

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/08/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA

Leonardo Bergamasco Ribeiro

**Extração, isolamento, caracterização e avaliação das atividades
biológicas de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia
brasiliensis***

Orientadora
Prof^a. Dr^a Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara, 2017

Leonardo Bergamasco Ribeiro

Extração, isolamento, caracterização e avaliação das atividades biológicas de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

R484e Ribeiro, Leonardo Bergamasco
 Extração, isolamento, caracterização e avaliação das
 atividades biológicas de metabólitos secundários das folhas de
 Garcinia brasiliensis / Leonardo Bergamasco Ribeiro. –
 Araraquara : [s.n.], 2017
 97 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

 1. Produtos naturais. 2. Metabólitos.
 3. Câncer-Quimioprevenção. 4. Cromatografia a gás.
 5. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

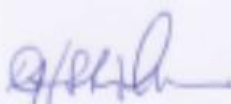
Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

LEONARDO BERGAMASCO RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 04 de agosto de 2017.

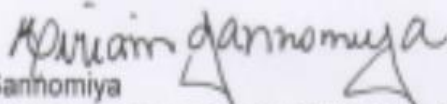
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Miriam Sanhomiya
Escola de Artes, Ciências e Humanidade / USP / São Paulo - SP

Dados Curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Leonardo Bergamasco Ribeiro

Nome em citações bibliográficas: Leonardo B. Ribeiro

ENDEREÇO PROFISSIONAL

NUBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015 – Atual

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
UNESP, IQ-CAr

Título: Extração, isolamento, caracterização e avaliação das atividades biológicas de metabólitos secundários das folhas de *Garcinia brasiliensis*.

Orientadora: Dulce Helena Siqueira Silva

Bolsista CAPES

2008 – 2014

Bacharelado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
UNESP, IQ-CAR

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Cristiana da Silva; Leonardo B. Ribeiro; Caio C. Furuno; Gislaine A. da Cunha; Ronan F.F. de Souza; Adelino V.G. Netto; Antonio E. Mauro; Regina C.G. Frem; José A. Fernandes; Filipe A. Almeida Paz; Leonardo B. Marino; Fernando R. Pavan; Clarice Q.F. Leite Pyrazolyl Pd(II) complexes containing triphenylphosphine: synthesis and antimycobacterial activity. **Polyhedron**, v.100, p. 10-16, 2015.

RESUMO

Garcinia brasiliensis, popularmente conhecida como bacupari, é uma árvore pertencente à família Clusiaceae, de origem amazônica, encontrada nos diversos biomas tropicais e utilizada na medicina popular como anti-inflamatório do trato urinário e antinociceptivo. O estudo fitoquímico da fração butanólica das folhas desta espécie levou ao isolamento e identificação de 4 flavonoides: miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (**S1**), miricetina-3-O-glucopiranosídeo (**S2**), 4'-metoxi-miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (**S3**) e quercetina-3-O-glucopiranosídeo (**S4**) e cinco C₁₃-norisoprenos glicosilados da classe das megastigmanas, relatadas pela primeira vez na literatura para o gênero *Garcinia*: o 3-oxo- α -ionol-glucopiranosídeo (**S5**), e dois pares de megastigmanas diastereôméricas: (*Z*)-4-[3'-(glucopiranosil)butilideno]-3,5,5-trimetil-2-cicloexen-1-ona (**S6 e S7**) e (*E*)-4-[3'-(glucopiranosil)butilideno]-3,5,5-trimetil-2-cicloexen-1-ona (**S8 e S9**). Através do estudo de desreplicação por CG-EM da fração hexânica de *G. brasiliensis* foi possível identificar 18 substâncias pertencentes a classe dos álcoois, ácidos graxos, triterpenos e esteroides, no qual se dá destaque aos triterpenos pentacíclicos α e β -amirina, ácido ursólico e ácido oleanólico como componentes majoritários deste extrato. Os ensaios de citotoxicidade com MTT frente a linhagens tumorais humanas indicaram forte potencial citotóxico para os extratos acetato de etila e butanólico com porcentagem de inibição superiores a 90%, apesar de baixa especificidade. Já os ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase humana apresentaram resultados promissores para os extratos butanólico e aquoso com inibição enzimática superior a Tacrina, utilizada como controle positivo.

