



**Universidade Federal de Alagoas – UFAL**  
**Escola de Enfermagem e Farmácia – ESENFAR**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF**

DANIEL PORTO BARBOSA

**Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida e antioxidante de *Aspidosperma pyrifolium***  
**Mart. (Apocynaceae)**

**Maceió, AL**

**2014**

DANIEL PORTO BARBOSA

**Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida e antioxidante de *Aspidosperma pyriforme*  
Mart. (Apocynaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas com ênfase em Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior.

Coorientadora: Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

**Maceió, AL**

**2014**

**Folha de aprovação**

DANIEL PORTO BARBOSA

**Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida e antioxidante de *Aspidosperma pyriformium*  
Mart. (Apocynaceae)**

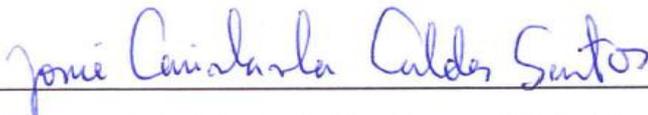
Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 29 de outubro de 2014.



---

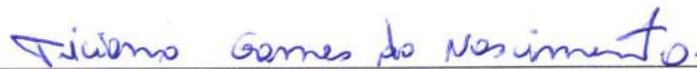
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior – UFAL (Orientador)

**Banca Examinadora:**



---

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos – UFAL (Examinador Externo)



---

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento – UFAL (Examinador Interno)

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Roselito de Oliveira Santos**

B239e    Barbosa, Daniel Porto.  
          Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida e antioxidante de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apcynaceae) / Daniel Porto Barbosa. – Maceió, 2014  
          102 f.: il.

          Orientador: João Xavier de Araújo Júnior  
          Co-Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira  
          Dissertação (TCC em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2014.

          Bibliografia: f. 89-102.

          1. *Aspidosperma pyrifolium*. 2. Apcynaceae. 3. leishmanicida. I. Título.

CDU: 615.1

Dedico esse trabalho em, primeiro lugar, a **Deus**, pelo Dom da Vida.

Aos meu pais **Joaquim Barbosa e Zilda Porto**, pois não faltaram em nenhuma circunstância, mesmo de longe me oferecendo todo o suporte necessário para realização dos meus sonhos.

*“Coragem para mudar as coisas que podem ser mudadas;*

*Serenidade para respeitar as coisas que não podem ser mudadas;*

*Sabedoria para entender a diferença existente entre elas...”*

*Joseph Murphy*

## RESUMO

As espécies do gênero *Aspidosperma* são árvores com uma grande variedade de portes e que crescem em diferentes habitats, estando distribuídas por todas as Américas, sendo no Brasil catalogadas cerca de 50 espécies deste gênero. A espécie *A. pyrifolium* é uma árvore encontrada na caatinga nordestina do Brasil, popularmente conhecida como pereiro, pereiro-branco, pereiro-preto, peroba-rosa, trevo, pereiro-de-saia e pereiro-do-sertão. A partir desta espécie foram isolados alguns alcaloides e avaliadas as atividades cardiovasculares, antioxidante e inseticida. Tendo em vista a escassez de estudos acerca desta espécie na literatura e o grande potencial químico e farmacológico das espécies do gênero *Aspidosperma*, foi realizado um estudo fitoquímico da espécie *A. pyrifolium* no intuito de contribuir para o conhecimento do potencial químico e farmacológico da espécie e do gênero, além de avaliar as atividades leishmanicida e antioxidante. Foi realizado estudo químico e avaliação da atividade leishmanicida dos extratos hexânico e metanólico das folhas da planta. O material vegetal foi submetido a maceração com hexano e posteriormente com metanol para obtenção dos extratos brutos. Em seguida o material se submeteu a sucessivos processos de separações utilizando a cromatografia em coluna clássica e a técnica de cromatografia líquida de média pressão e a identificação das substâncias encontradas foi possível através de técnicas espectroscópicas RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Foram isolados os triterpeno ácido betulínico e o ácido benzóico, sendo identificada a presença de alcaloides. A atividade antioxidante foi realizada segundo os métodos de fenólicos totais e ABTS e resultados demonstram a capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações. Com relação à atividade leishmanicida, foram utilizados cepas promastigotas de *L. amazonensis* no ensaio *in vitro* incubadas por 24 horas. Após esse período a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de do sal de tetrazólio MTT. Os resultados obtidos demonstraram que quatro frações oriundas do fracionamento fitoquímico apresentaram atividade leishmanicida, incluindo os dois compostos isolados o ácido betulínico e o ácido benzóico.

Palavras-chave: *Aspidosperma pyrifolium*. Apocynaceae. Leishmanicida. Antioxidante.

## ABSTRACT

The species of the genus are *Aspidosperma* trees with a wide variety of sizes and growing in different habitats, are distributed throughout the Americas, and in Brazil cataloged about 50 species of this genus. The species *A. pyriformis* is a tree found in the caatinga of Brazil, popularly known as pereiro, pereiro-white, pereiro-black, mahogany pink clover pereiro-of-skirt and pereiro-the-wild. From this species were isolated some alkaloids and evaluated cardiovascular activities, antioxidant and insecticide. Given the scarcity of studies on this species in the literature and the great chemical and pharmacological potential of species of *Aspidosperma* genus, a phytochemical study of the species *A. pyriformis* in order to contribute to the knowledge of the chemical and pharmacological potential of the species was carried out and the genus, and to measure leishmanicide and antioxidant activities. Was conducted chemical and evaluation of leishmanicide activity of hexane and methanol extracts of the leaves. The plant material was subjected to trituration with hexane and then with methanol to obtain the crude extract. Then the material is subjected to successive separation processes using classical chromatography column and liquid chromatography and medium pressure identify the substance was found possible by spectroscopic NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Were isolated triterpene betulinic acid and benzoic acid, was identified by the presence of alkaloids. The antioxidant activity was performed according to the methods of total phenolic and ABTS and results demonstrate the ability antioxidant the raw extracts and fractions. With respect to the leishmanicidal activity promastigotes of *L. amazonensis* strains were used in the in vitro assay incubated for 24 hours. After this period, cell viability was determined by testing MTT reduction of tetrazolium salt. The results showed that four fractions resulting from the phytochemical fractionation showed leishmanicide activity, including the two compounds isolated betulinic acid and benzoic acid.

Keywords: *Aspidosperma pyriformis*. Apocynaceae. Leishmanicide. Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de Figuras

Figura 1. A produção de metabólitos secundários dos vegetais.	19
Figura 2. Aplicações etnofarmacológicas de espécies do gênero <i>Aspidosperma</i>	22
Figura 3. Atividades biológicas de plantas do gênero <i>Aspidosperma</i>	24
Figura 4. Classes de substâncias isoladas de espécies de plantas do gênero <i>Aspidosperma</i>	27
Figura 5. <i>Aspidosperma pyriforme</i> : (A) Árvore verde. (B) Sementes. (C) Flores (D) Caule de uma árvore jovem.	32
Figura 6. Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan.	34
Figura 7. Ciclo de vida heteroxênico de <i>Leishmania</i> .	35
Figura 8. Reação genérica - forma oxidada e reduzida do ABTS.	40
Figura 9. Espectro de $^1\text{H}$ [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz] de APFHF <sub>2</sub> .	70
Figura 10. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz] de APFHF <sub>2</sub> .	70
Figura 11. Espectro de DEPT-135 APFHF <sub>2</sub> .	71
Figura 12. Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz em azul e DEPT-135 em vermelho. de APFHF <sub>2</sub> .	71
Figura 13. Estrutura química do Ácido Betulínico.	72
Figura 14. Espectro de $^1\text{H}$ [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz].	74
Figura 15. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz.	74
Figura 16. Espectro de DEPT-135.	75
Figura 17. Espectro de DEPT-90.	75
Figura 18. Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN [ $\delta$ (ppm), $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz em verde, DEPT-135 em vermelho e DEPT-90 em azul] obtidos da amostra codificada como APF-C5,6.	76
Figura 19. Estrutura química do Ácido Benzóico.	76
Figura 20. Efeito das soluções obtidas dos extratos de <i>A. pyriforme</i> sobre a viabilidade celular. A- 100 $\mu\text{g/mL}$ , B- 10 $\mu\text{g/mL}$ e C-1 $\mu\text{g/mL}$ .	77
Figura 21. Efeito das soluções dos extratos e frações de <i>A. pyriforme</i> sobre a viabilidade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . A- 100 $\mu\text{g/mL}$ , B- 10 $\mu\text{g/mL}$ e C-1 $\mu\text{g/mL}$ .	80

### Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação quimiotaxonômica das espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> .	20
Tabela 2. Prospecção fitoquímica do extrato hexânico de APF.	65
Tabela 3. Prospecção fitoquímica do extrato metanólico de APF.	66
Tabela 4: Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de APFHF <sub>2</sub> em $\text{CDCl}_3$ , comparados com os dados de RMN de $^{13}\text{C}$ da literatura ( $\delta$ em ppm).	68

Tabela 5: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de APFHC <sub>5,6</sub> em $\text{CDCl}_3$ , comparados com os dados de RMN de $^{13}\text{C}$ da literatura ( $\delta$ em ppm).	73
Tabela 6. Parâmetros analíticos empregados para os métodos utilizados.	83
Tabela 7. Determinação da capacidade antioxidante pelo método Folin-Ciocalteu.	83
Tabela 8. Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS ( $N = 3$ ).	84

### Lista de Quadros

Quadro 1. Estruturas de alcaloides isolados de <i>A. pyriformium</i> .	28
Quadro 2. Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flavanonóis.	49
Quadro 3. Colorações indicativas para a presença de leucoantocianidinas, catequinas, e flavanonas.	50
Quadro 4. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de APF.	53
Quadro 5. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato hexânico de APF. (*) = precipitados obtidos nas frações.	53
Quadro 6. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (MPLC <sub>1</sub> ) do extrato hexânico de APF.	54
Quadro 7. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (MPLC <sub>2</sub> ) do extrato hexânico de APF.	54
Quadro 8. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (CC <sub>2</sub> ) do extrato hexânico de APF.	55
Quadro 9. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de APF.	57
Quadro 10. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato metanólico de APF. (*) = precipitados obtidos nas frações.	59

### Lista de Esquemas

Esquema 1. Fracionamento cromatográfico dos extratos brutos de <i>A. pyriformium</i> .	52
Esquema 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>A. pyriformium</i> .	56
Esquema 3. Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de <i>A. pyriformium</i> .	58

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ABTS - (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato)

AG – Ácido Gálico

APF - *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFEBH - Extrato bruto hexânico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFEBM - Extrato bruto metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFHAC - Fração Acetato de Etila do extrato Hexânico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFHC - Fração Clorofórmica do extrato Hexânico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFHH - Fração Hexânica do extrato Hexânico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFHM - Fração Metanólica do extrato Hexânico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFMAC - Fração Acetato de Etila do extrato Metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFMC - Fração Clorofórmica do extrato Metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFMH - Fração Hexânica do extrato Metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFMH:C - Fração Hexânica:Clorofórmica 1:1 do extrato Metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas;

APFMM - Fração Metanólica do extrato Metanólico de *Aspidosperma pyrifolium* folhas.

BHT – Hidroxitolueno de Butila

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

FC – Folin – Ciocalteu

ICBS – Instituto de Ciências Biológicas

IQB – Instituto de Química e Biotecnologia

LaFi – Laboratório de Farmacologia e Imunidade

LINQA – Laboratório de instrumentação e desenvolvimento em química analítica

LPqRN – Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais

LQM – Laboratório de Química Medicinal

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

MTT - [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difenil brometo de tetrazolium]

OMS - Organização Mundial de Saúde

Rfs – Fatores de retenção

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

TAH - Transferência de átomos de hidrogênio

TE – Transferência de elétrons

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Plantas Medicinais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Biossíntese dos Produtos Naturais .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 A Família Apocynaceae e o Gênero <i>Aspidosperma</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1 Etnofarmacologia do gênero <i>Aspidosperma</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Atividades biológicas presentes no gênero <i>Aspidosperma</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.3 Substâncias isoladas de espécies do gênero e suas atividades biológicas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.4 <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.5 Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.6 Leishmaniose.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.6.1 Leishmaniose visceral.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.6.2 Leishmaniose tegumentar americana .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.6.3 Tratamento da leishmaniose.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3.7 Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3.7.1 Método do radical ABTS<sup>•+</sup> .....</b>	<b>41</b>
<b>2.3.7.2 Folin-Ciocalteu (FC).....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Solventes, materiais e equipamentos.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Estudo Químico .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1 Coleta e identificação do material botânico .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.2 Preparação dos extratos brutos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.3 Análise Fitoquímica.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.3.1 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavanoides.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.3.2 Teste para Leucocianidinas, Catequinas, Flavanonas .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.3.3 Teste para flavonóis, flavanonóis e xantonas .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.3.4 Teste para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard).....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.3.5 Teste para saponinas .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.3.6 Teste para alcaloides .....</b>	<b>51</b>

4.2.3.7 Teste para Antraquinonas, antronas e cumarinas .....	51
4.2.3.8 Teste para fenóis e taninos.....	51
4.2.4 Fracionamento do extrato hexânico bruto de <i>A. pyrifolium</i> . .....	51
4.2.4.1 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato hexânico de APF. ....	53
4.2.4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico.....	57
(+) indicam a presença de alcaloides observados de acordo com a intensidade de formação de precipitados.....	58
4.4 Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.....	60
4.4.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS* <sup>+</sup> .....	60
4.4.2 Método de Folin-Ciocalteu.....	60
4.4.3 Preparo das amostras .....	61
4.4.4 Tratamento estatístico dos dados .....	61
4.3 Ensaios Farmacológicos .....	62
4.3.1 Manutenção de linhagem macrófagos .....	62
4.3.2 Ensaio de citotoxicidade.....	62
4.3.3 Ensaio de toxicidade sobre formas promastigotas .....	63
4.3.4 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
5.1 Análise Fitoquímica.....	66
5.2 Caracterização química do fracionamento cromatográfico .....	68
5.3 Ensaios farmacológicos .....	77
5.4 Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.....	83
6 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS .....	90

# **1 INTRODUÇÃO**

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

Substâncias químicas derivadas de animais, plantas e microorganismos têm sido utilizadas para tratar doenças desde o início da medicina (KOEHN; CARTER, 2005). A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas, canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas e dos microorganismos (CALIXTO, 2003).

A investigação dos produtos naturais como fonte de novas terapias alternativas chegou ao seu auge na indústria farmacêutica ocidental no período de 1970 - 1980, o que resultou em um cenário farmacêutico maciçamente influenciado por moléculas não sintéticas (KOEHN; CARTER, 2005).

Com tal sucesso, pode-se pensar que nesses últimos anos, a identificação de novos metabólitos a partir de organismos vivos seria o cerne dos esforços industriais, visando novas descobertas farmacêuticas. Contudo, muitas indústrias têm eliminado sua pesquisa na área de produtos naturais na última década. Apesar de mais de 100 substâncias baseadas em produtos naturais estarem em estudos clínicos, representando uma queda de cerca de 30% relacionado a período 2001 - 2008 (VEREDAS, et al., 2009).

Ao mesmo tempo, fatores como o avanço na biologia molecular, biologia celular, genômica (que aumentou o número de alvos moleculares, diminuindo o tempo de descoberta de moléculas líderes), o desenvolvimento da química combinatória, e a diminuição do interesse de grandes companhias farmacêuticas em relação a terapia de doenças parasitárias e infecciosas (área tradicional dos produtos naturais), induziu as indústrias a se concentrarem na química sintética. É reconhecido que as estruturas dos produtos naturais, possuem características de alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as fazem favoráveis a se tornarem estruturas possíveis candidatas a protótipos, quando se trata de descoberta de novos fármacos (KOEHN; CARTER, 2005).

Os produtos naturais considerados interessantes derivam do fenômeno da biodiversidade. A consequência da interação da grande variedade de organismos entre eles e com o meio ambiente resultou na evolução de diversas moléculas naturais complexas produzidas por estes organismos, o que possibilitou sua sobrevivência e competitividade. Existem milhões de estruturas químicas naturais, descritas na literatura, fornecendo uma

diversidade química inimaginável, com estruturas complexas com diversos grupos funcionais, moléculas capazes de interagir nos sistemas biológicos, com os mais diversos alvos terapêuticos (MCCHENSNEY et al., 2007).

Dentre as ciências farmacêuticas, uma das mais antigas a se estabelecer foi a farmacognosia, sendo o termo inicialmente referido à investigação de substâncias medicinais originadas de plantas, animais ou minerais, no seu estado bruto, na forma de, por exemplo, chás ou tinturas (DEWICK, 2009). A farmacognosia, pioneira nos estudos sobre plantas medicinais, é uma ciência interdisciplinar, incorporando aspectos da química analítica, bioquímica, biossíntese, biotecnologia, ecologia, etnobotânica, microbiologia, biologia molecular, taxonomia e química orgânica (KINGHORN, 2001).

As espécies do gênero *Aspidosperma* são árvores de uma grande variedade de portes e que crescem em diferentes habitats, estando distribuídas por todas as Américas, sendo no Brasil catalogado cerca de 50 espécies deste gênero (AMORIM; SAMPAIO; ARAÚJO, 2005; CORRÊA, 1984; OLIVEIRA et al., 2009).

Existem diversos relatos na literatura acerca da sua utilização pela população das plantas deste gênero, como por exemplo, no tratamento de malária, disenteria, apendicite, asma, febre, dispneia, escabiose, dor de barriga, tosse, prisão de ventre, furúnculos, reumatismo, leishmaniose, dor de dente, inflamações do trato urinário e dermatite. Porém vários estudos trazem a ressalva de que algumas plantas do gênero são contraindicadas para mulheres grávidas pelo seu potencial abortivo e teratogênico (AGRA et al., 2007; BOTSARIS, 2007; BOURDY et al., 2000; BOURDY; CHAVEZ DE MICHEL; ROCA-COULTHARD, 2004; BOURDY et al., 2004; BRANDÃO et al., 1992; DE ALMEIDA et al., 2010; DEL VITTO; PETENATTI; PETENATTI, 1997; DESMARCHELIER et al., 1996; FILIPOV, 1994; GOLENIOWSKI et al., 2006; HAJDU; HOHMANN, 2012; KVIST et al., 2006; MARTÍNEZ; BARBOZA, 2010; MONTELES; PINHEIRO, 2007; MUÑOZ et al., 2000; RODRIGUES, 2007; RUIZ et al., 2011; SANZ-BISET; CAÑIGUERAL, 2011; SANZ-BISET et al., 2009; SCARPA, 2004; SCHMEDA-HIRSCHMAN, 1993; SILVA et al., 2010).

Em alguns casos, as espécies foram submetidas a ensaios farmacológicos no sentido de identificar atividades biológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo identificadas as atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária (*Leishmania* e *Plasmodium*), antioxidante, antineoplásica, pró-erétil e inseticida. Além disso, vários esforços têm sido feitos no sentido de identificar as substâncias produzidas pelas espécies do gênero (HAJDU; HOHMANN, 2012).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Plantas Medicinais

Desde os tempos mais remotos o ser humano utiliza os produtos naturais para diversas finalidades, tanto para sua alimentação quanto para o alívio ou tratamento das suas enfermidades. Há relatos de registros desde os egípcios, que conheciam os efeitos sedativos, por volta de 1600 a.C. já apresentavam estudos com mais de seiscentas plantas de uso medicinal (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Em países onde os serviços de saúde e o acesso médico hospitalar são limitados, a utilização das plantas funciona como estratégia terapêutica. Assim, vários profissionais da saúde prescrevem estas plantas que podem ser vendidas em farmácias de manipulação e estimulam a indústria farmacêutica no desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos (FRANCO; FONTANA, 2003). Os produtos naturais tem sido a maior fonte de fármacos do século, além das substâncias que são diretamente extraídas, a medicina alopática utiliza as plantas como precursores para a síntese de outras substâncias. O Brasil, com as suas dimensões continentais, detém aproximadamente 25% de todas as espécies vegetais catalogadas no planeta. Portanto, o Brasil representa papel crucial quando analisado o desenvolvimento oriundo dos produtos naturais (RATES, 2001).

A fitoterapia surge como uma estratégia na terapêutica medicamentosa bem aceita e de fácil acesso aos povos de todo o planeta. Contudo, é de extrema importância a investigação do uso popular das plantas medicinais. Torna-se essencial a difusão e pesquisa das espécies vegetais utilizadas pela população, assim como, o incentivo e incorporação aos sistemas de saúde (ELDIN; DUNFORD, 2001).

O estudo desta terapia, inicialmente, teve grande parte do seu desenvolvimento creditado aos farmacêuticos e médicos que se esforçavam nos seus estudos, com o avanço da química moderna, os laboratórios absolveram grande parte da mão de obra especializada e a fitoterapia foi dando espaço aos medicamentos sintéticos. Todo o interesse e investimento no potencial dos produtos naturais e suas atividades farmacológicas obtiveram um grande incentivo a partir de 1978, quando esta terapia foi legalmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (PACHÚ, 2007).

Diante do interesse crescente que gira em torno dos fitoterápicos, uma série de sugestões apresentadas por diferentes segmentos da sociedade, estabeleceu a elaboração de uma legislação para a área que regulamentasse seu uso, produção e comercialização, dentre outros aspectos. A Portaria SVS nº 6 de 31/01/1995 definiu claramente que, o fitoterápico é um medicamento com componentes ativos exclusivamente de origem vegetal, e que deve apresentar comprovação de eficácia, segurança e qualidade. Esta portaria, padronizou conceitos os técnicos na área, tratando de termos relacionados à segurança na produção e ao controle qualidade dos medicamentos, determinou prazos para a realização de estudos toxicológicos para produtos já existentes no mercado e estabelecendo bases para uma maior aceitação dos produtos finais (BRASIL, 1995). Portaria esta, que foi aprimorada pela Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC-ANVISA nº 48, esta resolução também redefiniu o termo aplicado aos fitoterápicos, antes chamados de produtos fitoterápicos e agora são medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Várias áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias obtidas a partir de plantas e medicamentos fitoterápicos, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização dos princípios ativos; a etnobotânica e etnofarmacologia, que buscam informações a partir de diferentes povos e etnias; a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos dos extratos e dos constituintes químicos isolados. A etnobotânica possui um diverso campo para a pesquisa no Brasil, que apresenta grande diversidade biológica, e a intensificação dos trabalhos nessa área leva ao conhecimento de espécies que são utilizadas, podendo servir de instrumento para delinear estratégias de utilização e conservação das espécies nativas e seus respectivos potenciais (MACIEL et al., 2002).

