSON, A. H. Alkaloidal Constituents of *Erythrina crista-galli* Flowers. **J. Nat. Prod.**, v. 50(6), p. 1146-1148, 1987.
31. COSTA, R. A. C. V.; A. B. B. Fenologia e Visitantes Florais de *Erythrina crista-galli* L. (Leguminosae: Faboideae) em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biotemas**, v. 21(2), p. 51-56, 2008.
32. GRATIERI-SOSSELLA, A.; PETRY, C.; NIENOW, A. A. Propagação da Corticeira do Banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (Fabaceae) pelo Processo de Estaquia. R. **Árvore**, Viçosa-MG, v. 32(1), p.163-171, 2008.
33. SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª Ed. Editora da UFSC, 2001.
34. SÓTO-HERNANDEZ, R. M. et al. Erythrina, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. In RASOOLI, I. (Ed.). **Bioactive Compounds in Phytomedicine**. Intech, p. 163-185, 2012.
35. DYKE, S.F., QUESSY, S.N. Erythrina and Related Alkaloids. In: MANSKE, R.H.F., RODRIGO, R.G.A. (Ed.). **The Alkaloids: Chemistry and Physiology V18**. Academic Press, p. 1-98, 1981.
36. AMER, M. E.; SHAMHIA, M.; FREYER, A. J. The Tetracyclic *Erythrina* Alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 54(2), p. 329-363, 1991.
37. BARTON, D. H. R.; COHEN, T. Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation. In: Festschrift STOLL, A. **Birkhäuser**, p. 117-143, 1957.
38. BARTON, D. H. R. et al. The Constitutions of Erythratine and Erysodine and the Biosynthesis of the *Erythrina* Alkaloids. **Chem. Comm.**, v. 10, p. 294-295, 1966.
39. BARTON, D. H. R. et al. The Biosynthesis of the *Erythrina* Alkaloids. **Chem. Comm.**, p. 266-268, 1967.
40. BARTON, D. H. R. et. al. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XVIII. The Structure and Biosynthesis of *Erythrina* Alkaloids. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 1529-1537, 1968.
41. BARTON, D. H. R.; BOAR, R. B.; WIDDOWSON, D. A. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XXI. The Biosynthesis of the *Erythrina* Alkaloids. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 1213-1217, 1970.
42. FOMUM, Z. T.; AYAFOR, J. F.; WANDJI, J. Erythrisenegalone, a Prenylated-Flavanone from *Erythrina senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 24(12), p. 3075-3076, 1985.
43. WANDJI, J. et al. Epoxyisoflavones from *Erythrina senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 35(6), p. 1573-1577, 1994.

44. NKENGFACK, A. E. et al. Indicanine A, a New 3-Phenylcoumarin from Root Bark of *Erythrina indica*. **J. Nat. Prod.**, v. 63(6), p. 855-856, 2000.
45. NGUYEN, P. H. et al. Prenylated Pterocarpanes as Bacterial Neuraminidase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18(9), p. 3335-3344, 2010.
46. INNOK, P. et al. Fuscacarpanes A-C, New Pterocarpanes from the Stems of *Erythrina fusca*. **Fitoterapia**, v. 81(6), p. 518-523, 2010.
47. AHAMD, W. Y. et al. A Pterocarpan from *Erythrina variegata*. **Journal of Biological Sciences**, v. 2(8), p. 542-544, 2002.
48. NKENGFACKA, A. E. et al. Cytotoxic Isoflavones from *Erythrina indica*. **Phytochemistry**, v. 58(7), p. 1113-1120, 2001.
49. RUKACHAISIRIKUL, T.; INNOK, P.; SUKSAMRARN, A. *Erythrina* Alkaloids and a Pterocarpan from the Bark of *Erythrina subumbrans*. **J. Nat. Prod.**, v. 71(1), p. 156-158, 2008.
50. KOUAM, J. X. et al. Sigmoiside E: A New Antibacterial Triterpenoid Saponin from *Erythrina sigmoidea* (HUA). **Bull. Chem. Soc. Ethiop.**, v. 21(3), 373-378, 2007.