ABSTRACT

Garcinia brasiliensis, known as “bacupari”, is a tree that belongs to Clusiaceae family, native from Amazonia and spread in diverse subtropical biomes, which is used in folk medicine to treat inflammation of the urinary tract and relieve pain. The phytochemical study of the butanol fraction from the leaves led to the isolation and identification of four flavonoids: myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside (S1), myricetin-3-*O*-glucopyranoside (S2), 4'-methoxy-myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside (S3) and quercetin-3-*O*-glucopyranoside (S4), in addition to five megastigmane glycosides, reported for the first time in the literature for the *Garcinia* genus: 3-oxo- α -ionol-glucopyranoside (S5) and two pairs of diastereoisomeric megastigmans, (*Z*)-4-[3'-(glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (S6 and S7) and (*E*)-4-[3'-(glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (S8 and S9). The GC-MS dereplication study of the hexane extract from *G. brasiliensis* led to the identification of 18 substances belonging to the class of alcohols, fatty acids, triterpenes and steroids, highlighting the pentacyclic triterpenes α - and β -amyrin, ursolic acid and oleanolic acid as major metabolites. The cytotoxicity evaluation using the MTT assay against human tumor cell lines showed strong cytotoxic potential for the ethyl acetate and butanol extracts with inhibitory percentage greater than 90%, despite their low specificity. The human acetylcholinesterase enzyme inhibition assay showed promising results for the butanol and aqueous extracts, with stronger inhibitory potential than Tacrine, a commercial drug used as positive control.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura de produtos naturais utilizados ainda hoje na medicina. | 17 |
| Figura 2 - Metabólitos secundários encontrados no gênero <i>Garcinia</i> : cowaxantona D (1), ácido hidroxicítrico (2), conrauanalactona (3), fukugetina (4) e 7-epiclusianona (5). | 19 |
| Figura 3 - Representação esquemática da extração e partição líquido-líquido. | 25 |
| Figura 4 - Perfil cromatográfico dos extratos obtidos usando gradiente de 5-100% MeOH, 0-45 min. detecção λ 254 nm em coluna Phenomenex® C18 Luna, (250 x 4,60mm, 5 μ m) 1 mL.min ⁻¹ , volume de injeção 20 μ L..... | 26 |
| Figura 5 - Perfil químico por RMN de ¹ H das frações de partição dos extratos (CD ₃ OD, 300 MHz)..... | 27 |
| Figura 6 - Cromatograma exploratório das frações F3 e F2 em gradiente de 5-100%, eluição com MeOH, de 0-45 min. e detecção em λ 254 nm. | 30 |
| Figura 7 - Cromatograma semi-preparativo da fração F6. Modo isocrático MeOH/H ₂ O 4:6, 55 minutos com detecção em λ 254 nm. | 32 |
| Figura 8 - Cromatograma semi-preparativo da fração F7. Gradiente descrito na Tabela 5 e detecção em λ 254 nm. | 33 |
| Figura 9 - Cromatograma semi-preparativo da fração C2. 15% MeOH, 18 minutos, detecção λ 254 nm. | 35 |
| Figura 10 - Cromatograma semi-preparativo das frações D4, D5 e D6. 40% MeOH, 60 minutos, detecção λ 254 nm..... | 37 |
| Figura 11 - Expansão do cromatograma de D5 e D6 entre 35 e 60 minutos. | 37 |
| Figura 12 - Hidrólise da acetilcolina e reação de Ellmann..... | 40 |
| Figura 13 - Estrutura e espectro no UV da miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (S1). | 42 |
| Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H PRESAT da substância S1 (CD ₃ OD, 300 MHz). | 43 |
| Figura 15 - Mapa de contorno COSY da substância S1 (CD ₃ OD, 300 MHz). | 44 |
| Figura 16 - Mapa de contorno HSQC da substância S1 (CD ₃ OD, 300 MHz). | 44 |
| Figura 17 - Mapa de contorno HMBC da substância S1 (CD ₃ OD, 300 MHz). | 45 |
| Figura 18 - Estrutura e espectro no UV da miricetina-3-O- β -glucopiranosídeo (S2). | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da substância S2 (DMSO- d_6 , 300 MHz). | 47 |
| Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância S2 (DMSO- d_6 , 75 MHz). | 48 |
| Figura 21 - Estrutura e espectro no UV da 4'-metoxi-miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (S3). | 49 |
| Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H PRESAT da substância S3 (CD $_3$ OD, 300 MHz). | 50 |
| Figura 23 - Mapa de contorno HMBC da substância S3 (CD $_3$ OD, 300 MHz). | 50 |
| Figura 24 - Estrutura e espectro no UV da quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo (S4). | 51 |
| Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H da substância S4 (CD $_3$ OD, 300 MHz). | 52 |
| Figura 26 - Mapa de contorno HSQC da substância S4 (CD $_3$ OD, 300 MHz). | 53 |
| Figura 27 - Estrutura e espectro no UV do 3-oxo- α -ionol- β -glucopiranosídeo (S5)... | 54 |
| Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 55 |
| Figura 29 - Espectro de RMN TOCSY-1D com irradiação seletiva em 5,77 ppm da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 55 |
| Figura 30 - Mapa de contorno COSY da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 56 |
| Figura 31 - Espectro de RMN TOCSY-1D com irradiação seletiva em 4,31 ppm da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 56 |
| Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância S5 (CD $_3$ OD, 150 MHz). | 57 |
| Figura 33 - Mapa de contorno HSQC da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 57 |
| Figura 34 - Mapa de contorno HMBC da substância S5 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 58 |
| Figura 35 - Correlações de HMBC mais relevantes para identificação da estrutura da substância S5. | 59 |
| Figura 36 - Estrutura das substâncias S6-S9. | 61 |
| Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H PRESAT da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 62 |
| Figura 38 - Mapa de contorno HSQC da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 62 |
| Figura 39 - Mapa de contorno COSY da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 63 |