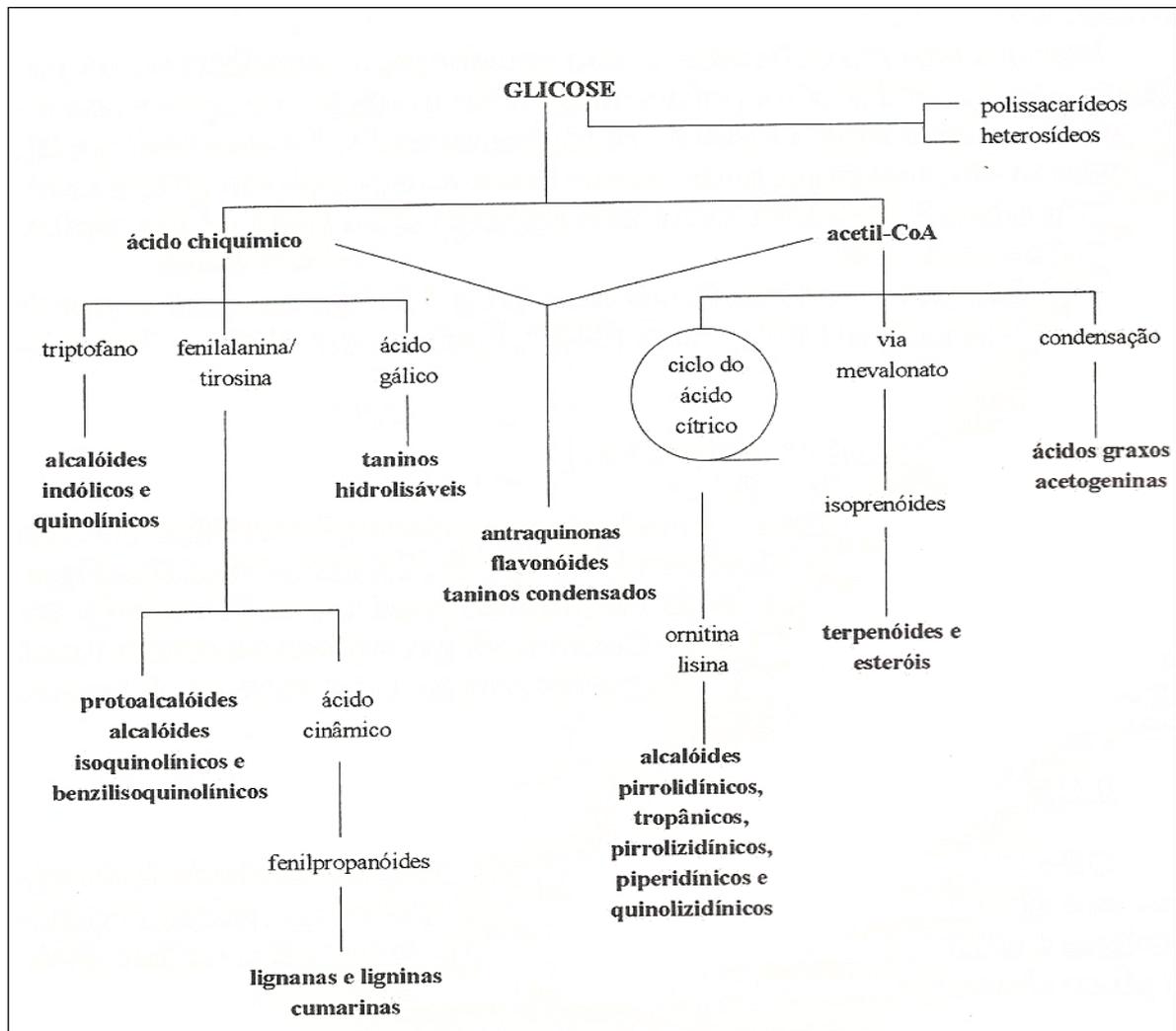
O uso popular e a tradição não garantem a eficácia e a qualidade dos produtos naturais, não diferem em nada em relação aos produtos sintéticos, necessitando comprovação da sua eficácia através de testes e ensaios farmacológicos, para garantir a qualidade do produto acabado, assim como, todas as suas etapas de produção. Aliado a isso deve-se ter em mente a natural diferença na composição entre as plantas medicinais decorrente dos fatores ambientais, climáticos, genéticos, qualidade do solo, período em que é coletado a espécie vegetal (BARREIRO; BOLZANI, 2009), somado ao fato do Brasil ser rico em matéria-prima de origem vegetal, além disso, estudos de farmacoeconomia mostram o impacto da utilização das plantas medicinais na economia de outros países, quando associados a terapêutica que pode contribuir para o desenvolvimento de áreas estratégicas no país. (DE SEMET et al., 2000).

## 2.2 Biossíntese dos Produtos Naturais

A organização celular apresenta semelhanças entre os organismos. Cada célula é capaz de realizar de forma contínua uma série de reações, visando sempre a homeostase no organismo, sendo este conjunto de reações químicas chamado metabolismo. Nos vegetais, existem basicamente dois tipos de metabolismo, o metabolismo primário, responsável por processos essenciais à vida e comuns a quase todos os seres vivos (processos metabólicos relacionados às macromoléculas: carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos); e o metabolismo secundário, responsável pela produção de substâncias que não estão necessariamente diretamente relacionadas com a manutenção do organismo produtor, mas que garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie naquele ecossistema onde ela está inserida (DEWICK, 2009).

Nos vegetais, a produção de todos os metabólitos secundários começa na fotossíntese, quando a planta produz glicose a partir de gás carbônico e água. A glicose pode seguir diversas rotas metabólicas diferentes, a depender do metabólito a ser sintetizado (figura 1).

**Figura 1. A produção de metabólitos secundários dos vegetais.**



Fonte: Dos Santos, 2004

### 2.3 A Família Apocynaceae e o Gênero *Aspidosperma*

A família Apocynaceae é caracterizada por ser composta principalmente de plantas produtoras de látex. Dentro desta família, as plantas do gênero *Aspidosperma* são encontradas somente nas Américas, principalmente entre o México e a Argentina (CORRÊA, 1984; RAPINI, 2000). As espécies de *Aspidosperma* são árvores que medem de dois a 60 m de altura, capazes de crescer em uma variedade de habitats, como o cerrado do Brasil central e nos pampas do sul do Brasil, da Argentina e do Paraguai, bem como nas margens dos rios amazônicos e nas elevações cerca de dois mil metros acima do nível do mar das regiões orientais do Peru e da Bolívia (WOODSON, 1951). No Brasil há catálogo de cerca de 50

espécies desse gênero, distribuídas por todos os ecossistemas do território nacional, incluindo floresta amazônica, cerrado e caatinga (AMORIM; SAMPAIO; ARAÚJO, 2005; CORRÊA, 1984; OLIVEIRA et al., 2009).

De forma geral, a família Apocynaceae, compreende cerca de 3700 a 5100 espécies, as quais são divididas entre 250 a 550 gêneros (AMORIM; SAMPAIO; ARAÚJO, 2005). No território brasileiro, são encontradas de acordo com a sua classificação quimiotaxônomica, como segue a tabela abaixo (PEREIRA et al., 2007)

**Tabela 1. Classificação quimiotaxonômica das espécies do gênero *Aspidosperma*.**

Série	Espécies
Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby.; <i>A. laxiflorum</i>
Nitida	<i>A. Auriculatum</i> Mgf.; <i>A. carapanauba</i> M. Pichon.; <i>A. compactinervium</i> Kuhlmann.; <i>A. discolor</i> A . DC.; <i>A. eburneum</i> F. Allem.; <i>A. excelsum</i> Benth.; <i>A. marcgravianum</i> Wodson.; <i>A. nitidum</i> Benth Ex Müll.-Arg., <i>A. oblongum</i> A. DC.; <i>A. spagazzinii</i> Molf. Ex Meyer.
Quebranchines	<i>A. chakensis</i> Spegazzini.; <i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht.
Polyneura	<i>A. cuspa</i> Blake.; <i>A. cylindrocarpon</i> Müell.-Arg.; <i>A. dispersum</i> ; <i>A. peroba</i> ; <i>A. polyneuron</i> Müell.-Arg.; <i>A. sessiliflorum</i>
Pyricolla	<i>A. australe</i> Müell.-Arg.; <i>A. campus-bellus</i> A. P. Duarte.; <i>A. gomesianum</i> A. DC.; <i>A. multiflorum</i> A. DC.; <i>A. nigricans</i> Handro.; <i>A. olivaceum</i> Müell.-Arg.; <i>A. parviflorum</i> ; <i>A. populifolium</i> A. DC.; <i>A. pyricollum</i> Müell.-Arg.; <i>A. pyrifolium</i> Mart.; <i>A. quirandy</i> ; <i>A. refractum</i> Mart.; <i>A. rhobeosignatum</i> ; <i>A. subincanum</i> Mart.; <i>A. tomentosum</i> Mart.; <i>A. ulei</i> Mgf.; <i>A. vargasii</i>
Nobile	<i>A. álbum</i> (Vahl) R. Bent.; <i>A. desmanthum</i> Benth ex Müell.-Arg.; <i>A. exalatum</i> Monachino.; <i>A. fendleri</i> ; <i>A. limae</i> Woodson.; <i>A. megalocarpon</i> Müell.-Arg.; <i>A. melanocalyx</i> Müell.-Arg.; <i>A. neblinae</i> Monachino.; <i>A. obscurinervium</i> Azembuja.; <i>A. sandwithianum</i> ; <i>A. spruceanum</i> Benth.
Macrocarpa	<i>A. duckei</i> ; <i>A. macrocarpon</i> Mart.; <i>A. verbascifolium</i> Müell.-Arg.

Tomentosa	<i>A. formosanum</i> ; <i>A. daysycarpum</i> A. DC.
-----------	---

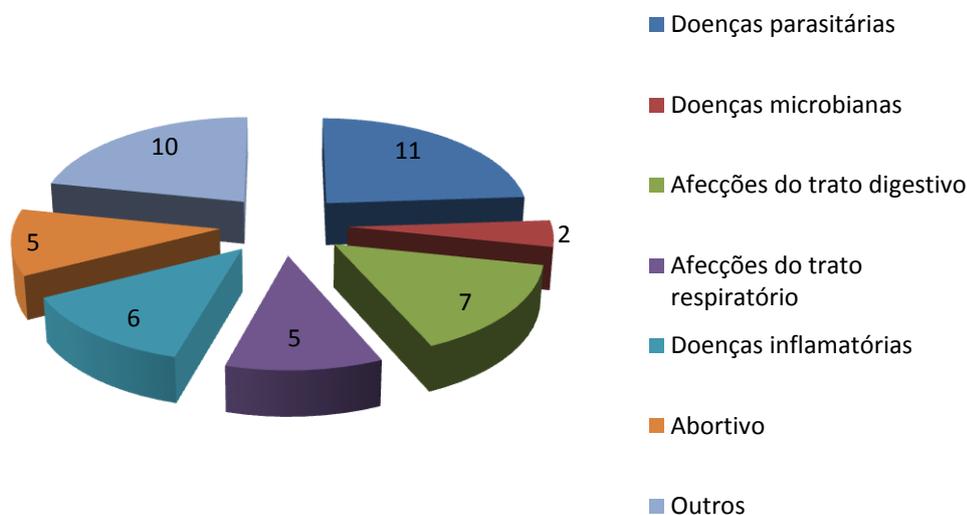
Fonte: adaptado de PEREIRA et al., 2007.

A atual classificação quimiotaxonômica das espécies deste gênero foi proposta por Bolzani em 1987, na qual 48 espécies são divididas em sete séries (BOLZANI et al., 1987). Diversas espécies deste gênero são conhecidas como perobas, pereiro, guatambus e quina. São espécies arbóreas tropicais, apresentam flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas que podem apresentar látex abundante, mas a característica específica do gênero é que elas não apresentam o látex no tronco, ao contrário dos outros gêneros desta família (CORREA, 1978).

### 2.3.1 Etnofarmacologia do gênero *Aspidosperma*

Bastante apreciadas pela qualidade da madeira, as plantas deste gênero também encontram variadas aplicações etnofarmacológicas (figura 2). Em dois estudos com índios *Isoceño-Guaraní* bolivianos e na região da *Sierra de Comechingones* na Argentina, a espécie *Aspidosperma quebracho-blanco* é citada como útil no tratamento de malária, disenteria, apendicite, asma, feridas e febre, porém sendo contra-indicada para grávidas e crianças menores de cinco anos (BOURDY et al., 2004a, 2004b; GOLENIOWSKI et al., 2006). Outra pesquisa, desta vez na região de *San Luis* (Argentina), revelou a utilização da espécie *A. quebracho-blanco* (citada como nativa da região) como antidispneico e antiasmático, cicatrizante e febrífugo (DEL VITTO; PETENATTI; PETENATTI, 1997). Em mais um estudo na Argentina (comunidade *Toba*, no *Chaco* Central), o infuso ou decocto das cascas da espécie *A. quebracho-blanco* é citado como útil no tratamento da escabiose (MARTÍNEZ; BARBOZA, 2010). Foi citada a utilização do decocto da casca de *A. quebracho-blanco* no tratamento de dor de barriga, tosse, como analgésico e como abortivo, pelos índios *Pilagá* na região do *Chaco* Central argentino (FILIPOV, 1994). Em outro estudo, ainda na região do *Chaco* argentino, desta vez com os chamados *Criollos*, a mesma espécie é citada como abortiva, antitussígena, depurativa do sangue, laxativa e expectorante (decocto da casca, via oral); anti-caspa (decocto da casca, tópico); capaz de tratar “estômago frio” e malária (infusão da casca, via oral) e furúnculos (casca aquecida, colocada diretamente sobre as lesões) (SCARPA, 2004).

**Figura 2. Aplicações etnofarmacológicas de espécies do gênero *Aspidosperma* (n= 46).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Dois estudos realizados na floresta amazônica Peruana (vale *Chazuta*) revelam que as cascas das espécies *A. myristicifolium* e *A. rigidum* são utilizadas, na forma de decocto, para o tratamento do reumatismo (SANZ-BISET et al., 2009) e que o decocto das cascas de *A. rigidum* era utilizado como um “tônico para a saúde” (SANZ-BISET; CAÑIGUERAL, 2011). Em estudo na região de Loreto (Peru), foram pesquisadas plantas para o tratamento da malária e da leishmaniose, sendo citado o córtex da espécie *A. excelsum* como útil no tratamento das duas doenças e aquele de *A. rigidum* como útil no tratamento da malária (KVIST et al., 2006). Em outro estudo no Peru, com habitantes da região do rio *Nanay*, em Loreto, revelou que as cascas da espécie *A. nitidum* são utilizadas no tratamento da malária (RUIZ et al., 2011).

O estudo com um grupo de ameríndios (*Ese'ejas*) habitantes do sudoeste da Floresta Amazônica, nas regiões dos rios *Madre de Dios*, *Tambopata* e *Heath* (Bolívia) revelou que a casca da espécie *A. excelsum* era utilizada para o tratamento da dor de dente (DESMARCHELIER et al., 1996). Em pesquisa na comunidade *Porvenir*, na reserva indígena *Bajo Paraguá* (Bolívia), o decocto da casca do caule da espécie *A. rigidum* foi citada como útil no tratamento de escabiose e febre, por uso externo (HAJDU; HOHMANN, 2012). O xarope obtido da casca da mesma espécie foi citado como útil no tratamento de apendicite, em estudo com o grupo étnico *Tacana* (Amazônia Boliviana) (BOURDY et al., 2000). Em pesquisa com índios *Ayoreos* da região do *Chaco* paraguaio a espécie *A. quebraho-blanco* foi

citada como uma panacéia, útil no tratamento de qualquer doença além de utilizada nos rituais religiosos da tribo (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1993). As cascas da espécie *A. nitidum* tem sido citadas como úteis tanto no tratamento da malária quanto da febre comum (BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2003).

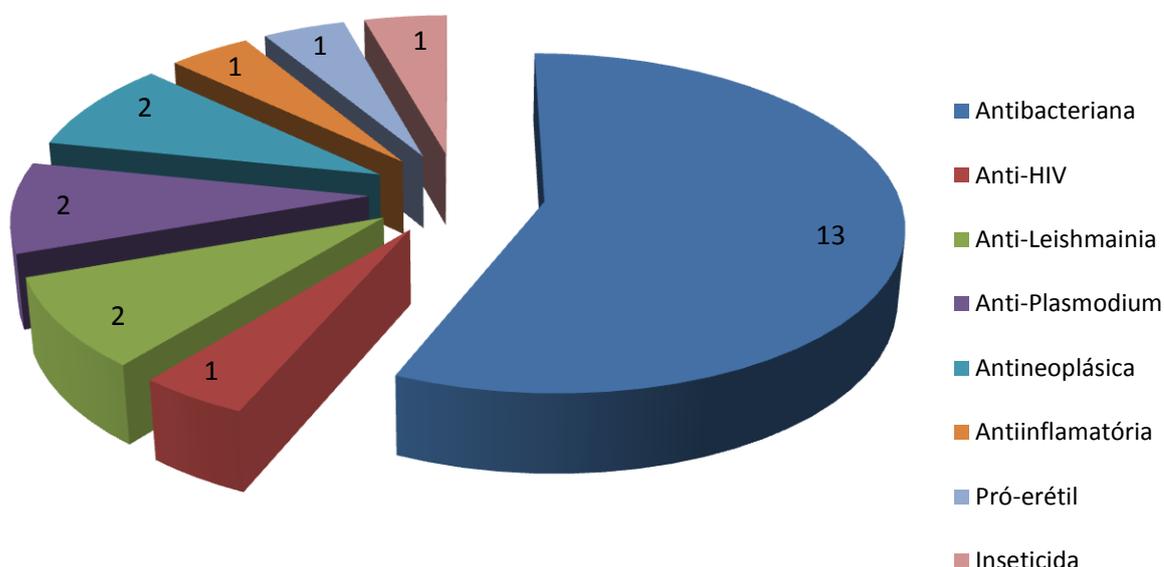
No Brasil também há relatos da utilização de plantas do gênero em medicina popular. Em pesquisa com ribeirinhos da floresta amazônica no Brasil, a espécie *A. excelsum* é citada como abortiva, sendo assim contra-indicada durante a gravidez (RODRIGUES, 2007). Em pesquisa nos arquivos da Flora Medicinal brasileira, foram encontrados registros da utilização da espécie *A. polyneuron* para o tratamento da febre, da diarreia e da malária (BOTSARIS, 2007). Em levantamento realizado no Quilombo Sangrador (MA, Brasil), a espécie *A. subincanum* foi citada como útil no tratamento de distúrbios do aparelho digestivo, sendo consumida na forma de garrafada (MONTELES; PINHEIRO, 2007). Em levantamento realizado na cidade de Nova Xantina (MT, Brasil) com o intuito de identificar plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas, a espécie *A. tomentosum* foi uma das dez mais citadas (DA SILVA et al., 2010).

### 2.3.2 Atividades biológicas presentes no gênero *Aspidosperma*

Algumas espécies do gênero tem sido alvo de pesquisa no sentido de identificar suas propriedades farmacológicas e outras atividades biológicas (figura 3). Ensaio *in vitro* com os extratos aquosos das partes aéreas e das raízes de *A. pachypterum* frente *Staphylococcus aureus* e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), respectivamente, demonstrou que esta espécie exibia uma atividade moderada, quando observada a cultura com células infectadas (SUFFREDINI et al., 2002a, 2002b). O extrato metanólico das partes aéreas de *A. ramiflorum* mostrou-se ativo *in vitro* frente a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (AGRIPINO et al., 2004) e frente o fungo *Cryptococcus neoformans* (causador de infecções oportunistas em humanos) (DE SOUZA et al., 2006) enquanto o extrato metanólico da casca do caule da mesma espécie mostrou-se moderadamente ativo frente bactérias gram-positivas e inativo frente gram-negativas (TANAKA et al., 2006). Estudando rejeitos do beneficiamento de madeiras nobres no Paraná, foi descrito que o extrato metanólico da madeira da planta identificada como Peroba-rosa (*Aspidosperma* sp.) apresentava uma composição com fenóis e rica em alcaloides, bem como forte atividade frente a bactéria gram-negativa *Proteus mirabilis* (GRANATO et al., 2005). Em duas triagens realizadas com diversas espécies

vegetais, dentre elas cinco do gênero *Aspidosperma*, foi observado que os extratos etanólicos da casca do caule de *A. excelsum*, *A. megalocarpon*, *A. marcgravianum* e *A. oblongum* eram ativos frente a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* e que os mesmos extratos e também o extrato etanólico da casca do caule de *A. album* eram ativos frente a bactéria gram-positiva *S. aureus* (VERPOORTE et al., 1982, 1983). Em estudo com plantas peruanas, foi descrito que o extrato etanólico da casca de *A. rigidum* apresentava atividade antibacteriana frente ao *B. subtilis* (ROJAS et al., 2003).

**Figura 3 – Atividades biológicas de plantas do gênero *Aspidosperma* (n=23).**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Outra atividade relatada para espécie foi a anti-*Leishmania*, onde, em ensaio *in vitro* frente promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*, a fração rica em alcaloides obtida da casca do caule mostrou-se ativa, sendo a magnitude da atividade maior frente à primeira espécie (FERREIRA et al., 2004).

Com relação a atividade anti-*Leishmania*, outras frações com alcaloides, obtiveram bom resultados *in vitro*, frente as cepas promastigotas de *L. amazonensis*, foram analisadas todas as partes da espécie *A. ramiflorum*, sendo os melhores resultados para as folhas e casca do caule, esta última foi mais ativa biologicamente, evidenciando que os compostos de alcaloides monoterpene indólicos, estavam numa concentração duas vezes maior, do que os

presentes nas folhas, considerando que os seus rendimento são semelhantes (CUNHA et al., 2012).

Ainda no intuito de se descobrir alternativas para o tratamento de doenças negligenciadas, o extrato metanólico da casca de *A. megalocarpon* foi testado frente as cepas D2 e F32 de *Plasmodium falciparum*, mostrando-se ativo (WENIGER et al., 2001). O extrato em diclorometano da raiz de *A. tomentosum* mostrou-se ativo frente *P. falciparum* (linhagem FcB1/Colombia) com um índice de seletividade de 67,5 quando comparado com a atividade frente células NIH-3T3 (ALBERNAZ et al., 2010). Em relação à pesquisa com substâncias antifúngicas, foi visto que o extrato etanólico do caule de *A. polyneuron* era capaz de inibir o fungo *Cladosporium herbarum* (patógeno de plantas) (FERREIRA et al., 2003).

No intuito de se encontrar alternativas para o tratamento do câncer, o extrato em diclorometano das partes aéreas de *A. tomentosum* mostrou-se capaz de inibir a proliferação das linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), UACC62 (melanoma), NCIADR (câncer de mama com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos e NCI460 (câncer de pulmão), sendo observado que a atividade estava concentrada nas frações ricas em terpenos e espécies de polaridade alta (KOHN et al., 2006). Já em ensaio com o extrato aquoso das raízes de *A. pachypterum*, o mesmo mostrou-se ativo frente a linhagem celular HL(60)-TB (SUFFREDINI et al., 2002).

Em ensaio *in vivo* com o extrato etanólico do caule de *A. nitidum* foi observada atividade antiinflamatória significativa, quando avaliado no ensaio de edema induzido por carragenina em camundongo (PEREIRA et al., 2006a). Na prospecção de fontes de compostos antioxidantes, o extrato aquoso a quente da espécie *A. quebracho-blanco* foi testado no ensaio de poder de oxidação/redução férrico, mostrando uma atividade baixa, não sendo assim considerada como potencial produtora de compostos antioxidantes (BORNEO et al., 2009).

Foi observado que a administração de uma fração rica em alcaloides obtida da casca da raiz de *A. ulei* exerceu efeito pró-erétil em ratos, sendo sugerido um mecanismo de ação via bloqueio de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pré-sinápticos, ativação de sistema dopaminérgico e liberação de óxido nítrico (CAMPOS et al., 2006). Quando a mesma fração foi testada em corpo cavernoso obtido de pênis de coelho, foi observada sua capacidade de provocar relaxamento, sendo o mecanismo proposto o bloqueio do influxo de cálcio nas células (CAMPOS et al., 2008). Em ensaio utilizando receptores  $\alpha$ -adrenérgicos isolados de pênis humano, foi mostrado que o extrato bruto e quatro frações obtidas da casca de *A. quebracho-blanco* eram capazes de bloqueá-los, sendo a magnitude de interação diretamente proporcional ao conteúdo do alcaloide ioimbina (SPERLING et al., 2002).

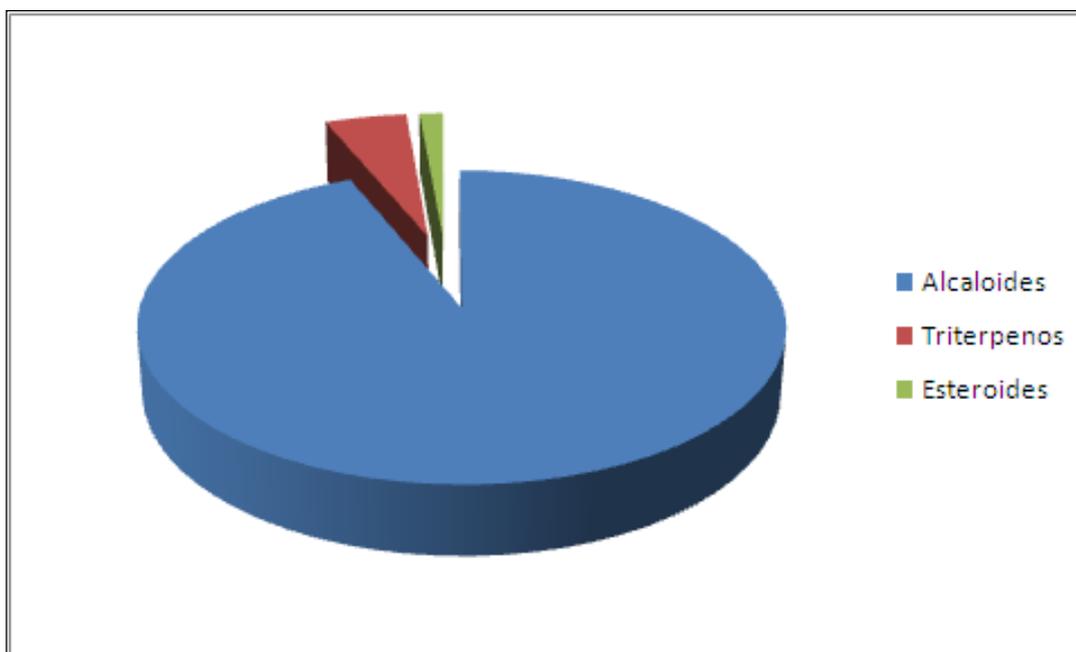
Uma das alternativas mais eficazes para o controle de doenças transmitidas por insetos é o controle dos vetores (LUNA et al., 2005). Seguindo esta linha foi realizado um *screening* de plantas do estado do Amazonas (Brasil) com o intuito de se identificar plantas com o potencial de erradicar a larva do mosquito *Aedes aegypti*, responsável pela transmissão da dengue, sendo ensaiados extratos de diversas plantas, dentre elas oito espécies de *Aspidosperma* (*A. araracanga*, *A. desmanthum*, *A. marcgravianum*, *A. nitidum*, *A. sandwithianum*, *A. schultesii*, *A. spruceanum* e *A. vargasii*), porém nenhuma delas mostrou atividade apreciável (POHLIT et al., 2004). Outra linha de pesquisa para os extratos vegetais é em relação ao controle de pragas na agricultura. Em se tratando de plantas do gênero *Aspidosperma*, os extratos etanólico e aquoso da casca do caule da espécie identificada como *A. pyrifolium* se mostraram ativos frente larvas de *Plutella xylostella*, uma praga que ataca plantas da família das Crucíferas, como couve, brócolis e repolho (TORRES et al., 2001; TRINDADE et al., 2008).

