



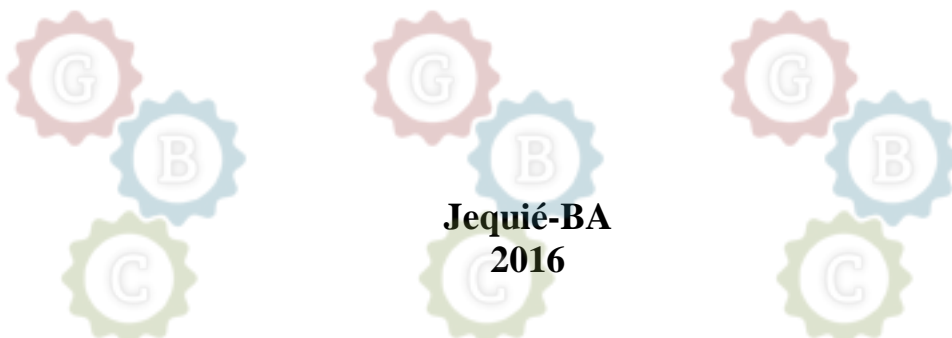
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS
FOLHAS DE *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine***



LÉIA ALEXANDRE ALVES

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**Jequié-BA
2016**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



LÉIA ALEXANDRE ALVES

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine*



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlúcia Fonseca de Paula

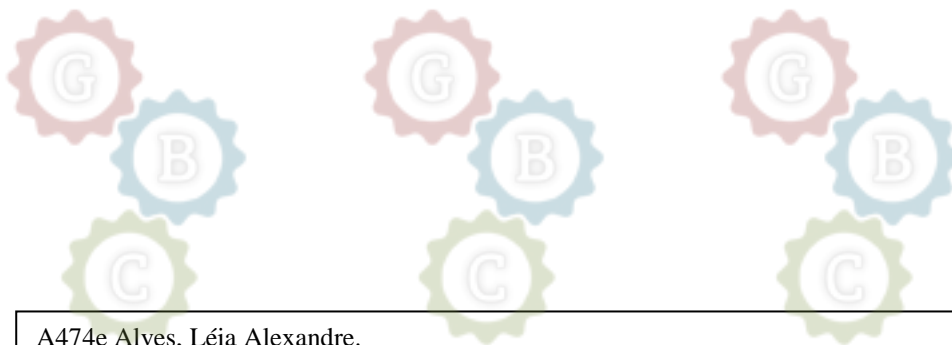


**Jequié-BA
2016**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



A474e Alves, Léia Alexandre.

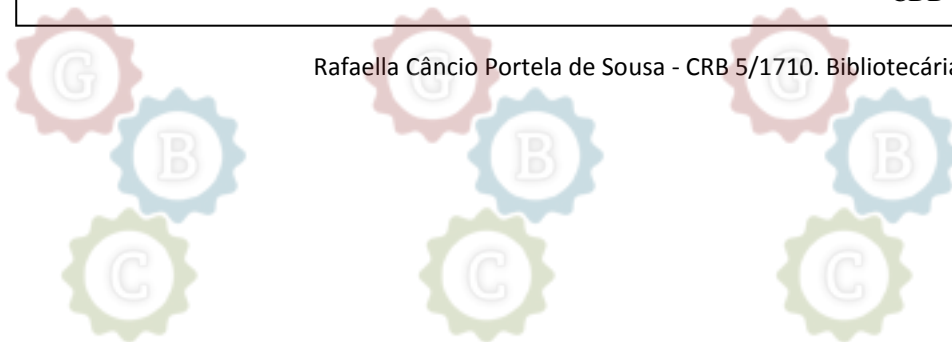
Estudo fitoquímico e potencial farmacológico das folhas de *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine*/ Léia Alexandre Alves.- Jequié, 2016. 114f.

(Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof^ª. Prof^ª. Dr^ª. Vanderlúcia Fonseca de Paula)

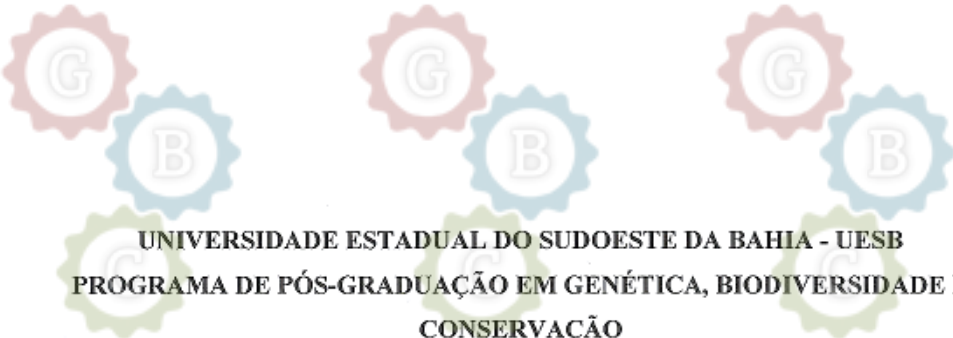
1. Alcaloides tropânicos 2. Citotoxicidade 3. Anticolinesterásica 4. Hipoglicemiante 5. *Erythroxylum* I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 333.9516

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: Estudo fitoquímico e potencial farmacológico das folhas de *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine*.

Autor (a): Léia Alexandre Alves

Orientador (a): Profa. Dra. Vanderlucia Fonseca de Paula

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Profª. D. Sc. Vanderlucia Fonseca de Paula – UESB / Jequié-BA

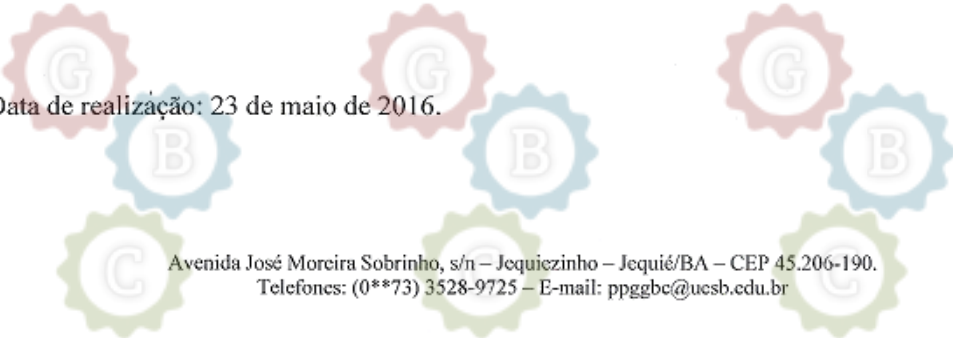


Profª. D. Sc. Regiane Yatsuda – UFBA / Vitória da Conquista-BA



Prof. D. Sc. Daniel de Melo Silva – UESB/ Jequié-BA

Data de realização: 23 de maio de 2016.



Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br

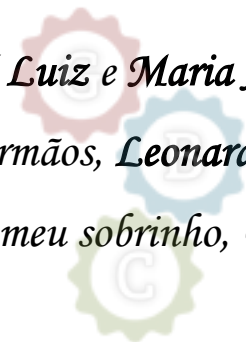


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dedicatória



Aos meus pais, José Luiz e Maria Aparecida.

Aos meus irmãos, Leonardo e Lucas.

Ao meu sobrinho, Guilherme.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Agradecimentos

A Deus

À Ele toda honra e glória por essa conquista!

Porque Ele abençoou e permitiu que eu alcançasse mais essa vitória em minha vida.

Graças Te rendo Senhor!

À Minha Família

Aos meus amados pais, José Luiz e Maria Aparecida, pelo amor e dedicação.

Pelas orações que, tenho certeza, me ajudaram a enfrentar os momentos de desânimo e dificuldades.

Aos meus irmãos, Leonardo e Lucas, pelo carinho e pelas gentilezas, principalmente, durante esse período.

Ao meu amado, Glauco, por todo apoio e incentivo. Por toda a sua disponibilidade, ajudando a tornar o fardo desse trajeto mais leve.

Vocês foram essenciais para essa conquista!

Aos Mestres e Amigos

À minha orientadora, profa. Vanderlúcia Fonseca de Paula, pelos ensinamentos, dedicação e confiança.

À profa. Julita Borges, pelo incentivo e apoio precioso em todos os momentos.

Ao amigo Lauro Caires, pela amizade, dedicação e todo o apoio.

À amiga Anny Carolayne Tigre, pelo carinho, confiança e amizade.

Faltam-me palavras para agradecer vocês!



Aos Colaboradores

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - PPGGBC.

À Profa. Guadalupe Macedo e ao Herbário da UESB.

À Profa. Suzimone Correia e demais colegas do LPN - UESB.

Ao colega David Caires - UESB.

Ao Laboratório de Cromatografia - UESB.

À Profa. Solange de Paula - UESB.

Ao Prof. Raphael Queiroz e às colegas Rafaella Valete, Michele Santos e Danielba da Silva - UESB.

Ao Prof. Ramom El-Bachá do Laboratório de Neuroquímica - UFBA.

Ao Prof. Clayton Alves e à Danielle Silva - UEFS.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - UFV.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Ao Prof. John Boukouvalas do Département de Chimie - Université Laval

– Canadá.



RESUMO

Erythroxylum é o gênero mais representativo da família Erythroxylaceae, que possui ampla distribuição na Região Nordeste do Brasil e se destaca pela presença de alcaloides tropânicos, terpenos e flavonoides, importantes classes de metabólitos secundários biologicamente ativos. *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine* são espécies endêmicas no Brasil, para as quais não existem estudos químicos ou biológicos publicados. Visando contribuir para o conhecimento químico e do potencial biológico de espécies do gênero *Erythroxylum*, que ocorrem no estado da Bahia, este estudo objetivou identificar os metabólitos secundários das folhas de *E. macrocalyx* e *E. affine* e avaliar a ação biológica dos seus extratos, frações e substância isolada. A investigação fitoquímica de *E. macrocalyx* revelou que os alcaloides tropânicos são os principais constituintes das folhas, dos quais, dois foram isolados, sendo um deles identificado, como 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano. Em *E. affine*, estes alcaloides estão ausentes ou em baixas concentrações, e portanto, não foram detectados. A quantificação de fenólicos totais revelou maior teor desses compostos no extrato etanólico bruto das folhas de *E. affine*. As atividades biológicas avaliadas no presente estudo, incluíram os testes, *in vitro*, anticolinesterásico, hipoglicemiante, antibacteriano e antitumoral sobre células do Sistema Nervoso Central (SNC). Os resultados revelaram que o extrato etanólico e as frações hexânica, acetato de etila e butanólica das folhas de *E. affine* apresentaram ação inibitória da acetilcolinesterase (49,5%, 8,0%, 56,0% e 46,2%, respectivamente), enquanto que as frações acetato de etila e butanólica apresentaram inibição significativa (94,5% e 96,6%, respectivamente) sobre a atividade da α -amilase (hipoglicemiante). Ao contrário, o extrato etanólico e frações de *E. macrocalyx* apresentaram baixa e nenhuma atividade hipoglicemiante e anticolinesterásica, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método de Tukey para avaliar os resultados das amostras entre si. Nenhuma atividade antibacteriana foi observada para os extratos e frações de *E. affine* e *E. macrocalyx*, bem como para o alcaloide 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano. Este, apresentou baixa citotoxicidade sobre glioma murino (C6) e astrócitos. Os resultados apresentados pelas frações da *E. affine* sobre a atividade da acetilcolinesterase e α -amilase foram positivos o que permite criar a perspectiva de isolamento de metabólitos nessas frações para averiguação e possível atribuição da resposta biológica aos compostos isolados. O alcaloide tropânico inédito isolado por este estudo revelou baixa toxicidade sobre às células do SNC o que confere segurança para que outros testes sejam realizados com a molécula.

Palavras-chave: Alcaloides tropânicos. Citotoxicidade. Anticolinesterásica. Hipoglicemiante. *Erythroxylum*.



ABSTRACT

Erythroxylum is the most representative genre of Erythroxylaceae family, which has extensive distribution in northeastern Brazil and is distinguished by the presence of tropânicos alkaloids, terpenes and flavonoids, important classes of biologically active secondary metabolites. *Erythroxylum macrocalyx* and *Erythroxylum affine* are endemic in Brazil, for which there are no chemical or biological studies published. To contribute to the chemical knowledge and the biological potential of the genus *Erythroxylum* that occur in the state of Bahia, this study aimed to identify the secondary metabolites of *E. macrocalyx* and *E. affine* leaves and evaluate the biological activity of its extracts, fractions and isolated substance. The phytochemical research *E. macrocalyx* revealed that tropânicos alkaloids are the main constituents of the leaves of which, two were isolated, one of them identified as 6 β ,7 β -dibenzoyloxy-3 α -hidroxitropano. *E. affine*, these alkaloids are absent or in low concentrations, and therefore were not detected. The quantification of total phenolics showed higher content of these compounds in ethanol extract of the leaves of *E. affine*. The biological activities evaluated in this study included testing in vitro anticholinesterase, hypoglycemic, antibacterial and antitumor activity on cells of the Central Nervous System (CNS). The results revealed that the ethanol extract and all fractions hexane, ethyl acetate and butanol sheets of *E. affine* showed inhibitory action on acetylcholinesterase (49,5%, 8,0%, 56,0% e 46,2% and 46.2%, respectively), where as only the fractions ethyl acetate and butanol showed significant inhibition (94,5% e 96,6%, respectively) on the activity of α -amylase (hypoglycaemic). Instead, the ethanol extract and fractions *E. macrocalyx* showed low and no hypoglycaemic and anticholinesterase activity, respectively. Statistical analyzes were performed by analysis of variance (ANOVA) using the Tukey's method for evaluating the results of samples between them. No antibacterial activity was observed for the extracts and fractions *E. affine* and *E. macrocalyx* as well as the alkaloid 6 β ,7 β -dibenzoyloxy-3 α -hidroxitropano. This, showed low cytotoxicity on murine glioma (C6) and astrocytes. The results presented by fractions of *E. affine* on the activity of acetylcholinesterase and α -amylase were positive allowing create the prospect of isolation of metabolites in these fractions for investigation and possible allocation of biological response to isolated compounds. The new tropânico alkaloid isolated by this study showed low toxicity of the CNS cells which provides security so that other tests are performed with the molecule.

Keywords: Alkaloids tropânicos. Cytotoxicity. Anticholinesterasic. Hypoglycemic. *Erythroxylum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas da <i>E. macrocalyx</i>	22
Figura 2. Folhas da <i>E. affine</i>	22
Figura 3. Estrutura do alcalóide tropânico	29
Figura 4. Biossíntese do anel tropânico.....	30
Figura 5. Estrutura química: A) Atropina; B) Escopolamina.....	31
Figura 6. Estrutura química da cocaína	32
Figura 7. Desenho experimental.....	43
Figura 8. Exsicata da <i>E. macrocalyx</i> depositada no HUESB	44
Figura 9. Exsicata da <i>E. affine</i> depositada no HUESB.....	45
Figura 10. Esquema do procedimento de obtenção da fração total de alcalóides	47
Figura 11. Resultado positivo para a FDCM-2 de <i>E. macrocalyx</i> por meio da análise de CCD	49
Figura 12. Esquema do fracionamento da FDCM-2 da <i>E. macrocalyx</i> obtida por coluna cromatográfica.....	50
Figura 13. Esquema do fracionamento da FDCM-2 da <i>E. macrocalyx</i> obtida por coluna cromatográfica.....	50
Figura 14. Esquema de obtenção das frações hexano, acetato de etila e butanólica pelo procedimento de partição líquido-líquido.....	51
Figura 15. Esquema de obtenção das frações acetato de etila e butanólica da <i>E. macrocalyx</i> e isolamento dos principais constituintes químicos	52
Figura 16. Espectro de Infravermelho (ATR) de SI-1.....	63
Figura 17. Cromatograma de SI-1 (CG-EM-IE)..	64
Figura 18. Espectro de Massas de SI-1 (CG-EM-IE).....	64
Figura 19. Anel tropânico da SI-1.....	65
Figura 20. Fórmula estrutural de SI-2	62
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de SI-1.	67
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de SI-1.	68
Figura 23. Principais fragmentações sugeridas para SI-1	69
Figura 24. Mapa de contorno NOESY da SI-1.....	70
Figura 25. Correlações observadas no mapa de contorno de NOESY da SI-1	70
Figura 26. Espectro de COSY da SI-1.....	71

Figura 27. Principais correlações (acoplamentos) observadas no mapa de contorno COSY para o anel tropânico da SI-1	71
Figura 28. Mapa de contorno de HMBC de SI-1 – ampliação 1	72
Figura 29. Mapa de contorno de HMBC de SI-1 – ampliação 2.....	73
Figura 30. Principais correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC da SI-1.....	73
Figura 31. Desenho gerado por computador da estrutura cristalina 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	75
Figura 32. Cromatograma da SI-2 (CG-EM-IE)	75
Figura 33. Espectro de Massas da SI-2 (CG-EM-IE).....	76
Figura 34. Fórmulas estruturais sugeridas para SI-2.....	77
Figura 35. Espectro de RMN de ¹ H da SI-2	79
Figura 36. Espectro de RMN de ¹³ C da SI-2.....	80
Figura 37. Curva padrão da quercetina.....	82
Figura 38. Avaliação da atividade de inibição da acarbose sobre a α -amilase.	86
Figura 39. Avaliação da atividade de inibição da α -amilase pela fração acetato de etila (FAE) da <i>E. affine</i> , nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62 e 31,2 μ g/mL, comparando com a acarbose (C+).....	88
Figura 40. Avaliação da atividade de inibição da α -amilase pela fração butanol (FB) da <i>E. affine</i> , nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62 e 31,2 μ g/mL, comparando com a acarbose (C+).....	88
Figura 41. Efeito citotóxico sobre a morfologia das células C6 após 72 horas de tratamento com a substância 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	92
Figura 42. Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de glioma murino (C6) após exposição com o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano.	92
Figura 43. Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de glioma murino (C6) após exposição com o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	93
Figura 44. Efeito citotóxico sobre a morfologia dos astrócitos após 72 horas de tratamento com a substância 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano.....	95
Figura 45. Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de cultura primária de astrócitos após exposição com o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	96



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das frações obtidas pelo processo de obtenção da fração total de alcalóides	48
Tabela 2. Dados RMN de ^{13}C e ^1H , NOESY, HMBC e ^1H , ^1H -COSY da SI-2	74
Tabela 3. Dados RMN de ^{13}C e ^1H da SI-2	81
Tabela 4. Quantidade de fenólicos totais em <i>E. macrocalyx</i> e <i>E. affine</i>	82
Tabela 5. Resultado da atividade acetilcolinesterásica das amostras de <i>E. affine</i> , <i>E. macrocalyx</i> e SI-1	84
Tabela 6. Resultado da atividade das amostras de <i>E. affine</i> , <i>E. macrocalyx</i> e SI-1 sobre a α -amilase	88
Tabela 7. Halos de inibição das bactérias (em mm) pelo método de difusão em disco.	91



LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das espécies de <i>Erythroxylum</i>	21
Quadro 2. Estruturas de alcaloides tropânicos isolados no gênero <i>Erythroxylum</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AT	Alcaloide Tropânico
BHI	Infusão de cérebro-coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
COSY	Espectroscopia correlacionada (do inglês <i>Correlated Spectroscopy</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5,5'-Ditiobis [2-ácido nitrobenzóico] (do inglês <i>5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]</i>)
EBE	Extrato bruto etanólico
EtOH	Etanol
FDCM-2	Fração Diclorometano 2
FTA	Fração total de alcaloides
g	Gramas (unidade de medida de massa)
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HMBC	Correlação de ligações múltiplas heteronuclear (do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC50	Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IV	Infravermelho
LabNq	Laboratório de Neuroquímica
mg	Miligramas (unidade de medida de massa)
mL	Mililitros (unidade de medida de volume)
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz (unidade de medida de frequência)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolina

NOESY	Espectroscopia de efeito nuclear de Overhauser (do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
PA	Puro
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SI-1	Substância Isolada 1
SI-2	Substância Isolada 2
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UV	Ultra-Violeta
μg	Microlitros (unidade de medida de massa)
μL	Microlitros (unidade de medida de volume)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
d	Dubleto
J	Constante de acoplamento
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
s	Singleto
t	Tripleto
M	Molaridade (quantidade de matéria)
m/z	Razão massa carga
$[M]^+$	Pico do íon molecular



SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE	20
2.2	POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO <i>Erythroxylum</i>	23
2.3	REVISÃO FITOQUÍMICA DO GÊNERO <i>Erythroxylum</i>	24
2.3.1	Alcaloides Tropânicos de <i>Erythroxylum</i>	25
2.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ALCALOIDES	29
2.4.1	Biossíntese	29
2.4.2	Ação biológica e importância dos alcaloides	31
2.5	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL	33
2.5.1	Atividade anticolinesterásica	33
2.5.2	Atividade hipoglicemiante	35
2.5.3	Atividade de sensibilidade bacteriana	36
2.5.4	Atividade antitumoral sobre o SNC.....	37
3.	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	43
4.2	MATERIAL VEGETAL.....	44
4.2.1	Coleta e Identificação Botânica da <i>E. macrocalyx</i> e <i>E. affine</i>	44
4.3	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	45
4.3.1	Obtenção dos extratos brutos.....	45
4.3.2	Obtenção da fração total de alcaloides	46
4.3.3	Avaliação do perfil fitoquímico.....	48
4.3.4	Fracionamento e purificação de <i>E. macrocalyx</i>	49
4.3.5	Partição líquido-líquido de <i>E. macrocalyx</i> e <i>E. affine</i>	50
4.3.6	Elucidação da fórmula estrutural das substâncias isoladas de <i>E. macrocalyx</i>	52
4.3.7	Quantificação de fenólicos totais de <i>E. macrocalyx</i> e <i>E. affine</i>	53
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	53
4.2.1	Atividade de inibição da acetilcolinesterase <i>in vitro</i>	53

4.2.2	Atividade de inibição da α -amilase <i>in vitro</i>	55
4.2.3	Atividade antibacteriana por difusão em disco.....	57
4.2.4	Citotoxicidade de glioma murino (C6) e cultura primária de astrócitos pela SI-1	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	63
5.1.1	Substância Isolada 1	63
5.1.2	Substância Isolada 2	75
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	82
5.3	TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	83
5.3.1	Atividade de inibição da acetilcolinestarese <i>in vitro</i>	83
5.3.2	Atividade de inibição da α -amilase <i>in vitro</i>	85
5.3.3	Atividade antibacteriana.....	89
5.3.4	Ensaio de citotoxicidade com linhagem de glioma murino (C6).....	91
5.3.5	Ensaio de citotoxicidade com astrócitos.....	94
6.	CONCLUSÕES	99
	Referências Bibliográficas.....	100
	Anexos.....	114



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Introdução



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

1 INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte potencial para a descoberta de novos fármacos devido ao grande número de substâncias produzidas pelas diversas espécies. Desde os primórdios da humanidade é relatado o uso de plantas na busca pelo tratamento de enfermidades que acometiam a população. Com o passar dos séculos, o aprimoramento dos estudos e técnicas colaborou para que os produtos naturais, além de fornecerem a matéria-prima para a produção de fármacos, fossem capazes de permitir a elaboração de medicamentos com síntese química planejada a partir de protótipos naturais.

A variedade de substâncias originadas de fontes naturais aumenta a oportunidade de novos estudos sobre os benefícios destes produtos e projeta expectativas para o endosso do seu potencial terapêutico. Uma vez que, uma considerável parte dos fármacos disponíveis no mercado é originada de produtos naturais, ou mesmo, planejada quimicamente a partir destes, o interesse pelo estudo de moléculas biologicamente ativas de compostos naturais, é criar informações que possam ser úteis para a ampliação da farmacoterapia.

A descoberta de novos fármacos e o bom êxito na indústria farmacêutica é uma das consequências dos estudos sobre o potencial dos produtos naturais. Nos países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos originam-se de plantas, e aproximadamente 120 compostos empregados na terapia moderna, são produzidos a partir de 90 espécies (AGUIAR et al., 2012). Além dos medicamentos, os produtos vegetais são fortemente empregados na indústria de cosméticos e de alimentos, demonstrando importância destes nos dias atuais.

A diversidade de espécies vegetais no Brasil é favorável ao desenvolvimento de estudos sobre os produtos naturais. O país possui uma extensa variedade de espécies e grande parte dessa riqueza natural, pode ser encontrada na região semiárida. No entanto, a investigação por novas moléculas com ação farmacológica ainda é pouco explorada nessa região.

O gênero *Erythroxylum* possui ampla distribuição no território brasileiro, principalmente no estado da Bahia. Estudos realizados com algumas espécies deste gênero identificaram metabólitos secundários com importantes atividades biológicas, o que desperta o interesse por espécies ainda não investigadas, bem como a avaliação da atividade farmacológica dos seus metabólitos.

Assim, esta pesquisa dedicou-se à identificação dos constituintes químicos das folhas de *E. macrocalyx*, uma espécie até então, não estudada. E também, à avaliação da atividade

biológica dos extratos e frações das folhas desta espécie, bem como, das folhas *E. affine*, pois reconhece a importância desses estudos na busca por moléculas com perfil farmacológico. Desse modo, buscou-se contribuir para o conhecimento científico de espécies do gênero *Erythroxylum*.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Fundamentação Teórica



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE

A família Erythroxylaceae Kunth está classificada no sistema Grupo de Filogenia das Angiospermas - APG III (2009). O sistema apresenta a relação entre as ordens e algumas famílias de angiospermas. A Malpighiales é a maior ordem de Rosídeas, da qual faz parte a família Erythroxylaceae (SOUZA & LORENZI, 2005). Estudos em filogenia têm revelado grande semelhança entre Erythroxylaceae e Rhizophoraceae, podendo ser considerada, por alguns autores, como uma só família, devido às características morfológicas e anatômica que possuem (COSTA-LIMA & ALVES, 2015b; LOIOLA et al., 2007).

As principais características botânicas da Erythroxylaceae são a apresentação em forma de arbustos ou árvores, com folhas alternas espiraladas, simples, estípulas intrapeciolares, mais persistentes que as folhas e margem inteira. Sua inflorescência é cimosa, e geralmente limita-se a uma única flor ou a fascículos. As flores são pouco vistosas e os frutos drupa (SOUZA & LORENZI, 2005).

A família Erythroxylaceae possui quatro gêneros identificados como *Erythroxylum* P. Browne, *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonça. Entretanto, somente o gênero *Erythroxylum* P. Browne, possui ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais da América, África, Sudeste da Ásia e Oceania, enquanto os outros três gêneros estão limitados ao continente africano (ARAÚJO et al., 2014; COSTA-LIMA et al., 2014; LOIOLA et al., 2007).

Erythroxylaceae possui aproximadamente 250 espécies (COSTA-LIMA & ALVES, 2015a), sendo o gênero *Erythroxylum* o mais representativo, com uma abrangência de 97% das espécies (RIBEIRO et al., 2013). Destas, 187 são encontradas na América tropical (COSTA-LIMA et al., 2014), e 127 no território brasileiro, das quais 83 são espécies endêmicas (LOIOLA & COSTA-LIMA, 2016).

A Região Nordeste do Brasil concentra grande quantidade de *Erythroxylum*, com cerca de 70 espécies já localizadas, e com destaque para o estado da Bahia que reúne o maior número (ARAÚJO et al., 2014). Seu domínio fitogeográfico é mais expressivo na Mata Atlântica, seguida pela Amazônia, Cerrado e Caatinga (LOIOLA & COSTA-LIMA, 2016).

Os registros de *Erythroxylum* no Brasil são crescentes, conforme observado pelos inúmeros estudos publicados sobre diferentes espécies localizadas no país. Esse número vem sendo atualizado frequentemente pelo sistema “Lista de Espécies da Flora do Brasil”, uma

versão *on-line* com informações sobre nomenclatura e distribuição geográfica da flora brasileira que é administrado pelo Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro com a colaboração de pesquisadores brasileiros e estrangeiros.

Em consulta realizada a esse sistema, sobre a distribuição de *Erythroxylum*, observou-se a ocorrência da espécie *E. macrocalyx* nos estados da Bahia, Sergipe (Região Nordeste) e Minas Gerais (Região Sudeste) e de *E. affine* na Bahia, Alagoas, Pernambuco, Sergipe (Região Nordeste), Espírito Santo e Rio de Janeiro (Região Sudeste). É válido destacar que não foram encontrados estudos químicos ou biológicos sobre ambas as espécies, na base de dados *PubMed*, *Web of Science*, *Scielo* e *Scifinder*, evidenciando assim, a relevância do presente estudo, por ser este o primeiro trabalho desenvolvido sobre estudo químico e biológico de *E. macrocalyx* e *E. affine*.

A classificação botânica das espécies *E. macrocalyx* e *E. affine*, segundo Oliveira (2012, apud CRONQUIST, 1988), são mostradas no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação das espécies de *Erythroxylum*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malpighiales
Família	Erythroxylaceae
Gênero	<i>Erythroxylum</i>
Espécie	<i>Erythroxylum macrocalyx</i> <i>Erythroxylum affine</i>

A *E. macrocalyx* também se apresenta como árvore com cerca de 8 metros de altura, folhas com estípulas de, aproximadamente, 2 mm de comprimento, com margem inteira e flores pediceladas (ARAÚJO et al., 2014). *E. macrocalyx* é endêmica no Brasil e possui distribuição geográfica na Mata atlântica, Cerrado e Caatinga (LOIOLA e COSTA-LIMA, 2014).



Figura 1. Folhas da *Erythroxylum macrocalyx*.

A *E. affine* é considerada endêmica no Brasil, com distribuição geográfica na Mata atlântica (LOIOLA e COSTA-LIMA, 2014). Suas folhas são simples e alternas, apresentando-se como árvore com 8 metros de altura, aproximadamente.



Figura 2. Folhas da *Erythroxylum affine*.