| Figura 40 - Espectro de RMN TOCSY-1D com irradiação seletiva em 4,41 ppm da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 63 |
| Figura 41 - Espectro de RMN TOCSY-1D com irradiação seletiva em 5,97 ppm da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 64 |
| Figura 42 - Mapa de contorno HMBC da substância S7 (CD $_3$ OD, 600 MHz). | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 43 - Correlações de HMBC mais relevantes para identificação das substâncias S6-S9. | 65 |
| Figura 44 - Espectro de RMN NOESY-1D com irradiação seletiva em 5,96 ppm da substância S6 e S7 (CD ₃ OD, 600 MHz). | 68 |
| Figura 45 - Espectro de RMN NOESY-1D com irradiação seletiva em 6,35 ppm da substância S8 e S9 (CD ₃ OD, 600 MHz). | 68 |
| Figura 46 - Diferença de intensidade dos sinais dos hidrogênios 1' e 2 no espectro de RMN de ¹ H da substância S7 devido a interconversão dos isômeros Z em E. | 69 |
| Figura 47 - Sugestão da rota biossintética dos C ₁₃ -norisoprenoides (S5-S9) | 70 |
| Figura 48 - A: Perfil cromatográfico do extrato GbH obtido por CG-EM; B: Série homóloga de hidrocarbonetos C ₈ -C ₄₀ | 71 |
| Figura 49 - Cromatograma de CG-MS da fração GbH com a indicação das bandas atribuídas às substâncias e separado nos tempos de retenção 25 a 49 minutos (A) e 50 a 59 minutos (B). | 72 |
| Figura 50 - Estrutura dos triterpenos pentacíclicos majoritários do extrato GbH. | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Frações obtidas após cromatografia por permeação em gel, subfrações agrupadas, massa e porcentagem de massa em relação ao extrato butanólico..... | 28 |
| Tabela 2 - Frações, alíquotas agrupadas, massa e método utilizado para fracionamento cromatográfico por coluna C-18 das frações F2 e F3..... | 29 |
| Tabela 3 - Parâmetros das análises em CLAE-DAD..... | 31 |
| Tabela 4 - Bandas coletadas, tempo de retenção, massa e λ máximo de absorção das substâncias isoladas de F6. | 31 |
| Tabela 5 - Otimização do método cromatográfico empregado para o isolamento das substâncias da fração F7. | 32 |
| Tabela 6 - Bandas coletadas, tempo de retenção, massa e λ máximo de absorção das substâncias isoladas de F7. | 33 |
| Tabela 7 - Bandas coletadas, tempo de retenção, massa e λ máximo de absorção das substâncias isoladas das subfrações C2 e C3. | 34 |
| Tabela 8 - Bandas coletadas, tempo de retenção, massa e λ máximo de absorção das substâncias isoladas de D2 e D3. | 35 |
| Tabela 9 - Bandas coletadas, tempo de retenção, massa e λ máximo de absorção das substâncias isoladas de D4, D5 e D6..... | 36 |
| Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância S1 (CD_3OD)..... | 46 |
| Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância S2 ($\text{DMSO}-d_6$)..... | 48 |
| Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância S3 (CD_3OD)..... | 51 |
| Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz) da substância S4 (CD_3OD)..... | 53 |
| Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e RMN de ^{13}C (150 MHz) da substância S5 (CD_3OD)..... | 60 |
| Tabela 15 - Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz) das substâncias S6, S7, S8 e S9 (CD_3OD)..... | 66 |
| Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz) das substâncias S6, S7, S8 e S9 (CD_3OD)..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Tabela 17 - Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato GbH de <i>Garcinia brasiliensis</i> por comparação espectral e dos índices de retenção (IR) por CG-EM..... | 73 |
| Tabela 18 - Atividade citotóxica dos extratos da <i>Garcinia brasiliensis</i> frente às linhagens PC3, HCT-116 e SF-295..... | 75 |
| Tabela 19 - Atividade inibitória dos extratos frente à enzima acetilcolinesterase humana (hu) e de enguia elétrica (ee). | 76 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 O ESTADO DA ARTE..... | 15 |
| 1.2 FAMÍLIA CLUSIACEAE..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS: | 22 |
| 3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC)..... | 22 |
| 3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA FASE REVERSA (CC-FR)..... | 22 |
| 3.3 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (CPG) | 22 |
| 3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) ANALÍTICO E PREPARATIVO | 22 |
| 3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA | 23 |
| 3.6 LIOFILIZADOR | 23 |
| 3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 23 |
| 3.8 EVAPORADOR ROTATÓRIO..... | 23 |
| 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 24 |
| 4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL..... | 24 |
| 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES | 24 |
| 4.3 PERFIL QUÍMICO POR RMN DE 1H | 26 |
| 4.4 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL..... | 27 |
| 4.5 CROMATOGRAFIA EM COLUNA EM FASE REVERSA | 28 |
| 4.6 CLAE-DAD ANALÍTICO E PREPARATIVO..... | 30 |
| 4.7 ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO BUTANÓLICA..... | 31 |
| 4.7.1 FRAÇÃO F6..... | 31 |
| 4.7.2 FRAÇÃO F7..... | 32 |
| 4.7.3 FRAÇÃO F3..... | 34 |
| 4.7.4 FRAÇÃO F2..... | 35 |
| 4.8 CROMATOGRAFIA GASOSA | 38 |
| 4.9 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER HUMANO..... | 39 |
| 4.10 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: | 41 |
| 5.1 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.... | 41 |
| 5.1.1 <i>Identificação da substância S1</i> | 42 |
| 5.1.2 <i>Identificação da substância S2</i> | 46 |
| 5.1.3 <i>Identificação da substância S3</i> | 49 |
| 5.1.4 <i>Identificação da substância S4</i> | 51 |
| 5.1.5 <i>Identificação da substância S5</i> | 54 |
| 5.1.6 <i>Identificação das substâncias S6, S7, S8 e S9</i> | 61 |
| 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE GBH POR CG-EM | 71 |
| 5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA | 75 |
| 6. CONCLUSÕES: | 77 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| ANEXOS | 86 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 O ESTADO DA ARTE