Em estudo de toxicidade frente o microcrustáceo *A. franciscana* com várias espécies encontradas na Amazônia brasileira, dentre elas sete espécies de *Aspidosperma*, foi relatado que os extratos da casca de *A. marcgravianum*, *A. vargasii*, *A. nitidum* e *A. spruceanum* levaram à mortalidade de 100, 94, 70 e 65% dos crustáceos, enquanto os extratos da casca de *A. desmanthum*, *A. sandwithianum* e *A. schultesii* levaram a mortalidade de 6, 0 e 0% dos crustáceos, mostrando o potencial tóxico de algumas espécies do gênero (QUIGNARD et al., 2003). Em outro ensaio com *Artemia salina*, tanto o extrato em diclorometano quanto o extrato em metanol da casca de *A. excelsum* mostraram toxicidade (DESMARCHELIER et al., 1996).

### **2.3.3 Substâncias isoladas de espécies do gênero e suas atividades biológicas**

A grande maioria dos estudos em fitoquímica relata o isolamento de alcaloides do tipo indólico, sendo os mesmos considerados marcadores quimiotaxonômicos para a classificação botânica das espécies de *Aspidosperma* (figura 4) (GARCIA; BROWN, 1976; PEREIRA et al., 2007).

**Figura 4 – Classes de substâncias isoladas de espécies de plantas do gênero *Aspidosperma*.**



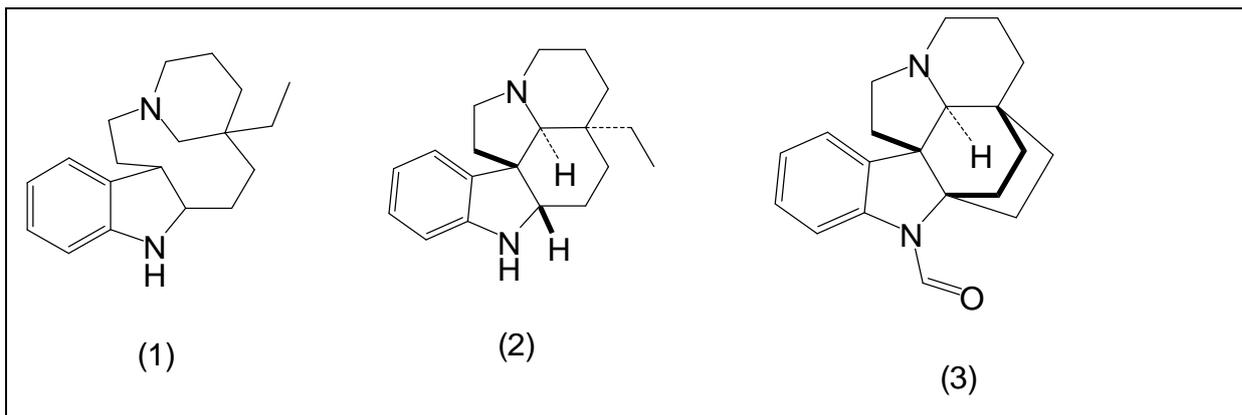
Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

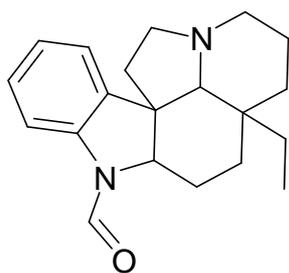
Dentre as substâncias isoladas de plantas do gênero *Aspidosperma*, algumas foram avaliadas quanto ao seu potencial biológico. Isoladas da casca do caule de *A. ramiflorum*, as substâncias ramiflorina A e B mostraram ambas atividade antibacteriana frente os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (TANAKA et al., 2006) e atividade antifúngica frente o microorganismo *Cryptococcus neoformans* (DE SOUZA et al., 2006). Outra atividade relatada foi a antimalárica, para os alcaloides aspidocarpina e elipiticina, ambas superiores à da cloroquina, frente a cepa multirresistente K1 de *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO et al., 2007). Finalmente, em estudo com os alcaloides quebrachamina e aspidospermina foi visto que os mesmos possuíam atividade bloqueadora  $\alpha$ -adrenérgica em vários tecidos urogenitais, significando um potencial pró-erétil para estas substâncias (DEUTSCH et al., 1994).

Com relação a espécie a ser estudada neste trabalho, alguns alcaloides já foram isolados por diversos pesquisadores, como por exemplo: (+)-Quebrachamina (1), Aspidospermidina (2), Formilaspidofractinina (3), Desmetoxivalesina (4), Vincadiformina (5), 10-Metoxiaspidospermidina (6), Desacetilaspidospermina (7), Acuamicina (8), Des-N-metoxiaspidospermidina (9), N-formilaspidospermidina (10), Aspidofilina (11), Desidroxiplocidina (12), Refractidina (13) por (GILBERT et al., 1965), 15-

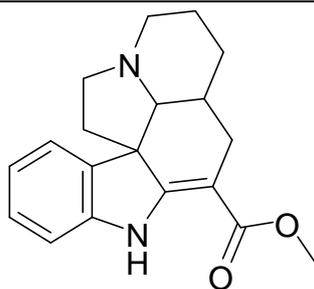
desmetoxipirifolina (14), 6-Desmetoxipirifolina (15), Aspidospermina (16), Desmetilpalosina (17), Diidrocondilocarpina (18), Pirifolina, Aspidofractina (19) (DJERASSI et al., 1962 *apud* PEREIRA et al., 2007), Haplocina (20), Palosina (21) (MITAINE et al., PEREIRA et al., 2007) (22) (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983), Pirifolidina (23) (WALSER; DJERASSI, 1965), Aspidofractinina (24) (ARAUJO-JUNIOR et al., 2007).

**Quadro 1. Estruturas de alcaloides isolados de *A. pyrifolium*.**

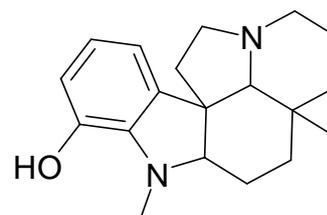




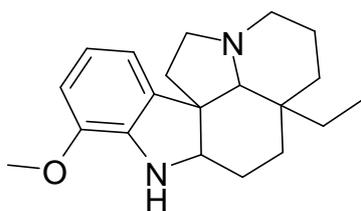
(4)



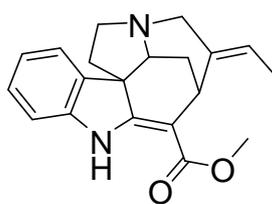
(5)



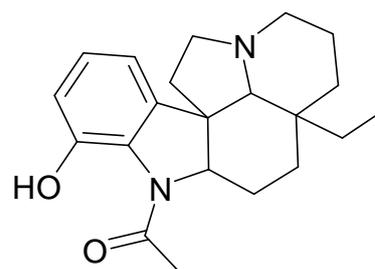
(6)



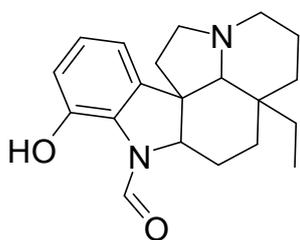
(7)



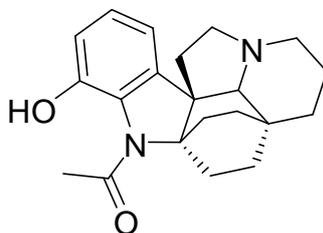
(8)



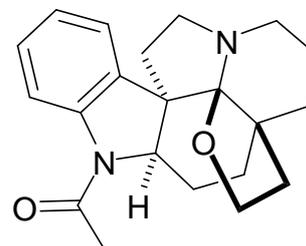
(9)



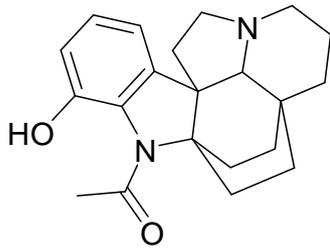
(10)



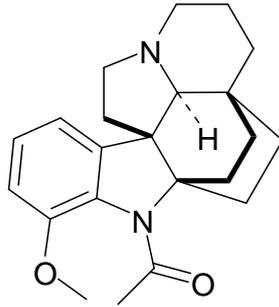
(11)



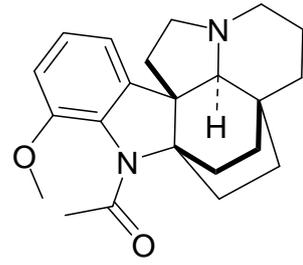
(12)



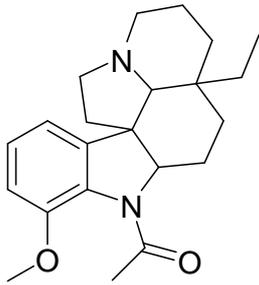
(13)



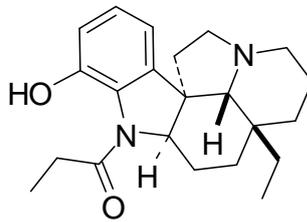
(14)



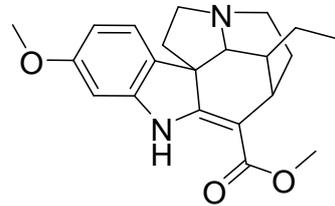
(15)



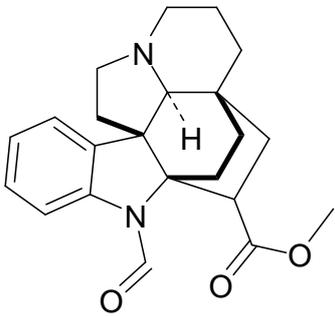
(16)



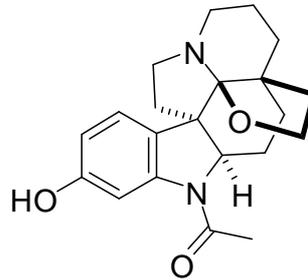
(17)



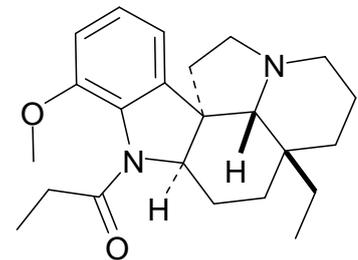
(18)



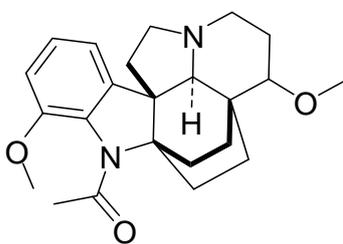
(19)



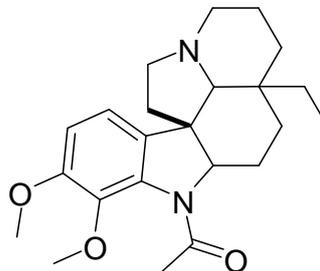
(20)



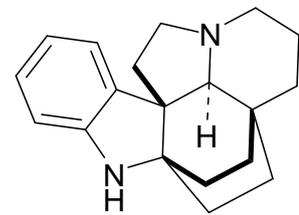
(21)



(22)



(23)



(24)

### 2.3.4 *Aspidosperma pyrifolium*

*Aspidosperma pyrifolium* é uma espécie que é encontrada na caatinga nordestina e no pantanal. É uma árvore de porte médio, com aproximadamente sete metros de altura. Sua casca apresenta sabor amargo característico, de coloração acinzentada, de textura lisa quando jovem e rugosa quando idosa. Suas folhas são de forma oval, pequenas (em torno de 10 cm de comprimento), também apresentam sabor amargo assim como o caule. Seus frutos são em forma de gota, apresentando cerca de 5 cm de comprimento, quando velhos eles se dividem em dois, deixando dessa forma suas sementes, o que facilita sua propagação, pois podem ser levadas à longas distâncias (MAIA, 2004).

Dentre os nomes populares que ela é conhecida, podemos citar os seguintes nomes: pereiro, pereiro-branco, pereiro-preto, peroba-rosa, trevo, pereiro-de-saia, pereiro-do-sertão (REDE DE SEMENTES DO PANTANAL, 2012).

Apesar dos relatos de baixa toxicidade associada à utilização de plantas do gênero *Aspidosperma* (FERREIRA et al., 2004; GOLONI et al., 2005; PEREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2009; WENIGER et al., 2001), alguns estudos mostram uma situação contrária em relação a espécie *A. pyrifolium*, comum na região do sertão nordestino, inclusive em Alagoas (ARAÚJO-JUNIOR. et al., 2007; LIMA; SOTO-BLANCO, 2010). Em estudo com a espécie *A. pyrifolium*, foram relatados casos de aborto em caprinos devido ingestão de partes da plantas e quando o extrato etanólico das folhas foi administrado a ratos prenhes foi observado redução do peso fetal e toxicidade materna, bem como hemólise e toxicidade no ensaio frente o microcrustáceo *Artemia salina* (LIMA; SOTO-BLANCO, 2010).

**Figura 5. *Aspidosperma pyrifolium*: (A) Árvore verde. (B) Sementes. (C) Flores (D) Caule de uma árvore jovem.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Em pesquisa na região da caatinga paraibana, a espécie *A. pyrifolium* foi citada nas cidades de Cachoeira e Barrocas (PB, Brasil) como importante em termos medicinais, porém sem revelar em qual doença (DE ALMEIDA, 2010). Em estudo na região do Cariri Paraibano, o decocto da casca do caule da espécie *A. pyrifolium* foi citada como útil no tratamento de inflamações do trato urinário e de dermatites (AGRA et al., 2007). Em relação aos efeitos tóxicos de plantas do gênero, uma pesquisa direcionada à ocorrência de toxicidade em animais na região do Seridó Ocidental e Oriental (RN, Brasil), a espécie *A. pyrifolium* foi citada como causadora de abortos e de alterações nervosas em ovinos, caprinos e bovinos (DA SILVA et al., 2006).

### 2.3.4 Ensaio de citotoxicidade

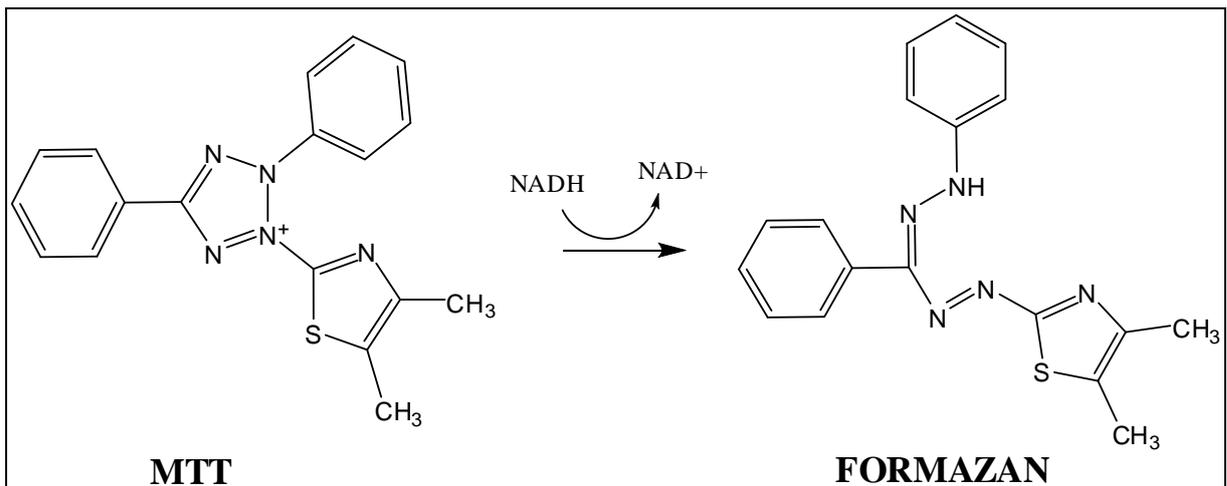
Existe, vários ensaios para avaliação da citotoxicidade, mais frequentemente usados estão baseados na alteração da permeabilidade celular (ex. uso de corantes vitais, tais como azul de Trypan, preto de naftaleno, eosina, etc), nas funções mitocondriais (ex. ensaio do MTT, XTT, etc), e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular (ex. ensaios de proliferação celular, ensaios clonogênicos, etc). Esses ensaios já estão estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; WILSON, 2000). O MTT, por sua vez, possui o mais fácil efeito observado, após a exposição das células a um composto ou a uma mistura de compostos (ex. extratos de plantas), é a avaliação microscópica das alterações morfológicas ocorridas na monocamada de células, as quais se traduzem pela desorganização do tapete celular e/ou pelo aspecto granuloso, arredondado e vacuolizado das células (STREISSLE et al, 1981; BARILE,1994). Outra técnica para avaliar a citotoxicidade é a avaliação da viabilidade celular, através do método de exclusão do corante azul de Trypan, o qual permite determinar a integridade das membranas (WILSON, 2000). Esse corante só penetra em células mortas cujas membranas não podem mais excluí-lo. A contagem das células viáveis é comparada com o controle e fornece um índice de toxicidade do composto (WALUM; STREIBER; JENSSEN, 1990; BARILE,1994).

No ensaio do MTT, o sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5- difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazan de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular (DENIZOT; LANG, 1986). Após a adição de DMSO (DENIZOT; LANG, 1986), isopropanol ou outro solvente apropriado, o produto é solubilizado, liberado e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria tipo ELISA. A habilidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986; BARILE, 1994).

O ensaio do MTT é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente a mitocôndria, resultando em uma

superestimação da toxicidade (BARILE, 1994; SMEE et al., 2002). Substâncias indicadoras colorimétricas da viabilidade celular, tal como MTT (TAKAHASHI et al., 2001; SMEE et al., 2002) ou vermelho neutro, são utilizados para uma avaliação menos subjetiva da citotoxicidade (SMEE et al., 2001, 2002).

**Figura 6. Reação de redução do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] a formazan.**



Fonte: (MOSMANN, 1983).

### 2.3.5 Leishmaniose

A leishmaniose, também conhecida popularmente como Calazar, botão do oriente, ferida brava e úlcera de Bauru, é uma protozoose emergente e negligenciada que afeta mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e apresenta em média mais de 2 milhões de novos casos por ano (GIL et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2010).

A doença é causada por protozoários pertencentes ao reino Protista, ao sub-reino Protozoa, ao filo Sarcomastigophora, ao sub-filo Mastigophora, a classe Zoomastigophorea, a ordem Kinetoplastida, a sub-ordem Trypanosomatina, a família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, podendo pertencer a várias espécies, sendo esse número superior a trinta (BAIOCCO et al., 2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

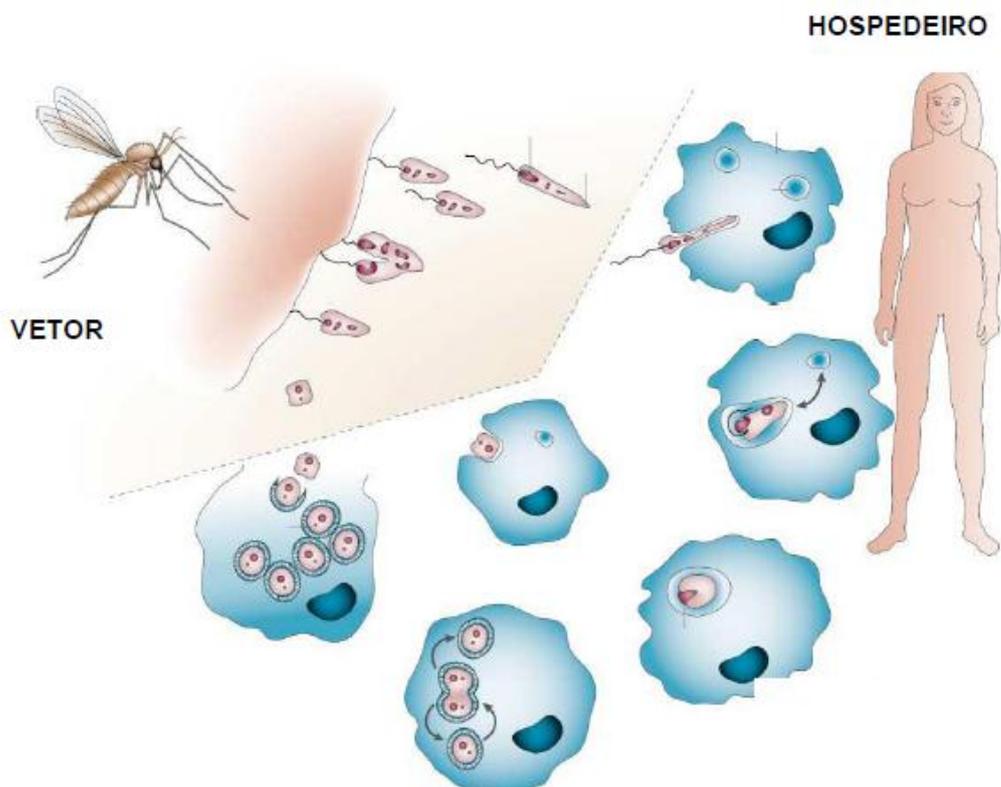
Esses parasitos possuem um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, tem dois hospedeiros: vertebrados e insetos vetores (dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no novo mundo, e *Phlebotomus* no velho mundo). Estes vetores são responsáveis

pela transmissão das leishmanias aos mamíferos, durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas (figura 6) (KILLICK-KENDRICK; RIOUX, 1991).

Nos hospedeiros vertebrados (de várias ordens e espécies – incluindo o homem), como exposto na figura 6, os parasitos estão sob a forma amastigota (forma arredondada e imóvel que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário dos mamíferos). À medida que os parasitos se multiplicam os macrófagos se rompem e essa lise libera amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos, proliferando a infecção (BAIOCCO et al., 2009; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Já nos flebotomíneos as leishmanias encontram-se na luz do trato digestivo, isso porque foram ingeridas durante o repasto sanguíneo sob a forma amastigota. Nesse ambiente as amastigotas se diferenciam em formas flageladas e móveis, conhecidas como promastigotas metacíclicas (formas infectantes), que posteriormente serão inoculadas na pele dos mamíferos durante o repasto sanguíneo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

**Figura 7. Ciclo de vida heteroxênico de *Leishmania*.**



Fonte: SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002.

A leishmaniose apresenta duas formas clínicas: leishmaniose visceral (LV) e tegumentar. Sendo a leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, a forma mais grave da doença

(GIL et al, 2007). A leishmaniose tegumentar no Novo Mundo é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA) (PEARSON, et al., 2000).

### 2.3.5.1 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, é caracterizada por apresentar febre irregular, perda de peso, anemia, podendo atingir o fígado, o baço e a medula óssea e dessa forma levar o paciente a óbito. As espécies responsáveis pelo desenvolvimento dessa forma clínica são: *L. donovani* e *L. infantum chagasi* (OMS, 2012).

Na América Latina a espécie responsável pelo desenvolvimento da LV é a *L. infantum chagasi*, parasito transmitido pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, um inseto bem adaptado ao ambiente peridoméstico e distribuído toda a América Latina, esse parasito tem o cão doméstico como principal reservatório animal (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Aproximadamente 90% dos casos de LV registado no Américas ocorrem no Brasil. De 1980 a 2005, o Brasil registrou 59.129 casos de LV, 82,5% do qual estava na região Nordeste. No entanto, mais recentemente, observou-se relatos de casos espalhados em todo o país. Por exemplo, em 1998, as regiões fora do Nordeste relatavam 15% de todos os casos, mas em 2005 esta proporção havia aumentado para 44% (HARHAY et al., 2011).