51. RUKACHAISIRIKUL, T. et al. Biological Activities of the Chemical Constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 30(11), p. 1398-1403, 2007.
52. MITSCHER, L. A. et al. Erycristin, A New Antimicrobial Pterocarpan from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 27(2), p. 381-385, 1988.
53. DAGNE, E. et al. Two Bioactive Pterocarpanes from *Erythrina burana*. **J. Nat. Prod.**, v. 56(10), p. 1831-1834, 1993.
54. JUMA, B. F.; MAJINDA, R. R. T. Erythrinaline Alkaloids from the Flowers and Pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH Radical Scavenging Properties. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1397-1404, 2004.
55. WANJALA, C. C. W. et al. Erythrinaline Alkaloids and Antimicrobial Flavonoids from *Erythrina latissima*. **Planta Med**, v. 68(7), p. 640-642, 2002.
56. FLAUSINO JR, O. et al. Anxiolytic Effects of *Erythrinian* Alkaloids from *Erythrina mulungu*. **J. Nat. Prod.**, v. 70(1), p.48-53, 2007.
57. RUKACHAISIRIKUL, T. et al. Antibacterial Pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110(1), p. 171-175, 2007.
58. NGUYEN, P. H. et al. Cytotoxic and PTP1B Inhibitory Activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19(23), p. 6745-6749, 2009.

59. OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing activity of *Erythrinan* Alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19(1), p. 234-236, 2009.
60. CORNELIUS, W. W. et al. Antifeedant Activities of the Erythraline Alkaloids from *Erythrina latissima* against *Spodoptera littoralis* (Lepidopteranocuidae). **Rec. Nat. Prod.**, v. 3(2), p. 96-103, 2009.
61. NDE, C. B. M. et al. *In vitro* Estrogenic Activity of Two Major Compounds from the Stem Bark of *Erythrina lysistemon* (Fabaceae). **European Journal of Pharmacology**, 674, p. 87-94, 2012.
62. IRANSHAHI, M. et al. Cytotoxic Evaluation of Alkaloids and Isoflavonoids from the Australian Tree *Erythrina vespertilio*. **Planta Med.**, 78, p. 730-736, 2012.
63. POLGÁR, L. The Prolyl Oligopeptidase Family. **CMLS**, v. 59(2), p. 349-362, 2002.
64. WALTER, R. et al. Leucylglycinamide Released from Oxytocin by Human Uterine Enzyme. **Science**, 173, p. 827-829, 1971.
65. KOIDA, M.; WALTER, R.; Post-proline Cleaving Enzyme. Purification of this Endopeptidase by Affinity Chromatography. **J. Biol. Chem.**, v. 251(23), 7593-7599, 1976.
66. VENÄLÄINEN, J. I. et al. Slow-binding Inhibitors of Prolyl Oligopeptidase with Different Functional Group at the P1 Site. **Biochem. J.**, 382, p. 1003-1008, 2004.
67. MAES, M. et al. Alterations in Plasma Prolyl Oligopeptidase Activity in Depression, Mania, and Schizophrenia: Effects of Antidepressants, Mood Stabilizers and Antipsychotic Drugs. **Psychiatry Res.**, v. 58(3), 217-225, 1995.
68. MAES, M. et al. Lower Serum Activity of Prolyl Endopeptidase in Anorexia and Bulimia Nervosa. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26(1), p. 17-26, 2001.
69. SHINODA, M. et al. Specific Inhibitor for Prolyl Endopeptidase Suppresses the Generation of Amyloid β -protein in NG108-15 Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 235(3), p. 641-645, 1997.
70. LAWANDI, J. et al. Inhibitors of Prolyl Oligopeptidases for the Therapy of Human Diseases: Defining Diseases and Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 53(9), p.3423-3438, 2010.
71. BIRNEY, Y. A. The Purification and Characterisation of a Z-Pro-Prolinal Insensitive Z-Glypro-Mca Degrading Peptidase from Bovine Serum. Tese da Escola Superior de Biotecnologia, Dublin City University, Irlanda, 2000.