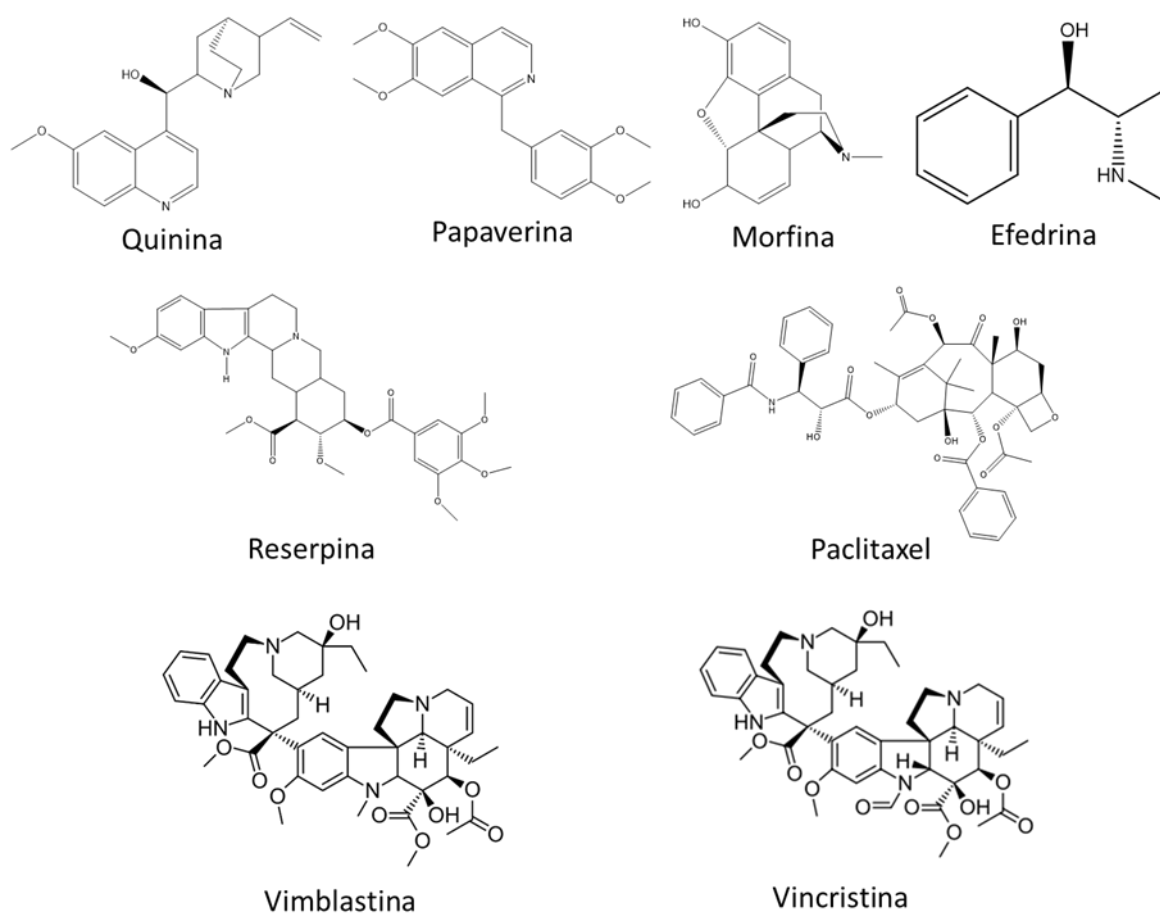
A história dos produtos naturais sempre caminhou lado a lado com a do homem, que buscava alimentos, proteção e a cura de males e doenças. Os primeiros relatos documentados sobre o uso de plantas datam de 4000 a.C. com os Sumérios, que descreviam em tabloides de argila, por exemplo, o uso de mandrágora para aliviar a dor, e alho cru contra disfunções circulatórias¹. As antigas civilizações chinesa, indiana e africanas também dispunham de documentos escritos a respeito da utilização de produtos de origem natural para a cura de diversas doenças². Mesmo com esses conhecimentos etnofarmacológicos documentados por milhares de anos, foi apenas no século XIX que os grandes avanços na área da química dos produtos naturais começaram tendo como evento marcante o isolamento e caracterização da quinina pelos pesquisadores franceses Caventou e Pelletier, extraída da casca do tronco da *Cinchona officinalis*, que é utilizada até hoje como precursor dos medicamentos utilizados no tratamento da malária³. A partir deste marco, muitas outras substâncias derivadas de plantas foram relatadas, assim como suas atividades farmacológicas, por exemplo a papaverina, morfina e codeína (Figura 1), extraídas de *Papaver somniferum* e que apresentam atividade anti-hipertensiva para a primeira e anestésica para as demais, além da efedrina, isolada de *Ephedra sinica* como antiasmático, e da reserpina, isolada de *Rauwolfia serpentina*, um anti-hipertensivo utilizado na medicina tradicional Ayurveda no tratamento de picada de cobra³.