O diagnóstico dessa doença pode ser realizado por algumas técnicas, dentre elas a detecção do DNA de *Leishmania*, que possui dois objetivos: a detecção do agente etiológico e a identificação das espécies de *Leishmania*, o que não é conseguido por outros métodos. O PCR é utilizado para detectar o agente etiológico, sendo considerado um bom método para o diagnóstico. Algumas das vantagens desta técnica quando comparado com métodos parasitológicos são: a possibilidade de detecção do DNA da *Leishmania*, mesmo com uma baixa carga parasitária, especificidade, a disponibilidade rápida dos resultados, a possibilidade de utilização de diferentes materiais biológicos e a possibilidade de detectar o DNA de amastigotas e promastigotas (GOTO; LINDOSO, 2010).

Quando estas abordagens falharem, testes imunológicos deverão ser realizados para fornecer os parâmetros indiretos para o diagnóstico. Esses testes imunológicos são realizados através de algumas técnicas, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA. Esse último é o método mais utilizado, pois constitui uma técnica sensível, porém com

possibilidade de reações cruzadas especialmente com a doença de Chagas (RATH et al., 2003).

### **2.3.5.2 Leishmaniose tegumentar americana**

A leishmaniose tegumentar pode apresentar três formas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. A leishmaniose cutânea é conhecida pela presença de úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local do repasto sanguíneo (na maioria das vezes em braços, pernas e face). A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se pela presença de úlceras crônicas similares à forma cutânea, mas que tendem a reaparecer mesmo após a cicatrização, em mucosas do nariz e da boca, na maioria das vezes associadas a infecções secundárias levando a destruição de grandes extensões de tecido. A leishmaniose cutânea difusa é conhecida por formação de pápulas, principalmente na face (GIL et al., 2007; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Relatos e descrições literárias mostram que a LTA afeta o homem desde tempos antigos, o primeiro datado no século I d.C. (CAMARGO; BARCINSKI, 2003). Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-Colombianas datadas de 400-900 anos depois de Cristo que apresentavam mutilações nos lábios e narizes. Já no Brasil, o primeiro documento que reporta a doença é da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, que foi citado no livro de Tello, “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, que relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros, de Tabatinga (Amazonas) até o Peru, percorrendo o vale amazônico (PARAGUASSU-CHAVES, 2001).

A LTA no Brasil só foi confirmada pela primeira vez em 1909, por Adolpho Carlos Lindenberg, um médico dermatologista que encontrou formas de *Leishmania* idênticas as do velho Mundo em lesões cutâneas de trabalhadores do interior do Estado de São Paulo. No entanto, Gaspar de Oliveira Vianna, médico anatomopatologista, identificou características que diferiam o parasito da espécie encontrada no velho mundo e o nomeou como *L. braziliensis*, que é o agente etiológico da conhecida “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (BASANO; CAMARGO, 2004).

Até os anos setenta, a *L. braziliensis* era considerada o agente etiológico de todos os casos de leishmaniose tegumentar americana no país. Mas com o passar dos anos, outras espécies foram descobertas, e até o momento seis espécies estão descritas como sendo as atuais causadoras da leishmaniose tegumentar americana: *Leishmania* (*Leishmania*)

*amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* e *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*. Sabe-se que, 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru, e que 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2012; RATH et al., 2003).

Estudos mostram que a espécie *L. braziliensis* é a mais prevalente no homem, e pode causar lesões cutâneas e mucosas. Ela é encontrada em todas as zonas endêmicas do Brasil, estando associada à presença de animais domésticos. A *L. guyanensis* causa principalmente lesões cutâneas e é encontrada principalmente na margem norte do Rio Amazonas, estando associada a desdentados e marsupiais como reservatórios (GOTO; LINDOSO, 2010).

Já a *L. naiffi* ocorre nos estados do Pará e Amazonas e o tatu é o seu reservatório natural. Esta espécie é conhecida por causar a forma de evolução benigna da doença (uma forma inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma associação entre hospedeiro-parasita, que evolui para auto-cura. A espécie *L. shawi* é a causadora de casos esporádicos no Amazonas e Pará e tem como reservatórios vários animais silvestres. A *L. lainsoni* é encontrada apenas na região da Amazônia e tem a paca como reservatório natural (BARRAL et al., 1991).

A *L. amazonensis* é a causadora tanto de lesões cutâneas como também da leishmaniose cutânea difusa (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Foi observado que *L. amazonensis*, uma das espécies causadoras da forma tegumentar da doença, já foi encontrada em pacientes com a forma visceral (BARRAL et al., 1991). Além disso, *L. chagasi* foi relatada em manifestações cutâneas com ausência de envolvimento visceral (OLIVEIRA et al., 1986).

O diagnóstico da LTA é baseado em aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e diagnóstico imunológico). O diagnóstico clínico é feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, destacando-se a importância dos dados epidemiológicos. Essa doença produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato, pois as características clínicas são diversas e dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e de fatores relacionados ao hospedeiro, incluindo o estado imunológico. No entanto, a evolução da lesão inicial é semelhante no local do repasto sanguíneo. Após um período de incubação de 2 semanas a 3 meses, uma pequena pápula eritematosa pruriginosa ou nódulo aparece, às vezes precedida ou acompanhada de linfonodomegalia. Essa lesão inicial pode curar espontaneamente ou evoluir, desenvolvendo a doença propriamente dita, com diferentes características clínicas (MACHADO et al., 2002).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado, pois existem algumas morbidades que podem ser confundidas com as úlceras características da LTA, como por exemplo, úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, paracoccidioidomicose, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária e granuloma médio facial (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Em todos os casos de suspeita e confirmação clínica de LTA, é necessário ter o diagnóstico confirmado pelo achado do agente etiológico, a partir de uma amostra obtida da lesão, através do diagnóstico parasitológico. O diagnóstico pode ser conseguido através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta. A técnica mais simples e a primeira a ser realizada, é a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda, corado pelo Giemsa ou Leishman e visto em microscópio óptico. Além disso, ensaios de detecção de DNA e testes imunológicos também são realizados (AMATO, 2000).

### **2.3.5.3 Tratamento da leishmaniose**

O controle das leishmanioses está baseado tanto em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitos nas áreas peri-domiciliares, como também no tratamento dos pacientes infectados com os fármacos disponíveis no mercado farmacêutico. No entanto, o tratamento medicamentoso apresenta deficiências significativas, incluindo a toxicidade elevada, longos regimes terapêuticos, administração parenteral e custo elevado, o que limita a sua utilização e eficácia (MORAIS-TEIXEIRA, 2011; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Por esses motivos, muitos pacientes abandonam o tratamento, o que favorece ao aparecimento de cepas resistentes de *Leishmania* (AMATO et al., 2000).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes ainda são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, mesmo existindo muitas cepas resistentes. Dentre os antimoniais mais consumidos no mundo, destacam-se o Pentostan® (Glaxo Wellcome), o Solustibosan® (Bayer) e o Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) (GIL et al., 2007).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda é controverso e pouco compreendido, no entanto existem hipóteses sobre o seu mecanismo de ação, considerando o potencial de redução do Sb (V) em sistemas biológicos, o mecanismo de oxirredução é uma das hipóteses consideradas, sendo proposto a redução *in vivo* de complexos Sb (V) para compostos mais tóxicos de Sb(III). Destaca-se ainda o papel de grupos tiol, comuns em biomoléculas contendo cisteína, que tem sido implicado nesta conversão (CHAI, 2005). Além disso, Sb(III) tem demonstrado inibir a tripanotona redutase e a glutatona sintetase, pois a exposição a Sb(III) resulta também em efluxo rápido de tripanotona e de glutatona de amastigotas e promastigotas *in vitro*, substâncias essas importantes para a manutenção da amastigota dentro do macrófago (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004).

Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, a anfotericina B, a paramomicina e a miltefosina (RATH et al., 2003).

A descoberta da atividade terapêutica do grupo das diamidas, do qual a pentamidina faz parte, foi ao acaso. Ela é o fármaco de segunda escolha, mais comumente recomendado, embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira administração parenteral. Essa substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais pentavalentes (AMATO et al., 2000; RATH et al., 2003).

### **2.3.6 Avaliação da Capacidade Antioxidante**

Os antioxidantes nas últimas décadas vêm ganhando destaque no ramo científico devido a vários fatores benéficos causados nos organismos vivos. Diante disso, o interesse por grande parte dos pesquisadores no desenvolvimento de métodos que sejam capazes de determinar esses compostos também aumenta. Dessa maneira, atualmente existem diversos métodos para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos e enzimas a ensaios mais complexos (ALVES, et al., 2010).

Os métodos analíticos para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, estes, baseiam-se em dois princípios: princípio competitivo e não competitivo. Ensaios competitivos: a espécie alvo definida como uma biomolécula deve ser atacada simulando um

meio biológico, e os compostos antioxidantes competem pela espécie reativa (radical ou não radical). Para esse tipo de sistema, a avaliação da capacidade antioxidante é baseada na quantificação de um composto que permita a medição analítica baseada na alteração de alguma propriedade física, por exemplo: mudança de cor, definida como sonda analítica. Na maioria dos ensaios competitivos, a sonda é a espécie alvo, também pode ser um composto adicionado após a reação, que permite a quantificação das moléculas-alvo ou espécies reativas restantes. Ensaios não competitivos, os compostos antioxidantes interagem diretamente com as espécies reativas sem que haja uma espécie alvo concorrente, e a sonda analítica para monitorar a reação é a própria espécie reativa (MAGALHÃES, et al., 2008).

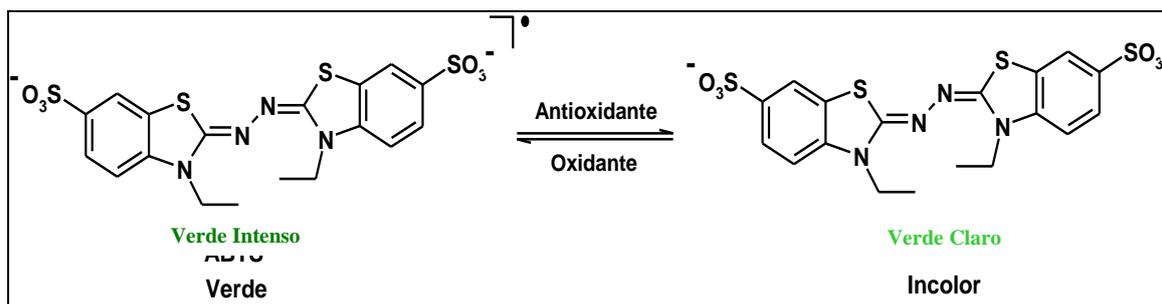
Em meio a tantas metodologias empregadas para a determinação da  $C_{AO}$  sabe-se que os mecanismos reacionais dos métodos em geral são baseados na transferência de elétrons (TE) e na transferência de átomos de hidrogênio (TAH), ou ainda, em alguns casos ocorrem as duas formas simultaneamente. A maioria dos ensaios baseados em TAH emprega a estratégia competitiva, diferentemente dos ensaios baseados em TE que normalmente são baseados na forma não competitiva (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Contudo, ainda não há um consenso quanto aos aspectos reacionais existentes para os principais métodos de medição da  $C_{AO}$ , pois a depender da condição reacional pode-se haver alterações dos mecanismos atuantes.

Diante disso, os principais métodos baseados preferencialmente na transferência de átomos de hidrogênio (TAH) podemos citar o sequestro dos radicais  $ABTS^{\bullet+}$  (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), já entre os métodos baseados preferencialmente na transferência de elétrons (TE) citamos o Folin-Ciocalteu (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

#### **2.3.6.1 Método do radical $ABTS^{\bullet+}$**

Neste ensaio, a capacidade antioxidante é medida pela redução do radical  $ABTS^{\bullet+}$  (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) de coloração verde intensa ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 734$  nm) a  $ABTS^{2-}$ . O aumento da concentração do antioxidante acarreta na diminuição da intensidade de coloração e a avaliação quantitativa se dá por espectrofotometria (MAGALHÃES, et al., 2009). Uma das limitações do método é que a geração do radical  $ABTS^{\bullet+}$  é muito demorada, no qual o radical é gerado em no mínimo 16 h. A figura 7, apresenta a reação genérica deste radical.

**Figura 8. Reação genérica - + forma oxidada e reduzida do ABTS.**



Fonte: adaptado HUANG; OU; PRIOR, 2005.

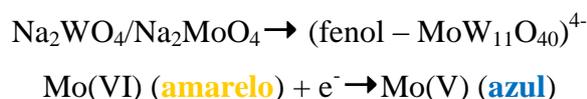
O método empregando o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é aplicável tanto a antioxidantes com caráter hidrossolúveis quanto a lipossolúveis. A inibição do radical frente a compostos com capacidade antioxidante é estabelecida em função da concentração remanescente do radical e do tempo de inibição do mesmo. A medição é relativa a concentrações conhecidas de substâncias determinadas como padrões ou referência (Trolox, BHT (Hidroxitolueno de Butila), Ácido Gálico) (referência) sob as mesmas condições da amostra avaliada. Os resultados do ensaio são expressos em equivalentes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) dos respectivos padrões utilizados (VASCONCELOS, et al., 2007).

### 2.3.6.2 Folin-Ciocalteu (FC)

O método de Folin-Ciocalteu (FC) é baseado na oxidação de compostos fenólicos presentes na amostra ou na solução de padrão. O reagente de FC é constituído principalmente por uma mistura de molibdato e tungstato de sódio. Quando os compostos fenólicos são oxidados, o reagente de FC, que apresenta coloração amarela, passa a ter coloração azul ( $\lambda_{\text{máx}} \cong 750 \text{ nm}$ ), dessa maneira, a concentração de fenólicos totais é mensurada por meio da espectrofotometria (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

A reação química envolvida no ensaio de FC ocorre por TE de compostos fenólicos ou por espécies que sejam doadoras de elétrons para o Mo(VI) em meio alcalino (5 a 10% (m/v) em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Esse tipo de meio provoca a desprotonação dos compostos fenólicos levando a formação do íon fenolato, redutor mais eficiente que a sua forma associada. Os íons fenolatos são aqueles que reagem com o Mo(VI) reduzindo-o a Mo(V). (ROGINSKY, LISSI, 2005).

Abaixo é exemplificada a reação do o método de Folin-Ciocalteau:



O método de FC é um dos ensaios mais antigos e bem elucidados dos que são encontrados na literatura e que tem como função determinar a concentração total de compostos fenólicos. Este ensaio é muito utilizado em análises de extratos de plantas como uma investigação inicial de funcionalidade fisiológica para posterior estímulo ao consumo, com o objetivo de prevenir determinados tipos de doenças (ANTOLOVICH, et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido um trabalho no sentido de ser estudar as propriedades químicas e farmacológicas de plantas do gênero *Aspidosperma*. Dentre as plantas estudadas, pode-se citar *A. macrocarpum*, sendo verificada a atividade anti-hipertensiva. Outra planta estudada foi *A. tomentosum*, sendo identificada a atividade anti-hipertensiva (FURTADO et al., 2008, 2010), antinociceptiva, anti-inflamatória e analgésica (AQUINO et al., 2008; EPIFANIO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Será continuado os estudos com *A. pyriformium*, onde, já foram identificadas as atividade inseticida (TRINDADE et al., 2008), antibacteriana (PESSINI et al., 2011) e hipotensora (ARAÚJO-JUNIOR. et al., 2011a) e isolados os alcaloides aspidofractinina, 15-desmetoxipirifolina e *N*-formilaspidofractinina, dentre os quais o último foi descrito pela primeira vez no gênero (ARAÚJO-JUNIOR. et al., 2007).

### **3 OBJETIVOS**

---

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento da composição química e do potencial biológico do gênero *Aspidosperma*, através do estudo químico, a da atividade leishmanicida e avaliação anti-oxidante da espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e classificar a estrutura química de alguns dos constituintes químicos presentes nos extratos e frações da planta;
- Avaliar a atividade leishmanicida com a composição química do extrato e fracionamento das folhas de *A. pyrifolium*;
- Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante do fracionamento fitoquímico.

## **4 METODOLOGIA**

---

---

## 4 METODOLOGIA

O estudo químico foi realizado no Laboratório de Química Medicinal (LQM), da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), cuja coordenação está a cargo do Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, com o apoio do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), cuja coordenação está a cargo do prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

### 4.1 Solventes, materiais e equipamentos

- Na preparação dos extratos foi utilizado erlenmeyer de vidro;
- Os solventes utilizados (acetato de etila, clorofórmio, etanol, hexano e metanol) foram de grau P. A. ou de grau comercial e destilados no próprio laboratório;
- Nas separações cromatográficas em coluna clássica utilizou-se sílica gel 60 (230-400 mesh, da Merck) ou Sephadex LH-20 (Pharmacia), em colunas de vidro de variados tamanhos;
- A sílica desativada foi obtida por adição de 10 mL de água a cada 100 g de sílica gel 60 e agitação por 30 minutos em rotavapor sem aplicação de vácuo e aquecimento;
- Nas separações cromatográficas sob média pressão utilizou-se o aparelho Flashsmart Evolution, A. I. T. France, com colunas tipo open top (empacotadas no laboratório) ou simply connect (empacotadas de fábrica);
- A concentração das soluções extrativas e frações contendo grandes volumes foi efetuada em evaporador rotativo (BÜCHI, Modelo R-210) e as de pequeno volume à temperatura ambiente, em capela de exaustão (Permutation);
- Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck;
- Os cromatogramas foram revelados através de irradiação com luz ultravioleta em comprimentos de onda 254 e 356 nm e revelação com solução ácida de sulfato cérico (SERRA et al., 1991);
- Nas solubilizações utilizou-se ultra-som da Branson (Modelo 1210);
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica (Modelo AX 200) e semi-analítica, das marcas Shimadzu e Bel, respectivamente;

## 4.2 Estudo Químico

### 4.2.1 Coleta e identificação do material botânico

O material vegetal foi coletado em 30/03/2013 na cidade de Sertânia (PE, Brasil) e a planta foi identificada por Rosângela Pereira de Lyra Lemos, foi depositada uma exsicata no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, registrada sob o código MAC 55381.

### 4.2.2 Preparação dos extratos brutos

A preparação de extratos a partir de materiais vegetais pode ocorrer de duas formas, inespecífica ou específica para determinadas classes de substâncias. Optou-se, pela via de extração inespecífica para identificação dos constituintes químicos do extrato.

Após desidratação em estufa a 45 °C obtivemos 2 kg de folhas, as quais foram trituradas e submetidas à extração por maceração com 6 L de Hexano a temperatura ambiente ( $27 \pm 1$  °C), em três ciclos de 72h cada, sendo a solução hexânica obtida concentrada sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C, fornecendo 56 g de extrato hexânico bruto das folhas de *A. pyrifolium* (APF-EH).

Após a obtenção do extrato hexânico bruto das folhas, realizou-se uma nova maceração, desta vez utilizando como solvente, 6 L de Metanol. A extração ocorreu da mesma forma, a temperatura ambiente ( $27 \pm 1$  °C), em três ciclos de 72h cada, sendo a solução metanólica obtida concentrada sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C, fornecendo 351,58 g de extrato metanólico bruto das folhas de *A. pyrifolium* (APF-EM).

### 4.2.3 Análise Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Matos (1997), com a finalidade de identificar as classes dos componentes presentes na espécie vegetal e possibilitar uma possível comparação com os dados presentes na literatura. Os testes qualitativos e semi-quantitativos realizados abrangeram ensaios para antocianinas, antocianidinas, flavanóides, leucoantocianidinas, catequina, flavanonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenos, saponinas, alcaloides, antraquinonas, antronas,

cumarinas, fenóis e taninos. Para a realização dos testes foram retirados 30 mg dos extratos e solubilizados em 30 mL de etanol, colocados em tubos de ensaio e numerados.

#### 4.2.3.1 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides

Os extratos brutos foram avaliados quanto a presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides. Preparou-se três tubos de ensaio para cada amostra. O pH do tubo 1 foi ajustado para 3 com HCl 3 M. Os tubos 2 e 3 foram alcalinizados a pH 8,5 e pH 11 com NaOH 1 M. As mudanças na coloração observadas foram interpretadas segundo o quadro 2 (MATOS, 1997).

**Quadro 2. Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas e auronas, flavanonóis.**

Constituintes	Coloração observada		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho laranja

Fonte: MATOS, 1997.

#### 4.2.3.2 Teste para Leucocianidinas, Catequinas, Flavanonas

Dois tubos foram numerados. O pH do primeiro foi ajustado para pH 2 pela adição de HCl 1 M e o segundo tubo alcalinizado com NaOH 1 M até pH 11. Os tubos foram aquecidos por 3 minutos. As mudanças de coloração observadas foram interpretadas segundo o quadro 3 (MATOS, 1997).

**Quadro 3. Colorações indicativas para a presença de leucoantocianidinas, catequinas, e flavanonas.**

Constituintes	Coloração observada	
	pH 2	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas	Pardo-amarelada	-
Flavanonas	-	Vermelho alaranjado

Fonte: MATOS, 1997.

#### 4.2.3.3 Teste para flavonóis, flavanonóis e xantonas

Adicionou-se magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado a um tubo contendo a amostra. Aguardou-se o fim da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se a mudança de coloração da mistura reacional. O aparecimento ou a intensificação de cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou na forma de heterosídeos (MATOS, 1997).

#### 4.2.3.4 Teste para esteroides e triterpenos (Lieberman-Burchard)

Uma alíquota do extrato foi diluída em 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  e filtrada em funil coberto com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para a retirada da água residual. Ao tubo de ensaio contendo esta solução foi adicionado 1 mL de anidrido acético e, depois de agitação branda, adicionou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Depois de uma nova agitação observamos a mudança de coloração. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres. Coloração de parda até vermelha indica triterpenos pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

#### 4.2.3.5 Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior foi separado, dissolvido em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. O tubo foi vigorosamente agitado e

foi observado se ocorreu a formação de espuma. Aparecimento de espuma persistente e abundante é indicativo da presença de saponinas (MATOS, 1997).

#### **4.2.3.6 Teste para alcaloides**

Para avaliação da presença de alcaloides os extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada, usando clorofórmio como eluente 2 mL. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcaloides. Foi também utilizado, para confirmação, uma pequena alíquota da amostra a ser analisada, foi solubilizada em 3 gotas de uma solução de HCl 0,1 M, após a solubilização, foram adicionadas 3 gotas do reagente de Dragendorff. A formação de precipitado na cor alaranjada é indicativo de alcaloides (MATOS, 1997).

#### **4.2.3.7 Teste para Antraquinonas, antronas e cumarinas**

Os testes para antraquinonas e cumarinas foram realizados em placas de cromatografia em camada delgada. Os extratos foram solubilizados em metanol, aplicados na placa e eluídos com mistura de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1). Após eluição, borrifou-se KOH 10%, esperou-se secar e observou-se a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm. O surgimento de coloração azul é indicativo de cumarina, vermelho de antraquinona, e amarelo de antrona (MATOS, 1997).

#### **4.2.3.8 Teste para fenóis e taninos**

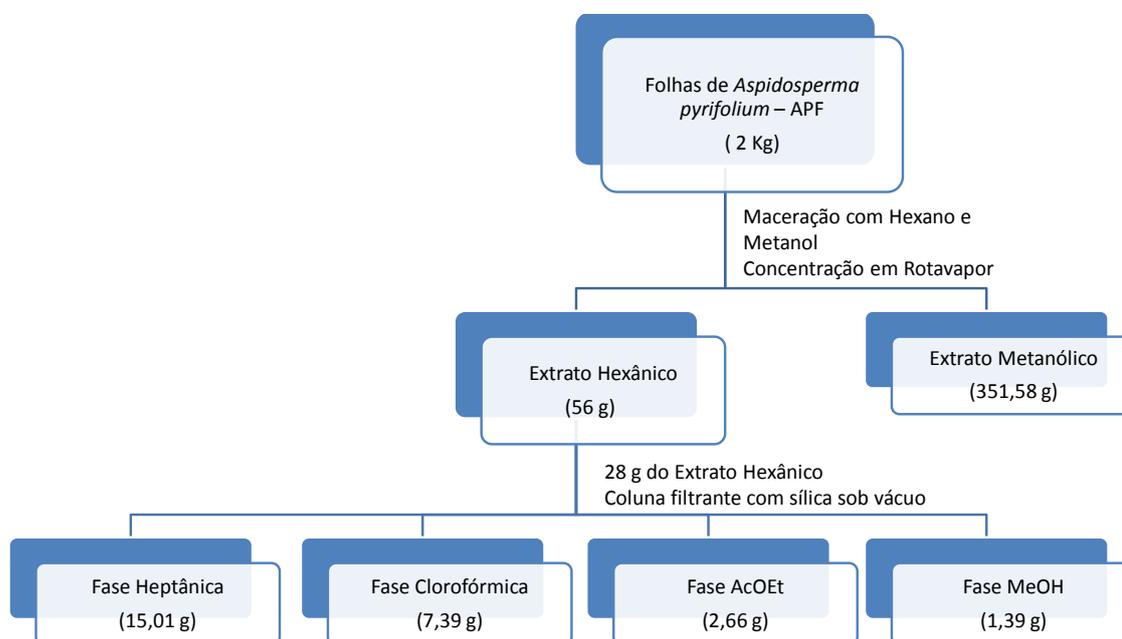
Um tubo contendo 3 mL da solução extrativa adicionou-se três gotas de uma solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$ . Após agitação, foi observado se houve variação de cor ou formação de precipitado. Coloração variável entre azul e vermelho indica a presença de fenóis. A formação de precipitado azul escuro indica a presença de taninos hidrolisáveis e de precipitado verde, a presença de taninos condensados (MATOS, 1997).