72. DALCOL, I. I. et al. Inhibitory Effects of Three Species of *Hypericum* on POP and DPP IV Activities. Anales del VI International Symposium on Natural Products and its Applications, Chillán, CL, 2007.
73. TARRAGÓ, T. et al. Baicalin, a Prodrug Able to Reach the CNS, is a Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7516-7524, 2008.

74. MARQUES, M. R. et al. Flavonoids with Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activity Isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. **Fitoterapia**, v. 81(6), p. 552-556, 2010.
75. GITZEL F., A. Atividade Biológica de Metabólitos Secundários de *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.
76. FILHO, A.G. et al. Inhibitory Effect of Verbascoside Isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on Prolyl Oligopeptidase Activity. **Phytother. Res.**, v. 26, p. 1472-1475, 2012.
77. GREEN, B. D.; FLATT, P. R., BAILEY, J. F. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) Inhibitors: a Newly Emerging Drug Class for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 3, p. 158-165, 2006.
78. ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W. Prolylpeptidases: a Serine Protease sub Family with High Potential for Drug Discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 7, p. 496-504, 2003.
79. DEACON, C. F.; AHRÈN, B.; HOLST, J. Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV: a Novel Approach for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes?. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 13, p. 1091-1102, 2004.
80. TAMBASCIA, M. A. et al. Novas Perspectivas para o Tratamento do Diabetes tipo 2: Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-IV. **Revista Brasileira de Medicina**, supl 3, p. 2-19, 2007.
81. SIMPKINS, L. M. et al. Potent Non-nitrile Dipeptidic Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17(23), p. 6476-6480, 2007.
82. ZHAO, G. et al. Substituted Piperidinyl Glycinylnyl 2-cyano-4,5-methano Pyrrolidines as Potent and Stable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23(6), p. 1622-1625, 2013.
83. IKUMA, Y. et al. Discovery of 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones as Potent and Selective Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-4) Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20(19), p. 5864-5883, 2012.
84. YOSHIDA, T. et al. Discovery and Preclinical Profile of Tenzeligliptin (3-[(2S,4S)-4-[4-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-ylcarbonyl] thiazolidine): A Highly Potent, Selective, Long-lasting and Orally Active Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20(19), p. 5705-5719, 2012.
85. PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. A Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **Revista Militar de Artigos Ciência e Tecnologia**, 3º trimestre, p. 3-14, 2011.
86. KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 9ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

87. JÚNIOR, C. V. et al. Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 27(4), p. 655-660, 2004.
88. ANEKONDA, T. S.; REDDY, P. H. Can Herbs Provide a New Generation of Drugs for Treating Alzheimer's Disease?. **Brain Res Rev**, v. 50, p. 361-376, 2005.
89. LIRA, A. F. Estudo da Cinética de Inibição Acetilcolinesterásica por Dialquilfosforamidatos, Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
90. BROOKMEYER, R.; JOHNSON, E.; ZIEGLER-GRAHAM, K.; ARRIGHI, H. M. Forecasting the Global Burden of Alzheimer's Disease. **Alzheimers Dement**, v. 3(3), p. 186-191, 2007.
91. BARBOSA FILHO, J. M. Natural Products Inhibitors of the Enzyme Acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 158-285, 2006.
92. PERRY, E. K. et al. Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: from Ethnobotany to Phytotherapy. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 51(5), p. 527-534, 1999.
93. OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(2), p. 301-307, 2008.
94. PANDA, S. K. Screening Methods in the Study of Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. **International Journal of Biotechnology and Research (IJBTR)**, v. 2(1), p. 1-35, 2012.
95. CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 25ª Ed., McGraw Hill Brasil, 2005.
96. SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por Microrganismos da Microbiota Endógena. **Arq. Inst. Biol.**, v. 67(2), p. 275-281, 2000.
97. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Módulo V. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, 2004.
98. NIRMA, C.; EPARVIER, V.; STIEN, D. Antifungal Agents from *Pseudallescheria Boydii* SNB-CN73 Isolated from a *Nasutitermes* sp. Termite. **J. Nat. Prod.**, 76, p. 988-991, 2013.