A descoberta dos alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, extraídas de *Catharanthus roseus*, na década de 1960, bem como do paclitaxel (Figura 1), conhecido como Taxol®, extraído de *Taxus brevifolia*, deu forte impulso à busca por novos agentes antitumorais a partir de fontes naturais. Estas substâncias, por apresentarem boa eficiência no tratamento do câncer, também serviram como precursores para a síntese de compostos análogos mantendo o grupamento farmacofórico e trazendo modificações nos grupos auxofóricos a fim de melhorar suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, assim como tentar diminuir os efeitos tóxicos que a substância e seus derivados metabolizados podem causar. Este é o caso do docetaxel e do cabazitaxel, análogos do paclitaxel comercialmente

disponíveis para o tratamento de câncer³. A área da química medicinal vem crescendo muito e apresenta enorme interesse tanto para pesquisadores quanto as indústrias farmacêuticas. Segundo a revista Forbes, em 2015 o mercado de medicamentos oncológicos alcançou a marca de 100 bilhões de dólares de lucro anual, e a estimativa é que até 2018 esse valor aumente em 50%⁴.

A contínua busca por novos candidatos a fármacos deve-se à rápida evolução das doenças, aparecimento de novas patologias, e ao desenvolvimento de resistência aos tratamentos utilizados atualmente, principalmente no ambiente hospitalar^{5,6}. O desenvolvimento de resistência aos medicamentos pelas bactérias e fungos é ainda mais preocupante quando se leva em conta o processo de desenvolvimento de um fármaco a partir de extrato ou molécula isolada de fontes naturais por ser um processo extremamente rigoroso, demorado e caro, no qual devem ser considerados os efeitos adversos, interações medicamentosas, toxicidade, metabolização, dosagem, eficácia, entre outros parâmetros, que implicam em um percentual de sucesso muito baixo, com poucos medicamentos aprovados a cada ano⁷. Baseando-se no histórico dos produtos naturais, eles podem desempenhar um papel fundamental neste desafio, já que apresentam elevada quimiodiversidade, fornecendo modelos estruturais diversificados, muitos dos quais mostram bioatividades importantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Figura 1 - Estrutura de produtos naturais utilizados ainda hoje na medicina.



O estudo dos produtos naturais a partir de plantas é um campo bastante vasto e pouco explorado ainda hoje. Estima-se que 15% das espécies vegetais foram sistematicamente investigadas quimicamente e apenas 6% tiveram estudos farmacológicos³. Isso mostra a potencialidade das pesquisas nesta área, sobretudo levando-se em consideração a rica biodiversidade brasileira de plantas superiores, estimada em 55 mil espécies, que representam aproximadamente 22% do total mundial⁸. Diante desta grande diversidade da flora, a etnofarmacologia tem se mostrado bastante útil na seleção do material vegetal, direcionando o estudo químico e farmacológico às plantas utilizadas na medicina tradicional. Como exemplo podemos destacar o estudo da *Artemisia annua*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa por muitos anos para o tratamento de febre, que levou ao isolamento de uma das substâncias hoje utilizadas no tratamento da malária, a artemisinina. A pesquisadora responsável foi laureada com o prêmio Nobel de medicina em 2015⁹, reafirmando o reconhecimento da importância dos produtos

naturais para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e seu impacto na melhoria das condições de saúde humana.

Além do interesse biológico, algumas classes de produtos naturais podem exercer diferentes papéis na indústria, como por exemplo a classe dos flavonoides, utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia, nutracêutica e para alimentação animal sendo aplicada como antioxidante e corante. Segundo a pesquisa realizada pela empresa Zion Market Research, o mercado de flavonoides em 2015 movimentou ca. de 840 milhões de dólares, com previsões de crescimento para mais de 1 bilhão de dólares até o ano de 2021¹⁰. Essas previsões reforçam ainda mais a busca por novas fontes mais ricas em determinadas classes de substâncias que consigam suprir o crescimento e demanda do mercado.