#### **4.2.4 Fracionamento do extrato hexânico bruto de *A. pyrifolium*.**

Uma alíquota de 28 g do APF-EH foi particionada em coluna filtrante sob vácuo, utilizando como fase estacionária, sílica gel e como fase móvel, heptano, clorofórmio

(CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A filtração foi realizada utilizando-se os solventes puros, até que toda a coloração desaparecesse em todas as soluções e da coluna respectivamente. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, resultando em 4 fases: fase heptânica (15,01 g), fase clorofórmica (7,39 g), fase AcOEt (2,66 g) e fase metanólica (1,39 g), como apresentado no Esquema 1.

**Esquema 1. Fracionamento cromatográfico dos extratos brutos de *A. pyrifolium*.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após este processo, obtivemos 37 frações do extrato hexânico de APF, que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas em evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança de seus Fatores de Retenção (Rfs). Como mostra o quadro 4, abaixo.

**Quadro 4. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de APF.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Heptano	100	1 - 8	1-2, 6-8
Clorofórmio	100	9 - 15	9-10, 11-15
AcOEt	100	16 - 17	16-17
MeOH	100	18 - 19	18 - 19

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

#### 4.2.4.1 Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato hexânico de APF.

Uma alíquota de 5 g da fase clorofórmica do extrato hexânico de APF, foi cromatografada em coluna clássica (CC<sub>1</sub>), utilizando como fase estacionária, 280 g de sílica gel 60 da Merck e como eluentes, heptano, acetato de etila e metanol, puro e em mistura binária, obedecendo a um sistema gradiente crescente de polaridade.

Neste processo, obteve-se um total de 34 frações, que foram coletadas a cada 125 mL e concentradas no evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs), como observado no quadro e esquema abaixo.

**Quadro 5. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato hexânico de APF. (\*) = precipitados obtidos nas frações.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Heptano	100	1 - 2	1-2
Heptano:AcOEt	5	3	3
Heptano:AcOEt	10	4 - 5	4, 5
Heptano:AcOEt	20	6 - 10	
Heptano:AcOEt	30	11 - 19	11-15, 12*, 13*
Heptano:AcOEt	50	20 - 24	22-34
AcOEt	100	25 - 28	
AcOEt:MeOH	30	29 - 31	
MeOH	100	32 - 34	

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Obtivemos, dois precipitados, o qual, a fração de número 12, foi submetida a uma lavagem com heptano refrigerado a 5° C, que resultou em mais duas frações. Estas frações foram identificadas como Precipitado e o Sobrenadante.

Do precipitado obtido na lavagem com Heptano, foi submetido a uma cromatografia líquida de média pressão (MPLC<sub>1</sub>), 354 mg, coluna simply connect, 15 mL/min, 12 g de sílica, utilizando sistema isocrático de Hexano:AcOEt 10%.

Neste processo, obteve-se um total de 40 frações, que foram coletadas a cada 10 mL e concentradas no evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs).

**Quadro 6. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (MPLC<sub>1</sub>) do extrato hexânico de APF.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Hexano:AcOEt	10	1 - 40	1-7, 12-14, 16-18

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após reunião das frações e análise da CCD, a fração de número 10, obtida do MPLC<sub>1</sub>, foi submetida a uma cromatografia líquida de média pressão (MPLC<sub>2</sub>), 210 mg, coluna simply connect, 15 mL/min - 12 g de sílica, utilizando sistema isocrático de Hexano: AcOEt 15%.

Neste processo, obteve-se um total de 24 frações, que foram coletadas a cada 10 mL e concentradas no evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs).

**Quadro 7. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (MPLC<sub>2</sub>) do extrato hexânico de APF.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Hexano:AcOEt	15	1 - 24	1-3, 5-6, 7-9, 10-12

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após a reunião das frações, a fração 5,6, teve um melhor rendimento de 44,06 mg e um bom aspecto na CCD, apresentando apenas uma mancha, foi denominada de FC 5,6.

Ainda com relação a essa fase, foram reunidas as frações de número 11 à 15 e estas foram cromatografadas em coluna clássica (CC<sub>2</sub>) 2,07 g, utilizando como fase estacionária, 63 g de sílica gel 60 da Merck e como eluentes, heptano e acetato de etila, puros e em mistura, obedecendo a um sistema gradiente crescente de polaridade.

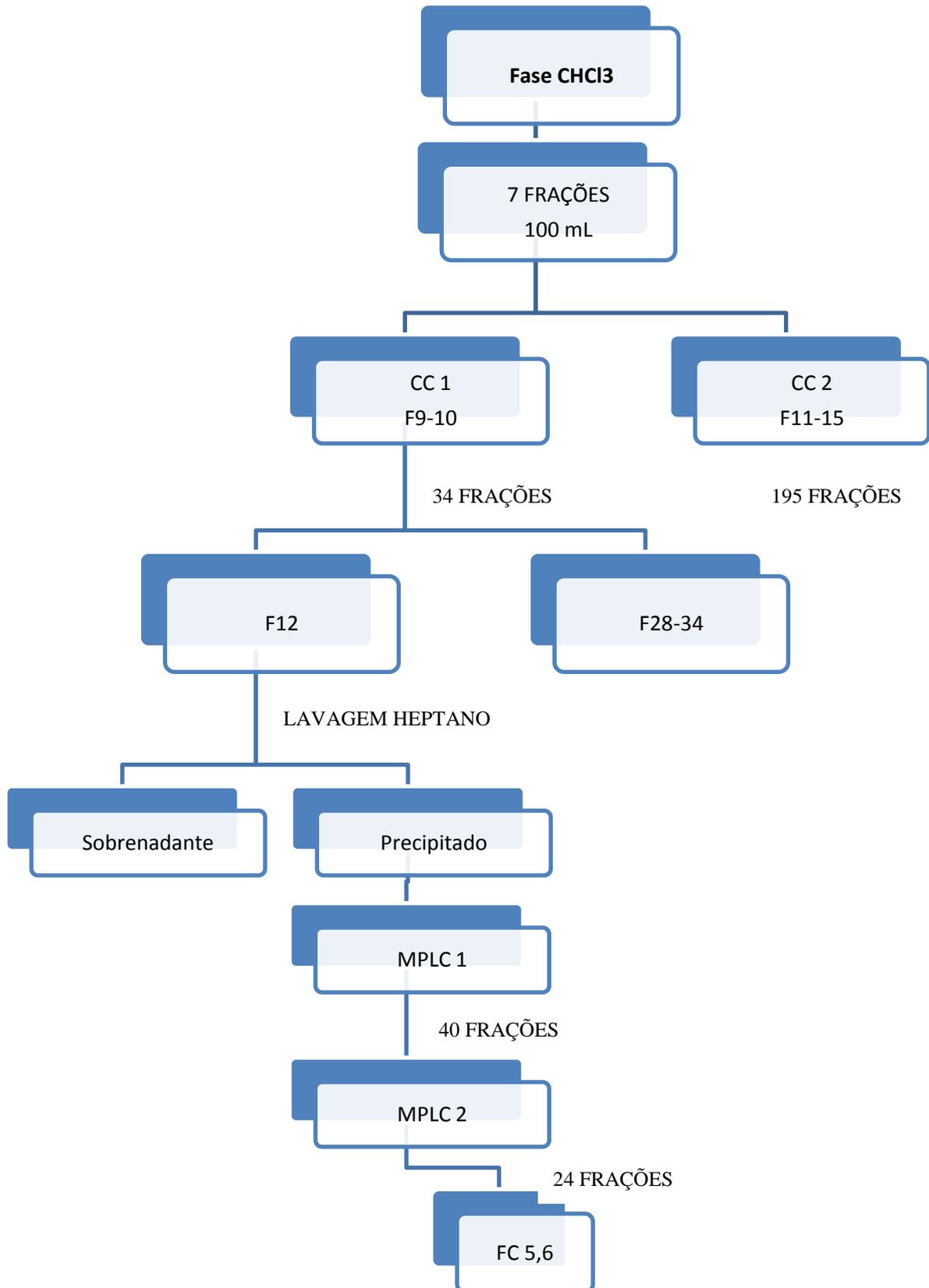
Neste processo, obteve-se um total de 195 frações, que foram coletadas a cada 25 mL e concentradas no evaporador rotativo. As frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rfs), como observado no quadro e esquema abaixo.

**Quadro 8. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica (CC<sub>2</sub>) do extrato hexânico de APF.**

<b>Eluentes</b>	<b>Proporção</b>	<b>Frações obtidas</b>	<b>Frações reunidas</b>
Heptano	100	1 - 11	1-28
Heptano:AcOEt	10	12 - 20	
Heptano:AcOEt	20	21- 31	
Heptano:AcOEt	30	32 - 95	50-58, 63-83
Heptano:AcOEt	50	96 - 153	90-96, 140-153
Heptano:AcOEt	70	154 - 173	163-173
AcOEt	100	173 - 195	175 - 195

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Esquema 2. Fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *A. pyrifolium*.



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

#### 4.2.4.2 Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico.

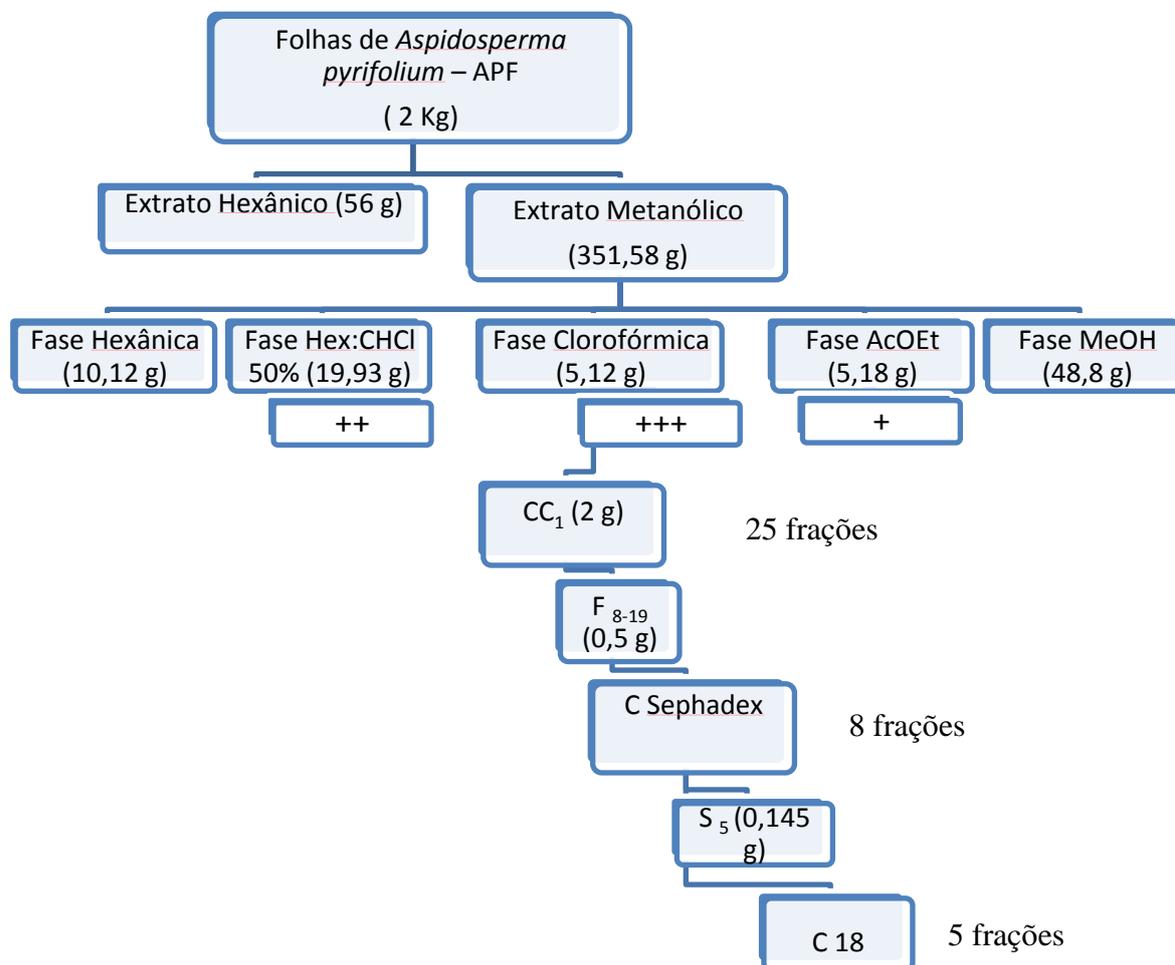
Após o fracionamento do extrato hexânico, seguiu-se o fracionamento do extrato metanólico. Uma alíquota de 150 g do APF-MEOH foi particionada em coluna filtrante sob vácuo, utilizando como fase estacionária, sílica gel e como fase móvel, hexano, hexano:clorofórmio (1:1), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A filtração foi realizada utilizando-se os solventes puros, até que toda a coloração desaparecesse em todas as soluções e da coluna respectivamente. As soluções obtidas foram coletadas a cada 125 mL e foram concentradas em evaporador rotativo, resultando em 5 fases: fase hexânica (10,12 g), fase hexano:clorofórmio (19,93 g), fase clorofórmica (5,12 g) fase AcOEt (5,18 g) e fase metanólica (48,8 g), como ilustrado no quadro e Esquema 3. Com reagente Dragendorff, seletivo para identificação de alcaloides, foi possível encontrar a presença de alcaloides nas fases hexano:clorofórmio, clorofórmica e acetato de etila, observando a formação de precipitados ao solubilizar em solução ácida de 0,1 M HCl e adicionar algumas gotas do reagente Dragendorff.

**Quadro 9. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de APF.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
Heptano	100	1 - 8	1-2, 6-8
Clorofórmio	100	9 - 15	9-10, 11-15
AcOEt	100	16 - 17	16-17
MeOH	100	18 - 19	18 - 19

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

**Esquema 3. Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de *A. pyriformium*.**



(+) indicam a presença de alcaloides observados de acordo com a intensidade de formação de precipitados.

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após este processo, seguimos o fracionamento com a fase clorofórmica, devido seu aspecto na placa CCD, que aparentava estar com os compostos majoritários. Logo, pesou-se 2 g desta fase e foi cromatografada em coluna clássica (CC<sub>1</sub>), utilizando como fase estacionária, 250 g de sílica gel 60 da Merck e como eluentes, clorofórmio e metanol em mistura binária, obedecendo a um sistema gradiente crescente de polaridade (Quadro 10). Foram obtidos 25 frações, que foram coletadas a cada 100 mL e concentradas no evaporador rotativo. As

frações foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com a semelhança dos seus Fatores de Retenção (Rf), como observado no quadro abaixo.

**Quadro 10. Eluentes utilizados e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica do extrato metanólico de APF. (\*) = precipitados obtidos nas frações.**

Eluentes	Proporção	Frações obtidas	Frações reunidas
CHCl <sub>3</sub>	100	1 - 5	6-7, 8-19, 20-25
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	99:1	6	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	98:2	7 - 10	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	97:3	11 - 13	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	96:4	14 - 16	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	95:5	17 - 18	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	90:10	19 - 21	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	80:20	22 - 24	
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	70:30	25	

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após esse processo, realizou-se placas CCD utilizamos 0,5 g da fração F<sub>8-19</sub> e realizamos uma nova coluna como fase estacionária utilizamos Sephadex LH-20 e como eluente 100% de metanol. Obtivemos 8 frações que foram coletadas a cada 40 mL. Após observamos as placas CCD destas frações obtidas, escolheu-se a fração S<sub>5</sub> uma quantidade de 0,145 g foi submetida a uma pequena coluna de fase reversa de 10 cm, utilizando como eluente 100% de metanol, obtivemos 5 frações, de baixos rendimentos.

#### **4.4 Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.**

Os ensaios realizados foram desenvolvidos no LINQA (Laboratório de instrumentação e desenvolvimento em Química Analítica), no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), cuja coordenação está a cargo do Prof. Josué Carinhanha Caldas Santos, com auxílio do aluno de mestrado Allysson Roberto Barbosa de Lima, na Universidade Federal de Alagoas.

##### **4.4.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>**

Para realização do método empregando o radical ABTS<sup>•+</sup>, em um tubo falcon de 10 mL adicionou-se 220 µL da solução estoque do radical ABTS<sup>•+</sup> (2 mmol L<sup>-1</sup>), 1,0 mL da solução padrão ou da amostra previamente diluída e aferiu-se com água até 5,0 mL, aguardou-se 15 min após a mistura dos reagentes e procedeu-se a medida espectrofotométrica em 734 nm empregando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal de referência foi obtido a partir de uma solução semelhante a anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água. Para construção da curva analítica ácido gálico, Trolox e BHT foram empregados como referências e, a partir dos dados das curvas, a capacidade antioxidante da amostra foi estimada, tendo seus resultados expressos em equivalentes (mg g<sup>-1</sup>) respectivos dos padrões.

##### **4.4.2 Método de Folin-Ciocalteu**

Num balão volumétrico de 5,0 mL foram inseridos, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:9, v/v), 2,0 mL da amostra ou solução de referência e 500 µL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g L<sup>-1</sup>). O volume final de 5,0 mL foi completado com água ultra pura, após 30 min procederam-se as medidas espectrofotométricas em 770 nm utilizando cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. O sinal analítico de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, onde o mesmo volume de amostra foi substituído por água, ácido gálico, Trolox e BHT foram empregados como referências e, a partir dos dados das curvas, a concentração dos compostos fenólicos totais da amostra foi estimada, tendo seus resultados expressos em equivalentes (mg g<sup>-1</sup>) respectivos dos padrões.

#### 4.4.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas, a partir de 30 mg de cada extrato bruto ou fração correspondente do fracionamento fitoquímico solúveis em DMSO. Essas amostras foram solubilizadas em 4 mL de DMSO e diluídas para a obtenção de uma solução estoque de 3000 mg/L<sup>-1</sup>.

As amostras utilizadas foram os extratos brutos (hexânico e metanólico) de *A. pyrifolium* codificados como: APFEBH e APFEBM, respectivamente. Seguidos das frações obtidas na coluna filtrante com os solventes: Hexano, Acetato, Clorofórmio, Metanol, puros e em mistura. As frações hexânicas foram codificadas como: APFH, seguidas com a inicial da fase do respectivo solvente utilizado. Assim sendo, APFHH (fase hexânica), APFHAC (fase acetato de etila), APFHC (fase clorofórmica) e APFHM (fase metanólica), para obtidos do extrato bruto hexânico. Já as frações metanólicas foram codificadas como: APFMH (fase hexânica), APFMH:C (fase hexano:clorofórmio 1:1), APFMAC (fase acetato de etila), APFMC (fase clorofórmica) e APFMM (fase metanólica).

#### 4.4.4 Tratamento estatístico dos dados

Para otimização de alguns parâmetros analíticos foi empregado como critério à sensibilidade a partir do valor de coeficiente angular das respectivas curvas analíticas. A curva analítica avaliada foi construída com no mínimo cinco pontos de acordo com a relação:  $\%I_A = aC_{AO} + b$ , sendo  $\%I_A$  o percentual de inibição,  $C_{AO}$  a concentração do composto antioxidante,  $a$  o coeficiente angular e  $b$  o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear.

A inibição do sinal analítico ( $\%I$ ) pela presença de substâncias antioxidantes frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> foi calculada a partir da equação:  $\%I = (1 - A_{amostra}/A_{branco}) \times 100$ , onde  $A_{amostra}$  corresponde a absorvância após a adição da amostra a solução contendo o radical e  $A_{branco}$  a absorvância relativa ao branco analítico (FOGLIANO, et al., 1999).

Os valores obtidos pelos extratos e frações foram convertida em equivalentes de Ácido Gálico (AG), Trolox e BHT pela aplicação da equação das curvas analíticas.

### **4.3 Ensaios Farmacológicos**

Os ensaios farmacológicos foram realizados no LaFi (Laboratório de Farmacologia e Imunidade, no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) cuja coordenação está a cargo da Professora Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, com auxílio da aluna de mestrado Mariana da Silva Santos, na Universidade Federal de Alagoas.

#### **4.3.1 Manutenção de linhagem macrófagos**

Macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em garrafas de cultura em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e 1 mL dessa suspensão será distribuída em poços de placa de 24 poços. Os macrófagos serão infectados com formas promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa será incubada por 4 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas de infecção, os macrófagos foram “lavados” com RPMI sem soro, para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato e 2 mM de aminoácidos não-essenciais (Sigma), e foram mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias.

#### **4.3.2 Ensaio de citotoxicidade**

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados e, posteriormente, foram acrescentadas as diferentes concentrações dos compostos a serem testados. Nos poços controles foram cultivadas células somente com meio de cultura (Sigma) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT após 48 horas de incubação (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

### 4.3.3 Ensaio de toxicidade sobre formas promastigotas

Foram adicionadas plaquetas  $1 \times 10^6$  de promastigotas de *leishmania amazonensis* em placas de 96 poços com meio RPMI suplementado com urina. Nos poços foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de promastigotas suspensas no RPMI com 50  $\mu\text{L}$  das substâncias teste já nas concentrações que iriam ser testadas. As placas foram incubadas em estufa BOD por 48 horas. Logo após esse período, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração 5 mg/mL e as placas foram levadas para estufa 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e aguardou-se 2 horas. Após esse período, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de isopropanol e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por uma hora e em seguida realizada a medida em leitor de microplaca a 550 nm. (DUTTA et al.,2005).

### 4.3.4 Análise estatística

Os dados obtidos serão representados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm \text{EPM}$ ) e serão analisados estatisticamente por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett com nível de significância de  $p < 0,05$ .



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Fitoquímica

A partir dos extratos brutos de *A. pirifolium*, hexânico e metanólico, realizou-se uma análise fitoquímica preliminar a fim de avaliar, de forma qualitativa, as classes de metabólitos secundários presentes na espécie. As tabelas 2 e 3 abaixo apresentam os resultados obtidos na prospecção fitoquímica.

**Tabela 2. Prospecção fitoquímica do extrato hexânico de APF.**

Teste	Resultado encontrado
Antocioninas	- Negativo
Antocianidinas	- Negativo
Flavonoides	- Negativo
Leucoantocianidinas	- Negativo
Catequinas	- Negativo
Flavononas	- Negativo
Flavonóis	- Negativo
Xantonas	- Negativo
Esteróides e Triterpenos	+ <b>Triterpenos livres (coloração parda) e Esteróide (verde intenso)</b>
Saponinas	- Negativo
Alcaloides	- Negativo
Antraquinonas e Antronas	- Negativo
Cumarinas	- Negativo
Fenóis e Taninos	- Negativo

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Estas análises fitoquímicas preliminares tiveram como objetivo o estabelecimento de quais metabólitos secundários estão presentes na espécie vegetal intermediária, usando para essa identificação as reações específicas.

Os resultados obtidos através desta abordagem para o extrato hexânico das folhas de APF, demonstram a presença de possíveis triterpenos, uma vez que houve a mudança de coloração específica. Dentre o gênero, alguns autores já descreveram a presença de triterpenos, como o trabalho de Barbosa em 2010 a partir de extratos das folhas e cascas da espécie *A. illustre* (BARBOSA, et al., 2010) e o Pereira em 2006, em estudo da espécie *A. nitidum*, extrato do caule (PEREIRA et al., 2006).

**Tabela 3. Prospecção fitoquímica do extrato metanólico de APF.**

<b>Teste</b>	<b>Resultado encontrado</b>
Antocioninas	- Negativo
Antocianidinas	- Negativo
Flavonoides	- Negativo
Leucoantocianidinas	- Negativo
Catequinas	- Negativo
Flavononas	- Negativo
Flavonóis	- Negativo
Xantonas	- Negativo
Esteróides e Triterpenos	<b>+ Esteroides livres (verde permanente)</b>
Saponinas	- Negativo
Alcaloides	<b>+ Positivo</b>
Antraquinonas e Antronas	<b>+ Antronas (amarelo intenso), levemente laranja, possível positivo para antraquinona</b>
Cumarinas	- Negativo
Fenóis e Taninos	- Negativo

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Com relação a análise fitoquímica do extrato metanólico de APF, observamos a presença de alguns outros constituintes químicos. A presença de alcaloides, corrobora com outros dados existentes na literatura, tanto para o gênero *Aspidosperma* de uma forma geral quanto para, a espécie estudada, pois já foi identificado alguns alcaloides monoterpinoindólicos isolados da casca do caule de *A. pyriforme* (ARAÚJO-JUNIOR, et al., 2007). Assim como outros trabalhos já descritos (GILBERT et al., 1965), (WALSER; DJERASSI, 1962), entre outros.