99. MACÊDO, D. P. C. et al. Infecções Oportunistas por Leveduras e Perfil Enzimático dos Agentes Etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42(2), p. 188-191, 2009.
100. SILVA, F. H. A.; PAÇO, F. R.; REIS, E.; AMARAL, V. *Saccharomyces cerevisiae* Infection - an unusual pathogen in the ICU. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23(1), p. 108-111, 2011.

101. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em 7 de agosto de 2013.
102. COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2(1), p. 47-58, 2010.
103. World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Acesso em 7 de agosto de 2013.
104. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a Source of Anti-cancer Agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, p. 72-79, 2005.
105. QIAO, L.; WONG B. Colon Cancer Experimental Therapy. In: SCHWAB, M. (Ed.) **Encyclopedia of Cancer: SpringerReference**, 2009. Disponível em: <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/178245.html>. Acesso em 7 de agosto de 2013.
106. BRAMBILLA, E. et al. Staging of Colorectal Cancer in the Private Service Versus Brazilian National Public Health System: What has Changed After Five Years?. **Journal of Coloproctology**, v. 32(2), p. 144-147, 2012.
107. TANG, Y. J. et al. Houttuynia Cordata Thunb Extract Induces Apoptosis Through Mitochondrial-Dependent Pathway in HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. **Oncology Reports**, 22, p. 1051-1056, 2009.
108. TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer Colorretal: uma Revisão da Abordagem Terapêutica com Bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53(2), p.173-182, 2007.
109. CINGI, M. R. et al. Choice and Standardization of Test Protocols in Cytotoxicology: a Multicentre Approach. **Toxicol. in vitro**, v. 5(2), p. 119-125, 1991.
110. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, v. 30(12), p. 3864-3874, 1991.
111. ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-celular Específicos e Ciclo-celular não Específicos que Interagem com o DNA: uma Introdução. **Quim. Nova**, v. 28(1), p. 118-129, 2005.
112. QUENT, V. M. C. et al. Discrepancies Between Metabolic Activity and DNA Content as Tool to Assess Cell Proliferation in Cancer Research. **J Cell Mol Med**, v. 14(4), p. 1003-1013, 2010.
113. HOUGHTON, P. et al. The Sulphorhodamine (SRB) Assay and Other Approaches to Testing Plant Extracts and Derived Compounds for Activities Related to Reputed Anticancer Activity. **Methods**, v. 42(4), p. 377-387, 2007.

114. HENRIKSSON, E. et al. Differences in Estimates of Cisplatin-induced Cell Kill *in vitro* Between Colorimetric and Cell Count/colony Assays. ***In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal***, v. 42(10), p. 320-323, 2006.
115. MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. ***Quim. Nova***, v. 25(3), p. 429-438, 2002.
116. AHN, S. J.; COSTA, J.; EMANUEL, J. R. PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples pre- or post- PCR. ***Nucleic Acids Research***, v. 24(13), p. 2623-2625, 1996.
117. ZHAO, D. et al. LDH-A Acetylation: Implication in Pancreatic Cancer Initiation and Diagnosis. ***Oncotarget***, v. 4(6), p. 802-803, 2013.
118. LABRIOLA, R. A. Argentine Plants. XI. The Partial Structure of Erysovine, Erysodine, and Erysofine. ***Journal of Organic Chemistry***, 16, p. 90-93, 1951.
119. BARTON, D. H. R. et al. Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XXII. The Alkaloids of *Erythrina lysistemon*, *E. abyssinica*, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, and *E. lithosperma*: the Structure of Erythratidine. ***J. C. S. Perkin I***, p. 874-880, 1973.
120. Food and Drugs Administration (FDA): Code of Federal Regulations, Cap. 21, 300, 1991.
121. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, 5th Ed, NCCLS Document M7-A4, 2000.
122. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; Antimicrobial Activity of Essential Oils and Plants Extracts. ***Journal of applied of food Microbiology***, v. 94, p. 223-253, 2004.