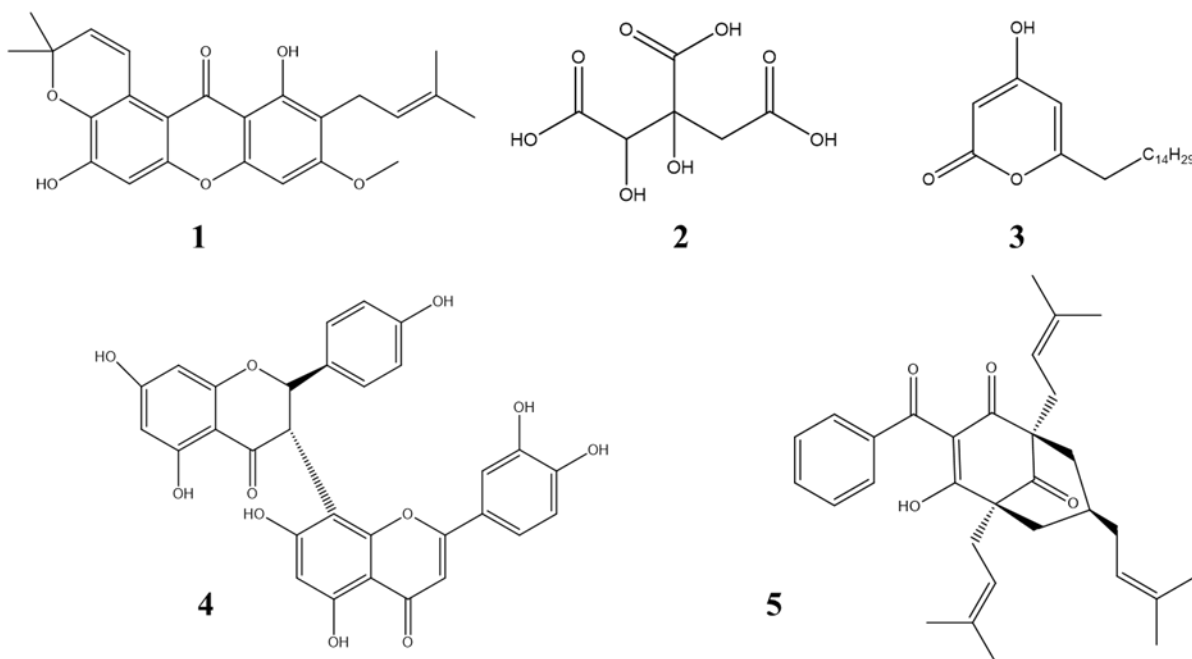
1.2 FAMÍLIA CLUSIACEAE

A família Clusiaceae possui mais de 1000 espécies localizadas majoritariamente na região tropical. Dentre os 40 gêneros pertencentes a esta família, destaca-se a *Garcinia*, com mais de 400 espécies de arbustos e árvores que, no Brasil, se desenvolvem em diversos biomas. Na medicina tradicional, são usadas em uma gama variada de aplicações, como no tratamento de inflamações, dores reumáticas, úlceras, diarreia e também como digestivo. Este gênero tem se mostrado bastante interessante e extensivamente estudado tanto no ponto de vista fitoquímico quanto biológico por conta de sua rica quimiodiversidade¹¹. Este gênero é conhecido pela produção de xantonas^{12,13}, benzofenonas^{14,15}, lactonas¹⁶, ácidos fenólicos¹⁷, flavonoides^{18,19} e biflavonoides²⁰⁻²² (Figura 2), que ocorrem frequentemente substituídos com uma ou mais unidades isoprênicas¹⁵. Diversas atividades biológicas foram descritas na literatura para os metabólitos de *Garcinia*, como antimicrobiana²³⁻²⁵, antiparasitária^{26,27}, anti-inflamatória²⁸⁻³⁰, antilipogênica³¹, citotóxica³²⁻³⁶. O extrato dos frutos de *Garcinia cambogia* pode ser encontrado facilmente sendo comercializado nacional e internacionalmente como fitoterápico para emagrecimento.

Garcinia brasiliensis é uma planta originária da Amazônia conhecida popularmente como bacupari, porocó e bacuri. É uma árvore de médio porte, copa piramidal e floresce entre os meses de agosto e setembro³⁷. Seu fruto é de coloração amarela, com polpa mucilagínosa, branca e comestível³⁸. São encontrados na literatura estudos

sobre os metabólitos presentes nos frutos, destacando-se a presença de biflavonoides e benzofenonas preniladas, assim como diversas atividades biológicas para extratos e substâncias isoladas, tais como leishmanicida^{26,27}, antiproteolítica²⁶, antioxidante^{26,39,40}, anti-inflamatória²⁹, antimicrobiana^{25,41} e fotoprotetora⁴².

Figura 2 - Metabólitos secundários encontrados no gênero *Garcinia*: cowaxantona D (1), ácido hidroxícítrico (2), conrauanalactona (3), fukugetina (4) e 7-epiclusianona (5).



Já para as folhas de *G. brasiliensis*, os estudos acerca dos constituintes metabólicos e bioatividades relacionadas a estes metabólitos são bastante escassos. Santa-Cecília *et al.* relataram as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* do extrato etanólico das folhas de *G. brasiliensis* em ratos²⁹. Em outro trabalho, Arwa *et al.* apresentaram a atividade redox de biflavonoides em processos de estresse oxidativo do corpo humano, destacando o potencial quimiopreventivo destas substâncias⁴³. Em nosso grupo de pesquisa, o estudo fitoquímico das folhas e galhos pelo Dr. Phaniel Saroni Arwa resultou no isolamento e identificação de diversas substâncias como a amentoflavona, podocarpusflavona, fukugetina, procianidina e seus trímeros e também a benzofenona garcinol das frações polares. Já para os extratos de baixa polaridade, foram identificados por CG-MS os esteroides e triterpenos estigmasterol, β -amirinona, β -amirina, taraxerol e lupeol como constituintes majoritários²².