2.2 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO GÊNERO *Erythroxylum*

Os estudos sobre o potencial farmacológico do gênero *Erythroxylum* ainda são pouco explorados, o que fornece informações insuficientes sobre a utilização destas plantas para fins terapêuticos. As espécies já estudadas mostram potencial terapêutico na disfunção renal, infecções hepáticas e vesiculares, problemas respiratórios, como asma, bronquite, pneumonia e tuberculose (RIBEIRO et al. 2013b; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006), reumatismo e doenças venéreas (AGUIAR et al., 2012; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006), cujo mecanismo de ação pode estar envolvido com as ações antiparasitárias (RIBEIRO et al. 2013b; BRINGMANN et al., 2000), antibacterianas e anti-inflamatórias (AGUIAR et al., 2012; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

As principais ações terapêuticas atribuídas às espécies *Erythroxylum* mencionadas em estudos etnofarmacológicos são, por exemplo, o *E. argentinum* O. E. Schulz, popularmente conhecida como cocão, para tratamento de problemas respiratórios (BAPTISTA et al., 2013; BUSSMANN, 2013); *E. ampliofolium* (Mart.) O. E. Schulz para casos de disfunção erétil (LOZANO et al., 2014); *E. argentinum* com ação antiinflamatória (LIMA et al., 2011); *E. ferrugineum* Cav. indicada em casos de diarreia, anemia e para evacuação da placenta; *E. gerrardii* Baker em casos de febre amarela e epilepsia (RAZAFINDRAIBE et al., 2013); *E. minutifolium* Griseb para problemas musculares, hepáticos, infecção vesicular e renal, além da atividade anti-inflamatória e antibacteriana; *E. confusum* Britt. com ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiviral (RODEIRO et al., 2008); e *E. havanense* para dores no ovário e edemas (VOLPATO et al., 2009).

Resultados positivos para ensaios biológicos, visando à busca por ação farmacológica, foram demonstrados em estudos, por exemplo, com alcaloides tropânicos (AT) isolados da *E. rotundifolium*, que comprovaram atividade contra células de carcinoma epidermóide oral (KB-V1), multirresistentes à drogas tradicionais (CHÁVEZ et al., 2002). A atividade antitumoral de AT isolados de *E. pervillei* também foi evidenciada pelo aumento da ação de drogas anti-neoplásicas contra células KB-V1 e reversão da resistência de medicamentos utilizados contra adenocarcinoma de ovário humano (SILVA et al., 2001). O extrato metanólico da *E. caatingae* apresentou uma significativa redução de células tumorais em ratos, transplantados com sarcoma 180, e um alcalóide isolado da mesma espécie exibiu atividade citotóxica significativa contra linhagens de câncer de pulmão (NCI-H292) (OLIVEIRA et al., 2011). A cocaína, isolada da *E. coca*, causou uma redução significativa da viabilidade de astrogliomas C6 (BADISA e GOODMAN, 2012). A sua ação também foi

observada na indução erétil, por aumento da pressão intracavernosa em ratos (CHAN et al., 1996). Os extratos e frações de *E. caatingae* apresentaram citotoxicidade em linhagem de células de câncer de pulmão (NCI-H292), laringe (HEp-2) e leucêmicas (K562) e as frações mostraram-se efetivas contra bactérias gram-positivas e fungos (AGUIAR et al., 2012). O extrato metanólico de *E. pulchrum* também inibiu o crescimento de linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas (ALBUQUERQUE et al., 2014). Os Extratos de *E. minutifolium* e *E. confusum* em culturas primárias de hepatócitos, tratadas com toxinas, revelaram uma redução dos danos hepáticos, apresentando efeito hepatoprotetor (RODEIRO et al., 2008), assim como o extrato metanólico de *E. monogynum* em ratos com toxicidade hepática induzida pelo paracetamol (SYED e NAMDEO, 2013).

2.3 REVISÃO FITOQUÍMICA DO GÊNERO *Erythroxylum*

Os principais metabólitos secundários produzidos por plantas são classificados em três grandes grupos: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos. Dentre estes, os mais citados nos estudos sobre espécies de *Erythroxylum*, são os alcaloides (GRIFFIN e LIN, 2000; Brachet et al. 1997). De um modo geral, o gênero é caracterizado pela presença de alcaloides, taninos, terpenos e fenilpropanoides (BARBOSA et al., 2014; BARREIROS et al., 2005).

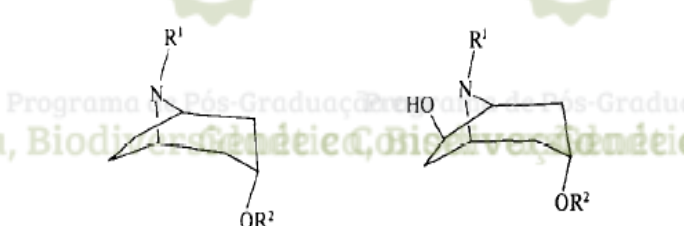
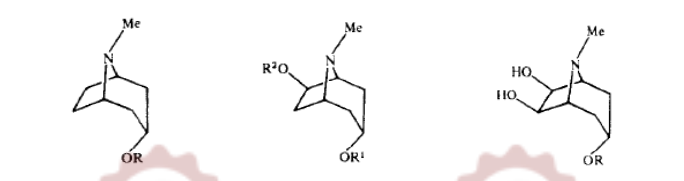
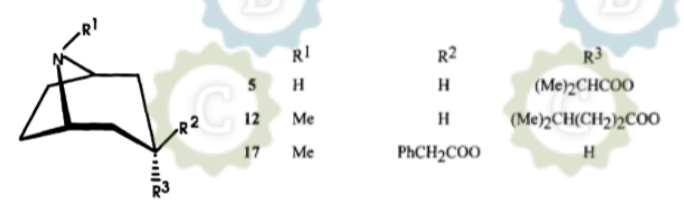
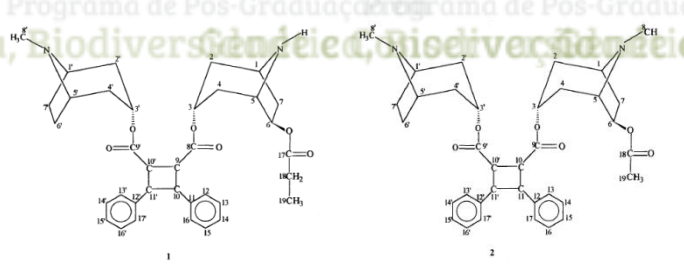
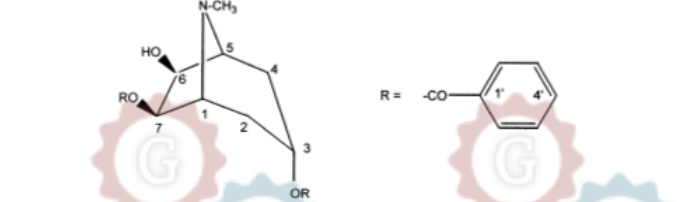
Segundo um levantamento bibliográfico publicado em 2010, 186 alcaloides tropânicos (AT) foram identificados em 35 espécies *Erythroxylum* (OLIVEIRA et al., 2010). Outros metabólitos identificados no gênero são, por exemplo, flavonoides glicosilados isolados das folhas de *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE et al., 2014); taninos, flavonoides glicosilados, esteróides e fenóis identificados no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. monogynum* (KUMAR et al., 2014); diterpenos no caule de *E. betulaceum* (RIBEIRO et al., 2013a); Flavonoides e diterpenoides no extrato etanólico das folhas da *E. suberosum* (NASCIMENTO et al., 2012); diterpenos no fruto maduro de *E. passerinum* e *E. nummularia* (BARREIROS et al., 2007); flavonoides e ésteres de ácidos graxos triterpênicos nas folhas da *E. nummularia* (BARREIROS et al., 2005); flavonoides, do tipo flavonóis, nos ramos e folhas de *E. minutifolium*, *E. confusum*, *E. areolatum* e *E. suave* (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006); e diterpenos em *E. areolatum*, *E. argentinum*, *E. brevipes*, *E. cuneatum*, *E. cunefolium*, *E. deciduum*, *E. delagoense*, *E. emarginatum*, *E. macrocarpum*, *E. microphyllum*, *E. minutifolium*, *E. myrsinites*, *E. neocalidonium*, *E. rotundifolium*, *E. sideroxyloides*, *E. zambesiicum* e *E. sp.* (ANSELL et al., 1993).

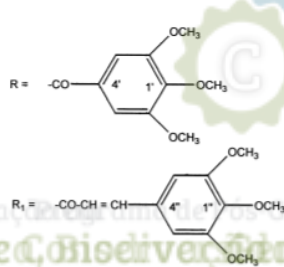
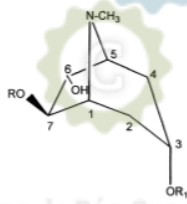
2.3.1 Alcaloides Tropâmicos de *Erythroxylum*

A presença de alcaloides no gênero *Erythroxylum* é abundante. Dentre eles, um dos mais conhecidos é a cocaína, identificado na espécie *E. coca*, o qual apresenta intensa atividade estimulante sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) (BRESLERET al., 2000). Outros estudos já apontaram para a presença da cocaína na espécie *E. novogranatense*, em concentrações menores (BIERI et al., 2006).

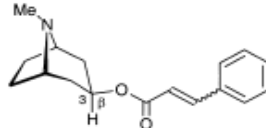
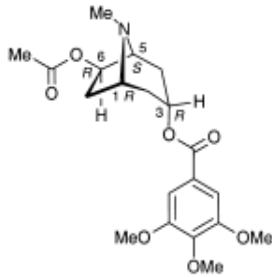
O número crescente de estudos sobre espécies de *Erythroxylum* tem confirmado a abrangência de alcaloides tropâmicos (AT) no gênero e contribuído para a identificação de novos AT. Uma consulta bibliográfica em estudos publicados entre 1986 a 2013 sobre espécies *Erythroxylum*, mostrou que 47% dos alcaloides tropâmicos identificados eram inéditos. Por exemplo, Al-Said e colaboradores (1986), isolaram seis alcaloides tropâmicos nas espécies *E. macrocarpum* e *E. sideroxyloides*, dos quais três foram considerados novos. El-Imam e colaboradores (1988), identificaram dez AT no estudo das espécies *E. cuneatum*, *E. ecarinatum* e *E. australe*, sendo três inéditos. Christen e colaboradores (1995), isolaram vinte e seis AT, sendo três inéditos em *E. monogynum*. Bringmann e colaboradores (2000), identificaram seis AT em *E. zeylanicum*, dos quais três eram novos. Em 1998, foram isolados dois AT inéditos na *E. moonii*, por Rahma e colaboradores, e mais tarde, outros quatro novos (KHATTAK et al., 2002). Payo-Hill e colaboradores (2000), identificaram um AT inédito em *E. alaternifolium* e outro em *E. rotundifolium*. Esta última, também foi estudada por Chavez e colaboradores (2002), que isolaram seis AT, sendo três considerados novos. Em 2001, Silva e colaboradores isolaram nove alcaloides na *E. pervillei*, dos quais sete eram inéditos. Zuanazzi e colaboradores (2001) identificaram três AT na *E. argentinum*, sendo um inédito. Na *E. vacciniifolium*, Zanolari e colaboradores (2002), identificaram seis novos AT. Sena-Filho e colaboradores (2010) isolaram um novo AT na *E. pungens*. Em 2011, Oliveira e colaboradores, identificaram três alcaloides tropâmicos da *E. caatingae*, sendo um inédito e Ribeiro e colab. (2013b) isolaram um novo AT de *E. rimosum* (Quadro 2).

Quadro 2. Estruturas de alcaloides tropicânicos isolados no gênero *Erythroxylum* (1986-2013)

Estruturas	Espécies	Referências
 <p>1a R¹ = H, R² = PhCO (Bz) 2a R¹ = H, R² = Bz 2b R¹ = Me, R² = Bz</p>	<p><i>E. macrocarpum</i> <i>E. sideroxyloides</i></p>	<p>Al-Said et al., 1986</p>
 <p>1a R = 4-HOC₆H₄CH₂CO 2b R¹ = R² = PhCO 3c R = PhCH=CH-CO</p>	<p><i>E. cuneatum</i>, <i>E. ecarinatum</i> <i>E. australe</i></p>	<p>El-Imam et al., 1988</p>
 <p>R¹ 5 H 12 Me 17 Me R² H H PhCH₂COO R³ (Me)₂CHCOO (Me)₂CH(CH₂)₂COO H</p>	<p><i>E. monogynum</i></p>	<p>Christen et al., 1995</p>
 <p>1 2</p>	<p><i>E. moonii</i></p>	<p>Rahma et al., 1998</p>
 <p>R = -CO-C₆H₄</p>	<p><i>E. alaternifolium</i></p>	<p>Payo-Hill et al., 2000</p>

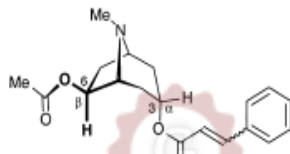


E. rotundifolium Payo-Hill et al.,
2000

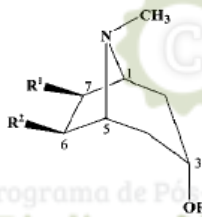


3a cis

E. zeylanicum Bringmann et al.,
2000

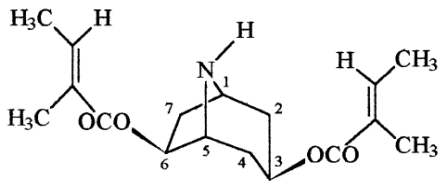


4a cis

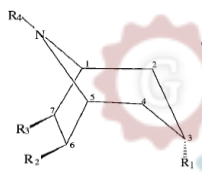


	R ¹	R ²	R ³	Other
3	OH	OTmc	Tmb	--
4	OH	OTmc	Tmb	N→O
5	H	OTmc	Tmb	--
6	H	OTmc	Tmc	--
7	OH	OTmc	Tmc	--
8	H	OTmc	3-HOPhCH ₂ CO	--
9	H	OTmc	PhCH ₂ CO	--

E. pervillei Silva et al., 2001



E. argentinum Zuanazzi et al.,
2001



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	OCOC ² H(C ³ H ₇) ₂	H	OH	H
2	OH	H	OCOC ² H ₃ Ph	H
3	OCOC ² H=C ³ HPh (cis)	H	H	CH ₃
4	OH	OCOC ² H(C ⁴ H ₉)C ³ H(OH)Ph	OH	CH ₃

E. moonii Khattak et al.,
2002

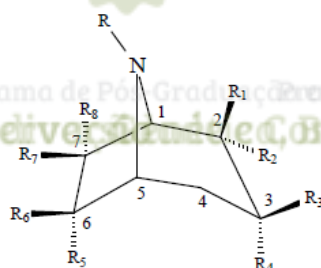
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>OH</td> <td>Tmb</td> <td>Tmc</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>H</td> <td>Bz</td> <td>cis-Tmc</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>H</td> <td>Bz</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R ¹	R ²	R ³	1	OH	Tmb	Tmc	2	H	Bz	cis-Tmc	3	H	Bz	H	<p><i>E. rotundifolium</i> Chavez et al., 2002</p>												
	R ¹	R ²	R ³																											
1	OH	Tmb	Tmc																											
2	H	Bz	cis-Tmc																											
3	H	Bz	H																											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7</td> <td>H</td> <td>Mpc</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>H</td> <td>Mpc</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>Mpc</td> <td>Mpc</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td>Mpc</td> <td>Pc</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>23</td> <td>Mpc</td> <td>Mpc</td> <td>CH₂COO</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>Mpc</td> <td>Mpc</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	7	H	Mpc	OH	13	H	Mpc	H	21	Mpc	Mpc	OH	22	Mpc	Pc	H	23	Mpc	Mpc	CH ₂ COO	24	Mpc	Mpc	H	<p><i>E. vacciniifolium</i> Zanolari et al., 2003</p>
	R ₁	R ₂	R ₃																											
7	H	Mpc	OH																											
13	H	Mpc	H																											
21	Mpc	Mpc	OH																											
22	Mpc	Pc	H																											
23	Mpc	Mpc	CH ₂ COO																											
24	Mpc	Mpc	H																											
		<p><i>E. pungens</i> Sena-Filho et al., 2010</p>																												
		<p><i>E. caatingae</i> Oliveira et al., 2011</p>																												
		<p><i>E. rimosum</i> Ribeiro et al., 2013b</p>																												

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ALCALOIDES

2.4.1 Biossíntese

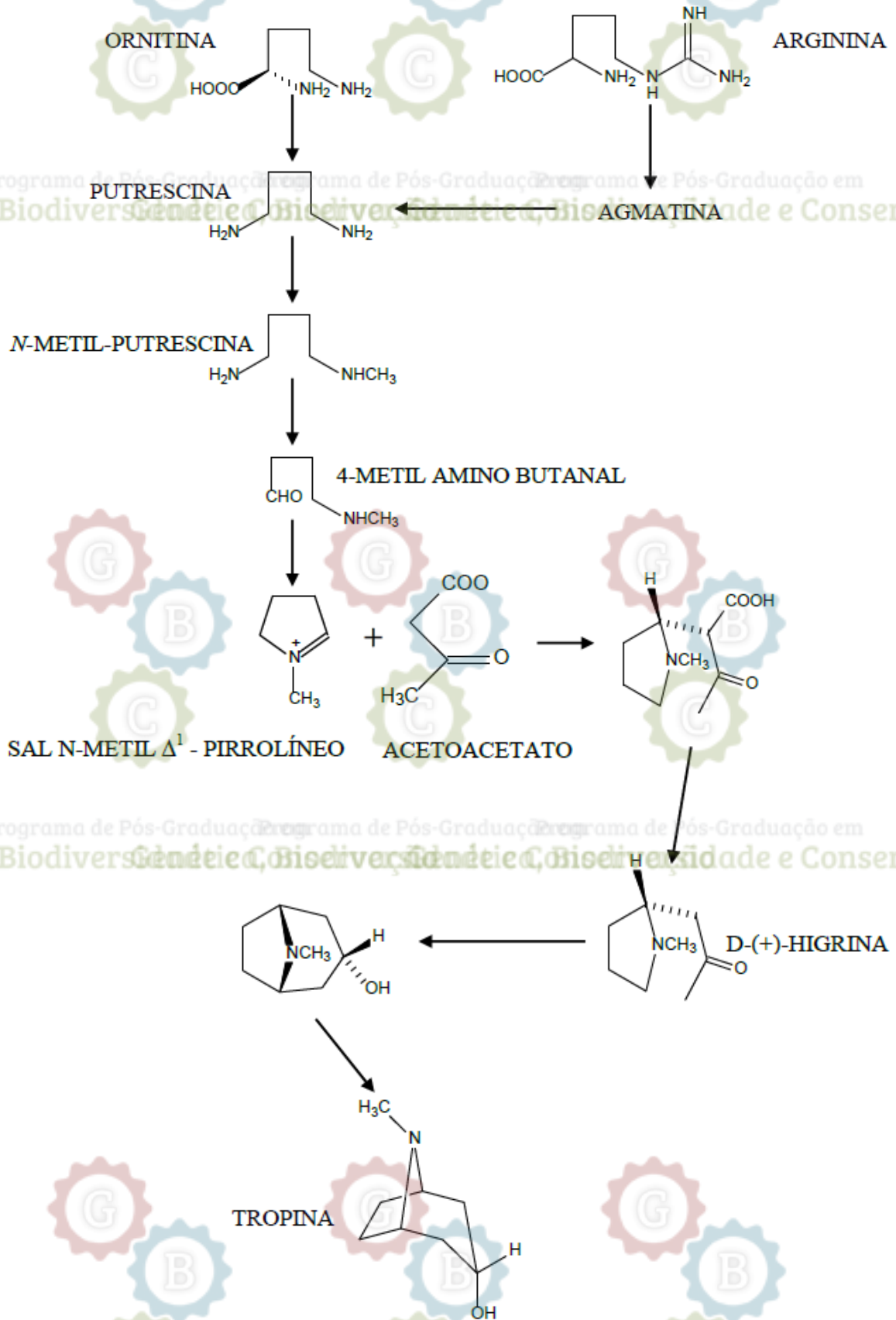
Os alcaloides são compostos nitrogenados, geralmente heterocíclicos, produzidos a partir do metabolismo secundário de plantas, microorganismos e animais marinhos (OLIVEIRA et al., 2009; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2008; CORDELL et al., 2001). São formados por meio de reações moleculares e diferentes precursores biogênicos que permitem diferenciá-los e classificá-los quanto a sua estrutura.

Os alcaloides tropânicos, caracterizados por uma estrutura bicíclica, denominada de tropano 8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano) (Figura 3) são formados pelos anéis pirrolidina e piperidina. A formação do anel pirrolidínico ocorre por meio dos aminoácidos ornitina ou arginina que formam o sal *N*-metil- Δ^1 -pirrolíneo, que é responsável pelo átomo de nitrogênio dos alcaloides, que ao condensar-se com duas moléculas de ácido acético ativo (acetoacetato) forma o ácido do cetocarbônico *N*-metil-pirrolidínico, completando o anel piperidínico, que por descarboxilação forma a D-(+)-higrina que formará o tropanol (Figura 4) (BACCHI, 2007).



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

Figura 3. Estrutura do alcalóide tropânico.



Fonte: BACCHI, 2007.

Figura 4. Biossíntese do anel tropânico.

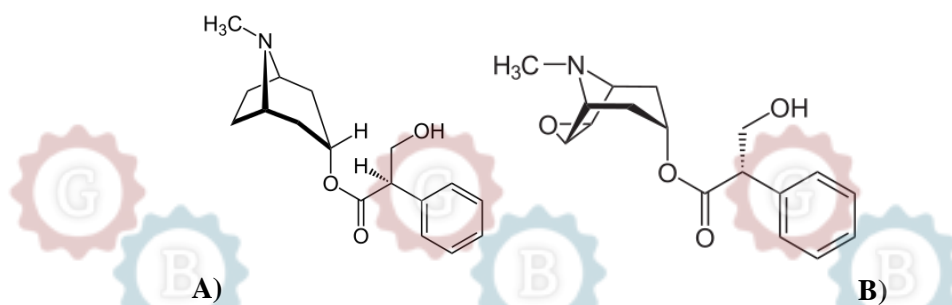
Segundo Cordell e colaboradores (2001), os alcaloides representam cerca de 20% das substâncias naturais conhecidas, e exercem um importante papel terapêutico no desenvolvimento de protótipos e medicamentos sintéticos (BACCHI, 2007).

2.4.2 Ação biológica e importância dos alcaloides

Os primeiros estudos sobre o isolamento de alcaloides foram impulsionados pelo interesse biológico por plantas, registrados em 1819 pelos estudiosos Pelletier e Caventou na Universidade de Paris. Ao passar dos anos, a busca por moléculas com atividade farmacológica revelou o amplo potencial desses compostos. No final do século XX, dentre 119 substâncias de 90 plantas utilizadas para fins terapêuticos, 54 eram alcaloides (CORDELL et al., 2001).

Os vegetais são as principais fontes desse metabólito, que ganhou evidência farmacológica com o desenvolvimento da morfina, primeiro medicamento formulado a partir do estudo dos alcaloides, demonstrando a relevância da substância nos tratamentos contra dores crônicas. O ópio foi isolado do látex de *Papaver somniferum* L. em 1805, passando a ser comercializado como morfina em 1826, com significante atividade hipnoanalgésica (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; FARIAS, 2006; CORDELL et al., 2001).

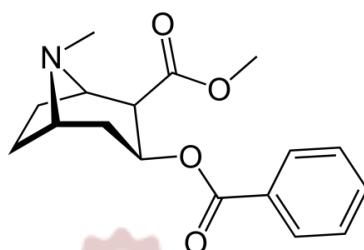
Quanto aos alcaloides tropânicos que tiveram destaque, pode-se citar a atropina e a escopolamina (Figura 5) que foram isolados da família Solanaceae, ambos com ação anticolinérgica. A atropina exerce ação antiespasmódica, broncodilatadora, midriática e antiarrítmica e a escopolamina possui maior atividade em glândulas salivares, brônquicas e sudoríparas. No SNC, enquanto a atropina estimula a medula espinal e o centro cerebral superior, a escopolamina promove depressão do sistema, sendo comumente administrada, por exemplo, como pré-anestésico (BACCHI, 2007).



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/> Acessado em 09/02/2016.

Figura 5. Estrutura química: A) Atropina; B) Escopolamina.

No gênero *Erythroxylum*, a cocaína (Figura 6) é o principal alcalóide tropânico identificado, isolado na *E. coca* por Gaedcke em 1855. Sua notoriedade é atribuída ao seu potencial estimulante do SNC e seus derivados análogos possuem a ação anestésica local (CHAN et al., 1996). A intensa atividade sobre o SNC ocorre devido ao fato de a cocaína exercer a inibição da recaptação de neurotransmissores nos neurônios pré-sinápticos, aumentando assim, a ação agonista dopaminérgica e adrenérgica. No entanto, o seu uso terapêutico é, atualmente, restrito a atividade anestésica local (BRESLER et al., 2000).



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Coca%C3%ADna>. Acessado em 09/02/2016

Figura 6. Estrutura química da cocaína.

A atividade sobre o SNC atribuída aos alcalóides tem um grande interesse terapêutico diante do mecanismo de ação que exercem sobre os receptores de acetilcolina, muscarínicos, adrenérgicos, canais de cálcio, sódio e potássio, além da inibição da acetilcolinesterase e neurotransmissores de captação. Os alcalóides alteram a percepção da realidade (datura e centeio), promovem euforia (ópio), vasoconstrição e alucinações (centeio), inibem a acetilcolinesterase (calabar), são estimulantes (cafeína, teobromina do chocolate), e podem causar dependência (nicotina, a coca e a heroína) (CORDELL et al., 2001).

Estudos realizados com a fração total de alcalóides obtidos a partir de plantas mostraram ação depressora do SNC de camundongos, ocasionando mudanças comportamentais, tais como diminuição da resposta ao toque e ambulação, alteração das funções fisiológicas urinárias e fecais, e contorções abdominais (MONTENEGRO et al., 2010). Outras atividades como anestesia, analgesia e anti-hipertensiva são frequentemente atribuídas aos alcalóides (AGUIAR et al., 2012; BRESLER et al., 2000).

Em síntese, a classe dos alcalóides é ampla, sendo capaz de promover diferentes ações sobre o organismo humano. O desenvolvimento de novos fármacos e modelos

para a produção de substâncias sintéticas estimula energicamente os estudos sobre os produtos naturais (PASSOS et al., 2009).

Por isso, a partir da investigação de alcalóides de espécies ainda não estudadas torna-se necessário fazer uma busca do potencial farmacológico destas moléculas sobre patologias que acometem vários órgãos e sistemas, especialmente, àquelas sobre o SNC, como a Doença de Alzheimer e câncer, às relacionadas a desordens metabólicas, como a diabetes mellitus, e às doenças bacterianas, que estão entre as patologias de interesse de pesquisas com produtos vegetais, com resultados promissores comprovados.

2.5 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL

2.5.1 Atividade anticolinesterásica

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que impede a transmissão de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas por meio da hidrólise da acetilcolina (ACh). Este é um importante neurotransmissor liberado pelos neurônios no sistema nervoso central e periférico e que está associado com as funções de aprendizagem, memória, consciência, sono e controle dos movimentos voluntários (CUARTERO et al., 2012; MOTA et al., 2012).

A perda da atividade colinérgica, ocasionada pela diminuição de acetilcolina em importantes áreas cerebrais está relacionada à doença denominada Mal de Alzheimer (ALIPOUR et al., 2012; ANAND et al., 2012). A doença de Alzheimer é uma desordem degenerativa que ocorre no cérebro de humanos, que acomete cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente, os idosos (CATTO et al., 2013).

A neuropatologia da doença de Alzheimer é observada pela presença de placas beta-amilóide, emaranhados neurofibrilares e atrofia de neurônios colinérgicos. Este último resulta da redução de ACh sináptica. O acúmulo de beta-amilóide em várias áreas do cérebro também induz a doença, e promove alterações bioquímicas neuronais causando danos às células. O fato é que a AChE interage com as beta-amilóides formando fibrilas de amilóide. Portanto, os anticolinesterásicos além de aumentar a

disponibilidade de ACh sináptica, também diminuem a deposição de beta-amilóides (ANAND et al., 2012).

Inibidores de acetilcolinesterase são utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer porque aumentam os níveis de acetilcolina sináptica (ALIPOUR et al., 2012; ANAND et al., 2012). Os medicamentos disponíveis para o tratamento da doença são os sintéticos: tacrina, donepezila e rivastigmina, sendo este último obtido a partir do alcaloide fisiostigmina; e os que são obtidos de plantas: galantamina, extraído de espécies da família Amaryllidaceae (CORTES et al., 2015; MOTA et al., 2012; CARDOSO-LOPES et al., 2009; VIEGAS JR. et al., 2004), e a huperzina A, isolado da planta *Huperzia serrata*, ambos alcaloides (SERENIKI & VITAL, 2008).

Os alcaloides são os principais metabólitos com atividade de inibição da AChE (CARDOSO-LOPES et al., 2009). Estudos têm demonstrado o potencial dessas substâncias como, por exemplo, Cortes e colaboradores (2015) que mostraram a atividade inibitória de duas frações de alcaloides isoladas de espécies Amaryllidaceae. E Atta-ur-Rahman e colaboradores (2001) observaram a ação inibitória de alcaloides triterpenoides isolados de *Buxus papillosa* sobre a AChE.

Outras substâncias isoladas de plantas também têm exercido perfil anticolinesterásico como, por exemplo, as cumarinas e seus derivados com potente ação inibitória da AChE (CATTO et al., 2013; ALIPOUR et al., 2012; ANAND et al., 2012); Compostos peptídicos isolados de Leguminosae com IC₅₀ similar ao controle fisostigmina (ALVES et al., 2013); Chalconas com ação duas vezes maior que o controle positivo (LIU et al., 2014).