123. TOIDE, K. et al. JTP-4819: a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor with Potential as a Cognitive Enhancer. ***J. Pharmacol. Exp. Ther.***, 274, p. 1370-1378, 1995.
124. CHECLER, F.; VICENT, J. P.; KITABGI, P. Inactivation of Neurotensin by Rat Brain Synaptic Membranes Partly Occurs Through cleavage at the Arg8-Arg9 Peptide Bond by Metalloendopeptidase. ***J. Neurochem.***, 45, p. 1509-1513, 1985.
125. RHEE, I. K. et al. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica gel thin-layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining. ***Journal of Chromatography A***, v. 915(1-2), p. 217-223, 2001.
126. TRAINER, D. L. et al. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. ***Int. J. Cancer***, v. 41(2), 287-296, 1988.
127. PERES, C. M.; CURI, R. Como Cultivar Células. Ed. Guanabara, Koogan, v. 1, p. 3-4, 2005.
128. YU, D. L. et al. Studies on Chemical Constituents of *Erythrina arborescens* Roxb. ***Zhongguo Zhong Yao Za Zhi***, v. 25(6), p. 353-355, 2000.

129. SAEED, A.; HASHEM, A. Phytochemical and Biological Studies of *Erythrina corallodendron* Linn: family Leguminosae. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy** (Cairo University), v. 35(3), p. 225-231, 1997.
130. SINGH, H. et al. Investigation of *Erythrina* spp. IX. Chemical Constituents of *Erythrina stricta* Bark. **Journal of Natural Products**, v. 44(5), p. 526-529, 1981.
131. SINGH, H.; CHAWLA, A. S. *Erythrina* sp. III. Chemical Constituents of *Erythrina suberosa* Roxb Seeds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59(8), p. 1179-1182, 1970.
132. SINGH, H. et al. Waxes and Sterols of *Erythrina suberosa* Bark. **Phytochemistry**, v. 9(7), p. 1673-1675, 1970.
133. SHAMA, S.K.; CHAWLA, H. M. Structure Elucidation of Erythrosotidienone and Erythromotidienone - Two New Isoquinoline Alkaloids from *Erythrina variegata* Flowers. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 75(10-12), p. 833-837, 1998.
134. SINGH, H. et al. Investigation of *Erythrina* spp. VII. Chemical Constituents of *Erythrina variegata* var Orientalis. **Lloydia**, v. 38(2), p. 97-100, 1975.
135. RAHMAN, M. Z. et al. Phytochemical and Biological Investigations of *Erythrina variegata*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 15(2), p. 140-145, 2007.
136. LI, X.; WANG, N.; YAO, X. Chemical constituents from stem bark of *Erythrina variegata*. **Zhongcaoyao**, v. 36(7), p. 975-978, 2005.
137. ABO EL-FOTOUH, M. et al. Phytochemical and Biological Study of *Erythrina crista-galli* (L.) Grown in Egypt. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy** (Cairo University), v. 46(3), p. 127-138, 2008.
138. IMAMURA, H.; ITO, M.; OHASHI, H. Isoflavonoids of *Erythrina crista-galli* (Leguminosae). **Gifu Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku**, 45, p.77-82. 1981.
139. SUNDARARAMAN, P.; DJERASSI, C. A Convenient Synthesis of Progesterone from Stigmasterol. **J. Org. Chem.**, v. 42(22), p. 3633-3634, 1977.
140. HUANG, J. G. et al. Insecticidal and Cytotoxic Activities of Extracts of *Cacalia tangutica* and its Two Active Ingredients Against *Musca domestica* and *Aedes albopictus*. **Journal of Economic Entomology**, v. 102(4), p. 1444-1447, 2009.
141. GÓMEZ, M. A.; GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T. Cytostatic Activity of *Achillea ageratum* L. **Phytotherapy Research**, v. 15(7), p. 633-634, 2001.
142. KASAHARA, Y. et al. *Carthami flos* Extract and its Component, Stigmasterol, Inhibit Tumour Promotion in Mouse Skin Two-stage Carcinogenesis. **Phytotherapy Research**, v. 8(6), p. 327-331, 1994.