A ausência de trabalhos mais detalhados principalmente a respeito das folhas de *G. brasiliensis* sugere um grande potencial a ser investigado quanto à sua quimiodiversidade e atividades biológicas. Com o intuito de continuar trabalhos já iniciados em nosso grupo de pesquisa e um maior detalhamento químico desta espécie, as folhas de *G. brasiliensis* foram selecionadas para estudo neste trabalho.

6. Conclusões:

O estudo fitoquímico de *Garcinia brasiliensis* resultou no isolamento e identificação de 9 substâncias da fração butanólica: miricetina-3-O- α -ramnosídeo (**S1**), miricetina-3-O- β -glucopiranosídeo (**S2**), 4'-metoxi-miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (**S3**) e quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo (**S4**) e cinco C₁₃-norisopreno glicosilado da classe das megastigmanas, o 3-oxo- α -ionol- β -glucopiranosídeo (**S5**), (Z)-4-[3'- β -(glucopiranosil)butilideno]-3,5,5-trimetil-2-cicloexen-1-ona (**S6** e **S7**) e (E)-4-[3'- β -(glucopiranosil)butilideno]-3,5,5-trimetil-2-cicloexen-1-ona (**S8** e **S9**). Estes norisoprenoides já foram encontrados em diferentes espécies do reino vegetal, mas está sendo descrito pela primeira vez na família Clusiaceae. As análises por técnicas hifenadas indicaram ainda a presença de substâncias não identificadas nas frações investigadas, sugerindo a necessidade de estudos adicionais visando sua identificação bem como o prosseguimento dos ensaios para verificação da inibição enzimática e potencial citotóxico das substâncias isoladas e identificadas.

A utilização de técnicas hifenadas com a finalidade de identificação da composição do extrato hexânico por desreplicação se mostrou uma ferramenta rápida, reprodutível e ambientalmente mais limpa quando comparada a fitoquímica clássica empregada no extrato butanólico deste presente trabalho. Foram identificadas 18 substâncias pertencentes à classe dos álcoois, ácidos graxos, terpenos e esteroides, sendo os triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina, ácido ursólico e ácido oleanólico, os constituintes majoritários deste extrato. Apesar da identificação destas substâncias pela comparação dos espectros de fragmentação de massas serem bastante confiáveis, com índices de similaridade elevados, a utilização dos índices de retenção como confirmação adicional não foi satisfatória pela falta de padronização das metodologias encontradas na literatura.

Os resultados obtidos das atividades citotóxicas dos extratos de *Garcinia brasiliensis* indicaram altas taxas de inibição dos extratos acetato de etila e butanol frente às linhagens celulares de tumor de próstata, cólon e glioblastoma humano, chegando a mais de 90% de inibição. Já para os testes de inibição da enzima

acetilcolinesterase, os extratos mais ativos foram o butanólico e aquoso, apresentando inibição enzimática maior do que a Tacrina, utilizada como controle positivo. Apesar destes dados serem bastante promissores, eles ainda são inconclusivos, já que não foi possível atribuir a atividade observada a um agente farmacológico específico ou se esses resultados são oriundos da ação sinérgica das substâncias presentes nas frações analisadas.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para melhor compreensão da fitoquímica da espécie *Garcinia brasiliensis* assim como justifica o interesse no aprofundamento da investigação química e farmacológica acerca desta planta, que apresentou potencial destacado em relação à quimiodiversidade e bioatividade, e, portanto, contribuição significativa para aumento de valor agregado de produtos oriundos da biodiversidade vegetal brasileira.

Referências

- 1 KONG, J. M. et al. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 1, p. 7-21, 2003.
- 2 PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.
- 3 CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- 4 MERCADO de remédios contra o câncer de US\$100bilhões/ano. **Forbes Brasil**, maio 2015. Disponível em: <www.forbes.com.br/negocios/2015/05/mercado-de-remedios-contra-o-cancer-atinge-marca-de-us-100-bilhoesano/>. Acesso em: 23 set 2016.
- 5 CHAMON, R. C. et al. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 185-189, 2016.
- 6 MARTINS, A. F. et al. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 40, p. 108-112, 2012.
- 7 FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 69-75, 2001.
- 8 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF, 2002.
- 9 TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1217-1220, 2011.
- 10 ZION MARKET RESEARCH. **Global flavonoids market is expected to reach above USD 1047.63 million in 2021**. Sarasota, 2016. Disponível em: <<https://www.zionmarketresearch.com/news/global-flavonoids-market>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

11 BALIGA, M. S. et al. The chemistry and medicinal uses of the underutilized Indian fruit tree *Garcinia indica* Choisy (kokum): a review. **Food Research International**, v. 44, p. 1790-1799, 2011.

12 THONG, N. M. et al. Antioxidant properties of xanthenes extracted from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen): a theoretical study. **Chemical Physics Letters**, v. 625, p. 30-35, 2015.