As plantas têm demonstrado ser uma fonte em potencial de inibidores de AChE. Essa verificação pode ser notada pelos estudos de Morais e colaboradores (2013) que confirmaram que dentre seis extratos de plantas com atividade de inibição da AChE, dois deles apresentaram perfil de inibição próximo e igual ao controle positivo; Cardoso-Lopes e colaboradores (2009), em um ensaio com 17 espécies, verificaram que 12 inibiram a AChE, sendo que três apresentaram mais de 50% de atividade; Mota e colaboradores (2012), analisaram os extratos aquosos de 13 espécies e revelaram que dentre as seis que apresentaram ação anticolinesterásica, uma possui atividade potente e duas moderadas; Mazzanti e colaboradores (2004) também haviam mostrado em um ensaio *in vivo* que o extrato etanólico de *Syzygium cumini* apresentou efeito inibitório da AChE no cerebelo e córtex cerebral de ratos.

Embora a doença de Alzheimer não tenha cura, os medicamentos utilizados diminuem os seus sintomas, mas apresentam limitações devido à ocorrência de efeitos adversos (CORTES et al., 2015; SERENIKI & VITAL, 2008). Sendo assim, a busca por novas moléculas capazes de inibir a AChE, com menor dano ao organismo dos pacientes é motivo de interesse de diversos pesquisadores que vêm nos produtos de origem vegetal uma oportunidade para descobrir novas drogas terapêuticas.

2.5.2 Atividade hipoglicemiante

A diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas resultante de alterações na secreção e/ou ação da insulina (ALI et al., 2006). A diabetes pode ser classificada em tipo I, quando está relacionada a processos auto-imunes e/ou destruição das células- β pancreáticas e em tipo II, caracterizada por problemas na secreção de insulina ou resistência à mesma (KIM et al., 2011; FUNKE; MELZIG, 2006).

Essas alterações contribuem para o aumento da glicose na corrente sanguínea e no meio extracelular gerando um quadro de hiperglicemia. Desse modo, retardar o metabolismo da glicose e impedir o excesso da molécula na circulação sanguínea é uma medida terapêutica tomada para controle da diabetes (ALI et al., 2006).

O uso de agentes hipoglicemiantes é uma alternativa adotada para o tratamento da diabetes tipo II, podendo ter como objetivo de impedir a atividade das enzimas responsáveis pela catálise dos carboidratos da dieta e, assim, retardar o metabolismo da glicose. Dentre os principais hipoglicemiantes de uso clínico para tratamento da diabetes tipo II estão a acarbose, o miglitol e o voglibose que agem, por exemplo, inibindo a enzima α -amilase (ALI et al., 2006; FUNKE; MELZIG, 2006).

A α -amilase (α -1-4-4-glucano-glucanohidrolase) é uma enzima com importante ação digestiva responsável pela hidrólise de carboidratos. Esse procedimento é essencial para o organismo, pois disponibiliza moléculas menores para serem absorvidas no intestino delgado e liberadas na corrente sanguínea para, em seguida, desempenharem suas funções. Deste modo, os inibidores de α -amilase, ao impedirem esse processo, tornaram-se uma alternativa para o tratamento da diabetes mellitus (BHANDARI et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011).

O uso de plantas para controle da diabetes é uma prática popular antiga, muito comum em países em desenvolvimento (BHANDARI et al., 2008; ALI et al., 2006). O interesse pela atividade terapêutica de produtos naturais é atribuído a sua eficácia, associada a menos efeitos colaterais e menor custo, quando comparados aos medicamentos sintéticos (BHANDARI et al., 2008).

Diante disso, inúmeros estudos têm investigado a atividade inibitória enzimática de produtos de vegetais. Por exemplo, Wang e colaboradores (2010), concluíram que o extrato da *Psidium guajava* Linn e os flavonoides isolados dela, inibiram a α -amilase; Ali e colaboradores (2006), mostraram que o extrato hexano da *Phyllanthus amarus* possui atividade de inibição da α -amilase e atribuiu a ação à presença de ácidos triterpenoides. Bhandari e colaboradores (2008), apontaram a atividade hipoglicemiante de *Bergenia ciliata*, conferindo aos flavonoides isolados na espécie a ação inibitória enzimática.

O crescimento do número de casos de diabetes é motivo de preocupação, haja visto que 100 milhões de pessoas no mundo já sofrem com essa desordem metabólica (RAHIMZADEH et al., 2014). Os efeitos adversos associados ao uso de hipoglicemiantes orais e a oferta de produtos naturais são fatores que contribuem para o interesse na descoberta de novas moléculas para o tratamento da diabetes.

2.5.3 Atividade de sensibilidade bacteriana

A busca por fontes alternativas com ação antibacteriana ocorre de maneira incessante, conforme observado em diversos estudos sobre produtos naturais. As infecções causadas por bactérias patogênicas são responsáveis por grandes números de doenças tanto em humanos, quanto em animais, podendo vir a evoluir até mesmo para o óbito.

Outro grave problema que potencializa essas ocorrências é a capacidade que muitas bactérias apresentam de mutação, e que acabam gerando a chamada resistência bacteriana aos medicamentos convencionais. Apesar de ser vasta a antibioticoterapia disponível no mercado farmacêutico, muitos desses microorganismos já se tornaram resistentes a antibióticos, aos quais antes eram sensíveis, o que aumenta a preocupação e o interesse no desenvolvimento de novas substâncias capazes de inibir o crescimento bacteriano (HASENACK et al., 2008).

Diante deste cenário, os produtos de origem vegetal representam uma fonte alternativa nessa procura, que é ainda mais estimulada pela imensa disponibilidade de espécies vegetais que o Brasil oferece. A atividade antibacteriana de extratos de plantas e de seus metabólitos já foi demonstrada em diversos estudos (PEREIRA et al., 2015; GARCIA et al., 2011; COUTINHO et al., 2008), e são também defendidas como fonte de gentes moduladores capazes de reverter a resistência bacteriana (GIBBONS, 2005).

Para avaliar a atividade antibacteriana de produtos de origem vegetal, são encontrados na literatura variados métodos *in vitro*, com destaque para o teste de difusão em disco que é comumente utilizado na pesquisa com extratos vegetais. Trata-se, portanto, de um ensaio qualitativo que permite identificar se a substância analisada inibe ou não os microorganismos aos quais serão testados (DE BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008). Assim, o perfil de inibição do crescimento dos microorganismos pode ser classificado em: sensível, moderadamente sensível e resistente. As cepas sensíveis são observadas quando o halo de inibição possui 3 mm de diâmetro maior que o controle positivo, ou até 3 mm menor que ele; As moderadamente sensíveis apresentam um halo de inibição maior que 2 mm, mas menor do que o controle em mais de 3 mm; E as resistentes apresentam uma zona de inibição igual ou maior que 2 mm (OSTROSKY et al., 2008).

A atividade antibacteriana de espécies *Erythroxylum* já foi apontada em estudos etnofarmacológicos que atribuíram tal ação às *E. minutifolium* e *E. confusum* (RODEIRO et al., 2008). *E. caatingae* se mostrou eficiente contra bactérias gram-positivas, a partir da análise do extrato do caule da planta (AGUIAR et al. 2012). Também, *E. pulchrum*, inibiu o crescimento de linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas (ALBUQUERQUE et al., 2014).

2.5.4 Atividade antitumoral sobre o SNC

Gliomas são tumores que surgem no SNC, mais frequentemente no tecido cerebral (OSTROM et al., 2014a). Com base na origem celular pode ser denominado como meningiomas, gliomas (glioblastoma, astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas) e meduloblastomas (KLEIHUES et al., 2002; CHEN et al., 2013). Esse tipo de neoplasia neuroepitelial é altamente agressiva devido mutações progressivas (STUPP et al., 2006; CASTRO et al., 2011) e com prognóstico muito ruim.

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos mais comuns no homem adulto (OSTROM et al., 2014a), representando cerca de 40% a 60% de todas as neoplasias do SNC. Ainda de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) são estimados mais de 5 mil novos casos de câncer no SNC em 2016 no Brasil. Só nos Estados Unidos, os gliomas representam 81% das neoplasias cerebrais malignas diagnosticadas (OSTROM et al., 2014b).

A extensão do tumor é um importante prognóstico da doença, que é classificada de acordo com o grau de malignidade entre I e IV, sendo os últimos os mais agressivos. Os gliomas apresentam uma baixa taxa de sobrevida, sendo que aproximadamente 0,05% a 4,7% dos pacientes diagnosticados com glioblastoma sobrevivem cinco anos (OSTROM et al., 2014a).

Dentre as formas de tratamento estão a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. No entanto, tais opções terapêuticas ainda não conseguiram prolongar a sobrevida dos pacientes portadores da doença (BADKE et al., 2014). A falta de tratamentos efetivos somada à elevada incidência de gliomas e à alta agressividade da doença, despertam o interesse pela investigação e descoberta de moléculas capazes de inibir o crescimento desses tumores.

Os produtos naturais são considerados uma fonte efetiva de substâncias antitumorais. Estudos publicados em 2005 já relatavam que cerca de 60% dos compostos utilizados na terapêutica contra o câncer eram provenientes de alguma fonte natural, como plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, são referências no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos. Isolados da *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae). A planta era utilizada popularmente pela atividade hipoglicemiante de seus extratos, a investigação e descoberta do perfil de citotoxicidade em células tumorais levou ao isolamento desses metabólitos e, mais tarde ao desenvolvimento dos seus análogos semi-sintéticos vinorelbina e vindesina (NOBILI et al., 2009; CRAGG & NEWMAN, 2005).

Outro quimioterápico derivado de plantas é o paclitaxel (Taxol®), isolado da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), com ação efetiva contra o câncer de mama, de ovário e de pulmão de células não-pequenas. O semi-sintético docetaxel (Taxotere®) também é utilizado contra o câncer de mama e o de pulmão de células não-pequenas. A

camptotecina isolada da *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae), apesar de entrar em desuso por causa da toxicidade apresentada na bexiga, contribuiu para o desenvolvimento do topotecano, utilizado no tratamento do câncer do pulmão de células pequenas e de ovário, e irinotecano no câncer de colo-retal (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Além destes, diversos outros quimioterápicos foram desenvolvidos a partir de fontes vegetais, seja de forma direta ou indireta, servindo de modelo para a produção de novas drogas sintéticas.





Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Objetivos



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento químico e do potencial farmacológico de espécies do gênero *Erythroxylum* (Erythroxilaceae), que ocorrem no estado da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a presença de alcaloides nas espécies *Erythroxylum macrocalyx* e *Erythroxylum affine*, através do procedimento de obtenção da Fração Total de Alcaloides;

Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos presentes nos extratos e frações das folhas de *Erythroxylum macrocalyx*;

Identificar as estruturas das substâncias isoladas através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), Espectrometria de Massas e difração de raio-X;

Avaliar o potencial do constituinte químico majoritário isolado sobre a viabilidade de células neoplásicas de glioma murino (C6), *in vitro* e a citotoxicidade sobre cultura primária de astrócitos;

Avaliar a atividade dos extratos, frações e constituinte químico majoritário isolado, sobre as enzimas acetilcolinesterase e α -amilase, *in vitro*;

Avaliar a atividade dos extratos e constituinte químico majoritário isolado, sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Materiais e Métodos



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A parte experimental foi desenvolvida em duas etapas: Estudo fitoquímico e Ensaios biológicos. O primeiro envolveu os processos de coleta, identificação botânica e triagem fitoquímica das espécies *E. macrocalyx* e *E. affine*; e a segunda incluiu os testes, *in vitro*, para avaliação da ação farmacológica dos extratos, frações e composto isolado, conforme demonstrado na Figura 7.

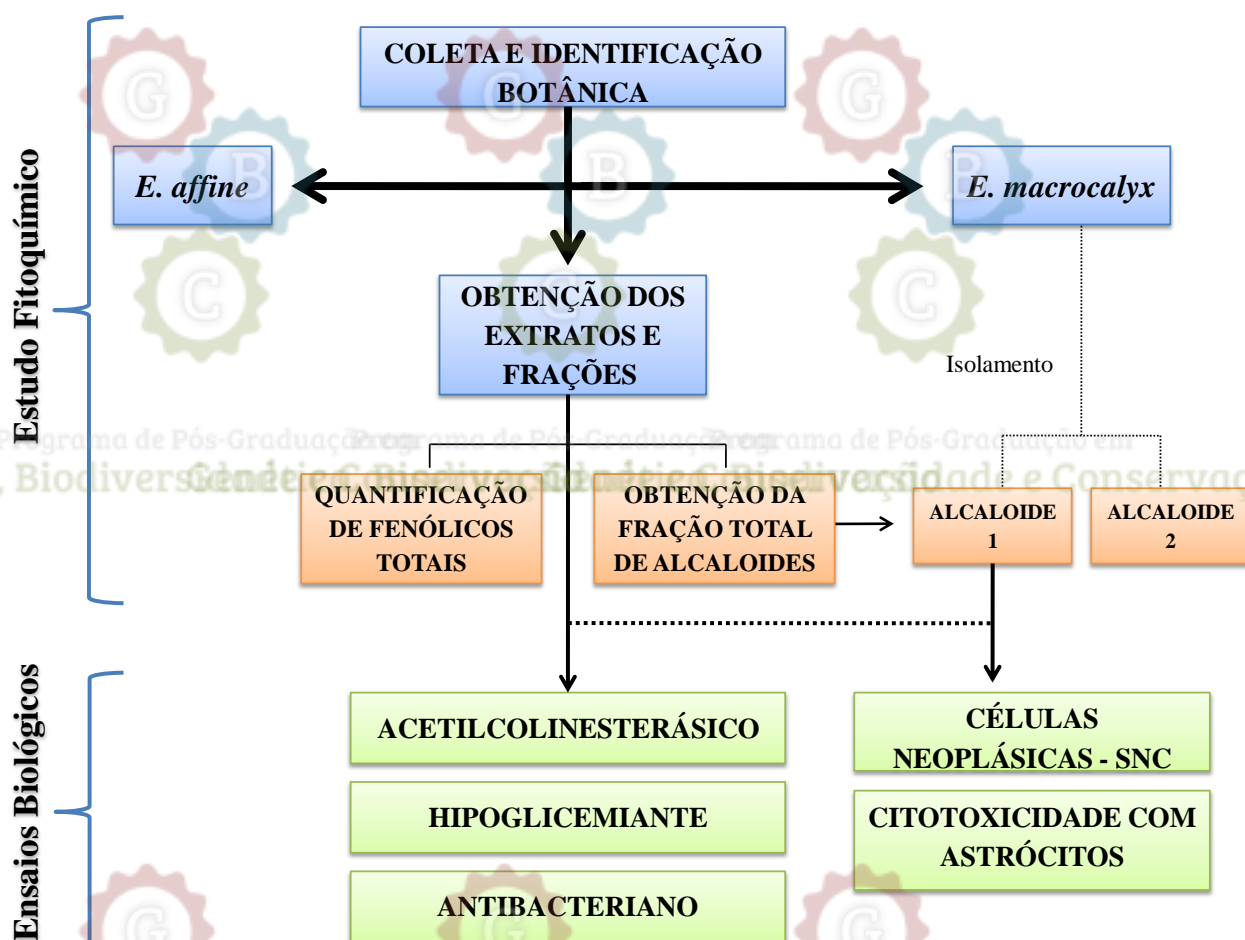


Figura 7. Desenho experimental.

4.2 MATERIAL VEGETAL

4.2.1 Coleta e Identificação botânica de *E. macrocalyx* e *E. affine*

As partes aéreas das plantas foram coletadas na Fazenda Brejo Novo, município de Jequié, Bahia, Brasil (13°56'41''S, 4°00'63''W) em abril de 2014. As exsicatas de *E. macrocalyx* e *E. affine* foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB, e catalogadas como HUESB 9933 (Figura 8) e HUESB 9934 (Figura 9), respectivamente. A identificação botânica foi realizada pela especialista do gênero *Erythroxylum*, Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola (Universidade Federal do Ceará - UFCE).



Figura 8. Exsicata da *E. macrocalyx* depositada no HUESB.



Figura 9. Exsicata da *E. affine* depositada no HUESB.

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Obtenção dos extratos brutos

As folhas (466 g) de *E. macrocalyx* e as folhas (493 g) de *E. affine* foram separadas dos galhos, secas em estufa sob aeração a uma temperatura de 40 °C. Em seguida, cada material foi triturado manualmente e imerso em etanol 95% (PA), para extração exaustiva, a frio. Após o processo de maceração, o solvente foi filtrado, e em seguida, destilado, à pressão reduzida, em evaporador rotatório. Este procedimento foi repetido três vezes para cada material.

O extrato bruto etanólico (EBE) obtido das folhas da *E. macrocalyx* (25g), correspondeu a 5,4% em massa, das folhas secas, e o EBE das folhas da *E. affine* (26g), correspondeu a 5,3% em massa, das folhas secas.

4.3.2 Obtenção da fração total de alcaloides

Os extratos brutos etanólicos das espécies *E. macrocalyx* e *E. affine* foram submetidos, separadamente, ao procedimento para obtenção da fração total de alcaloides (FTA), adaptado da metodologia descrita por Giordani e colaboradores (2008). Cada EBE foi dissolvido em volume mínimo de metanol (MeOH) e, em seguida, adicionado uma solução de ácido clorídrico (HCl) 2%, até atingir pH 2,0. A mistura foi transferida para funil de separação com diclorometano para extração. Esse procedimento foi realizado três vezes, obtendo-se a fração diclorometano 1, a qual foi concentrada no evaporador rotatório, e a fração aquosa ácida.

À fração aquosa, ácida adicionou-se hidróxido de amônio (NH_4OH) 5% até atingir pH 10. Em seguida, foi realizada a extração com diclorometano três vezes, para obter a fração aquosa 2 e a fração diclorometano 2. Esta última foi submetida à evaporação do solvente em evaporador rotatório, para obtenção da FTA.

A fração aquosa 2 foi extraída com acetato de etila, três vezes, gerando a fração aquosa 3 e a fração acetato de etila, a qual foi concentrada em evaporador rotatório (Figura 10).

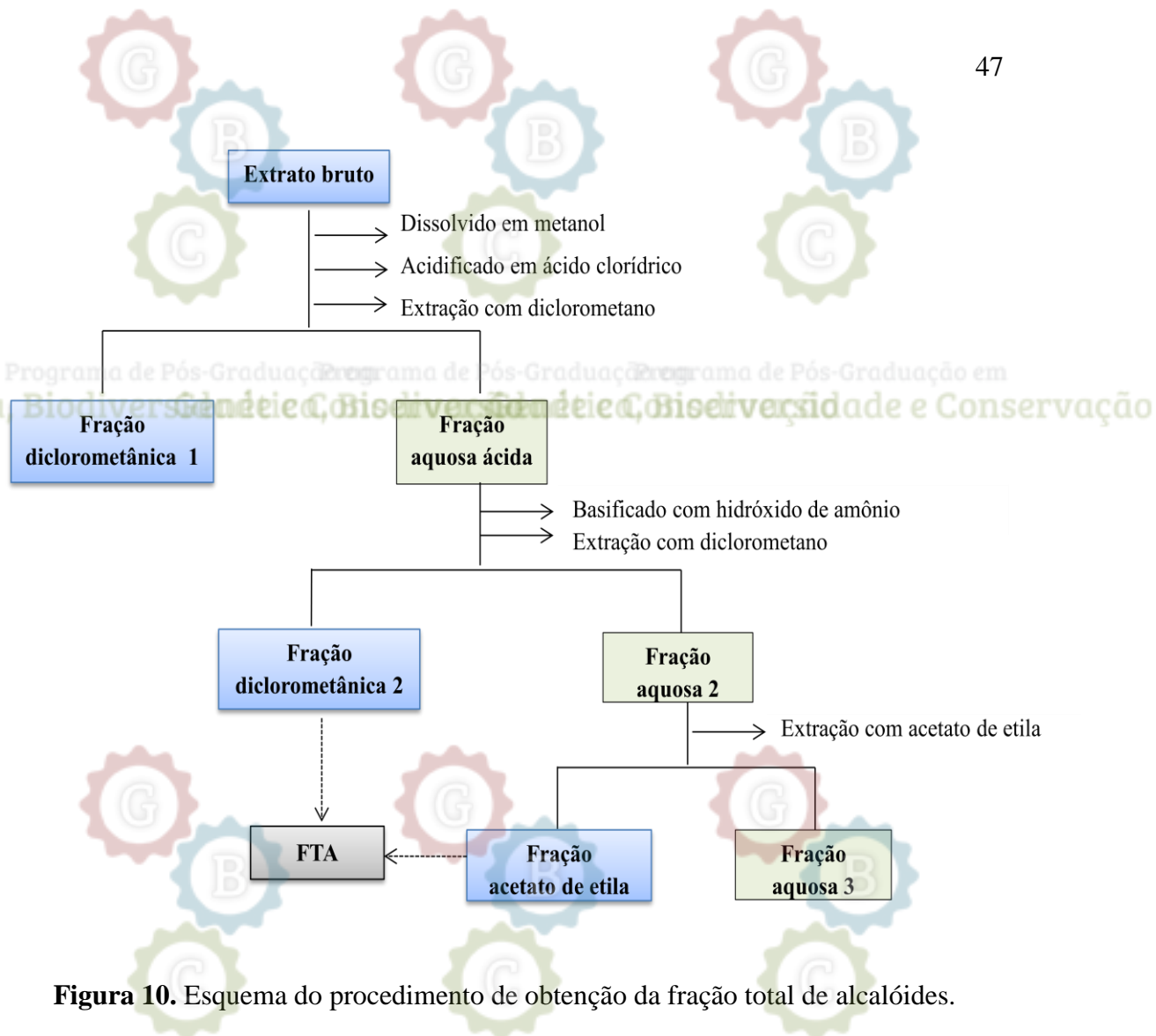


Figura 10. Esquema do procedimento de obtenção da fração total de alcalóides.

Foram realizadas duas repetições do procedimento FTA para a *E. macrocalyx*. No primeiro utilizou 1 g de massa inicial do EBE, e no segundo, 66 mg. Para a *E. affine* foi utilizado 1 g do EBE. O rendimento de cada fração está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento das frações obtidas pelo processo de obtenção da fração total de alcalóides.

Frações obtidas	Rendimento
<i>E. macrocalyx</i> (1g EBE)	
Diclorometano 1	17 %
Diclorometano 2 – FTA	10 %
Acetato de etila – FTA	2 %
<i>E. macrocalyx</i> (66 mg EBE)	
Diclorometano 1	7,5 %
Diclorometano 2 – FTA	6 %
Acetato de etila – FTA	3 %
<i>E. affine</i> (1 mg EBE)	
Diclorometano 1	24 %
Diclorometano 2 – FTA	0,8 %
Acetato de etila – FTA	4,7 %

4.3.3 Avaliação do perfil fitoquímico

As frações: diclorometano 1, diclorometano 2 e acetato de etila de *E. macrocalyx* e *E. affine* foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Cada fração foi solubilizada em solvente correspondente, e aplicada em placas preparadas com sílica (fase estacionária), e colocadas para eluir em cuba de vidro contendo uma mistura de acetato de etila : metanol (8:2). Foram eluídas duas placas, as quais foram observadas sob luz UV 254 nm e 365 nm, e reveladas em iodo e em reagente de Dragendorff, respectivamente. Este último foi preparado de acordo com Matos (1997), e é utilizado como revelador para classe dos alcalóides. A fração diclorometano 2 (FDCM-2) de *E. macrocalyx* que revelou-se positiva (mancha alaranjada, Figura 11) para alcalóides foi submetida a um fracionamento

cromatográfico, para isolamento destes constituintes. Em *E. affine*, o revelador mostrou-se negativo para alcaloides, o que indica a ausência ou a baixa concentração dessas substâncias

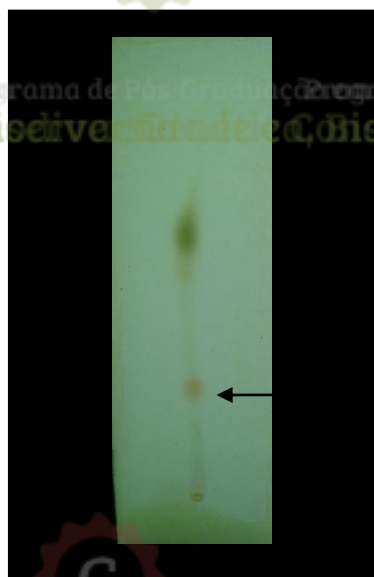


Figura 11. Resultado positivo para a FDCM-2 de *E. macrocalyx* por meio da análise de CCD.

4.3.4 Fracionamento e purificação de alcaloides de *E. macrocalyx*

As frações diclorometano 2 obtidas nos dois procedimentos de FTA de *E. macrocalyx* foram submetidas ao fracionamento em Coluna Cromatográfica (CC), utilizando como fase estacionária a sílica gel e como eluentes o sistema acetato de etila: metanol (8:2). No fracionamento da FDCM-2 (101mg), foram obtidas 21 subfrações (Figura 12). Um segundo fracionamento, com uma menor massa de FDCM-2 (66mg), obteve-se 19 subfrações (Figura 13).

Todas as subfrações foram analisadas por CCD e reveladas em iodo. As que apresentaram o fator de retenção (Rf) semelhante foram agrupadas, concentradas em evaporador rotatório e identificadas por códigos.

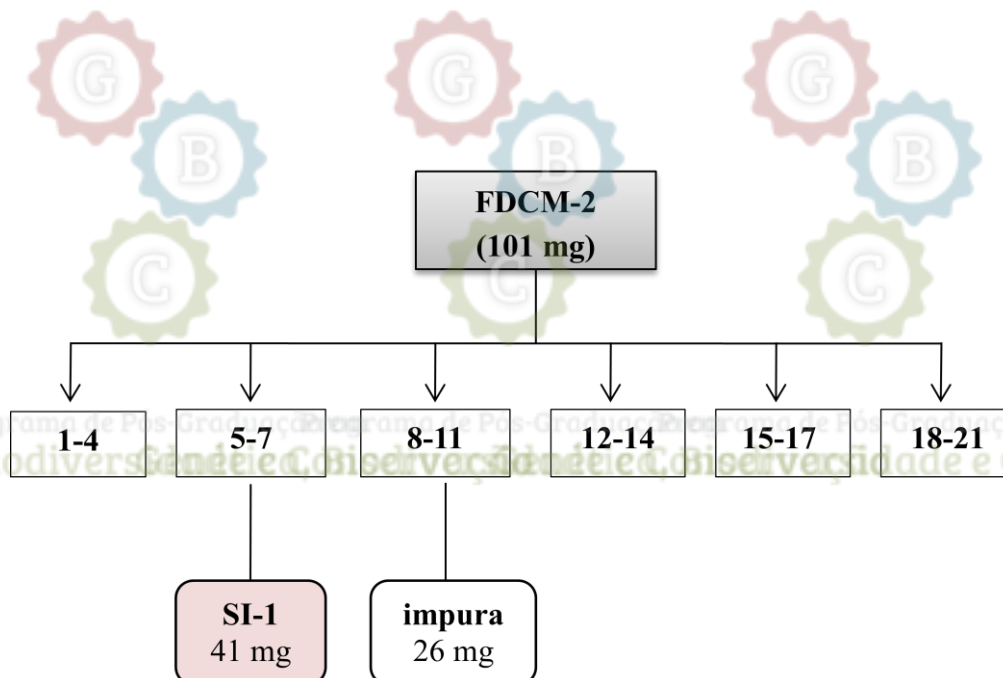


Figura 12. Esquema do fracionamento da FDCM-2 da *E. macrocalyx* obtida por coluna cromatográfica. SI-1: Substância Isolada 1.

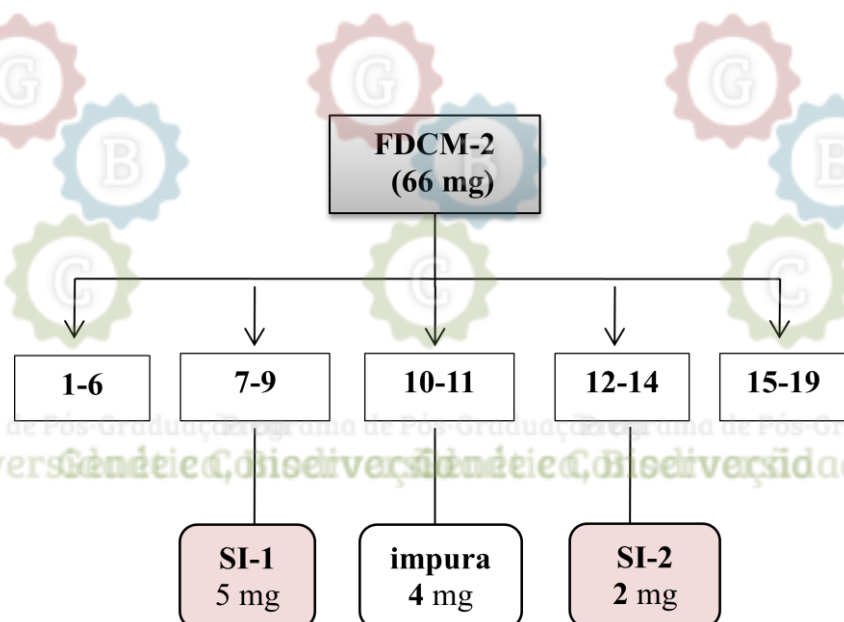


Figura 13. Esquema do fracionamento da FDCM-2 da *E. macrocalyx* obtida por coluna cromatográfica. SI-1: Substância Isolada 1; SI-2: Substância Isolada 2.