143. PANDA, S. et al. Thyroid Inhibitory, Antiperoxidative and Hypoglycemic Effects of Stigmasterol Isolated from *Butea monosperma*. **Fitoterapia**, v. 80(2), p. 123-126, 2009.

144. LIM, J. C. et al. Antimutagenic Constituents from the Thorns of *Gleditsia sinensis*. **Chem. Pharm. Bull**, v. 53(5), p. 561-564, 2005.
145. GARCÍA, M. D. et al. Topical Antiinflammatory Activity of Phytosterols Isolated From *Eryngium Foetidum* on Chronic and Acute Inflammation Models. **Phytotherapy Research**, v. 13(1), p. 78-80, 1999.
146. PAL, D. K.; NANDI, M. CNS Activities of *Celesia coromandeliane* Vahl. in Mice. **Acta Pol. Pharm.**, v. 62(5), p. 355-361, 2005.
147. FORGO, P.; KÖVÉR, K. E. Gradient Enhanced Selective Experiments in the ^1H NMR Chemical Shift Assignment of the Skeleton and Side-chain Resonances of Stigmasterol, a Phytosterol Derivative. **Steroids**, v. 69(1), p. 43-50, 2004.
148. MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, Phytostanols, and their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitative Analysis, and Health-promoting Uses. **Prog. Lipid Res.**, v. 41(6), p. 457-500, 2002.
149. AL-REHAILY, A. J. et al. Pharmacological Studies of Various Extracts and the Major Constituent Lupeol Obtained from Hexane Extract of *Teclea nobilis* in Rodents. **Nat. Prod. Sci.**, v. 7(3), p. 76-82, 2001.
150. FERNÁNDEZ, M. A. et al. New Insights into the Mechanism of Action of the Anti-inflammatory Triterpene Lupeol. **J. Pharm. Pharmacol.**, 53, p. 1533-1539, 2001.
151. CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for Chemoprevention. **Cancer Lett.**, v. 263(1), p. 1-13, 2008.
152. SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P. Effect of Lupeol and Lupeol Linoleate on Lipemic-hepatocellular Aberrations in Rats Fed a High Cholesterol Diet. **Mol Nutr. Food Res.**, v. 50(12), p. 1212-1219, 2006.
153. SUDHAHAR, V. et al. Remedial Effect of Lupeol and its Ester Derivative on Hypercholesterolemia-induced Oxidative and Inflammatory Stresses. **Nutr. Res.**, v. 27(12), p. 778-787, 2007.
154. GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P.; LATHA, R. M. Effect of Triterpenes from *Crataeva nurvala* Stem Bark on Lipid Peroxidation in Adjuvant Induced Arthritis in Rats. **Pharm. Res.**, 37, p. 191-195, 1998.
155. SALEEM, M. et al. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-mediated Apoptotic Death of Androgen-sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. **Cancer Res.**, v. 65(23), p. 11203-11213, 2005.
156. SALEEM, M. et al. Lupeol Inhibits Growth of Highly Aggressive Human Metastatic Melanoma Cells *in vitro* and *in vivo* by Inducing Apoptosis. **Clin. Cancer Res.**, v. 14(7), p. 2119-2127, 2008.

157. PREETHA, S. P. et al. Lupeol Ameliorates Aflatoxin B1-induced Peroxidative Hepatic Damage in Rats. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 143(3), p. 333-339, 2006.
158. PRASAD, S. et al. Protective Effects of Lupeol and Mango Extract Against Androgen Induced Oxidative Stress in Swiss Albino Mice. **Asian J. Androl.**, 10, p. 313-318, 2008.
159. HAQUE, M. E. et al. Triterpenoids from the Stem Bark of *Crataeva nurvala*. **Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.**, v. 97(1), p. 71-74, 2008.
160. MOHAMMED, M. M. D. et al. Anti-HIV-1 and Cytotoxicity of the Alkaloids of *Erythrina abyssinica* Lam. Growing in Sudan. **Natural Product Research**, v. 26(17), p. 1565-1575, 2012.