## 5.2 Caracterização química do fracionamento cromatográfico

O estudo fitoquímico efetuado com as folhas de *A. pirifolium*, extratos brutos e frações, apresentaram resultados promissores nos ensaios de atividade biológica e capacidade anti-oxidante, esse estudo resultou no isolamento de duas substâncias, que foram codificadas de acordo com o nome da espécie [*A. pirifolium* (AP)], parte da planta (F = folhas) e a fração correspondente do solvente que foi obtido (H = hexano, H:C = hexano:clorofórmio, C = clorofórmio, A = acetato, M = metanol).

Os dois compostos isolados tiveram suas estruturas identificadas com base na análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), pelos dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo os experimentos DEPT 135 e DEPT 90, bem como comparação dos dados dos compostos correspondente descrito na literatura.

A substância codificada como APFHF<sub>2</sub>, foi isolada na forma de um pó, amarelado, solúvel em clorofórmio, com rendimento de 2,04% em relação ao extrato hexânico bruto utilizado (56g).

Para o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) apresentou sinais condizentes com 5 metilas em 0,73; 0,77; 0,88; 0,90; 0,97. Juntamente com dois singletos mais largos compreendidos na região entre 4 e 5 ppm, com os respectivos deslocamentos químicos em  $\delta$  4,51 ppm e  $\delta$  4,62 ppm referentes aos hidrogênios metilênicos, reforçando a presença de um grupo isoprenil na molécula (DAVID et al, 2007). Além destes sinais, comparando-se com dados da literatura, reforçamos a presença de um hidrogênio em  $\delta$  5,06 ppm, característico de triterpenóides  $3\beta\text{-OH}$  (COSTA et al., 2010).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observou-se a presença de sinais referentes a estrutura de um esqueleto triterpênico, mais precisamente, com os sinais em  $\delta$  109,60 e  $\delta$  150,77, juntamente com o sinal em 19,40 ppm, sugerem a presença de um grupo isoprenil, típico de triterpenos da série lupano (DAVID et al, 2007; COSTA et al., 2010). Juntamente com o DEPT 135 e 90, obtivemos a confirmação do esqueleto proposto (figuras 9, 10, 11, 12 e 13).

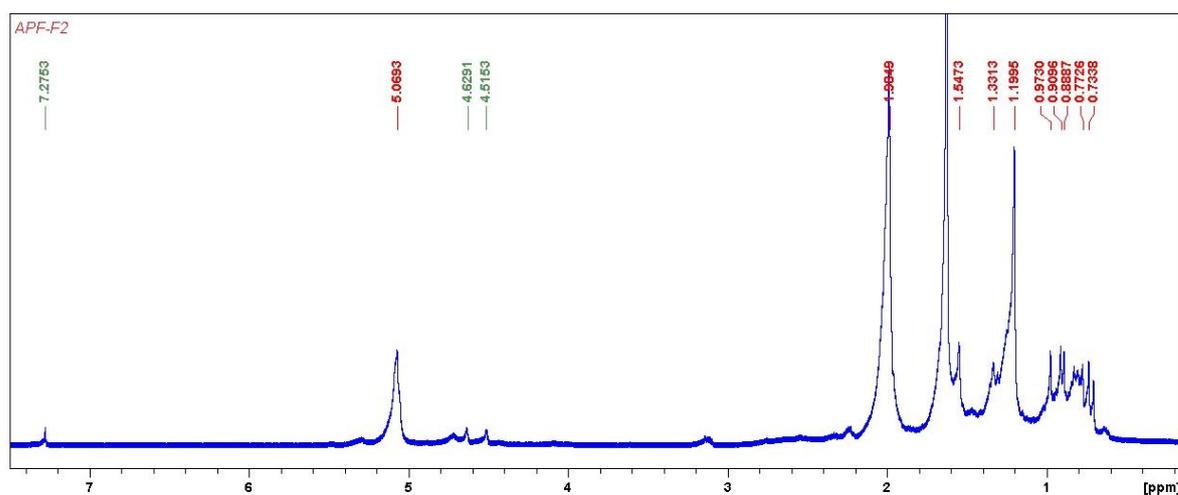
**Tabela 4. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de APFHF<sub>2</sub> em CDCl<sub>3</sub>, comparados com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura ( $\delta$  em ppm).**

	APFHF <sub>2</sub>	Ácido Betulínico
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>		
<b>4</b>	38,68	38,8
<b>8</b>	40,71	40,7
<b>10</b>	37,15	37,2
<b>14</b>	42,75	42,4
<b>17</b>	56,25	56,3
<b>20</b>	150,62	150,3
<b>28</b>	180,0	180,5
<b>CH</b>		
<b>3</b>	78,71	78,9
<b>5</b>	55,25	55,3
<b>9</b>	50,36	50,5
<b>13</b>	38,68	38,4
<b>18</b>	47,92	46,8
<b>19</b>	50,12	49,2
<b>CH<sub>2</sub></b>		
<b>1</b>	38,68	38,7
<b>2</b>	27,32	27,4
<b>6</b>	18,97	18,3
<b>7</b>	34,22	34,3
<b>11</b>	20,86	20,8
<b>12</b>	25,68	25,5
<b>15</b>	31,00	30,5
<b>16</b>	32,14	32,1
<b>21</b>	29,77	29,7
<b>22</b>	37,09	37,0
<b>29</b>	109,30	109,6
<b>CH<sub>3</sub></b>		
<b>23</b>	28,22	27,9
<b>24</b>	15,50	15,3
<b>25</b>	16,08	16,0

26	17,05	16,1
27	14,11	14,7
30	19,26	19,4

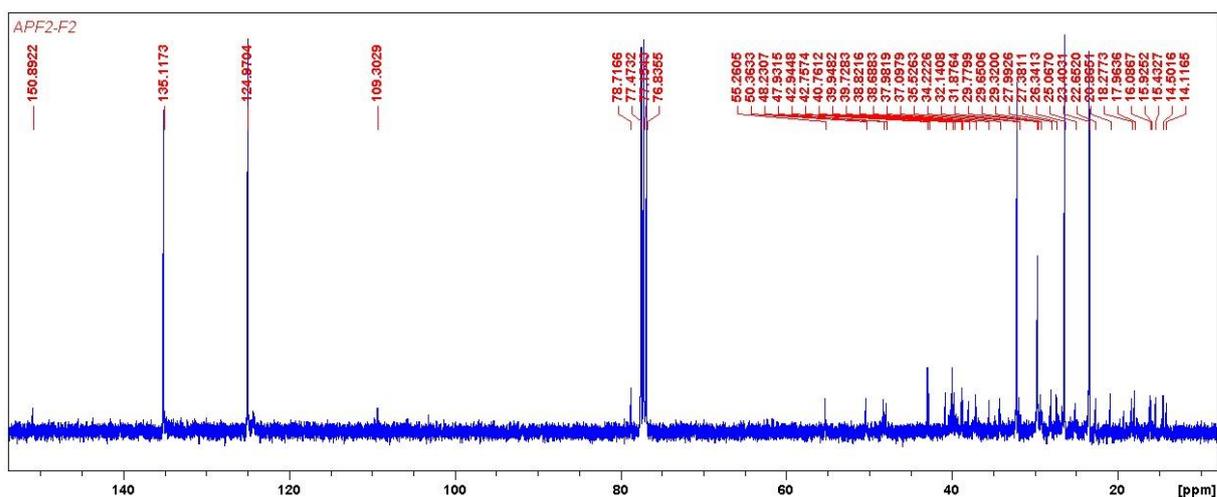
Fonte: MAHATO & KUNDU, 1994.

**Figura 9.** Espectro de  $^1\text{H}$  [ $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz] de  $\text{APFHF}_2$ .



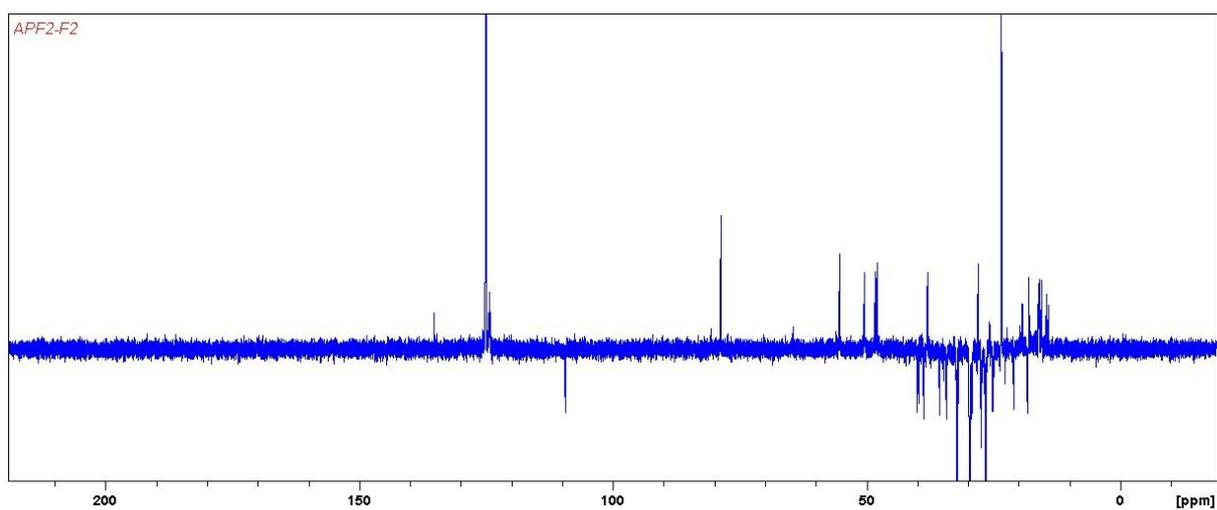
Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

**Figura 10.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN [ $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz] de  $\text{APFHF}_2$ .



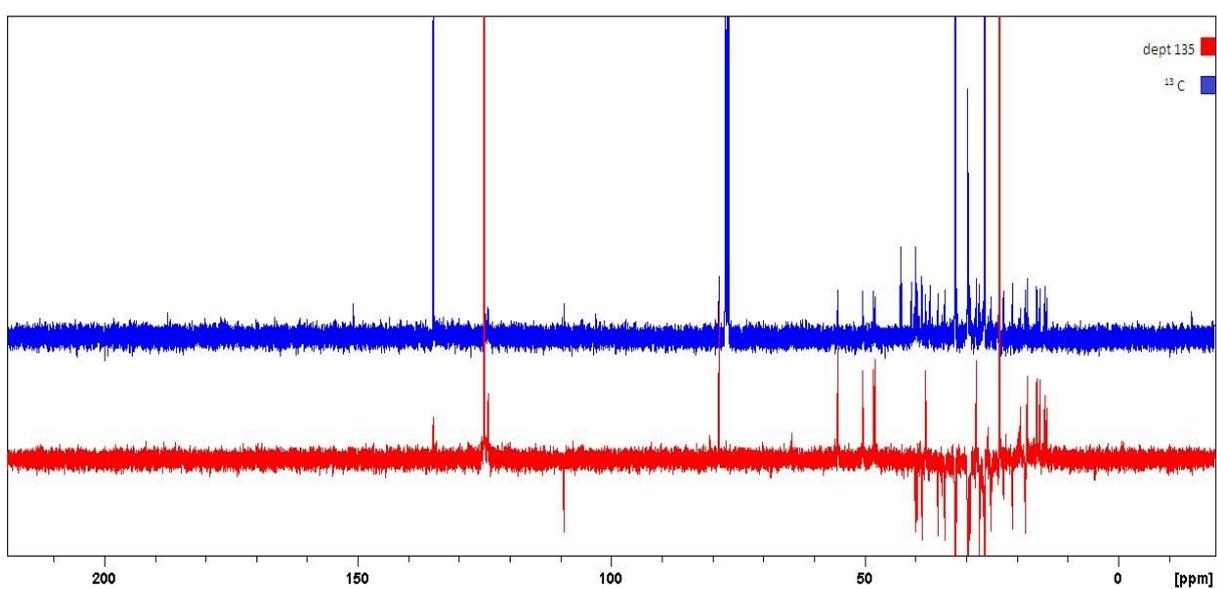
Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

**Figura 11. Espectro de DEPT-135 APFHF<sub>2</sub>.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

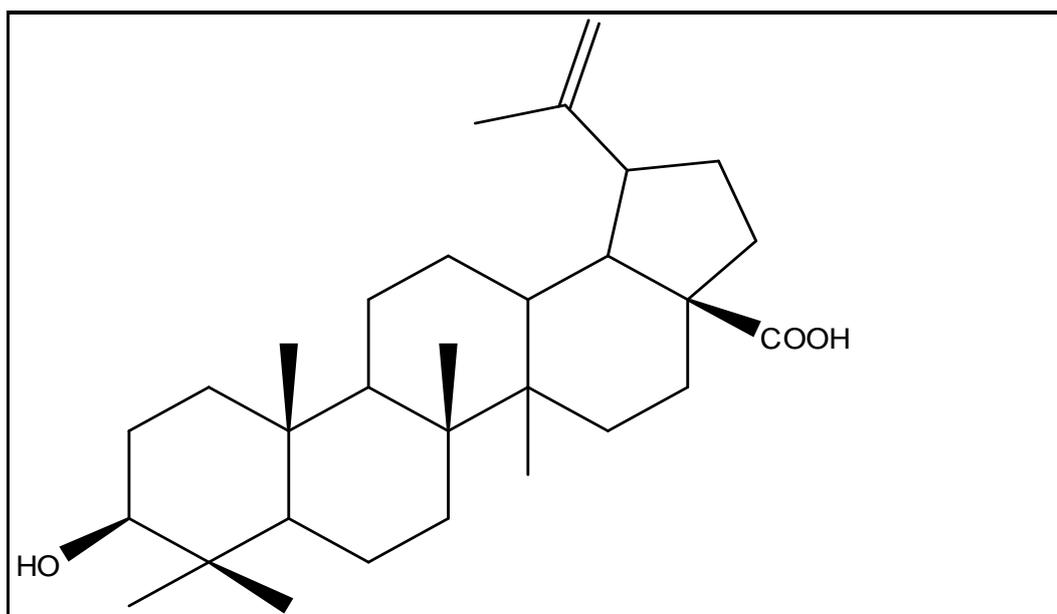
**Figura 12. Espectros de <sup>13</sup>C RMN [δ (ppm), CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz em azul e DEPT-135 em vermelho. de APFHF<sub>2</sub>.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Após analisar esses dados, e assinalar os carbonos, com os da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994), na tabela 4, pode-se definir que o esqueleto da espécie isolada trata-se de um composto usualmente denominado de Ácido Betulínico, este descrito pela primeira vez na espécie.

**Figura 13. Estrutura química do Ácido Betulínico.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

O triterpeno ácido betulínico ocorre naturalmente em diversas plantas, possui diversas atividades: anti-viral, inibição do vírus da hepatite B (YAO et al., 2009), antioxidante, sequestrador das espécies de radicais livres por transferências de átomos de hidrogênio (ALLOUCHE et al., 2010) e principalmente atividade citotóxica frente a células tumorais das linhagens: HL-60 e K562 (leucemia) e antiparasitária (FAUJAN et al., 2010; WU et al., 2010).

De modo similar ao presente trabalho, ao presença do triterpeno ácido ursólico já havia sido relatada nas folhas de outra planta do gênero *Aspidosperma*, a espécie *A. illustre*, e o triterpeno ácido oleanólico (BARBOSA et al., 2010), mas a presença do ácido betulínico é descrita pela primeira vez nesta espécie.

De acordo com o fracionamento obtido, a fração denominado APF-C5,6, apresentou um pó amorfo, de coloração branca, pesando 44,06 mg (aproximadamente 0,21% do rendimento, em relação a porção bruta do extrato fracionada). Iniciou-se a caracterização pela

análise do perfil em CCD, o qual apresentava uma única mancha de coloração avermelhada quando revelada na luz UV em ambos os comprimentos de onda 254 e 356 nm. A amostra foi submetida a análise em Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo sua estrutura identificada na análise de dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , incluindo os experimentos DEPT 135 e DEPT 90, bem como comparação dos dados dos compostos correspondente descrito na literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (figura 15) evidenciou sinais na região entre 7,2 e 8,3 ppm, típicos de ácido benzóico, como sugerido. Em conjunto com os dados dos valores do RMN  $^{13}\text{C}$ , incluindo os experimentos DEPT 135 e DEPT 90, confirmando a presença de 7 carbonos, com os deslocamentos químicos:  $\delta$  171,53 (C),  $\delta$  129,33 (C),  $\delta$  133,73 (CH) e equivalentes em CH para  $\delta$  130,19 e  $\delta$  128,48 (figuras 15 e 16) (PINHEIRO et al., 2003).

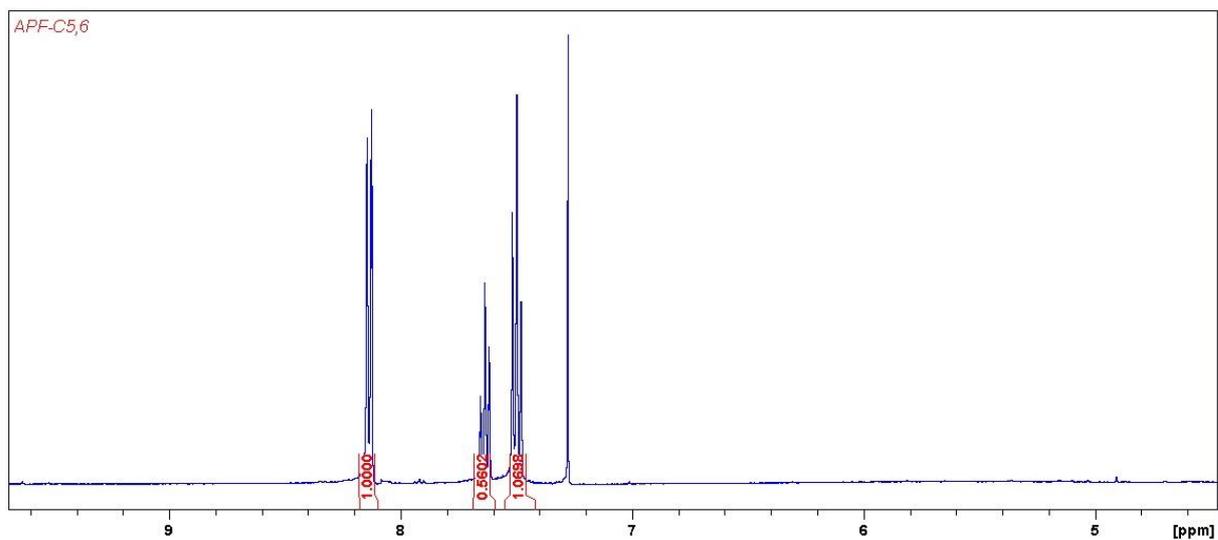
As análises dos valores encontrados na literatura com os espectros permitiu a conclusão do composto estudado (Tabela 5, Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19).

**Tabela 5. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de APFHC<sub>5,6</sub> em  $\text{CDCl}_3$ , comparados com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura ( $\delta$  em ppm).**

APFHC <sub>5,6</sub>		Ácido Benzóico
	$\delta_c$	$\delta_c$
<b>C</b>		
<b>1</b>	171,53	170,0
<b>2</b>	129,33	130,0
<b>3</b>	128,48	129,0
<b>4</b>	128,48	129,0
<b>5</b>	130,19	130,3
<b>6</b>	130,19	130,3
<b>7</b>	133,73	133,9

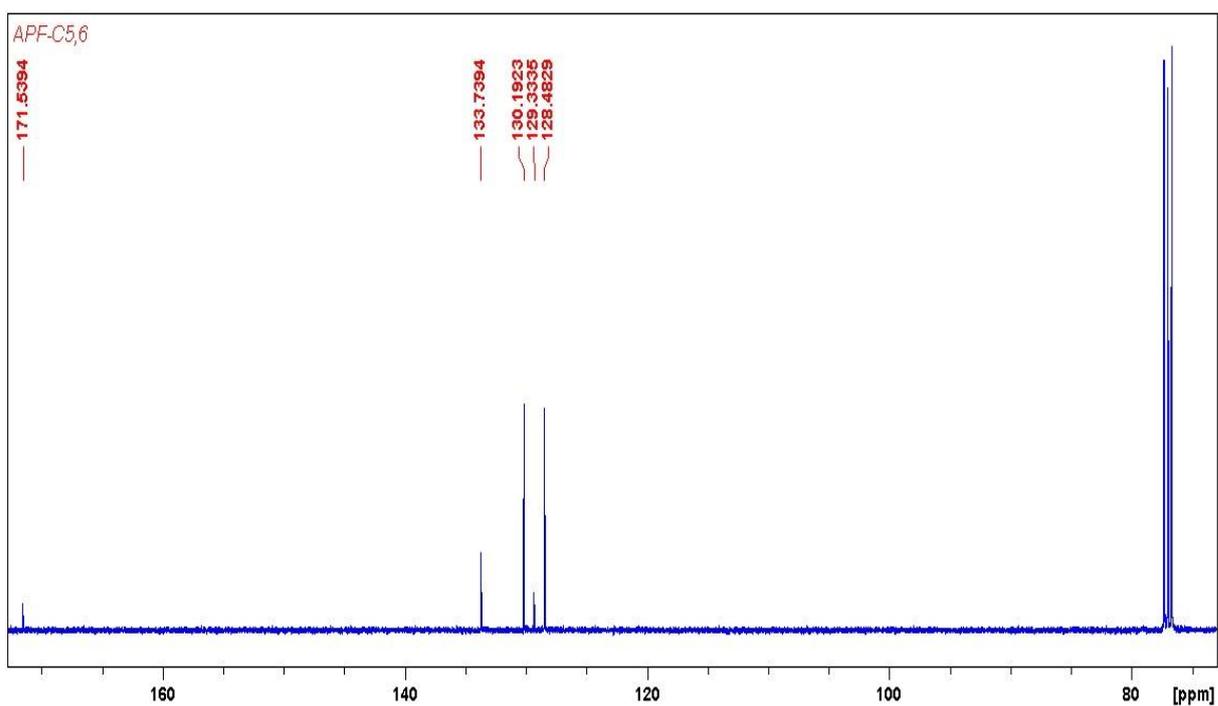
Fonte: PINHEIRO et al., 2003.

Figura 14. Espectro de  $^1\text{H}$  [ $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz].