4.3.5 Partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico de *E. macrocalyx* e *E. affine*

Os extratos brutos etanólicos de *E. macrocalyx* (5 g) e *E. affine* (5 g) foram, separadamente, dissolvidos numa mistura de MeOH e água e submetidos à partição

líquido-líquido com os respectivos solventes para obtenção das frações hexânica, em acetato de etila e butanólica (Figura 14).

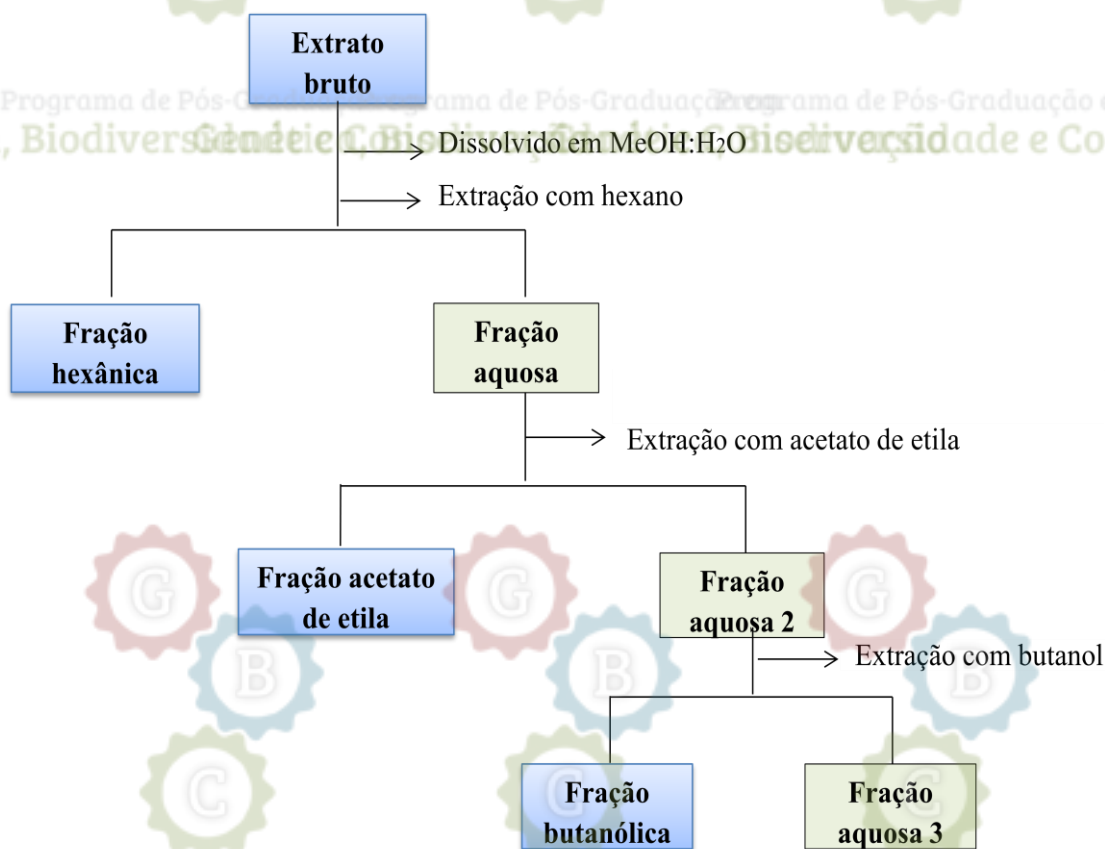


Figura 14. Esquema de obtenção das frações hexânica, acetato de etila e butanólica pelo procedimento partição líquido-líquido.

Após uma análise de todas as frações por cromatografia em camada delgada e reagente Dragendorff, as frações em acetato de etila e butanólica da *E. macrocalyx* foram selecionadas e submetidas ao fracionamento por cromatografia em coluna, obtendo diferentes subfrações, que após serem analisadas por CCD, foram agrupadas (Figura 15) de acordo com a semelhança entre os valores de R_f.

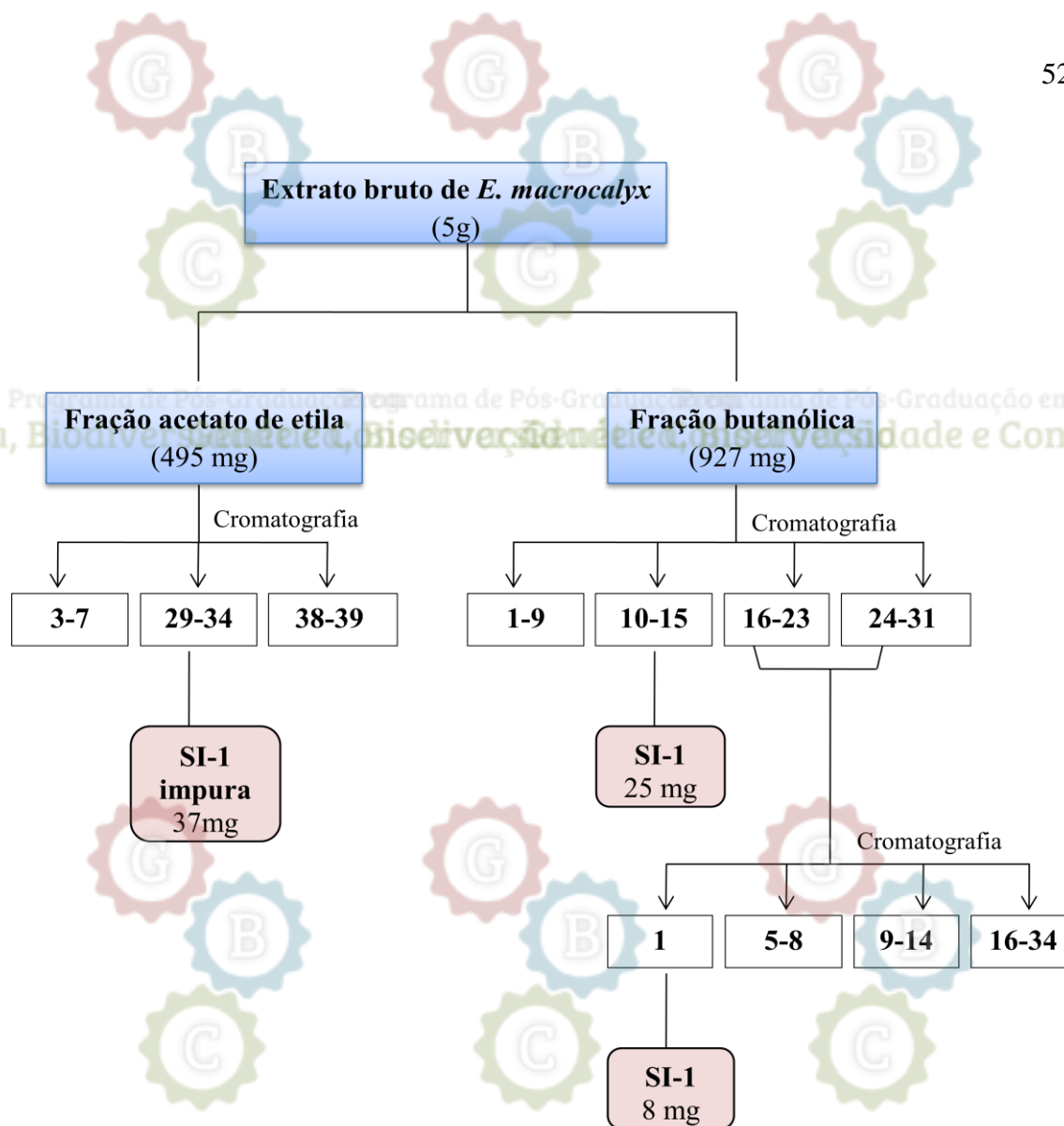


Figura 15. Esquema de fracionamento das frações em acetato de etila e butanólica da *E. macrocalyx* e isolamento dos principais constituintes químicos.

4.3.6 Elucidação da fórmula estrutural das substâncias isoladas da *E. macrocalyx*

Para elucidação de suas estruturas, as Substâncias Isoladas 1 (SI-1) e 2 (SI-2) foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz), bidimensional (2D), em equipamento Varian Mercury 300, usando como solvente CDCl_3 (CIL); e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), por impacto eletrônico (IE), a 70 eV, em um equipamento Shimadzu, modelo QP2010 SE.

A SI-1 também foi analisada no infravermelho em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum Two ATR-FTIR e por cristalografia de raio-X em difratômetro da marca Siemens.

4.3.7 Quantificação de fenólicos totais de *E. macrocalyx* e *E. affine*

A quantidade de fenólicos totais foi determinada pelo ensaio espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Foi utilizada uma alíquota de 125 µL de extrato bruto etanólico (1 mg/mL), adicionada à 125 µL do reagente Folin-Ciocalteu, 1 mL de água destilada e 125 µL de solução saturada de Na₂CO₃. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C e avaliadas por espectrofotometria em 750 nm.

A quercetina foi utilizada como padrão, em soluções com concentrações de 3,3, 10, 25, 50 e 100 µg/mL para construção da curva de calibração. Para determinação da concentração de compostos fenólicos no extrato analisado, foi feita regressão linear e com a equação da reta obtida, foram realizados os cálculos por meio da interpolação do valor das absorbâncias. O resultado final foi expresso em mg de quercetina equivalente (QE) por g de extrato.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Atividade de inibição da acetilcolinesterase *in vitro*

4.4.1.1 Soluções

- **Solução Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5:** 1,25 g de fosfato de sódio monobásico, 2,95 g de fosfato de sódio dibásico, 0,388 g de NaCl e água destilada, quantidade suficiente para (q.s.p.) 1000 mL.

- **Solução enzimática (0,5 U/mL):** Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (500U, Sigma Aldrich) em tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7,5.

- **Solução do substrato:** 21,7 mg de iodeto de acetiltiocolina (15 mM, Sigma Aldrich) em q.s.p. 5 ml de água destilada.

- **Solução de DTNB:** 29,72 mg de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico (DTNB) (3mM, Sigma Aldrich), em q.s.p. 250 ml de tampão.

- **Amostras:** Extrato bruto etanólico e frações em etanol (EtOH) (1 mg/mL). Substância isolada (500 $\mu\text{mol/L}$).

- **Solução controle:** Controle positivo: solução padrão comercial eserina (fisiostigmina) 500 $\mu\text{mol/L}$.

Controle negativo: solvente EtOH.

4.4.1.2 Determinação da atividade de acetilcolinesterase

O procedimento para determinação da atividade inibitória da AChE foi realizado na Universidade Estadual de Feira de Santa (UEFS), segundo o método descrito por Ellmann e colaboradores (1961). Foram adicionados nas cavidades das microplacas 140 μL de tampão fosfato, 20 μL da enzima acetilcolinesterase e 20 μL das amostras a serem analisadas. A placa foi então incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 10 μL de DTNB e 10 μL de iodeto de acetiltiocolina.

A absorbância foi monitorada após 20 minutos, em $\lambda = 405 \text{ nm}$ em leitor de microplacas MultiskanTM GO 3.2. Os resultados foram comparados com o padrão comercial eserina (fisiostigmina). A acetilcolinesterase é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, em colina e acetato, impedindo a recaptação da mesma pelo receptor pós-sináptico (Mota et al., 2012). No teste quantitativo fotométrico utilizado para avaliar a atividade acetilcolinesterásica, o substrato usado é um análogo da ACh, a acetiltiocolina. Esta, ao ser hidrolisada pela AChE em acetato e tiocolina. Como resultado, a tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (DTNB), produzindo o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato, que pode ser medido a 405 nm em espectrofotômetro (Alves, 2012).

Para determinar a atividade da enzima foi calculada a variação da absorbância do branco e da amostra, de acordo com a equação 1.

$$\text{Equação 1: \% inibição da AChE} = \frac{(\Delta\text{Ab} - \Delta\text{Ai})}{\Delta\text{Ab}} \times 100$$

Onde, ΔAb é a diferença de absorbância do branco no tempo de 10 minutos e no tempo inicial, e ΔAi é a diferença de absorbância do inibidor (padrão ou amostra) no tempo de 10 minutos e no tempo inicial.

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método de Tukey para avaliar os resultados das amostras entre si. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

4.4.2 Avaliação da inibição da α -amilase *in vitro*

4.4.2.1 Soluções:

- **Solução Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0:** 1,25 g/L de fosfato de sódio monobásico, 2,95 g/L de fosfato de sódio dibásico, 0,388 g/L de NaCl e água destilada, q.s.p. 1000mL.

- **Solução enzimática (0,5 mg/mL):** α -amilase pancreática de porco (Tipo VI, Sigma Aldrich) em tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7,0.

- **Solução do substrato:** Solução comercial de amido (Kit Amilase, Bioclin), contendo amido 0,4 g/L, tampão fosfato (pH 7,0) 100 mmol/L, estabilizante e conservante.

- **Solução reagente de cor:** Solução comercial de iodo (Kit Amilase, Bioclin), contendo iodo 50 mmol/L e estabilizante.

- **Amostras:** Extrato bruto etanólico, frações e substância isolada, dissolvidos em etanol (EtOH), (5 mg/mL). Essa concentração foi reajustada para uma concentração final de 1000 μ g/mL.

Para as amostras que apresentaram atividade de inibição, foram preparadas diluições seriadas para obtenção de uma curva dose-resposta em concentrações finais de 1000; 500; 250; 125; 62 e 31,25 μ g/mL.

- **Controles:** Controle positivo - solução acarbose + tampão fosfato de sódio 20 mM (0,5 mg/mL). A concentração foi reajustada para uma concentração final de 160; 80; 40; 20; 10 e 1 μ g/mL.

Controle negativo - solvente EtOH.

4.4.2.2 Análise da atividade de α -amilase

A metodologia utilizada foi adaptada do método de Caraway e baseia-se na determinação da atividade inibitória da enzima α -amilase. A solução enzimática foi homogeneizada com a amostra e solução tampão e colocada em banho-maria a 37° C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado o substrato (banho-maria a 37° C por 7 minutos e 30 segundos), o reagente de cor e a água. Para o controle negativo e padrão foi utilizado o mesmo procedimento, diferenciando apenas na ausência da enzima no padrão. A leitura foi feita no espectrofotômetro em 660 nm.

O substrato (amido) em contato com o reagente de cor (iodo) forma um complexo amido-iodo que adquire a coloração azul, a qual foi denominada de padrão no ensaio. Quando a α -amilase catalisa a hidrólise do amido há um impedimento para a formação do complexo, o que é considerado 100% da atividade enzimática, sendo denominado de controle negativo.

No entanto, na presença de um inibidor, a ação da enzima é bloqueada e como resultado o amido permanece livre para a formação do complexo que pode ser medido em 660 nm no espectrofotômetro (Oliveira, 2012b).

Para determinar a atividade da enzima foi calculada a absorvância do padrão (substrato) com a absorvância do controle negativo (enzima + substrato) (Equação 2a), a qual forneceu o referencial para a atividade máxima da enzima no procedimento, referente a 100% (Equação 2b). Para determinar a atividade da enzima diante das amostras foi calculada a absorvância do padrão (substrato) com a absorvância da amostra (enzima + substrato + amostra) (Equação 2a), que forneceu o referencial para a amostra (Equação 2b). A porcentagem de inibição da atividade da enzima foi calculada pela Equação 2c.

Equação 2a:

$$\text{Amilase (U/dL)} = \frac{\text{Absorvância do padrão} - \text{Absorvância da amostra} \times 800}{\text{Absorvância do padrão}}$$

Equação 2b:

$$\text{Amilase (U/dL): Padrão - Controle negativo} \text{ ----- } 100\%$$

$$\text{Amilase (U/dL): Padrão - Amostra} \text{ ----- } x$$

x = % atividade da enzima

Equação 2c:

$$\% \text{ atividade da enzima} - 100 = \% \text{ de inibição}$$

4.4.2.3 Determinação dos valores da Concentração Inibitória de 50% da atividade enzimática IC₅₀

A concentração capaz de inibir 50% da atividade da enzima (IC₅₀) foi calculada a partir dos valores de inibição obtidos em diluições seriadas do extrato bruto e frações de *E. macrocalyx* e *E. affine*, expressa numa curva dose-resposta. Para esta, foi construído um gráfico com a porcentagem de inibição versus o logaritmo da concentração da amostra inibidora.

Para o controle positivo também foi construída uma curva dose-resposta para a acarbose em concentrações variando entre 1 e 160 µg/mL.

Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para a curva e os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando o *software GraphPad Prism 5.0*.

4.4.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método de Tukey para avaliar os resultados das amostras entre si. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

4.4.3 Ensaio de sensibilidade bacteriana por difusão em disco

4.4.3.1 Soluções:

- **Meio de cultura:** Ágar Mueller-Hinton (3,4g) em água destilada (100 mL). Esterilizado.
- **Caldo nutritivo:** BHI (Brain Heart Infusion) (3,7 g) em água destilada (100 mL). Esterilizado.

- **Solução salina 0,9%:** Cloreto de sódio (NaCl) (0,9 g) em água destilada (100 mL). Esterilizado.

- **Suspensão para crescimento das bactérias:** As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) ressuspensas em caldo nutriente BHI, separadamente, e incubas em estufa a 37° C por 24 horas.

- **Solução bacteriana:** Suspensão bacteriana diluída em solução salina 0,9% (1:3) na concentração equivalente a 0,1 de absorbância em 625 nm. Em seguida, semeada em placas de Petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton e, incubadas em estufa 37° C por 24 horas.

- **Amostras:** Extrato bruto etanólico dissolvido em MeOH (0,1 mg/μL). A concentração foi reajustada para uma concentração final de 1 mg/disco. Substância isolada dissolvida em MeOH (10 mg/mL). A concentração foi reajustada para uma concentração final de 100 μg/disco.

- **Controles:** Controle positivo de *S. aureus*: Tetraciclina (3mg/disco).

Controle positivo para *P. aeruginosa*: Ceftriaxona (3mg/disco).

Controle negativo: solvente MeOH.

4.4.3.2 Análise do Halo Inibitório

A metodologia utilizada foi adaptada de Bauer-Kirby (1966) e consiste na determinação da atividade antibacteriana pela técnica de difusão em disco. O procedimento utilizou pequenos discos de papel em filtro (6 mm de diâmetro), que foram tratados com 1 mg/disco de extrato bruto etanólico e 100 μg/disco de substância isolada, assim como 3 mg/disco de tetraciclina como controle positivo para *S. aureus* (ATCC29213) e de 3mg/disco de ceftriaxona para *P. aeruginosa* (ATCC27853), além do MeOH como controle negativo. As concentrações foram calculadas para que cada disco recebesse 10 μL de cada amostra.

Em seguida, os discos foram distribuídos em placas de Petri contendo as bactérias semeadas em meio de cultura Mueller-Hinton e incubos em estufa a 37° C por 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata.

As amostras que apresentam ação contra o crescimento das bactérias formam um halo de inibição ao redor do disco tratado. Os raios dos halos foram medidos com o auxílio de uma régua em centímetros (cm) e, em seguida, convertidos para milímetros (mm) de diâmetro.

A análise foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e desvio padrão.

4.4.4 Citotoxicidade de glioma murino (C6) e cultura primária de astrócitos pela SI-1

4.4.4.1 Soluções:

-PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM de KCl, 1,47 mM de Na₂HPO₄. pH 7. Solução autoclavada.

-Tripsina: 0,1% (p/v) de tripsina em PBS contendo 1mM de EDTA pH 7,0. Solução previamente esterilizada através de filtro de membrana 0,22 µm.

-Solução de MTT: O brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolina (MTT) 5mg/mL em tampão fosfato de sódio.

-Meios de Cultura: O meio DMEM (Eagle Modificado por Dulbecco), (COD D0017 Cultilab), foi suplementado com 110 mg/L Ácido Pirúvico, 2 mM Glutamina, 10 mL/L de Antibiótico (100 U/mL penicilina 100 U/mL estreptomicina), 0,5 g/L de Glicose, 3,7 g/L Bicarbonato de sódio. O meio de cultura foi esterilizado através de filtro de membrana 0,22 µm e em seguida foram adicionados suplementos com 10% de SFB de acordo com a necessidade do uso.

4.4.4.2 Cultura da linhagem de glioma murino (C6)

As linhagens de células de glioma murino (C6) foram fornecidas pelo Laboratório de Neuroquímica – LabNq, da Universidade Federal da Bahia – UFBA, local onde os ensaios foram realizados. As linhagens de células de glioma murino (C6) foram cultivadas em meio de cultivo DMEM suplementado com 110 mg/L Ácido Pirúvico, 2 mM Glutamina, 10 mL/L de Antibiótico (100 U/mL penicilina 100 U/mL estreptomicina), 0,5 g/L de Glicose, 3,7 g/L Bicarbonato de sódio e incubadas a 5% de CO₂ a 37°C até atingir confluência. As células foram tratadas com tripsina 0,01% e semeadas em placas de 96 poços com densidade de $2,9 \times 10^4$ células/cm² e incubadas em ambiente com 5% CO₂, 37 °C. Após 24 h da exposição das células com SI-1 isolada da *E. macrocalyx* nas concentrações de 30, 60, 100, 200, 300, 600, 1000, 2000, 3000 e 6000 µM, foram incubadas por 72 horas. Sendo n= 8 por dose, teste realizado em triplicatas independentes.

4.4.4.3 Cultura primária de astrócitos

Os astrócitos, células normais da glia, foram removidas de cérebros de ratos Wistar recém nascidos seguindo o protocolo de Cookson e Pentreath (1994) e modificações adotadas pelo LabNq, Instituto de Ciência da Saúde realizado após aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (Anexo A). Para obtenção das células astrocíticas, após sacrifício por decaptação, os cortices cerebrais serão removidos e dissecados em campo estéril. As meninges foram descartadas, os cortices foram submetidos a dissociação celular mecânica com auxílio de pipeta de Pasteur, em meio de cultura gelado, em seguida centrifugado a 2000 g, 10 minutos, 4 °C. As células obtidas foram ressuspensas em meio DMEM suplementado e cultivadas em ambiente com 5% de CO₂, 37 °C. Após 48 hs de cultivo, as garrafas contendo as células são fortemente agitadas para remoção de microglia e precursores de oligodendrócitos. O meio de cultura é trocado a cada 48 h até obter confluência celular. Para realização do teste de viabilidade celular, as células são descoladas da garrafa com ação de tripsina, contadas com exclusão de células mortas com uso do azul de tripan 4%, e semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas a SI-1 nas concentrações de

30, 60, 100, 200, 300, 600, 1000, 2000, 3000 e 6000 μM , incubadas por 72 horas. O controle com meio de cultura e DMSO foram submetidos ao mesmo tratamento das amostras. Sendo $n=8$ por dose, teste realizado em triplicatas independentes.

4.4.4.4 Viabilidade celular por MTT

Após as 72 horas de incubação, o processo foi interrompido com a substituição do meio por outro contendo 20% de solução MTT (5mg/mL). As placas foram incubadas a 5% de CO_2 a 37°C por duas horas. Nesta etapa, as desidrogenases mitocondriais das células viáveis promovem a redução do MTT (cor amarela), em formazam (cor purpúrea intenso), conforme a capacidade de metabolização das células e a concentração utilizada (Mosmann,1983). Em seguida, o meio contendo o MTT foi removido e foi adicionado 100 μL de solução de lise (50/50% Dimetilformamida/Duodesil Sulfato de Sódio 200 g/L (v/)) .

A leitura espectrofotométrica da coloração púrpura, referente ao formazam, foi feita em um leitor de microplacas e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 595 nm. Um poço com apenas meio de cultivo foi utilizado como branco. A viabilidade celular foi expressa pelo percentual do controle, obtidos pela mediana ou media, conforme distribuição e normalidade.

A evolução das células na fase final do tratamento foram acompanhadas e registradas, pelo uso de microscópio de contraste de fase, para conferir morfologia e densidade celular e as alterações observadas com uso de câmera digital.

4.4.4.5 Análises estatísticas

Os testes foram realizados em triplicatas, 8 poços para cada concentração, por placa. Os dados foram analisados utilizando um *software GraphPad Prism*, versão 5.0 para *Windows (GraphPad Software, San Diego California, EUA)*, quanto a normalidade de distribuição, para definir o uso da média e desvio padrão, ou mediana e variação. As diferentes concentrações foram avaliadas para definição do uso dos testes paramétricos ou não paramétricos. Foram utilizadas regressões não lineares para determinar a concentração capaz de matar 50% das células (IC_{50}).



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Resultados e Discussão



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.1.1 Substância Isolada 1 (SI-1)

A substância isolada das folhas da *E. macrocalyx*, codificada como SI-1, revelou-se positiva para alcaloides após exposição ao reagente Dragendorff. A mesma apresentou na forma de cristais brancos com ponto de fusão de 170-171°C, e um pico de absorção em 283 nm no Ultra-Violeta (UV).

O espectro no IV (Figura 16) indicou a presença dos principais grupos funcionais, apresentando absorções em 3593 cm⁻¹, referente ao estiramento do grupo hidroxila (OH); a banda em 1723 cm⁻¹ indicou a presença de C=O de éster conjugado com ligação dupla; na região de 1600 a 1450 cm⁻¹ foram observadas bandas alusivas às ligações de C=C de anel aromático; as bandas em 1279, 1265, 1109 e 1095 cm⁻¹ foram atribuídas aos estiramentos de ligações C-CO-O de grupos ésteres, C-O de álcool e da ligação C-N.

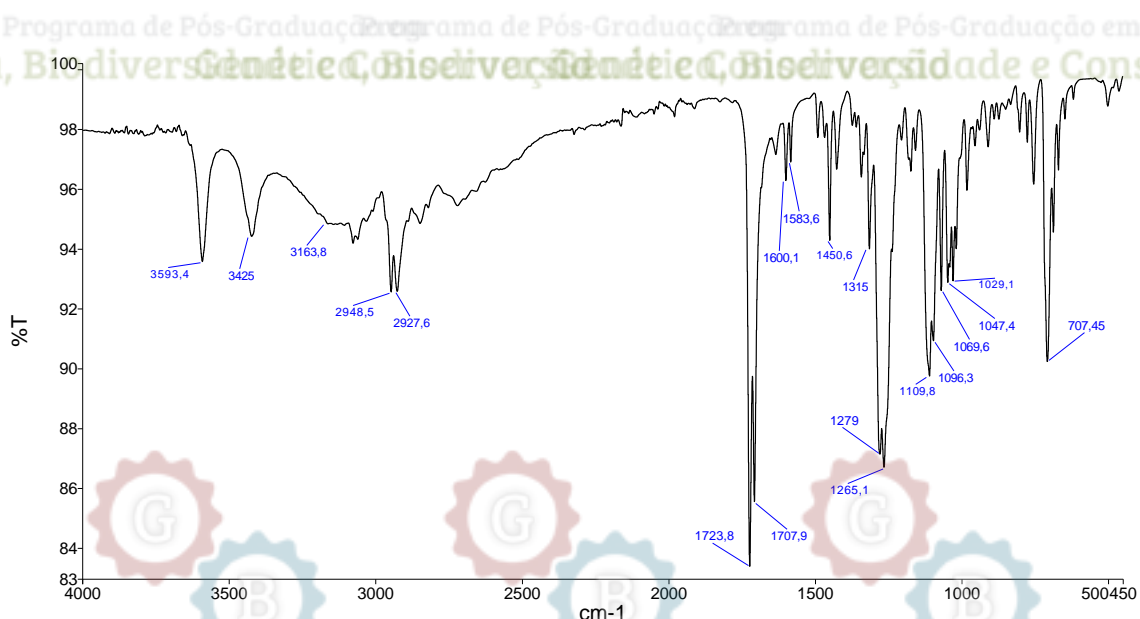


Figura 16. Espectro no Infravermelho (ATR) de SI-1.

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), permitiu identificar que a SI-1 encontrava-se pura (Figura 17). O seu espectro de massas (Figura 18) indicou o pico do íon molecular em $m/z = 381 [M^+]$, compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{23}NO_5$, sugerindo se tratar de um alcaloide, classe de metabólito especial, de ampla ocorrência em plantas do gênero *Erythroxylum*.

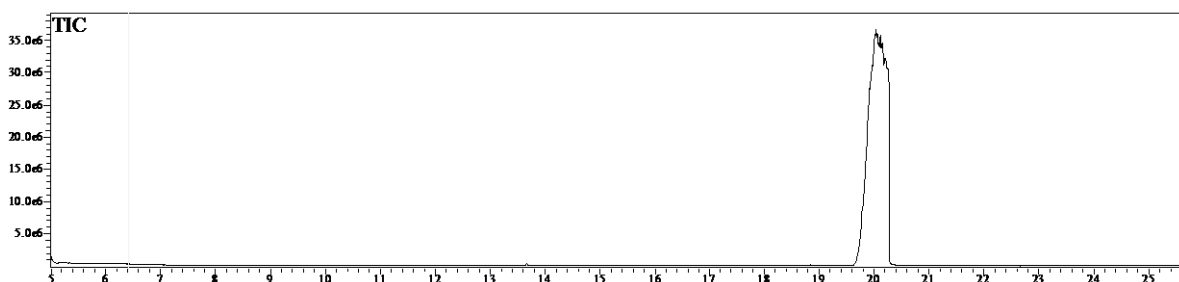


Figura 17. Cromatograma (CG-EM-IE) de SI-1.