13 RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Xanthenes from the stem bark of *Garcinia nigrolineata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1149-1156, 2003.

14 SRIYATEP, T. et al. Cowabenzophenones A and B, two new tetracyclo [7.3.3.3^{3,11}.0^{3,7}]tetradecane-2,12,14-trione derivatives, from ripe fruits of *Garcinia cowa*. **Fitoterapia**, v. 92, p. 285-289, 2014.

15 KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, v. 89, p. 86-125, 2013.

16 HUSSAIN, R. A.; WATERMAN, P. G. Lactones, flavonoids and benzophenones from *garcinia conrauana* and *garcinia mannii*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1393-1396, 1982.

17 ZADERNOWSKI, R.; CZAPLICKI, S.; NACZK, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). **Food Chemistry**, v. 112, p. 685-689, 2009.

18 DEACHATHAI, S. et al. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2368-2375, 2005.

19 YU, L. et al. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 104, p. 176-181, 2007.

- 20 AYEOLA, O. R. et al. Kolaviron, a biflavonoid complex of *Garcinia kola* seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1785-1793, 2014.
- 21 MENG, F. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129-134, 2012.
- 22 ARWA, P. S. **Estudo químico e busca de substâncias bioativas de *Garcinia brasiliensis***. 2013. 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- 23 MAHAMODO, S. et al. Antimicrobial prenylated benzoylphloroglucinol derivatives and xanthenes from the leaves of *Garcinia goudotiana*. **Phytochemistry**, v. 102, p. 162-168, 2014.
- 24 AURANWIWAT, C. et al. Antibacterial tetraoxygenated xanthenes from the immature fruits of *Garcinia cowa*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 179-183, 2014.
- 25 NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.
- 26 GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.
- 27 PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.
- 28 CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.
- 29 SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 467-473, 2011.
- 30 SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 280-285, 2011.

- 31 JENA, B. S. et al. Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 10-22, 2002.
- 32 KOSHY, A. S.; ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, v. 72, p. 289-294, 2001.
- 33 YU, L. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from *Garcinia mangostana* fruit pericarp. **Food Chemistry**, v. 116, p. 969-973, 2009.
- 34 CHIN, Y.-W. et al. Xanthonones with quinone reductase-inducing activity from the fruits of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Phytochemistry**, v. 69, p. 754-758, 2008.
- 35 LEE, L.-T. et al. Guttiferone F from the fruit of *Garcinia multiflora* and its anti-hepatocellular carcinoma activity. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 247-252, 2013.
- 36 TANG, Z. Y. et al. Four new cytotoxic xanthonones from *Garcinia nujiangensis*. **Fitoterapia**, v. 102, p. 109-114, 2015.
- 37 SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 3, p. 397-404, 2013.
- 38 CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 4324 p.
- 39 FIGUEIREDO, S. A. et al. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65-73, 2014.
- 40 GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1230-1235, 2012.

- 41 CARVALHO-SILVA, L. B. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, p. 180-186, 2012.
- 42 ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 886-891, 2008.
- 43 ARWA, P. S. et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 410-418, 2015.
- 44 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- 45 MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 46 ELLMAN, G. L. et al. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.
- 47 MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970.
- 48 BILIA, A. R. et al. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v. 71, p. 199-204, 1996.
- 49 SIMPSON, J. H. **Organic structure determination using 2-D NMR spectroscopy: a problem-based approach**. 2nd ed. Massachusetts: Elsevier, 2012.
- 50 LU, Y.; FOO, Y. L. Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. **Food Chemistry**, v. 80, p. 71-76, 2003.

- 51 BRACA, A. et al. Three flavonoids from *Licania heteromorpha*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1121-1124, 1999.
- 52 LAM, S.-H. et al. Investigation of flavonoid glycosides from *Neolitsea sericea* var. *aurata* via the general method and HPLC-SPE-NMR. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 55, p. 449-455, 2008.
- 53 PABST, A. et al. Two diastereomeric 3-oxo- α -ionol β -D-glucosides from raspberry fruit. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1649-1652, 1992.
- 54 BAUMES, R. et al. Biogenesis of C₁₃-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 3-14, 2002.
- 55 ENZELL, C. Biodegradation of carotenoids - an important route to aroma compounds. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 693-700, 1985.
- 56 TAZAKI, H. et al. Structure of sesquiterpene glucosides from potato leaves. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1067-1070, 1993.
- 57 KHAN, S. H. et al. Three megastigmane glycosides from the leaves of *Pterospermum semisagittatum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 7, p. 512-515, 2003
- 58 BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. 1 Pentacyclic triterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 3688-3699, 1963.
- 59 YU, F. et al. Functional characterization of amyrin synthase involved in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis. **Phytochemistry**, v. 91, p. 122-127, 2013.

60 JO, H.-J. et al. β -amyrin synthase (EsBAS) and β -amyrin 28-oxidase (CYP716A244) in oleanane-type triterpene saponin biosynthesis in *Eleutherococcus senticosus*. **Phytochemistry**, v. 135, p. 53-63, 2017.

61 LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

62 CARGNIN, S. T.; GNOATTO, S. B. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: a valuable triterpenoid with functional properties. **Food Chemistry**, v. 220, p. 477-489, 2017.