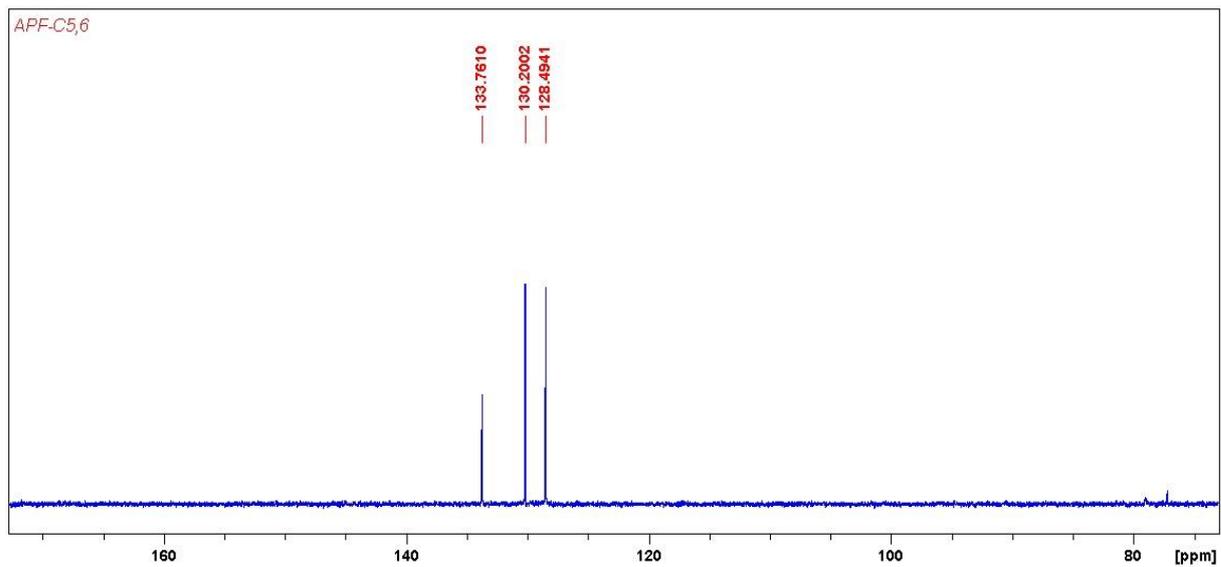


Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

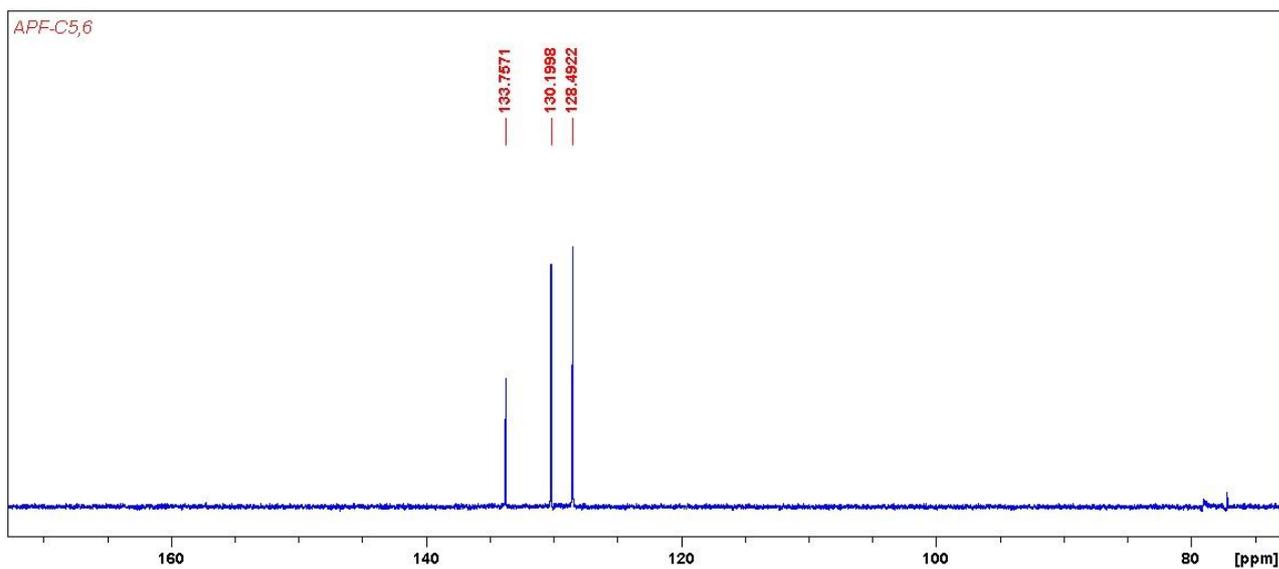
Figura 15. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN [ $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz]



Fonte: Autor desta dissertação, 2014

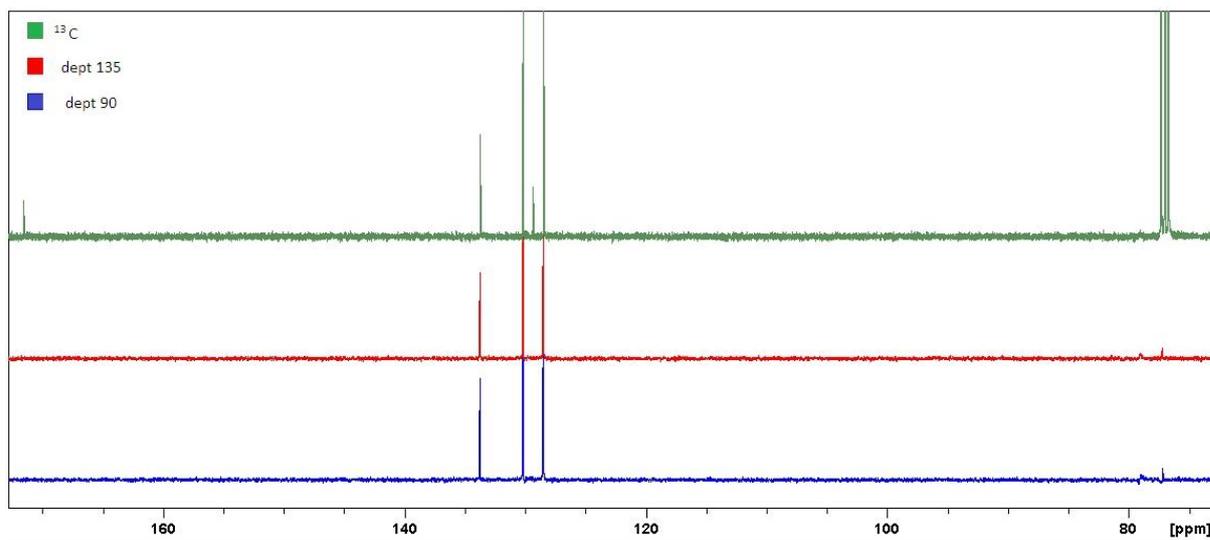
**Figura 16. Espectro de DEPT-135.**

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

**Figura 17. Espectro de DEPT-90.**

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

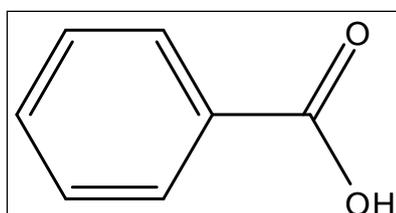
**Figura 18.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN [ $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz em verde, DEPT-135 em vermelho e DEPT-90 em azul] obtidos da amostra codificada como APF-C5,6.



Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

O ácido benzóico em espécies vegetais, faz parte dos processos do metabolismo secundário, conferindo-lhes defesas contra as espécies reativas de oxigênio, quando o sistema de segundos mensageiros é ativado, como por exemplo o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) promove a ativação da hidrolase do ácido benzóico, enzima responsável pela conversão do ácido benzóico em ácido salicílico, composto fenólico presente na maioria das espécies vegetais (RESENDE et al, 2003).

**Figura 19.** Estrutura química do Ácido Benzóico.



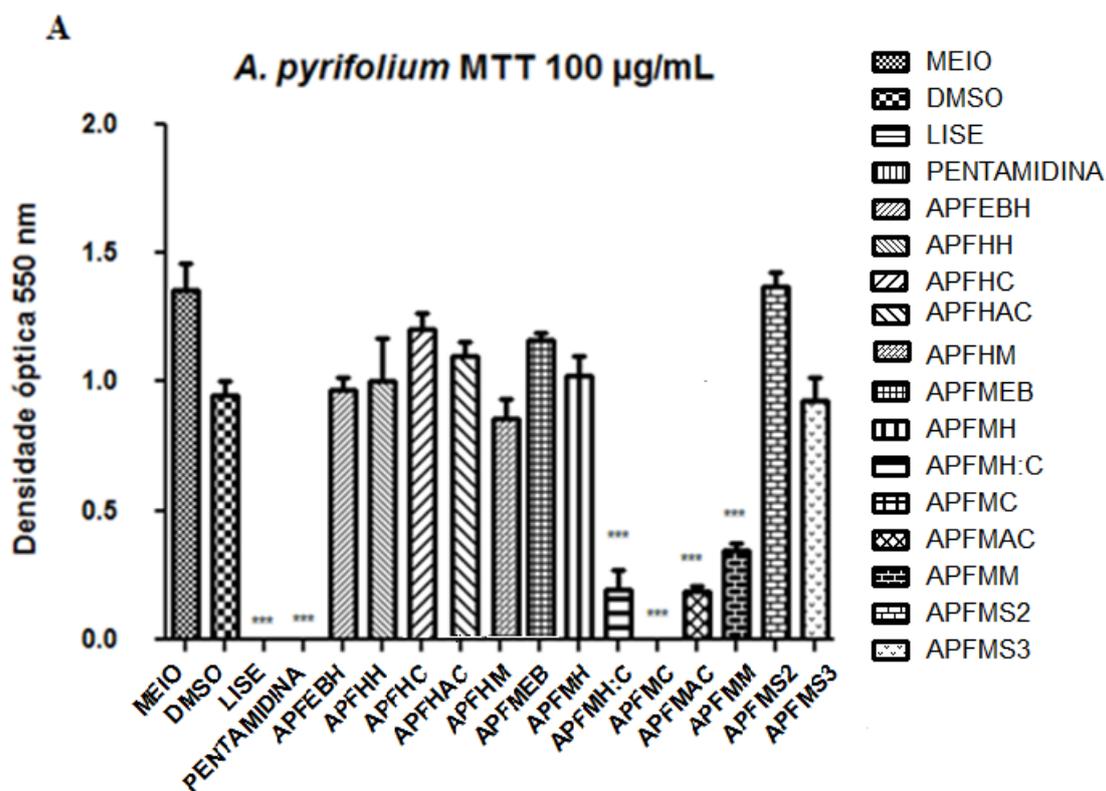
Fonte: Autor desta dissertação, 2014

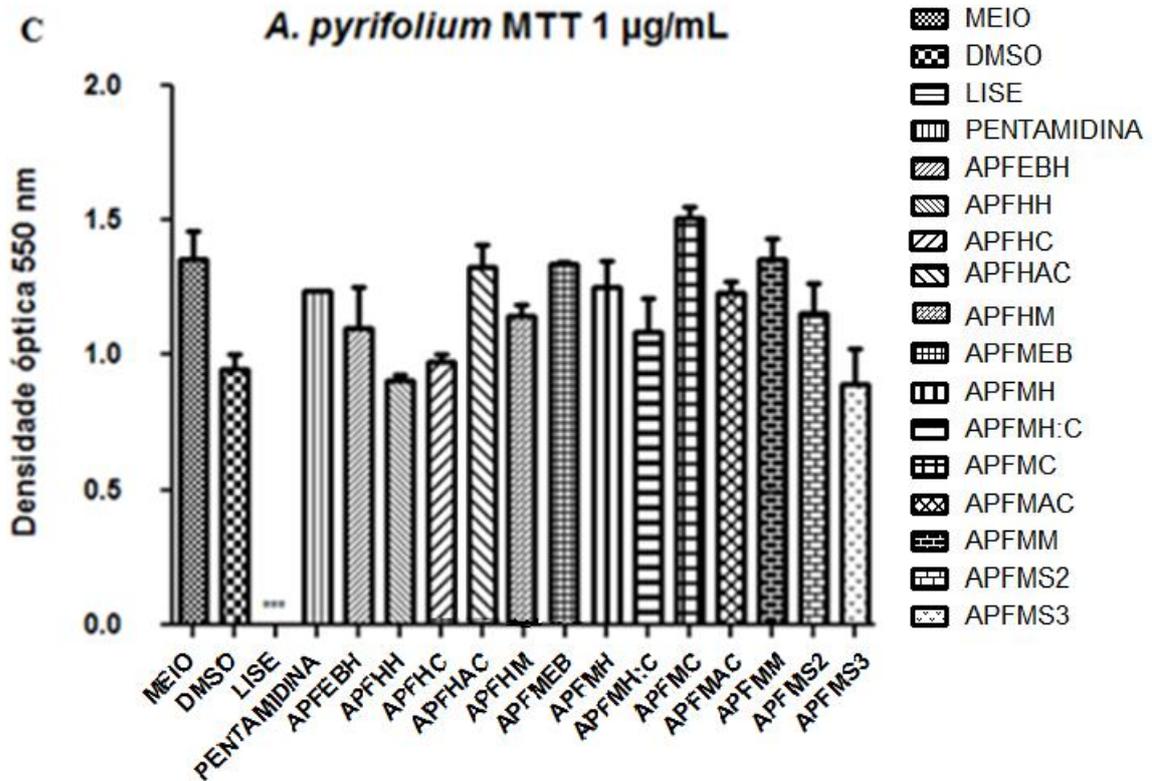
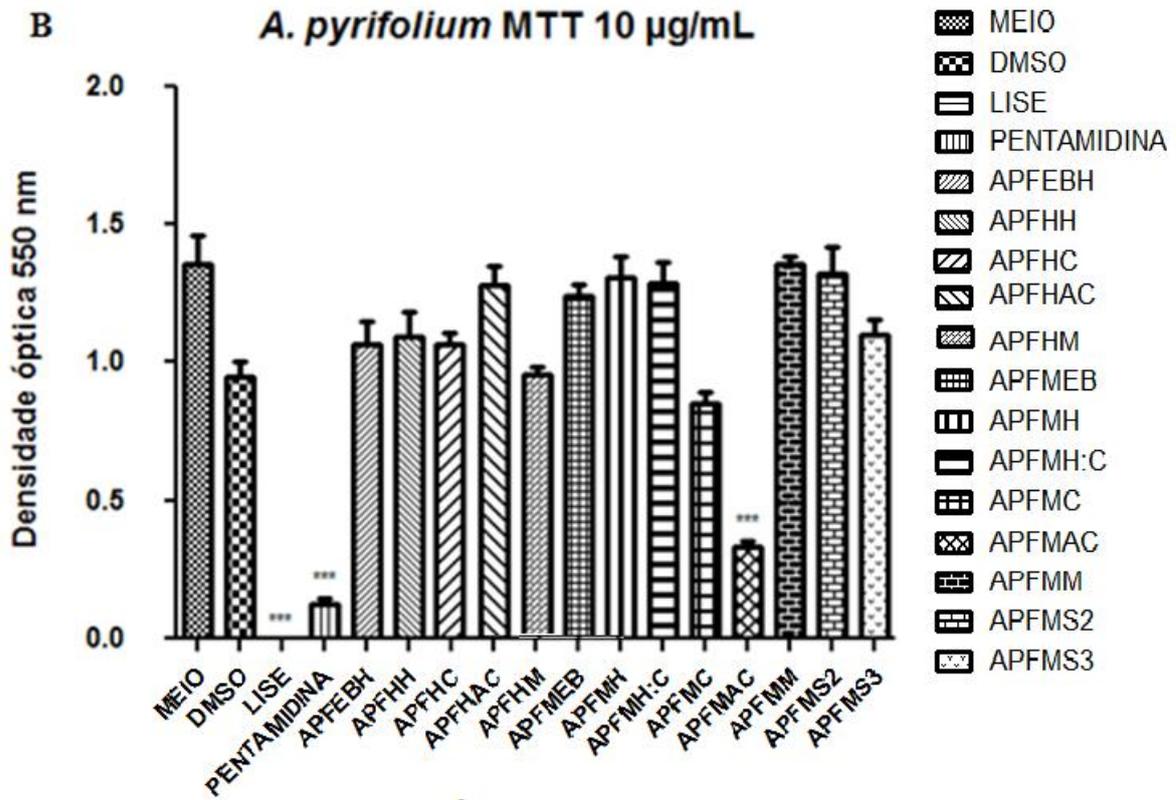
### 5.3 Ensaio farmacológicos

Com os extratos brutos e frações obtidos de *A. pyriformium*, realizou-se a avaliação da atividade leishmanicida. O ensaio de citotoxicidade foi realizado para identificar a viabilidade celular destes compostos e seus efeitos deletérios frente aos macrófagos da linhagem J774, nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, ilustrados na figura abaixo.

**Figura 20. Efeito das soluções obtidas dos extratos de *A. pyriformium* sobre a viabilidade celular. A- 100 µg/mL, B- 10 µg/mL e C-1 µg/mL.**

Os resultados representam a média ± EPM de triplicatas de um experimento representativo; Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ , em relação ao grupo DMSO 0,1%; \*\*\* representa uma citotoxicidade relevante frente aos macrófagos J774.



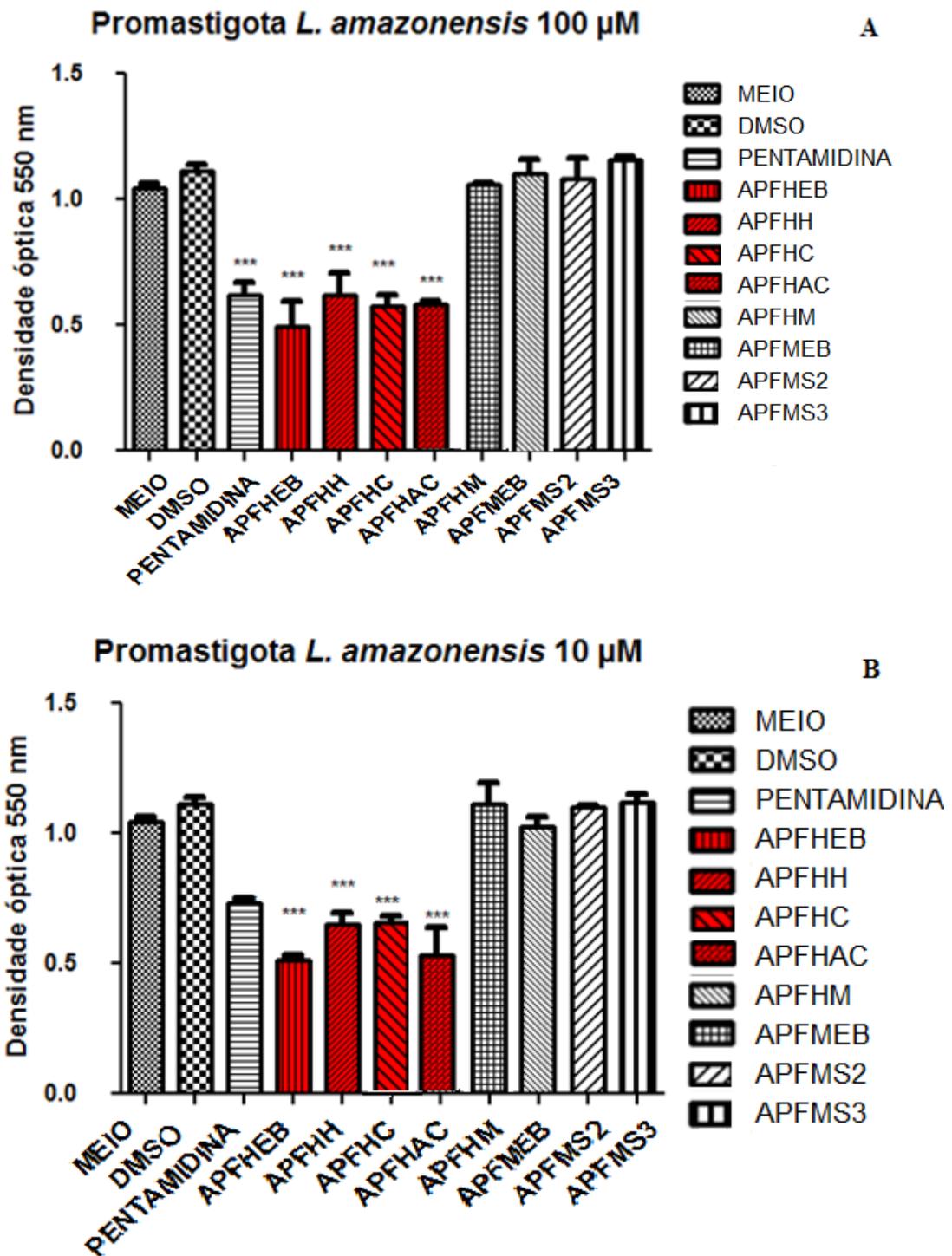


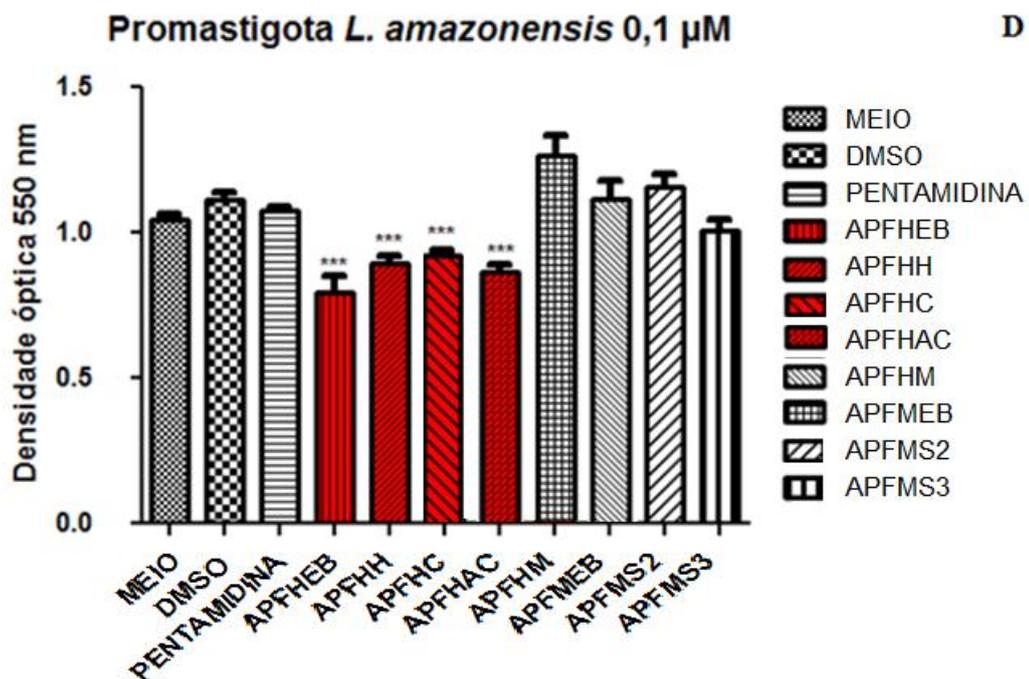
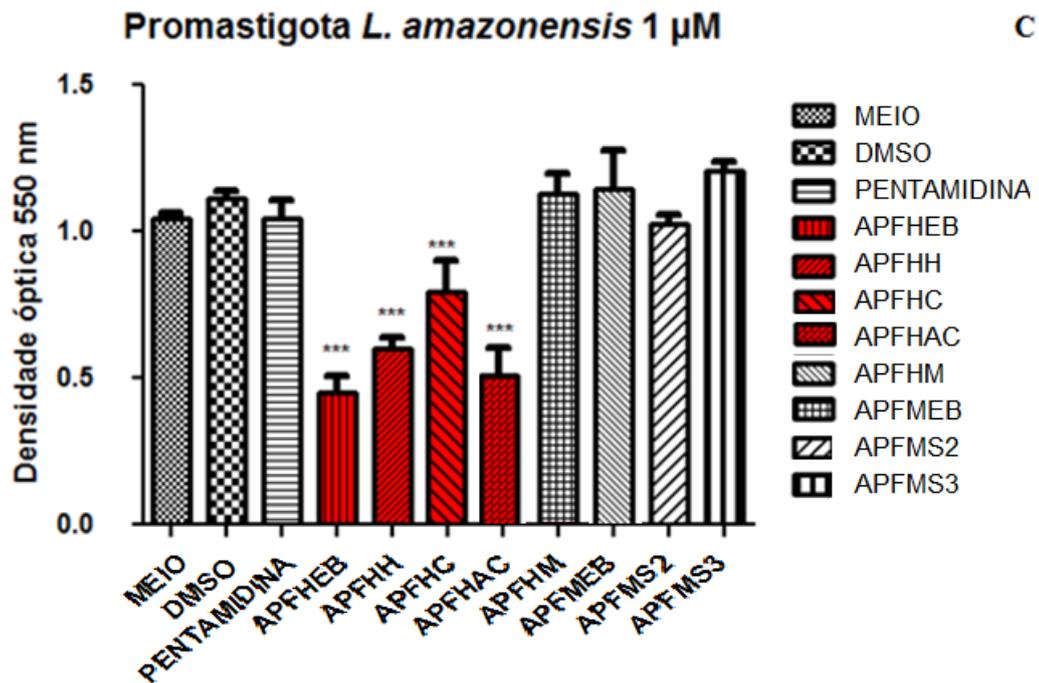
Das treze amostras analisadas, oito não apresentaram citotoxicidade na maior concentração de 100 µg/mL. Na concentração de 10 µg/mL apenas uma amostra foi citotóxica e nenhuma das amostras apresentou efeitos deletérios para a célula hospedeira na menor concentração.

Diante deste resultado, as amostras que não foram citotóxicas na maior concentração de 100 µg/mL, foram analisadas quanto a sua atividade leishmanicida, realizando o ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A figura 21 mostra que das frações analisadas, quatro inibiram o crescimento de *L. amazonensis*, mostrando que as frações denominadas APHHEB, APFHH, APFHC e APFHAC, apresentam efeito leishmanicida direto no ensaio *in vitro*, sobre formas promastigotas. A fração APFHHEB apresentou a melhor atividade em todas as concentrações analisadas. A pentamidina foi usada como fármaco padrão.

Figura 21. Efeito das soluções dos extratos e frações de *A. pyrifolium* sobre a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis*. A- 100  $\mu\text{g/mL}$ , B- 10  $\mu\text{g/mL}$  e C-1  $\mu\text{g/mL}$ .





Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de triplicatas de um experimento representativo; Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ , em relação ao grupo DMSO 0,1%; \*\*\* representa uma citotoxicidade relevante frente as promastigotas de *L. amazonensis*.

As mesmas frações, também conseguiram inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, quando testadas nas concentrações de 10 µg/ml, 1 µg/ml e 0,1 µg/ml, quando comparado com a pentamidina, como ilustrado na figura 20.

Os resultados encontrados foram obtidos do extrato bruto hexânico e de suas frações subsequentes. De acordo com a prospecção fitoquímica, as frações que apresentaram resultados significativos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, também foram positivas no teste para a presença de triterpenos. Estudos demonstraram que fitoconstituintes isolados de plantas tem mostrado potente atividade leishmanicida, como: compostos fenólicos, flavonóides, isoflavonóides, saponinas, alcaloides, taninos e triterpenos, porém pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação (SEN; CHATTERJEE, 2011).

Da fração APFHH, seguiu-se o fracionamento e foi isolado o triterpeno ácido betulínico, de acordo com a literatura, esse composto obtido das folhas de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), apresentou atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*; e atividade tripanocida contra cepas de *Trypanosoma cruzi*. (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al, 2010). Segundo Sousa (2014), o triterpeno ácido betulínico e derivados sintéticos da betulina demonstraram atividade leishmanicida frente *L. infantum* (SOUSA et al, 2014).

Da fração APFHAC, não foi isolado nenhum constituinte, porém apresentou positividade para triterpeno, sendo sua presença possível indicativo para a atividade leishmanicida. Por outro lado, da fração APFHC, onde isolou-se o composto fenólico, ácido benzóico não existe relato na literatura sobre o efeito desta substância na atividade leishmanicida, porém, o ácido benzóico é produto do processo de degradação de triterpenos e esteroides (RESENDE et al, 2003).

#### 5.4 Avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.

De acordo com a metodologia estabelecida para determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais, pelos métodos ABTS e Folin-Ciocalteu, para construção da curva analítica, os valores obtidos foram aplicados na equação da curva dos ensaios estão representados na tabela 6. Fez-se uso do AG, Trolox e BHT, que foram empregados como referências para avaliar a capacidade antioxidante das amostras estimadas, tendo seus resultados expressos em equivalentes ( $\text{mg g}^{-1}$ ), tabela 7 e 8.

**Tabela 6. Parâmetros analíticos empregados para os métodos utilizados.**

FC					
Padrão	Faixa linear, $\text{mg L}^{-1}$	A = aC + b			N
		a	b	r	
AG	0,25 - 20	0,033	0,006	0,9990	5
Trolox	0,5 - 40	0,007	0,0161	0,9996	5
BHT	0,5 - 30	0,007	0,0007	0,9949	5
ABTS					
Padrão	Faixa linear, $\text{mg L}^{-1}$	%I = aC + b			N
		a	b	r	
AG	0,2 - 14	38,617	4,172	0,9990	5
Trolox	1,4 - 10	4,072	2,721	0,9999	5
BHT	2 - 18	4,872	5,173	0,9991	5

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

**Tabela 7. Determinação da capacidade antioxidante pelo método Folin-Ciocalteu.**

Amostra	Concentração Equivalente $\text{mg g}^{-1}$		
	AG	Trolox	BHT
APFEBH	2,05 ± 0,21	2,50 ± 1,51	13,43 ± 1,52
APFHH	3,86 ± 0,21	11,07 ± 1,51	22,00 ± 1,52
APFHAC	1,21 ± 0,02	2,05 ± 0,01	9,50 ± 0,01
APFHC	2,65 ± 0,21	5,36 ± 1,51	16,28 ± 1,52
APFHM	1,29 ± 0,21	3,75 ± 1,71	9,85 ± 1,52
APFEBM	4,02 ± 1,21	11,79 ± 1,51	22,71 ± 1,52
APFMH	2,27 ± 0,01	3,57 ± 0,01	14,50 ± 0,01
APFMH:C	10,98 ± 1,21	44,64 ± 1,51	55,55 ± 1,52
APFMAC	9,92 ± 1,21	39,64 ± 1,51	50,56 ± 1,52
APFMC	10,99 ± 1,21	44,65 ± 1,51	55,57 ± 1,52
APFMM	5,08 ± 1,21	16,79 ± 1,51	27,71 ± 1,52

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

Os valores encontrados demonstram que todas as frações apresentam resultados significativos para os três padrões analisados. Com relação ao extrato bruto hexânico e frações oriundas, a fração APFHH, apresentou o melhor índice de fenólicos totais, seguido das frações APFHAC, APFHM, APFEBH e APFMM, em equivalente para os padrões analisados, respectivamente. Sendo os melhores resultados quando comparados com o padrão lipofílico (BHT), seguidos pelo padrão intermediário (Trolox) e o hidrofílico (AG).

Com relação aos valores encontrados das amostras do extrato metanólico, as frações APFMC, APFMH:C e APFMAC, apresentam os melhores resultados e semelhantes, estas frações, apresentaram positividade, quando submetidas ao teste fotoquímico para identificação de alcaloides. Seguidos pelas frações APFMM, APFEBM e APFMH, sendo também, os melhores resultados quando comparados com o padrão lipofílico (BHT), seguidos pelo padrão intermediário (Trolox) e o hidrofílico (AG).

**Tabela 8. Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS (N = 3).**

Amostra	Concentração Equivalente mg g <sup>-1</sup>		
	AG	Trolox	BHT
APFEBH	1,05 ± 0,18	10,67 ± 1,75	7,91 ± 1,46
APFHH	1,75 ± 0,18	17,28 ± 1,75	13,43 ± 1,46
APFHAC	1,62 ± 0,18	16,12 ± 1,75	12,47 ± 1,46
APFHAC	1,59 ± 0,37	15,83 ± 3,50	12,23 ± 2,92
APFHM	1,29 ± 0,18	12,99 ± 1,75	9,85 ± 1,46
APFEBM	1,93 ± 0,01	18,97 ± 0,01	14,85 ± 0,01
APFMH	1,91 ± 0,18	18,85 ± 1,75	14,75 ± 1,46
APFMH:C	1,49 ± 0,18	16,58 ± 0,01	12,81 ± 1,46
APFMAC	1,72 ± 0,74	17,15 ± 0,01	13,30 ± 1,46
APFMC	1,67 ± 0,55	16,54 ± 1,75	12,81 ± 1,46
APFMM	1,69 ± 0,18	16,78 ± 1,75	13,02 ± 1,46

Fonte: Autor desta dissertação, 2014.

De acordo com os valores obtidos para a determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS, as frações e extratos de APF analisados, os melhores resultados apresentados encontram-se na comparação em equivalente com o padrão Trolox, em sequência, BHT e AG.

Para os obtidos da fase hexânica, a fração APFHH apresentou melhor índice da capacidade antioxidante, assim como no ensaio de FC, seguidos na ordem com valores

próximos, as frações APFHAC, APFHC, APFHM e APFEBH. Nesse caso, o extrato bruto obteve o menor índice.

Com relação aos obtidos da fase metanólica, o extrato bruto obteve o maior resultado (APFEBM), seguidos pelas frações APFMH, APFMAC, APFMM, APFMH:C e APFMC, com valores significativamente semelhantes.

Ao se tratar de extratos vegetais e frações obtidas, devido ao fato dos vários compostos antioxidantes ou até mesmo compostos redutores presentes apresentarem diferenças em suas estruturas, as suas propriedades/aspectos também se mostram diferentes e nesse caso pode-se citar como exemplo: solubilidade em meio aquoso que é uma consequência do grau de hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, complexidade ou tamanho das estruturas dos compostos, potencial redox e distribuição dos compostos nas amostras reais analisadas, por esse motivo, utilizou-se os três padrões, onde o AG (hidrofílico), Trolox (polaridade intermediária) e BHT (lipofílico) (REZENDE, 2010).

Segundo, Ak e Gülçin (2008), o estudo realizado para avaliação da curcumina em solução etanólica, pelo método ABTS, os resultados obtidos apresentaram relação dependente da concentração, frente aos padrões BHT e Trolox. Na concentração de 45 µg/mL, obteve-se valores de equivalentes em BHT, maiores que o Trolox (97,8 e 79,6). Em comparação com esses resultados, as amostras analisadas também apresentaram maiores valores para o padrão BHT, em todas as amostras (AK; GÜLÇİN, 2008).

Soong e Barlow (2004), ao analisar os compostos fenólicos da manga, tamarindo, abacate e jaca, a partir de extratos hidroalcoólicos (etanol:água 50%), pelo método de FC, obtiveram os valores equivalentes em mg.g<sup>-1</sup> de, 2,4 (manga), 3,9 (tamarindo), 1,3 abacate e 0,9 jaca, frente ao padrão AG, em comparação com os resultados obtidos das amostras analisadas os extratos e frações de *A. pyrifolium* apresentam valores semelhantes de compostos fenólicos. As amostras denominadas APFMH:C, APFMAC e APFMC, apresentaram valores maiores do que encontrados no estudo (SOONG; BARLOW, 2004). Ainda nesse estudo, os valores obtidos pelo método ABTS para o padrão AG em µmol/g foram de 7,2 manga, 17,0 tamarindo, 4,9 abacate e 3,0 jaca, considerando assim, valores de inibição do radical maiores do que os encontrados no estudo das amostras de *A. pyrifolium* quando comparadas ao padrão hidrofílico.

De acordo com Flores et al., (2013), estudo com a polpa da goiaba da Costa Rica *Psidium friedrichsthalianum*, para avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória, após um processo de liofilização com metanol:água (70:30), realizou-se uma partição e foram obtidas frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Estas frações obtidas,

juntamente com o extrato bruto da goiaba, foram avaliadas quanto a sua capacidade antioxidante pelo método ABTS, tiveram seus resultados comparados em equivalentes de trolox e a ordem da atividade entre as frações foi a fração acetato de etila mais potente, seguidas do extrato bruto, *n*-butanol, clorofórmio e hexano (FLORES et al., 2013). Nosso estudo apresentou resultado quando comparado em equivalente de trolox a fração mais potente obtida do hexano, seguido pelas frações, acetato de etila, clorofórmio, metanol e extrato bruto.

Outros estudos disponíveis na literatura sobre a avaliação do potencial antioxidante de espécies de *Aspidosperma* demonstrou, que a espécie *A. quebracho-blanco* apresentava atividade antioxidante desprezível de acordo com BORNEO et al., 2009, assim como a espécie *A. macrocarpum* apresentou baixo índice de atividade antioxidante, quando comparados em consideração os potenciais de materiais sabidamente produtores de polifenóis e com alta atividade antioxidante, como os extratos de uva Chardonay (*Vitis vinifera*) e amora (*Morus nigra* e *M. alba*), (Aquino, 2012).

De acordo com Azedo, 2013, os valores encontrados para amostras de extratos atomizados de *A. pyrifolium* evidencia valores pouco superior ao padrão estabelecido campferol, que obteve 1,34 mmol/g em equivalente de trolox e a amostra analisada de *A. pyrifolium* de 3,06 mmol/g de equivalente de trolox (AZEVEDO, 2013).

Os melhores valores encontrados para as frações hexânicas, também foram os melhores resultados da atividade farmacológica leishmanicida.

## **6 CONCLUSÕES**

---

---

## 6 CONCLUSÕES

- O estudo químico da espécie *A. pyrifolium* revelou a presença de triterpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Foram isolados o triterpeno, ácido betulínico, e o ácido benzóico;
- O ensaio da atividade farmacológica, demonstrou que as frações obtidas destas espécies isoladas, foram ativas contra as formas promastigotas de cepas de *L. amazonensis*, na atividade biológica leishmanicida;
- O ensaio para determinação da capacidade antioxidante (ABTS) e fenólicos totais (FC) nas frações estudadas, mostraram ser bastante promissores, apesar de apresentar valores inferiores quando comparado com a literatura. Entretanto, ao ser analisado os resultados com os padrões intermediários e lipofílicos nota-se que estes apresentaram concentrações semelhantes e maiores dos valores encontrados na literatura. A fração onde isolou-se o ácido betulínico, que foi mais ativa farmacologicamente, também apresentou o melhor resultado da avaliação da capacidade antioxidante;
- Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a avaliação química da capacidade antioxidante da espécie *A. pyrifolium* e justificam estudos farmacológicos mais aprofundados.

## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.

AGRIPINO, D. et al. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain Forest – ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.

AK, T., GÜLÇİN. I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions** V. 174 P. 27-37, 2008.

ALBERNAZ, L. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 116-121, 2010.

ALBERNAZ, L. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 116-121, 2010.

ALLOUCHE, Y.; et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenoids diols and acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2885-2890, 2010.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2202-2210, 2010.

AMATO, V. S. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000.

AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. L. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 615-623, 2005.

ANDRADE-NETO, V. F.; et al.. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007.

ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, 989 - 1009, 2000.

AQUINO, P. G. V. Estudo químico e atividades anti-hipertensiva e antioxidante de *Aspidosperma macrocarpum* Mart (Apocynaceae) Dissertação (Mestrado). Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

ARAÚJO-JUNIOR., J. X.; et al. Isolation and characterization of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry Reviews**. V. 6, p. 183 - 188, 2007.

BAIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis **Journal Medicinal Chemistry**. v. 52,p. 2603–2612, 2009.

BARBOSA, L. F.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Chemical constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1434-1438, 2010.

BARILE, F. A. In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. Florida: **CRC**, p. 222. 1994.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 44, p. 536-546, 1991.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 29, n. 3. P. 678-688, 2009.

BASANO, S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia** v. 7, n. 3, 2004.

BOLZONI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole Alkaloid Evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 15, n. 3, p. 187 - 200, 1987.

BORNEO, R.; et al. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. **Food Chemistry**, v. 112, p. 664-670, 2009.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, p. 18, 2007.

BOURDY, G.; CHAVES DE MICHEL, L. R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 189-208, 2004a.

BOURDY, G.; et al. Medicinal plants uses of the Tacana, na Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 70, p. 87-109, 2000.

BOURDY, G.; et al. Search of natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 269-277, 2004b.

BRANDÃO, M. G. L., et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 175-182, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos - PNPMF**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de Janeiro de 1995**. Brasília, 1995.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. v. 55, n.3, p. 37 - 39, 2003.

CAMARGO L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 1, p. 34-37, 2003.

CAMPOS, A. R.; et al. Relaxant effects of an alkaloid-rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark on isolated rabbit corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p. 255-263, 2008.

CAMPOS, A. R, et al. Pro-erectile effects of na alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 240-244, 2006.

CHAI, Y. Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 2257-2263, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Volumes I a VI**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S., COSTA, C. L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Stercula striata* St. Hil. Et Naudin. *Acta Amazonica*. v.40, n.1, p.207 - 212, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyriforme* (aspidospermine and 6-demethoxyprofoline). **Phytochemistry**. V. 22, n. 6, p. 1526 - 1528, 1983.

CUNHA, A. C., et al. Anti-*leishmanial* activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**. V.19, p. 413 - 417, 2012.

DA SILVA, D. M., et al. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

DA SILVA, M. A. B., et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

DAVID, J. P., et al. New triterpene and antibacterial laddenoic acid derivatives from *Moldenhawera nutans*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v.18, n.8, p. 1585 - 1589, 2007.

DE ALMEIDA, C. F. C. B. R., et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.

DE SEMET, P. A. G. M., et al. Introduction to the pharmacoeconomics of herbal medicines. **Pharmacoeconomics**, v.18, n.1, p1-7, 2000.

DE SOUZA, A. C. M., et al. Propriedades antifúngicas dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais**.São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. **Multequina**, v. 6, p. 49-66, 1997.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**. v. 89, p. 271-277, 1986.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 91-96, 1996.

DEUTSCH, H. F., et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 10, p. 1283-1287, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach**. 3<sup>a</sup> ed. Wiltshire: Wiley, 2009.

DJERASSI, C., et al. Journal of American Chemical Society. V. 84, p. 3480, 1962. *apud* PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alacoides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**. V. 30, n. 4, p. 970 - 983, 2007.

DOS SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SSIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia – Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: EdUFRGS/EdUFSC, 2004. p. 403-434.

DUTTA, A. et al., Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v.54, p. 119–122, 2005.

ELDIN, S; DUNFORD, A. A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. Editora **Malone**. São Paulo. 2001.

EPIFANIO, W. A. N.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SANT'ANA, A. E. G. Evaluation of the anti-nociceptive and antiinflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). In: XVI congresso Italo-latinoamericano de Etnomedicina, 2007, La Plata. **Anais**. p. 228-229. 2007.

FAUJAN, N. H., et al. Citotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. **African Journal of Biotechnology**. v.9, n.38, p. 6387 - 6396, 2010.

FERREIRA, D. T.; et al. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos da raiz, caule e folha de *Aspidosperma polyneuron*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, XI., 2003, Pelotas. **Anais**. Rio Grande do Sul: SBQSUL, 2003.

FERREIRA, I. C. P., et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FILIPOV, A. Medicinal plants of Pilagá of Central Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 181-193, 1994.

FLORES, G. et al. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry** v. 141 p. 889-895, 2013.

FOGLIANO, V. et al. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, 1035–1040, 1999.

FRANCO I. J.; FONTANA V.L. Ervas e plantas: a medicina dos simples. Editora **Edelbra** Erexim. Rio Grande do Sul. 8ª Ed. 2003.

GARCIA, R. F.; BROWN-JR., K. S. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1093-1095, 1976.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**, Trindade/Go, v. 1, n. 01, 2007.

GILBERT, B., et al. The alkaloids of twelve *Aspidosperma* species. **Tetrahedron**. V. 21, p. 1141 - 1166, 1965.

GOLENIOWSKI, M. E., et al. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341, 2006.

GOLONI, R., et al. Estudo da toxicidade aguda do *Aspidosperma subincanum* MARTIUS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 89-91, 2005.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8,n. 4, p. 419–433, 2010.

GRANATO, D., et al. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2005.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 838-857, 2012.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-410 Setembro, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 1841–1856, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R; RIOUX, J, A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. **Annales de Parasitologie Humaine et Compareé** v. 66, p.71-74, 1991.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21<sup>st</sup> century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 135-148, 2001.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature**. v. 4, p. 206 - 220, 2005.

KOHN, L. K., et al. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp, p. 110-115, 2006.

KVIST, L. P., et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 390-402, 2006.

LIMA, M. C. J. S.; SOTO-BLANCO, C. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyriformium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**. v. 55, p. 320-324, 2010.

LIMA, M. P., et al. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: chemosystematic implications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 3, p. 385-394, 2004.

LUNA, J. S., et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACHADO, P. et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p. E69–E73, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v 25, p. 429-438. 2002.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, 1–19, 2008.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. 13C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. v.37, n.6, p. 1517 - 1575, 1994.

MAIA, R. M., et al. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Boussieraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2004.

MARTÍNEZ, G. J.; BARBOZA, G. E. Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 86-100, 2010.

MARTÍNEZ, G. J.; BARBOZA, G. E. Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 86-100, 2010.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza, EUFC, 1997.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**. V. 68, p. 2015 - 2022, 2007.

MITAINE, A. C., et al. *Planta Medica*. V. 62, p. 458, 1996 *apud* PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P. ALCANTÁRA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**. V. 30, n. 4, p. 970 - 983, 2007.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 38-48, 2007.

MORAIS-TEIXEIRA, E. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, F. Q., et al. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 23-31, 2003.

OLIVEIRA, N. et al. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani* chagasi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 81, 303-309, 1986.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R. M.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009<sup>a</sup>

OMS 2012. Organização Mundial de Saúde. Disponível em:

<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em: 27 de maio de 2014.

PACHÚ, C. O. **Processamento de Plantas Mediciniais para obtenção de extratos secos e líquidos**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. 2007.

PARAGUASSU-CHAVES, C. A. **Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental)**. Editora da Universidade Federal de Rondônia, 2001.

PEARSON, R.D. et al. **Leishmania species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis**. In **Principles and Practice of Infections Diseases**, Churchill Livingstone, p. 2832–2845, 2000.

PEREIRA, E. A. **Obtenção e caracterização do extrato seco de *Aspidosperma pyrifolium* (Apocynaceae) e *Aspidosperma macrocarpum* (Apocynaceae)** Dissertação (Mestrado). Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

PEREIRA, M. M., et al. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Química Nova**. V. 30, n. 4, p. 970 - 983, 2007.

PESSINI, G. L., et al. Evaluation of the antimicrobial activity of three species of *Aspidosperma*. In: XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, 2011, Fortaleza. **Anais**. Silae, 2011. v. 1.

PINHEIRO, L., et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* MART (CLUSIACEAE). **Química Nova**, v.26, n.2, p. 157 - 160, 2003.

POHLIT, A. M., et al. Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 97–105, 2004.

QUIGNARD, E. L. J., et al. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

RAPINI, A. **Sistemática: estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais**. São Paulo: USP, 2000.

RATES, S. M. K.. Plantas as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, n.5, p.603-613, 2001.

RATH, S. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n.. 4, p. 550-555, 2003.

**REDE DE SEMENTES DO CERRADO**. Disponível em <http://www.rededesementesdocerrado.com.br/> Acesso em: 12/01/14.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28:123-130. 2003.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e Composição química de seis frutas Tropicais Consumidas na Bahia**. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 295-302, 2007.

ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; BAUER, J.; FERNÁNDEZ, I.; ALBÁN, J.; LOCK, O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 199-204, 2003.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America- A Systematic Review. **PLOS neglected tropical diseases** v. 4 ,n. 1. e 584. Janeiro, 2010.

RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A. L.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 917-921, 2011.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH N. The Immunology Of Susceptibility And Resistance To *Leishmania Major* In Mice. **Nature Reviews, Immunology**, v.2, November, 2002.

SANZ-BISET, J.; CAMPOS-DE-LA-CRUZ, J.; EPIQUIÉN-RIVERA, M. A.; CAÑIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 333-362, 2009.

SANZ-BISET, J.; CAÑIGUERAL, S. Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 271-288, 2011.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 115-135, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Magic and medicinal plants of the Ayoreos of the Chaco Boreal (Paraguay). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 105-111, 1993.

SEN, R.; CHATTERJEE M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis, **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056– 1069, 2011.

SMEE, D.F.; MORRISON, A.C.; BARNARD, D.L.; SIDWELL, R.W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**. v. 106, p. 71-79, 2002.

SMEE, D.F., et al.Characterization of an influenza A (H3N2) virus resistant to the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201. **Antiviral Research**, v. 52, p. 251-259, 2001

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, 2004.

SOONG, Y. Y., BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**. v. p. 411-417, 2004.

SOUSA, M. A., et al. Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine. **PLOS ONE**. v 9, ed. 3 2014.

SPERLING, H.; et al. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho-blanco* binds to human penile  $\alpha$ -adrenoceptors. **The Journal of Urology**, v. 168, p. 160-163, 2002.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, V. 1, p. 67-90, 1981.

SUFFREDINI, I. B., et al. Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 89-94, 2002b.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, D.; DE OLIVEIRA, A. In vitro anti-HIV and antitumor evaluation of Amazonian plants belonging to the Apocynaceae family. **Phytomedicine**, v. 9, p. 175, 2002a.

TANAKA, C. C., J. C.; DE SOUZA, L. M.; GONÇALVES, R. A. C. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**. V.19, p. 413 - 417, 2012.

TANAKA, J. C. A.; et al. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 387-391, 2006.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; DE OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 151-156, 2001.

TRINDADE, R. C. P., et al. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyriformis* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1813-1816, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1323-1338, 2007.

VEREDAS, J. C., LI, J. W. H.; Drug Discovery and natural products: end of na era or na endless frontier?. **Science**. V. 325, p. 161 - 165, 2009.

VERPOORTE, R.; A TSOI, A. T.; VAN DORRNE, H. Medicinal plants of Suriname. I. Antimicrobial activity of some medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 221-226, 1982.

VERPOORTE, R., et al. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 287-302, 1983.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D.A. Plant substances as antiviral agents. *Current Organic Chemistry*. v. 1, p. 307-344, 1997.

WALSER, A.; DJERASSI, C. Alkaloid-Studien LII. Die Alkaloide aus *Vallesia dichotoma* RUIZ et PAV. **Helvetica Chimica Acta**. V. 48, Issue 2, p. 391 - 404, 1965.

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. Understanding cell toxicology: principles and pratice. NewYork: Ellis Howood, p. 97-111, 1990.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J.R.W. *Animal Cell Culture*. Oxford: University, p.175 -219, 2000.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 38, p. 119-206, 1951.

WU, Q.; HE, J.; FANG, J.; HONG, M. Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K652 cells *in vitro*. *Journal of Huazhong University of Science and Tecnology*. v.30, n.4, p.453 - 457, 2010.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p. 39925–39932, 2004.