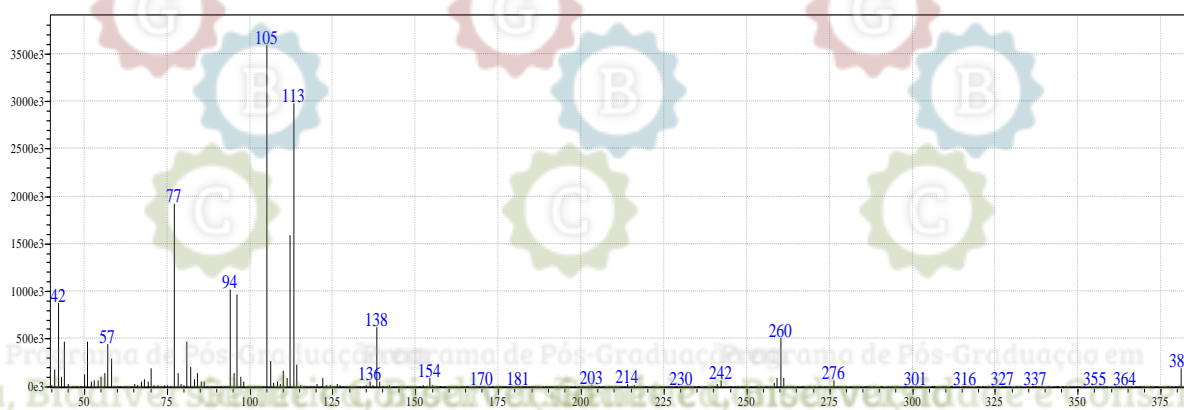


Figura 18. Espectro de Massas (CG-EM-IE) de SI-1.

Os sinais apresentados nos espectros de RMN foram característicos, mas não coincidentes, ao de alcaloides tropânicos isolados de outras espécies *Erythroxylum* (Figura 19) (Oliveira et al., 2010; Chvez et al., 2002)

O espectro de RMN de 1H de SI-1 (Figura 21) apresentou um singlete em δ 6,13, compatível à dois hidrogênios benzoiloxi metínicos em C-6 e C-7 do anel tropânico. Em δ 4,16, observou-se um singlete largo integrando para um hidrogênio, também indicativo de hidrogênio oximetínico em C-3 de anel tropânico. A disposição destes sinais simetricamente no anel tropânico foi sugerida pelo fato dos demais sinais de H deste anel aparecerem sobrepostos. Em δ 3,45, observou-se um singlete integrando para

dois hidrogênios (1, 5); em δ 2,20 observou-se um dubleto de triplete (2_{eq} , 4_{eq}) e em δ 1,94 um dubleto largo (2_{ax} , 4_{ax}). Ainda foram observados em δ 2,72, um singlete integrando para três hidrogênios, o qual foi atribuído à metila ligada ao nitrogênio do anel tropânico e um singlete largo em δ 2,58, integrando para um hidrogênio, atribuído a hidroxila em C-3.

O espectro de RMN de ^{13}C de SI-1 (Figura 22) apresentou em δ 78,6 o sinal atribuído a dois carbonos (6 e 7) de anel tropânico ligados ao grupo benzoiloxi; em δ 66,1, a dois carbonos (1 e 5), e em δ 63,7, ao carbono (3) ligado à hidroxila. O sinal em δ 40,0 foi atribuído ao carbono metílico ligado ao nitrogênio e, em δ 35,1, a um carbono metilênico (2 e 4) do anel tropânico.

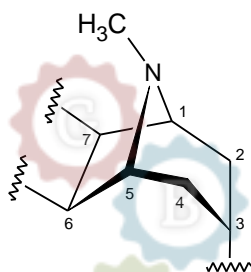


Figura 19. Anel tropânico da SI-1

Além dos sinais referentes ao esqueleto tropânico, foi verificado no espectro de RMN de ^1H um dubleto em δ 7,88, integrando para quatro hidrogênios ($2'$, $2''$, $6'$ e $6''$), um triplete em δ 7,46, integrando para dois hidrogênios ($4'$ e $4''$) e um triplete δ 7,26 integrando para quatro hidrogênios ($3'$, $3''$, $5'$ e $5''$), todos característicos de hidrogênios localizados nos anéis aromáticos monossustituídos de dois grupos benzoíla. A coincidência entre os deslocamentos químicos desses hidrogênios reforçou ainda mais a hipótese de disposição simétrica destes grupos no anel tropânico.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou apenas dez sinais, reforçando a hipótese de se tratar de uma molécula simétrica, com grande parte dos sinais sobrepostos. Em δ 166,0 foi verificado um sinal de carbono não hidrogenado ($7'$, $7''$), representando duas carbonilas de ésteres conjugados, correspondentes a dois grupos benzoiloxi ligados ao anel tropânico em C-6 e C-7. O sinal em δ 132,9 foi atribuído a dois carbonos hidrogenados ($4'$, $4''$) e, em δ 130,0 a dois carbonos não hidrogenados ($1'$, $1''$), ambos

referentes aos dois anéis aromáticos. O sinal em δ 129,7 foi atribuído aos carbonos nas posições *orto* dos anéis aromáticos (2', 2'', 6', 6'') e, em δ 128,3, aos carbonos nas posições *meta* (3', 3'', 5' e 5''). A partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos (IV, EM e RMN) foi possível propor a estrutura 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano (Figura 20) para SI-1.

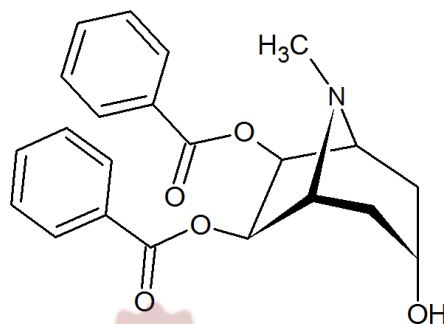


Figura 20. Fórmula estrutural SI-1.

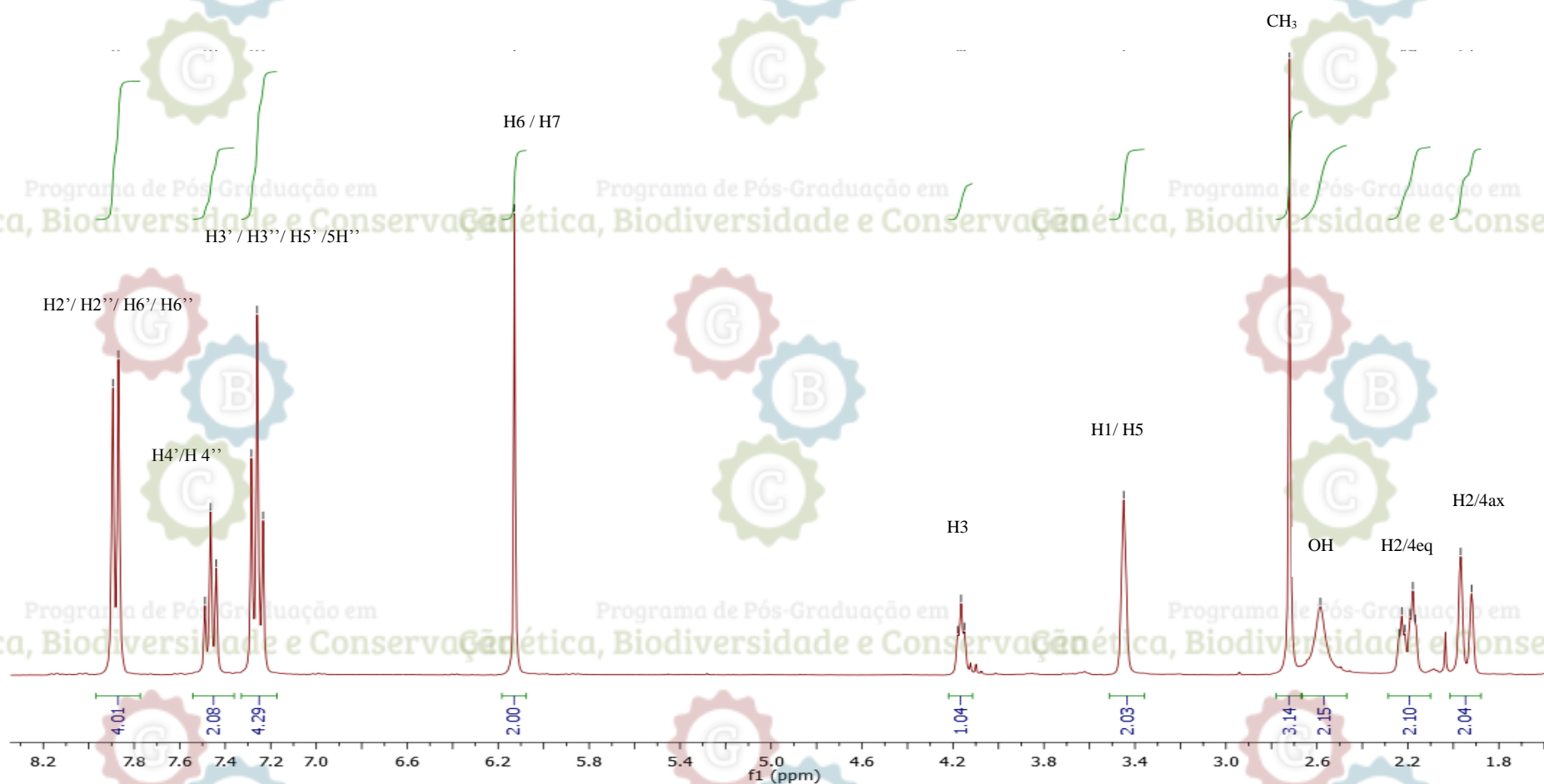


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de SI-1.

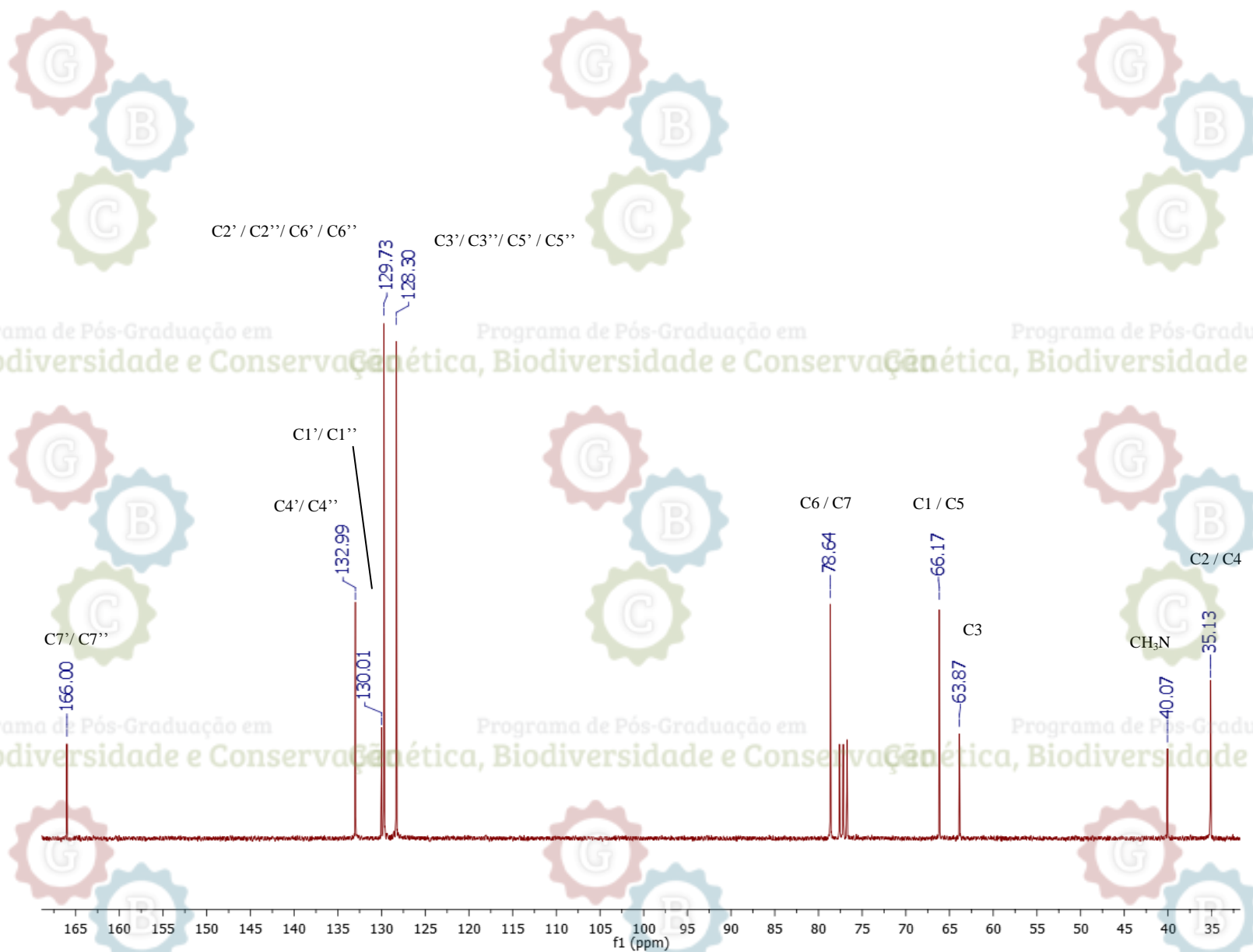


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de SI-1.

Os principais fragmentos observados no espectro de massas (Figura 18), mostraram-se compatíveis à estrutura de 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano, proposta para SI-1. O mecanismo de formação dos principais fragmentos, observados nesse espectro, são apresentados na Figura 23.

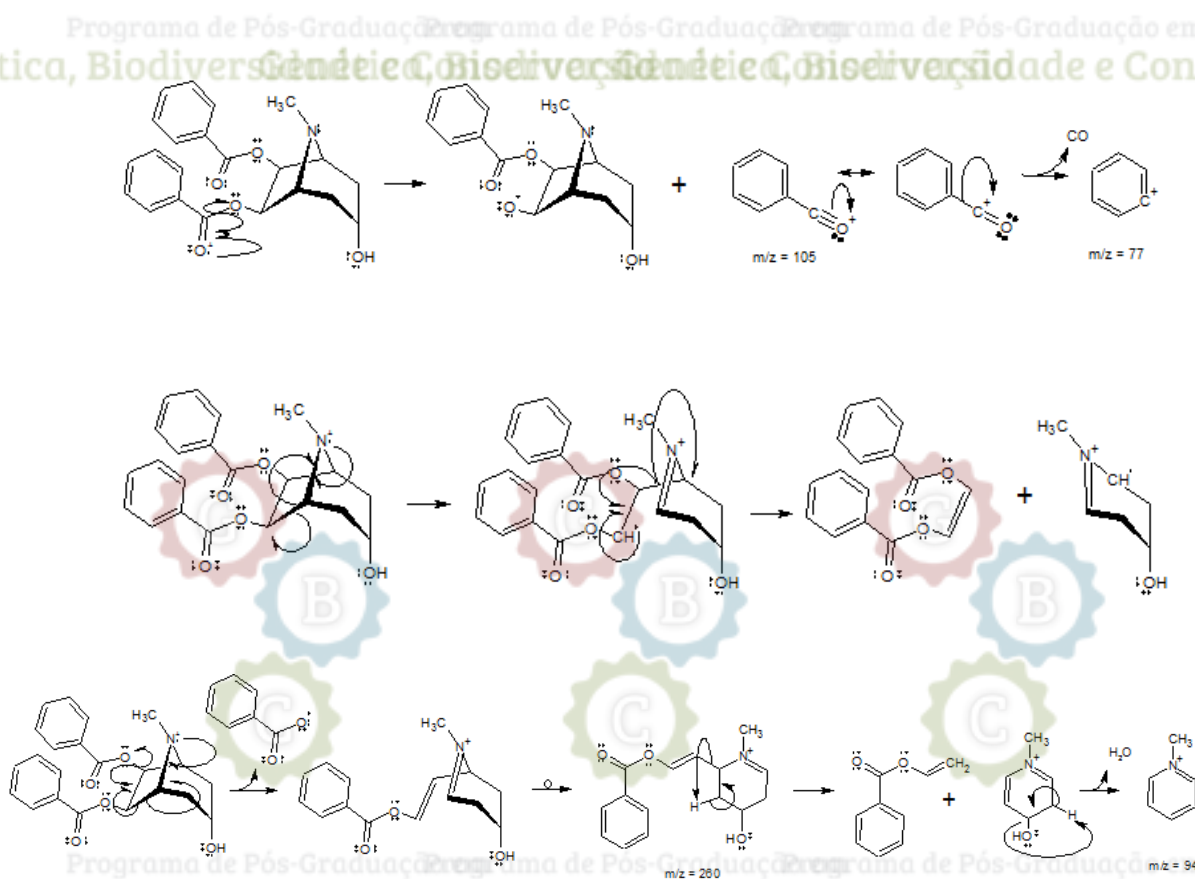


Figura 23. Principais fragmentações sugeridas para SI-1.

A estereoquímica em C-3, C-6 e C-7 de SI-1 pôde ser sugerida pela análise do mapa de contorno NOESY (Figura 24). Foi observada a correlação entre os hidrogênios em *orto* dos anéis aromáticos com os hidrogênios do grupo N-CH₃, sugerindo o arranjo espacial dos grupos substituintes do anel tropanico (Figura 25A). A correlação entre o hidrogênio H-3 com os hidrogênios H_{ax} (2 e 4) e H_{eq} (2 e 4) no anel tropanico sugere a posição axial do grupo 3-OH (Figura 25B). As demais correlações observadas nesse experimento são apresentadas na Figura 25C.

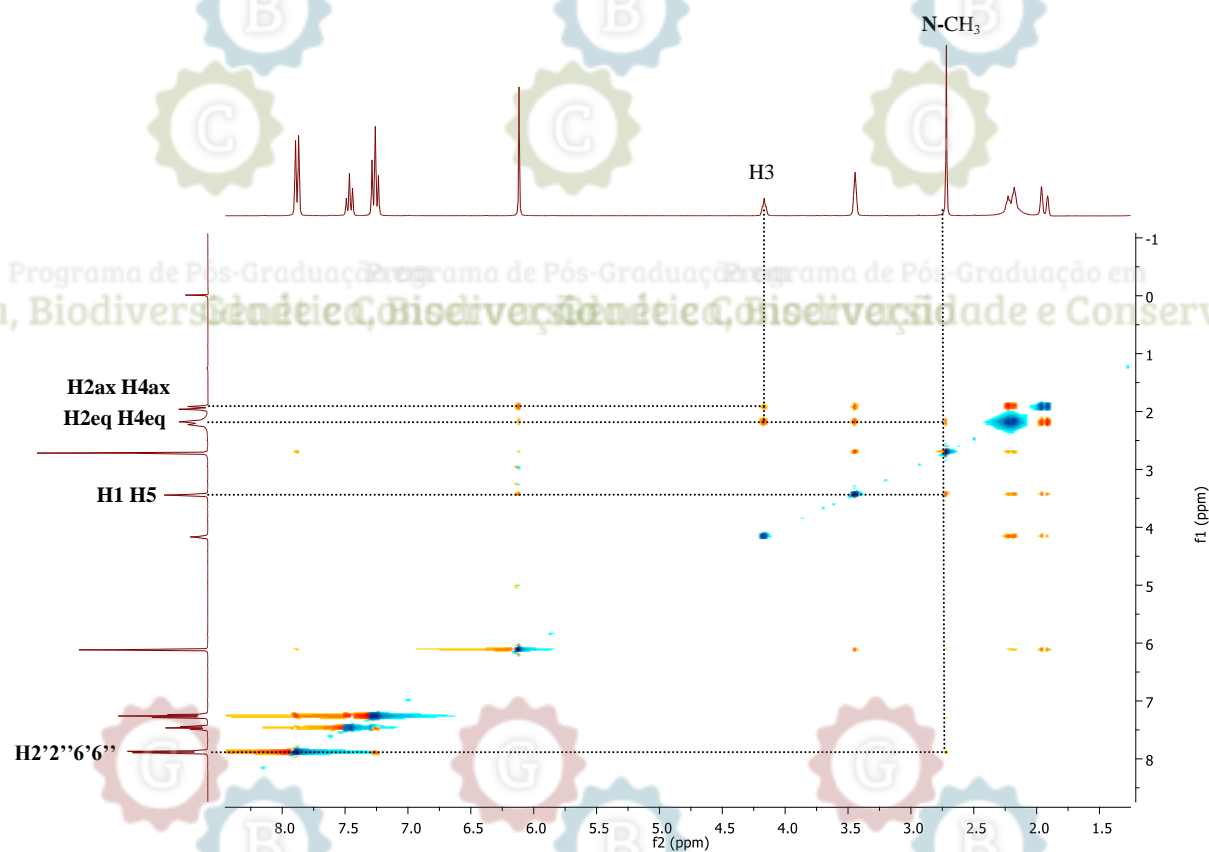
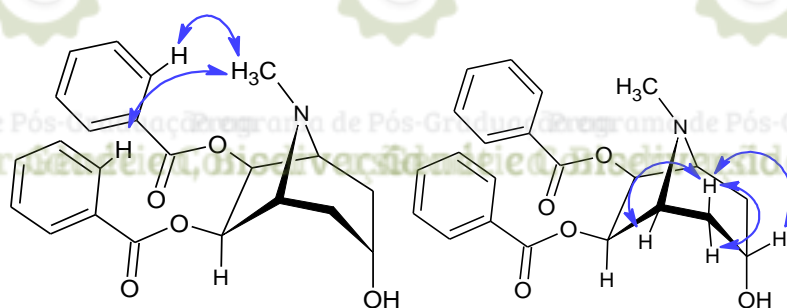
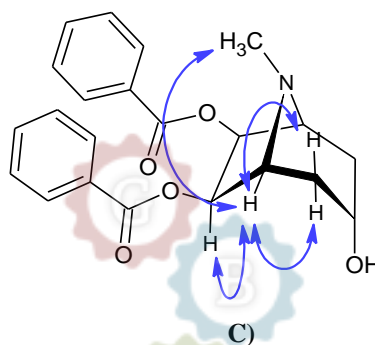


Figura 24. Mapa de contorno NOESY da SI-1.



A)

B)



C)

Figura 25. Correlações observadas no mapa de contorno NOESY da SI-1.

A atribuição dos sinais de alguns hidrogênios no esqueleto tropânico foi realizada com base nos dados do COSY (Figura 26). Observou-se que o hidrogênio na posição H-3 acopla com os hidrogênios H_{eq}-4 e H_{ax}-4, e que estes também acoplam com os hidrogênios na posição H-1 e H-5 (Figura 27).

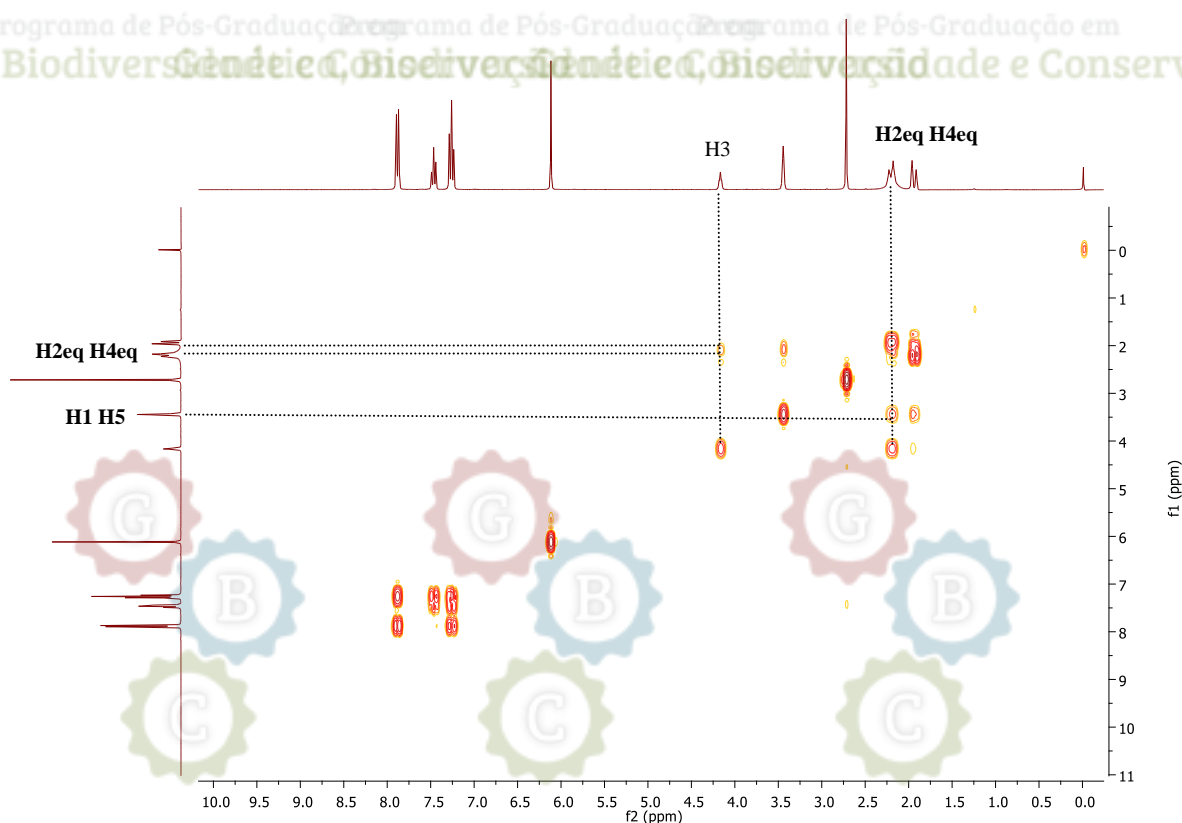


Figura 26. Mapa de contornos COSY da SI-1.

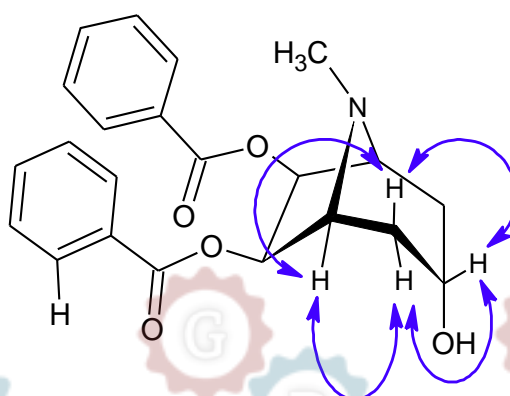


Figura 27. Principais correlações (acoplamentos) observadas no mapa de contornos COSY para o anel tropânico da SI-1.

A análise do mapa de contornos HMBC (Figura 28 e 29) possibilitou verificar a conectividade entre alguns átomos de C e H e auxiliou nas atribuições de alguns sinais. Foi observada correlação entre o hidrogênio na posição H-6 e H-7 do anel tropânico com os carbonos C-7' e C-7'' dos grupos benzoiloxi, e destes com os hidrogênios H-2' e H-2'' do anel aromático (Figura 30). Também foram observadas correlações entre os hidrogênios H-6 e H-7 com os carbonos C-1 e C-5, e o hidrogênio H-3 com os carbonos nas posições C-1 e C-5 (Figura 29).

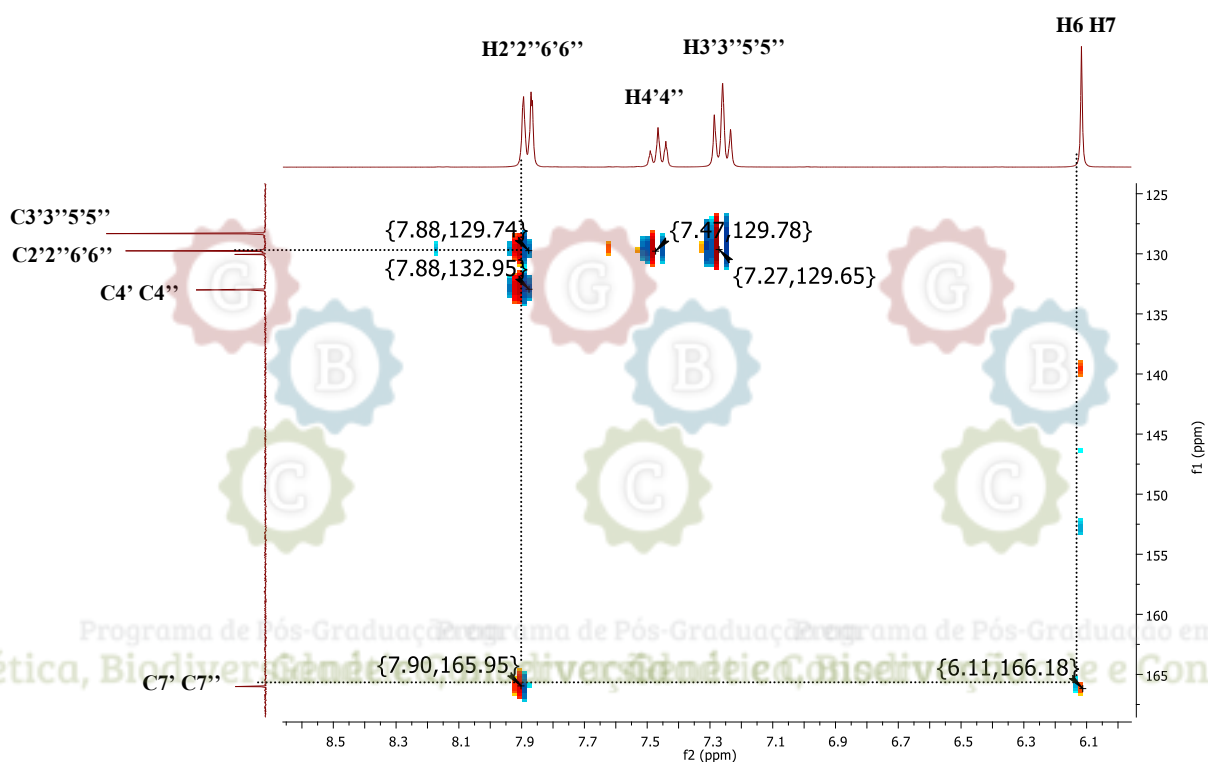


Figura 28. Mapa de contornos de HMBC da SI-1– ampliação 1.