161. SERRANO, M. A. R. et al. Anxiolytic-like Effects of *Erythrinian* Alkaloids from *Erythrina suberosa*. **Quim. Nova**, v. 34(5), p. 808-811, 2011.
162. ROSA, D. S. et al. Erysothrine, an Alkaloid Extracted from Flowers of *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth: Evaluating its Anticonvulsant and Anxiolytic Potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23(3), p. 205-212, 2012.
163. OZAWA, M. et al. TRAIL-enhancing Activity of *Erythrinan* Alkaloids from *Erythrina velutina*. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 19(1), p. 234-236, 2009.
164. BELTRÁN, O. G. et al. Structural Reassignment of Epierythratidine, an Alkaloid from *Erythrina fusca*, Based on NMR Studies and Computational Methods. **J. Chil. Chem. Soc.**, 57(3), p. 1323-1327, 2012.
165. TAO, R.; WANG, C. Z.; KONG, Z. W. Antibacterial/Antifungal Activity and Synergistic Interactions Between Polyphenols and Other Lipids Isolated from *Ginkgo biloba* L. Leaves. **Molecules**, v. 18(2), p. 2166-2182, 2013.
166. TANAKA, A.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Antibacterial Compounds from Shoot Skins of Moso Bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Journal of Wood Science**, v. 59(2), p. 155-159, 2013.
167. MATHABE, M. C. et al. Antibacterial Activities and Cytotoxicity of Terpenoids Isolated from *Spirostachys africana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116(1), p. 194-97, 2008.
168. SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four Pentacyclic Triterpenoids with Antifungal and Antibacterial Activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C. A. Sm. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119(2), p. 238-244, 2008.
169. BALANDRIN, M. F. et al. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**, v. 228(5), p. 1154-1160, 1985.
170. DI GIOVANNI, S. et al. *In vitro* Screening Assays to Identify Natural or Synthetic Acetylcholinesterase Inhibitors: Thin Layer Chromatography Versus Microplate Methods. **Eur J Pharm Sci**, v. 33(2), p. 109-119, 2008.

171. HUSSAIN, S. S. A New Alkaloid from Flowers of *Erythrina stricta*. **Journal of Sciences**, v. 13(1), p. 35-38, 2002 .
172. SINGH, H.; CHAWLA, A. S. Isolation of Erysodine, Erysotrine and Hypaphorine from *Erythrina suberosa* Roxb. Seeds. **Experientia**, v. 25(8), p. 785, 1969.
173. BARROS, G. S. G. et al. Pharmacological Screening of Some Brazilian Plants. **Pharm. Pharmacol.**, v. 22(2), p. 116, 1970.
174. BONATERRA, G. A. et al. Mechanisms of the Anti-proliferative and Anti-inflammatory Effects of the Herbal Fixed Combination STW 5 (Iberogast®) on Colon Adenocarcinoma (HT29) Cells *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 20(8-9), p. 691-698, 2013.
175. SAKULNARMRAT, K. et al. Cytoprotective and Pro-apoptotic Activities of Native Australian Herbs Polyphenolic-rich Extracts. **Food Chem.**, v. 136(1), p. 9-17, 2013.
176. STILL, P. C. et al. Alkaloids from *Microcos paniculata* with Cytotoxic and Nicotinic Receptor Antagonistic Activities. **J. Nat. Prod.**, v. 76(2), p. 243-249, 2013.
177. WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. Califórnia, 2010. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010202&representation=PDF>. Acesso em 11 de julho de 2013.
178. HA, T. T. N. et al. Elevated Levels of Cell-free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **Plos One**, v. 6(10), e25969, 2011.
179. INNOK, P.; RUKACHAISIRIKUL, T.; SUKSAMRARN, A. Flavanoids and Pterocarpanes from the Bark of *Erythrina fusca*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57(9), p. 993-996, 2009.
180. CUI, L.; THUONG, P. T.; LEE, H. S.; et al. Four New Chalcones from *Erythrina abyssinica*. **Planta Med.**, v. 74(4), p. 422-426, 2008.