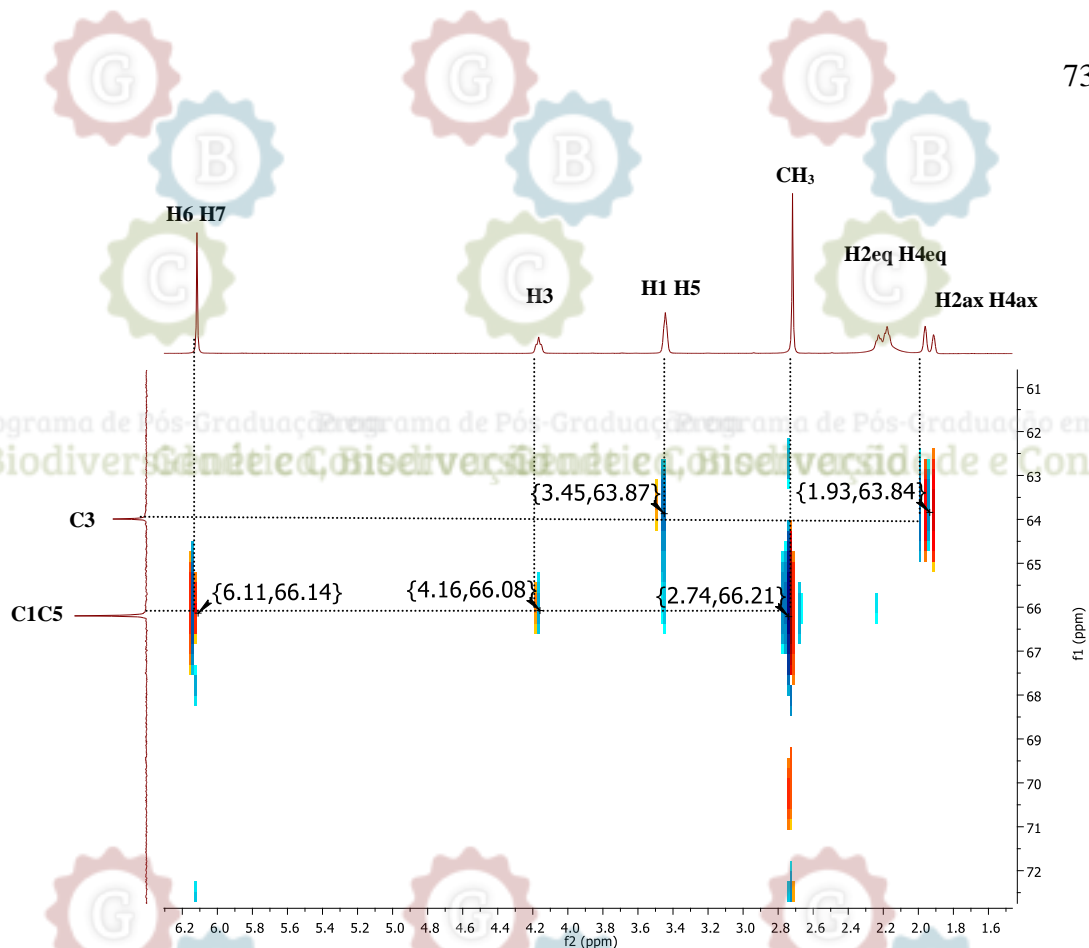


Figura 29. Mapa de contornos de HMBC da SI-1– ampliação 2.

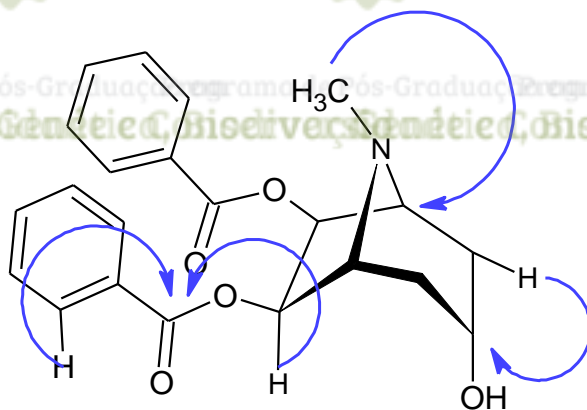


Figura 30. Principais correlações observadas nos mapas de contorno HMBC da SI-1.

A Tabela 2 descreve os valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos e atribuição completa dos sinais do composto SI-1, a partir dos dados de NOESY, HMBC e ^1H , ^1H -COSY.

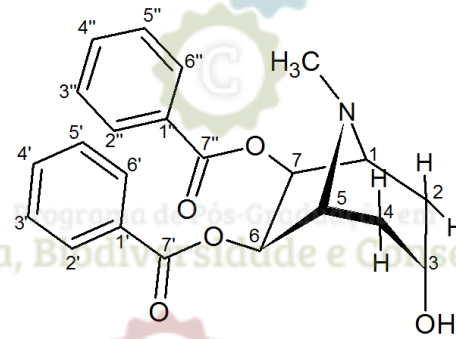


Tabela 2. Dados RMN de ^{13}C e ^1H , NOESY, HMBC e $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY da SI-1.

Posição/Grupo	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ ppm δ (mult.. J/Hz)	NOESY	HMBC	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY
1 e 5	66,17	3,45 (br. s)	Hax-C(2 e 4) / Heq-C(2 e 4) / N-CH ₃ / H-C(6 e 7)	H-C(6 e 7) / H-C(3) / N-CH ₃	Heq-C(2 e 4) / Hax-C(2 e 4)
2eq e 4eq	35,13	1,94 (br. d, J=14,3 Hz)	Hax-C(2 e 4) / N-CH ₃ / H-C(1 e 5) / H-C(3) / H-C(6 e 7)		Hax-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(3)
2ax e 4ax	35,13	2,20 (dt, J=14,3 e 3,5 Hz)	Heq-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(3) / N-CH ₃		Heq-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(3)
3	63,87	4,16 (br. t, J= 4,2Hz)	Hax-C(2 e 4) / Heq-C(2 e 4)	H-C(1 e 5) / Heq-(2 e 4)	Heq-C(2 e 4) / Hax-C(2 e 4)
6 e 7	78,64	6,13 (s)	Heq-C(2 e 4) / H-C(1 e 5)	H-C(1 e 5)	---
1' e 1''	130,01	---	---	---	---
2', 2'', 6' e 6''	129,73	7,88 (d, J=7,2 Hz)	N-CH ₃ / H-C(3', 3'', 5' e 5'')	H-C(2', 2'', 6' e 6'') / H-C(3', 3'', 5' e 5'') / H-C(4' e 4'')	H-C(3', 3'', 5' e 5'')
3', 3'', 5' e 5''	128,30	7,26 (t, J=7,7 Hz)	H-C(2', 2'', 6' e 6'') / H-C(4' e 4'')		H-C(2', 2'', 6' e 6'') / H-C(4' e 4'')
4' e 4''	132,99	7,46 (t, J= 7,4 Hz)	H-C(3', 3'', 5' e 5'')	H-C(2', 2'', 6' e 6'')	H-C(3', 3'', 5' e 5'')
7' e 7''	166,00	---	---	H-C(2', 2'', 6' e 6'') / H-C(6 e 7)	---
N-CH ₃	40,07	2,72 (s)	Hax-C(2 e 4) / H-C(1 e 5) / H-C(2', 2'', 6' e 6'')		---
O-H	---	2,58 (s)	---		---

Por fim, os dados obtidos pela cristalografia de Raio-X possibilitaram a confirmação inequívoca da estrutura proposta e da estereoquímica (Figura 31), para o composto SI-1, sendo este identificado como o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano, tratando-se, portanto, de um alcaloide tropânico inédito.

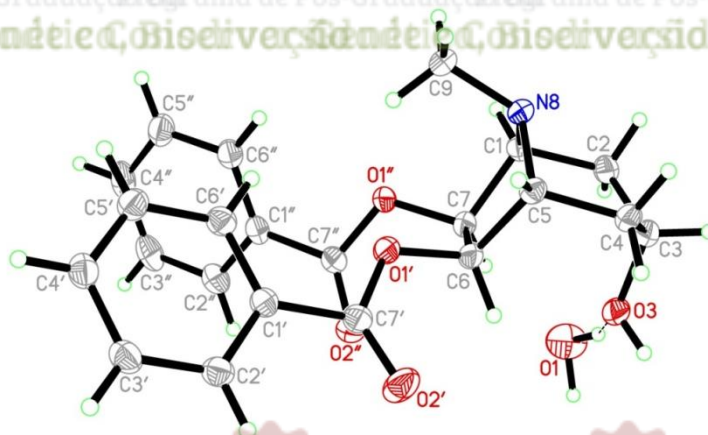


Figura 31. Desenho gerado por computador da estrutura cristalina 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano.

5.1.2 Substância Isolada 2 (SI-2)

A segunda substância isolada das folhas da *E. macrocalyx* foi codificada como SI-2. Esta substância apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff sugerindo se tratar também de um alcaloide.

A análise por CG-EM confirmou o alto grau de pureza da amostra apresentando apenas um pico no cromatograma (Figura 32). O espectro de massas obtido nesta análise (Figura 33) apresentou o pico do íon molecular em $m/z = 319 [M^+]$, compatível com a provável fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_5$.

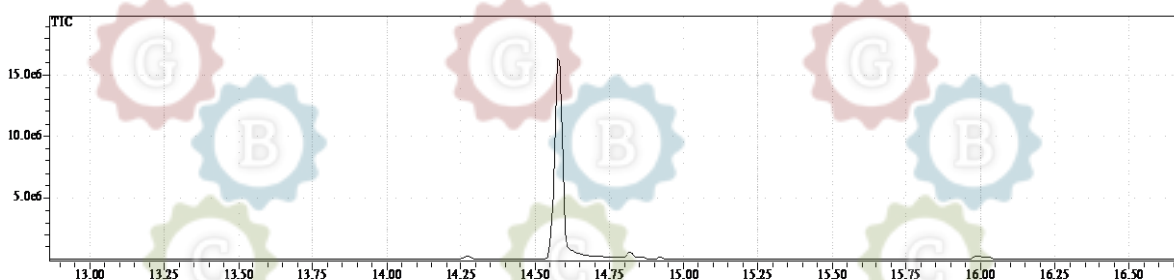


Figura 32. Cromatograma da SI-2 (CG-EM/IE).

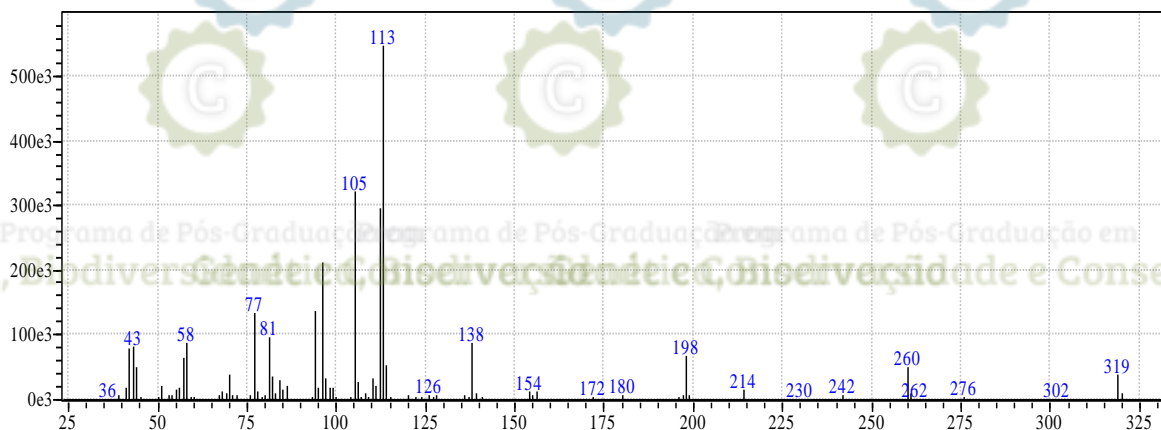


Figura 33. Espectro de Massas da SI-2 obtido por CG-EM.

A análise por RMN de ^1H da SI-2 (Figura 35) sugeriu que a substância se tratava de um alcalóide tropânico. O espectro apresentou três sinais correspondentes a cinco hidrogênios de um anel aromático monosubstituído. Um dubleto em δ 7,9, integrando para dois hidrogênios (2' e 6'), um tripleto δ 7,48 integrando para dois hidrogênios (3' e 5') e um tripleto em δ 7,64, integrando para um hidrogênio (4').

Ainda de acordo com o RMN de ^1H , em relação ao anel tropânico foram observados em δ 6,31 e δ 6,21, dois dubletos acoplados entre si, cada um integrando para um hidrogênio. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios nas posições 6 e 7 deste anel, mostrando inexistência de simetria, neste anel, diferente do que foi observado para a SI-1. Em δ 4,32, foi verificado um singleto largo integrando para um hidrogênio, sendo este sinal atribuído ao hidrogênio na posição 3. O deslocamento químico e o valor das integrais destes três últimos sinais indicaram que nas posições em que se encontram tais hidrogênios, existem grupos substituintes desblindando-os. Em δ 4,00 e δ 3,89 foram observados dois singletos largos, característicos dos hidrogênios das posições 1 e 5 do anel tropânico. Em δ 3,17, foi verificado um dubleto integrando para três hidrogênios, o qual foi atribuído ao grupo CH_3N - do anel tropânico. Entretanto, o alto deslocamento químico apresentado por este sinal, além de sua multiplicidade, foram indicativos de que o composto analisado se encontrava na forma protonada (Figura 35), na qual a metila em questão apresentou um acoplamento com o hidrogênio (δ 12,52) ligado ao nitrogênio quaternário. Foram verificados no espectro outros dois sinais em δ 3,10 e δ 2,27, cada um integrando para dois hidrogênios. Estes foram atribuídos aos hidrogênios nas posições 2 e 4 do anel tropânico, cujo valor de deslocamento, acima do esperado, pode ser justificado pela presença nitrogênio protonado. Por fim, foi

observado um singlete em δ 1,95 integrando para três hidrogênios, característico da metila de um grupo acetato.

Com base nas análises espectroscópicas, foram sugeridas três possíveis estruturas para a molécula SI-2 (Figura 34).

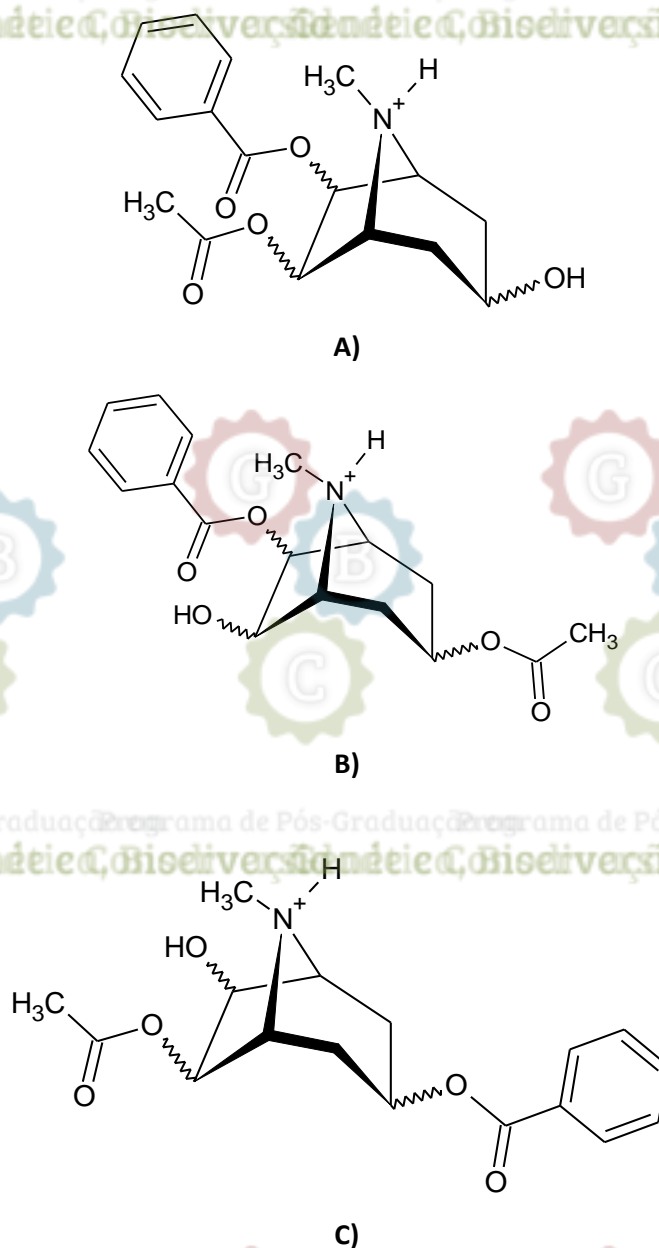


Figura 34. Fórmulas estruturais sugeridas para SI-2

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 36) corrobora com as propostas de estrutura apresentadas na Figura 34 para o composto SI-2. Os sinais em δ 69,1 e δ 73,9 são

correspondentes aos carbonos 1 e 5 do anel tropânico, respectivamente. Em δ 29,6 e δ 35,5 representam os carbonos metilênicos, também do anel tropânico, assim como os sinais em δ 61,7, δ 74,3 e δ 77,1 que podem ser atribuídos aos substituintes: hidroxila, grupo acetato e benzoiloxi. Quanto aos carbonos do anel aromático, o sinal em δ 128,4 representa o carbono não hidrogenado, em δ 126,5 e em δ 128,3 os carbonos na posição *orto* e *meta*, respectivamente, e em δ 134,0 o carbono na posição *para*. O sinal em δ 164,7 referente à carboxila, em δ 42,0 corresponde ao carbono metílico ligado ao nitrogênio do anel tropânico e em δ 168,8 e δ 20,7 representando os carbonos do grupo acetato.



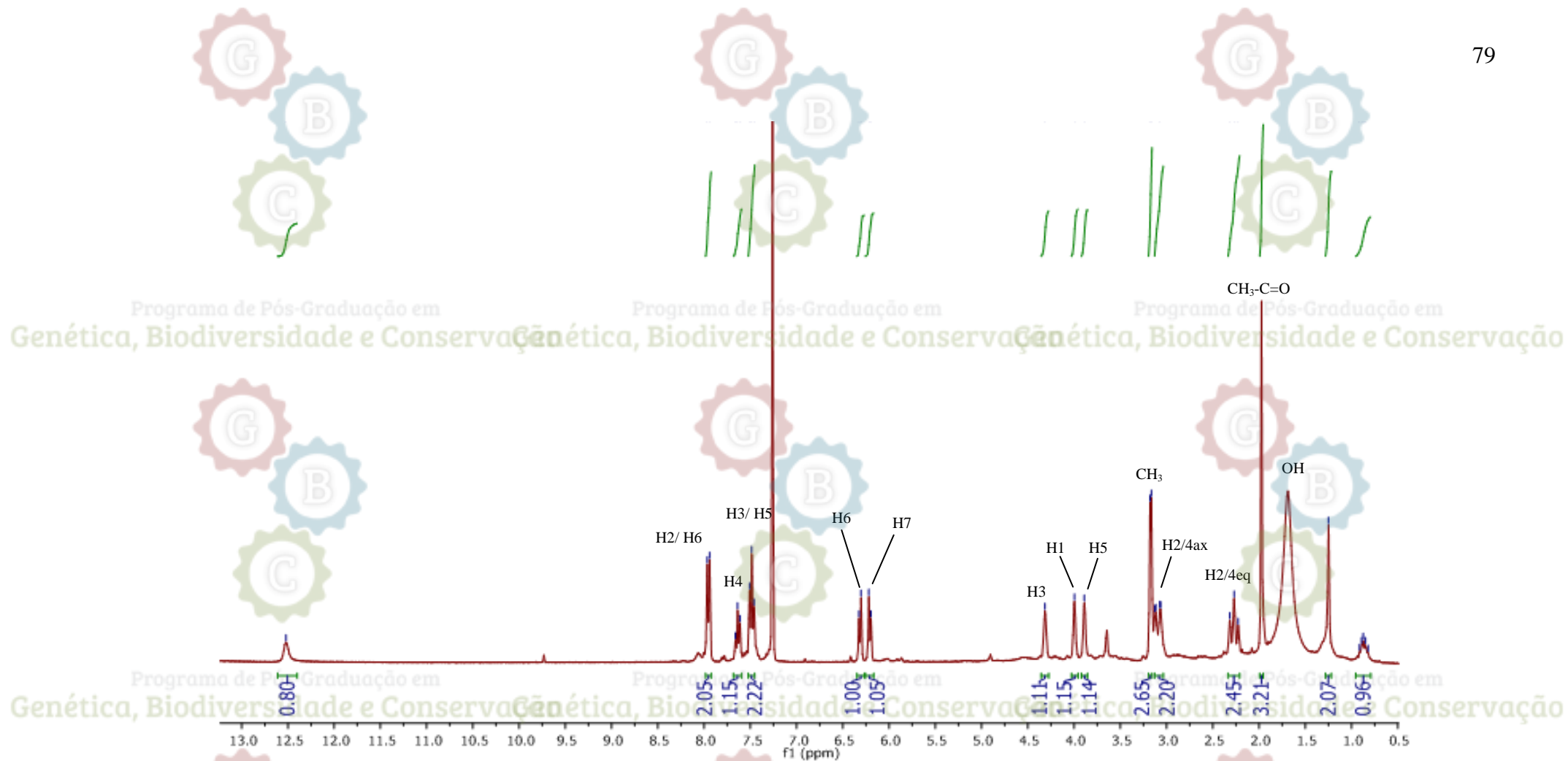


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da SI-2.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

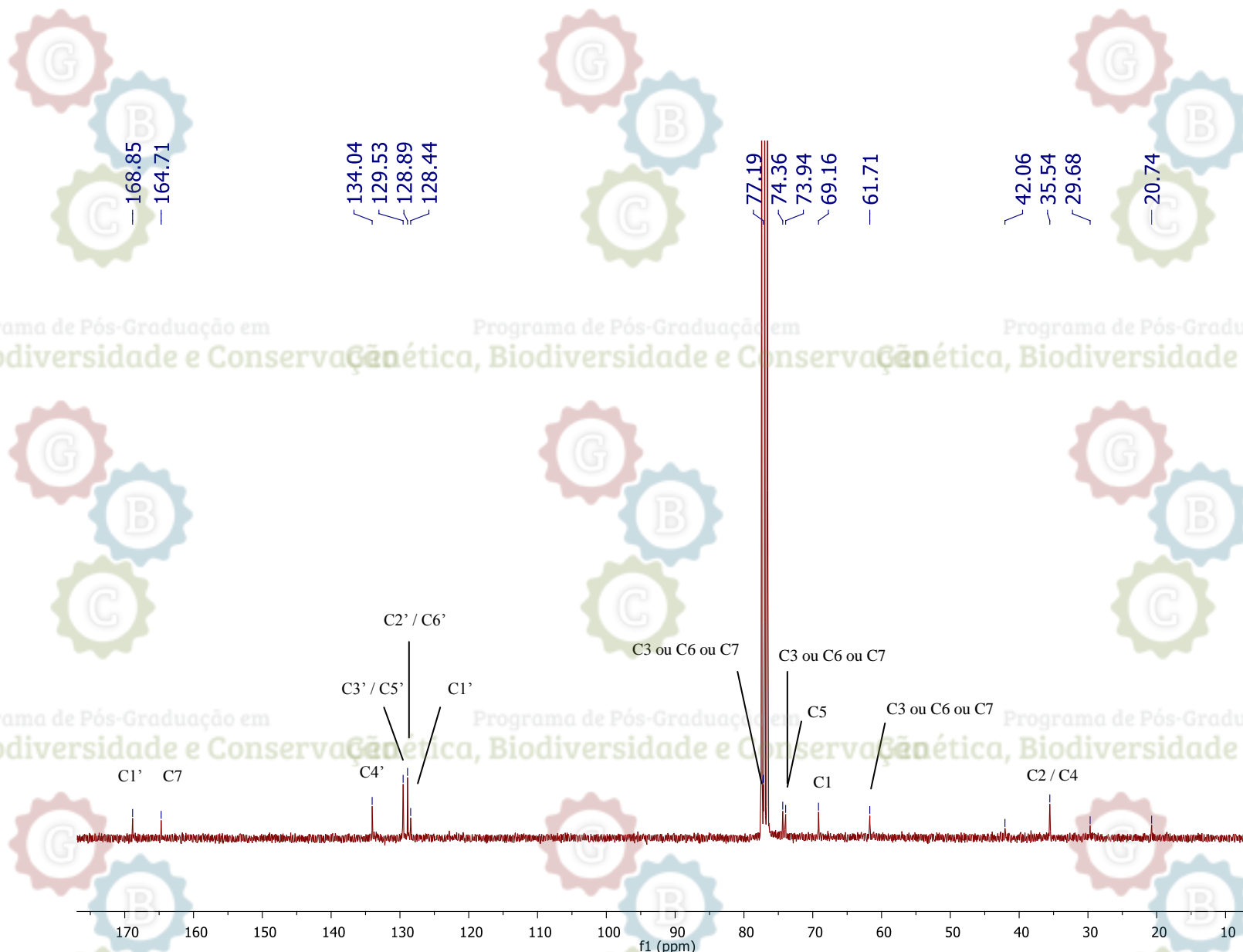


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da SI-2.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

A Tabela 3 descreve os valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos atribuídos a SI-2.

Tabela 3. Dados RMN de ^{13}C e ^1H da SI-2.

Posição/Grupo	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ ppm δ (multi. J/Hz)
1	69,1	4,0 (s)
5	73,9	3,8 (s)
2eq e 4eq	29,6 ou 35,5	2,27 (t, J = 13,8 Hz)
2ax e 4ax	29,6 ou 35,5	3,09 (ddt, J = 15,7 e 2,9 Hz)
3	61,7 ou 74,3 ou 77,1	4,32 (sl)
6	61,7 ou 74,3 ou 77,1	6,31 (d, J = 6,9 Hz)
7	61,7 ou 74,3 ou 77,1	6,21 (d, J = 6,9 Hz)
1'	128,4	---
2' e 6'	126,5	7,96 (d, J = 7,4 Hz)
3' e 5'	128,8	7,48 (t, J = 7,6 Hz)
4'	134,0	7,64 (t, J = 7,4 Hz)
7	164,7	---
N-CH ₃	42,0	3,17 (d, J = 4,6 Hz)
CH ₃ -CO	168,8 e 20,7	2,2 (s)
O-H	---	1,2 (sl)

A análise espectroscópica indicou que a substância SI-2 foi isolada na forma de um sal, possivelmente gerado no processo de obtenção da FTA, sendo necessária uma análise futura, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), dos extratos brutos que geraram esse composto para confirmar se o mesmo está presente na planta na forma protonada ou não protonada.

Uma substância análoga, na forma não protonada, foi isolada das cascas da *E. macrocalyx*, por outro integrante do grupo de pesquisa. No entanto, a quantidade insuficiente da SI-2 não permitiu a análise da mesma por espectros de RMN de ^{13}C e ^1H bidimensionais, necessários para comparar se a substância não protonada isolada da casca é a mesma que a SI-2. Assim, torna-se indispensável a obtenção de mais massa da substância SI-2 para esta análise.

Uma busca realizada na base de dados *Scifinder* não encontrou dados referentes a nenhuma das três estruturas atribuídas para esse composto (Figura 34) ou para essas mesmas

estruturas na forma não protonada, sendo este um indicativo de que se trata de uma nova substância.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação da quantidade de fenólicos totais nos extratos de *E. macrocalyx* e *E. affine* foi calculada com base na equação obtida por meio da curva de calibração da quercetina (Figura 37).

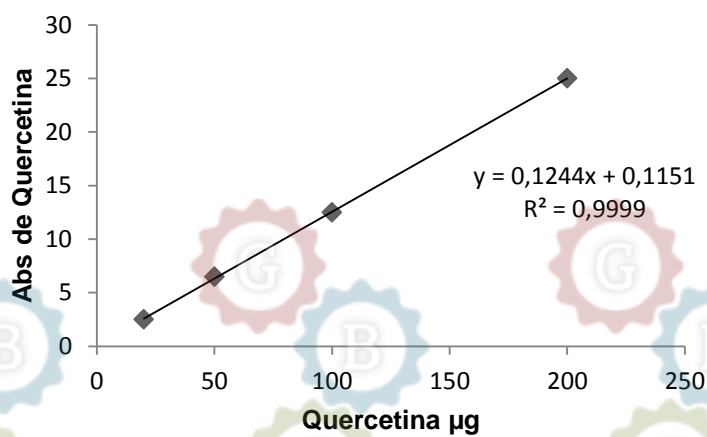


Figura 37. Curva padrão da quercetina.

Os resultados revelaram a quantidade de fenólicos totais em cada extrato analisado, expresso em µg de quercetina equivalente (QE) por mg de extrato, apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidade de fenólicos totais em *E. macrocalyx* e *E. affine*.

Amostras	QFT
Extrato bruto <i>E. affine</i>	34,66 ± 0,72
Extrato bruto <i>E. macrocalyx</i>	12,55 ± 0,09

QTF: Quantidade de fenólicos totais.

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários caracterizados pela presença de uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis benzênicos (fenol ou polifenóis, respectivamente). Os principais representantes desse grupo são os ácidos fenólicos

e os flavonoides que são facilmente encontrados em plantas e frutos (ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

Muitos estudos são publicados sobre os benefícios dos compostos fenólicos para a saúde humana, citando, por exemplo, a proteção cardiovascular e o controle do colesterol (VACCARI et al., 2009). São diversas as atribuições aos fenólicos, o que o torna motivo de interesse em pesquisas com produtos vegetais.

A presença de compostos fenólicos no gênero *Erythroxylum* é usualmente citada em estudos sobre suas espécies (BARREIROS et al., 2005). Kumar e colaboradores (2014), por exemplo, identificaram fenólicos e flavonoides nos extratos de *E. monogynum*; e González-Guevara et al. (2006) isolaram flavonoides em outras quatro espécies. Além destes, estudos mencionam a presença de quercetina e kaempferol, especialmente em espécies da região nordeste do Brasil (BARREIROS et al., 2005).

Assim, é possível afirmar que os resultados encontrados pelo presente estudo corroboram com os dados publicados, e cria a expectativa de isolar e identificar os fenólicos da *E. macrocalyx* e *E. affine*.

5.3 TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.3.1 Atividade de inibição da acetilcolinesterase *in vitro*

A atividade de inibição da acetilcolinesterase pelo extrato bruto e frações das espécies *E. affine* e *E. macrocalyx*, e do 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano foram comparadas ao controle positivo eserina. Os resultados mostraram que o extrato bruto e frações da *E. affine* e a fração hexânica da *E. macrocalyx* inibiram a AChE. Contudo, o maior percentual de atividade foi apresentado pela fração acetato de etila, de *E. affine*, com inibição de 56% da atividade colinesterásica, seguida pelo extrato bruto (49%) e fração butanólica (46%). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os valores apresentados pela fração acetato de etila, butanólica e extrato bruto (Tabela 5).

Embora os valores de inibição apresentados pela *E. affine* sejam menores que o padrão testado, é importante lembrar que nas frações e no extrato bruto estão presentes inúmeros compostos, ao contrário da eserina que se trata de uma só substância.

Tabela 5: Resultado da atividade acetilcolinesterásica do extrato e frações das *E. affine* e *E. macrocalyx* e 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano.

	Amostras	% inibição
<i>E. affine</i>	Extrato bruto	49,58 \pm 6,53 ^a
	Fração hexânica	8,06 \pm 2,87 ^b
	Fração acetato de etila	56,01 \pm 2,95 ^a
	Fração butanólica	46,23 \pm 1,49 ^a
<i>E. macrocalyx</i>	Extrato bruto	-
	Fração hexânica	5,86 \pm 3,11 ^b
	Fração acetato de etila	-
	Fração butanólica	-
	6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	-
	Eserina	94,43 \pm 0,75

(-): Não inibiu.

Estatística realizada: ANOVA e Teste Tukey (p<0,05)

De acordo com a classificação apresentada por Vinutha et al. (2007), e adotada por outros estudos envolvendo a AChE, os inibidores potentes apresentam atividade maior que 50%; os moderados inibem entre 30 a 50%; e os fracos menos que 30%. Assim, a fração acetato de etila da *E. affine* pode ser considerada, de acordo com a classificação acima, um potente inibidor de AChE.

Apesar dos alcaloides serem relatados como as substâncias de maior atividade acetilcolinesterásica (CARDOSO-LOPES et al., 2009), não foi possível afirmar que tal ação é exercida pelos alcaloides tropânicos, visto que o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano, isolado da *E. macrocalyx* neste estudo, não inibiu a atividade da AChE nas concentrações testadas.

Quanto à diferença de inibição revelada entre as espécies *E. affine* e *E. macrocalyx*, é presumível que possa ter relação com a maior quantidade de fenólicos totais presentes na *E. affine*, conforme demonstrado no ensaio de Quantificação de Fenólicos Totais. A hipótese levantada baseia-se na sugestão de pesquisadores sobre os efeitos benéficos dos compostos polifenólicos na comunicação neuronal e proteção contra déficits relacionados ao envelhecimento na função cognitiva e motora (JOSEPH et al., 2007). Uma vez que o decréscimo de acetilcolina nas áreas cerebrais responsáveis pelas funções citadas acima, pode ser comprometidos por ação da AChE.

Os compostos fenólicos são referidos como metabólitos de ação neuroprotetora. Dentre eles, os flavonoides são citados pela provável ação de reversão de lesões neuronais, com conseqüente atraso da progressão de doenças degenerativas (SPENCER, 2010).

Estudos com extratos fenólicos de 12 plantas medicinais indicaram boa atividade acetilcolinesterásica em pelo menos cinco delas (ADEWUSI et al., 2011). A associação de flavonóides como inibidores de AChE tem evidenciado que estes compostos são candidatos em potencial para o desenvolvimento de novas drogas acetilcolinesterásicas, conforme relatado por Guo et al. (2010) ao comprovar a ação de um flavonóide isolado de *Rhizoma Alpiniae Officinarum*; E por Jung & Park (2007), com flavonóides isolados de *Agrimonia pilosa*.

São diversos os estudos direcionados à busca por novas moléculas com ação acetilcolinesterásica, justificados pelo fato de que os produtos de origem vegetal já se mostraram como fontes em potenciais de inibidores da AChE. Acontecimento que pode ser confirmado pela terapêutica atual do tratamento da doença de Alzheimer que disponibiliza, dentre os medicamentos utilizados, dois que foram obtidos de plantas: a galantamina (CORTES et al., 2015; MOTA et al., 2012; CARDOSO-LOPES et al., 2009; VIEGAS JR. et al., 2004), e a huperzina A (SERENIKI & VITAL, 2008).

No entanto, a limitação das drogas para o tratamento da doença de Alzheimer é outro motivo pelo qual surge o interesse por novas moléculas com ação acetilcolinesterásica. Apesar da doença de Alzheimer não possuir cura, os medicamentos empregados para amenizar os sintomas causam, muitas vezes, efeitos indesejados que limitam o seu tratamento (CORTES et al., 2015; SERENIKI & VITAL, 2008). Sendo assim, a procura por moléculas capazes de inibir a AChE, com menor agravo ao organismo dos pacientes torna-se ensejo para descoberta de novas drogas terapêuticas.

Este estudo mostrou que os compostos presentes nas frações acetato de etila e butanólica e extrato bruto de *E. affine* apresentaram porcentagens significativas na inibição da AChE. Estes compostos ainda não foram identificados e testados isoladamente, porém cria perspectivas na terapia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

5.3.2 Atividade de inibição da α -amilase *in vitro*

A atividade de inibição do extrato bruto e frações das espécies *E. affine* e *E. macrocalyx* e SI-1 foram comparadas ao controle positivo acarbose. Os resultados mostraram

que a concentração máxima de inibição apresentada pela acarbose foi de 75% e o IC₅₀ foi de 36,7% (Figura 38).

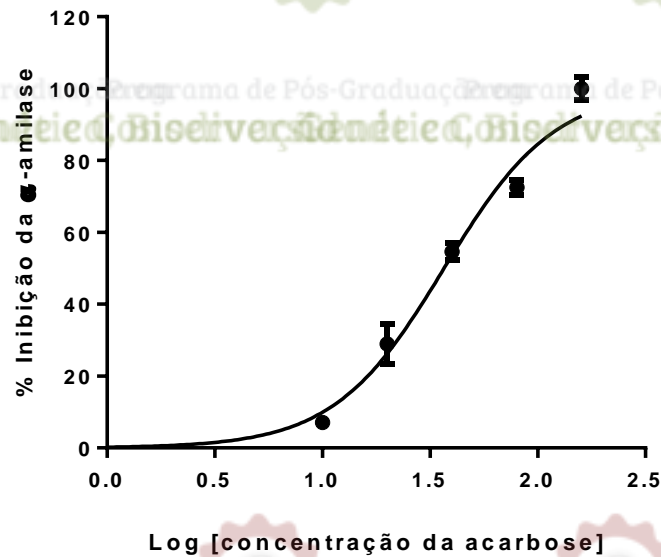


Figura 38: Avaliação da atividade de inibição da acarbose sobre a α -amilase. Foram utilizadas concentrações finais crescentes do inibidor (1, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

As folhas de *E. macrocalyx* e *E. affine* foram testadas por meio da análise dos seus extratos brutos etanólicos, frações butanol (FB), acetato de etila (FAE) e hexano (FH), além da substância isolada 1. Todos na concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados mostraram que as inibições enzimáticas pela *E. macrocalyx* e 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano não foram significativas quando comparada à acarbose, conforme apresentado na Tabela 6. Quanto à *E. affine*, os resultados indicaram que a FAE e FB inibiram a α -amilase com atividade de 94% e 96%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Resultado da atividade dos extratos e frações de *E. affine*, *E. macrocalyx* e 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano sobre a α -amilase.

	Amostras	% inibição
<i>E. affine</i>	Extrato bruto	13,36 \pm 4,52 ^a
	Fração hexânica	49,49 \pm 5,74 ^b
	Fração acetato de etila	94,58 \pm 4,74 ^c
	Fração butanólica	96,62 \pm 1,98 ^c
<i>E. macrocalyx</i>	Extrato bruto	2,31 \pm 2,72 ^d
	Fração hexânica	36,80 \pm 1,59 ^e
	Fração acetato de etila	11,55 \pm 3,02 ^{a,d}
	Fração butanólica	5,61 \pm 4,43 ^{a,d}
	6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano	12,54 \pm 3,36 ^{a,d}
	Acarbose	75,91 \pm 2,81

Estatística realizada: ANOVA e Teste Tukey (p<0,05)

A atividade de inibição da fração acetato de etila e fração butanol da *E. affine* foi avaliada. Foram utilizadas concentrações decrescentes: 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,2 μ g/mL.

Para a FAE, os resultados mostraram uma inibição máxima de 94%, 93% e 91% alcançadas nas concentrações de 1000 μ g/mL, 500 μ g/mL e 250 μ g/mL, respectivamente (Figura 39). O valor de IC₅₀ foi de 176,5 μ g/mL.

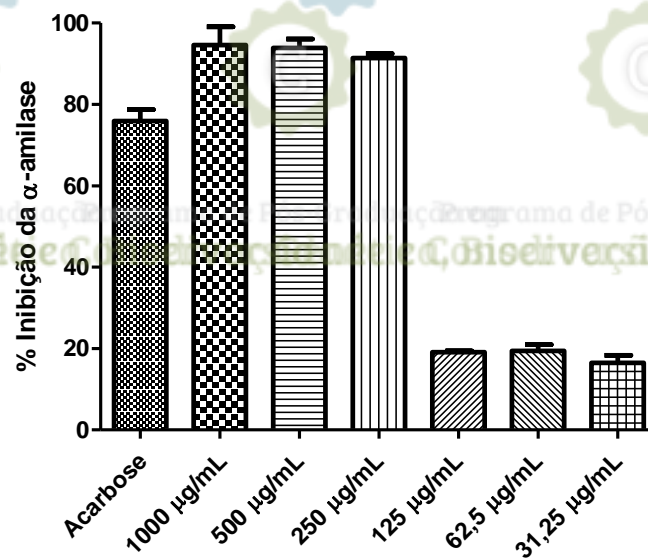


Figura 39: Avaliação da atividade de inibição da α -amilase pela fração acetato de etila (FAE) da *E. affine*, nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, comparando com a acarbose. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

Para a FB, os resultados mostraram uma inibição máxima de 96%, 92% e 89% alcançadas nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 40). O valor de IC_{50} foi de 175,3% $\mu\text{g/mL}$.

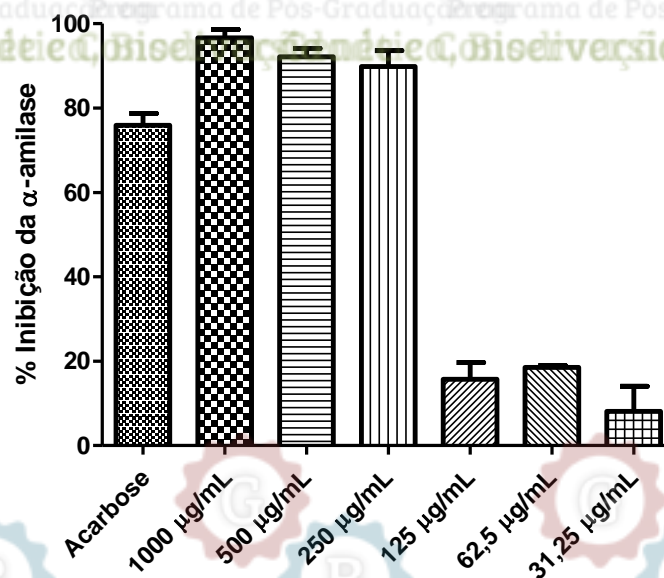


Figura 40: Avaliação da atividade de inibição da α -amilase pela fração butanólica (FB) da *E. affine*, nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, comparando com a acarbose. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

Este é o primeiro estudo de atividade inibitória de α -amilase com espécies *Erythroxylum*. Os resultados mostraram que as frações acetato de etila e butanol da *E. affine* apresentaram níveis de inibição superiores ao apresentado pelo controle acarbose.

É possível sugerir que a diferença de resultados apresentada entre *E. macrocalyx* e *E. affine* sobre a α -amilase tenha relação com a maior quantidade de fenólicos totais apresentados pela *E. affine*, visto que a atividade inibitória de enzimas digestivas já foram atribuídas aos compostos fenólicos em outros estudos (DJERIDANE et al., 2013; Gonçalves et al., 2011; KIM et al., 2011). Por exemplo, o extrato da *Psidium guajava* Linn e os flavonoides isolados da mesma (WANG et al., 2010); os flavonóides identificados na *Bergenia ciliata* (BHANDARI et al., 2008) e os ácidos triterpenoides da *Phyllanthus amarus* (ALI et al., 2006), que apresentaram boa inibição da α -amilase são alguns dos estudos publicados sobre a associação de fenólicos à atividade enzimática da α -amilase.

A α -amilase catalisa a hidrólise de ligações α -1,4-glicosídicas de amido, glicogênio e outros oligossacáridos. Assim, os inibidores desta enzima agem impedindo a absorção intestinal de carboidratos, gerando uma diminuição da hiperglicemia pós-prandial, eficaz no controle da diabetes mellitus (BHANDARI et al., 2008).

A diabetes é uma desordem metabólica que acomete mais de 371 milhões de pessoas no mundo com uma estimativa de 552 milhões em 2030 (CRUZ-FERREIRA et al., 2015). Atualmente, são poucos os hipoglicemiantes orais disponíveis, por exemplo, a acarbose, o miglitol e o voglibose, sendo à estes atribuídos o surgimento de efeitos indesejados, tais como flatulência, dores abdominais, lesões hepáticas e diarreia (KIM et al., 2011).

A limitação das drogas com ação hipoglicemiante e o crescimento de casos de diabetes a nível mundial aumenta o interesse por moléculas com atividade antienzimática. Deste modo, os resultados apresentados pela *E. affine* sobre a inibição da α -amilase contribui não só para o conhecimento do potencial biológico das *Erythroxylum*, como também cria a perspectiva de estudo sobre os fitoconstituintes presentes nas frações analisadas.

5.3.3 Teste de sensibilidade bacteriana

O ensaio de difusão em disco avaliou a atividade dos extratos da *E. affine*, *E. macrocalyx* e SI-1 sobre as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosas*, e mostrou que os microorganismos testados foram poucos sensíveis, quando comparadas aos controles positivos (Tabela 7).

Tabela 7: Halos de inibição das bactérias (em mm) pelo método de difusão em disco.

Amostras	Microorganismos	
	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
Extrato bruto <i>E. affine</i>	2 mm	2 mm
Extrato bruto <i>E. macrocalyx</i>	2 mm	2 mm
SI-1	2,6 mm	4,6 mm
Controle positivo	13,3 mm	10,6 mm
Metanol	-	-

(-): Não inibiu.

Controle positivo para *S. aureus*: Ceftriaxona; *P. aeruginosa*: Tetraciclina.

Ainda que a SI-1 tenha apresentado um halo de inibição de 4,6 mm para *P. aeruginosa*, o que corresponde a 43% de atividade da tetraciclina, controle positivo, a mesma não é considerada clinicamente efetiva, visto que, apesar do halo de inibição ser maior que 2 mm, a diferença entre o controle foi maior que 3 mm, característica necessária para que o microorganismo seja avaliado como moderadamente sensível (OSTROSKY et al., 2008).

Embora os resultados encontrados pelo presente estudo não foram significativos, a atividade antibacteriana é mencionada como uma das indicações farmacológicas de *Erythroxyllum*. É possível citar como exemplo, o ensaio realizado com o extrato metanólico de *E. pulchrum*, por Albuquerque e colaboradores (2014), que mostrou ser efetivo contra linhagens bacterianas gram-positivas e gram-negativas. Aguiar et al. (2012), também avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato e frações de *E. caatingae*, revelando que houve inibição somente nas linhagens gram-positivas e de fungos.

S. aureus, avaliada neste estudo, é uma bactéria gram-positiva comumente utilizada em ensaios antibacterianos. Apesar de estar presente na microbiota normal dos seres humanos, algumas estirpes são responsáveis por infecções graves como meningite, pneumonia, endocardite, septicemia, e etc. Já a *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, que pode ser encontrada em indivíduos sadios, mas considerada oportunista, uma vez que acomete pacientes imunocomprometidos agravando o quadro de saúde destes.

A presença de *P. aeruginosa* nos hospitais é crescente e preocupante, pois é frequentemente relatada em estudos sobre infecções nosocomiais, associadas a bacteremias, infecções respiratórias, auditivas, oculares e urinárias, por exemplo (CORDEIRO et al., 2009; FUENTEFRÍA et al., 2008; MATA & ABEGG, 2007). Além disso, o seu controle torna-se

ainda mais complexo, visto que também adquiriu resistência a muito antibióticos convencionais, o que desperta o interesse por substâncias capazes de inibir a sua atividade.

As cepas utilizadas neste ensaio representam os dois grupos de classificação de bactérias: as gram-positivas e gram-negativas. Essa diferenciação é realizada a partir de uma técnica denominada Coloração de Gram que permite identificar as bactérias por sua camada externa. Assim, as gram-positivas que possuem uma espessa camada de peptidoglicanos e não possui membrana externa, coram-se de roxo, enquanto que as gram-negativas que possuem somente uma fina camada, mas com uma membrana externa contendo lipídeos, não retém o corante, assumindo a coloração avermelhada. Essa diferenciação é importante porque está associada ao perfil de virulência apresentado por cada grupo (Warren Levinson, 2014).

Portanto, o extrato metanólico das folhas de *E. affine* e *E. macrocalyx* não apresentaram sensibilidade bacteriana sobre as cepas avaliadas. No entanto, cria-se a perspectiva de testar em outros microorganismos como, por exemplo, os fungos, haja visto que, assim como no estudo apresentado por Aguiar et al. (2012), o ensaio realizado por Rahman et al. (1998), com o extrato de *E. moonni*, que também não inibiu as bactérias testadas, demonstrou atividade contra fungos.

5.3.4 Ensaio de citotoxicidade com linhagem de glioma murino (C6)

A citotoxicidade do alcalóide tropânico $6\beta,7\beta$ -dibenzoil- 3α -hidroxitropano foi avaliada por teste, *in vitro*, envolvendo uma linhagem de células tumorais cerebrais do tipo glioma murino (C6), representativo em estudos que visam características de células da glia. A análise morfológica revelou células alongadas de confluência e distribuição espacial uniforme, fenótipo fusiforme no controle (DMSO 0,5% em meio de cultivo). Observou-se redução da celularidade mediante o aumento da concentração, quando comparado com o controle, visualização de espaços intracelulares e debris, indicativos de morte celular, principalmente na última concentração, 3000 μ M (Figura 41).

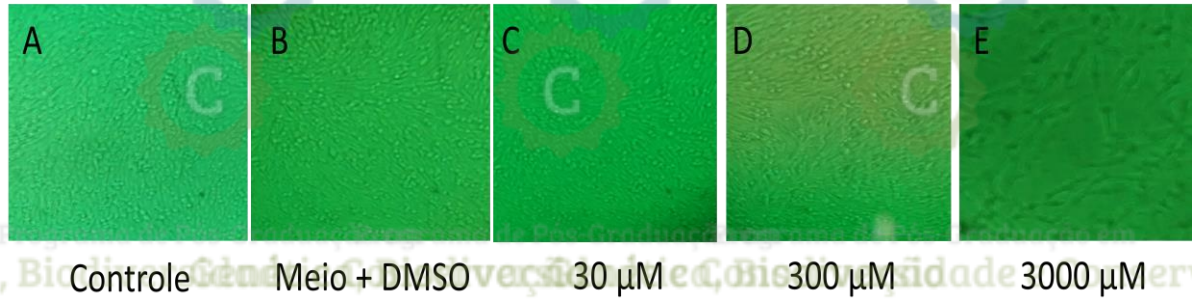


Figura 41. Efeito citotóxico sobre a morfologia das células C6 após 72 horas de tratamento com a substância 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano. Aumento de 20x. **A.**Controle; **B.** Meio + DMSO; **C.** 30 μ M; **D.** 300 μ M; **E.** 3000 μ M.

Na análise dos dados envolvendo células tumorais (C6), foi observada a concentração tóxica mínima em 300 μ M de 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano ($p > 0,005$), definida pela sobrevivência de 75% das células (Figura 42). As concentrações menores que 300 μ M não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle. A concentração na qual foi determinada 50% de morte celular EC_{50} (1825 μ M) foi obtida pelo cálculo da média de cada triplicata (Figura 43).

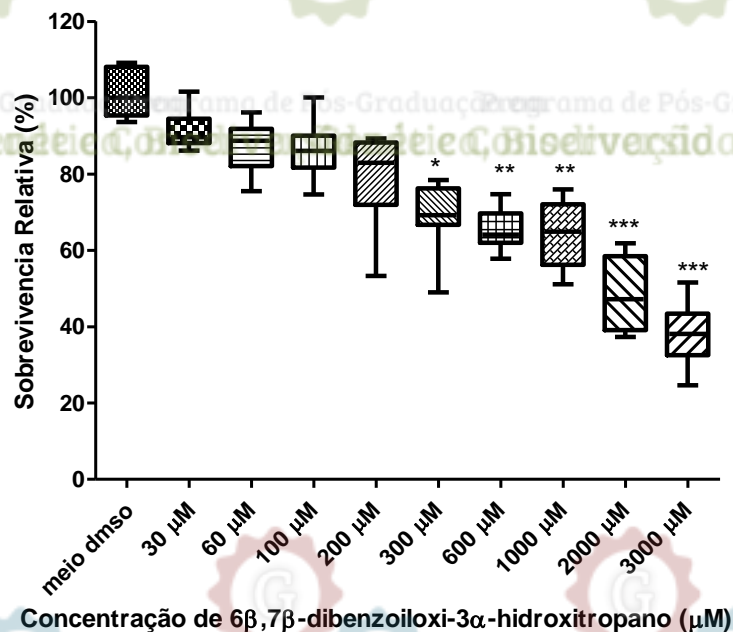


Figura 42. Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de glioma murino (C6) após exposição com o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano. Concentrações de 30-3000 μ M, tempo de exposição 72 h. A concentração capaz de matar 50% das células (IC_{50}) 1825 μ M. Teste em triplicatas, $n = 8$ para cada concentração, Significancia estatística $p < 0,05$.

O espectro de absorção do 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano (na diluição de 2624 μ M, em DMSO), mostrou uma absorção máxima no comprimento de onda (λ) 282 (Figura 34). O gráfico da Figura 44, representa a viabilidade relativa versus logaritmo da concentração de 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano em comparação com o controle. Foi observado que a função mitocondrial foi reduzida nas doses acima de 300 μ M, pelo teste de viabilidade com MTT, o que pode ter sido influenciado por ação direta na cadeia respiratória ou em outras organelas com consequências sobre a produção de energia das células.

Os produtos naturais são considerados uma fonte efetiva de substâncias antitumorais. Estudos publicados em 2005 já relatavam que cerca de 60% dos compostos utilizados na terapêutica contra o câncer eram provenientes de alguma fonte natural, como plantas, organismos marinhos e microorganismo (CRAGG & NEWMAN, 2005).

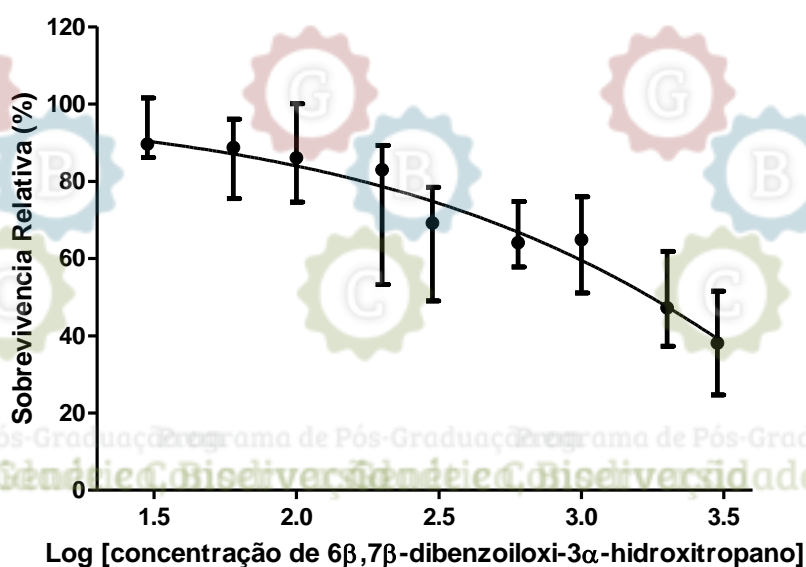


Figura 43 Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de glioma murino (C6) após exposição com o 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano. Concentrações de 30-3000 μ M, tempo de exposição 72 h. Teste em triplicatas, n = 8 para cada concentração.

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos mais comuns no homem adulto (Ostrom et al., 2014a), representando cerca de 40% a 60% de todas as neoplasias do SNC. Os resultados revelaram um baixo potencial antineoplásico para glioma C6. Embora tenha sido observado que em 300 μ M a 3000 μ M, a substância apresentou toxicidade. É importante destacar que a taxa de sobrevivência nessas concentrações pode permitir a recidiva do tumor. A ação de outros alcaloides tropânicos sobre células astrogliomas C6 também foi observada,

por Badisa e Goodman (2012) ao avaliar os efeitos crônicos da cocaína e verificar que a mesma causou uma redução significativa da viabilidade das células. A concentração capaz de matar 50% das células testadas (EC_{50}) da cocaína foi 4717 μM , ou seja, uma concentração superior à observada pelo presente estudo.

Sena-Filho e colaboradores (2010) testaram a citotoxicidade de um alcalóide tropânico isolado da *E. pungens* contra várias linhagens de células tumorais (HL-60: leucemia promielocítica humana, U937: linfoma humano, K562: leucemia mielóide crônica, KG-1: leucemia mielóide aguda, e U266: mieloma humano), revelando que não houve inibição da viabilidade celular na concentração de 10 μM .

Oliveira e colaboradores (2011) testaram a atividade citotóxica do extrato MeOH de *Erythroxylum caatingae* e de um alcalóide isolado desta espécie, sobre linhagens de câncer em humanos (HEp-2, NCI-H292 e KB, carcinoma de laringe, câncer de pulmão e espinocelular bucal, respectivamente). O alcaloide exibiu citotoxicidade significativa somente contra o tipo NCI-H292, que se refere ao câncer de pulmão humano, com EC_{50} maior que 10989 μM .

O ensaio de citotoxicidade realizado no presente estudo não permite afirmar que o composto analisado possui potencial antitumoral, visto que somente uma linhagem foi testada. No entanto, abre possibilidades de pesquisas envolvendo outros tipos de tumores menos agressivos que o glioma.

A atividade sobre o SNC confere aos alcaloides um maior interesse terapêutico, conforme é demonstrado pelo mecanismo de ação que exercem sobre os receptores de acetilcolina, muscarínicos, adrenérgicos, canais de cálcio, sódio e potássio, além da inibição da acetilcolinesterase e captação de neurotransmissores (Cordell et al., 2001), um indicativo de que estas moléculas conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e agir sobre sítio ativos no SNC. Desse modo, a interação entre o 6 β ,7 β -dibenzoil-3 α -hidroxitropano com biomoléculas do organismo animal, deve ser explorada, buscando entender o papel biofarmacológico desse composto.

5.3.5 Ensaio de citotoxicidade com astrócitos

O perfil de toxicidade de 6 β ,7 β -dibenzoil-3 α -hidroxitropano em células normais do SNC, também foi avaliado por meio do ensaio com astrócitos. A análise morfológica revelou que não houve alterações significativas, visto que não foi observada redução da celularidade mediante o aumento da concentração, quando comparado com o controle. Na concentração de 3000 μ M foi visualizada ainda a formação de cristais, que por algum mecanismo desconhecido promoveu a cristalização da substância sem, no entanto, diminuir o volume das células (Figura 45).

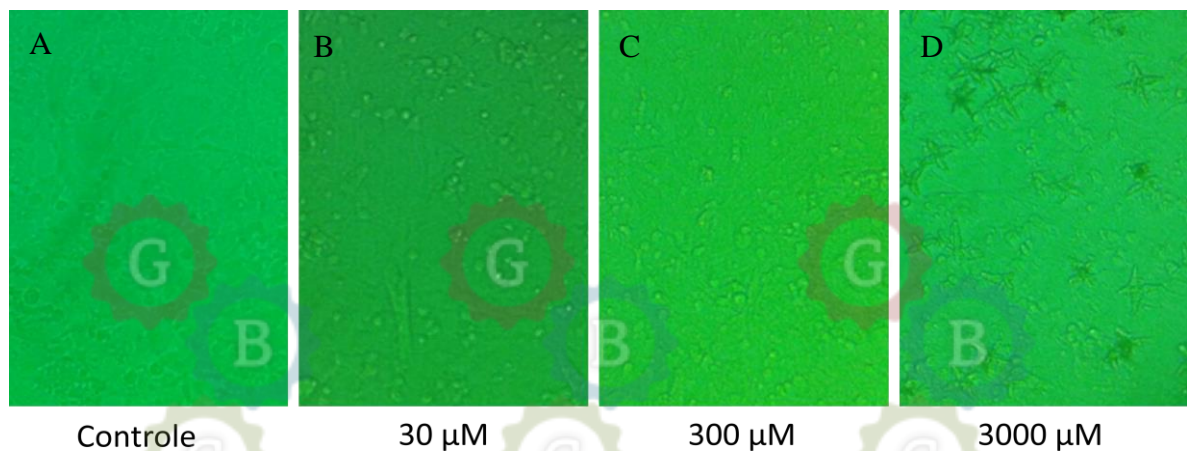


Figura 44. Efeito citotóxico sobre a morfologia dos astrócitos após 72 horas de tratamento com a substância 6 β ,7 β -dibenzoil-3 α -hidroxitropano. Aumento de 20x. **A.** Controle; **B.** 30 μ M; **C.** 300 μ M; **D.** 3000 μ M.

Os astrócitos são células indispensáveis pela homeostase do sistema nervoso central. Além dos neurônios, o SNC é formado pelas células da glia, que compreendem: os astrócitos, a microglia e os oligodendrócitos. Os astrócitos são responsáveis pela manutenção da função dos neurônios no cérebro, sendo atribuídos à eles a primeira linha de defesa contra neuropatologias, com um importante papel de proteção devido à produção de moléculas neuroprotetoras (KIM et al., 2010).

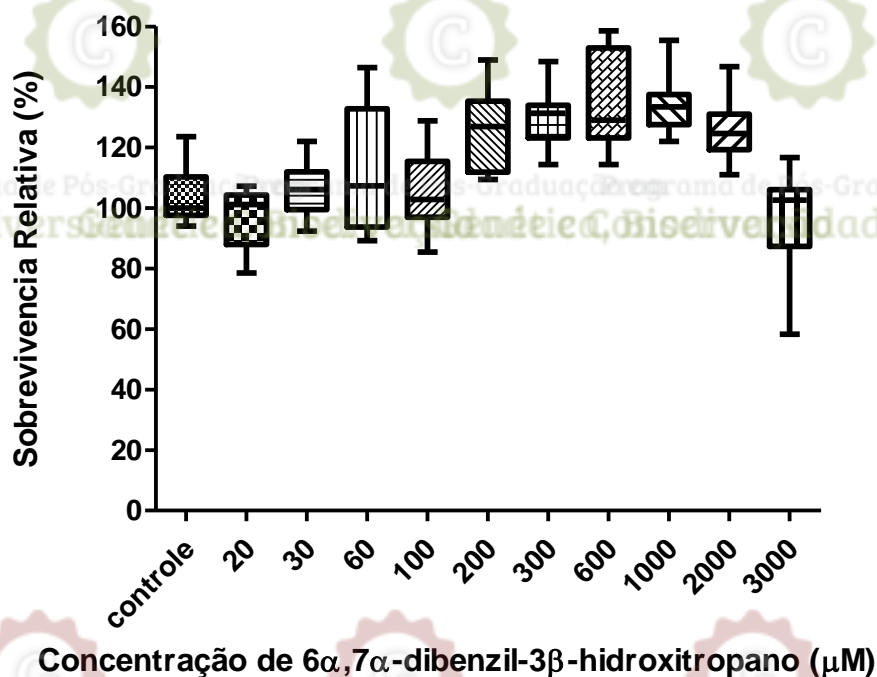


Figura 45. Citotoxicidade avaliada pelo teste de MTT em células de cultura primária de astrócitos após exposição com o 6β,7β-dibenzoiloxi-3α-hidroxitropano. Concentrações de 30-3000 μM, tempo de exposição 72 h. Teste em triplicatas, n = 8 para cada concentração, p<0.05.

No presente estudo, culturas primárias de astrócitos foram expostas a mesmas concentrações da molécula 6β,7β-dibenzoiloxi-3α-hidroxitropano que foram testadas em glioma murino e não houve diferença significativas na resposta destas células, com exceção da dose de 1000 μM (Figura 45) que apresentou diferença significativa para resposta de neuroproteção. A baixa toxicidade sobre os astrócitos pode ser considerada uma resposta positiva atribuída à molécula, o que confere segurança para outros testes que poderão ser realizados na busca de resposta terapêutica à doenças do SNC. Não há registro sobre a resposta biológica desta molécula por ter sido identificada pela primeira vez neste trabalho, abrindo assim a perspectiva de estudos investigando mecanismo de cura sobre doenças do SNC, uma vez que não é citotóxica para os astrócitos.

O ensaio com células saudáveis é essencial durante a avaliação da segurança no uso da substância testada. É válido destacar que os testes envolvendo cultivo celular, manutenção e multiplicação de células primárias e linhagens, *in vitro*, é uma metodologia que possibilita a análise molecular e respostas biológicas de sistemas isolados de interferentes ambientais. No entanto, os modelos de culturas disponíveis permitem a realização de estudos envolvendo a

utilização de técnicas para elucidação de mecanismos de resposta celular, sinalização intracelular, interação celular, desenvolvimento de drogas e toxicidade (OLIVEIRA et al., 2014; PARK et al., 2014).

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Conclusões



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo investigou e isolou dois alcaloides tropânicos nas frações de *E. macrocalyx*, sendo um deles identificado com 6 β ,7 β -dibenzoiloxi-3 α -hidroxitropano, e confirmado como inédito. Este apresentou baixa citotoxicidade contra células tumorais e células saudáveis de ratos, gliomamurino C6 e astrócitos, respectivamente, revelando que apesar de não apresentar ação antitumoral contra o glioma, tipo de câncer altamente agressivo no SNC, também não foi tóxica sobre as células normais.

Os resultados encontrados criam a perspectiva de realização de novos ensaios com outros tipos de neoplasias. O fato de a molécula ser um alcaloide tropânico inédito desperta o interesse na realização de outros tipos de ensaios biológicos, visto que o histórico de ação farmacológica de alcaloides tropânicos é significativo.

O extrato bruto e as frações de *E. affine* apresentaram significativa ação inibitória da acetilcolinesterase, e potente atividade de inibição da α -amilase, *in vitro*. A quantificação de fenólicos totais revelou que o extrato etanólico de *E. affine* possui grande quantidade destes compostos, levantando a hipótese de relação com os resultados biológicos apresentados por essa espécie. Deste modo, sugere-se a realização de novos estudos fitoquímicos e biológicos com *E. affine* para investigação do perfil de seus constituintes.

Referências Bibliográficas

ADEWUSI, EA.; STEENKAMP, V. 2011. *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, p. 829-835.

AL-SAID, MS.; EVANS, WC.;GROUT, RJ. 1986. Alkaloids of *Erythroxylum macrocarpum* and *E. Sideroxyloides*. Phytochemistry, vol. 25, no. 4, p. 851-853.

ALBUQUERQUE, CH.; TAVARES, JF.; DE OLIVEIRA, SL.; SILVA, TS.; GONÇALVES, GF.; COSTA, VCO.; AGRA, MF.; PESSÔA, HLF.; SILVA, MS. 2014. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). Química Nova, vol. 37, no. 4, p. 663-666.

ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. Journal of Ethnopharmacology, vol. 107, p. 449-455.

ALIPOUR, M.; KHOOBI, M.; FOROUMADI, A.; NADRI, H.; MORADI, A.; SAKHTEMAN, A.; GHANDI, M.; SHAFIEE, A. 2012. Novel coumarin derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety: Potent and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 20, p. 7214-7222.

ALVES, CQ.; LIMA, LS.; DAVID, JM.; LIMA, MVB.; DAVID, JP.; LIMA, FWM.; PEDROZA, KCMC.; QUEIROZ, LP. 2013. *In vitro* acetylcholinesterase activity of peptide derivatives isolated from two species of Leguminosae. Pharmaceutical Biology, vol. 51, no. 7, p. 936-939.

ALVES, CQ. 2012. Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum*. Salvador: Universidade Federal do Sudoeste da Bahia. Tese de Doutorado em Química Orgânica. 227 p.

ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. 2012. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 20, p. 1175-1180.

ANSELL, SM.; PEGEL, KH.; TAYLOR, DAH. 1993. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, vol. 32, no. 4, p. 953- 959.

APG III. 2009. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x/epdf>>. Acesso em: 22 de novembro de 2015.

AGUIAR, JS.; ARAÚJO, RO.; RODRIGUES, MD.; SENA, KXFR.; BATISTA, AM.; GUERRA, MMP.; OLIVEIRA, SL.; TAVARES, JF.; SILVA, MS.; NASCIMENTO, SC.; SILVA TG. 2012. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylumcaatingae* Plowman. *International Journal of Molecular Sciences*, vol.13, p. 4124-4140.

ARAÚJO, TF.; FIASCHI, P.; AMORIM, AM. 2014. *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) na Mata Atlântica da Bahia, Brasil. *Rodriguésia*, vol. 65, no. 3, p. 637-658.

ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, LH. 2013. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, vol. 34, no. 2, p. 193-210.

ATTA-UR-RAHMAN; PARVEEN, S.; KHALID, A.; FAROOQ, A.; CHOUDRARY, MI. 2011. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. *Phytochemistry*, vol. 6, no. 6, p. 963-969.

BACCHI, EM. 2007. Alcaloides Tropânicos. In: SIMÕES, CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC.

BADISA, RB.; GOODMAN, CB. 2012. Effects of chronic cocaine in rat C6 astroglial cells. *International Journal Molecular Medicine*, vol. 30, no. 3, p. 687–692.

BADKE, GL.; PANAGOPOULOS, AT.; AGUIAR, GB.; VEIGA, JCE. 2014. Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. *Arq Bras Neurocir*, vol. 33, no. 1, p. 45-51.

BAPTISTA, MM.; RAMOS, MA.; ALBUQUERQUE, UP.; COELHO-DE-SOUZA, G.; RITTER, MR. 2013. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 9, p. 54.

BARBOSA, CC.; SILVA, FD.; SANTOS, AM.; VAZ, MRF.; NÓBREGA, FFF. 2014. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxylum*. *Revista Saúde e Ciência On line*, vol. 3, no. 3, p. 207-216.

BARREIROS, ML.; DAVID, JM.; QUEIROZ, LP.; DAVID, JP. 2005. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum numulária*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, p. 537–540.

BARREIROS, ML.; DAVID, JP.; DAVID, JM.; LOPES, LMX.; SÁ, MS.; COSTA, JFO.; ALMEIDA, MZ.; QUEIROZ, LP.; Santana, EG. 2007. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, v. 68, p: 1735–1739.

BHANDARI, M.R.; JONG-ANURAKKUN, N.; HONG, G.; KAWABATA, J. 2008. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.) *Food Chemistry*, vol. 106, p. 247–252.

BRACHET, A.; MUÑOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J.L.; CHRISTEN, P. 1997. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. *Phytochemistry*, vol. 46, no. 8, p. 1439-1442.

BRESLER, MM.; ROSSER, SJ.; BASRAN, A.; BRUCE, NC. 2000. Gene Cloning and Nucleotide Sequencing and Properties of a Cocaine Esterase from *Rhodococcus* sp. Strain MB1. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 3, p. 904–908.

BRINGMANN, G.; GÜNTHER, C.; MÜHLBACHER, J.; GUNATHILAKE, MDLP., WICKRAMASINGHE, A. 2000. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O.E. Schulz (Erythroxylaceae). *Phytochemistry*, vol. 53, p. 409-416.

BIERI, S.; BRACHET, A.; VEUTHEY, JL.; CHRISTEN, P. 2007. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, p. 439–447.

BUSSMANN, RW. 2013. The Globalization of Traditional Medicine in Northern Peru: From Shamanism to Molecules. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação
CARDOSO-LOPES, EM.; CARREIRA, RC.; AGRIPINO, DG.; TORRES, LMB.; CORDEIRO, I.; BOLZANI, VS.; DIETRICH, SMC.; YOUNG, MCM. 2008. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol.18 (Supl.), p. 655-660.

CASTRO, MG.; CANDOLFI, M.; KROEGER, K.; KING, GD.; CURTIN, JF. et al. 2011. Gene Therapy and Targeted Toxins for Glioma. Curr Gene Ther, vol. 11, no. 3, p. 155–180.

CATTO, M.; PISANI, L.; LEONETTI, F.; NICOLOTTI, O.; PESCE, P.; STEFANACHI, A.; CELLAMARE, S.; CAROTTI, A. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 21, p. 146-152.

CHÁVEZ, D.; CUI, B.; CHAI, HB.; GARCÍA, R.; MEJÍA, M.; FARNSWORTH, NR.; CORDELL, GA.; PEZZUTO, JM.; KINGHORN, AD. 2002. Reversal of Multidrug Resistance by Tropane Alkaloids from the Stems of *Erythroxylum rotundifolium*. J. Nat. Prod. vol. 65, p. 606-610.

CHAN, JYH.; HUANG, C.; CHAN, SHH. 1996. Nitric oxide as a mediator of cocaine-induced penile erection in the rat. British Journal of Pharmacology, vol. 118, p. 155-161.

CHEN, L.; ZOU, X.; WANG, Y.; MAO, Y.; ZHOU, L. 2013. Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. BMC Clinical Pathology, vol. 13, no. 1, p. 1.

CHRISTEN, P.; ROBERTS, MF.; PHILLIPSON, JD.; EVANS, WC. 1995. Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* root-bark. Phytochemistry, vol. 38, no. 4, p. 1053-1056.

CORDELL, GA.; QUINN-BEATTIE, ML.; FARNSWORTH, NR. 2001. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytotherapy Research*, vol.15, p.183–205.

CORTES, N.; POSADA-DUQUE, RA.; ALVAREZ, R.; ALZATE, F.; BERKOV, S.; CARDONA-GÓMEZ, GP.; OSORIO, E. 2015. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of Five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences*, vol.122, p. 42-50.

COUTINHO, HDM.; COSTA, JGM.; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP.; LIMA, EO. 2008. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18 (Supl.), p. 670-675.

CRAGG, GM.; NEWMAN, DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, p. 72–79.

CRUZ-FERREIRA, AM.; LOUREIRO, ER.; CSALTA-LOPES, JE.; PIMENTEL, ISTB. 2014. Avaliação dos níveis de atividade física e sedentarismo em doentes diabéticos. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, vol.9, no. 53, p. 189-199.

CUARTERO, M.; ORTUÑO, JA.; GARCÍA, MS.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. 2012. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Analytical Biochemistry*, vol. 421, p. 208-212.

DE BONA, EAM.; PINTO, FGS.; FRUET, TK.; JORGE, TCM.; MOURA, AC. 2014. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol.*, vol.81, no. 3, p. 218-225.

DJERIDANE, A.; HAMDY, A.; BENSANIA, W.; CHEIFA, K.; LAKHDARI, I.; YOUSFI, M. 2013. The *in vitro* evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Clinical Research & Reviews*, vol. 9, no. 4, p. 324-31.

EL-IMAM, YMA.; EVANS, WC.; GROUT, RJ. 1988. Alkaloids of *Erythroxylum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*. *Phytochemistry*, vol. 27, no. 7, p. 2181-2184.

FARIAS, FM. 2006. *Psychotria myriantha* Mull Arg. (rubiaceae): Caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. 191 p.

FUENTEFRIA, DB.; FERREIRA, AE.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 41, no. 5, p. 470-473.

FUNKE, I; MELZIG, M.F. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 16, no. 1, p. 1-5.

GARCIA, CS.; UEDA, SMY.; MIMICA, LMJ. 2011. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 70, no. 4, p. 589-98.

GIBBONS, S. 2005. Plants as a Source of Bacterial Resistance Modulators and Anti-Infective Agents. *Phytochemistry Reviews*, vol. 4, no. 1, p. 63-78.

GONÇALVES, R.; MATEUS N.; FREITAS, V. 2011. Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, vol. 125, p. 665-672.

GONZÁLEZ-GUEVARA, JL.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, KL.; PAYO-HILL, AL.; GONZÁLEZ-LAVAUT, JA.; MOLINA-TORRES, J.; PIETRO-GONZÁLEZ, S. 2006. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 34, p. 539-542.

GRIFFIN, WJ.; LIN, GD. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, vol. 53, p. 623-637.

GUO, AJY.; XIE, HQ.; CHOI, RCY.; ZHENG, KYZ.; BI, CWC.; XU, SL.; DONG, TXT.; TSIM, KWK. 2010. Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. *Chemico Biological Interactions*, vol. 187, no. 1-3, p. 246-8.

HASENACK, BS.; SICHINELLI, JM.; GARCIA, AF.; GOMES, KS.; SPITI, S.; COSTA, CL.; OLIVEIRA, SPLF. 2008. Atividade Antibacteriana do Extrato Barbatimão Sobre Cepas de *Staphylococcus Aureus* Isoladas de Secreções de Feridas Crônicas de Pacientes Ambulatoriais. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 10, no. 1, p. 13-18.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2015. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA.

JOSEPH, JA.; SHUKITT-HALE, B.; LAU, FC. 2007. Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. *Annals of the New York Academy of Science*, vol. 1100, p. 470–485.

JUNG, M.; PARK, M. 2007. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*, vol. 12, p. 130-139.

KHATTAK, KF.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, MI.; HEMALAL, KD.; TILLEKERATNE, LM. 2002. New Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 65, p. 929-931.

KIM, JS.; HYUN, TK.; KIM, MJ. 2011. The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities. *Food Chemistry*, vol. 124, no. 4, p. 1647-1652.

KIM, SY.; PARK, E.; PARK, JA.; CHOI, BS.; KIN, S.; JEONG, G. 2010. The Plant Phenolic Diterpene Carnosol Suppresses Sodium Nitroprusside-Induced Toxicity in C6 Glial Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, p. 1543–1550.

KLEIHUES, P.; LOUIS, DN.; SCHEITHAUER, BW.; RORKE LB.; REIFENBERGER, G.; BURGER, PC.; CAVENEE, WK. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 61, no. 3, p. 215-25.

LIMA, GRM.; MONTENEGRO, CA.; ALMEIDA, CLF.; ATHAYDE-FILHO, PF.; BARBOSA-FILHO, JM.; BATISTA, LM. 2011. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, p. 2692-2749.

LIU, H.; LIU, X.; FAN, H.; TANG, J.; GAO, X.; LIU, W. 2014. Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol.22, p. 6124-6133.

LOIOLA, MIB; COSTA-LIMA, JL. 2016. Erythroxyllaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7709>>. Acesso em: 26 Jan. 2016.

LOIOLA, MIBL.; AGRA, MF.; BARACHO, GS.; QUEIROZ, RT. 2007. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxyllaceae Kunth. *Acta bot. bras.*, vol. 21, no. 2, p. 473-487.

LOZANO, A.; ARAÚJO, EL.; MEDEIROS, MFT.; ALBUQUERQUE, UP. 2014. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 10, no. 2.

MANFREDINI, C.; PICOLI, SU.; BECKER, AP. 2011. Comparação de métodos na determinação de sensibilidade à vancomicina em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 47, no. 2, p. 141-145.

MATA, PTG. & ABEGG, MA. 2007. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. *Arquivos do Mudi*, vol.11, no.2, p. 20-25.

MOTA, WM.; BARROS, ML.; CUNHA, PEL.; SANTANA, MVA.; STEVAM, CS.; LEOPOLDO, PTG., FERNANDES, RPM. 2012. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 14, no. 4, p. 624-628.

MAZZANTI, CM.; SCHOSSLER, DR.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVA, AC.; CORREA, M.; SCHETINGER, MRC. et al. 2004. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. *Ciência Rural*, vol.34, no. 3.

MONTENEGRO, FC.; SENA, MCP.; BARBOSA FILHO, JM.; ALMEIDA, RN. 2010. Evidência de uma ação central exercida pela fração total de alcalóides de *Chondrodendron Platyphyllum* em camundongos. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, vol. 14, no. 2, p. 7-12.

MORAIS, SM.; LIMA, KSB.; SIQUEIRA, SMC.; CAVALCANTI, ESB.; SOUZA, MST.; MENEZES, JESA.; TREVISAN, MTS. 2013. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol.15, no.4, p.575-582.

MOTA, WM.; BARROS, ML.; CUNHA, PEL.; SANTANA, MVA.; STEVAM, CS.; LEOPOLDO, PTG., FERNANDES, RPM. 2012. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol.14, no.4, p.624-628.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, vol. 59, p. 365–378.

OLIVEIRA, SL. 2012. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonóides e diterpenos. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. In: Cronquist, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. 2 ed. 1988.

OLIVEIRA, VB.; FREITAS, MSM.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, IJC. 2009. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Rev. bras. plantas med.*, vol. 11, no. 1.

OLIVEIRA, SL.; TAVARES, JF.; BRANCO, MVSC.; LUCENA, HFC.; BARBOSA-FILHO, JM.; AGRA, MF.; NASCIMENTO, SC.; AGUIAR, JS.; SILVA, TG.; SIMONE, CA.; ARAÚJO-JÚNIOR, JX.; SILVA, MS. 2011. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 8.

OLIVEIRA, MVP. 2012b. Aplicações de Estudos Bioquímicos Quantitativos em Ciências Biológicas e da Saúde. *RENEFARA – Revista Eletrônica de Educação da Faculdade Araguaia*, vol. 2, no. 2.

OSTROM, QT.; BAUCHET, L.; DAVIS, FG.; DELTOUR, I.; FISCHER, JL. LANGER, CE. et al. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology*, vol. 0, p. 1–18.

OLIVEIRA, DM.; FARIAS, MT.; TELES, ALB.; SANTOS JUNIOR, MC.; CERQUEIRA, MD.; LIMA, RMF.; EL-BACHÁ, RS., 2014. 8-Methoxypsoralen is a competitive inhibitor of glutathione *S*-transferase P1-1. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8, 1-11.

OSTROSKY, EA.; MIZUMOTO, MK.; LIMA, MEL.; KANEKO, TM.; NISHIKAWA, SO.; FREITAS, BR. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 2, p. 301-307.

PASSOS, CS.; ARBO, MD.; RATES, SMK.; POSER, GL. 2009. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, no. 1A, p. 140-149.

PAYO-HILL, AL.; DOMINGUEZ, RS.; SUAREZ, MO.; BATISTA-BAEZ, M.; CASTRO, HTV.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. 2000. Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylum alaternifolium* and *Erythroxylum rotundifolium*. *Phytochemistry*, vol. 54, p. 927-932.

PEREIRA, M.; MATIAS, D.; PEREIRA, F.; REIS, CP.; SIMÕES, MF.; RIJO, P. 2015. Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, vol. 12, no.1, p. 127-138.

PIRES, EJVC; SILVA JÚNIOR, VV.; LOPES, ACS.; VERAS, DL. LEITE, LE.; MACIENL, MAV. 2009. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, vol. 21, no. 4, p. 384-390.

RAZAFINDRAIBE, W.; KUHLMAN, AR.; RABARISON, H.; RAKOTOARIMANANA, V.; RAJERARISON, C.; RAKOTOARIVELO, N.; RANDRIANARIVONY, T.; RAKOTOARIVONY, F.; LUDOVIC, R.; RANDRIANASOLO, A.; BUSSMANN, RW. 2013. Medicinal plants used by women from Agnalazaha littoral forest (Southeastern Madagascar). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 9, p. 73.

RAHMAN, A.; KHATTAK, KF.; NIGHAT, F.; SHABBIR, M.; HEMALAL, K.D.; TILLEKERATNE, LM. 1998. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry*, vol. 48, no. 2, p. 337-383.

RIBEIRO, EMO.; LIMA, LS.; DAVID, JM.; VALE, AE.; LOPES, LMX.; DAVID, JP. 2013. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (*Erythroxylaceae*). *Phytochemistry Letters*, vol. 6, p. 232–235.

RODEIRO, I. DONATO, MT.; MARTÍNEZ, I.; HERNÁNDEZ, I. GARRIDO, G.; GONZÁLEZ-LAVAUT, JA.; MENÉNDEZ, R.; LAGUNA, A.; CASTELL, JV.; GÓMEZ-LECHÓN, MJ. 2008. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicology in Vitro*, vol. 22, p. 1242–1249.

SAMY, RP.; GOPALAKRISHNAKONE, P. 2010. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 7, no. 3, p.283–294.

SENA-FILHO, JG.; DA SILVA, MS.; TAVARES, JF.; OLIVEIRA, SL.; ROMERO, MAV.; XAVIER, HS.; BARBOSA-FILHO, JM.; BRAZ-FILHO, R. 2010. Cytotoxic Evaluation of

Pungencine: A New Tropane Alkaloid from the Roots of *Erythroxylum pungens* O. E. Schulz. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 93.

SERENIKI, A; VITAL, MABF. 2008. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, vol. 30(1 Supl).

SILVA, GL.; CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.; RASOANAIVO, P.; LIN, SM.; O'NEILL, MJ.; LEWIS, JA.; BESTERMAN, JM.; MONKS, A.; FARNSWORTH, NR.; CORDELL, GA.; PEZZUTO, JM.; KINGHORN, D. 2001. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by New Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. *J. Nat. Prod.*, vol.64, p. 1514-1520.

SPENCER, JPE. 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, vol. 104, p. S40–S47.

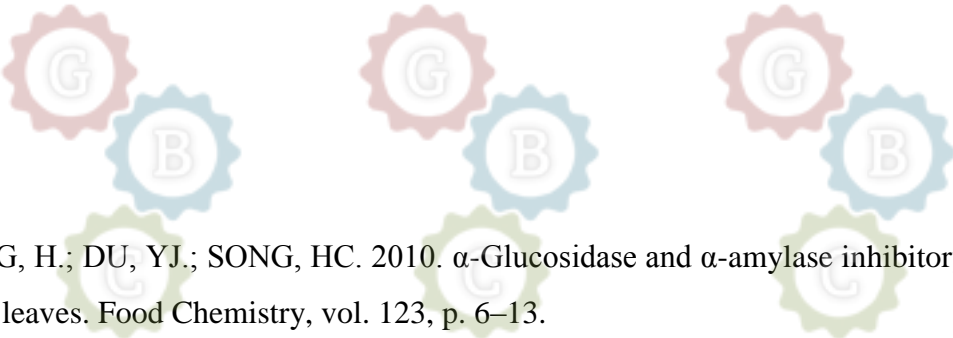
SYED, SH.; NAMDEO, AG. 2013. Hepatoprotective effect of leaves of *Erythroxylum monogynum* Roxb. On paracetamol induced toxicity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, no.11, p. 877-881.

STUPP, R.; HEGI, ME.; VAN DEN BENT, MJ. 2006. Changing paradigms-an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist*, vol. 11, no. 2, p. 165–180.

VACCARI, NFS.; SOCCOL, MCH; IDE, GM. 2009. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, vol. 8, no. 1, p. 71-83.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, SL.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 109, no. 2, p. 359–363.

VOLPATO, G.; GODÍNEZ, D.; BEYRA, A.; BARRETO, A. 2009. Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 5, p. 16.

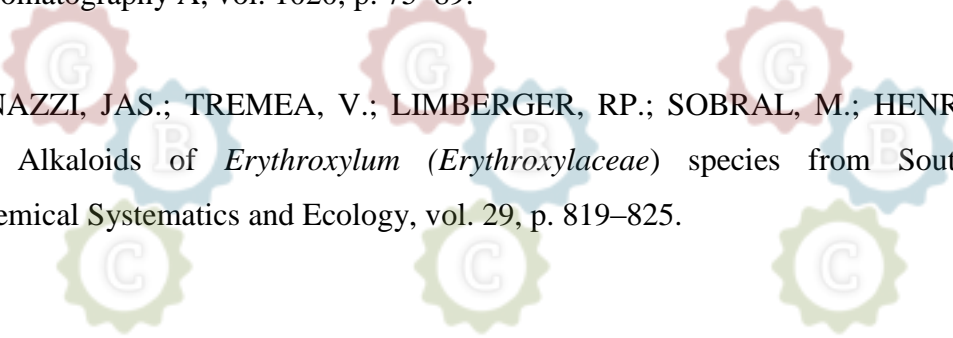


WANG, H.; DU, YJ.; SONG, HC. 2010. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, vol. 123, p. 6–13.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

WARREN LEVINSON, MD. 2014. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 12^a ed. Porto Alegre : AMGH Editora Ltda.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, JL.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, EF.; PAULO, MQ.; HOSTETTMANN, K. 2003. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography–UV detection–multiple mass spectrometry and liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1020, p. 75–89.



ZUANAZZI, JAS.; TREMEA, V.; LIMBERGER, RP.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, AT. 2001. Alkaloids of *Erythroxylum* (*Erythroxylaceae*) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 29, p. 819–825.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Anexos



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Anexo A – Certificado de autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98
Comitê de Ética No Uso de Animais - CEUA / UESB

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do Potencial Farmacológico e Toxicológico de Plantas do Gênero *Erythroxylum*", registrada com o nº 126/2016, sob a responsabilidade de Vanderlúcia Fonseca de Paula, UESB (Departamento de Química e Exatas, Campus de Jequié) - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8/10/2008, do Decreto nº 6.899, de 15/07/2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em reunião de 15/04/2015.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/04/2016 a 28/02/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico Swiss / Rato isogênico Wistar
Nº de animais	17 animais / 06 animais
Peso/Idade	25-35g / 0-1 dia de vida
Sexo	Macho / n.d.
Origem	Biotério UESB

Lembramos ao pesquisador que:

- O responsável pela proposta encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca da proposta de acordo com o roteiro publicado em conjunto com a RN nº 4 do CONCEA publicado no DOU em 19/04/2012.
- No caso da necessidade da continuidade das propostas usando animais para fins científicos ou didáticos é obrigatório o envio do Relatório à CEUA acrescido da justificativa.
- Para os casos da continuidade de propostas, após a análise do relatório e de esclarecimentos adicionais, se necessário, a CEUA pode deferir, suspender, ou requerer modificação dos mesmos, dentro de suas atribuições.

Itapetinga, 11 de Abril de 2016.

Sônia Martins Teodoro
 Dr.^a Sônia Martins Teodoro
 Coordenadora CEUA/UESB